

## 铜-焦脱镁叶绿酸a甲酯的合成及抗肿瘤活性研究实验教学设计

宋平<sup>†</sup>, 张楠<sup>†</sup>, 王洁<sup>†</sup>, 闫蕊<sup>\*</sup>, 王志强<sup>\*</sup>, 金英学

哈尔滨师范大学化学化工学院, 哈尔滨 150025

**摘要:** 本实验设计合成了铜-焦脱镁叶绿酸a甲酯(Cu-MPPa), 用于活性氧(ROS)介导的癌症治疗和消耗谷胱甘肽, 并通过类Fenton反应循环产氧维持细胞内高浓度氧。实验过程中考察了Cu-MPPa的活性氧产生能力、氧气产生能力和谷胱甘肽消耗能力等性能。所合成中间体的结构用质谱进行了表征。这个实验综合了有机化学合成、仪器分析化学和生物化学实验, 要求由三名学生组成实验小组, 大约需要24学时, 旨在培养学生综合创新能力、解决复杂问题能力和培养团队合作精神。

**关键词:** 铜-焦脱镁叶绿酸a甲酯; 活性氧; 有机化学合成; 仪器分析; 抗肿瘤

**中图分类号:** G64; O6

## Experimental Teaching Design on Synthesis and Antitumor Activity Study of Cu-Pyropheophorbide-a Methyl Ester

Ping Song<sup>†</sup>, Nan Zhang<sup>†</sup>, Jie Wang<sup>†</sup>, Rui Yan<sup>\*</sup>, Zhiqiang Wang<sup>\*</sup>, Yingxue Jin

School of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Normal University, Harbin 150025, China.

**Abstract:** In this experiment, Cu-pyropheophorbide-a methyl ester (Cu-MPPa) was designed to be synthesized for cancer therapy mediated by reactive oxygen species (ROS) and glutathione depletion. Additionally, it facilitates the maintenance of high intracellular oxygen concentrations through cyclic oxygen production *via* a Fenton-like reaction. The reactive oxygen generation capacity, oxygen production capacity and glutathione consumption capacity of Cu-MPPa were investigated during the experiment. Mass spectrometry was used to characterize the structures of the synthesized intermediates. Combining Organic Chemistry synthesis, Instrumental Analytical Chemistry and Biochemistry experiments, this experiment necessitates a team of three students and is estimated to take about 24 credit hours. It is designed to cultivate students' abilities in synthesis and innovation, complex problem-solving and teamwork enhancement.

**Key Words:** Cu-pyropheophorbide-a methyl ester; Reactive oxygen species (ROS); Organic chemical synthesis; Instrumental analysis; Antineoplastic

癌症严重威胁人类健康, 传统的治疗方法存在如创伤大、副作用大和药耐药性的问题, 而且面临着转移、复发以及预后难料等严重挑战<sup>[1-3]</sup>。这些问题与肿瘤环境缺氧和高浓度谷胱甘肽(GSH)有密切关系。活性氧物种是氧在电子转移过程中生成的具有较强氧化性的物质, 活性氧物种英文名称作active oxygen species, 简称ROS, 常见有超氧自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、羟自由基(·OH)及单线态氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)等, 氧化损伤生物大分子致细胞死亡。光动力治疗(PDT)、化学动力治疗(CDT)是ROS介导的新的癌症治疗方法, 具有传统治疗方法无法企及的优势, 如无创或微创、无毒副作用、无多药

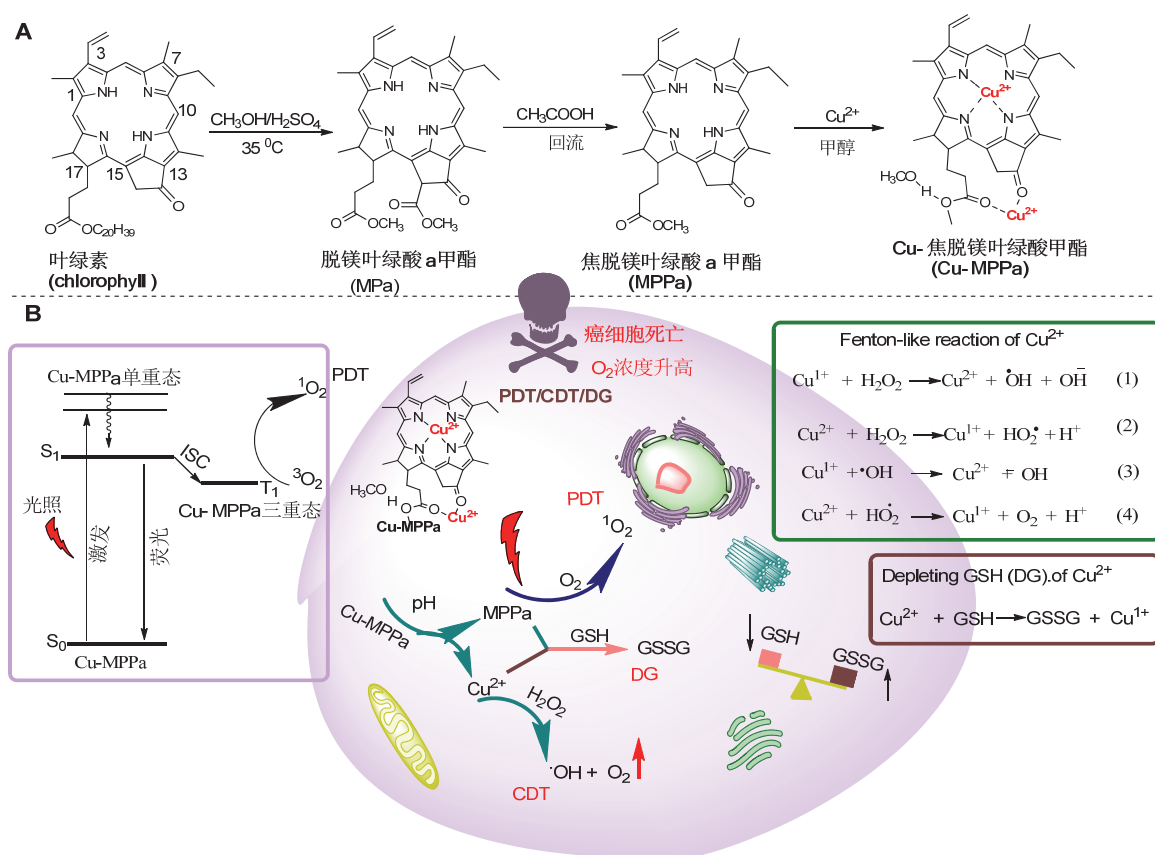
收稿: 2023-10-25; 录用: 2024-01-22; 网络发表: 2024-02-05

