

靶向端粒 G-四链体手性钆配合物的 抗肿瘤活性研究*

黄竹娟, 苏宁, 吴绍锋, 林锐珊, 郭建超, 张小年
(广州中医药大学, 广州 510006)

摘要: [目的] 研究手性钆配合物 Λ -[Ru(bpy)₂(pyip)]²⁺(Λ -OMe)、 Δ -[Ru(bpy)₂(pyip)]²⁺(Δ -OMe)及其外消旋化合物[Ru(phen)₂p-MOPIP]²⁺(dl-OMe)在体外实验中的抗肿瘤活性。[方法] 3种配合物分别作用于人胃癌细胞株(MGC-803),人结肠癌细胞株(Colo205),人乳腺癌细胞株(MCF-7),人肺腺癌上皮细胞株(A549),人肝癌细胞株(HepG2),人舌鳞状细胞癌株(SCC-9)48 h,以人胃黏膜上皮细胞株(GES-1)为正常对照细胞株,顺铂为阳性对照药物,四甲基偶氮唑蓝(MTT)法筛选出其中半抑制浓度(IC₅₀)最小的药物和药敏作用最好的肿瘤细胞。筛选出药物和肿瘤细胞后,再用MTT法测定24、48、72 h相应药物对肿瘤细胞的抑制作用;Hoechst33342染色法测定其对肿瘤细胞的凋亡诱导作用。[结果] MTT法筛选出 Λ -OMe对胃癌MGC-803细胞的增殖抑制作用最好,即(IC₅₀)最小,在作用48 h的半数抑制浓度为:7.4 mg/L,且呈现很好的时间和剂量依赖性。Hoechst33342染色显示,在药物处理48 h后,随着药物浓度增加,药物促凋亡作用越明显。[结论] 手性钆配合物具有良好的抗肿瘤活性,其中以 Λ -OMe抗肿瘤活性最好。

关键词: 手性钆配合物 Λ -OMe;人胃癌细胞株(MGC-803);抗肿瘤活性

中图分类号: R730.7

文献标志码: A

文章编号: 1673-9043(2016)02-0109-05

近年来肿瘤的发病率越来越高,中医药常以配合化疗以增效减毒、提高机体免疫力以预防肿瘤复发与转移,或者用于治疗缺乏有效治疗手段的中晚期肿瘤等的辅助治疗方式出现,而中医药单用治疗肿瘤的规律还处在摸索与总结阶段。自从1969年顺铂被发现具有抗肿瘤活性以来,金属配合物研究引发了人们的广泛关注。目前国际上大多数研究报告认为非铂类配合物中的钆配合物具有低毒性、易吸收并可很快被排泄,且具有易于被肿瘤组织吸收的特点^[1-3]。因此,钆配合物已被公认为是一类活性强的新型抗肿瘤药物,钆配合物的合成及其生物活性已经成了国内外的研究热点^[4-7]。手性钆配合物与DNA相互作用的研究始于美国科学家Barton和瑞典科学家Norden^[8-9]。Mei等^[10]的研究进一步证实手性钆(II)金属配合物与DNA的作用存在手性选择性,并且 Λ -异构体与DNA的结合速率更快,在肿瘤的化疗、DNA的结构探针等领域具有潜在的

应用前景^[11]。而刘亚楠、Shi等^[12-13]研究证实手性钆(II)金属配合物对端粒末端形成G-四链体具有高选择性。这种在端粒末端形成的G-四链体结构能够抑制端粒的复制,阻断端粒延伸,进而达到抑制肿瘤细胞增殖或促进其凋亡的目的。Sun等^[14]在化学分子水平的研究表明,甲氧基的手性钆配合物 Δ/Λ -[Ru(phen)₂p-MOPIP]²⁺(Δ/Λ -OMe)能选择性诱导人体端粒形成G4-DNA结构并稳定该结构,说明了其在抗肿瘤活性中的潜在价值。且进一步研究表明其与G-四链体的作用存在明显的选择性,左旋异构体稳定G-四链体能力远远强于右旋异构体,但此项研究未进行体外实验。基于以上研究,本文从体外实验来验证 Δ/Λ -OMe及其消旋体dl-OMe的抗肿瘤活性以及凋亡诱导作用。

