紫苏醇芳基钌配合物的合成及抗肿瘤性能

吴健陶 钦 葛 超 薛旭玲* 钱 勇 刘红科* (南京师范大学化学与材料科学学院,南京 210023)

摘要:紫苏醇作为既有癌症预防又有癌症治疗作用的少数几种天然产物之一,曾作为临床药物用于癌症的治疗。但是紫苏醇 通过口服给药生物利用度低、给药剂量大,因而限制了它的临床应用。我们将紫苏醇进行化学修饰,作为配体引入到芳基金属 配合物中,合成了一种新型芳基钌配合物 Ru-L,并利用核磁共振氢谱、碳谱、电喷雾质谱及元素分析对其进行了基础表征。配 合物 Ru-L 对肿瘤细胞 A2780、A2780/DDP 及 MCF-7 都表现出较高的细胞毒活性,而对正常细胞株毒性较小(IC_{so}>200 μmol· L⁻¹),表明紫苏醇芳基钌配合物可以克服紫苏醇给药量大和毒性大等缺陷。紫外可见及荧光光谱表明配合物具有较快的水解 速率,可通过嵌入作用与CT-DNA结合,并通过静态猝灭与BSA/HSA 相互作用。流式细胞术也揭示配合物将肿瘤细胞周期阻 滞在 G0/G1 期,从而导致了肿瘤细胞的凋亡。以上结果表明,基于紫苏醇的芳基钌配合物 Ru-L 克服了紫苏醇的高剂量、高毒 性等缺点。

关键词:天然产物;芳基金属;紫苏醇;抗肿瘤 中图分类号:0614.82*1 文献标识码:A 文述 DOI:10.11862/CJIC.2020.159

文章编号: 1001-4861(2020)07-1223-10

Synthesis and Antitumor Properties of Ruthenium-Arene Complexes Based on Natural Product Perillol

WU Jian TAO Qin GE Chao XUE Xu-Ling^{*} QIAN Yong LIU Hong-Ke^{*} (School of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: As one of the few natural products that is useful both in the prevention and treatment of cancers, perillol has been used as a clinical drug for the treatment of cancer. However, perillol has low bioavailability and large dosage by oral administration, which limits its clinical application. In this work, perillol was chemically modified and introduced into the metal-arene complex as a ligand, thus a novel ruthenium-arene complex **Ru-L** was synthesized and characterized by NMR, ESI-MS and elemental analysis. The complex exhibited high cytotoxic activity against several tumor cells A2780, A2780/DDP and MCF-7, while it was none toxic to the normal cell lines ($IC_{50}>200 \mu mol \cdot L^{-1}$). Absorbance and fluorescence spectra suggested that the complex had a fast hydrolysis rate, could bind to CT-DNA with a high affinity through intercalation mode and interact with BSA/HSA by static quenching. Flow cytometry also revealed that the complex induced tumor cell cycle arrest in the G0/G1 phase, which led to apoptosis of tumor cells. The above results indicate that the ruthenium-arene complex **Ru-L** based on perillol can overcome the disadvantages of perillyl alcohol, such as its high doses and severe toxicity.

Keywords: natural products; metal-arene complex; perillol; anticancer

收稿日期:2019-12-04。收修改稿日期:2020-05-16。

国家自然科学基金重点国际合作项目(No.21420102002)、国家自然科学基金(No.21771109,21778033,21807060)、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)和中国博士后基金(No.2019M651874)资助。 *通信联系人。E-mail:xuexuling87@163.com,liuhongke@njnu.edu.cn

0 引 言

以顺铂为代表的金属配合物具有良好的药理 学特性,引起了人们对金属抗癌药物的极大兴 趣[1-3],但铂类药物毒副作用大、固有或获得性耐药 性等不足大大限制了铂类药物的应用,因此新型 钌、铱等金属抗癌药物逐渐走入人们的视野[45]。其 中,半三明治有机金属配合物因其化学结构的多样 性和易于控制的芳烃或环戊二烯基的疏水性而在 化学治疗研究中极为突出[68]。此外,芳烃或环戊二 烯基不仅有助于提高细胞对金属药物的摄取,而且 对生物靶标的功能模式和配合物的动力学惰性也 具有重要作用^[9-11]。Sadler等报道此类金属配合物不 同于铂类药物的多种作用机理,具有毒性小、耐药 性低及易代谢等独特的优势[12-13]。在此类有机金属 配合物中,含有各种螯合配体的Ru(II)-芳烃配合物 表现出优异的化学可修饰性,例如将芳基钌配合物 与其他生物活性分子结合,可以轻松地修改其化学 结构,以调节其物理化学性质和生物活性[14-18]。

天然产物因其可修饰的化学结构、丰富的生物 活性以及潜在多功能靶点等优势,也得到了人们的 广泛关注,目前有科研工作者也将其引入金属抗癌 药物以提高药物的生物活性[19-21]。其中,紫苏醇作 为一种治疗及预防癌症的单萜类口服药物,曾经 进入临床二期试验^[22-23],在乳腺癌(IC₅₀≈500 µmol· L⁻¹)^[24]、肺癌(IC₅₀≈1 000 µmol·L⁻¹)^[25]等多种肿瘤细胞 具有一定的防癌及抗癌作用。紫苏醇通过在血清 中被氧化为紫苏酸和脱水紫苏酸来发挥其抗癌作 用^[26]。此外,紫苏醇还可以抑制血管生成^[27],诱导 MCF-7细胞阻滞在G0/G1期,引起p21^{Cip1/Wafl}水平的 上调。但因紫苏醇口服给药生物利用度低、给药剂 量大,高剂量的摄入会引起肠道毒性,如导致患者 恶心、疲劳和呕吐等副作用。因此,开发一种抗肿 瘤活性强、毒副作用小的紫苏醇药物具有广泛的应 用前景。

