

平衡透析法研究顺铂与多核苷酸的作用

董艳红 邵伟平 唐雯霞 戴安邦

(南京大学配位化学研究所, 南京 210008)

用平衡透析法研究了 37℃, pH=7 (或 5) 离子强度为 0.1 条件下 ($0.01\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 磷酸盐缓冲体系), 顺式二氯二氨合铂 (顺铂) 与多鸟苷酸、多腺苷酸以及多胞苷酸之间的相互作用。用 McGhee 和 von Hippel 法对实验数据进行分析, 求得其结合常数, 反映键合过程中顺铂分子间相互作用的协同参数以及每个顺铂分子所键合的核苷酸残基数, 并讨论了顺铂与多核苷酸的键合方式。

关键词: 顺铂 多核苷酸 键合常数

顺铂是临床上最常用的抗癌药物之一。它的作用机理涉及与癌细胞 DNA 作用, 并阻断癌细胞 DNA 的复制。因此, 顺铂与 DNA 组成物的作用, 包括结合方式, 结合的热力学和动力学性质, 一直是近十多年来生物无机化学的研究热点。一系列研究表明顺铂与 DNA 链的同股相邻二个鸟嘌呤的 N_7 、 N_7 交联是它抑制 DNA 复制的原因^[1,2]。但亦有证据表明, 顺铂在中性条件下能与 DNA 同股相邻二个鸟嘌呤的 N_7 、 N_1 原子交联, 且此种交联形式比 N_7 、 N_7 交联更为有效地阻断 $G \equiv C$ 对间的氢键的形成。因此, N_7 、 N_1 交联可能是顺铂抗癌作用的真正机理^[3,4]。为了进一步了解顺铂与癌细胞 DNA 作用的模式, 本文继以前的工作, 用平衡透析法研究了顺铂与多核苷酸的相互作用, 得到了有意义的新结果。

实验部分

多核苷酸钾盐为 Sigma 公司产品, 分子量大于 100,000。顺铂按文献方法合成^[5]。

20 号透析管为 Union Carbide 公司产品, 可透过分子量小于 30,000 的分子, 而不能透过分子量大于 45,000 的分子。用 5% 的 NaHCO_3 溶液将其煮沸半小时, 再用二次蒸馏水煮沸半小时, 然后浸泡在二次蒸馏水中, 每十二小时换一次水, 共三次, 最后将其取出, 凉干备用。

玻璃器皿洗净后, 置于 120℃ 烘箱中烘四个小时。所有溶液均用二次蒸馏水配制。

缓冲液 A: 含 $0.1\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaClO_4 , pH7.0 的 $0.01\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 磷酸盐缓冲液。

缓冲液 B: 含 $0.2\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaClO_4 , pH7.0 的 $0.02\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 磷酸盐缓冲液。

缓冲液 C: pH5.0, 其他条件同 A。

缓冲液 D: pH5.0, 其他条件同 B。

1mol 顺铂与 2mol AgNO_3 水溶液在 37℃ 下避光反应 10h, 滤掉 AgCl 沉淀, 滤液用二次蒸馏水稀释, 使 $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (记作: $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$) 的浓度为 $2 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 加入等体积的缓冲液 B, 得到 pH7.0 的 $1 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 备用液。

用缓冲液 D 配制得到 pH5.0 的 $1 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 备用液。各备用液使用前均用 0.45μ 微孔滤膜过滤。

本文于 1990 年 6 月 4 日收到。

用 0.45μ 微孔滤膜过滤的缓冲液 A 和 C 分别制得 pH7.0 和 pH5.0 的浓度为 $1.00 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 的 poly N (多核苷酸) 溶液 (poly N 的浓度以每 dm^3 体积中核苷酸残基的摩尔数表示)。

取 5ml poly N 溶液于透析管内对 50ml $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 溶液透析。在所有情况下, poly N 的浓度为 $1.00 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 。改变 $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 的浓度, 使初始 $[c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2] / [\text{poly N}]$ 的值在 0.03~1.0 范围内。避光, 37℃ 透析, 用岛津 UV-240 型紫外可见分光光度计监测反应已达平衡。反应平衡后, 用日立 180-8 型原子吸收分光光度计采用无火焰法测定透析管内外 Pt 的浓度。

数据用 McGhee 和 von Hippel 方法处理。其简单原理为: 将金属离子或其他分子 (金属配合物、蛋白等) 与生物大分子的作用看作配基与格子间的相互作用^[6]。考虑到配基与格子中一个以上重复单元结合的可能性, 根据条件概率推导出描述任何大小配基 (金属离子等) 与均匀格子 (如 poly N 等) 存在协同作用的方程式(1):

$$\frac{v}{L} = K(1 - nv) \left[\frac{(2\omega - 1)((1 - nv) + v - R)}{2(\omega - 1)(1 - nv)} \right]^{n-1} \cdot \left\{ \frac{1 - (n+1)v + R}{2(1 - nv)} \right\}^2 \quad (1)$$

