

联合化疗与光动力治疗于一体的水溶性铜(II)、 镍(II)酞菁的合成及体外抗癌活性

潘佳宝 陈 曦 方文娟 刘 伟* 于光伟
(山东大学晶体材料国家重点实验室, 济南 250100)

摘要:以邻苯二腈法合成了全水溶性铜酞菁(CuPc)**6**与镍酞菁(NiPc)**7**。对该类酞菁进行了光物理化学特性测试及体外细胞生物试验。结果表明:合成的铜酞菁**6**与镍酞菁**7**不仅水溶性好,而且对光热都十分稳定,并能有效产生单线态氧。体外细胞测试证实,铜酞菁**6**与镍酞菁**7**表现出了对癌细胞的避光下的抑制效应以及光照下的光动力治疗效应,显示了金属配合物化疗效应与光动力治疗的协同抗癌活性。

关键词:铜酞菁;镍酞菁;单线态氧;光毒性

中图分类号:O614.121;O614.813

文献标识码:A

文章编号:1001-4861(2018)05-0889-08

DOI:10.11862/CJIC.2018.127

Water Soluble Cu(II) and Ni(II) Phthalocyanine: Syntheses and *in Vitro* Synergistic Anticancer Activities of Photodynamic Therapy and Chemotherapy Effects

PAN Jia-Bao CHEN Xi FANG Wen-Juan LIU Wei* YU Guang-Wei
(State Key Laboratory of Crystal Materials, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Water-soluble Cu(II) phthalocyanine **6** and Ni(II) phthalocyanine **7** were successfully synthesized starting from 1,2-dicyanobenzene derivative. The photophysical and photochemical properties of these phthalocyanines show that they are not only very stable towards either heat or light, but also could yield singlet oxygen moderately. *In vitro* cell study demonstrates that both **6** and **7** could inhibit the growth of cancer cells in dark and also exhibit photodynamic therapy effect upon exposure to red light. These results show that these compounds have synergistic anticancer activities of photodynamic therapy and chemotherapy effects.

Keywords: Cu(II) phthalocyanine; Ni(II) phthalocyanine; singlet oxygen; phototoxicity

0 引 言

当今,集多效于一体的抗癌药物是现代肿瘤治疗的新兴研究热点。通过将不同治疗机理应用到同一药物中,可以发挥不同治疗手段的协同作用,从而达到高效抗癌活性^[1-6]。

光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)是一种 20 世纪 70 年代发展起来的癌症治疗手段,它利用

光激发癌细胞内部吸收的光敏剂,产生高细胞毒性的单线态氧,从而在细胞内部杀死癌细胞,以达到治疗肿瘤目的^[7-8]。与传统癌症治疗手段相比,这种疗法可以避免对正常组织造成伤害,且不会在体内积累,可以反复治疗,并能与其他疗法同时使用。PDT 光敏剂中,酞菁由于其理化性质稳定,在红光有强吸收,单线态产率高以及皮肤光敏作用短等特点,是继临床应用最广泛的卟啉类光敏剂之后最具

收稿日期:2017-10-31。收修改稿日期:2018-03-30。

山东省自然科学基金(No.ZR2016BM16)和山东大学基础研究基金(No.2015JC036)资助项目。

*通信联系人。E-mail:weiliu@sdu.edu.cn

有应用潜力的新生代光敏剂之一^[9-11]。其中,部分酞菁类配合物已经应用到一期和二期临床试验中,并表现出良好的抗肿瘤效果。

另一方面,自从 20 世纪 60 年代末顺铂被发现具有良好的肿瘤抑制作用以来,基于金属配合物的抗癌药物的研究日益引起人们的重视。近年来众多研究结果已证实铜、镍、钴、钼、钯、镍等金属及其配合物同样具有良好的抗肿瘤、抗菌等活性^[12-14]。其中,铜和镍作为生命必须微量元素,参与到多项生命活动中,扮演着重要的角色。因此,关于铜和镍配合物的抗菌及抗癌活性的研究已经成为抗肿瘤药物的研究重点之一,并逐渐吸引愈来愈多的药物工作者的研究兴趣。但是,迄今为止,关于酞菁类抗癌药物的研究主要集中在锌、硅等酞菁上,对于铜、镍、钴、钼、钯、镍等过渡金属酞菁的抗癌活性的研究至今鲜见报道^[15]。

鉴于铜、镍金属配合物的抗菌和抗肿瘤效应,我们首次合成水溶性铜(CuPc)、镍酞菁(NiPc)配合物,在对其进行了表征的基础上研究了其光化学物理特性以及对肿瘤细胞杀伤力。以期将金属配合物的抗癌活性与光动力治疗特性相结合,得到集多效为一体的抗癌药物。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

所用仪器有:Bruker AVANCE 300 MHz 核磁共振仪;Thermo NEXUS 670 IR Spectrometer 红外光谱仪;Vario EI III 元素分析仪;PerkinElmer Diamond TG/DTA Analyzer 热重分析;Perkin Elmer Lambda 35 紫外-可见光谱仪;Shimadzu AXIMA-CFR PLUS 质谱仪;Bio-TEK ELX 800 microplate reader 酶标仪。