在本研究中,我们对紫苏醇进行化学修饰,合成了基于紫苏醇的新型芳基钌配合物,并通过'H NMR、ESI-MS及元素分析进行了结构表征。采用 MTT法评估了配合物对多种肿瘤细胞株的抗增殖 能力,并利用UV-Vis分光光度计及荧光光谱仪检测 了配合物与重要生物分子如DNA、BSA及HSA的相 互作用,同时利用流式细胞术通过细胞内活性氧生 成、细胞周期及细胞凋亡实验探讨了配合物诱导细 胞死亡的作用机理。

报

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

实验所用的化学药品和溶剂均为商用分析纯, 无需进一步纯化即可直接使用。4,4'-dimethyl-2,2' -bipyridine购自晚晴化学品公司,根据文献方法制 备了化合物4'-methyl-2,2'-bipyridine-4-carboxylic acid^[28]和二聚体[Ru(η^{6} -*p*-cym)Cl₂]₂^[29]。4-二甲氨基吡 啶(DMAP)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐 酸盐(EDCI)等药品购自阿拉丁试剂有限公司。

细胞培养基 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen)、双抗(含有青霉素和链霉素的混 合液)和胎牛血清等购自 Gibco 公司。PBS 缓冲溶 液、胰蛋白消化酶-EDTA 等生物试剂购自南京凯基 生物科技有限公司。紫苏醇购自北京华威锐科化 工有限公司。所有的反应均在氩气氛围下进行。

¹H NMR使用 Bruker Avance II 400 MHz 光谱仪 检测。电喷雾电离质谱(ESI-MS)通过使用 Mass Lynx 系统的 Thermo LCQ-FLEET 质谱仪测定。在 PerkinElmer 240C 元素分析仪上测量 C,H 和 N 的含量。 UV-Vis 数据采用 PerkinElmer Lambda 365 紫外-可 见光谱仪进行收集。荧光光谱仪采用 Edinburgh FS5 型号。使用的多功能酶标仪型号为 LabServ K3, 流式细胞仪型号为 BD FACSverse。

1.2 紫苏醇化学修饰配体及配合物的合成

1.2.1 紫苏醇化学修饰配体(L)的合成

将 4'-methyl-2, 2'-bipyridine-4-carboxylic acid (82.20 mg, 0.54 mmol)、紫苏醇(173.5 mg, 0.81 mmol) 和DMAP(131.9 mg, 1.08 mmol)的DMF溶液在氩气和 冰浴条件下搅拌15 min,然后加入EDCI(207.0 mg, 2.0 mmol), 室温搅拌 24 h。TLC 监测至反应结束后 旋干溶剂,将粗产品用乙酸乙酯(3×20 mL)萃取,用 水、盐水洗涤,并通过快速柱色谱法(石油醚-乙酸乙 酯)纯化,产物为无色油状物(100.3 mg, 53.3%)。'H NMR(400 MHz, DMSO- d_{6}): δ 8.89(dd, J=5.0, 0.8 Hz, 1H), 8.82(dd, J=1.6, 0.8 Hz, 1H), 8.59(d, J=4.9 Hz, 1H), 8.27(s, 1H), 7.89(dd, J=5.0, 1.7 Hz, 1H), 7.34 (ddd, *J*=4.9, 1.6, 0.7 Hz, 1H), 5.88(s, 1H), 4.78(s, 2H), 4.72(s,2H), 2.44(s,3H), 2.21~2.06(m,4H), 1.97(dd, J= 13.8, 2.4 Hz, 1H), 1.86~1.77(m, 1H), 1.71(s, 3H), 1.45 $(tt, J=12.7, 8.5 Hz, 1H)_{\circ}$ ¹³C NMR(101 MHz, DMSOd₆):δ 164.91, 156.99, 154.46, 150.99, 149.74, 149.44, 148.76,138.55,132.56,126.13,125.99,123.21,121.81, 119.60,109.52,69.52,41.22,30.27,27.24,26.28,21.18, 21.06。ESI-MS(*m/z*): [L+H]⁺理论值349.44,实验值 349.32。

 1.2.2 配合物[Ru(η⁶-p-cym)(bpy-POH)Cl]Cl(**Ru-L**)的 合成

将二聚体[Ru(ŋ⁶-p-cym)Cl₂],(25.0 mg, 0.04 mmol) 和配体L(28.5 mg, 0.08 mmol)的二氯甲烷溶液在氩 气下回流12h,TCL监测至反应结束后旋干溶剂,并 将粗产物通过快速柱色谱法(二氯甲烷-甲醇)纯化, 产物为浅红色粉末(39.4 mg, 75.2%)。¹H NMR(400 MHz, DMSO- d_6): δ 9.74(d, J=5.9 Hz, 1H), 9.40(d, J= 5.8 Hz, 1H), 8.92(s, 1H), 8.81(s, 1H), 8.09(dd, J=5.9, 1.6 Hz,1H), 7.69(d, J=5.7 Hz, 1H), 6.25(dd, J=9.1, 6.3 Hz, 2H), 6.02(dd, J=9.4, 6.3 Hz, 2H), 5.91(s, 1H), 4.85 (s,2H), 4.73(s,2H), 2.60(s,4H), 2.18(s,7H), 2.02~1.92 (m, 1H), 1.87~1.78(m, 1H), 1.73(s, 3H), 1.52~1.42(m, 1H), $0.95(d, J=6.9 Hz, 6H)_{\circ}$ ¹³C NMR(101 MHz, CD-Cl₃): δ 163.09, 158.50, 156.13, 155.14, 153.38, 151.81, 149.34,140.01,131.51,129.58,128.97,127.93,126.98, 126.28, 123.94, 121.65, 108.98, 104.93, 104.44, 70.89, 40.58,31.18, 30.47, 27.18, 26.53, 22.29, 22.22, 21.56, 20.80。ESI-MS(m/z): [Ru-L-Cl]⁺理论值619.18,实验 值 619.33。元素分析:按C₂,H₃₈Cl₂N₂O₂Ru 计算值 (%):C 58.71,H 5.85,N 4.28。实验值(%):C 59.04,H 5.91, N 4.16_o

