

## 金属细菌叶绿素的合成及其对肿瘤细胞的抑制作用

王梦亮\*, 常如波, 刘滇生

(山西大学 现代化学研究所, 山西 太原 030006)

**摘要:** 目的 寻找一种新型光动力学疗法光敏剂。方法 采用从光合细菌中分离纯化的脱镁细菌叶绿素为配体,与金属盐在有机溶剂中反应,合成了 Cu, Zn, Co, Ni 4种金属细菌叶绿素,并对其紫外可见光谱和荧光光谱进行研究。此外还研究了 4种金属细菌叶绿素对 K562和 HL60两种白血病细胞生长的影响。结果 4种金属细菌叶绿素的光谱图都有可预见的漂移,证明金属已配位到细菌叶绿素的卟啉大环上。同时,4种金属细菌叶绿素都有很强的抑瘤作用,光照可以明显提高其抑瘤率。结论 金属细菌叶绿素作为一种新型光敏剂具有优良的性质,是新一代光敏剂发展的一个方向。

**关键词:** 细菌叶绿素; 过渡金属; 光谱; 肿瘤细胞

中图分类号: R916.696 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2005)10-0920-04

## Synthesis and antitumour activity of metal complexes of bacteriochlorophyll

WANG Meng-liang\*, CHANG Ru-bo, LIU Dian-sheng

(Institute of Modern Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** **Aim** To find a new PDT sensitizer. **Methods** There were four complexes (Cu, Zn, Co, Ni) synthesized through reaction of metal and depriving-Mg bacteriochlorophyll in the organic solvent. Their antitumor action was detected by MTT. **Results** The ultraviolet-visible spectrum and the fluorescence spectrum of these complexes showed that synthesis of these four complexes was succeeded. And these metal complexes have potent antitumor action on two kinds of leukaemic cells. **Conclusion** Metal bacteriochlorophylls as PDT sensitizers have very good properties and this is a way to develop new PDT sensitizers.

**Key words:** bacteriochlorophyll; transition metal; spectrum; tumour cell

植物金属叶绿素(即用植物叶绿素作为卟啉配体)的研究国内外已有报道<sup>[1-3]</sup>,多数研究工作集中在过渡金属如铜、钴、镍、锌等金属上,这些化合物已广泛应用于食品、医药领域,特别是近十几年来发展起来的用其治疗恶性肿瘤的新技术(光动力学疗法 PDT),由于其选择性杀伤肿瘤细胞的特点而倍受关注。光敏剂能否被激发依赖于激发光的波长,若使 PDT 达到最佳治疗效果,最好是采用光敏剂吸收峰附近的光源。所以,激发光源的选择原则一是光敏

剂所能吸收的频谱,二是有一定的组织穿透性,从可见光到红外光(波长在 400~900 nm)的光线对组织的穿透性随波长的增长而增加。但是,目前国际上所使用的第二代光敏剂的吸收峰为 670 nm 或 690 nm,由于对生物组织穿透性差,吸收谱宽,从而导致副作用大等不足,使得长波激发的光敏剂及与其相适应的光源成为该疗法所追求的目标。

金属细菌叶绿素是一种在结构和功能上都不同于植物叶绿素的卟啉类化合物,与植物叶绿素相比,其卟啉环 3,4 位没有双键,侧链也有明显不同,因此具有不同的光谱性质。其特征吸收位于 350~400 nm 和 750~800 nm,在 400~700 nm 的可见光区域没有吸收。若将其用于肿瘤的诊断和治疗,就可用

收稿日期: 2004-11-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20171030).

