

手性钌配合物的合成、抗肿瘤活性及其与血清蛋白的相互作用

刘亚楠¹, 杨芳¹, 梅文杰^{1,2}, 刘杰¹, 郑文杰¹

(1. 暨南大学化学系, 广州 510632; 2. 广东药学院医药化工学院, 广州 510006)

摘要 合成了手性钌配合物 Δ , Λ -[Ru(bpy)₂(pyip)]²⁺, 通过元素分析、核磁共振、质谱和 CD 光谱对配合物进行了表征. 采用 MTT 法评价了 3 种异构体对多种肿瘤细胞株的体外抗肿瘤活性以及对正常细胞的毒性. 结果表明, Δ -[Ru(bpy)₂(pyip)]²⁺ 的抗肿瘤活性明显优于其异构体, 对 A375, SW480, MCF-7 和 A549 的半数抑制浓度低于顺铂. 通过荧光光谱法研究了在生理 pH 条件下, 手性钌配合物与牛血清白蛋白 (BSA) 之间的结合作用以及荧光猝灭机制. 依据 Scatchard 方程测定了结合常数和结合位点数, 根据热力学方程讨论了两者间的主要作用力类型. 结果表明, 钌配合物对牛血清白蛋白的荧光猝灭机制为静态猝灭. Δ -**1**, **1** 和 Λ -**1** 与牛血清白蛋白的结合常数分别为 1.16×10^5 , 5.12×10^4 和 3.64×10^4 , 结合位点数均为 1, 主要作用力类型是静电作用. 钌配合物在体内能够被血清蛋白存储转运且结合时对蛋白构象无影响.

关键词 手性钌配合物; 抗肿瘤活性; 牛血清白蛋白

中图分类号 O614

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2010)03-0435-07

在具有抗肿瘤活性的金属配合物中, 钌配合物受到了广泛的关注, 国际上普遍认为, 钌和钌配合物属于低毒性, 容易吸收并在体内很快排泄, 将成为最有前途的抗癌药物之一^[1~3]. 钌配合物与顺铂相似, 与临床应用的抗肿瘤药物具有不同的抗肿瘤机制, 并且它与顺铂的抗肿瘤机制也不尽相同^[4~6], 与顺铂产生交叉耐药的比例较小. 目前, 已有 3 种钌配合物作为抗肿瘤药物进入 II 期或 I 期临床^[7~10].

血清白蛋白是血浆中含量最为丰富的载体蛋白, 它不仅对维持渗透压起重要作用, 而且能与进入血液中的大多数内源性和外源性化合物结合, 从而起到在体内存储和转运的作用^[11]. 药物自给药部位吸收进入血液循环后, 通过血浆的储存和运输到达受体部位产生药效作用, 药物与白蛋白的亲合力大小也影响到药物在体内的分布, 通过改变血液或组织中游离药物浓度来影响药效. 因此, 研究钌配合物与血清白蛋白之间的相互作用, 有助于了解钌配合物在体内的运输和分布情况, 对于阐明钌配合物的作用机制具有重要意义. 目前, 对钌配合物与 DNA 相互作用的研究比较深入细致^[12~15], 对其抗肿瘤活性及作用机制也有研究^[16,17], 但是关于钌配合物与血清蛋白的结合作用的报道较少.

本文研究了 3 种异构体的钌配合物的抗肿瘤活性及其与血清蛋白的结合作用, 为进一步开发钌配合物作为抗肿瘤药物奠定了基础.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

所用试剂均为分析纯. 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自广州化学试剂批发部 (进口分装); 牛血清白蛋白 (BSA) 购自上海生工公司; 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (以 0.9% 的 NaCl 水溶液配制, pH =

收稿日期: 2009-10-15.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 20871056, 20771044, 20901030)、广东省自然科学基金 (批准号: 8251063201000008, 9451063201002077) 和广东省科技计划项目 (批准号: 2007B030702010) 资助.

联系人简介: 刘杰, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物无机化学研究. E-mail: tliuliu@jnu.edu.cn

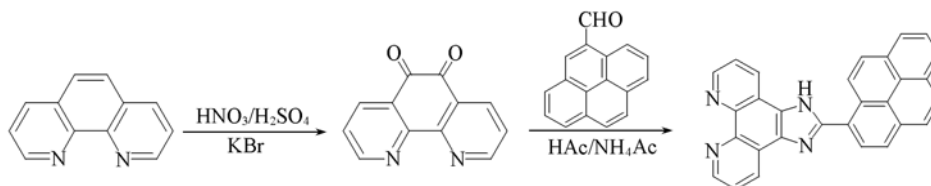
郑文杰, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物无机化学研究. E-mail: tzhwj@jnu.edu.cn

7.4), 配合物储备液浓度为 4.0×10^{-4} mol/L. 荧光光谱测量中, 以 296 nm 为激发波长, 激发和发射狭缝均为 4.0 nm, 发射单色器的扫描速度为 500 nm/min. 在 240 ~ 400 nm 区间测量体系的吸收光谱.

