

琼脂糖凝胶微球在多酚类天然产物靶点钓取与分离中的应用

许肇初 陈亮*

北京科技职业大学

DOI:10.32629/as.v9i6.4104

[摘要] 多酚类天然产物具有多种生物活性,但因天然产物组分复杂、作用靶点不明确,制约了功能化开发与临床转化。琼脂糖凝胶微球凭借优良的生物相容性、低非特异性吸附及丰富的可修饰羟基,已成为多酚类天然产物靶点鉴定与分离纯化的核心载体。本文系统综述了琼脂糖凝胶微球在多酚类天然产物研究中的应用进展,重点论述基于环氧活化与CNBr(溴化氰)活化的亲和钓靶应用,涵盖姜黄素、杨梅素、山奈酚、甘草查尔酮、木犀草素、棉皮素等典型多酚化合物的直接作用靶点验证案例;同时介绍了免疫亲和层析在大豆苷元、柚皮苷、黄芩苷分离纯化中的应用,以及离子交换色谱在多酚代谢酶分离中的辅助作用。本文旨在为多酚类天然产物的分子机制解析与功能化研究提供方法学参考。

[关键词] 琼脂糖凝胶微球; 多酚类天然产物; 亲和钓靶; 免疫亲和层析; 靶点蛋白

中图分类号: Q946.1 文献标识码: A

Applications of Agarose Gel Microspheres in Target Fishing and Separation of Polyphenolic Natural Product

Zhaochu Xu Liang Chen*

Beijing Polytechnic University

[Abstract] Polyphenolic natural products exhibit diverse biological activities; however, the complex composition of natural products and the ambiguous nature of their action targets constrain their functional development and clinical translation. Owing to their excellent biocompatibility, low nonspecific adsorption, and abundant modifiable hydroxyl groups, agarose gel microspheres have become a core carrier for target identification and separation-purification of polyphenolic natural products. This review systematically summarizes the application progress of agarose gel microspheres in polyphenolic natural product research, with a focus on affinity-based target fishing strategies employing epoxy activation and CNBr (cyanogen bromide) activation. Representative cases of direct target validation for typical polyphenolic compounds are covered, including curcumin, myricetin, kaempferol, echinatin, luteolin, and gossypin. Furthermore, the application of immunoaffinity chromatography in the separation and purification of daidzein, naringin, and baicalin is introduced, along with the auxiliary role of ion-exchange chromatography in the separation of polyphenol-metabolizing enzymes. This review aims to provide methodological references for elucidating the molecular mechanisms and functional research of polyphenolic natural products.

[Key words] agarose gel microspheres; polyphenolic natural products; affinity-based target fishing; immunoaffinity chromatography; target proteins

1 引言

多酚类天然产物在生物体代谢流中承担重要作用,是具有重要生物活性且种类多样的植物次生代谢产物,主要为黄酮类与非黄酮类^[1]。这类化合物多具有安全无毒特性,同时存在生物抗氧化保护活性^[2]。在食品科学领域开展了大量多酚类天然产物应用研究,这源于其可能带来的健康益处进一步强化了这一趋势。然而多酚类天然产物通常稳定性较差、成本更高、使用

起来不如人工色素便捷,因此关于提高天然色素稳定性、相关生物活性机理及生物合成途径研究成为热点方向。

琼脂糖凝胶微球因其原料来源广泛且具有优异的生物相容性及低非特异性吸附特性,让这类材料更易于进行多种化学修饰,这类材料的功能潜力被认为在天然色素的分子靶点组学分析、包埋等相关应用中具有优势^[3]。通过改变交联度或不同配体修饰可以适应不同色素的共价结合,实现在生物活性机理及

生物合成途径解析,是实施“亲和蛋白质组学”或“分子钓靶”策略的核心工具^[4]。琼脂糖凝胶微球具有大量三维网络空腔,可以作为“微胶囊”将天然色素包埋其中隔绝光、氧化、热量及环境pH值变化^[5]。

本文旨在总结琼脂糖凝胶微球在多酚类天然产物研究中的应用进展,重点阐述基于不同活化策略的亲和钓靶与分离纯化方法,为解决多酚类天然产物生物活性分子机制不明这一瓶颈问题提供解决思路。

