

N-烷基-1,10-菲咯啉 2-甲胺 La(Ⅲ) 配合物的合成及抗癌活性

李风华¹, 吴红星², 林华宽²

(1. 青岛科技大学化学与分子工程学院, 青岛 266042; 2. 南开大学化学学院, 天津 300071)

摘要 合成和表征了甲基、乙基、丙基、丁基和苄基 *N*-取代 1,10-菲咯啉 2-甲胺衍生配体及其镧(Ⅲ)配合物. 研究了配合物对 HL60 人白血病、PC-3MIE8 人前列腺癌、BGC-823 人胃癌、MDA-MB-435 人乳腺癌、Bel-7402 人肝癌、Hela 人宫颈癌共 6 种瘤株的体外抗肿瘤活性及其与 DNA 的作用方式. 结果表明, 该系列化合物对实验的 6 种瘤株均具有不同程度的生长抑制作用, 其中配合物 L^3LaL^5 对 MDA-MB-435 人乳腺癌和 Bel-7402 人肝癌的抑制效果较好, 对 Bel-7402 人肝癌和 Hela 人宫颈癌的抑制效果优于顺铂. 其作用机理可能是配合物以部分插入方式同时伴随共价和静电与 DNA 发生作用, 影响其基因调控与表达, 进而抑制肿瘤细胞的生长, 最终导致癌细胞凋亡.

关键词 邻菲咯啉; 镧(Ⅲ)配合物; 抗癌活性; DNA

中图分类号 O614

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)10-1800-05

顺铂的研制及其在抗肿瘤治疗方面的应用开辟了攻克癌症的新方向. 它以抗肿瘤的高效广谱等特性成为临床上最广泛使用的药物之一^[1,2], 但其肾毒、肠胃毒性、催吐性及长期使用产生的耐药性等又促使人们去开发更好的抗癌药物^[3]. 顺铂类似物的结构与顺铂极其相似, 这决定了它们有相似的作用机理, 产生相似的生物学效应, 即这些化合物在抗肿瘤谱、抗药性和毒性等方面与顺铂也很相似^[4,5]. 因此, 要想设计出各方面药理指标都超过顺铂的抗肿瘤药物, 就必须突破顺铂类药物的限制, 寻找一类新的抗肿瘤药物. 邻菲咯啉具有较大的刚性芳香环, 其衍生物的配合物因独特的稳定性、氧化还原性、荧光寿命及与 DNA 极好的作用等成为设计以核酸为靶的抗癌药物的一类重要化合物^[6,7]. 稀土配合物在用于癌症治疗方面逐步受到重视^[6~8], 但这方面的工作还做得不多.

本文旨在合成、表征系列邻菲咯啉衍生物的稀土配合物, 并通过其与 DNA 的相互作用对其抗癌机理进行了研究, 以期对抗癌药物的合成、筛选提供指导.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Varian UNITY-plus 400 MHz 核磁共振谱仪, Perkin Elmer 240C 元素分析仪, Nicolet 170 SX 傅里叶变换红外光谱仪(KBr 压片), Beckman DU-8B 紫外-可见光谱仪, Hitachi 公司 F-3010 荧光光谱仪.

溴化乙锭(EB, A. R. 级, Fluka 公司, 瑞典), 小牛胸腺 DNA(Sigma 公司, 美国), 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris, B. R. 级, Sigma 公司, 美国), 1,10-菲咯啉-2-甲醛参照文献[9]方法合成. 其它试剂均为分析纯. Tris-HCl 缓冲溶液(含 Tris 50 mmol/mL, NaCl 10 mmol/mL, pH 值为 7.00). 将适量小牛胸腺 DNA 溶于 Tris-HCl 缓冲溶液中, 其浓度用 260 nm 处的吸光度确定($OD_{260}/OD_{280} > 1.86$, $\epsilon_{260\text{ nm}} = 6\ 600\ \text{mol}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}$)^[10].

