

硫杂蒽酮稀土铈配合物与 DNA 相互作用的研究(II)

杨武, 高琦宽, 芦小林, 吴锦绣

西北师范大学化学化工学院, 甘肃 兰州 730070

摘要 以荧光光谱, 紫外吸收光谱和圆二色谱法研究了硫杂蒽酮稀土铈(III)配合物与 DNA 的作用。结果表明, 在 pH 7.10 的模拟体液条件下, 当 DNA 存在时, 该化合物的紫外-可见吸收光谱随 DNA 浓度的增加表现出减色效应, 使 DNA 的圆二色谱中的负峰发生较大变化, 导致 DNA 的双螺旋结构变得松散。荧光光谱表明: 该配合物的荧光强度在 DNA 存在时有较大的增加, 表现出增色效应, 同时使溴化乙锭(EB)-DNA 体系的荧光强度降低, 而溴化乙锭(EB)的存在也可使配合物 DNA 体系的荧光强度降低。表明该配合物和 EB 与 DNA 有着强烈的竞争反应。据此推断, 该配合物主要以嵌入方式与 DNA 作用。

关键词 硫杂蒽酮稀土铈配合物; 小牛胸腺 DNA; 溴化乙锭

中图分类号: O614.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2008)02-0366-04

引言

DNA 是生物体中重要的一类生物大分子, 对于生命遗传密码的翻译、转录、复制起着非常重要的作用。近年来, 为了进一步探索和认识 DNA 的性质、结构、行为、形态, 揭示生命之奥秘, 对金属配合物与生物大分子 DNA 的相互作用的研究已成为生物无机化学领域十分活跃的研究课题。金属配合物现已广泛应用于 DNA 的结构探针、DNA 的分子光开关、DNA 足迹试剂以及 DNA 断裂试剂和抗肿瘤药物, Santa^[1], 计亮年^[2,3], 杨频^[4,5]等都做了相当多的探索。多数研究结果认为这些化合物与核酸结合的部位是核酸的碱基、磷酸骨架和戊糖环。作用方式为非共价键结合, 共价键结合和剪切结合作用。

通常, 小分子与 DNA 的非共价键结合作用有三种方式: 嵌入作用, 沟槽作用和静电结合^[6]。国内外对稀土元素与核酸、蛋白质等生物大分子的作用研究表明^[7,8], 稀土离子可以与蛋白质、核酸发生相互作用, 并影响其生理活性。将具有抗肿瘤活性^[9]的配体与稀土离子形成小分子配合物后, 由于金属与配体间的协同作用, 使稀土配合物抗肿瘤活性较配体增强^[10]。本课题组合成了 2-氧代乙酸-硫杂蒽酮稀土配合物, 并初步研究了 2-氧代乙酸-硫杂蒽酮稀土配合物对质粒 DNA 的切割作用^[11]。本文在此基础上, 用紫外吸收光谱、荧光光谱和圆二色谱法研究了 2-氧代乙酸-硫杂蒽酮铈与 DNA 的相互作用。这为进一步探讨抗癌稀土配合物与生物

分子作用模式及其生物活性之间的关系, 对于在分子和细胞水平上研究癌症的起因, 寻找新的具有抗肿瘤活性的药物有着重要意义。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

小牛胸腺 DNA(CT DNA)为华美生物工程公司产品, UV 谱测定 A_{260}/A_{280} 大于 1.8, 溴化乙锭(EB)购自华美生物工程公司, O-(硫杂蒽酮[2]-基)-氧乙酸稀土铈(III)配合物(自制)^[11], 其他试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水, 缓冲溶液为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH 7.10 的溶液。LAMBDA 35 紫外-可见分光光度计(美国 PE 公司), LS-55 荧光分光光度计(美国 PE 公司), J-810 圆二色谱仪(日本 Jasco 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 对铈(III)配合物紫外光谱的影响

称取一定量的 O-(硫杂蒽酮[2]-基)-氧乙酸稀土铈(III)配合物, 用 DMSO 溶解, 配制成 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。取 2.5 mL, 每间隔 10 min 加入等体积 DNA($c_{\text{DNA}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 在给定条件下扫描其紫外光谱。

1.2.2 DNA 对铈(III)配合物荧光强度的影响

称取一定量的 O-(硫杂蒽酮[2]-基)-氧乙酸稀土铈(III)配合物, 用 DMSO 溶解, 配制成 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。取该溶液 2.5 mL, 选定激发波长为 399 nm, 激发狭缝与发

