

荧光分子探针 β -1,4-半乳糖基转移酶 I 底物的合成

赵卫^a, 李小红^b, 赵琦^b, 徐孝浪^b, 周闯^b, 郭晓强^b

(成都大学 a. 四川抗菌素工业研究所; b. 药学与生物工程学院, 成都 610106)

摘要:以 7-羟基香豆素为原料,经甲酰化后制得 8-甲酰基-4-甲基伞形酮(2);2 与 D-葡萄糖和 N-乙酰氨基葡萄糖进行取代、氟代及醇解反应后,分别合成了荧光分子探针 β -1,4-GalT I 的两个特异性底物,即 8-二氟甲基-7-羟基香豆素- β -D-葡萄糖苷(7)和 8-二氟甲基-7-羟基香豆素- β -乙酰氨基葡萄糖苷(8);其结构经 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 和 ESI-MS 确证。

关键词: β -1,4-GalT I; 分子探针; 7-羟基香豆素; 化学合成

中图分类号:O621.3

文献标志码:A

随着糖生物学的迅速发展,糖链和糖复合物的生物学功能逐渐被人们所认识,糖基转移酶对糖和糖复合物生物合成的调节作用成为当今糖化学和糖生物学研究的热点^[1-3]. 糖基转移酶是糖蛋白、糖脂中糖链生物合成的关键酶之一,其活性的非正常表达与肿瘤、免疫系统等疾病的发生与发展有着密切的关系^[4,5]. 细胞表面的 β -1,4-半乳糖基转移酶 I (β -1,4-GalT I) 具有与受精、神经元细胞迁移、癌细胞转移、上皮细胞增殖及细胞信号传导等过程相关的重要生物学功能, β -1,4-GalT I 与细胞间质中的 N-乙酰葡萄糖胺的结合是细胞与间质粘连的主要原因,它参与细胞间、细胞-基质间相互作用的特性决定了它在肿瘤转移中具有重要的作用^[6]. 研究表明,当细胞与层粘连蛋白发生黏附时,细胞表面的 β -1,4-GalT I 水平升高 3 倍,其主要功能是在高尔基体上负责将半乳糖苷基团从 UDP-Gal 转移到 N-多糖复合物的末端 N-乙酰氨基葡萄糖或葡萄糖上,形成 β -1,4-糖苷键^[7]. 目前国内外对糖基转移酶抑制剂进行了大量研究,如亚氨基糖衍生物,碳糖苷衍生物,氧糖苷衍生物,非糖基供体过渡态类似物以及以连有荧光基团的供体探针^[8,9]. 为更好地研究酶在糖基化反应中的作用机制,需采用一些特殊的方法对其进行研究. 酶活检测是对酶功能的检测,可使酶催化化学转化的功能“可视化”,是发现新酶和对酶进行表征不可或缺的工具^[10]. 已报道的检测酶活的方法包括同位素标记法、电化学法、分光光度法、荧光法等^[11],其中分光光度法和荧光法是最大的一类检测方法,但是目前所制备的探针复合物荧光稳定性和荧光量子产率在后处理过程中受到挑战,且大多数荧光分子探针的水溶性较差,在水环境中难以应用. 因此迫切需要寻找具有安全、稳定、灵敏、快速、水溶性好等特性的肿瘤标志物检测试剂。

香豆素类化合物的母核苯并吡喃本无荧光,但取代后的衍生物,特别是 7 位上引入给电子基团后,形成推拉电子体系,便得到强荧光物质^[12]. 近年来,以香豆素为母体的荧光探针主要有阳离子型荧光探针、中性有机分子和阴离子型荧光探针等^[13]. Mizukami 等^[14]设计合成了一种能在中性水溶液中用于分析检测的新型阴离子型荧光探针,但化合物中的 Cd 毒性较大,会对环境造成严重的污染。

本研究以细胞中高效表达的 β -1,4 半乳糖基转移酶 I 为靶点,设计合成 β -1,4 半乳糖基转移酶 I 的专一性底物. 选用安全性良好的 7-羟基香豆素作为荧光活性基团,以化学合成手段在母核的 C-8 位引入二氟甲基^[15-17],并连接 β -1,4-GalT I 的底物糖,用修饰后的酶底物作为荧光探针,通过检测催化作用前后

收稿日期:2017-03-07;修回日期:2017-06-24.

