

微量热法研究 $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ 、 $[\text{Cu}(\text{bpy})_2]^{2+}$ 与 DNA 的作用

易平贵^{*,1} 商志才² 俞庆森²

(¹ 湘潭工学院化工系, 湘潭 411201)

(² 浙江大学化学系, 杭州 310027)

用微量热法对菲咯啉铜 $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ 和联吡啶铜 $[\text{Cu}(\text{bpy})_2]^{2+}$ 与小牛胸腺 DNA 的相互作用进行了研究, 依据 McGhee-Von Hippel 邻近排斥方程确定了结合反应的平衡常数 K 、结合位点距离 n 及热力学参数 $\Delta_r H_m$ 、 $\Delta_r G_m$ 和 $\Delta_r S_m$ 。结果表明这两种铜的配合物与 DNA 之间均可形成稳定的三元配合物, 且反应为熵驱动过程, DNA 与这些配合物的键合过程中同时存在插入和静电作用两种模式, 插入作用的强弱与金属配合物中配体的平面性质有关。

关键词: 微量热法 热力学 铜(II)配合物 小牛胸腺 DNA

分类号: O641.4

DNA 与其靶向分子相互作用的研究不仅对阐明抗肿瘤、抗病毒药物及致癌物质的作用机制, 而且对进一步指导人工核酸酶及 DNA 高级结构的研究等方面的工作都具有重要意义。金属配合物, 尤其是过渡金属配合物是一类重要的 DNA 靶向化合物。已有的研究表明, 这类化合物可望设计成人工核酸酶, 从而实现对 DNA 链上某些位点的特异性剪切; 也有望设计并合成出某些性能优良的抗肿瘤或抗病毒药物^[1, 2]; 其中有些对 DNA 作用具有立体选择性的配合物还可作为 DNA 结构和构象的探针, 对 DNA 的 B 型和 Z 型进行手性识别^[3, 4]。特别是菲咯啉、联吡啶、卟啉、Schiff 碱类配体和 Cu、Ru、Co、Fe 等过渡金属离子之间所形成的配合物与 DNA 的作用更是引人注目^[2, 5~7]。人们采用多种现代实验手段如 NMR、ESR、UV、CD、共振 Raman 光谱、荧光探针、电化学、光谱电化学、DSC 及微量热等从不同角度对它们的作用进行了广泛的研究, 得到了许多有益的结论^[7]。

Sigman 等在研究菲咯啉对大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 抑制作用机理时发现菲咯啉铜具有剪切 DNA 的化学核酸酶的活性^[8], 随后有关菲咯啉铜、联吡啶铜与 DNA 作用的各种研究就变得异常活跃^[9]。光谱电化学的研究发现, $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}/[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ 或 $[\text{Cu}(\text{bpy})_2]^{2+}/[\text{Cu}(\text{bpy})_2]^+$ 与 DNA 之间有较强的相互作用, 且配合物在氧化和还原过程中的光谱存在可逆性的变化^[10]。

微量热法是一种近年来发展起来的研究生物热力学与生化过程动力学的重要方法, 该法在测定过程中不会干扰生物体系的正常活动与代谢, 对反应体系的光谱性质、电学性质及溶剂性质等无任何限制条件, 因而有许多独到之处。微量热法已先后被用于一些抗肿瘤药物、生物染料及金属配合物与 DNA 相互作用的研究^[11~14]。本文用微量热法研究了 $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ 、 $[\text{Cu}(\text{bpy})_2]^{2+}$ 两铜离子配合物与小牛胸腺 DNA 作用的热力学性质及结合位点, 并分析了键合

收稿日期 2000-07-13。收修改稿日期: 2000-09-25。

国家自然科学基金资助项目 (No. 29633020)。

* 通讯联系人。

第一作者: 易平贵, 男, 39 岁, 博士, 副教授, 研究方向: 生物物理化学。

模式。

1 实验部分

1.1 试剂

小牛胸腺 DNA 为上海华美生物工程公司产品,采用常规生化方法纯化,其余试剂均为分析纯或生化试剂,实验过程中所用水均为无菌去离子蒸馏水,所有试样溶液均用浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{pH} = 7.0$ 的 Tris-HCl (内含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$) 缓冲溶液配制。将 DNA 溶液置于冰水浴中用超声波将其打断成长度约为 1000 个碱基对 (bp) 的 DNA 片段,然后进行紫外测定,吸光度 $A_{260}/A_{280} = 1.88$,纯度合格,DNA 的浓度由吸光值 A_{260} 及相应的摩尔消光系数 $\varepsilon_{(260)} = 6600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 确定,处理好的 DNA 溶液置于 4°C 冰箱保存。配合物溶液的制备按金属离子与配体为 1:2 的摩尔比由 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 1, 10-菲咯啉或 2, 2'-联吡啶反应制得,用缓冲溶液配成不同的浓度供实验之用。