1 实验部分

1.1 肿瘤细胞、药物来源,实验菌株 人胃癌细胞株(MGC-803),人结肠癌细胞株(Colo205),人乳腺癌细胞株(MCF-7),人肺腺癌上皮细胞株(A549),人肝癌细胞株(HepG2),人舌鳞状细胞癌株(SCC-9),人胃黏膜上皮细胞株(GES-1)均来源于暨南大学医学院实验中心,顺铂(CDDP)(美国Sigma公司),

* 基金项目:广州中医药大学优秀青年学者科研基金项目。

作者简介:黄竹娟(1989-),女,硕士研究生,研究方向为中医药防治免疫相关性疾病。

通讯作者:张小年,E-mail: shezxn84@gzucm.edu.cn。

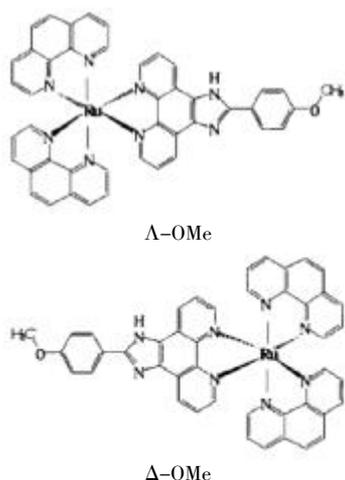


图1 手性钌配合物的结构图

手性钌配合物(Λ -OMe、 Δ -OMe)及其消旋体 dl-OMe 来源于暨南大学生命科学学院刘杰教授。

1.2 试剂和仪器 RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司);DMEM 培养液(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司);二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司);Hoechst33342 染色液(南京凯基生物技术有限公司);680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);BNA-3210 型二氧化碳(CO_2)培养箱(日本 Espec 公司);IX71-F22FL/PH 型荧光倒置显微镜及图像采集系统(日本 Olympus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 (人胃癌细胞株(MGC-803),人结肠癌细胞株(Colo205),人乳腺癌细胞株(MCF-7),人肺腺癌上皮细胞株(A549),人肝癌细胞株(HepG2),人舌鳞状细胞癌株(SCC-9))培养于含 10%胎牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养液中,人胃黏膜上皮细胞株(GES-1)培养于含 10%胎牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养液中,细胞在相对湿度为 95%、 37°C 、5% CO_2 的环境中单层生长,取对数生长期细胞用于实验。

1.3.2 抗肿瘤活性实验

1.3.2.1 MTT 筛选敏感细胞株及药物 按 MTT 法^[15],即取对数生长期的肿瘤细胞消化、计数,调整细胞密度,取每孔 3 000~5 000 铺于 96 孔板中,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 Λ -OMe、 Δ -OMe、dl-OMe 100 μL (使培养液的药物终浓度为 2.5、5、10、20、40、80 mg/L),阴

性对照为等体积培养液,阳性对照为顺铂,加样组和对照组均设 3 个复孔,置 37°C 、5% CO_2 培养。在药物处理 48 h 后每孔加入 20 μL MTT(5 g/L),在 37°C 、5% CO_2 的环境中继续培养 4 h 后,弃去上清液,加入 DMSO 每孔 150 μL ,振荡 10 min 左右,于酶标仪 570 nm 波长处测吸光值 A 值,计算细胞存活率,通过软件计算其半数抑制浓度(IC_{50})。

1.3.2.2 MTT 检测 Λ -OMe 对 MGC-803 细胞的抑制作用 按四甲基偶氮唑蓝(MTT)法,即取对数生长期的细胞消化、计数,调整细胞密度,取 3 000~5 000/孔铺于 96 孔板中,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 (使培养液的药物终浓度为 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$),阴性对照为等体积培养液,加样组和对照组均设 3 个复孔,置 37°C 、5% CO_2 培养。在药物处理 24、48、72 h 后收集细胞,每孔加入 20 μL MTT(5 mg/mL),在 37°C 、5% CO_2 的环境中继续培养 4 h 后,弃去上清液,加入 DMSO 每孔 150 μL ,振荡 10 min 左右,于酶标仪 570 nm 波长处测吸光值,计算肿瘤生长抑制率。肿瘤细胞抑制率($\%$)=(1-加药组细胞 A 值/对照组细胞 A 值) $\times 100\%$ 。