基金项目:四川省教育厅重点科研项目(13ZΛ0299)

作者简介:赵卫(1991-),男,四川平昌人,成都大学在读硕士研究生,主要从事药物化学研究,E-mail:scddxzww@163.com.

通信作者:郭晓强,成都大学教授,E-mail:gqq2002@cdu.edu.cn.

底物的荧光信号变化来监测酶活性的变化。

具体地,以4-甲基伞形酮(1)为原料,制备中间体8-甲酰基-4-甲基伞形酮(2);再分别与2,3,4,6-四乙酰氧基- α -D-溴代葡萄糖(3)和2-乙酰胺-3,4,6-三乙酰氧基- α -D-氯代氨基葡萄糖(4)通过取代反应得到中间体8-甲酰基-7-羟基香豆素-2,3,4,6-四乙酰氧基- α -D-溴代葡萄糖(5)和8-二氟甲基-7-羟基香豆素-2-乙酰胺-3,4,6-三乙酰氧基- α -D-氯代氨基葡萄糖(6);最后经氟代及水解反应得到目标化合物8-二氟甲基-7-羟基香豆素- α -D-溴代葡萄糖苷(7)和8-二氟甲基-7-羟基香豆素- β -D-乙酰氨基葡萄糖苷(8)。目标化合物7和8的合成路线见图1。

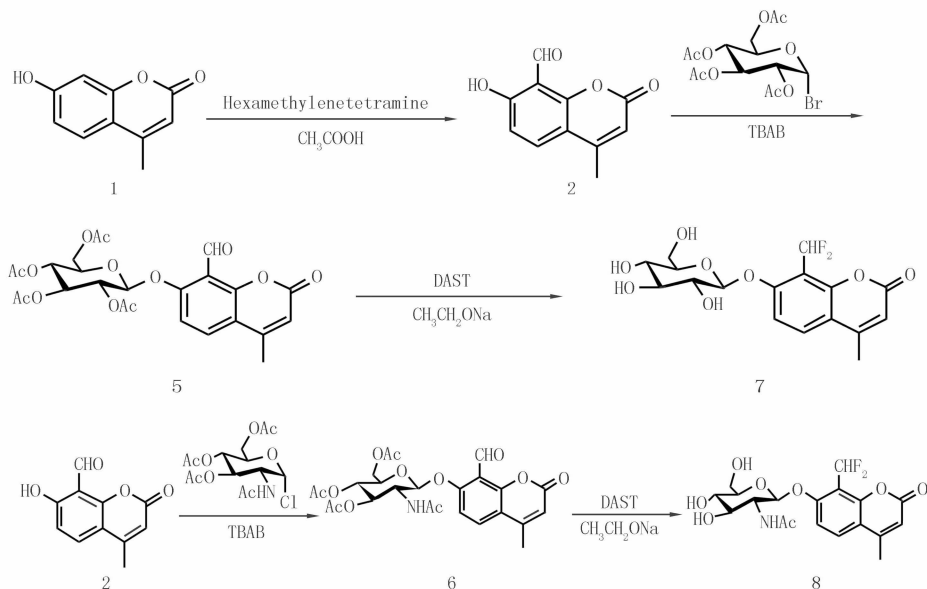


图1 目标化合物7和8的合成路线

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

M271466型核磁共振仪;Agilent 6210 LC/MS TOF;4-甲基伞形酮1,分析纯;D-葡萄糖,分析纯;N-乙酰氨基葡萄糖,分析纯;六次甲基四胺,分析纯;二乙氨基三氟化硫(DAST),成都贝斯特试剂有限公司;四丁基溴化铵(TBAB),分析纯。

1.2 合成

1.2.1 中间体2的制备

向反应瓶中加入5 g 1,10 g 六次甲基四胺,50 mL 乙酸,95 ℃反应5.5 h;向反应液中加入75 mL 稀HCl(浓HCl:水=84:100),继续反应30 min.反应液冷却至室温,向反应液中加入300 mL 水,无水乙醚萃取,减压蒸馏,无水乙醇重结晶得黄色固体20.97 g,收率22%。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ :12.21(s, 1H),10.62(s, 1H),7.74(d, J =9.0 Hz, 1H),6.91(d, J =9.0 Hz, 1H),6.21(s, 1H),2.43(s, 3H)。

