

· 药理实验与临床观察 ·

甘草酸苯胺铂配合物的结构和理化特性
及其抗肿瘤细胞活性的研究

张 静, 孙润广*, 齐 浩

(陕西师范大学 食品工程系, 陕西 西安 710062)

摘要: 目的 对合成的 3 种甘草酸苯胺铂配合物的结构、理化特性以及抗癌活性进行研究。方法 采用红外光谱和元素分析及 X 衍射对其结构、理化特性进行分析。实验选用黑色素瘤 (LiBr), 白血病细胞 K₅₆₂, 肝癌 (7721) 细胞作为体外抗癌活性的模型, 用 MTT 法对其抗癌活性进行了研究。结果 元素分析结果和理论计算一致。红外光谱结果表明官能团配位与结构相符。X 射线衍射分析表示该类化合物均属斜方晶系。结论 抗癌活性与浓度以及甘草酸苯胺铂配体密切相关。磁场处理的甘草酸苯胺铂配合物对抑制肿瘤细胞的活性有明显的影。

关键词: 甘草酸苯胺铂配合物; 抗癌活性; 磁场强度

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)11-1002-04

Studies on structure, physicochemical properties and anticancer activity
of glycyrrhizic acid aniline-platinum complex compounds

ZHANG Jing, SUN Run-guang, QI Hao

(Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: **Object** To investigate the structure, physicochemical properties and anticancer activity of three kind of glycyrrhizic acid aniline-platinum complex compounds. **Methods** Using the FT-IR methods, elementary analysis and X-ray diffraction, the physicochemical properties of the tested drugs were determined; by means of MTT test the inhibitory effects of the drugs on human tumor cell growth were examined, with hematopoietic cell K₅₆₂, melanoma cell LiBr and liver cancer cell 7721 as the model of anticancer activity. **Results** Experimental values of elemental analysis of three complex compounds tally with the theoretically calculative values. The infrared spectroscopy showed that the functional group location agreed with the structure. The X-ray diffraction exhibited that this type of the compounds was monoclinic system. **Conclusion** The experimental results show that the anticancer activity of the test complex compounds is related to their concentration and ligands. Magnetic field treatment has significant influence on anticancer activity of this type of compounds.

Key words: glycyrrhizic acid aniline-platinum complex compounds; anticancer activity; intensity of magnetic field

铂类抗癌新药目前面临着理论、技术及思路的更新^[1~6]。甘草是传统的常用中药, 具有多种药理功能。甘草酸 (glycyrrhizic acid) 是甘草的最主要药理活性成分, 具有解毒、消炎、抗氧化、抗过敏、抗肿瘤以及增强免疫等多种药理作用^[7~9]。铂类药物与甘草酸都具有较强的抗肿瘤活性和抗病毒作用, 如果用具有多种重要药理功能的甘草酸来代替某些化学复合物, 这无论从降低铂类药物的毒性, 还是从改善

肿瘤患者体内新陈代谢的平衡来看都是十分有意义的工作。本实验选用甘草酸替代其他化学复合物, 合成了 3 种甘草酸苯胺铂配合物, 并对其结构和抗癌活性做了研究。

1 材料与方法

1.1 几种甘草酸苯胺铂类配合物的合成: 采用改进后的 Dhare 方法, 合成了几种甘草酸苯胺铂配合物: 甘草酸苯胺合铂, 甘草酸对苯二胺合铂, 甘草酸

* 收稿日期: 2002-02-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29672024); 高等学校骨干教师资助计划项目 (教技司[2000]65号)

作者简介: 张 静 (1959-), 女, 陕西西安人, 副教授, 从事天然药物化学研究。中国化学学会会员, 西安市新长征突击手, 共承担了国家自然科学基金等科研项目 9 项, 完成国家科技成果 1 项, 发表论文 30 余篇。E-mail: zhangjin@snnu.edu.cn

* 通讯作者: 710062 西安陕西师范大学 27-3-18 信箱, E-mail: sunrun@pub.xaonline.com

邻苯二胺合铂。

1.2 仪器

1.2.1 红外光谱及元素分析数据测定: 美国麦巨公司制造的 PK-8000 傅里叶变换红外分光光度计。测试条件: 灵敏度为 4 cm⁻¹; 扫描速度为 16 cm⁻¹/min。美国 PE 公司造的 PE2400 元素分析仪。

