

大环铜(Ⅱ)配合物与DNA结合的ESR及自旋捕获测定

刘长林 周井炎 徐辉碧*

(华中理工大学化学系, 武汉 430074)

与DNA结合前后的大环铜(Ⅱ)配合物(CuL^{2+} , 如图1所示)ESR谱表明 CuL^{2+} 与DNA碱基有配位作用。以DMPO为自旋捕获剂进行的自旋捕获实验则证实了活性氧中间产物·OH的存在, 在 CuL^{2+} 的引导下导致DNA氧化损伤。

关键词:

大环铜(Ⅱ)配合物

DNA

ESR

自旋捕获

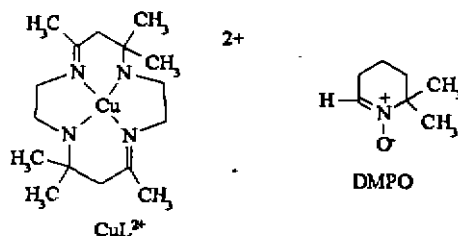
自从发现 $\text{Fe}(\text{EDTA})^{2-}$ 由氧化还原反应产生活性氧物种导致DNA断裂以来^[1], 设计和合成能与DNA有效结合, 特异断裂DNA的过渡金属配合物及其载体衍生物在化学、生物化学及癌症的化疗中引起了高度重视^[2]。Sigman等表明 $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ 及其肽或蛋白质衍生物的核酸酶活性甚至优于天然核酸酶^[3], 此外, 水溶性金属阳离子卟啉^[4]、大环镍^[5]等配合物由插入或表面结合, 导致DNA的某一特异部位断裂。过渡金属配合物作为化学核酸酶^[3], 降解DNA的共同特点是存在一种或多种可能与过渡金属配合物有结合的活性氧中间产物^[6,7]。

关于用ESR方法分析与DNA结合前后配合物配位状态变化, 用自旋捕获技术检测氧化还原性过渡金属配合物导致的能氧化降解DNA的活性氧中间产物的工作, 还较少见报道。

1 材料和方法

除了采用超声波方法溶解断裂DNA外, 其他样品的提纯制备及浓度测定方法与文献^[8]相同。还原剂NADH(还原型辅酶Ⅰ)、GSH(还原型谷胱甘肽)、抗坏血酸钠及DMPO(如图1所示)均来源于Sigma公司, 未经提纯直接使用。

样品溶液的ESR谱在JES-FE3XG型(日本JEOL)电子自旋共振波谱仪上测定, X波段, 微波功率4—16 mW, 场调制100 kHz, 调制幅度0.1 G, 扫描范围3100±1000 G, 由MgO中的Mn(Ⅱ)分裂计算磁场, 测定温度77 K。自由基自旋捕获实验则在37℃下进行, 自旋捕获剂DMPO的浓度是0.012 mol/L, 用缓冲溶液Tris-HCl($[\text{Na}^+] = 0.05 \text{ mol/L}$, pH 8.0)配制。

图1 CuL^{2+} 和 DMPO 的分子结构Fig. 1 Molecular structures of CuL^{2+} and DMPO

收稿日期:1997-04-14, 收修改稿日期:1998-01-20.

国家自然科学基金资助项目.

* 通讯联系人.

第一作者:刘长林,男,35岁,副教授.研究方向:核酸-过渡金属配合物化学.

2 结果与讨论

2.1 与 DNA 结合前后,大环铜(Ⅱ)配合物的 ESR 谱

图 2 为大环铜(Ⅱ)配合物与 DNA 结合前后的 ESR 谱。 Cu^{2+} 的未成对电子与 4 个配位等价氮原子核发生超精细偶合作用, $g_{\perp}=2.053$, $g_{\parallel}=2.331$; $A=148.4\text{G}$, $A_{\perp\text{N}}=15.1\text{G}$ 。 CuL^{2+} 与 DNA 在 37°C 长时间恒温及超声波促进的条件下充分反应后, Cu^{2+} 的 ESR 谱有了明显的变化, 由原来的 9 重线变成了 11 重线(由于分辨及重叠等原因, 有时为 10 条线), $g_{\perp}=2.056$, $g_{\parallel}=2.295$; $A_{\parallel}=149.1\text{G}$, $A_{\perp\text{N}}=14.4\text{G}$ 。这意味着 $\text{Cu}(\text{Ⅱ})$ 的未成对电子与第 5 个氮原子核发生了超精细偶合作用, 即与 DNA 中碱基氮原子有了配位作用。

在 DNA-CuL^{2+} 的混合溶液或 CuL^{2+} 中分别加入一定量的还原剂, 如 NADH 、 GSH 或抗坏血酸钠经充分反应后, 则只能观察到极弱的 ESR 讯号, 有时甚至观察不到任何 ESR 谱线, 如图 3 所示, 表明 $\text{Cu}(\text{Ⅱ})$ 大多转变成了 $\text{Cu}(\text{Ⅰ})$ 。在这两个反应体系中, 再分别加入 H_2O_2 , 经恒温充分反应后, 前一个体系的 ESR 谱出现了较为清晰的 11 重氮分裂谱线 $g_{\perp}=2.05$, $g_{\parallel}=2.232$; $A_{\parallel}=150.2\text{G}$, $A_{\perp\text{N}}=14.2\text{G}$; 而后一个体系则与 CuL^{2+} 有完全相同的 ESR 谱图。这表明 DNA-CuL^{2+} 体系中, $\text{Cu}(\text{Ⅰ}) \rightarrow \text{Cu}(\text{Ⅱ})$, 配位环境可能为 5 配位四方锥。

