齐墩果酸-环金属铱配合物的点击化学合成及抗肿瘤性能

李世杰 钱晓婷 黄元镭 薛旭玲* 钱 勇 苏 志 刘红科* (南京师范大学材料与科学学院,南京 210023)

摘要:选择天然产物齐墩果酸进行炔基化修饰(OA-alkyne),与环金属铱前体 CycloIr-N₃在铜催化条件下发生叠氮-块环加成 (CuAAC)反应,得到新的环金属铱配合物 CycloIr-OA,通过¹H NMR、ESI-MS 对配体及配合物进行了表征。配合物具有良好的 脂溶性,可以快速进入细胞。用 MTT法、激光共聚焦成像及流式细胞术对 CycloIr-OA 的抗肿瘤活性和抗癌机制进行了研究。 结果表明,连接齐墩果酸后,配合物 CycloIr-OA 的抗癌活性有较大提升。CycloIr-OA 富集在肿瘤细胞的线粒体中,导致活性 氧产生,同时将细胞周期阻滞在S期,最终诱导肿瘤细胞坏死。

关键词:环金属铱配合物;齐墩果酸;抗肿瘤;坏死
中图分类号:0614.82⁺¹
文献标识码:A
文章编号:1001-4861(2023)02-0317-10
DOI:10.11862/CJIC.2022.289

Click-chemistry synthesis and antitumor properties of cyclometalated iridium(III) complex based on oleanolic acid

LI Shi-Jie QIAN Xiao-Ting HUANG Yuan-Lei XUE Xu-Ling^{*} QIAN Yong SU Zhi LIU Hong-Ke^{*} (School of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Herein, we modified the natural product oleanolic acid with alkyne to synthesize the ligand **OA-alkyne**, and tethered it with cyclic metal iridium precursor **CycloIr-N**₃ to obtain the final complex **CycloIr-OA** via copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction. The ligand and the complex were characterized by ¹H NMR and ESI-MS. The results show that the complex had good lipophilicity, which was helpful to enter the cells quickly. The antitumor activity of **CycloIr-OA** and the mechanism of inducing tumor cell death were further studied by MTT, confocal imaging, and flow cytometry. After oleanolic acid was linked, the anti-cancer activity of complex **CycloIr-OA** was greatly improved. **CycloIr-OA** is enriched in the mitochondria of tumor cells, leading to the production of reactive oxygen species, and at the same time, it blocks the cell cycle in the S phase, ultimately inducing tumor cell necrosis.

Keywords: cyclometalated iridium complex; oleanolic acid; antitumor; necrosis

0 引 言

癌症由于具有高死亡率、易复发、侵袭和强转 移能力,已经成为威胁全球人类健康的主要公共卫 生问题之一^[1]。在癌症的临床治疗中,以顺铂为代 表的金属药物发挥着独特的作用,并在化疗药物发

展的舞台上扮演着重要角色^[2]。近些年来,与铂类 药物相比,非铂类金属配合物具有多样性的结构、 多样化的配位类型、丰富的光学性质及异于顺铂的 抗肿瘤作用机理等优良特性,引起了科研工作者们 的极大兴趣^[38]。其中,环金属铱配合物表现出良好 的光物理特性,这使其成为医疗试剂和成像剂的最

收稿日期:2022-08-20。收修改稿日期:2022-11-09。 国家自然科学基金(No.21771109,22077066,21807060)资助。 *通信联系人。E-mail:xuexuling87@163.com,liuhongke@njnu.edu.cn

报

佳候选者^[9]。Mao等通过对环金属铱配合物进行*N*-杂环卡宾修饰,实现了特定靶向线粒体的光动力治疗^[10]。Chao等通过调节环金属铱配合物的相关配体来调节其亲脂性^[11]。本课题组设计的环金属铱与大黄酸相结合后实现了克服顺铂耐药性^[12],启发我们将金属前体与天然产物相结合,有望实现金属药物的多功能化应用^[13]。

天然产物因其具有可修饰的活性位点、丰富的 生物活性以及潜在的靶点等优势,逐渐走入人们的 视野。Liang课题组将天然存在的生物碱1,2,3,4-四氢异喹啉(THIQ)进行修饰后与有机金属Au结合 引起内质网应激,诱导癌细胞凋亡和自噬14。本课 题组在天然产物的金属化修饰方面做了一系列研 究,并取得了较大的进展。我们发现,将天然产物 与金属配合物连接后能够克服天然产物固有的缺 陷。将姜黄素与半夹心Os(II)芳烃偶联,开辟了Os-芳烃配合物的光化学疗法[15]。对天然产物阿魏酸进 行化学修饰后,通过酰胺反应与环金属钌连接,使 其具有良好的荧光性能119,将紫苏醇引入到芳基钌 配合物中,克服了其剂量大、毒性大的缺点四。齐墩 果酸(oleanolic acid)是广泛存在于天然植物中的一 种提取物,表现出较强的抗肿瘤活性,能抑制多种 肿瘤细胞的增殖(如慢性粒细胞白血病细胞、人宫颈 癌细胞及肝癌细胞株等),通过调控细胞周期的停滞 节点以达到杀死肿瘤的效果[18-21]。然而,由于齐墩 果酸水溶性差、药用剂量大及生物相容性差等缺 陷,限制了其在临床上的发展。因此,将其与水溶 性、生物相容性好的环金属铱结合,将有可能提高 齐墩果酸的成药性,同时也有助于提高配合物的生 物活性。铜催化的叠氮-炔环加成(CuAAC)反应是 诺贝尔化学奖得主K. Barry Sharpless于2001年提出 的,其可在细胞内发生,具有反应速率快、副产物对 细胞无毒、条件温和、对水与氧等环境不敏感等特 性,已广泛应用于生物和化学领域[22]。

