

钌配合物抗肿瘤活性及对人肺腺癌 A549 细胞的凋亡作用

摘 要

钌配合物由于其易吸收、低毒性,被认为将是最有前途的抗癌药物,已经有两个配合物 NAMI-A, KP1019 分别于 1999 年和 2003 年进入临床。

本文设计合成了系列钌配合物: $[\text{Ru}(\text{MeIm})_4(\text{dppz})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Ru}(\text{MeIm})_4(\text{dpq})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Ru}(\text{MeIm})_4(\text{phen})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, *trans,cis,cis*- $\text{RuCl}_2(\text{dmsO})_2(\text{Biim})$, *mer*- $\text{RuCl}_3(\text{bpy})(\text{dmsO})$, *mer*- $\text{RuCl}_3(\text{phen})(\text{dmsO})$, *mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{dmsO})(\text{Biim})]$ 。并通过元素分析、NMR、ES-MS 等方法对合成的配合物进行了表征。

本文采用 MTT 法测定了钌配合物对肺癌 A549 细胞的半数抑制浓度 IC_{50} 值,采用光学观察法观察钌配合物对人肺腺癌 A549 细胞的凋亡作用,以 DNA 琼脂糖凝胶电泳法、流式细胞术测定不同浓度的钌配合物对 A549 细胞的凋亡作用。上述研究结果表明:在显微镜下阴性对照组细胞生长良好,加配合物处理后细胞皱缩变圆,体积缩小,随着浓度的增大,死亡细胞增多。配合物大多在电泳时出现了特征的“梯状”条带。流式细胞仪检测结果亦显示它们均可以诱导 A549 细胞凋亡,并显示出一定的浓度依赖性。综合研究结果表明,这些钌配合物均可以不同程度地诱导 A549 细胞凋亡。

关键词: 钌配合物, 抗肿瘤活性, 肿瘤细胞凋亡

Investigation of Ru complex-induced apoptosis and the antitumor activity in A549 human lung cancer cells

ABSTRACT

Ruthenium drugs appear as promising compounds due to their low toxicity and the ability to accumulate into tumor. NAMI-A and KP1019 have entered clinical trials in 1999 and 2003, respectively.

In this paper, a series of Ru complexes, $[\text{Ru}(\text{MeIm})_4(\text{L})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\text{L} = \text{dp-pz}, \text{dpq}, \text{phen}$), *trans,cis,cis*- $\text{RuCl}_2(\text{dmsO})_2(\text{Biim})$, *mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{dmsO})(\text{L})]$ ($\text{L} = \text{bpy}, \text{phen}, \text{Biim}$), have been synthesized and characterized by elemental analysis, NMR, EI-MS, etc.

The IC_{50} of the Ru complexes on the A549 cells were screened by using the method of MTT. The Morphologic of the A549 cell was observed by the microscope, and the apoptosis of the cells was evaluated by DNA ladder and Flow cytometry. These results showed that all complexes induced A549 cell apoptosis to different extent. The A549 cells were observed to be shrunken and decreased in size by Ru complexes under invert microscope. As concentration increased by Ru complexes, more and more bel cells with apoptotic bodies were exfoliated and suspended in culture medium. Cells without drugs were in active growth. Typical DNA ladder was detected by agarose gel electrophoresis of DNA extracted from A549 cells by most Ru complexes for 48 hours. Ru complexes could induce cells apoptosis in concentration-dependence manner by flow cytometry. These results showed that all complexes induced A549 cell apoptosis to different extent.

Keywords: ruthenium complex, antitumor, apoptosis

英文缩写词表

A549	人肺腺癌细胞
IC ₅₀	半数抑制浓度
Caspase	天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶
FACS	流式细胞术
CDDP	顺铂
PI	碘化丙啶
dppz	邻联吡啶并[3,2- <i>a</i> :2',3'- <i>c</i>]吩嗪
dpq	联吡啶喹啉
bpy	2,2'-联吡啶
phen	1,10-邻菲咯啉
Biim	2,2'-联咪唑
PBS	磷酸盐缓冲液
FBS	胎牛血清
MTT	四甲基偶氮唑盐
DMSO	二甲亚砜
TAM	它莫西芬
EDTA	乙二胺四乙酸二钠

原创性声明

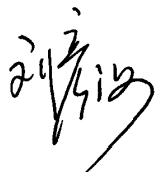
本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

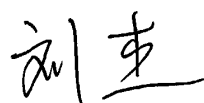
学位论文作者签名：刘彦强

日期：2008年6月14日

学位论文使用授权声明

本人完全了解中山大学有关保留、使用学位论文的规定,即:学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆、院系资料室被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,可以采用复印、缩印或其他方法保存学位论文。

学位论文作者签名: 

导师签名: 

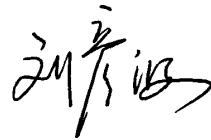
日期:  年 6 月 10 日

日期: 2008 年 6 月 10 日

知识产权保护声明

本人郑重声明：我所提交答辩的学位论文，是本人在导师指导下完成的成果，该成果属于中山大学化学与化学工程学院，受国家知识产权法保护。在学期间与毕业后以任何形式公开发表论文或申请专利，均需由导师作为通讯联系人，未经导师的书面许可，本人不得以任何方式，以任何其它单位作全部和局部署名公布学位论文成果。本人完全意识到本声明的法律责任由本人承担。

学位论文作者签名



日期：2008年6月0日

第一章 前 言

癌症对人类健康和生命的威胁很大。它和心血管疾患已成为医学上的两大难关。在全世界构成死亡原因的头两位。全世界每年约有 700 万人新患癌症，每年约有 500 多万人死于癌症，几乎每 6 秒钟就有一名癌症患者死亡。

最新调查显示，心脑血管病、恶性肿瘤是我国前两位死亡原因，分别占死亡总数的 22.45% 和 22.32%。我国目前每年平均约有 150 万人新患癌症，每年约有 80 万人死于癌症，其中肺癌、胰腺癌、肝癌、鼻咽癌、前列腺癌、恶性淋巴瘤等，近年来有上升的趋势，由于防癌措施的普及，宫颈癌、睾丸癌症、白血病等有下降的趋势^[1,2]。每年千万的经济损失上千亿元。

世界卫生组织（WHO）专家预计，2020 年新发癌症病例将达到 1500 万，死亡病例超过 1000 万，现患病例越过 3000 万。癌症将成为本世纪人类的第一杀手。

化学药物治疗是治疗肿瘤的主要方法之一。抗癌药物的研究经历了一个漫长的发展过程，尽管已对许多抗肿瘤药物的细胞目标有了一定了解，但对于药物与肿瘤作用后如何导致细胞死亡的确切机制尚不清楚。细胞凋亡是有机体主动采取的、由基因决定的并受到外界一些因素影响和制约的细胞自动结束生命的过程。研究发现各种抗癌药物引发细胞死亡的主要方式是细胞凋亡，从而使得细胞凋亡与癌症之间的关系及细胞凋亡在癌症治疗中的作用成为抗肿瘤研究的新焦点^[3,4]。肿瘤的发生及对治疗的耐受与细胞凋亡密切相关，深入探讨化疗药物作用机制，调控凋亡相关基因或相应因子，提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性，并特异性地诱导肿瘤细胞进入凋亡，是肿瘤治疗取得成功的关键^[5-7]。

1. 细胞凋亡研究及应用

1.1 细胞凋亡的概念及生物学意义

Carl Vog 在 19 世纪中期已经发现了细胞凋亡的现象。英国 Aberdeen 大学

病理系 Kerr 教授等根据多年的研究于 1972 发现一种不同于细胞坏死的形态学特征从而提出了细胞凋亡 (apoptosis) 的概念^[8-11]。细胞凋亡 (apoptosis) 一词希腊文的原义为 "falling off", 指像秋天的落叶样落下。细胞凋亡是机体维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主的有序性死亡。与细胞的坏死不同, 细胞凋亡不是一种被动的过程, 而是涉及一系列基因激活、表达以及调控等的主动过程, 是机体为了更好地适应生存环境而存在的一种死亡过程。细胞凋亡已经成为当今生命科学研究最前沿与最活跃的领域之一。

细胞凋亡与细胞坏死的主要区别^[8,12]见表 1-1 与图 1-1:

表 1-1 细胞凋亡与细胞坏死区别表

特征	细胞凋亡	细胞坏死
诱导因素	生理及弱刺激	强烈刺激
最初表现	蛋白质合成下降	肿胀
细胞数量	单个细胞丢失	成群细胞死亡
细胞形状	形成凋亡小体	破裂成碎片
细胞形态	细胞皱缩、断裂	溶解
膜完整性	保持到最后阶段	很早消失
线粒体	完整、自身吞噬	肿胀
染色质	致密、凝聚、边缘化	分解、稀疏、固缩
细胞核	早期固缩断裂	晚期破碎
核生化改变	DNA 片断化	弥散性降解
细胞器	无明显变化	肿胀、破坏
胞内容物	无释放	释放
胞质生化改变	溶酶体酶增多	溶酶体解体
DNA	核小体 DNA 断裂, 呈 180-200bp 整数倍大小, 的片段	随机大小碎片
基因控制	有	无
谷氨酰胺转移酶活性	升高	无变化
自吞噬	常见	缺少

潜伏期	数小时	没有
蛋白质合成	有	无
后果	不引起炎症反应	引起炎症反应
意义	生理性死亡方式	病理性死亡方式

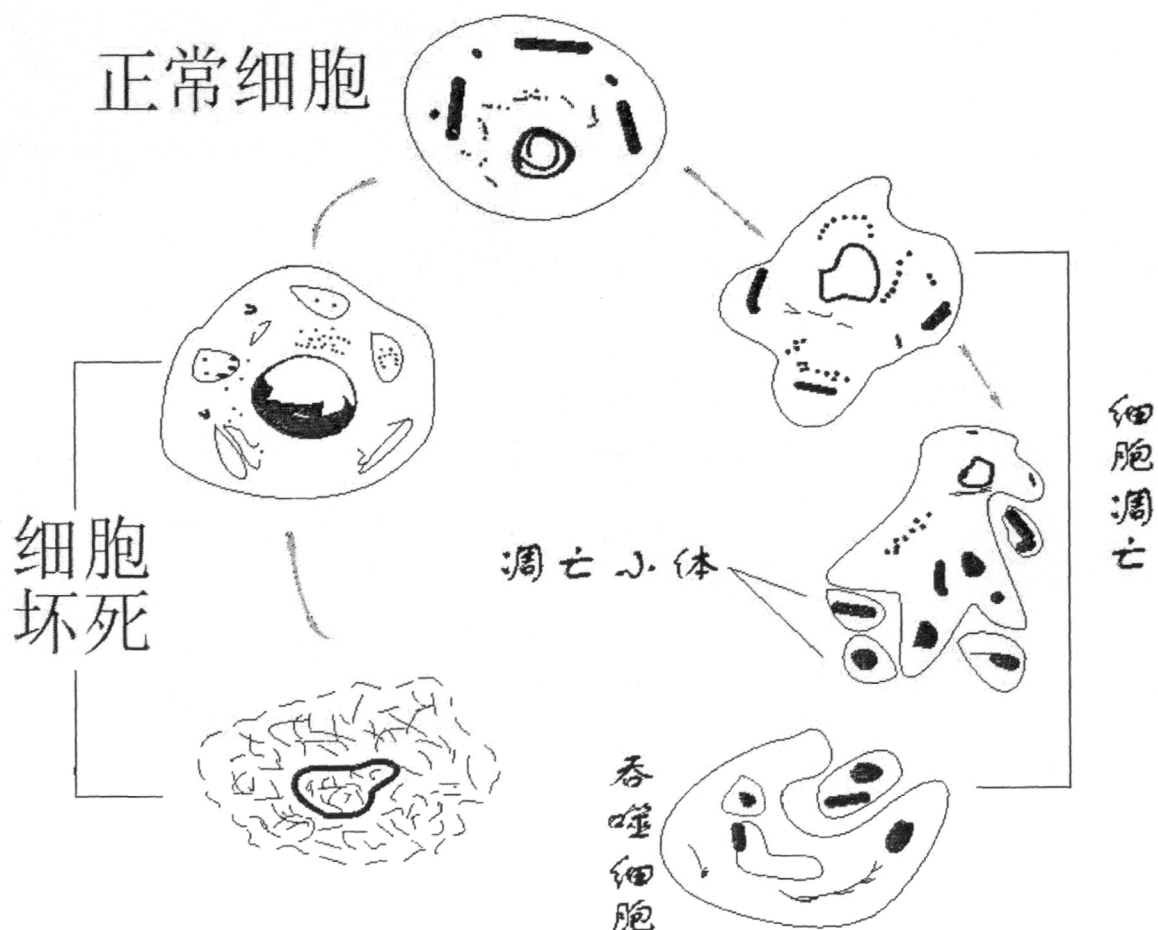


图 1-1 细胞凋亡与坏死的区别

随着对细胞凋亡研究的深入开展，大量的事实表明：细胞凋亡是维持人体正常生理过程和功能活动所必须的，因而具有重大的生物学意义^[13-16]，主要表现在：

- ①细胞凋亡在生物界普遍存在；
- ②细胞凋亡是多细胞生物生命活动中不可缺少的组成内容，是其以存活的需要，因而贯穿于全部寿命周期中，无论是低等还是高等动物都是如此；
- ③细胞凋亡是生物在进化过程中形成的细胞死亡方式。

细胞凋亡的作用主要包括以下几个方面：

- ①清除无用细胞，比如人脑在发育过程中有 95% 的细胞死亡^[17]；
- ②清除多余的细胞，比如人的肢体在发育过程中，最初手与足形是桨形，当一些多余细胞凋亡以后就形成了正常的指和趾^[18]；
- ③清除发育不正常的细胞，比如大脑中没有正确连接的神经元；
- ④清除已经完成任务的细胞从而维持细胞数量的稳定，比如在成年机体清除衰老细胞代之以新生细胞以及女性通过月经周期进行子宫内膜的脱落与更新^[19,20]；
- ⑤清除有害细胞，比如胸腺细胞在离开胸腺之前被诱导死亡，畸胎瘤的形成可能是未彻底凋亡的残留胚层结构^[21,22]。

当细胞凋亡受到抑制，会导致肿瘤的发生和各种疾病发生，而不适当的细胞凋亡激活(许多外源化学物质、药物和细胞因子等均可引发细胞凋亡)或细胞凋亡过度，是中风、心肌梗死、早老性痴呆、帕金森病、AIDS、Lycell 综合症、肝功能衰竭相关疾病、造血系统疾病等发生的重要原因^[17-22]。细胞凋亡与细胞增殖构成一对矛盾，我们可按它们的辩证关系，借助诱导药物干扰细胞凋亡过程，从而达到防治疾病的目标。

1.2 细胞凋亡的特征

1.2.1 形态学特征

凋亡细胞的形态学特征表现为细胞体积缩小、连接消失、胞质浓缩、细胞骨架解体，其中细胞核变化最显著。细胞核 DNA 在核小体连接处断裂成片段，且聚集形成浓缩的染色质块，在电镜下呈高电子密度^[13,23]。透明区的不断扩大，使染色质进一步聚集，核膜在核膜孔处断裂，两断端向内包裹将聚集的染色质块分割，形成核碎片^[24]。细胞质明显浓缩，大约为原体积的百分之七十。除内质网、线粒体外多数细胞器完整。在凋亡早期个别细胞内线粒体变大，表现为线粒体增殖，接着增殖线粒体发生空泡化；在多数情况下，凋亡细胞其内质网腔扩大；凋亡细胞的细胞骨架也发生改变，其疏松有序的结构变得致密紊乱。凋亡细胞细胞

膜其原有的微绒毛、细胞突起等特定的形状会消失^[24-26]。

1.2.2 生物化学特征

1.2.2.1 DNA 片段化

大多数细胞凋亡时,在核酸内切酶 I、核酸内切酶 II、Nuc-18 内源性核酸内切酶的作用下,核小体间的连接 DNA 被降解^[27,28],这种降解非常特异并有规律,所产生的不同长度的 DNA 片段约为 180-200bp 的整倍数,其 DNA 琼脂糖电泳呈特征性的梯状条带(ladder);而细胞坏死时 DNA 断裂为长度不一的片段,其琼脂糖凝胶电泳呈现弥散状(smear)^[29]。

1.2.2.2 胞浆钙离子与细胞凋亡

钙是人体中重要的元素,不仅发挥着调节细胞生长、分化基因表达,并且参与介导细胞凋亡的作用。Kaiser 在 1977 年报道了用糖皮质激素诱导细胞凋亡伴随有胞浆 Ca^{2+} 浓度的升高。Mcconkey 认为通过 Ca^{2+} 有两条诱导细胞凋亡的途径:一条途径是细胞内 Ca^{2+} 释放,细胞外 Ca^{2+} 回流,从而导致胞浆 Ca^{2+} 浓度升高启动细胞凋亡;另一途径 Ca^{2+} 释放破坏了细胞的稳定,由此细胞凋亡效应系统的成分接触了以往接触不到的基质,从而启动了细胞凋亡^[30]。胞浆 Ca^{2+} 浓度升高诱发细胞凋亡变化有信号转导、激活核酸内切酶、激活蛋白酶、激活转谷氨酰胺等方式^[31]。

1.2.2.3 胞浆 PH 值与细胞凋亡

研究表明,胞浆 PH 值的变化也会影响到细胞凋亡。细胞内酸化是细胞凋亡过程中的一种细胞内信号变化,它促进细胞凋亡受到以下几点支持^[32,33]:

- ①特异性 Na^+/H^+ 交换抑制剂通过抑制 Na^+/H^+ 交换体使细胞内酸化可诱导凋亡,除 Na^+/H^+ 交换器外, $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ 协同运输器与 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交换器的改变也与细胞凋

- 亡关系密切,细胞浆酸化程度与细胞凋亡发生率存在量效关系;
- ②单纯的碱处理通过减少胞内酸化程度而表现出对抗诱导剂诱导的细胞凋亡;
 - ③细胞内存在酸性核酸内切酶,细胞内酸化能激活该酶,触发核小体 DNA 断裂,该酶是细胞酸化介导细胞凋亡的一个重要物质基础;
 - ④许多与细胞凋亡有关的酶和蛋白质如转谷氨酰胺酶、酸性鞘磷脂酶、gelsolin 等的活性在酸性环境中增强;
 - ⑤细胞内酸化会影响细胞凋亡发生率。各种外界诱导物诱导细胞内酸化程度与细胞凋亡率相关,酸化的细胞易出现凋亡。紫外线诱导细胞酸化较弱,其凋亡细胞数也较少; Lovastatin 可以产生剂量依赖性的细胞内酸化与细胞凋亡。

1.2.2.4 线粒体与细胞凋亡

线粒体是真核细胞的重要细胞器,是动物细胞生成 ATP 的主要地点。它在细胞凋亡中处于核心地位,是细胞凋亡的调控中心。很长一段时间研究人员普遍认为细胞核才是细胞凋亡的主要目标,现在发现,细胞凋亡有细胞核和细胞质两条途径,线粒体在介导细胞凋亡方面起着重要作用^[34,35]。在核酸酶被激活之前即有线粒体跨膜电位耗散,线粒体跨膜电位一耗散,细胞就进入了凋亡过程;并且研究表明,如果稳定住线粒体跨膜电位即可阻止细胞凋亡^[35]。细胞凋亡时线粒体发生一系列与之密切相关的变化,通过其通透性升高影响细胞凋亡。与细胞凋亡密切相关的 Bcl-2 蛋白家族的功能与线粒体也有着紧密联系。射线、化疗药物等一些凋亡刺激因素,促使线粒体释放凋亡启动因子,包括细胞色素 C、凋亡诱导因子(AIF)、HtrA2 和 Smac/Diablo 等进入胞浆。细胞色素 c 在 dATP 存在的情况下,结合凋亡蛋白酶激活因子 1 (Apaf-1),使 Apaf-1 暴露其上的 CARD 基序,从而可以结合 caspase-9,并使其激活。caspase-9 一旦激活,就启动凋亡级联反应^[36,37]。

1.3 细胞凋亡的过程

细胞凋亡的过程可分为四个阶段(见图 1-2):凋亡信号转导、凋亡基因的激活、

细胞凋亡的执行及凋亡细胞的清除。负调控因子存在于整个细胞凋亡过程，形成了完整的反馈环路，以精密调节细胞凋亡过程。细胞凋亡过程需要几分钟到数小时不等。

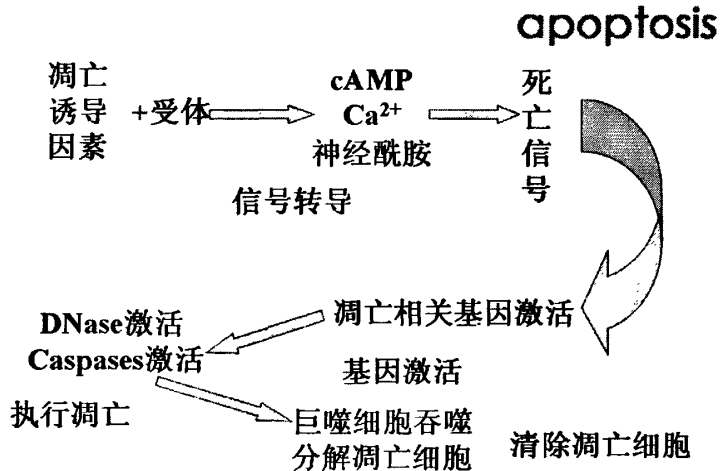


图1-2 细胞凋亡的基本过程

1.4 细胞凋亡的基因调控

在细胞凋亡的分子生物学研究过程中，发现细胞核内的 DNA 的一些基因参与了细胞凋亡的基因调控，比如 *ced* 基因、*bcl-2* 基因、*p53* 基因、*Fas/Apo* 基因及 *c-myc* 基因等^[14]。

ced 基因：与线虫的细胞凋亡有关的 3 个基因，即 *ced-3*、*ced-4* 和 *ced-9*，这些基因与线虫胚胎发育过程中一百多个注定要凋亡的细胞全部有关^[38]。其中 *ced-3* 和 *ced-4* 被称为“死亡基因”，它们的作用是使细胞进入凋亡，其中任何一个基因发生突变均会抑制所有的细胞凋亡；而 *Ced-9* 是细胞凋亡的负调控基因，它阻止细胞进入凋亡，故被称之为“生存基因”^[39,40]。

Bcl-2 基因：*Bcl-2* (B-cell lymphoma/leukemia-2, *bcl-2*) 基因即细胞淋巴瘤白血病 2 基因是 Tsujimoto 等 1984 年从与滤泡性淋巴瘤细胞瘤相关的 t(14;18) 染色体易位的断裂点克隆到的一种癌基因，一般认为 *bcl-2* 通过抑制诱导细胞凋亡的信