实验中所用试剂均为分析纯,反应中所有溶剂都按照溶剂手册进行蒸馏除水。

1.2 合成

1.2.1 前置配体 3 的合成^[16]

称取 4,5-二氯邻苯二腈(2.0 g, 10.2 mmol),与 5-羟基间苯二甲酸甲酯(4.3 g, 20.4 mmol)混合,加入碳酸钾(16.6 g, 0.12 mol)、DMF(45 mL),65 °C 条件下反应 16 h。减压抽干 DMF,加水过滤得浅棕色固体。将粗产物在甲醇中重结晶,真空干燥,得到白色固体即为化合物 3。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, TMS): δ 8.56~8.55 (br, 2H, Ar-H), 7.83~7.82 (br, 4H, Ar-H), 7.33~7.26(br, 2H, Ar-H), 3.97(s, 12H, CH₃)。

1.2.2 铜酞菁 4 的合成

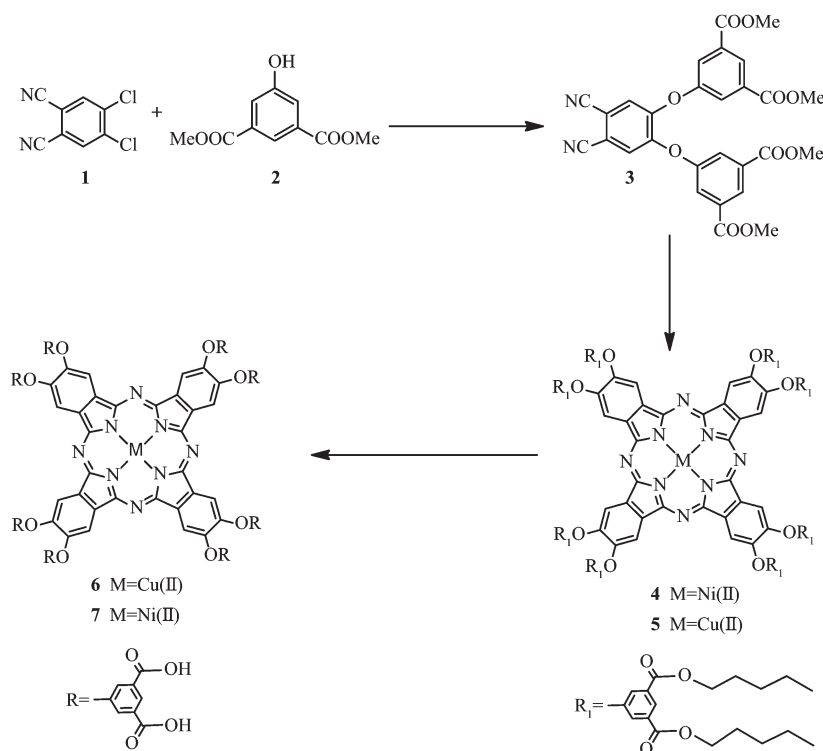
将化合物 3(0.52 g, 0.96 mmol)、100 μ L 的 DBU、10 mL 正戊醇混合,升温至 150 °C,氮气保护下反应 15 h,得到墨绿色溶液后,往体系中加入乙酸铜(0.85 g, 4.40 mmol),5 h 后停止反应。减压蒸馏,60 °C 条件下抽干戊醇。加入适量甲醇超声后,过滤得到绿色固体,将得到的固体使用硅胶柱进行柱色谱分离提纯,洗脱剂为氯仿+乙酸乙酯(20:1, V/V)。得到铜酞菁 4 为 255 mg,产率为 34%。MALDI-TOF/MS: C₁₇₆H₂₀₈N₈O₄₀Cu [M⁺], *m/z*: 计算值 3 136.37, 实验值 3 136.61。元素分析按 C₁₇₆H₂₀₈N₈O₄₀Cu 计算值(%):C 67.34;H, 6.68 N, 3.57;实验值(%):C 67.1;H 6.0;N 3.1;UV-Vis(CHCl₃, $\lambda_{\max}$ /nm):344, 610, 646, 677。

1.2.3 镍酞菁 5 的合成

将化合物 3(0.52 g, 0.96 mmol)、乙酸镍(0.08 g, 0.45 mmol)混合,加入 100 μ L 的 DBU 和 10 mL 正戊醇,氮气保护下升温至 150 °C 反应 10 h。反应结束后进行减压蒸馏,60 °C 条件下抽干戊醇,在反应瓶中加满甲醇,超声过滤,收集到的滤渣,以氯仿+乙酸乙酯(10:1, V/V)为洗脱剂进行柱色谱分离提纯。得到绿色固体 5 为 304 mg,产率为 40%。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, TMS): δ 8.60(s, 8H, Ar-H), 8.15(s, 8H, Ar-H), 7.99(s, 16H, Ar-H), 4.19(m, 32H, 16OCH₂), 1.69~1.65(m, 32H, 16CH₂), 1.31~1.20(m, 64H, 16CH₂CH₂), 0.76~0.73(t, *J*=5.3 Hz, 48H, 16CH₃);MALDI-TOF/MS: C₁₇₆H₂₀₈N₈O₄₀Ni [M⁺], *m/z*: 计算值 3 131.38, 实验值 3 131.39;元素分析按 C₁₇₆H₂₀₈N₈O₄₀Ni 计算值(%):C 67.4, H 6.7, N 3.4;实验值:C 67.6, H 6.7, N 3.4;UV-Vis(CHCl₃, $\lambda_{\max}$ /nm):297, 603, 641, 667。

