

氧化苦参碱及苦参碱 Au(III) 金属配合物对肿瘤细胞增殖的影响及分子机制初探

毛 俐¹, 汪广杰^{2*}, 张 鑫¹, 陈 坤¹

1. 成都医学院公共卫生学院, 四川 成都 610500

2. 中国人民解放军西部战区总医院 肿瘤科, 四川 成都 610083

摘要: 目的 合成氧化苦参碱 Au(III) 金属配合物 (OMT-Au) 和苦参碱 Au(III) 金属配合物 (MT-Au), 并比较 2 种配合物体外抑制肿瘤细胞增殖的效果, 初步探讨其分子机制及构效关系。方法 溶剂热法合成配合物, X 射线单晶衍射表征结构, 不同剂量配合物分别处理 10 种肿瘤细胞株, MTT 法观察细胞增殖抑制, 流式细胞术检测配合物对细胞凋亡和细胞周期的影响, 琼脂凝胶电泳探究配合物对拓扑异构酶 I (TOPO I) 活性的影响。结果 OMT-Au 明显抑制人胃癌 MGC803 细胞增殖, 阻滞 MGC803 细胞于 G₂/M 期, 抑制 TOPO I 介导的 pUC19 DNA 质粒的解旋反应, 呈剂量依赖关系, 且抑制作用均强于 MT-Au 配合物。结论 OMT-Au 抗肿瘤活性强于 MT-Au, 原因可能与配体的分子构象差异有关。

关键词: 苦参碱; 氧化苦参碱; 金属配合物; 肿瘤细胞; 拓扑异构酶 I

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)03-0639-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.03.016

Effect of Au(III) complex with oxymatrine and matrine on proliferation of tumor cells *in vitro* and its mechanisms

MAO Li¹, WANG Guang-jie², ZHANG Xin¹, CHEN Kun¹

1. Department of Public Health, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

2. The General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610083, China

Abstract: Objective To synthesize metal complexes of Au(III) with matrine (MT-Au) and oxymatrine (OMT-Au), compare their inhibitory effect on the proliferation of tumor cells *in vitro*, and discuss the mechanism and structure-activity relationship. **Methods** The metal complexes were synthesized by solvothermal method and characterized by X-ray single crystal diffraction. The *in vitro* cytotoxicity of complexes with different doses towards 10 selected tumor cell lines was evaluated by MTT method. The effects of complex on cell apoptosis and cell cycle were investigated by flow cytometer. Agarose gel electrophoresis was used to study the effects of complex on topoisomerase I (TOPO I) activity. **Results** Complex OMT-Au obviously inhibited the proliferation of MGC803 tumor cells, blocked cell cycle of MGC803 in G₂/M phase, and suppressed TOPO I mediated untwisting of pUC19 DNA plasmid with a dose-dependence manner. And the inhibited effects of complex OMT-Au were all stronger than MT-Au complex. **Conclusion** The antitumor activity of complex OMT-Au is stronger than that of MT-Au, which could be attributed to the variation in the molecular conformation of ligand.

Key words: matrine; oxymatrine; metal complex; tumor cell; TOPO I

苦参碱 (matrine, MT) 和氧化苦参碱 (oxymatrine, OMT) 均属于四环喹啉类生物碱化合物, 是豆科槐属植物柔枝槐 *Sophora subprostrata* Chunet T. Chen 的干燥根及茎 (广豆根) 中的主要药效成分。近年来, 抗肿瘤活性研究发现 MT 和

OMT 对肝癌、胃癌、卵巢癌等肿瘤细胞有抑制增殖效果^[1-5]。但有关 MT 和 OMT 金属配合物的抗肿瘤活性对比研究却少见报道。

1969 年 Rosenberg 发现顺铂具有抗肿瘤活性以来^[6], 金属配合物药物 (包括 Pt、Ru、Rh、Pd、Ti、

收稿日期: 2018-05-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81601859); 四川省教育厅重点项目 (17ZA0111); 成都医学院校基金项目 (CYZ15-05)

作者简介: 毛 俐, 博士, 副教授, 研究方向为金属抗肿瘤药物。Tel: (028)62739777 E-mail: chemistrymao@126.com

*通信作者 汪广杰, 博士, 医师, 研究方向为临床肿瘤学。Tel: (028)86571072 E-mail: wangwangnj@163.com

Sn、Au、Ge、Ga、Fe 等的配合物), 已被证实具有良好的抗肿瘤活性, 有的已用于临床^[7-8]。鉴于 Au(III) 与 Pt(II) 等电子体 d^8 构型, Au(III) 配合物的细胞毒性成为近年来金属药物研究领域的热点^[9]。但 Au(III) 在生理环境下易被还原和快速水解而难以到达作用靶点^[10], 故选择合适的配体稳定 Au(III) 中心, 是 Au(III) 类抗肿瘤金属配合物合成的关键。生物碱易与酸性 HAuCl_4 发生路易斯酸碱反应, 有较大的稳定 Au(III) 中心的潜力。

