

四乙酰哌嗪苯氧基酞菁锌及其蛋白质复合物的制备、表征与光动力活性

黄剑东^{*,1} 刘丰冉¹ 陈燕梅¹ 孙建成² 江 舟¹

(¹ 福州大学化学化工学院, 福州大学功能材料研究所, 福州 350002)

(² 福建医科大学药理系, 福州 350004)

摘要: 合成了 2 个酞菁锌配合物, 即 α -四(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧基)酞菁锌($C_{80}H_{72}N_{16}O_8Zn$) (**1**)和 β -四(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧基)酞菁锌($C_{80}H_{72}N_{16}O_8Zn$) (**2**), 并通过 1H NMR, MS, IR 和元素分析等手段进行表征。配合物 **1**, **2** 在 *N,N*-二甲基甲酰胺、四氢呋喃和正辛醇等有机溶剂中呈现出典型的酞菁的单体吸收光谱特征, *Q* 带分别位于 693~698 nm 和 681~682 nm, 相对于 β 位取代者, α 位取代的配合物的 *Q* 带明显红移。在含水溶剂中的吸收光谱测试显示, α 位取代较 β 位取代更能有效地阻止配合物在含水溶剂中形成聚集体。通过吸收光谱和荧光光谱研究了 2 个配合物与血清白蛋白(BSA, HSA)和转铁蛋白(apoTf)的相互作用, 结果表明, 结合常数在 $(1\sim20) \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 之间, 相对而言, β 位取代的配合物与白蛋白的结合能力强于 α 位取代者。同时, 制备了 **1**-BSA, **2**-BSA, **1**-HSA, **1**-apoTf 和 **1**-FeTf 等非共价键结合的酞菁-蛋白质复合物。对 MCF-7 乳腺癌细胞的光动力杀伤作用的测试初步表明, 复合物的活性较高, 活性顺序为: **1**-BSA > **1**-FeTf > **1**-HSA, **1**-apoTf > **2**-BSA > **1** > **2**。

关键词: 酞菁; 合成; 蛋白质; 光动力治疗

中图分类号: O614.24+1; O627.23; R977.6

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2006)03-0435-08

Tetra-(acetyl piperazine phenoxy) Phthalocyaninato Zinc Complexes and Their Proteins Conjugates: Synthesis, Characterisation and Photodynamic Activities

HUANG Jian-Dong^{*,1} LIU Feng-Ran¹ CHEN Yan-Mei¹ SUN Jian-Cheng² JIANG Zhou¹

(¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002)

(²Department of pharmacology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004)

Abstract: Two zinc phthalocyanines, tetra- α -[4-(4-acetyl piperazine) phenoxy] phthalocyaninato zinc ($C_{80}H_{72}N_{16}O_8Zn$) (**1**) and tetra- β -[4-(4-acetyl piperazine) phenoxy] phthalocyaninato zinc ($C_{80}H_{72}N_{16}O_8Zn$) (**2**), have been synthesised and characterised with 1H NMR, MS, IR and elemental analysis. The electronic absorption spectra of two complexes in common organic solvents (*N,N*-dimethyl formamide, tetrahydrofuran, *n*-octanol) were typical for non-aggregated phthalocyanines, showing a *Q* band at 693~698 nm for **1** and 681~682 nm for **2**. This indicates that the *Q* band of zinc phthalocyanine with the substituted groups located in the α position is largely red shifted than that in the β position. The spectral features of complexes **1** and **2** in aqueous media suggest the α -substituted groups are more effective than β -substituted groups to hinder the aggregation of phthalocyanine molecule. The interactions between two complexes with serum albumin and transferrin (BSA, HSA and apoTf) were investigated by absorption and fluorescence spectroscopy. The binding constants were found to be $(1\sim20) \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$. By comparison, β -substituted **2** had stronger combining ability with albumin than that of α -substituted **1**. The non-covalent conjugates (**1**-BSA, **2**-BSA, **1**-HSA, **1**-apoTf and **1**-FeTf) with the molar ratio of about 1:1 have also been prepared. The photodynamic activities of two complexes and their bioconjugates against MCF-7 mammary tumor cells were examined. The result shows that the photocytotoxicities of conjugates are higher than that of complexes **1**~**2** and follows the order **1**-BSA > **1**-FeTf > **1**-HSA, **1**-apoTf > **2**-BSA > **1** > **2**.

Key words: phthalocyanine; synthesis; protein; photodynamic therapy

收稿日期: 2005-08-29. 收修改稿日期: 2005-12-21.