1.2.4 水溶性铜酞菁 6 和镍酞菁 7 的合成

按照甲醇+水 (10:1, V/V) 的比例配制溶液 400 mL,往其中加入 50.0 g 氢氧化钠配成饱和氢氧化钠溶液。将配好的饱和溶液转移到反应釜中,将 CuPc 4 或者 NiPc 5(0.10 mmol)用少量 THF(5 mL)溶解,逐滴加入到上述的碱溶液中,搅拌升温至 45 °C,氮气保护下反应 6 h。反应结束后过滤,粗产物用 100 mL 去离子水溶解后用 1 mol·L⁻¹ 的稀盐酸溶液调节 pH 值为 2~3,溶液中有大量蓝色沉淀出现,将得到的沉淀离心收集,用水反复冲洗。真空下除去残留的溶剂,得到目标产物。CuPc 6;MALDI-TOF/MS: C₉₆H₄₈N₈O₄₀Cu[M+H⁺], *m/z*: 计算值 2 016.13, 实验值 2 016.51;IR (cm⁻¹):2 918, 2 805, 2 567, 1 699, 1 591, 1 508, 1 455, 1 407, 1 273, 1 221, 1 173, 1 144, 1 092,



Scheme 1

1 042, 1 001, 971, 892, 827, 759, 747, 667; 元素分析按 $\text{C}_{96}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_{40}\text{Cu}$ 计算值(%): C 57.2, H 2.4, N 5.6; 实验值: C 59.6, H 2.2, N 5.3; UV-Vis(DMF, λ_{max} /nm): 351, 612, 647, 685。NiPc 7: ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6 , TMS): δ 13.04(br, 16H, COOH), 8.63(s, 8H, Ar-H), 7.97(s, 8H, Ar-H), 7.84(s, 16H, Ar-H); MALDI-TOF/MS: $\text{C}_{96}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_{40}\text{Ni}[\text{M}+\text{H}^+]$, m/z : 计算值 2 011.13, 实验值 2 011.32; IR(cm^{-1}): 3 076, 2 607, 1 706, 1 593, 1 536, 1 458, 1 417, 1 354, 1 278, 1 147, 1 094, 1 054, 1 001, 973, 887, 831, 753, 668; 元素分析按 $\text{C}_{96}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_{40}\text{Ni}$ 计算值(%): C 57.30, H 2.40, N 5.57; 实验值(%): C 57.6, H 2.1, N 5.5。UV-Vis(DMF, λ_{max} /nm): 303, 608, 645, 672 nm。

1.3 单线态氧测试

以 1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF)为单线态氧捕获剂,光源使用 150 W 配有 610 nm 截止型滤光片($\lambda > 610$ nm)的卤素灯。以 30 s 为一个时间间隔使用光源照射,记录溶液的紫外可见光谱。单线态氧量子产率计算公式如下:

$$\Phi_{\Delta\text{sample}} = \Phi_{\Delta\text{ZnPc}} \frac{K_{\text{DPBF, sample}}}{K_{\text{DPBF, ZnPc}}} \frac{A_{\text{ZnPc}}}{A_{\text{sample}}}$$

其中, $K_{\text{DPBF, sample}}$ 和 $K_{\text{DPBF, ZnPc}}$ 分别为样品和 ZnPc 存在时 DPBF 分解速率常数, A_{sample} 和 A_{ZnPc} 分别为样品和 ZnPc 在 610~720 nm 波长范围内的 Q 带吸收峰的

面积, $\Phi_{\Delta\text{ZnPc}} = 0.56$ 。

1.4 生物测试

1.4.1 细胞培养条件

实验所用细胞为宫颈癌细胞 Hela, 培养条件为: 培养环境为温度 37 °C, 5%(V/V)二氧化碳的恒温培养箱, 培养基使用添加了 10% 小牛血清和 1% 双抗(青霉素 100 units·mL⁻¹, 链霉素 100 μg ·mL⁻¹)的 DMEM 高糖培养基。使用细胞计数板对培养基中的细胞进行计数, 使得培养基中细胞浓度 10⁵ mL⁻¹。取培养基加入 96 孔板, 每孔 100 μL , 将加好细胞的孔板放入恒温培养箱培养过夜。

1.4.2 抗癌活性实验

合成的 CuPc 6 和 NiPc 7 酞菁样品溶于磷酸盐缓冲溶液(PBS)中配制成母液, 然后用细胞培养液稀释到所需要的浓度。金属盐对照组 CuCl_2 、 NiCl_2 溶于 PBS 中。不同浓度的样品在 96 孔培养板中与细胞共同培养 4 h、24 h 后移除, 以 PBS 洗细胞 3 次, 光照组加入培养基后用 LED 光源连续照射 20 min(总能量 24 J·cm⁻²), 然后继续恒温培养 24 h; 避光组、金属盐对照组除光照外, 其他步骤相同。最后, 每孔中加入 20 μL 浓度 5 mg·mL⁻¹ MTT 的 PBS, 再次恒温培养 4 h 后, 每孔加入 200 μL DMSO, 在水平摇床上晃动 20 min。使用酶标仪测试孔板在 492 nm