本研究以 MT 和 OMT 为配体, 合成 MT 与 Au(III)、OMT 与 Au(III) 的配合物 (MT-Au、OMT-Au) 晶体, 用 X 射线单晶衍射表征其结构。同时, 培养多种常见且高发肿瘤细胞株, 采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 微量酶反应比色法, 对比观察 MT-Au、OMT-Au 对体外肿瘤细胞增殖的抑制作用, 并初步探究其分子机制, 为深入研究与开发该类生物碱 Au(III) 配合物提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

MT(质量分数 98%, 批号 Dksj20171117)、OMT(质量分数 98%, 批号 Dyhksj20171110) 购自陕西昂盛生物试剂公司; 顺铂注射液购自江苏豪森药业集团有限公司(每支 30 mg, 6 mL, 批号 171001); 胰蛋白酶、MTT 购自美国 Amersco 公司; RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 细胞凋亡和细胞周期检测试剂盒均购自美国 BD 公司; AO-EB 荧光染色试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; pUC19 质粒 DNA (250 ng/ μL) 购自大连 Takara 宝生物工程有限公司; 新生牛血清购自杭州四季青生物工程公司; 二甲基亚砜 (DMSO)、氯金酸 ($\text{AuCl}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、无水乙醇等试剂均为国药集团公司生产的分析纯试剂。

1.2 仪器

傅里叶变换红外光谱仪 (KBr 压片, 美国 PerkinElmer 公司); Bruker Smart CCD 单晶面衍射仪 (德国 Bruker 公司); CO_2 培养箱 (美国 Thermo 公司); Model-450 酶联免疫检测仪 (美国 Bio-Rad 公司); IX71 倒置荧光显微镜、IX51 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); BD Accuri C6 流式细胞仪 (美国 Thermo Fisher 公司); Gel doc 2000 凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 细胞

人鼻咽癌细胞株 CNE1 和 CNE2、结肠癌细胞

株 HT29 和 HCT116、肺癌细胞株 NIC-H460、肾癌细胞株 7860、乳腺癌细胞株 MCF-7、胃癌细胞株 MGC803 及肝癌细胞株 HepG2、BEL7404 均购自中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 配合物 MT-Au、OMT-Au 的合成

OMT 和 $\text{AuCl}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 等物质的量比混合, 20 mL 无水乙醇溶解, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴搅拌 8 h, 滤过, 滤液封置挥发, 黄色晶体析出, 产率 71%。MT 和 $\text{AuCl}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 等物质的量比混合, 20 mL 无水乙醇溶解, 在室温搅拌 8 h, 滤过, 滤液封置挥发, 黄色晶体析出, 产率 67%。

2.2 配合物晶体结构测定

分别选取尺寸为 0.26 mm $\times$ 0.20 mm $\times$ 0.13 mm 的 MT-Au 晶体、0.35 mm $\times$ 0.22 mm $\times$ 0.11 mm 的 OMT-Au 晶体, 安装在玻璃纤维上, 采用 Bruker Smart CCD 单晶面衍射仪, 用石墨单色器单色化的 $\text{MoK}\alpha$ 射线 ($\lambda=0.071\ 07\ \text{nm}$), 在温度 293 K 下, 不同衍射角 (θ) 范围内收集衍射数据, 经最小二乘法修正确定晶胞参数。晶体结构由直接法解出, 全部非氢原子由差值 Fourier 合成及差值电子密度函数修正得到。从差值电子密度函数结合几何分析得全部 H 原子坐标。全部非 H 原子坐标, 各向异性热参数及 H 原子坐标, 各向同性参数经全最小二乘法修正至收敛。所有计算结果均用 Bruker Smart, SHELXS-97 (Sheldrick, 1990) 和 SHELXL-97 (Sheldrick, 1997) 程序包完成, 结构用半经验法校正。

2.3 肿瘤细胞培养

人鼻咽癌细胞株 CNE1 和 CNE2、结肠癌细胞株 HT29 和 HCT116、肺癌细胞株 NIC-H460、肾癌细胞株 7860、乳腺癌细胞株 MCF-7、胃癌细胞株 MGC803 及肝癌细胞株 HepG2、BEL7404 均置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱, 用含 10% 新生牛血清以及青、链霉素 (各 100 U/mL) 的 RPMI 1640 培养液 (1:9) 或 DMEM 培养液培养。倒置显微镜观察细胞生长, 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期细胞用于实验。

2.4 MTT 法检测细胞增殖

将 MT-Au、OMT-Au 溶解后用基础培养基依次倍比稀释成 5 个梯度的母液, 取对数生长期细胞, 以每孔 190 μL (约 1×10^4 个/孔) 接种于 96 孔板, 培养 12 h 待细胞贴壁后, 分别加入不同浓度上述配合物和顺铂阳性对照药各 10 μL , 每个浓度设 4 个复孔, 分别孵育 24、48、72 h 后, 每孔加入 10 μL MTT