国家自然科学基金(No.20201005)、福建省自然科学基金(No.C0410005)和高等学校骨干教师资助计划的资助项目。

*通讯联系人。E-mail: jdhuang@fzu.edu.cn

第一作者: 黄剑东, 男, 36 岁, 副研究员; 研究方向: 功能配合物与药物化学。

酞菁配合物是一类重要的功能配合物,有多方面的应用前景和研究价值,其中作为抗癌光敏剂的研究一直受到人们的广泛关注^[1-3]。考虑到中心离子为锌的酞菁配合物具有较高的光敏化能力^[2],本文将乙酰哌嗪苯氧基引入到酞菁锌的周环,得到了 2 个未见报道的配合物,即 α -四(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧基)酞菁锌(**1**)和 β -四(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧基)酞菁锌(**2**),结构见图 1。同时,进一步研究了二者与白蛋白和转铁蛋白的相互作用,制备了相应的复合物,并初步比较了其离体光动力活性。白蛋白和转铁蛋白是血液中的主要运载蛋白,且对乳腺癌和白血病等类型的癌细胞具有受体介导的选择性^[4],因此,开展它们与酞菁锌配合物的相互作用研究对于构建具有靶向功能的酞菁-蛋白质复合型光敏剂具有重要意义。

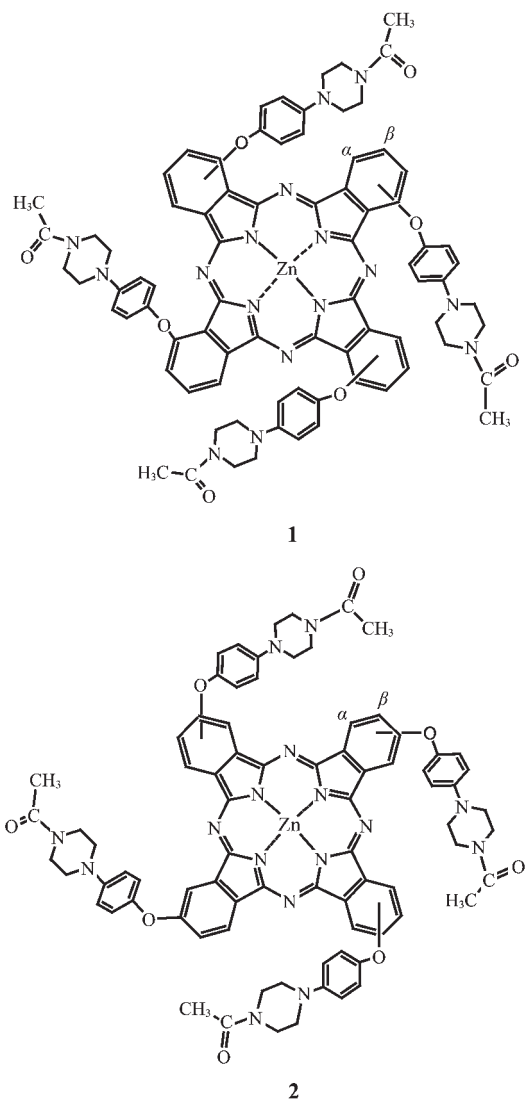


图 1 配合物 **1** 和 **2** 的结构示意图

Fig.1 Structure of complexes **1** and **2**

但是,目前相关的研究还不多见^[4-8]。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国 Varian 公司的 Unity500 型核磁共振谱仪 (500 MHz, TMS 为内标); 德国 ELEMENT 公司的 Vario EL II 元素分析仪; 美国 Pekin Elmer 公司的 Spectrum 2000 型 FTIR 光谱仪 (采用 KBr 压片法); 美国 Pekin Elmer 公司的 Lambda 900 型紫外可见分光光度计; 英国 Edingburgh 公司的 FL900/FS920 型稳态与瞬态荧光光谱仪; 德国 Finnigan 公司 LCQ Decap Max 质谱仪; 美国 Waters 公司 HPLC 系统 (1525 二元泵, 2996 二极管紫外可见检测器)。

牛血清白蛋白(BSA)为上海化学试剂公司产品, 人血清白蛋白(HSA)和脱铁的转铁蛋白(apoTf)为 Sigma 公司产品, 纯度均为生化试剂级, 并用浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液(内含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 以维持离子强度)为溶剂, 配成待用溶液。4-乙酰哌嗪苯酚, 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳烯-7(DBU)为 Acros 产品, 蓖麻油衍生物 Cremophor EL 为 Sigma 公司产品。其它试剂为国产试剂。层析用硅胶(100~200 目)为青岛海洋化工试剂有限公司产品; 凝胶色谱分离用凝胶为 Sigma 公司葡聚糖 G-100。

1.2 配合物的合成与表征

1.2.1 前驱体的合成与表征

1.2.1.1 3-(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧)邻苯二甲腈

将 1.10 g (5 mmol) 4-乙酰哌嗪苯酚、 0.865 g (5 mmol) 3-硝基邻苯二甲腈和 1.38 g (10 mmol) 无水 K_2CO_3 加入到 20 mL DMSO 中, 常温搅拌 5 h (通氮气保护)。将反应溶液加到 100 mL 冰水中, 抽滤(用水洗涤), 二氯甲烷-甲醇混合溶剂重结晶, 真空干燥, 得到浅黄色固体。产率为 91%。熔点为 $178.6 \sim 179.3 \text{ }^\circ\text{C}$ 。IR (KBr, cm^{-1}): $3076, 2820, 729, 2237, 1643, 1514, 1449, 1273, 1239, 1165$ 。MS (ESI, m/z): $347 [\text{M}+1]^+$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz , ppm) δ : $7.55(\text{t}, 1\text{H}, \text{H}-2), 7.43(\text{d}, 1\text{H}, \text{H}-1), 7.04(\text{m}, 5\text{H}, \text{H}-3, \text{H}-4, \text{H}-5), 3.66 \sim 3.80(\text{d}(\text{br}), 4\text{H}, \text{H}-6), 3.21 \sim 3.17(\text{d}(\text{br}), 4\text{H}, \text{H}-7), 2.16(\text{s}, 3\text{H}, \text{CH}_3)$ 。元素分析: 按 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值(%): C (69.35), H (5.24), N (16.17); 实验值(%): C (69.39), H (5.50), N (15.75)。