号而在肿瘤发生中起作用，而且 bcl-2 还可以防止或延迟辐射、热休克及一些化疗药物所诱导的细胞凋亡^[41-43]。Bcl-2 家族成员中的 Bcl-2、Bcl-X_LAl、Mcl-1、Ced-9、BHRF-1、LMW5-HL、E1B19K 抑制细胞凋亡，而 Bcl-X_S、Bax、Bak、Bad 促进细胞凋亡。Veux 于 1988 年首次报道 Bcl-2 蛋白功能的研究，指出 bcl-2 的过度表达使前 B 细胞在失去生长因子后增长了寿命。由于 Bcl-2 蛋白高表达可保护细胞死亡，故 bcl-2 基因被认为是对细胞凋亡具有明显抑制作用的癌基因。它通过阻止细胞死亡的最后途径如核苷酸内切酶对 DNA 的降解而选择性的干扰细胞死亡^[43,44]。Bcl-2 的过度表达不仅在缺乏生长因子状态下延缓细胞死亡，并且可明显的抑制化疗药物、射线、热休克、某些病毒、自由基、谷氨酸盐、钙、TNF、去除葡萄糖、生长因子、ced-9 突变、过氧化氢等激发的细胞的凋亡。根据其实验中未出现细胞变小、染色质聚集等形态学特征，认为其抑制细胞凋亡应当发生在早期。Bcl-2 调节细胞凋亡的确切机制一般认为有多种途径共同作用^[41-45]：①Bcl-2 可以通过改变细胞内的钙离子流抑制细胞凋亡；②通过起抗氧化剂的作用或抑制氧自由基产生抑制细胞凋亡；③通过在核转运中发生作用，改变 P53 等细胞周期调节蛋白的核-胞浆转动，与 myc 封闭 P53 进入核，进而阻断 P53 诱导的细胞凋亡；④Bax 表达水平增加可促进细胞凋亡并抵抗 Bcl-2 的作用，Bcl-2 与 Bax 结合，进而抑制细胞凋亡；⑤Bcl-2 具有作为蛋白通道和作为适配子/停泊蛋白的双向功能，可通过 CED-4 作用调节 caspases 及调节线粒体通透性转变抑制细胞凋亡。

P53 基因：1979 年 Linzer 等在哺乳动物细胞中发现与 SV40 大 T 抗原结合的蛋白，其分子量为 53kD，即以命名为 p53。p53 基因是突变频率最高的抑癌基因，约有百分之六十的肿瘤中有其突变，Science 杂志于 1993 年将其评为“年度分子”^[46-49]。大量研究表明，p53 基因与细胞凋亡关系密切。P53 蛋白主要集中于核仁区，能与 DNA 特异结合，其活性受磷酸化调控。正常 P53 的生物功能好似“基因组保护神”，在 G1 期检查 DNA 损伤点，监视基因组的完整性。当其受到损伤时，P53 蛋白阻止 DNA 复制，以提供足够的时间使损伤 DNA 修复；当其修复失败时，P53 蛋白则引发细胞凋亡；如果 p53 基因的两个拷贝都发生了突变，对细胞的增殖失去控制，导致细胞癌变，突变的 p53 基因，失去通过 p21、p16 和 p15 阻断细胞周期于 G0 期及进而诱导细胞凋亡的能力，致使机体内的 DNA 受损细

胞不能发生凋亡, 导致无法从机体排除受损细胞^[49,50]。同时, 它还可通过调节 bcl-2 家族和 bax 基因的表达来影响细胞凋亡。化疗药物、放射线、热休克治疗等因素诱导的细胞凋亡均有 p53 基因的参与, 比如当小鼠胸腺细胞缺乏 p53 基因时可抵抗射线诱导的细胞凋亡。美国霍华休斯医学研究所 (Howard Hughes Medical Institute) 和冷泉港实验室 (Cold Spring Harbor Laboratory) 尝试着在已经发生肿瘤组织的实验动物身上重新激活肿瘤细胞的 p53 基因。研究人员利用不同种类的肿瘤细胞株, 在确定 p53 基因功能失效的前体下, 重新激活 p53 基因。结果在不同的癌细胞上发现了不同的反应: 肝癌细胞和淋巴癌细胞因为 p53 的再度活化而消失, 但可以恶性滋生的肉瘤细胞没有多大的影响^[15,16]。研究人员表示, 这个意外发现的抑癌效果开启了一个以 p53 基因治疗做为对抗肿瘤恶性滋生的一个治疗策略。

Fas 基因: Fas 是肿瘤坏死因子受体和神经生长因子受体家族的细胞表面分子。Fas 分子中 EXT、DD、RR 等三个结构域与细胞凋亡诱导功能关系密切^[51]。EXT 只结合抗 Fas 抗体或 FasL, DD 结构域由 68 个氨基酸组成, 一旦发生缺失、突变或被显性负调分子阴截, 就会使 Fas 细胞凋亡诱导功能马上失去^[52]。RR 结构域由 15 个氨基酸组成, 可结合 Fas 功能相关磷酸酶, 从而抑制 Fas 之细胞凋亡的诱导作用。Fas 系统参与排除正常活化的淋巴细胞和病毒感染的细胞^[53]。Fas 和 FasL 功能丧失可导致淋巴细胞积聚, 从而导致自身免疫疾病。Fas 诱导的细胞凋亡有如下特点:

- ①细胞质、细胞核固缩出现, 并形成了片段;
- ②凋亡与细胞核、细胞外钙离子和细胞内大分子合成不相关;
- ③bcl-2 的高表达可以抑制 Fas 所诱导的凋亡作用。

C-Myc 基因: c-myc 最先发现于含有鸟骨髓瘤病毒 MC29 的转化基因的同源器官中, 其定位于动物第 8 号染色体, 编码两个磷酸蛋白。c-Myc 的主要作用是参与转录, 其在转录过程中可以激活启动从而诱导细胞周期进程与分化, 也可以抑制启动从而导致阻止细胞分化, 故其既是激活子也是抑制子^[54]。当有生长因子存在时, 细胞就表现为大量增殖; 若生长因子缺乏时, 由进入凋亡状态, 有抑癌基因存在时, 其表达将会促使细胞发生凋亡^[55]。在多种肿瘤中常有 c-Myc 基因的高度表达, 这表明其过度表达是细胞恶化过程中的重要一环。c-Myc 的主要

功能是促进细胞分裂，当其表达受到抑制，将会抑制细胞的增殖。在 c-Myc 诱导的成纤维细胞凋亡中观察到其表达会使 p53 表达增加^[55]。

其它相关基因：ICE 基因家族、R-ras 基因（p23）、Apo 基因、jun 基因、fos 基因、myb 基因等也与细胞凋亡密切相关。

1.5 细胞凋亡的酶学基础

1.5.1 核酸内切酶

细胞凋亡的机制复杂,涉及到基因调控、信号分子传导、细胞内代谢变化等一系列因素,形成错综复杂的调控网络。然而越来越多的证据表明,凋亡刺激引起的蛋白酶级联反应在凋亡发生过程中居核心地位。核酸内切酶(DNase)是最早被发现与细胞凋亡有直接关系的酶,它在细胞凋亡中起到至关重要的作用^[56]。核酸内切酶被激活,使染色质 DNA 在核小体处断裂,形成核酸寡聚体片段是已被公认并经常据此来判断细胞凋亡的生化特征^[57]。细胞凋亡中核酸内切酶对 DNA 降解一般认为是分三步进行:首先 300kb 或更大的 DNA 片段形成,组成六聚体的花球结构;第二步是它们进一步降解成 50kb 左右的 DNA 片段环;最后形成更小分子的核小体间的梯状 DNA 的出现。其中只有第三步才是细胞凋亡所特有。

所有的核酸内切酶均可以使 DNA 断裂,并产生 180-200bp 或其整数倍的 DNA 片段,但是在不同细胞系时适宜条件不同。参与细胞凋亡的核酸内切酶按活性可分为二价金属离子依赖性核酸内切酶和二价金属离子非依赖性核酸内切酶。

1.5.1.1 二价金属离子依赖性核酸内切酶

脱氧核糖核酸内切酶 I (Dnase I) 是一种分泌性消化酶,降解的 DNA 条带形成 3'-OH 末端,与细胞凋亡中 DNA 片段化产物末端相同。它是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 依赖性的,适宜 PH 值为 7.0-8.0,最适宜 PH 值为 7.5。Dnase I 在细胞内主要存

在于胞浆的内质网以及高尔基体。细胞凋亡时, **Dnase I** 从细胞质进入到细胞核, 所以细胞凋亡早期内质网等细胞器和核膜仍然完整^[58]。

NUC18 是 **Gaido** 等从糖皮质激素诱导的大鼠胸腺细胞凋亡时分离出来的一种中性核酸内切酶, 由于其分子量大约为 18kD, 故被称作 **NUC18**^[59]。是一种 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 依赖性核酸内切酶, Zn^{2+} 、金精三羧酸(ATA)和二价金属离子螯合剂能抑制 **NUC18** 活性。

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 核酸内切酶 **Ribeio** 等从人类脾脏细胞中分离出的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 依赖性的核酸内切酶^[60]。它分布于细胞核中, 分子量 27000 左右, 适宜的 PH 值为 8.0。也能被 Zn^{2+} 所抑制, 不能被 G 动蛋白抑制, 而能被 ATA 抑制。

Dnasey 是 **Shiokawa** 等从大鼠胸腺细胞中分离出来的, 它与 **NUC18** 相似, 位于细胞核, PH 要求也与 **NUC18** 相似^[61]。**DNasey** 不同于 **DNase I**, G 动蛋白不能抑制其活动, 加之其特有的分子质量和适宜的 pH 值都表明 **DNasey** 是一个参与细胞凋亡的新的二价金属离子依赖性核酸内切酶。

NUC70 核酸内切酶是 **Urbano** 1998 年鉴定的一种仅见于人体造血细胞的分子量为 70KDa 的核酸内切酶, 在药物诱导下引起人造血细胞凋亡。它与分离的海勒

细胞共同孵育时, 还能引起该细胞产生 DNA 片断化, 它是一种 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 依赖性的内切酶, 适宜 PH 值为 6.0-8.0。**NUC70** 分布在细胞质内, 凋亡早期从细胞质转移到细胞核^[62]。

1.5.1.2 二价金属离子非依赖性核酸内切酶

二价金属离子非依赖性核酸内切酶主要是指 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 非依赖性核酸内切酶。脱氧核糖核酸内切酶 II (**Dnase II**) 主要存在于溶酶体, **Dnase II** 编码 360-364 个氨基酸, 分子量约为 40-60kD^[63,64]。它不需要 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的激活, 并且在酸性 pH 的情况下具有最大的活性。细胞发生凋亡时, 它对 DNA 酶切产生 5'-OH^[64]。研究表明, 均一纯化的 **Dnase II** 可导致某些细胞如中国仓鼠卵细胞染色质降解与细胞凋亡。

1.5.2 蛋白激酶

蛋白激酶 (protein kinase, PK) 是一类催化蛋白质磷酸化的酶, 体内蛋白激酶种类很多^[15,65]。

蛋白激酶 A (PKA) 全酶分子是由四个亚基组成的四聚体, 其中两个是调节亚基, 另两个是催化亚基。蛋白激酶 A(PKA) 有时可诱导细胞凋亡, 有时有可抑制细胞凋亡^[66]。

蛋白激酶 B (PKB) 又称 ATK, 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶, 分子量 60KD, 目前分为 PKBa、PKB β 、PKB γ 三类。蛋白激酶 C(PKC) 由其活性依赖于 Ca^{2+} 而得名。蛋白激酶 B 对抗细胞凋亡起着重要的调节作用。蛋白激酶 B 的抗细胞凋亡机制主要涉及: 磷酸化 FoxO 降低其与凋亡有关的转录活性; 使凋亡抑制剂存活蛋白(survivin)的表达增加; 使 NF- κ B 活化并转位入核, 启动抗凋亡基因的转录; 使胱天蛋白酶-8(caspase-8)抑制剂 FLIP(FADD-like ICE inhibitory protein)的表达增加; 磷酸化 MDM2 使其转位入核进而抑制 p53 的促凋亡作用; 使糖原合成酶激酶 3 失活; 磷酸化 Bad 使其与 Bcl-2 或 Bcl-XL 解离而抗细胞凋亡; 直接磷酸化胱天蛋白酶-9 使其激活下游胱天蛋白酶的能力降低^[67]。

蛋白激酶 C(PKC)的作用主要是促进细胞的增殖与分化, 抑制细胞凋亡。PKC 活化剂佛波豆冠乙酯、伴刀豆蛋白 A 可抑制细胞凋亡的发生, PKC 的抑制剂它莫昔芬 (TAM)、叉孢素 (staurosporine) 诱导的大鼠与小鼠胸腺细胞凋亡, PKC 是细胞凋亡信号的重要参与者。在细胞生长信号转导通路中发挥重要作用, 参与细胞增殖、生长、分化和凋亡的调节^[68]。

DNA 依赖性蛋白激酶 (DNA-PK) 是一种位于细胞核的哺乳类蛋白质丝/苏氨酸激酶, 它由两部分 DNA-PKcs 和 Ku 组成^[65]。由于其激活需要 DNA 片段与之结合, 所以被命名为 DNA 依赖性蛋白激酶。DNA-PK 主要参与损伤 DNA 的修复, 参与维持细胞结构与功能的完整, 其对细胞凋亡起负调控作用。DNA-PK 在细胞凋亡过程中是 caspase-3 的作用底物, 而 caspase-3 主要催化 DNA-PKcs 降解与断裂, DNA-PKcs 的断裂会使细胞对 DNA 修复能力下降, 加速与细胞凋亡的 DNA 降解与断裂^[15]。

1.5.3 Caspases 蛋白酶

白细胞介素 1 β 转化酶 (interleukin-1 β -converting enzyme, ICE), 是一种与细胞凋亡密切相关的蛋白酶。哺乳类 ICE 家族蛋白酶与线虫主要死亡基因 *ced3* 编码的蛋白 CED 约 29% 氨基酸序列完全一样, 故被归类在同一家族, 称为 ICE/CED-3 家族^[69]。Caspases 是这类系列化蛋白酶的总称与词根。Pro-ICE 含有 404 个氨基酸, 相对分子质量为 45KDa, 在一定条件下可自身催化产生 20KDa 和 10KDa 两个片段, 聚合形成 (p20)₂(p10)₂ 杂四聚体, 成为活化的 ICE, 然后两大两小四个片段再聚合成含有两个活性化位点的一个活化分子^[70-72]。Caspases 是半胱氨酸基天冬氨酸-特异性蛋白酶 (cysteiny aspartate specific proteinase) 即半胱氨酸天冬氨酸酶 (cysteine aspartase) 的缩写。目前 Caspases 家族成员已经有十多种被发现。在哺乳动物的细胞凋亡中, Caspases 起着十分重要的作用, 是与细胞凋亡最相关的蛋白酶, 被看作是凋亡通路的中心执行者。半胱天冬酶存在细胞外和细胞内两条激活途径, 每条途径有各自对应的半胱天冬酶。其中 caspase-3 在细胞凋亡过程中处于核心地位, 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 由于在蛋白酶级联切割过程中可能发挥着非常重要的作用, 所以它又被称作 Yama (印度传说中的死亡之神)。caspase-3 基因转染昆虫 Sf9 细胞后引起细胞凋亡, 这个过程可以被 BCL-2 阻断; 在发生凋亡的细胞提取液中去除 caspase-3 后, 这些提取液就失去了诱导细胞凋亡的能力; 再加入纯化的 caspase-3 它就又恢复了致凋亡的功能。其他 caspase 蛋白酶也不同程度地参与了细胞凋亡的过程。

Caspases 在细胞凋亡中发生的作用主要是^[69-73]。

- ① 灭活细胞凋亡的抑制物, 如可裂解阻止细胞凋亡发生的 Bcl-2 蛋白;
- ② 水解细胞的蛋白质结构, 破坏重组细胞骨架, 阻止 DNA 修复与复制, 导致细胞解体, 形成凋亡小体;
- ③ 在 caspases 级联反应中水解相关活性蛋白酶, 导致细胞损伤, 比如外界信号作用于 caspase 前体, 前体可使蛋白酶激活因子活化, 后者又使蛋白酶效应因子活化, 然后作用于核层蛋白等底物蛋白, 使蛋白分解而引起了细胞凋亡。

1.5.4 转谷氨酰胺酶

转谷氨酰胺酶 (TGase) 是一个 Ca²⁺ 依赖性的酶家族, 其基本作用是保护细

胞与组织的完整性,可催化酰基转移反应,使翻译后的多肽链形成交联蛋白^[74]。TGase 家族包括组织型转谷氨酰胺酶 (tTG)、角化细胞转谷氨酰胺酶、表皮转谷氨酰胺酶和凝血因子等。其中组织型 TGase (tissue TGase,tTG) 与细胞凋亡关系最为密切,在多数细胞凋亡过程中表达水平明显增高,其表达升高亦可作为细胞凋亡的标志之一。以维甲酸转染纤维母细胞、神经母细胞瘤细胞等细胞,使它们的 tTG 过表达,其细胞凋亡速率显著增加。tTG 的高表达可增强对细胞凋亡的敏感性。研究表明,tTG 包含一个 Bcl-2 家族 BH₃ 结构域。具有该结构域的多肽,能够诱导 Bax 构象的改变并向线粒体移位,引起线粒体去极化,释放细胞色素 C,最终引发细胞凋亡^[75,76]。

1.5.5 其他与细胞凋亡相关的酶

聚(腺苷二磷酸-核糖)多聚酶 [poly (ADP-ribose) polymerases,PARP] 是存在于多数真核细胞中的一个蛋白质翻译后修饰酶。PARP 可能启动了细胞从损伤到死亡的信号传递途径,通过 caspases、p53 等分子级联反应,从而使细胞凋亡^[77]。

一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase,NOS) 可分为诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和结构型一氧化氮合酶 (cNOS) 两类。大量事实表明,影响和调控细胞凋亡的 NOS 为 iNOS^[13,15]。

丝氨酸蛋白酶、钙依赖性的中性蛋白酶、纤溶酶原激活物、泛素介导的蛋白酶等均与细胞凋亡有关^[76-78]。

1.6 细胞凋亡与肿瘤

肿瘤的发生是由于正常的调控机制丧失,细胞的异常增殖,细胞死亡速度下降及死亡平衡失调所致。细胞凋亡是一切生物胚胎发生过程及人类发育过程中细胞清除的正常途径,当这一过程紊乱时将会导致发育异常和许多严重疾病。许多事实表明,肿瘤的发生与细胞凋亡有密切关系。细胞凋亡在肿瘤的发生发展中负调控作用,当它受到抑制时,细胞的增殖与凋亡的平衡被破坏,细胞数目持续

增多，为肿瘤的形成打下了基础^[79,80]。随着科技的发展，肿瘤中细胞凋亡的研究越来越受到关注与重视。

1.6.1 肿瘤发病学中细胞凋亡的机制

肿瘤发病学中细胞凋亡的机制^[81]可能有：

- ①诱导细胞凋亡的基因失活突变或抑制细胞凋亡的基因过度表达；
- ②化学致癌物、病毒通过影响凋亡机制而致癌；
- ③前癌细胞凋亡机制不健全；
- ④机体免疫应答诱导肿瘤细胞凋亡的功能不全；
- ⑤宿主因子抑制肿瘤细胞凋亡；
- ⑥肿瘤细胞逃避凋亡，促进转移和演化。

可以预见，诱导细胞凋亡将成为肿瘤治疗的新策略。正在研究的有放射线、抗癌药物、激素应用或撤退、基因及其产物、免疫细胞、单克隆抗体及细胞因子、中药、高浓度氧、高热、光动力治疗、电化学疗法等诱导细胞凋亡的方法。

1.6.2 各种肿瘤与细胞凋亡

胃癌：在世界范围内，胃癌发病率在男性占恶性肿瘤第2位，仅次于肺部；在女性是第4位。20世纪我国的两次全国性死因调查中，胃癌均是我国第一位的恶性肿瘤。我国每年死亡胃癌病人约36万，现患胃癌病人约60万，其死亡率占恶性肿瘤死亡总数的23.93%^[1]。常用的治疗药物5-氟尿嘧啶(5-FU)、顺铂(CDDP)、蒽环类的多柔比星与表柔比星及吡柔比星等。Ishida等以TdT介导的dUTP末端平移标记法检测到胃癌存在细胞凋亡，他们认为细胞凋亡在胃粘膜发生肠上皮等病变中起决定作用，从而参与肿瘤的形成。胃癌的细胞凋亡主要由bcl-2基因家族、p53基因、c-myc基因家族和Fas基因家族调节^[82]。不同种类的胃癌存在不同的细胞凋亡调控基因表达及细胞凋亡指数，表明不同类型的存在着不同的细胞凋亡机制，比如P53表达与肠型胃癌正相关，但与弥漫型胃癌无关；肠型胃癌没有Fas表达，但弥漫型胃癌有高水平Fas表达^[83,84]。

大肠癌：大肠癌是常见的恶性肿瘤,发生率高居全球恶性肿瘤第四位,年累及人数超过 100 万,死亡数超过 50 万。我国大肠癌死亡数占癌症总死亡数的 4.9%-5.29%,是癌症死亡率的第 3-5 位,其中湖南比例最高,河南最低。化疗药物、射线、抗体、缺氧、短链脂肪酸等因素均可以诱导大肠癌细胞凋亡^[1,2]。细胞凋亡率以正常大肠黏膜组织中最高, FAP (家族性腺瘤性息肉病) 次之,随后为散发性腺瘤,腺癌最低,说明在大肠癌形成过程中细胞凋亡调节逐渐减弱。与大肠癌细胞凋亡相关的基因主要有 bcl-2、野生型 p53、APC 基因、DCC 基因等。目前大肠癌诱导细胞凋亡治疗的主要靶点集中在环氧化酶-2、死亡受体、Bcl-2 家族成员以及 IAP 等方面^[85-87]。常用来治疗大肠癌的药物有氟尿嘧啶 (5-FU) 及其衍生物、草酸铂或奥沙利铂等第三代铂类药物、喜树碱类药。

肝癌：我国为肝癌高发国家,占全世界肝癌的 50%以上。从 20 世纪 90 年代起,肝癌在我国肿瘤死亡中占第二^[1,2]。实验证明,细胞凋亡与肝癌生长呈负相关。肝癌细胞组织培养时,在广泛轻微损伤或受刺激时可诱导肝癌细胞凋亡。肝癌细胞凋亡的诱导因素^[88-90]有:

- ①内源性调节蛋白: 细胞因子和针对 Fas 抗原的抗体; 转化生长因子 β 。
- ②外源性化学物质: 苯亚甲基抗坏血酸钠、硝酸铅、毒胡萝卜素、乙醇等。
- ③与治疗相关的致凋亡原: 顺铂、它莫西芬、丝裂霉素、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、维苯甲酸等化疗药物; 放射治疗; 高热、微波。
- ④其他原因: 营养缺乏, 胆汁介导, 缺血、缺氧、再灌注损伤, HBV、HCV、HIV、EBV、CMV 等病毒, 免疫介导, 比如小柴胡汤等中草药介导。

绝大多数上市的化疗药物都曾用于肝癌的化疗,但很少有超过百分之二十缓解率。所以开发新药物还任重道远。

乳腺癌：乳腺癌是全球女性的第一号健康杀手,目前全球大约有 100 万乳腺癌患者。我国是世界上发病率较低的地区,但近年来发病率持续上升,每年以 3% 的速度增长,在北京、上海、广州等大城市发病率更高,已经成为我国城市女性名副其实的第一杀手。

导致患乳腺癌的主要因素^[1,2]有:

- ①遗传因素, 母亲、姐妹、女儿等家庭成员中有患乳腺癌的人, 其发病几率比其他人高出四倍;