在本研究中,我们将齐墩果酸、环金属铱分别 通过化学修饰,制备出含有炔基或叠氮基团的前 体,通过CuAAC反应得到了新型配合物。通过现代 分析手段对化合物组成及脂溶性进行了表征和测 试,同时研究了细胞毒性及抗癌机理。

1 实验部分

1.1 实验试剂和仪器

三氯化铱水合物(IrCl₃·H₂O)、4-叠氮基甲基-4'-

甲基-2,2'-联吡啶(N₃-bpy)根据文献路线合成^[23]。其 余试剂均为购买后直接使用,未进行任何提纯。齐 墩果酸、二氧化硒、五水合硫酸铜(CuSO₄·5H₂O)、抗 坏血酸钠、2-苯基吡啶、炔丙胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI)、1-羟基苯并三氮唑 (HOBT)、硼氢化钠、叠氮化钠购于天津希恩思。其 余试剂购于南京晚晴。牛血清白蛋白(BSA)、 Dulbecco's Modified Eagle Medium 细胞培养基 (DMEM)、双抗(链霉素和青霉素)、胰蛋白消化酶、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、2',7'-二氯荧光 素二乙酸盐(H₂DCF-DA)试剂盒等生物试剂均购于 南京凯基生物。

¹H NMR 波谱使用 Bruker Avance II 400 MHz 光 谱仪检测。电喷雾电离质谱(ESI-MS)使用 LCQ 光谱 仪(Thermo Scientific)质谱仪检测。UV-Vis 光谱使用 Lambda 365 紫外可见分光光度计测得。荧光光谱 使用 FS5 荧光分光光度计(Edinburgh Instrument)获 得。细胞毒活性通过多功能酶标仪 LabServ K3 测 定。用激光共聚集显微镜(A1,Nikon)测试配合物在 细胞内的共定位成像。应用流式细胞仪(BD FACSverse,美国)进行细胞凋亡、周期及活性氧等分 析测定。

1.2 配体及配合物的合成

1.2.1 配体**OA-alkyne**的合成

在冰浴和氩气保护条件下,将齐墩果酸(0.91 g, 2.0 mmol)与 EDCI(0.38 g,4 mmol)溶于 50 mL 无水 DMF 中,缓慢滴加 300 μL 三乙胺,并在 0 ℃下搅拌 20 min,随后加入含有 HOBt(0.21 g,1.6 mmol)的无水 DMF 溶液,继续搅拌 20 min。最后,加入炔丙胺 (0.13 g,2.4 mmol),反应 16 h。然后加入 50 mL水,用 二氯甲烷(3×20 mL)萃取,合并有机层,用无水硫酸 钠干燥,旋蒸除去二氯甲烷,粗产物经柱层析纯化 (DCM/MeOH,200:1,V/V),得到 0.47 g白色固体产物 **OA - alkyne**(产率 50%)。¹H NMR(400 MHz, DMSOd₆): δ 7.68(q, J=5.7 Hz,1H),5.21(d, J=3.4 Hz,1H),4.30 (d, J=5.1 Hz,1H),3.88~3.70(m,2H),3.03~2.97(m,1H), 2.96(t, J=2.5 Hz, 1H), 2.79(dd, J=13.6, 4.5 Hz, 1H), 1.93~1.20(m,21H),1.14~1.02(m,6H),0.87(dd, J=11.1, 7.6 Hz,16H)。

1.2.2 桥联配体 N₃-bpy 的合成

在氩气的保护下,向150 mL1,4-二氧六环中加入4,4'-二甲基-2,2'-二联吡啶(8.0 g,43.0 mmol)和二氧化硒(8.0 g,71 mmol),将该混合物回流24 h。使其

冷却到室温,过滤,旋转蒸发,干燥,加入三氯甲烷, 得到黄色固体,将所得的固体溶于50 mL甲醇中,并 置于冰浴中,继续用溶解有2.8 g NaBH₄的20 mL氢 氧化钠(0.1 mol·L⁻¹)溶液滴加到上述混合物中,在室 温下搅拌1h,旋转蒸发除去甲醇,剩余的水溶液用 饱和碳酸氢钠溶液稀释后用三氯甲烷萃取。用无 水硫酸钠干燥,旋转蒸发除去溶剂,并通过柱层析 法纯化(DCM/MeOH,110:1,*V/V*),得到白色固体L1 (4.0 g,47%)。

在40 mL的48% 溴化氢溶液中添加上述获得的 L1(2.0g, 10.0 mmol), 再将 10 mL浓硫酸加至该溶液 中,回流过夜。待冷却到室温后,将该混合物倒入 100 mL的冰水中,用碳酸钠调整 pH 值到 8.0,然后 用三氯甲烷萃取无色的有机层,然后用无水硫酸钠 干燥,旋转蒸发除去溶剂;经柱层析纯化(DCM/ MeOH, 50:1, *V/V*), 获得 L2(2.4 g, 93%)。将 L2(5 g, 19 mmol) 和叠氮化钠(6.4 g, 86 mmol) 溶解在 DMF/ H₂O(10:1, V/V, 50 mL)中,并将混合物在70℃下搅拌 过夜,真空除去溶剂,用二氯甲烷萃取并用水洗涤, 无水硫酸钠干燥后除去溶剂,用柱色谱纯化(DCM/ TEA,40:1, *V*/*V*)后得到白色油状固体 N₃-bpy(4.0 g, $87\%)_{\circ}$ ¹H NMR(400 MHz, DMSO - d₆): δ 8.68(dd, J= 4.9, 0.8 Hz, 1H), 8.55(dd, J=5.0, 0.8 Hz, 1H), 8.38(dd, J=1.7, 0.9 Hz, 1H), 8.26(dt, J=1.7, 0.9 Hz, 1H), 7.44~ 7.41(m, 1H), 7.31(ddd, J=5.0, 1.8, 0.8 Hz, 1H), 4.70(s, 2H), 2.42(d, J=0.7 Hz, 3H)_o