1.2 实验仪器与方法

微量热实验在瑞典产 LKB-2277 型生物活性检测仪 (Bioactivity Monitor) 中完成。该仪器是一种流动型热导式热量计,其量热方式有流通式 (flow-through)、混合流动式 (flow-mix) 和安培反应器 (ampoule) 等三种模式。本实验采用混合流动法实验方式,使用带有微信息处理器控制流速的 LKB-2132 型双通道蠕动泵和 LKB-2210 型双通道记录仪。测量前,依次用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$ 溶液、75% 酒精、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸及无菌去离子蒸馏水对测量通道进行消毒和清洗。选择好流速与测量量程,待用无菌去离子蒸馏水走线稳定后,改用缓冲溶液设定基线并充分稳定,将 DNA 溶液与配合物溶液以相同的流速同时泵入检测系统的测量池内,当反应系统达到稳定后,其表观输出为一稳定值,此时记录曲线为一平台段,然后切换溶液,用缓冲溶液复查基线,在同样的条件下测定 DNA 溶液及配合物溶液的稀释热效应。这样,从混合过程的表现热功率中扣除两反应物溶液的混稀释热功率即得相应反应的真实热功率。

2 热力学模型

DNA 与小分子化合物之间的结合平衡可用 McGhee-Von Hippel 方程^[15]处理,此时将 DNA 双螺旋结构看作由 N 个等同重复单元组成的均匀点阵链分子。假定小分子配体占据其中 n 个连续点阵单元,当 $n = 1$ 时,即为 Scatchard 方程所描述的情况,当 $n > 1$ 时,同时考虑配体之间的相互影响,得到:

$$\nu/C_t = K(1 - n\nu) \left[\frac{2(\omega - 1)(1 - n\nu) + \nu - R}{2(\omega - 1)(1 - n\nu)} \right]^{-1} \left[\frac{1 - (n+1)\nu + R}{2(1 - n\nu)} \right] \quad (1)$$

式中 $R = \sqrt{[1 - (1+n)\nu]^2 + 4\omega\nu(1 - n\nu)}$, ω 是与邻近结合配体自由能变化有关的参数,当 $\omega = 1$ 时,方程 (1) 简化为邻近排斥方程:

$$\nu/C_t = K(1 - n\nu)^n / [1 - (n-1)\nu]^{n-1} \quad (2)$$

式中 K 为表观结合常数, C_t 是配体的游离浓度, ν 是 DNA 上每个核苷酸平均已结合配体的分子数, n 是结合位点距离,即每个配体分子可结合 DNA 链上核苷酸的数目。由于 ω 的不确定性,用式 (1) 很难拟合,所以通常采用式 (2) 来求算反应的 K 和 n 值。

在 DNA 总浓度 D_t 固定的情况下,一个稳流反应体系的热功率 P 与 DNA-配合物的复合物形成量成正比:

$$P = \Delta_r H_m F_T C_b$$

(3)

式中 $\Delta_r H_m$ 为金属配合物为计量的摩尔键合焓, C_b 为流速 F_T 恒定时结合在 DNA 链上的金属配合物浓度。由于 $\nu = C_b / D_t$ 及 $C_t = C_f + C_b$, 故式 (3) 又可表示为:

$$P = \Delta_r H_m F_T \nu D_t$$

(4)

假定金属配合物与 DNA 之间的结合服从邻近排斥方程, 则平均结合数 ν 按下式计算:

$$\nu - K(C_t - D_t)(1 - n\nu)^n[1 - (n - 1)\nu]^{1-n} = 0$$

(5)

根据 P 的实验值, 按式 (4) 及式 (5) 做非线性最小二乘法拟合即可由混合流动量热法确定反应的 K 、 n 及 $\Delta_r H_m$ 值。进一步依据下列热力学关系式可分别求出 DNA 与金属配合物作用的摩尔 Gibbs 函数变 $\Delta_r G_m$ 及摩尔熵变 $\Delta_r S_m$ 等热力学参数:

$$\Delta_r G_m = -RT \ln K$$

(6)

$$\Delta_r S_m = (\Delta_r H_m - \Delta_r G_m) / T$$

(7)