处的吸光度。作图并计算细胞的成活率。

1.4.3 细胞吸收实验

将培养好的 HeLa 细胞利用细胞计数板对培养基中细胞进行计数,使培养基中的细胞数目约为 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 。稀释好的细胞液加入直径为 35 mm 的 6 孔板中,每孔加 1 mL,每个样品平行培养 3 组作为平行实验。接着将孔板放入恒温培养箱中培养过夜,使得细胞贴壁。将细胞完全贴壁的孔板取出,吸出培养基,向培养皿中加入含样品 (浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的培养基 1 mL,恒温培养 4 h。取出孔板,吸出其中的培养基,用 PBS 冲洗 3 次,利用细胞刮板将细胞小心刮起,分别转移到 2 mL 的离心管中冷冻干燥。细胞液冻干后,向每个离心管中加入 DMF 溶液 400 μL ,超声 30 min。随后用离心机离心,设置转速 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 4 min,将细胞器以及细胞碎片完全除去,随后测定上清液的紫外吸收光谱并计算细胞中样品的含量。

2 结果与讨论

2.1 合成

通过在酞菁骨架上引入水溶性基团,可以减弱酞菁分子间的 $\pi-\pi$ 相互作用,有效改善溶解性能。本文首先以金属盐为模板,通过配体 4,5-(3,5 二甲氧基羰基) 苯氧基邻苯二腈 **3** 的对称合成得到金属酞菁。在合成 CuPc **4** 时发现,不同于以往配体、DBU、溶剂、金属盐同时加入的模板反应,铜酞菁的产率极低。然后,我们将反应步骤改为在无金属盐存在下,以前置配体、DBU、溶剂先合成非金属酞菁,然后再加入金属盐合成金属酞菁,这种方法较大地提高了铜酞菁的纯度和产率。分析原因为,前置配体 **3** 中的大量酯基会参与到 Cu(II) 的配位中,

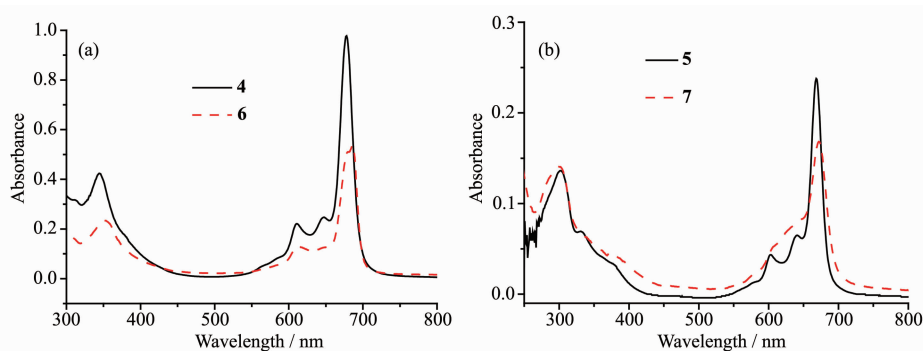
从而影响到铜离子的模板的作用,降低了前置配体的成环率。然而,同样的情况下,在镍酞菁 **5** 的合成过程中,同时加入原料、催化剂和金属盐,对镍酞菁的成环率影响不大。

水溶性酞菁的合成则是分别以铜酞菁 **4** 和镍酞菁 **5** 原料,在强碱性条件下发生水解反应,粗产物再用盐酸调节 pH 值为 2~3,由于羧基在酸性溶液中被质子化,从而从水中沉淀出来,最后得到 CuPc **6** 和 NiPc **7** (Scheme 1)。

2.2 紫外-可见光谱分析

图 1 为未水解的 CuPc **4** 和 NiPc **5** 在 CHCl_3 溶液中和水解后 CuPc **6** 和 NiPc **7** 在水中的紫外可见吸收谱图对比。可以看出,**6** 在水中与 **4** 在 CHCl_3 中表现出相似的峰型,为非常典型的酞菁非聚集态谱图(图 1a)^[8-9],证明其能够在无任何助溶剂存在下就能以单体的形式存在,是一类全水溶性酞菁。铜酞菁 **4** 和 **6** 的 B 带吸收峰分别位于 344 和 351 nm, Q 带吸收峰位于 677 和 685 nm,显示水解后酞菁 **6** 在水中的吸收峰具有约 10 nm 的红移。镍酞菁相比较于铜酞菁,其吸收峰值发生了一定量的蓝移。镍酞菁 **5** 和 **7** 的 B 带吸收峰位都位于 300 nm, Q 带吸收峰分别位于 668 和 672 nm(图 1b),显示水解后的镍酞菁在水中的吸收峰同样发生红移。与铜酞菁 **6** 一样,镍酞菁 **7** 在水中同样以单体形式存在,是一类水溶性酞菁。而生物所用的培养液与生理环境相匹配,其 pH=7.4,在该 pH 值下,酞菁上的羧基被水解成为羧酸根,所以该类酞菁具有优异的水溶性。