2 琼脂糖凝胶微球概述

琼脂糖是来源于红藻细胞壁中的琼脂,本质上是一种非均相碳水化合物,其分子是典型的线性多糖,由等摩尔比的D-半乳糖以 β -1,4糖苷键与3,6-脱水-D-半乳糖结合成二糖,二糖间再通过 α -1,3糖苷键形成多糖主链,具有电中性,琼脂糖链中的D-半乳糖与3,6-脱水-D-半乳糖之间形成桥联双环结构,即稠合五元环(3,6-脱水)和六元吡喃糖是形成螺旋结构的关键结构,由此形成的琼脂糖双螺旋结构进一步聚集成三维结构框架,最终形成琼脂糖凝胶颗粒^[6]。

琼脂糖凝胶微球之所以能方便地引入功能基团或偶联特异性配体,是因为分子链上富含大量羟基(-OH)。这些羟基是活性的官能团,可以参与多种化学反应并键合上各种功能基团或配体,从而衍生出离子交换、疏水、亲和等不同类型作用功能^[7]。而琼脂糖本身呈电中性,这避免了因带有电荷(如琼脂中的硫酸基)而产生的非特异性吸附,为后续修饰提供了一个“洁净”的基底,确保了引入的配体能够发挥特异性的相互作用,而不会被介质的本底电荷干扰^[8]。

在多酚类天然产物研究中,琼脂糖凝胶微球主要经功能基团活化后偶联多酚化合物或特异性识别蛋白,构建亲和介质开展靶点垂钓或分离纯化。常用的活化策略包括环氧活化与溴化氰(CNBr)活化两类,二者在偶联化学、适用配基及操作复杂度上各有特点,为不同结构特征的多酚类天然产物提供了灵活的研究工具。

3 多酚类天然产物的靶点垂钓与分离纯化

3.1 基于环氧活化的靶点垂钓。环氧活化琼脂糖凝胶微球具有基团广谱性结合能力,能偶联从蛋白质、核酸到天然产物小分子等各类配基,构建出多样化的定制亲和介质^[9]。

在多酚类天然产物作用机制研究中。Firouzi等^[10],在Sephacryl微球上将姜黄素通过连接臂共价固定,将小鼠脑组织裂解液进行过柱开展Pull-down实验,后利用MALDI/TOF/TOF质谱鉴定出11种结合蛋白,涵盖结构蛋白、代谢酶及凋亡通路蛋白,为姜黄素的神经药理作用提供了直接的靶点证据。在网络药理学层面则为靶点验证提供了系统生物学层面的补充策略。

Zhirong W等^[11],将白藜芦醇固定在环氧活化琼脂糖上,然后从细胞提取液中分步洗脱,依次用高盐、ATP,最后用白藜芦醇本身把结合蛋白洗脱下来,得到蛋白NQO2,这种蛋白在不同阶段的前列腺癌细胞中表达水平不同,有助于比较细胞恶性状态。

张琦等^[12],利用环氧氯丙烷活化琼脂糖凝胶,系统优化了活化条件后,将槲皮素偶联上去,偶联率19.53%,偶联量17.08

$\mu\text{mol/mL}$ 。用这个自制的亲和介质从小鼠脑总蛋白中“钓”到了三条特异性条带,质谱鉴定为热休克蛋白、脑酸溶性蛋白和谷氨酰胺合成酶等。这些蛋白跟神经突起生长、突触可塑性关系密切,正好能解释槲皮素的神经保护作用。

刘静等^[13],利用环氧活化琼脂糖凝胶6B为载体,通过人参皂苷Rg1的羟基与环氧基的开环反应偶联上去。用红外光谱验证了环醚特征峰(1295 cm^{-1})在偶联后消失,证实反应成功,从PC12细胞蛋白裂解液分离得到一种结合蛋白。

YM等^[14],将山奈酚-3-O-(6"-乙酰基)- β -D-吡喃葡萄糖苷溶于1,4-二氧六环与环氧活化Sephacryl 6B混合孵育,用乙醇胺封闭剩余活性基团,通过交替pH洗涤去除未偶联的配体,实现DNA聚合酶 $\text{pol } \alpha$ 的选择性吸附与洗脱,酶回收率达到85%。表明当环氧活化琼脂糖凝胶微球具有合适长度的连接臂和稳定的共价结合特性时,小分子与特异性蛋白会形成较强的结合作用以实现吸附效果,同时又避免了结合过紧而无法洗脱的问题。

