

光谱学研究重金属离子参与下对甲萘威与 ctDNA 相互作用的影响

刘立栓, 王忻, 杨宝元, 孙英*

农业部农药化学与应用技术重点开放实验室, 中国农业大学理学院, 北京 100094

摘要 应用紫外、荧光光谱分析方法, 研究了离体条件八种重金属参与下对农药甲萘威与小牛胸腺 DNA 的相互作用的影响。当有不同重金属离子参与时, 甲萘威的猝灭常数及其结合位点数都发生了不同的变化。通过计算和分析, 重金属离子对甲萘威与 ctDNA 的加合物的影响程度为 $Pb^{2+} > Ag^+ > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Cr^{3+}$ 。通过 $400 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的不同金属离子对 ctDNA 的作用研究, 得出不同离子对 DNA 的双螺旋结构的破坏能力强弱依次为: $Pb^{2+} > Cd^{2+} > Ag^+ > Co^{2+} > Zn^{2+} \approx Cu^{2+} > Ni^{2+} > Cr^{2+}$ 。两种光谱所得结果表明不同重金属离子对 DNA 的作用机理不同。

关键词 甲萘威; DNA 加合物; 重金属离子; 紫外光谱; 荧光光谱

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2008)06-1353-03

引言

DNA 作为生命的遗传物质, 它的损伤如得不到修复, 可能导致基因突变、致癌、遗传性疾病等危害生物体生存的后果, 是相当有害的^[1]。重金属离子广泛存在于环境中, 可以通过各种途径进入生物体, 重金属在生物体内以离子或螯合物的形式存在; 其中有些金属螯合物或离子能识别、损伤及断裂 DNA, 对这些金属的研究已成为近年来生物无机化学的热点之一^[2]。甲萘威作为氨基甲酸酯类农药被人们广泛应用, 已有实验证明甲萘威可以与 ctDNA 通过嵌插作用产生加合物, 而 DNA 加合物可能会在生物体环境下逃避生物体的自身的修复^[3]。

随着越来越多的农药与重金属进入生态环境系统, 其潜在的危害性也越来越显现出来。所以研究金属离子和农药共存时对 DNA 的作用及其相互影响对于揭示复合污染物之间的交互作用的本质及影响因素, 具有重大意义。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

日立 F4500 荧光分光光度计; 电热恒温水浴锅; PHS-3C 精密 pH 计; 紫外可见分光光度计(美国 PE); 小牛胸腺 DNA(Calf Thymus, SigmaD 1501)购自北京欣经科技技术公司, 配成浓度为 $200 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 配好保存于 4 °C 的冰

箱中备用; 甲萘威由中国农业大学农产品质检中心提供(纯度 95%), 配成 $40 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液; $Pb(NO_3)_2$, $Co(NO_3)_2$, $AgNO_3$, $ZnSO_4$, $NiSO_4$, $CuSO_4$, $CdSO_4$ 和 $CrCl_3$ 均为分析纯, 均配成 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的使用液; 缓冲液由 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDTA 组成, 调节 pH 至 7.11; 实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

向数只 10 mL 的试管中分别加入 1 mL 的缓冲液与 1 mL 的甲萘威溶液, 再依次分别加入 $0 \sim 4 \text{ mL}$ 的 ctDNA 溶液, 用水定容, 将上述溶液在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 30 min , 分别测定溶液的荧光强度, 平行测定三次取平均值。

向数只 10 mL 的试管中分别加入 1 mL 的缓冲液与 1 mL 的甲萘威溶液和 0.5 mL 的金属离子, 再依次分别加入 $0 \sim 4 \text{ mL}$ 的 ctDNA 溶液, 用水定容, 将上述溶液在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 30 min , 分别测定溶液的荧光强度。平行测定三次取平均值。

向 10 mL 的比色管中分别加入 1 mL 的缓冲溶液与 1 mL ctDNA 溶液, 再向其中加入不同浓度的重金属溶液, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 30 min , 观察其紫外吸收变化, 平行测定三次取平均值。

2 结果与讨论

2.1 金属离子对 ctDNA 作用的紫外-可见光谱研究

图 1 是不同重金属离子不同浓度下对 ctDNA 紫外-可见

光谱的影响, 总的变化趋势是随着金属离子浓度的上升, 吸光度逐渐增大产生增色效应, 当达到一个临界值之后, 吸光度开始减小, 出现减色效应。这种现象表明双螺旋 DNA 先发生了解旋, 然后又发生了单链内部键合, 这是因为单链多核苷酸的吸光度值比双螺旋结构多核苷酸的吸光度值要高。增色效应也表明金属离子与 ct DNA 之间产生了加和物。DNA 的双螺旋结构使碱基对的 π 电子云发生重叠。因而减少了对紫外光的吸收, 双螺旋解旋变为单链时, 原来被禁阻的 π 电子可以自由吸收入射光而发生跃迁。