1.2.1.2 4-(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧基)邻苯二甲腈

用 4-硝基邻苯二甲腈代替上述的 3-硝基邻苯

二甲腈,按同样的方法,得到 4-(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧基)邻苯二甲腈。产率为 79%。熔点为 161.2~161.8 °C。IR (KBr, cm^{-1}): 3 028, 2 843, 726, 2 232, 1 643, 1 514, 1 485, 1 307, 1 239, 1 157。MS (ESI, m/z): 347 [$M+1$]⁺。¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, ppm) δ : 7.70 (d, 1H, H-1), 7.22 (d, 2H, H-2, H-3), 7.01 (s(br), 4H, H-4, H-5), 3.82-3.67 (d(br), 4H, H-6), 3.22-3.18 (d(br), 4H, H-7), 2.16 (s, 3H, CH_3)。元素分析:按 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值(%):C (69.35), H (5.24), N (16.17); 实验值(%):C (69.30), H (5.43), N (15.82)。

1.2.2 酞菁锌配合物的合成与表征

1.2.2.1 α -四(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧基)酞菁锌(1)的合成与表征:

将 0.693 g (2 mmol) 3-(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧基)邻苯二甲腈、0.37 g (2 mmol) 无水醋酸锌和 0.4 mL 的 DBU 加入到 20 mL 正戊醇中,在氮气保护下回流反应 8 h。减压蒸馏除去溶剂,甲醇洗涤,DMF 溶解,利用硅胶层析柱纯化(DMF 为洗脱剂),收集深绿色组分,减压蒸馏,甲醇重结晶,真空干燥,得到黑绿色固体。产率为 26%。通过三维 HPLC 检查产物纯度,色谱条件:Nova-park[®]C₁₈ 色谱柱 (3.9 mm ID $\times$ 150 mm Long, Waters 公司),流动相为 DMF 和 H₂O,梯度为:0~30 min,由 40% H₂O 线性变化为 100% DMF;30~35 min,100% DMF;流量为 1 mL $\cdot$ min⁻¹;柱温为 30 $\pm$ 2 °C;检测波长为 300~800 nm。IR (KBr, cm^{-1}): 1 634, 1 505, 1 481, 1 333, 1 228, 1 116, 1 080。MS (ESI, m/z): 1451.5 [$M+1$]⁺。¹H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz, ppm) δ : 8.66 (d, 4H, H (-Pc)), 7.99 (d, 8H, H (-Pc)), 7.29~7.40 (t, 8H, H-Ar ortho C-O), 7.08 (s, 8H, H-Ar ortho C-N), 3.53~3.50 (d(br), 16H, CH_2 -N-Ar), 3.03~2.75 (m, 16H, CH_2 -N-C=O), 2.01~1.98 (m, 12H, $-\text{CH}_3$)。元素分析:按 $\text{C}_{80}\text{H}_{78}\text{N}_{16}\text{O}_{11}\text{Zn}$ ($1\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 计算值(%):C (63.85), H (5.22), N (14.89); 实验值(%):C (64.01), H (5.23), N (14.76)。

1.2.2.2 β -四(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧基)酞菁锌(2)的合成与表征

用 4-(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧基)邻苯二甲腈替代上述的 3-(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧基)邻苯二甲腈,按同样的方法可以得到绿色的目标产物 2,产率为 21%。IR (KBr, cm^{-1}): 1 651, 1 507, 1 470, 1 335, 1 227, 1 090。MS (ESI, m/z): 1 450.8 [M]⁺。¹H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz, ppm) δ : 8.67~8.15, 7.56~7.22 (m(br), 28H, H-Pc, H-Ar), 3.62 (s(br), 16H, CH_2 -N-Ar), 3.23 (s(br), 16H, CH_2 -N-C=

O), 2.10 (d, 12H, CH_3)。元素分析:按 $\text{C}_{80}\text{H}_{78}\text{N}_{16}\text{O}_{11}\text{Zn}(2\cdot 3\text{H}_2\text{O})$ 计算值(%):C (63.85), H (5.22), N (14.89); 实验值(%):C (63.99), H (5.17), N (14.91)。

1.3 酞菁与蛋白质相互作用的光谱研究

1.3.1 吸收光谱

25 °C 下,以 pH=7.4 的 Tris-HCl 溶液为参比,取 2.0 mL Tris-HCl 于 1 cm 石英比色池中,滴加 2 μL 浓度为 2.0 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的酞菁锌配合物的 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)溶液,测体系的吸收光谱,然后在上述体系中滴加蛋白质溶液,观测体系的吸收光谱变化情况。

1.3.2 稳态荧光光谱

25 °C 下,移取 2.0 mL 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白质溶液于 1 cm 石英比色池中,逐次滴加 2.0 mmol $\cdot$ L⁻¹ 酞菁锌配合物的 DMF 溶液(累加体积小于 220 μL ,以减少体积变化引起的影 响),测定体系在 300~500 nm 之间的发射光谱(激发波长为 280 nm)。