收稿日期: 2006-09-08, 修订日期: 2006-12-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(20475044)和西北师范大学知识与科技创新工程项目(KJCX-01)资助

作者简介: 杨武, 1966年生, 西北师范大学化学化工学院教授, e-mail: yangwu@nwnu.edu.cn

射狭缝 10 nm, 每间隔 10 min 加入等体积的 DNA ($c_{\text{DNA}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 在给定的条件下扫描其荧光发射谱。

1.2.3 EB 对 Eu(III) 配合物 DNA 体系荧光强度的影响

在 Eu(III) 配合物 DNA ($c_{\text{Eu}}/c_{\text{DNA}} = 10$) 体系中, 加入不同量的 EB ($1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.5 h 后, 在给定的条件下扫描其荧光发射谱。

1.2.4 铈(III) 配合物对 EB DNA 体系荧光强度的影响

在 EB DNA 体系 ($c_{\text{EB}}/c_{\text{DNA}} = 1$) 中, 加入不同量的铈(III) 配合物 ($5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.5 h 后, 在上述条件下扫描其荧光发射谱。

1.2.5 铈(III) 配合物对 DNA 的 CD 谱影响

取浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DNA 溶液, 扫描其 CD 谱, 加入 $1 \times 10^{-3} \text{ mL}$ 铈(III) 配合物溶液 ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 反应 0.5 h, 扫描其 CD 谱。

2 结果与讨论

2.1 DNA 对铈(III) 配合物紫外光谱的影响

由于核酸分子本身有光吸收活性, 许多小分子与核酸结合后, 对核酸或小分子的吸收光谱都会产生影响。紫外-可见吸收光谱法是研究小分子与核酸相互作用机理的最常用、最方便的方法。含有碱基生色团双螺旋结构的 DNA 分子, 其 UV-Vis 吸收光谱在 260 nm 附近有一强的吸收峰, 某些小分子如金属配合物亦有吸收谱带, 可根据相互作用前后 DNA 或其他分子的吸收谱带的变化对二者相互作用模式进行判断。对 DNA 的吸收光谱来说, 如导致分子的轴向变化即其构象变化, 则产生减色效应及红移现象, 且作用越强减色效应越明显; 如导致 DNA 双螺旋结构的破坏, 则产生增色效应^[12]。对于金属配合物等小分子的特征吸收谱带, 如该分子与 DNA 发生嵌插作用, 则该分子的吸收光谱出现减色效应和红移现象, 且作用越强减色效应越明显; 如该分子与 DNA 发生静电作用或沟槽作用, 紫外可见吸收光谱峰将出现较小的红移, 且其减色效应不明显^[13]。

稀土铈(III) 配合物在 260 nm 附近有一强的紫外吸收峰, 这与 DNA 双螺旋结构在此处的吸收峰叠加, 无法判断其变化趋势。但是, 铈(III) 配合物在 400 nm 处有另一紫外特征吸收峰(见图 1), 且随着 DNA 的加入, 配合物分子的吸收光谱出现明显的减色效应和较小的红移现象, 由此可初步判断, 该分子与 DNA 相互作用的方式可能是嵌入作用或者沟槽作用。

2.2 荧光光谱研究

溴化乙锭(EB) 是经典的荧光探针, 被广泛应用于抗癌药物的筛选和小分子与 DNA 作用的研究^[14, 15]。EB 本身的荧光强度很弱, 但嵌入 DNA 双螺旋结构后荧光强度显著增强。如果共存于上述 EB-DNA 体系中的小分子 M 也能与 DNA 发生类似于 EB 的嵌入作用, 就会竞争 EB 与 DNA 的结合位点, 使 EB-DNA 体系的荧光减弱。通常, 当 EB-DNA 体系荧光强度减弱 50% 且 $c_{\text{M}}/c_{\text{DNA}} < 100$ 时, 就认为 M 与 DNA 发生了类似于 EB 的嵌入作用^[16]。

2.2.1 DNA 对铈(III) 配合物荧光强度的影响

在不同量 DNA 存在下, 铈(III) 配合物的荧光发射光谱如图 2 所示。在 DNA 存在下, 铈(III) 配合物的最大发射波长发生微弱红移, 其荧光强度有较明显的增大, 产生了明显的增色效应。增色效应是由于 DNA 碱基与嵌入其间的小分子产生电子相互作用引起的。铈(III) 配合物是不溶于水的, 当进入到 DNA 的疏水区域时, 减小了水分子对它的碰撞, 也可导致荧光强度的增加。DNA 的加入引起铈(III) 配合物荧光强度增加的现象和已知的一些嵌入试剂在 DNA 存在时荧光强度增加的现象是一致的。由此可初步断定, 铈(III) 配合物可能发生了类似于 EB 嵌入到 DNA 的碱基对中的作用。