$\text{Cu}(\text{Ⅰ})$ 一般采取 5 配位或 6 配位, 但由于 Jahn-Teller 效应, 轴向配位发生畸变, 呈拉长的四方锥或八面体构型。此外 I^- 的配位能力很弱, 因此 $\text{CuL}^{2+} \cdot 2\text{I}^-$ 看起来是平面四方结构, 实际上是 5 或 6 配位。 $\text{CuL}^{2+} \cdot 2\text{I}^-$ 和 DNA 作用, 与 $\text{Cu}(\text{Ⅱ})$ 有更强配位能力的 DNA 碱基取代 I^- , 而与 $\text{Cu}(\text{Ⅱ})$ 配位, 从而产生了上述 ESR 结果。

在 DNA 中最容易与 $\text{Cu}(\text{Ⅱ})$ 键合的位置是鸟苷酸的 N_7 原子^[9], 这个识别位置与大环镍(Ⅱ)等配合物^[5]相同。关于 $\text{Cu}(\text{Ⅱ})$ 配合物与 DNA 的结合模式与其结构有关, 如四面体 $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ 以沟结合为主^[3], 而 X-射线单晶衍射表明铜(Ⅱ)卟啉 $\text{Cu}(\text{TMpyP4})$ (TMpyP4, 中位

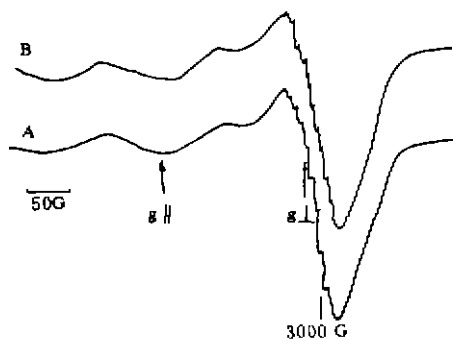


图 2 A, CuL^{2+} 和 B, DNA-CuL^{2+} 的 ESR 谱

Fig. 2 ESR spectra for the CuL^{2+} (A) and its assembly with DNA (B); Reaction conditions: $[\text{CuL}^{2+}] \sim 10^{-4} \text{ mol/L}$, $[\text{DNA}] = 4.2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, incubation for 8 hours at 37°C , DNA cleavage and its interaction with CuL^{2+} were promoted by ultrasonic wave in the former 2 hours.



图 3 CuL^{2+} 的 ESR 谱。A, +DNA+抗坏血酸钠; B, +DNA+抗坏血酸钠+ H_2O_2 ; C, +抗坏血酸钠+ H_2O_2

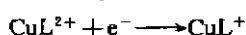
Fig. 3 ESR spectra of CuL^{2+} at the presence of DNA and sodium ascorbate (A); DNA, sodium ascorbate, and H_2O_2 (B); and sodium ascorbate and H_2O_2 (C), respectively. Reaction conditions: $[\text{CuL}^{2+}] \sim 10^{-4} \text{ mol/L}$, $[\text{DNA}] = 4.2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $[\text{sodium ascorbate}] \sim 2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] \sim 2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, incubation for 8 hours at 37°C

四-N-甲基-4-吡啶卟啉)则是插入DNA碱基对之间的^[10]。从CuL²⁺对DNA中乙锭离子荧光的有效猝灭过程来看,CuL²⁺是良好的电子受体,猝灭机理之一是电子转移,这就要求CuL²⁺与DNA结合方式是插入,但CuL²⁺与DNA碱基氮原子间的配位作用则妨碍其插入到碱基对之间,因此,与DNA可能还存在沟结合方式。这样看来,CuL²⁺与DNA可能采取两种方式:沟结合和插入,与DNA发生相互作用。

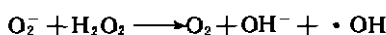
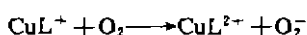
2.2 自旋捕获实验

在反应体系DNA-CuL²⁺-抗坏血酸钠,NADH或GSH及CuL²⁺-抗坏血酸钠中加入H₂O₂,并立即加入自旋捕获剂DMPO,起初几乎看不出任何自由基的讯号,随着反应时间的延长,慢慢出现了如图4所示的ESR谱线。显然这是DMPO与羟自由基所形成加合物自由基的ESR谱, $g=2.0063$, $A_N=A_B^H=15.0G$ ^[7]。由此说明羟自由基作为中间产物确实存在,而且是Cu(Ⅰ)配合物导致产生的,DNA的损伤则可能是与DNA松散结合的·OH直接进攻所至。