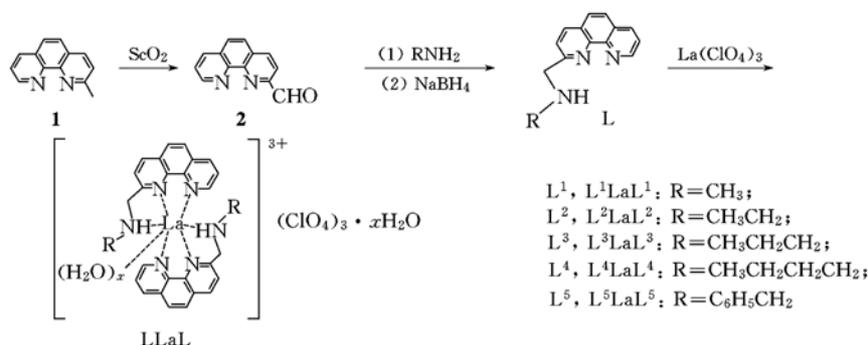
1.2 配合物的合成

配体及配合物的合成路线如 Scheme 1 所示.

收稿日期: 2006-03-17.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 29971018)和天津市自然科学基金(批准号: 023605811)资助.

联系人简介: 李风华(1972 年出生), 女, 博士, 讲师, 主要从事生物无机化学研究. E-mail: lifenghua2001@163.com



Scheme 1 Synthetic routes of the ligands and the La(III) complexes

1.2.1 配体的合成 以配体 L^1 合成为例, 其详细实验步骤如下: 将 10 mmol 1,10-菲咯啉-2-甲醛溶于 50 mL 乙醇中, 在磁力搅拌下慢慢滴加 10 mmol 甲胺盐酸盐的 50 mL 乙醇溶液, 室温下于氮气气氛中反应 10 h, 加入 2.5 g $NaBH_4$, 继续搅拌反应 10 h, 抽滤, 旋转蒸发至留有少量滤液, 加入 50 mL 水, 用氯仿萃取 (30 mL \times 3), 洗涤, 用无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 蒸发浓缩, 真空干燥, 得黄色固体 L^1 , 产率 65%. 元素分析实测值 ($C_{14}H_{13}N_3 \cdot 2HCl \cdot 0.67H_2O$ 计算值, %): C 54.21 (54.55), H 5.38 (5.30), N 13.49 (13.64). 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, 以 TMS 为内标), δ : Phen-ring 9.06 (m, 2H), 8.49 (d, 1H), 8.11 (m, 3H), 7.77 (d, 1H); CH_2 -phen 4.64 (s, 2H); N- CH_3 2.81 (s, 3H). IR (KBr), $\tilde{\nu}/cm^{-1}$: 3438 (NH); 1596, 1350, 860 (phen-ring). 同法合成并表征配体 $L^2 \sim L^5$.

1.2.2 配合物的合成 以配合物 L^1LaL^1 的合成为例. 将 2 mmol $La(ClO_4)_3 \cdot 6H_2O$ 的 10 mL 无水甲醇溶液逐滴加入到 4 mmol L^1 的 5 mL 甲醇溶液中, 于室温下在氮气气氛中搅拌反应 10 h, 加入 10 mL 无水乙醚, 过滤, 用甲醇/乙醚 (体积比 1:1) 重结晶, 得白色固体产物 L^1LaL^1 . 产率 65%. 元素分析实测值 ($[La(C_{14}H_{13}N_3)_2H_2O]_4 (ClO_4^-)_3 \cdot 2H_2O$ 计算值, %): C 33.89 (33.94), H 3.84 (3.87), N 8.45 (8.49), La 14.23 (14.03). 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, 以 TMS 为内标), δ : Phen-ring 9.18 (m, 4H), 8.62 (d, 2H), 8.19 (m, 6H), 7.84 (d, 2H); CH_2 -phen 4.71 (s, 4H); N- CH_3 2.88 (s, 6H). IR (KBr), $\tilde{\nu}/cm^{-1}$: 3450 (NH); 1599, 1358, 864 (phen-ring); 210 (La-N); 481 (La-NH); 407 (La-O); 1105, 627 (ClO_4^-). FABMS, m/z : 657.2 [M], 585.2 [M-4H₂O]. $A_m/(S \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1})$ (CH_3OH): 320.6. 同法合成并表征配合物 $L^2LaL^2, L^3LaL^3, L^4LaL^4$ 和 L^5LaL^5 .

