

含 5-氟尿嘧啶稀土磷钨酸盐诱导细胞凋亡作用研究

甘强¹, 刘霞²

1. 北京理工大学爆炸科学与技术国家重点实验室, 北京 100081

2. 中国农业大学理学院, 北京 100193

摘要 多金属氧酸盐作为一种无机金属-氧簇化合物, 在抗肿瘤、抗病毒等药物化学领域引起广泛关注。研究了以下 5 种含 5-氟尿嘧啶稀土磷钨酸盐 $K_9(C_4H_4FN_2O_2)_2La(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 18H_2O$, $K_9(C_4H_4FN_2O_2)_2Ce(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 23H_2O$, $K_9(C_4H_4FN_2O_2)_2Nd(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 25H_2O$, $K_9(C_4H_4FN_2O_2)_2Sm(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 11H_2O$ 和 $K_9H(C_4H_4FN_2O_2)Eu(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 11H_2O$ (FLnPW, Ln=La、Ce、Nd、Sm、Eu) 对 HeLa 细胞凋亡和周期的影响, 以 5-氟尿嘧啶为阴性对照, 同时比较了含 5-氟尿嘧啶磷钨酸盐 $K_{11}C_4H_4FN_2O_2(PW_{11}O_{39}) \cdot 7H_2O$ (FPW) 及磷钨酸 $H_3PW_{12}O_{40}$ (PW) 的生物活性。细胞形态检测表明, 化合物作用于 HeLa 细胞后均出现明显凋亡形态特征, 细胞核染色质呈高度浓缩和边缘化现象 (PW 除外)。流式细胞周期检测表明, 化合物作用后 HeLa 细胞均出现 S 期阻滞, 与 5-氟尿嘧啶相比, FPW 作用后 S 期阻滞增强, 而 FCePW、FNdPW 和 FEuPW 组同时出现 S 期和 G₂/M 期阻滞。流式细胞检测表明, 化合物诱导 HeLa 细胞发生凋亡 (PW 除外), 且诱导凋亡活性顺序为 FLnPW>FPW>5-氟尿嘧啶。Caspase 3 检测表明, 化合物作用后 Caspase 3 活性增强 (PW 除外), 活性顺序与凋亡活性顺序相同, 其中 FCePW 组和 FEuPW 组 Caspase 3 相对活性显著增强。实验结果表明, 所考查化合物 (PW 除外) 能诱导细胞周期阻滞、诱导凋亡活性以及激活 Caspase 3, 且 FLnPW 的活性均高于 FPW 和 5-氟尿嘧啶, 而 PW 只能使肿瘤细胞发生坏死, 说明 5-氟尿嘧啶和稀土元素对化合物的抗肿瘤活性发挥关键作用, FLnPW 可能是通过诱导细胞周期阻滞以及激活 Caspase 3 细胞凋亡通路, 实现显著抑制 HeLa 细胞增殖。

关键词 多金属氧酸盐; 5-氟尿嘧啶; 抗肿瘤; 凋亡; 细胞周期阻滞

多金属氧酸盐 (POMs) 是由 W、Mo、V 等过渡金属与氧形成的无机金属-氧簇化合物, 在抗肿瘤、抗病毒等药物化学领域受到广泛关注^[1-3]。在其独特的结构基础上, 把多种金属元素、有机基团或无机基团引入阴离子骨架中, 可构造功能新颖和结构复杂的新化合物, 赋予特殊的药物活性^[4-5]。在抗肿瘤机理研究方面, Yamase 等^[6]于 1988 年首次提出氧化还原假设, 指出多钨酸盐 $[NH_3Pr]_4[Mo_7O_{24}] \cdot 3H_2O$ 的抗肿瘤活性与其多聚阴离子氧化性相关, 近年来研究先后发现多钨酸盐、多钨酸盐和多钨酸盐衍生物具有诱导凋亡^[7-8]、细胞周期阻滞^[9]、诱导自噬性死亡^[7,10]、影响机体免疫^[11-12]等生物学作用, 研究还发现了它们与酶^[13-14]的相互作用, 这些成果对进一步揭示 POMs 抗肿瘤作用机理非常有利。

5-氟尿嘧啶 (5-FU) 是传统抗代谢类药物, 对实体瘤抑制效果良好, 但其毒副作用也十分显著, 主要表现为骨髓抑制、胃肠道不良反应, 还存在口服给药不便、半衰期短和易产生

耐药性等缺点, 在临床使用上受到限制^[15-16]。2004 年, 李娟等^[17]首次把 5-FU 与 POMs 结合, 制备的 POMs 衍生物 $C_{20}H_{19}F_5N_{10}BW_{12}O_{52}$, 对 SMMC-7721 细胞的抑制活性提高, 同时体内毒性降低。在此基础上, 刘霞等在多阴离子骨架中引入稀土元素 (Pr、Nd、Sm), 制备了含 5-FU 和稀土元素的 POMs 衍生物 $K_{10}C_4H_4FN_2O_2Pr(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 24H_2O$ 、 $K_{10}C_4H_4FN_2O_2Nd(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 12H_2O$ 、 $K_{10}C_4H_4FN_2O_2Sm(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 12.5H_2O$ ^[18] 和 $K_{26}(C_4H_4FN_2O_2)_8Nd(SiW_{11}O_{39})_4 \cdot H_2O$ ^[19], 分别对 HeLa 和 HepG-2 肿瘤细胞表现出较高的体外抑制活性。

