

5-甲基-2-(2'-吡啶基)苯并咪唑及甘氨酸根铜(II) 配合物的合成、DNA 结合及抗癌活性

莫慧雯 刘雅娴 蔡戴宏 沈 芳 乐学义*

(华南农业大学材料与能源学院应用化学系, 广州 510642)

摘要: 利用溶剂缓慢挥发法合成了以 5-甲基-2-(2'-吡啶基) 苯并咪唑为主配体的铜(II)混配配合物 $[\text{Cu}(\text{HPBM})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (HPBM=5-甲基-2-(2'-吡啶基)苯并咪唑, Gly=甘氨酸根)。采用元素分析、红外光谱、紫外可见光谱、摩尔电导率测定和 ESI-MS 等手段对配合物进行了表征。应用电子吸收光谱、荧光光谱、粘度测定及分子对接等方法揭示了配合物主要以沟槽结合的方式与 DNA 作用。应用 MTT 法测定了配合物对 Eca-109、HeLa 和 A549 细胞株的体外细胞毒活性, 其 IC_{50} 值范围为 $6.4 \sim 8.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。尤为重要的是, 通过 AO/EB 双染法、单细胞凝胶电泳、线粒体膜电位及细胞周期测定分析等揭示了配合物通过 DNA 结合及线粒体功能失调途径诱导 Eca-109 细胞凋亡。

关键词: 铜(II)配合物; 5-甲基-2-(2'-吡啶基)苯并咪唑; 甘氨酸; DNA 结合; 抗癌作用

中图分类号: O614.121

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2019)03-0477-08

DOI: 10.11862/CJIC.2019.059

Synthesis, DNA Interaction and Anticancer Activity of Mixed-Ligand Copper(II) Complex of 5-Methyl-2-(2'-pyridyl)benzimidazole and Glycinate

MO Hui-Wen LIU Ya-Xian CAI Dai-Hong SHEN Fang LE Xue-Yi*

(Department of Applied Chemistry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A new copper(II) complex $[\text{Cu}(\text{HPBM})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (HPBM=5-methyl-2-(2'-pyridyl)benzimidazole, Gly=Glycinate), was prepared and characterized by elemental analysis, IR spectroscopy, UV-Vis spectroscopy, molar conductivity and ESI-MS spectroscopy. Electronic absorption spectroscopy, EB-DNA fluorescence quenching spectroscopy, viscosity measurement and molecular docking revealed that the complex could interact with CT-DNA through a minor groove binding mode. The cytotoxic activity *in vitro* of the complex against Eca-109, HeLa and A549 cell lines was evaluated by MTT method. The IC_{50} values ranged from 6.4 to $8.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. AO/EB double staining analysis indicated that the complex could induce apoptosis in Eca-109 cells. The comet assays demonstrated that the complex could damage DNA in Eca-109 cells, which further revealed that the complex could cause apoptosis in the cells. The mitochondrial membrane potential studies showed that the complex could induce decrease in the intracellular mitochondrial membrane potential. Moreover, the cell cycle arrest of Eca-109 cell lines was investigated by flow cytometry. The results demonstrated that the complex can induce apoptosis in Eca-109 cell through DNA interaction and mitochondria dysfunctional pathways.

Keywords: copper(II) complex; 5-methyl-2-(2'-pyridyl)benzimidazole; glycine; DNA interaction; anticancer activity

收稿日期: 2018-10-21。收修改稿日期: 2018-12-16。

广东省自然科学基金(No.2015A030313423)和广东省大学生创新训练项目(No.201710564307)资助。

*通信联系人。E-mail: lexifu@163.com, Tel: 020-85280319; 会员登记号: S060000184M。

铜是人体内必需的生命元素,作为结构和催化辅助因子参与机体内许多生命过程,并且其配合物在氧化还原环境中有着可调控的配位构型,在细胞水平能得到更好的利用,因此常常作为药物分子尤其是抗肿瘤药物分子的基本结构单元^[1-2]。芳杂环化合物具有生物分子中咪唑、嘌呤碱和嘧啶碱等基团类似的配位性质,并且具有潜在的杀菌、抗氧化、抗病毒和抗肿瘤等生物活性,尤其是当与生命元素形成配合物时通过协同作用可进一步提高其生物活性^[3-4]。氨基酸为重要的生物配体,具有很好的生物兼容性和潜在的生物活性(如抗氧化、抗肿瘤等)及识别生物大分子的功能,作为配体不仅有助于提高配合物的生物活性,而且能够改善配合物在溶液中的溶解性,提高其生物利用率,降低其毒副作用等^[5-6]。

基于以上考虑,本研究设计、合成和表征了新的三元铜(II)混配配合物 $[\text{Cu}(\text{HPBM})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (其中 HPBM=5-甲基-2'-(2'-吡啶基)苯并咪唑, Gly=甘氨酸根)。研究了配合物与 DNA 的作用及其抗肿瘤活性,探讨了其作用机制。