1.2.3 CycloIr-N₃的合成

将 IrCl₃·H₂O(0.31 g, 1 mmol)与 2-苯基吡啶(ppy, 0.62 g, 4 mmol)溶解在2-乙氧基乙醇(20 mL)和水(10 mL)混合溶剂中,加热回流过夜。反应完成后,冷却 至室温过滤,再将沉淀物溶于40mL二氯甲烷中离 心,取上清液。将20 mL的甲苯和10 mL的正己烷 添加到滤液中,旋蒸将溶剂量减少至10 mL,在4 ℃ 冰箱静置一晚,获得[Ir(ppy)2Cl]2。在氩气保护条件 下,称取[Ir(ppy),Cl],(1.07 g, 1.0 mmol)和 N₃-bpy(0.55 g,2.2 mmol)溶解于二氯甲烷与甲醇(3:1, V/V,24 mL) 中,将混合物在40℃下回流搅拌过夜。旋转蒸发去 除溶剂,将固体溶于15mL甲醇,向上述甲醇溶液中 缓慢加入饱和六氟磷酸铵溶液,收集得到的黄色固 体沉淀,用硅胶柱层析(DCM/MeOH,100:1,V/V),得 到0.61g黄色固体产物CycloIr-N₃,产率约为35%。 ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 8.60(d, J=1.7 Hz, 1H), 8.54(s,1H), 7.96~7.88(m, 3H), 7.82~7.75(m, 3H), 7.70 (dt, *J*=8.0, 1.5 Hz, 2H), 7.54(ddd, *J*=7.5, 5.8, 1.3 Hz, 2H), 7.43(dd, *J*=5.7, 1.6 Hz, 1H), 7.23~7.20(m, 1H), 7.06(dtdd, *J*=13.1, 7.1, 5.7, 1.4 Hz, 4H), 6.93(tdd, *J*=7.5, 3.2, 1.3 Hz, 2H), 6.32(ddd, *J*=7.7, 3.4, 1.2 Hz, 2H), 4.81(s, 2H), 2.62(s, 3H)。 MS(*m*/*z*): [**CycloIr-N**₃-PF₆]⁺理论值726.2,实验值726.1。

1.2.4 配合物 CycloIr-OA 的合成

在氩气保护下,将配合物 CycloIr-N₃(0.029 g, 0.04 mmol)、 配体 OA - alkyne(0.024 g, 0.05 mmol)、 CuSO₄·5H₂O(0.002 g, 0.01 mmol) 与抗坏血酸钠 (0.001 g, 0.01 mmol)加入到 5 mL 无水 DMF 中, 在室 温和黑暗条件下,将混合物搅拌8h,旋蒸除去溶剂 DMF, 通过硅胶柱层析纯化(DCM/MeOH, 200:1, V/ V),得到黄色配合物 CycloIr-OA(0.017 g, 32%)。¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.86(dd, *J*=19.8, 1.7 Hz, 1H), 8.31~8.22(m, 2H), 8.00(d, J=9.3 Hz, 1H), 7.97~ $7.76(m, 6H), 7.70(d, J=5.6 Hz, 1H), 7.66 \sim 7.51(m, 3H),$ 7.17(dddd, J=14.5, 11.5, 5.8, 1.5 Hz, 3H), 7.01(tdd, J= 7.2, 5.8, 1.3 Hz, 2H), 6.95~6.82(m, 2H), 6.23~6.10(m, 2H), 5.83(d, J=5.2 Hz, 2H), 5.13(q, J=3.1 Hz, 1H), 4.33(d, J=5.0 Hz, 1H), 4.24(q, J=7.5, 5.4 Hz, 2H), 2.97 $(t, J=7.0 \text{ Hz}, 1\text{H}), 2.77 \sim 2.71(m, 1\text{H}), 2.55(s, 3\text{H})_{\circ} \text{ MS}$ (*m/z*): [CycloIr - OA-PF₆]⁺理论值1 220.62,实验值 1 219.65

1.3 配合物的光物理性质检测

使用紫外可见分光光度计检测配合物前体和 配合物的紫外可见吸收光谱。将配体和配合物溶 于 DMSO 中,配制出 20 mmol·L⁻¹的浓储液,再用 Milli-Q 超纯水将配合物前体和配合物的浓储液稀 释成 30 μmol·L⁻¹的样品溶液(H₂O/DMSO,99:1, V/V),并在实验时将吸收波长采集范围设为 250~ 600 nm。

使用荧光分光光度计检测前体 **CycloIr-N**₃和配合物 **CycloIr-OA**在 298 K下的荧光发射光谱。用水将前体 **CycloIr-N**₃和配合物 **CycloIr-OA**的浓储液分别稀释成 10 μ mol·L⁻¹的样品溶液(H₂O/DMSO, 99:1,*V/V*),并记录下 400~800 nm 范围内的发射光谱(激发波长为 405 nm)。