1.3 细胞毒性研究

原料紫苏醇(perillol)、紫苏醇化学修饰配体L、 配合物 Ru-L 及其对照药物顺铂的细胞毒性实验采 用 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)法测定,选择人源肿瘤细胞系卵巢 癌(A2780)、卵巢癌的顺铂耐药株(A2780/DDP)、乳腺 癌(MCF-7)和正常人源细胞肺成纤维细胞(HLF)进行 测试。细胞在 DMEM(Dulbecco 改良的 Eagle 培养 基, Gibco BRL) 中培养, 其中含有 10% FBS(胎牛血 清,Gibco BRL),100 µg·mL⁻¹链霉素和100 U·mL⁻¹青 霉素(Gibco BRL)。将处于对数生长期的4种细胞系 以每孔5000个细胞的初始密度接种到96孔细胞培 养板中,在5%(V/V)CO,、310K条件下培养24h后, 加入待测药物(药物溶于1%(V/V) DMSO的 DMEM 培 养基溶液),继续孵育48h。在每孔加入20 µL(5 mg· mL⁻¹)的MTT后继续孵育4h,然后吸去培养基,加入 150 µL DMSO,振荡10 min后,使用 LabServ K3 酶标 仪读取 492 nm 处吸光度值。测得的 IC₅₀值是平均 值±SEM。

1.4 配合物的水解

通过紫外可见光谱法测定配合物 **Ru-L**的水解 常数及半衰期。制备的纯化样品在 H₂O(含 10%(V/V) DMSO)中的浓度为 50 µmol·L⁻¹。在 298 K下,24 h内以选定的波长(250~550 nm)在 15 或 30 min 的间 隔内记录吸光度。将吸光度随时间变化的图拟合 为适当的等式。($A=C_0+C_1e^{-tt}$,其中 C_0 和 C_1 是计算机 拟合的常数,A是配合物与时间相对应的吸光度), 用于拟合一级反应动力学,以计算水解速率常数K和半衰期 $t_{1/2}$ 。

1.5 配合物与CT-DNA的相互作用

使用配合物 Ru-L 的 DMSO 储备液在 PBS(10 mmol·L⁻¹,含有10 mmol·L⁻¹ NaCl, pH 7.4)中稀释并 进行DNA结合实验。用PBS将CT-DNA稀释至所需 的浓度,并通过UV-Vis光谱测定CT-DNA在260 nm 处吸光度值,确定CT-DNA的浓度(*ε*=6 600 L·mol⁻¹· cm⁻¹)。同时测定其在280 nm处的吸光度值, A260/A280 的比值约为1.87,表明DNA 溶液不含蛋白质,对 DNA滴定实验没有干扰。固定每个样品中配合物 的浓度,加入CT-DNA的浓缩储备液,其中在参比池 中每次都要添加等浓度CT-DNA,以最大程度地减 少由于DNA在260 nm吸收引起的实验干扰。将样 品在生理条件下(PBS, 10 mmol·L⁻¹, 含有 10 mmol· L⁻¹ NaCl, pH 7.4)室温孵育 10 min 以达到结合平衡, 然后记录配合物 Ru-L 在 302 nm 处的吸光度。将配 合物 Ru-L与CT-DNA 的相互作用拟合到 Benesi-Hildebrand^[30]方程,以计算结合常数 $K_{\rm ho}$ 。

1.6 配合物与BSA/HSA的相互作用

使用固定浓度的 BSA 或 HSA 进行荧光猝灭滴 定实验研究配合物与 BSA 或 HSA 的相互作用。在 PBS(10 mmol·L⁻¹,含有 10 mmol·L⁻¹ NaCl,pH 7.4)中 制备 BSA 或 HSA 储备溶液并在4℃下保存。每次连 续加入配合物 **Ru**-L 并在室温下孵育 10 min 以完成 相互作用后,记录不存在和存在配合物 **Ru**-L 的情 况下 BSA(3.0 µmol·L⁻¹)或 HSA(1.0 µmol·L⁻¹)的荧光 发射光谱,配合物 **Ru**-L 的浓度区间分别设为 0~20 µmol·L⁻¹和 0~5 µmol·L⁻¹。其中 BSA 和 HSA 激发波 长分别为 280 和 278 nm,测定 BSA 或 HSA 溶液在 334 或 307 nm处的荧光强度。

1.7 细胞凋亡检测

将处于对数生长期的A2780细胞以每孔2×104

个细胞的初始密度接种到6孔细胞培养板中。在 5%(V/V) CO₂、310 K条件下培养24 h后,加入不同浓 度(0、11、22 和 33 μ mol·L⁻¹)的待测药物(含有 1%(V/ V) DMSO 的 DMEM 培养基溶液)。继续孵育24 h后, 消化并收集细胞。用 PBS洗涤2次,加入500 μ L 的 binding buffer 重悬细胞,并加入5 μ L 的 Annexin V-FITC,5 min后加入5 μ L 的 propidium iodide 混匀,室 温避光静置15 min,随后立即使用 BD FACSverse 流 式细胞仪检测,使用 FlowJo 7.6 软件处理数据。

1.8 细胞周期阻滞检测

将处于对数生长期的 A2780 细胞以每孔 2×10⁴ 个的初始密度接种到 6孔细胞培养板中。在 5%(V/ V) CO₂、310 K条件下培养 24 h后,加入不同浓度(0、 11、22 和 33 μmol·L⁻¹)的待测药物(含有 1%(V/V) DMSO 的 DMEM 培养基溶液)。继续孵育 24h后,消 化并收集细胞。用 PBS洗涤 2次,加入 300 μL 的 PBS 重悬细胞,向其中缓慢滴加 700 μL冰乙醇,277 K过夜固定细胞。固定结束后,2 000 r·min⁻¹离心 5 min,PBS洗涤,加入提前配好的碘化丙啶染色液(PI/ RNase A,9:1,V/V),室温下避光静置 30 min,随后立 即使用 BD FACSverse 流式细胞仪检测,使用 FlowJo 7.6软件处理数据。