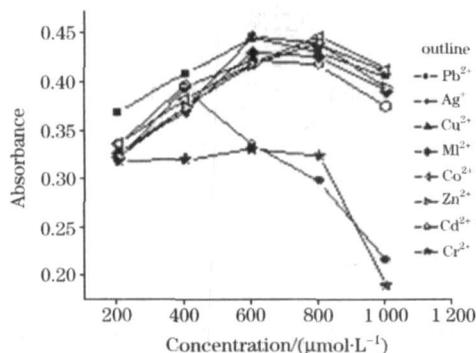


Fig 1 Affection of heavy metallic ions to ct DNA in difference concentration

吸光度浓度曲线在一定程度上反映了不同金属离子对 DNA 作用的强弱, 不同的离子对 DNA 的作用不同, 据文献报道 Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} 和 Co^{2+} 不能介导 DNA 氧化, 但可能诱导链交联的发生^[2], Pb^{2+} 对小牛胸腺 DNA 的作用最强, 有资料^[4]证明是 Pb^{2+} 直接进攻核酸分子, 促进自由基链式反应, 引起氧化损伤而导致 DNA 分子发生变化。 Cu^{2+} 对 DNA 的损伤和 Pb^{2+} 相似, 通过氧化作用来损伤 DNA。 Cr^{3+} 可以与 DNA 生成二元加和物, 从而产生致癌作用。

通过 $400 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的不同金属离子对 ct DNA 的作用研究了不同离子对 DNA 的双螺旋结构的破坏能力, 得出作用

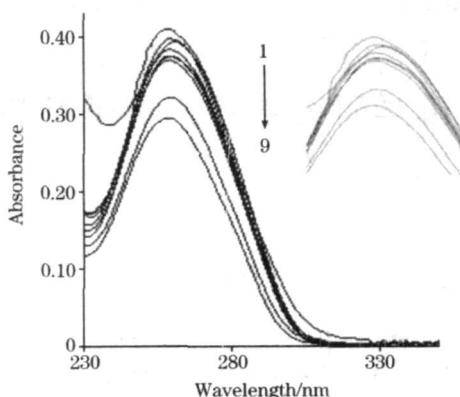


Fig 2 Affection of heavy metallic ions to ct DNA in the same concentration

From 1 to 9: Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{2+} , DNA

强弱依次为: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cr}^{2+}$ 。从图 2 可以看出, Cd^{2+} 和 Ag^+ , Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 的谱图很接近几乎重合, 作用能力基本上相同。 Cd^{2+} 可以与 DNA 的核酸碱基共价键合, 这种作用会扰乱碱基杂环上的电子云密度, 并可能削弱磷酸二酯键, 通过上述一系列作用, Cd^{2+} 即破坏了 DNA 的结构, Cd^{2+} 易与 A 和 G 的 N7 位结合^[5]。

从这些金属所处的元素周期表的位置来看 Pb^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} 和 Cr^{3+} , 原子序数也是依次降低, 可见随着原子序数的增加, 金属离子对小牛胸腺 DNA 的作用也越来越强烈。

2.2 不同金属离子对 ct DNA 甲萘威加和物的影响

已有实验证明甲萘威可以与 ct DNA 通过嵌插作用产生稳定的加合物^[3], 而 Cu 可以加强这种作用^[6]。根据文献^[6]静态猝灭公式 $\log[(F_0 - F)/F] = \log K_a + n \log[Q]$ 对不同的金属离子对 ct DNA- 甲萘威加和物的所有荧光强度数据进行处理, 处理结果列于表 1。

Table 1 Analysis of the metallic ions' function to ct DNA carbaryl adducts

Metallic ions	Linear equation	r_2	K_a
No Ion	$\log[(F_0 - F)/F] = 1.0764 \log[Q] + 8.6638$	0.9982	4.61×10^8
Pb^{2+}	$\log[(F_0 - F)/F] = 1.7901 \log[Q] + 14.831$	0.9795	6.78×10^{14}
Ag^+	$\log[(F_0 - F)/F] = 1.5004 \log[Q] + 12.294$	0.8837	1.97×10^{12}
Cu^{2+}	$\log[(F_0 - F)/F] = 1.1959 \log[Q] + 9.7163$	0.9986	5.20×10^9
Ni^{2+}	$\log[(F_0 - F)/F] = 0.9611 \log[Q] + 8.0215$	0.9616	1.05×10^8
Co^{2+}	$\log[(F_0 - F)/F] = 0.9491 \log[Q] + 7.9963$	0.9906	9.92×10^7
Cd^{2+}	$\log[(F_0 - F)/F] = 0.8254 \log[Q] + 6.755$	0.9514	5.69×10^6
Zn^{2+}	$\log[(F_0 - F)/F] = 0.8195 \log[Q] + 7.0248$	0.9797	1.06×10^7
Cr^{3+}	$\log[(F_0 - F)/F] = 0.5251 \log[Q] + 4.246$	0.9629	1.76×10^4