1.2.2 X 射线衍射图谱及数据测定: X 射线衍射图谱及数据在日本理学公司制造的 D/max-C 全自动 X 射线衍射仪上测定。测试条件: CuK α 辐射; Ni 滤波片; 管压: 40 kV; 管流: 40 mA; 散射狭缝 (DS): 1 $^{\circ}$; 接收狭缝 (RS): 0.15 mm; 防散射狭缝 (SS): 1 $^{\circ}$; 扫描速度: 2 $^{\circ}$ /min; 测试在大气室温进行。

1.3 细胞及培养: 试验选用黑色素瘤 (LiBr) 作为外胚层模型, 白血病细胞 K₅₆₂作为中胚层模型, 肝癌 (7721) 作为内胚层模型。上述几种细胞, 在 RPMI 1640 (Gibco) + 10% 小牛血清培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ 、5% CO₂及饱和水蒸汽的 CO₂ 培养箱中培育。

1.4 MTT (噻唑蓝) 测试: 对上述几种铂类化合物做了体外抗癌活性实验。分别取对数生长的黑色素瘤 (LiBr)、肝癌细胞和 K₅₆₂细胞, Hanks 液洗涤、离心并用培养基 (RPMI 1640+ 10% 小牛血清) 调整细胞密度为 1 $\times$ 10⁶/mL; 用 96 孔板, 每孔接种细胞 0.1 mL, 每种药物分 5 个浓度: 4, 5, 10, 15, 20 μ g/mL。每一浓度接种 4 个重复孔; 加入药物后, 将 96 孔板置 37 $^{\circ}$ 、5% CO₂及饱和水蒸汽的 CO₂培养箱培育 4~6 h 后, 小心弃去上清液, 加入 0.1 mL 二甲基亚砷, 用于 MTT 测试。在 DG3022 酶联免疫检测仪上检测吸光度 (A) 值, 计算细胞生长抑制率。

细胞生长抑制率 (%) = (空白对照 A 值 - 给药组 A 值) / 空白对照 A 值 $\times$ 100%

1.5 磁场和药物与癌细胞相互作用: 分别选用 38, 76 和 90 Gs 3 个强度的磁场对配合物进行处理, 然后分别与黑色素瘤 (LiBr)、肝癌细胞和 K₅₆₂细胞作用。

2 实验结果

2.1 3 种甘草酸苯胺铂类配合物的结构、理化特性

2.1.1 配合物的元素分析: 3 种甘草酸苯胺铂类配合物的元素分析列入表 1。

表 1 配合物的元素分析

编号	配合物	实验值 (%)		
		C	N	H
1	甘草酸苯胺合铂	53.54	1.60	6.27
2	甘草酸对苯二胺合铂	51.64	1.51	6.28
3	甘草酸邻苯二胺合铂	51.65	1.50	6.27

2.1.2 配合物的红外分析: 3 种甘草酸苯胺铂类配合物的红外光谱主要吸收峰按文献^[10, 11]归属见表 2。

因为所合成的 3 种配合物为同系物, 官能团相同, 所以光谱极为相似, 在 2 950 cm⁻¹均为强的 NH₂伸缩振动峰 ν (NH₂), ν (NH₂) 其值比游离氨分子的波数值低 200~300 cm⁻¹, 在 1 650 cm⁻¹为 NH₂的弯曲振动峰 δ (NH₂), 比相应的游离氨分子低 10~90 cm⁻¹。这两组吸收峰表明配合物中苯胺分子与铂原子配位, 由于配位效应的影响使伸缩振动峰 ν (NH₂) 和弯曲振动峰 δ (NH₂) 值均向低频方向移动。在 550 cm⁻¹左右出现一弱峰, 属于苯胺分子与铂原子配位的特征峰。与甘草酸的红外光谱相比, 甘草酸苯胺铂配合物、甘草酸对苯二胺铂配合物和甘草酸邻苯二胺铂配合物, 在 1 700 cm⁻¹附近出现 $\nu_{C=O}$ 峰, 比相应的甘草酸的羧酸 $\nu_{C=O}$ 峰向低频方向移动 50 cm⁻¹波数, 表明在这 3 种甘草酸苯胺铂配合物中, 甘草酸的羧酸氧与铂原子配位。因此, 在 1 700 cm⁻¹附近出现 1 650 cm⁻¹的 $\nu_{C=O}$ 峰, 属于甘草酸分子与铂原子配位的特征峰。

表 2 甘草酸苯胺铂配合物的红外光谱吸收峰的归属 (cm⁻¹)