- ②激素暴露史，既是其生理周期的长短以及生育、哺乳状况，未曾生育、哺乳的患病的几率高；
- ③饮食结构，生活节奏和情绪因素。长期情绪紧张、过度劳累都会导致身体激素水平发生变化，增加得病几率；
- ④环境因素，辐射以及环境激素污染等是致使发病的诱因。

30%-50%的乳腺癌患者携有突变型 P53,另外约 30%的患者携有非功能野生型 P53。Bcl-2 和 P53 在乳腺癌中呈相反关系。Bcl-2 在乳腺组织中几乎都有表达，bax 在正常乳腺细胞中有强表达，但在乳腺癌细胞中表达微弱，低水平的 bax 与正常的 Bcl-2 和 Bcl-x 结合，破坏细胞内稳态，导致细胞积聚，易于二次突变从而引发肿瘤^[91]。研究发现 bcl-2 蛋白在正常乳腺组织、癌前病变及乳腺癌中表达随着乳腺组织恶性程度增加其表达呈逐渐上升的趋势。这一结果表明 bcl-2 蛋白表达与乳腺组织恶性改变有一定关系。结合细胞凋亡进行分析,发现凋亡细胞多, bcl-2 蛋白表达低,且 bcl-2 蛋白表达与细胞凋亡指数呈负相关,可认为 bcl-2 蛋白对细胞凋亡起抑制作用^[92]。所以乳腺癌的起源与细胞凋亡失调有关。化疗药物主要是通过激发细胞凋亡来提高疗效，它莫昔芬（TAM）、芳香化酶抑制剂是常用来治疗乳腺癌的化学药物。

子宫颈癌：子宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一，它是全球妇女中仅次于乳腺癌的第二个最常见的恶性肿瘤。全世界每年约有 50 万新发子宫颈癌病例，中国约 15 万例，全世界每年约 23 万妇女死于宫颈癌，中国约 8 万。研究表明，宫颈癌发生与人乳头状瘤病毒（HPV）感染有直接关系^[93]。HPV16/18E6 与抑癌基因 P53 结合，很快 p53 基因就会变性，阻止了野生型 P53 刺激导致的细胞凋亡。与宫颈癌密切相关的 HPV 染色体组，可以激活 c-myc 基因使 P53 变性，从而抑制细胞凋亡，此可能是 HPV 诱发宫颈癌的机制。目前常用的化学治疗药物有顺铂、异环磷酰胺。

食管癌：我国是食管癌高发国家，又是死亡率最高的国家，全球一半以上食管癌患者为中国人。据估计我国每年有 16 万-20 万食管癌患者死亡。食管癌的病因有：亚硝胺类化合物和真菌毒素；食管损伤、食管疾病以及食物的刺激作用 食管损伤及某些食管疾病；营养不良和微量元素缺乏，摄入动物蛋白不足和维生素 A、B2、C 缺乏；遗传因素；肥胖因素等。研究表明，食管癌是多种癌基因和抑

癌基因突变积累的结果,多种环境因素引发了食管癌^[94]。将 c-myc 癌基因反义 RNA 导入食管癌细胞可以有效抑制细胞增殖并诱导食管癌细胞凋亡。在基因水平治疗食管癌方面也显示出了诱人的前景^[95]。顺铂、卡铂、紫杉醇、氟尿嘧啶、长春酰胺、丝裂霉素等是常用来治疗食管癌的化学药物。

白血病:白血病是造血干细胞在分化成熟过程中的某一阶段停止分化所致,是细胞死亡被抑制,而细胞的增殖率相对升高的病态。白血病细胞凋亡可由去除存活因子,细胞毒剂的治疗引起。而存活因子,突变型 P53 和 bcl-2 可抑制细胞凋亡并增强癌症产生的可能^[96]。已经发现粒细胞性白血病细胞中 bcl-2 表达水平与细胞对凋亡诱导剂的敏感性有关,而 C-myc 则无关。

前列腺癌:前列腺癌发病多见于老年人,我国是前列腺癌发病率低的国家,但是近年来发病率在升高。前列腺癌患者应用激光治疗之后 bcl-2 均有表达,正常生长与肥大的前列腺细胞的 bcl-2 表达仅限于基底细胞,说明细胞凋亡受抑在前列腺癌发生中十分重要^[97]。研究表明,抗癌药物的疗效不仅取决于药物与靶细胞的相互作用,还取决于药物诱导细胞凋亡的能力^[98]。

肺癌:肺癌是现今各国常见的恶性肿瘤,已经成为大多数国家因癌症死亡的首要原因,是发病率、死亡率增长最快,对人类健康和生命了大的恶性肿瘤,其发病率与死亡率十分接近。我国最新的第三次居民死亡原因调查显示,肺癌已经取代肝癌成为我国恶性肿瘤首位死亡原因,30 年来竟然增长了近五倍。吸烟是一个导致肺癌的重要因素,其燃烧时肺癌会产生与肺癌相关密切的多环芳香烃类化合物、芳香胺、苯、丙烯等。烟雾中的致癌物质通过不同的机制,导致支气管上皮细胞 DNA 损伤,某些癌基因的激活与抑癌基因的突变及失活,从而导致细胞遗传信息改变,最终细胞转化、癌变^[99]。其中存在多种基因突变的基因损伤,目前关于 myc(c-myc、N-myc、L-myc)基因家族、ras(K-ras、H-ras、N-ras)基因家族、p53 基因研究较多。Myc 基因突变使蛋白质持续表达,促使细胞生长,研究发现,几乎所有的小细胞肺癌和大多数非小细胞肺癌患者存在 myc 基因的过度表达^[100]。12,13,16 位点是 ras 基因常发生突变的位点,由于突变,ras 蛋白转化的潜能,传递持续性促进有丝分裂的信号,促使癌的形成。Ras 基因突变主要见于非小细胞肺癌中,此类患者出现这种突变的几率为百分之二十到三十。K-ras 基因突变与吸烟高度相关^[101]。P53 突变主要有误译突变、mRNA 连接错误、基

因缺失,小细胞肺癌和非小细胞肺癌患者均有一半以上有 p53 突变,与 K-ras 不同的是,非小细胞肺癌患者与吸烟并不明显相关。

膀胱癌:早期衰竭的膀胱癌患者,抗细胞凋亡的基因 bcl-2 表达高于促进细胞凋亡的基因 bax。在对膀胱移行上皮癌的凋亡标记时发现,正常膀胱上皮、I、II 级的移行上皮癌的细胞凋亡率大大低于 III 级的移行上皮癌^[102]。这说明膀胱癌 III 级细胞凋亡率虽高,但其细胞的增殖率更高。

鼻咽癌:鼻咽癌占头颈恶性肿瘤的首位,其发病率以中国的南方较高,全世界大约 80% 的病例发生在中国南方。如广东、广西、湖南等省,特别是广东的中部和西部的肇庆、佛山和广州地区更高。大部分鼻咽癌发生在 45-54 岁年龄之间,严重影响劳动力健康。流行病学调查提示鼻咽癌的病因可能与 EB 病毒感染、环境、饮食和遗传等因素有关。研究发现采用细胞凋亡原位检测技术(TUNEL)发现鼻咽癌组织中出现自发的细胞凋亡。尽管其凋亡率明显低于正常鼻咽粘膜组织,但说明鼻咽癌患者肿瘤内细胞凋亡机制仍然存在,只是增殖速度超过细胞凋亡,导致肿瘤继续发展^[103]。研究表明,鼻咽癌中 p53 基因突变率比较高,其突变以第 273 密码子为突变热点,该突变点为鼻咽癌发病过程中的必要因素,并用在鼻咽癌组织中有 bcl-2 的过度表达^[104]。鼻咽癌治疗目前主要采用放射治疗、外科手术治疗和化学药物治疗等方法。

肾癌:我国肾脏肿瘤在泌尿男生殖系肿瘤中发病率仅次于膀胱肿瘤,近年来患病人数日益增多,每年新增肾癌患者 2-3 万例。肾脏位置隐蔽,肾癌早期局限于肾脏实质,所以早期不易发现与诊断。研究表明,在肾癌的发生发展过程中,均有细胞凋亡的存在^[105,106]。多数研究认为,肾癌组织比正常成年人肾脏的 Bcl-2 表达增高。研究证实,肾癌中 c-myc 呈现高表达, c-myc 基因编码 c-myc 蛋白可与 Max 蛋白形成二聚体,成为既可以激活细胞增殖的基因,又可成为激活细胞凋亡的基因^[107]。大多数研究者认为,肾癌细胞中既无 p53 蛋白表达,也很少见 p53 基因突变。

1.7 细胞凋亡的检测

1.7.1 形态学观察

1.7.1.1 普通光学显微镜观察

在倒置显微镜下可观察到凋亡细胞细胞膜完整，细胞体积变小并皱缩，并且有凋亡小体产生。采用 HE（苏木素-伊红）染色法时，可以观察到凋亡细胞在组织中常单个散在分布，细胞核浓缩、染色致密、有破碎，染色体被染成深蓝色或蓝黑色；正常细胞染色体显均匀淡蓝色或蓝色，坏死细胞肿胀，核染色体呈现很淡的蓝色甚至消失^[108-110]。采用甲基绿-派诺宁染色时，凋亡细胞细胞核呈现绿色或绿蓝色，细胞质呈红紫色；坏死细胞只有细胞核呈绿色。

1.7.1.2 透射电镜观察

透射电镜是观察细胞凋亡最可靠的方法，但它只可对细胞凋亡进行定性分析。可以观察到凋亡细胞表面微绒毛消失，染色质固缩，呈新月形，胞膜起泡或者“出芽”，晚期可见凋亡小体^[111]。

1.7.1.3 荧光显微镜观察

常用的荧光染色方法是吖啶橙（AO）染色、Hoechst33258 染色、Hoechst33342 染色。此方法简单易行，但在定量与定性方面较差^[14,112]。

1.7.2 DNA 凝胶电泳

坏死细胞的 DNA 断裂为无特征的杂乱片段。而凋亡细胞的 DNA 被核酸内切酶降解成 180-200bp 或其整数倍的寡核苷酸片段，将这些 DNA 片段提取出来后，在含有荧光染料的琼脂糖凝胶电泳之后，可在紫外灯下观察到梯状（ladder）条带，而坏死细胞呈现连续条带，正常活细胞为一条区带^[108,111,112]。此方法敏感性该方法简便有效，适合于群体细胞的凋亡分析，但敏感性不高，需要标本细胞数较多（在 10^6 个细胞/ml）以上。

1.7.3 原位末端标记法 (in situ end-labeling, ISEL)

ISEL 的原理是将掺入到凋亡细胞中的外源性核苷酸在酶的催化下与凋亡细胞因内源性核酸酶的激活所产生的单股或双股断链相结合,再通过显示系统使之显示出来^[113,114]。ISEL 分为两种:末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法 (TUNEL),原位切口平移 (INST)。TUNEL 法可检测出极少量的凋亡细胞,所以在细胞凋亡的研究中被广泛采用^[111,115]。但是在某些情况下,TUNEL 法可能产生高达 20% 的假阳性。此外,研究表明 TUNEL 的敏感性远高于 ISNT,尤其是对早期凋亡的检出 TUNEL 更为适用。

1.7.4 酶联免疫分析 (ELISA)

ELISA 检测基于定量三明治酶免疫鉴定原理,用抗 DNA 的单克隆和抗组蛋白抗体进行检测。此方法有比较好的稳定性,所需细胞数少,敏感性高,可检测到 500 个/mL 细胞,但是不可精确测定凋亡细胞发生的绝对量^[14]。

1.7.5 流式细胞仪 (FACS) 分析

流式细胞仪是一种新型高科技仪器,是各种学科高度发展、综合的结晶^[15,108]。它工作时以高能量激光照射高速流动状态下被荧光色素染色的单细胞或微粒,测量其产生的散射光和发射荧光的强度,从而对细胞(微粒)的性状进行定性或定量分析,具有速度快、精度高、准确性好的优点,是现今最先进的细胞定量分析技术。但它的标本制作复杂,不易将变性细胞鉴别。凋亡细胞的通透性增加,其程度正好介于正常细胞与坏死细胞之间,将细胞悬液以荧光素染色,然后用流式细胞仪测量细胞荧光强度来区分活细胞、坏死细胞与凋亡细胞。也由于凋亡细胞通透性的增加,促进了 DNA 片段从细胞内逸出^[111,115]。所以,凋亡细胞 DNA 含量减少,与荧光染料的结合减少,细胞 DNA 荧光强度降低,在 DNA 直方图上显示在 G0/G1 峰前出现凋亡细胞峰。在研究细胞凋亡时,流式细胞术可以用来从细胞的形态与特征上鉴别出凋亡细胞,进行细胞 DNA、RNA 含量分析,也可以检测细

胞凋亡的周期特异性及定量测定细胞凋亡蛋白质的表达情况。

1.7.6 其他检测方法

乳酸脱氢酶 (LDH) 检测、端粒酶检测、线粒体膜电位检测、caspase 检测、膜联蛋白 V 法、细胞内钙离子浓度检测^[108,111,115,116]。

2. 钌配合物抗肿瘤研究进展

顺铂和卡铂在内的铂类抗癌药物可用于睾丸癌、卵巢癌、头颈肿瘤和膀胱癌等很多恶性肿瘤的治疗, 是使用非常广泛的化疗药物, 它们开辟了金属配合物抗癌药物的一个新领域。它们主要通过 Pt 原子与 DNA 链内相邻碱基间形成共价键联接, 扰乱抑制 DNA 的复制, 诱导细胞凋亡而杀死癌细胞。但是它们的肾毒性、骨髓毒性、耳毒性、外周神经毒性、催吐性等毒副作用及耐药性制约了它们的应用^[117]。

由于钌配合物的低毒性、可以很快排泄以及容易被肿瘤细胞所吸收, 比如 KP1019 在大鼠结肠直肠癌治疗中展示出良好的效果, 它可以有效地被细胞吸收, 100 μ m 的钌 (III) 配合物 30 分钟里面每 10⁶ 个细胞吸收 120-160ng 的钌^[118]。国际上普遍认为, 钌配合物将是最有前途的抗肿瘤药物之一。1984 年, 意大利化学家 Giovanni Mestroni 和他的合作者首次发现 *cis*-和 *trans*-Ru(II) Cl₂(dmsO)₄ 对几种鼠类转移性肿瘤具有抗赘生长的性质, 钌配合物做为抗肿瘤药物的研究从此开始^[119]。欧盟 1997 年成立了钌抗癌药物的研究和发展工作组 (COST D8) 来加强相应研究, 关于钌抗肿瘤药物的研究越来越受到重视。目前已经有上百种相应的钌配合物被合成出来。两个钌配合物分别进入了临床, NAMI-A {[ImH] [trans-RuCl₄(DMSO-S)(Im)]}, 图 1-3, 它对肺部的转移瘤有明显效果; 而 KP1019 {[HL] [trans-Ru(III)L₂Cl₄]}, 见图 1-3, 则主要是对结肠癌、路易斯肺癌起作用, 它对结肠癌的治疗比常用药物 5-FU(氟尿嘧啶)、顺铂有更好的疗效, 在体外体内实验中并没产生抗药性, 而且并未发现其严重副作用, 在六个实验者中有五个保持了 5-8 周的病情稳定^[120]。Ru(tfac)₃ 展示了对 A2780 人卵巢癌细胞较强

的抑制作用, 并且只有合理的毒性^[121]。 $\text{RuCl}_2(\text{KTZ})_2$ 对 C8161 黑色素瘤细胞有超过 80% 的抑制率^[122]。具有抗肿瘤活性的钌配合物可以分为氨和亚胺类、多吡啶类、乙二胺四乙酸类、二甲基亚砷类等四类^[123]。关于钌配合物的抗肿瘤活性机理, 目前还不很清楚, 其可能机理^[124]有: ①钌配合物的水解, ②钌(III)配合物的还原活化, ③钌配合物与 DNA 结合, ④钌配合物与蛋白的结合。

研究表明细胞凋亡是各种抗癌药物引发细胞死亡的主要方式, 从而使得细胞凋亡与癌症之间的关系及细胞凋亡在癌症治疗中的作用成为研究的新焦点。淋巴瘤、白血病、乳腺癌、卵巢癌、大肠癌、前列腺癌、混合性腺癌、精原细胞癌和恶性胶质瘤细胞等均对化疗药物诱导的细胞凋亡敏感。化疗药物引起癌细胞凋亡的过程比较复杂, 各种通路互相渗透、互相影响, 各种蛋白、基因互相作用、互相制约。一般认为 caspase 酶被激活是整个凋亡过程的关键。大多数化疗药物引起的细胞凋亡都是 caspase 依赖性途径。化疗药物引起的细胞凋亡主要与 P53、Bcl-2 等基因相关, 顺铂、5-Fu 及烷化剂的抗癌作用是通过 P53 依赖途径实现的, 而 KP1019、紫杉醇则是通过非 P53 依赖途径^[125]。对于钌配合物 KP1019 其诱导结肠直癌细胞凋亡是线粒体膜电位耗散, 下调 Bcl-2 表达, 线粒体释放细胞色素 c, 形成所谓的凋亡体, 激活 caspase 酶, 从而启动凋亡的执行阶段, 不依赖于 P53, Ki-ras 突变^[118]并且显示出比顺铂更高的凋亡率。对于钌配合物诱导肿瘤细胞凋亡的研究还很少, 十分有待于进一步的工作。

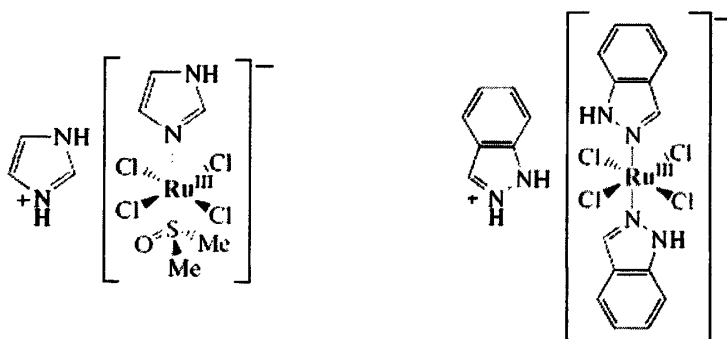


图 1-3 NAMI-A

KP1019

3 参考文献

[1] 韩锐, 孙燕. 新世纪癌的化学预防与药物治疗. 人民军医出版社. 2005 年.

- [2] 董志伟主编.中国癌症研究进展(第7卷)——中国主要癌症的筛查及早诊早治.北京大学医学出版社.2004年.
- [3] M.I.Gougeon .Apoptosis in AIDS.*Science*.1993,260,1269-1271.
- [4] B.C.Trauth.Monoclonal antibody mediated tumor regression by induction of apoptosis .*Science*.1989,245,301-305.
- [5] S.Kuamfnan. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs:a cautionary note. *Cancer Research*. 1989.49,5870-5874.
- [6] J.F.R.Kerr.A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes.*J.Pathol.Bacteriol*.1965.90,419-435.
- [7] D.R.Catchpole.Formation of apoptotic bodies is associated with internucleosomal DNA fragmentation during drug-induced apoptosis.*Exp.Cell.Res*.1995,216,169-177.
- [8] J.F.Kerr,C.M.Winterford,B.V.Harmen.Apoptosis:Its significance in cancer and cancer therapy.*Cancer*.1994,73,2013-2016.
- [9] J.F.Kerr,A.H.Willie,A.R.Currie.Apoptosis:abasic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.*Br.J.Cancer*.1972,26,239-257.
- [10] K.Vermeulen , D.R.V.Bockstaele , Z.N.Berneman.Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer.*Ann,Hematol*.2005,84(10),627-639.
- [11] J.Searle ,T.A. Lawson, P.J.Abbott , et al. An electronmicroscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *J Pathol*,1975,116(3),129-138.
- [12] M. T.Silva,et al. Fish and apoptosis : studies in disease and pharmaceutical design. *Current Pharmaceutical Design*.2008,14(2),170-183.
- [13] 姜泊主编.细胞凋亡的基础与临床.人民军医出版社.1999年.
- [14] 彭黎明,王曾礼主编.细胞凋亡基础与临床.人民卫生出版社.2000年.
- [15] 陈意生,史景泉主编.肿瘤分子生物学.人民军医出版社.2002年.
- [16] 胡野,凌志强,单小云.细胞凋亡的分子医学.军事医学科学出版社.2002年.
- [17] M.D.Jacobson,M.Wei,M.C.Raff.Programmed cell death in animal development.*Cell*.1997,88,347-354.
- [18] J.J.Cohen,R.Duke.Apoptosis and programmed cell death in immunity.*Annu.Rev.Immunol*.