1.4 细胞毒性研究

用 MTT 法对 OA-alkyne、CycloIr-N₃、配合物 CycloIr-OA 以及阳性对照药物顺铂(cisplatin)进行 细胞毒活性测定。选取人源癌细胞 A2780、A549、 HeLa 以及正常人肺成纤维 HLF 细胞。细胞在 DMEM 中培养。将对数生长期的细胞接种在96孔 板(每孔5000个)中,在CO₂体积分数5%、310 K条件 下培养过夜,然后加入不同浓度的待测药物(DMEM/ DMSO,99:1,V/V)继续孵育48h。每孔加入20 μ L MTT(5 mg·mL⁻¹),继续孵育4h。小心地将培养液吸 出,溶解在150 μ L的DMSO中,使用LabServ K3 酶 标仪进行振荡混匀后,读取590 nm处吸光度值,计 算半抑制浓度(IC₅₀)。

1.5 配合物的脂溶性测试

使用摇瓶法^[24]测试并计算 CycloIr - N₃和 CycloIr-OA的脂水分配系数lg P_{olv} 。将等体积的正 辛醇与0.9%的氯化钠溶液振摇2d,使两相之间混 合充分,将配体和配合物分别溶解在氯化钠溶液中, 然后加入等量的正辛醇,在37 ℃、500 r·min⁻¹下摇动 6h,将样品在8000 r·min⁻¹的转速下离心8 min,用 分液漏斗将两相分离,使用紫外可见分光光度计分 别测试有机相和水相中的吸光度,利用对数求出 lg P_{olv} 。最后结果用3次独立实验的平均值表示。

1.6 配合物的细胞定位检测

分别使用线粒体探针 Mito-green,溶酶体探针 Lyso-blue 和细胞核探针 Hoechst33342 检测 A2780 细 胞的 3 种亚细胞器中 **CycloIr-OA** 的分布情况。将 A2780 细胞以 5×10^{5} mL⁻¹的密度接种于4孔板中,在 CO₂体积分数 5%、310 K条件下孵育 12 h,以保证其 贴壁生长。然后向其中加入含2 μ mol·L⁻¹ **CycloIr-OA** 的 DMEM 培养基(DMEM/DMSO,99:1,*V/V*)溶液继续 孵育 12 h。将培养基吸出,用磷酸盐缓冲溶液(PBS) 洗涤 3 次,分别加入 2 μ mol·L⁻¹ 探针避光孵育 30 min,用 PBS洗涤 3 次,在共聚焦显微镜下进行测试。

1.7 配合物诱导细胞凋亡检测

利用细胞凋亡检测试剂盒探究配合物 CycloIr-N₃和 CycloIr-OA 诱导 A2780 细胞的死亡方式。 在 6 孔板中接种上密度为 1.5×10⁶ mL⁻¹的 A2780 细 胞,在 CO₂体积分数 5%、310 K条件下孵育 12 h,以 保证其贴壁生长。然后向每孔中加入只含有 1% DMSO 的 DMEM 培养基(DMEM/DMSO,99:1,*V/V*)以 及含有不同浓度梯度的配合物培养基继续孵育 24 h。收集细胞,用 1×PBS缓冲液清洗细胞 2次,加入 500 μL 的 Binding buffer,重悬细胞。将 5 μL 的 V-FITC 和 5 μL 的 PI 加入到每个孔中后,在黑暗条件 下染色 20 min,并使用流式细胞仪对样品进行检测。

1.8 配体和配合物诱导细胞内活性氧检测

将A2780细胞以1.5×10° mL⁻¹的密度接种于6

孔板中,在CO₂体积分数5%、310 K条件下孵育12 h。然后向其中加入只含有DMSO的DMEM培养基 (DMEM/DMSO,99:1,V/V)以及含有不同浓度梯度 **CycloIr-N**₃和 **CycloIr-OA**的培养基继续孵育12 h, 用1×PBS缓冲液洗涤3次,在避光条件下,加入无血 清DMEM稀释的H₂DCF-DA探针(10 μmol·L⁻¹)孵育 25 min。收集细胞,用1×PBS洗涤2次,加入500 μL 并重悬。通过流式细胞仪在对样品进行分析,并使 用FlowJo 10.1处理数据。

将A2780细胞以 5×10^{5} mL⁻¹的密度接种于共聚 焦小皿中,在CO₂体积分数5%、310 K条件下孵育 12 h,接着将含2 μ mol·L⁻¹待测药物的DMEM培养 基(DMEM:DMSO,99:1,*V/V*)溶液加入到皿中,继续 孵育12 h。在避光条件下,使用H₂DCF-DA(10 μ mol·L⁻¹)探针染色25 min,用1×PBS缓冲液洗涤2 次,通过共聚焦成像进行监测。 λ_{ex} =488 nm, λ_{em} = (510±20) nm。

1.9 配合物阻滞细胞周期检测

使用细胞周期检测试剂盒研究配合物 **CycloIr-N**₃和 **CycloIr-OA** 对 A2780 细胞周期的影响。在6 孔板中接种上密度为1.5×10⁶ mL⁻¹的 A2780 细胞,在 CO₂体积分数 5%、310 K条件下孵育 12 h。接着将 含有不同浓度梯度的配合物孵育细胞24 h。收集细胞,用1×PBS(4 °C)洗涤2次,加入体积分数为70%的 冰乙醇来重悬细胞,并置于4 °C的冰箱中固定过夜。将固定的细胞离心收集细胞(5 000 r·min⁻¹,5 min, 4 °C),并将染色液(PI/RNase A,9:1,*VIV*)加入到细胞 中继续孵育 30 min。用流式细胞仪对样品进行检测 $(\lambda_{er}=488 \text{ nm}, \lambda_{er}=620 \text{ nm})$ 。