另外,浓度-吸收关系测试说明,CuPc **6** 和 NiPc **7** 溶液的吸光度与样品浓度满足朗伯-比尔定律(图 2),所以在细胞吸收实验中我们可以依据该线性关系,通过吸收值来确定细胞对的样品的吸收。



Solvent: CHCl_3 for **4** and **5**, H_2O for **6** and **7**

图 1 (a) 水解前铜酞菁 **4** 和水解后铜酞菁 **6** 的紫外光谱; (b) 水解前镍酞菁 **5** 和水解后镍酞菁 **7** 的紫外光谱

Fig.1 (a) UV-Vis absorption spectra of CuPc **4** and **6**; (b) UV-Vis absorption spectra of NiPc **5** and **7**

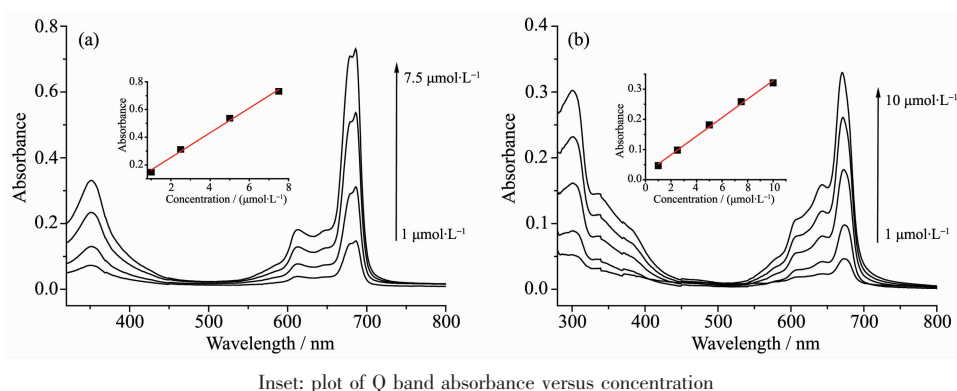


图2 铜酞菁 6 (a)和镍酞菁 7 (b)在 DMF 中的紫外吸收光谱

Fig.2 Electronic absorption spectra of CuPc 6 (a) and NiPc 7 (b) in DMF

2.3 单线态氧测试

将 DPBF 配制成浓度为 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DMF 溶液,分别加入样品 CuPc 6 或 NiPc 7,使酞菁最终浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,以 30 s 为一个时间间隔使用光源照射,测试溶液的紫外可见光谱。如图 3 所示,随着光照时间的延长溶液中 DPBF 吸收峰逐渐减小,而酞菁的吸收峰没有明显的变化,这说明在这一光照条件下,铜酞菁都能够有效产生单线态氧,同时自身不会分解。图 4 为铜酞菁 6 和镍酞菁 7 单线态氧产率比较,从图中可以看出,CuPc 6 的单线态氧产率明显高于 NiPc 7。

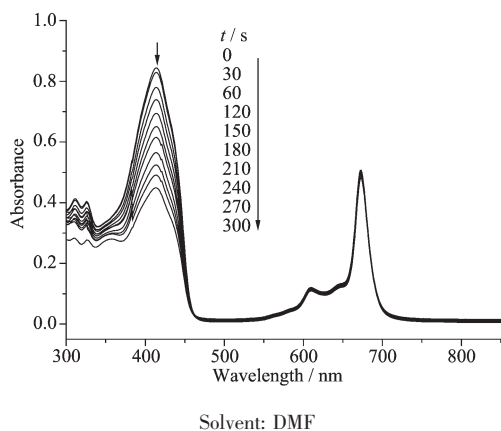


图3 单线态氧测试过程中 DPBF 中加入 CuPc 6 时吸收峰随光照时间的变化

Fig.3 Absorption changes of DPBF upon exposure to red light in the presence of CuPc 6 for determination of singlet oxygen generation

2.4 稳定性测试

2.4.1 光稳定性测试

在光照下酞菁如果能保持自身结构的完整性,具有良好的稳定性,那么在光动力治疗过程中酞菁

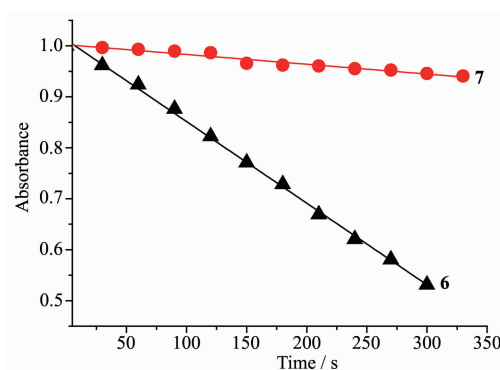


图4 DPBF 在 CuPc 6 或 NiPc 7 存在时吸收峰值 (415 nm) 随时间的变化

Fig.4 Absorbance of DPBF (415 nm) changes over time in the presence of CuPc 6 or NiPc 7