<sup>†</sup>共同第一作者, 对本工作有同等贡献

<sup>\*</sup>通讯作者, Emails: yanrui-1981@163.com (闫蕊); wzq70402@163.com (王志强)

基金资助: 哈尔滨师范大学高等教育教学改革研究项目(XJGYFW20220005)

耐药性、多次治疗等,更令人振奋的是CDT和PDT抑制GSH,诱导免疫活性,抑制癌症转移,治疗过程中循环产生氧气缓解肿瘤缺氧<sup>[4-6]</sup>。PDT基于激发态光敏剂和周围氧之间的能量交换,产生高细胞毒性的<sup>1</sup>O<sub>2</sub><sup>[7-9]</sup>。CDT基于Fenton或Fenton-like反应生成<sup>•</sup>OH和O<sub>2</sub>,在杀死癌细胞的同时提高氧水平<sup>[5,10,11]</sup>。焦脱镁叶绿酸a甲酯(简称MPPa)是叶绿素降解产物,是临床应用的出色的PDT光敏剂,生物相容性好,原料来源广泛,制备简单。Cu(II)是人体必需的微量元素,在体内不容易产生沉淀和毒性反应,通过Fenton-like反应催化分解癌细胞中高浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生<sup>•</sup>OH和O<sub>2</sub>。Cu<sup>2+</sup>又是出色的氧化剂,将GSH氧化成氧化型(GSSG)使之失去抑制氧化应激能力,放大细胞内ROS水平从而提高抗肿瘤效果。目前培养高质量应用型、创新型人才是地方性高校的重要责任。根据教育部颁布的《化学类专业教学质量国家标准》,对交叉性综合性实验的比例要求要逐步加大,通过综合性实验的强化提高学生的实验操作和创新能力<sup>[12-14]</sup>。化学药物类综合实验涉及多学科交叉和融合及实验操作技能,与实际应用紧密结合,有利于冲破学科壁垒,有利于培养学生的创新能力和解决复杂问题能力<sup>[15]</sup>。这个创新性实验设计了合成了具有PDT和CDT活性的焦脱镁叶绿酸a甲酯铜络合物(Cu-MPPa),以从蚕沙中提取的叶绿素为起始原料,经过酯交换、脱羧等反应制备MPPa, MPPa与Cu<sup>2+</sup>络合得到目标化合物Cu-MPPa。用核磁共振氢谱、质谱表征了结构,用单线态氧探针DPBF考察了光致激发产单线态氧能力,用氧气探针RDPP和羟基自由基探针MB考察了Cu-MPPa的Fenton-like反应能力,用谷胱甘肽探针DTNB评价了消耗GSH能力,用细胞毒性实验(MTT)评价了抗肿瘤效果。Cu-MPPa的制备路线和抗肿瘤机制如Scheme 1所示。