本文研究含 5-FU 磷钨酸稀土衍生物 FLnPW (Ln=La、Ce、Nd、Sm、Eu)^[20-22] 的体外抗肿瘤活性, 从细胞凋亡形态、凋亡率、细胞周期检测、Caspase3 相对活性等方面, 研究以上 5 种 POMs 衍生物对 HeLa 细胞周期及凋亡的影响, 初步分析其抗肿瘤活性的构效关系。

收稿日期: 2015-11-24; 修回日期: 2016-11-22

基金项目: 《科技导报》博士生创新研究资助计划项目 (kjdb200902-11)

作者简介: 甘强, 讲师, 研究方向为多酸抗肿瘤药物, 电子信箱: ganqiang@bit.edu.cn; 刘霞 (通信作者), 教授, 研究方向为多酸药物化学和光催化作用, 电子信箱: liuxia6680@sina.com

引用格式: 甘强, 刘霞. 含 5-氟尿嘧啶稀土磷钨酸盐诱导细胞凋亡作用研究[J]. 科技导报, 2016, 34(24): 80-86; doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2016.24.011

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

磷钨酸($H_3PW_{12}O_{40}$, PW), 购自国药集团北京化学试剂公司。Hoechst33342, 购自美国Solarbio公司。质量分数为99%的甘油和4%的多聚甲醛, 购自迈晨科技(北京)有限公司。细胞周期检测试剂盒, 购自北京科悦达生物科技有限公司。KGA203 Caspase 3分光光度法检测试剂盒、KGP BCA蛋白含量检测试剂盒、KGA106 Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒, 购自南京凯基科技发展有限公司。

Multiskan Ascent全自动酶标仪, 美国Thermo公司。Centrifuge 5424高速离心机、Centrifuge 5417R低温离心机, 德国Eppendorf公司。AR2140电子分析天平, 美国Ohaus公司。IX71荧光显微镜, 日本Olympus公司。FACSCalibur型流式细胞仪、FACSAria I型流式细胞仪, 美国BD公司。

1.2 相关溶液配制

Hoechst33342染液: 称取0.1000 g Hoechst33342, 加入PBS缓冲液溶解并定容至10 mL, 得到 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hoechst33342染液, 0°C 避光保存。

PBS/甘油固封液: 取90 mL PBS缓冲液与10 mL甘油混合得PBS/甘油固封液, 室温避光保存。

FLnPW(Ln=La, Ce, Nd, Sm, Eu)参考文献[20]~[22]方法合成, 用去离子水溶解并配制浓度为 $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。

1.3 细胞凋亡形态学检测

FLnPW溶液作用HeLa细胞72 h后, 在IX71荧光显微镜明场观察细胞形态。

在 2×10^6 个HeLa细胞中加入FLnPW溶液, 作用72 h后1000g离心5 min, 用PBS洗涤并制备细胞悬液, 吸取含 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞等分液, 4°C 下1000g离心5 min, 弃上清液, 用30~50 μL 4%多聚甲醛重悬浮, 吸取细胞滴加到玻片上, 空气中干燥。用 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hoechst33342染料染玻片, 室温避光放置10 min, 用蒸馏水洗5次。盖上盖玻片, 用PBS/甘油封固。荧光显微镜下采用蓝色滤片检测荧光, 观察HeLa细胞核形态变化。

1.4 PI单染流式细胞检测

分别接种 5×10^5 个对数生长期HeLa细胞, 24 h后分别加入FLnPW、FPW、PW和5-FU溶液, 阴性对照组加入等体积生理盐水, 每组3个重复。作用72 h后胰酶消化、收集细胞, PBS冲洗2次, 70%预冷乙醇溶液固定24 h。1200 r/min离心5 min弃乙醇, 用PBS洗涤1次, 300目滤膜过滤, 离心去除PBS, 加入1 mL $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PI染液和50 μL $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNase, 混匀后避光反应30 min。使用FACSCalibur流式细胞仪检测PI信号, 并分析各细胞周期细胞比例。

1.5 Annexin V-FITC/PI双染流式细胞检测

接种 2×10^5 个对数生长期HeLa细胞, 24 h后分别加入FLnPW、FPW、PW和5-FU溶液, 阴性对照组加入等体积生理盐水。作用72 h后胰酶消化、收集细胞, 用PBS冲洗2次,

离心去除PBS、收集细胞。在收集细胞中加入500 μL 结合缓冲液重悬浮细胞, 再加入5 μL Annexin V-FITC染液和5 μL PI染液混匀, 室温下避光反应15 min。300目滤膜过滤后, 使用FACSAria I型流式细胞仪进行检测, 激发波长为488 nm, 发射波长为530 nm。

1.6 Caspase 3活性检测

分别接种 5×10^5 个对数生长期HeLa细胞, 24 h后加入FLnPW、FPW、PW和5-FU溶液, 每组重复3次, 阴性对照组加入等体积生理盐水。作用24、48和72 h后用胰酶消化、收集细胞, 再用PBS冲洗2次后去除PBS。在收集的细胞中加入50 μL 预冷裂解缓冲液, 冰上裂解60 min并涡旋震荡。在 4°C 下10000 r/min离心1 min, 收集上清液待用。吸取0.5 μL 上清液至96孔板, 加入19.5 μL 去离子水和200 μL BCA工作液, 混匀后 37°C 放置30 min, 以标准曲线0号管为参比, 在酶标仪上测定570 nm吸光值, 根据标准曲线计算上清液中蛋白浓度。吸取含200 μg 蛋白的上清液, 用裂解缓冲液补充至50 μL 。加入50 μL 的2 \times Reaction Buffer, 再加入5 μL Caspase 3底物, 37°C 避光孵育4 h。空白对照组加入50 μL 裂解缓冲液和50 μL 2 \times Reaction Buffer。在酶标仪405 nm波长测定吸光值, Caspase 3相对活性计算公式为

$$\text{相对活性} = \frac{OD - OD_0}{OD_c - OD_0} \quad (1)$$

式中, OD_0 为空白对照组吸光值, OD_c 为阴性对照组吸光值, OD 为给药组吸光值。

1.7 统计学分析

使用SPSS软件进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据比较采用单因素方差分析, 当 $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 凋亡细胞形态