3.2 基于CNBr活化的亲和钓靶。CNBr活化琼脂糖微球通过氰酸酯基团易于与含氨基化合物进行反应,形成异脲基团实现与官能团共价结合^[15]。天然配体可通过简单条件控制与CNBr活化的Sephacryl 4B共价结合,然后与复杂蛋白样品共孵育来垂钓出可与天然配体结合的目标蛋白。

杨梅素是典型的具有多重药理活性的黄酮醇。通过杨梅素偶联的Sephacryl 4B微球,从细胞裂解液中“钓取”了多个与其直接结合的蛋白激酶。Hou DX等^[16],直接将杨梅素偶联至CNBr-Sephacryl 4B微球,在Pull-down实验中,将杨梅素-微球与JB6 P+小鼠表皮细胞裂解液或纯化的重组激酶蛋白共同孵育。孵育过夜后,经多次洗涤去除非特异性结合蛋白,最后通过SDS-PAGE和免疫印迹(Western blot)分析被“垂钓”的蛋白。实验发现,杨梅素-微球能够特异性富集多种蛋白激酶,证实了杨梅素是一种“多靶点”药物,能够通过直接结合并抑制这些激酶的活性,进而调控PI3K/Akt和JNK等一系列致癌信号通路。

山奈酚偶联的微球同样用于探索其抗类风湿关节炎的分子机制。Lee CJ等^[17],将山奈酚与CNBr活化的Sephacryl 4B微球偶联,随后与MH7A细胞(类风湿关节炎滑膜细胞)裂解液进行孵育,进行Pull-down实验。实验后通过Western blot检测被洗脱下的蛋白。结果显示,山奈酚-微球能够成功地从细胞裂解液中捕获并富集FGFR3蛋白,证明了山奈酚可直接结合成纤维细胞生长因子受体3(FGFR3),并抑制其激酶活性,从而阻断bFGF-FGFR3-RSK2信号轴,实现对滑膜细胞增殖和迁移的抑制。

Xu G等^[18],将纯化后的甘草查尔酮(Echinatin)偶联至微球,将Echinatin-微球与脂多糖(LPS)预刺激的骨髓源性巨噬细胞(BMDMs)裂解液共孵育12小时。同时设置对照组,包括空白微球(Control-sephacryl)和偶联微球+竞争性游离Echinatin。洗涤后,通过免疫印迹检测被洗脱的蛋白。Echinatin-微球能够从BMDMs裂解液中特异性地“钓取”HSP90蛋白,游离的Echinatin能竞争性抑制HSP90被微球捕获,证实了Echinatin与HSP90之间存在直接且可逆的结合,锁定HSP90为Echinatin的直接靶点,揭示

了其通过靶向HSP90-ATPase来抑制NLRP3炎症小体激活的全新抗炎分子机制。

H R等^[19],将木犀草素偶联微球,研究木犀草素如何保护人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)免受蓝光诱导的光毒性。将木犀草素-微球与ARPE-19细胞裂解液共孵育,孵育后通过质谱分析鉴定被拉下的蛋白。木犀草素-微球成功捕获了Kelch样ECH关联蛋白1(Keap1),Keap1是Nrf2的负调控蛋白。进一步的免疫印迹验证了木犀草素与Keap1的直接结合,揭示了木犀草素通过直接结合Keap1,激活Nrf2/Keap1信号通路,从而保护细胞免受蓝光损伤的分子机制。

Wang L等^[20],将棉皮素偶联微球研究抑制胃癌细胞生长的直接靶点蛋白。将棉皮素-微球与胃癌细胞(如AGS、MKN-45)裂解液共孵育,通过免疫印迹检测被富集的蛋白。证实棉皮素能直接结合并抑制AURKA和RSK2蛋白活性,引起G2/M期细胞周期阻滞和内在凋亡通路的激活,进而发挥抑制胃癌细胞生长的作用。

