

联吡啶衍生物芳基钌配合物的合成及其与 DNA、蛋白质相互作用

葛 超¹ 王红艳¹ 董益利¹ 李 季¹ 徐 芸¹ 顾秋予¹

苏 志¹ 钱 勇^{*,1} Peter J. Sadler² 刘红科^{*,1}

(¹ 南京师范大学化学与材料科学学院, 南京 210023)

(² Department of Chemistry, University of Warwick, Gibbet Hill Road, Coventry CV4 7AL, UK)

摘要: 以 2 种配体 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine (L1) 和 4'-methyl-(2,2'-bipyridine)-4-carbaldehyde oxime (L2), 分别与芳基钌二聚体 $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})]_2$ 合成了 2 种新型单核配合物 $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**1**) 和 $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{L2})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**2**)。应用元素分析、ESI-MS 和 ¹H NMR 对配合物的组成和结构进行表征, 通过紫外光谱法和荧光光谱法研究了配合物的水解及其与 CT-DNA 和血清蛋白的结合性质, 并且进行了细胞毒性研究。结果表明, 在水溶液中配合物 **1** 比 **2** 在动力学上更稳定 ($k: 0.383 \text{ h}^{-1}$ (**1**), 1.458 h^{-1} (**2**)); 配合物均通过嵌入作用与双链 DNA 结合, 但 **2** 有较强的结合能力 ($K_b: 7.8 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (**1**), $1.86 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (**2**))。配合物均能与蛋白质发生相互作用, 引起蛋白静态猝灭, 但 **1** 作用较强 ($K_A: 1.04 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (**1**), $8.62 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (**2**))。配合物与蛋白的较强结合能力, 可能是其细胞毒性不高的原因。

关键词: 芳基钌; 联吡啶; DNA/BSA 结合作用

中图分类号: O614.82⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2018)06-1079-07

DOI: 10.11862/CJIC.2018.148

Ru(II)-Arene Complexes Based on Bipyridyl Derivatives Ligand: Syntheses, Characterization and Interaction with DNA/BSA

GE Chao¹ WANG Hong-Yan¹ DONG Yi-Li¹ LI Ji¹ XU Yun¹ GU Qiu-Yu¹

SU Zhi¹ QIAN Yong^{*,1} Peter J. Sadler² LIU Hong-Ke^{*,1}

(¹ School of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(² Department of Chemistry, University of Warwick, Gibbet Hill Road, Coventry CV4 7AL, UK)

Abstract: Two novel ruthenium-arene complexes of general formula $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{L})\text{Cl}]\text{Cl}$, where L=4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine (**1**), 4'-methyl-(2,2'-bipyridine)-4-carbaldehyde oxime (**2**), were synthesized. They were characterized by elemental analysis, mass spectrometry and ¹H NMR spectroscopy. The hydrolytic property and binding activity of complexes with CT-DNA and serum proteins were detected by UV spectroscopy and fluorescence spectroscopy; the cytotoxic assay was also conducted. The results indicated that **1** is more dynamically stable in the aqueous solution than **2**. Complexes **1** and **2** bind to DNA double helix structure via intercalation with the binding constants of $7.8 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (**1**) and $1.86 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (**2**), respectively. These complexes also exhibit strong interaction with protein and cause quiescent quenching of proteins with the binding constants of $1.04 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (**1**) and $8.62 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (**2**), respectively. Strong binding ability between complexes and protein may be the reason of low cytotoxicity.

Keywords: ruthenium-arene; bipyridine; DNA/BSA binding

收稿日期: 2017-11-06。收修改稿日期: 2018-04-23。

国家自然科学基金重点国际合作项目(No.21420102002), 自然科学基金(No.21601088, 21771109, 21778033), 江苏省 333 工程人才专项基金, 江苏省六大人才高峰和江苏省自然科学基金(No.BE2013716, BK20171472)资助。

*通信联系人。E-mail: liuhongke@njnu.edu.cn, 07250@njnu.edu.cn

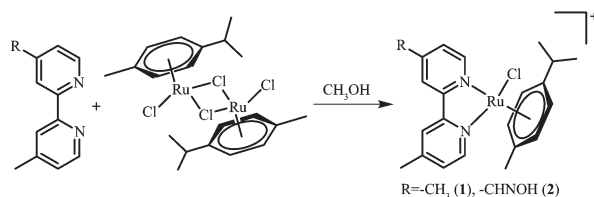
0 引言

1965 年,美国科学家 Rosenberg 首次发现顺铂能够抑制细胞生长并开展了抗肿瘤实验研究^[1]。由于顺铂的抗药性及毒副作用,人们将研究扩展到了过渡金属配合物抗癌方面,已报道了很多新型具有低毒、高效抗癌活性的金属(如铂、钯、铑、铱、钇、钆等元素)配合物,其中钌配合物抗癌成为研究热点^[2]。Sadler 等发现双核芳基钌配合物对光敏感,具有结合光诱导细胞死亡和光活化荧光成像的潜力^[3]。Dyson 等设计了一系列的含膦配体的芳基钌配合物并研究芳烃结构变化对抗癌活性的影响^[4]。