1.3.2.3 细胞凋亡实验 取洁净盖玻片在 70%乙醇中浸泡 5 min 或更长时间,用无菌的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 遍,再用细胞培养液洗涤 1 遍。将盖玻片置于 6 孔板内,种入细胞培养过夜,使约为 50%~80%。各浓度药物处理细胞 48 h,吸尽培养液,加入 0.5 mL 含 4%多聚甲醛或 70%乙醇的固定液,固定 10 min 或更长时间(可 4°C 过夜)。去固定液,用 PBS 洗两遍,每次 3 min,吸尽液体。洗涤时用摇床彻底清洗。加入 1 mL 10 mg/L 的 Hoechst33342 染色液, 37°C 染色 15 min。去染色液,用 PBS 洗两遍,每次 3 min,吸尽液体。滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上,将贴有细胞的盖玻片小心盖在载玻片上,让细胞接触封片液,尽量避免气泡。荧光显微镜下用紫外光激发,可检测到呈蓝色的细胞核,根据细胞核形态是否聚缩高亮度来判断细胞凋亡情况。

2 结果

2.1 手性钌配合物的抗肿瘤活性

2.1.1 MTT 筛选结果 采用 MTT 法评价手性钌配合物 Λ -OMe、 Δ -OMe、dl-OMe 及 CDDP 的体外抗肿瘤活性,配合物对肿瘤细胞及正常人胃黏膜上皮细胞的半数抑制浓度 IC_{50} (mg/L)见表 1 所示,如最高测试浓度下抑制率仍小于 50%的, IC_{50} 以 >100 表

示。从表 1 可以看出,两个异构体及外消旋体对所测试的肿瘤细胞株均表现出一定的细胞毒性,且两个异构体相比其外消旋体表现出了更为优异的抗肿瘤活性,其中配合物 Λ -OMe 对 MGC-803 细胞的抑制作用明显高于 Δ -OMe、dl-OMe。这些结果显示钆配合物对肿瘤细胞具有一定的选择性,其中 Λ -OMe 对 MGC-803 胃癌细胞的化学预防作用最佳。

表 1 钆配合物对不同肿瘤细胞的抑制作用($\bar{x}\pm s$)

化合物	IC ₅₀ (mg/L)						
	MGC-803	Colo205	MCF-7	A549	HepG2	SCC-9	GES-1
Λ -OMe(1)	7.4±1.8	35.3±4.3	21.8±3.1	33.4±3.6	42.3±3.9	33.2±2.7	>100
dl-OMe(2)	47.1±4.8	74.2±8.3	>100	>100	>100	>100	>100
Δ -OMe(3)	21.3±3.4	20.6±3.7	32.2±4.2	16.4±2.3	>100	22.7±3.2	78.0±9.1
CDDP	6.8±1.5	18.6±2.1	12.4±1.7	13.6±1.8	19.8±3.6	15.9±2.6	20.3±1.9

2.1.2 MTT 检测 Λ -OMe 对 MGC-803 细胞的抑制作用的结果 进一步用 MTT 检测 Λ -OMe 对 MGC-803 细胞生长的抑制作用,发现其增殖抑制作用具有良好的时间和剂量依赖性。其结果见表 2 和图 2,由实验数据可知,在相同时间内,随着药物浓度的增加,抑制率增加;而同一药物浓度,抑制率随作用时间的延长而增加。

表 2 钆配合物(Λ -OMe)对 MGC-803 细胞的抑制作用

Λ -OMe (mg/L)	抑制率(%)		
	24 h	48 h	72 h
2.5	16	32	57
5.0	22	47	62
10.0	25	53	68
20.0	32	54	86
40.0	64	85	96
80.0	79	93	96