基于CNBr活化修饰的琼脂糖凝胶微球的亲和垂钓技术最突出的优势在于操作简单,无需显著的有机合成基础。直接使用天然活性化合物与商业化的活化凝胶偶联,避免了复杂的探针设计和合成步骤,对于结构复杂、修饰困难的多酚类化合物尤为适用。此外,仅需毫克级别的微量化合物即可完成偶联,适用于天然产物研究中样品量有限的场景,为快速、简便地发现和验证天然小分子的直接作用靶点开辟了一条有效路径。

3.3免疫亲和分离纯化。多酚类化合物与蛋白质之间存在着广泛的相互作用,这种相互作用主要基于氢键、疏水相互作用和 $\pi-\pi$ 堆积等非共价键。利用这一特性,将能够与多酚特异性结合的蛋白质(如单克隆抗体)偶联到活化琼脂糖凝胶微球上,制备成免疫亲和层析柱,用于从复杂样品中分离纯化多酚类化合物。

Huihua Qu等^[21,22],将单克隆抗体AA9与溴化氰活化的Sepharose 4B偶联,制备了免疫亲和层析柱。该免疫亲和层析柱能够高效、特异性地从豆科植物中多种结构相似的大豆异黄酮中提取大豆苷元、甘草素和染料木素,从而为从天然产物中的类似化合物中提取目标成分提供了新方法。同时还制备并表征了一种特异性识别柚皮苷的新型单克隆抗体。通过将抗柚皮苷单克隆抗体与溴化氰活化的Sepharose 4B偶联,构建了免疫亲和层析柱,并建立了快速免疫亲和和色谱分析法。该方法取1克CNBr活化修饰Sepharose 4B结合10 mg抗柚皮苷单克隆抗体,可以高效、特异性地捕获约250 μ g柚皮苷,且与其结构相似的化合物发生交叉反应。该免疫亲和层析柱可用于从金橘中分离柚皮苷。

Yan Zhao等^[23],制备了一种抗黄芩素单克隆抗体,抗体与CNBr活化修饰的琼脂糖凝胶微球偶联后可高效特异性分离黄芩苷,15 g抗体-CNBr活化修饰的琼脂糖凝胶微球对黄芩苷最大吸附量为771 μ g。

3.4离子交换色谱辅助应用。离子交换修饰琼脂糖凝胶微球后可通过静电作用从混合物中分离具有相应电荷组分的方法。相比于传统离子交换树脂骨架表面具有较强的亲水性^[24]。容易导致生物大分子在分离过程中发生非特异性吸附,以琼脂糖基质的

离子交换介质能最大限度地减少对蛋白的非特异性吸附,有效维持目标蛋白的生物活性。无论是阴离子交换基团(如DEAE、Q),还是阳离子交换基团(如CM、SP),都能通过成熟的化学工艺稳定地偶联到琼脂糖骨架上^[25]。

在多酚类天然产物的代谢研究中,NU等,离子交换修饰琼脂糖微球常用于多酚代谢相关酶的分离纯化。例如 α -L-鼠李糖酶可水解芦丁、柚皮苷等黄酮苷类化合物释放苷元,是研究多酚代谢途径的关键工具酶。通过DEAE琼脂糖凝胶离子交换层析,可从微生物发酵液中分离纯化高活性的 α -L-鼠李糖酶,为多酚类天然产物的糖苷代谢机制研究提供酶学基础^[26]。

4 结语

琼脂糖凝胶微球作为一种以天然多糖为骨架的亲和分离介质,在多酚类化合物的分离纯化与活性机制研究中展现出了显著的应用价值。环氧活化琼脂糖凝胶微球凭借其广谱的反应性,可灵活偶联含氨基、巯基、羟基的多酚小分子,在姜黄素、白藜芦醇、槲子苷、人参皂苷等多酚类化合物靶点垂钓中展现了良好的适用性;CNBr活化琼脂糖凝胶微球则以操作简便、无需复杂有机合成的优势,在杨梅素、山奈酚、甘草查尔酮、木犀草素、棉皮素等结构复杂多酚的直接靶点验证中发挥了关键作用,同时结合单克隆抗体技术,实现了大豆苷元、柚皮苷、黄芩苷等的高特异性免疫亲和分离。离子交换色谱则作为重要补充,在多酚代谢酶的分离中发挥辅助作用。