1.2.2 中间体3的制备

向三口瓶中加入干燥乙酸酐50 mL,滴加0.3 mL 高氯酸,冰浴搅拌下缓慢加入D-葡萄糖13.7 g,控制温度在20 ℃以下.搅拌完全溶解后将体系降温至5 ℃,加入红磷3.8 g,缓慢滴加8 mL 液溴,温度不超过15 ℃,滴加完毕后控制温度在5 ℃左右反应3 h.向体系中加入30 mL 三氯甲烷,倒入冰水中搅拌,分出有机相,水相萃取三次,合并并干燥有机相,减压旋干处理得白色固体10.85 g,产率38%。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ :6.17(d, J =3.6 Hz, 1H),5.56(d, J =8.9 Hz, 1H),5.31~5.16(m, 2H),4.48(td, J =10.7, 3.5 Hz, 1H),4.24(dd, J =12.5, 4.0 Hz, 1H),4.06(dd, J =12.5, 2.2 Hz, 1H),2.19(s, 3H),2.04(d, J =4.1 Hz, 6H),1.94(s, 3H)。

1.2.3 中间体 4 的制备

向反应瓶中加入 5 g *N*-乙酰氨基 D-葡萄糖, 25 mL 乙酰氯, 密闭搅拌反应 48 h, 溶液逐渐澄清, 向反应体系中加入 50 mL 三氯甲烷, 搅拌下倒入冰水中分液, 有机相用饱和 NaHCO_3 洗涤至中性, 减压浓缩处理得固体 3.17 g, 产率 38%。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.19(d, $J=3.2$ Hz, 1H), 5.81(d, $J=6.5$ Hz, 1H), 5.33(t, $J=10.0$ Hz, 1H), 5.22(t, $J=9.8$ Hz, 1H), 4.54(t, $J=11.3$ Hz, 1H), 4.29(d, $J=8.5$ Hz, 2H), 4.14(d, $J=11.3$ Hz, 1H), 2.11(s, 3H), 2.06(s, 6H), 1.99(s, 3H)。

1.2.4 中间体 5 的制备

向单口瓶中加入 1 g 中间体 2, 4.1 g 中间体 3, 3.4 g 四丁基溴化铵, 20 mL 二氯甲烷作溶剂, 搅拌下用 1 M NaOH 调 pH 至 11 左右, 维持 pH 在 10 左右反应, TLC 监控反应至无原料。用 EA 萃取反应液三次 (3×20 mL), 有机相用 1 M NaOH 洗涤 (2×20 mL), 水洗有机相, 干燥后减压旋干处理得淡黄色固体 0.56 g, 产率 21%。M. p. 141~144 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 10.53(s, 1H), 7.75(d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.14(d, $J=8.9$ Hz, 1H), 6.26(s, 1H), 5.45~5.29(m, 2H), 5.22(dd, $J=18.3, 8.3$ Hz, 2H), 4.27(ddd, $J=13.9, 12.3, 3.3$ Hz, 2H), 4.04~3.86(m, 1H), 2.44(s, 3H), 2.12~2.05(m, 12H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 186.35, 170.49, 170.22, 169.34, 169.32, 159.31, 159.13, 154.68, 151.59, 130.28, 116.00, 114.54, 113.95, 112.40, 99.26, 72.40, 72.23, 70.47, 68.00, 61.71, 30.95, 20.73, 20.65, 20.61, 18.95; ESI-MS m/z : 552{[M+NH₄]⁺}。

