

水溶性铜卟啉配合物的合成、与 DNA 的相互作用及抗肿瘤活性

哈斯其美格* 陈丽华 肖朝虎
(西北民族大学实验中心, 兰州 730030)

摘要: 合成了 3 种水溶性铜卟啉配合物, 分别为水溶性含溴铜卟啉(CuP-1)及其溴取代衍生物(CuP-2、CuP-3), 并采用核磁氢谱、元素分析、质谱等手段进行了结构表征。利用紫外光谱法、EB-DNA 荧光淬灭法、粘度法以及圆二色谱法等光谱法研究了 CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 与小牛胸腺 DNA(CT-DNA)的相互作用。采用噻唑兰(MTT)法, 以体外培养的宫颈癌细胞(Hela)和乳腺癌细胞(MDA)为测试细胞株对 CuP-1~CuP-3 的抗肿瘤活性进行检测。人成纤维细胞(L929)作为正常细胞系。光谱法实验结果表明, CuP-1 以插入的方式与 CT-DNA 相互作用, 而 CuP-2 和 CuP-3 与 CT-DNA 以沟面结合的方式相互作用, 且 CuP-1 与 CT-DNA 的结合能力优于 CuP-2 和 CuP-3。体外抗癌活性实验结果表明, CuP-1~CuP-3 对 Hela 和 MDA 均有体外抑制细胞增殖作用, 呈时间、剂量依赖关系, 并且 CuP-1 的体外抗肿瘤活性明显优于 CuP-2、CuP-3。

关键词: 水溶性铜卟啉配合物; 小牛胸腺 DNA; 抗肿瘤活性

中图分类号: O614.121

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2018)10-1841-10

DOI: 10.11862/CJIC.2018.239

Syntheses, DNA-binding and Antitumor Activities of Water Soluble Copper Porphyrins Complexes

HASI Qi-Mei-Ge* CHEN Li-Hua XIAO Chao-Hu
(Experimental Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Three water-soluble copper porphyrin complexes (water-soluble bromine-containing copper porphyrin CuP-1 and its bromine substituted derivatives CuP-2 and CuP-3) have been synthesized and characterized by ^1H NMR, elementary analysis and MS spectra. The interaction of CuP-1, CuP-2 and CuP-3 with CT-DNA have been investigated by UV spectrum, EB-DNA fluorescence quenching, viscosity method and circular dichroism spectrum. Moreover, the antitumor activities of CuP-1~CuP-3 against Hela (cervical cancer) cell lines and MDA (breast carcinoma) cell lines have been studied by MTT assay. L929 (human fibroblast) cell line was used as a normal cell lines. Various spectroscopic approaches indicates that CuP-1 could effectively bind with CT-DNA through intercalation mode, while CuP-2 and CuP-3 may interact with CT-DNA by outside groove binding mode. And the binding affinity of CuP-1 with CT-DNA is better than its derivatives CuP-2 and CuP-3. *In vitro* antitumor activity experiments showed that CuP-1~CuP-3 can inhibit the growth of Hela and MDA cell lines, and the inhibition shows concentration and time dependent. In addition, antitumor activity *in vitro* of CuP-1 is much better than CuP-2 and CuP-3.

Keywords: water soluble copper porphyrins complexes; CT-DNA; anticancer activity

收稿日期: 2018-05-28。收修改稿日期: 2018-07-23。

甘肃省高等学校科研项目(No.2017B-87)和西北民族大学“一优三特”学科中央高校基本科研业务费(No.31920170168)资助。

*通信联系人。E-mail: ha2qimei@163.com

0 引言

自顺铂作为抗癌药物问世后,金属配合物与 DNA 相互作用的研究一直是生物无机化学的重要课题^[1-4]。最早用于治疗癌症和艾滋病的药物是一些通过与 DNA 结合进而干扰 DNA 复制、转录与表达的药物,且药物与 DNA 的作用机制有利于药物设计的靶向性^[5]。因此,设计合成活性较高、毒副作用较低的抗肿瘤药物分子,关键在于研究药物分子与 DNA 的相互作用。通过研究药物分子与 DNA 相互作用,有利于了解药物作用机理,进行药物体外筛选,以及利用药物构效关系进行药物结构改造,设计活性更高、毒副作用更低的新药物分子。

卟啉及金属卟啉类化合物是一种重要而特殊的物质,具有独特的生物活性。如光合作用中的关键物质叶绿素(含镁的卟啉化合物)、促进骨髓造血的血红素(含铁的卟啉化合物)等都广泛存在于自然界和生物体中^[6]。近年来,卟啉类化合物因其结构的特异性,被广泛的应用于各个领域如医学、生物化学、材料化学等,尤其是其医学方面的研究已成为当今的热门课题,涉及的领域包括如研发抗病毒试剂、DNA/RNA 选择性切割试剂、端链酶抑制剂及研究 DNA 足迹法、DNA/RNA 杂交的稳定等^[7-9];又如利用其光敏性、实现光动力学治疗或利用其对肿瘤细胞的特殊亲和性和选择性富集的特点,实现抗肿瘤作用等^[10-13]。但由于卟啉化合物具有较大的刚性空间构型,其在水中的溶解度几乎为零,这大大限制了卟啉化合物在医学方面的应用。而吡啶基、磺酸基、氨基、羧基等大极性基团具有良好的水溶性,可以通过将卟啉环与大极性基团结合在一起,获得相应的水溶性卟啉及金属卟啉^[14-17]。水溶性卟啉及金属卟啉被认为是具有“双重作用”的化合物,其原因在于水溶性卟啉化合物一方面能与带有负电荷的水溶性 DNA 稳定结合,另一方面可利用其光活性裂解 DNA。因此,对水溶性卟啉及金属卟啉与 DNA 相互作用及其抗肿瘤活性的研究,将有助于更深入了解 DNA 的结构和功能,有助于水溶性卟啉及金属卟啉在医学上的应用,如 PDT、癌症检测、人造核酸酶、抑制病毒等^[18-20];对认识很多疾病的治疗机制和药物的设计也起到非常重要的作用。

本文合成了 3 种 A₃B 型水溶性含溴铜卟啉(CuP-1)及其溴取代衍生物(CuP-2、CuP-3),并对其结构进行了表征。采用紫外光谱法、EB-DNA 荧光淬灭

法、粘度法以及圆二色谱法等光谱手段研究了它们与小牛胸腺 DNA(CT-DNA)的相互作用。采用噻唑兰(MTT)法,以人成纤维细胞为正常细胞系,评价了 CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 在不同浓度、不同作用时间下,对宫颈癌细胞(Hela)和乳腺癌细胞(MDA)2 种肿瘤细胞株的抗肿瘤活性。以期为研究和开发疗效更高、毒副作用小的具有抗肿瘤活性的卟啉类药物提供一定的实验基础。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