Elementar Vario EL 元素分析仪; Perkin-Elmer Lambda-850 与 Shimadzu UV-3150 紫外-可见光谱仪; Perkin-Elmer Ls55 荧光光谱仪; JASCO J-810 圆二色谱仪; Varian 500 MHz 核磁共振波谱仪. 用 VG ZAB-HS 质谱仪测定快原子轰击质谱 (FAB-MS), ES-MS 用 LCQ 系统 (Finnigan MAT, USA) 电喷雾质谱测定.

1.2 配体与配合物的合成

配体的合成路线如 Scheme 1 所示. 配合物的结构如图 1 所示.



Scheme 1 Synthesis route of pyip

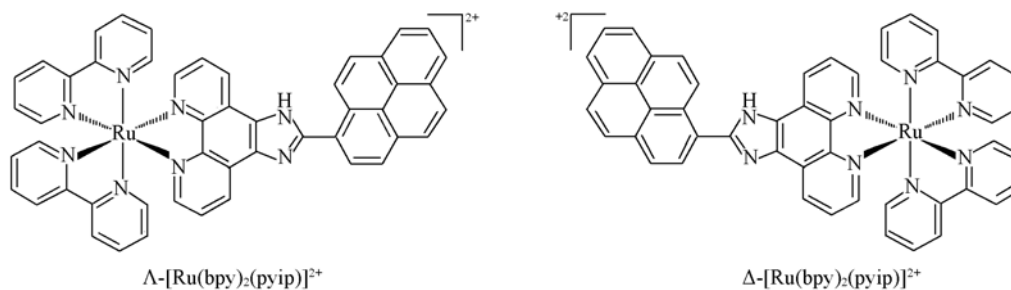


Fig. 1 Structures of the chiral Ru(II) complexes $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{pyip})]^{2+}$

1.2.1 配体 (pyip) 的合成 邻菲咯啉-5,6-二酮的合成参见文献[15]方法, 将 0.315 g 邻菲咯啉-5,6-二酮 (1.5 mmol), 0.261 g 醛基芘 (1.5 mmol), 2.31 g 乙酸铵 (30 mmol) 和 20 mL 冰乙酸的混合物于油浴中加热回流 2 h. 冷却至室温后, 用 80 mL 水稀释, 然后滴加浓氨水中和至近中性, 即析出大量黄色沉淀. 抽滤, 用水、乙醇洗涤数次, 烘干即得粗产物. 将粗产物在无水乙醇中重结晶, 产率为 73%.

1.2.2 $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{pyip})(\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的合成 (**1**) 称取 0.26 g $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.5 mmol) 和 0.15 g pyip (0.5 mmol), 混合后加入 20 mL 乙二醇, 于 120 °C 氩气保护下反应 6 h, 得红色清液. 冷却至室温, 50 mL 水稀释后, 加入 NH_4PF_6 饱和溶液即产生大量红色沉淀. 抽滤, 用水和乙醚洗涤数次后干燥. 将干燥后的粗产物用少量乙腈溶解, 中性氧化铝 (200 目) 柱分离. 用 $V(\text{甲苯}):V(\text{乙腈}) = 1:3$ 的混合溶剂淋洗, 减压并蒸去溶剂, 得红色晶体. 产率为 64%. 元素分析实测值 (%), $\text{C}_{49}\text{H}_{36}\text{F}_{12}\text{N}_8\text{O}_2\text{P}_2\text{Ru}$ 计算值): C 50.65 (50.74), H 3.14 (3.13), N 9.69 (9.66). ESI-MS, m/z : 978.9 ($\text{M} - \text{PF}_6$), 833.3 ($\text{M} - 2\text{PF}_6 - \text{H}$), 417.3 ($\text{M} - 2\text{PF}_6/2$). $^1\text{H NMR}[(\text{CD}_3)_2\text{SO}]$, δ : 9.19 ~ 9.17 (d, 2H), 8.91 ~ 8.84 (t, 4H), 8.73 ~ 8.70 (d, 1H), 8.56 ~ 8.53 (d, 1H), 8.42 ~ 8.32 (m, 5H), 8.25 ~ 8.06 (m, 8H), 7.96 ~ 7.92 (m, 2H), 7.88 ~ 7.87 (d, 2H), 7.67 ~ 7.64 (d, 2H), 7.62 ~ 7.57 (t, 2H), 7.37 (t, 2H).