\* 通讯作者 Tel: 86-351-7016078, Fax: 86-351-7016048,  
E-mail: mhwang@sxu.edu.cn

750 nm 以上的近红外线作为治疗光源,大大增加了在组织中的穿透能力,可直接用于体内组织的诊断和治疗。同时,减少了治疗后的可见光光敏反应。从理论上讲,金属细菌叶绿素比植物金属叶绿素和其他光敏剂在 PDT 领域更具有优越性,因此对此类配合物的合成和细胞实验的研究具有重要的理论意义和应用前景。细菌叶绿素作为卟啉配体的研究国内尚未见报道。

本文选择经本实验室分离培养的血色红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas nitila*) 和类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 提取细菌叶绿素,再与过渡金属合成金属细菌叶绿素,研究其光谱性质和细胞实验的肿瘤抑制率。

## 实验部分

日本岛津紫外-可见分光光度仪 UV-265,美国荧光光谱仪 Perkin Elmer LS-50B。K562 和 HL-60 细胞株由山西大学生物技术研究所提供,所用试剂均为分析纯。

### 1 金属细菌叶绿素的合成

1.1 细菌叶绿素的制备 将培养 1 周的光合细菌,4 500  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min,收集菌体。参照文献 [4, 5] 进行细菌叶绿素的提取、分离和纯化。

1.2 金属细菌叶绿素的合成 脱镁细菌叶绿素的制备:将细菌叶绿素在 0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 盐酸丙酮溶液中作用 4 h,然后加入石油醚萃取,用双蒸水洗 5 次,在 75  $^{\circ}\text{C}$  水浴下蒸馏浓缩、干燥。

细菌叶绿素 Zn (ZnBchl) 的合成:将脱镁细菌叶绿素 10 mg 溶于氯仿 10 mL 中,将质量 5 倍于细菌叶绿素的醋酸锌溶于甲醇中,将溶液混合,并在 60  $^{\circ}\text{C}$  恒温下,通氮反应 30 min,即得到深红色的细菌叶绿素 Zn<sup>[6]</sup>。

其他过渡金属叶绿素的合成与细菌叶绿素 Zn 基本相同,只是溶剂与反应时间略有差异,具体条件见表 1。

### 2 肿瘤细胞实验<sup>[5]</sup>

2.1 细胞培养 K562 和 HL-60 细胞株,将其接种于含 10% 热灭活小牛血清的新鲜 DMEM 培养液中,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。2~3 d 传代 1 次,实验均采用对数生长期的细胞。

2.2 MTT 比色法测细胞活性 将两种细胞悬液调整为 2  $\times$  10<sup>5</sup>  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>,分别接种于 96 孔细胞培养板,并设好适当的空白对照及本底 (DMEM 培养液 + 对应浓度的药物),每孔 80  $\mu\text{L}$ ,与试验药物在 CO<sub>2</sub> 培

**Table 1** The synthesis condition of transition metal and bacteriochlorophyll

Synthesis condition	Bacteriochlorophyll Cu (CuBchl)	Bacteriochlorophyll Co (CoBchl)	Bacteriochlorophyll Ni (NiBchl)
The solvent of depriving-Mg bacteriochlorophyll	Acetone	Methanol	Chloroform
Metal salt	Copper acetate	Cobalt acetate	Nickel acetate
The solvent of salt	Methanol	Methanol	Acetic acid
Reaction time / min	30	30	180

养箱中共培养 24 h,结束前 5 h,每孔加入含 5 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的 MTT 10  $\mu\text{L}$ ,继续于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,4 h 后,1 200  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心,吸去上清液 50  $\mu\text{L}$ ,每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,混匀后继续培养 1 h,待甲臜结晶完全溶解后,在酶联免疫检测仪上检测 490 nm 处的 A 值,根据下列公式分别计算各自的抑制生长率。

抑制 (促进) 生长率 (%) =

$$|A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}| / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

实验设为两组,一组加药 4 h 后 100 W 白炽灯 50 cm 光照 30 min,另一组不光照。两组分别进行 CuBchl, NiBchl, CoBchl 和 ZnBchl 4 种配合物 3 个浓度梯度 (200, 50 和 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的细胞抑制实验。

