

过渡金属配合物断裂双链 DNA 及其机理

刘长林 余四旺 徐辉碧* 周井炎

(华中理工大学化学系, 武汉 430074)

本文讨论了过渡金属配合物导致 DNA 双链断裂的各种攫氢反应及碱基氧化机理, 对由水解过程促进 DNA 断裂的过渡金属配合物也作了介绍。

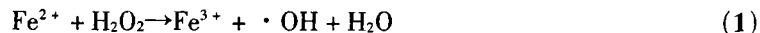
关键词: DNA 过渡金属配合物 攫氢 碱基氧化 水解
分类号: O614 Q523

DNA 损伤如得不到修复, 可能导致突变、致癌、遗传性疾病及细胞衰老死亡, 是相当有害的。对能识别、损伤及断裂 DNA 的过渡金属配合物的研究是近年来生物无机化学的热点之一, 在此基础上发展的所谓合成化学核酸酶是某些疾病的有效化疗试剂及大分子结构探针。合成核酸酶由氧化作用攻击核糖环及碱基, 产生各种氧化产物, 而大多数天然核酸酶以水解机理断裂 DNA, 仅影响磷酸二酯键, 不造成碱基和核糖环损伤。过渡金属配合物断裂 DNA 双链的机理信息不仅在解释配体-DNA 足迹实验结果时非常有用, 而且有助于深入理解 DNA 损伤机制, 并能用于探讨生物大分子的结构。例如链断裂反应已用于表征 DNA 弯曲、三股及四股 DNA 交会点、RNA·RNA 及 RNA·DNA 杂交及大量的蛋白质-DNA 及药物-DNA 复合物。我们曾对过渡金属配合物在 DNA 中的结合方式、特异识别和氧化降解 DNA 进行过评述^[1]。作为对该文的补充, 这里将主要集中讨论 DNA 断裂的氧化及水解机理, 希望能对这方面的研究有所促进。

1 DNA 的氧化断裂

1.1 由 Fenton 氧化剂导致的 DNA 降解

过渡金属与 H_2O_2 反应, 生成羟自由基 $\cdot\text{OH}$ 及有关的氧化剂, 这就是 Fenton 反应。以铁为例:



在 Fe^{2+} -EDTA 或 Fe^{2+} -ADP 等存在下, 由 H_2O_2 生成的氧化剂性质不同于 $\cdot\text{OH}$, 据认为是铁自由基:



或表示为 $[\text{Fe}-\text{H}_2\text{O}_2]^{2+}$ 或 $[\text{FeOOH}]^+$, 它们可能是上述反应的中间产物。铁自由基通过以下反应

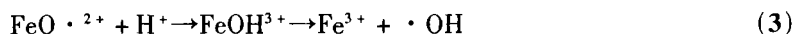
收稿日期: 1999-07-14。收修改稿日期: 1999-10-21。

国家自然科学基金(No. 29871011)及湖北自然科学基金资助项目(No. 987051)。

* 通讯联系人。

第一作者: 刘长林, 男, 36 岁, 副教授; 研究方向: 生物分子-过渡金属配合物化学。

产生 $\cdot\text{OH}$:

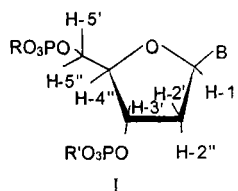


溶液中产生的 Fenton 氧化剂是扩散性的,断裂 B-DNA 时不显示特异性,该特征使 Fenton 氧化剂区别于其他和 DNA 结合的断裂试剂。Fenton 氧化剂断裂 DNA 至少有两类可能的途径:第 I 类对 H_2O_2 及乙醇敏感,优先断裂 RTGR 、 TATTY 、 CTTR (下划线的核苷酸为断裂点)序列;第 II 类优先降解 NGGG 。应注意与 DNA 结合的位置并不一定就是降解点^[2]。

Fenton 氧化剂可能损伤糖环,也可能损伤碱基,从脱氧核糖的碳原子上攫氢引发糖环损伤最终结果是 DNA 链断裂及碱基释放。最近我们对多种结构的铜配合物由 Fenton 氧化途径损伤 DNA 进行了较为详细的研究,发现断裂效率及片断大小与配合物结构有密切关系^[3-6]。

1.2 从核糖攫氢导致 DNA 降解

同位素取代研究表明羟自由基能攫取 B-DNA 脱氧核糖(I)各个碳原子上的氢,但最容易与 4'- 及 5'- 位的氢反应,单个氢的优先反应顺序是 $\text{H-5}' > \text{H-4}' > \text{H-2}' \approx \text{H-3}' > \text{H-1}'$ ^[7],这个反应次序正好与单个氢的溶剂可接近性相联系。



一般不同的反应途径有不同的标志产物^[8],某些配合物导致 DNA 断裂的产物列于表 1 中^[8]。DNA 的断裂途径取决于它的螺旋结构及配合物相对于糖环的取向。小沟结合分子及非选择性自由基多进攻 B-DNA 脱氧核糖的 4'- 及 5'- 位,因为这两个部位最容易从小沟中接近,且紧邻氧原子。大沟结合分子多由 3'- 攫氢降解 DNA,因为这个氢可由大沟靠近。

表 1 DNA 断裂的主要产物

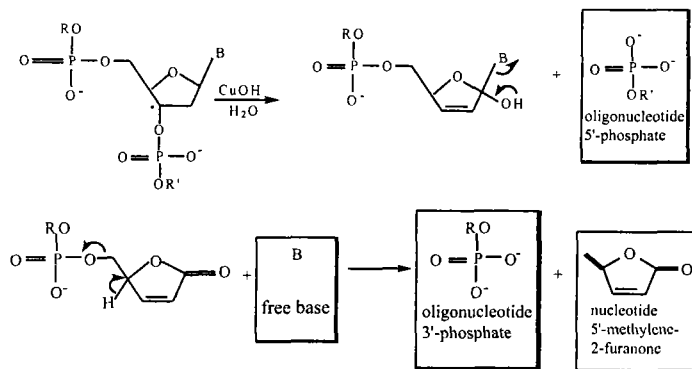
Table 1 Main Products for DNA Cleavage Mediated by Transition Metal Complexes