未来,随着修饰工艺的不断完善和跨学科方法的持续引入,琼脂糖凝胶微球有望在多酚类化合物的功能研究与产业化应用中发挥更为关键的作用。

【基金项目】

(2024X004-KXY)北京科技职业大学院内科技类一般课题—基于复合蛋白增强红树莓花色苷稳定性研究。

【参考文献】

- [1]E Oirdi,M.Harnessing the power of polyphenols:a new frontier in disease prevention and therapy[J].Pharmaceuticals 2024,17(6):692.
- [2]Bas,T.G.Dietary Polyphenols(Flavonoids)Derived from Plants for Use in Therapeutic Health: Antioxidant Performance,ROS,Molecular Mechanisms, and Bioavailability Limitations [J].International Journal of Molecular Sciences2026,27(3),1404.
- [3]Jiang,F.Xu,X.-W.;Chen,F.-Q.;Weng,H.-F.;Chen,J.;Ru,Y.;Xiao,Q.;Xiao,A.-F.Extraction,Modification and Biomedical Application of Agarose Hydrogels:A Review[J].Marine Drugs 2023,21(5),299.
- [4]Li,G.;Peng,X.;Guo,Y.;Gong,S.;Cao,S.;Qiu,F.Currently Available Strategies for Target Identification of Bioactive Natural Products[J].Frontiers in Chemistry2021,9,761219.
- [5]王怡婷,刘芬芬,赵雯靓.多酚微胶囊化技术及其体外释放研究进展[J].药物化学,2022,10(4):299-306.

[6] Sousa, V.; Monteiro, L. P. G.; Rocha, D. H. A.; Rodrigues, J. M. M.; Borges, J.; Mano, J. F. Marine-Origin Polysaccharides and Their Chemically Modified Derivatives as Sources of Advanced Biofunctional Materials for Biomedical Applications[J]. *Biomacromolecules* 2025, 26(3), 1129–1171.

[7] Gericke, M.; Witzler, M.; Enkelmann, A.; Heinze, T. Functional Agarose Hydrogels Obtained by Employing Homogeneous Synthesis Strategies[J]. *Polymers* 2024, 16(13), 1812.

[8] Fu, L.; Xiao, Q.; Ru, Y.; Hong, Q.; Weng, H.; Zhang, Y.; Chen, J.; Xiao, A. Bio-based active packaging: Gallic acid modified agarose coatings in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) preservation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules* 2024, 255, 128196.

[9] Alács, B.; Zrinyi, A.; Hornyánszky, G.; Poppe, L.; Bell, E. Upgrading Epoxy Supports for Enzyme Immobilization by Affinity Function Doping—A Case Study with Phenylalanine Ammonia-Lyase from *Petroselinum crispum*[J]. *Catalysts* 2024, 14(1), 14.

[10] Firouzi, Z.; Lari, P.; Rashedinia, M.; Ramezani, M.; Iranshahi, M.; Abnous, K. Proteomics screening of molecular targets of curcumin in mouse brain[J]. *Life sciences* 2014, 98(1), 12–17.

[11] Wang, Z.; Hsieh, T.-c.; Zhang, Z.; Ma, Y.; Wu, J. M. Identification and purification of resveratrol targeting proteins using immobilized resveratrol affinity chromatography[J]. *Bioc hemical and biophysical research communications* 2004, 323(3), 743–749.

[12] 张琦, 张子剑, 谭琰. 基于亲和层析方法研究栀子苷的药物靶标[J]. *Progress in Modern Biomedicine* 2016, 16(15).

[13] 刘倩, 寇俊萍, 黄娅琳. 以人参皂苷Rg1为配基的亲色谱介质的制备与初步应用[J]. *中国药科大学学报* 2010, 41(5), 451–455.

[14] Mizushima, Y.; Ishidoh, T.; Kamisuki, S.; Nakazawa, S.; Takemura, M.; Sugawara, F.; Yoshida, H.; Sakaguchi, K. Flavonoid glycoside: A new inhibitor of eukaryotic DNA polymerase α and a new carrier for inhibitor-affinity chromatography[J]. *Biochemical and biophysical research communications* 2003, 301(2), 480–487.