过渡金属配合物可通过多种反应途径来产生羟自由基,其中两种最为有效的途径是Fenton反应及Haber-Weiss机制。在前一种反应中,金属离子作为催化剂,促进从过氧化氢产生·OH的反应。



而Haber-Weiss机制则涉及超氧阴离子与H₂O₂反应,产生O₂,OH⁻及·OH:



Detmer Ⅱ等用2-脱氧核糖及罗丹明B降解实验也证实四方锥型(2S,8R)5-氨基-2,8-二苯-5-甲基-3,7-二氮杂壬二酸合铜(Ⅰ)在非随机断裂DNA时,加入还原剂形成Cu(Ⅰ),再加入H₂O₂产生·OH^[6]。Sigman等指出,Cu³⁺=O₂⁻是导致DNA断裂的关键中间活性氧物种^[3]。但现在还无法区分由Cu³⁺=O₂⁻及·OH降解DNA的产物,而且O₂⁻不能直接损伤DNA,必须通过产生·OH来达到间接损伤DNA。

将H₂O₂加到DNA-CuL²⁺-抗坏血酸,NADH或GSH体系中,以DMPO为自旋捕获剂直接证实了活性氧中间产物·OH存在,说明CuL²⁺引导羟自由基进攻DNA,导致其氧化损伤。最后反应产物中存在5配位四方锥铜(Ⅰ)配合物也可以证明这一点。羟自由基有选择性地氧化断裂DNA是因为过渡金属配合物在DNA中的识别位置有选择性。不少学者指出,·OH等活性氧物种在进攻DNA前,可能由一松弛的化学键与过渡金属配合物结合在一起^[3,5],这一部分·OH不一定能被DMPO捕获并检测。在不加DNA而其他反应条件完全相同时进行的自旋捕获实验显示·OH浓度要大于DNA存在的反应体系(如图4所示)。这表明DNA-CuL²⁺-抗坏血



图4 自旋捕获剂DMPO捕获羟自由基后形成的加合物DMPO·OH的ESR谱,A.+DNA+抗坏血酸钠+H₂O₂,B.+抗坏血酸钠+H₂O₂

Fig. 4 ESR spectra of the adduct DMPO·OH in the presence (A) and absence (B) of DNA, respectively, reaction conditions: [CuL²⁺]~10⁻⁴ mol/L, [DNA]=4.2×10⁻⁴ mol/L, [sodium ascorbate]~1.2×10⁻⁴ mol/L, [H₂O₂]~1.2×10⁻⁴ mol/L

酸-H₂O₂ 体系中有相当一部分 ·OH 处于 DNA 内部,非常靠近它们要进攻的 DNA 部位。事实上本体溶液中的 ·OH 是不能导致 DNA 氧化降解的,因为羟自由基在本实验温度下的寿命极短,一经产生,甚至还没有来得及扩散,已被猝灭^[7]。

从以上结果可以看出,大环铜(Ⅱ)配合物确实与 DNA 上的某一碱基有配位作用,活性氧 ·OH 可能是氧化降解 DNA 的关键中间产物,这为自旋捕获实验所证实。

致谢:本工作的 ESR 实验是日本早稻田大学理工学部分析测试中心进行的,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Tullius, T. D. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Biochem.*, 1989, 1, 213.
- [2] 刘长林、徐辉碧、周井炎,化学通报,1995, 8, 26.
- [3] Sigman, D. S.; Bruice, T. W.; Mazumaer, A. et al *Acc. Chem. Res.*, 1993, 26, 98.
- [4] Pratviel, G.; Bermadou, J.; Meunier, B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34, 746.
- [5] Burrows, C. J.; Rokita, S. E. *Acc. Chem. Res.*, 1994, 27, 295.
- [6] Detmer, C. A.; Pamatong, F. V.; Bocarsly, J. R. *Inorg. Chem.*, 1996, 35, 6292.
- [7] Tan, J. D.; Hudson, S. E.; Brown, S. J. et al *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 3841.
- [8] Liu, C.; Zou, J.; Xu, H. *SPIE Vol. 1640, Time-Resolve Laser Spectroscopy in Biochemistry II*, 1992, 606.
- [9] Martin, R. B. *Acc. Chem. Res.*, 1985, 18, 32.
- [10] Lipscomb, L. A.; Zhou, F. X.; Presnell, S. R. et al *Biochemistry*, 1996, 35, 2818.

MACROCYCLIC COPPER (Ⅱ) ASSEMBLY WITH DNA STUDIED BY ELECTRON SPIN RESONANCE AND SPIN TRAPPING

Liu Changlin Zhou Jingyan Xu Huibi

(Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

The electron spin resonance spectra of macrocyclic copper (Ⅱ) and its assembly with DNA have suggested that the base in the DNA is coordinated to copper (Ⅱ). The presence of active oxygen intermediate ·OH has been indicated by spin trapping experiment by use of DMPO as spin trapping agent. DNA oxidative damage is caused by the active oxygen species by the copper (Ⅱ)-mediation.

Keywords: copper (Ⅱ) macrocycle DNA ESR spin trapping