化合物	ν O-H	ν NH ₂	ν C-H	ν C=O	ν C-O	ν Pl-O	ν Pl-H
甘草酸	3 500		2 920, 2 860	1 700	1 400		
甘草酸苯胺合铂	3 500	3 400	2 920, 2 860	1 650	1 390	680	550
甘草酸对苯二胺合铂	3 500	3 400	2 920, 2 860	1 650	1 390	680	550
甘草酸邻苯二胺合铂	3 500	3 400	2 920, 2 860	1 650	1 390	680	550

2.1.3 配合物的 X 衍射分析: 对于衍射峰少, 强度普遍较强, 且 d^2/d^2 是一些整数, 或 1, 1.33, 2.67,, 这样的晶体必定属于立方晶系。其次, 在衍射峰值 $1/d^2$ 的数值中, 有某些数值的比值是 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9,, 大都属于四方晶系。第三, 在衍射峰值 $1/d^2$ 的数值中, 有某些数值的比值是 1, 3, 4, 7, 9, 12,, 大都属于六方晶系。凡是不属于上述 3 种情况, 一般是属于低级晶系。若能用 $\Delta\theta$ 值的方法进行指标化, 则它一定是斜方晶系。将实测的 $1/d^2$ 值和计算的 $1/d^2_{(hkl)}$ 值进行比较, 给出各衍射峰的衍射指数, X 射线衍射结果表明, 甘草酸苯胺(胺) 铂配合物均属斜方晶系。晶胞参数为 a、b、c, $A = a/b$, $C = c/b$, 见表 3。

表 3 铂类配合物的晶格常数 (nm)

配合物	a	b	c	A	C	Z
甘草酸苯胺合铂	2.673 0	1.796 0	3.015 0	1.488 3	1.678 7	4
甘草酸对苯二胺合铂	2.500 0	0.376 6	0.330 4	6.638 3	0.877 3	4
甘草酸邻苯二胺合铂	1.302 0	0.877 0	0.801 0	1.484 6	0.913 3	4

2.2 3 种甘草酸苯胺铂配合物对肿瘤细胞生长的抑制作用: 甘草酸苯胺铂、甘草酸对苯二胺铂和甘草酸邻苯二胺铂对黑色素瘤细胞、肝癌细胞和白血病细胞的杀伤作用与浓度以及甘草酸苯胺配体密切相

关,见表 4。随着药物的浓度增大对肿瘤细胞杀伤作用增强,而不同类型的肿瘤细胞的杀伤作用明显不同。甘草酸苯胺铂配体对肿瘤细胞生长抑制的协同

作用表明,不同的苯胺配体,对同类型肿瘤细胞的杀伤作用不同,对不同类型的肿瘤细胞的杀伤作用也各异。

表 4 浓度梯度对甘草酸苯胺铂配合物抑制肿瘤细胞活性的影响

组 别	浓 度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	黑色素瘤 (LiBr)		K ₅₆₂ 细胞		肝癌细胞 (7721)	
		A 值	抑制率 (%)	A 值	抑制率 (%)	A 值	抑制率 (%)
甘草酸苯胺铂	4	0.165	52.72	0.243	46.88	0.248	48.97
	5	0.150	56.90	0.235	48.50	0.231	52.57
	10	0.145	58.39	0.160	64.93	0.165	66.00
	15	0.118	66.24	0.146	68.05	0.164	66.31
	20	0.077	77.87	0.073	83.97	0.157	67.75
甘草酸对苯二胺合铂	4	0.196	43.82	0.215	53.06	0.183	62.29
	5	0.167	52.01	0.211	53.88	0.159	67.34
	10	0.156	55.10	0.066	85.56	0.145	70.22
	15	0.145	58.33	0.032	92.94	0.123	74.59
	20	0.122	64.87	0.031	93.27	0.108	77.83
甘草酸邻苯二胺合铂	4	0.200	42.31	0.242	47.10	0.234	51.78
	5	0.161	53.66	0.187	59.08	0.226	53.36
	10	0.119	65.87	0.169	63.02	0.220	54.80
	15	0.104	70.26	0.146	68.16	0.169	65.17
	20	0.101	70.98	0.127	72.26	0.131	73.05
对照(细胞悬液)	—	0.348	0	0.457	0	0.486	0

