

氨基葡萄糖席夫碱金属配合物与 DNA 的作用

黄永华 沈昊宇^{#*} 龙 姝

(湖南轻工业高等专科学校基础部 长沙 410015 [#]复旦大学化学系 上海 200433)

摘 要 报道了 3 种甲基取代水杨醛 D-2-氨基-2-脱氧葡萄糖席夫碱及其 21 种金属配合物与 DNA 相互作用的荧光光谱和紫外吸收光谱。通过研究化合物-溴化乙啶-DNA 体系的荧光光谱, 从中筛选出 5 种与 DNA 有较强相互作用的配合物。进一步研究这 5 种配合物与 DNA 作用的紫外吸收光谱, 得到配合物与 DNA 作用的 Scatchard 曲线, 推导出这 5 种配合物与 DNA 作用结合常数分别为 16.25×10^4 , 7.75×10^4 , 12.5×10^4 , 8.75×10^4 , $8.86 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

关键词 DNA 氨基葡萄糖席夫碱金属配合物 荧光光谱 紫外吸收光谱 Scatchard 曲线

Fluorescence and UV-Vis Absorption Spectroscopic Studies on the Interaction between DNA and Schiff-base Complexes Derived from Methyl-substituted Salicylal D-Glucosamine

Huang Yonghua, Shen Haoyu[#], Long Shu

(Department of Core Curriculum, Hunan Light Industry College, Changsha, Hunan, 410015)

([#]Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai, 200433)

Abstract The interactions between DNA and three Schiff base ligands derived from methyl-substituted salicylal D-glucosamine (3-MSG, 4-MSG, 5-MSG) and their 21 metal complexes ML(ML, M = Cu(II), Zn(II), Fe(II), Fe(III), Co(II), Co(III), Ni(II); L = 3-MSG, 4-MSG, 5-MSG) have been investigated by fluorescence and UV-Vis absorption spectrophotometry. The fluorescence spectrophotometry studies show that 5 of the 21 complexes combined with DNA strongly. The Scatchard plots of the 5 complex-DNA systems have been further studied by UV-Vis absorption spectrophotometry. The combining constants of the interaction between DNA and the 5 complexes are 16.25×10^4 , 7.75×10^4 , 12.5×10^4 , 8.75×10^4 , $8.86 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ for Cu(3-MSG), Cu(4-MSG), Cu(5-MSG), Co(3-MSG) and Co(5-MSG) respectively.

Key words DNA, Deoxyglucosamine Schiff-base complexes, Fluorescence spectrometry, UV-vis absorption spectrometry, Scatchard plot

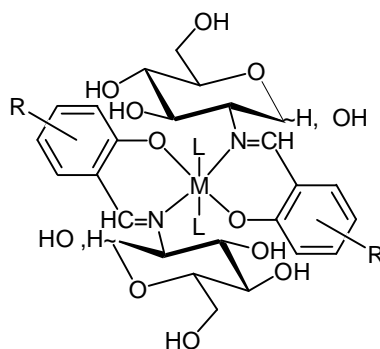
研究糖衍生物与金属离子螯合的能力, 在发展新型金属亲合色层材料、手性均相催化剂、临床用金属螯合剂和生物螯合模型方面有重要意义^[1~3]。自从 1969 年 Rosenberg 发现铂氨配合物有抗癌活性以来, 人们一直在寻求氨的替代物以减小其毒性。与正常细胞相比, 癌细胞的细胞膜上糖缀体的结构存在深刻的变化。这种分子突变, 最终出现的表面新抗原, 可能是肿瘤诱发和转移扩散的一种因子。因而近年来有关氨基葡萄糖过渡金属配合物的合成、性能、应用的研究十分活跃, 这类配合物大都有一定的生理、生化功能^[1~3]。在药物筛选方面, 光谱法因其快

黄永华 男, 31 岁, 讲师, 从事生物无机研究。 *联系人

2001-09-30 收稿, 2001-12-25 修回

速简便发挥着重要作用。

双链 DNA 分子含有芳香性碱基和磷酸根, 其紫外光谱在 260 nm 附近有一强的吸收峰^[4]。DNA 的碱基是很多药物与 DNA 结合的位点。结合药物后, DNA 的上述特征吸收峰会发生位移。溴化乙啶(EthBr)是一种能与双链 DNA 发生特殊作用的荧光试剂。它能插入 DNA 的碱基之间与 DNA 发生专一作用, 因此其本身的荧光强度被大大增强, 达到 100 倍, 成为测定 DNA 及其各种性质的灵敏试剂^[5~8]。如果化合物与 DNA 有作用, 则会竞争溴化乙啶与 DNA 的结合, 使相对荧光强度值降低。跟踪体系的荧光变化, 则可以判断化合物是否与 DNA 发生作用。本文报道了 3-甲基水杨醛(3-MS)、4-甲基水杨醛(4-MS)和 5-甲基水杨醛(5-MS)与 D-2-氨基-2-脱氧葡萄糖(Glu)形成的席夫碱配体(3-MSG、4-MSG、5-MSG)及其铜(II)、锌(II)、铁(II)、铁(III)、钴(II)、钴(III)和镍(II)的金属配合物 ML(M = Cu(II), Zn(II), Fe(II), Fe(III), Co(II), Co(III), Ni(II); L = 3-MSG, 4-MSG, 5-MSG), 与 DNA 相互作用的荧光光谱和紫外吸收光谱, 从中筛选出 5 种与 DNA 相互作用较强的配合物。配合物的结构式如图 1 所示。