(5 mg/mL), 继续培养 4 h, 吸去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 平板震荡器振荡 5 min。另外设空白孔 3 个, 只加完全培养基 200 μ L, 不加细胞, 并同上述操作后, 空白孔调零, 用酶标仪以 570 nm 和 630 nm 双波长测定去除本底后的吸光度(A)值, 计算细胞增殖抑制率。实验以复孔均值表示, Bliss 法计算各样品的半数抑制浓度(IC_{50})。

增殖抑制率 = $1 - \text{样品 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}$

2.5 荧光染色观察细胞形态变化

取对数生长期的胃癌 MGC803 细胞, 以 1×10^5 个/mL 浓度接种于 24 孔板, 培养于含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 每孔 2 mL, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养, 细胞完全贴壁后, 以未加化合物的细胞为对照组 (2 个孔), 以加梯度浓度 OMT 配体和 OMT-Au 配合物药物的细胞为实验组 (每种药物每个浓度设 2 个复孔), 孵育 48 h 后, 轻轻吸尽对照组 (无化合物, 仅含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液) 和实验组 (加有梯度浓度化合物的 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液) 的液体, 用 PBS 洗涤每孔细胞 2 次, 每孔均加入吖啶橙 (AO) 和溴化乙锭 (EB) 等体积混合的染色剂 1 μ L 和 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液 1 mL, 避光染色 15 min, 荧光显微镜观察细胞形态改变并拍摄。

2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期

取对数生长期的胃癌 MGC803 细胞, 以 1×10^5 个/孔浓度接种于 96 孔板, 于含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养, 细胞完全贴壁后, 以未加化合物药物的细胞为对照组, 以加梯度浓度 MT、OMT 配体和 MT-Au、OMT-Au 配合物药物的细胞为实验组 (每种药物每个浓度设 2 个复孔), 孵育 48 h, 胰酶消化, PBS 清洗后的对照组和实验组细胞, 调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL, 取 1 mL 细胞悬液到 5 mL 流式管中, 离心, 弃上清液; 用 100 μ L $1 \times$ Binding Buffering 重悬, 混匀后, 加入 5 μ L FITC Annexin V 和 PI, 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min, 最后添加 300 μ L $1 \times$ Binding Buffering 到每个流式管中, 在 1 h 内上流式细胞仪检测并分析结果。

取对数生长期的胃癌 MGC803 细胞, 以 1×10^5 个/mL 浓度接种于 12 孔板, 于含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 每孔 2 mL, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养, 细胞贴壁后, 以未

加化合物药物的细胞为对照组 (设 3 个复孔), 加 25 μ mol/L OMT 配体和 OMT-Au 配合物药物的细胞为实验组 (每种药物每个浓度设 3 个复孔), 孵育 48 h, 胰酶消化后清洗的对照组和实验组细胞, 计数并分别转移 2×10^5 个细胞到 5 mL 流式管中, 于离心机 1 000 r/min 离心 4 min, 吸出上清液后, 先加周期检测试剂盒里的 A 液破膜剂 250 μ L, 微震荡管壁, 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后, 再加 B 液 RNA 酶 200 μ L, 再微震荡管壁, 25 $^{\circ}\text{C}$ 再孵育 10 min, 最后加 C 液 PI 200 μ L, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min, 用冰盒保存并在 3 h 内检测。实验以复孔均值, 计算各周期细胞百分数。实验结果选取有代表性的流式周期图说明。

2.7 琼脂糖凝胶电泳检测拓扑异构酶 I (TOPO I)

在 12 μ L $1 \times$ 反应缓冲液 (10 mmol/L Tris-Cl, pH 7.9, 100 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl_2 , 0.1 mmol/L EDTA, 15 mg/mL BSA) 中加入 0.25 μ g pUC19 DNA、1U TOPO I 及不同的受试物, 包括阴性对照及不同浓度的 OMT、OMT-Au, 并加灭菌三蒸水至 20 μ L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。反应后加入 2 μ L 终止液 (含 10% SDS 和 100 mmol/L EDTA) 终止反应, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 30 min。孵育后加 5 μ L $6 \times$ 上样缓冲液, 在 0.8% 琼脂糖 $1 \times$ TBE 缓冲液中以 5 V/cm 电泳 1 h。电泳后用 $1 \times$ TBE 缓冲液配制的 0.5 mg/L EB 室温暗处染色 30 min, 凝胶成像系统观察电泳条带并拍照。

2.8 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件统计, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较采用 t 检验进行; 流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期实验结果为分类变量资料, 采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 OMT-Au 和 MT-Au 配合物晶体结构

OMT 和 MT 分子均以 N 质子化的阳离子形式与 $[\text{AuCl}_4]^-$ 阴离子结合成离子型的单分子金属化合物 (图 1)。分子间经配体 N(2) 上的 H 原子与另一配体的羰基 O(1) 或 O(2) 形成氢键 N(2)-H(2) $\cdots$ O(1) 或 N(2)-H(2) $\cdots$ O(2) 作用堆积成斜方晶系晶胞结构。MT-Au 和 OMT-Au 晶体数据见表 1。