- 1992,10,267-293.
- [19] S.V.Leonnon.Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli.*Cell Prolif*.1991,24,203-214.
- [20] K.F.Ferri ,G.Froemer.Organelle-specific initiation of cell death pathways.*Nat Cell Biol*. 2001,3(11),255-263.
- [21] S.W.Hetts.To die or not to die:an overview of apoptosis and its role in disease.*JAMA*. 1998, 279,300-307.
- [22] N.K.Kuan, E.Passaro.Apotosis:programmed cell death.*Arch Surg*.1998,133,773-775.
- [23] J.J.Cohn.Apoptosis.*Immunology Today* .1997,14,120.
- [24] F.Moinfar ,C.Mannion ,Y.G.Man ,et al.Mammary“comedo”2DCIS:apoptosis,oncosis and necrosis:an electron microscopic examination of 8 cases.*Ultrastruct Pathol* 2000,24, 135 -144.
- [25] T.Nonaka,A.Kuwae,C.Sasakawa,et al.*Shigella flexneri* YSH6000 induces two types of cell death,apoptosis and oncosis,in the differentiated human monoblastic cell line U937. *FEMS Microbiol Lett* .1999,174,89-95.
- [26] S.Levin.Apoptosis,necrosis,or oncosis:what is your diagnosis? A report from the Cell Death Nomenclature Committee of the Society of Toxicologic Pathologists.*Toxicl Sci* . 1998,41,155-156.
- [27] S.Hristoskova,W.Holzgreve,S.Hahn,et al. The chromatin of differentiating erythroblasts is cleaved into large size fragments independent of caspase activated DNase and apoptosis inducing factor. *Journal of Cellular Physiology*.2007,213 (2), 490-494.
- [28] D.Chhabra, G.Cristobal,et al.The N-terminal fragment of gelsolin inhibits the interaction of DNaseI with isolated actin, but not with the cofilin-actin complex. *Proteomics*. 2005, 5(12), 3131-3136.
- [29] M.Murata,T.Suzuki,K.Midorikawa,S.Oikawa,S.Kawanishi.Ox-idative DNA damage induc-ed by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide.*Free Radical Biology & Medicine*. 2004, 37(6), 793-802.
- [30] D.J.Mcconkey,P.Nicotera,O.Sten.Signaling and chromatin fragmentation in thymocyte apoptosis.*Immunol Rev*.1994,142,343.
- [31] H.M.Veere,et al.Species specific induction of DNA frag-mentation typical of apoptotic

- cell death by selenium.*Proc.am.Assoc.Cancer Res.*1994,35,2.
- [32] I.N.Rich,W.W.D,O.A.Garden,P.Musk.Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na^+/H^+ exchanger.*Blood.* 2000,95(4),1427-1434.
- [33] P.Wong,H.W.Kleemann,I.F.Tannock.Cytostatic potential of novel agents that inhibit the regulation of intracellular pH.*British Journal of Cancer.*2002,87(2),238-245.
- [34] B.Mignotte,Vayssiere.Mitochondria and apoptosis.*Eur J Biochem.*1998,252,1-15.
- [35] B.W.Ella,D.D.Newmeyer,D.R. Green.Mitochondrial cytochrome C release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.*1998,17,37.
- [36] D.D.Newmeyer,D.R.Green.Surviving the cytochrome seas.*Neuron* .1998,21,653-655.
- [37] N.Haga,N.Fujita,T.Tsuruo.Mitochondrial aggregation precedes cytochrome c release from mitochondria during apoptosis.*Oncogene.*2003,22,5579-5585.
- [38] N.Tamassia,V.L.Moigne,F.Calzetti,et al.The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4. *J.Immunology.* 2007, 178(11), 7344-7356.
- [39] R.J.Ellis,J.Yuan,H.R.Horvitz. Mechanisms and functions of cell death. *Annu.Rev.Cell.Biol.* 1991,7,663-698.
- [40] P.Joshi,D.M.Eisenmann.The caenorhabditis elegans pvl-5 gene protects hypodermal cells from ced-3-dependent,ced-4-independent cell death. *Genetics.*2004,167(2),673-685.
- [41] Hyun, H.Jae ,Kim, Elvira,et al. Apoptosis induction of HL-60 leukemia cells by extract of *Crinum asiaticum*. *Yakhak Hoechi.*2008,52(1),1-6.
- [42] J.C.Reed.Bcl-2 and the regulation of programmed cell death.*J.Cell Biol.*1994,124,1-6.
- [43] Y.Feng,Z.H.Lin,X.Shen,K.X.Chen,H.L.Jiang ,D.X.Liu.Bcl-xL forms two distinct homodimers at non-ionic detergents: implications in the dimerization of Bcl-2 family proteins. *Journal of Biochemistry.*2008,143(2),243-252.
- [44] F.J.Tan,J.E.Zuckerman,A.Z.Fire,R.B.Hill.Evolutionarily conserved membrane activity of Bcl-2 proteins. *Abstracts of Papers, 235th ACS National Meeting, New Orleans, LA, United States, April 6-10. 2008.*

- [45] R.J.Youle,A.Strasser.The **BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.2008,9(1),47-59.
- [46] E.Meulmeester,A.G.Jochimsen.**P53 : a guide to apoptosis.** *Current Cancer Drug Targets*.2008,8(2),87-97.
- [47] Z.A.Stewart,M.D.Westfall,J.A.Pietenpol.**Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy.** *Trends Pharmacol Sci*.2003,24,139-145.
- [48] M.Gostissa,T.G.Hofmann,H.Will,G.D.Sal.**Regulation of p53 functions:let`s meet at the nuclear bodies.***Curr Opin Cell Biol* .2003,15,351-357.
- [49] K.Somasundaram.**Tumor suppressor p53:regulation and function.***Front Biosci*. 2001 ,5,D424-437.
- [50] H.Xiao,A.Pearson,B.Coulombe,et al.**Binding of basal transcription factor TFILH to the acidic activation domains of VP16 and p53.***Mol Cell Biol*.1994,14,7013-7024.
- [51] A.Kaponis,A.Skylas,N.Zagorianakou,I.Georgiou,V.Passa,E.Paraskevaidis,G.Makrydimas.**Coelomic cells show apoptosis via Fas/FasL system: a comparative study between healthy human pregnancies and missed miscarriages.** *Human Reproduction*. 2008, 23(5),1159-1169.
- [52] K.Klemm,C.Eipel,K.Abshagen,B.Vollmar.**Fas-induced hepatocellular apoptosis is inhibited by erythropoietin.** *Chirurgisches Forum fuer Experimentelle und Klinische Forschung*.2007,231-232.
- [53] X.H.Zi,M.Abuhamed,Y.Yuan,H.Q.Xu,L.F.Lei,K.Guo,Q.D.Yang.**Correlation between MMP-3, TIMP-3 expression and neuronal apoptosis after ischemia -reperfusion injury in rates.** *American Journal of Immunology*. 2007, 3(2),25-30.
- [54] P.B.Reid,E.Fernando,M.Arthin,et al.**Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by Bcl-2.***Nature*.1992,359,554.
- [55] J.L.Cleveland,J.N.Ihle.**Contenders in FasL/TNF death signaling.***Cell*.1995,81(4),479-482.
- [56] A.H.Wyllie.**Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.***Nature*.1980,284,555-556.
- [57] D.Shiokawa,Y.Shika,S.Araki,et al. **Stage-specific expression of DNase during B-cell development and its role in B-cell receptor-mediated apoptosis in WEHI-231 cells.** *Cell Death and Differentiation*.2007,14(5),992-1000.

- [58] D.Shiokawa,S.Tanuma.Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis. *Biochemistry*. 2001,40(1),143-152.
- [59] M.L.Gaido,J.A.Cidlowski.Identification,purification,and characterization of a calcium dependent endonuclease(NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B.J *Biol Chem*.1994,266,18580-18585.
- [60] J.M.Riberiro,D.A.Carson.Ca²⁺/Mg²⁺ dependent endonuclease from human spleen: purification,properties,and role in apoptosis.*Biochemistry*.1993,32,9129-9136.
- [61] D.Shiokawa,H.Ohyama,T.Yamada,K.Takahashi,S.Tanuma.Identification of an endonuclease responsible for apoptosis in rat thymocytes. *European journal of biochemistry*.1994,226(1),23-30.
- [62] X.Y.Yin,E.O.Apostolov,S.V.Shah,X.Y.Wang,et al. Induction of renal endonuclease G by cisplatin is reduced in DNase I-deficient mice. *Journal of the American Society of Nephrology*.2007,18(9),2544-2553.
- [63] B.Anna,E.Jacob,K.Kohki,et al. DNase II and the Chk2 DNA Damage Pathway Form a Genetic Barrier Blocking Replication of Horizontally Transferred DNA.*Molecular Cancer Research*. 2006, 4(3), 187-195.
- [64] T.Alicia,C.Elisabeth,et al. Involvement of L-DNase II in nuclear degeneration during chick retina development. *Experimental Eye Research*.2001,72(4),443-453.
- [65] P.Ling,T.H.Tan.Signal transduction by HPK1, a mammalian STE20-related serine/threonine protein kinase. *Recent Research Developments in Molecular & Cellular Biology*.2002,3(Pt.1),297-315.
- [66] L.Zhao,Z.M.Qian,C.Zhang,et al.Amyloid-peptide 31-35-induced neuronal apoptosis is mediated by caspase-dependent pathways via cAMP-dependent protein kinase A activation.*Aging Cell*.2008,7(1),47-57.
- [67] H.J.Feng,J.X.Tan.Advances in research of protein kinase B in cardiomyocyte apoptosis. *Guowai Yixue Linchuang Shengwu Huaxue Yu Jianyanxue Fence*.2005,26(12),904-906.
- [68] E.M.Griner, M.G.Kazanietz.Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Reviews Cancer*.2007,7(4),281-294.
- [69] N.A. Thornberry and Y.Lazebnik.Caspasea:enemies within.*Science*.1998,481,1312-1316.
- [70] J.M.Coppola,B.D.Ross,A.Rehemtulla.Noninvasive Imaging of Apoptosis and Its

- Application in Cancer Therapeutics. *Clinical Cancer Research*.2008, 14 (8), 2492-2501.**
- [71] I.Okun,K.V.Balakin,et al.Caspase activity modulators as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2008,8(3),322-341.
- [72] S.Shimizu,Y.Eguchi,W.Kamiike,et al.Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors:possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions.*Oncogene* .1996,12,2251-2257.
- [73] C.Sebastien,P.Remo,R.Thomas,P.Christoph,et al. Caspase -8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *Journal of Experimental Medicine*.2008,205(3), 685-698.
- [74] V.Giandomenico,F.Lancillotti,G.Fiorucci,et al.Retinoic acid and IFN inhibition of cell proliferation is associated with apoptosis in squamous carcinoma cell lines: role of IRF-1 and TGase II-dependent pathways. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1997,8(1),91-100.
- [75] S.K.Lee,Y.S.Kim,et al. Antisense inhibition of transglutaminase 2 affects development of mouse embryo submandibular gland in organ culture. *Archives of Oral Biology* . 2005,50(9),789-798.
- [76] A.A.Moibenko,V.E.Dosenko,V.S.Nagibin.Enzymatic mechanisms of apoptosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*.2005,(3), 17-26.
- [77] S.D.Mundle,S.A.Gregory,H.D.Preisler,et al. Enzymic programming of apoptotic cell death. *Pathobiology*.1996,64(3), 161-170.
- [78] P.Widlak.Apoptosis : nuclease, caspases, cytochrome c. *Postepy Biochemii*.1998,44(3), 252-254.
- [79] G.Majno,I.Joris.Apoptosis,oncosis,and necrosis.An overview of cell death.*Am J Pathol*.1995,146(1),3-15.
- [80] 王曾礼, 石应康.基础医学与临床研究进展.成都大地出版社.1998, 173—197.
- [81] M.J.Staunton,E.F.Gaffney.Apoptosis:Basic concepts and potential significance in human cancer.*Arch Pathol Lab Med*.1998,122(4),310.
- [82] H.Tsurumi,H.Moriwaki.Digestive tract diseases and anemia.*Shindan to Chiryō*. 2006,94(11), 2050-2053.
- [83] T.Ushijima.Stomach cancer and epigenetic field for cancerization.Accumulation of

- aberrant DNA methylation raises cancer risk. *Kagaku to Seibutsu*.2008,46(3), 150-151.**
- [84] I.Berenblum,N.Haran.The influence of dose of carcinogen,emptiness of stomach , and other factors on tumor induction in the forestomach of the mouse. *Cancer Research* .1955,15,504-9.
- [85] U.Nyberg,B.Nilsson,et al.Cancer incidence among Swedish patients exposed to radioactive thorotrast: a forty-year follow-up survey. *Radiation Research*.2002,157(4), 419-425.
- [86] J.Liu,Y.H.Liu.Expression of CD117, CD34, SMA, S-100 protein, Vim and desmin in patients with gastrointestinal stromal tumors. *Nanfang Yike Daxue Xuebao*.2008,28(3), 438-440.
- [87] J.B.Wang,L.X.Liu.Use of photodynamic therapy in malignant lesions of stomach , bile duct, pancreas, colon, and rectum. *Hepato-Gastroenterology*.2007,54(75), 718-724.
- [88] V.Carloni,F.Vizzutti,P.Pantaleo.Farnesyltransferase Inhibitor, ABT-100, Is a Potent Liver Cancer Chemopreventive Agent. *Clinical Cancer Research*.2005,11(11), 4266-4274.
- [89] C.H.Har,C.K.Keong.Effects of tocotrienols on cell viability and apoptosis in normal murine liver cells (BNL CL.2) and liver cancer cells (BNL 1ME A.7R.1), in vitro.*Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*.2005,14(4), 374-380.
- [90] Y.H.Park,J.A.Kim,J.H.Baek,et al.Induction of apoptosis in HepG2 human hepato-cellular carcinoma cells by a novel derivative of ursodeoxycholic acid (UDCA). *Archives of Pharmacal Research*.1997,20(1),29-33.
- [91] B.Cao,Z.Y.Lei,H.Chen,et al.YB-13, a novel synthetic microtubule inhibitor, induces apoptosis of HeLa cells and its mechanism. *Zhongguo Yaolixue Tong bao*. 2008,24(1),123-127.
- [92] 李龙山, 孙东植, 孙抒, 等. 乳腺癌及其癌前病变中细胞凋亡与p53、bcl-2蛋白的表达. *中国肿瘤临床*.2000,27(5),329-332.
- [93] E.Szliszka,Z.P.Czuba,K.Jernas,W.Krol.Dietary flavonoids sensitize HeLa cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *International Journal of Molecular Sciences*.2008,9(1), 56-64.
- [94] I.L.P.Beales,O.Ogunwobi,E.Cameron,et al.Activation of Akt is increased in the dysplasia-

- carcinoma sequence in Barrett's oesophagus and contributes to increased proliferation and inhibition of apoptosis: a histopathological and functional study.** *BMC Cancer*.2007,7.
- [95] I.L.P.Beales,O.O.Ogunwobi.**Leptin synergistically enhances the anti-apoptotic and growth-promoting effects of acid in OE33 oesophageal adenocarcinoma cells in culture.** *Molecular and cellular endocrinology*.2007,274(1-2), 60-8.
- [96] E.Capodicasa,P.Cornacchione,et al.**Omeprazole induces apoptosis in normal human polymorphonuclear leucocytes.** *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*.2008,21(1), 73-85.
- [97] B.Wegiel,A.Bjartell,Z.Culig,J.L.Persson.**Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival.** *International Journal of Cancer*.2008,122(7),1521-1529.
- [98] K.V.Desai,A.M.Michalowska,et al.**Gene expression profiling identifies a unique androgen-mediated inflammatory/immune signature and a PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)-mediated apoptotic response specific to the rat ventral prostate.** *Molecular Endocrinology*.2004,18(12), 2895-2907.
- [99] G.Filomeni,P.Turella,M.L.Dupuis ,et al. **6-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol, a specific glutathione S-transferase inhibitor, overcomes the multidrug resistance (MDR)-associated protein 1-mediated MDR in small cell lung cancer.** *Molecular Cancer Therapeutics*.2008,7(2), 371-379.
- [100] S.Mori,G.Ito,N.Usami,et al.**P53 apoptotic pathway molecules are frequently and simultaneously altered in nonsmall cell lung carcinoma.** *Cancer (New York, NY, United States)*. 2004,100(8), 1673-1682.
- [101] M.Volm,R.Koomagi.**Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer.** *Anticancer Research*.2000,20(3A), 1527-1533.
- [102] K.J.Patel,S.E.Pambuccian,et al.**Genes associated with early development, apoptosis and cell cycle regulation define a gene expression profile of adenoid cystic carcinoma.** *Oral Oncology*.2006,42(10),994-1004.
- [103] Y.Wang,Q.Y.He,et al.**Modulation of gold(III) porphyrin 1a-induced apoptosis by mitogen-activated protein kinase signaling pathways.** *Biochemical Pharma-*

- cology*.2008,75(6),1282-1291.
- [104] C.Du,B.Wen,D.Li,et al.Downregulation of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 by arsenic trioxide in nasopharyngeal carcinoma cells. *Tumori*. 2006,92(2),140-148.
- [105] N.Zantl,G.Weirich,H.Zall,B.M.Seiffert,et al.Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance. *Oncogene*.2007,26(49),7038-7048.
- [106] M.I.Zhou,R.L.Foy,et al.Jade-1, a candidate renal tumor suppressor that promotes apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.2005,102(31),11035-11040.
- [107] G.Schmid,M.P.Kramer,et al.Cellular and organismal ageing: role of the p53 tumor suppressor protein in the induction of transient and terminal senescence. *Journal of Cellular Biochemistry*.2007,101(6), 1355-1369.
- [108] A.Camins,M.Pallas,J. S. Silvestre.Apoptotic mechanisms involved in neurodegenerative diseases: experimental and therapeutic approaches. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*.2008,30(1),43-65.
- [109] J.Zhang,M.Nagasaki,Y.Tanaka,S.Morikawa.Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukaemia cells.*Leuk Res*. 2003,27,275-283.
- [110] K.Yamaki,J.Hong,K.Hiraizumi,J.W.Ahn,O.Zee,K.Ohuchi.Participation of various kinases in staurosporine-induced apoptosis of RAW 264.7 cells/*J Pharm Pharmacol* .2002,54,1535-1544.
- [111] R.Sgonc,G.Wick.Methods for the detection of apoptosis.*Arch Alerg Immunol*. 1994,105,327-332.
- [112] A.Negoescu,C.Guillermet,et al.Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity.*Biomed Pharmacother*.1998,52,252-259.
- [113] M.M.Compton,J.A.Cidlowsky.Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid.*Endocrinology*.1986,118,38-45.
- [114] G.H.Cui,Z.L.Xu,et al.A combined regimen of gossypol plus methyltestosterone and ethinylestradiol as a contraceptive induces germ cell apoptosis and expression of its related genes in rats.*Contraception*.2004,70(4),335-342.

- [115] R.Mirakian,K.Nye,et al.**Methods for detecting apoptosis in thyroid disease.***J Immunol Methods.***2002**,265,161-175.
- [116] R.Chaturvedi,R.K.Srivastava,et al.**Augmentation of Ras ligand-induced apoptosis by MUCI mucin.***Int J Oncol.***2005**,26(5),1169-1176.
- [117] D.S.Sigman,A.Mazumder,D.M.Perrin.**Chemical nucleases.** *Chem Rev.***1993**,93,2295.
- [118] S.Kapitza,M.Pongratz.**Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells.** *J Cancer Res Clin Oncol.***2005**,131,101-110.
- [119] M. J. Clarke.**Oncological implications of the chemistry of ruthenium.***Met. Ions Biol. Syst.* **1980**, 11, 231-283.
- [120] R.Erwin,B.A.Vladimir,et al.**Electron-transfer activated metal-based anticancer drugs.** *Inorganica Chimica Acta.***2008**, 361,1569-1583.
- [121] S.Arandjelovic¹,Z.Tesic¹,et al.**Cellular Sensitivity to β -Diketonato Complexes of Ruthenium(III),Chromium(III) and Rhodium(III).***Medicinal Chemistry.* **2006**, 2, 227-237.
- [122] M.S.Rieberl, A.Anzellotti ,et al.**Tumor apoptosis induced by Ruthenium(II)- ketoconazole is enhanced in nonsusceptible carcinoma by monoclonal antibody to egf receptor.***Int. J.Cancer:* **2004**,112, 376-384.
- [123] 汪中明, 计亮年.**钌配合物的抗肿瘤活性研究进展.***化学进展***2002**, 14 (4) ,296-304.
- [124] 刘杰, 计亮年, 梅文杰.**金属钌配合物的抗肿瘤活性及其作用机理.***化学进展.* **2004**, 16 (6) ,969-974.
- [125] K.Ryungsa,T.Kazuaki,U.Yoko,et al.**Inducing cancer cell death by targeting transcription factors.***Anti Cancer Drugs.***2003**,14(1),3-11.

第二章 钌配合物的合成

1 引言

铂类抗肿瘤药物顺铂和卡铂在临床上被大量应用,但由于具有一定的毒副作用、容易产生耐药性等受到一定的限制。钌配合物的低毒性而且易于被肿瘤组织吸收,钌配合物将成为最有前途的抗癌药物之一。目前合成钌配合物主要包括包括氨(亚胺类)、多吡啶类、乙二胺四乙酸类和二甲亚砜类等四类,其中 $\text{trans-[Ru(III)Cl}_4\text{(DMSO)Im]}$ 是第一个进入临床实验的抗肿瘤转移的钌(III)配合物,它们易溶于水,可静脉注射,对肺癌等显示出高活性^[1]。同时采用咪唑作为主要配体的 ICR 也进入了临床实验,它证实对结肠癌有显著效果。

本实验室设计合成了一系列钌配合物^[2,3] [a: $\text{[Ru(MeIm)}_4\text{(dppz)]}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, b: $\text{[Ru(MeIm)}_4\text{(dpq)]}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, c: $\text{trans, cis, cis-RuCl}_2\text{(dmsO)}_2\text{(Biim)}$], d: $\text{[Ru(MeIm)}_4\text{(phen)]}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e: $\text{mer-[RuCl}_3\text{(bpy)(dmsO)}$, f: $\text{mer-[RuCl}_3\text{(phen)(dmsO)]}$, g: $\text{mer-[RuCl}_3\text{(dmsO)(Biim)]}$], 通过元素分析、ES-MS、NMR 对配合物进行了表征,它们的结构分别见图 2-1。对配合物抗肿瘤活性及诱导肺癌 A549 细胞的凋亡作用进行了研究。

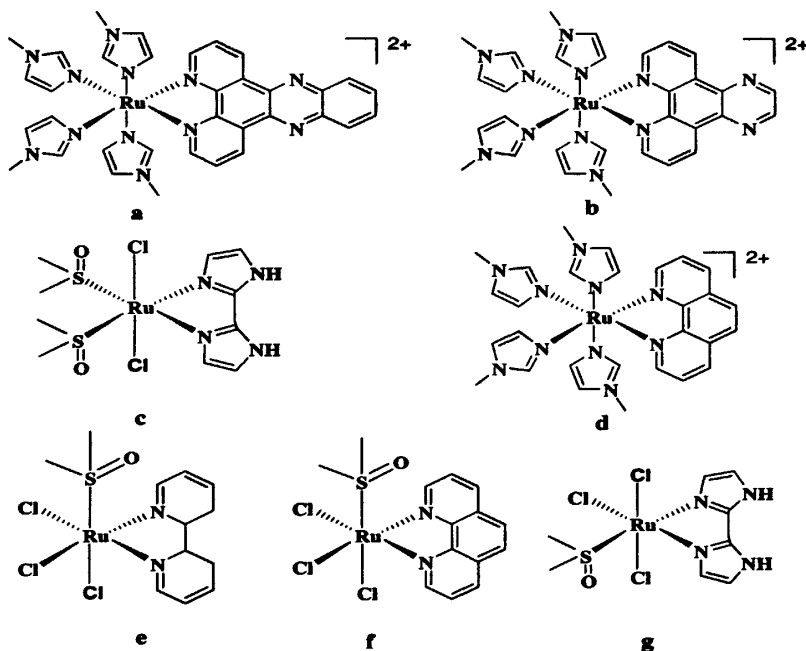


图 2-1 钌配合物结构图 (a-g)

2 实验部分

2.1 实验试剂

试剂名称	纯度级别	生产厂家或提供商
$\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	AR	昆明贵金属研究所
2, 2'-联吡啶	AR	上海试剂一厂
1,10-邻菲咯啉	AR	广州化学试剂厂
无水乙醇	AR	广州化学试剂厂
无水甲醇	AR	广州化学试剂厂
乙腈	AR	广州化学试剂厂
乙酸铵	AR	上海试剂一厂
乙二醛	AR	广州化学试剂厂
乙二醇	AR	广州化学试剂厂
甲苯	AR	广州化学试剂厂
邻苯二胺	AR	广东光华化学试剂厂
N, N-二甲基甲酰胺(DMF)	AR	广州化学试剂厂
三羟甲基甲胺(Tris)	BR	Sigma
$\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$	PAGE	Sangon
二甲基亚砷		Acros 公司
高氯酸钠	CP	上海试剂二厂
氢氧化钠	AR	广州化学试剂厂
硼酸(H_3BO_3)	AR	广州化学试剂厂
活性炭		广州化学试剂厂
盐酸	AR	广州化学试剂厂
氯化锂	AR	广州化学试剂厂
溴化钾	AR	广州化学试剂厂
氯化钠	AR	广州化学试剂厂
硅胶(60-100 目)	AR	广州化学试剂厂
中性氧化铝(200-300 目)	AR	广州化学试剂厂

2.2 实验仪器和方法

元素分析(C、H、N)用 Elementar Vario EL 元素分析仪测定。

核磁共振波谱用 VARIAN Mercury-Plus 300 或 Varian 500MHz 核磁共振波谱仪记录。

快原子轰击质谱(FAB-MS)用 VG ZAB-HS 质谱仪记录, 选用 3-硝基苄醇作辅助基质。电喷雾质谱(ES-MS)用 LCQ 系统(Finnigan MAT, USA)记录, 选用甲醇作流动相; 或岛津 Shimadzu LCMS-2010A 液质联用仪, 流动相为乙腈。

2.3 钌(II)配合物的合成

2.3.1 配体的合成

配体 dpq、dppz 的合成: 配体 dpq、dppz 都按文献方法合成^[4]。

2,2'-联咪唑(Biim)的合成: 2,2'-联咪唑(Biim)按文献^[5]方法合成: 称取35.4 g 乙酸铵(0.46 mol), 溶解于6.5 mL水中, 逐滴加入乙二醛(20%, 10 g, 0.173 mol), 在40 °C下, 3小时内滴加完毕, 混合物接下来在室温条件下反应5小时, 溶液中即有大量灰色沉淀生成, 抽滤, 滤出物用水洗涤(3 × 20 mL), 继而用丙酮洗涤(3 × 20 mL), 得粗产品。粗产品用乙二醇(130 mL/g)重结晶, 结晶过程中用活性炭脱色, 重复数次即得白色羽毛状晶体。产率: 40%。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7.06 (s).

