

### 3 结论

在本文中,用势能平滑搜索与多构象优化相结合的方法,模拟了标题化合物的结构,得到了其低能构象集,NMR 实验结果验证了本构象分析方法的正确性.本研究不仅为研究此类化合物构效关系提供了详细的结构信息,而且为含环柔性分子的构象分析尝试了新途径.

**致谢** 感谢 Washington 大学 J.W. Ponder 和 G.V. Nikiforovich 有益的讨论和帮助.本工作为国家留学基金资助项目.

### 参 考 文 献

- 1 Thomas N J, Karplus M. Pseudosystematic conformational search application to cycloheptadecane. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 5657~5667
- 2 Saunders M, Houk K N, Wu Y D, et al. Conformations of cycloheptadecane: a comparison of methods for conformational searching. *J Am Chem Soc*, 1990, 112: 1419~1427
- 3 Tamamura H, Murakami T, Masuda M, et al. Structure-activity relationships of an anti-HIV peptide, T22. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, 205(3): 1729~1735
- 4 Tamamura H, Otaka A, Murakami T, et al. An anti-HIV peptide, T22, forms a highly active complex with Zn(II). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 229: 648~652
- 5 Leach A R. A survey of methods for searching methods for understanding and predicting protein structure. *Rev Comput Chem*, 1991, 2: 1~55
- 6 Scheraga H A. Predicting three-dimensional structures of oligopeptides. *Rev Comput Chem*, 1992, 3: 73~142
- 7 蒋华良, 陈凯先, 陈建忠, 等. 配体活性构象搜索方法及其应用研究. *中国科学, B 辑*, 1997, 27(5): 411~418
- 8 Piela L, Kostrowicki J, Scheraga H A. The multiple-minima problem in the conformational analysis of molecules: deformation of the potential energy hypersurface by the diffusion equation method. *J Phys Chem*, 1989, 93: 3339~3346
- 9 Pappu R V, Hart R K, Ponder J W. Analysis and application of potential energy smoothing and search methods for global optimization. *J Phys Chem, B*, 1998, 102: 9725~9742
- 10 Ponder J W. TINKER: Software Tools for Molecular Design. Version 3.6. Washington University School of Medicine, 1998
- 11 Jorgensen W L, Maxwell D S, Tirado-Rives J. The OPLS potential functions for proteins. Energy minimizations for crystal of cyclic peptides and crambin. *J Am Chem Soc*, 1996, 118: 11225~11236
- 12 Mohamadi F, Richards N G J, Guiga W C, et al. MacroModel—an integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics. *J Comput Chem*, 1990, 11: 440
- 13 Still W C, Tempczyk A, Hawley R C, et al. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J Am Chem Soc*, 1990, 112: 6127~6129
- 14 Tamamura H, Kuroda M, Masuda M, et al. A comparative study of the solution structures of tachyplesin I and a novel anti-HIV synthetic peptide, T22 ([Tyr<sup>5,12</sup>, Lys<sup>7</sup>]-Polypheusin II), determined by nuclear magnetic resonance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, 1163: 209~216
- 15 Nikiforovich G V, Kover K E, Zhang W J, et al. Cyclopentapeptides as flexible conformational templates. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 3262~3273

(2000-12-26 收稿, 2001-04-13 收修改稿)

## 水溶性有机锡卟啉酯的合成及其体外抗肿瘤活性

韩高义<sup>①②</sup> 杨 频<sup>②\*</sup>

(<sup>①</sup>南京大学化学系, 配位化学国家重点实验室, 南京 210093; <sup>②</sup>山西大学分子科学研究所, 太原 030006.

\* 联系人, E-mail: yangpin@sxu.edu.cn)

**摘要** 合成并用 <sup>1</sup>H NMR, 元素分析, IR, UV-vis 和电喷雾质谱法(ESMS)表征了以 5-羧基甲氧苯基-10,15,20-三吡啶基卟啉为母体的二丁基锡(IV)卟啉酯化合物. 在氯仿中以过量的碘甲烷处理, 得到水溶性的二丁基锡卟啉酯化合物. 体外抗肿瘤活性测试结果表明非水溶性的二丁基锡卟啉化合物对 P388 小鼠白血病、A-549 人肺腺癌细胞几乎没有抑制能力, 而水溶性的二丁基锡卟啉化合物对两种癌细胞都有很好的抑制能力.