3.2 配合物对肿瘤细胞的增殖抑制作用

OMT-Au 和 MT-Au 配合物对 10 种肿瘤细胞增殖抑制作用结果见表 2, OMT-Au 对大多数肿瘤细胞的 IC_{50} 值均低于 MT-Au ($P < 0.01$), 仅肾癌 7860、乳腺癌 MCF-7 和肺癌 NIC-460 的结果相反。且

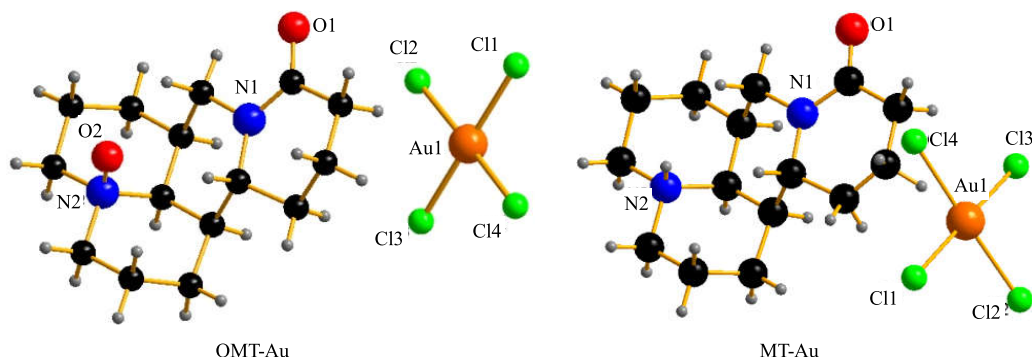


图 1 OMT-Au 和 MT-Au 配合物晶体结构 (Diamond 3.0)

Fig. 1 Crystal structure of complex OMT-Au and MT-Au (Diamond 3.0)

表 1 配合物晶体数据和结构精修参数

Table 1 Crystallographic data and refinements of complex

参数	MT-Au	OMT-Au
经验式	C ₁₅ H ₂₄ AuCl ₄ N ₂ O	C ₁₅ H ₂₃ AuCl ₄ N ₂ O ₂
相对分子质量	587.13	602.13
波长/nm	0.071 073	0.071 073
晶系	orthorhombic	orthorhombic
空间群	P2(1) 2(1) 2(1)	P2 (1) 2(1) 2(1)
a/nm	0.805 65 (13)	0.800 04 (12)
b/nm	1.046 84 (17)	1.100 84 (15)
c/nm	2.323 2 (4)	1.952 9 (3)
$\alpha/^\circ$	90	90
$\beta/^\circ$	90	90
$\gamma/^\circ$	90	90
晶胞体积 V/nm^3	1.959 3 (5)	1.956 2 (2)
晶胞独立原子数 Z	4	4
晶体密度 $D_c/(\text{Mg}\cdot\text{m}^{-3})$	1.990	1.679
吸收校正系数/ mm^{-1}	8.058	2.334
单胞内的电子数目 $F(000)$	1 132	941
晶体尺寸	0.26 mm×0.20 mm×0.13 mm	0.35 mm×0.22 mm×0.11 mm
数据收集的衍射角范围 $\theta/^\circ$	1.75~25.09	2.11~25.73
衍射指标	$-9\leq h\leq 8, -12\leq k\leq 11, -27\leq l\leq 27$	$-10\leq h\leq 10, -12\leq k\leq 11, -24\leq l\leq 25$
独立衍射数据	9 823/3 476 [R(int) = 0.040 2]	9 963/3 962 [R (int) = 0.140 3]
最大、最小透射率	0.409 2、0.225 7	0.609 2、0.125 7
精修方法	Full-matrix least-squares on F^2	Full-matrix least-squares on F^2
数据数目/限制数目/参数数目	3 476/0/209	3 752/2/218
基于 F^2 精修的吻合程度	0.991	0.994
衍射吻合因子 [$I > 2 \text{ sigma}(I)$]	$R1 = 0.028\ 0, wR2 = 0.054\ 7$	$R1 = 0.082\ 4, wR2 = 0.131\ 9$
所有数据吻合因子	$R1 = 0.034\ 9, wR2 = 0.056\ 1$	$R1 = 0.086\ 4, wR2 = 0.123\ 9$
最大峰顶、峰谷(差值傅里叶图)	0.791、-0.510 e. Å ⁻³	1.971、-1.610 e. Å ⁻³

OMT-Au 和 MT-Au 对胃癌 MGC803 细胞增殖抑制作用明显。

不同浓度 OMT-Au、MT-Au 配合物作用胃癌 MGC803 细胞不同时间后,增殖抑制率变化见图 2。随配合物浓度增加,对胃癌 MGC803 细胞的增殖抑制率逐渐升高,呈剂量依赖性。但配合物浓度大于 25 $\mu\text{mol/L}$ 时,随作用时间增加,细胞增殖抑制率增幅减小。OMT-Au 配合物作用胃癌 MGC803 细胞