R = 3-Me, 4-Me, 5-Me; M = Cu(II), Zn(II), Ni(II), L = none; M = Fe(II), Co(II), L = H₂O

图 1 配合物的结构式

Fig.1 Proposed structures of the Complexes

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

岛津 RF-540 型荧光分光光度计; 岛津 265 型 UV/Vis 光谱仪; 鱼精 DNA 含 P 6%~8%, N 11%~13% (生化试剂); 溴化乙啶 (Fluka 公司进口), 三 (羟甲基) 氨基甲烷(Tris), 生化试剂。

1.2 荧光光谱

在 10 mL 容量瓶中, 依次加入 4.00×10^{-4} mol/L 溴化乙啶、 1.00×10^{-5} mol/L 鱼精 DNA 各 1.00 mL, 加入不同浓度的化合物, 并用 pH = 7.40 内含 0.01 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液稀释定容。以未加化合物的 DNA-EthBr 体系为参比, 激发波长 525nm, 发射波长 590nm, 激发和发射狭缝均为 5 nm, 记录荧光强度, 并利用下列公式计算相对荧光强度:

$$\text{相对荧光强度(RF)}/\% = \frac{\text{样品荧光强度}}{\text{参比荧光强度}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3 吸收光谱

选取荧光实验中配合物与 DNA 物质的量浓度之比在 100 以内, 而相对荧光强度降至 50% 以下的化合物进行吸收光谱研究。

(1) 固定配合物浓度为 0.05mmol/L, 用 0.000~0.024mmol/L DNA 滴定; 以不加 DNA 的金

属配合物为空白, 分别在 500~280nm 范围内扫描, 测定体系的相对吸光度 ΔA 。以各种 DNA 浓度的倒数对 ΔA 的倒数作图, 横坐标上的截距的倒数为 ΔA_{\max} 。

(2) 固定 DNA 的浓度为 0.075mmol/L, 分别用浓度为 0.004~0.032 mmol/L 配合物, 用不加 DNA 的金属配合物浓度作空白, 测定配合物在 328 nm 处的相对吸光度 ΔA 。这样金属配合物与 DNA 的成键浓度 c_b 可以根据式(2)得到^[9]:

$$c_b = \Delta A \cdot c_{\max} / \Delta A_{\max} \quad (2)$$

其中 c_{\max} 为吸光度最大时的配合物浓度

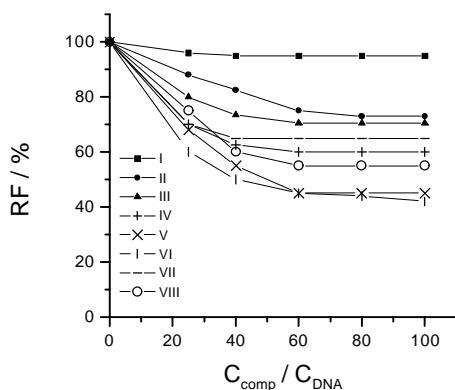
代入 Scatchard 方程(3):

$$r/c = K(n-r) \quad (3)$$

式(3)中 K 表示金属配合物的结合常数, r 是金属配合物的成键浓度(c_b)与总 DNA 浓度之比, c 是游离的金属配合物的浓度, n 是每个核苷酸片段可提供的结合位置数。

2 结果与讨论

一般认为 DNA 是抗癌药物在体内发生作用的主要靶标, 现已证明在体外对 DNA 发生作用的药物在体内对 DNA 也有作用^[10]。如果化合物与 DNA 发生类似溴化乙啶与 DNA 的相互作用, 则化合物会与溴化乙啶竞争 DNA 的结合, 使相对荧光强度值降低。以化合物与 DNA 的物质的量浓度之比为横坐标, 相对荧光强度作纵坐标作图。其中 3-MSG 系列配合物的结果如图 2 所示。从图 2 可以看到, 随着某些化合物浓度的增加, 体系的荧光强度有较大幅度的减弱; 但随着化合物浓度继续增加, 荧光强度减弱的程度基本上停留在 50% 或 50% 以下的某一水平。如果以物质的量浓度比 $c_{\text{comp}}/c_{\text{DNA}}$ 不超过 100 为浓度限制, 就可以用荧光值减弱到 50% 作为一个化合物与 DNA 作用的判据^[11,12]。化合物的荧光实验表明, Cu(3-MSG)、Cu(4-MSG)、Cu(5-MSG)、Co(II)(3-MSG)、和 Co(II)(5-MSG)在上述条件下, 荧光值均减弱到 50% 以下, 说明这 5 种化合物均与 DNA 发生了较强的相互作用。



I – 3-MSG, II – Ni(3-MSG), III – Zn(3-MSG), IV – Fe(II)(3-MSG)