1.4 酞菁-蛋白质复合物的制备

参照文献^[5,6]的方法,通过温育交换法来制备复合物:配合物与蛋白质以物质的量比为 2:1 在 pH=7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液(内含 1% 的 Cremophor EL)混匀,37 °C 在气浴摇床上温育过夜,然后,通过 G-100 葡聚糖凝胶色谱 (15 mm ID $\times$ 150 mm Long)分离纯化,流动相采用 2 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的 NH_4HCO_3 水溶液,收集复合物对应的洗脱组分,并通过冷冻干燥除去溶剂。复合物中白蛋白的含量通过考马斯亮蓝法(简称 CBB 法)^[9]测定,配合物的含量则通过吸收光谱法测定(稀释到 DMF 溶液中,通过 Q 带的吸光度来计算,1 在 698 nm 处的摩尔吸光系数为 $2.48 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$, 2 在 681 nm 处摩尔吸光系数为 $2.46 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$)。

1.5 离体光动力活性测试

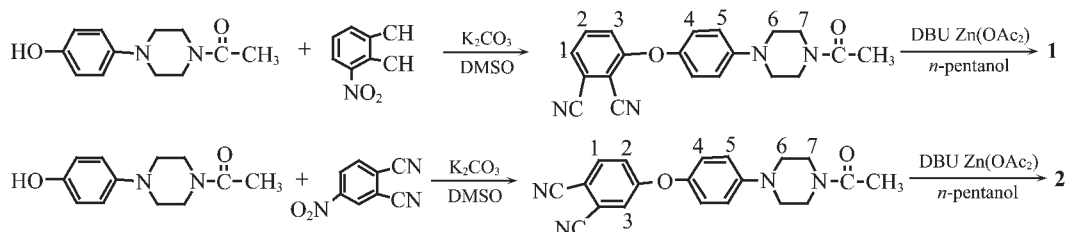
将配合物的 DMF 溶液稀释到(稀释 100 倍)PBS 溶液(磷酸盐缓冲液)作为待测液,而复合物直接溶解到 PBS 溶液作为待测液。所测试的细胞为 MCF-7 人乳腺癌细胞(引自上海细胞生物研究所)。利用 MTT 法考察细胞在光敏剂作用下的存活率。所用激发光源为波长大于 610 nm 的红光,光剂量为 60 J $\cdot\text{cm}^{-2}$,其他试验步骤按文献^[6]进行。

2 结果与讨论

2.1 配合物的合成与光谱性质

式 1 是合成过程的示意图。从中可见,通过硝基

邻苯二甲腈与 4-乙酰哌嗪苯酚之间的亲核取代反应得到了 2 种酞菁前驱体, 即 3-(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧)邻苯二甲腈和 4-(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧基)邻苯二甲腈



式 1 配合物 **1** 和 **2** 的合成

Scheme 1 Preparation of complexes **1** and **2**

以 3-(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧)邻苯二甲腈或 4-(4-(4-乙酰哌嗪)苯氧基)邻苯二甲腈为原料, 通过模板法(醋酸锌为模板剂, 强有机碱 DBU 为催化剂), 得到酞菁锌配合物 **1** 和 **2**, 二者在酞菁周环具有 4 个相同的取代基, 但取代的位置不同, 前者是 α 位取代, 后者是 β 位取代。

在合成的过程中, 对分离纯化后的样品, 采用二极紫外可见-高效液相色谱(即三维高效液相色谱)进行纯度检查。如图 2(a)和(b)所示, 配合物 **1** 和 **2** 分

别位于保留时间为 18.7 min 和 22.3 min 的位置上, 在色谱图中, 未见吸收在 300~800 nm 的其他组分, 尤其是未见最大吸收在 700 nm 附近的酞菁类杂质, 从一个侧面, 说明产物具有较高的纯度。通过纯度检查后, 进一步对目标产物进行 IR、 ^1H NMR、MS 以及元素分析等表征测试, 如实验部分所示, 表征结果与目标产物相符合, 说明我们得到了预期结构的酞菁配合物(见图 1)。

别位于保留时间为 18.7 min 和 22.3 min 的位置上, 在色谱图中, 未见吸收在 300~800 nm 的其他组分, 尤其是未见最大吸收在 700 nm 附近的酞菁类杂质, 从一个侧面, 说明产物具有较高的纯度。通过纯度检查后, 进一步对目标产物进行 IR、 ^1H NMR、MS 以及元素分析等表征测试, 如实验部分所示, 表征结果与目标产物相符合, 说明我们得到了预期结构的酞菁配合物(见图 1)。