在螯合配体中,吡啶类化合物由于容易进行化学修饰得到系列衍生物,比其它氮杂环化合物更有优势,其与芳基钌配位一般有 2 种方式, N,N 配位及 C,N 配位。值得注意的是,含有 N,N-螯合配体的芳基钌配合物不仅在催化反应中表现优异,而且它们良好的抗癌活性也令人瞩目^[5-6]。Sheldrick 和同事已经报道了一系列具有 N,N-螯合多吡啶基配体的铑和铱配合物^[7],它们表现出良好的细胞毒性并通过配位、插入或双重结合的方式与 DNA 作用^[8]。

抗癌配合物水解速率的大小对抗癌活性有重要影响,含有卤素离去基团的芳基钌配合物进入体内更容易在细胞质里发生水解而不是血液里,因为血液里 Cl⁻ 浓度比较高抑制了配合物的水解(大约 100 mmol·L⁻¹),而细胞质中的 Cl⁻ 浓度低(<25 mmol·L⁻¹),促进水解,水解后带正电荷的水解产物可能进入细胞核与带负电荷的 DNA 作用造成 DNA 损伤,从而导致癌细胞凋亡^[9]。DNA 是抗癌化合物在细胞内的主要靶标之一,核酸和其他分子之间的相互作用是生命科学中的基本问题^[10]。一些疾病的标志物质和 DNA 靶向药物的相互作用机制涉及基因的复制、转录、突变和物种的相关变异等^[11]。血清白蛋白是一种重要的生物分子,也是重要的血液蛋白质,其具有转运配体如脂肪酸、氨基酸、类固醇、金属离子和药物的能力^[12-13]。药物-白蛋白在血流中的结合能力对药物的活体分布、游离浓度、代谢和排泄性质有重要影响,同时也影响化疗过程中的药物稳定性和毒性^[14]。由于牛血清白蛋白与人血清白蛋白含 90% 的相同序列,性质差别小,其价格低,许多文献也用牛血清白蛋白进行实验,所以本文选择用牛血清白蛋白来研究配合物与蛋白的相互作用^[15]。

研究导致配合物抗癌活性降低的因素也具有



Scheme 1 Synthetic route and general structures of complexes **1** and **2**

特别重要的意义。通过对配合物的水解、与靶标物质如 DNA、蛋白等相互作用研究,可以让我们全面了解抗癌机理,进而在未来设计高效低毒配合物时避免不利因素^[10]。本文合成了 2 种单核芳基钌吡啶衍生物配合物 [Ru(η⁶-p-cymene)(L1)Cl]Cl (**1**) 和 [Ru(η⁶-p-cymene)(L2)Cl]Cl (**2**) (L1=4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine, L2=4'-methyl-(2,2'-bipyridine)-4-carbaldehyde oxime), 通过元素分析、ESI-MS 和 ¹H NMR 进行了表征。用 MTT 法测试了配体及配合物对癌细胞及正常细胞的毒性,并用紫外光谱法和荧光光谱法研究了配合物与 DNA、BSA 的作用。在上述结果基础上探讨了影响配合物抗癌活性的因素,将为研究新药物、新靶点、新机制提供参考。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

实验所用溶剂均采用分析纯试剂,根据实验需要,试剂在使用前均按照《实验室化学品纯化手册(第五版)》^[16]进行纯化。所有的反应均在氩气保护氛围下进行。4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine(L1)购自晚晴化学品公司。根据文献方法^[12-13]制备了配体 4'-methyl-(2,2'-bipyridine)-4-carbaldehyde oxime(L2)。除特殊要求,所有测试均在室温下进行。¹H NMR 采用 Bruker AVANCE 400 spectrometer(德国)测定,C、H、N 元素分析使用元素分析仪(vario EL III, 贺力氏公司,德国)测定,ESI-MS 使用 LCQ FLEET 电喷雾质谱仪(赛默飞世尔科技,美国)测定(Source Voltage 4.0 kV, Sheath Gas Flow Rate 8 arb, Capillary Voltage 70 V, Capillary Temp 275 K, 流动相为甲醇,流速为 200 pL·min⁻¹, 进样方式为直接进样,样品配成甲醇溶液),紫外吸收分光光谱仪为美国瓦里安公司生产的 Cary 50 仪器,荧光光谱是用 PerkinElmer Ls-55 荧光光谱仪测定。