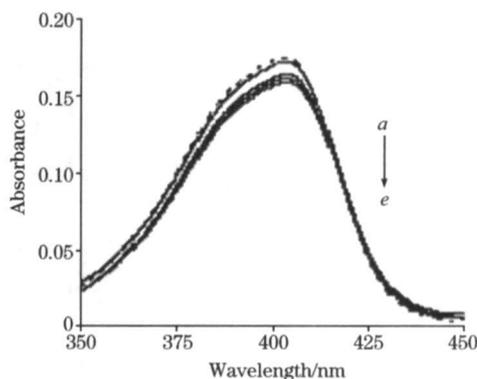


Fig 1 Change of UV-Visible spectra of the complex ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the absence (---) and presence (—) of different concentrations of DNA ($1.25 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

a: 2.0 mL EuL₃; b: a+ 0.1 mL DNA;

c: a+ 0.2 mL DNA; d: a+ 0.3 mL DNA; e: a+ 0.4 mL DNA

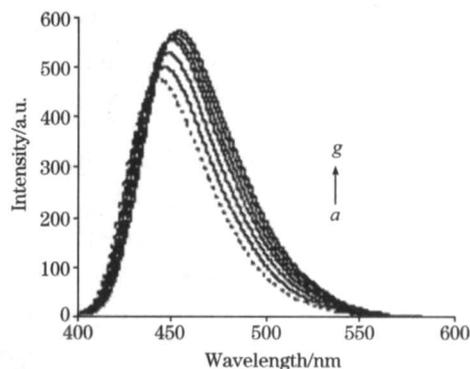


Fig 2 Emission spectra of EuL₃ · 5H₂O system in the absence (---) and presence (—) of different concentrations of DNA (excited at 399 nm, 2.5 mL solution)

a: $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EuL₃ · 5H₂O; b: a+ 0.1 mL DNA ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); c: a+ 0.2 mL DNA; d: a+ 0.3 mL DNA; e: a+ 0.4 mL DNA; f: a+ 0.5 mL DNA; g: a+ 0.6 mL DNA

2.2.2 EB 对 Eu(III) 配合物 DNA 体系荧光强度的影响

为了进一步考察铈(III) 配合物与 DNA 的作用方式, 在 Eu(III) 配合物 DNA ($c_{\text{Eu}}/c_{\text{DNA}} = 10$) 体系中加入 EB, 结果如图 3 所示。当加入 EB 时, 发现 Eu(III) 配合物 DNA 体系的发射波长没有发生移动, 其荧光强度随 EB 浓度的增加而下降。而在 600

nm 处出现了 EB-DNA 体系的荧光发射峰, 峰强度随着 EB 浓度的增加而迅速增大。加入 EB 使得 E_{tr} DNA 体系荧光强度降低, 说明 EB 分子取代了 $Eu(III)$ 配合物 DNA 体系中部分配合物分子, 形成了 EB-DNA 复合物体系, 导致了铕(III)配合物 DNA 体系荧光强度的降低及标志 EB-DNA 新体系形成的新峰的出现。EB 能使铕(III)配合物 DNA 体系在 480 nm 处的荧光产生猝灭现象, 而且猝灭程度随 EB 浓度的增加而加大。由此推断, 铕(III)配合物与 DNA 的作用方式与 EB 与 DNA 作用方式应该是相似的, 均为嵌入方式。

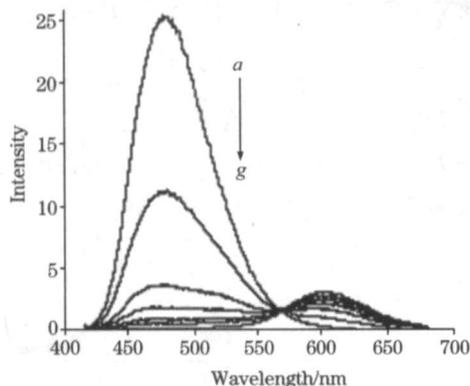


Fig 3 Emission spectra of DNA- EuL_3 system ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA, $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $EuL_3 \cdot 5H_2O$) in increasing amounts of $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EB (0.3 mL per scan), excited at 399 nm, 4 mL solution

a: 4 mL DNA + 0.01 mL EuL_3 ; b: a + 0.2 mL EB; c: a + 0.5 mL EB; d: a + 0.8 mL EB; e: a + 1.1 mL EB; f: a + 1.4 mL EB; g: a + 1.7 mL EB