	$\cdot\text{OH}$	BLM-Fe(II)	$\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$	Ru-complexes	cationic metal porphyrins	H-abstraction site
free base	+	+	+	+	+	
base propenal	+	+	+	-	-	
base propenoic acid	-	-	-	-	+	3'
nucleotide 5'-phosphate	+	+	+	+	+	
nucleotide 5'-aldehyde	+	-	-	-	+	5'
nucleotide 3'-phosphate	+	+	+	+	+	
nucleotide 3'-phosphoglyceraldehyde	-	-	-	+	-	3'
nucleotide 3'-phosphoglycolate	+	+	+	-	-	4'
nucleotide 5-methylene-2-furanone	-	-	+	-	-	1'
furfural	-	-	-	-	+	5'

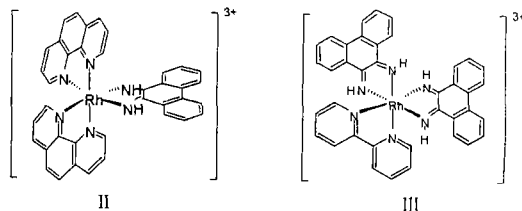
1.2.1 H-1'的攫取

在 B-DNA 中,H-1'被埋在小沟中,溶剂分子不容易接近,理论计算^[9]及氘动力学同位素效应实验^[7]均表明 H-1'被 $\cdot\text{OH}$ 攫氢的可能性很小。因此,H-1'作为反应部位的重要性似乎仅限于小沟结合分子,如 $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$,它序列依赖地结合于 DNA 小沟中,朝向 H-1',并在 H_2O_2 存在下产生氧化剂,降解双链 DNA^[10-11]。导致 DNA 断裂的可能是游离的 $\cdot\text{OH}$,也可能是与铜结合的氧化剂,如 $[\text{CuO}]^+$ 、 $[\text{CuOH}]^{2+}$ 或 $\text{CuO}_2\text{H}^{12]}$ 。 $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ 断裂 DNA 的作用机理如图 1 所示,该反应机理的关键特征为 DNA 链断裂能在室温下进行,不需加热或用碱处理,且糖环没有被打碎,不同于大多数其他断裂机理^[13]。

1.2.2 H-3'的攫取

图 1 $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ 由 1'- 攫氢导致 DNA 断裂的反应机理Fig. 1 Proposed mechanism of DNA cleavage by $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ via 1'-H abstraction

H-3' 位于大沟内, 氘动力学同位素效应测定结果表明 $\cdot\text{OH}$ 等非选择性 Fenton 氧化剂不易从脱氧核糖的 3'-C 上攫氢。大多数氧化剂结合在小沟中, 因此 3'- 攫氢机理很少, 此外, 可能也因为 3'- 脱氧核糖自由基的稳定性低或不大会接近。



以 DNA 插入分子作为配体的光反应性铑配合物 $[\text{Rh}(\text{phen})_2(\text{phi})]^{3+}$ (II)、 $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$ (III) 及 $[\text{Rh}(\text{en})_2(\text{phi})]^{3+}$ ($\text{phi} = 9, 10$ -菲醌二亚胺) 借助于光活化, 通过 3'- 攫氢断裂 DNA^[14, 15]。这些配合物也使 DNA 轻度解链。铑配合物可能借助于光诱导的配体到金属电荷迁移生成阳离子自由基, 在 DNA- 铑配合物中, 它指向 H-3'。化学修饰、HPLC 及凝胶电泳研究表明断裂反应机理如图 2a, b 所示。产物分别是 3'-、5'- 磷酸末端及 3'- 甘油醛磷酸 DNA 片断, 游离碱基及碱基烯丙酸。生成甘油醛及烯丙酸需要氧, 但游离碱基及其它产物的生成则不需要氧。需氧及厌氧途径的分化极好地说明了铑配合物的形状如何限制氧接近断裂部位。厌氧途径涉及的步骤包括自由基的氧化作用和溶剂引起的分解作用产生醇, 该醇经 β - 消去磷酸盐后释放出游离碱基。该机理将生成闭合的糖内酯衍生物。在依赖氧的断裂机理中, 氧与 3'- 自由基反应生成过氧化氢自由基, 经重排后氧原子插入脱氧核糖环中, 生成的中间产物分解成碱基烯丙酸, 5'- 磷酸末端及 3'- 甘油醛磷酸 DNA 片断。属于光断裂试剂还有 BLM-Co (II) (BLM = bleomycin) 及其类似物等^[16]。光诱导断裂的最大优点为: 通过光化学反应, 光可选择性激发光断裂试剂, 有利于限制副反应的数目及分析反应机理。例如结构与卟啉类似的五氮大环钼系配合物与寡核苷酸偶合后, 当被波长高于 620nm 的光照射时, 仅损伤与其互补的核酸靶^[17]。光断裂试剂的选择性取决于它的物理化学性质及 DNA 的局部结构, 如果一个光活化配合物在 DNA 内仅结合一个或几个碱基对, 且反应机理是从脱氧核糖环上直接攫氢, 则它有高度的序列选择性。因此, 设计新型断裂试剂时可通过改变结构来改善断裂的选择性。