1.2.5 中间体 6 的制备

向反应瓶中加入 2.35 g 2, 3.8 g 4, 3.34 g 四丁基溴化铵, 加入 20 mL CH_2Cl_2 做溶剂用 1 M NaOH 调 pH 至 11, 搅拌反应至 TLC 监控无原料。用 EA 萃取 (3×30 mL), 水洗有机相, 饱和食盐水洗有机相; 干燥后旋干至粗固体, 加入少量 EA, 析出大量白色固体, 抽滤, 真空干燥, 得 0.86 g 白色固体, 产率 30%。M. p. 188 °C~192 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 10.54(s, 1H), 7.69(d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.16(d, $J=8.8$ Hz, 1H), 6.23(s, 1H), 5.59(dd, $J=14.4, 8.9$ Hz, 2H), 5.17(t, $J=9.5$ Hz, 1H), 4.29(dd, $J=12.3, 4.4$ Hz, 1H), 4.20(d, $J=11.8$ Hz, 1H), 4.07(d, $J=9.1$ Hz, 1H), 3.93(d, $J=7.8$ Hz, 1H), 2.41(s, 3H), 2.10(s, 3H), 2.08(s, 3H), 2.05(s, 3H), 1.98(s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 187.22, 171.34, 170.57, 170.54, 169.46, 160.27, 159.34, 154.02, 151.94, 130.53, 115.63, 114.19, 113.58, 99.10, 72.21, 71.84, 68.44, 61.88, 54.63, 30.96, 23.29, 20.77, 20.73, 20.65, 18.92; ESI-MS m/z : 572{[M+K]⁺}。

1.2.6 目标化合物 7 的制备

向单口瓶中加入 4.0 g 5, 40 mL 二氯甲烷溶解, 加入 4 mL 二乙胺基三氟化硫, 氮气保护反应 2.5 h, TLC 监控无原料残留。向反应瓶中加入适量冰水停止反应, 用 EA (3×30 mL) 萃取, 水 (3×30 mL) 洗有机相, 饱和食盐水 (2×30 mL) 洗有机相, 干燥, 减压旋干, 得棕黄色黏稠油状物。用石油醚少量多次洗涤油状物析出黄色粉末, 得 3.33 g 淡黄色固体, 产率 80%。

取上步所得产品 1 g, 用 20 mL 甲醇溶解, 加入甲醇钠溶液 1 mL, 搅拌反应 1 h, 加入阳离子交换树脂 16 g, 搅拌反应 40 min, TLC 监控无原料, 抽滤, 滤液旋干得黄色油状物, 用少量甲醇溶解, 滴入大量异丙醇中, 析出淡黄色固体, 抽滤, 得淡黄色固体 0.36 g, 产率为 51%。M. p. 186 °C~189 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.91(d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.39~7.24(m, 1H), 6.35(s, 1H), 5.24(d, $J=24.7$ Hz, 2H), 5.06(d, $J=7.0$ Hz, 1H), 4.68(s, 1H), 3.71(d, $J=11.3$ Hz, 1H), 3.17(s, 3H), 2.43(s, 3H); ESI-MS m/z : 389{[M+H]⁺}。

1.2.7 目标化合物 8 的制备

向单口瓶中加入 1.74 g 6, 20 mL 二氯甲烷溶解, 加入 2.18 mL 二乙胺基三氟化硫, 氮气保护反应 2.5 h, TLC 监控无原料残留。向反应瓶中加入适量冰水停止反应, 用 EA (3×30 mL) 萃取, 水 (3×30 mL) 洗有机相, 饱和食盐水 (2×30 mL) 洗有机相, 干燥, 减压旋干, 得棕黄色黏稠油状物。用乙酸乙酯重结晶, 得 0.51 g 淡黄色固体, 产率 28%。

取上步所得产品 1 g, 用 20 mL 甲醇溶解, 加入甲醇钠溶液 1 mL, 搅拌反应 1 h, 加入阳离子交换树脂 16 g, 搅拌反应 40 min, TLC 监控无原料, 抽滤, 滤液旋干得黄色油状物, 用甲醇-乙醚溶液重结晶, 得淡黄

色固体 0.16 g, 产率为 21%。M. p. 157~162 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.89(d, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.72(d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.15(d, $J=9.0$ Hz, 1H), 6.25(s, 1H), 5.71(s, 1H), 5.20(d, $J=23.6$ Hz, 2H), 5.02(d, $J=8.4$ Hz, 1H), 4.69(t, $J=5.3$ Hz, 1H), 3.85(m, 1H), 3.75(m, 1H), 2.39(s, 3H), 1.84(s, 3H); ESI-MS m/z : 430{[M+H] $^+$ }.