2.2.3 铕(III)配合物对 EB-DNA 体系荧光强度的影响

EB 本身的荧光很弱, 但嵌入 DNA 双螺旋结构后荧光强度显著增强。如果在 EB-DNA 体系中加入的有机小分子 M 也能与 DNA 发生类似于 EB 的嵌入作用, 这个小分子就会与 EB 竞争同 DNA 的结合位点, 使 EB-DNA 体系的荧光强度减弱。一般认为当 EB-DNA 体系的荧光强度减弱 50%, 且 $c_M/c_{DNA} < 100$ 时, M 与 DNA 发生了类似于 EB 的嵌入作用。

铕(III)配合物对 EB-DNA 体系荧光强度影响的结果如图 4 所示, 在不同量的铕(III)配合物存在下, EB-DNA 体系的最大发射波长没有发生移动, 其荧光强度随 (c_{Eu}/c_{DNA}) 比值 r 的增大而减小。实验中发现, 当 $r = 16$ 时, EB-DNA 体系的荧光强度已降到了原来的 60% 以下, 说明铕(III)配合物发生了类似于 EB 的嵌入作用。铕(III)配合物的加入, 取代了 EB-DNA 复合物体系中的相当数量的 EB 分子, 导致了 EB-DNA 体系荧光强度的较大降低, 说明配合物与 EB 发生了相当程度的竞争反应。

2.3 铕(III)配合物对 DNA 的 CD 谱的影响

圆二色光谱 CD 是目前研究有机化合物和生物大分子的

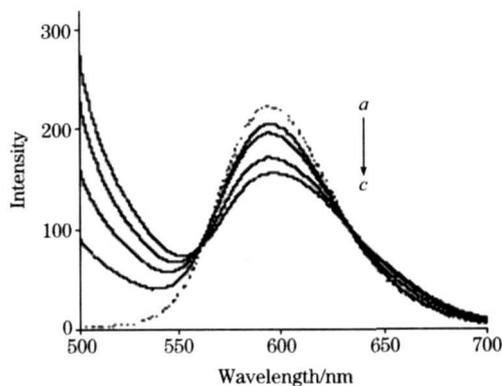


Fig 4 Emission spectra of EB-DNA system ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA, $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EB) in increasing amounts of $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $EuL_3 \cdot 5H_2O$ (0.1 mL per scan), excited at 480 nm, 5 mL solution

a: 2.5 mL DNA + 2.5 mL EB; b: a + 0.1 mL EuL_3 ; c: a + 0.2 mL EuL_3 ; d: a + 0.3 mL EuL_3 ; e: a + 0.4 mL EuL_3

构型、构象和三维空间结构的重要手段, 可根据 DNA 的 CD 光谱在其他药物分子存在时的波形变化, 判断药物与 DNA 的作用方式^[17]。一方面根据 DNA 在 260 nm 处的吸收提供有关结构信息, 另一方面对一些本身没有 CD 信号, 但与 DNA 结合后能产生诱导 CD 信号的分子, 获得一定的有关其结构的间接信息。DNA 的 CD 谱中处于 275 nm 的正峰是由碱基的堆积作用而产生的, 处于 245 nm 的负峰则是由于 DNA 双螺旋构象产生的^[18]。

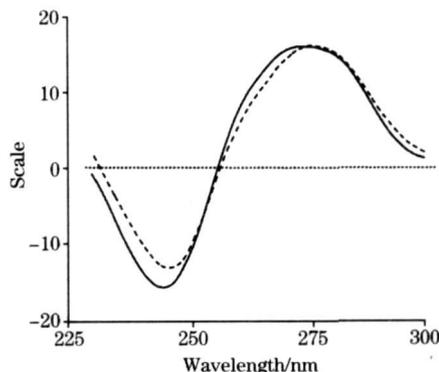


Fig 5 CD spectra of DNA ($1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the absence (—) and presence of (---) EuL_3 ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