所用试剂均为分析纯,N,N-二甲基甲酰胺(DMF)使用前用 CaH₂ 回流除水,然后减压蒸馏备用。吡咯使用前重蒸。除非另有说明,其余试剂在使用前均不做任何处理。CT-DNA 购自 Sigma 公司,溴化乙锭(EB),三羟甲基甲胺(Tris)等均购自上海生工生物工程公司。胎牛血清购自 GIBCO 公司,DEME 购自 Hyclone 公司。

仪器包括核磁共振仪(MERCRY Plus 400)、质谱仪(Bruker Esquire 6000)、紫外光谱仪(UV-2550)、荧光光谱仪(RF-5301PC)、粘度计(Ubbelohde)、圆二色谱仪(J-810)、CO₂ 培养箱(Thermo)、酶标仪(THERMO Multiskan FC)等。

1.2 合成及表征

1.2.1 5,10,15-三(4-吡啶)-20-(4-对溴)苯基卟啉的合成

称取 1.85 g(0.01 mol)对溴苯甲醛于 500 mL 三口烧瓶中,加入 150 mL 丙酸,加热并搅拌。当油浴温度达到 130 ℃左右时,快速加入 2.7 mL(0.03 mol)4-吡啶甲醛,再用滴液漏斗缓慢滴加溶解在 10 mL 丙酸中的新蒸吡咯 2.6 mL(0.04 mol),10 min 内加完。溶液逐渐变为棕黑色,保持高速搅拌,140 ℃继续回流 2 h。反应结束,减压蒸馏,蒸去丙酸,得到深紫色的粗产物。将深紫色粗产物溶于二氯甲烷中,用饱和碳酸氢钠中和,有机相以无水硫酸钠干燥,浓缩。用硅胶(200~300 目)作固定相,二氯甲烷和石油醚混合液(1:1, V/V)作流动相,不同体积比的二氯甲烷和乙酸乙酯的混合液做洗脱剂进行柱层析分离纯化,收集第 5 色带,减压旋蒸,真空干燥,即得紫色目标产物 5,10,15-三(4-吡啶)-20-(4-对溴)苯基卟啉,产率:4%。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 8.99(d, 6H), 8.79~8.60(m, 8H), 8.19(m, 6H), 8.07(m, 2H), 7.83(d, 2H), -3.00(s, 2H)。质谱 *m/z*: 698.331 0, [M+H]⁺。元

素分析按 $C_{41}H_{26}BrN_7$ 计算值(%):C,70.69%;H,3.76%;N,14.08%。实验值(%):C,70.63%;H,3.78%;N,13.98%。

1.2.2 CuP-1 的合成

称取 100 mg(0.14 mmol)5,10,15-三(4-吡啶)-20-(4-对溴)苯基卟啉于 50 mL 三口烧瓶中,加入 5 mL 无水 DMF,磁力搅拌使其溶解。氩气保护、避光的条件下,将 1 mL 碘甲烷(过量)加到上述溶液中,继续避光、通氮气,40 °C 加热搅拌反应 3 h。反应完毕停止加热,冷却至室温,缓慢滴加丙酮,析出沉淀、过滤,滤饼反复用三氯甲烷洗涤、真空干燥,得到 5,10,15-三甲基吡啶基-20-(4-对溴)苯基卟啉,产率:89%。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.51(s,6H),9.01(m,12H),8.09(m,2H),7.83(d,2H),4.59(s,8H),-3.00(s,2H)。质谱 m/z :742.060 7, $[M-3I]^+$ 。元素分析按

$C_{44}H_{35}BrI_3N_7$ 计算值(%):C,47.08%;H,3.14%;N,8.74%。实验值(%):C,47.05%;H,3.16%;N,8.75%。

称取 100 mg (0.13 mmol)5,10,15-三甲基吡啶基-20-(4-对溴)苯基卟啉溶于 5 mL 无水 DMF 中,加入 3 mL 溶有 89 mg(0.52 mmol)氯化铜的无水甲醇溶液,65 °C 搅拌反应 5 h。反应完毕,减压蒸去甲醇,滴加丙酮,析出沉淀、过滤,滤饼反复用三氯甲烷洗涤、真空干燥,得到目标产物 CuP-1,产率:75%。 1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9.32(m,6H),8.09(m,6H),7.27~7.55 (m,4H),6.68 (d,2H),4.50 (s,5H),3.56(s,9H)。ESI-MS:质谱 m/z :803.033 4, $[M-3Cl]^+$ 。元素分析按 $C_{44}H_{33}BrCl_3CuN_7$ 计算值(%):C,58.10%;H,3.66%;N,10.78%。实验值(%):C,58.03%;H,3.70%;N,10.88%。UV-Vis(Tris-HCl buffer, pH=7.2) λ_{max}/nm (absorbance)=424.5(1.579),549.5(0.198),584(0.09)。