1.2 配合物的合成与结构

1.2.1 [Ru(η⁶-p-cymene)(L1)Cl]Cl (**1**) 的合成

芳基钌二聚体 $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})]_2$ (122.4 mg, 0.2 mmol)、配体(L1) (73.6 mg, 0.4 mmol)溶于10 mL 甲醇中,在氩气氛围下,338 K 回流12 h。反应结束后通过柱层析分离, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (15:1, V/V)为洗脱剂,产量为85.2 mg,产率为43.5%。 ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz): 9.52(2H, d, pyridine), 8.03(2H, s, pyridine), 7.54(2H, d, pyridine), 6.17(2H, d, *p*-cymene), 6.02(2H, d, *p*-cymene), 2.70 (1H, dt, CH), 2.58 (6H, s, CH_3), 2.27 (3H, s, CH_3), 1.06(6H, d, CH_3)。ESI-MS: $[\text{1-Cl}]^+ m/z$ 的理论值为454.98,实验值为455.25。元素分析(%): $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{RuCl}_2$ 的理论值为C 53.88, H 5.34, N 5.71; 实测值为C 53.28, H 5.28, N 5.86。

1.2.2 $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{L2})\text{Cl}]\text{Cl}$ (2)的合成

将芳基钌二聚体 $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})]_2$ (122.4 mg, 0.2 mmol)、配体L2 (85.6 mg, 0.4 mmol)溶于甲醇中,在氩气氛围下,338 K 回流12 h。反应结束后通过柱层析分离, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:1, V/V)为洗脱剂,产量为83.7 mg,产率为40.3%。 ^1H NMR($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): 12.41 (1H, s, OH), 9.50 (1H, t, pyridine), 9.38 (1H, dd, pyridine), 8.70 (1H, d, pyridine), 8.53 (1H, s, pyridine), 8.35 (1H, d, pyridine), 7.89 (1H, dd, pyridine), 7.67 (1H, t, CH), 6.29~6.19 (2H, m, *p*-cymene), 6.02~5.91 (2H, m, *p*-cymene), 2.62~2.55 (4H, m, CH_3), 2.18 (3H, d, CH_3), 1.01~0.86 (6H, m, CH_3)。ESI-MS: $[\text{2-Cl}]^+ m/z$ 的理论值为483.98,实验值为484.25。元素分析(%): $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{ORuCl}_2$ 的理论值为C 50.87, H 4.85, N 8.09; 实测值为C 49.83, H 5.23, N 7.82。

1.3 配合物的水解

通过UV-Vis光谱测定配合物1、2的水解。将配合物溶于DMSO,浓度为 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,加水稀释,得浓度为 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液(溶剂体积比为 $V_{\text{DMSO}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=5:95$)。在298 K下,于波长200~800 nm范围用1 cm路径的石英比色皿测定,12 h内每隔15 min记录吸光度值。

1.4 配合物与CT-DNA的相互作用

将CT-DNA配制在磷酸盐缓冲液(PBS, $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0)中,储存在269 K温度下。用PBS适当稀释后,通过UV-Vis在波长为260 nm处用1 cm路径的石英比色皿测量吸光度值,确定CT-DNA的浓度($\epsilon=6\text{ }600\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。紫外吸光强度的比值(A_{260}/A_{280})约为1.9,表明DNA溶液不含蛋白质。滴定实验在室温下进行,用双通道进行测试,以相应浓度的CT-DNA作为空白对照。将 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 配

合物溶液置于1 cm路径的石英比色皿中保持浓度不变,加入等体积的 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ CT-DNA储备溶液,CT-DNA与配合物的浓度比例CT-DNA与配合物的浓度比例 r 依次为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0,CT-DNA的浓度分别为5、10、15、20、25、30、35、40、45、 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。CT-DNA与配合物混合7 min以达到平衡,于200~800 nm范围记录吸光度值。

1.5 配合物与血清白蛋白的相互作用

称取2 mg BSA,用pH=7.4的PBS溶解,加缓冲液稀释,配制浓度为 $3\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BSA溶液。将配合物溶于DMSO,使配合物的初始浓度为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,将配合物用pH=7.4的PBS稀释至 $1.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,滴定实验在室温下进行,将 $3\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BSA溶液置于1 cm路径的石英比色皿中,加入等体积的 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 配合物溶液,配合物与BSA的比例 r 依次为0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5,配合物的浓度分别为0、1.5、3.0、4.5、6.0、7.5、9.0、 $10.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。混合10 min达到平衡后,于样品的激发波长285 nm处测定荧光强度。

1.6 细胞毒性研究

实验选取了3种细胞系:人卵巢癌细胞(A2780),肺癌细胞(A549)和正常肝脏细胞(L02),来源于中山大学(中国,广州)动物实验中心。细胞在含10%的血清培养基RPMI1640(Gibco BRL)中 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养。配合物对癌细胞体外抗增殖活性试验方法为:取对数生长期的细胞,调整细胞悬液浓度为 $5\times 10^4\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬液接种于96孔细胞培养板中,预培养24 h。分别设空白对照组、细胞对照组以及4个浓度(12.5、25、50、 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)配合物药物组,孵育48 h。然后向每个孔中加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 噻唑蓝(MTT, $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,以PBS溶解), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养4 h。小心地除去培养基,向每个孔中加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ DMSO以溶解甲瓚晶体,避光放置30 min。使用酶标仪(Infinite M200, Tecan, Mannedorf, 瑞士)测定590 nm处的吸光度。计算配合物对癌细胞增殖(48 h)的半数抑制浓度(IC_{50})^[17-18]。