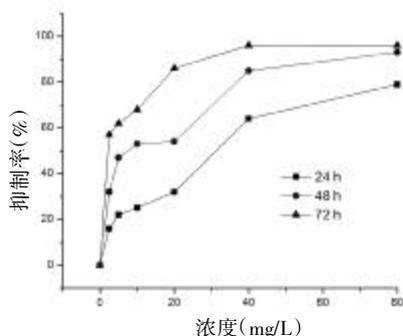


图 2 不同浓度的 Λ -OMe 处理细胞 24、48、72 h 后的细胞抑制率

2.2 Λ -OMe 对胃癌 MGC-803 细胞形态的影响 MGC803 细胞经不同浓度的配合物 Λ 处理 48 h 后,

用倒置显微镜拍得形态学特点如图 3 所示,其中 A: 0 μ g/mL; B: 5 μ g/mL; C: 10 μ g/mL; D: 20 μ g/mL。根据药物的不同浓度变化, MGC-803 细胞的数目和形态都发生了显著的变化。随着浓度增加,细胞数量减少,细胞间间隙增宽,漂浮细胞增多,形态从圆形变长梭形、三角形等不规则形状。

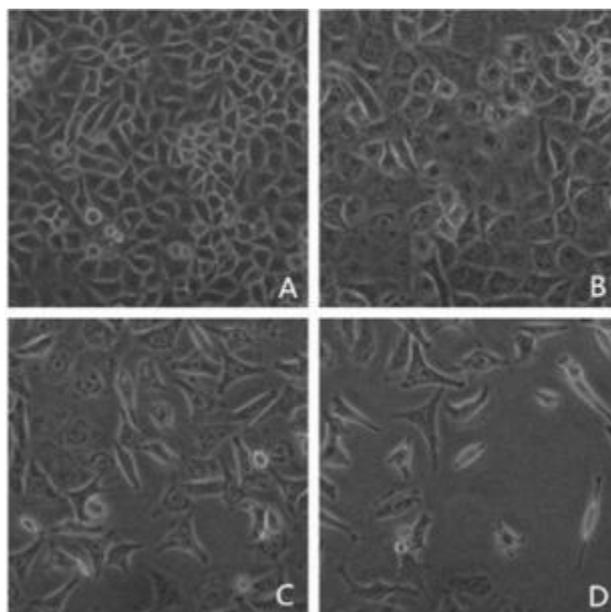


图 3 光镜下观察 Λ -OMe 诱导 MGC-803 细胞凋亡

2.3 Λ -OMe 对 MGC-803 细胞凋亡的影响 Hoechst33342 对于细胞核染色质的形态学改变也是检测细胞凋亡的一个重要方法。为了验证配合物 Λ 对胃癌 MGC-803 的凋亡诱导作用,采用 Hoechst33342 染色,在荧光显微镜下观察细胞核染色质的形态学改变,观察结果表明,对照组胃癌 MGC-803 其细胞核呈现弥散、均匀的荧光。加入配合物 Λ 后,胃癌 MGC-803 细胞的核染色质高度凝聚、边缘化,核内的荧光亮度增加,并且有不规则的核裂解现象,这种现象随着浓度的增加越来越明显,见图 4。

3 讨论

中医药对消化道肿瘤的治疗,主要以扶正固本、清热解毒、活血化瘀、消痰散结等方式,但现代临床治疗多配合以放化疗或介入,且均有相应的实验证明^[6],这些治疗方法能提高机体免疫力,抑制肿瘤的生长和转移。在化疗药物的使用中,相对于其他金属配合物而言,手性钆配合物还具有丰富的光谱性质以及优异的抗菌、抗肿瘤等生物活性^[17-20]。在肿瘤的治疗过程中,使用化疗药物无可避免要关注其毒副作用,手性钆配合物 Λ/Δ -OMe 与端粒 DNA