细胞发生凋亡时会出现细胞收缩、染色质固缩、细胞核片段化、细胞膜发泡等现象^[23]。从图1可见, FLnPW、FPW和5-FU给药后部分HeLa细胞均出现皱缩、变圆, 胞膜出现大量泡状结构, 说明HeLa细胞膜结构发生改变, 出现凋亡现象。而PW作用后细胞不发生明显凋亡, 与生理盐水组相似。

细胞凋亡时染色质首先浓缩和边缘化, 随后染色质膜皱缩、细胞核裂解, 最终生成凋亡小体^[24], 使用Hoechst33342标记DNA的A-T碱基区, 可研究染色质形态变化。图2给出了FLnPW、FPW和5-FU作用72 h后, HeLa细胞核形态变化。与生理盐水组相比, 给药组HeLa细胞部分染色质呈高度浓缩和边缘化状态(红色箭头所示), 可见细胞核裂解、产生凋亡小体, 凋亡特征明显。而PW给药后HeLa细胞无明显凋亡现象。

2.2 细胞周期分布变化

细胞周期分为间期(包括G₁期、S期和G₂期)、有丝分裂期(M期)和静息期(G₀期), 检测HeLa细胞DNA含量的变化, 可

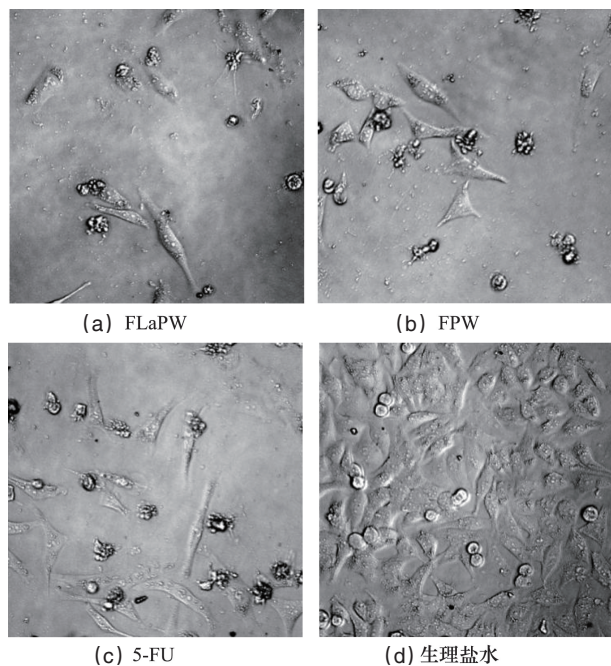


图1 药物作用72 h后HeLa细胞形态(400×)

Fig. 1 Cellular morphology of HeLa cell after treatment with drugs for 72 h (400×)

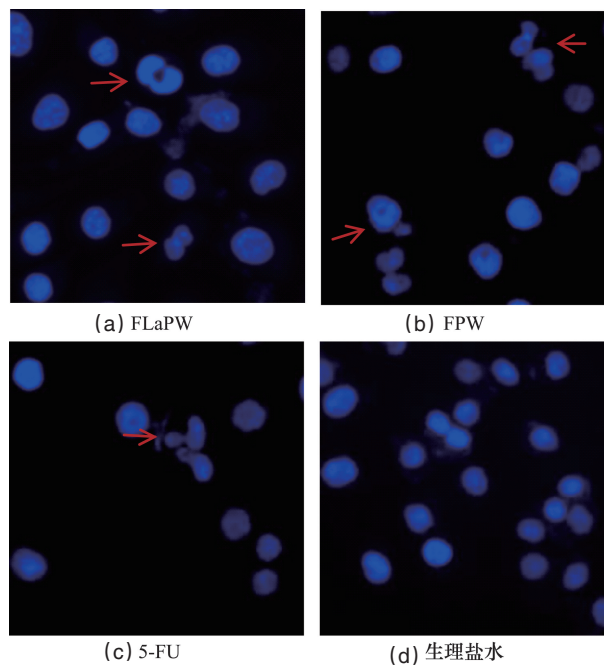


图2 药物作用72 h后HeLa细胞Hoechst33342染色图(400×)

Fig. 2 Cell morphologic change of HeLa cell by Hoechst33342 dyeing after treatment for 72 h (400×)

反映细胞群体中各周期的比率。图3给出 $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FLaPW、FPW和5-FU作用72 h后, HeLa细胞的PI单染流式细胞图。

从图3可见, 生理盐水组HeLa细胞主要处于G₀/G₁期, 给药5-FU、FPW和FLaPW后HeLa细胞G₀/G₁期细胞含量急剧

减小、S期增多, 发生S期阻滞($P < 0.001$), 其中FLaPW在诱导S期阻滞的同时还使HeLa细胞发生G₂/M期阻滞($P < 0.001$)。

表1给出了相同浓度下FLaPW作用72 h后HeLa细胞周期分布情况。从表1可见, 除PW外, 本研究的POMs均表现出明显的S期阻滞活性。与5-FU相比, FPW给药后HeLa细