就不发生分解,保证药物作用的持续性,所以光稳定性是光敏剂的重要指标之一。将 CuPc 6、NiPc 7 和 ZnPc 分别溶于 DMF 中,使用配有 610 nm 截止型滤波片($\lambda > 610 \text{ nm}$)的卤素灯光源进行测试。每隔 10 min 测定酞菁溶液的吸光度的变化,以 ZnPc 作为对照组,可以判断 CuPc 6 和 NiPc 7 两种样品的光稳定性。测试结果表明,在相同的实验条件下,用来作为对比的 ZnPc 随着光照时间的延长大量分解,60 min 时已经分解 50%,而合成的 CuPc 6 和 NiPc 7 在光照 60 min 后没有明显分解,具有更强的光稳定性(图 5)。

2.4.2 热稳定性测试

为了分析该类酞菁的热稳定性,我们对其做了热重分析。以铜酞菁为例,水解前和水解后的铜酞菁热重曲线如图 6 所示。可以看出,铜酞菁 4 由于大量烷基碳链的存在,开始分解温度大约为 370°C 。对于水解后的铜酞菁 6,在 400°C 以后才开始分解,比铜酞菁 4 初始分解温度有提高。总的来说,该

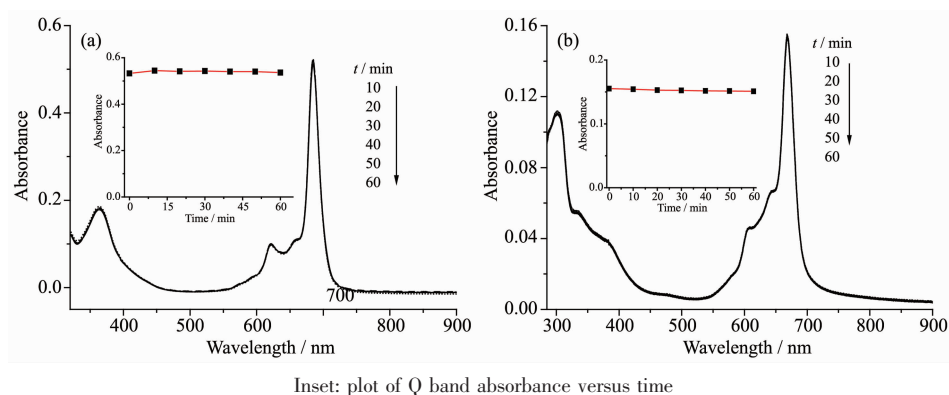


图 5 铜酞菁 **6** (a)和镍酞菁 **7** (b)在 DMF 溶液中不同光照时间下的紫外可见光谱图

Fig.5 UV-Vis absorption spectra of CuPc **6** (a) and NiPc **7** (b) under different illumination times in DMF

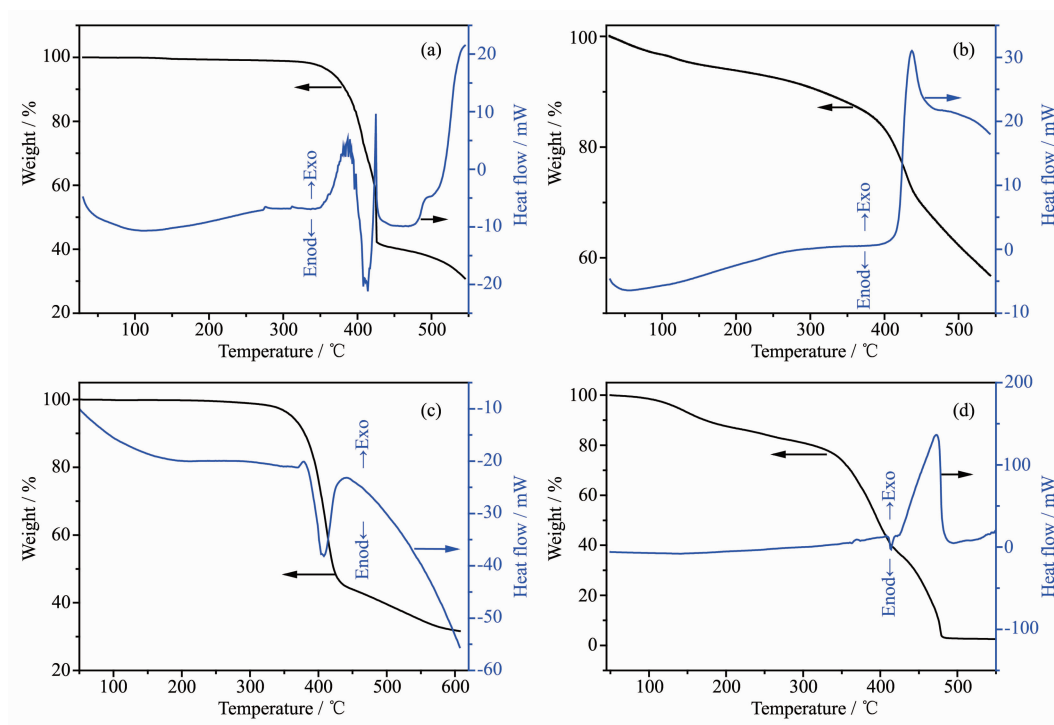


图 6 铜酞菁 **4** (a)与 **6** (b)和镍酞菁 **5** (c)与 **7** (d)的热重分析(TG-DTA)曲线

Fig.6 TG-DTA curves of CuPc **4** (a), **6** (b) and NiPc **5** (c), **7** (d)