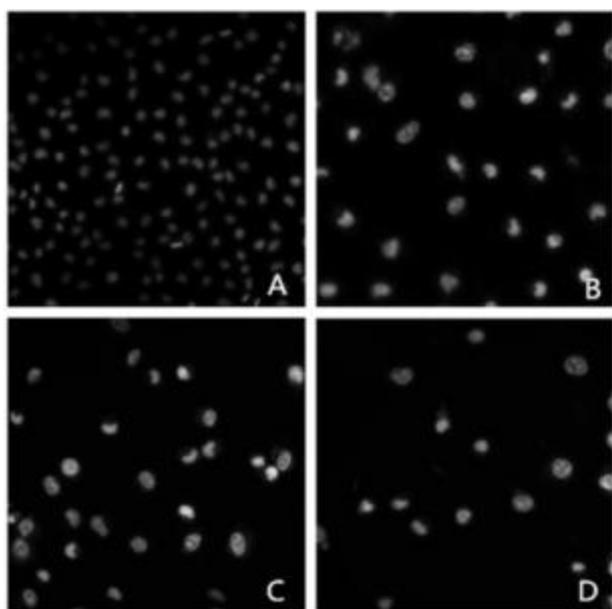


图4 荧光显微镜下观察 Λ -OMe 诱导 MGC-803 细胞凋亡

的相互作用并诱导其形成 G-四链体使得该类配合物在抗肿瘤方面具有了靶向性的潜在优势。笔者实验研究表明 Λ -OMe 具有良好的抗肿瘤活性, 其对 MGC-803 细胞的增殖抑制能力在一定程度上强于顺铂, 且对正常人胃黏膜上皮细胞的毒性很低, 进一步研究表明其对胃癌 MGC-803 细胞的增殖抑制作用可能是通过诱导凋亡实现。鉴于手性钌配合物独特的结构和理化性质, 为手性钌配合物结构优化和生物活性的作用机制以及临床开发应用提供了理论依据。但是其具体的抗肿瘤机制还待进一步研究。而且此类手性钌配合物是否能与中医药配合使用也待进一步研究。

参考文献:

[1] Cailleaux S, LoPes -Martins RA, Aimbire F, et al. Involvement of Platelet-activating factor in the modulation of vaseular tone in the isolated perfused rabbit kidney [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1999,359(6):505-511.

[2] Mendoza-Ferri MG, Hartinger CG, Mendoza MA, et al. Transferring the concept of multinuclearity to ruthenium complexes for improvement of anticancer activity [J]. Med Chem, 2009,52(4):916-925.

[3] Heffeter P, Jungwirth U, Jakupcic M, et al. Resistance against a novel anticancer metal complex: differences and similarities [J]. Drug Resist Updat, 2008,11(1-2):1-16.

[4] 张小年, 刘亚楠, 杨晓新, 等. 钌配合物诱导肿瘤细胞凋亡的信号通路及其作用机制 [J]. 化学进展, 2011,21(5):983-990.

[5] Stevens SK, Strehle AP, Miller RL, et al. The anticancer ruthenium complex KP1019 induces DNA damage, leading to cell cycle delay and cell death in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Molecular Pharmacology, 2013,83(1):225-234.

[6] Chakree K, Ovatlamporn C, Dyson PJ, et al. Altered DNA Binding and Amplification of Human Breast Cancer Suppressor Gene BRCA1 Induced by a Novel Antitumor Compound, [Ru(η^6 -p-phenylethacrylate)Cl₂(pta)] [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012,13(10): 13183-13202.

[7] Heffeter P, Atil B, Kryeziu K, et al. The ruthenium compound KP1339 potentiates the anticancer activity of sorafenib in vitro and in vivo [J]. European Journal of Cancer, 2013,49(15): 3366-3375.

[8] Rehmann JP, Barton JK. Proton NMR studies of tris(phenanthroline) metal complexes bound to oligonucleotides: characterization of binding modes [J]. Biochemistry, 1990, 29, 1701-1709.

[9] Eriksson MM, Leijon M, Hiort C, et al. Minor groove binding of [Ru(phen)₃]²⁺ to [d(CGCGATCGCG)]₂ evidenced by two-dimensional NMR [J]. J. Am. Chem. Soc, 1992,114: 493-494.

[10] Mei WJ, Liu J, Zheng KC, et al. Experimental and theoretical study on DNA-binding and photocleavage properties of chiral complexes Δ - and Λ -[Ru(bpy)₂L](L = o-hpip, m-hpip and p-hpip) [J]. Dalton Trans, 2003,32(7): 1352-1359.

[11] Kumar CV, Barton JK, Turro N J. Photophysics of ruthenium complexes bound to double helical DNA [J]. J Am Chem Soc, 1985,107: 5518-5520.