2 结果与讨论

2.1 中间体 2 的反应条件优化

中间体 2 的合成中, 重点探讨了温度与产率的关系, 结果如表 1.

表 1 中间体 2 反应温度与产率的关系

编号	1	2	3	4	5
$T/^\circ\text{C}$	75	85	95	105	110
产率/%	20	21	22	18	14

从表 1 中可以看出, 此步的反应产率较低, 在 95 °C 时产率相对最高, 为 22%, 且仍有大量原料未反应, 若延长反应时间, 会使杂质增加; 后处理用乙醚作萃取剂, 萃取率较低, 换用乙酸乙酯、二氯甲烷或三氯甲烷萃取时发现, 杂质较多且萃取率更低, 故暂仍采用乙醚作萃取剂.

2.2 卤代糖中间体反应条件的控制

在制备全乙酰化溴代葡萄糖时, 需控制加糖时温度不高于 20 °C, 温度太高会使糖碳化, 影响产率; 在滴加溴素及水时, 温度不能超过 15 °C, 需要严格控制滴加温度, 此步为影响反应产率的主要步骤.

2.3 目标化合物条件控制

DAST 极不稳定, 遇水会发生分解, 必须严格确保体系无水, 实验中可采用氮气保护、试剂无水处理. 用强酸性阳离子交换树脂进行脱乙酰基保护时, 需要先活化树脂.

3 结 论

本研究以肿瘤细胞株中高效表达的 β -1,4 半乳糖基转移酶 I 为靶点, 基于生物活性的探针分子技术 (Activity-Based Probes, ABPs) 策略, 通过引入水溶性糖基转移酶底物, 设计合成了 8-二氟甲基-7-羟基香豆素- β -乙酰氨基葡萄糖苷及 8-二氟甲基-7-羟基香豆素- β -吡喃葡萄糖苷. 所合成荧光探针底物的水溶性得到了增强, 能够在水环境中快速与 β -1,4-半乳糖基转移酶 I 特异性结合; 同时原料廉价易得、合成方法简单经济, 使得本研究具有一定的工业应用前景.

参 考 文 献

- [1] 刘婧, 陈启和, 章海峰, 等. 糖苷酶与糖基转移酶工程的研究进展[J]. 食品工业科技, 2010, 31(8): 386-390.
- [2] 郭淑, 罗红梅, 宋经元, 等. 糖基转移酶在植物次生代谢途径中的研究进展[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2012, 14(6): 2126-2130.
- [3] 王军, 于森. 葡萄糖次生代谢 UDP-糖基转移酶研究进展[J]. 园艺学报, 2010, 37(1): 141-150.
- [4] 成翔, 汪晓莺, 季玉红, 等. β -1,4-半乳糖基转移酶-1 在树突状细胞中的表达及作用[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(10): 867-871.
- [5] 代智, 刘银坤. 糖基转移酶与肝癌发生[J]. 国外医学(肿瘤学分册), 2005, 32(2): 144-146.
- [6] 周嘉梁, 吴士良. 肿瘤细胞 O-GalNAc 聚糖的生物合成途径[J]. 生命的化学, 2004, 24(4): 350-353.
- [7] Lo N W, Shaper J II, Pevsner J, et al. The expanding β 4-galactosyltransferase gene family: messages from the databanks[J]. Glycobiology, 1998, 8(5): 517-526.
- [8] 陈华, 王东跃, 李小六. 糖基转移酶抑制剂研究进展[J]. 有机化学, 2009, 29(5): 704-716.
- [9] Cipolla L, La Ferla B, Gregori M. Combinatorial approaches to iminosugars as glycosidase and glycosyltransferase inhibitors[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2006, 9(8): 571.
- [10] Reymond J L, Wahler D. Substrate arrays as enzyme fingerprinting tools[J]. ChemBiochem, 2002, 3(8): 701-708.
- [11] 邢艳珑, 毛朝朝, 王舒, 等. 应用荧光分析法检测酶的研究进展[J]. 生物工程学报, 2009, 25(12): 1765-1769.