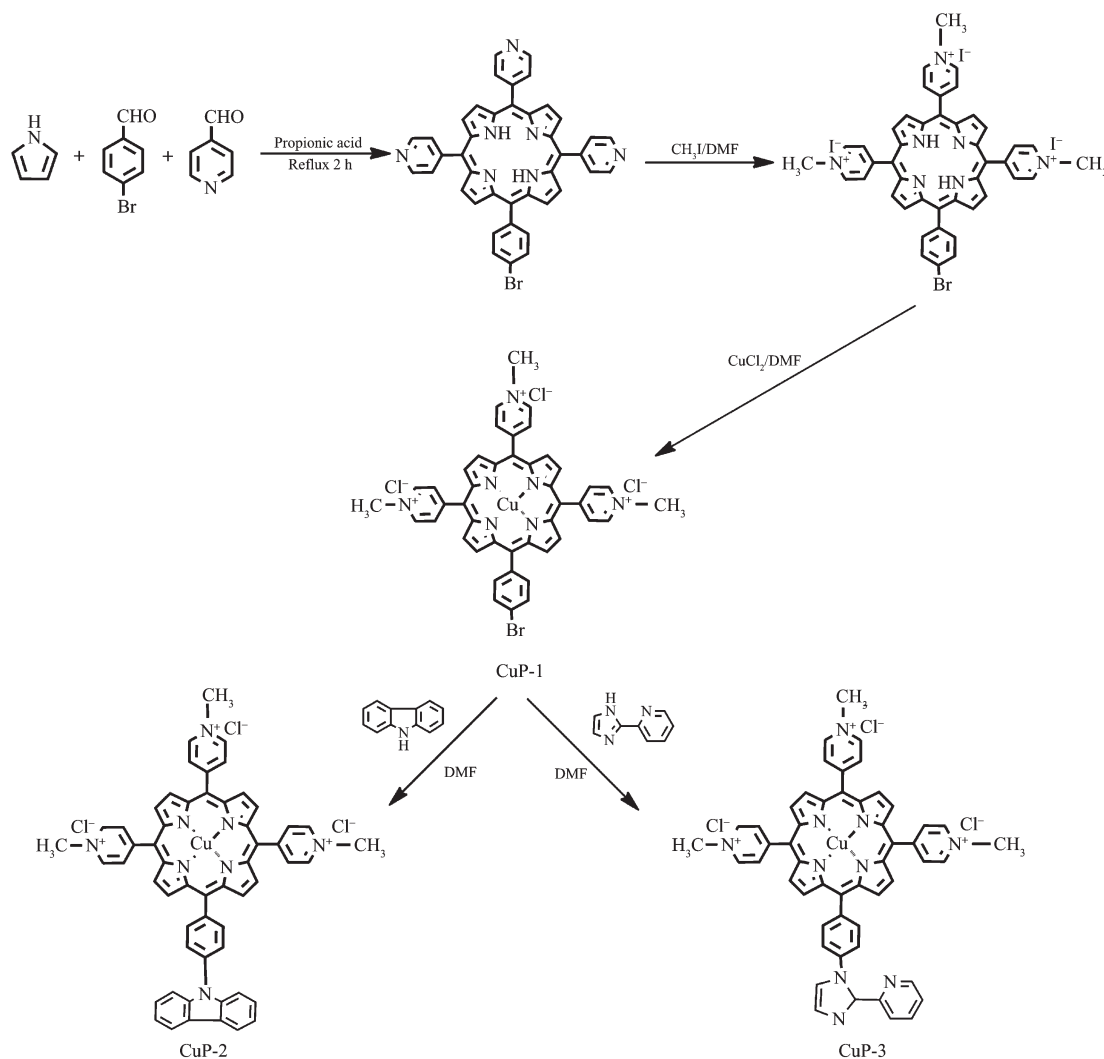


图 1 CuP-1、CuP-2 及 CuP-3 的合成路线

Fig.1 Synthesis routes for CuP-1, CuP-2 and CuP-3

1.2.3 CuP-2 或 CuP-3 的合成

氩气保护下,将 100 mg(0.13 mmol)CuP-1 溶于 30 mL 无水 DMF 中,依次加入 33 mg(0.2 mmol)咪唑或 29 mg (0.2 mmol)2-(咪唑-2-基)吡啶,84 mg(0.26 mmol)碳酸铯,5 mg(0.026 mmol)碘化亚铜和 5.5 mg (0.13 mmol)无水氯化锂,于 140 °C 回流反应 72 h。反应结束,冷却至室温,滴加三氯甲烷,析出沉淀、过滤,滤饼反复用三氯甲烷洗涤、真空干燥,得到目标产物 CuP-2 或 CuP-3,产率:43%(CuP-2)或 37%(CuP-3)。

CuP-2: ^1H NMR(600 MHz, DMSO) δ 9.12(m, 6H), 8.30(m, 6H), 8.06~7.10(m, 6H), 4.49(s, 6H), 3.30(s, 9H)。质谱 m/z : 888.293 6, $[\text{M}-3\text{Cl}]^+$ 。元素分析按 $\text{C}_{56}\text{H}_{41}\text{Cl}_3\text{CuN}_8$ 计算值(%): C, 67.54%; H, 4.15%; N, 11.25%。实验值(%): C, 67.61%; H, 4.09%; N, 11.23%。UV-Vis (Tris-HCl buffer, pH=7.2) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}(\text{absorbance}) = 422.5(1.491), 546.5(0.182), 628.5(0.12)$ 。

CuP-3: ^1H NMR(600 MHz, DMSO) δ 9.18(m, 6H), 8.30(m, 6H), 7.93(s, 3H), 4.49(s, 6H), 3.30(s, 9H)。质谱 m/z : 866.124 4, $[\text{M}-3\text{Cl}]^+$ 。元素分析按 $\text{C}_{52}\text{H}_{40}\text{Cl}_3\text{CuN}_{10}$ 计算值(%): C, 64.07%; H, 4.14%; N, 14.37%。实验值(%): C, 64.09%; H, 4.13%; N, 14.36%。UV-Vis (Tris-HCl buffer, pH=7.2) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}(\text{absorbance}) = 433.5(1.405), 564.5(0.108), 628.5(0.076)$ 。

1.3 配合物与 DNA 相互作用的实验

CT-DNA 溶液用缓冲溶液(5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 50 mmol·L⁻¹ NaCl, pH=7.2)配制,测其 $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 1.9$,说明该 DNA 溶液基本上不含蛋白质^[21],不需要进一步处理。CT-DNA 的浓度根据其在 260 nm 处的摩尔消光系数值(6 600 L·mol⁻¹·cm⁻¹)来计算^[22]。配合物的溶液用称量法进行配制。

1.3.1 紫外光谱滴定实验

室温下,参比池中加入 3.0 mL Tris-HCl (pH=7.20)缓冲溶液,样品池中加入 3.0 mL 待测样品,用微量进样器每隔 5 min 向样品池中加入 2 μL 1.0 mmol CT-DNA 并搅拌,直到紫外吸收值恒定不变。每次加 CT-DNA 前检测其在 200~700 nm 范围内的紫外可见吸收光谱。待测样品与 CT-DNA 相互作用的结合常数(K_b)由下面公式计算得到:

$$c_{\text{DNA}}/(\varepsilon_a - \varepsilon_f) = c_{\text{DNA}}/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/[K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)] \quad (1)$$

其中, ε_a 代表存在不同浓度的 CT-DNA 时待测样品的摩尔消光系数; ε_f 为不存在 CT-DNA 时待测样品的摩尔消光系数; ε_b 为待测样品与 CT-DNA 作用达

到平衡时的摩尔消光系数。以 $c_{\text{DNA}}/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ 为纵坐标, c_{DNA} 为横坐标作图,得到一条直线,待测样品的结合常数(K_b)即为这条直线斜率与截距的比值。