1 实验部分

1.1 主要材料和仪器

小牛胸腺 DNA(CT-DNA)购自华锐试剂有限公司,生物纯;细胞毒性实验所用试剂或试剂盒购自碧云天生物技术有限公司,生物纯;其它试剂均为市售分析纯;食管癌细胞(Eca-109)、人宫颈癌细胞(HeLa)和人肺癌细胞(A549)等细胞系来自于中山大学实验动物中心。整个试验过程使用的水均为去离子水。

所用仪器有:河南巩义仪器有限公司 DDS-11A 数显电导率仪;美国 Nicolet 公司 ACATAR 360 FT-IR 型红外光谱仪;德国 ELEMENTAR 公司 Vario EL 元素分析仪;日本 Shimadzu 公司 Pharmacia UV-2550 紫外-可见分光光度计;日本岛津 RF-5301 荧光光谱仪;上海晶菱玻璃有限公司乌氏粘度计;瑞士 Tecan 公司 Infinite M200 pro 多功能酶标仪;北京六一仪器厂 JY200C 电泳仪;意大利 Laboratories-Segrate BIO-RAD 凝胶成像系统;美国 Thermo 公司 Scientific Forma CO₂ 细胞培养箱;德国 LEICA 公司 DMI3000B 正置荧光显微镜;美国 BD Bioscience 公司 FACSCalibur 流式细胞仪。

1.2 常用溶液的配制

Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液(pH=7.2): $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷(Tris)+ $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl。 0.01

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液(PBS,pH=7.4): $2.68 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl+ $0.138 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl+ $1.76 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH₂PO₄+ $0.01014 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na₂HPO₄· $0.012 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 噻唑蓝(MTT)溶液;用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 配制。配好后置于 4 ℃ 下避光保存,储存时间不超过 1 周。CT-DNA 溶液:用 Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液配制。配制好后测得 A_{260}/A_{280} 比值介于 1.8~1.9 之间,表明溶液中基本不含蛋白质,且浓度以 $\epsilon_{260}=6600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 确定^[7]。CT-DNA 溶液放置在 4 ℃ 冰箱内保存,且储存时间不超过 3 d。

1.3 配合物的合成

首先,参照文献方法^[8]制备配体 HPBM。

配合物合成具体过程如下:称取 HPBM(0.5 mmol , 0.0523 g)于 20 mL 无水甲醇中,待其完全溶解后加入 1 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu(ClO₄)₂ 溶液,加热搅拌得到草绿色澄清液 A;然后称取甘氨酸(0.5 mmol , 0.0188 g)溶于 4 mL 去离子水中,再加入 1 mL 的 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液,得到 B 液;将 B 液缓慢滴加到 A 液中,加热搅拌回流 1 h 后自然冷却到室温,过滤、静置自然挥发,2 周后得到墨绿色粉末态沉淀物。将过滤得到的固体粉末用甲醇重结晶,获得的固体产物空气干燥后密封保存。元素分析按 CuC₁₅H₁₈N₄O_{7.5}Cl 计算值(%):C,38.07;H,3.80;N,11.84。实验值(%):C,37.86;H,3.86;N,11.72;IR(KBr, cm⁻¹):3438(s,br),3311(w),3149(w),1612(s),1492(s),1398(s),625(w),432(w);UV-Vis(甲醇为溶剂), λ/nm ($\epsilon/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$):207 (46512),348 (21262),626 (65.35);MS(甲醇为溶剂): $m/z=345.9$ 对应于 $[\text{Cu}(\text{HPBM})(\text{Gly})]^+$;电导率测定(甲醇为溶剂): $\Lambda=104.2 \text{ S} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

1.4 配合物与 DNA 相互作用实验

1.4.1 电子吸收光谱滴定实验

在空白池和样品池中分别加入 3 mL Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液和 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 配合物溶液,用紫外分光光度计检测在 200~450 nm 波长范围内电子吸收光谱,随后依次往空白池和样品池中分别加入等体积的 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CT-DNA 溶液,使 CT-DNA 与配合物的浓度比值不断增加。每次加入 CT-DNA 溶液并静置 5 min 后,在上述同样波长范围内进行扫描。

1.4.2 荧光猝灭光谱测定

将等体积(2.5 mL)的 $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴化乙啶(EB)与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CT-DNA 溶液混匀,放置 2 h 使 EB 与 CT-DNA 充分作用。往样品池中加入 3 mL 的 EB-

CT-DNA 混合溶液,设定好相关参数值;激发波长为 525 nm,扫描速度为 $240 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$,扫描波长范围 540~700 nm。然后,用移液枪依次往 EB-CT-DNA 体系中滴加 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 配合物溶液 $20 \mu\text{L}$,使配合物浓度不断增加。每次待其反应 5 min 后测定其荧光发射光谱。