如图 5 所示, 当加入铕(III)配合物后, DNA 的 CD 谱图发生了明显的变化。245 nm 处的负峰发生位移, 强度降低, 说明铕(III)配合物的加入使 DNA 双螺旋结构部分被破坏, 双螺旋结构变得松散, 而正峰的位置和强度基本保持不变。CD 谱比较的结果表明, 铕(III)配合物的嵌入只使 DNA 碱基的堆积和双螺旋结构变得松散, 并没有引起解链。

参 考 文 献

- [1] Shanta Dhar, Munirathinam Nethaji, Akhil R Chakravarty. *Inorganic Chim. Acta*, 2005, 358: 2437.
- [2] JI Liang nian, ZHANG Qiarr ling, CHAO Hui(计亮年, 张黔玲, 巢 晖). *Chinese Science Bulletin(科学通报)*, 2001, 46: 451.
- [3] WANG Zhong ming, JI Liang-nian(汪中明, 计亮年). *Progress in Chemistry(化学进展)*, 2002, 14: 296.
- [4] YANG Pin, SONG Yur fei(杨 频, 宋宇飞). *Progress in Chemistry(化学进展)*, 2000, 12: 32.
- [5] SONG Yur fei, YANG Pin(宋宇飞, 杨 频). *Progress in Chemistry(化学进展)*, 2001, 13: 368.
- [6] Kumar C V, Asuncion E H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115: 8547.
- [7] Franklin S J, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, 5: 201.
- [8] SONG Yur min, YANG Pei ju, WANG Liu fang, et al(宋玉民, 杨培菊, 王流芳, 等). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2003, 61: 1266.
- [9] Sydaey Archer, Abdel Hadizayed, Rabindra Rej, et al. *J. Med. Chem.*, 1983, 26: 1240.
- [10] TANG Hu an, WANG Liu fang(唐慧安, 王流芳). *Journal of Lanzhou University(Natural Science)(兰州大学学报·自然科学版)*, 2001, 37: 143.
- [11] SONG Yur min, LU Xiao lin, TANG Lu an, et al(宋玉民, 芦小林, 唐慧安, 等). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2006, 64: 1451.
- [12] DU Jiang yan, HUANG Xiao-hua, XU Fei, et al(杜江燕, 黄晓华, 徐 飞, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 25(9): 1435.
- [13] ZHANG Fang, ZHANG Qiarr qian, ZHU Cher jian, et al(张 芳, 张前前, 祝陈坚, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 25(9): 1439.
- [14] Pasternack P F, Gibbs FJ, Villatrnaca J. *Biochem.*, 1983, 22: 2406.
- [15] Rehmann JP, Barton J K. *Biochemistry*, 1990, 29: 1701.
- [16] JIN Lan, YANG Pin(靳 兰, 杨 频). *Chemical Research in Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 1996, 17: 1345.
- [17] LU Ji xin, ZHANG Gu zhu, HUANG Zhi na, et al(卢继新, 张贵珠, 黄志娜, 等). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2002, 60: 967.
- [18] LIU Yong ming, LI Gu zhi, JING Ji rong(刘永明, 李桂芝, 荆济荣). *Chin. J. Anal. Chem.(分析化学)*, 2002, 30(11): 1341.

Study on the Interactions of Eu(III) Complex of O-(Thioxanthone [2]-yl)-Oxyacetic Acid with DNA

YANG Wu, GAO Qi kuan, LU Xiao lin, WU Jir xiu

College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

Abstract The interaction of the Eu(III) complex of O-(thioxanthone [2]-yl)-oxyacetic acid and calf thymus DNA was studied using fluorimetric, UV-Vis and CD(circular dichroism) methods. It was found that the ultraviolet absorption intensity of Eu(III) complex of O-(thioxanthone [2]-yl)-oxyacetic acid decreased as the concentration of DNA increased under the physiological condition of pH 7.10, and the compound remarkably influenced the negative peak in CD spectra of DNA when Eu(III) complex of O-(thioxanthone [2]-yl)-oxyacetic acid interacted with DNA. The emission intensity of the Eu(III) complex evidently increased in the presence of DNA. The emission intensity of the DNA-EB system decreased as the concentration of the complex increased. And the presence of EB also led to the decrease in the emission intensity of the DNA-complex system. These changes observed here are often characteristic of intercalation. The above results strongly suggest that the complex can bind to DNA mainly by intercalation.

Keywords Eu(III) complex of O-(thioxanthone [2]-yl)-oxyacetic acid; Calf thymus DNA; Ethidium bromide

(Received Sep. 8, 2006; accepted Dec. 18, 2006)