1.3.2 EB-DNA 淬灭实验

恒定室温下,荧光池中加入 2.5 mL Tris-HCl 缓冲溶液和 20 μL EB,然后滴加 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CT-DNA 直到荧光强度不再变化即达到滴定平衡($\lambda_{\text{ex}} = 496$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 596$ nm)。每隔 5 min,用微量进样器滴加 0.2 mL 待测样品直到荧光强度不再下降即达到滴定平衡。根据 Stern-Volmer 方程^[23]计算荧光淬灭常数(K_{sv}):

$$F_0/F = 1 + K_{sv}c_Q \quad (2)$$

其中, F_0 代表不存在待测样品时的荧光强度; F 代表存在待测样品时的荧光强度; c_Q 代表淬灭剂的浓度; K_{sv} 代表动态淬灭常数。

1.3.3 粘度实验

在(25.00±0.01) °C 恒定温度条件下,首先将 10 mL Tris-HCl(pH=7.20)缓冲溶液加入到粘度计中,测量溶液流经毛细管所用的时间为 t_0 ;接着将 50 μL 配制的 CT-DNA 溶液加入其中,混匀后,测量溶液流经毛细管所需的时间 t ;每隔 5 min,滴加待测样品 2.5 μL ,混匀后,测量待测样品加入后 CT-DNA 粘度的变化;停止测量,直至流动时间基本不发生变化。此操作重复 3 次。以 $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ 为纵坐标,待测样品与 CT-DNA 浓度比为横坐标作图,观察 CT-DNA 相对粘度变化^[24]。

$$\eta = (t - t_0)/t_0 \quad (3)$$

其中 η_0 代表不存在待测样品时 CT-DNA 粘度值, η 代表存在待测样品时 CT-DNA 粘度值。

1.3.4 圆二色谱实验

首先将 1 mL Tris-HCl(pH=7.20)缓冲液加到比色池中,扫描其在 220~500 nm 范围内的 CD 光谱作为对照,然后将 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 待测样品和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CT-DNA 溶液混合,混匀、反应 5 min,在 220~500 nm 范围内测定待测样品的 ICD 光谱。

1.4 抗肿瘤活性实验

人成纤维细胞(L929)、宫颈癌细胞(Hela)和乳腺癌细胞(MDA)均由兰州大学医学院提供。取宫颈癌细胞(Hela)、乳腺癌细胞(MDA)和人成纤维细胞(L929)(处于对数生长期),用 DMEM 培养基(含有 10% 胎牛血清)配制单细胞悬浮液,浓度约为 4×10^4 mL⁻¹。然后接种于 96 孔板中。每孔加入的细胞悬液为 100 μL ,需要注意的是配制单细胞悬液时尽量保

持加入每孔的细胞数一致。

将细胞培养至贴壁再分组,分为 4 组进行实验,对照组(con)为不加药组,加入 DMEM 培养基(含有 10% 胎牛血清);其余各组为实验组(exp),各实验组分别加入 100 μL 的含 CuP-1~CuP-3 的浓度分别为 25、50、75 及 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液。每组设 3 个实验孔、3 个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%(V/V) CO_2 、水蒸气饱和和培养条件下,分别继续培养 24、48 和 72 h,以仅含有 10%胎牛血清 DEME 培养基,不接种细胞的空白组为调零孔。

培养终止,分别向每孔中加入 10 μL MTT 溶液($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),原条件下继续培养 4 h,培养终止后,弃上清液,加二甲基亚砜(DMSO)(200 μL)到每孔,然后以中速于水平摇床上振荡 15 min,检测 570 nm 吸光度 OD 值。重复 3 次实验,计算细胞抑制率(R_{in})公式如下:

$$R_{\text{in}}=1-(\text{OD}_{\text{exp}}/\text{OD}_{\text{con}})\times 100\%$$

其中 OD_{exp} 为实验组 OD 值, OD_{con} 为对照组 OD 值。

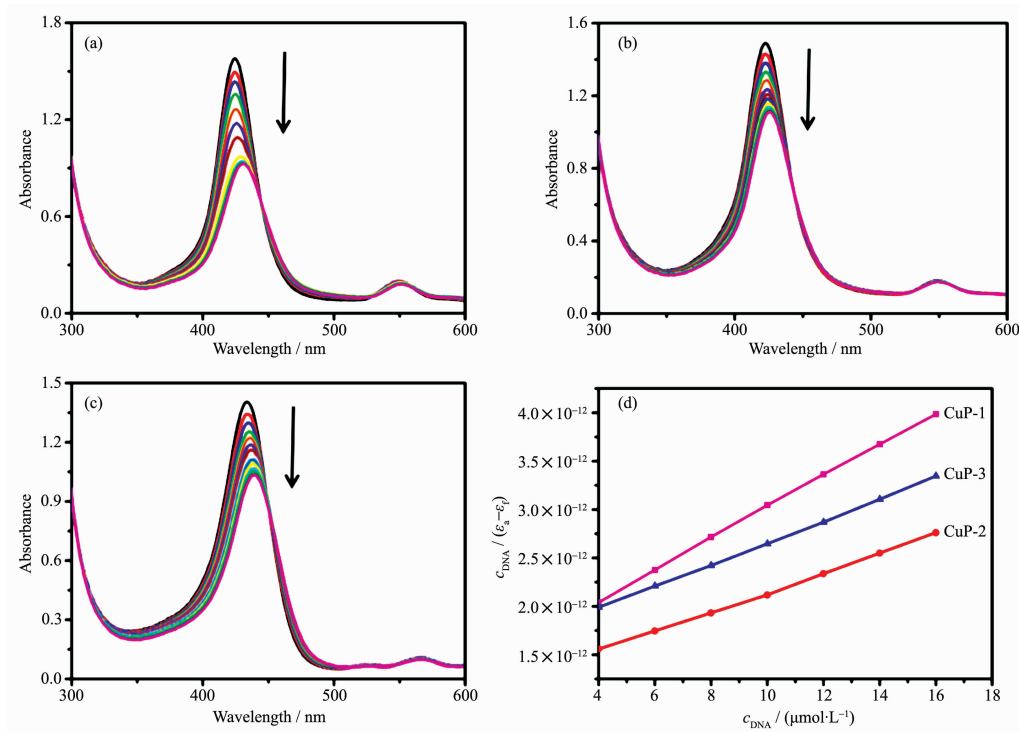
2 结果与讨论

2.1 紫外光谱滴定实验

卟啉类化合物的结构中由于存在共轭大环结

构,而具有紫外可见吸收特征光谱,在 Soret 带有一个强吸收峰而在 Q 带有 3~4 个弱的吸收峰^[25]。因此紫外-可见光谱常被用来研究卟啉类化合物与 DNA 的相互作用^[26]。