1.4.3 粘度测定

粘度测定试验参照我们以前报道的方法进行^[9]。

1.4.4 分子对接

使用 Gaussian viewer 软件画出配合物的分子结构,并采用 Gaussian 09 软件进行几何构型优化,优化后得到的配合物分子结构文件用于分子对接。DNA 结构文件来自 PDB 数据库(PDB ID:6BNA)。整个分子对接过程在 AutoDock4.2 软件^[10]上进行,格点间隔为 0.0375 nm ,格点中心坐标为: $x=24.986$ 、 $y=9.578$ 、 $z=20.079$,格点大小为 $60 \times 60 \times 60$,采用经典拉马克遗传算法(Lamarckian genetic algorithm,LGA),计算轮数为 100,其他参数保持默认设置。配合物分子和 DNA 分子间的能量匹配用半经验的自由能计算方法进行评价^[11]。计算结果使用 Autodock 1.5.6 软件进行分析并运用 PyMol 软件进行可视化处理^[12]。

1.5 配合物细胞毒性试验

1.5.1 MTT 实验

试验细胞用 RPMI-1640 培养基培养,复苏后的细胞接种于 50 cm^3 培养瓶中进行培养,收集对数生长期的细胞接种于 96 孔板中,细胞密度为每孔 $8 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 个之间,将该板放置于含 5%(V/V) CO_2 的 37°C 无菌培养箱中,待细胞贴壁并长至 85% 时进行加药处理。每种试验药物设置 7 个浓度,其浓度变化范围为 $1.57 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,每个样重复 3 次,并使用顺铂作为阳性对照。加药孵育 48 h 后,除去孔中上清液,每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜,缓慢振荡 10 min 使蓝色甲瓚溶解完全,使用多功能酶标仪测定 96 孔板各孔在 490 nm 处的吸光度值,记录并处理分析结果。

1.5.2 AO/EB 双重荧光染色法

将 1×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,培养 24 h 后除去培养基,然后加入新的 RPMI-1640 培养基和一定浓度的试验药物化合物,设置空白组和加药组,孵育 24 h 后除去培养液,用 PBS 清洗 2 次,加入吖啶橙(AO)/溴化乙锭(EB)混合染色液($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AO, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EB)染色,置培养箱中避光作用 15 min 后,再用 PBS 清洗掉细胞表面残留的染色液,使用荧光显微镜观察细胞的形态并进行拍照(全程尽量

避光)。

1.5.3 单细胞凝胶电泳试验

将处于对数期的 Eca-109 细胞接种于 6 孔板中,每孔约 35 万个细胞,置于 5%(V/V) CO_2 培养箱中培养 24 h 后,再加药物化合物并放入培养箱继续培养 24 h。将培养板取出并弃去培养液,用 PBS 冲洗掉残余的培养基和细胞碎片,再加入胰蛋白酶进行消化,待消化完全后加入等量的无血清 RPMI-1640 培养基,以 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心 5 min 后倒掉上清液,然后添加 PBS 至细胞悬浮液浓度约为 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 。

用 PBS 配制 0.5% 正常熔点琼脂糖凝胶(NMA)置于 56°C 水浴中恒温备用,同时用该缓冲液配制 0.5% 和 1.0% 低熔点琼脂糖凝胶(LMA)置于 38°C 水浴中恒温备用。取 $100 \mu\text{L}$ 0.5% 正常熔点琼脂糖凝胶铺于载玻片上并放上盖玻片,置于 4°C 冰箱中冷却 10 min 作为第一层胶;去掉盖玻片,取 $50 \mu\text{L}$ 上述细胞悬浮液与 $50 \mu\text{L}$ 1.0% 低熔点琼脂糖凝胶混合均匀后立即铺于第一层胶上,放上盖玻片并置于冰箱中冷却 10 min;再取 $100 \mu\text{L}$ 0.5% 低熔点琼脂糖凝胶铺于第二层胶上,同样放上盖玻片置于冰箱中冷却 10 min,至此制得三层胶板。将制得的胶板放入 4°C 碱性细胞裂解液中裂解 2 h,紧接着用蒸馏水冲洗掉胶面上的碱性裂解液,再置于电泳槽中电泳 20 min(25 V, 300 mA)。电泳结束后,用冰水清洗胶板 10 min,再用 $20 \mu\text{L}$ EB 溶液($20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)在避光条件下作用 20 min,最后用水清洗胶板后上机进行检测。

1.5.4 线粒体膜电位变化检测

以每孔约 2×10^5 个处于对数期生长的 Eca-109 细胞接种于 12 孔板,置于 5%(V/V) CO_2 培养箱中培养孵育过夜,待细胞贴壁并长至 80% 左右加入相应药物化合物继续孵育。作用 24 h 后,吸弃旧培养液,用 PBS 清洗 2 次,每孔加入 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 荧光探针 JC-1,在 37°C 干燥箱中避光孵育 30 min。最后,用 PBS 清洗并立即上机检测,全程尽量避光。

1.5.5 细胞周期检测

将每孔约 4×10^5 个 Eca-109 细胞接种于 6 孔板,置于 5%(V/V) CO_2 培养箱中培养过夜,再加入一定浓度的药物化合物孵育 24 h。弃掉残余培养液,用 PBS 清洗 2 次后加入 $15 \mu\text{L}$ $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 核糖核酸酶(RNase)和 $15 \mu\text{L}$ $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 碘化丙啶(PI)并避光放置 30 min,最后使用流式细胞仪检测处于各个期的细胞百分数。