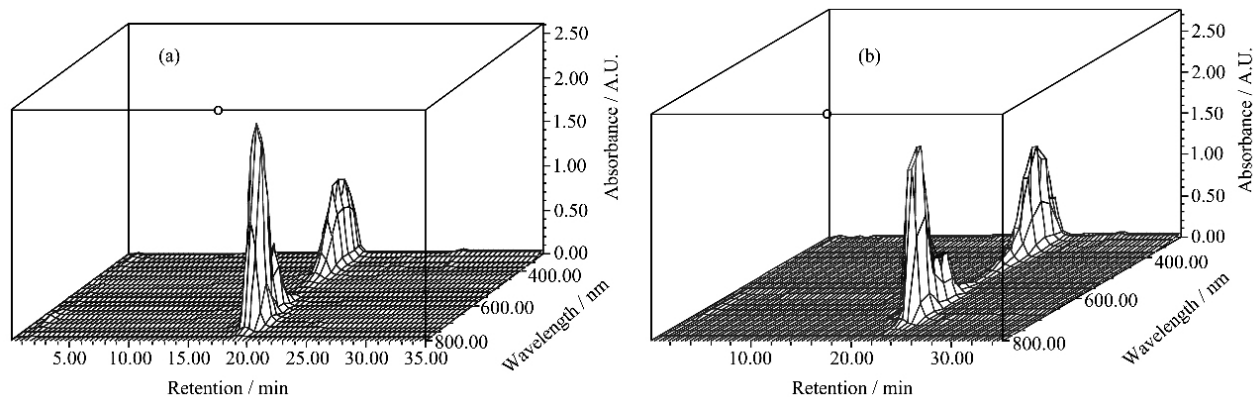


图 2 配合物 **1**(a)和 **2**(b)的三维 HPLC 分析色谱图

Fig.2 3D-HPLC chromatograms of **1**(a) and **2**(b)

另外, 值得一提的是, 四取代酞菁配合物(无论是 α 位或是 β 位)可能存在 4 种异构体(分子点群分别是 C_{4h} 、 D_{2h} 、 C_{2v} 、 C_s)^[10,11]。本文所合成的配合物虽然经过色谱分析, 在相应的色谱条件下, 展现出一个单峰(见图 2), 但仍然不能肯定其是否只属于其中哪一种异构体。

表 1 和图 3 比较了 **1**、**2** 在 N,N -二甲基甲酰胺(DMF)中的电子吸收和荧光光谱性质, 从中可见, 两者均展现出典型的酞菁单体光谱形状, 但是 Q 带的

位置有所不同, **1** 位于 698 nm, 而 **2** 位于 681 nm, 即 α 位取代的酞菁锌配合物相对于 β 位取代者, Q 带红移了近 17 nm, 荧光发射带也相应红移了 14 nm。这与谢文委等^[13]对 α 和 β 位四烷氧基取代酞菁的研究结果一致。本文在酞菁周环引入的取代基为给电子的苯氧基, 当取代基位于 α 位时, 它的 $n(\pi)$ 轨道与未取代的母体酞菁环的大 π 道相互作用, 产生较大的共轭效应^[13], 导致酞菁最大吸收带红移较大。如果取代基位于 β 位, 这种共轭效应就较小^[13], 酞菁最

表 1 配合物 1 和 2 在 DMF 中的电子吸收和发射光谱参数

Table 1 Electronic absorption and emission Data for complexes 1~2 in DMF

Complex	$\lambda_{\max(ab)}$ / nm at Q band	$\varepsilon_{\max}$ / (mol ⁻¹ ·L·cm ⁻¹)	λ_{em} / nm	ϕ_f^b
1	698	2.48×10^5	703	0.03
2	681	2.46×10^5	689	0.11

^a Excited at 620 nm for 1, 610 nm for 2.

^b Using unsubstituted Zinc(II) phthalocyanine in DMF as the reference ($\phi_f=0.28$)^[12].

大吸收带红移的幅度也相应较小。

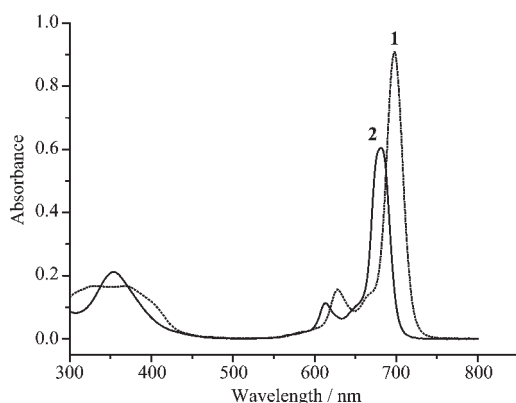


图 3 配合物 1 (3.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 2 (2.33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在 DMF 中的吸收光谱

Fig.3 Absorption spectra of 1 (3.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and 2 (2.33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in DMF

2 个配合物在四氢呋喃和正辛醇中也展现出单体的光谱特征,1 的 Q 带位于 695 nm (四氢呋喃)、693 nm (正辛醇),2 的 Q 带位于 681 nm (四氢呋喃)、682 nm (正辛醇),也反映了 α 位取代相对于 β 位取代, Q 带红移的特点。

如图 4 所示,1、2 在 100% 乙醇中也基本呈现出单体的光谱特征,而在 60% (体积分数) 乙醇水溶液中,1 还基本保持单体特征,2 的光谱却发生了明显

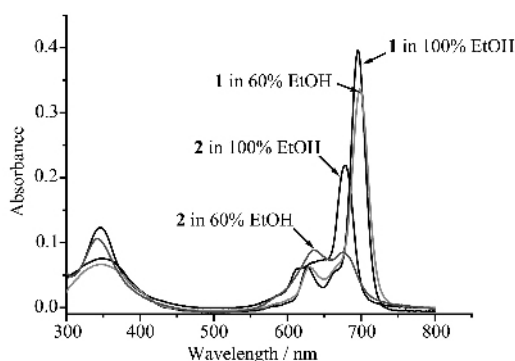


图 4 配合物 1 和 2 (1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在 100% EtOH 和 60% EtOH/H₂O 中的吸收光谱