如图 2 所示,水溶性铜卟啉配合物 CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 的 Soret 带分别位于 424.5、422.5 和 433.5 nm。随着滴加 CT-DNA 浓度的递增,CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 Soret 带的吸收强度都出现明显降低,且分别红移到 430.5、426.5 和 439 nm。其中 CuP-1 的 Soret 带减色 41.5%,红移 6 nm。而相同条件下,CuP-2 和 CuP-3 的 Soret 带分别减色 25.4%和 26.4%,且分别红移了 4 nm 和 5.5 nm。研究结果显示,CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 Soret 带的紫外吸收均出现红移及减色现象,说明 DNA 碱基的 π 共轭体系与 CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 的大环 π^* 共轭体系发生了某种作用,致使 π 电子堆积, π 电子轨道和 π^* 空轨道发生耦合,促使 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁能降低,表现为红移。减色效应是因为耦合作用促使 π^* 轨道部分充满电子,减小了 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁,吸收峰强度因此降低。初步判断 CuP-1 与 CT-DNA 可能以插入结合的方式作用,而 CuP-2 和 CuP-3 与 CT-DNA 是以外部沟面结合的方式作用。为了定量比较 CuP-1、CuP-2 和



Arrows show the absorbance changed upon increasing CT-DNA concentration

图 2 CT-DNA 对 CuP-1 (a)、CuP-2 (b) 和 CuP-3 (c) 紫外可见吸收光谱的影响; (d) 结合常数的测定

Fig.2 Influence of CT-DNA on the absorption spectra of CuP-1 (a), CuP-2 (b) and CuP-3 (c); (d) Determination of binding constant

CuP-3 与 CT-DNA 结合能力的强弱,根据 Soret 带吸光度值随着 CT-DNA 浓度的变化进行紫外光谱滴定,测定配合物与 CT-DNA 的结合常数。如表 1 所示,本实验条件下,CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 与 CT-DNA 的结合常数 K_b 分别为 1.622×10^5 、 1.004×10^5 和 $1.143 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。说明 CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 与 DNA 结合能力的大小为 CuP-1>CuP-3>CuP-2。

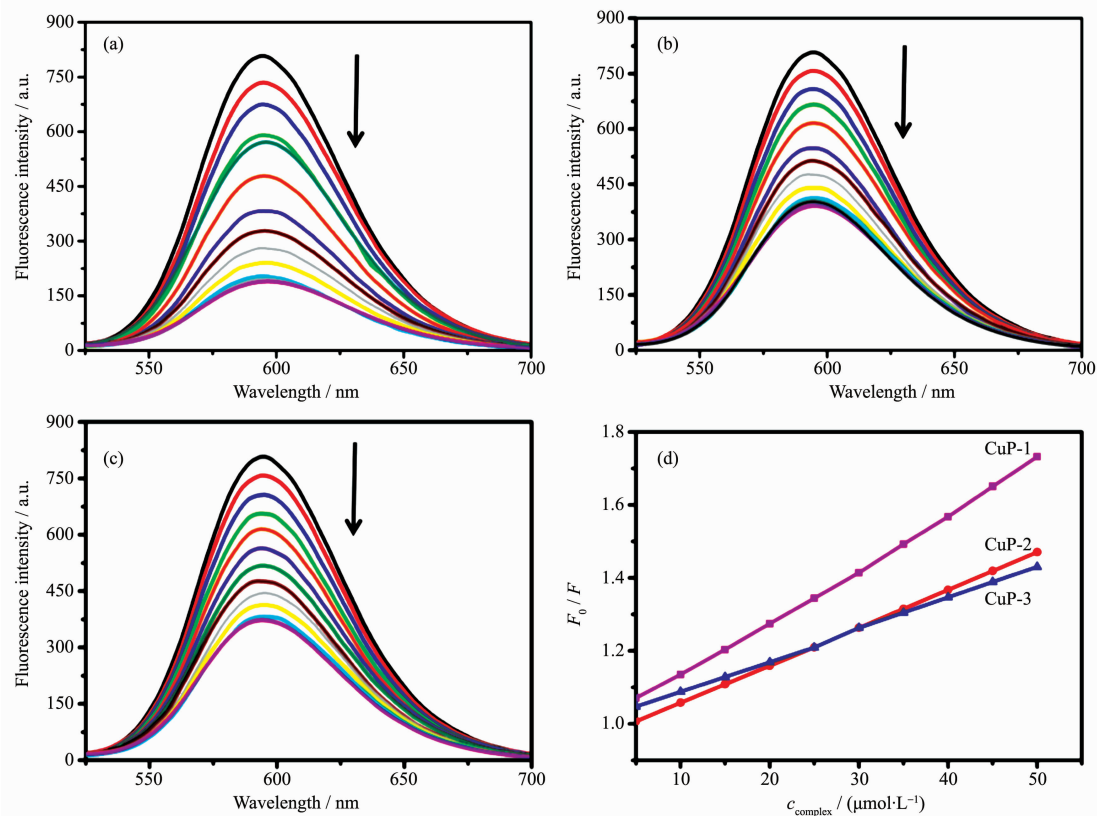
2.2 EB-荧光淬灭法

荧光光谱是研究化合物与 DNA 相互作用的主要手段之一,由于 Cu(II)离子的 3d 轨道有单电子存在,具有顺磁性,所以水溶性铜卟啉配合物 CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 这 3 种金属配位的卟啉化合物均没有荧光,与文献^[27]报道一致。

EB 分子本身的荧光很弱,但若存在 DNA 时,EB 分子能够迅速插入到 DNA 碱基对中并发出很强的荧光。原因在于 EB 分子插入到 DNA 碱基对后,受到 DNA 疏水环境的保护,避免了 EB 分子激发态与水分子之间由于发生能量交换而产生的非辐射猝灭。而对于本身没有荧光的化合物而言,化

合物的加入若使 EB-DNA 体系的荧光明显降低,认为该化合物与 EB 发生了 DNA 竞争结合,EB-DNA 体系荧光降低的程度就成为化合物与 DNA 结合能力的间接体现^[28]。

如图 3 所示,EB-DNA 体系随 CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 的滴加,EB-DNA 体系的荧光光谱均发生不同程度的荧光淬灭现象,表明这些配合物与 CT-DNA 之间存在一定的相互作用。其中,随滴加的 CuP-1 浓度的递增,EB-DNA 体系的荧光强度淬灭现象最为明显,EB-DNA 体系的荧光强度逐渐减弱,最后几乎被完全猝灭,表明可能有部分 EB 分子已被 CuP-1 从 EB-DNA 体系中取代出来,发生了与 EB 分子类似的插入作用。另外,根据 Stern-Volmer 方程和荧光淬灭常数曲线得出 CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 的淬灭常数,分别为 1.303×10^4 、 8.62×10^3 和 $1.032 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (表 1)。这 3 种阳离子卟啉化合物的 Stern-Volmer 淬灭常数呈现 CuP-1>CuP-3>CuP-2 的趋势。淬灭常数的这种次序能反映出这些淬灭剂与 CT-DNA 的结合能力。荧光淬灭实验所反映的水