1.2.3 $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{pyip})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的合成 ($\Delta\text{-1}$) $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})_2][\text{O}, \text{O}'\text{-dibenzoyl-D-tartrate}] \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 的合成参照文献[18]方法. 称取 0.20 g $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})_2]\text{Cl}_2[\text{O}, \text{O}'\text{-dibenzoyl-D-tartrate}] \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 0.076 g pyip 溶于 20 mL 乙二醇和水的混合溶剂中. 在氩气保护下于 140 °C 反应 8 h, 冷却至室温后加水 60 mL 稀释. 过滤, 向滤液中加入饱和 NH_4PF_6 溶液即产生大量红色沉淀. 抽滤, 沉淀依次用水和乙醚洗涤数次, 干燥, 然后用少量乙腈溶解干燥的产物, 过中性氧化铝 (200 目) 柱分离, 用 $V(\text{甲苯}):V(\text{乙腈}) = 1:3$ 的混合溶剂淋洗后得红色微晶. 元素分析实测值 (%), $\text{C}_{49}\text{H}_{36}\text{F}_{12}\text{N}_8\text{O}_2\text{P}_2\text{Ru}$ 计算值): C 50.65 (50.74), H 3.14 (3.13), N 9.69 (9.66). ESI-MS, m/z : 978.9 ($\text{M} - \text{PF}_6$), 833.3 ($\text{M} - 2\text{PF}_6 - \text{H}$), 417.3 ($\text{M} - 2\text{PF}_6/2$). $^1\text{H NMR}[(\text{CD}_3)_2\text{SO}]$, δ : 9.19 ~ 9.17 (d,

2H), 8.91 ~ 8.84(t, 4H), 8.73 ~ 8.70(d, 1H), 8.56 ~ 8.53(d, 1H), 8.42 ~ 8.32(m, 5H), 8.25 ~ 8.06(m, 8H), 7.96 ~ 7.92(m, 2H), 7.88 ~ 7.87(d, 2H), 7.67 ~ 7.64(d, 2H), 7.62 ~ 7.57(t, 2H), 7.37(t, 2H). CD [$\epsilon/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$] (DMSO-H₂O), λ/nm : 469 (-6.4), 423 (8.16), 291 (-74.6), 273 (28.8).

1.2.4 Λ -[Ru(bpy)₂(pyip)](PF₆)₂ · 2H₂O 的合成 (Λ -1) Λ -1 的合成采用与 Δ -1 相似的方法, 得红色微晶 166 mg, 产率 70%. 元素分析实测值(%), C₄₉H₃₆F₁₂N₈O₂P₂Ru 计算值): C 50.67 (50.74), H 3.14 (3.13), N 9.68 (9.66). ESI-MS, m/z : 978.9 (M - PF₆), 833.3 (M - 2PF₆ - H), 417.3 (M - 2PF₆/2). ¹H NMR [(CD₃)₂SO], δ : 9.19 ~ 9.17(d, 2H), 8.91 ~ 8.84(t, 4H), 8.73 ~ 8.70(d, 1H), 8.56 ~ 8.53(d, 1H), 8.42 ~ 8.32(m, 5H), 8.25 ~ 8.06(m, 8H), 7.96 ~ 7.92(m, 2H), 7.88 ~ 7.87(d, 2H), 7.67 ~ 7.64(d, 2H), 7.62 ~ 7.57(t, 2H), 7.37(t, 2H). CD [$\epsilon/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$] (DMSO-H₂O), λ/nm : 470(6.1), 421(-7.4), 291(70.0), 273(-26.0).

1.3 配合物抗肿瘤活性

1.3.1 细胞株及配合物 人恶性黑色素瘤细胞(A375)、人肝癌细胞(HepG2)、人结肠癌细胞(SW480)、人前列腺癌细胞(PC-3)、人乳腺癌细胞(MCF-7)和人肺腺癌细胞(A549)购自 ATCC 公司. 样品编号: Δ -Ru(bpy)₂(pyip)(PF₆)₂ · 2H₂O 记为 Δ -1, Ru(bpy)₂(pyip)(PF₆)₂ · 2H₂O 记为 1, Λ -Ru(bpy)₂(pyip)(PF₆)₂ · 2H₂O 记为 Λ -1 和顺铂.

1.3.2 MTT 法评价配合物体外抗肿瘤活性 取对数生长期的肿瘤细胞, 调整细胞浓度为 2×10^4 cell/mL, 加入 96 孔培养板, 每孔 100 μL , 在培养箱中培养 24 h 待贴壁后, 再分别加入不同浓度受试样品 100 μL , 阴性对照为等体积生理盐水, 阳性对照为顺铂, 加样组和对照组均设 4 个复孔, 置 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 培养 72 h, 然后加入 MTT(5 mg/mL) 20 μL /孔, 5 h 后离心弃上清液, 加入二甲基亚砜(DMSO) 100 μL /孔, 振荡 10 min, 用酶标仪在 570 nm 下测定 OD 值. 计算细胞存活率, 通过软件计算其半数抑制浓度(IC₅₀).