2 结果与讨论

2.1 合成与表征

选取齐墩果酸进行化学修饰得到炔端配体 OA-alkyne^[25],将桥联配体N₃-bpy与铱二聚体 [Ir(ppy)₂Cl]₂进行反应得到含有叠氮端的环金属铱配 合物前体CycloIr-N₃,将CycloIr-N₃与OA-alkyne在 铜催化的条件下进行CuAAC反应^[26],得到新配合物 CycloIr-OA,合成路径如图1所示,并通过¹H NMR 及ESI-MS对配合物进行了表征(图S1~S4,Supporting information)。

2.2 配合物前体和配合物的光学性质

金属配合物所具有的光物理性质有助于实现 在体内进行跟踪检测,并进一步探索其在细胞中的





生理功能^[27]。图 2A、2B 分别为前体 CycloIr-N₃、配 合物 CycloIr-OA 的紫外吸收及荧光发射光谱。 CycloIr-N₃的紫外吸收波长主要在 250 nm,荧光发 射波长在 600 nm,这与 CycloIr-OA 的紫外吸收和 荧光发射波长基本吻合。CycloIr-OA 在 250~450 nm的吸收峰归属于金属到配体的电荷转移(¹MLCT 及³MLCT),及配体到配体的电荷转移(LLCT)^[28]。 **CycloIr-OA**用405 nm的光激发时,在600 nm处有 较强的荧光发射峰,为在体内进行可视追踪提供了 可能。





2.3 配合物的脂水分配系数

药物的亲水性或亲脂性过高或低会对药效产

生不利影响^[29]。这种性质常用 lg P_{ole}表示,其值越大,化合物越容易透过细胞膜进入细胞内,反之化

 μ mol·L⁻¹

合物易溶于水。我们使用摇瓶法对 CycloIr-N₃和 CycloIr-OA 的脂溶性进行了测试,并用 lg P_{ofw}说明 化合物的亲脂性能。CycloIr-N₃和 CycloIr-OA 的 lg P_{ofw}分别为1.82±0.03和0.8±0.05,这表明引入齐墩 果酸后有效加强了配合物 CycloIr-OA 的水溶性,克 服了齐墩果酸原有的水溶性差等缺陷,使其与人体 环境更好地适配,增加了药物的吸收速度。

2.4 细胞毒性活性研究

采用 MTT 法测定了 OA-alkyne、CycloIr-N₃和 CycloIr-OA 对肿瘤细胞 A2780、A549、HeLa 及正常 细胞 HLF 的细胞毒性,以顺铂为对照化合物。由 IC₅₀值(表 1)可以看出,配体 OA-alkyne 对上述肿瘤 细胞表现出较低毒性,其中对 A2780 细胞的 IC₅₀为 40.5 μ mol·L⁻¹; CycloIr-N₃对上述肿瘤细胞均表现出 较好的抗肿瘤活性,尤其对A2780细胞的毒性最好, IC₅₀低至5.6 μ mol·L⁻¹。而当两者通过CuAAC反应 结合后,得到的新配合物CycloIr-OA对上述肿瘤细 胞的毒性有了明显的提升,优于临床药物顺铂:对 A2780 细胞的 IC₅₀ 仅为 1.6 μ mol·L⁻¹,比前体 CycloIr-N₃的活性提高了2.5倍,仅为顺铂的IC₅₀的 五分之一。这一结果表明,天然产物齐墩果酸的引 入可以较大地提升金属配合物的抗肿瘤活性,为高 活性抗癌金属药物的研制提供了新途径。由于配 合物CycloIr-OA对A2780细胞的抗癌活性最佳,我 们选用A2780细胞进行抗癌作用机理研究。

表1 化合物 OA-alkyne、CycloIr-N₃、CycloIr-OA 对癌细胞 A2780、A549、HeLa 和正常细胞 HLF 48 h的 IC₅₀值 Table 1 IC₅₀ values of OA-alkyne, CycloIr-N₃, and CycloIr-OA against A2780, A549, HeLa cancer, and normal HLF cell lines for 48 h

Compound	A2780	A549	HeLa	HLF
OA-alkyne	40.5±2.1	58.6±2.7	59.7±2.7	30.7±0.7
CycloIr-N ₃	5.6±0.8	7.1±1.9	7.0±0.3	7.4±0.2
CycloIr-OA	1.6±0.1	5.2±0.3	3.8±0.2	4.5±0.2
Cisplatin	8.1±0.3	9.5±2.5	10.0±0.7	8.6±0.7

2.5 配合物的亚细胞器分布

激光共聚焦成像是探索药物亚细胞器定位 常用的方法^[30]。配合物 CycloIr-OA 具有良好的荧 光性质,因此我们使用3种商用的细胞器探针 Mito-green(线粒体)、Lyso-blue(溶酶体)及 Hoechst33342(细胞核),通过共聚焦显微镜分析了 CycloIr-OA 在 A2780 细胞内的分布情况。如图3 所示, CycloIr-OA 的红色荧光与线粒体探针 Mitogreen的荧光信号有较好的重叠,处理分析后得到 CycloIr-OA 与线粒体共定位系数为0.92,与溶酶体 的共定位系数为0.52,基本不定位在细胞核,结果说 明CycloIr-OA 靶向 A2780 细胞的线粒体。线粒体 是细胞和生物体内稳态的重要调节者,涉及许多复 杂的癌症生物学过程,如细胞信号传递、细胞代谢 和细胞死亡等。因此,线粒体成为抗肿瘤的重要靶 点[31]。靶向线粒体是一种可行、有效和安全的抗肿 瘤靶向策略。