48 h 和 72 h 抑制率差异除 3.125 $\mu\text{mol/L}$ 组和 50 $\mu\text{mol/L}$ 组无统计学意义 ($P > 0.05$) 外,其余各组均有统计学意义 ($P < 0.01$)。MT-Au 配合物作用 MGC803 细胞 48 h 和 72 h 抑制率差异除 3.125 $\mu\text{mol/L}$ 组无统计学意义 ($P > 0.05$) 外,其余各组均有统计学意义 ($P < 0.001$)。

对比 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 配体、配合物、顺铂对胃癌 MGC803 细胞的 48 h 增殖抑制率,结果见图 3,

表 2 OMT-Au 和 MT-Au 对体外肿瘤细胞增殖抑制作用的 IC_{50} 值 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 IC_{50} value of OMT-Au and MT-Au on tumor cell proliferation *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

药物	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$				
	CNE1	CNE2	7860	HT29	HCT116
MT-Au	197.22±32.10	160.52±20.38	72.54±5.66	67.44±4.72	182.78±29.02
OMT-Au	116.25±17.55 ^{*△}	123.01±4.57 ^{*△}	77.26±6.02 ^{*△}	45.91±7.33 ^{*△}	36.56±3.87 ^{*△}
顺铂	128.96±5.56	119.23±4.77	91.45±5.51	71.66±4.11	42.67±4.03

药物	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$				
	MGC803	MCF-7	NIC-460	BEL7404	HepG2
MT-Au	11.22±1.05	92.75±9.03	57.28±7.76	35.04±3.88	235.16±21.04
OMT-Au	7.76±0.95 ^{*△}	98.26±7.70 ^{*△}	101.64±11.15 ^{*△}	18.13±1.02 ^{*△}	192.33±15.21 ^{*△}
顺铂	27.55±1.83	75.14±3.32	48.69±5.27	32.19±2.67	39.34±1.92

与 MT-Au 组比较: ^{*} $P < 0.01$; 与顺铂组比较: [△] $P < 0.01$

^{*} $P < 0.01$ vs MT-Au group; [△] $P < 0.01$ vs cisplatin group

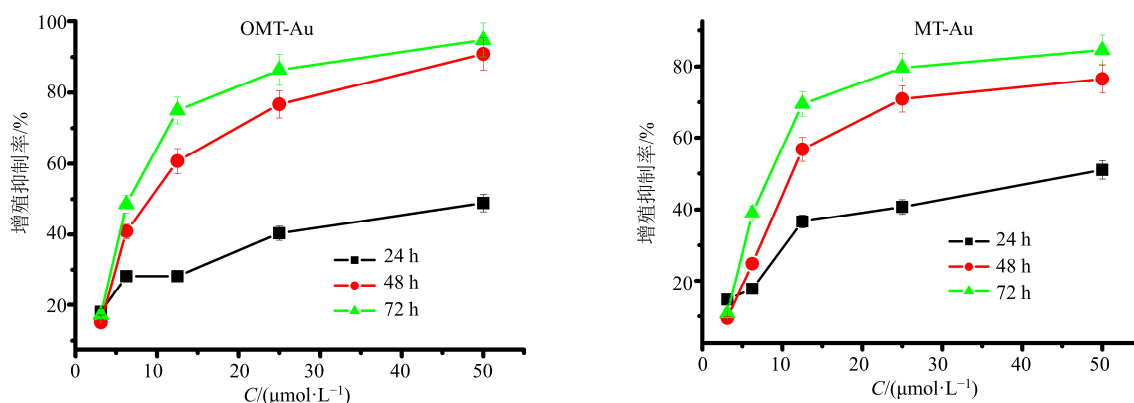
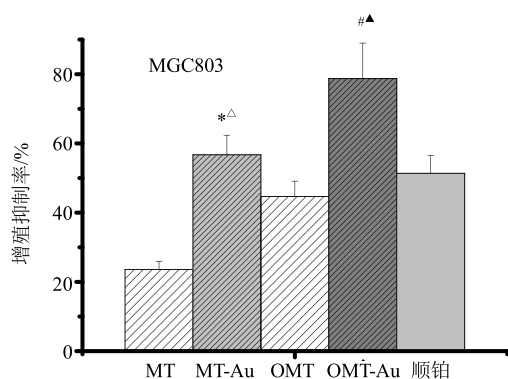


图 2 OMT-Au 和 MT-Au 对胃癌 MGC803 细胞增殖抑制作用的时效及量效曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Time-effect and dose-effect relationship curve of inhibiting MGC803 tumor cell proliferation by complexes OMT-Au and MT-Au ($\bar{x} \pm s, n = 4$)



与 MT 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 OMT 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 OMT-Au 组比较: [△] $P < 0.05$; 与顺铂组比较: [▲] $P < 0.01$

^{*} $P < 0.05$ vs MT group; [#] $P < 0.05$ vs OMT group; [△] $P < 0.05$ vs OMT-Au group; [▲] $P < 0.01$ vs cisplatin group

图 3 配体、配合物和顺铂对 MGC803 细胞增殖抑制率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Proliferation inhibition rate of ligand, complex and cisplatin for MGC803 tumor cell ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