## 结果与讨论

### 1 金属配位对细菌叶绿素性质的影响

细菌叶绿素在脱镁反应后颜色变为鲜红色,而植物叶绿素脱镁后为深绿色,说明两者在结构上有很大差别。鲜红色的脱镁细菌叶绿素金属配位后, CuBchl 变为深绿色, NiBchl 为浅绿色, CoBchl 为紫红色, ZnBchl 为血红色,整个反应过程出现明显的颜色变化,有利于对其反应过程进行监控。另外,本实验还对合成的 CuBchl, NiBchl, CoBchl 和 ZnBchl 4 种化合物进行氧化、加热和光照处理,并与细菌叶绿素进行比较。结果表明,金属配位后的细菌叶绿素,其抗氧化性、热稳定性和光稳定性都比细菌叶绿素有明显提高。Mg 排列在周期表中的 s 区,细菌叶绿素的 Mg 离子一般以静电引力与配体形成配合物,而过渡金属在 d 区,其金属与配体的结合带有明显的共价键性质,因此,过渡金属配合物从理论上讲要比细菌叶绿素本身稳定。

2 紫外可见光谱 (UV-Vis) 和荧光光谱 (均以甲醇为溶剂)<sup>[7]</sup>

表 2 结果表明,细菌脱镁叶绿素和植物脱镁叶绿素相比,其特征峰为 358 nm 和 751 nm,分别发生

蓝移 50 nm 和红移 86 nm。这是由于其卟啉环上 3, 4 位缺乏双键和侧链基团不同所致, 该结果与文献报道一致。细菌脱镁叶绿素被金属配位后, 其特征峰相对脱镁细菌叶绿素又出现较大的红移和蓝移, 其移动的大小因配位金属种类的不同而不同, 最显著的是铜金属配合物, 其特征峰蓝移 97 nm, 红移 29 nm。其他细菌脱镁叶绿素金属配合物的峰型也有几到几十纳米的变化, 其中红移的幅度尤为明显, CuBchl > ZnBchl > NiBchl > CoBchl。同时还伴有峰高比和中间带的小峰变化, 其变化类同于植物叶绿素金属配位, 说明金属已经配合到细菌叶绿素的卟啉环上。

**Table 2** UV-Vis peak data of Pheo and metal assorted chlorophyll of bacteria and plant ( nm )

Group	Pheo	CuBchl	CoBchl	NiBchl	ZnBchl
Plant chlorophyll as counterpart	408, 665	408, 642	408, 661	414, 645	416, 657
Bacteriochlorophyll as counterpart	358, 751	261, 780	357, 756	357, 762	356, 767

荧光光谱仪的激发狭缝与发射狭缝均为 10 nm, 激发波长为 410 nm, 对细菌脱镁叶绿素及各种金属细菌叶绿素进行荧光测定。结果见表 3。

**Table 3** Fluorescent peak data of Pheo and metal assorted chlorophyll of bacteria and plant ( nm )

Group	Pheo	CoBchl	NiBchl	ZnBchl
Plant chlorophyll as counterpart	645, 688	618, 662	618, 675	624, 672
Bacteriochlorophyll as counterpart	720, 770	698, 764	705, 764	681, 752

由表 3 可见, 除 CuBchl 无荧光外, 其余都有荧

光。与植物金属叶绿素的荧光谱相比较, 在整体上有较大的红移, 其中 Pheo 红移 75 nm 和 82 nm, CoBchl 红移 80 nm 和 102 nm, NiBchl 红移 87 nm 和 89 nm, ZnBchl 红移 57 nm 和 80 nm, 最大发射波长可达 770 nm。同时, 作者也发现细菌叶绿素及其金属配合物的发射波长与细菌脱镁叶绿素相比, 均在一定程度上蓝移, 移动幅度 ZnBchl, CoBchl, NiBchl 分别为 39 nm, 22 nm, 15 nm, 其移动的比例 ZnBchl > CoBchl > NiBchl, 这是由于金属配位到细菌叶绿素卟啉大环上所致。