1.9 细胞内活性氧(ROS)检测

将处于对数生长期的A2780细胞以每孔2×10⁴ 个的初始密度接种到6孔细胞培养板中,在5%(V/V) CO_2 、310 K 条件下培养 24 h后,加入不同浓度(0、 11、22 和 33 µmol·L⁻¹)的待测配合物 **Ru-L**(含有 1% (*V/V*) DMSO 的 DMEM 培养基溶液)。继续孵育 4h 后,收集细胞,用 DMEM 培养基洗涤 2次,并向其中 加入 10 µmol·L⁻¹活性氧探针 H₂DCFDA,避光继续孵 育 20 min。PBS 洗涤 2次后收集细胞并用 PBS 重悬 细胞。随后立即使用 BD FACSverse 流式细胞仪检 测,激发波长为 488 nm,发射波长为 510~540 nm,使 用 FlowJo 7.6软件处理数据。

2 结果与讨论

2.1 合成和表征

选择具有抗肿瘤活性的天然产物紫苏醇对其 进行化学修饰,引入同样具有抗肿瘤活性的芳基钌 配合物,希望结合紫苏醇和芳基钌的双重作用,提 高配合物 **Ru-L**的抗肿瘤效果。紫苏醇化学修饰配 体 L 是由紫苏醇和4'-methyl-2,2'-bipyridine-4-carboxylic acid在 DMF 中通过酰胺化反应,并通过柱层 析分离提纯制得。芳基二聚体[Ru(η^{6} -*p*-cym)Cl₂],是 由 RuCl₃·3H₂O 与 α -松油烯在甲醇中制备得到。配 合物 **Ru-L**由芳基二聚体[Ru(η^{6} -*p*-cym)Cl₂],与配体 L 直接在二氯甲烷中反应,并通过柱层析分离提纯制 得(如图 1 所示)。利用¹H NMR、¹³C NMR、ESI-MS 及 元素分析对配体L和配合物 **Ru-L**进行了表征。



图 1 配体L及配合物Ru-L的合成路线 Fig.1 Synthetic route of ligand L and complex Ru-L

2.2 细胞毒性研究

通过MTT法研究了紫苏醇、紫苏醇化学修饰配体L以及配合物Ru-L对人源肿瘤细胞株A2780、A2780顺铂耐药株(A2780DDP)、MCF-7和正常细胞HLF48h的体外细胞毒性,并以顺铂作为阳性对照药物。从表1可以看出,紫苏醇和配体L对人源肿瘤细胞及正常细胞毒性较小(IC₅₀>200 μmol·L⁻¹),与文献报道数值相一致^[21,31],远低于顺铂的细胞毒性。与天然产物、相应配体及[Ru(η⁶-p-cym)Cl₂]₂(IC₅₀>200

μmol·L⁻¹)相比^[32],配合物**Ru**-L对A2780细胞、A2780/DDP细胞及MCF-7细胞的毒活性显著提高, 其IC₅₀值分别为22、40和34 μmol·L⁻¹。同时对人正 常细胞HLF毒性较小(IC₅₀>200 μmol·L⁻¹),表明引入 天然产物紫苏醇后配合物**Ru**-L不仅可以显著提高 对肿瘤细胞的毒性,而且对正常细胞具有较低的毒 副作用。为了探究配合物**Ru**-L对多种肿瘤细胞株 毒活性提高的原因,我们深入研究了配合物**Ru**-L 的水解速率,与重要生物分子如DNA、BSA和HSA

χ_1 家亦時、配件工及配日初Ku-L对不同所通知配体的+6 II 的 C_{50} 但								
Table 1	$IC_{\rm 50}$ values towards different cells by perillol, L and complex Ru-L for 48 h							
				$\mu mol \cdot L^{-1}$				
Compound	A2780	A2780/DDP	MCF-7	HLF				

Compound	A2780	A2780/DDP	MCF-7	HLF
Perillol	>200	>200	>200	>200
L	>200	>200	>200	>200
Ru-L	22.636±0.288	40.460±1.203	33.981±1.874	>200
Cisplatin	2.133±0.035	18.277±1.324	15.082±0.326	11.049±0.255

的相互作用,以及诱导A2780细胞死亡的作用机理。

± 1

2.3 配合物的水解

芳基金属配合物通过水解来调控其药理学性 质,如细胞摄取、细胞毒性及与DNA的相互作用 等[33-34],其中配合物水解后可与DNA的碱基发生配 位,进而影响DNA的转录及翻译等生理功能[35]。因 此我们利用UV-Vis光谱研究配合物Ru-L(50 µmol· L⁻¹)在含有10%(V/V) DMSO的水溶液中的水解速率。 如图2所示,配合物Ru-L的特征吸收峰为278、296、 314、318及398 nm,其中,在278和296 nm处较强的 特征峰归属于MLCT/LLCT跃迁,在314和318 nm处 的特征峰为离去基团 Cl的π轨道跃迁到π*所引起 的LLCT跃迁,其中398 nm处的特征峰为Ru原子4d 轨道上的电子向配体的 π*空轨道 MLCT 跃迁所 致[36-37]。在 298 K, 100 min 之内, 配合物 Ru-L 水溶 液中吸收峰发生了明显的变化,在296 nm处的吸收 峰减弱(减弱率为7.72%),在278、314、318及398 nm 处的吸收峰增强(增强率分别为12.16%、3.63%、 8.26%及15.91%),表明配合物发生了水解。利用一 级反应动力学方程求导得到 ln(C/C_a)与时间的关系, 其中 C_0 是初始时配合物的浓度,C是对应时间时配