1.2.3 H-4' 的攫取

在很多体系中都能观测到攫取 H-4' 断裂双链 DNA, 因为在 B-DNA 中, 这个氢特别容易接近, 许多断裂试剂均与其作用, 如甲铈丙基 -EDTA-Fe (II)^[18]、 $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ ^[18]、BLM-Fe (II)^[19] 等。

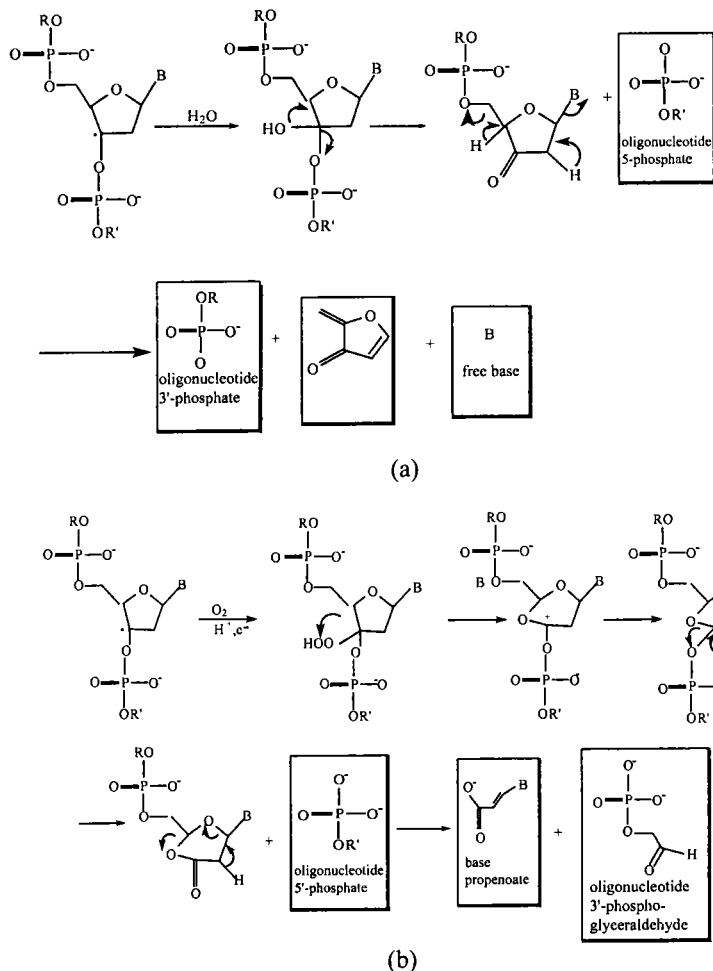


图2 $[\text{Rh}(\phi)_2(\text{bpy})]^{3+}$ 在厌氧(a)及需氧(b)条件下由 3'-攫氢导致 DNA 断裂的反应机理

Fig. 2 Proposed mechanisms of DNA cleavage by $[\text{Rh}(\phi)_2(\text{bpy})]^{3+}$ via 3'-H-abstraction in the absence (a) or in the presence (b) of O_2

抗肿瘤抗菌素 BLM-Fe(II) 结合在 DNA 小沟中, 可由分子氧及两个电子或由 H_2O_2 活化, 活化的 BLM-Fe(II) 中氧化物种的本质目前仍在争论中。电喷雾质谱为氢氧化铁(III)及高价 $\text{Fe(V)} = \text{O} \leftrightarrow \text{Fe(IV)} - \text{O} \cdot$ 的存在提供了证据, 后者能从脱氧核糖攫氢; 也有的学者认为产生了羟自由基, 但实验证据不足^[20]。

从实验上确定攫氢是 DNA 断裂的机理之一是从 BLM-Fe(II) 开始的。Kozarich 及 Stubbe 将氘及氚引入脱氧核糖的特定位置并观测其动力学同位素效应, 表明攫氢是该 DNA 降解反应中的速率决定步骤^[21], 该降解机理如图 3a, b 所示, 降解产物包括游离碱基、碱基丙烯醛 3'-及 5'-磷酸末端片段, 存在两种碱基产物及两种 3'-末端产物表明 4'-脱氧核糖自由基的反应途径出现了分化, 降低体系中氧浓度将抑制碱基丙烯醛及 3'-磷酸股的生成。在少量氧存在下(图 3a), 4'-脱氧核糖自由基被氧化, 生成 4'-羟基物种及游离碱基, 经 β -消去产生 5'-磷酸末端链及 4'-酮-1'-醛末端的 DNA 片段。后一中间产物在碱性条件下不稳定, 如加热或加入吡啶一类的碱会分解成 3'-磷酸末端股。另一条可能的反应途径则是 C-4' 自由基的氧化(也许借助