[15] Rodriguez, E. L.; Poddar, S.; Iftekhar, S.; Suh, K.; Woolfork, A. G.; Ovbude, S.; Pekarek, A.; Walters, M.; Lott, S.; Hage, D. S. Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years[J]. *Journal of Chromatography B* 2020, 1157, 122332.

[16] Hou, D.-X.; Kumamoto, T. Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling[J]. *Antioxidants & redox signaling* 2010, 13(5), 691–719.

[17] Lee, C.-J.; Moon, S.-J.; Jeong, J.-H.; Lee, S.; Lee, M.-H.; Yoo,

S.-M.; Lee, H. S.; Kang, H. C.; Lee, J. Y.; Lee, W. S. Kaempferol targeting on the fibroblast growth factor receptor 3-ribosomal S6 kinase 2 signaling axis prevents the development of rheumatoid arthritis[J]. *Cell Death & Disease* 2018, 9(3), 401.

[18] Xu, G.; Fu, S.; Zhan, X.; Wang, Z.; Zhang, P.; Shi, W.; Qin, N.; Chen, Y.; Wang, C.; Niu, M. Echinatin effectively protects against NLRP3 inflammasome-driven diseases by targeting HSP90[J]. *JCI insight* 2021, 6(2), e134601.

[19] Hayakawa, R.; Ishii, T.; Fushimi, T.; Kamei, Y.; Yamaguchi, A.; Sugimoto, K.; Ashida, H.; Akagawa, M. Luteolin protects human ARPE-19 retinal pigment epithelium cells from blue light-induced phototoxicity through activation of Nrf2/Keap1 signaling[J]. *Free Radical Research* 2025, 59(4), 356–368.

[20] Wang, L.; Wang, X.; Chen, H.; Zu, X.; Ma, F.; Liu, K.; Bode, A. M.; Dong, Z.; Kim, D. J. Gossypin inhibits gastric cancer growth by direct targeting of AURKA and RSK2[J]. *Phytotherapy Research* 2019, 33(3), 640–650.

[21] Qu, H.; Qu, B.; Wang, X.; Zhang, Y.; Cheng, J.; Zeng, W.; Liu, S.; Wang, Q.; Zhao, Y. Rapid, sensitive separation of the three main isoflavones in soybean using immunoaffinity chromatography[J]. *Journal of Separation Science* 2016, 39(6), 1195–1201.

[22] Qu, H.; Zhang, Y.; Qu, B.; Cheng, J.; Liu, S.; Feng, S.; Wang, Q.; Zhao, Y. Novel immunoassay and rapid immunoaffinity chromatography method for the detection and selective extraction of naringin in *Citrus aurantium*[J]. *Journal of Separation Science* 2016, 39(6), 1189–1194.

[23] Zhao, Y.; Feng, H.; Shan, W.; Cheng, J.; Wang, X.; Zhao, Y.; Qu, H.; Wang, Q. Development of immunoaffinity chromatography to specifically knockout baicalin from Gegenqinlian Decoction[J]. *Journal of Separation Science* 2015, 38(15), 2746–2752.

[24] 卢慧丽, 东强. 琼脂糖-DEAE离子交换介质的配基密度和孔径对BSA吸附的影响[J]. *化工学报*, 2011, 62(11), 3164–3170.

[25] Inc., B. Agarose Chromatography Media: Properties and Applications[Z]. Biovanix Inc., Canada, 2024. <https://biovanix.com/en/agarose-chromatography-media/>.

[26] Unterlander, N.; Mats, L.; McGary, L. C.; Gordon, H. O. W.; Bozzo, G. G. Kaempferol rhamnoside catabolism in rosette leaves of senescing *Arabidopsis* and postharvest stored radish [J]. *Planta* 2022, 256(2):36.

作者简介:

许肇初(1996--)男,汉族,北京人,硕士研究生,助理实验员,研究方向:天然药物化学。

*通讯作者:

陈亮(1986--)男,汉族,陕西人,博士研究生,教授,研究方向:药物化学、药物分析。