Fig.4 Absorption spectra of 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of 1 and 2 in 100% EtOH or 60% EtOH/H₂O

的变化:681 nm 处的吸收显著下降,而在 630 nm 处的吸收显著上升。这样的光谱变化趋势表明,2 在含水溶液中形成面对面聚集态^[14]。可见,取代基位于 α 位,相对于 β 位,更可以阻止酞菁在含水体系中形成聚集态。配合物从浓的 DMF 溶液稀释 100 倍到 Tri-HCl (pH=7.4) 水溶液中得到的光谱 (参见图 5) 也反应了这一点。在含水溶液中以单体或聚集态形式存在,对光敏剂是否能发挥光动力活性是很重要的问题,已有的研究表明,聚集态光动力活性远不如单体^[15]。从这一点上看, α 位相对于 β 位取代更有利于光动力治疗。

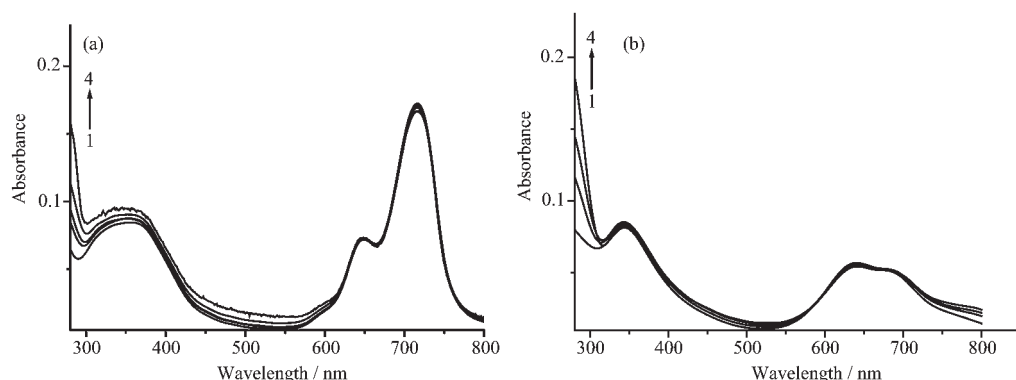
2.2 配合物与蛋白质的相互作用

本文借助吸收光谱和荧光光谱初步研究了配合物与白蛋白 (BSA)、转铁蛋白 (apoTf) 的相互作用。如上所述,1、2 在 pH=7.4 的水溶液中形态不同,1 基本以单体形态存在 (其特征吸收峰在 700 nm 左右),而 2 则为聚集形态,BSA 的加入对两者 Q 带吸收光谱的影响不大 (见图 5)。HSA、apoTf 对 1、2 的影响与 BSA 类似。

虽然蛋白质对 1 和 2 的吸收光谱影响不大,但 1 和 2 却能引起蛋白质的荧光发射光谱的明显变化。如图 6 所示,随着 1 和 2 的不断加入,蛋白质的特征荧光强度发生有规律的猝灭,且最大发射峰发生蓝移。利用 1、2 使 BSA、HSA 和 apoTf 特征荧光猝灭的数据,根据文献方法^[16],可以估计配合物与蛋白质的结合常数和位点数 (如图 7 所示):

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg c_Q$$

上式中, F_0 为猝灭体 (本文中即为酞菁配合物) 不存在时蛋白的内源荧光强度, F 为加入猝灭体后的荧光强度, c_Q 为猝灭体的浓度。拟合结果汇总于表 2。从中可见,1、2 与 3 种蛋白质之间均存在较强的相互作用,结合常数在 $(1\sim 20) \times 10^5 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}$ 之间,在测试的物质的量的范围内均只存在 1 个结合位点。从总体上看,2 个配合物与血清白蛋白的结合能力强于转铁蛋白,且 β 位取代的 2 与白蛋白结合能力



(a) $c_1=2.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, c_{BSA} from 1 to 4: 0, 1.0, 2.0, 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

(b) $c_2=2.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, c_{BSA} from 1 to 4: 0, 1.0, 2.0, 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 5 BSA 对配合物 **1** 和 **2** 在 Tris-HCl 缓冲溶液中的吸收光谱的影响

Fig.5 Absorption spectra of **1** (a) and **2** (b) in a Tris-HCl buffer upon titration with BSA