3 结果与讨论

固定两反应物溶液的流速及 DNA 总浓度而改变金属配合物浓度, 其混合流动量热过程则相当于一个滴定量热过程。图 1 给出了 [Cu(phen)₂]²⁺、[Cu(bpy)₂]²⁺ 与 DNA 反应体系量热曲线的实验结果及按邻近排斥方程式 (2) 之拟合值, 其中各实验值均取两次实验的平均值。可以看出计算值与实验值两者之间吻合得相当好, 这也表明所用的结合模型是合理的, 从图 1 还可以看出在相同浓度下两配合物与 DNA 相互作用的真实输出热功率 P 均与流速 F_T 成正比, 因此在实验所选流速下反应达到了化学平衡。比较各曲线的形状容易发现, phen 的配合物比 bpy 的配合物量热曲线斜率大且先出现平台, 表明前者与 DNA 的结合程度比后者高。由曲线拟合可以得到反应的热力学函数及结合位点等反应参数, 有关结果列于表 1。

表 1 [Cu(phen)₂]²⁺、[Cu(bpy)₂]²⁺ 与 DNA 作用的结合参数

Table 1 Binding Parameters of [Cu(phen)₂]²⁺ or [Cu(bpy)₂]²⁺ Interacting with DNA (298.15K)

complex	F_T /(mL · min ⁻¹)	K /(L · mol ⁻¹)	n	$\Delta_r H_m$ /(kJ · mol ⁻¹)	$-\Delta_r G_m$ /(kJ · mol ⁻¹)	$\Delta_r S_m$ /(J · K ⁻¹ · mol ⁻¹)
[Cu(phen) ₂] ²⁺	0.9252	2.23 × 10 ⁵	3.46	11.95	30.53	142.48
	1.1102	2.10 × 10 ⁵	3.48	12.47	30.38	143.72
	averg.	(2.17 ± 0.07) × 10 ⁵	3.47 ± 0.01	12.21 ± 0.26	30.46 ± 0.08	143.10 ± 0.62
[Cu(bpy) ₂] ²⁺	0.9252	9.75 × 10 ³	3.51	16.58	22.77	131.98
	1.1102	1.18 × 10 ⁴	3.40	15.42	23.24	129.67
	averg.	(1.08 ± 0.10) × 10 ⁴	3.46 ± 0.06	16.00 ± 0.58	23.06 ± 0.29	130.83 ± 1.16

$$T = 298.15\text{K}, C_{\text{DNA}}(D_t) = 1.6816 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

在中性水溶液中, DNA 以被水分子包围的双螺旋形式存在^[16]。根据其结构特点, 小分子化合物与 DNA 分子间存在的非共价键作用主要有: 小分子带正电的基团与 DNA 双螺旋链上带负电的磷酸残基之间的静电作用; 小分子进入 DNA 双螺旋的沟区与碱基之间的疏水作用及氢键作用; 芳香性化合物进入 DNA 双螺旋的沟区与芳香族碱基之间的 π 电子相互作用及疏水作用; van der Waals 引力作用。化合物与 DNA 作用的摩尔焓变为上述几种作用的综合, 其作用能大小在 van der Waals' 力 (40kJ · mol⁻¹) 和氢键力 (8 ~ 50kJ · mol⁻¹)^[16] 的范围内。表 1 结果表明, 配合物 [Cu(phen)₂]²⁺、[Cu(bpy)₂]²⁺ 与双链 DNA 的作用均为热效应较小的吸热反应且是熵驱动的自发过程, 这是由于两配离子以沟槽方式与 DNA 结合时^[17], 配离子的正电荷与核苷酸磷酸基所带负电荷间的静电作用及 DNA 沟槽中被束缚的水分子被释放出来的综合效应所