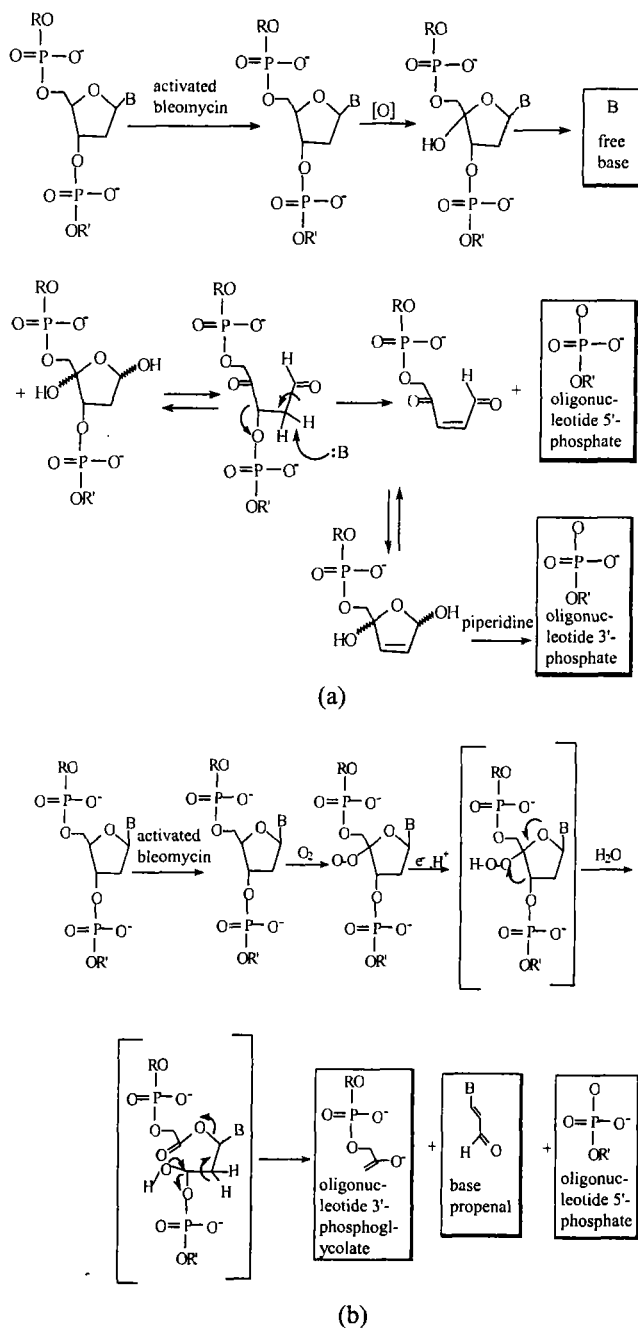


图 3 BLM-Fe(II) 在厌氧(a)及需氧(b)条件下由 4'-攫氢导致 DNA 断裂的反应机理

Fig. 3 Proposed mechanisms of DNA cleavage by BLM-Fe(II) via 4'-H abstraction in the absence

(a) or in the presence (b) of O_2

于电子转移过程)产生 C-4' 铕离子并释放出碱基, 水亲核进攻 C-4' 生成醛, 碱性条件下磷酸酯被消去, 生成含磷酸末端的 DNA 股。在中性 pH 及大量氧存在下, 反应机理则不一样(图 3b)。分子氧在碳中心自由基处反应, 生成过氧自由基及过氧化物, 这些中间产物可能进行类似于 Criegee 重排的反应, 但发生 Criegee 重排反应则是存疑问的, 因为这要求强酸。而 BLM-Fe(II)可

能表现得象 Lewis 酸,影响该重排反应,生成 3'-磷酸甘醇酸酯末端 DNA,碱基烯丙醛及 5'-磷酸末端 DNA。只有 4'-攫氢才能生成碱基烯丙酮,硫代巴比妥酸的比色分析证明了这一点。磷酸甘醇酸酯末端 DNA 也是发生氧化反应的标志。在凝胶电泳中,与磷酸末端股相比,它的迁移速率更高^[21]。形式为 $\text{NH}_2\text{-Xaa-Xaa-CONH}_2\text{-Ni}^{2+}$ (Xaa 是任意氨基酸)的金属肽,当被 KHSO_5 、单过氧邻苯二甲酸镁或 H_2O_2 活化时,象 BLM-Fe(II)一样,通过 H-4'攫氢导致脱氧核糖损伤, DNA 降解途径也有两条,而且产物也基本一样^[22]。

1.2.4 H-5'的攫取

DNA 双螺旋中 5'-碳上的两个氢是高度可接近的,考虑两个 5'-H 的可接近表面积之和,则溶剂接近的可能性更大。尽管这两个氢可从小沟中接触,但有个氢偏离小沟而朝向溶剂,借助于 5'-攫氢的反应途径使 DNA 断裂的物种是阳离子金属卟啉,羟自由基及过氧自由基^[23]。

阳离子金属卟啉进攻 5'-位氢断裂 DNA 的产物中有多种降解的糖。中位-四(N-甲基吡啶正离子基-4)卟啉(TMPyP)锰的五醋酸盐(MnTMPyP)在 KHSO_5 等氧原子给予体存在下可断裂双链 DNA^[8]。该配合物能攫取 1'-H 或 5'-H,取决于 DNA 序列。5'-机理似乎主要出现在 poly(dA)·poly(dT) 序列中,而对混合序列则不大重要,建议的反应途径如图 4 所示,它的独有产物是带醛基的氧化糖,称为糠醛,它是在加热的条件下生成的,此外还有 3'-磷酸末端及 5'-醛末端 DNA 股。

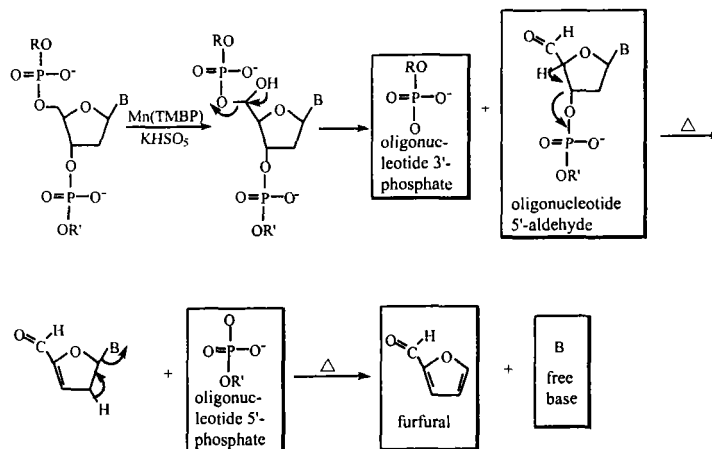


图 4 阳离子金属卟啉 MnTMPyP 由 5'-攫氢导致 DNA 断裂的反应机理

Fig. 4 Proposed mechanism of DNA scission by cationic metalloporphyrin MnTMPyP via 5'-H abstraction