1.3.3 流式细胞分析 离心收集处理后的细胞, 用 PBS 清洗 2 次, 加入 70% 乙醇, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜, 离心, 清洗后进行细胞 PI 染色. 利用 Beckman 流式细胞分析仪测定 DNA 含量. 用 Multi Cycle 软件(Phoenix Flow Systems, San Diego, CA) 计算细胞周期分布, 用 DNA 柱状图表示细胞在 G₀/G₁, S 和 G₂/M 各相的分布比例. 凋亡细胞亚二倍体 DNA 含量通过定量图中 sub-G₁ 峰测得. 每个样品分析 10⁴ 个细胞.

1.4 配合物与 BSA 相互作用的荧光光谱滴定

BSA 的浓度为 1.0×10^{-6} mol/L, 配合物的浓度分别为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 $\mu\text{mol/L}$. 移取 2.5 mL BSA 于石英比色皿中, 用微量进样器逐次加入一定量的配合物进行荧光滴定, 每次加入溶液后混合 5 min 使其均匀, 以 296 nm 为激发波长, 记录 300 ~ 500 nm 范围内的发射光谱.

2 结果与讨论

2.1 配合物的合成

在反应过程中, 氩气保护能够显著提高配合物的产率, 在采用柱层析的方法分离和纯化过程中, 洗脱液的选择是关键因素, 既要保证分离副产物, 又要考虑分离的时间. 经过多次实验证明, $V(\text{甲苯}): V(\text{乙腈}) = 1:3$ 时混合溶剂可达到最佳淋洗效果.

配合物在 Tris-HCl 缓冲溶液中, 分别在 284, 365 和 459 nm 出现强烈的吸收光谱, 其中 284 nm 处的吸收峰被指认为 MLCT (Metal-to-ligand charge transfer), 在 459 nm 处出现的吸收峰被指认为 Ru($d\pi$)-bpy(π^*) 和 Ru($d\pi$)-pyip(π^*), 365 nm 的吸收峰归属为配体 pyip 的 π - π^* 跃迁. 在配合物电喷雾质谱图中, m/z 峰分别在 978.9, 833.3 和 417.3 位置出现, 相应的归属为 M - PF₆, M - 2PF₆ - H 和 M - 2PF₆/2 的分子离子峰, 与相应化合物的理论计算值基本一致. ¹H NMR [(CD₃)₂SO], δ : 9.19 ~ 9.17(d, 2H), 8.91 ~ 8.84(t, 4H), 8.73 ~ 8.70(d, 1H), 8.56 ~ 8.53(d, 1H), 8.42 ~ 8.32(m, 5H), 8.25 ~ 8.06(m, 8H), 7.96 ~ 7.92(m, 2H), 7.88 ~ 7.87(d, 2H), 7.67 ~ 7.64(d, 2H), 7.62 ~ 7.57

(t, 2H), 7.37(t, 2H). 这与结构中的 H 分析相吻合. Δ -1 和 Λ -1 的 CD 光谱也证明了它们属于一对手性异构体. 配合物的 ^1H NMR 和 CD 光谱分别见图 2 和图 3.