2 结果与讨论

2.1 细胞毒性研究

采用MTT法测定了配体L1和L2及配合物1、2对肺癌细胞(A549)、人卵巢癌细胞(A2780)和正常肝脏细胞(L02)细胞毒性(IC_{50})。由配合物 IC_{50} 结果(表

表 1 配体 L1、L2 及配合物 1、2 和顺铂的细胞毒性(IC₅₀)
Table 1 Cell toxicity of L1, L2 and complexes 1, 2 and cisplatin (IC₅₀)

Compound	$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		
	A2780	A549	L02
L1	142.82±4.97	11.83±1.71	174.67±2.36
L2	171.11±5.86	65.40±3.24	162.98±2.27
1	174.59±10.13	>200	100.87±1.16
2	>200	>200	177.23±1.87
Cisplatin	9.59±0.42	13.84±1.26	2.26±0.12

1)可以看出,配体 L1 和 L2 对肺癌细胞(A549)有较强的毒性,其中 L1 的细胞毒性($11.83 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)优于临床使用的抗癌药物顺铂($13.84 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),但他们对正常细胞毒性很小($>100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。配合物 **1** 和 **2** 对癌细胞 A2780、A549 和正常细胞 L02 基本没有毒性,远远低于顺铂的毒性。从上述结果可以看出,与对-伞花烃钌配位后,配合物 **1**、**2** 对癌细胞及正常肝脏细胞的毒性急剧降低($\sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。为了探究造成配合物抗癌活性降低的原因,我们研究了配合物的水解及其与蛋白、DNA 的相互作用。

2.2 配合物的水解

配合物的水解化学可以调控它们的药理学性质,包括细胞摄取、分布、与 DNA 结合、体内代谢和毒性等^[19-20]。通过紫外吸收光谱研究了 **1**、**2** 的水解(图 1)。配合物 **1** 在 250 nm 处有一肩峰,264 nm 处有较强的吸收峰可归属为混合 LLCT/MLCT(配体 $\pi-\pi^*$ /中心金属 d 轨道上的电子向配体 π^* 轨道的跃迁)跃迁,在 304 和 314 nm 处的较强吸收峰归属为 LLCT 跃迁;配合物 **2** 在 250 和 280 nm 处的较强吸收峰可归属为混合 LLCT/MLCT 跃迁,320 nm 处较

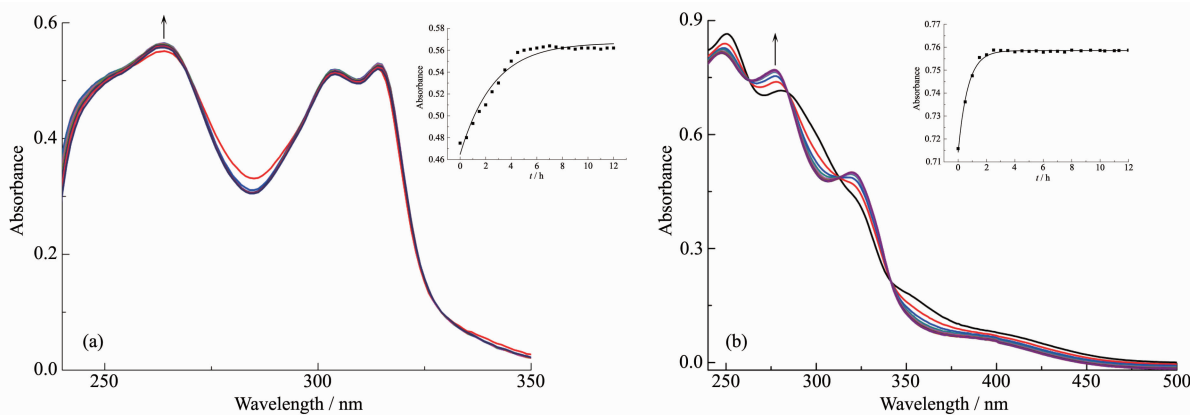
弱的吸收峰可归属为 LLCT 跃迁^[21]。2 个配合物的水解都是离去基团 Cl^- 与 H_2O 发生交换,有新物质生成,产物浓度的升高会导致吸收峰增强,而配合物浓度的降低则导致吸收峰减弱。配合物 **1** 水解时的吸收峰强度随着时间变化很小,最大吸收峰处的吸光度略微增加(从 0.551 增加到 0.557),说明 **1** 在水溶液中比较稳定,。配合物 **2** 水解时的吸收峰强度随时间变化比较明显,280 nm 吸收峰处的吸光度有较大增加(从 0.716 升至 0.759)。上述结果说明 2 个配合物水解反应不同,且配合物 **1** 水解速率比 **2** 慢。根据吸光度的变化,按准一级反应动力学^[22]计算出配合物 **1** 和 **2** 的水解速率常数分别为 0.383 和 1.458 h^{-1} ,半衰期分别为 1.81 和 0.47 h (表 2),与文献报道^[22]的水解方式一样。