OMT-Au 和 MT-Au 配合物对胃癌 MGC803 细胞的抑制率分别为 68.75%、56.73%，均高于配体 OMT (44.65%) 和 MT (23.61%)，配体组与相应的配合物组比较增殖抑制率差异显著 ($P < 0.05$)。且配合物 OMT-Au 对胃癌 MGC803 细胞的增殖抑制率高于 MT-Au，高于顺铂处理组 (51.36%)，抑制率差异显著 ($P < 0.01$)。

3.3 OMT-Au 和 OMT 对 MGC803 细胞形态的影响

倒置显微镜观察: 对照组 MGC803 细胞呈多边形贴壁生长，轮廓清晰，胞质均匀透明；用药后实验组大多数 MGC803 细胞皱缩、破碎、脱落、形态呈长梭形，细胞数量随配合物浓度和作用时间增加而明显减少。对比用药前后细胞形态变化，初步推测肿瘤细胞增殖阻滞。

荧光显微镜观察 (图 4): 对照组正常 MGC803 细胞核质体染成均匀绿色，形状大小单一；凋亡早期细胞: 核质体被染成绿色，细胞呈不规则形状；凋亡

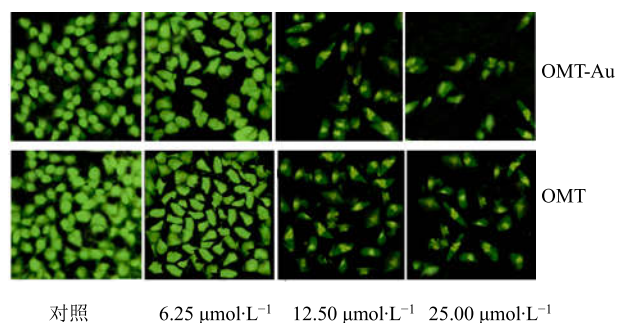


图 4 OMT-Au 和 OMT 作用 MGC803 细胞的形态变化 (荧光显微镜)

Fig. 4 Cellular morphology of MGC803 in fluorescence microscope after treatment with OMT-Au and OMT

表 3 MT、OMT 及 MT-Au、OMT-Au 对胃癌 MGC803 细胞凋亡的影响

Table 3 Apoptosis rate of MGC803 after treatment with complex and ligand

组别	C/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	凋亡率/%		总凋亡率/%	组别	C/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	凋亡率/%		总凋亡率/%
		早期	晚期				早期	晚期	
OMT	0	3.6	4.7	8.3	MT	0	3.1	4.9	8.0
	6.25	7.7	10.6	18.3		6.25	6.9	9.8	16.7
	12.50	8.3	26.5	34.8		12.50	7.9	20.6	28.5
	25.00	8.7	44.3	53.0		25.00	7.6	40.2	47.8
OMT-Au	0	4.9	5.3	10.2	MT-Au	0	3.7	5.9	9.6
	6.25	8.3	17.1	25.4 ^{*△}		6.25	6.1	13.6	19.7 ^{*△}
	12.50	9.4	47.7	57.1 ^{*△}		12.50	8.0	33.4	41.4 ^{*△}
	25.00	9.1	72.3	81.4 ^{*△}		25.00	7.3	56.5	63.8 ^{*△}

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 OMT 组比较: [△] $P < 0.01$; 与 MT 组比较: [▲] $P < 0.01$

^{*} $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.01$ vs OMT group; [▲] $P < 0.01$ vs MT group

例组细胞晚期凋亡率较对照组明显增高, 与配合物浓度呈剂量依赖关系。各实验组总凋亡率与对照组总凋亡率比较差异显著 ($P < 0.05$), 配体组总凋亡率显著低于相应的配合物组 ($P < 0.01$)。细胞周期测定结果见表 4 和图 5, 25 $\mu\text{mol/L}$ OMT-Au 对胃癌 MGC803 细胞周期阻滞作用较 OMT 更为明显, 与对照组比较使 S 期细胞比例下降, G₂/M 期细胞比

晚期细胞: 核质体被染成橙色, 染色质被浓缩, 细胞核成点状碎裂, 可见胞质突起早芽状。坏死细胞: 核质体染成均橙黄色, 大小和形状较单一。6.25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组有少量的凋亡早期细胞和凋亡晚期细胞; 12.50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组有更多凋亡晚期细胞; 25.00 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组多为凋亡晚期细胞, 可见坏死细胞。

3.4 配体及配合物对 MGC803 细胞凋亡和细胞周期的影响

流式细胞仪测定不同浓度配体 (MT、OMT) 和配合物 (MT-Au、OMT-Au) 作用胃癌 MGC803 细胞 48 h 后的细胞凋亡率。结果 (表 3) 显示, 实

例升高, 细胞被阻滞于 G₂/M 期。推测配合物通过影响 DNA 复制, 使细胞阻滞于有丝分裂期, 进而诱导细胞凋亡及抑制肿瘤细胞增殖。

3.5 配合物对 TOPO I 的影响

TOPO I 在调控 DNA 拓扑形态及 DNA 复制转录中起关键作用, 是抗肿瘤药物研发的重要靶点。OMT 配体及 OMT-Au 配合物对 TOPO I 的抑制作用