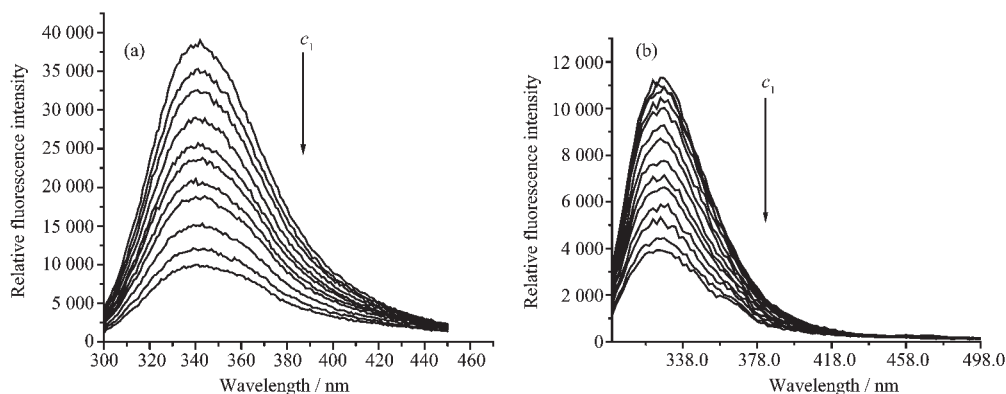


图 6 配合物 **1** 对 BSA($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)(a)和 apoTf($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)(b)在 Tris-HCl 缓冲溶液中的荧光光谱的影响

Fig.6 Change in fluorescence spectrum of (a) BSA ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and (b) apoTf ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in a Tris-HCl buffer upon titration with **1** (excited at 280 nm)

要大于 α 位取代的 **1**。

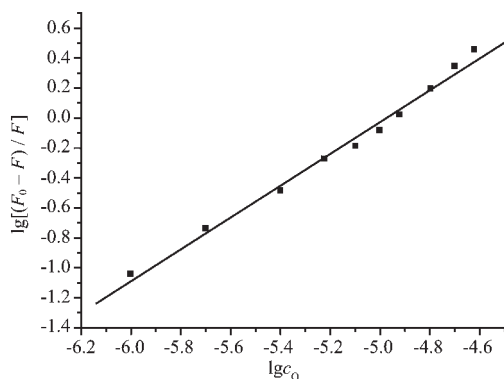


图 7 配合物 **1** 猝灭 BSA 荧光的双对数拟合曲线

Fig.7 Double logarithmic regression curve of BSA fluorescence quenching caused by complex **1**

2.3 复合物的制备

考虑到 2 个配合物与蛋白质之间存在较强的相

表 2 配合物与蛋白质相结合的参数

Table 2 Parameters of complexes binding to proteins

Protein	Phthalocyanine	Bind constants $K / (10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L})$	Binding sites	Correlation coefficient (r)
BSA	1	1.92	1.06	0.994 6
BSA	2	19.8	1.18	0.995 5
HSA	1	4.82	1.12	0.994 6
HSA	2	9.10	1.16	0.991 8
apoTf	1	0.98	1.01	0.991 1
apoTf	2	0.89	0.97	0.986 7

互作用,因此我们参照文献^[5,6]的方法,通过温育交换法合成、凝胶色谱分离来获得一系列非共价键结合的酞菁-蛋白质复合物。复合物(既含有酞菁配合物又含有蛋白质)与未复合的游离酞菁配合物,在分子量上存在数量级的差距,因而在凝胶色谱中容易被分离。分离过程中,第一个洗脱组分(洗脱体积约为

9~10 mL),即为分子量大的复合物。当温育物质的量比为 2:1 的酞菁和蛋白混合物,分离得到了物质的量比约为 1:1 的下列 4 种复合物:1-BSA、2-BSA、1-HSA 和 1-apoTf。在 1-apoTf 复合物溶液中加入少量的 FeCl_3 ($1 < c_{\text{Fe}^{3+}} / c_{\text{apoTf}} < 2$),使脱铁的转铁蛋白(apoTf)转化为配位了铁离子的转铁蛋白(FeTf),便得到了 1-FeTf。转铁蛋白是血液中转运铁离子的蛋白质,在其 N2 端结构域和 C2 端结构域具有特定三价铁离子结合位点。

复合物在水溶液中展现的 Q 带吸收光谱特征与图 5 所示类似,1 的复合物表现出单体的 Q 带特征。对于 2-BSA 复合物,酞菁和蛋白质的组成比约为 1:1,但该复合物却表现出聚集体的 Q 带特征,类似的现象也见报道^[7],对此,目前还难于给出确切的解释,需要进一步探讨,值得注意的是,实验测定的组成比是表观的物质的量比。

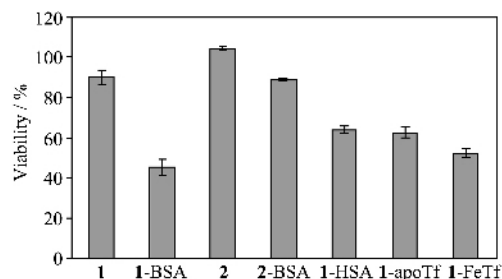
2.4 离体光动力活性

初步的离体活性测试表明,若不进行光照,酞菁浓度为 $1.04 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1、2、1-BSA、2-BSA、1-HSA、1-apoTf 和 1-FeTf 对 MCF-7 乳腺癌细胞没有杀伤和生长抑制作用,这一点是作为光敏剂所必需具备的条件。