1.3 配合物的体外抗肿瘤活性

配合物对人白血病 HL-60 和人乳腺癌 MDA-MB-435 的体外抗肿瘤活性用 MTT 法测定, 对人前列腺癌 PC-3MIE8、人肝癌 Bel-7402、人宫颈癌 Hela 和人胃癌 GC-823 的体外抗肿瘤活性用 SRB 法测定. 其 IC_{50} 值见表 1, 表 1 中同时列出了常见抗癌药物对相应瘤株的 IC_{50} 值^[11~15].

Table 1 IC_{50} values ($\mu g/mL$) of complexes and some drugs against different cell lines

Complex	Cell line					
	HL-60	PC-3MIE8	BGC-823	MDA-MB-435	Bel-7402	Hela
L^1LaL^1	48.89	20.43	49.34	96.60	30.45	44.54
L^2LaL^2	33.97	13.98	46.08	95.53	14.77	24.63
L^3LaL^3	23.47	12.21	36.11	77.89	13.38	22.14
L^4LaL^4	16.29	12.05	23.70	66.58	12.07	20.96
L^5LaL^5	14.49	11.79	21.20	7.47	4.75	18.09
Cisplatin	6.00	4.66	7.70	4.63	6.80	30.00
Melatonin		1200				
Aclarubicin				8.41		
Pingyangmycin					771.00	
Adriamycin					560.00	
Arc-C					89000.00	

1.4 配合物与 DNA 的相互作用

1.4.1 配合物与 DNA 作用的紫外光谱 紫外-可见分光光度计采用波长扫描方式, 波长范围 200 ~

350 nm. 测定时, 向参比池和样品池中加入相同体积的缓冲溶液和配合物溶液(8 $\mu\text{mol/L}$), 记录其吸收光谱, 然后每次向参比池和样品池中滴加相同体积的小牛胸腺 DNA, 使 DNA 与配合物的浓度比不断增加, 直至饱和, 吸收光谱不再变化.

1.4.2 配合物与 DNA 作用的荧光 Scatchard 图 荧光测定激发波长 550 nm, 发射波长 590 nm, 激发狭缝 5 nm, 发射狭缝 10 nm. 测定时, ctDNA 溶液(44.2 $\mu\text{mol/L}$, 用 50 $\mu\text{mol/L}$ pH = 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液配制)3 mL, 于室温测量荧光强度(测 2 次), 再以 EB 溶液进行滴定, 每次滴定 1 μL , 搅拌 3 min 后测定其荧光强度, 直至荧光强度不变. 分别配制一系列配合物-ctDNA 溶液($[\text{DNA}] = 44.2 \mu\text{mol/L}$, $R = [\text{LLaL}]/[\text{DNA}] = 0 \sim 0.5$), 于室温下避光反应 12 h 后, 按上述相同方法以 EB 溶液进行滴定, 直至荧光强度不变为止.

1.4.3 DNA 溶液的粘度测定 将乌氏粘度计浸入水浴[(25 \pm 0.1) $^{\circ}\text{C}$]中. 首先测定缓冲溶液的流动时间 t_0 , 然后测定加入不同浓度配合物前后 DNA 溶液的流动时间 t . 1.0 mmol/L DNA 可确保其流动时间 > 90 s. 实验采用滴定方法进行, 测完 DNA 溶液的流动时间后, 用微量注射器分别加入不等量的配合物溶液, 混合均匀, 测定流动时间, 重复 3 次(误差为 ± 0.1 s), 取平均值.

2 结果与讨论

2.1 配体及配合物的合成

所有配体都经过核磁共振氢谱、元素分析及红外光谱表征, 配合物经过元素分析、红外光谱、热分析、摩尔电导率的表征, 稀土元素的含量用 EDTA 滴定法测定.

2.2 配合物的抗癌活性

从表 1 的结果可见, 该系列配合物对实验所测试的 6 种瘤株均表现出不同程度的生长抑制作用; 5 种配合物对 PC-3MIE8 瘤株的活性均高于 Melatonin, 对 Bel-7402 瘤株的活性均高于 Pingyangmycin, Adriamycin 和 Arc-C, 其中配合物 $\text{L}^{\text{I}}\text{LaL}^{\text{I}}$ 对 MDA-MB-435 人乳腺癌和 Bel-7402 人肝癌效果较好, 对 Bel-7402 人肝癌和 HeLa 人宫颈癌的效果优于顺铂, 对 MDA-MB-435 人乳腺癌的效果优于 Aclarubicin, 可见该类化合物有望设计成为一种新型抗肿瘤药物.