- [9] 赵秋霞,王成彬,赵德明. 超声波降解水中对氟硝基苯的研究[J]. 广州化工,2011,39(7):64-67.
- [10] Sun J II,Li X Y,Feng J L,et al. Oxone/Co²⁺ oxidation as an advanced oxidation process: Comparison with traditional Fenton oxidation for treatment of Landfill Leachate[J]. Water Research,2009,43(17):4363-4369.

Treatment of Landfill Leachate by US/Oxone/Co²⁺ Oxidation Technology

Li Xiaoyan^{1,2}, Su Xianfa¹, Pi Yunqing¹, Sun Jianhui¹

(1. School of Environment;Key Laboratory of Yellow River and Huai River Water Environment and Pollution Control, Ministry of Education;Henan Key Laboratory for Environmental Pollution Control, Henan Normal University, Xinxiang, 453007, China;2. Jiaozuo Environmental Monitor Station, Jiaozuo 454003, China)

Abstract: The treatment of landfill leachate (COD=1116 mg/L, SS=17mg/L and chrominance=300) by low-intensity ultrasonic assisted US/Oxone/Co²⁺ was carried out, the effects of operating conditions such as pH value, reaction temperature, [Oxone]/[Co²⁺], Oxone's reagent dosage, ultrasonic sound intensity, reaction time and dosing mode on COD removal were investigated. The results indicated that under the optimal operational conditions such as: ultrasonic power=50 W, ultrasonic frequency=40 kHz, ultrasonic intensity=60%, [Oxone]=3 mmol/L, [Oxone]/[Co²⁺]=5×10⁵, pH=9.0, original reaction temperature=25 °C, reaction time=35 min, number of stepwise addition=6, the removal of COD, TOC, SS and chrominance achieved 63.74%, 59.46%, 69.35% and 83.33%, respectively.

Keywords: Advanced Oxidation Technologies (AOTs); US/Oxone/Co²⁺; landfill leachate

[责任编辑 陈留院]

(上接第22页)

- [12] 程铸生,马海麟. 吡喃类激光染料的合成及光谱研究[J]. 华东化工学院学报,1990,16(2):176-181.
- [13] 陈康裕. 新型香豆素类荧光化合物和荧光探针的合成及性质研究[D]. 西安:西北大学,2010.
- [14] Mizukami S,Nagano T,Urano Y,et al. A fluorescent anion sensor that works in neutral aqueous solution for bioanalytical application[J]. J Am Chem Soc,2002,124(15):3920-3925.
- [15] Kwan D II,Chen II M,Ratananikom K,et al. Self-immobilizing fluorogenic imaging agents of enzyme activity[J]. Angew Chem Int Ed Engl,2011,50(1):300-303.
- [16] Li J Y,Zhou X Q,Zhou Y,et al. A highly specific tetrazole-based chemosensor for fluoride ion: A new sensing functional group based on intramolecular proton transfer[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc,2013,102(2):66-72.
- [17] Sokkalingam P,Lee C II. Highly sensitive fluorescence "Turn-On" indicator for fluoride anion with remarkable selectivity in organic and aqueous media[J]. J Org Chem,2011,76(10):3820-3828.

Synthesis of Novel Substrates for Fluorescent Molecular Probe of β -1,4-galactosyltransferase I

Zhao Wei^a, Li Xiaohong^b, Zhao Qi^b, Xu Xiaolang^b, Zhou Chuang^b, Guo Xiaoqiang^b

(a. Sichuan Industrial Institute of Antibiotics;b. College of Pharmacy and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

Abstract: 8-formyl-4-methylumbelliferone (2) was prepared by formylation from 7-hydroxycoumarin. Two novel substrates for fluorescent molecular probe of β -1,4-galactosyltransferase I, 8-difluoromethyl-7-hydroxycoumarin- β -D-glucoside (7) and 8-difluoromethyl-7-hydroxycoumarin- β -acetylglucoside (8), were synthesized by substitution, fluorination and alcoholysis of 2 with D-glucose and N-acetylglucosamine respectively. The structures were characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR and ESI-MS.

Keywords: β -1,4-GalT I; molecular probe; 7-hydroxy-coumarin; chemical synthesis

[责任编辑 王凤产]