配合物 **1**、**2** 的水解反应的速率不同可能与其

表 2 配合物 **1** 和 **2** 的水解常数

Table 2 Hydrolysis constant of complexes **1**, **2**

Complex	T / K	k / h^{-1}	$t_{1/2} / \text{h}$
1	298	0.383 ± 0.037	1.81
2	298	1.458 ± 0.039	0.47



$C_{\text{complex}} = 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{\text{DMSO}}:V_{\text{H}_2\text{O}} = 5:95$; $\uparrow$: Absorption of the complexes increased with time

图 1 配合物 **1** (a) 和 **2** (b) 在 DMSO 溶液中的紫外吸收光谱图

Fig.1 Absorption spectra of complexes **1** (a) and **2** (b) in the DMSO solution

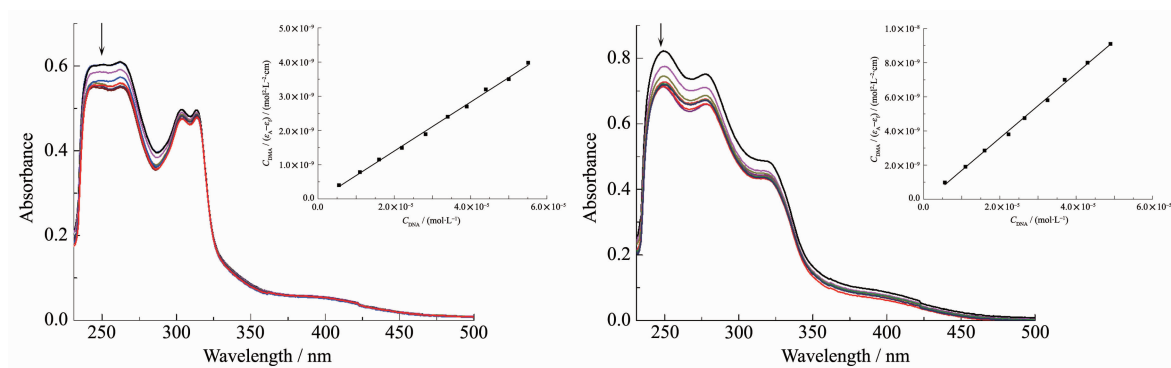
联吡啶整合配体有关,配体 L1 和 L2 的取代基分别为 $-\text{CH}_3$ 和 $-\text{CHNOH}$, $-\text{CHNOH}$ 为亲水基团,能增加配合物 **2** 的溶解度。

2.3 配合物与 CT-DNA 的相互作用

芳基钌配合物在细胞中的可能靶点是 DNA,研究 DNA 和金属配合物之间的相互作用在抗癌机制中至关重要^[23-24]。当配合物与 DNA 发生作用时,紫外光谱吸收峰会表现出减色现象,减色越明显表明配合物与 DNA 相互作用越强^[25]。通过紫外光谱法研究了配合物 **1**、**2** 与 DNA 相互作用。在 200~600 nm 范围测定配合物 **1**、**2** 与 CT-DNA 作用的吸收光谱(图 2)。结果发现 **1** 在 250、263、304 及 314 nm 处有吸收,最强吸收峰出现在 250 和 263 nm。配合物 **2** 在 250、280 及 314 nm 处有吸收,最强吸收峰出现在 250 和 280 nm。**1** 和 **2** 的紫外吸收强度随着 DNA 浓度的增加出现减色效应。配合物 **1** 和 **2** 的 ΔA 分别为 0.05 和 0.1,减色百分比分别为 8.3% 和 12.3%。**2** 的减色效果强于 **1**,出现这种差异的原因可能是联吡啶的取代基不一样^[26]。配合物通过嵌入作用与 DNA 结合后与碱基对发生 π 电子堆积,配体的 π^* 空轨道与 DNA 碱基对的 π 轨道发生偶合

导致能级下降,偶合后的 π^* 轨道部分填充电子,使其 $\pi-\pi^*$ 跃迁几率减小,从而产生减色效应^[27]。上述结果表明配合物可能通过嵌入作用与双链 CT-DNA 结合。Schatzschneider 等发现钌配合物紫外吸收峰波长的改变与联吡啶配体上的取代基有关,取代基会影响配体的 $\pi-\pi^*$ 的跃迁,取代基为吸电子基团时会使 $\pi-\pi^*$ 跃迁更容易^[25]。配合物 **1** 和 **2** 中联吡啶配体上的取代基分别为 $-\text{CH}_3$ 和 $-\text{CHNOH}$, $-\text{CHNOH}$ 为吸电子基,所以 **2** 的减色效果明显。