2.3 配合物与 DNA 作用

2.3.1 配合物与 DNA 作用的电子吸收光谱 当加入 DNA 后, 邻菲咯啉配合物的电子结构会受到 DNA 的扰动, 配体所处环境发生改变, 在紫外区的电子吸收发生了变化. 所出现的减色红移效应可认为是配合物与 DNA 发生插入作用的证据之一^[16,17].

分别测定了 5 个配合物在 DNA Tris 缓冲溶液中的吸收光谱. 图 1 是配合物 $\text{L}^{\text{I}}\text{LaL}^{\text{I}}$ 在 DNA Tris 缓冲溶液中的吸收光谱, 结果显示在 270 和 230 nm 附近出现了 2 个较强的吸收峰, 随着 DNA 的加入, 其吸收光谱产生了明显的减色效应, 且减色程度随 DNA 浓度的增大而增大, 同时伴有轻微的红移现象发生, 这表明配合物与 DNA 发生了反应, 可能已嵌入 DNA 的碱基对平面, 以插入模式与 DNA 作用. DNA 对其它 4 个配合物吸收光谱的影响相似, 说明其作用方式相似. 随着取代基长度的增加, 减色效应及红移程度增大.

2.3.2 配合物与 DNA 作用的荧光 Scatchard 图

根据实验测得的荧光强度作出 Scatchard 图^[18,19], 求出 Tris-HCl 缓冲液中 20 $^{\circ}\text{C}$ 时 EB 对纯 DNA 的表观结合常数为 2.028×10^6 L/mol, 平均结合位点数为 0.198, 与文献[19]报道的数值相符, 说明实验方法是可靠的. 同样求得不同浓度的 5 个配合物存在下 EB 对 DNA 的表观结合常数(见表 2).

结果表明, 在不同浓度的配合物存在下, EB 键合 DNA 的荧光 Scatchard 图(图 2)中直线斜率改变, 其在 r 轴上的截距也改变, 直线即不平行, 也

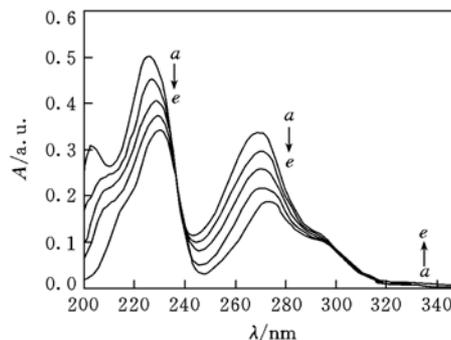


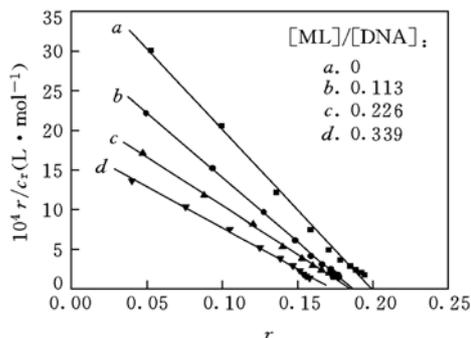
Fig. 1 Effect of ctDNA on the electronic absorption spectra of complex $\text{L}^{\text{I}}\text{LaL}^{\text{I}}$

$a-e$. $n(\text{DNA})/n(\text{L}^{\text{I}}\text{LaL}^{\text{I}})$: 0, 20, 40, 60, 80.

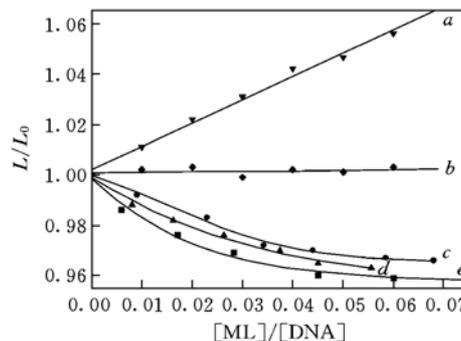
Table 2 The apparent conjunction constants (K) and average inherent conjunction site numbers (n) of EB to DNA in the presence of increasing concentrations of complexes