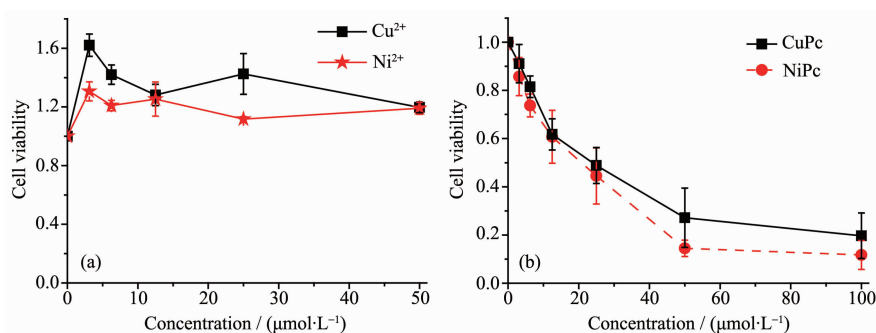
类酞菁对热是十分稳定的。

2.5 细胞实验

2.5.1 避开肿瘤细胞抑制测试

在该部分实验中选用了宫颈癌细胞 HeLa 作为细胞主体。为了更好的比较该类铜酞菁 **6** 和镍酞菁 **7** 对癌细胞的抑制作用,同时测试了铜离子(Cu^{2+})和镍离子(Ni^{2+})对 heLa 细胞的毒性。从图 7a 可以看出,铜离子(Cu^{2+})和镍离子(Ni^{2+})样品与细胞共同培养时间为 4 h 后,即使浓度达到 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,2 种金属离子对于癌细胞抑制效果仍然很微弱。这主要是由于在生理 $\text{pH}=7.4$ 下,铜和镍离子都几乎以沉淀形式

析出,所以直接利用金属离子进行抗癌是不可行的。与之对比,2 种酞菁的金属配合物表现出随浓度增加而增强的肿瘤细胞抑制作用。从图中可以看出 24 h 培养后,铜酞菁 **6** 的 IC_{50} 值为 $23.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,镍酞菁 **7** 的 IC_{50} 值为 $19.73 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,类似于文献报道联吡啶类和甲醛缩氨基硫脲铜、镍配合物 48 h 的细胞实验数据^[17-18]。证实本文合成的金属酞菁类化合物具有良好抗肿瘤活性。这从另一方面也可以说明,铜镍离子与酞菁形成的配合物不仅水溶性好、生物相容性高,而且更有利于肿瘤细胞的吸收,从而表现出对肿瘤细胞良好的抑制效果。

图 7 (a) 铜、镍离子和(b) 铜、镍酞菁配合物 **6**、**7** 对 Hela 细胞的浓度-抑制关系曲线Fig.7 Comparison of cytotoxic effect of Cu²⁺, Ni²⁺ (a) and CuPc **6**, NiPc **7** (b) towards Hela cells

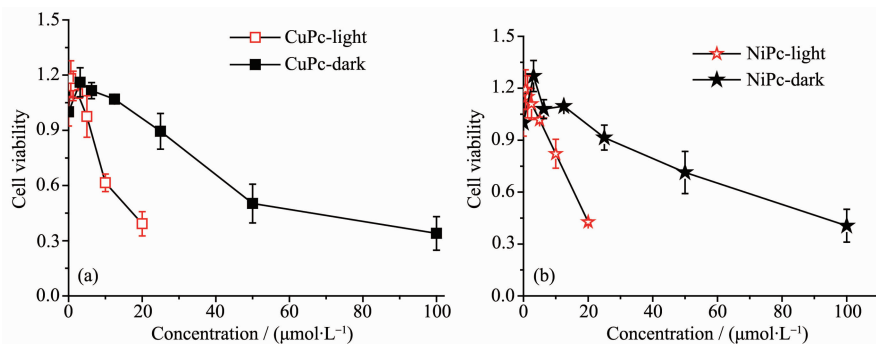
2.5.2 光照下肿瘤细胞抑制测试

为了有效地显示该类铜、镍酞菁对肿瘤细胞的抑制作用和光动力治疗的联合效应,测试了光照条件下铜酞菁 **6** 和镍酞菁 **7** 对癌细胞的抑制作用。从图 8 可以看出,培养 4 h 后,铜、镍酞菁在避光条件下的细胞抑制作用依然表现出随浓度增加而增强的肿瘤细胞抑制作用。只是与培养 24 h 的结果相比,CuPc **6** 和 NiPc **7** 的 IC₅₀ 值均显著提升。表明避光下,铜、镍酞菁的细胞的抑制作用与培养时间同样具有依赖关系。所以,延长培养时间是提高该类配合物肿瘤细胞抑制作用的有效途径。

在共同培养 4 h 后,样品被移除,以 PBS 洗细胞 3 次,光照组加入培养基后用 660 nm LED 光源连续照射 20 min。当在红光的照射下,2 种样品表现出相应的光毒性,较低浓度下均能有效杀死细胞,20