表 4 OMT-Au 和 OMT 对胃癌 MGC803 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of OMT-Au and OMT on cell cycle of MGC803 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞周期分布/%		
		G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照	—	46.45 $\pm$ 4.33	36.05 $\pm$ 3.11	16.58 $\pm$ 1.70
OMT	25	44.26 $\pm$ 3.92	31.07 $\pm$ 3.03 [*]	24.73 $\pm$ 2.06 [*]
OMT-Au	25	40.39 $\pm$ 3.67	21.77 $\pm$ 2.15 ^{*#}	37.65 $\pm$ 3.09 ^{*#}

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 OMT 组比较: [#] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs OMT group

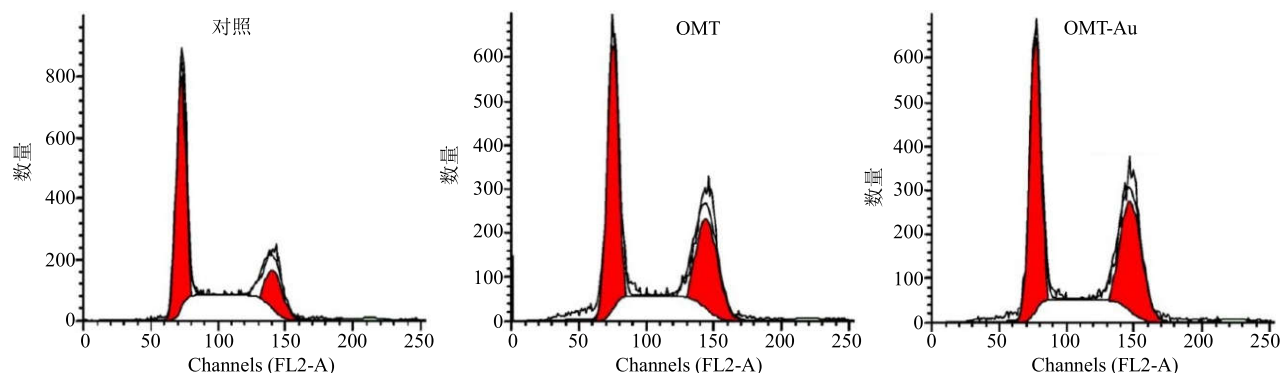
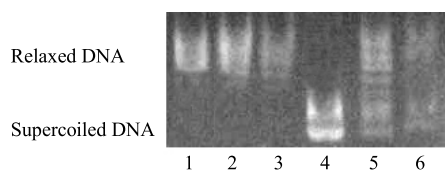


图 5 OMT 及 OMT-Au 对胃癌 MGC803 细胞周期的影响

Fig. 5 Cell cycle arrest in MGC803 cells after treatment with OMT and OMT-Au

结果见图 6, 与 OMT 配体相比, OMT-Au 配合物能明显抑制 TOPO I 介导的质粒 pUC19DNA 超螺旋的解旋反应, 对 TOPO I 催化活性的抑制作用较强, 且呈剂量依赖关系。



1-DNA/TOPO I 2, 3-50、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ OMT + DNA/TOPO I
4, 5-50、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ OMT-Au + DNA/TOPO I 6-DNA

图 6 不同浓度 OMT 和 OMT-Au 抑制 TOPO I 介导的 pUC19 DNA 的解旋作用

Fig. 6 Gel electrophoresis comparison of TOPO I mediated unwinding of pUC19 DNA plasmid inhibited by complexes

4 讨论

体外对肿瘤细胞增殖抑制实验显示, Au(III) 离子与生物碱形成的配合物对肿瘤细胞的抑制作用明显强于 MT、OMT 等生物碱配体, 对部分肿瘤细胞甚至表现出高于顺铂的体外细胞毒性, 说明 Au(III) 金属离子与生物碱配体形成离子型配合物有明显的协同增效作用。

对比 OMT-Au 和 MT-Au 两种配合物对同 1 种肿瘤细胞株的抑制作用, 发现二者抑制强度差异较大, 这或许与其配体 OMT 和 MT 的构效差异有关。实验研究发现, 具有易离去基团, 且配体结构稳定性弱的 Au(III) 金属配合物有更强的细胞毒性^[7]。量子力学研究显示^[10], 构象上, MT 和 OMT 最低能量的构象结构同为椅式构象, 但 OMT 多 1 个 O 原

子, 空间构象稳定性更低; 轨道上, 二者轨道结构相似, 但 OMT 最低空轨道能量更低, 易接受外来电子; 电荷上, 两者同为正包负电荷结构, 对 Au(III) 有较好的电荷稳定作用, 但 OMT 两个 O 原子电荷值高, 电荷作用增强。从分子构象、轨道能量和分子电荷看, 配体 OMT 稳定性均弱于 MT, 药理活性强于 MT。由此推测, OMT-Au 配合物细胞毒性强于 MT-Au, 这与本实验结果相符。