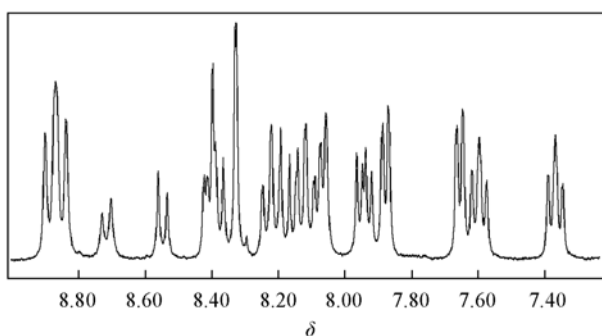


Fig. 2 ^1H NMR spectra of Δ -[Ru(bpy)₂(pyip)]²⁺ and Λ -[Ru(bpy)₂(pyip)]²⁺

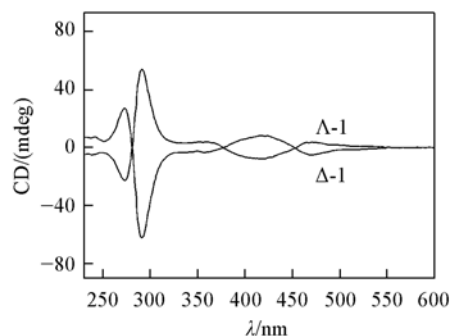


Fig. 3 CD spectra of Δ -[Ru(bpy)₂(pyip)]²⁺ and Λ -[Ru(bpy)₂(pyip)]²⁺

2.2 配合物体外抗肿瘤活性

采用 MTT 法评价配合物 Δ -1, **1** 和 Λ -1 的体外抗肿瘤活性, 配合物对肿瘤细胞的半数抑制浓度如表 1 所示. 从表 1 可以看出, 配合物 Δ -1 对肿瘤细胞的抑制作用明显高于其异构体 **1** 和 Λ -1. 这些结果显示钌配合物对癌细胞具有一定的选择性, 其中对 A375 黑色素瘤的化学预防作用最佳.

Table 1 Growth inhibition of Ru complexes on various human cancer cells

Compound	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)					
	A375	HepG2	SW480	PC-3	MCF-7	A549
Δ -1	3.2	18.6	8.6	32.4	11.2	10.1
1	25.6	21.8	20.3	—	—	20.9
Λ -1	36.5	33.7	27.4	—	—	25.3
cis-Pt	7.3	13.6	16.9	36.2	24.4	22.2

* Cells were treated with various concentrations of tested compounds for 48 h. Cell viability was determined by MTT assay and IC₅₀ values were calculated as described in the experimental section.

在评价药物的药理学应用价值时, 其疗效和毒性的平衡至关重要. 因此同时测定了钌配合物对正常细胞的体外毒性, 结果如图 4 所示. 从图 4 可以看出, 即使配合物的浓度增加到 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 对于 Hs68 人体纤维原细胞仍无毒性作用. 这些结果显示钌配合物对于肿瘤细胞和正常细胞具有明显的选择性.

2.3 配合物抑制肿瘤细胞增殖的机制

一般来说, 化合物对肿瘤细胞生长的抑制作用可能是配合物诱导肿瘤细胞凋亡或者是细胞周期阻滞, 或者是两者同时发生. 选用对配合物 Δ -1 表现出较高敏感性的 A375 为靶细胞, 研究配合物 Δ -1 抗肿瘤活性的作用机理, 用流式细胞技术及 Annexin V/PI 双染色法进行分析, 结果发现, 凋亡是 Δ -1 抑制肿瘤细胞增殖的最主要机制(图 5). 配合物 Δ -1 处理 A375 细胞 48 h 后, 出现明显的 Sub-G1 凋亡峰, 且峰值随着浓度的增加而变大, 表明配合物诱导细胞凋亡呈现了剂量效应关系. 配合物 Δ -1 引起了 G1 和 S 期细胞百分数呈剂量效应的增加, G2/M 和 G0/G1 期细胞百分数相应减少, 说明配合物 Δ -1 诱导 A375 细胞发生 S 期阻滞.

2.4 配合物与牛血清白蛋白作用的荧光光谱

图 6 是在 25 $^{\circ}\text{C}$, pH=7.4 的 Tris-HCl 缓冲体系中, 改变配合物 Δ -1, **1** 和 Λ -1 的浓度, 记录的 BSA

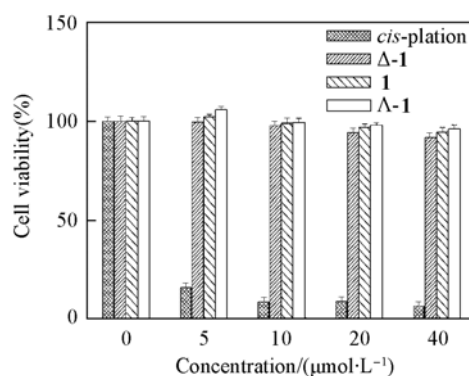


Fig. 4 Growth inhibitory effects of Ru complexes on Hs68 human normal cells

Cells were treated with different concentrations of the extract for 72 h and cell viability was determined by MTT assay as described in materials and methods.