2.3 磁场与甘草酸苯胺铂类化合物对肿瘤细胞生长抑制的协同作用:见表 5。不同磁场强度的甘草酸苯胺铂配合物对肿瘤细胞生长抑制有协同作用,随着磁场强度的增加,对同类型的肿瘤细胞,在药物浓度相同的条件下,抗癌效果明显不同。(1)对黑色素瘤细胞来说,磁场作用可以提高甘草酸苯胺铂、甘草酸对苯二胺合铂、甘草酸邻苯二胺合铂对黑色素瘤细胞的生长抑制作用。但甘草酸苯胺铂对黑色素瘤细胞的生长抑制作用在低磁场时表现最强。而甘草酸对苯二胺合铂、甘草酸邻苯二胺合铂对黑色素瘤细胞的生长抑制作用在中强度磁场效果显著。(2)对白血病细胞来说,磁场作用有碍甘草酸苯胺铂、甘草酸对苯二胺合铂、甘草酸邻苯二胺合铂对白血病细胞的生长抑制作用。随着磁场强度的增加,甘草酸苯胺铂类对白血病细胞的生长抑制作用明显减弱。但低强度磁场低浓度的甘草酸苯胺铂对白血病细胞的生长抑制作用仍比不加磁场明显增强,低强度磁场中高浓度的甘草酸邻苯二胺铂有益于对白血病细胞的生长抑制作用。(3)对肝癌细胞来说,磁场强度变化的作用并不明显,但低磁场低浓度、以及高磁场高浓度时甘草酸苯胺铂、甘草酸邻苯二胺合铂对肝癌细胞的生长抑制作用的影响均比不加磁场明显增强。磁场作用对甘草酸对苯二胺的影响不大,对肝癌细胞的生长抑制作用反而有所减弱。

3 讨论

3.1 甘草酸苯胺铂类配合物的结构特点:选用羧酸

根取代氯离子合成铂配合物,前人已有尝试^[12],但用甘草酸取代氯离子合成甘草酸胺铂类配合物的研究报道,到目前为止尚不多见。本实验用甘草酸根作配体合成了 3 种新的配合物:甘草酸苯胺铂、甘草酸对苯二胺合铂、甘草酸邻苯二胺合铂。这 3 种配合物以天然的中草药的有效成分替代其他化学成分,易于被吸收,对癌细胞有一定的抑制作用,其水解产物不会对人体构成伤害作用,故用甘草酸代替其他化学成分作配体合成的铂配合物,可能产生高效低毒的效果。

3.2 磁场强度对甘草酸苯胺铂类配合物抑制肿瘤细胞活性作用的影响:磁场与甘草酸苯胺铂类配合物对黑色素瘤细胞生长抑制作用有协同效应,随着磁场强度的增强,甘草酸苯胺铂类配合物对白血病细胞的杀伤作用有明显的减弱趋势。磁场变化对甘草酸苯胺铂类配合物抑制肝癌细胞生长作用的影响不明显。

3.3 磁场作用前后甘草酸苯胺铂类配合物抑制肿瘤细胞活性作用的比较:从表 4 和 5 可以看出:(1)磁场作用可以提高甘草酸苯胺铂类配合物对黑色素瘤细胞生长的抑制作用。尤其是甘草酸苯胺铂对黑色素瘤细胞的生长抑制作用在低磁场时表现较大幅度增长,而甘草酸对苯二胺合铂、甘草酸邻苯二胺合铂对黑色素瘤细胞的生长抑制作用在中强度磁场效果显著。(2)磁场强度的增加,使甘草酸苯胺铂类对白血病细胞的生长抑制趋势明显减弱。但低强度磁