**关键词** 卟啉 有机锡(IV) 体外抗肿瘤

卟啉或金属卟啉作为生物分子对质子和电子的跨膜转移<sup>[1]</sup>有催化作用, 对癌组织具有较强的选择性和亲和性<sup>[2,3]</sup>, 把卟啉与抗癌药物连接起来增强药物疗效或减少药物毒副作用的研究已引起人们的极大

关注. Czuchajowski 等人<sup>[4-6]</sup>合成了连有尿嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶等核苷的非水溶性和水溶性卟啉化合物, 发现这类化合物对人恶性黑色素瘤细胞有很好的抑制能力. 水溶性带正电的锰卟啉是一种有效的

DNA 切割剂, Ding 等人<sup>[7]</sup>发现锰卟啉化合物单独或与 9-methoxellipticine 相连时对癌和 HIV 都显示有很强的抑制能力. 有机锡化合物作为潜在的抗癌剂已引起国内外的重视<sup>[8-13]</sup>, Mirisola 和 Mansueto 等人<sup>[14,15]</sup>等测试了有机锡(IV)四(4-羧基苯基)卟啉酯化合物体内抗癌能力, 发现它们有很好的活性. 我们实验室经过对有机锡(IV)化合物的系统研究, 发现二丁基锡(IV)类化合物有很好的抗癌性能. 因此, 我们合成了以[5-(羧基甲氧苯基)10, 15, 20-三(4-吡啶基)]卟啉为母体的二丁基锡(IV)酯类化合物. 当把卟啉的吡啶基甲基化后, 可增强其水溶性. 合成路线如图 1.

### 1 化合物的合成

按 Alder 方法在丙酸中, 以摩尔比<sup>[16]</sup>为 1 : 3 : 4 的乙氧羰基甲氧苯甲醛、4-吡啶甲醛、吡咯回流反应 2.5 h. 用硅胶柱色谱, 以氯仿/甲醇为淋洗剂分离得化合物 4.

$C_{45}H_{33}N_7O_3$  (4) 计算值(%): C, 75.10; H, 4.58; N, 13.63; 实测值(%): C, 74.76; H, 4.56; N, 13.29.  $\delta_H$ (CD-Cl<sub>3</sub>): 9.05(d,  $J = 5.3$  Hz, 6 H, 2, 6-pyridine), 9.01(s, 2H,  $\beta$ -pyrrole), 8.95(m, 6H,  $\beta$ -pyrrole), 8.17(d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, 2, 6-phenyl), 8.12(d,  $J = 5.2$  Hz, 2H, 3, 5-pyridine), 7.33(d,  $J = 7.9$  Hz, 2 H, 3, 5-phenyl), 4.93(s, 2 H, CH<sub>2</sub>COO), 4.44 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2 H, —CH<sub>2</sub>—), 1.44(t,  $J = 7.1$  Hz, 3 H, —CH<sub>3</sub>), -2.91(s, 2 H, NH-

pyrrole);  $\nu_{max}$ : 3317 cm<sup>-1</sup> (NH-pyrrole), 1755 cm<sup>-1</sup> (m, C = O).  $\lambda_{max}$ (CHCl<sub>3</sub>): 648, 589, 549, 515, 419 nm.

化合物 4 在 6 mol/L 的盐酸中水解 24 h, 得化合物 3.

$C_{43}H_{29}N_7O_3$  (3) 计算值(%): C, 74.67; H, 4.20; N, 14.18; 实测值(%): C, 74.34; H, 4.18; N, 13.97.  $\nu_{max}$ : 3317 cm<sup>-1</sup> (NH-pyrrole), 1733 cm<sup>-1</sup> (C = O).  $\lambda_{max}$  (CHCl<sub>3</sub>): 648, 588, 548, 514, 419 nm.

化合物 3 与二丁基氧锡(IV)在无水甲醇中回流反应 6 h, 得化合物 2.