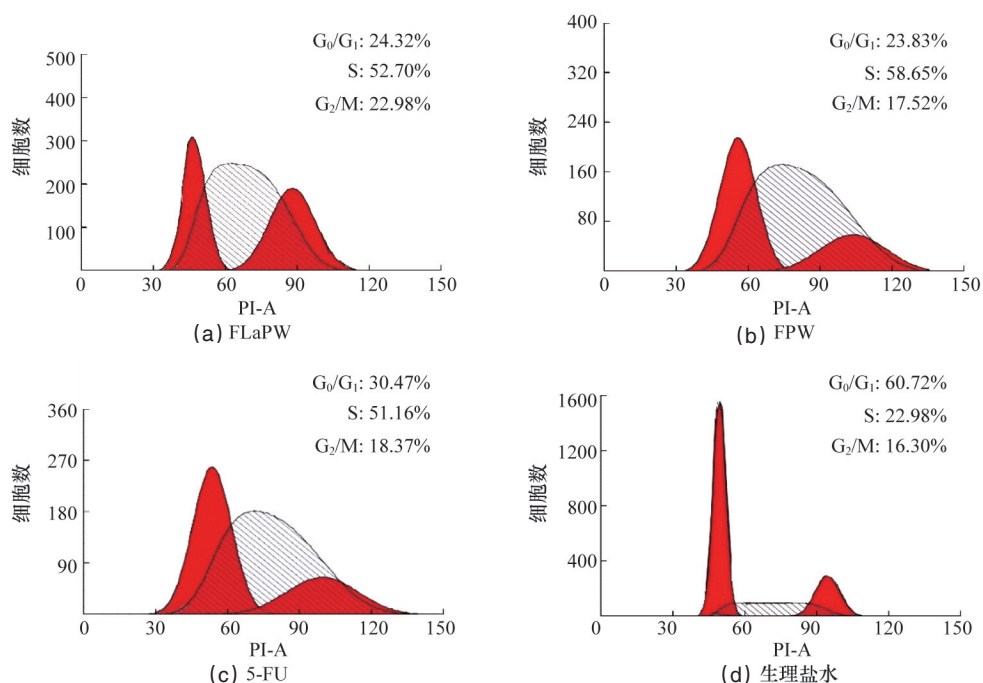


图3 药物作用后HeLa细胞PI单染流式细胞图

Fig. 3 Flow cytometry figures of HeLa cells after drug treatment by PI staining

表 1 药物作用后 HeLa 细胞周期分布 ($n=3, \bar{x} \pm s$)
Table 1 Cell cycle distribution of HeLa cells after drug treatment ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞周期分布/%		
	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
FLaPW	24.32±2.18**	52.70±1.92	22.98±0.89
FCePW	24.22±2.06**	50.84±2.13	24.94±1.71**
FNdPW	31.05±1.97	44.97±0.55***	23.98±1.42*
FSmPW ^[20]	34.64±3.11	42.59±1.45***	22.77±3.61
FEuPW ^[20]	28.23±1.80	47.68±2.33*	24.08±3.99*
FPW	23.83±3.76**	58.65±1.68***	17.52±2.52
5-FU	30.47±1.65	51.16±1.69	18.37±3.34
PW	58.29±1.06***	23.95±1.12***	17.76±0.22
生理盐水	60.72±3.73***	22.98±0.57***	16.30±3.41

注:与 5-FU 比较,*为 $P<0.05$,**为 $P<0.01$,***为 $P<0.001$ 。下表同。

胞 G₀/G₁ 期细胞数量相对减小、S 期阻滞增强 ($P<0.001$), 而

FPW 的母体分子 PW 本身无明显周期阻滞作用,可能是通过增强 5-FU 的溶解性而发挥作用。FLaPW 作用后 HeLa 细胞同时出现 S 期和 G₂/M 期阻滞,其中 FCePW、FNdPW 和 FEuPW 的 G₂/M 期阻滞活性最高。而 PW 组与生理盐水组相比,未见明显凋亡现象 ($P>0.05$)。

2.3 凋亡率变化

正常状态下磷脂酰丝氨酸位于细胞膜内侧,凋亡早期翻转到细胞膜表面,使用荧光素 FITC 标记的 Annexin-V 蛋白和 PI 分别标记磷脂酰丝氨酸和 DNA,可将凋亡早、晚期细胞和坏死细胞区分开^[25]。图 4 给出 $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 FLaPW、FPW 和 5-FU 作用 72 h 后 HeLa 细胞 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞图。

从图 4 可见,生理盐水组中绝大多数 HeLa 细胞均为正常状态(Q3 区),早、晚期凋亡(Q4 和 Q2 区)和坏死(Q1 区)细胞较少。5-FU 和 FPW 作用后正常细胞减少,早、晚期凋亡细胞显著增多 ($P<0.001$),说明 HeLa 细胞发生凋亡。而 FLaPW 作用后正常细胞急剧减少、晚期凋亡细胞大量增加,HeLa 细胞凋亡率进一步增大,说明引入 La 元素能增强多金属酸盐诱导凋亡活性。