LML	R	$10^6 K/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	LML	R	$10^6 K/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	
L^1LaL^1	-0.000	2.028	0.198	L^3LaL^3	0.226	1.447	0.166	
	0.113	1.631	0.183		0.339	0.854	0.156	
	0.226	1.521	0.171		L^4LaL^4	0.113	1.502	0.169
	0.339	0.993	0.164			0.226	1.395	0.161
L^2LaL^2	0.113	1.594	0.180	L^5LaL^5	0.339	0.790	0.149	
	0.226	1.489	0.169		0.113	1.411	0.160	
	0.339	0.899	0.160		0.226	1.320	0.151	
L^3LaL^3	0.113	1.550	0.174	0.339	0.699	0.140		

不相交于 r 轴上的某一点. 表 2 的数据同样显示, 随着配合物浓度的增加, EB 键合 DNA 的表观结合常数降低, 固有结合位点数也减小, 所以配合物与 DNA 的键合既非典型的竞争性抑制 EB 与 DNA 的结合, 又非典型的非竞争性抑制 EB 与 DNA 的结合^[19]. 由于 EB 与 DNA 的结合是通过典型的插入方式完成的, 所以其与 DNA 的作用有可能是通过部分插入方式来完成. 随着取代基碳链长度增加, EB 与 DNA 的表观结合常数和结合位点数均减小, 即配合物与 DNA 的作用增强, 对 EB 与 DNA 的结合抑制作用增大.

**Fig. 2** Fluorescence Scatchard plots for the binding of EB to DNA in the absence and the presence of increasing concentrations of complex L^1LaL^1

$[\text{DNA}] = 44.2 \text{ mol/L}$. $[\text{EB}] = 1.67\text{--}16.7 \text{ mol/L}$.

**Fig. 3** Effect of complex concentration on the length of ctDNA

a: EB; b: Hoechst 33258; c: L^1LaL^1 ; d: L^2LaL^2 ; e: L^5LaL^5 .

2.3.3 配合物对 DNA 溶液粘度的影响 通常在缺少高精度晶体结构数据和核磁共振数据的情况下, 粘度法是检测溶液状态下配合物与 DNA 作用模式的重要手段. 可以通过测定加入配合物前后 DNA 溶液粘度的变化来研究配合物与 DNA 的相互作用. 根据实验测得的流动时间计算出加入配合物前后 DNA 溶液的相对粘度 η_0 及 η , 进而计算出加入配合物前后 DNA 长度比 L/L_0 , 将其对 $[\text{ML}]/[\text{DNA}]$ 作图^[20,21], 结果见图 3. 从图 3 谱线 c~e 可以看出, 配合物都能使 DNA 溶液的粘度降低, 说明其与 DNA 的作用方式即不是典型的完全插入方式, 也不是典型的沟面结合方式^[21], 这可能是由于配合物中的 La^{3+} 中心离子易与 DNA 的磷酸氧和糖羟基氧配位, 其所带的正电荷也能与 DNA 的磷酸氧所带的负电荷发生静电作用, 从而使配合物的位置固定, 而其平面芳香环部分的尺寸有限, 再加上其它基团较大的空间位阻效应, 不能完全插入, 而只能部分插入 DNA 碱基中, 从而使棒状 DNA 分子的双螺旋结构发生弯曲或扭结, 其有效长度降低, 溶液粘度降低. 随着配合物溶液浓度的增加, DNA 溶液的粘度降低. 当配合物溶液浓度增加到一定程度后, DNA 溶液的粘度不再降低. 取代基碳链长度增加, DNA 溶液粘度降低程度增大.

本文合成的配合物具有较好的抗癌活性, 能以部分插入方式伴随共价作用和静电作用与 DNA 结合(圆二色谱及熔点实验也证实了这一点), 有望成为设计以 DNA 为靶的新型抗肿瘤药物.