表 5 磁场强度与甘草酸苯胺铂配合物对人体肿瘤细胞抑制的协同作用

组 别	磁场强度 浓 度		黑色素瘤 (LiBr)		K ₅₆₂ 细胞		肝癌细胞 (7721)	
	(Gs)	(μg/mL)	A 值	抑制率 (%)	A 值	抑制率 (%)	A 值	抑制率 (%)
甘草酸苯胺铂配合物	38	5	0.157	67.73	0.154	65.98	0.119	75.57
		10	0.145	70.15	0.146	68.75	0.104	78.57
		15	0.052	89.21	0.110	68.97	0.103	78.87
		20	0.008	98.51	0.074	83.68	0.068	86.08
	76	5	0.145	58.23	0.332	26.49	0.250	48.51
		10	0.134	61.57	0.255	43.49	0.219	55.93
		15	0.048	86.14	0.228	49.56	0.196	59.54
		20	0.019	94.47	0.203	55.03	0.185	61.85
	90	5	0.129	63.00	0.359	20.63	0.247	49.12
		10	0.118	66.16	0.315	30.35	0.195	59.90
		15	0.063	81.83	0.236	47.73	0.158	67.42
		20	0.040	88.51	0.190	57.96	0.121	75.05
甘草酸对苯二胺铂配合物	38	5	0.153	68.52	0.314	30.53	0.187	61.31
		10	0.114	76.22	0.253	44.14	0.152	68.76
		15	0.115	76.28	0.221	51.05	0.149	69.23
		20	0.112	76.91	0.153	66.10	0.122	74.79
	76	5	0.173	50.29	0.278	38.57	0.249	48.59
		10	0.155	55.46	0.247	45.41	0.229	52.78
		15	0.142	59.27	0.098	78.24	0.223	54.09
		20	0.038	89.08	0.087	80.86	0.137	71.75
	90	5	0.138	60.35	0.378	16.25	0.239	50.79
		10	0.133	61.85	0.336	25.73	0.221	54.43
		15	0.112	67.72	0.241	46.61	0.209	57.01
		20	0.040	88.65	0.185	59.17	0.129	73.40
甘草酸邻苯二胺铂配合物	38	5	0.146	69.95	0.217	51.94	0.149	69.27
		10	0.145	70.21	0.161	64.49	0.094	80.56
		15	0.143	70.62	0.119	73.78	0.093	80.82
		20	0.108	77.78	0.111	75.50	0.131	73.04
	76	5	0.135	61.35	0.329	27.06	0.273	43.76
		10	0.130	62.64	0.302	33.19	0.215	55.62
		15	0.111	68.25	0.275	39.23	0.210	56.70
		20	0.045	87.21	0.274	39.32	0.123	74.64
	90	5	0.132	62.14	0.290	35.78	0.277	42.83
		10	0.088	74.71	0.265	41.32	0.178	63.40
		15	0.076	78.09	0.228	49.53	0.113	76.65
		20	0.053	84.77	0.199	55.97	0.081	83.25
对照(细胞悬液)		-	0.348	0.00	0.452	0.00	0.485	0.00

场低浓度的甘草酸苯胺铂对白血病细胞的生长抑制作用仍比不加磁场明显增强,低强度磁场中高浓度的甘草酸邻苯二胺铂也有益于对白血病细胞生长的抑制作用。(3)低磁场低浓度、以及高磁场高浓度时甘草酸苯胺铂、甘草酸邻苯二胺合铂对肝癌细胞的生长抑制作用的影响均比不加磁场明显增强。磁场作用对甘草酸对苯二胺合铂的影响不大,对肝癌细胞的生长抑制作用反而有所减弱。

通过上述分析看出,磁场作用后的药物对不同类型的癌细胞抑制作用不同。这与选择的磁场强度和药物的协同效应有关,而且与癌细胞的类型密切相关。这是一个十分有趣且值得探讨的问题。

参考文献:

[1] 于盛海,孔祥林.抗癌新药甘草酸铂的药理和临床研究进展[J].国外医学-肿瘤分册,1992,19(5):271-273.

[2] 张静,孙润广,齐浩,等.脂肪酸甲胺铂配合物的结构表征及电磁场对其抗癌活性的影响[J].化学学报,2000,58(6):704-712.

[3] 孙润广,张静,王永昌.甘草酸二胺合铂的结构及理化特性的研究[J].西安交通大学学报,1998,32(6):108-110.

[4] 张静,孙润广.液晶态油酸多相脂质体与生物膜相互作用的理化特性[J].物理学报,1994,43(9):1495.

[5] 孙润广,张静,王永昌.亚油酸铂靶向脂质体抗肿瘤特性的研究[J].生物物理学报,1996,12(3):419.

[6] 孙润广,张静.用SAXS和³¹P-NMR谱技术对抗癌药物蓖麻酸多相脂质体结构的研究[J].物理学报,1994,43(4):616.

[7] 李晓学,温文秀.甘草酸及其衍生物的制备与应用[J].中国医药工业杂志,1993,24(10):475-478.

[8] 金健民,刘秀芳,许汉生.甘草次酸衍生物的合成及抗癌活性[J].应用化学,2001,18(11):869-872.

[9] 李铁民,梁再赋.甘草提取物及其衍生物的抗病毒研究现状[J].中草药,1994,25(12):655-658.

[10] 中本一雄.无机和配位化合物的红外和拉曼光谱(第三版)[M].北京:科学出版社,1978.

[11] 胥佩菱.抗癌药物合成设计[M].北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1990.

[12] 唐雯霞,管荫桐.铂络合物的抗癌作用及作用机理[J].南京大学学报,1979,2:49-63.