2.3.2 配合物的合成

2.3.2.1 配合物 a 的合成

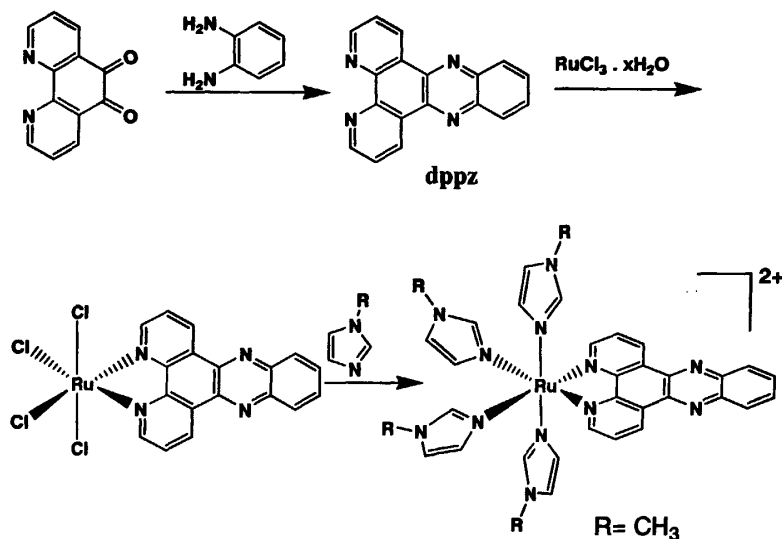


图 2-2 配合物 a 的合成路线

(1) 菲罗啉 5,6-二酮的合成^[6]

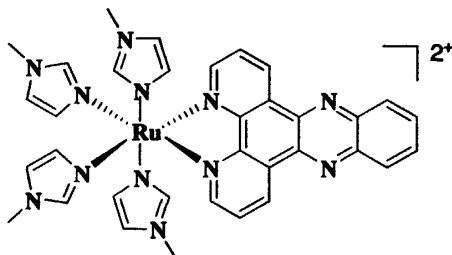
将 4.0 g 1,10-邻菲咯啉和 4.0 g 溴化钾置于圆底烧瓶中并在冰水浴拌匀，然后滴加冷的浓 H_2SO_4 (40 mL) 和浓 HNO_3 (20 mL) 的混合酸。滴加完混酸后维持温度在 80-85 °C 反应 3h，冷却，使溴逸出，将冷却后的黄色溶液倒入 500 mL 冰水中，然后用 10 mol L⁻¹ NaOH 溶液小心中和至中性。用 3×100 mL 氯仿对该溶液进行萃取。合并有机相后，用 50 mL 水对其洗涤，最后用硫酸钠干燥过夜。过滤后，减压蒸去氯仿，固体产物用乙醇重结晶，得黄色或橙黄色针状晶体。产率：77%。

(2) 邻联吡啶并[3,2-a:2',3'-c]吩嗪 (dppz) 的合成^[7]

菲罗啉-5,6-二酮(1 g, 4.8 mmol)，邻苯二胺 (0.6 g, 5.7 mmol)，无水乙醇(400 mL) 置于圆底烧瓶中在 50 °C 下搅拌回流 2 h，然后搅拌一夜，自然冷至室温。将反应溶液在 50 °C 下旋转蒸发至有乳状淡黄色的产物析出后，静止 8 h，后加入甲醇/水=1:9，抽滤，粗产品用甲醇重结晶。产率：80%。

(3) $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Cl}_4]$ 的合成^[8]

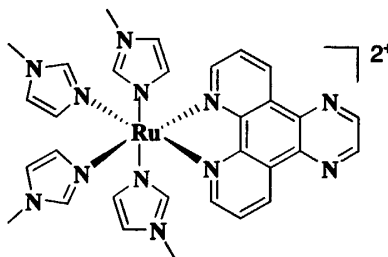
将 0.5572 g $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 和 0.7583 g 邻联吡啶并吩嗪(dppz)加入到 50 mL, 1 M HCl 中, 在氩气保护下搅拌 30 分钟使之溶解。将反应体系密闭, 在氩气保护下静置 10 天, 抽滤, 用水洗涤至无色, 得暗绿色固体。产率: 61%。

(4) 配合物 $[\text{Ru}(\text{MeIm})_4(\text{dppz})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的合成图 2-3 $[\text{Ru}(\text{MeIm})_4(\text{dppz})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 结构图

将 $[\text{Ru}(\text{dppz})\text{Cl}_4]$ (0.131 g, 0.25 mmol) 和 1-甲基咪唑 (0.41 g, 5 mmol) 加入到 DMF (*N,N*-dimethylformamide) (20 mL) 中, 在氩气保护下搅拌回流 8 h, 得深红色溶液。冷却至室温, 过滤, 旋转蒸发至 5 mL, 然后加入 15 mL 水稀释。逐滴加入饱和的 NaClO_4 溶液, 立即产生大量的红色沉淀。搅拌均匀后静置 1 h, 抽滤, 用 50 mL 的乙醚洗涤, 真空干燥。将干燥后的粗产品用少量的乙腈溶解, 装入约 15 cm 的中性氧化铝柱。用乙腈: 甲苯=3:1 (v/v), 淋洗下主要的红色组分, 得红色微晶 171 mg, 产率: 69%。

^1H NMR (ppm, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.36 (d, 2 H, $J = 8.1$ Hz); 9.14 (d, 2 H, $J = 5.5$ Hz); 8.42-8.40 (m, 2 H); 8.13-8.11 (m, 2 H); 8.07-8.04 (m, 2 H); 7.93 (s, 2 H); 7.50 (s, 2 H); 7.25 (s, 2 H); 7.05 (s, 2 H); 6.79 (s, 2 H); 6.29 (s, 2 H); 3.84 (s, 6 H); 3.44 (s, 6 H). ESI-MS (MeCN): $m/z = 711.2$ ($[\text{M}-2\text{ClO}_4-\text{H}]^+$), 356.1 ($[\text{M}-2\text{ClO}_4]^{2+}$). UV-Vis (cm^{-1}) (H_2O): 274 (57979), 359 (12202), 376 (12709), 470 (6722). Anal. calc. for $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_{12}\text{O}_{10}\text{Ru}$: C, 43.13; H, 4.05; N, 17.75; found: C, 43.02; H, 4.06; N, 17.71.

2.3.2.2 配合物 b 的合成

图 2-4 $[\text{Ru}(\text{MeIm})_4(\text{dpq})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 结构图

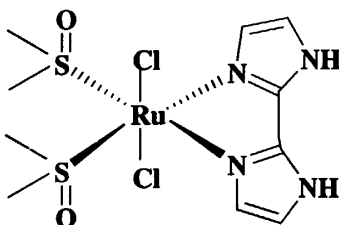
配合物 b 的合成类似于 a, 只是配体不同。

2.3.2.3 配合物 c 的合成

(1) *cis*- $[\text{Ru}(\text{dmsO})_4\text{Cl}_2]$ 前体的合成

该配合物的合成参照文献进行^[9], 但是做了改进。

称取 $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 约 1 g, 用 3 mL dmsO 溶解, 得橙红色溶液, 电磁搅拌, 在 120 °C 下油浴回流 0.5 小时, 反应过程中溶液逐渐变为亮黄色, 随后, 用减压蒸馏装置蒸去约一半溶剂, 停止蒸馏。往溶液中加入丙酮, 室温下电磁搅拌, 出现大量的黄色固体, 为提高产量, 可将滤液在进行蒸馏, 再加入丙酮, 如此反复几次, 产率可达 80%。

(2) 配合物 *trans,cis,cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dmsO})_2(\text{Biim})]$ 的合成图 2-5 *trans,cis,cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dmsO})_2(\text{Biim})]$ 结构图

参考文献中合成类似结构配合物的方法^[10,11]。

称取 *cis*-[Ru(dmsO)₄Cl₂] (200 mg, 0.41 mmol) 溶于 100 mL 用分子筛干燥过甲苯中, 逐滴加入 2,2'-联咪唑(Biim, 55 mg, 0.41 mmol)的甲苯溶液(50 mL), 所得混合物于 100 °C 反应 24 小时, 溶液中有浅绿色沉淀产生, 过滤, 用乙醚洗涤, 真空干燥即得产物。配合物的单晶由产品在甲醇中重结晶得到。产率: 70%。ESI-MS (*m/z*): 418.6 for [RuCl₂(dmsO)₂(Biim)]⁺. Elemental Anal. Calcd. for C₁₀H₁₈Cl₂N₄O₂RuS₂: C, 25.98; H, 3.92; N, 12.12. Found: C, 25.96; H, 3.94; N, 12.15.

2.3.2.4 配合物 d 的合成

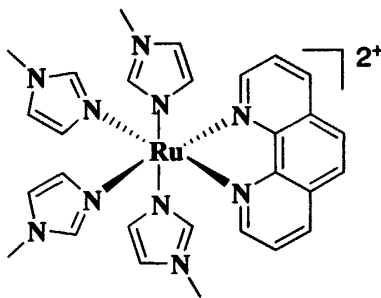


图 2-6 [Ru(MeIm)₄(phen)](ClO₄)₂·2H₂O 结构图

配合物 d 的合成类似于配合物 a, 仅配体不同。

2.4 钌 (III) 配合物的合成

2.4.1 配体的合成

2,2'-联咪唑(Biim)的合成: 同于本章 2.3.1:2,2'-联咪唑(Biim)的合成。

2.4.2 配合物的合成

2.4.2.1 配合物 e 的合成

(1) cis -[Ru(dmsO)₄Cl₂]前体的合成

同于本章 2.3.2.3:(1) cis -[Ru(dmsO)₄Cl₂]前体的合成

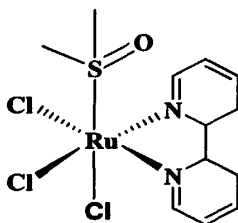
(2) 配合物 mer -[RuCl₃(dmsO)(bpy)]的合成

图 2-7 mer -[RuCl₃(dmsO)(bpy)]结构图

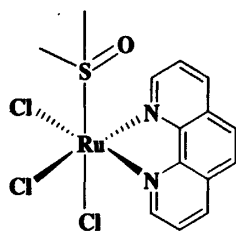
称取 cis -[Ru(dmsO)₄Cl₂] (0.20g, 0.41mmol) 和 2,2'-联吡啶(bpy)的混合物(64 mg, 0.41 mol)于 20 mL 混合溶剂(CH₃OH 和 CHCl₃ 体积比为 1:1), 在 100 °C 下反应 2 小时, 将所得混合物过滤得橙红色的澄清溶液。在空气中自然挥发数日, 溶液中既有橙红色薄片状的晶体生成, 采用机械分离方法得纯产品。产率: 0.069 g , 35%。ESI-MS (m/z): 442.6 for [RuCl₃(dmsO)(bpy)]⁺. Elemental anal. Calcd for C₁₂H₁₄Cl₃N₂ORuS: C, 32.63; H, 3.19; N, 6.34. Found: C, 32.62; H, 3.18; N, 6.35. IR data (KBr, cm⁻¹): 3106 (v, C-H), 3074 (v, C-H), 1604–1447 (d, C-H), 1312–1308 (d, C-H), 1107 (v, S-O), 1071 (v, S-O).

2.4.2.2 配合物 f 的合成

(1) cis -[Ru(dmsO)₄Cl₂]前体的合成

同于本章 2.3.2.3:(1) cis -[Ru(dmsO)₄Cl₂]前体的合成

(2) 配合物 mer -[RuCl₃(dmsO)(phen)]的合成

图 2-8 mer -[RuCl₃(dmsO)(phen)]结构图

mer -[RuCl₃(dmsO)(phen)]按文献方法合成^[10], 但是做了少量改动。

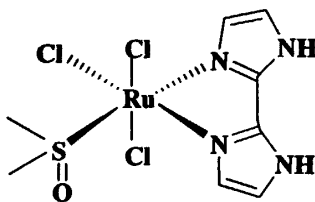
称取 cis -[Ru(dmsO)₄Cl₂] (0.20 g, 0.41 mmol) 和 1,10-邻菲咯啉(phen)混合物(74 mg, 0.41 mol), 溶解于含 6 M HCl (10 mL) 和 CH₃CH₂OH (10 mL) 的混合溶剂中, 混合物于 80 °C 反应 2 小时, 随后所得的红色溶液于旋转蒸发仪中减压蒸至近干, 固体产品在干燥器中放置两天, 粗产品用 CH₃OH 或者 CH₃CH₂OH 重结晶即得红色晶体, 还可在 CH₃OH 和 H₂O 的混合溶剂中重结晶, 后者的产率更高。产率: 0.103 g (30%)。ESI-MS (m/z): 466.7 for [RuCl₃(dmsO)(phen)]⁺. Elemental anal. Calcd for C₁₄H₁₄C₁₃N₂ORuS: C, 36.10; H, 3.03; N, 6.01. Found: C, 36.07; H, 3.05; N, 6.03.

2.4.2.3 配合物 g 的合成

(1) cis -[Ru(dmsO)₄Cl₂]前体的合成

同于本章 2.3.2.3:(1) cis -[Ru(dmsO)₄Cl₂]前体的合成

(2) 配合物 mer -[RuCl₃(dmsO)(Biim)] 的合成

图 2-9 mer -[RuCl₃(dmsO)(Biim)]结构图

和第二章中合成 $trans, cis, cis$ -[RuCl₂(dmsO)₂(Biim)]的方法类似(见 2.3.2.3)。

称取 $cis-[Ru(dmsO)_4Cl_2]$ (0.20 g, 0.41 mmol) 和 2,2'-联咪唑 (Biim) 的混合物 (55 mg, 0.41 mol) 于 20 mL 混合溶剂 (CH_3OH 和 $CHCl_3$ 体积比为 1: 1), 在 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 下反应 2 小时, 将所得混合物过滤得绿色的澄清溶液。在空气中自然挥发数日, 溶液中既有绿色块状的晶体生成, 采用机械分离方法得纯产品。产率: 55%。ESI-MS (m/z): 418.6 for $[RuCl_3(dmsO)(Biim)]^+$. Elemental anal. Calcd for $C_8H_{12}Cl_3N_4ORuS$: C, 22.89; H, 2.88; N, 13.35. Found: C, 22.90; H, 2.89; N, 13.38.

3 参考文献

- [1] C.X.Zhang, S.J.Lippard. *New metal complexes as potential therapeutics. Current Opinion in Chemical Biology.* 2003, (7), 481-489.
- [2] 谭彩萍. 中山大学博士论文. 2007.
- [3] 陈兰美. 中山大学博士论文. 2008.
- [4] J.E.Dickenson, L.A.Summers. *Dervatives of 1,10-phenanthroline-5,6-quinone. Aust. J. Chem.* 1970, 23, 1023-1027.
- [5] J.C.Xiao, J.M.Shreeve. *Synthesis of 2,2'-biimidazolium-based ionic liquids: use as a new reaction medium and ligand for palladium-catalyzed suzuki cross-coupling reactions. J. Org. Chem.* 2005, 70, 3072-3078.
- [6] W.Paw, R.Eisenberg. *Synthesis, Characterization, and Spectroscopy of Dipyridocatecholate Complexes of Platinum. Inorg. Chem.* 1997, 36, 2287-2293.
- [7] A.Greguric, I.D.Greguric, T.W.Hambley, et al. *Minor groove intercalation of capital Delta-[Ru(Me₂phen)₂dppz]²⁺ to the hexanucleotide d(GTCGAC)₂. Dalton Trans.* 2002, 849-855.
- [8] R.B.Nair, L.K.Yeung, C.J.Murphy. *Synthesis and Solvent-Dependent Properties of Ru(acac)₂dppz. Inorg. Chem.* 1999, 38, 2536-2538.
- [9] I.P.Evans, A.Spencer, G.Wilkinson. *Dichlorotetrakis(dimethyl sulphoxide)ruthenium(II) and its use as a source material for some new ruthenium(II) complexes. J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1973, 204-209.
- [10] R.C.Drift, J.W.Sprengers, E.Bouwman, et al. *Ruthenium-catalyzed isomerization of allylic*

alcohols: oxidation state determines resistance against diene inhibition, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2002, 2147-2155.

- [11] M.B.Cingi,M.Lanfranchi,M.A.Pellinghelli,M.Tegoni.Synthesis, spectroscopic and struct-ural characterization of new Ru^{II} and Ru^{III} complexes containing triazole- and thiadiazole-type ligands. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2000, 703-711.**

第三章 Ru(II) 配合物对 A549 细胞的凋亡作用

1 引言

细胞凋亡是机体在生长、发育和受到外来刺激时,在相关基因调控之下清除多余的、衰老的和受损伤的细胞,以保持机体内环境平衡的一种自我调节机制^[1]。在正常情况下,细胞的增殖与凋亡维持组织中的细胞总数的动态平衡,一旦细胞增殖异常或细胞凋亡发生异常,均可导致细胞的恶性转化。细胞的凋亡数量大于细胞的增殖数量则器官就逐渐萎缩,而细胞的凋亡数量小于细胞的增殖数量则形成肿瘤,使已形成的肿瘤细胞发生凋亡已成为当前研究的一大热点。细胞凋亡是体内细胞平衡的生理机制,理解细胞凋亡及其调节机制有助于发现新的癌症化疗药物。随着细胞凋亡认识的不断加深,可以开发出选择性作用于凋亡通路不同组分的癌症化疗药物,通过临床试验,使用更大剂量和更短时间,单组分或不同机制的药物组合给药物,诱导细胞凋亡达到清除变异克隆的目标^[2,3]。

肺癌是发病率和死亡率增长最快,对人类健康和生命威胁最大的恶性肿瘤。由于环境污染、致癌物增多、吸烟等因素导致肺癌发病率与死亡率迅速增高,已经成为我国城市最常见的癌症^[4]。卫生部 2008 年发布的第三次居民死亡原因调查显示,肺癌已经取代肝癌成为我国恶性肿瘤首位死亡原因,30 年来竟然增长了近五倍。肺癌在诊断时有三分之二已经超越了手术切除的范围,一半已经有了临床或潜在的播散,化疗在临床上占较重要的地位,成为肺癌治疗不可或缺的手段之一。

铂类抗癌药物在临床上的成功应用,极大地促进了无机金属药物的发展。时至今日,铂类抗癌药物依然是使用最广泛的化疗药物之一。但是它们所产生的肾毒性、骨髓毒性、耳毒性、外周神经毒性、催吐性及长期使用产生的耐药性等一些毒副作用与比较窄的抗肿瘤谱使它们的应用受到了限制^[5]。而钌配合物由于它的低毒性、易于被肿瘤组织吸收、易于排泄,被认为是最有前途的抗癌药物之一^[6]。

本章以本实验室设计合成的含有与临床钌配合物对肺转移瘤有明显效果的 NAMI-A^[6]有相同配体的钌(II)配合物(a-d)与人肺腺癌 A549 细胞相互作用,

采用 MTT 法研究了钌（II）配合物（a-d）对 A549 细胞的增殖抑制活性，通过形态学观察、琼脂糖凝胶电泳、流式细胞术等方法检测这些钌（II）配合物对 A549 细胞的凋亡作用。

2 材料试剂及主要仪器

2.1 实验材料

A549 人肺腺癌细胞:购于中山大学动物实验中心

DEME 干粉培养基: GIBCO

胎牛血清: GIBCO

胰蛋白酶: SIGMA

蛋白酶 K:SIGMA

乙二胺四乙酸二钠(EDTA) (Amersco)

100bp DNA Marker:SIGMA

DNA 提取试剂: 上海华美生物工程公司

磷酸缓冲液 (PBS): (博士德)

DMSO:SIGMA

NaHCO₃ 分析纯 上海虹光化工厂

荧光色素, 琼脂糖, 无水乙醇等。

2.2 实验仪器:

二氧化碳细胞培养箱: Forma Scientific, Inc.

细胞培养专用超净工作台: SW-CJ-2FD, 苏州净化设备有限公司

倒置显微镜: CK×31, OLYMPUS

荧光倒置相差显微镜: Leica

高速低温离心机: Centrifuge 5417R

离心机: Allegra X-15R, Bechman Coulter, Inc.

电泳仪: EPS 100, Tanon.