2.6 配合物 CycloIr-OA 诱导细胞内活性氧的产生

正常细胞通过控制细胞内活性氧(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。据文献报道,促进癌细胞产生ROS是金属药 物杀伤肿瘤细胞的作用机制之一[32]。因此为了进一 步研究配合物 CycloIr-OA 诱导细胞死亡的作用机 理,我们使用商业化的ROS探针H,DCF-DA检测了 肿瘤细胞中的ROS水平[33]。细胞中产生的ROS可 以将探针氧化为有荧光的DCF,可以通过观察荧光 强度表示细胞内 ROS 水平。CycloIr-N,处理后 A2780细胞的绿色荧光强度没有明显增强,流式细 胞术结果也证实了 CycloIr-N,处理后细胞内 ROS 增 加并不明显(图 S5)。CycloIr-OA 处理后的 A2780 细 胞与未加药的对照组相比绿色荧光强度增强(图 4A),表明齐墩果酸的引入可诱导细胞产生过量的 ROS。流式细胞术也证实了 CycloIr-OA 处理后细 胞内ROS的增加(图4B),并呈现出配合物的浓度依 赖性,说明ROS的产生可能是诱导癌细胞死亡的原 因之一。

2.7 配合物诱导A2780细胞周期阻滞和凋亡

通过流式细胞仪研究了 CycloIr-OA 对细胞周期的影响,结果如图 5 所示。与未加药物的对照组相比,当将不同浓度的 CycloIr-OA 孵育 A2780 细胞



CycloIr-OA: λ_{ex} =405 nm, λ_{em} =590 nm; Mito-green: λ_{ex} =490 nm, λ_{em} =516 nm; Lyso-blue: λ_{ex} =405 nm, λ_{em} =425 nm; Hoechst 33342: λ_{ex} =405 nm, λ_{em} =460 nm

- 图3 配合物 CycloIr-OA 与 A2789 细胞于 37℃孵育 24 h 后的共聚焦显微镜图,图中可以看到 CycloIr-OA 主要分布在线粒体
- Fig.3 Confocal micrograph of complex CycloIr-OA and A2789 cells incubated at 37 °C for 24 h shows that CycloIr-OA is mainly distributed in mitochondria



- 图 4 CycloIr-OA 诱导 A2780 细胞产生 ROS: (A) CycloIr-OA (2 μmol·L⁻¹)处理 A2780 细胞 12 h 后 ROS 生成的共聚焦图像;
 (B) CycloIr-OA (control 和1、2、4 μmol·L⁻¹)处理 A2780 细胞 12 h 后 ROS 生成的流式细胞图
- Fig.4 ROS generation induced by CycloIr-OA in A2780 cells: (A) confocal images of ROS generation in A2780 cells treated with CycloIr-OA (2 μmol·L⁻¹) for 12 h; (B) ROS generation in A2780 cells treated with different concentrations of CycloIr-OA (control and 1, 2, 4 μmol·L⁻¹) for 12 h by flow cytometry

24 h后,配合物诱导的S期的细胞比例随药物浓度 的增大而增大;用6μmol·L⁻¹ CycloIr-OA 处理后S 期细胞数量由13.2%增长到34.9%,而G0/G1期细胞 数量从64.5%减少至38.4%,说明CycloIr-OA 以浓 度依赖的方式将细胞周期阻滞在S期,从而诱导细 胞死亡。经不同浓度前体配合物CycloIr-N₃处理后 的细胞,随着药物浓度的增加,未能对A2780细胞起 到阻滞作用(图S6)。上述结果说明将齐墩果酸引入 到环金属铱中,增强了其对细胞阻滞的效果。

细胞凋亡揭示了一种广泛的免疫病的致病机 理,尤其是凋亡与肿瘤的相关性越来越受到关 注^[34-35]。通过流式细胞仪对配合物 **CycloIr-OA**诱导 细胞凋亡的情况进行检测,结果如图6所示。在二 维散点图上,Annexin V是x轴,PI是y轴,十字门将 图片分为4个象限:左上象限Q1区域的细胞为坏死 细胞;右上象限Q2区域的细胞为晚期凋亡细胞;右



图 5 CycloIr-OA (control和2、4、6 μmol·L⁻¹)和A2780 孵育24 h 后并用PI染色,通过流式细胞术测定细胞周期 Fig.5 Cell cycle assay of A2780 cells by flow cytometry after incubation with CycloIr-OA (control and 2, 4, 6 μmol·L⁻¹) for 24 h and stained with PI



图 6 CycloIr-OA (control和1、2、4 μmol·L⁻¹)和A2780 孵育24 h并用Annexin V-FITC和PI染色后, 通过流式细胞术进行凋亡测定

 $[\]label{eq:Fig.6} Fig.6 \quad \mbox{Apoptotic assays of A2780 cells by flow cytometry after incubation with $CycloIr-OA$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI $PITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 h and stained with Annexin V-FITC and PI$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 μmol·L^-1$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 μmol·L^-1$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 μmol·L^-1$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 μmol·L^-1$ (control and 1, 2, 4 μmol·L^-1$) for 24 μmol·L^-1$ (control and 2, 2 μmol·L^-1$) for 24 μmol·L^-1$ (control and 2,$

下象限Q3区域的细胞为早期凋亡细胞;左下象限 Q4区域的细胞为活细胞^[36]。可以看出,随着浓度的 增加,处于坏死区域的细胞比例在逐渐增加。在用 4 μmol·L⁻¹的药物处理24h后,坏死细胞的含量由 2.20%增加到75.2%。而经同样浓度的CycloIr-N₃ 处理后,坏死细胞含量仅由9.34%增加到12.1%(图 S7),由此可见,环金属铱连接齐墩果酸后,使肿瘤细 胞坏死数量有了明显提高。因此,CycloIr-OA 主要 以诱导肿瘤细胞坏死的方式导致细胞的死亡。