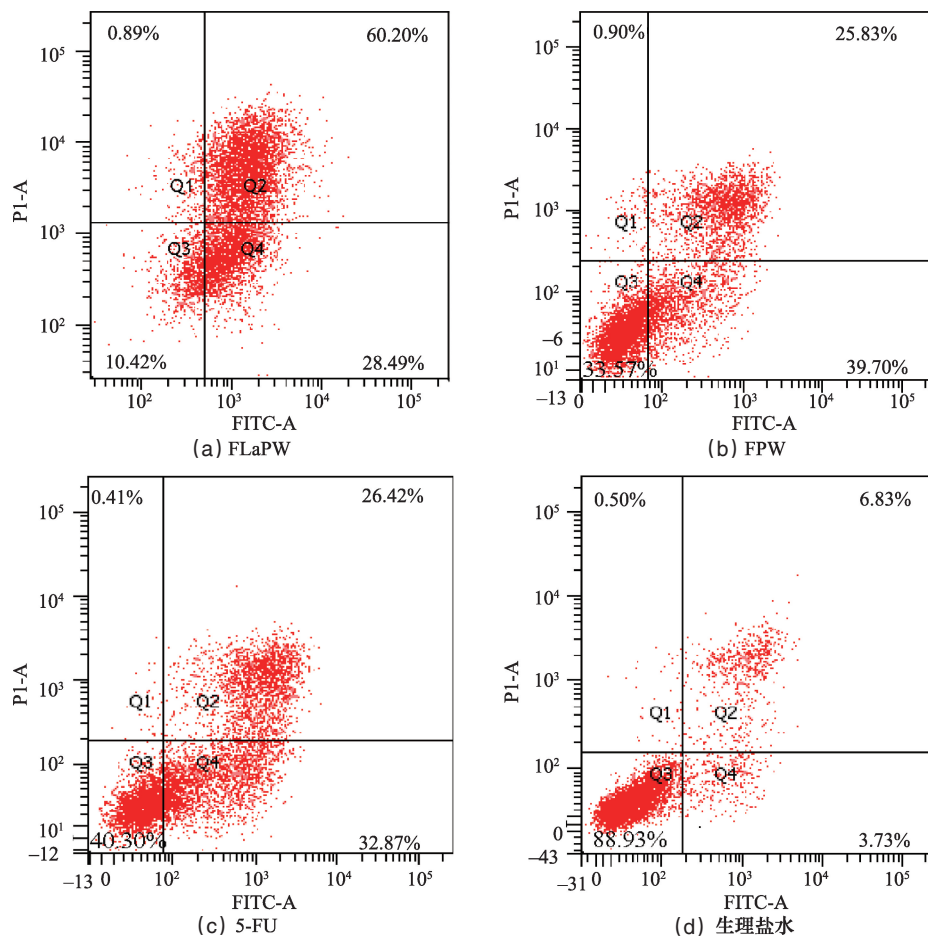


图 4 药物作用后 HeLa 细胞 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞图

Fig. 4 Flow cytometry results of HeLa cells after drugs treatment by Annexin V-FITC/PI double staining

表2给出了FLnPW、FPW、PW和5-FU作用HeLa细胞72 h后 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞检测结果。如表2所示,所研究的化合物(PW除外)作用后HeLa细胞发生凋亡,且诱导凋亡活性顺序为FLnPW>FPW>5-FU>PW,与化合物抗肿瘤活性顺序一致。与5-FU相比,FPW给药后早期凋亡细胞含量增加($P<0.01$);进一步引入稀土元素后,所合成的FLnPW使正常细胞数量继续减少、晚期凋亡细胞数量显著增加($P<0.001$),说明5种稀土元素均能促进HeLa细胞发生凋亡,其中FEuPW诱导HeLa细胞凋亡活性最高。比较HeLa细胞凋亡情况可见,FLnPW结构中5-FU和稀土元素在化合物诱导凋亡过程中发挥关键作用,而PW作为母体分子,无诱导凋亡活性。

表2 药物作用后HeLa细胞凋亡情况($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Apoptosis of HeLa cells after treatment with drugs ($n=3, \bar{x} \pm s$)

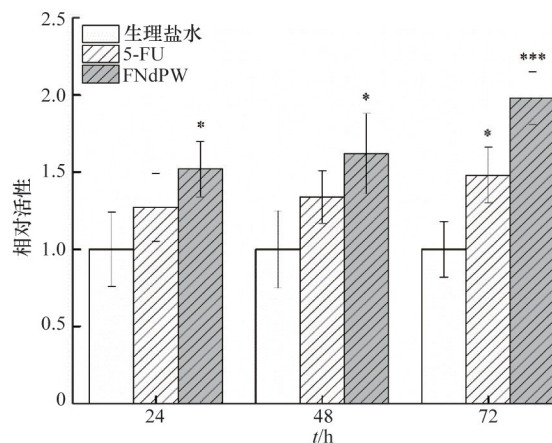
组别	正常/%	早期凋亡/%	晚期凋亡/%	坏死/%
FLaPW	10.42±3.43***	28.49±4.39*	60.20±4.36***	0.89±0.06
FCePW	10.61±2.30***	36.79±0.65	51.57±2.25***	1.03±0.17*
FNdPW	15.00±0.76***	34.90±2.24	58.79±2.976***	1.17±0.06**
FSmPW ^[20]	8.73±0.47***	26.93±2.55**	60.80±3.08***	3.53±0.42***
FEuPW ^[20]	3.57±0.42***	31.00±2.02	64.13±2.78***	1.30±0.20**
FPW	33.57±49**	39.70±3.56**	25.83±4.12	0.88±0.08
5-FU	40.30±2.15	32.87±1.43	26.42±0.69	0.41±0.05
PW	79.96±1.73***	6.69±0.79***	8.03±0.60***	30.00±0.67***
生理盐水	88.93±1.46***	3.73±0.21***	6.83±0.76***	0.50±0.05