2 结果与讨论

2.1 配合物的表征

在配合物红外光谱中, $3\,438\text{ cm}^{-1}$ 处强吸收峰归属于水的 $-\text{OH}$ 伸缩振动; $3\,311$ 和 $3\,149\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰分别归属于 $-\text{NH}_2$ 的不对称伸缩振动和对称伸缩振动; $1\,750\sim 1\,700\text{ cm}^{-1}$ 范围内没有吸收带, 表明甘氨酸根参与了配位^[13]; $1\,612$ 和 $1\,392\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰分别为 $-\text{COO}^-$ 的不对称伸缩振动和对称伸缩振动, 且 $\Delta\nu=\nu_{\text{as}}-\nu_{\text{s}}>200\text{ cm}^{-1}$, 表明甘氨酸根中 $-\text{COO}^-$ 为单齿配位基团; $1\,492\text{ cm}^{-1}$ 处尖锐的吸收峰可归属于芳杂环配体上的 $\text{C}=\text{N}$ 伸缩振动; 625 和 432 cm^{-1} 处的吸收峰可归属于 $\text{Cu}-\text{O}$ 和 $\text{Cu}-\text{N}$ 的伸缩振动^[14]。

在配合物甲醇溶液紫外可见光谱中, 207 和 348 nm 处 2 个较强的吸收峰归属于配体的 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁, 并且与自由配体 HPBM 相关吸收峰相比, 配合物吸收峰均发生了红移 ($202\rightarrow 207\text{ nm}$, $317\rightarrow 348\text{ nm}$), 且吸收强度减弱, 证实了 HPBM 参与配位; 626 nm 处弱而宽的吸收峰归属于中心离子 Cu^{2+} 的 $d\rightarrow d$ 跃迁, 表明配合物分子可能具有变形四方锥结构^[15], 即具有 5 个配位原子。

配合物元素分析结果表明, 实验值与理论计算值一致。而配合物甲醇溶液质谱中存在 $[\text{Cu}(\text{HPBM})(\text{Gly})]^+$ 离子峰, 进一步证实了 HPBM 及 Gly 与 Cu^{2+} 配位。另外, 测得配合物在甲醇溶液的摩尔电导率值为 $104.2\text{ S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$, 表明配合物为 1:1 型电解质^[16], 高氯酸根未参与配位。结合上述配合物紫外可见光谱分析结果, 可推测有一水分子参与配位。

据上述元素分析、红外光谱、紫外可见光谱、质谱及摩尔电导率等测定结果, 并参照类似配合物 $[\text{Cu}(\text{pbt})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ ^[17] 研究结果, 可合理地推测标题配合物分子式为 $[\text{Cu}(\text{HPBM})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$, 可能的分子结构如图所示:

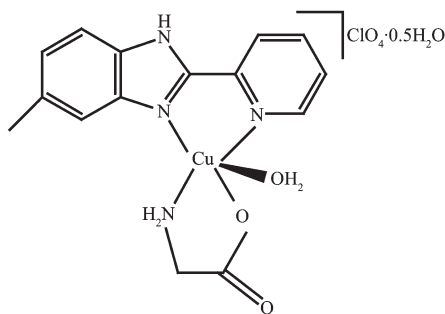


图 1 配合物可能的分子结构

Fig.1 Possible molecular structure of the complex

2.2 配合物与 DNA 的作用

2.2.1 配合物与 DNA 作用的电子吸收光谱

在研究小分子化合物(配合物)与 DNA 的作用中, 电子吸收光谱是最常用的方法之一。可以通过 DNA 滴定过程中配合物电子吸收光谱吸收峰的减色或增色、红移或蓝移等现象初步判断配合物与 DNA 的结合模式。配合物的电子吸收光谱滴定实验如图 2 所示。

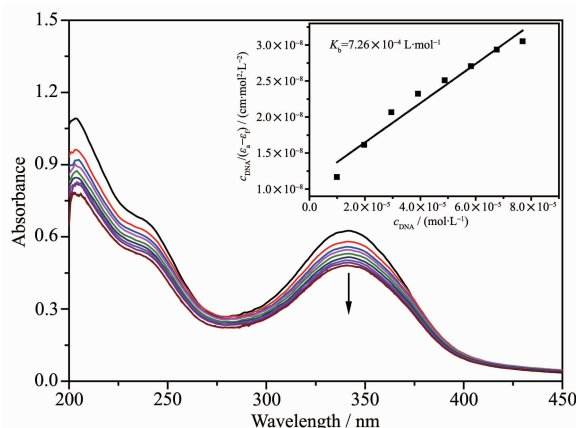


图 2 配合物在不同 CT-DNA 浓度下的电子吸收光谱图

Fig.2 Electronic absorption spectra of the complex upon addition of CT-DNA

结果表明, 随着 CT-DNA 浓度增加(图中箭头指向), 配合物在 342 nm 处具有比较弱的减色性, 最后趋于稳定, 且吸收峰位置未出现明显的移动, 由此推测配合物对 CT-DNA 具有部分插入作用且较弱。此外, 根据滴定过程中配合物光谱吸收带强度的变化, 应用下列方程式可获得配合物与 CT-DNA 的结合常数 K_b ^[18]:

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

式中 c_{DNA} 为 CT-DNA 的浓度, ε_a 、 ε_b 和 ε_f 分别表示 $A_{\text{obs}}/c_{\text{Cu}^{2+}}$ 、与 CT-DNA 完全结合后配合物的摩尔吸光系数及自由配合物的摩尔吸光系数。以 $c_{\text{DNA}}/(\varepsilon_f - \varepsilon_a)$ 对 c_{DNA} 作图, 则斜率与截距的比值为结合常数 K_b 。获得标题配合物与 DNA 的结合常数为 $7.26 \times 10^4\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, 比没有甲基取代的吡啶基苯并咪唑铜(II)配合物 $[\text{Cu}(\text{HPB})(\text{Gly}-L\text{-val})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ 的结合常数 ($3.21 \times 10^5\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$) 小^[19], 这可能主要归因于 HPB 环上引入甲基后产生了空间位阻, 不利于配合物插入到 DNA 碱基对之间。

2.2.2 配合物与 DNA 作用的荧光猝灭

EB 本身没有荧光性质, 但当插入到 DNA 碱基

对中时会产生强烈的荧光。通过将配合物溶液滴加到 DNA-EB 体系之后,测定体系荧光强度的变化并获得配合物的猝灭常数,进而可分析配合物与 DNA 的作用模式。标题配合物对 EB-CT-DNA 体系荧光猝灭作用如图 3 所示。可以看出,随着配合物浓度增加(图中箭头指向),EB-CT-DNA 体系的荧光强度逐渐减弱,表明配合物分子进入碱基对之间将 EB 挤出来并取代了其位置。另外,据 Stern-Volmer 公式^[20]可计算出标题配合物对 EB-CT-DNA 体系的荧光猝灭常数 K_{SV} 值:

$$I_0/I = 1 + K_{SV}r \quad (2)$$

其中 I_0 和 I 分别表示未加入和加入配合物时 EB-DNA 体系的荧光强度, r 为配合物与 DNA 浓度的比值。获得配合物对 EB-CT-DNA 体系的荧光猝灭常数值为 0.116 2,表明二者作用较弱,具有部分插入作用,与以上电子吸收光谱法测定结果一致。

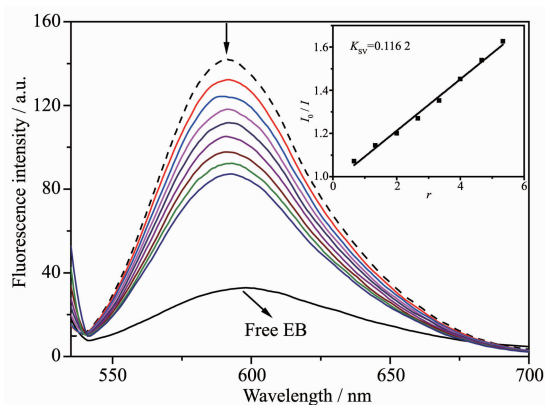


图 3 配合物对 EB-CT-DNA 体系荧光光谱的影响
 Fig.3 Effects of the complex on fluorescence spectra of EB-CT-DNA system

2.2.3 配合物与 DNA 作用的粘度实验

在缺少晶体学结构数据的情况下,粘度测定被认为是检测配合物与 DNA 结合模式最有效的方法^[21]。加入配合物时,若 DNA 溶液粘度无明显变化,表明配合物以静电、沟槽等非插入模式结合;若 DNA 溶液粘度降低,表明配合物以部分插入的模式进行了结合;若 DNA 溶液粘度增大,则说明配合物以经典的插入模式结合。配合物对 CT-DNA 溶液粘度影响如图 4 所示。结果表明,随着配合物的加入,起初 CT-DNA 的粘度下降,但当配合物与 CT-DNA 的比例增加到一定程度(0.05)后粘度基本保持不变,由此推测配合物部分以插入模式作用,而大部分以沟槽结合方式与 CT-DNA 作用,与上述实验结果一致。

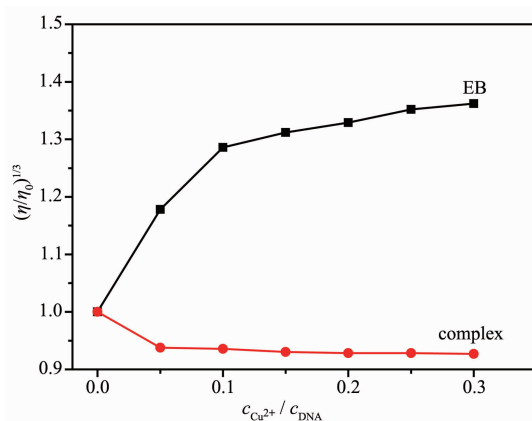
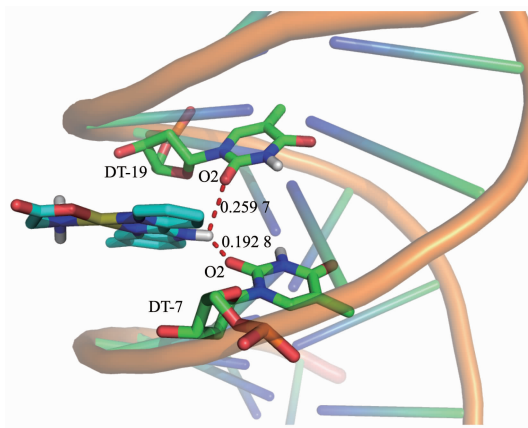