3 结 论

我们通过点击反应将无毒性的五环三萜类化 合物齐墩果酸引入到环金属铱配合物中,配合物 CycloIr-OA的抗肿瘤活性有较大提升,明显优于临 床药物顺铂,对A2780细胞的IC_{so}为1.6 μmol·L⁻¹,仅 为顺铂的五分之一。CycloIr-OA 主要富集在线粒 体中,通过产生大量活性氧杀伤肿瘤细胞,并将肿 瘤细胞周期阻滞在S期,诱导肿瘤细胞的坏死。将 天然产物引入到金属前体中,不仅提高了配合物的 抗肿瘤活性,而且拓展了天然产物在金属药物中的 应用,为新型高活性金属配合物的设计、合成提供 了指导。

Supporting information is available at http://www.wjhxxb.cn

参考文献:

- [1]Xiong X, Liu L Y, Mao Z W, Zou T T. Approaches towards understanding the mechanism-of-action of metallodrugs. *Coord. Chem. Rev.*, 2022,453:214311
- [2]Ouyang C, Chen L, Rees T W, Chen Y, Liu J K, Ji L N, Long J G, Chao H. A mitochondria - targeting hetero - binuclear Ir (III) - Pt (II) complex induces necrosis in cisplatin - resistant tumor cells. *Chem. Commun.*, 2018,54(49):6268-6271
- [3]Xiong K, Ouyang C, Liu J Q, Karges J, Lin X L, Chen X, Chen Y, Wan J, Ji L N, Chao H. Chiral Ru(II)-Pt(II) complexes inducing telomere dysfunction against cisplatin - resistant cancer cells. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2022,61:e202204866
- [4]Qin W W, Pan Z Y, Cai D H, Li Y, He L. Cyclometalated iridium(III) complexes for mitochondria-targeted combined chemo-photodynamic therapy. *Dalton Trans.*, 2020,49(11):3562-3569
- [5]Zamora A, Vigueras G, Rodríguez V, Santana M D, Ruiz J. Cyclometalated iridium(III) luminescent complexes in therapy and phototherapy. *Coord. Chem. Rev.*, 2018,360:34-76
- [6]Yuan H, Han Z, Chen Y C, Qi F, Fang H B, Guo Z J, Zhang S R, He W J. Ferroptosis photoinduced by new cyclometalated iridium (III)

complexes and its synergism with apoptosis in tumor cell inhibition. Angew. Chem. Int. Ed., **2021,60**(15):8174-8181

- [7]He L T, Xiong K, Wang L L, Guan R L, Chen Y, Ji L N, Chao H. Iridium (III) complexes as mitochondrial topoisomerase inhibitors against cisplatin-resistant cancer cells. *Chem. Commun.*, **2021**,**57**(67):8308-8311
- [8]Zhang C, Guan R L, Liao X X, Ouyang C, Rees T W, Liu J P, Chen Y, Ji L N, Chao H. A mitochondria-targeting dinuclear Ir-Ru complex as a synergistic photoactivated chemotherapy and photodynamic therapy agent against cisplatin-resistant tumour cells. *Chem. Commun.*, 2019, 55(83):12547-12550
- [9]Caporale C, Massi M. Cyclometalated iridium (III) complexes for life science. Coord. Chem. Rev., 2018,363:71-91
- [10]Li Y, Liu B, Lu X R, Li M F, Ji L N, Mao Z W. Cyclometalated iridium(III) N-heterocyclic carbene complexes as potential mitochondrial anticancer and photodynamic agents. *Dalton Trans.*, 2017, 46(34): 11363-11371
- [11]Qiu K Q, Liu Y K, Huang H Y, Liu C F, Zhu H Y, Chen Y, Ji L N, Chao H. Biscylometalated iridium(III) complexes target mitochondria or lysosomes by regulating the lipophilicity of the main ligands. *Dalton Trans.*, 2016,45(41):16144-16147
- [12]Wang M M, Xu F J, Su Y, Geng Y, Qian X T, Xue X L, Kong Y Q, Yu Z H, Liu H K, Su Z. A new strategy to fight metallodrug resistance: Mitochondria-relevant treatment through mitophagy to inhibit metabolic adaptations of cancer cells. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2022, 61(27):e202203843
- [13]Xue X L, Qian C G, Tao Q, Dai Y X, Lv M D, Dong J W, Su Z, Qian Y, Zhao J, Liu H K, Guo Z J. Using bio-orthogonally catalyzed lethality strategy to generate mitochondria-targeting anti-tumor metallodrugs *in vitro* and *in vivo*. *Natl. Sci. Rev.*, **2021,8**(9):nwaa286
- [14]Huang K B, Wang F Y, Tang X M, Feng H W, Chen Z F, Liu Y C, Liu Y N, Liang H. Organometallic gold(III) complexes similar to tetrahydroisoquinoline induce ER - stress - mediated apoptosis and prodeath autophagy in A549 cancer cells. J. Med. Chem., 2018, 61(8): 3478-3490
- [15]Xue X L, Fu Y, He L, Salassa L, He L F, Hao Y Y, Koh M J, Soulie C, Needham R J, Habtemariam A, Garino C, Lomachenko K A, Su Z, Qian Y, Paterson M J, Mao Z W, Liu H K, Sadler P J. Photoactivated osmium arene anticancer complexes. *Inorg. Chem.*, **2021**, **60**(23): 17450-17461
- [16]陶软,吴健,葛超,王萌萌,吕梦迪,薛旭玲,刘红科.反式阿魏酸 钌配合物的合成、表征、荧光光谱及其与DNA/蛋白作用.无机化 学学报,2020.36(10):1853-1864
 - TAO Q, WU J, GE C, WANG M M, LÜ M D, XUE X L, LIU H K. Synthesis, characterization, fluorescence and interactions with DNA/ BSA properties of ruthenium ferulate complexes. *Chinese J. Inorg. Chem.*, **2020,36**(10):1853-1864
- [17]吴健,陶钦,葛超,薛旭玲,钱勇,刘红科.紫苏醇芳基钌配合物的合成及抗肿瘤性能.无机化学学报,2020,36(7):1223-1232
 WU J, TAO Q, GE C, XUE X L, QIAN Y, LIU H K. Synthesis and antitumor properties of 3-(2-pyridine-3-vinyl)-1*H*-indole dipyridine