**Scheme 1** A) 焦脱镁叶绿酸a甲酯(Cu-MPPa)的合成; B) Cu-MPPa 的产单线态氧机理(PDT), Cu<sup>2+</sup>的Fenton-like反应产氧和羟基自由基机理, 耗竭GSH机理

## 1 实验设计

### 1.1 实验目的设计

(1) 通过化学、生物学、药学的交叉性综合实验，培养学生的创新能力，提高学生解决复杂问题的能力。

(2) 掌握光敏化单线态氧产生原理和Fenton-like反应原理，紫外-可见分光光度计及质谱的分析方法；了解生化实验方法，认识细胞培养箱，酶标仪等仪器。

(3) 培养团队合作精神，激发科学研究兴趣。

### 1.2 实验原理

Cu-MPPa的合成路线如Scheme 1A所示，蚕沙叶绿素膏(主要成分叶绿酸)在甲醇/硫酸溶液中加热搅拌得到脱镁叶绿酸a甲酯(MPa)，MPa在冰醋酸中回流得到焦脱镁叶绿酸a甲酯(MPPa)，MPPa在室温下与醋酸铜络合得到Cu-MPPa。MPPa是优良的PDT光敏剂，被光激发产生单线态氧的机制如Scheme 1B(左侧Jablonsic图)所示，在近红外光照射下激发至激发态 $S_1$ ，一部分辐射猝灭发出红色荧光回到基态( $S_0$ )，一部分经系间穿越(Intersystem crossing, ISC)至三重激发态 $T_1$ ， $T_1$ 态的Cu-MPPa与基态氧( $^3O_2$ )碰撞交换能量， $^3O_2$ 激发至激发单重态 $^1O_2$ 态， $^1O_2$ 是具有强氧化性的活性氧，能够损伤细胞至凋亡，可以发挥光动力治疗功能(PDT)。Cu<sup>2+</sup>具有氧化性，与GSH发生氧化还原反应耗竭GSH(Depletion Glutathione, DG)和生成Cu<sup>+</sup>，GSH被氧化成GSSG失去猝灭ROS的能力。Cu<sup>+</sup>通过Fenton-like反应分解癌细胞内过量的过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)，生成具有细胞毒性的 $\cdot OH$ 和O<sub>2</sub>，在杀死癌细胞的同时增加细胞内O<sub>2</sub>浓度，Cu-MPPa抗肿瘤机理(ROS生成机制和增氧、耗竭GSH机制)如Scheme 1B所示。

### 1.3 实验内容设计

该综合性实验主要分为三部分：① 结合提取、酯交换和脱羧等有机反应制备Cu-MPPa(10学时)；② 结合紫外、质谱等仪器分析对Cu-MPPa性能表征；③ 结合荧光倒置显微镜、酶标仪开展初步细胞实验(14学时)。

### 1.4 实验安排

该综合实验项目适用于制药工程专业及材料化学专业，开展时间为1周，24学时，1.0学分。30人班级，3-4人为一组。教师提前1个月布置实验任务，学生依据教学要求及实验目的，结合老师提供的相关的文献再自行查阅文献，预习实验内容并合作探究制定实验方案，设计实验步骤、表征方法，经指导教师审查后确定最终实验方案。本过程旨在于培养学生的自学能力以及应用已有知识和文献解决实际问题的能力。实验过程中，以学生为主体，教师负责指导，尤其是在性能表征过程中。实验结束后，学生应基于整个实验过程以及结果进行系统的分析、思考和总结，并以论文的形式呈现出来，本过程旨在于提高学生的实验操作能力，培养团队协作的精神。最后每组进行PPT汇报展示实验成果并分享心得，教师给予评价以及建议。本过程锻炼学生的学术交流能力和创新思维。

本实验是一个综合性很强的实验，要求学生具有较为扎实的知识基础和实验操作基础，对于学生具有较大的挑战性，也需要学生能够很好的进行团队内的配合和协助。

### 1.5 实验考核方式

本实验的考核方式应该和一般实验课考核方式区分开，重点考察学生们综合知识的应用、实验结果的分析、科技论文的撰写以及最后的学术汇报等，所以学生的考核成绩占比为：预习与讨论占比10%，实验过程以及结果的分析占比50%，科技论文的撰写占比20%，汇报与心得分享20%。

### 1.6 实验开课方式

本实验是综合性实验，涉及到有机化学、仪器分析、生物化学、药学等学科的相关知识以及一些基础检测仪器的使用，所以本实验应该开设在大三、大四的研究性实验课中。

## 2 实验部分

### 2.1 试剂或材料

主要试剂: 叶绿素膏购自山东广通宝生物科技公司, 甲醇、二氯甲烷、无水硫酸钠、浓硫酸(98%)、乙酸乙酯(EA)、石油醚(PE)均为分析纯级购自国药集团化学试剂有限公司(沈阳)。冰醋酸、无水乙醇、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)均购自天津市富宇精细化工有限公司; 亚甲基蓝(MB)、单线态氧探针(DPBF)、谷胱甘肽探针5,5-二硫二硝基苯甲酸(DTNB)、谷胱甘肽(GSH)、MTT、氧气探针(RDPP)均购自萨恩化学技术(上海)有限公司。DMEM培养基、活性氧探针(DCFH-DA)购自碧云天生物技术有限公司。实验所需的细胞由实验准备室提前复苏、孵育。

主要仪器: UV-2600紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)、Leica DM IL IED倒置荧光显微镜(德国Eppendorf公司)、PL-X300D氙灯光源(普林塞斯公司)、Waters Xevo TQD液相色谱三重四级杆串联质谱仪(美国Waters公司)、酶标仪。

### 2.2 实验步骤

#### 2.2.1 Cu-MPPa的制备

##### (1) MPa的制备。

在500 mL三口瓶中加入100 mL叶绿素膏甲醇溶液(50 Wt.%), 用恒压滴液漏斗分次加入10 mL浓硫酸, 在且于35 °C下反应2 h, 抽滤除去不溶物, 用10 mL甲醇洗涤滤饼3次, 滤液减压蒸馏除去甲醇, 剩余物分散在30 mL二氯甲烷中, 用50 mL水洗涤3次, 有机层用无水硫酸钠干燥20 min, 抽滤、浓缩, 剩余物用硅胶柱层析分离纯化(流动相:  $V_{\text{石油醚}} : V_{\text{乙酸乙酯}} = 4 : 1$ ), 的纯MPa 12 g, 产率大约23%。