Arrows show the fluorescence spectra of EB-DNA changed upon increasing concentrations of CuP-1, CuP-2 and CuP-3

图 3 CuP-1 (a)、CuP-2 (b)和 CuP-3 (c)对 EB-DNA 体系荧光光谱的影响及 Stern-Volmer 方程的线性拟合

Fig.3 Influence of CuP-1 (a), CuP-2 (b) and CuP-3 (c) on the fluorescence spectra of EB-DNA and Linear fitting of the Stern-Volmer equation (d)

表 1 CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 与 CT-DNA 结合的参数

Table 1 Parameters of CuP-1, CuP-2 and CuP-3 in binding with CT-DNA

Complex	$\lambda_{\max}$ / nm	Hypochromicity	Red shift / nm	K_b / ($L \cdot mol^{-1}$)	K_{sc} / ($L \cdot mol^{-1}$)	ICD
CuP-1	424.5	41.5%	6.0	1.622×10^5	1.303×10^4	-
CuP-2	422.5	25.4%	4.0	1.004×10^5	8.62×10^3	+
CuP-3	433.5	26.4%	5.5	1.143×10^5	1.032×10^4	+

溶性卟啉配合物与 CT-DNA 结合能力的次序与紫外光谱实验结果基本一致。

2.3 粘度法研究

化合物与 DNA 是否发生相互作用可通过光谱学数据充分反映出来,但不能充分说明化合物与 DNA 的作用方式。研究化合物与 DNA 相互作用的实验方法中最有说服力的是粘度法^[29]。当某种化合物与 DNA 以插入的方式进行相互作用时,这种化合物会插入到 DNA 相邻碱基对中,致使相邻碱基对的距离变长,进而增加 DNA 链的相对长度,表现为 DNA 相对粘度升高。而当化合物与 DNA 以部分插入或非经典的插入方式进行作用时, DNA 相邻碱基对发生扭结, DNA 链的相对长度变短,表现为 DNA 相对粘度降低。当 DNA 相对粘度没有明显变化时,说明化合物与 DNA 以外部沟面结合的方式进行作用。

水溶性铜卟啉配合物 CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 滴加到 CT-DNA 体系(pH 7.20, TrisHCl 缓冲液)后对 CT-DNA 相对粘度的影响,如图 4 所示。当 CuP-1 滴加到 CT-DNA 体系后,随浓度比率 $r(r=c_{\text{complex}}/c_{\text{DNA}})$ 的递增, CT-DNA 溶液的粘度呈明显的上升趋势。表明 CuP-1 可能以插入模式与 CT-DNA 进行作用。而 CuP-2 和 CuP-3 滴加到 CT-DNA 体系后, CT-DNA 溶液的粘度没有明显的变化,说明这 2 种配合物可能以外部沟面结合的方式与 CT-DNA 进行作用。

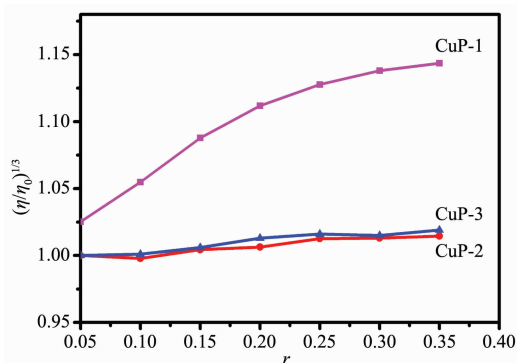


图 4 CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 对 CT-DNA 相对粘度的影响
Fig.4 Influence of CuP-1, CuP-2 and CuP-3 on the relative viscosity of CT-DNA

2.4 圆二色谱法研究

通常研究卟啉类化合物与 DNA 相互作用最直接的方法是圆二色谱法(CD)。具有不对称结构的卟啉类化合物在 Soret 带没有 CD 信号,当 DNA 与这种卟啉类化合物发生相互作用时会在 Soret 带产生诱导 CD(ICD)信号峰。因此卟啉类化合物与 DNA 不同的作用模式对应不同的诱导 CD(ICD)信号峰。一般认为,负的 ICD 信号峰,表示卟啉类化合物与 DNA 以插入的方式相互作用;正 ICD 信号峰,表示卟啉类化合物与 DNA 以外部沟面结合方式相互作用;等强的正、负 ICD 信号峰,表示卟啉类化合物与 DNA 以外部堆积的方式相互作用^[30-31]。

为进一步证实 CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 与 CT-DNA 的结合模式,采用 CD 光谱在 220~500 nm 的波长范围内研究其与 CT-DNA 的结合模式。如图 5 所示,当配合物与 DNA 的浓度比 $r(r=c_{\text{complex}}/c_{\text{DNA}})$ 为 0.05 时, CuP-1 在 433 nm 处出现 1 个较强的负峰,而 CuP-2 和 CuP-3 在 431 和 430 nm 处各出现 1 个正峰。这表明 CuP-1 与 CT-DNA 以插入的模式进行作用,而 CuP-2 和 CuP-3 通过外部沟面结合的方式与 CT-DNA 进行作用。

以上结果表明 CuP-1 与 CT-DNA 以插入的模式进行相互作用,而 CuP-2 和 CuP-3 通过外部沟面

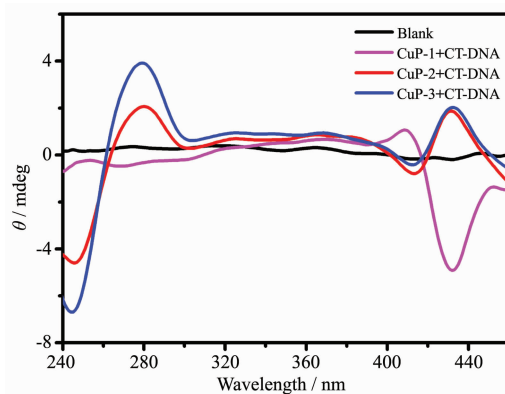


图 5 CT-DNA 存在时 CuP-1、CuP-2 和 CuP-3 的诱导圆二色谱

Fig.5 ICD spectra of CuP-1, CuP-2 and CuP-3 in the presence of CT-DNA

结合的方式与 CT-DNA 进行相互作用,且 CuP-1 与 CT-DNA 的结合能力优于 CuP-2 和 CuP-3。可能的原因在于 CuP-1 的空间构型及体积相对于 CuP-2 和 CuP-3 较小,且趋于平面,利于其嵌入到 DNA 的碱基对中成键,与 CT-DNA 以插入的模式进行结合。CuP-2 和 CuP-3 结构中由于芳香环上存在 N 杂环取代基,会使 CuP-2 和 CuP-3 与 DNA 结合时产生较大的空间位阻,因此 CuP-2 和 CuP-3 易从外部与 CT-DNA 分子进行键合,与 CT-DNA 以外部沟面结合的模式进行作用。且 CuP-2 和 CuP-3 结构中芳香环上 N 杂环取代基含有带孤电子对的 N 原子,影响复合物的稳定性,进而影响 CuP-2 和 CuP-3 与 CT-DNA 的结合效果。