ruthenium complex. Chinese J. Inorg. Chem., 2020,36(7):1223-1232

- [18]Luo Y, Liu Z, Zhang X, Huang J, Yu X, Li J, Xiong D, Sun X, Zhong Z. Effect of a controlled-release drug delivery system made of oleanolic acid formulated into multivesicular liposomes on hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. Int. J. Nanomed., 2016,11:3111-3129
- [19]Hu C X, Cao Y B, Li P, Tang X R, Yang M H, Gu S L, Xiong K, Li T, Xiao T B. Oleanolic acid induces autophagy and apoptosis via the AMPK-mTOR signaling pathway in colon cancer. *J. Oncol.*, 2021: 8281718
- [20]Wang H Z, Zhong W L, Zhao J M, Zhang H, Zhang Q, Liang Y, Chen S, Liu H J, Zong S M, Tian Y X, Zhou H G, Sun T, Liu Y R, Yang C. Oleanolic acid inhibits epithelial-mesenchymal transition of hepato-cellular carcinoma by promoting iNOS dimerization. *Mol. Cancer Ther.*, 2019,18(1):62-74
- [21]Xiao S L, Tian Z Y, Wang Y F, Si L L, Zhang L H, Zhou D M. Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives. *Med. Res. Rev.*, 2018,38 (3):951-976
- [22]Agrahari A K, Bose P, Jaiswal M K, Rajkhowa S, Singh A S, Hotha S, Mishra N, Tiwari V K. Cu(I)-catalyzed click chemistry in glycoscience and their diverse applications. *Chem. Rev.*, 2021,121(13):7638-7956
- [23]Ye R R, Peng W, Chen B C, Jiang N, Chen X Q, Mao Z W, Li R T. Mitochondria-targeted artesunate conjugated cyclometalated iridium(III) complexes as potent anti-HepG2 hepatocellular carcinoma agents. *Metallomics*, 2020,12(7):1131-1141
- [24]Porte K, Riomet M, Figliola C, Audisio D, Taran F. Click and bioorthogonal reactions with mesoionic compounds. *Chem. Rev.*, 2021, 121(12):6718-6743
- [25]Bird R E, Lemmel S A, Yu X, Zhou Q A. Bioorthogonal chemistry and its applications. *Bioconjugate Chem.*, 2021,32(12):2457-2479
- [26]Guan R L, Chen Y, Zeng L L, Rees T W, Jin C Z, Huang J J, Chen Z

S, Ji L N, Chao H. Oncosis-inducing cyclometalated iridium(III) complexes. *Chem. Sci.*, **2018**,9(23):5183-5190

- [27]He L, Tan C P, Ye R R, Zhao Y Z, Liu Y H, Zhao Q, Ji L N, Mao Z W. Theranostic iridium(III) complexes as one- and two-photon phosphorescent trackers to monitor autophagic lysosomes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**,**53**(45):12137-12141
- [28]Huang H Y, Zhang P Y, Yu B L, Chen Y, Wang J Q, Ji L N, Chao H. Targeting nucleus DNA with a cyclometalated dipyridophenazineruthenium(II) complex. J. Med. Chem., 2014,57(21):8971-8983
- [29]Song X D, Kong X, He S F, Chen J X, Sun J, Chen B B, Zhao J W, Mao Z W. Cyclometalated iridium (III) - guanidinium complexes as mitochondria-targeted anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, 138:246-254
- [30]Towers C G, Thorburn A. Targeting the lysosome for cancer therapy. Cancer Discov., 2017,7(11):1218-1220
- [31]Daum S, Reshetnikov M S V, Sisa M, Dumych T, Lootsik M D, Bilyy R, Bila E, Janko C, Alexiou C, Herrmann M, Sellner L, Mokhir A. Lysosome-targeting amplifiers of reactive oxygen species as anticancer prodrugs. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, **56**(49):15545-15549
- [32]Wang F X, Liang J H, Zhang H, Wang Z H, Wan Q, Tan C P, Ji L N, Mao Z W. Mitochondria-accumulating rhenium(I) tricarbonyl complexes induce cell death via irreversible oxidative stress and glutathione metabolism disturbance. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2019, 11 (14):13123-13133
- [33]Wang J Q, Hou X J, Bo H B, Chen Q Z. A cyclometalated iridium(III) complex that induces apoptosis in cisplatin - resistant cancer cells. *Inorg. Chem. Commun.*, 2015,61:31-34
- [34]Xiong K, Chen Y, Ouyang C, Guan R L, Ji L N, Chao H. Cyclometalated iridium (III) complexes as mitochondria - targeted anticancer agents. *Biochimie*, 2016,125:186-194
- [35]Bertheloot D, Latz E, Franklin B S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: An intricate game of cell death. *Cell. Mol. Immunol.*, 2021,18(5):1106-1121