[12] 刘亚楠, 杨芳, 梅文杰, 等. 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 [J]. 高等学校化学学报, 2010,31(3):435-441.

[13] Shi S, Geng XT, Zhao J, et al. Interaction of [Ru(bpy)₂(dp-pz)]²⁺ with human telomeric DNA: Preferential binding to G-quadruplexes over i-motif [J]. Biochimie, 2010,92:370-377.

[14] Sun D, Liu Y, Liu D, et al. Stabilization of G-quadruplex DNA, inhibition of telomerase activity and live cell imaging studies of chiral ruthenium(II) complexes [J]. Chemistry, 2012, 18(14):4285-4295.

[15] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. Immunol Methods, 1983,65:55-58.

[16] 宋恩峰, 张珏. 消化道肿瘤的中医药治疗进展 [C]. 中国中西医结合学会肿瘤专业委员会第三届国际中医、中西医结合肿瘤学术交流大会暨第十二届全国中西医结合肿瘤学术大会, 2010:4.

- [17] Pahontu E, Julea F, Rosu T, et al. Antibacterial, antifungal and in vitro antileukaemia activity of metal complexes with thiosemicarbazones[J]. Cell Mol Med, 2015, 19(4):865-878.
- [18] Nitha LP, Aswathy R, Mathews NE, et al. Synthesis, spectroscopic characterisation, DNA cleavage, superoxidase dismutase activity and antibacterial properties of some transition metal complexes of a novel bidentate Schiff base derived from isatin and 2-aminopyrimidine[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2014, 118:154-161.
- [19] Sun D, Zhang W, Lv M, et al. Antibacterial activity of ruthenium(II) polypyridyl complex manipulated by membrane permeability and cell morphology[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25 (10):2068-2073.
- [20] Malipeddi M, Lakhani C, Chhabra M, et al. An efficient synthesis and in vitro antibacterial evaluation of ruthenium-quinolinol complexes[J]. Bioorg Med Chem, 2015, 25(15): 2892-2896.
- (收稿日期:2015-11-21)

Anti-tumor activities research of chiral ruthenium to targeted telomeres G-quadruplex

HUANG Zhu-Juan, SU Ning, WU Shao-feng, LIN Rui-shan, GUO Jian-chao, ZHANG Xiao-nian
(Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006)

Abstract: [Objective] Study on anti-tumor activities research of a pair of chiral ruthenium complexes Λ -[Ru(bpy)₂(pyip)]²⁺(Λ -OMe)、 Δ -[Ru(bpy)₂(pyip)]²⁺(Δ -OMe) and their racemic mixture [Ru(phen)₂p-MOPIP]²⁺(dl-OMe) in vitro experiments. [Methods] Three complexes were acting 48 hours on human gastric cancer cell line (MGC-803), human colon cancer cell lines (Colo205), human breast cancer cell line (MCF-7), human lung adenocarcinoma epithelial cell line (A549), human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2), human tongue squamous cell carcinoma lines (SCC-9), human gastric epithelial cell line (GES-1) and cisplatin (CDDP) is a positive control. And then find the drug and tumor cells which half inhibitory concentration (IC₅₀) was the smallest by MTT assay. Second, Detect the drug's inhibitory effect on tumor cells after drug treatment 24、48、72 hours. Third, induced apoptosis of gastric cancer cells with Hoechst33342 staining. [Results] The best anti-tumor effects drug and cell is chiral ruthenium complexes Λ -[Ru(phen)₂p-MOPIP]²⁺(Λ -OMe) and MGC-803 with MTT assay. The IC₅₀ is: 7.4 μ g/mL at 48 hours. The tested compound induces cell death in a dose and time dependent manner on MGC-803 cells; Hoechst33342 staining showed that with the increase of drug concentration, more obvious of apoptosis after 48 hours drug treatment. [Conclusion] Chiral ruthenium complexes have good anti-tumor activity and the Λ -OMe have significant anti-tumor activities.

Key words: chiral ruthenium complexes Λ -[Ru(phen)₂p-MOPIP]²⁺(Λ -OMe); Human gastric cancer cell line MGC-803; anti-tumor activity