1.3 碱基的氧化修饰导致 DNA 断裂

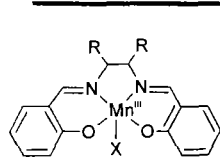
碱基的氧化损伤也是 DNA 断裂的主要途径之一,因为富电子的嘌呤及嘧啶杂环是氧化剂进攻的首选靶之一。氧化还原活性的过渡金属配合物在氧化剂存在下,导致 DNA 碱基损伤;用电化学或化学方法产生的高氧化态金属物种也能氧化 DNA。表 2 列出了由氧化碱基导致 DNA 断裂的过渡金属配合物及反应机理,从中可明显看出氧化剂进攻部位绝大部分是鸟苷。

作为 DNA 的碱基氧化修饰剂,镍配合物引起了化学家们的广泛重视,因为镍能与染色体结合而致癌。镍配合物导致的 DNA 损伤包括链断裂、碱基氧化及 DNA-蛋白质交联。在 H_2O_2 存在下, Ni^{2+} 与 DNA 作用的主要产物是 8-oxoG, Ni^{2+} 与组氨酸或含组氨酸的多肽配位能提高它氧化 DNA 的能力^[24]。多肽镍(II)及大环镍(II)在 KHSO_5 等过酸氧化剂引发下,以类似的方式导致 G 氧化损伤,但后者的特征为低盐条件下,在小沟中不显示任何反应性。大多数氧化损

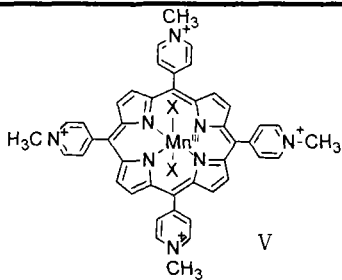
表 2 导致 DNA 碱基氧化的过渡金属配合物

Table 2 Transition Metal Complex-Mediated DNA Base Oxidation

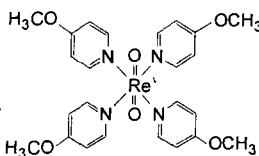
metal complex	oxidant	DNA target/lesion	mechanism
IV	HSO_3^-	G (+ ribose)	$\text{Mn(V)} = \text{O}$
V	HSO_3^-	G (+ ribose)	$\text{Mn(V)} = \text{O}$
VI	$-e^-$	G	et
VII	$\text{SO}_3^{2-}/\text{O}_2$	various	?
VIII	$-e^-$	G	et
Ru(II/III)(bPy)_3	$\text{S}_2\text{O}_8^{2-}/h\nu$	G	et
XIV	-	G	et
$\text{Ru(III)(tPy)(bPy)OH}$	-	G (+ ssb)	et + O atom transfer
IX	O_2	G	$\text{Co(III)(OH)}?$
X	HSO_3^- or $\text{SO}_3^{2-}/\text{O}_2$	G (+ AT)	$\text{Ni(III)-SO}_4^{\cdot -}$
XI	HSO_3^-	G (> C > T)	$\text{Ni(III)-SO}_4^{\cdot -}$
Ni-BLM	HSO_3^-	G	Ni(III)
XII	HSO_3^-	G	alkylation
XIII	HSO_3^-	G	alkylation
XIV	HSO_3^-	G	oxidation
XV	H_2O_2	G	N7 binding, oxidation
Cu-peptide	H_2O_2	8 - oxoG	?
XVI	$\text{SO}_3^{2-}/\text{O}_2$	T > G > C ~	?



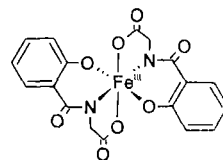
IV



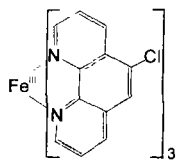
V



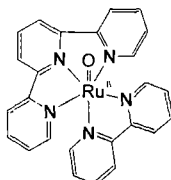
VI



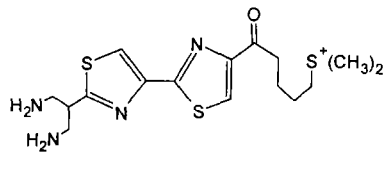
VII



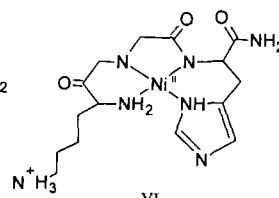
VIII



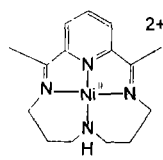
IX



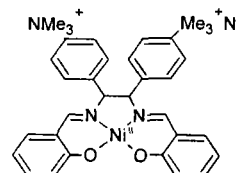
X



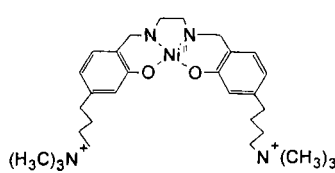
XI



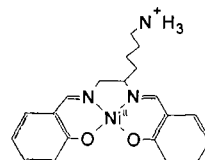
XII



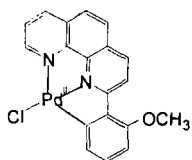
XIII



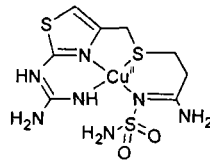
XIV



XV



XVI



XVII

伤发生在暴露的 G 上。这种对暴露 G 的灵敏性使后者成为 DNA 及 RNA 的结构探针^[25]。大环镍(II)与 DNA 的作用机理似乎涉及 Ni^{2+} 与 G-N7 的配位作用,因为反应性与 G-N7 的暴露程度有关,NMR 实验结果证实了这一推论。随着 Ni^{2+} 与 G-N7 的配位,DNA 优先从 B 型转变为 Z 型双螺旋^[26]。如果不存在暴露的 G,则优先氧化的部位是 5'-GG-3'^[27],这说明大环镍(II)不能在大沟中接近 G-N7,它们可能是通过外层电子转移进行反应的。机理研究表明反应时,并没有自由扩散的自由基参予,因此氧化物种与大环镍(II)有结合作用,例如硫酸自由基^[28]。