$C_{94}H_{74}N_{14}O_6Sn$  (2) 计算值(%): C, 69.93; H, 4.59; N, 12.15; 实测值(%): C, 69.50; H, 4.56; N, 11.86.  $\delta_H$ (CDCl<sub>3</sub>): 9.10(d,  $J = 5.3$  Hz, 12 H, 2,6-pyridine), 9.04 ~ 8.88 (m, 16 H,  $\beta$ -pyrrole), 8.22(d,  $J = 7.8$  Hz, 4 H, 2, 6-phenyl), 8.16(d,  $J = 5.2$  Hz, 12 H, 3, 5-pyridine), 7.7(d,  $J = 8.7$  Hz, 4 H, 3, 5-phenyl), 5.10 (s, 4 H, —CH<sub>2</sub>COO), 1.93(m, 8 H, SnCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—), 1.41(m, 4 H, CH<sub>2</sub>), 0.92(t,  $J = 7.25$  Hz, 6 H, —CH<sub>3</sub>), -2.94(s, 4 H, NH-pyrrole);  $\nu_{max}$ : 3315 cm<sup>-1</sup> (NH-pyrrole); 2923 ~ 2856 cm<sup>-1</sup> (w, Butyl); 1596 cm<sup>-1</sup> (br, C = O).  $\lambda_{max}$  (CHCl<sub>3</sub>): 648, 588, 549, 515, 419 nm.

化合物 2 在氯仿中与过量的碘甲烷室温反应 20 h, 得最终水溶性产物 1.

$C_{100}H_{92}N_{14}O_6SnI_6 \cdot 6H_2O$  (1) 计算值(%): C, 46.64; H, 4.07; N, 7.62; 实测值(%): C, 46.21; H, 4.12; N, 7.53.  $\delta_H$  (DMSO-d<sub>6</sub>): 9.43(d,  $J = 5.2$  Hz, 12 H, 2, 6-pyridine), 8.97(broad, 28 H,  $\beta$ -pyrrole + 3, 5-pyridine), 8.12(d,  $J =$

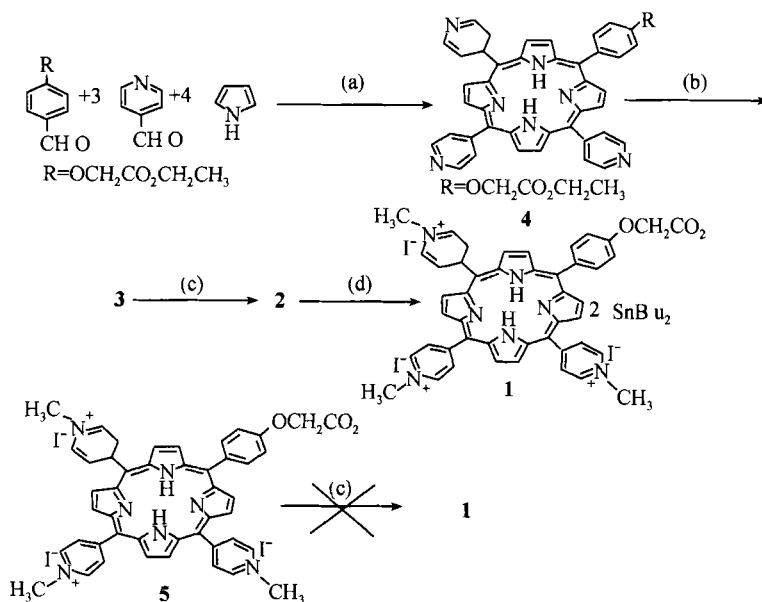


图 1 化合物的合成路线

(a) 丙酸 2.5 h, (b) 6 mol · dm<sup>-3</sup> HCl 24 h, (c) MeOH 回流 6 h, (d) CH<sub>3</sub>I/CHCl<sub>3</sub> 20 h