##### (2) MPPa的制备。

将12 g MPa置于50 mL单口反应瓶中, 加入30 mL冰醋酸, 在氮气保护下搅拌油浴加热180 °C至3 h, 冷却后浓缩至干, 加入2 mL二氯甲烷和5 g硅胶(300目), 混合均匀后, 干法上样, 硅胶柱层析分离(流动相:  $V_{\text{EA}} : V_{\text{PE}} = 1 : 4$ ), 得纯MPPa 7.5 g, 产率83%。

##### (3) Cu-MPPa的制备。

将MPPa (100 mg, 0.16 mmol)溶解于10 mL DMF中, 加入0.5 mL冰醋酸, 滴加醋酸铜(22 mg, 0.16 mmol溶解在10 mL DMF中), 在30 °C下反应2 h, 用50 mL饱和食盐水洗涤三次, 用无水硫酸钠干燥, 旋蒸除去DMF, 剩余物用硅胶柱层析纯化(洗脱液:  $V_{\text{EA}} : V_{\text{PE}} = 1 : 3$ )得到纯Cu-MPPa, 产率70%。质量分子式, 计算分子量, 实测值 $[M + 2\text{Cu}^{2+} + \text{MeOH} \cdot 3]^{+} = 701.6$ 。核磁数据如下:  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -1.68 (br, 1H, NH), 0.45 (br, 1H, NH), 1.68 (d,  $J = 7.4\text{ Hz}$ , 3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 1.84 (t,  $J = 7.5\text{ Hz}$ , 3H, 8 $^2$ - $\text{CH}_3$ ), 2.19–2.37 (m, 2H 17 $^1$ - $\text{CH}_2$ ) 2.45–2.85 (m, 2H, 17 $^2$ - $\text{CH}_2$ ), 3.24, 3.43, 3.62, 3.64 (each s, 12H,  $\text{OCH}_3 + \text{CH}_3$ ), 3.72 (q,  $J = 7.2\text{ Hz}$ , 2H, 8 $^1$ - $\text{CH}_2$ ), 4.18–4.39 (m, 1H, 17-H); 4.39–4.55 (m, 1H, 18-H), 5.15 (d,  $J = 20.0\text{ Hz}$ , 1H, 13 $^2$ -H), 5.28 (d,  $J = 20.0\text{ Hz}$ , 1H, 13 $^2$ -H), 6.19–6.27 (m, 2H, 3 $^2$ -H), 8.02 (m, 1H, 3 $^1$ -H), 8.55, 9.41, 9.54 (each s, 1H, *meso*-H)。

#### 2.2.2 Cu-MPPa的性能测试

(1) 三重四级杆串联质谱测试: 液相质谱采用Waters Xevo TQD液相色谱三重四级杆串联质谱, 测试条件: 色谱条件是C18, 50 mm \* 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , 流动相为乙腈 : 水 = 60 : 40, 流速0.15  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 质谱条件: 毛细管电压3.5 kV, 锥孔电压20 eV, 离子源温度150 °C, 去溶剂温度350 °C, 去溶剂流速800  $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ , 全扫描模式, 正离子和负离子扫描范围500–2000  $m/z$ 。

(2) Cu-MPPa吸收光谱测试: 将浓度为 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的Cu-MPPa甲醇溶液置于比色皿中, 在紫外-可见光分光光度计下记录700 nm处的左右的吸光度。平行实验3次。

(3) Cu-MPPa的抗光漂白性: 将Cu-MPPa (30  $\mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )分散在100  $\mu\text{L}$ 的DMSO中, 加入到3 mL比色皿中, 用3 mL DMSO稀释, 用700 nm激光照射0–60 min ( $0.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ), 每隔10 min记录一次吸光度。

(4) 单线态氧( $^1\text{O}_2$ )量子产率: 用DPBF为 $^1\text{O}_2$ 捕获剂, 以MB为参照品, 测定Cu-MPPa的 $^1\text{O}_2$ 量子产率。分别配制Cu-MPPa和MB溶液( $2.8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 取3 mL加入比色皿中, 加入30  $\mu\text{L}$  DPBF ( $6 \times$

$10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。用氙灯光源  $700 \text{ nm}$  ( $0.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ )照射  $0\text{--}120 \text{ s}$ , 记录吸光度, 计算随辐照时间的衰减速率  $\ln(A_0/A_t)$ , 拟合出一阶线性方程。按公式(1)计算单线态氧产率  $\Phi_S$ :

$$\Phi_S = \Phi_{\text{MB}} t_{\text{MB}}/t_S \quad (1)$$

其中  $t_S$ 和 $t_{\text{MB}}$ 分别为光照射待测样品和MB时间。

(4) MB检测羟基自由基: 配制  $\text{pH} = 6.8$ 的磷酸盐缓冲溶液, 将  $200 \mu\text{L}$ 的MB ( $0.01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )与  $200 \mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $200 \mu\text{L}$  Cu-MPPa ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )及  $3.4 \text{ mL}$ 的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)混合于离心管中。混合  $30 \text{ min}$ 后, 通过紫外可见分光光度计进行检测, 记录MB在  $660 \text{ nm}$ 处的吸光度。

(5) GSH的检测: 将  $100 \mu\text{L}$  GSH ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )水溶液, 分别加入到  $100 \mu\text{L}$ ,  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的Cu-MPPa的PBS溶液( $\text{pH} = 6.8$ )中, 在室温下混合  $30 \text{ min}$ , 加入DTNB ( $100 \mu\text{L}$ ,  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )充分反应  $5 \text{ min}$ , 用紫外可见分光光度计记录DTNB的吸光度。