2.5 MTT 法测定 CuP-1~CuP-3 对肿瘤细胞增殖的影响

基于水溶性铜卟啉配合物 CuP-1~CuP-3 与 CT-DNA 以不同的结合模式进行相互作用,以及卟啉类化合物对肿瘤细胞良好的靶向作用及其结构的特异性^[32],本文以人成纤维细胞(L929)为正常细胞系,以宫颈癌细胞(Hela)和乳腺癌细胞(MDA)为测试细胞株,考察了 CuP-1~CuP-3 的体外抗肿瘤活性。

不同浓度、不同作用时间的条件下,CuP-1~CuP-3 对 Hela 和 MDA 的抑制率如图 6~8 所示。结果表明,随浓度和作用时间的增大,CuP-1~CuP-3 对 Hela 和 MDA 的抑制率呈现时间和剂量依赖性,其中 CuP-1 对 2 种肿瘤细胞的抑制率明显高于其溴取代衍生物 CuP-2 和 CuP-3。通常,利用化合物的半数有效浓度 IC_{50} 来评价其药效, IC_{50} 值越小表明其药效越好。如表 2 所示,CuP-1 对 Hela 和 MDA 分别作用 24、48、72 h 后的 IC_{50} 值分别为:59.399、42.513 和 33.956 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以及 107.094、60.215 和 46.406 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;可知在相同条件下,CuP-1 对 Hela 的体外增殖抑制作用优于 MDA,且作用 72 h 时其抑制率最高,说明 CuP-1 对 Hela 可能具有特定的靶向性。而 CuP-2 和 CuP-3 对 Hela 和 MDA 分别作用 24、48、72 h 后的 IC_{50} 值均大于 119 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 2),表明 CuP-2 和 CuP-3 对 2 种肿瘤细胞的体外增殖抑制作用相对于 CuP-1 的抑制作用较弱,可能与其和 CT-DNA 的作用模式有关。另外,从表 2 中可知,CuP-1~CuP-3 对 L929 的抑制率均很弱,其可能的原因在于卟啉环对肿瘤细胞的选择性^[33]。

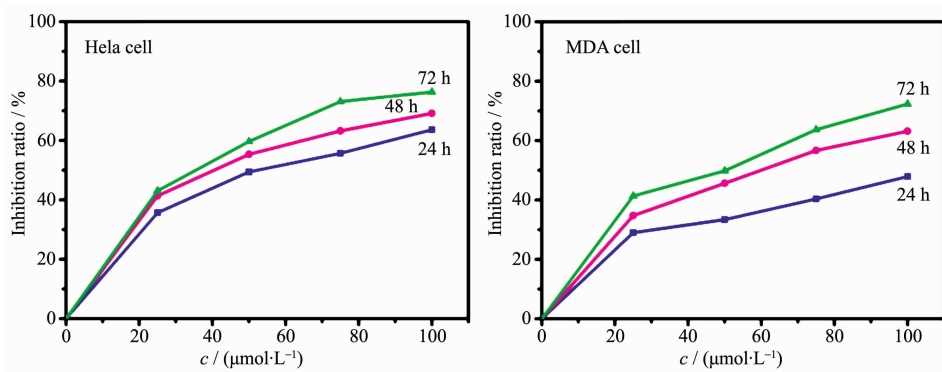


图 6 CuP-1 对 2 种肿瘤细胞的增殖抑制作用

Fig.6 Proliferation inhibition of CuP-1 on two kinds of tumor cell lines

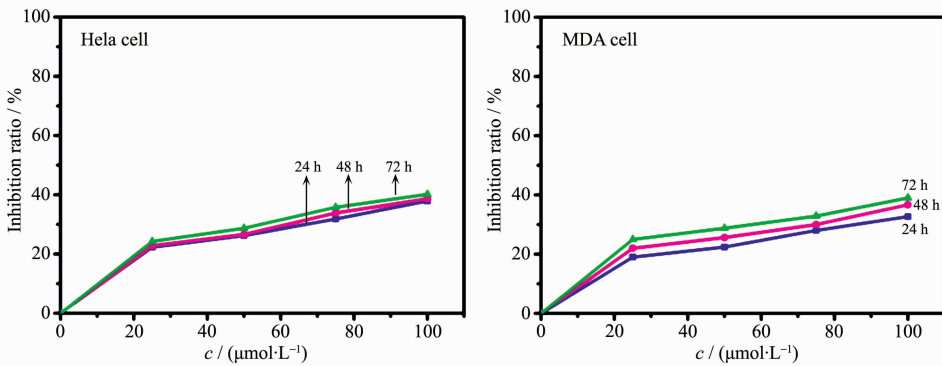


图 7 CuP-2 对 2 种肿瘤细胞的增殖抑制作用

Fig.7 Proliferation inhibition of CuP-2 on two kinds of tumor cell lines

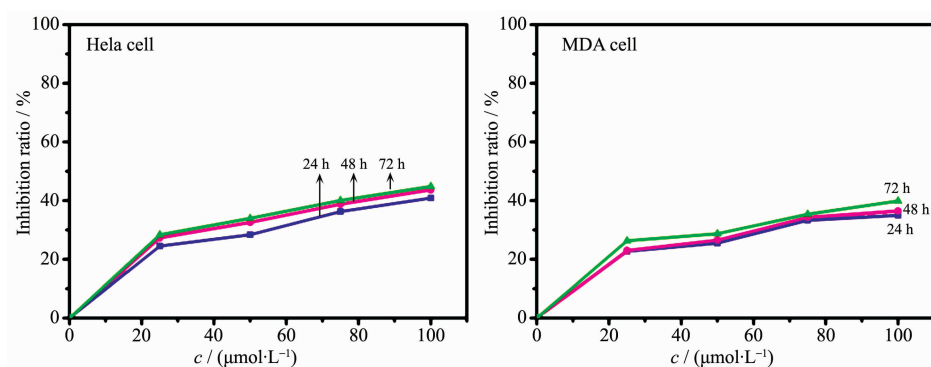


图 8 CuP-3 对 2 种肿瘤细胞的增殖抑制作用

Fig.8 Proliferation inhibition of CuP-3 on two kinds of tumor cell lines

表 2 CuP-1~CuP-3 的 IC_{50} 值Table 2 IC_{50} values of CuP-1~CuP-3

Complex	$IC_{50} / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$								
	HeLa cell			MDA cell			L929 cell		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
CuP-1	59.399	42.513	33.956	107.094	60.215	46.406	>400	300~400	289.341
CuP-2	151.545	144.162	138.280	176.126	162.231	156.066	>400	300~400	300~400
CuP-3	134.340	124.896	119.723	168.196	156.852	148.581	>400	300~400	300~400