### 3 细胞实验

对 K562 细胞的抑制生长率见表 4。对 HL60 细胞的抑制生长率见表 5。

4 种金属配合物对 K562 和 HL60 两种肿瘤细胞都有很强的抑制作用。其中在 10 μg·mL<sup>-1</sup> 药物浓度时, 肿瘤细胞抑制率最高分别达到 82.87% 和 84.93%, 200 μg·mL<sup>-1</sup> 时, 最大抑制率可达 100%。实验结果还表明, 光照后抑制率都明显提高, 但由于实验条件限制, 光源使用的是普通日光灯, 如果用细菌叶绿素吸收的特定激发光激发, 结果可能会更理想。究其原因, 是由于金属细菌叶绿素可吸收 750 nm 以上的红外光, 并将这种吸收的能量耦合到对 DNA 的剪切作用, 该工作目前已得到光谱学和电泳的充分证明, 将在近期予以报道。

综上所述, 金属细菌叶绿素有望成为肿瘤光动力治疗的新一代光敏剂, 它的治疗光源波长比目前国际上广泛应用的第二代光敏剂红移 130 nm 以上, 属于红外区域, 其光谱介于血红蛋白吸收和水吸收之间, 从而使光在组织结构中的穿透距离更长。相信随着对新型光敏剂的研究开发以及临床经验的积累, 金属细菌叶绿素将成为治疗恶性肿瘤和多种良性肿瘤较好的选择。

**Table 4** Inhibitory rate ( % ) to K562 cells

Concentration	CuBchl		NiBchl		CoBchl		ZnBchl	
	Light	Unlighted	Light	Unlighted	Light	Unlighted	Light	Unlighted
10 μg·mL <sup>-1</sup>	36.72	33.00	52.39	44.69	82.87	75.82	78.11	64.48
50 μg·mL <sup>-1</sup>	57.23	56.68	65.62	65.11	95.15	88.04	99.87	96.89
200 μg·mL <sup>-1</sup>	92.95	79.85	96.10	89.01	96.25	92.32	101.65	101.26

**Table 5** Inhibitory rate ( % ) to HL60 cells

Concentration	CuBchl		NiBchl		CoBchl		ZnBchl	
	Light	Unlighted	Light	Unlighted	Light	Unlighted	Light	Unlighted
10 μg·mL <sup>-1</sup>	56.25	43.04	82.03	42.89	72.46	61.85	84.93	73.92
50 μg·mL <sup>-1</sup>	67.89	61.74	83.33	84.27	93.33	90.09	94.93	89.01
200 μg·mL <sup>-1</sup>	94.20	81.68	98.41	89.87	94.06	91.38	101.51	96.09

## References

- [ 1 ] Hong FS, Wei ZG, Zhao WG, *et al.* Determination of coordination structure on metal-substituted chlorophyll a by spectroscopy [ J ]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2001, **28**(3): 381 - 386.
- [ 2 ] Yang JH, Tao Y. Method for a large scale isolation of chlorophyll a, b [ J ]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 2002, **38**(2): 156 - 158.
- [ 3 ] Liu J, Xu DH, Mei WJ, *et al.* Synthesis, anticancer activity and mechanism of water-soluble porphyrin and metalloporphyrins [ J ]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2001, **22**(9): 1446 - 1449.
- [ 4 ] Gerhard H, Leszek F, Ingrid S, *et al.* Metal-substituted bacteriochlorophylls. 1. Preparation and influence of metal and coordination on spectra [ J ]. *J Am Chem Soc*, 1998, **120**: 3675 - 3683.
- [ 5 ] Teuchner K, Stiel H, Leupold D, *et al.* Fluorescence and excited state absorption in modified pigments of bacterial photosynthesis—a comparative study of metal-substituted bacteriochlorophylls [ J ]. *J Luminescence*, 1997, **72**: 612 - 614.
- [ 6 ] Yamashita H, Inoue H. Determination of zinc ( II ) chlorophylls and derivatives by high performance liquid chromatography with fluorometric detection [ J ]. *Anal Sci*, 1991, **7**: 1371 - 1374.
- [ 7 ] Jiao JY, Li SJ, Chen J, *et al.* Synthesis and spectrum researching of transition metal complexes of bacterial chlorophyll [ J ]. *Nat Sci Prog* (自然科学进展), 1999, **9**(5): 405 - 412.