2.4 Caspase 3相对活性变化

半胱氨酸蛋白酶Caspase 3是细胞凋亡过程中的关键蛋白,正常细胞中Caspase 3以酶原形式存在,在凋亡早期被裂解活化,在凋亡信号传递过程中发挥着重要作用^[26]。本文以FNdPW和5-FU为例,研究了药物作用24、48和72 h后Caspase 3相对活性变化,结果如图5所示。

从图5可见,在药物作用24、48和72 h后, FNdPW和5-FU组Caspase 3相对活性均随着作用时间延长而逐渐增强。与生理盐水组相比,5-FU作用后HeLa细胞Caspase 3相对活性均大于1,在72 h差异显著($P<0.05$)。FNdPW作用24、48和72 h后Caspase 3相对活性均显著增强,在72 h时间点Caspase 3相对活性值最大($P<0.001$)。

表3给出了FLnPW、FPW、5-FU和PW作用72 h后, Caspase 3相对活性变化情况。从表3可见,FLnPW、FPW和5-FU均能增强HeLa细胞Caspase 3相对活性,而PW对Caspase 3活性无明显影响。化合物激活Caspase 3活性的强弱顺序为FLnPW>FPW>5-FU>PW,与化合物的抗肿瘤活性和诱导凋亡活性强弱顺序一致,再次证明了文献[26]的结论。与5-FU相比,FLnPW和FPW组Caspase 3相对活性均有所增



$n=3$,与生理盐水相比* $P<0.05$,*** $P<0.001$

图5 FNdPW和5-FU作用后HeLa细胞Caspase 3相对活性

Fig. 5 Caspase 3 relative activity of HeLa cells after treatment with FNdPW and 5-FU

表3 药物作用72 h后Caspase 3的OD值及相对活性大小($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 3 OD values and relative activities of Caspase 3 after drug treatment for 72 h ($n=3, \bar{x} \pm s$)

化合物	OD值	相对活度
FLaPW	0.166±0.013	1.75±0.21
FCePW	0.181±0.014	1.99±0.22**
FNdPW	0.181±0.011	1.98±0.17**
FSmPW	0.170±0.013	1.80±0.19
FEuPW	0.188±0.016	2.10±0.26**
FPW	0.157±0.015	1.60±0.24
5-FU	0.149±0.012	1.48±0.18
PW	0.125±0.010	1.10±0.15*
生理盐水	0.119±0.011	1.00±0.18*

强,其中FCePW、FNdPW和FEuPW组差异显著($P<0.01$)。实验结果表明,5-FU基团和稀土元素在本研究所分析的多金属硝酸盐激活Caspase 3过程中发挥关键作用。

多金属硝酸盐抗肿瘤机理研究已有20多年的历史,近年来研究人员在多阴离子骨架引入稀土元素、有机基团等进行官能化修饰^[27-28],获得一大批结构新颖的多金属硝酸盐衍生物,并赋予优异的抗肿瘤活性。其中,对同多钼酸盐PM-8的抗肿瘤机理研究最为深入。自1988年以来,Yamase等先后提出PM-8抗肿瘤的氧化还原假设^[6]和诱导凋亡理论^[29],认为PM-8多阴离子 $[Mo_7O_{24}]^{6-}$ 在机体中不稳定,易与黄素单核苷酸发生单电子还原反应,阻断线粒体电子传递,抑制ATP生成,从而激活Caspase 3等凋亡信号传递,诱发肿瘤细胞凋亡。与PM-8类似,Keggin结构的阴离子 $[PW_{12}O_{40}]^{3-}$ 也能发生单电子或双电子还原,生成混合价态的杂多蓝^[30]。而抗肿瘤研究发

现, PW对HeLa(或HepG-2)细胞表现出较低的抗肿瘤活性,对HeLa细胞的细胞周期、凋亡率以及Caspase 3活性均无明显影响,主要通过其自身酸性使HeLa细胞坏死。抗代谢类药物5-氟尿嘧啶能抑制细胞DNA合成、使细胞阻滞于S期,从而阻止肿瘤分裂增殖^[17],而稀土元素也能使肿瘤细胞发生凋亡或周期阻滞^[31-32]。因此,在含5-FU稀土PW盐结构中, PW主要是作为母体结构引入5-FU和稀土元素,而5-FU基团和稀土元素通过阻滞细胞周期和诱导凋亡,通过协同作用提高POMs的抗肿瘤活性,同时提高5-FU的溶解性并降低毒性。推测所研究化合物通过激活HeLa细胞的Caspase 3凋亡通路,促进HeLa细胞发生凋亡。稀土元素根据电子结构差异可分为轻稀土元素(La到Eu)和重稀土元素(Gd到Lu, Y),其4f电子层饱和度、给电子能力等理化性质表现出周期性变化规律^[33],本文所研究衍生物均引入轻稀土元素,后续工作将进一步与含重稀土元素(Gd, Dy, Er)衍生物^[34]比较,分析稀土元素在POMs衍生物抗肿瘤过程中的作用机理。