(6) 细胞内的ROS: 取对数生长的CT26细胞系接种到6孔培养板中, 加入Cu-MPPa ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )后孵育  $4 \text{ h}$ 。弃掉上清液, 用PBS洗涤3次, 每孔加入DCFH-DA ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )后孵育  $30 \text{ min}$ 。然后激光照射  $0\text{--}10 \text{ min}$ 。光照后继续孵育  $30 \text{ min}$ , 用倒置荧光显微镜观察并拍照成像。

(7) 细胞内 $\text{O}_2$ 产生检测: 取对数生长的CT26细胞系接种到6孔培养板中, 用Cu-MPPa的DMEM溶液( $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )对细胞进行不同时间( $0, 30, 60, 90 \text{ min}$ )的处理, 用PBS洗涤3次, 再用RDPP( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )染色  $10 \text{ min}$ , 用PBS洗涤, 用倒置荧光显微镜观察并拍照。

(8) 体外抗肿瘤活性测试: 将CT26细胞系接种至96孔板中( $4 \times 10^4$ 个细胞/孔), 用  $100 \mu\text{L}$ 不同浓度的Cu-MPPa ( $0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )处理后继续孵育  $4 \text{ h}$ 。孵育后光照  $10 \text{ min}$ , 继续孵育。除去培养基并加入  $100 \mu\text{L}$  MTT ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )溶液, 培养箱中继续培养  $4 \text{ h}$ , 除去MTT, 加入  $100 \mu\text{L}$  DMSO, 震荡  $10 \text{ min}$ , 用酶标仪记录  $491 \text{ nm}$ 处吸光度, 无光照组实验过程与上述实验过程相同。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 Cu-MPPa 表征

为了考察铜离子与MPPa的络合, 采用紫外-可见吸收光谱测试络合过程吸收光谱的变化。MPPa在近红外区  $700 \text{ nm}$ 处有最大波长吸收, 将配制好的一定浓度的 $\text{Cu}^{2+}$ 离子逐步加入到MPPa甲醇溶液中, 测试紫外可见吸收信号, 结果如图1A所示, 随着 $\text{Cu}^{2+}$ 增加, MPPa在  $700 \text{ nm}$ 处的响应逐渐降低, 同时  $350 \text{ nm}$ 到  $450 \text{ nm}$ 峰形逐渐变宽, 说明 $\text{Cu}^{2+}$ 和MPPa发生了络合反应, 质谱表征如图1B所示, 所得到的准分子离子峰 $[\text{M} + \text{MeOH}-3]^+$ 为  $701.6$ , 可以初步推测出MPPa与2个铜离子络合, 具体结构见Scheme 1A。

#### 3.2 Cu-MPPa的抗光漂白性

光漂白是指光敏剂在光照下降解的现象, 光漂白现象的发生会降低活性氧(ROS)的产量, 降低光敏剂对肿瘤的破坏能力。PDT的治疗效果与光漂白量和光漂白速率有关, 因此, 光敏剂是否具有抗光漂白的能力是评估光敏剂的一个重要参数。抗光漂白性能测试结果如图1C所示, Cu-MPPa的DMSO溶液暴露在激光下(激光  $700 \text{ nm}$ ,  $0.5 \text{ W}$ )  $60 \text{ min}$ , 在  $700 \text{ nm}$ 处的吸收峰随时间的变化趋势可以看出, Cu-MPPa的吸光度随着光照时间增加逐渐降低, 在  $60 \text{ min}$ 下降了  $10\%$ , 表明抗光漂白能力较强。

#### 3.3 单线态氧( $^1\text{O}_2$ )量子产率

辐射淬灭是光电子物理淬灭的一种方式之一, 它通过发射荧光释放能量回到基态<sup>[6]</sup>。荧光能量转移发生在光激发的光敏剂(PS)和周围的基态氧之间, PS发射的荧光被基态氧吸收, 基态的三线氧( $^3\text{O}_2$ )激发为高细胞毒性的单线氧( $^1\text{O}_2$ )<sup>[7]</sup>。PS产生的 $^1\text{O}_2$ 的量子产率是评价PDT效果的一个重要指标。Cu-MPPa的 $^1\text{O}_2$ 量子产率用探针DPBF测量, DPBF是 $^1\text{O}_2$ 捕获剂, 在  $412 \text{ nm}$ 处有吸收峰, 被单线态氧降解后该峰消失, 测试结果如图2A所示, DPBF在Cu-MPPa溶液中被光照射后, 随着时间的增加DPBF

的吸光度明显下降,说明Cu-MPPa在光照下有很强的单态氧产生能力。绘制DPBF的降解率( $\ln A_0/A_t$ )和时间关系曲线,得到了一阶线性关系方程和标准曲线,相关系数 $R^2$ 大于0.99,证明降解率和光照时间密切相关,所得一阶线性方程合理。如图2B所示,MB为参照光敏剂,单线态氧量子产率49%,根据标准曲线和公式(1),计算Cu-MPPa的 $^1O_2$ 量子产率为34.7%。