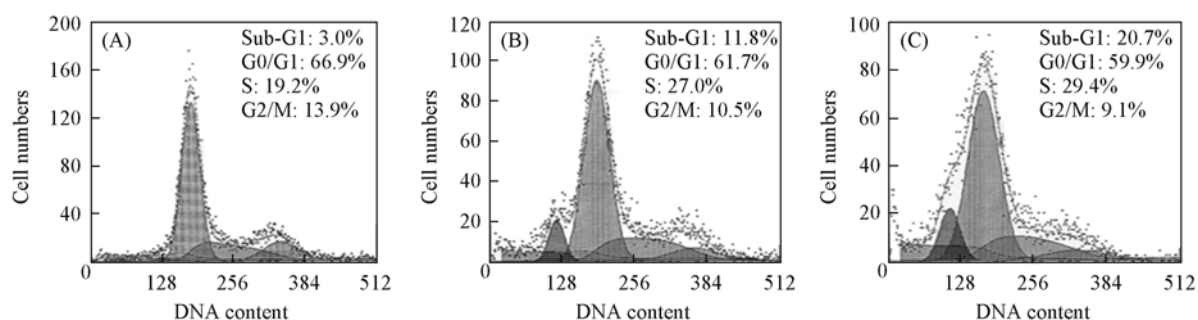


Fig. 5 Flow cytometry analysis of A375 cells apoptosis after treatment with complex $\Delta-1$ for 48 h

(A) Control; (B) $c(\Delta-1) = 5 \mu\text{mol/L}$; (C) $c(\Delta-1) = 10 \mu\text{mol/L}$.

荧光发射光谱, 可以看到, 随着不同浓度的配合物滴定到固定浓度的 BSA 内, BSA 的荧光强度逐渐降低, 表明配合物与 BSA 之间发生了相互作用, 从而猝灭了 BSA 的荧光. 随着配合物浓度的不断增加, BSA 荧光强度的猝灭趋势有所减缓, 即配合物与 BSA 的键合作用逐渐趋于饱和. 牛血清白蛋白在 348 nm 附近的发射峰可归属于其色氨酸残基的发光, 而色氨酸残基的最大发射波长与其所处的微环境有关, 发射峰波长蓝移, 表明牛血清白蛋白的构象发生了变化, 从而使色氨酸残基周围的疏水性有所增加. 3 种异构体对 BSA 荧光强度的猝灭程度为 $\Delta-1 > \mathbf{1} > \Lambda-1$, 对 BSA 吸收峰位基本无影响, 说明配合物对牛血清白蛋白的构象没有影响.

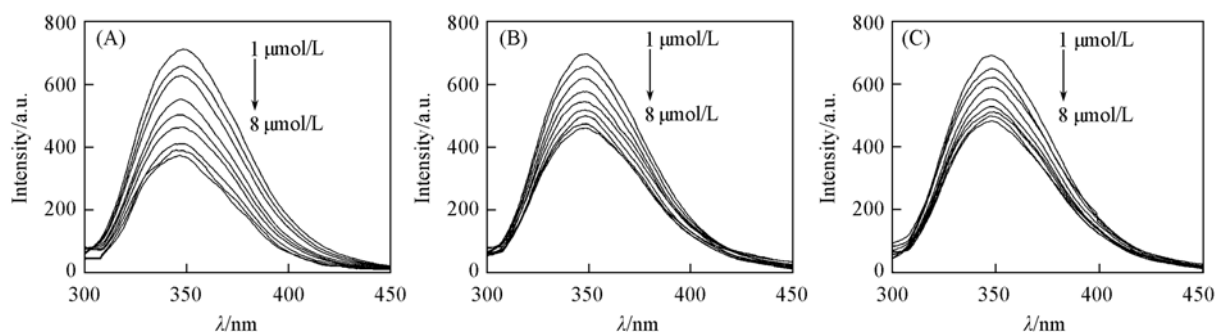


Fig. 6 Fluorescence spectra of BSA in the presence of complexes $\Delta-1$ (A), $\mathbf{1}$ (B) and $\Lambda-1$ (C)

BSA concentration was $1 \mu\text{mol/L}$. Concentrations of complexes $\mathbf{1}$, $\Delta-1$, $\Lambda-1$ were 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 $\mu\text{mol/L}$.

2.5 猝灭机理及形成常数的确定

为了定量比较 3 种异构体与 BSA 作用的强弱, 根据 Stern-Volmer 方程^[3]:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0$$

$$[Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

其中, F_0 为不加配合物时的 BSA 的荧光强度, F 为加入配合物后体系的荧光强度, K_q 为猝灭过程的速率常数, τ_0 为没有猝灭剂存在下的荧光分子的平均寿命, K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常数. $[Q]$ 为配合物的浓度. 以 $F_0/F - 1$ 为纵坐标, 配合物与 BSA 的浓度比为横坐标作图, 可得到配合物对 BSA 的荧光猝灭曲线(图 7).