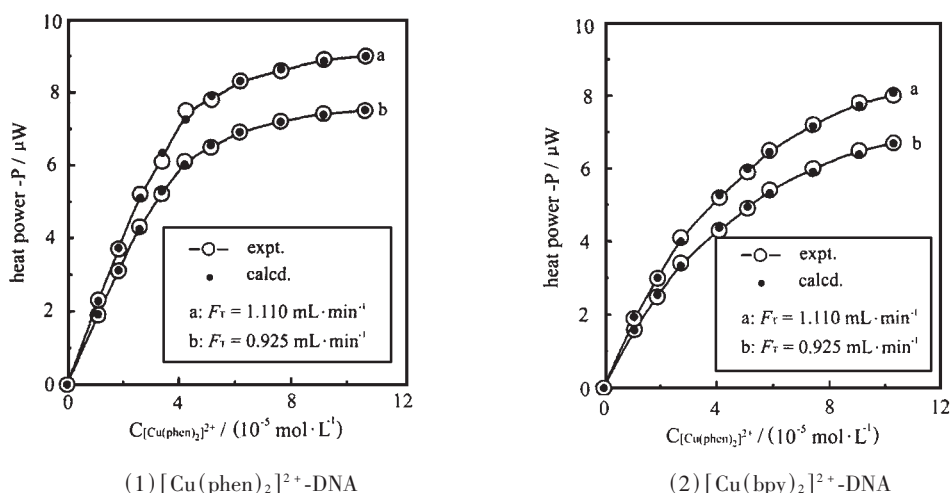


图 1 $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ 、 $[\text{Cu}(\text{bpy})_2]^{2+}$ 与 DNA 作用量热曲线拟合结果

Fig. 1 Regression for microcalorimetric curve of $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ or $[\text{Cu}(\text{bpy})_2]^{2+}$ binding to DNA

$$C_{\text{DNA}}(D_t) = 1.6816 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

致,与此同时结合过程的空间位阻效应也可能引起 DNA 的构型转变甚至部分解旋。两种配离子相比, $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ 与 DNA 作用的结合常数远大于 $[\text{Cu}(\text{bpy})_2]^{2+}$, 而键合焓略小于 $[\text{Cu}(\text{bpy})_2]^{2+}$, 这是因为配体菲咯啉比联吡啶的稠环程度高, 苯环的共平面性强, 环平面面积、疏水性及 π 电子离域程度等都大, 特别是与金属离子形成配合物后这种差异更是加大, 因此当这些配合物与 DNA 作用时, 前者除了沟槽方式外尚可借助疏水作用和 π 电子作用使芳环平面部分插入 DNA 双螺旋结构中的碱基对之间, 从而增强了配合物与 DNA 之间的相互作用, 而后者仅有沟槽作用, 由于疏水缔合的 $\Delta H < 0$ ^[18], 它部分抵消了沟槽作用的热效应, 这样总的结果使得 $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ 与 DNA 作用的 ΔH 比 $[\text{Cu}(\text{bpy})_2]^{2+}$ 小, 这一量热结果也印证了紫外光谱及荧光光谱的测定结果。据文献报道^[19], 在过量 DNA 存在下, 邻菲咯啉类配合物吸收光谱的最大吸收峰可产生 2nm 的红移, 而联吡啶类配合物的吸收光谱一般不发生移动, 吸收光谱能否红移及红移程度是小分子化合物能否与 DNA 发生插入作用以及插入能力强弱的重要准则之一, 这就是说从吸收光谱看, 与 DNA 作用时, 邻菲咯啉类配合物可有一定程度的插入能力, 而联吡啶类配合物一般仅有微弱的插入能力; 另外, 宋玉民等^[6]在研究 DNA 对这两类配体的配合物发光强度的影响时发现, DNA 对邻菲咯啉配合物发光有明显的增强效应, 而联吡啶配合物的发光强度几乎不受 DNA 的影响, 这是因为当配合物与 DNA 有插入作用时, 大分子 DNA 的疏水性保护作用将使配合物的发光增强, 据此亦可判断配合物对 DNA 的插入能力。