图 4 配合物及 EB 浓度的增加对 CT-DNA 相对粘度的影响
 Fig.4 Effect of increasing amounts of the complex and EB on relative viscosity of CT-DNA

2.2.4 配合物与 DNA 作用的分子对接

由以上实验结果可推断配合物可能主要以沟槽结合方式与 DNA 结合。为进一步验证配合物与 DNA 之间相互作用的模式,我们使用 DNA 分子片段 6BNA(PDB ID:6BNA)进行了分子对接计算。得到的最低能量构象如图 5 所示。结果表明,配合物-DNA 最稳定构象的结合能为 $-36.84 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,配合物结合在 DNA 小沟处,并与邻近的碱基形成氢键(配合物:N4H13...6BNA:DT-19:O2(0.259 7 nm),配合物:N4H13...6BNA:DT-7:O2(0.192 8 nm)),结合模式与上述粘度测量等实验方法获得的结果一致。另外,标题配合物与 DNA 结合的主要驱动力为范德华力,而氢键也是维持配合物与 DNA 复合物稳定性的重要因素。



Hydrogen bonds between the complex and DNA are represented by dashed lines
 图 5 配合物与 DNA(PDB ID: 6BNA)分子对接最优构象
 Fig.5 Molecular docked model of the complex with DNA

2.3 配合物的体外细胞毒性

2.3.1 MTT 实验

以顺铂作为阳性对照,应用 MTT 法测得配合物及配体 HPBM 对所选细胞株 (Eca-109、HeLa 和 A549) 的抑制活性(IC_{50} 值)如表 1 所示。由表 1 可见,配体 HPBM 细胞毒性较弱,但当与铜(II)形成标题配

合物后,其活性显著增强(提高 10~20 倍),并与顺铂相当,表明配体与铜(II)的协同作用对配合物的抗癌活性有重要影响。其中配合物对 Eca-109 细胞最为敏感、抑制作用最强,故以下选用 Eca-109 细胞对配合物的抗肿瘤作用机制进行探究。

表 1 配体及配合物对细胞的 IC_{50} 值

Table 1 IC_{50} values of HPBM and the complex toward selected cell lines

Compound	IC_{50}		
	Eca-109	HeLa	A549
HPBM	127.6±3.3	102.6±2.5	148.9±7.6
Cu(II) complex	6.4±0.2	8.5±0.7	7.3±0.2
Cisplatin	14.7±0.9	7.9±1.4	7.0±0.8

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

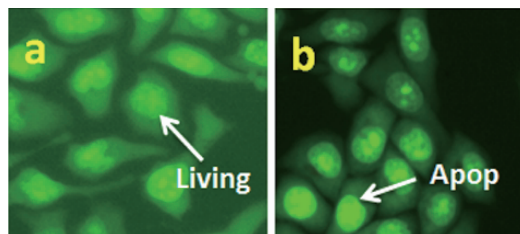
2.3.2 AO/EB 染色法

采用 AO/EB 染色法观察配合物作用后 Eca-109 细胞形态的变化。其中, AO 能分别透过活细胞和死细胞的细胞膜,与 DNA 结合呈现绿色荧光,而 EB 仅能在细胞膜受损时嵌入 DNA 呈现红色荧光。配合物对 Eca-109 细胞的诱导凋亡试验如图 6 所示。结果表明,与空白组实验 a 的细胞形态相比较,在配合

物作用实验 b 中可观察到细胞收缩、细胞质凝结等现象,表明该配合物的加入能够诱导 Eca-109 细胞发生凋亡。

2.3.3 单细胞凝胶电泳结果分析

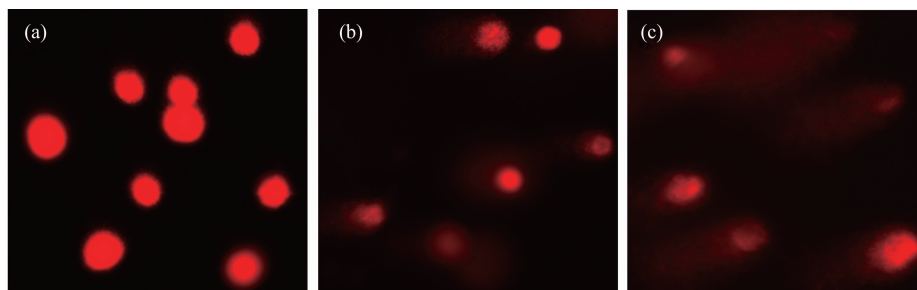
DNA 作为生命的基础分子,其碎片化是细胞凋亡和有丝分裂的重要标志之一^[22]。药物作用于细胞后,通过检测 DNA 的变化,可间接反映药物是否诱导细胞发生凋亡。单细胞凝胶电泳实验是一种在单细胞水平上检测 DNA 损伤的研究方法,因受损的细胞核在电场的作用下向正极移动,形成类似彗星的尾巴,故又称彗星实验。本文用配合物处理 Eca-109 细胞 24 h 后,测得其单细胞凝胶电泳如图 7 所示。从图中可见,对照试验(a)中的 Eca-109 细胞呈球体,而当有配合物作用(b、c)时有彗星拖尾现象,表明配合物的加入使 Eca-109 细胞中的 DNA 碎片化,从而进一步证明了标题配合物能诱导细胞凋亡。并且发现,随着配合物浓度增加(6.25→12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),彗星尾巴增长(b→c),表明配合物浓度越高细胞 DNA