7.1 Hz, 4 H, 2,6-phenyl), 7.35(d,  $J = 7.2$  Hz, 4 H, 3, 5-phenyl), 4.99(s, 4 H,  $-\text{CH}_2\text{COO}$ ), 4.77(s, 18 H,  $\text{N}^+-\text{CH}_3$ ), 1.69 ~ 1.56(m, 8H,  $\text{SnCH}_2\text{CH}_2-$ ), 1.35(m, 4 H,  $\text{CH}_2$ ), 0.87(t,  $J = 7.2$  Hz, 6 H,  $\text{CH}_3$ ),  $-3.03$ (s, 4H, NH-pyrrole).  $\nu_{\text{max}}$ : 3317  $\text{cm}^{-1}$ (NH-pyrrole); 2923 ~ 2856  $\text{cm}^{-1}$ (m, butyl); 1737  $\text{cm}^{-1}$ ( $\text{C} = \text{N}^+$ ). ESMS:  $m/z$  (M-5I-H<sub>2</sub>O, 383.7).  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>3</sub>OH): 648, 591, 552, 515, 418 nm.

## 2 体外抗癌活性研究

二丁基锡(IV)酯衍生物的体外抗肿瘤活性在上海药物研究所国家药物筛选中心测试. P388 小鼠白血病用四氮唑盐(microculture tetrazolium, MTT)还原法测试, A-549 人肺腺癌以磺酰罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)蛋白染色法测试. 结果列于表 1 和 2.

表 1 不同浓度的化合物对 A-549 人肺腺癌细胞的抑制率(%)

化合物	$C/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$					评价
	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	
2	59.2	9.4	8.8	5.0	9.3	无效
1	78.0	90.1	16.2	0.1	8.9	弱效

表 2 不同浓度的化合物对 P388 小鼠白血病细胞的抑制率(%)

化合物	$C/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$					评价
	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	
2	100	67.3	22.1	5.5	11.5	无效
1	100	100	100	65.3	18.9	强效

## 3 结果与讨论

按 Alder 方法合成化合物 4, 虽然用同样方法<sup>[17]</sup>合成其他不对称卟啉, 如: [5-(羟基苯基)-10, 15, 20-三甲苯基]卟啉产率可达 7%, 但我们经过多次尝试, 化合物 4 的产率始终未达到 7%, 只有 2% 左右. 化合物 4 经水解生成化合物 3, 3 在氯仿中溶解度大大减小, 使得萃取不易进行. 水解后,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$  从原来的 1759  $\text{cm}^{-1}$  移至水解后的 1733  $\text{cm}^{-1}$ . 化合物 3 与二丁基氧锡(IV)反应后, 在 2923 ~ 2856  $\text{cm}^{-1}$  处出现多重峰, 这是二丁基锡(IV)的丁基 C—H 振动, 在 1733  $\text{cm}^{-1}$  的  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$  振动消失, 而 1596  $\text{cm}^{-1}$  处的峰变宽变强, 这可能是反应后羰基振动红移至 1596  $\text{cm}^{-1}$  附近, 发生吸收峰重叠所致. 这说明卟啉与二丁基氧锡(IV)发生反应, 生成了目标化合物. 元素分析及核磁数据支持以上结果. 化合物 2 与过量碘甲烷反应后, 2923 ~ 2856  $\text{cm}^{-1}$  处的峰依然存在, 1637  $\text{cm}^{-1}$  处出现吡啶鎓离子的  $\text{C} = \text{N}^+$  振动峰, 说明在室温反应, 没有发生碘甲烷

与羰基的反应, 生成目标水溶性产物 1. 元素分析, 核磁谱确证得到水溶性目标化合物, LCQ 电喷雾质谱仪测试表明, 质荷比为 383.7 的峰为 M-5I-H<sub>2</sub>O 的离子峰, 这进一步说明生成了目标化合物 1. 我们曾尝试用化合物 3 的甲基化产物 5 与二丁基氧锡(IV)反应制备水溶性目标产物, 但测试结果表明并没有生成目标化合物 1.

抗癌活性测试表明, 当二丁锡卟啉化合物未甲基化时, 它们对癌细胞的抑制能力不强, 基本上没有活性. 但甲基化后生成可溶于水的目标化合物 1 后, 它们对癌细胞的抑制能力大大提高, 从未甲基化 2 的无效变为甲基化后 1 的有效. 这充分说明了增强其水溶性, 有利于提高有机锡卟啉化合物对癌细胞的抑制能力. 这对我们以后设计有机锡(IV)类抗癌药物以及对它们的抗癌机理的理解可能会有所帮助. 详细的机理研究及体内抗癌活性测试正在进行.