3 结论

研究了5种含5-氟尿嘧啶稀土磷钨酸盐衍生物FLnPW(Ln=La, Ce, Nd, Sm, Eu)对HeLa细胞周期和凋亡的影响,结果表明5种化合物能使HeLa细胞和细胞核产生明显凋亡形态变化,HeLa细胞出现细胞周期阻滞和凋亡现象,且化合物的诱导凋亡活性大于FPW、5-FU和PW。凋亡蛋白Caspase 3活性检测表明,FLnPW作用使HeLa细胞Caspase 3活性显著增强。实验结果表明,5-氟尿嘧啶基团和稀土元素是其抗肿瘤活性的关键,推测化合物可能激活了HeLa细胞的Caspase 3凋亡通路。

参考文献(References)

- [1] Liu X, Gan Q, Feng C G. Synthesis, characterization and antitumor activity of rare earth (Y, La) substituted phosphotungstates containing 5-fluorouracil[J]. *Journal of Rare Earths*, 2012, 30(6): 604-608.
- [2] 刘杰, 王恩波, 计亮年. 多金属氧酸盐抗病毒药物研究[J]. *化学进展*, 2006, 18(1): 114-119.
Liu Jie, Wang Enbo, Ji Liangnian. The development of polyoxometalates as antiviral drugs[J]. *Progress in Chemistry*, 2006, 18(1): 114-119.
- [3] Feng C G, Xiong Y D, Liu X. Synthesis, spectroscopy and antibacterial activity of supermolecular compounds of organotitanium substituted heteropolytungstates containing 8-quinolinol[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2011, 31(5): 1153-1160.
- [4] Hasenknopf B. Polyoxometalates: Introduction to a class of inorganic compounds and their biomedical applications[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2005, 10(1): 275-287.
- [5] Mialane P, Dolbecq A, Secheresse F. Functionalization of polyoxometalates by carboxylato and azido ligands: Macromolecular complexes and extended compounds[J]. *Chemical Communications*, 2006(33): 3477-3485.
- [6] Yamase T, Fujita H, Fukushima K. Medical chemistry of polyoxometalates. Part I. Potent antitumor activity of polyoxomolybdates on animal transplantable tumors and human cancer xenograft[J]. *Inorganica Chimica Acta*, 1988, 151(1): 15-18.
- [7] Ogata A, Mitsui S, Yanagie H, et al. A novel anti-tumor agent, polyoxomolybdate induces apoptotic cell death in AsPC-1 human pancreatic cancer cells[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2005, 59(5): 240-244.
- [8] Mitsui S, Ogata A, Yanagie H, et al. Antitumor activity of polyoxomolybdate, $[\text{NH}_3\text{Pr}]_6[\text{Mo}_7\text{O}_{24}] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, against, human gastric cancer model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2006, 60(7): 353-358.
- [9] 张学军, 常雅萍, 刘建辉, 等. 甘氨酸-钼磷酸盐抗肿瘤作用的机理研究[J]. *免疫学杂志*, 2002, 18(5): 404-405.
Zhang Xuejun, Chang Yaping, Liu Jianhui, et al. Anti-tumor activity and mechanism of GP[J]. *Immunological Journal*, 2002, 18(5): 404-405.
- [10] Ogata A, Yanagie H, Ishikawa E, et al. Antitumor effect of polyoxomolybdates: induction of apoptotic cell death and autophagy in in vitro and in vivo models[J]. *British Journal of Cancer*, 2008, 98(2): 399-409.
- [11] Sun X, Wu Y, Gao W, et al. CD39/ENTPD1 expression by CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice[J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(3): 1030-1040.
- [12] 张松龄, 梅少林, 常雅萍. 三取代型钛钨硅酸盐体内抑瘤效应的免疫机制探讨[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(5): 650-652.
Zhang Songlin, Mei Shaolin, Chang Yaping, et al. Investigation of immunological mechanism of the in vivo antitumor effect of $\text{K}_8(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2)_2[\text{SiW}_5\text{Ti}_3\text{O}_{40}] (\text{W T})$ [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2005, 21(5): 650-652.
- [13] Seko A, Yamase T, Yamashita K. Polyoxometalates as effective inhibitors for sialyl- and sulfotransferases[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2009, 103(7): 1061-1066.
- [14] Müller C E, Iqbal J, Baqi Y, et al. Polyoxometalates—a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16(23): 5943-5947.
- [15] Wood P A, Du-Quiton J, You S, et al. Circadian clock coordinates cancer cell cycle progression, thymidylate synthase, and 5-fluorouracil therapeutic index[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006, 5(8): 2023-2033.
- [16] Zhang N, Yin Y, Xu S J, et al. 5-fluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies[J]. *Molecules*, 2008, 13(8): 1551-1569.
- [17] Hakan A, Osman N. Antitumor effects of TNF- β , 5-FU and their combinations on cervix carcinoma cell lines[J]. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 2002, 32(2): 127-132.
- [18] Liu X, Wang S S, Feng C G. Synthesis and anticancer properties of rare earth substituted tungstophosphoric polyoxometalate containing 5-fluorouracil[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2010, 28(12): 2411-2415.
- [19] Liu X, Wang S S, Feng C G. Synthesis and anticancer properties of tungstosilicic polyoxometalate containing 5-fluorouracil and neodymium[J]. *Journal of Rare Earths*, 2010, 28(6): 965-968.
- [20] Feng C G, Gan Q, Liu X, et al. Synthesis, antitumor and apoptosis inducing activities of novel 5-fluorouracil derivatives of rare earth (Sm, Eu) substituted polyoxometalates[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2012, 30(7): 1589-1593.
- [21] Feng C G, Gan Q, Liu X, et al. Synthesis and antitumor activities of rare earth substituted phosphotungstates containing 5-fluorouracil[J]. *Journal of Rare Earths*, 2012, 30(5): 467-472.
- [22] Liu X, Gan Q, Feng C G. Synthesis, characterization and antitumor activity of rare earth (Y, La) substituted phosphotungstates containing 5-