G 是最容易被氧化的碱基,DNA 及 RNA 与各种氧化剂作用的最初产物是 G 自由基阳离子。目前已观测到的 G 序列反应性顺序为 $\text{GGGG} > \text{GGG} > \text{GG} > \text{GA} > \text{GT} \approx \text{GC}$ 。借助于水合作用及随后的单电子氧化,G 自由基阳离子导致 8-oxoG 的生成;另一方面,去质子的 G 自由基 $(\text{G-H}) \cdot$ 不发生水合作用,而是与双氧作用,引发一连串反应,生成咪唑啉酮及噁唑酮等产物;8-oxoG 很容易由三条途径被进一步氧化^[24]。

2 DNA 的水解断裂

迄今设计的 DNA 断裂试剂多以氧化机理断裂 DNA,氧化断裂试剂的特异性主要依赖于在 DNA 不同位置的反应性差异以及断裂试剂与 DNA 的特异性结合造成的局部自由基富集;但由于自由基的高反应性和扩散性,其特异性一般较差,反应难于控制,产物种类较多,从而大大限制了其应用。而以水解机理断裂 DNA 的试剂分子则必须与 DNA 链结合并相互作用,通常是金属离子直接或间接与磷酸骨架上的氧原子配位,进攻磷酸二酯键引起水解或酯转移反应并导致链断裂,其机理与天然核酸酶基本相同。因此,水解断裂与氧化断裂试剂相比具有相当的优越性,可达到较高的序列特异性,并且反应条件温和、产物单一。

与 RNA 相比,DNA 具有显著的稳定性,生理条件下很难水解,是最稳定的生物大分子之一。这是由于 DNA 没有 2'-OH,同时其双螺旋结构非常稳定,不易降解。因此小分子化合物很难在生理条件下水解断裂 DNA。尽管如此,近年来还是发现了一些能水解断裂 DNA 的小分子化合物。

2.1 稀土金属离子及其配合物

镧系金属离子 Ce(III)/Ce(IV)是最早发现的可水解断裂 DNA 的离子。Chin 等发现 $\text{Ce}(\text{ClO}_4)_3$ 在 O_2 存在下可显著促进模型化合物 BNPP(二-(对硝基苯酚)-磷酸酯)水解断裂,其他镧系离子无此催化作用, H_2O_2 无促进作用^[29]。可能机理是:第一步 Ce(III)离子被 O_2 氧化成 Ce(IV)离子并形成超氧离子配合物;第二步 Ce(IV)超氧离子配合物进攻与其配位的磷酸二酯。该机理包括金属离子对磷酸二酯键的激活和配位超氧离子的分子内亲核进攻。Komiyama 等人随后进一步证明了起断裂作用的是 Ce(IV)离子,他们的实验表明, $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ 或在反应中原位产生的 Ce(IV)离子即可有效地催化 DNA 水解,不需要 O_2 或 H_2O_2 参与,断裂没有特异性^[30]。反应中 Ce(IV)及配位的羟基都参与了对磷酸二酯键的分子内亲核进攻,另一个配位水分子的一般酸催化作用促进了反应。他们还发现 $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ 和 Pr(III)、Nd(III)间存在协同作用,其催化作用远大于单独的 Ce(IV)离子,而 Pr(III)、Nd(III)本身没有活性^[31]。该体系随机切割寡聚 DNA 链,不形成糖环氧化断裂产物。但其他金属离子抑制 Ce(IV)的活性,其详细机理仍不清楚。亲核或插入配体如多胺、氮氧大环、多醇等可增强镧系离子的催化作用^[32]。此外,Hashimoto 等研究了一种羟胺酸的过渡金属配合物对 DNA 的断裂,发现镧系金属配合物的断裂作用除了 EDTA 之外不受其他抑制剂的抑制,因而很可能是以水解机理进行的^[33]。