从图 7 可以看出, 曲线呈良好线性关系, 25 °C 时 $\Delta-1$, $\mathbf{1}$ 和 $\Lambda-1$ 的相关系数 r^2 分别为 0.9986, 0.9979 和 0.9987, 由其斜率求得 $\Delta-1$, $\mathbf{1}$ 和 $\Lambda-1$ 猝灭 BSA 的猝灭常数 K_{SV} 分别为 12.1×10^4 , 6.34×10^4 和 $5.5 \times 10^4 \text{ L/mol}$. 大分子的 τ_0 一般为 $1 \times 10^{-8} \text{ s}$, 依据 $K_{SV} = K_q \tau_0$, 进一步求出 $\Delta-1$, $\mathbf{1}$ 和 $\Lambda-1$ 对 BSA 猝灭的 K_q 分别为 12.1×10^{12} , 6.34×10^{12} 和 $5.5 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. 一般认为, 各类猝灭剂

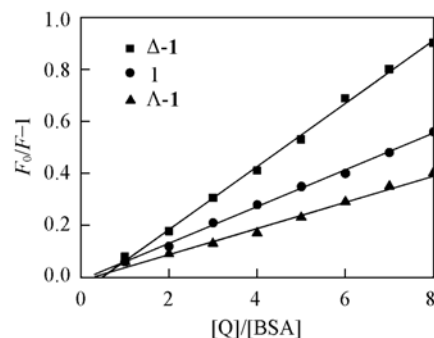


Fig. 7 Stern-Volmer curves for the binding of complexes $\mathbf{1}$, $\Lambda-1$, $\Delta-1$ with BSA

$\lambda_{\text{ex}} = 296 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 348 \text{ nm}$, $c(\text{BSA}) = 1 \mu\text{mol/L}$.

对生物大分子的最大扩散碰撞速率常数为 $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 显然配合物对 BSA 荧光猝灭速率远远大于扩散控制的 K_q , 据此, 配合物对 BSA 荧光猝灭可以推测为静态猝灭.

2.6 配合物 Δ -1, 1 和 Λ -1 与 BSA 作用的结合常数及结合位点

小分子与蛋白质分子之间的相互作用一般采用位点结合模型来描述, 依据 Scatchard 方程^[11]可求得结合反应的结合常数和结合位点数. 将所得的各荧光光谱按 348 nm 处的相对荧光强度可推导出 $\lg(F_0 - F)/F = \lg K + n \lg[Q]$, 以 $\lg(F_0 - F)$ 对 $\lg[Q]$ 绘图, 根据斜率和截矩可算出结合常数和结合位点数, 配合物 Δ -1, 1 和 Λ -1 与 BSA 的结合常数和结合位点数见表 2, 结果表明, 配合物与 BSA 作用时只有 1 个结合位点, 结合常数的大小顺序为 Δ -1 > 1 > Λ -1. 与配合物对 BSA 的荧光猝灭常数的大小相一致.

Table 2 Binding constant (K_a) and number of binding site (n) for Δ -1, 1, Λ -1 with BSA

Complex	Δ -1	1	Λ -1
$K_a/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	1.16×10^5	5.12×10^4	3.64×10^4
n	0.988	0.958	0.941

3 讨 论

在体外试验中配合物对多种肿瘤细胞具有强烈的抑制作用, 尤其是 Δ -1 对 A375, SW480, MCF-7 和 A549 肿瘤细胞株的抑制作用要优于顺铂, 且毒性比顺铂低, 显示出良好的应用价值. 另外, 其抗肿瘤活性显示出手性异构体的差异, 其中 Δ -异构体抗肿瘤活性最好, 消旋体和 Λ -异构体的抗肿瘤活性不高或没有抗肿瘤活性, 这可能是由于 Δ -异构体与 DNA 有较强的结合作用^[18]. 配合物的抗肿瘤活性与 DNA 作用的强度具有相关性, 但也有报道认为钆配合物抗肿瘤活性与 DNA 结合的方式和强度没有直接关系^[1]. 配合物抑制肿瘤细胞增殖的机制是配合物诱导肿瘤细胞凋亡, 配合物 Δ -1 诱导 A375 细胞发生 S 期阻滞.

牛血清蛋白具有 2 个色氨酸生色团, Trp-213 在蛋白质的疏水空腔内, Trp-134 在蛋白质分子的表面. 荧光光谱吸收峰的位置与色氨酸的微环境有关, 而荧光强度则与色氨酸支链是否被暴露于极性溶剂中, 以及色氨酸与猝灭基团所在位置的距 离有关. 从图 3 的实验数据分析可知: (1) 荧光吸收峰的位置基本没有变化, 说明色氨酸残基的微环境没有变化; (2) 荧光强度的变化说明配合物的加入导致生色团和猝灭剂发生了相互作用, 可能是通过改变蛋白质的二级结构, 从而使色氨酸残基暴露于极性溶剂中; (3) 由于配合物中存在平面性的结构, 配合物通过芳环平面与色氨酸的吡咯环形成 π - π 堆积, 或者插入血清蛋白疏水的 II A 亚结构域也是可能的. 与 DNA 刚性的结构不同, 牛血清白蛋白具有相对柔性的结构, 所以在配合物与蛋白的作用中, 有可能占据更为重要的位置. 配合物与蛋白的 π - π 堆积以及疏水作用可能是最重要的作用方式, 因为其作用强度顺序应与 DNA 作用的强度顺序一致^[18].