血球分类计算器: 江苏江阴第二医疗器械厂

血球计数板: 玉环县求精医用仪器厂

BCD-252T 型伊莱克斯冰箱

DW-FL135 中科美菱 -40℃ 冰箱

HH-W600 数显三用恒温水箱 江苏金坛市荣华仪器制造有限公司

BL610 电子天平: 北京赛多利斯仪器系统有限公司

电热恒温鼓风干燥箱: 上海跃进医疗器械厂

85-2 型恒温磁力加热搅拌器 江苏金坛市荣华仪器制造有限公司

ICE1 型制冰机 广州市正一科技有限公司

Galanz 微波炉

酶标仪 美国 Bio-RAD

凝胶成像系统 美国 Bio-RAD

MP220 pH meter 瑞士 METTLER TOLEDO 公司

Pipetting Aid 可充电电动加液器 法国吉尔森公司

移液器 法国吉尔森公司

Cryosystem 4000 型液氮罐 美国 MVE 公司

双蒸水系统、十万分之一电子天平、各种型号的滤器、滤膜、各种型号的细胞培养瓶、各种型号的移液管、吹打管、玻璃离心管、细胞冻存管、96 孔板、24 孔板等

2.3 溶液的配制:

DMEM(高糖)培养基: 13.5gDMEM 粉, 2gNaHCO₃, 238gHEPES, 青/链霉素 10μg/mL, 1000mL 三蒸水, 调节 PH 于 7.1-7.2 之间, 搅拌均匀后进行抽滤灭菌, 抽滤完后于超净台分装并密封保存于 4℃。

PBS 溶液配制: 10×PBS 贮存液: NaCl80g, KCl2g, NaHPO₄·12H₂O28.9g, KH₂PO₄2g, 加双蒸水定容至 1000mL。使用时稀释成 1×PBS 溶液, (先用普通漏斗过滤入瓶中; 在瓶塞下放棉线, 塞好塞子; 以小布包好瓶塞, 棉线绑好; 湿热消毒后即可以养细胞用)。

TAE 电泳缓冲液 50×TAE Buffer(pH=8.5), 组份浓度: 2M Tris-醋酸, 100mM EDTA,

配制量：1L

①称量下列试剂，置于 1L 烧杯中：

Tris 242g

Na₂EDTA·2H₂O 37.2g

②向烧杯中加入约 800mL 去离子水，充分搅拌溶解；

③加入 57.1mL 的醋酸，充分搅拌；

④加去离子水将溶液定容至 1L 后室温保存。

1.5%琼脂糖凝胶：15g 琼脂糖粉，加入 100mLTAE 缓冲液，再加入 6μL 荧光色素，于微波炉中低火加热两分钟后自然凝固。

0.125%胰蛋白酶溶液 0.5g 胰蛋白酶溶液，80mgEDTA，400mLPBS，抽滤后置于 -20℃ 保存。

细胞冻存液：向 7mL 培养基中加入 1mLDMSO 和 2mL 已灭活的胎牛血清，吹打均匀，于 4℃ 保存。

Lysis Buffer:10mM Tris·HCl(pH=8.0),2mM EDTA,150mM NaCl,1%SDS。

TE Buffer:10mM Tris·HCl(pH=8.0)1mM EDTANa₄(pH=8.0)。

MTT 溶液配制：MTT 0.5 克，溶于 100 mL 的磷酸缓冲液或无酚红的基础液中。 -20℃下避光保存。

3.实验方法：

3.1 A549 细胞培养

3.1.1 细胞冻存

①细胞弃废液，PBS 洗 2 遍，滴加胰酶消化，显微镜下观察（必要时可放进 37℃ 培养箱孵育）；

②待细胞突起回缩、胞体变圆，加入与胰酶等体积的含血清培养基终止消化，规律、小心吹打成细胞悬液；

③1000 转离心 5min，弃上清；

④沉淀物中加入冻存液，轻轻吹打形成细胞悬液，调节细胞密度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$

个/mL;

⑤按每管 1~1.5mL 分装于冻存管中, 标记;

⑥将冻存管中的细胞先放入 4℃30min, 再入 -20℃ 2h, 再入 -70℃ 过夜, 最后放入液氮中保存。

3.1.2 细胞复苏

①细胞培养室及超净工作台先以紫外线消毒 30min, 同时取半杯双蒸水及培养基于 37℃ 水浴中预热半个小时;

②从液氮罐中取出装有细胞的冻存管, 手捏住盖子两侧, 使盖子以下部分浸入水中, 轻轻晃动, 使其于 1min 之内迅速融化;

③在超净工作台上打开冻存管, 将细胞悬液吸入到预先装有 2mL/管的离心管中;

④1000rpm/5min 离心;

⑤弃上清, 加 2mL 培养基, 吹打均匀, 1000rpm/5min 离心;

⑥弃上清, 加入 2mL 培养基, 吹打均匀, 移至培养瓶, 并补加培养液至 10mL;

⑦将其置于 37℃、5%CO₂、饱和湿度中的培养箱中培养;

⑧24h 之后换入新鲜培养液。

3.1.3 细胞传代

①取对数生长期细胞, 弃掉旧培养基, 加入 2 滴管 1×PBS 洗涤之后弃掉 PBS;

②加入 1 滴管 0.125%胰蛋白酶溶液消化几分钟;

③当在倒置相差显微镜下观察到细胞变圆并脱落时, 加入 1 滴管含有血清的培养基终止消化;

④将其吸入离心管, 1000rpm/5min 离心;

⑤弃上清, 加入培养基制成细胞悬液, 按比例传入培养皿中, 补充培养基至每皿 10mL, 置于 37℃、5%CO₂、饱和湿度中的培养箱中培养。

3.2 细胞计数:

- ①计数板处理：用无水乙醇或 95% 乙醇溶液冲洗计数板后，用滤纸擦净，另擦净特制盖片一张，把盖片覆在计数板上。
- ②加细胞悬液：用无菌移液器吸取 10 μ L 细胞悬液（细胞悬液也可先进行稀释，计算时应乘以稀释倍数），从计数板边缘缓缓加入，使之充满计数和盖片之间的空隙中。注意不要使液体流到旁边的凹槽中或带有气泡，否则要重做。加完后枪头不能再用。
- ③计数：然后将计数板放在低倍镜下观察计数。
- ④计数方法：计算计数板的四角大方格（每个大方格又分为 16 个小方格）内的细胞数。计数时，只计数完整的细胞，成团的细胞按一个细胞进行计数。在一个大方格中，如果有细胞位于线上，一般计上线细胞不计下线细胞，计左线细胞不计右线细胞。两次重复计数误差不应超过 $\pm 5\%$ 。
- ⑤计数的换算：计完数后，需换算出每 mL 悬液中的细胞数。由于计数板中每一方格的面积为 0.1cm²，高为 0.01cm，这样它的体积为 0.0001cm³ 即 0.1mm³。由于 1mL=1000mm³，所以每一大方格内细胞数 $\times 10000$ =细胞数/mL，故可按下式计算：

细胞悬液细胞数/mL=4 个大格细胞总数/4 $\times 10000$ 。如果计数前已稀释，要再乘稀释倍数。

3.3 药物配制与实验分组

以 1mL 1%DMSO 将其配制成 20mM 的溶液。实验时用不含胎牛血清的 DMEM(高糖)培养基将原液配制成 5 μ M、10 μ M、20 μ M 的溶液，以 1%DMSO 作为阴性对照，以 30 μ M MTAM 作为阳性对照。

3.4 MTT 法检测细胞存活率

MTT 是一种能接受氢原子的化学染料，其化学名为 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶的蓝紫色结晶并沉积在细胞中，而坏死的细胞无此功能。DMSO 能溶解细胞中的蓝紫色结晶，用酶标仪检测其吸光度。在一定细胞浓度范围内，蓝紫色结

晶的形成量与活细胞数量成正比。即吸光度值与活细胞数量成正比。

取对数生长期细胞，计数后调整细胞浓度至 0.5×10^4 个/mL，接种于 96 孔板中，每孔接种 $100 \mu\text{L}$ ，至 CO_2 培养箱中过夜。待细胞贴壁后，倒去培养液，每孔加入 $90 \mu\text{L}$ 培养基，和 $10 \mu\text{L}$ 不同浓度的受测试药物。每一浓度设三个平行孔。对照组加等体积的 PBS。继续培养 48 小时后，小心除去上清，每孔加入 $20 \mu\text{L}$ MTT (5mg/mL)，至培养箱中继续育温 4-6 小时。除去上清后，每孔加 $100 \mu\text{L}$ DMSO 溶解沉淀物，振荡溶解 10 分钟，待完全溶解后，于酶标仪在 570nm ，参考波长 630nm 下检测 OD 值。

细胞生长增殖抑制率% = $(1 - \text{样品组平均 OD 值} / \text{对照组平均 OD 值}) \times 100\%$ 。按以下的改良 Karber 公式计算 IC_{50} ^[4]

$$\lg \text{IC}_{50} = X_m - i \times [P - (3 - P_m - P_n) / 4]$$

$$i = \lg(\text{最大剂量} / \text{相邻剂量})$$

$$X_m = \lg \text{最大剂量}$$

P = 阳性反应率之和

P_m = 最大阳性反应率

P_n = 最小阳性反应率

3.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测

- ◆准备两烧杯，分别装水，细胞刮刀，2 支滴管；
- ◆取离心管；
- ◆显微镜下观察细胞形态；
- ◆用刮刀将细胞刮下，滴管吹打，移入离心管；
- ◆2min/2500 转离心；
- ◆弃上清，加 2 滴管 PBS，吹打洗涤；
- ◆离心 2min, 2500 转；
- ◆弃上清，加 1mL PBS，吹打，移入标记好的 EP 管；
- ◆离心 5min, 5000 转；
- ◆弃上清，加入 $750 \mu\text{L}$ lysis buffer 吹打；
- ◆作用 15min, 离心 15min/13000rpm；

- ◆吸出上清，移入另一 EP 管；
- ◆制冰沙，将 proteinase K 于冰沙中；
- ◆加 5 μ L proteinase K 加入 EP 管；
- ◆55 $^{\circ}$ C 水浴中反应 30min；
- ◆加 0.75mL 无水乙醇，0.125mL 5M NaCl；
- ◆用手翻转混匀；
- ◆-20 $^{\circ}$ C 过夜；
- ◆打开低温离心机预冷；
- ◆配平后离心 15min/13000rpm；
- ◆弃上清；
- ◆加 500 μ L TE buffer；
- ◆加 500 μ L 抽提液（保存于冰箱中，用前摇匀），静置 15min；
- ◆室温离心 15min/13000rpm；
- ◆以移液器吸出上清，转移至另一 EP 管；
- ◆加 500 μ L 氯仿，摇匀，静置 15min；
- ◆室温离心 15min/13000rpm；
- ◆用移液器吸出上清，转移至另一 EP 管；
- ◆加 750 μ L 无水乙醇，125 μ L 5M NaCl 溶液；
- ◆-20 $^{\circ}$ C 过夜；
- ◆预冷低温离心机；
- ◆配平离心，15min/13000rpm；
- ◆上清倒掉；
- ◆于卫生纸上倒扣干（5-10min）；
- ◆加入 20 μ L TE buffer，放入冰箱 4 $^{\circ}$ C 过夜。

琼脂糖凝胶电泳：

制胶：

将旧胶于微波炉中熔解（中低火 2min 左右）；

称琼脂糖粉末(1.5%)，加 TAE；

于微波炉中中低火加热两分钟，再加入荧光色素（每 100mL 溶液 6-8 μ L）；

于微波炉中再熔解，摇匀，稍冷后，在凝固之前注入制胶。制好后大约一两小时才可用。

电泳：

- ① 向电泳槽中倒入 TAE，没过胶面 1-2mm，电泳完后 TAE 溶液要回收；
- ② 在 pa 膜上滴加 2 μ L 6 $\times$ loading buffer；
- ③ 向 loading buffer 加 10 μ L DNA，吹打；
- ④ 向孔内依次加样品；
- ⑤ 向孔内加入 3 μ L marker；
- ⑥ 盖盖子，电压 60-80V，时间 30min，开始电泳；
- ⑦ 观察是否有气泡产生，无则找原因。跑完后，直接拿入左边凝胶成像系统拍照。

3.6 流式细胞仪检测 A549 细胞凋亡率

- ① 收集所有废液，尚贴壁的细胞用胰酶充分消化；
- ② 终止消化，与前收集的废液一起离心，1000rpm $\times$ 5min；
- ③ 弃上清，PBS 洗涤 1~2 次，离心；
- ④ 弃上清，10mLPBS 重悬，充分吹打，300 或 400 目细胞筛网过滤；
- ⑤ 收集滤液，1000rpm 离心 5min；
- ⑥ 弃上清，1mL70%冷乙醇重悬细胞，并将其移入 EP 管中；
- ⑦ 4 $^{\circ}$ C 固定过夜，冰上送检；

注意事项：

- ① 应收集所有漂浮和贴壁的细胞；
- ② 每份样本的细胞总数应不低于 10⁶ 个；
- ③ 细胞消化应充分，但不可过度；
- ④ 全过程中吹打细胞时应尽量轻柔、充分，尽量减少泡沫的生成，应尽可能制成单细胞悬液，同时也应尽量减少细胞碎片的产生；
- ⑤ 样本送检时应置于冰上；
- ⑥ 机上检测。

4.实验结果与讨论

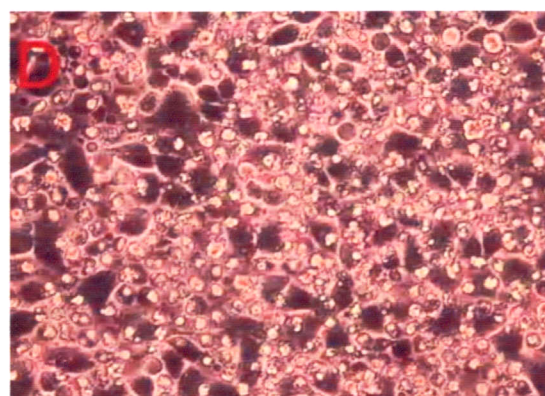
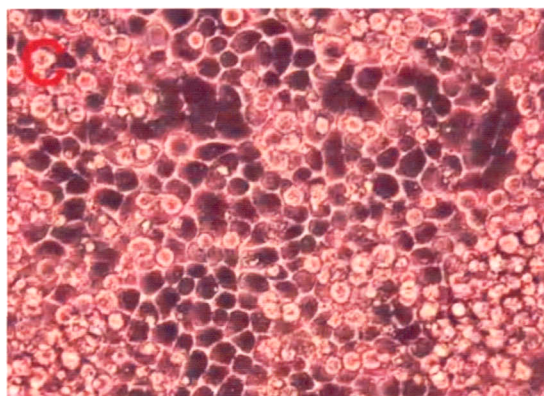
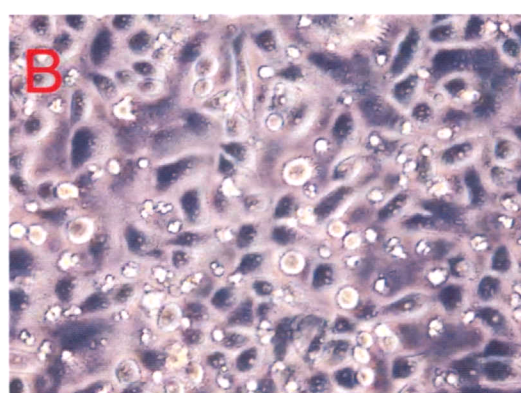
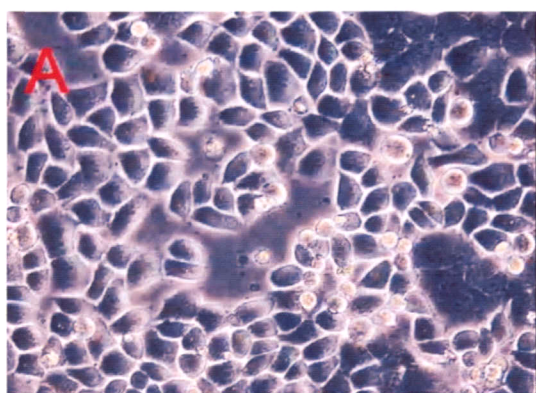
4.1 形态学观察

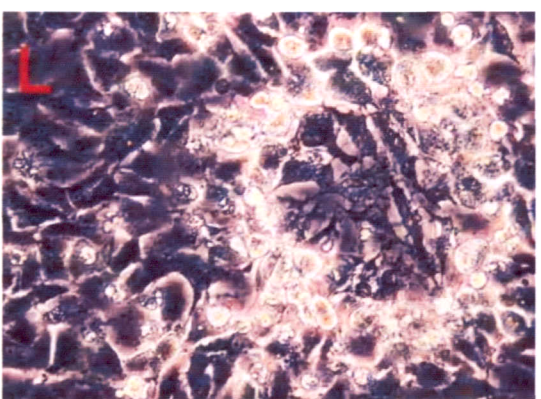
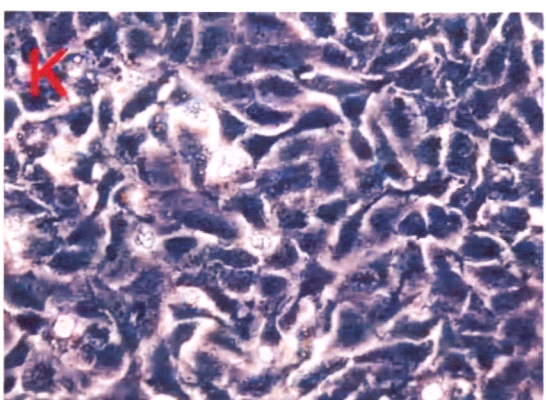
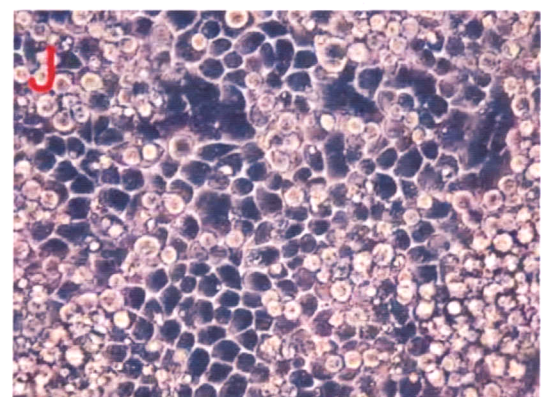
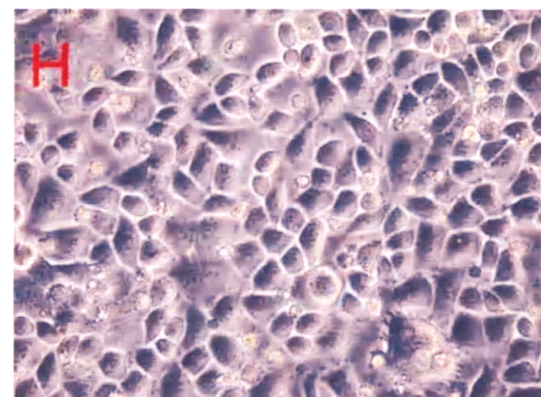
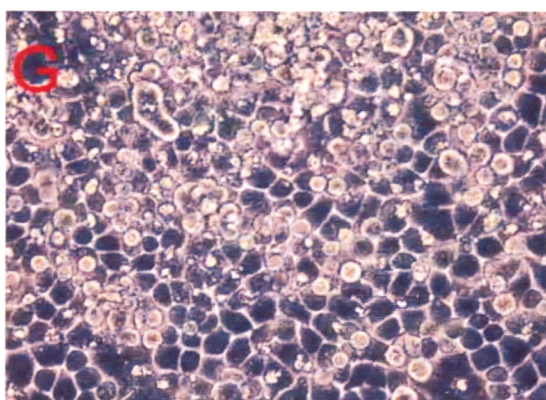
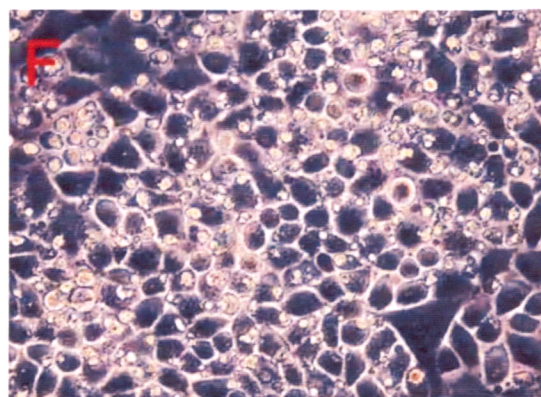
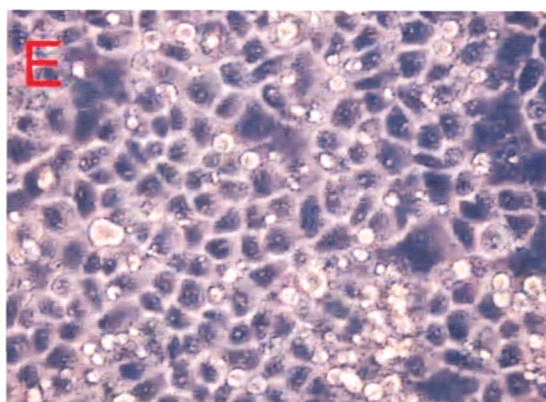
如下图所示，配合物 a-d 与 A549 细胞作用，在倒置显微镜下可观察到，阴性对照组 1%DMSO 作用 48h 后，细胞呈大的多角形，大小均匀，生长良好。

加入配合物作用后细胞失去附壁能力，失去基本的细胞形态，脱落至培养液中，细胞浮起、变圆，体积缩小、膜皱缩，发泡，折光性增强，产生凋亡小体。对于配合物 a-d，均随着用药浓度的增加漂浮细胞比例有所增加。整个看来，相同浓度的配合物作用于 A549 细胞时，漂浮死细胞数量有如下关系：

配合物 a>配合物 b>配合物 c>配合物 d。

但是形态学的观察还是不够精确，必须结合其他方法一同确证是否存在细胞凋亡。





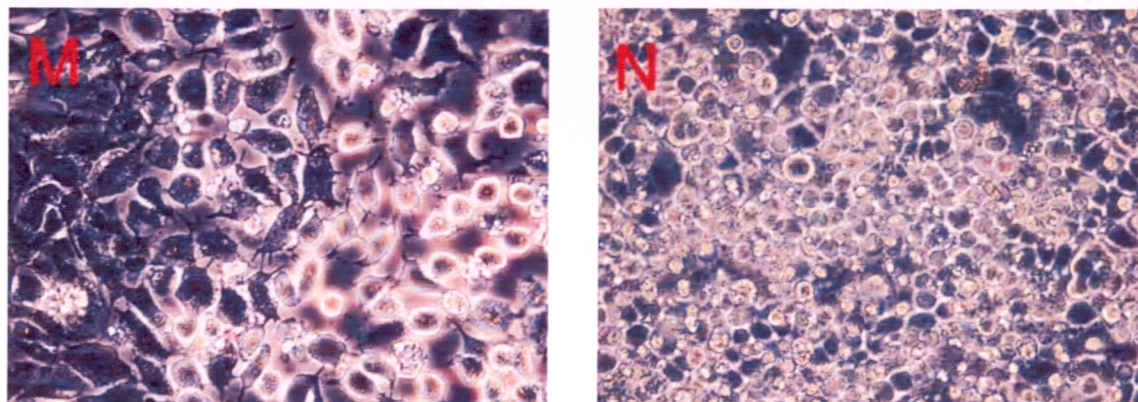


图 3-1 配合物 a-d 与 A549 细胞作用 48 小时图片

[A: 阴性对照 1%DMSO,B:5 μ M 配合物 a,C: 10 μ M 配合物 a,D: 20 μ M 配合物 a,E: 5 μ M 配合物 b,F: 10 μ M 配合物 b,G: 20 μ M 配合物 b,H: 5 μ M 配合物 c,I: 10 μ M 配合物 c,J: 20 μ M 配合物 c,K: 5 μ M 配合物 d,L: 10 μ M 配合物 d,M: 20 μ M 配合物 d,N: 阳性对照 30 μ MTAM]

4.2 MTT 细胞毒性检测

肿瘤的典型特征之一就是肿瘤细胞增殖失控，本文采用 MTT 法研究了本实验室所合成的一系列钇（II）配合物对 A549 细胞的增殖抑制活性，并通过计算与作图得出它们对 A549 细胞的 IC₅₀ 值。

MTT 法是一种常用的检测细胞增殖率的方法，其原理是 MTT 可作为哺乳类动物细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶的底物，当有活细胞存在时，线粒体内琥珀酸脱氢酶可将淡黄色的 MTT 还原成紫蓝色的晶状甲瓚(Formazan)，且甲瓚生成量与活细胞数量呈现线性关系^[7-9]。