其中 $R = \sqrt{[1 - (n+1)v]^2 + 4\omega v(1 - nv)}$

和非协同结合的方程式[2]:

$$\frac{v}{L} = K(1 - nv) \left[\frac{1 - nv}{1 - (n-1)v} \right]^{n-1} \quad (2)$$

式中 K 为结合常数, L 为游离配基浓度, v 为键合密度 (即每摩尔格子残基所结合配基的摩尔数)、 n 为配基键合部位的大小 (即每个配基所结合的格子残基数)、 ω 为反映键合过程中配基间相互作用的协同参数, $\omega > 1$ 表示存在正协同作用, $\omega < 1$ 表示存在负协同作用, $\omega = 1$ 表示无协同作用, 此时式(1)退化为式(2)。

因此, 只有用实验测出 L 、 v , 即可用最小二乘法将这些数据对式(1)或(2)进行拟合, 求出结合常数 K , 配合键合部位的大小 n 以及确定是否有协同作用存在。

结 果 和 讨 论

$c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 与 poly N 反应体系符合 McGhee 和 von Hippel 模型。因此, 我们用式(1)或(2)处理所得的实验数据。

在 pH5.0 条件下, $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 与 poly G 反应, 当 $[c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2] / [\text{poly G}] > 0.5$ 时, poly G 沉淀。而在 $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-poly G}$ (pH7), $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-poly A}$ (pH7) 以及 $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-poly C}$ (pH7) 体系中无此现象发生。

将 pH=7 条件下的实验数据 L 、 v 对式(1)或(2)进行拟合, 得到键合参数 K 、 n 和 ω 。结果列于表 1。拟合曲线见图 1^{a,b,c} (图中实线为理论值)。由图可见理论值与实验值吻合较好。

从顺铂与核苷酸相互作用的大量研究中已知, 在 pH < 5.5 情况下 Pt 只与鸟苷或鸟苷酸中的 N_7 原子结合, 生成 Pt: 核苷 = 1: 2 的配合物^[2,7,8] 而在 pH7 时, Pt 不仅能与鸟苷 (或鸟苷酸) 中的 N_7 配位, 也能与 N_1 配位, 形成 Pt: 核苷 = 1: 1 的配合物^[8-10]。从表 1 中我们看到,

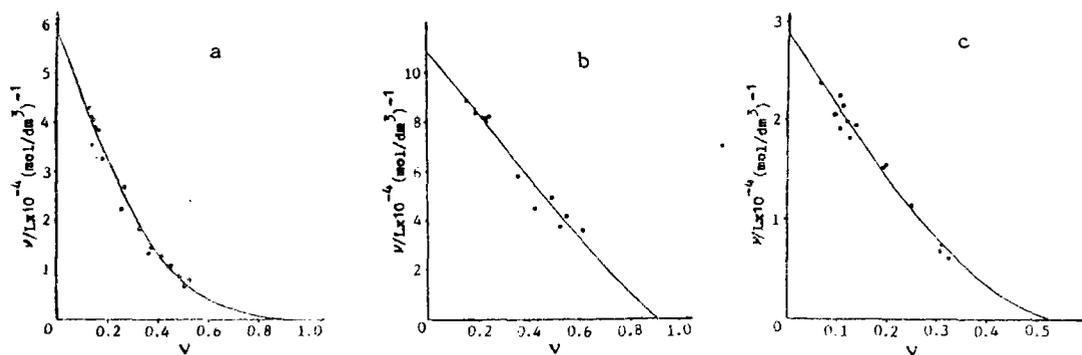


图1 $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-poly N}$ 的 $\frac{v}{L} \sim v$ 图

Fig.1 Variation of $\frac{v}{L}$ with v of $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-poly N}$

A. $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-poly G}(\text{pH}7.0)$

B. $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-poly A}(\text{pH}7.0)$

C. $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-poly C}(\text{pH}7.0)$

pH7 条件下, $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 与 poly G 作用, 每个 Pt 与一个鸟苷酸残基结合 ($n \approx 1$)。由于 $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 为双齿配基, 在游离核苷酸大量存在的情况下, 单功能配合物 $(\text{NH}_3)_2\text{Pt} \leftarrow \begin{matrix} \text{GMP} \\ \text{H}_2\text{O} \end{matrix}$ 是不稳定的, 它将很快通过另一个齿与另一个 GMP 结合, 形成稳定的饱和的配合物^[11,12]。因此推论, $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-poly G}(\text{pH}7)$ 体系中, $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 与 poly G 中的鸟苷酸残基生成单功能配合物是不可能的。 $n=1$ 说明一个鸟苷酸残基上应该有二个位点与双齿 Pt 配合物结合, 使得一个 $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 配基覆盖一个格子残基 (因为所取的格子残基为一个核苷酸残基), 即 $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 通过与鸟苷酸残基上的 N_7 、 N_1 配位与 poly G 结合。这一结果为我们以前提出的顺铂与 DNA 同一链上相邻两个鸟苷的 N_7 、 N_1 配位形成链内交联的抗癌机制提供了进一步的证据。从表 1 我们也看到, pH7 条件下, $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 与 poly A 相互作用时, 铂与腺苷酸残基的结合比为 1:1 ($n \approx 1$)。因为 pH = 2~9 范围内, 铂总是既与腺苷的 N_7 又与 N_1 配位^[13,14]。由此可知, $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 是通过与 poly A 中相邻的两个腺苷酸残基的 N_7 、 N_1 原子与 poly A 结合。对于 $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-poly C}(\text{pH}7)$ 体系, 每个铂与二个胞苷酸残基结合 ($n \approx 2$)。由于铂配合物与胞苷或胞苷酸相互作用时, 总是生成与胞苷 N_3 配位的配合物^[15,16], 即胞苷中只存在一个可与铂配位的位点- N_3 。因此, $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-poly C}(\text{pH}7)$ 体系中, $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 是通过与 poly C 中相邻的两个胞苷酸残基的 N_3 、 N_3 原子与 poly C 结合的。

