

5-氟尿嘧啶-1-乙酸合铜(II)的合成及其与 DNA 的作用

王志平^{*,1} 张强¹ 宋玉民² 黄键³ 王流芳^{*,3}

(¹ 兰州大学第二医院泌尿外科研究所, 兰州 730000)

(² 西北师范大学化学化工学院, 兰州 730070)

(³ 兰州大学功能有机分子化学国家重点实验室, 兰州 730000)

关键词: 5-氟尿嘧啶-1-乙酸合铜(II); DNA; 静电吸附

中图分类号: O627.12

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2005)09-1397-05

The Interactions between 5-fluorouracil-1-acetic Acid and its Copper(II) Complex with DNA

WANG Zhi-Ping^{*,1} ZHANG Qiang¹ SONG Yu-Min² HUANG Jiang³ WANG Liu-Fang^{*,3}

(¹Institute of Urology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000)

(²College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070)

(³State Key Laboratory of Functional Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract: The 5-fluorouracil-1-acetic acid (5FuAA) and its Cu(II) complex (5FuAACu) were synthesized and the date for the crystal complex was obtained. The interaction of 5-fluorouracil-1-acetic acid (5FuAA) and its Cu(II) complex (5FuAACu) with DNA was also investigated by using spectral, viscometric, electrochemical and agarose gel electrophoresis methods. The results of interaction with DNA suggest that both 5FuAA and 5FuAACu can bind to DNA in a static electricity attraction mode. But the attraction of 5FuAACu is greater than that of 5FuAA.

Key words: 5FuAACu; DNA; static attraction

0 引言

5-氟尿嘧啶(5-Fu)是目前研究较多的抗癌药物之一,对食管癌、肝癌等有一定的治疗作用,但对肝、肾、消化道的毒副作用明显。为了得到高效低毒的抗癌药物,近年来已有不少 5-Fu 的衍生物问世,5-氟尿嘧啶-1-乙酸(5FuAA)就是这样一种典型的化合物^[1,2],并得到了广泛研究。鉴于过渡金属在疾病治疗过程中有协同参与的功能,我们试图通过以金属铜(II)离子形成配合物的形式来降低毒性,提高疗效。在前期

工作中通过体外细胞培养试验表明:5-氟尿嘧啶-1-乙酸合铜(II)(5FuAACu)不仅对人肝癌细胞系、人宫颈癌细胞系和人前列腺癌细胞系三种肿瘤细胞系有较强的抑制作用,且抑制作用比 5FuAA 强;而对膀胱癌 EJ 细胞的抑制作用低于 5FuAA^[3]。在本试验中我们合成并获得 5-氟尿嘧啶-1-乙酸合铜(II)的晶体结构、键角、键长等结晶学参数,并且用凝胶电泳法、荧光光谱法、粘度法、循环伏安法研究了 5FuAA、5FuAACu 与 DNA 的作用,以期寻找配体和配合物抗肿瘤活性不同的原因,探索配合物对 DNA 的作用

收稿日期:2005-02-22。收修改稿日期:2005-05-09。

国家自然科学基金项目(No.50272027)资助,甘肃省高分子材料重点实验室和西北师范大学 A 级学科资助。

*通讯联系人。E-mail: wzpurol@yahoo.com

第一作者:王志平,45岁,男,教授;研究方向:肿瘤学与分子生物学。

模式与配体是否相同,以及由此产生的对抗癌性能的影响,为进一步合成高效低毒的抗肿瘤药物提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

RF-540 荧光分光光度计(日本岛津公司),UV-3400 紫外分光光度计(日本岛津公司),HV 3000 多用电泳仪(北京),pHS-3C 型酸度计(上海第二分析仪器厂),乌贝路德粘度计。pBR322DNA,小牛胸腺 DNA(CT DNA,UV 谱测定 A_{260}/A_{280} 大于 1.8),溴化乙锭(EB)均购自华美生物工程公司,琼脂糖购自北京夏斯生物公司,5-氟尿嘧啶和 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 购自华美生物工程公司,其他试剂均为分析纯试剂,水为二次蒸馏水,缓冲溶液为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl + $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH=7.10 的溶液。CHI 660 电化学工作站(CHI,美国),参比电极为 Ag/AgCl,工作电极为玻碳电极。

1.2 方法

1.2.1 配体和配合物的合成

5-氟尿嘧啶-1-乙酸配体按文献^[4]所报道的方法合成。产率:65%,产物为无色针状晶体,m.p.为 276~278 °C。

Cu(II)配合物的合成与单晶培养。按物质的量之比 $n(5\text{FuAA}):n(\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})=2:1$,将 5FuAA 和 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于水-乙醇(1:1)溶液中,在回流温度下搅拌 8 h,即得浅蓝色沉淀。静置,洗滤,产物用乙醇-水(1:1)溶液洗涤 2 次,真空干燥至恒重,产率为 40%。将滤液在室温下静置,使溶液缓慢挥发,得到蓝色菱形单晶。

配合物的 C、H、N 含量用 Vary EL 型元素分析仪测定。元素分析结果 Found(Calc.)为:C%:24.68(24.77),H%:4.45(4.16),N%:9.49(9.32)。

1.2.2 5FuAA 及其 Cu 配合物与 DNA 作用时的荧光光谱

5 mL 的 EB-DNA 体系中每次加入 100 μL 的 5FuAA($50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)或 300 μL 5FuAACu($50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),摇匀 0.5 h 后扫描荧光光谱。