(a) Control, (b) Exposed to $6.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of the complex for 24 h; Eca-109 cells were stained with AO/EB and then imaged under a fluorescence microscope

图 6 配合物对 Eca-109 细胞的凋亡诱导实验

Fig.6 Apoptosis induction experiment of Eca-109 cells by the complex



(a) Control, (b, c) Treated by 6.25 and $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of the complex after 24 h incubation, respectively

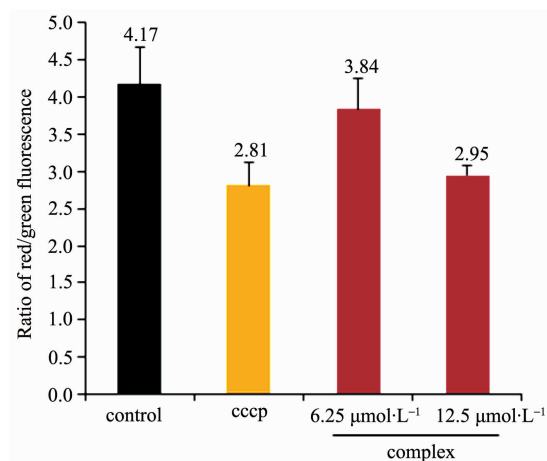
图 7 配合物与 Eca-109 细胞作用的单细胞凝胶电泳图

Fig.7 Single cell gel electrophoresis of Eca-109 cells treated by the complex

的损伤越严重。

2.3.4 线粒体膜电位检测结果分析

文献报道,当线粒体膜电位丧失时,线粒体会通过释放促凋亡因子如细胞色素 c 和凋亡诱导因子进而导致细胞凋亡^[22]。通常 JC-1 作为荧光探针可应用



Ratios of red/green fluorescence were calculated after Eca-109 cells were exposed to cccp (positive control), 6.25 and 12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of the complex for 24 h, respectively

图 8 配合物对 Eca-109 细胞线粒体膜电位影响的变化图

Fig.8 Changes in the effect of the complex on the mitochondrial membrane potential of Eca-109 cells

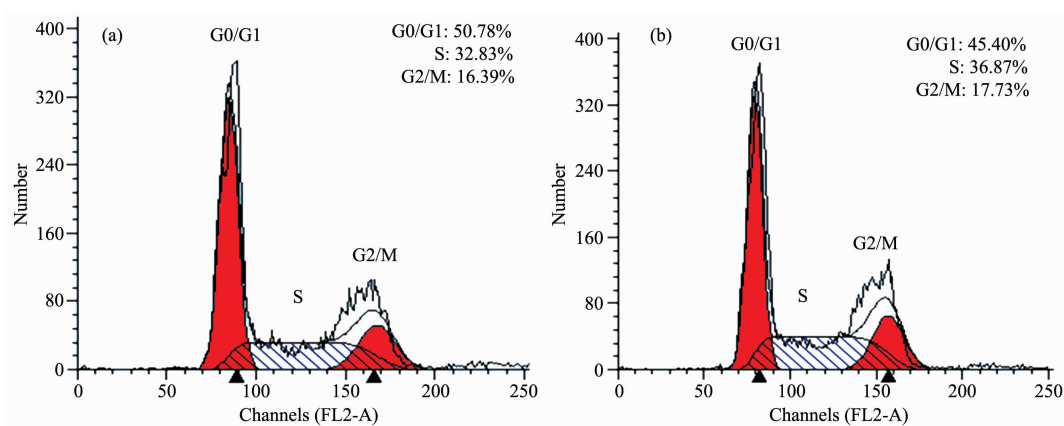


图 9 Eca-109 细胞在对照实验 (a) 及在 6.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 配合物作用后 (b) 的细胞周期分布图

Fig.9 Cell cycle distribution of Eca-109 cells in the control (a) and exposed to 6.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of the complex for 24 h (b)

3 结 论

合成、表征了新的 5-甲基-2-(2'-吡啶基)苯并咪唑的氨基酸铜(II)配合物,并着重研究了配合物与 DNA 结合及其抗肿瘤活性。结果表明,配合物主要通过沟槽结合方式与 DNA 作用,对所选癌细胞具有