表 1 的结果还表明, 两种铜的配合物对 DNA 的结合位点间隔均接近 4, 即每隔 4 个碱基对可结合一个配体分子。小牛胸腺 DNA 是 B 型右手螺旋分子, 每隔 10 个核苷酸形成一个螺旋结构, 其中有两条沟槽即大沟和小沟, 这些部位没有表面磷酸和脱氧核糖核酸骨架保护, 彼此距离也适当, 是小分子化合物最有利的作用部位。而大沟、小沟对于在遗传上有重要功能的蛋白质识别 DNA 双螺旋结构中的特定信息是非常重要的^[20]。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Rong-Ying(张蓉颖), PANG Dai-Wen(庞代文), CAI Ru-Xiu(蔡汝秀) *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*(*Chem. J. Chinese Universities*), **1999**, **20**, 1210.
- [2] David R. M., Kristina M. M. *Chem. Rev.*, **1998**, **98**, 1201.
- [3] Rehman J., Barton J. K. *Biochemistry*, **1990**, **29**, 1701.
- [4] Eriksson M., Leijon M., Hiort C. et al *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, **114**, 4933.
- [5] Dai-Wen Pang, Abruna H. D. *Anal. Chem.*, **1998**, **70**, 3162.
- [6] SONG Yu-Min(宋玉民), KANG Jing-Wang(康敬万), GAO Jin-Zhang(高锦章), FENG Ya-Fei(冯亚非) *Wuji Huaxue Xuebao*(*Chinese J. Inorg. Chem.*), **2000**, **16**, 53.
- [7] LIU Jin-Gang(刘劲刚), JI Liang-Nian(计亮年) *Wuji Huaxue Xuebao*(*Chinese J. Inorg. Chem.*), **2000**, **16**, 195.
- [8] Sigman D. S., Graham D. R., D' Aurora V. et al *J. Biol. Chem.*, **1979**, **254**, 12269.
- [9] Sigman D. S., Mazumder A., Perrin D. M. *Chem. Rev.*, **1993**, **93**, 2295.
- [10] Zhao G. C., Zhu J. J., Chen H. Y. *Chem. Res. Chinese Universities*, **1997**, **13**, 117.
- [11] Remeta D. P., Mudd C. P., Berger R. I. et al *Biochemistry*, **1991**, **30**, 9799.
- [12] Kagemoto A., Takagi H., Naruse K. et al *Thermochim. Acta*, **1991**, **190**, 191.
- [13] Kagemoto A., Kunihiro A., Baba Y. et al *Thermochim. Acta*, **1994**, **242**, 65.
- [14] XIONG Ya(熊 亚), HUANG Su-Qiu(黄素秋), WU Ding-Quan(吴鼎泉) et al *Wuli Huaxue Xuebao*(*Acta Physico Chimica Sinica*), **1996**, **12**, 543.
- [15] McGhee J. D., Von Hippel P. H. *J. Mol. Biol.*, **1974**, **97**, 133.
- [16] WANG Bao-Huai(王保怀), ZHANG You-Min(张有民), YANG Ming(杨 铭) *Wuli Huaxue Xuebao*(*Acta Physico Chimica Sinica*), **1994**, **10**, 82.
- [17] Sigman D. S. *Acc. Chem. Res.*, **1986**, **19**, 180.
- [18] GAO En-Jun(高恩君), WANG Kui(王 魁), LIU Qi-Tao(刘祁涛) *Huaxue Xuebao*(*Acta Chimica Sinica*), **1993**, **51**, 646.
- [19] Pyle A. M., Rehmann J. P., Eshoyter R. M. et al *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, **111**, 3051.
- [20] YANG Pin(杨 频), WANG Hong-Fei(王宏飞), YANG Bin-Fheng(杨斌盛) *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*(*Chem. J. Chinese Universities*), **1995**, **16**, 1075.

Studies on the Interaction of Copper Complexes of [Cu(phen)₂]²⁺ and [Cu(bpy)₂]²⁺ with DNA by Microcalorimetry

YI Ping-Gui¹ SHANG Zhi-Cai² YU Qing-Sen²

(¹ Department of chemical Engineering, Xiangtan Polytechnic University, Xiangtan 411201)

(² Department of chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

The interactions of the [Cu(phen)₂]²⁺ and [Cu(bpy)₂]²⁺ with calf thymus DNA were investigated by microcalorimetry. The equilibrium binding constant K and the binding site size n for the copper complexes binding to DNA were obtained based on the McGhee-Von Hippel neighbor-exclusion binding model, and the thermodynamic quantities, such as changes in free energy $\Delta_r G_m$, enthalpy $\Delta_r H_m$ and entropy $\Delta_r S_m$, for these reaction were further determined. It was suggested that the interactions between DNA and [Cu(phen)₂]²⁺ or [Cu(bpy)₂]²⁺ appear to form a stable ternary complex from the viewpoint of thermodynamics and that these ternary complexes formation is governed mainly by entropy. The results also showed that both intercalation and electrostatic mode exist in the interaction of binding to DNA, and the intercalative binding affinity of metal complex is consistent with the ligand's planarities.

Keywords: microcalorimetry thermodynamics copper (II) complex
calf thymus DNA