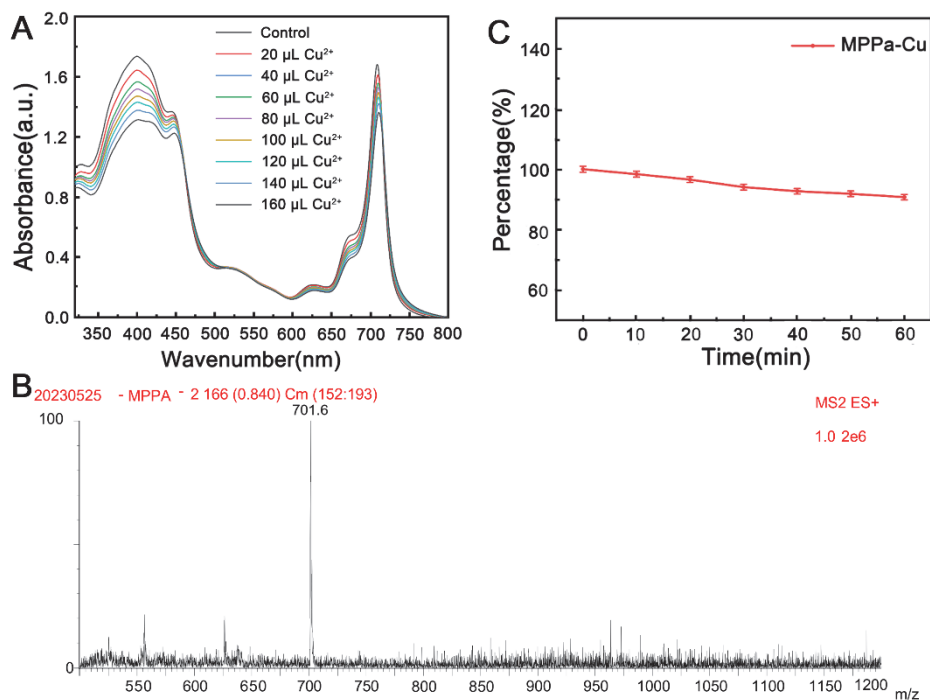


图1 A)  $Cu^{2+}$ 和MPPa络合表征紫外光谱; B) Cu-MPPa的抗光漂白性: Cu-MPPa在光照下0-60 min的700 nm处吸光度变化曲线;; C)  $Cu^{2+}$ 和MPPa络合表征质谱

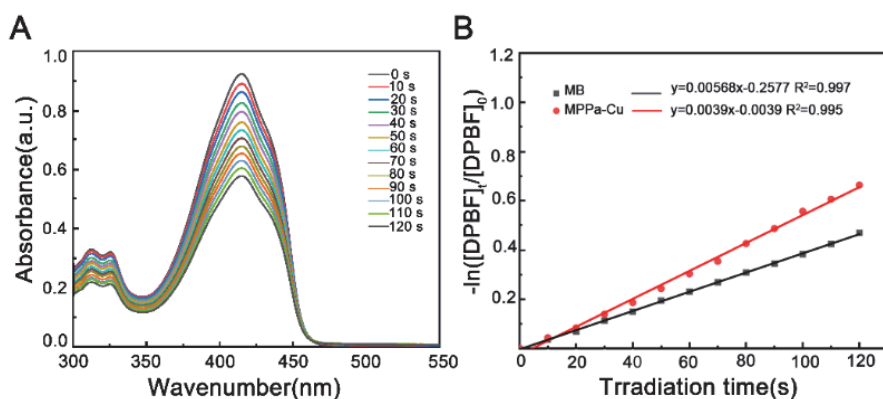


图2 A) Cu-MPPa辐照后DPBF的紫外-可见吸收率; B) DPBF降解率( $\ln A_0/A_t$ )和时间标准曲线

### 3.4 MB检测羟基自由基

MB被用作 $\cdot OH$ 的捕获剂,MB在660 nm有吸收,被 $\cdot OH$ 氧化后该吸收峰消失,MB的吸收峰强度与 $\cdot OH$ 的量负相关,即MB吸收峰强度与Cu-MPPa分解过氧化氢生成 $\cdot OH$ 能力负相关。结果如图3A,Control组为Cu-MPPa空白对照组,向MB +  $H_2O_2$ 溶液中加入Cu-MPPa,随着Cu-MPPa的增加,MB的峰值逐渐降低,表明Cu-MPPa发生Fenton-like反应,催化分解 $H_2O_2$ 生成了 $\cdot OH$ ,60  $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的Cu-MPPa溶液分解了70%的MB。实验结果表明Cu-MPPa通过Fenton-like反应生成 $\cdot OH$ 的能力很强。