于检测线粒体膜电位变化,在线粒体膜电位较高时,JC-1 聚集在线粒体的基质中而形成聚合物,将产生红色荧光;在线粒体膜电位较低时,JC-1 为单体,将产生绿色荧光。因此可通过检测结果计算红色和绿色荧光的比例,进一步分析线粒体膜电位的变化趋势。配合物对 Eca-109 细胞线粒体膜电位的影响如图 8 所示。由图中可见,空白对照中红色和绿色荧光的比例为 4.17,阳性对照(cccp: 羰基氰化物间氯苯胺)中荧光比例为 2.81,而配合物浓度为 6.25 和 12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时荧光比例分别为 3.84 和 2.95。结果表明配合物的加入导致线粒体膜电位丧失,并且配合物浓度越大膜电位丧失越大,从而揭示了标题配合物的抗癌活性与细胞线粒体功能失调有关。

2.3.5 细胞周期结果分析

已有研究发现,经药物作用后,将导致肿瘤细胞周期阻滞,进而 DNA 的合成被阻断而产生抗肿瘤作用^[23]。本文应用流式细胞仪测定了配合物与 Eca-109 细胞作用后细胞的周期分布情况,如图 9 所示。结果表明,在 6.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 配合物作用 24 h 后,Eca-109 细胞 S 期和 G2/M 期分别由对照实验时的 32.83% 和 16.39% 增加到 36.87% 和 17.73%,表明标题配合物能将 Eca-109 细胞阻滞在 S 期和 G2/M 期,其中 S 期增加的细胞较多 (4.04%)。因此,该配合物能使 Eca-109 细胞周期主要阻滞在 S 期。

显著的抑制作用($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),其中对 Eca-109 细胞活性最强。并且以 Eca-109 细胞为研究对象,通过 AO/EB 双染法、单细胞凝胶电泳、线粒体膜电位及细胞周期测定分析,揭示了配合物通过 DNA 结合及线粒体途径诱导细胞凋亡。该研究结果对设计、合成新的铜(II)配合物抗癌药物具有一定参考价值。

参考文献:

- [1] GAO Chao-Ming(高朝明), MENG Fan-Zong(孟繁宗). *Journal of Dezhou Teacher's College*(德州师范学院学报), **1997**,**13**(2): 51-54
- [2] Zhou W, Wang X Y, Hu M, et al. *Chem. Sci.*, **2014**,**5**(7): 2761-2770
- [3] LU Yan-Mei(卢艳梅), LE Xue-Yi(乐学义). *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2011**,**7**(2):199-213
- [4] Tisato F, Marzano C, Porchia M, et al. *Med. Res. Rev.*, **2010**,**30**(4):708-749
- [5] Santini C, Pellei M, Gandin V, et al. *Chem. Rev.*, **2014**,**114**(1):815-862
- [6] Zhang C L, Liu Y X, Zhang X M, et al. *Mater. Sci. Eng. C*, **2018**,**91**:414-425
- [7] Barton J K, Goldberg J M, Kumar C V, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**,**108**(8):2081-2088
- [8] Schiffmann R, Neugebauer A, Klein C D. *J. Med. Chem.*, **2006**,**49**(2):511-522
- [9] Zhang C L, Zhang X M, Liu W, et al. *Appl. Organometal. Chem.*, **2018**,**32**(2):e3994
- [10] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, et al. *J. Comput. Chem.*, **2009**,**30**(16):2785-2791
- [11] Theetharappan M, Subha L, Balakrishnan C, et al. *Appl. Organometal. Chem.*, **2017**,**31**(10):e3713
- [12] Loganathan R, Ganeshpandian M, Bhuvanesh N S P, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2017**,**174**:1-13
- [13] Neelakantan M A, Rusalraj F, Dharmaraja J, et al. *Spectrochim. Acta A*, **2008**,**71**(4):1599-1609
- [14] Tabassum S, Al-Asbahy W M, Afzal M, et al. *Dalton Trans.*, **2012**,**41**(16):4955-4964
- [15] Reddy P R, Raju N, Satyanarayana B. *Chem. Biodivers.*, **2011**,**8**(1):131-144
- [16] Geary W J. *Coord. Chem. Rev.*, **1971**,**7**(1):81-122
- [17] Lu Y M, Chen Y H, Ou Z B, et al. *Chin. J. Chem.*, **2012**,**30**(2):303-310
- [18] Wolfe A, Shimer Jr G H, Meehan T. *Biochemistry*, **1987**,**26**(20):6392-6396
- [19] Gan Q, Zhang C L, Wang B F, et al. *RSC Adv.*, **2016**,**6**(42): 35952-35965
- [20] Lakowicz J R, Weber G. *Biochemistry*, **1973**,**12**(21):4161-4170
- [21] Satyanarayana S, Dabrowiak J C, Chaires J B. *Biochemistry*, **1993**,**32**(10):2573-2584
- [22] Chilin A, Dodoni G, Frezza C, et al. *J. Med. Chem.*, **2005**,**48**(1):192-199
- [23] Zou H H, Wang L, Long Z X, et al. *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**,**108**:1-12