Inset: fitted curve of $\ln(C/C_0)$ of the complex at 314 nm versus time; $C_{0,\mathbf{Ru}\cdot\mathbf{L}}$ =50 µmol·L⁻¹



Fig.2 Ultraviolet absorption spectrum of complex ${\bf Ru}{\textbf -}{\bf L}$ in H_0 solution

合物的浓度。并通过在0~100 min之内的斜率因子 计算出配合物的水解速率常数和半衰期分别为 1.31 h⁻¹和0.53 h,表明配合物**Ru-L**在298 K的水溶 液环境中具有较快的水解速率^[8]。

2.4 配合物 Ru-L与 CT-DNA 的相互作用

DNA 是芳基金属配合物在肿瘤细胞内潜在靶 点之一,研究 DNA 和芳基金属配合物的相互作用在 研究抗肿瘤机制中发挥至关重要的作用。常用紫 外-可见光谱研究配合物与小牛胸腺 DNA(CT-DNA) 可能的结合模式及其结合常数 $K_b^{[38]}$ 。配合物通过嵌 入作用与 DNA 的碱基对发生电子堆积,配体的 π^* 轨道与 DNA 碱基对的 π 轨道发生耦合导致能级下 降,耦合后的 π^* 轨道部分被电子填充,使其 π - π^* 跃 迁几率减小,从而产生减色效应或红移现象^[39]。通 过 UV-Vis 光谱研究配合物 **Ru**-L(30 µmol·L⁻¹)在含 有 10%(*V/V*) DMSO 的 PBS(10 mmol·L⁻¹, pH 7.4)中的 结合常数 K_b 。如图 3 所示,在配合物溶液中滴加 CT-DNA 时,在 314~318 nm 处观察到了明显的减色效 应,其中在 CT-DNA 的浓度为40 µmol·L⁻¹时,配合物



Inset: fitted curve of $C_{\text{DNA}}/(\varepsilon_{a}-\varepsilon_{f})$ of the complex at 314 nm versus concentration; $C_{\text{Ru-L}}$ =30 µmol·L⁻¹, $C_{\text{CT-DNA}}$ =0~40 µmol·L⁻¹, $C_{\text{Ru-L}}/C_{\text{CT-DNA}}$ =0~1.3

- 图 3 配合物 Ru-L 在 PBS 中滴加 CT-DNA 后的紫外 吸收光谱图
- Fig.3 Ultraviolet absorption spectra of complex **Ru-L** after the addition of CT-DNA in PBS

报

的减色效应高达21.36%。

将配合物**Ru-L**与CT-DNA的相互作用拟合到 Benesi-Hildebrand方程,以计算结合常数 $K_{\rm h}$:

 $C_{DNA}/(\varepsilon_a - \varepsilon_t) = C_{DNA}/(\varepsilon_b - \varepsilon_t) + 1/[K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_t)]$ (1) 其中 C_{DNA} 是 CT-DNA 的浓度,表观吸收系数 ε_a 对应 于 $A_{obs}/C_{Ru-L}, \varepsilon_b$ 和 ε_t 分别表示结合态和游离态的配合 物的消光系数。将 $C_{DNA}/(\varepsilon_a - \varepsilon_t) = C_{DNA}$ 的关系进行线 性拟合,并通过斜率因子与截距的比值计算出配合 物与 DNA 的结合常数 K_b 为4.37×10⁵L·mol⁻¹,相比之 前文献报道^[40],配合物 **Ru-L**与 DNA 具有更强的结 合能力,并以嵌入的方式与 CT-DNA 相互作用,这种 结合方式在抗肿瘤药物的设计和开发中发挥着重 要作用。

2.5 配合物与BSA/HSA的相互作用

血清白蛋白(SA)是血浆中的主要蛋白质,是激 素、脂类等物质的转运载体,因此研究药物-白蛋白 之间的相互作用对药物的运输、释放、生物分布和 毒性至关重要^[41]。在本文中,研究基于芳基钌的抗 癌药物和SA的相互作用对于理解芳基钌的药代动 力学和药物-蛋白质相互作用非常重要。因此,我 们以牛血清白蛋白(BSA)和人血清白蛋白(HSA)为模 式蛋白研究了**Ru-L**与SA的相互作用。

BSA的结构类似于HSA,且更易获得。BSA产 生荧光的生色团是由蛋白质的色氨酸(Trp)和酪氨酸 (Tyr)引起的。BSA蛋白中由色氨酸的发射光谱发生 变化所引起的构象转换与结合的底物或变性反应 相关^[42]。我们利用荧光光谱研究配合物在含有1% (V/V) DMSO 的 PBS(10 mmol·L⁻¹, pH 7.4) 溶液中与 BSA(3 μ mol·L⁻¹)的荧光猝灭常数及其结合常数 K_a 。 如图4所示,在BSA溶液中滴加配合物Ru-L(0~20 µmol·L⁻¹),可观察到BSA在334 nm处的发射峰强度 急剧下降(降低率为48.68%),表明配合物与BSA有 很强的相互作用。有研究表明,BSA荧光猝灭的性 质可以是"静态淬灭"或"动态淬灭"[43]。静态机制通 常是由猝灭剂和荧光团之间的基态结合物形成引 起的,因此,它会引起荧光团吸收光谱的扰动。而 在动态机制中,荧光团和猝灭剂在激发态下彼此接 触,因此 BSA 的吸收光谱强度没有明显的变化。荧 光光谱实验结果表明配合物对BSA荧光猝灭性质 是"静态猝灭",其荧光猝灭机制可以用经典Stern-Volmer^[44]方程式表示:

 $F_0/F=1+K_{sv}C_0=1+K_q\tau_0C_0$ (2) 其中 F_0 和F分别是不存在和存在金属配合物(Q)的 情况下的荧光强度; K_{sv} 是Stern-Volmer淬灭常数,可





- 图4 配合物 Ru-L在 PBS 中滴加 BSA 后的荧光光谱图: (A) BSA 荧光强度随配合物浓度变化曲线,
 其中插图为 BSA 在 334 nm 处荧光强度对配合物浓度的拟合曲线; (B) Stern-Volmer 方程拟合;
 (C) lg[(F₀-F)/F]与 lgC₀拟合线性方程
- Fig.4 Fluorescence spectra of complex **Ru-L** after addition of BSA in PBS: (A) BSA fluorescence intensity as a function of complex concentration, where the illustration is the fitting curve of BSA fluorescence intensity at 334 nm;
 (B) Stern-Volmer equation fitting; (C) lg[(F₀-F)/F] and lgC₀ fitting for the linear constants corresponding to the binding constants and complex numbers

以通过 F₀/F 对 C₀作图,由拟合直线的斜率获得。使 用荧光和浓度数据的双对数曲线,可以通过截距和 斜率计算得到结合常数 K_a和与 BSA 结合的结合位 点数(n):

 $lg[(F_0 - F)/F] = lgK_a + nlgC_Q$ (3)

由公式(2)、(3)可算得配合物 Ru-L 与 BSA 相互 作用的 Stern-Volmer 淬灭常数 K_{sv}、双分子淬灭常数 K_q、结合常数 K_a及结合位点数 n 分别为 4.8×10⁴ L· mol⁻¹、4.8×10¹² L·mol⁻¹·s⁻¹、2.0×10⁴、1(表 2)。 BSA 主 要有 2个 Trp 残基发射内源荧光,其中一个 Trp 位于 BSA 分子内部疏水腔的 Trp-212 位点;另一个位于分 子表面的 Trp-134。由于 Trp-134 在亲水环境会发生 荧光猝灭,所以 BSA 分子的内源荧光主要由处于疏 水腔的 Trp-212 产生^[31]。因此,可以推断配合物 Ru-L 引起 BSA 荧光"静态猝灭"的主要原因是配合物影 响 Trp-212 的疏水环境,从而改变 BSA 蛋白质的二 级结构,引起荧光猝灭。

由于牛血清白蛋白(BSA)成本低且被广泛使用, 在许多生化和药理学应用中可以作为人血清白蛋 白(HSA)的替代品。但实际上,BSA 仅具有 HSA 的 75.8% 的生物学功能,因此在许多应用中无法替代 HSA^[45]。HSA 是 585 个氨基酸的球状蛋白,约占血清 总蛋白的 60%。它对广泛的内源性和外源性配体具 有出色的结合能力,并且其丰度使其成为许多药物 的药代动力学行为的重要决定因素。可根据配合 物与 HSA 的亲和程度来研究药物进入组织的分布 情况和药物代谢情况。利用荧光光谱研究配合物 在含有 1%(V/V) DMSO 的 PBS(10 mmol·L⁻¹,pH 7.4)溶 液中与 HSA(1 μmol·L⁻¹)的荧光猝灭常数及其结合常 数 K_a。如图 5 所示,在 HSA 溶液中滴加配合物 **Ru-**L,可观察到 HSA 在 307 nm 处的发射峰强度明显下 降(降低率为 20.17%),表明配合物与 HSA 有较强的

表 2 配合物 Ru-L 对 BSA/HSA 的荧光猝灭数据

Table 2	Fluorescence	quenching da	ta of complex	Ru-L on	BSA/HSA
---------	--------------	--------------	---------------	---------	---------



 $C_{\text{HSA}} = 1 \ \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}, \ C_{\text{Ru-L}} = 0 \sim 5 \ \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}, \ C_{\text{HSA}} / C_{\text{Ru-L}} = 0 \sim 5$

- 图5 配合物 Ru-L在 PBS 中滴加 HSA 后的荧光光谱图: (A) HSA 荧光强度随 **Ru-L**浓度变化曲线, 其中插图为 HSA 在 307 nm 处荧光强度对配合物浓度的拟合曲线; (B) Stern-Volmer 方程对 应双分子猝灭常数; (C) lg[(F₀-F)/F]与 lgC₀拟合线性方程对应结合常数及结合位点数
- Fig.5 Fluorescence spectra of complex **Ru-L** after HSA was added dropwise in PBS: (A) Curve of HSA fluorescence intensity as a function of Ru-L concentration, where the inset is a fitting curve of HSA fluorescence intensity at 307 nm versus complex concentration; (B) Stern-Volmer equation corresponding to the bimolecular quenching constant; (C) $\lg[(F_0-F)/F]$ and $\lg C_Q$ fitting for the linear constant corresponding to the binding constant and complex number

相互作用。由经典Stern-Volmer公式得到配合物Ru-L与HSA相互作用的Stern-Volmer淬灭常数K_a、双分子淬灭常数K_q、结合常数K_a及结合位点数n分别为4.8×10⁴L·mol⁻¹、4.8×10¹²L·mol⁻¹·s⁻¹、5.1×10⁴、1(表2)。HSA中产生荧光的生色团是由蛋白质的Trp、Tyr以及丙烯氨酸(Phe)引起的,其中Trp对荧光的贡献率超过95%。研究表明,HSA中有2个主要的结构选择性结合位点,即I位和II位^{14648]},当K_{sv}>10³L·mol⁻¹时,表明配合物对HSA的荧光猝灭是"静态猝灭"过程,且主要是由色氨酸及酪氨酸对HSA的微环境导致其荧光"静态猝灭"。