实验结果显示在一定浓度范围内，四种配合物均可以降低细胞存活率，抑制 A549 细胞生长增殖。

表 3-1 钇(II) 配合物对 A549 细胞的抑制作用及 IC₅₀ 值（48 小时）

配合物	抑制率(%)				IC ₅₀ 值(μ M)
	1(μ M)	10(μ M)	20(μ M)	40(μ M)	
a	39.4	45.2	57.1	73.3	12.5
b	28.5	40.8	58.9	63.4	15.2
c	4.95	10.1	12.5	23.9	44.8
d	1.31	3.92	8.55	21.8	47.9

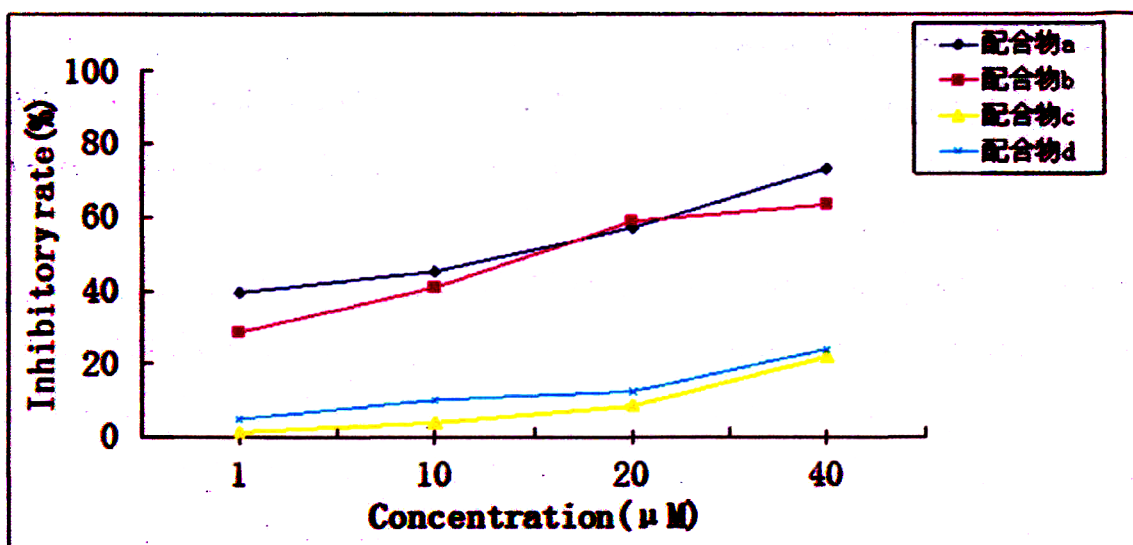


图 3-2 四种钌(II)配合物与 A549 细胞作用 48 小时抑制率图

4.3 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测

细胞凋亡时核酸内切酶活化,活化的核酸内切酶将 DNA 链在核小体连接区切成缺口,形成若干 180-200bp 或倍数的寡核苷酸片段;而坏死细胞的断裂无规律。DNA 琼脂糖凝胶电泳就是检测细胞凋亡时染色体从核小体间断裂形成由大约为 180-200bp 或多聚体组成的寡核苷酸片段,将这些片段从细胞中提取出来之后再是进行电泳,紫外灯下可以看到特征性的“梯状(ladder)条带”,若有“梯状条带”的出现,就可以确证受检测细胞中细胞凋亡的存在^[10,11]。DNA 琼脂糖凝胶电泳曾被认为是检验细胞凋亡的“金标准”,是一种常用来定性检测细胞凋亡的手段。

通过对以上四种配合物与 A549 细胞作用 48 小时的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图来看,图 3-3 为配合物 a 与 A549 细胞作用的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图,其中阴性对照 1%DMSO 没有条带出现,说明它对 A549 细胞不存在凋亡作用或者凋亡作用极弱。而配合物 a 的 3 个浓度均出现了清晰的梯度,这反映出细胞凋亡十分重要的生化特征,说明配合物 a 存在着诱导 A549 细胞凋亡的作用。

图 3-4 是配合物 b 与 A549 细胞凋亡作用 48 小时的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图,从中可以看到同样阴性对照没有清晰“梯度”出现,而配合物 b 在 5μM 的浓度时,“梯度”不太明显,这可能是因为它所引起的凋亡率不高,凋亡细胞数量不多所致。当配合物 b 浓度为 10μM、20μM 时可以看到有“梯度”的出现,这说明了配合物 b

也可以诱导 A549 细胞发生凋亡。

图 3-5、图 3-6 分别为配合物 c、配合物 d 与 A549 细胞作用 48 小时的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图。配合物 c 在高浓度时有“梯度”出现,说明它是可以诱导 A549 细胞凋亡的,在较低浓度时无明显“梯度”还是可能因为它所引起的凋亡率不够。配合物 d 在各种浓度均没表现出明显“梯度”,但结合在形态学观察中它所损伤细胞的量较少分析可能原因还是因为它在各浓度时诱导凋亡的细胞数量较少所致。

结合以上分析,配合物 a、b、c 均可以确定它们可以诱导 A549 细胞发生凋亡,配合物 d 是否可以诱导凋亡还必须结合更先进的方法进一步分析。

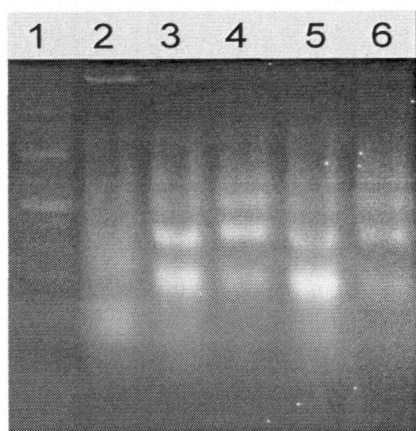


图 3-3 配合物 a 与 A549 细胞作用 48hDNA 电泳图

1:100bp DNA Marker;2: 1%DMSO;3:5 μ M; 4:10 μ M; 5:20 μ M; 6:阳性对照组:30 μ MTAM

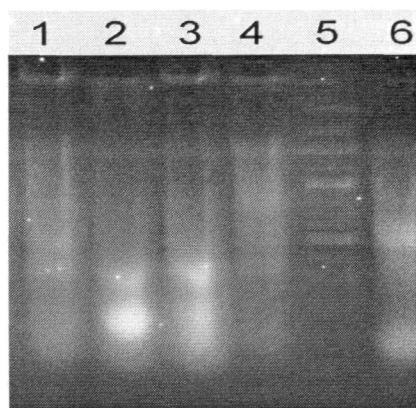


图 3-4 配合物 b 与 A549 细胞作用 48hDNA 电泳图

1:5 μ M; 2:10 μ M; 3:20 μ M; 4: 1%DMSO; 5:100bpDNA Marker 6:阳性对照组:30 μ MTAM

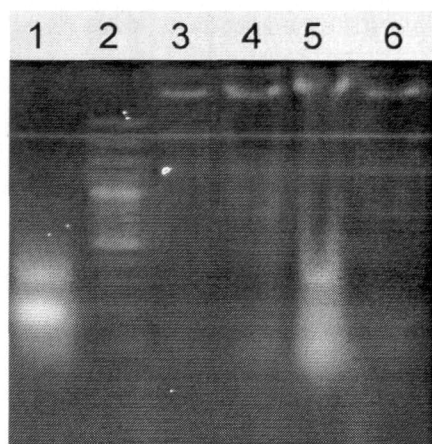


图 3-5 配合物 c 与 A549 细胞作用 48hDNA 电泳图

1:阳性对照组:30 μ M TAM;2:100bp DNA Marker;3:5 μ M; 4:10 μ M; 5:20 μ M;6: 1%DMSO 作用

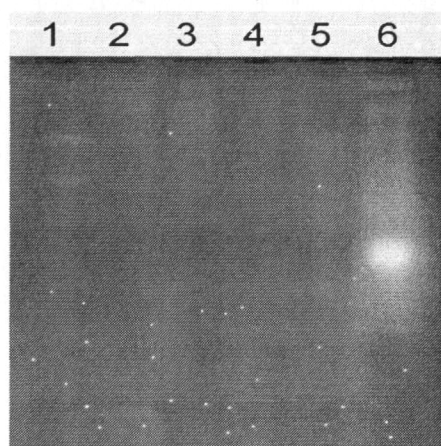


图 3-6 配合物 d 与 A549 细胞作用 48hDNA 电泳图

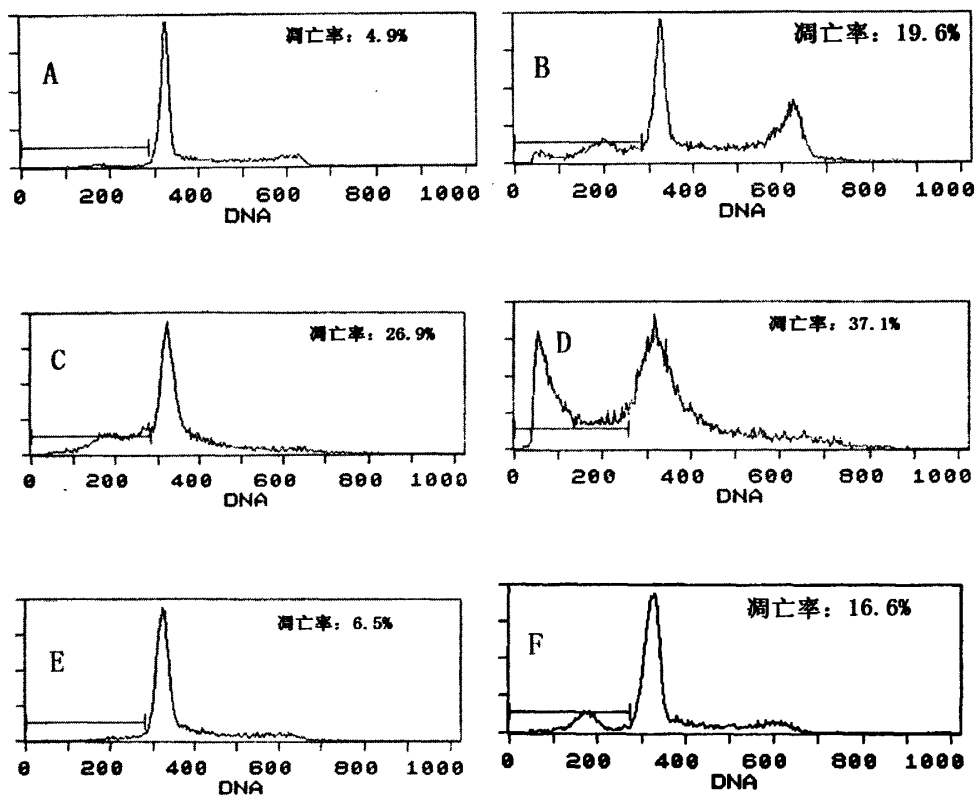
1: 100bp DNA Marker;2: 1%DMSO;3:5 μ M;4:10 μ M;5:20 μ M;6:阳性对照:30 μ M TAM

4.4 流式细胞术检测

从图 3-7 可以看出, 对照组 A 图只有 4.9% 较低的凋亡率, 而其它四个配合物在各个浓度的凋亡率均高于对照组, 这说明 4 个配合物均可导致 A549 细胞凋亡。并且每个配合物均显示出了一定的剂量效应关系。在配合物 a 的 B、C、D 三个图中, 都可以看到有凋亡峰的存在, 尤其在在 20 μ M 浓度时, 其峰非常明显, 这一特征也证明了配合物 a 可以诱导细胞凋亡。在配合物 b 和配合物 c 的高浓度作用的流式直方图中也可以看到有明显凋亡峰的存在, 也说明了配合物 b 和配合物 c 是可以诱导 A549 细胞凋亡的。配合物 d 的作用图中, 凋亡峰不明显, 这应

当是因为它的凋亡率比较低，细胞凋亡数量较少所致。

流式细胞术的结果与前面的形态学观察、DNA 琼脂糖凝胶电泳表现出很好的一致性，形态学观察中配合 a 中漂浮死细胞较多，其 DNA ladder 也比较清晰，而流式细胞术定量检测时其凋亡率也是比其它配合物要高，最高浓度时其凋亡率 37.1%。同样对于配合物 d, 形态学观察结果显示，其表现出凋亡特征细胞数量较少，而其 DNA ladder 亦不清晰，最后的流式细胞术检测结果应证了前面的推论，配合物 d 在浓度为 $5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 时对 A549 细胞的凋亡率均比较低，尤其是在其浓度为 $5\mu\text{M}$ 时，它的凋亡率为 5% 与阴性对照 4.9% 的凋亡率很接近，它的 DNA ladder 完全看不到有“梯度”出现，与阴性对照 DNA ladder 相似，而其形态学观察中，显微镜下的照片显示出它的凋亡细胞数量亦很少。



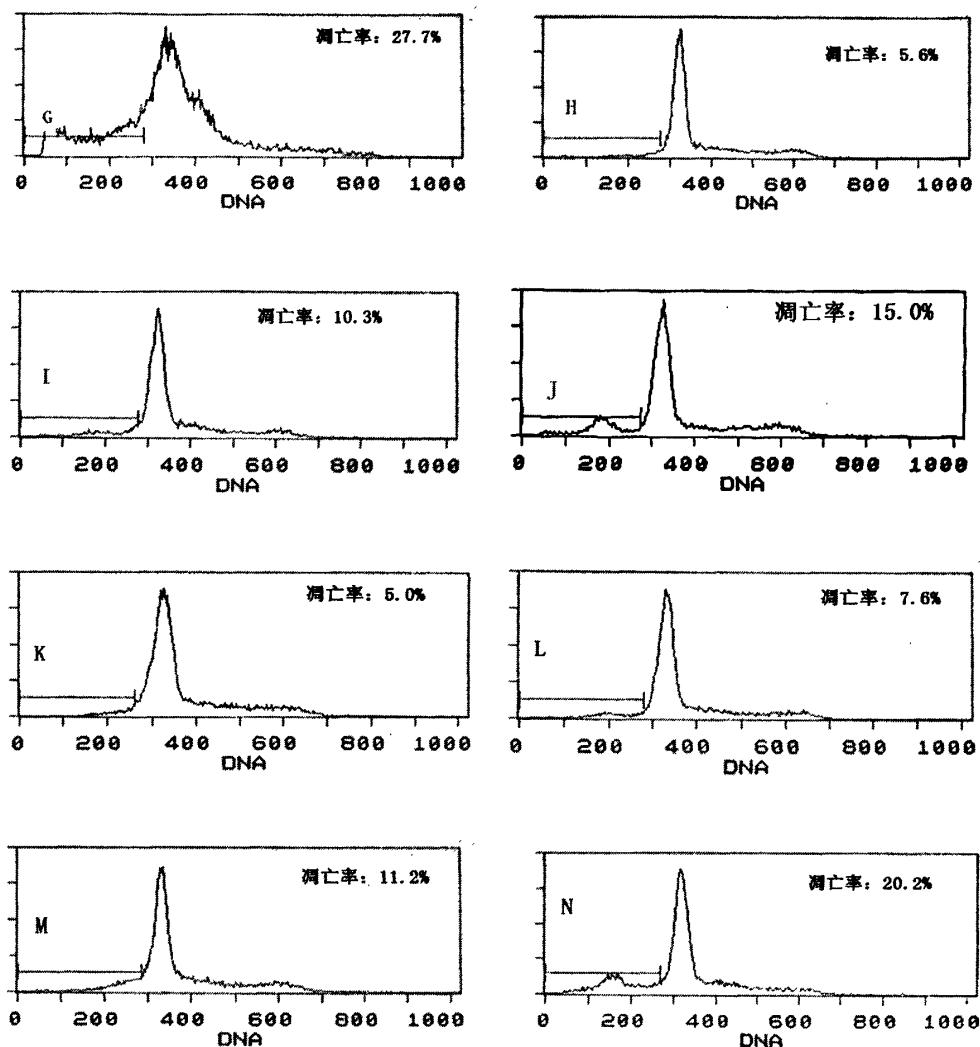


图 3-7 Ru(II)配合物作用 A549 细胞 48 小时流式细胞术检测结果

[A:1%DMSO 阴性对照, B:5 μ M 配合物 a, C:10 μ M 配合物 a, D:20 μ M 配合物 a, E:5 μ M 配合物 b, F:10 μ M 配合物 b, G:20 μ M 配合物 b, H:5 μ M 配合物 c, I:10 μ M 配合物 c, J:20 μ M 配合物 c, K:5 μ M 配合物 d, L:10 μ M 配合物 d, M:20 μ M 配合物 d, N:30 μ M MTAM 阳性对照]

4.5 讨论

细胞凋亡,是指细胞在一定条件下,主动的、高度有序的、由基因控制及一系列酶参与并遵循自身的程序,自己结束生命的过程^[12]。细胞发生凋亡时,会发

生表现出系列的形态学与生化特征, 基于它的这些特征建立起了一系列的检测方法。随着细胞凋亡研究的不断深入, 方法越来越多, 但是并没有到目前还没有一种方法可以单独确定任何情况下的细胞凋亡, 所以在本文采用了多种方法结合综合判断细胞凋亡各种钌(II)配合物是否有诱导 A549 细胞凋亡的活性。

本文通过采用形态学观察、MTT 法细胞毒性实验、DNA 琼脂糖凝胶电泳和流式细胞术等方法综合检测, 通过对这一系列结果的综合分析, 可以证明一系列的钌(II)配合物可以通过诱导 A549 细胞发生凋亡而抑制其增殖。通过比较, 钌配合物诱导 A549 细胞凋亡的能力为: $a > b > c > d$ 。其中 a、b、d 的结构相似, 有不同配体分别为 dppz, dpq, phen。从 a-b-d 诱导 A549 细胞的凋亡能力依次减弱, 这可能与其配体的芳环依次减少有关, 芳环减少导致其配位 N 原子电子云密度增大。

5 参考文献

- [1] J.F.Kerr,A.H.Willie,A.R.Currie.Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.*Br.J.Cancer*.1972,26,239-257.
- [2] X.X.Wu,Y.Mizutani,Y.Kakehi,et al.Enhancement of Fas-mediated apoptosis in renal cell carcinoma cells by adriamycin.*Cancer Res*.2000,60(11),2912-2918.
- [3] P.Huang,A.Oliff.Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy.*Trends Cell Biol*.2001,11(8),343-348.
- [4] 韩锐, 孙燕.新世纪癌的化学预防与药物治疗.人民军医出版社.2005 年.
- [5] S.D.Sigman,A.Mazumder,D.M. Perrin.Chemical nucleases. *Chem Rev*.1993,93,2295.p
- [6] G.Mestroni,E.Alessio,G.Sava,S.Pacor,M.Coluccia,A.Boccarelli.Water-soluble ruthenium (III)-dimethylsulfoxide complexes: chemical behaviour and pharmaceutical properties, *Metal-Based Drugs*, 1994, 1, 41-63.
- [7] T.S.Chu,M.S.Wu,B.S.Hsieh.Vasodilator agents inhibit opossum kidney proximal tubular cell growth.*J Formos Med Assoc*.2005,104,374-377.
- [8] A.Ptasznik,Y.Nakata,et al.Short interfering RNA(siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary ,and drugresistant,BCR-ABL1(+) leukemia cells.*Nat Med* .2004,10,1187-1179.

- [9] A.Yokoi ,J.Kuromitsu,et al.**Profiling Novel Sulfonamide Antitumor Agents with Cell- base Phenotypic Scereens and Array-based Gene Expression Analysis.***Mol Cancer Ther.***2002,1,275-286.**
- [10] R.Sgonc,G.Wick.**Methods for the detection of apoptosis.***Arch Alerg Immunol.***1994,105,327-332.**
- [11] A.Negoescu,C.Guillermet,et al.**Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity.***Biomed Pharmacother.***1998,52,252-259.**
- [12] 彭黎明,王曾礼主编.细胞凋亡基础与临床.人民卫生出版社.2000年.

第四章 Ru(III)配合物对 A549 细胞的凋亡作用

1. 引言

钌配合物作为最有前途的抗癌药物之一^[1]，特别是已经有两个 Ru(III)配合物 NAMI-A 和 KP1019 被运用于临床^[2-5]，在本章选用了本实验室合成的三个钌(III)配合物(e-g)与人肺腺癌 A549 细胞相互作用，采用 MTT 法等研究了钌(III)配合物对 A549 细胞的增殖抑制活性，采用形态学观察、琼脂糖凝胶电泳、流式细胞术等方法检测这些钌(III)配合物(e-g)对 A549 细胞的凋亡作用。

2 材料试剂及主要仪器

参见第三章：2 材料试剂及主要仪器

3 实验方法

参见第三章 3 实验方法

4 实验结果及讨论

4.1 形态学观察

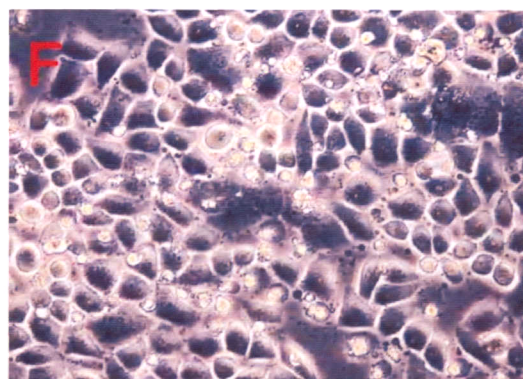
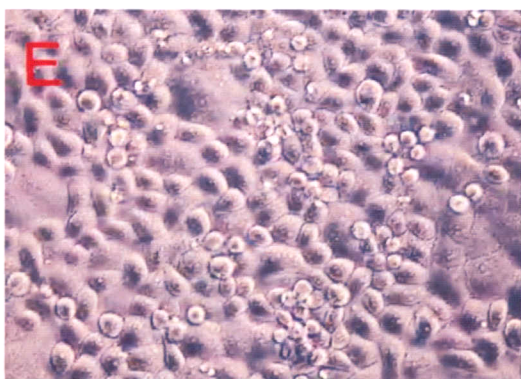
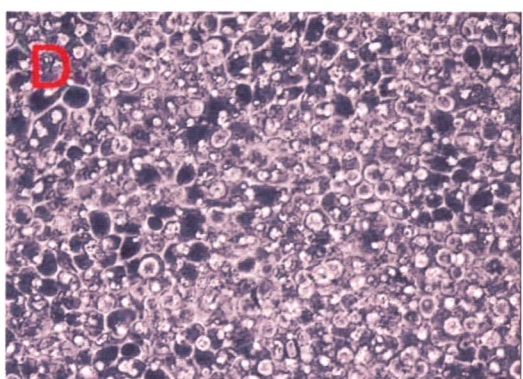
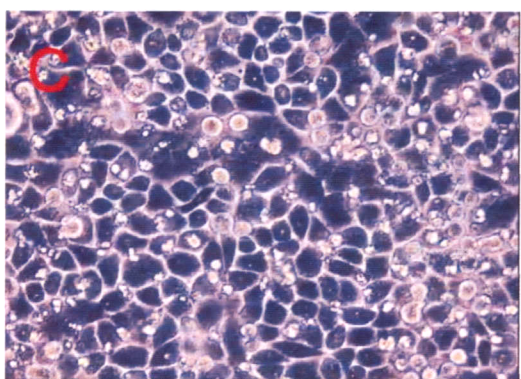
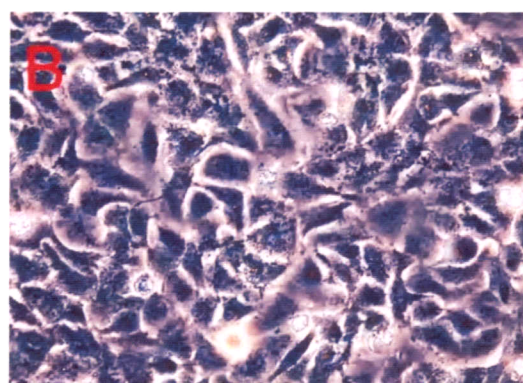
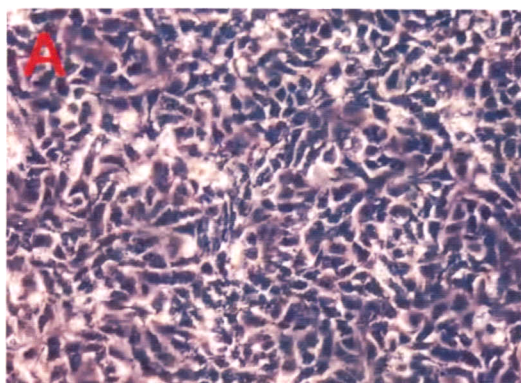
如图 4-1 所示，配合物 e-g 与 A549 细胞作用，在倒置显微镜下可观察到，阴性对照组 1%DMSO 作用 48h 后，细胞排列紧密，大小均匀，生长良好，但是也有少量圆形细胞出现。