**致谢** 作者感谢中国科学院上海药物研究所国家药物筛选中心对药物活性的测试. 本工作为国家自然科学基金(批准号: 29871020)和山西省自然科学基金(批准号: 991012)资助项目.

## 参 考 文 献

- 1 张韞宏, 马琛, 常海龙, 等. 双亲金属卟啉跨膜转移的控制. 科学通报, 2000, 45(2): 149-151
- 2 Ali H, Van Lier J E. Metal complexes as photo- and radiosensitizers. Chem Rev, 1999, 99: 2379-2450
- 3 Latouche C, Pereyre M, Verhac J B. Synthesis of porphyrins with pendant arms: participation of the ancillary ligands to the complexation process in proteic medium. Tetrahedron Lett, 1995, 36(10): 1655-1666
- 4 Czuchajowski L, Habdas J, Niedbala H, et al. Synthesis of porphyrinyl-nucleosides. J Heterocyclic Chem, 1992, 29: 479-486
- 5 Czuchajowski L, Palka A, Morra M, et al. Porphyrinyl-nucleosides containing fluorinated nucleobases. Tetrahedron Lett, 1993, 34: 5409-5412
- 6 Czuchajowski L, Habdas J, Niedbala H, et al. Porphyrinyl-uridines as the first water-soluble porphyrinyl-nucleosides. Tetrahedron Lett, 1991, 32: 7511-7512
- 7 Ding L, Etemad-moghadam G, Cros S, et al. Syntheses and in vitro evaluation of water-soluble "cationic metalloporphyrin-ellipticine" molecules having a high affinity for DNA. J Med Chem, 1991, 34: 900-906
- 8 Li Q S, Yang P, Wan J Z, et al. Dinuclear diorganotin hydroxamate from the reaction between  $\text{R}_2\text{SnCl}_2(\text{phen})$  with arylhydroxamic acid. Syn React Inorg Met-Org Chem, 1996, 26: 561-572
- 9 杨频, 李青山. 芳香羧酸二烷基锡配合物的合成、结构及其抗癌活性的研究. 结构化学, 1996, 15: 163-169
- 10 刘群, 李建新, 刘景福, 等. 三苯基锡-2-(1,2-亚乙二硫)亚甲基-3-羰基-5-芳基-4-戊烯酸酯的合成及晶体结构. 化学学报, 2000, 58: 92-99

- 11 Gielen M, Khloufi A E, Blesemans M, et al. Di-n-butyltin and diethyltin monofluorobenzoates synthesis, spectroscopic characterization and *in vitro* anti-tumor activity. *Appl Organometal Chem*, 1993, 7: 119-125
- 12 Gielen M, Khloufi A E, Biesemans M, et al. (2-methylthio-3-pyridinecarboxylato)-diethyltin and di-n-butyltin compounds; synthesis, spectroscopic characterization and *in vitro* anti-tumor activity. X-ray crystal structure of bis[diethyl(2-methylthio-3-pyridinecarboxylato) tin]oxide and of diethyltin bis (2-methylthio-3-pyridinecarboxylate). *Polyhedron*, 1992, 11: 1861-1868
- 13 Boualam M, Willem R, Biesemans M, et al. Synthesis, characterization and *in vitro* anti-tumor activity of dimethyl- diethyl- and di-t-butyl-tin derivatives of substituted salicylic acids. *Appl Organometal Chem*, 1991, 5: 497-506
- 14 Mirisola M G, Pellerito A, Fiore T, et al. Organometallic complexes with biological molecular: VII. Dialkyl- and trialkyl-tin (IV)[meso-tetra(4-carboxyphenyl)] porphinate derivatives solid-state, solution-phase structure aspects and *in vivo* effects. *Appl Organomet Chem*, 1997, 11(6): 499-511
- 15 Mansueto C, Puccia E, Maggio F, et al. Organometallic complexes with biological molecules: XIV. Biological activity of dialkyl and trialkyltin(IV)[meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphinate] derivatives. *Appl Organomet Chem*, 2000, 14: 229-235
- 16 Casas C, Saint-Jalmes B, Loup C, et al. Synthesis of cationic metalloporphyrin precursors related to the design of DNA cleavers. *J Org Chem*, 1993, 59: 2913-2917
- 17 Little R G, Anton J A, Loach P A, et al. The synthesis of some substituted tetraarylporphyrins. *J Heterocyclic Chem*, 1975, 12: 343-349