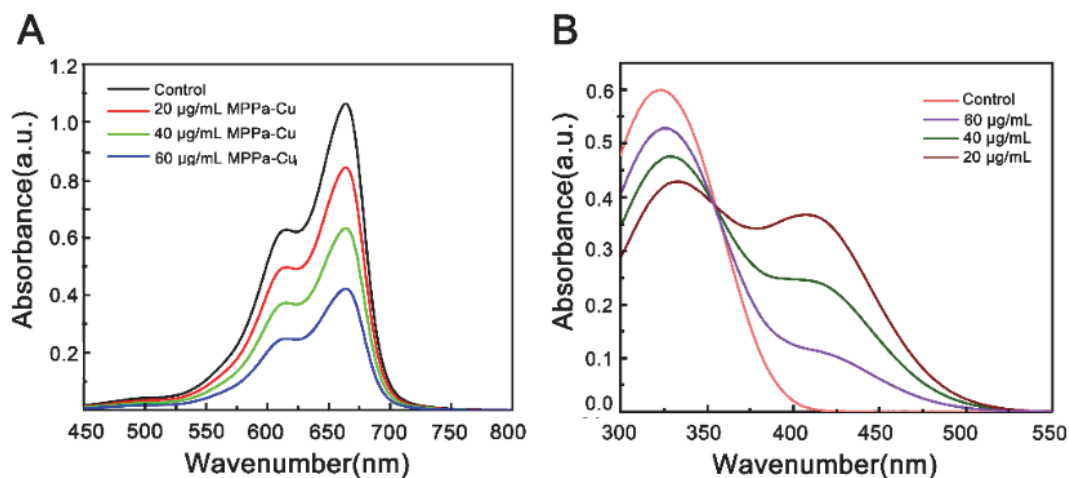


图3 A) MB探针检测Cu-MPPa产生羟基自由基能力; B) DTNB 探针检测Cu-MPPa消耗GSH能力

### 3.5 DTNB检测GSH

癌细胞为了抵抗氧化应激产生大量的谷胱甘肽(GSH), GSH消耗活性氧抑制氧化应激, 因此GSH是ROS介导治疗癌症的重要障碍,  $\text{Cu}^{2+}$ 具有氧化性, 能够通过氧化还原反应将还原性GSH氧化成GSSG<sup>[8]</sup>, 使之失去与ROS发生氧化还原反应能力, 从而放大ROS水平<sup>[9]</sup>。DTNB作为GSH探针, 在325 nm有特征吸收, 被GSH还原成2-硝基-5-硫代苯甲酸(NTB), 致使325 nm处特征峰消失, 同时在412 nm出现NTB的特征吸收峰, NTB的吸收强度与GSH的含量成正比, 与Cu-MPPa消耗GSH能力成负相关。GSH和Cu-MPPa(不同浓度)混合溶液静止30 min后, 加入DTNB, 测试紫外-可见吸收光谱, 结果如图3B所示, 随着Cu-MPPa的浓度增大, 412 nm处NTB的峰逐渐减弱, 表明溶液中GSH含量逐渐减少, 即Cu-MPPa消耗GSH能力增强, Cu-MPPa浓度依赖性地消耗GSH。

### 3.6 细胞内的ROS

DCFH-DA为ROS探针考察了Cu-MPPa在细胞内生成ROS的能力<sup>[10]</sup>。Cu-MPPa ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )与肿瘤细胞(CT26)共孵育4 h。弃掉上清液, 用PBS洗涤3次, 每孔加入DCFH-DA ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )后孵育30 min。然后激光照射0–10 min测试, 在荧光倒置显微镜下观察(激发波长450 nm, 发射波长550 nm), 绿色荧光强度代表活性氧水平, 结果如图4A所示, 随着光照时间的增加, 绿色荧光逐渐明显, 说明细胞内的ROS水平不断上升, 证明Cu-MPPa具有优异的细胞内生成ROS的能力。

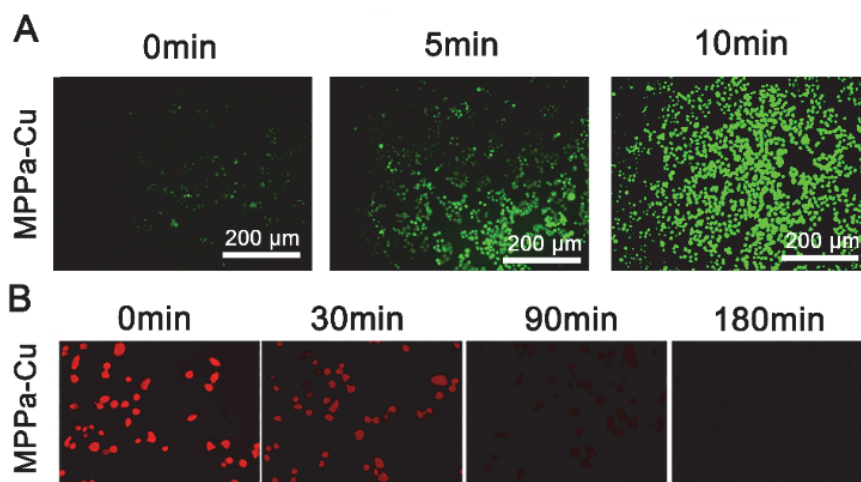


图4 A) CT26细胞中ROS水平; B) CT26细胞中氧气水平

### 3.7 细胞内O<sub>2</sub>产生检测

为了考察Cu-MPPa的Fenton-like反应催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分解产O<sub>2</sub>能力,用O<sub>2</sub>探针RDPP考察了细胞内O<sub>2</sub>水平<sup>[11]</sup>。RDPP是动态荧光染料,在无氧环境中发射红色荧光,在有氧环境中红色荧光猝灭,红色荧光强度与氧气水平负相关。将肿瘤细胞在缺氧条件下培养,加入Cu-MPPa (30 μg·mL<sup>-1</sup>)和RDPP,然后孵育0–90 min,在倒置荧光显微镜下观察RDPP的荧光强度变化,结果如图4B所示。0 min时荧光最强,随着孵育时间的增加细胞内红色荧光逐渐减弱,表明细胞内O<sub>2</sub>水平逐渐升高,90 min时红色荧光完全猝灭,此时RDPP完全被O<sub>2</sub>氧化。证明Cu-MPPa可以通过Fenton-like反应分解肿瘤微环境中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生O<sub>2</sub>,提高了细胞内O<sub>2</sub>水平,可以为PDT作用补充O<sub>2</sub>。