若施以激发光,如图 8 所示,2 仍然没有表现出对细胞的杀伤作用,但 1 已显示了约 9% 的细胞光动力杀伤能力,而蛋白质复合物则显示了更高的光动力活性,对癌细胞的杀伤率分别是:11% (2-BSA),55% (1-BSA),36% (1-HSA),37% (1-apoTf) 和 47% (1-FeTf)。从中可见:(1) 1、1-BSA 的光动力活性要强于 2、2-BSA,说明 α 位取代的 1 相对于 β 位取代的 2,作为抗癌光敏剂更具优势。一个明显的原因是 1 在水溶液中更易于保持单体的光谱特征。(2) 无论是 1 还是 2,其蛋白质复合物的生物活性都有所增强。既然配合物与蛋白质复合后,发生光动力作用的光谱性质没有明显的变化,因此,它们活性的差异可能是缘于细胞摄取程度的不同。已知乳腺癌细胞表面具有白蛋白受体^[4,5],细胞可以通过受体介导来提高对白蛋白复合物的摄取选择性,从而提高光动力活性。蛋白质复合物活性的提高也说明,非共价键的结合方式,既可以保持复合物中酞菁配合物的光敏活性又能保持蛋白质的靶向性。我们还能确定 MCF-7 乳腺癌细胞是否具有转铁蛋白的受体,但从本实验结果看,1-apoTf 的活性也要高于 1,如果将复合物中的脱铁的转铁蛋白转化为配位了铁离子的

转铁蛋白(FeTf),可能更有利于细胞的摄取,1-FeTf 对 MCF-7 细胞杀伤作用更明显。

3 结 论



Data are expressed as mean $\pm$ sd ($n=3$).

图 8 配合物 1、2 及其蛋白复合物对 MCF-7 细胞的光动力活性

Fig.8 Comparison of the photocytotoxicities of 1, 2 and their protein conjugates towards MCF-7 cells
 $c_{\text{pc}}=1.04 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

本文将乙酰哌嗪苯氧基引入到酞菁锌的周环,得到了 α 位四取代的酞菁锌(1)和 β 位四取代的酞菁锌(2)。同时,制备了 1-BSA、2-BSA、1-HSA、1-apoTf 和 1-FeTf 等以非共价键结合的酞菁-蛋白质复合物。

比较了取代位置对乙酰哌嗪苯氧基酞菁锌的光谱性质、聚集倾向、与蛋白质相互作用能力和光动力活性的影响,结果表明,相对于 β 位取代, α 位取代使配合物的 Q 带明显红移,且更能阻止配合物在含水溶剂中形成聚集体,但与白蛋白结合的能力小些。

α 位取代的 1 对 MCF-7 细胞的光动力活性稍优于 β 位取代的 2,说明对于乙酰哌嗪苯氧基,位于 α 位,更有利于光动力治疗,对于其它类型的取代基,是否具有同样的情况,需要进一步探讨。

复合物对 MCF-7 细胞的光动力杀伤能力要高于未复合的酞菁配合物,说明该类型的复合物有望发展为靶向型的光敏剂,值得进一步开展研究。

致谢:感谢福州大学黄金陵教授和陈耐生教授对本工作的大力支持和帮助!

参考文献:

- [1] McKeown N B. *Phthalocyanine Materials: Synthesis, Structure and Function*. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.
- [2] Allen C M, Sharman W M, vanLier J E. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2001,5:161~169
- [3] Dolmans D E J G J, Fukumura D, Jain R K. *Nat. Rev. Cancer*,

- 2003,3**:380~387
- [4] Sharman W M, van Lier J E, Allen C M. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2004,56**:53~76
- [5] Brasseur N, Langlois R, La Madeleine C, et al. *Photochem. Photobiol.*, **1999,69**:345~352
- [6] Huang J D, Wang S Q, Lo P C, et al. *New J. Chem.*, **2004,28**:348~354
- [7] Huang J D, Fong W P, Chan EY M, et al. *Tetrahedron Letters*, **2003,44**:8029~8032
- [8] Gantchev T G, Ouellet R, van Lier J E. *Archives of Biochem. Biophys.*, 1999,366:21~30
- [9] WEN Jin-Kun(温进坤), HAN Mei(韩梅). *Theory and Technique of Medicinal Molecule Biochemistry*(医学分子生物学理论与研究技术). Beijing: Science Press, **1999**.219~220
- [10] Sommerauer M, Rager C, Hanack M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996,118**:10085~10093
- [11] HUANG Jin-Lin(黄金陵), PENG Yi-Ru(彭亦如), CHEN Nai-Sheng(陈耐生). *Jiegou Huaxue* (Chinese J. Struct. Chem.), **2001,20**:144~148
- [12] Yslas Ines E, Rivarola V, Durantini E N. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2005,13**:39~46
- [13] XIE Wen-Wei(谢文委), XU Hai-Tao(徐海涛), GAN Chang-Sheng(甘昌胜), et al. *Huaxue Wuli Xuebao* (Chinese of Chemical Physics), **2003,12**:491~498
- [14] Liu W, Jensen T J, Fronczek F R, et al. *J. Med. Chem.*, **2005,48**:1033~1041
- [15] Ng D K P. *C. R. Chime.*, **2003**:903~910
- [16] Liu Y, Xie M X, Jiang M, et al. *Spectrochimica Acta Part A*, **2005,61**:2245~2251