- fluorouracil[J]. *Journal of Rare Earths*, 2012, 30(6): 604–608.
- [23] Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis – an overview of cell death[J]. *American Journal of Pathology*, 1995, 146(1): 3–15.
- [24] Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis[J]. *Anatomia Histologia Embryologia–Journal of Veterinary Medicine Series C*, 2002, 31(4): 214–223.
- [25] Cristea I M, Degli Esposti M. Membrane lipids and cell death: an overview[J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2004, 129(2): 133–160.
- [26] Jin Z Y, El-Deiry W S. Overview of cell death signaling pathways[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2005, 4(2): 139–163.
- [27] Wang X H, Liu J F, Chen Y G, et al. Synthesis, characterization and biological activity of organotitanium substituted heteropolytungstates [J]. *Dalton Transactions*, 2000(7): 1139–1142.
- [28] 刘景福, 陈亚光, 马建方, 等. 穴状稀土杂多化合物的生物活性研究 [J]. *中国稀土学报*, 2000, 18(3): 282–285.
Liu Jingfu, Chen Yaguang, Ma Jianfang, et al. Biological activity of cryptate lanthanide polyoxometalates[J]. *Journal of the Chinese Rare Earth Society*, 2000, 18(3): 282–285.
- [29] Yanagie H, Ogata A, Mitsui S, et al. Anticancer activity of polyoxomolybdate[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2006, 60(7): 349–352.
- [30] 伊万·科热夫尼科夫. 精细化学品的催化合成: 多酸化合物及其催化 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
IV Kozhevnikov. *Catalysis for fine chemical synthesis: Catalysis by polyoxometalates*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [31] Sato T, Hashizume M, Hotta Y, et al. Morphology and proliferation of B16 melanoma cells in the presence of lanthanoid and Al³⁺ ions[J]. *Biomaterials*, 1998, 11(2): 107–112.
- [32] Dai Y, Li J, Li J, et al. Effects of rare earth compounds on growth and apoptosis of leukemic cell lines[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology–Animal*, 2002, 38(7): 373–375.
- [33] 黄春晖. 稀土配位化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
Huang Chunhui. *Rare earth coordination chemistry*[M]. Beijing: Science Press, 1997.
- [34] Liu X, Gan Q, Feng C. Synthesis, characterization and biological activity of 5-fluorouracil derivatives of rare earth (Gd, Dy, Er) substituted phosphotungstate[J]. *Inorganica Chimica Acta*, 2016, 450: 299–303.

Apoptosis-inducing effects of rare earth substituted phosphotungstic acid containing 5-fluorouracil on HeLa cells

GAN Qiang¹, LIU Xia²

1. State Key Laboratory of Explosion Science and Technology; Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China
2. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract As a kind of inorganic metal-oxide cluster compound, polyoxometalates' potential antitumor activities have gained much attention. In this paper, the bioactivities of a series of rare earth substituted phosphotungstic acids containing 5-fluorouracil, $K_9(C_4H_4FN_2O_2)_2La(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 18H_2O$, $K_9(C_4H_4FN_2O_2)_2Ce(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 23H_2O$, $K_9(C_4H_4FN_2O_2)_2Nd(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 25H_2O$, $K_9(C_4H_4FN_2O_2)_2Sm(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 11H_2O$ and $K_9H(C_4H_4FN_2O_2)Eu(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 11H_2O$ (abbr. FLnPW, Ln=La, Ce, Nd, Sm, Eu) on HeLa cell are investigated. 5-fluorouracil (abbr. 5-FU) is used as positive control, and phosphotungstate containing 5-fluorouracil $K_{11}C_4H_4FN_2O_2(PW_{11}O_{39}) \cdot 7H_2O$ (abbr. FPW) and phosphotungstic acid $H_3PW_{12}O_{40}$ (abbr. PW) are also tested. Morphological analysis shows that typical characteristics of apoptosis appear after treatment with the above compounds (besides PW), and nuclear chromatin is highly concentrated and marginalized. Flow cytometry indicates that S phase cell cycle arrest is induced by compounds (besides PW), whose FPW shows higher S-phase arrest activity than 5-FU, and that the FCePW, FNdPW and FEuPW groups show S phase and G₂/M phase arrests simultaneously. Flow cytometry also shows that all compounds except PW induce apoptosis in HeLa cells, and that the apoptosis-inducing activity order is FLnPW>FPW>5-FU. Caspase 3 detection shows that caspase 3 activity of HeLa cell is enhanced after treatment with compounds, and the caspase 3 activity order is FLnPW>FPW>5-FU, where the FCePW and FEuPW groups show significant higher activities. These results show that the above compounds containing 5-FU group possess cell cycle arrest activity, apoptosis-inducing activity and caspase 3 inducing activity, while PW could only cause cell death because of acidity. It is suggested that 5-FU group and rare earth elements play most important roles in the antitumor activity, and FLnPW could inhibit cell proliferation by inducing cell cycle arrest, activating the caspase 3-dependent apoptosis pathway.

Keywords polyoxometalates; 5-fluorouracil; antitumor; apoptosis; cell cycle arrest

(责任编辑 王媛媛)