μmol·L⁻¹ 时 CuPc **6** 和 NiPc **7** 均能够杀死 70%左右的肿瘤细胞。光照下,CuPc **6** 的 IC₅₀ 为 14.9 μmol·L⁻¹,NiPc **7** 的 IC₅₀ 值为 18.5 μmol·L⁻¹,与避光 IC₅₀ 相比,均表现出了显著的降低。同时,该数值同样低于避光下 24 h 的暗毒性的 IC₅₀ 结果。所以,光照能明显提升铜、镍酞菁杀死癌细胞的能力,说明该类化合物具有化疗与光动力治疗抗癌的协同作用。

需要提及的是,从前面的单线态氧测试数据上看,镍酞菁的单线态氧产率明显小于铜酞菁。但是光照实验却表明在相同的培养浓度下,它们却具有很相近的光动力治疗效果。因此,对该类铜、镍酞菁在细胞中的吸收进行了对比。测试结果表明,Hela 细胞对 NiPc **7** 的吸收量明显高于 CuPc **6**,前者约为后者的 3 倍,这可能是镍酞菁具有良好的光动力治疗效应的一个原因。

图 8 不同浓度下的 CuPc **6** (a)和 NiPc **7** (b)在光照(☆)和避光(★)条件下对 Hela 细胞的毒性Fig.8 Comparison of cytotoxic effect of CuPc **6** (a) and NiPc **7** (b) toward Hela cells in the presence (☆) and absence (★) of light

3 结 论

以邻苯二腈法合成了全水溶性铜酞菁 **6** 与镍酞菁 **7**。由于铜(II)与前置配体中的酯基有较强的配位作用,先加入前置配体和催化剂待其反应成环后,再加入金属盐,是提高铜酞菁的纯度和产率的

有效方法。同样的情况下,加料顺序对镍酞菁的成环反应影响较小。

铜酞菁 **6** 与镍酞菁 **7** 在水溶液中能够以单体形式存在,水溶性好、生物相容性好,并具有很强的光稳定性和热稳定性。单线态氧测试结果表明铜酞菁 **6** 与镍酞菁 **7** 均能有效的产生单线态氧,其中铜

酞菁的单线态氧产率明显高于镍酞菁。细胞实验显示,铜酞菁 **6** 与镍酞菁 **7** 在避光下均表现出对肿瘤细胞的有效抑制作用。同时光照条件下 IC_{50} 值明显小于避光条件,这说明铜酞菁 **6** 与镍酞菁 **7** 表现出较强的光动力治疗效果,进一步证实合成的金属酞菁具有化疗-光动力治疗协同作用,是一类具有潜在应用价值的多功效抗癌药物。

参考文献:

- [1] Bio M, Rajaputra P, Nkepang G, et al. *J. Med. Chem.*, **2014**, **57**(8):3401-3409
- [2] Canti G, Nicolin A, Cubeddu R, et al. *Cancer Lett.*, **1998**, **125**(1/2):39-44
- [3] Conte C, Ungaro F, Maglio G, et al. *J. Controlled Release*, **2013**, **167**(1):40-52
- [4] Vivero-Escoto J L, Elnagheeb M. *Nanomaterials*, **2015**, **5**(4): 2302-2316
- [5] Lu H L, Syu W J, Nishiyama N, et al. *J. Controlled Release*, **2011**, **155**(3):458-464
- [6] Liang R Z, You S S, Ma L N, et al. *Chem. Sci.*, **2015**, **6**(10): 5511-5518
- [7] Beverina L, Abbotto A, Landenna M, et al. *Org. Lett.*, **2005**, **7**(19):4257-4260
- [8] Gu H W, Xu K M, Yang Z M, et al. *Chem. Commun.*, **2005**, **34**:4270-4272
- [9] Ke M R, Chen S F, Peng X H, et al. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, **127**:200-209
- [10] Luan L Q, Ding L L, Shi J W, et al. *Chem. Asian J.*, **2014**, **9**:3491-3497
- [11] DING Lan-Lan(丁兰兰), LUAN Li-Qiang(栾立强), SHI Jia-Wei(施佳伟), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2013**, **29**(8):1591-1598
- [12] Zhou W, Wang X, Hu M, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2013**, **121**:114-120
- [13] GAO Ping-Zhang(高平章), CHEN Ya-Xin(陈雅心), ZHANG Min-Min(郑敏敏), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2016**, **32**(9):1572-1578
- [14] ZHANG Qi-Long(张奇龙), WANG Huan-Yu(王焕宇), JIANG Feng(江峰), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2016**, **32**(3):464-468
- [15] Mantareva V, Angelov I, Kussovski V, et al. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, **46**:4430-4440
- [16] Liu W, Jensen T J, Fronczek F R, et al. *J. Med. Chem.*, **2005**, **48**(4):1033-1041
- [17] Deka B, Sarkar T, Banerjee S, et al. *Dalton Trans.*, **2017**, **46**(2):396-409
- [18] Belicchi F M, Bisceglie F, Pelosi G, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, **90**(3/4):113-126