加入配合物作用后细胞失去附壁能力，失去基本的细胞形态，脱落至培养液中，细胞浮起、变圆，体积缩小、膜皱缩，发泡，折光性增强，产生凋亡小体。对于配合物 e-g，均随着用药浓度的增加漂浮死细胞比例有所增加。整个看来，

相同浓度的配合物作用于 A549 细胞时，漂浮死细胞数量有如下关系：

配合物 e > 配合物 f > 配合物 g

从这些图片可以看出三个钉（III）配合物对 A549 细胞均有损伤作用，并且呈浓度依赖性，呈现了细胞凋亡的一些特征，至于是否是凋亡必须结合其他方式检测。



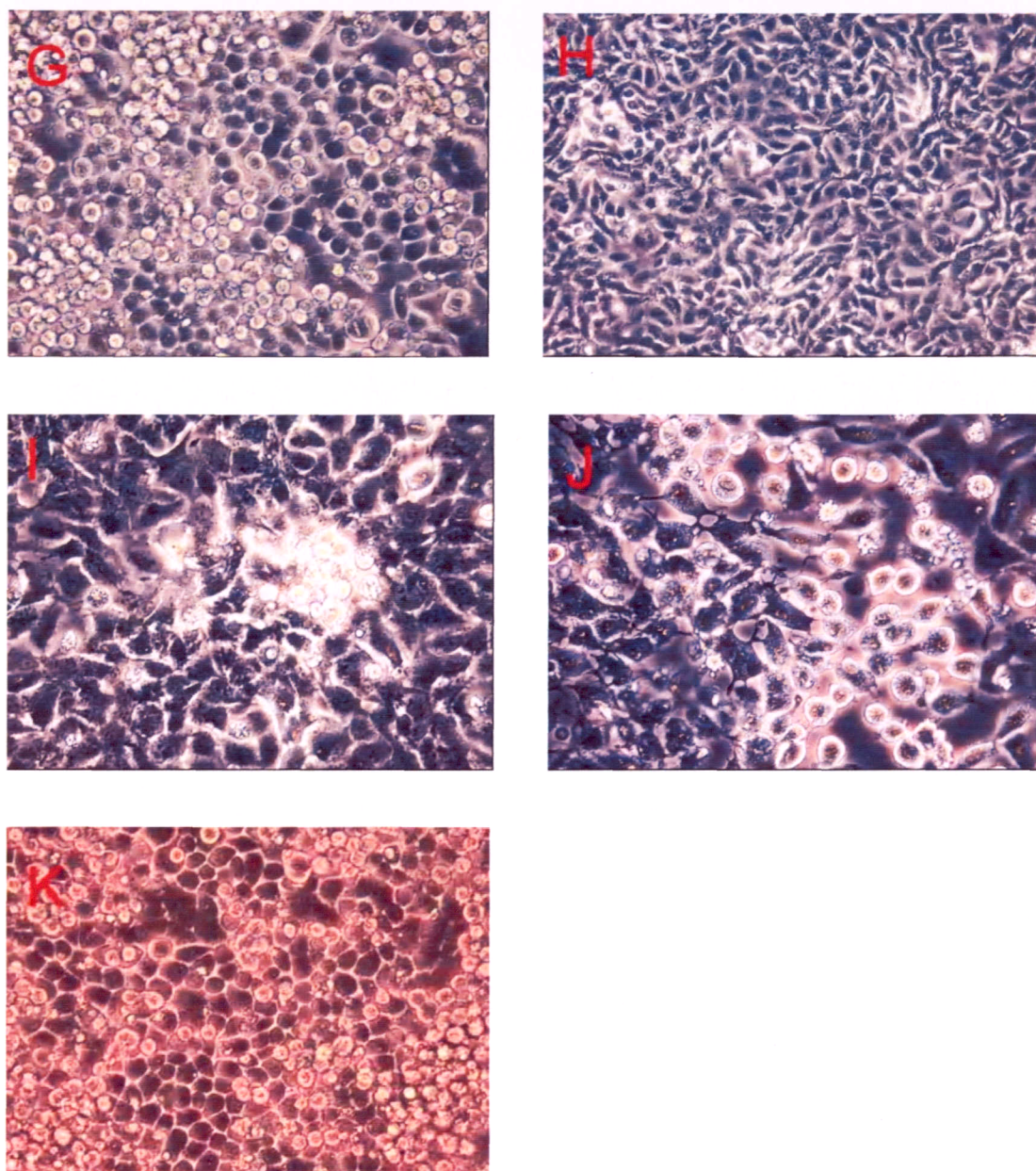


图 4-1 Ru(III)配合物 e-g 与 A549 细胞作用 48 小时

[A: 阴性对照 1%DMSO 作用,B:5 μ M 配合物 e,C: 10 μ M 配合物 e,D: 20 μ M 配合物 e,E: 5 μ M 配合物 f,F: 10 μ M 配合物 f,G: 20 μ M 配合物 f,H: 5 μ M 配合物 g,I: 10 μ M 配合物 g,J: 20 μ M 配合物 g, K:阳性对照 30 μ MTAM]

4.2 MTT 法毒性检测

实验结果见于表 4-1 和图 4-2,三个钌(III)配合物在各种浓度时均可抑制 A549 细胞的生长, 并且有浓度依赖性。

表 4-1 钇(III) 配合物对 A549 细胞的抑制作用及 IC₅₀ 值 (48 小时)

配合物	抑制率 (%)				IC ₅₀ 值(μM)
	1(μM)	10(μM)	20(μM)	40(μM)	
e	30.1	47.2	77.8	89.1	10.1
f	25.5	46.1	63.7	72.4	13.5
g	19.3	28.1	31.6	51.7	24.0

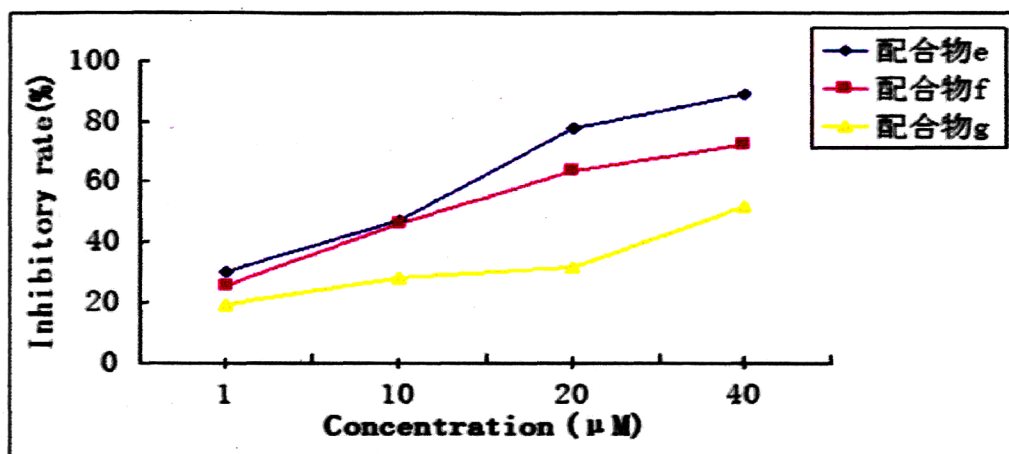


图 4-2 钇配合物对 A549 细胞生长抑制的浓度依赖型曲线 (48 小时)

4.3 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测

通过对以上四种配合物与 A549 细胞作用 48 小时的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图来看, 图 4-3 为配合物 e 与 A549 细胞作用的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图, 其中阴性对照 1%DMSO 没有条带出现, 说明它对 A549 细胞不存在凋亡作用或者凋亡作用极弱。而配合物 e 在各浓度时表现出清晰“梯状”条带, 说明了配合物 e 可以诱导 A549 细胞发生凋亡。

图 4-4 是配合物 f 与 A549 细胞凋亡作用 48 小时的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图, 从中可以看到同样阴性对照没有清晰“梯度”出现, 配合物 f 在 10μM、20μM 浓度时有“梯度”出现, 说明它是可以诱导 A549 细胞凋亡的, 在较低浓度 5μM 时无明显“梯度”还是可能因为它所引起的凋亡率不够高。

图 4-5 为配合物 g 与 A549 细胞作用 48 小时的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图。而配合物 g 在低浓度 5μM、10μM 时条带不明显, 这可能与低浓度时凋亡细胞数量不够多所致, 在高浓度 20μM 时出现了“梯状”条带, 这说明了配合物 g 存在着对 A549 细胞的凋亡作用。

综合以上分析, 可以确定配合物 e、f、g 均可以诱导 A549 细胞发生凋亡。

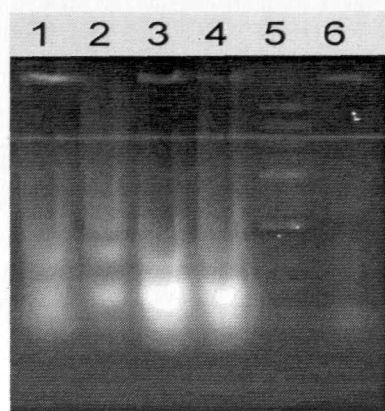


图 4-3 配合物 c 与 A549 细胞作用 48 小时 DNA 电泳图

1: 5 μ M;2: 10 μ M;3: 20 μ M;4: 阳性对照:30 μ MTAM;5: 100bp DNA Marker;6: 1%DMSO

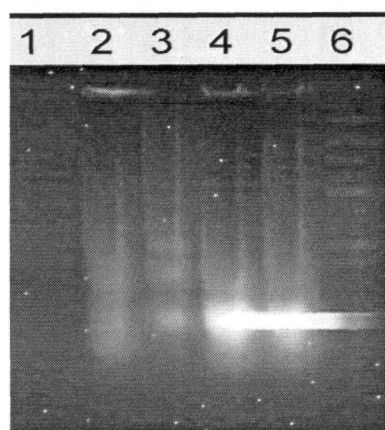


图 4-4 配合物 f 与 A549 细胞作用 48hDNA 电泳图

1: 1%DMSO 作用;2: 5 μ M;3: 10 μ M;4: 20 μ M;5: 阳性对照:30 μ MTAM;6: 100bp DNA Marker

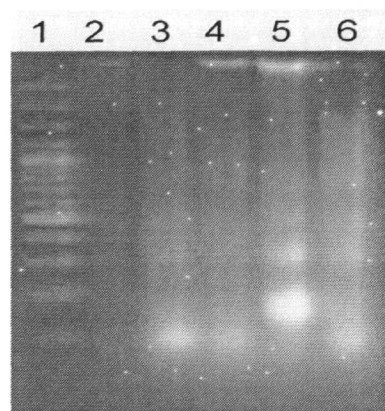


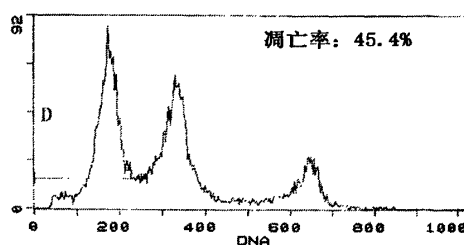
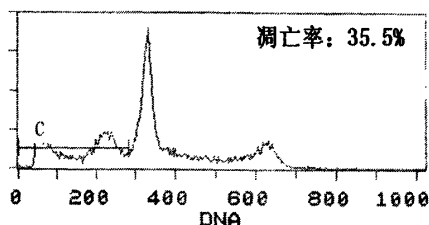
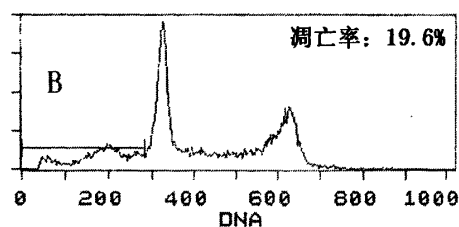
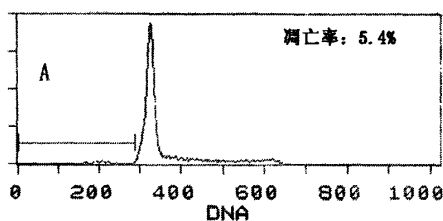
图 4-5 配合物 g 与 A549 细胞作用 48h 电泳图

1: 100bp DNA Marker;2: 1%DMSO;3:5 μ M;4:10 μ M;5:20 μ M;6:阳性对照:30 μ MTAM

4.4 流式细胞术检测

从图 4-6 可以看出, 对照组 A 图只有 5.4% 较低的凋亡率, 而其它三个配合物在各个浓度的凋亡率均高于对照组, 这说明三个配合物均可导致 A549 细胞凋亡。并且每个配合物均显示出了一定的剂量效应关系。在配合物 e 的 A、B、C 三个图中, 都可以看到有凋亡峰的存在, 这一特征也说明了配合物 e 可以诱导细胞凋亡, 在最高浓度时其凋亡率达 45.4%。在配合物 f 和配合物 g 的高浓度作用的流式直方图中也可以看到有明显凋亡峰的存在, 也说明了配合物 f 和配合物 g 是可以诱导 A549 细胞凋亡的。

流式细胞术的结果与前面的形态学观察、DNA 琼脂糖凝胶电泳表现出很好的一致性, 形态学观察中配合物 e 中漂浮死细胞较多, 其 DNA ladder 也比较清晰, 而流式细胞术定量检测时其凋亡率也是比其它配合物要高, 最高浓度时其凋亡率为 45.4%。同样对于配合物 g, 形态学观察结果显示, 其表现出凋亡特征细胞数量较少, 而其 DNA ladder 在低浓度时亦不清晰, 最后的流式细胞术检测结果印证了前面的推论——其诱导的凋亡细胞比例不高。配合物 f 对 A549 细胞的凋亡率居于 e 与 g 之间, 同样与其前述实验结果一致。



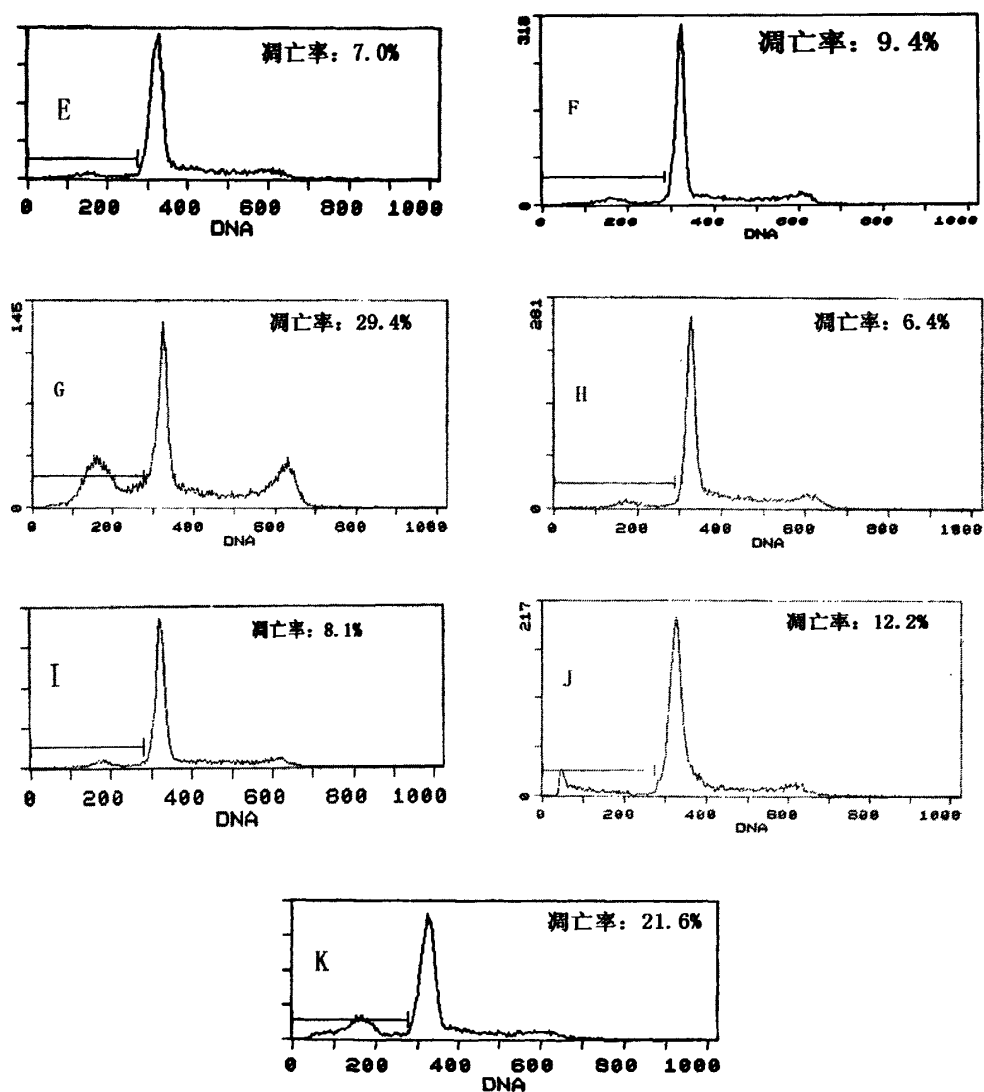


图 4-6 钌 (III) 配合物作用 A549 细胞 48 小时流式细胞术检测结果

[A:1%DMSO 阴性对照, B:5 μ M 配合物 e, C:10 μ M 配合物 e, D:20 μ M 配合物 e, E:5 μ M 配合物 f, F:10 μ M 配合物 f, G:20 μ M 配合物 f, H:5 μ M 配合物 g, I:10 μ M 配合物 g, J:20 μ M 配合物 g, L:30 μ MTAM 阳性对照]

4.5 结果讨论

本文通过采用形态学观察、MTT 法细胞毒性实验、DNA 琼脂糖凝胶电泳和流式细胞术等方法综合检测,通过对这一系列结果的综合分析,可以证明这一系列的钌 (III) 配合物可以通过诱导 A549 细胞发生凋亡而抑制其增殖。这三个钌

(III) 配合物诱导 A549 细胞凋亡的能力: $e > f > g$, 其中 e 的诱导 A549 细胞凋亡的能力比较强, 达到了 45.4% 的凋亡率。 e 、 f 、 g 三个配合物结构相似, 分别含有不同的配体: bpy , phen , Biim , 但是不同配体对钌(III)配合物诱导细胞凋亡能力的影响有待深入研究。而对于 g 与第三章中的 c , 凋亡率 $g > c$, 它们的配体相同, 仅仅是价态不同 g 是三价的, 是否对于 e, f 也有同样的关系即三价钌配合物凋亡率比相应的二价钌配合物高, 还有待后续合成更多的相应钌配合物来进行研究。

5 参考文献

- [1] 汪中明, 计亮年. 钌配合物的抗肿瘤活性研究进展. *化学进展*. 2002, 14 (4), 296-304.
- [2] R. Kim, K. Tanabe, Y. Uchida, et al. Inducing cancer cell death by targeting transcription factors. *Anti Cancer Drugs*. 2003, 14(1), 3-11.
- [3] E. Reisner, et al. Electron-transfer activated metal-based anti-cancer drugs. *Inorganica Chimica Acta*. 2008, 361, 1569-1583.
- [4] S. Kapitzka, M. Pongratz. Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005, 131, 101-110.
- [5] A. Bergamo, G. Sava, Ruthenium complexes can target determinants for tumor malignancy, *Dalton Trans.*, 2007, 13, 1267-1272.

总 结

关于钆配合物抗肿瘤的研究是当前的一大热点,本文对一系列钆配合物进行了以下的一些研究:以 MTT 法测定了系列钆配合物对人肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制活性,并测得了相应的 IC_{50} 值,发现几种钆配合物均对 A549 细胞有抑制作用。形态学观察可以看到细胞浮起、变圆,体积缩小、膜皱缩,发泡,折光性增强,产生凋亡小体。DNA 琼脂糖凝胶电泳可以观察到除一个之外其余均在一定浓度时出现了清晰的“梯状”条带,这一特征有力地证明了它们对 A549 细胞的诱导凋亡作用。最后采用流式细胞术定量测定不同浓度的钆配合物对 A549 细胞的凋亡情况,其中大多出现了比较明显的凋亡峰,应证了凋亡现象的存在,同时发现它们可不同程度地导致 A549 细胞的凋亡,并且呈现一定的浓度依赖性。并且其中配合物 c 有比较好的诱导凋亡能力,有 45.4%的凋亡率,诱导能力超过了阳性对照 TAM。

研究表明,钆配合物对 A549 细胞是通过细胞凋亡来发挥其细胞增殖抑制活性的。

下一步可以进一步探讨钆配合物诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡的分子机制,为开发肺腺癌治疗药物提供理论依据。

致 谢

本论文是在刘杰教授的精心指导和亲切关怀下完成的。刘老师渊博的学识、严谨的治学态度和忘我的工作作风深深地影响着、鼓励着我。同时，她在生活上对我的关心和帮助也使我终身难忘。在此谨致以衷心的感谢和崇高的敬意！

感谢北校区组织与胚胎学教研室的李朝红教授、谢富康教授为我细胞凋亡实验理论上的指导、实验基地与技术的大力支持，感谢组胚实验室黄锦桃教师对我实验所提供的方便和实验技术上的指导；感谢巢晖教授、翁丽萍老师，为本论文的顺利完成提供了许多宝贵的建议和有力的支持。

感谢石硕、谭彩萍、陈兰美、孙静、张璇、龚涛、袁益娴、裴令敏、魏远芳、李吕莹与北校区的田芬、李志华、陈倩、王娜、刘树迎、黄楠楠、张征宇、汪照静、张敏等同学及室友易伟、杨立国、吴文浩对我生活、学习与实验的热心指导与帮助。

本课题得到了国家自然科学基金资助，在此谨致谢意！

最后要特别感谢我的家人一直以来所给予我充分的理解和最大的支持和鼓励！他们是我的精神支柱和动力源泉，使我能按时完成学业。在此向他们表示深深的谢意！

刘彦波

二〇〇八年五月于中山大学康乐园