在紫外滴定实验基础上,利用以下公式计算了配合物 **1** 和 **2** 与 DNA 的结合常数 K_b : $C_{\text{DNA}}/(\varepsilon_a - \varepsilon_f) = C_{\text{DNA}}/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)$ 其中 ε_a 是表观吸收系数,根据朗博-比尔定律,应为 $A/(bC)$, ε_b 是完全结合 DNA 的消光系数, ε_f 是没有加 DNA 时配合物的消光系数^[28]。计算得到配合物 **1**、**2** 的结合常数分别为 7.8×10^3 和 $1.86 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,说明配合物 **2** 与 DNA 的结合能力较强。造成这种差别的原因可能是配体 L2 的取代基为 $-\text{CHNOH}$, $-\text{CHNOH}$ 是亲水基团,能增加配合物的溶解度,水解速度快。配合物 **1**、**2** 与 DNA 结合常数与文献报道的结果在同一个数量级^[29],也表明配合物与 DNA 以嵌入方式作用。



$C_{\text{complex}} = 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ↓: Absorbance of the complex decreased with the increase of the concentration of DNA

图2 配合物 **1** (a)和 **2** (b)加入 DNA 前后的紫外吸收光谱图

Fig.2 Absorption spectra of complex **1** (a) and **2** (b) in the absence and the presence of CT-DNA

2.4 配合物与蛋白的相互作用

金属配合物与血清白蛋白 BSA 结合的定性分析通常通过荧光光谱进行检测。BSA 产生荧光的生色团是由蛋白质的 2 个氨基酸引起的,即色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)。蛋白质构象转换,底物结合或变性反应都有可能引起色氨酸的发射光谱发生变化^[30]。BSA 的固有荧光可以提供关于其结构和动力学的信息,并且常用于蛋白质折叠和相关反应的研究^[31]。配合物与 BSA 滴定实验的荧光发射光谱如图

3(a)、3(b)所示。配合物 **1**、**2** 加入到 BSA 溶液中导致其在 348 nm 处的荧光强度的显著降低,分别降低了 44.9% 和 31.8%(图 4),说明配合物与血清白蛋白有较强的相互作用,且配合物 **1** 与蛋白质的结合能力强于 **2**。荧光强度的变化可以用 Stern-Volmer 方程^[32]描述: $I_0/I = 1 + k_q\tau_0C_Q = 1 + K_{sv}C_Q$; 其中 I_0 和 I 分别是只有 BSA 时和猝灭剂(配合物)、BSA 共存时荧光团的荧光强度, k_q 是 Stern-Volmer 猝灭常数, K_{sv} 是动态猝灭常数, τ_0 为荧光团的荧光寿命,其平均寿命

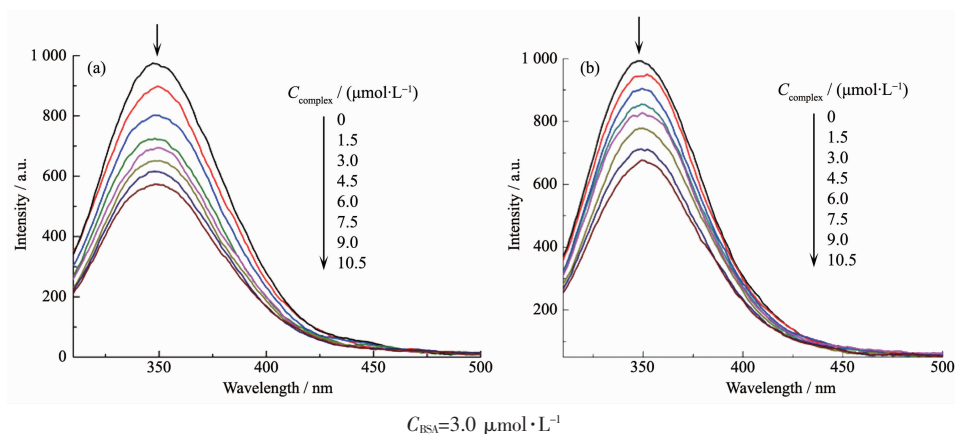


图 3 BSA 溶液中加入配合物 1 (a) 和 2 (b) 的荧光光谱

Fig.3 Emission spectra of BSA in the absence and presence of increasing amount of complexes 1 (a) and 2 (b)

大约为 10^{-8} s, C_Q 为猝灭剂的浓度。根据此方程计算得到了配合物 1 和 2 的 K_{sv} 和 k_q 。2 个配合物的 k_q 分别为 $(7.50 \pm 0.47) \times 10^{12}$ 、 $(5.00 \pm 0.43) \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (表 3), 远大于各类猝灭剂对生物大分子最大扩散碰撞猝灭速率常数 ($2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)^[32-33], 说明动态碰撞不是引起 BSA 荧光猝灭的主要原因, 而是由于配合物和 BSA 形成了不发光的加合物, 从而引起了 BSA 内源荧光的静态猝灭。配合物 1 和 2 的 K_{sv} 值分别为 $(7.50 \pm 0.47) \times 10^4$ 、 $(5.00 \pm 0.43) \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (表 3), 也说明配合物能与蛋白质发生作用, 且配合物 1