2.6 细胞内活性氧(ROS)的检测

正常细胞通过控制适当的活性氧(ROS)水平来 调控细胞内信号传导、细胞增殖及细胞死亡等生理 过程^[50]。有文献报道紫苏醇是通过氧化应激反应抑

制了 Ras/Raf/ERK 通路,从而诱导细胞了死亡^[51]。 因此为了研究配合物 Ru-L 引起细胞死亡的机理, 我们选择具有细胞膜穿透性的 ROS 荧光探针 H,DCFDA检测了肿瘤细胞中ROS水平。H,DCFDA 在细胞内被酯酶氧化或水解,生成无荧光的DCFH。 细胞中产生的 ROS 可以将 DCFH 氧化为有荧光的 DCF,因此可通过 DCF 的荧光强度来指示细胞内 ROS的水平^[52]。我们先将配合物在A2780细胞中孵 育4h,然后加入ROS荧光探针继续孵育30min,利 用流式细胞仪检测了细胞内ROS水平的变化。如 图6所示,我们观察到A2780细胞中相对荧光强度 仅从41.5上升到67.0,此结果相比于同类型金属配 合物的ROS水平变化(大于100倍)差距较大,这表明 引入紫苏醇配体的配合物 Ru-L 无法诱导细胞产生 过量的ROS,改变了紫苏醇通过干扰氧化应激通路 诱导细胞死亡的方式。





2.7 配合物诱导A2780的细胞凋亡

配合物 Ru-L 不是通过干扰细胞的氧化应激通路诱导细胞死亡,因此我们利用流式细胞术进一步研究了 Ru-L 的作用机理。肿瘤细胞的死亡方式有细胞凋亡、自噬、坏死、焦亡及铁死亡等^[53-54],其中细胞凋亡是细胞程序性死亡的过程,多数配合物通过诱导肿瘤细胞凋亡来发挥其细胞毒性。为了深入了解配合物 Ru-L 对肿瘤细胞毒活性的提升是否由细胞凋亡引起,我们将 A2780 细胞用 0~33 μmol·L⁻¹浓度的配合物孵育 24 h后,通过流式细胞仪检测了细胞的凋亡效果。结果如图7所示,我们观察到配合物 Ru-L 诱导 A2780 细胞的凋亡效果以剂量依赖性的方式上升,细胞凋亡的百分数由 0.597% 上升到

26.2%。其中配合物浓度达到 1.5 倍的 IC₅₀时,可诱导 11.4%的 A2780 细胞早期凋亡及 14.8%的细胞晚期凋亡。该结果表明配合物 **Ru-L** 通过诱导 A2780 细胞凋亡来发挥其抗肿瘤效果。

2.8 配合物诱导A2780的细胞阻滞

细胞周期主要分为间期和分裂期,其中细胞间 期包括DNA复制的合成前期(G1)、DNA合成期(S)以 及DNA合成后期(G2)。有文献报道紫苏醇及其衍 生物诱导肿瘤细胞阻滞在G2/M期,从而诱导细胞 凋亡^[55]。为了深入了解配合物**Ru-L**对周期阻滞的 影响,我们将A2780细胞用0~33 μmol·L⁻¹浓度的配 合物孵育24h后,用流式细胞仪检测细胞的周期阻 滞效果。结果如图8所示,A2780细胞的G0/G1期的



图 7 配合物 **Ru-L**对 A2780 细胞凋亡图: (A) 细胞群落分布; (B) 细胞群落柱状图统计结果 Fig.7 Apoptosis of A2780 cells by complex **Ru-L**: (A) cell distribution; (B) histogram of cell statistical results





细胞百分数由 56.14% 增加到 74.08%,这就表明配 合物 Ru-L 不同于紫苏醇对肿瘤细胞的 G2/M 期阻 滞,而将 A2780 细胞周期阻滞在 G0/G1 期,从而诱导 A2780 细胞凋亡。

3 结 论

将天然产物紫苏醇进行化学修饰后引入芳基 钌配合物中,得到了一种基于天然产物的芳基金属 配合物 Ru-L,并研究了配合物对人源肿瘤 A2780、 A2780/DDP及MCF-7细胞和人正常 HLF 细胞的抗 癌活性,探究了影响芳基钌配合物抗肿瘤活性的因 素。研究结果表明配合物 Ru-L 对肿瘤细胞表现出 很高的细胞毒活性,并且对正常细胞的毒性要远低 于顺铂。Ru-L 具有较快的水解速度,可以嵌入 DNA 发生碱基堆积作用,同时还可以改变 BSA/HSA 的疏水环境,从而导致蛋白质的二级结构发生变 化。此外,配合物通过将肿瘤细胞阻滞在 GO/G1 期 诱导 A2780 细胞的凋亡,不同于紫苏醇诱导肿瘤细 胞凋亡的作用机制。总之,将紫苏醇引入到芳基钌 配合物中,不仅提高了紫苏醇的抗癌活性,克服了 紫苏醇剂量大、毒性大的缺点,而且拓展了芳基金 属配合物在抗肿瘤活性方面的应用,这些结果将为 芳基金属抗肿瘤药物的研发提供一定的指导意义。

参考文献:

[1] Takahara P M, Rosenzweig A C, Frederick C A, et al. Nature, 1995,377(6550):649-652