生物碱可稳定酸性的氯金酸 Au(III) 金属离子中心, 提高药物在生物体内的稳定性, 并降低不良反应^[11]。但苦参碱类离子型配合物同时具有金属离子的平面构型和苦参碱类有机胺配体的多电子椅式构象。金属离子平面构型可插入 DNA 双链结构, 抑制 DNA 复制。而苦参碱类化合物具有抑制肿瘤细胞增殖、诱导分化和凋亡、减轻肿瘤炎症和减低化疗不良反应、促进肿瘤宿主的抗肿瘤免疫反应, 肿瘤预防性化疗等多方面功效^[12-13]。

靶点是药物分子药理机制的基础。近年来, 针对中药活性分子的药理作用靶点鉴定方法研究方兴未艾。计算机虚拟对接、系统生物学筛查、化学生物学寻靶, 还有逆向思维设计的基于化学修饰或光偶联药物于固相亲和载体表面, “靶点钩钓”富集靶点蛋白至载体表面再高分辨质谱直接鉴定等方法^[14], 在药物直接作用靶点及其信号通路调控研究中发挥重要作用。结合课题组前期生物碱金属配合物抗肿瘤机制研究经验^[15], 实验以调控 DNA 复制转录的 TOPO I 为分子机制的靶点模型初步探索, 发现 OMT-Au 配合物对 TOPO I 介导的质粒 DNA 解旋反应有明显抑制作用。推测 OMT-Au 配合物可能通过抑制 TOPO I 影响 DNA 复制转录, 诱导

MGC803 细胞凋亡。而多重药理学认为,单一化学成分也可作用于多靶点协同增效^[16]。因此,OMT-Au 作用于细胞凋亡相关的其他蛋白信号通路的作用机制值得继续深入探讨。同时,由于 OMT 配合物具有金属和有机活性分子多部位活性作用位点,所以系统生物学信号通路筛查、固相亲和界面靶点钩钓等靶点鉴定方法适用于后续 OMT 金属配合物药物作用靶点研究。

参考文献

- [1] 陈晓峡, 向小庆, 叶红. 苦参碱及氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 361-364.
- [2] 赵宝中, 荣大奇, 王秀军, 等. 苦参碱和氧化苦参碱电子结构与药性的关系 [J]. 分子科学学报, 2000, 16(2): 88-93.
- [3] 张庆, 茹庆国, 刘艳, 等. 苦参碱与氧化苦参碱对炎症相关结直肠癌的化学预防作用研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1548-1553.
- [4] 李嫚华, 许威, 张青, 等. 氧化苦参碱对 TGF- β 1 诱导的 PANC-1 细胞 Smad3/Gli1 通路相关因子表达的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5200-5205.
- [5] 王淑静, 任爽, 张家宁, 等. 氧化苦参碱对 HepG-2 与 A549 细胞增殖抑制与促凋亡活性比较研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(11): 1545-1549.
- [6] Rosenberg B, VanCamp L, Trosko J E, *et al.* Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents [J]. *Nature*, 1969, 222(5191): 385-386.
- [7] 牟永平, 吴刚, 周立社, 等. 抗肿瘤金属配合物药物及其药理作用的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(11): 1409-1413.
- [8] 黄晶, 洪鸣. 三氮螯合单功能三核铂(II)配合物的 DNA 结合及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(8): 65-69.
- [9] 施鹏飞, 姜琴. 三价金配合物抗肿瘤活性研究 [J]. 化学进展, 2009, 21(4): 644-653.
- [10] Shi P, Jiang Q, Zhao Y, *et al.* DNA binding properties of novel cytotoxic gold(III) complexes of terpyridine ligands: The impact of steric and electrostatic effects [J]. *J Biol Inorg Chem*, 2006, 11(6): 745-752.
- [11] 陈振锋, 彭艳, 谭明雄, 等. 基于中药活性成分的金属基抗肿瘤药物前期研究 [J]. 化学进展, 2009, 21(5): 929-933.
- [12] 胡美薇, 傅丽娟, 范翠华, 等. 苦参碱诱导人白血病耐药细胞 K562/IM 自噬和凋亡的研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(2): 213-218.
- [13] 刘勇华, 郭梅珍. 氧化苦参碱对 SGC-7901 胃癌细胞增殖及对血管内皮生长因子表达的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(4): 443-445.
- [14] 曾克武, 屠鹏飞. 固相亲和载体应用于中药复杂体系直接作用靶点研究现状与挑战 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3645-3649.
- [15] Chen Z F, Mao L, Liu L M, *et al.* Potential new inorganic antitumour agents from combining the anticancer traditional Chinese medicine (TCM) matrine with Ga(III), Au(III), Sn(IV) ions, and DNA binding studies [J]. *J Inorg Biochem*, 2011, 105(2): 171-180.
- [16] Chaudhari R, Tan Z, Huang B, *et al.* Computational polypharmacology: A new paradigm for drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2017, 12(3): 279-291.