参 考 文 献

[1] Rosenberg B. Cancer[J], 1985, 55: 2303—2310

- [2] Bogdanov A. A. J., Martin C., Bogdanova A. V. *et al.*. *Bioconjugate Chem.* [J], 1996, **7**: 144—149
- [3] Meyn R. E., Stephens L. C., Hunter N. R. *et al.*. *Int. J. Cancer*[J], 1995, **60**: 725—729
- [4] Francisco J. R., Oldřich V., Adoracio'n G. Q. *et al.*. *J. Med. Chem.* [J], 2006, **49**: 2640—2651
- [5] Jaroslav M., Marie V., Viktor B. *et al.*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*[J], 2005, **332**: 1034—1041
- [6] Petra H., Michael A. J., Wilfried K. *et al.*. *Biochemical Pharmacology*[J], 2006, **71**: 426—440
- [7] Li F. H., Zhao G. H., Wu H. X. *et al.*. *Journal of Inorganic Biochemistry*[J], 2006, **100**: 36—43
- [8] Upal K. M., Malaya G., Subhas S. K. *et al.*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*[J], 2005, **13**: 5766—5773
- [9] Młochowski J., Śliwa W., Skrowaczewska Z.. *Pol. 76345(CI C07D)* [P], 1975
- [10] Barton J. K., Goldberg J. M., Kumar C. V. *et al.*. *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1986, **108**: 2081—2090
- [11] FU Xin-Lu(付新录), ZHENG Xiao-Liang(郑小亮), LIU Xue-Li(刘雪莉). *Chin. Bull. Pharmacology(中国药理学通报)* [J], 2003, **19**(8): 883—886
- [12] ZHENG Quan-Hui(郑全辉), YIN Mei-Yun(阴梅云), ZHENG Li-Fen(郑力芬) *et al.*. *Cancerization · Distortion · Mutation(癌变 · 畸变 · 突变)*[J], 2003, **15**(2): 84—87
- [13] LIU Xiao-Yun(刘小云), SHANG Bo-Yang(尚伯杨), LIU Xiu-Jun(刘秀钧). *Chin. J. Medicine(中华医学杂志)* [J], 2001, **81**(4): 201—204
- [14] Indrani B., Frederick F. B., Bimal K. B.. *J. Med. Chem.* [J], 2003, **46**: 12—15
- [15] Adam W., David C. K., Brian O. P. *et al.*. *Inorganic Chemistry Communication*[J], 2003, **6**: 996—1000
- [16] LIANG Feng(梁峰), WEI Jun(魏俊), LI Zhao-Yang(李朝阳) *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)* [J], 2004, **25**(3): 470—473
- [17] ZHONG Wen-Tian(钟文添), WU Jian-Zhong(吴建中). *Chin. J. Inorganic Chemistry(无机化学学报)* [J], 2003, **19**(2): 196—200
- [18] Lepecq J. B., Paolett C.. *J. Mol. Biol.* [J], 1967, **27**: 87—90
- [19] Butor J. L., Wimmer S., Wimmer F. *et al.*. *Chemico-Biological Interactions*[J], 1997, **104**: 165—170
- [20] ZHANG Qian-Ling(张黔玲), LIU Jian-Hong(刘剑洪), REN Xiang-Zhong(任祥忠) *et al.*. *Chin. J. Inorganic Chemistry(无机化学学报)* [J], 2003, **19**(6): 645—648
- [21] Wu J. Z., Li H., Zhang J. G. *et al.*. *Inorganic Chemistry Communications*[J], 2002, **5**: 71—75

Synthesis and Antitumor Activity of Lanthanum(III) Complexes to N-Alkyl-1,10-phenanthroline-2-methanamine

LI Feng-Hua^{1,2*}, WU Hong-Xing², LIN Hua-Kuan²

(1. *College of Chemistry and Molecule Engineering, Qindao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China;*

2. *College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)*

Abstract Five lanthanum(III) complexes containing 1,10-phenanthroline units were synthesized and characterized by elemental analyses, ¹H NMR and IR spectra. All complexes were assayed for antitumor activity *in vitro* against HL-60(human leukocytoma) cells, PC-3MIE8(human prostate carcinoma) cells, BGC-823(human stomach carcinoma) cells, MDA-MB-435(human galactophore carcinoma) cells, Bel-7402(human liver carcinoma) cells and Hela(human cervix carcinoma) cells. The results show that the complexes exhibit good growth inhibition against different cell lines in general. DNA binding studies indicate that the complexes possibly interact with ctDNA by part intercalative, covalent binding and electrostatic effect.

Keywords Phenanthroline; La(III) complex; Antitumor activity; DNA

(Ed.: M, G)