- [2] Wang Z G, Wang N, Cheng S C, et al. Chem-US, 2019,5:3151 -3165
- [3] ZHANG Si-Qi(张思琪), GAO Li-Hua(高丽华), ZHAO Hua (赵华), et al. Chinese J. Inorg. Chem.(无机化学学报), 2019, 35(11):1974-1986
- [4] Xue X L, Qian C G, Fang F B, et al. Angew. Chem. Int. Ed., 2019,58(36):12661-12666
- [5] Rabik C A, Dolan M E. Cancer Treat. Rev., 2007,33(1):9-23
- [6] Liu Z, Sadler P J. Acc. Chem. Res., 2014,45:1174-1185
- [7] Zaki M, Hairat S, Aazam E S. RSC Adv., 2019,9:3239-3278
- [8] Zeng L L, Gupta P, Chen Y L, et al. Chem. Soc. Rev., 2017, 46:5771-5804
- [9] Li J J, Guo L H, Tian Z Z, et al. Inorg. Chem., 2018,57(21): 13552-13563
- [10]Liu H K, Sadler P J. Acc. Chem. Res., 2011,44(5):349-359
- [11]Novohradsky V, Rovira A, Hally C, et al. Angew. Chem. Int. Ed., 2019,58(19):6311-6315
- [12]Needham R J, Sanchez-Cano C, Zhang X. Angew. Chem. Int. Ed., 2017,56(4):1017-1020
- [13]Imberti C, Zhang P Y, Huang H Y, et al. Angew. Chem. Int. Ed., 2019,131:2-15
- [14]Kilpin K J, Cammack S M, Clavel C M, et al. Dalton Trans., 2013,42:2008-2014
- [15]Albada B, Metzler-Nolte N. Chem. Rev., 2016,116(19):11797 -11839
- [16]Hao L, Li Z W, Zhang D Y, et al. Chem. Sci., 2019,10:1285-1293
- [17]He L, Liao S Y, Tan C P, et al. Chem. Eur. J., 2013,19(36): 12152-12160
- [18]Zeng W, Zhao Y, Luo Q, et al. Sci. China Chem., 2016, 59: 1240-1249
- [19]Kong Y Q, Chen F, Su Z, et al. J. Inorg. Biochem., 2018,182: 194-199
- [20]Mitra K, Gautam S, Kondaiah P, et al. Angew. Chem. Int. Ed., 2015,54(47):13989-13993
- [21]Wulff J E, Siegrist R, Myers A G. J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(46):14444-14451
- [22]Bailey H H, Attia S, Love R R, et al. Cancer Chemother. Pharmcol., 2008,62:149-157
- [23]Meadows S M, Mulkerin D, Berlin J, et al. Int. J. Gastrointest. Cancer, 2002,32:125-128
- [24]Yuri T, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, et al. Breast Cancer Res. Treat., 2004,84(3):251-260
- [25]Hui Z, Zhang M H, Cong L, et al. Molecules, 2014, 19(5): 6671-6682
- [26]Sarkar S, Azab B, Quinn B A, et al. Curr. Mol. Med., 2014,14 (1):124-140
- [27]Loutrari H, Hatziapostolou M, Skouridou V, et al. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2004,311(2):568-575
- [28]Furrer J, Süss-Fink G. Coord. Chem. Rev., 2016,309:36-50

[29]Wu Q, Liu L Y, Li S L, et al. J. Inorg. Biochem., 2018,189: 30-39

报

- [30]Mohamadi M, Hassankhani A, Ebrahimipour S Y, et al. Int. J. Biol. Macromol., 2017,94:85-95
- [31]Chen T C, Fonseca C O D, Schönthal A H. Am. J. Cancer. Res., 2015,5(5):1580-1593
- [32]YANG Qing(杨清), LUO Wen-Ping(罗文平), WANG Jin-Tao(王金涛), et al. Sci. China Chem., 2014,44(4):437-447
- [33]Kubeil M, Vernooij R R, Kubeil C, et al. J. Inorg. Chem., 2017,56(10):5941-5952
- [34]Kandioller W, Hartinger C G, Nazarov A A, et al. Organometallics, 2009.28(15):4249-4251
- [35]Tang J H, Sun Y, Gong Z L, et al. J. Am. Chem. Soc., 2018, 140(24):7723-7729
- [36]Kepert C M, Deacon G B, Sahely N, et al. Inorg. Chem., 2004,43(9):2818-2827
- [37]Göttle A J, Alary F, Boggio-Pasqua M, et al. Inorg. Chem., 2016.55(9):4448-4456
- [38]Scott R L. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 1956,75:787-789
- [39]Liu Z C, Wang B D, Li B, et al. Eur. J. Med. Chem., 2010,45 (11):5353-5361
- [40]Zhu H B, Wang L, Chen Y M, et al. *RSC Adv.*, **2014**,**4**:29917 -29924
- [41]Meier S M, Kreutz S D, Winter L, et al. Angew. Chem. Int. Ed., 2017,56(28):8267-8271
- [42]Wang Y Q, Wang X Q, Wang J, et al. Inorg. Chem., 2011,50 (24):12661-12668
- [43]Mohanraj M, Ayyannan G, Raja G, et al. Mater. Sci. Eng. C, 2016.69:1297-1306
- [44]Pacheco M E, Bruzzone L J. J. Lumin., 2013,137:138-142
- [45]Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Oncogene, 2012, 31: 1869-1883
- [46]Wang Y R, Feng L, Xu L, et al. Sens. Actuators B, 2017,245: 923-931
- [47]Li H D, Yao Q C, Fan J L, et al. Dyes Pigm., 2016,133:79-85
- [48]Reja S I, Khan I A, Bhalla V, et al. Chem. Commun., 2016, 52(6):1182-1185
- [49]Rastegari B, Karbalaei-Heidari H R, Yousefi R, et al. Bioorg. Med. Chem., 2016,24(7):1504-1512
- [50]Liu Z, Salassa L, Habtemariam A, et al. Inorg. Chem., 2011, 50(12):4022-4027
- [51]Chaudhary S C, Alam M S, Siddiqui M S, et al. Chem. Biol. Interact., 2009,179:145-153
- [52]Xiao H B, Zhang W, Li P, et al. Angew. Chem. Int. Ed., 2019.58:2-17
- [53]Huang H Y, Zhang P Y, Yu B L, et al. J. Med. Chem., 2014, 57(21):8971-8983
- [54]Doll S, Freitas F P, Shah R, et al. Nature, 2019,10:1-7
- [55]Sampath S, Subramani S, Janardhanam S, et al. Phytomedicine, 2018,46:57-68