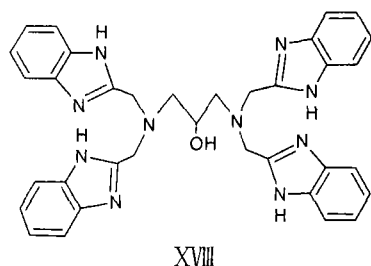
2.2 多胺、含氮大环及芳香环配体的过渡金属配合物

双核配合物 $\text{Fe}_2(\text{HPTB})(\text{OH})(\text{NO}_3)_4$ (HPTB, XVII) 在 H_2O_2 或 O_2 及还原剂参与下, 与 pBR322DNA 反应立即产生切口的(单链断裂)和线型的(双链断裂)的质粒^[34], $10\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Fe}_2(\text{HPTB})(\text{OH})(\text{NO}_3)_4$ 即可产生最大产率的线型质粒 DNA (31%), 且进一步降解 DNA。自由基猝灭剂不影响其活性, 其它氧化剂不能代替 H_2O_2 或 O_2 。断裂产物用 T4 DNA 连接酶连接可得到定量的闭环环状质粒; 断裂产物 5'-和 3'-末端的 ^{32}P 标记和天然限制酶的作用产物一样, 因此, $\text{Fe}_2(\text{HPTB})(\text{OH})(\text{NO}_3)_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 很可能以水解机理断裂 DNA, 其产物具有 3'-OH 和 5'-OPO₃ 端, 但还不清楚只产生 3'-OH 而不产生 5'-OH 的立体化学机理。根据与天然限制酶切割位点比较及合成序列断裂产物变性聚丙烯酰胺凝胶电泳-放射自显影分析, 断裂有一定的特异性。反应机理可能是: 该双核配合物和 H_2O_2 (或 O_2 + 还原剂) 作用可形成 (μ -1,2-超氧)二铁(III)配合物, 带正电的加合物和 DNA 磷酸酯骨架间的静电作用与苯并咪唑环的疏水作用共同促使配位的超氧阴离子亲核进攻磷酸二酯键。关于断裂特异性的机理还不清楚, 但显然和超螺旋有关, 因为被拓扑异构酶解除了超螺旋和带切口 pBR322 需要高浓度的配合物 ($>0.1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 才能断裂, 线型 DNA 很少且不产生清晰的电泳区带。

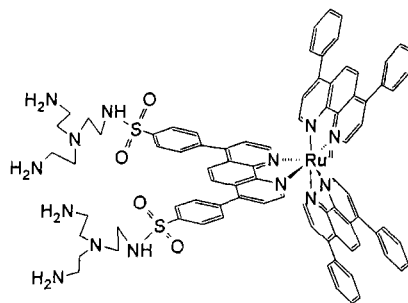
将 DNA 大沟特异插入部分和断裂活性部分结合在一起构建的 DNA 酶模型 (Rh-P)^[35], 前一部分为铑插入子 $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$ (III); 后一部分是模拟天然水解酶的金属多肽。在有 Zn^{2+} 存在时, Rh-P 可把 pBR322DNA 转化成带缺口的及线型的 DNA, 其活性与 $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$ 、多肽及 Zn^{2+} 有关, 加入化学计量的 Zn^{2+} 可产生最大活性, 毫摩尔浓度就可有效降解 DNA, 在 pH6.0 时切割 pBR322DNA 的初速率常数大约是非催化 DNA 水解的 10^{11} 倍。聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明产物具有 3'-OH 和 5'-OPO₃ 基团, 只产生 3'-OH 末端可能是因为从大沟的水解进攻。对 pBR322 和寡聚核苷酸切割的定量比较表明断裂对线型 DNA 和超螺旋 DNA 同样有效, 因此超螺旋不是 Rh-P 断裂活性的必要条件。这种把 DNA 结合部分和断裂活性部分结合起来构建能水解核酸的人工酶是一种重要策略。

$\text{Ru}(\text{DIP})_2\text{Macro}^{n+}/\text{M}^{2+}$ (XVIII) 体系的两条与金属阳离子配位的多胺臂可造成 DNA 磷酸骨架附近的局部高浓度亲核试剂, 并导致 DNA 双链断裂^[36, 37]。pBR322 断裂实验表明线形 DNA 的产率与时间成线性关系。其活性要求二价金属离子参与, DNA 断裂效率按 $\text{Cu}(\text{II}) > \text{Co}(\text{II}) > \text{Zn}(\text{II}) \approx \text{Cd}(\text{II}) > \text{Pb}(\text{II})$ 顺序变化。这些金属离子既有氧化还原活性的, 也有非氧化还原性的。T4 DNA 连接酶实验发现对 $\text{Cu}(\text{II})$ 、 $\text{Co}(\text{II})$ 断裂的产物连接效率很低, 且 H_2O_2 有促进作用; 而 $\text{Zn}(\text{II})$ 、 $\text{Cd}(\text{II})$ 、 $\text{Pb}(\text{II})$ 等非氧化还原性离子的断裂产物有较高的连接效率 (约 40%), 表明可能有非氧化机理的链断裂。

Co(III)-多胺衍生物配合物包括 1,4,7,10-四氮环十二烷及其衍生物、三(3-氨基丙基-)胺



XVIII



XIV

衍生物、四胺衍生物等与 Co(Ⅲ)的配合物等,均可显著促进质粒 DNA 断裂, H_2O_2 和自由基猝灭剂等不影响其活性,与天然限制酶比较和 T4 DNA 连接酶连接实验证明产物具有 3'-OH 和 5'-OPO₃ 基团,凝胶电泳显示断裂是非特异性的^[38]。带正电荷的侧链能加强催化效率,实验表明随着侧链增长配合物对 DNA 的结合力增加;增加侧链数(2 或 3 个)则可使活性大大增强。可能的反应机理为:一个磷酸基 O 原子取代一个 Co(Ⅲ)的配位水分子后形成活化的 P-O 键,然后邻近的配位羟基作为分子内亲核试剂进攻磷原子产生五配位中间体,再发生水解反应。羟基从四方磷中心的两面进攻将分别产生 3'-OH 或 3'-OPO₃ 末端。

从以上结果来看,能水解断裂 DNA 的金属配合物配体多为含氮大环或多胺,并常带有芳香环。芳香环与碱基对之间的疏水相互作用及其侧链与磷酸骨架之间的静电相互作用均可有效促进与 DNA 结合;配体将金属离子固定于 DNA 骨架附近的有效位置。配合物与 DNA 的结合方式可以是插入或结合于大沟、小沟,一般有配位的 H_2O 或 OH^- 作为亲核试剂。而金属离子在水解断裂中一般有以下作用:(1)作为 Lewis 酸促使亲核试剂产生;(2)与 O 原子配位使磷酸二酯键活化;(3)利用电子及空间效应稳定离去基团、中间体和过渡态;(4)利用模板效应调节断裂试剂-DNA 复合物空间结构;(5)通过静电相互作用加强与 DNA 磷酸骨架的结合。虽然氧化断裂反应依赖于氧化剂或光激发,但水解断裂也有些需要 H_2O_2 或 O_2 参与,解断裂反应中可能伴随有部分氧化反应,其催化效率一般比氧化断裂要低。