3 结 论

基于 A_4 型吡啶基阳离子卟啉具有与 DNA 强的插入作用及潜在的抗癌活性,合成了 A_3B 型含溴的吡啶基阳离子铜卟啉 CuP-1,进而通过官能团修饰,取代溴原子合成了其衍生物 CuP-2 和 CuP-3,并进行了结构表征。采用紫外光谱法、EB-荧光淬灭法、粘度法和圆二色谱法研究了它们与 CT-DNA 的相互作用。结果表明,CuP-1 与 CT-DNA 以插入的模式进行作用,而 CuP-2 和 CuP-3 与 CT-DNA 以外部分沟面结合的方式进行作用,且 CuP-1 与 CT-DNA 的结合能力优于 CuP-2 和 CuP-3。基于卟啉类化合物对肿瘤细胞良好的靶向作用及其结构的特异性,研究了 CuP-1~CuP-3 的体外抗肿瘤活性。实验结果表明,CuP-1~CuP-3 对 HeLa 和 MDA 均有体外抑制肿瘤细胞增殖的作用,呈时间、剂量依赖关系。其中 CuP-1 对 2 种肿瘤细胞的体外增殖抑制作用远远优于其溴取代衍生物 CuP-2 和 CuP-3,可能和 CuP-1 与 DNA 相互作用较强及结合模式有关,表明配合物与 DNA 的插入作用模式可能是配合物具有抗肿瘤活性的原因之一。且 CuP-1 对 HeLa 的抑制增殖作用明显优于 MDA,表明 CuP-1 对 HeLa 具有特定的靶向性,说明卟啉类化合物对肿瘤细胞存在靶向性筛选。

参考文献:

- [1] Zhao P, Liu M C, Zheng M, et al. *Dyes Pigm.*, **2016**,**128**:41-48
- [2] Ramakrishnan S, Shakthiptiya D, Suresh E, et al. *Inorg. Chem.*, **2011**,**50**:6458-6471
- [3] Huang Y M, Zheng S J, Yan J, et al. *Luminescence*, **2016**, **31**:1077-1084
- [4] Suntharalingam K, White A J P, Vilar R. *Inorg. Chem.*, **2010**, **49**:8371-8380
- [5] Sendhil K, Vijayan C, Kothiyal M P. *Opt. Commun.*, **2005**, **251**:292-298
- [6] Biesaga M, Pyrzyńska K, Trojanowicz M. *Talanta*, **2000**,**51**: 209-224
- [7] Rangasamy S, Ju H, Um S, et al. *J. Med. Chem.*, **2015**,**58**: 6864-6874
- [8] Ruan T L, Davis S J, Powell B M, et al. *Biochimie*, **2017**,**132**: 121-130
- [9] Huang L J, Zhang L, Yang L, et al. *Biosens. Bioelectron.*, **2018**,**104**:21-26
- [10] CAO Bo(曹波), LIU Tian-Jun(刘天军), NIU Cong(牛聪). *Chinese Pharmacological Bulletin(中国药理学通报)*, **2014**, **30**(2):170-174
- [11] Yao Y H, Li J, Yuan L F, et al. *RSC Adv.*, **2016**,**6**(51):45681-45688
- [12] Yao Y, Luo Y, Li J, et al. *Helv. Chim. Acta*, **2016**,**99**(1):24-29

- [13]Guy M E, Francesca B, Juozas D, et al. *Mol. Pharm.*, **2015**, **12**:4414-4423
- [14]Feng X X, Liu J C. *J. Inorg. Biochem.*, **2018**,**178**:1-8
- [15]Zhang J X, Zhou J W, Chan C F, et al. *Bioconjugate Chem.*, **2012**,**23**(18):1623-1638
- [16]Karunakarn S C, Babu P S, Madhuri B, et al. *ACS Chem. Biol.*, **2013**,**8**(1):127-132
- [17]ZHANG Xian-Xia(张现侠), CHEN Can-Yu(陈灿玉). *Acta Chim. Sinica*(化学学报), **2012**,**70**:2475-2483
- [18]HUANG Jun-Teng(黄俊腾), ZHANG Yang(张阳), WANG Xiang-Li(王湘利), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2013**,**29**(8):1649-1656
- [19]FANG Qi-Chao(方起超). *Chinese Journal of New Drugs*(中国新药杂志), **2014**,**23**(13):1540-1545
- [20]Entract G M, Bryden F, Domarkas J, et al. *Mol. Pharmaceutics*, **2015**,**12**(12):4414-4423
- [21]Marmur J. *J. Mol. Biol.*, **1961**,**3**(2):208-218
- [22]Liu J, Shi S, Ji L N, et al. *Transition Met. Chem.*, **2005**,**30**(6):684-690
- [23]Krishna A G, Kumar D V, Khan B M, et al. *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**,**1381**:104-112
- [24]Xu X H, Yang H C, Mallouk T E, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**,**116**(18):8386-8387
- [25]Zhao P, Huang J W, Mei W J, et al. *Spectrochim. Acta Part A*, **2010**,**75**:1108-1114
- [26]Wei C Y, Jia G Q, Yuan J L, et al. *Biochemistry*, **2006**,**45**(21):6681-6691
- [27]LI Wen-Quan(李文全), ZHANG Ling(张玲), GUO Jiang-Ning(郭江宁), et al. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*(广东药学院学报), **2014**,**30**(3):261-267
- [28]Ghosh K, Kumar P, Tyagi N, et al. *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**,**45**:3770-3779
- [29]Perontsis S, Hatzidimitriou A G, Begou O A, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2016**,**162**:22-30
- [30]PENG Xiao-Bin(彭小彬), LE Chang-Gao(乐长高), CAI Jie(蔡洁). *Progress in Chemistry*(化学进展), **1999**,**11**(3):327-332
- [31]Ethirajan M, Chen Y H, Joshi P, et al. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**,**40**:340-362
- [32]Feng X X, Zhang J X, Wu Y, et al. *Dyes Pigm.*, **2017**,**136**:773-778
- [33]Kralova J, Koivukorpi J, Kejik Z, et al. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**,**6**:1548-1552