参 考 文 献

- [1] Liu J., Zheng W. J., Shi S., *et al.* J. Inorg. Biochem. [J], 2008, **102**: 193—202
- [2] Clark M. J.. Chem. Rev. [J], 2002, **232**: 69—93
- [3] Sava G., Bergamo A., Zorzet S., *et al.* Eur. J. Cancer [J], 2002, **38**: 427—435
- [4] Bergamo A., Gagliardi R., Scarcia V., *et al.* Pharm. Exp. Ther. [J], 1999, **289**: 559—564
- [5] Serli B., Ingo E., Gianferrara T., *et al.* Metal Based Drugs [J], 2001, **8**: 9—18
- [6] Piccioli F., Sabatini S., Messori L., *et al.* J. Inorg. Biochem. [J], 2004, **98**: 1135—1142
- [7] Ioannis B., Alberta B., Gianni S., *et al.* J. Inorg. Biochem. [J], 2008, **102**: 606—617
- [8] Kostova I.. Curr. Med. Chem. [J]. 2006, **13**: 1085—1107
- [9] Hartinger C. G., Zorbas-Seifried S., Jakupec M. A., *et al.* J. Inorg. Biochem. [J], 2006, **100**: 891—904
- [10] Alessio E. G., Mestroni A., Bergamo G., *et al.* Curr. Top. Med. Chem. [J], 2004, **4**: 1525—1535
- [11] MA Jing(马静), ZHENG Xue-Fang(郑学仿), TANG Qian(唐乾). *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2008, **29**(2): 258—263

- [12] SUN Bin(孙斌), LIANG Si-Min(梁思敏), WANG Yu-Chuan(王宇传), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **12**: 2496—2501
- [13] JIANG Shang-Da(蒋尚达), LI Shi-Yuan(李世媛), CUI Meng-Chao(崔孟超), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**: 559—561
- [14] NIE Jing(聂晶), HAN Mei-Jiao(韩美娇), WANG Ke-Zhi(王科志), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**: 1833—1835
- [15] ZHANG Qian-Ling(张黔玲), LIU Jian-Hong(刘剑洪), REN Xiang-Zhong(任祥忠), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**: 1805—1810
- [16] Isabella B., Muhammad H., Alexey A. N.. Chem. Eur. J. [J], 2008, **14**: 9046—9057
- [17] LIU Jie(刘杰), JI Liang-Nian(计亮年), MEI Wen-Jie(梅文杰). Progress in Chemistry(化学进展)[J], 2004, **16**(6): 969—974
- [18] Shi S., Yao T. M., Geng X. T., *et al.* Chirality[J], 2009, **21**: 276—283

Synthesis and *in vitro* Anticancer Activities of Chiral Ruthenium Complexes and Interaction of the complex with Bovine Serum Albumin

LIU Ya-Nan¹, YANG Fang¹, MEI Wen-Jie^{1,2}, LIU Jie^{1*}, ZHENG Wen-Jie^{1*}

(1. Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong 510006, China)

Abstract Chiral ruthenium(II) complexes Δ -[Ru (bpy)₂ (pyip)]²⁺ and Λ -[Ru (bpy)₂ (pyip)]²⁺ were synthesized and characterized in detail by elemental analysis, ¹H NMR, electrospray ionization mass spectrometry(ESI-MS) and circular dichroism(CD). The *in vitro* anticancer activities of the ruthenium(II) complexes were screened by MTT assay. The results show that Δ -[Ru (bpy)₂ (pyip)]²⁺ exhibited higher cytotoxic effects against human cancer cells. The quenching mechanism of the fluorescence of bovine serum albumin(BSA) by chiral ruthenium(II) complexes was investigated by fluorescence spectroscopy under simulative physiological conditions. The binding constant *K* and the number of binding sites were determined according to Scatchard equation and the main binding force was discussed *via* thermodynamic equations. The experimental results show that the quenching mechanism of chiral ruthenium(II) complexes to bovine serum albumin was static quenching. The binding constants *K* were 1.16×10^5 , 5.12×10^4 , 3.64×10^4 L · mol⁻¹ with one binding site, respectively. The binding force is electrostatic interaction. Chiral ruthenium complexes have nearly no effect on the serum protein conformation.

Keywords Chiral ruthenium complex; Anticancer activity; Bovine serum albumin(BSA)

(Ed. : F, G)