与蛋白质的作用强于 2。

假设蛋白质上有 n 个相同且独立的结合位点, 根据 Scatchard 方程: $\Delta(I/I_0)/C_Q = nK_A - K_A \Delta(I/I_0)$ (C_Q 是猝灭剂即配合物的浓度), 以 $\Delta(I/I_0)/C_Q$ 对 $\Delta(I/I_0)$ 作图, 根据截距和斜率分别可以求得配合物与 BSA 的结合常数 K_A 和结合位点数 n (表 3), 配合物 1、2 的结合常数分别为 $(1.04 \pm 0.03) \times 10^5$ 和 $(8.62 \pm 0.71) \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。这表明配合物与 BSA 有很强的相互作用, 其中配合物 1 的作用较强。配合物与 BSA 之间的结合位点数约为 1, 即配合物与 BSA 分子存在 1 个结合位点。BSA 主要有 2 个色氨酸残基发射内源荧光, 一个是位于分子内部疏水腔的 Trp-212; 另一个是位于分子表面的 Trp-134。由于 Trp-134 暴露在亲水环境会发生猝灭, 所以 BSA 分子的内源荧光主要由处于疏水腔的 Trp-212 产生^[34-35]。因此, 可以推断引起 BSA 荧光猝灭的原因主要是配合物导致蛋白质二级结构发生变化, 从而影响了 Trp-212 的疏水环境^[36]。

血清白蛋白能够运输金属离子和金属配合物, 它们之间相互作用可能增强或减弱配合物的生物特性和改变药物运输通路。如果配合物与血清白蛋白的结合常数 K_A 太高, 配合物就无法从血清白蛋白中释放进入靶细胞, 导致细胞毒性降低^[36]。配合物 1 和 2 与血清白蛋白的作用强于文献报道的结

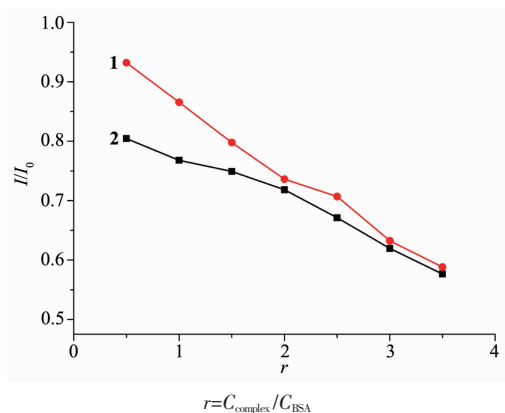


图 4 BSA 加入不同浓度的配合物 1 和 2 时的荧光强度变化

Fig.4 Fluorescence intensity variation of BSA-bound complexes 1 and 2

表 3 配合物 1 和 2 对 BSA 的 Stern-Volmer 荧光猝灭数据

Table 3 Stern-Volmer fluorescence quenching data of BSA in the complexes 1 and 2

Complex	$K_{sv} / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$K_A / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n
1	$(7.50 \pm 0.47) \times 10^4$	$(7.50 \pm 0.47) \times 10^{12}$	$(1.04 \pm 0.03) \times 10^5$	1.31
2	$(5.00 \pm 0.43) \times 10^4$	$(5.00 \pm 0.43) \times 10^{12}$	$(8.62 \pm 0.71) \times 10^4$	0.79

果^[37],引起配合物的细胞毒性降低。其中配合物 **1** 的结合能力较强,造成这种差别的原因可能是配体 L1 的取代基为-CH₃,-CH₃ 是疏水基团,疏水基团可能进入 BSA 的疏水腔,与 BSA 分子以疏水作用方式结合,从而使色氨酸周围疏水性增加,引起蛋白分子的结合位点间相互作用^[36]。

3 结 论

利用双齿螯合结构的联吡啶类配体和芳基钌二聚体[RuCl₂(η⁶-p-cymene)]₂ 合成了单核配合物 **1** 和 **2**,并探讨了影响其抗癌活性的因素。配合物 **2** 的水解反应速率比 **1** 快;**1**、**2** 都能与 DNA 结合但配合物 **2** 的结合能力较强。配合物与蛋白的较强结合能力,可能是其细胞毒性不高的原因。配合物 **1** 的较慢水解速度有利于提高抗癌活性,其与蛋白结合能力较强,通过蛋白输送进入细胞,在细胞内水解进攻可能的靶标 DNA;配合物 **2** 有可能在与蛋白结合之前已水解而与蛋白结合,没有到达靶标。上述结果可能是导致 2 个配合物抗癌活性略有不同的原因。因此,配合物的水解、与 DNA 和蛋白的作用可能是影响抗癌活性的主要原因。这些结果为未来设计新型高效的芳基钌抗癌药物将提供指导作用。