表 1 $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 与 poly N 的键合参数

Table 1 Binding Constants of Cisplatin to Polyribonucleotides

	poly N	pH	lgK	n	ω	F^*
$c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$	G	7	4.8	1.1	0.31	0.0055
	A	7	5.0	1.1	1	0.0050
	C	7	4.5	1.9	1	0.003

$$F^* = \frac{\Sigma(Y_{ex} - Y_{cal})^2}{\Sigma Y_{ex}^2} \quad Y = \frac{v}{L}$$

与 Scovell 等的研究结果—顺铂与 poly G、poly A、poly C 均是每个核苷酸残基上结合一个顺铂分子($n=1$)—相比, 本文的结果更合理。许多研究均已证实顺铂与胞苷、胞苷酸作用生成铂: 胞苷 = 1:2 的配合物。Scovell 实验的偏差可能来自于用比色法进行微量 Pt 分析所引进的误差^[17]。

由表 1 看出, pH7.0 时顺铂与 poly A、poly C 作用体系中无协同效应存在, 而与 poly G 作用时体系中存在负协同效应。这与 Scovell 等的结果是一致的^[17]。

表 1 结果还显示, $c\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ 与 poly G、poly A 及 poly C 的结合常数相差不大。由此我们想到顺铂优先进攻 DNA 中的鸟苷大概并非是热力学的原因, 可能主要为动力学上的原因。

参 考 文 献

- (1) Goodgame, D. M. L., Jeeves, I. Phillips, F. I., Skapski, A.C., *Biochim. Biophys. Acta*, **378**, 153 (1975).
- (2) Marzilli, L.G., Ghalilpoyil, P., Chiang, C. C. Kistenmacher, T. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2480 (1980).
- (3) 唐雯霞、董袍红、曲筠、戴安邦, 科学通报, **30**, 1793 (1985)。
- (4) Goswami, N., Bennett-Slavin, L., Bose, R. N., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **7**, 432 (1989).
- (5) Dhara, S. C., *Indian J. Chem.*, **8**, 193 (1970).
- (6) McGhee, J. D., von Hippel, P. H., *J. Mol. Biol.*, **86** 469 (1974).
- (7) Raudaschl-Seiber, G., Schollhorn, H., Thewait, U., Lippert, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3591 (1985).
- (8) Tang, W. X. et al., *Chem. J. Chin. Univ. (English Edition)*, **1**, 1 (1984).
- (9) 曲筠、唐雯霞、戴安邦, 高等学校化学学报, **7**, 287 (1986)。
- (10) van der Veer, J. L., van den Elst, H., Reedijk, J., *Inorg. Chem.*, **26**, 1535 (1987).
- (11) Johnson, N. P., Mazard, A. M., Escalier, J., Macquet, J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 6376 (1985).
- (12) Eastman, A., *Biochemistry*, **22**, 3927 (1983).
- (13) Inagake, K., Kuwayama, M., Kidani, Y., *J. Inorg. Biochem.*, **16**, 59 (1982).
- (14) Cloro, G. M., Gronenborn, A. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 1369 (1982).
- (15) Wu, S. M. Bau, R., *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **88**, 1435 (1979).
- (16) Reedijk, J., Fichtinger-Schepman, A. M., von Oosterom, A. T. van de Putte, P., *Struct. Bonding*, **67**, 53 (1987).
- [17] Scovell, W. M., O'conner, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 120 (1977).

**STUDY OF INTERACTION OF CISPLATIN
WITH HOMOPOLYNUCLEOTIDES BY EQUILIBRIUM
DIALYSIS METHOD**

Dong Yanhong Shao Weiping Tang Wenxia Dai Anbar.g

(Coordination Chemistry Institute, Nanjing University, Nanjing 210003)

The binding of cisplatin to polyriboguanilyc acid, polyriboadenylic acid, and polyribocytidylic acid has been studied by equilibrium dialysis at pH7 (or pH5), 37 °C, and an ionic strength of 0.1 (0.01 mol · dm⁻³ phosphate buffer). Using the treatment of McGhee and von Hippel, we obtain the magnitude of the intrinsic binding constant, the degree of cooperativity exhibited in the binding process, and the number of nucleotide residue bound with each cisplatin. The binding form of cisplatin with homopolynucleotides is discussed.

Keywords: cisplatin polyribonucleotide binding constant