(2000-11-20 收稿, 2001-04-16 收修改稿)

## 细胞色素 c 氧化酶可溶性 Cu<sub>A</sub> 结构域的表达、分离纯化和初步表征

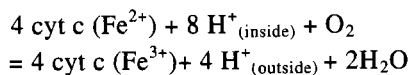
李连之<sup>①</sup> 宋爱新<sup>①</sup> 谢毅<sup>②</sup> 黄仲贤<sup>①\*</sup> E. de Waal<sup>③</sup> U. Kolczak<sup>③</sup>  
G. W. Canters<sup>③</sup>

(<sup>①</sup>复旦大学化学系化学生物学实验室, 上海 200433; <sup>②</sup>复旦大学生命学院遗传学国家重点实验室, 上海 200433; <sup>③</sup>Leiden Institute of Chemistry, Leiden University, P O Box 9502, 2300 RA Leiden, The Netherlands. \* 联系人, E-mail: zxhuang@fudan.edu.cn)

**摘要** 细胞色素 c 氧化酶亚基 II 含有可溶性双核铜中心 Cu<sub>A</sub> 结构域蛋白。报道了 *Paracoccus versutus* 菌 Cu<sub>A</sub> 结构域的基因克隆、表达和分离纯化及其初步表征。编码 Cu<sub>A</sub> 结构域的基因插入 pET11d 质粒载体中, 于 *E. coli* BL21(DE3) 中进行表达。结果表明, Cu<sub>A</sub> 结构域蛋白在这个表达体系中主要以包涵体的形式存在, 表达量占菌体总蛋白的 10% 左右。经尿素溶解, Cu<sup>+</sup>/Cu<sup>2+</sup> 重组复性, Q-Sepharose 快速阴离子交换柱和 Sephadex-G75 凝胶过滤柱纯化, 得到了电泳纯的紫红色可溶性蛋白。紫外-可见吸收光谱在 478 nm 有较强吸收峰, 530 nm 处有一肩峰, 在 360 和 806 nm 处有弱吸收峰, 它们可归属为混价双金属核中心(Cu<sub>2</sub>S<sub>2</sub>R<sub>2</sub>) 中 Cu-S 和 Cu-Cu 间的电荷转移与轨道相互作用。圆二色谱表明其二级结构主要为 β-折叠形式。荧光激发谱最大波长为 280 nm, 发射谱最大波长为 345 nm。

**关键词** 细胞色素 c 氧化酶 Cu<sub>A</sub> 结构域蛋白 基因表达 分离纯化 光谱性质

细胞色素 c 氧化酶(cytochrome c oxidase, CcO)是真核生物线粒体内膜和需氧菌细胞膜电子传递链上的终端酶。它催化细胞色素 c 到氧分子(O<sub>2</sub>)的电子传递, 使氧分子还原为水分子, 并与质子泵功能相偶联。在传递电子的同时, 伴随着质子由线粒体内膜基质一侧泵向胞浆一侧, 由此产生的 H<sup>+</sup> 电化学梯度用来合成 ATP, 催化反应式如下:



细胞色素 c 氧化酶是由多亚基组成的复杂酶分

子。大量研究表明<sup>[1-3]</sup>, 其催化核心亚基 Sub I 中含有 heme a, heme a<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub> 金属中心结构, 核心亚基 Sub II 中含有 Cu<sub>A</sub> 的双核金属中心结构。Sub II 中的可溶性 Cu<sub>A</sub> 结构域是接受来自细胞色素 c 电子传递的初始受体, 然后, 它将电子依次传递给 heme a 和 heme a<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub>, 最后, 在 heme a<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub> 双金属核中心把氧分子还原为水分子。Cu<sub>A</sub> 结构域是一个高度离域化的混价(+1.5) 双核结构, 两个铜离子之间由两个 Cys-S<sup>-</sup> 桥联起来, 这是生物体系中的一种新颖的化学结构。近几年来流行病学研究发现, CcO 与线粒体疾病间存在着明显