### 3.8 体外抗肿瘤活性测试

用MTT法评估了Cu-MPPa的抗肿瘤活性,用不同浓度梯度Cu-MPPa与肿瘤细胞共孵育,结果如图5所示,在黑暗中,随着药物浓度的升高细胞的成活率逐渐降低,表明Cu-MPPa有暗毒性,说明Cu-MPPa通过Fenton-like反应生成了细胞毒性羟基自由基杀死了癌细胞,但是在实验剂量下抑制肿瘤生长能力不强。形成对比的是,在光照条件下,细胞的存活率显著下降,在相同的药物剂量下光照组的抗肿瘤活性更突出,当浓度达到在30 μg·mL<sup>-1</sup>时,细胞生存率低于20%。表明PDT和CDT的协同治疗作用显著提高了抗肿瘤活性。

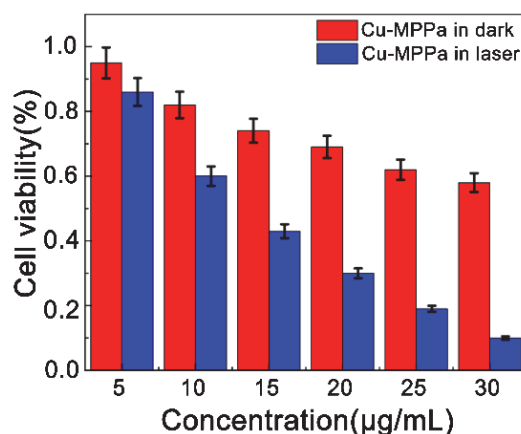


图5 不同浓度药物处理后CT26细胞存活率

## 4 结语

铜-焦脱镁叶绿酸a甲酯的合成及抗肿瘤活性研究实验的教学,结合了有机化学、分析化学、生物化学等相关学科的知识,考察了学生对于理论知识的理解以及运用,同时,学生能够通过自学完成基础分析化学仪器的使用,更加的考察了学生的综合能力。学生通过前期的自学互助、中期的实验操作、后期的数据处理以及科技论文的撰写,大大提升了自身的能力水平,这些能力的锻炼和提升,都可以很好地为学生在研究生阶段的学习打下坚实的基础。更有利于学生调动学生的科研兴趣以及科研素质。该创新实验项目以本学院开设的研究性实验为依托,针对制药工程和材料专业的学生开展实践,已有2学期,具有较强的可操作性,安全且易于实现,教学效果良好。

### 参 考 文 献

- [1] Steeg, P. S. *Nat. Rev. Cancer* 2016, 16 (4), 201.
- [2] Huang, J.; Huang, Y.; Xue, Z.; Zeng, S. *Biomaterials* 2020, 262, 120346.
- [3] Zhu, P.; Chen, Y.; Shi, J. L. *ACS Nano* 2018, 12 (4), 3780.

- [4] Alves, C. G.; Lima-Sousa, R.; de Melo-Diogo, D.; Louro, R. O.; Correia, I. J. *Int. J. Pharm.* **2018**, *542* (1), 164.
- [5] Liu, H.; Xu, C.; Meng, M.; Li, S.; Sheng, S.; Zhang, S.; Ni, W.; Tian, H.; Wang, Q. *Acta Biomater.* **2022**, *144*, 132.
- [6] Wang, J.; Sun, J.; Hu, W.; Wang, Y.; Chou, T.; Zhang, B.; Zhang, Q.; Ren, L.; Wang, H. *Adv. Mater.* **2020**, *32* (22), 2001862.
- [7] Lin, L. S.; Huang, T.; Song, J.; Ou, X. Y.; Wang, Z.; Deng, H.; Tian, R.; Liu, Y.; Wang, J. F.; Liu, Y.; *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (25), 9937.
- [8] Hong, P.; Wu, Z.; Yang, D.; Zhang, K.; He, J.; Li, Y.; Xie, C.; Yang, W.; Yang, Y.; Kong, L.; *et al.* *Chem. Eng. J.* **2021**, *421*, 129594.
- [9] Robert, W. R.; Irene, E. K. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82* (5), 1178.
- [10] You, C.; Ning, L.; Wu, H.; Huang, C.; Wang, F. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *258*, 117685.
- [11] Ding, X.-C.; Wang, L.-L.; Zhang, X.-D.; Xu, J.-L.; Li, P.-F.; Liang, H.; Zhang, X.-B.; Xie, L.; Zhou, Z.-H.; Yang, J.; *et al.* *J. Hematol. Oncol.* **2021**, *14* (1), 92.
- [12] 张树永, 朱亚先. 中国大学教学, **2018**, No. 7, 4.
- [13] 强根荣, 王海滨. 大学化学, **2022**, *37* (2), 2109074.
- [14] 赵卫光, 关英. 大学化学, **2021**, *36* (4), 2005076.
- [15] 肖娟, 陈华波, 陈雪娇, 姚劲松, 翟立红. 教育教学论坛, **2020**, No. 46, 390.