3 小 结

由以上讨论可看出过渡金属配合物导致 DNA 断裂的氧化机理有两种:攫氢及碱基氧化。不同的配合物在 DNA 中有不同的结合部位或结合模式,故攫取不同的脱氧核糖环氢原子,导致的不同的产物;另一方面,氧化剂在 DNA 中的进攻部位绝大部分是鸟苷。虽然过渡金属配合物由水解机理断裂 DNA 双链的特异性优于氧化机理,但由于双螺旋 DNA 有显著的稳定性,所以与氧化断裂剂相比,成功的 DNA 水解断裂分子极少。

参 考 文 献

- [1] LIU Chang-Lin(刘长林), XU Hui-Bi(徐辉碧), ZHOU Jing-Yan(周井炎) *Huaxue Tongbao (Chemistry)*, **1995**, (8), 26.
- [2] Henle E. S., Linn S. *J. Biol. Chem.*, **1997**, **272**, 19095.
- [3] Liu C., Zhou J., Xu H. *J. Inorg. Biochem.*, **1998**, **71**, 1.
- [4] Liu C., Li X., Wang L., Zhou J., Xu H. *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, **75**, 233.
- [5] LIU Chang-Lin(刘长林), XU Hui-Bi(徐辉碧), ZHOU Jing-Yan(周井炎) *Wuji Huaxue Xuebao (Chinese J. Inorg. Chem.)*, **1998**, **14**(3), 253.
- [6] ZHOU Jing-Yan(周井炎), LI Qing-Xiang(李庆祥), LIU Chang-Lin(刘长林), XU Hui-Bi(徐辉碧) *Wuji Huaxue Xuebao (Chinese J. Inorg. Chem.)*, **1997**, **13**(4), 390.
- [7] Balasubramanian B., Pogozeleski W. K., Tullius T. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1998**, **95**, 9738.
- [8] Pratviel G., Bernadou J., Meunier B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, **304**, 746.
- [9] Miaskiewicz K., Osman R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, **116**, 232.
- [10] Sigman D. S., Mazumder A., Perrin D. M. *Chem. Rev.*, **1993**, **93**, 2295.
- [11] Kuwabara M., Yoon C., Goyne T., Thedarahn T., Sigman D. S. *Biochemistry*, **1986**, **25**, 7401.

- [12] Johnson G. R. A., Mazhat N. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, **109**, 1990.
- [13] Meijler M. M., Zeleko O., Sigman D. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, **119**, 1135.
- [14] Sitlani A., Long E. C., Pyle A. M., Barton J. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, **114**, 2302.
- [15] Shields T. P., Barton J. K. *Biochemistry*, **1995**, **34**, 15037.
- [16] Tan J. T., Hudson S. E., Olmstead M. M., Mascharak P. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, **114**, 3841.
- [17] Sessler J. L., Sansom P. I., Kral V., O'Connor D., Iverson D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, **118**, 12322.
- [18] Hertzberg P. R., Dervan P. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, **104**, 313.
- [19] Stubbe J., Kozarich J. W., Wu W., Vanderwall D. E. *Acc. Chem. Res.*, **1996**, **29**, 322.
- [20] Burger R. M. *Chem. Rev.*, **1998**, **98**, 1153.
- [21] Wu W., Vanderwall D. E., Stubbe J., Kozarich J. W., Turner C. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, **116**, 10843.
- [22] Liang Q., Ananias D. C., Long E. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, **120**, 248.
- [23] Dix T. A., Hess K. M., Medina M. A., Tilly S. L., Web T. L. L. *Biochemistry*, **1996**, **35**, 4263.
- [24] Burrows C. J., Muller J. G. *Chem. Rev.*, **1998**, **98**, 1109.
- [25] Burrows C. J., Rokita S. E. *Acc. Chem. Res.*, **1994**, **27**, 295.
- [26] Shih H.-C., Tang N., Burrows C. J., Rokita S. E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, **120**, 3284.
- [27] Muller J. G., Hickerson R. P., Perez R. J., Burrows C. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, **119**, 1501.
- [28] Muller J. G., Zheng P., Rokita S. E., Burrows C. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, **118**, 2320.
- [29] Chin J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, **116**, 1121.
- [30] Komiyama M., Takeda N., Takahashi Y., Uchida H., Shiibe T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1995**, 269.
- [31] Takada N., Takamitsu I., Makoto I., Jun S., Morio Y., Komiyama M. *Chem. Lett.*, **1996**, 599.
- [32] Rammo, J., Hettich, R., Roigk, A., Schneider, H. J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1996**, 105.
- [33] Hashimoto S., Nakamura Y. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 1413.
- [34] Leah M. T., Schnaith R., Hanson S., Que L. JR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1994**, **91**, 569.
- [35] Fitzsimons M. P., Barton J. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, **113**, 3379.
- [36] Basile L. A., Barton J. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, **109**, 7548.
- [37] Basile L. A., Raphael A. L., Barton J. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, **109**, 7550.
- [38] Hettich R., Schneider H. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, **119**, 5638.

Progress on the Mechanisms for Double-Stranded DNA Scission Mediated by Transition Metal Complexes

LIU Chang-Lin YU Si-Wang XU Hui-Bi ZHOU Jing-Yan

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

Transition metal complex-mediated double-stranded DNA scission via hydrogen abstraction from the sugar moiety and base oxidation is reviewed. DNA hydrolytic cleavage promoted by transition metal complexes is also discussed in detail.

Keywords: DNA transition metal complex hydrogen abstraction base oxidation
hydrolytic cleavage