参考文献:

- [1] Rosenberg B, Camp L V, Krigas T. *Nature*, **1965**,**205**:698-699
- [2] Zhang C X, Lippard S J. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**,**7**: 481-489
- [3] Magennis S W, Novakova O, Sadler P J, et al. *Inorg. Chem.*, **2007**,**46**:5059-5068
- [4] Kilpin K J, Cammack S M, Dyson P J, et al. *Dalton Trans.*, **2013**,**42**:2008-2014
- [5] Akitaka I, Nozomi K, Yoshio T, et al. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2017**,**56**:3794-3808
- [6] Ashford D L, Glasson C R, Binstead R A, et al. *Inorg. Chem.*, **2012**,**51**:6428-6430
- [7] Ornatsky O I, Lou X, Schfer S, et al. *Anal. Chem.*, **2008**,**80**: 2539-2547
- [8] Arockiam P B, Bruneau C, Dixneuf P H, et al. *Chem. Rev.*, **2012**,**112**:5879-5918
- [9] Johnstone T C, Suntharalingam K, Lippard S J. *Chem. Rev.*, **2016**,**116**:3436-3486
- [10] Muenzner K J, Kasparkova A, Schobert R, et al. *J. Med. Chem.*, **2015**,**58**:6283-6292
- [11] Moggach S A, Prescimone A, Parsons S, et al. *Inorg. Chem.*, **2007**,**46**:4049-4059
- [12] Furrer J, Süss-Fink G. *Coord. Chem. Rev.*, **2016**,**309**:36-50
- [13] Kraatz H B, Keppler B K, Hartinger C G, et al. *Inorg. Chem.*, **2010**,**49**:7953-7963
- [14] Mishra A, Mishra A, Ravikumar S, et al. *Dalton Trans.*, **2014**,**43**:6032-6040
- [15] Singla R, Soni S, Padwad Y S, et al. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2017**,**104**:748-757
- [16] Armarego W L F, Chai C L L, Translated by LIN Ying-Jie (林英杰), LIU Wei(刘伟), WANG Hui-Ping(王会萍), et al. *Purification of Laboratory Chemicals. 5th Ed*(实验室化学品纯化手册.5 版). Beijing: Chemical Industry Press, **2007**.
- [17] Rijt S H, Fu Y, Shnyder S D, et al. *Metallomics*, **2014**,**6**: 1014-1022
- [18] Li T, Aime S, Sadler P J, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, **53**:13225-13228
- [19] Zhao M, Ji L N, Mao Z W, et al. *Chem. Eur. J.*, **2013**,**19**: 12152-12160
- [20] Kandioller W, Hartinger C G, Nazarov A A, et al. *Organometallics*, **2009**,**28**:4249-4251
- [21] Vernooij R R, Kubeil C, Wood B R, et al. *Inorg. Chem.*, **2017**,**56**:5941-5952
- [22] Habtemariam A, Moggach S A, Sadler P J, et al. *Inorg. Chem.*, **2007**,**46**:4049-4059
- [23] Kubanik M, Keppler B K, Hartinger C G, et al. *Dalton Trans.*, **2016**,**45**:13091-13103
- [24] Heimann K, Dinh X T, Collins J G, et al. *Mol. Biosyst.*, **2016**,**12**:3032-3045
- [25] Bischof C, Joshi T, Schatzschneider U, et al. *Inorg. Chem.*, **2013**,**52**:9297-9308
- [26] Liu H K, Kong Y Q, Sadler P J, et al. *Dalton Trans.*, **2016**, **45**:18676
- [27] Liu H K, Sadler P J. *Acc. Chem. Res.*, **2011**,**44**:349-359
- [28] Chen L M, Peng F, Li G D, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2016**, **156**:64-74
- [29] Wan Y, Zhang Y L, Li H L, et al. *RSC Adv.*, **2014**,**4**:35193
- [30] Mohanraj M, Ayyannan G, Raja G, et al. *Mater. Sci. Eng. C*, **2016**,**69**:1297-1306
- [31] Novakova O, Chen H, Sadler P J, et al. *Chem. Biol.*, **2005**, **12**:121-129
- [32] Peng B H, Cui J G, Huang C H, et al. *J. Org. Chem.*, **2015**, **783**:10-16
- [33] Peter T. *Adv. Protein Chem.*, **1985**,**37**:161-245
- [34] GUO Qiong(郭琼), LI Lian-Zhi(李连之), XU Tao(许涛), et al. *Acta Chim. Sinica*(化学学报), **2012**,**70**:1617-1624
- [35] KONG Ya-Qiong(孔亚琼), LI Ji(李季), LIU Hong-Ke(刘红科), et al. *Scientia Sinica: Chimica*(中国科学:化学), **2017**, **47**:277-283
- [36] Tan C, Liu J, Li H, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2008**,**102**:347-358
- [37] Gou Y, Zhang Y, Qi J X, et al. *Oncotarget*, **2016**,**7**:67004-67019