V – Co(II)(3-MSG), VI – Cu(II)(3-MSG), VII – Fe(III)(3-MSG), VIII – Co(III)(3-MSG)

图 2 3-MSG 系列化合物与 DNA 作用的荧光光谱研究结果

Fig.2 The fluorescence spectra resulted from the interaction of complexes with DNA

通过紫外可见分光光度实验得到了这 5 种配合物与 DNA 作用的吸收光谱。其中配合物

Cu(3-MSG)与 DNA 作用的吸收光谱如图 3 所示。配合物在 328 nm 处有较大的吸收峰, 其吸收峰值随着 DNA 浓度的增加而降低; 在 290nm 和 420nm 处有等吸收点存在, 表明了 DNA、DNA 成键金属配合物、游离金属配合物三者之间存在平衡^[5]。利用 r/c 对 r 作图可得 Scatchard 曲线(图 4), 其斜率 K 为金属配合物与 DNA 的结合常数^[6,7], 对于 Cu(3-MSG)、Cu(4-MSG)、Cu(5-MSG)、Co(3-MSG)、和 Co(5-MSG), 其值($10^4 K_M/L \cdot \text{mol}^{-1}$)分别为 16.25、7.75、12.5、8.75、8.86; 每 100 个核苷酸片段可提供的结合位置数(n)分别为 0.218、0.220、0.198、0.212、0.215, 与没有药物存在时 EthBr-DNA 体系 $n = 0.22$ 很接近^[7]; 但其结合方式有待进一步研究。

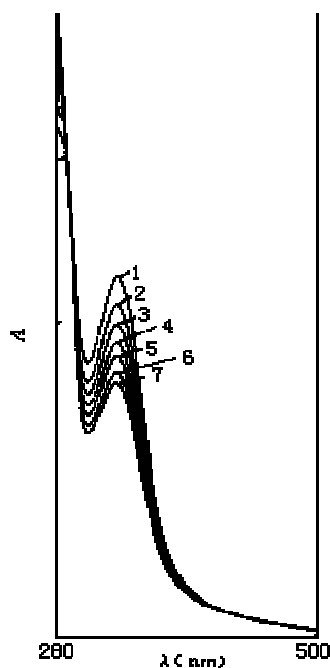


图 3 Cu(3-MSG) (0.05 mmol/L) 与鱼精 DNA (0.000~0.024 mmol/L) (1~7) 作用的吸收光谱

Fig.3 The UV-Vis spectroscopic studies of Cu(3-MSG)(0.05 mmol/L) and DNA(0.000~0.024 mmol/L)

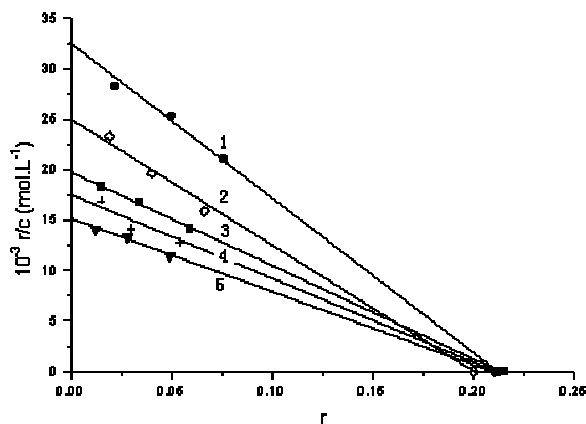


图 4 配合物与 DNA 作用的 Scatchard 曲线

Fig. 4 The Scatchard plots of the complexes-DNA System

1 - Cu(3-MSG), 2 - Cu(5-MSG), 3 - Co(5-MSG), 4 - Co(3-MSG), 5 - Cu(4-MSG)

参考文献

- [1] Michael J A, Lawrance D H. Chem. Comm., 1979:234~235.
- [2] Shen H Y, Liang S Y, Le Z F et al. Synth. React. Inorg. Met-Org. Chem., 1998, 28(6):907~916.
- [3] 沈昊宇, 刘 难, 乐芝凤. 化学通报, 2001, 64:W01028.
- [4] 沈 同 主编. 生物化学. 北京:高等教育出版社, 1980:194.
- [5] Torshizi H M, Srivastava T A, Parekh H K et al. J. Inorg. Biochem. 1992, 45: 135~483.
- [6] Mital R, Ray K S, Srivastava T S et al. J. Inorg. Biochem., 1986, 27:133~140.
- [7] Jain N, Mittal R, Srivastava T S et al. J. Inorg. Biochem., 1994, 53: 79~156.
- [8] Mital R, Jain N, Srivastava T S. Inorg. Chem. Acta, 1989, 166:135~140.
- [9] Gravina A, Pasini A, Pinciroli E et al. Inorg. Chem. Acta, 1989, 157:165~166.
- [10] 齐树民 主编. 药理学进展. 北京:人民卫生出版社, 1985:319.
- [11] Ong W-C. Inorg. Chem. Acta, 1986, 123: 221~224.
- [12] 沈昊宇, 包信涛, 乐芝凤. 应用化学. 2001, 18(3):251~253.