表 2 表明甲萘威与小牛胸腺 DNA 结合作用非常强, 在加入金属离子以后, 小牛胸腺 DNA 对甲萘威的荧光猝灭常数 K_a 和结合位点数 n 都发生了很大变化, 这说明重金属离子对甲萘威与 ct DNA 之间的作用产生了很大影响。

加入不同的金属离子, 小牛胸腺 DNA 对甲萘威的荧光猝灭表观结合常数 K_a 从大到小依次为 $\text{Pb}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cr}^{3+}$ 。由此可得出 Pb^{2+} 对小牛胸腺 DNA 与甲萘威之间的作用影响比较明显, 而

Cr^{3+} 作用最小, 这与有关报道相类似; Pb^{2+} , Cr^{6+} 具有明显的致癌因素, 而微量 Cr^{3+} 是人体的营养元素。另外从这些金属所处的元素周期表的位置来看 Pb^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} 和 Cr^{3+} , 原子序数也是依次降低, 可见随着原子序数的增加, 金属离子对小牛胸腺 DNA 与甲萘威之间的作用的影响也越来越严重。 Zn^{2+} , Cd^{2+} 同处于 II B, 可能由于其本身结构的特殊性使其对小牛胸腺 DNA 与甲萘威之间的作用影响并不大。

在 DNA 中, 能与磷酸基结合的金属离子对碱基的结合趋势如下: $\text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ ^[1]。同时有报道称 Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} 和 Co^{2+} 不能介导 DNA 氧化, 但可能诱导链交联的发生^[2]。本实验所得结果显示金属离子对小牛胸腺 DNA 与甲萘威之间的作用影响来看, 铜的影响较锌等几种离子强, 可见铜可能主要起到介导作用, 主要为催化 Fenton

反应, 而 Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} 主要为亲合力的作用。小牛胸腺 DNA 与甲萘威的荧光猝灭在加入 Cr^{3+} 离子前后, 猥灭常数并未发生多少变化, 因此可认为少量的 Cr^{3+} 对 DNA 可能并不会有伤害。

3 结 论

通过荧光光谱数据得出重金属离子对 ct-DNA 甲萘威加合物的影响能力为 $\text{Pb}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cr}^{3+}$, 紫外光谱表明各种金属离子对 ct-DNA 双螺旋结构的破坏能力为 $\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \approx \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cr}^{2+}$ 。两种光谱所得结果表明不同重金属离子对 DNA 的作用机理不同, 具体机理还需要进行进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] CHEN Qing, LU Guocheng(陈清, 卢国成, 主编). Trace Elements and Health(微量元素与健康). Beijing: Peking University Press (北京: 北京大学出版社), 1989. 100.
- [2] XI Zhuge, CHAO Furhuan, SUN Yongmei, et al(蔡著革, 魏福寰, 孙咏梅, 等). Journal of Environmental Science(环境科学学报). 2003, 23(5): 662.
- [3] ZHANG Lijin, MIN Shurong, SUN Ying, et al(张立金, 闵顺耕, 孙英, 等). Environmental Chemistry(环境化学), 2004, 23(5): 520.
- [4] HU Xiaopan, ZHOU Jiashua, SHI Xirjin, et al(胡晓磐, 周建华, 时夕金, 等). Journal of Suzhou University(Medical Edition)(苏州大学学报·医学版), 2004, 24(5): 595.
- [5] WANG Xirying, JI Ming, et al(王新莹, 纪鸣, 等). Journal of Analytical Science(分析科学学报), 2005, 21(5): 557.
- [6] ZHANG Xiaoming, LI Guoxue, LI Donghao, et al(张晓明, 李国学, 李东昊, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(3): 517.

Mechanism of Damage of DNA Induced by Carbaryl and Heavy Metal Ions

LIU Lishuan, WANG Xin, YANG Baoyuan, SUN Ying*

Key Laboratory of Pesticide Chemistry & Application Technology of Ministry of Agriculture, Department of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract The effect of heavy metals on the adduct of carbaryl and calf thymus DNA in vitro was studied using fluorescence and UV spectrum. The results showed that heavy metals can influence the carbaryl quenching constant and the number of binding sites, and the order of is $\text{Pb}^{2+} > \text{Ag}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cr}^{3+}$. The UV spectrum study showed that the heavy metal ions can change the double helix structure of ct-DNA, and the order of this ability is $\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \approx \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cr}^{2+}$.

Keywords Carbaryl; DNA damage; Heavy metal ion; UV spectrum; Fluorescence spectrum

(Received May 10, 2006; accepted Aug. 20, 2006)

* Corresponding author