1.2.3 5FuAA 及其 Cu 配合物对 DNA 溶液的粘度的影响

取 DNA 溶液 7.5 mL($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)分别加入不同量的 5FuAA 和 5FuAACu。溶液总体积为 15 mL,充分混合后分别于 1 h、48 h 测其粘度。同法测定缓冲

液、DNA 溶液、溴化乙锭的 DNA 溶液的粘度。

1.2.4 5FuAACu 配合物与 DNA 作用时的循环伏安图

在 5 mL 的 5FuAACu 溶液($250 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)中每次加入 100 μL 的 DNA 溶液,摇匀,通氮 15 min 后扫描。

1.2.5 5FuAA 及其 Cu 配合物对 DNA 的切割作用

一定量的缓冲溶液中,分别将一定体积的 5FuAA 和 5FuAACu(II)溶液与 pBR322DNA 溶液混合,然后在 37 °C 恒温水浴中反应一定时间,加入 EDTA 和溴酚蓝终止反应。琼脂糖凝胶浓度为 0.8%,80 V 电泳 2.5 h。

2 结果与讨论

2.1 配合物的性质

元素分析结果表明,产品符合 $\text{Cu}(\text{C}_6\text{H}_4\text{FN}_2\text{O}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_8$ 化学组成。由合成条件可推得 HFAA 与 CuCl_2 形成 2:1 物质的量之比的配合物。配合物易溶于 DMSO,微溶于水,不溶于甲醇,乙醇,石油醚等有机溶剂。此配合物在 DMSO 中的摩尔电导率为 $12.4 \text{ s} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$,说明配合物在该溶剂中是非电解质^[4]。

2.2 红外与紫外光谱

在 200~4 000 cm^{-1} 范围内所测的 5FuAACu 配合物和配体谱图表明:在配合物红外谱图中,羧基在 3 191 cm^{-1} 处的 O-H 的振动吸收峰在形成配合物后消失,在 1 595 cm^{-1} 和 1 409 cm^{-1} 处出现了 COO^- 的反对称和对称伸缩振动峰,在 442 cm^{-1} 和 347 cm^{-1} 处分别出现了 $\text{Cu-O}_{\text{Carboxyl group}}$ 和 $\text{Cu-O}_{\text{water}}$ 振动吸收峰^[5]。

以水为溶剂,在 UV-240 型紫外可见分光光度计上测得配体及配合物的紫外光谱。比较配体及配合物的谱图,发现两者峰形基本相似,说明配合物的紫外吸收主要以配体为主。配体在 272 nm、202 nm 处有两个吸收峰,分别归属为 $\pi-\pi^*$ 和 $n-\pi^*$ 跃迁^[6],形成配合物后两峰分别有 5 nm 和 2 nm 的红移。

2.3 晶体及结构测定

选取 $0.30 \times 0.15 \times 0.08 \text{ mm}$ 的单晶,固定在 CAD-4 四圆衍射仪上,用 $\text{Mo K}\alpha$ 射线, $\omega-2\theta$ 扫描方式,在 $2.12^\circ \leq 2\theta \leq 25.88^\circ$ 范围内收集到 1 674 个独立衍射强度数据。测得晶体学参数列于表 1 中。

由结晶学数据得到的配合物结构式如图 1 所示。

表 1 配合物晶体学参数

Table 1 Crystallography parameters

Molecular	[Cu(C ₆ H ₄ FN ₂ O ₂) ₂ (H ₂ O) ₄]·4H ₂ O	
Molecular weight:	$M_r=581.88$	$D_x=1.745 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$
Space group:	$P2_1/c$	
	$Z=2$	
	$a=0.830\ 4(1) \text{ nm}$	$b=1.204\ 4(2) \text{ nm}$
	$c=1.108\ 2(2) \text{ nm}$	$\beta=92.41(1)^\circ$
	$V=11\ 073(3) \text{ nm}^3$	
Refinement:	$R[F^2>2\sigma(F^2)]=0.020$	
	$wR(F^2)=0.056$	

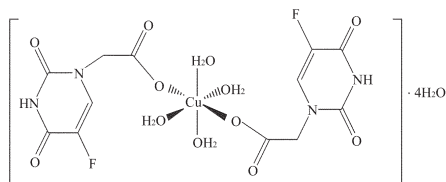


图 1 5FuAACu 的结构式

Fig.1 Structure of 5FuAACu

2.4 5FuAA 及其 Cu 配合物对 EB-DNA 体系荧光强度的影响

2.4.1 荧光光谱

由于 5FuAA 和 5FuAACu 本身没有荧光,因此采用经典的嵌入试剂溴化乙锭(EB)作为 DNA 荧光探针。溴化乙锭为一平面分子,其本身的荧光很弱,但能专一的插入双螺旋 DNA 内部的碱基之间,使荧光显著增强,当 EB 分子从 DNA 双螺旋中出来或 DNA 的双螺旋减少时,荧光会显著的降低,一般认为当 EB-DNA 体系的荧光强度减弱 50%且 $C_M/C_{DNA}<100$ 时, M 与 DNA 发生类似于 EB 的嵌入作用^[7]。从 5FuAA 和 5FuAACu 对 EB-DNA 体系的荧光强度产生猝灭的影响中可以看到:EB-DNA 体系的荧光强度随 (C_M/C_{DNA}) 比值 R 的增大而降低,但 5FuAA 和 5FuAACu 对 EB-DNA 体系的荧光猝灭程度不同。当加入 5FuAA 和 5FuAACu 后,EB-DNA 体系的荧光强度降低到 50%时的 R 值分别为 135、100,这说明配体和配合物与 DNA 发生了作用,但不是类似于 EB 的嵌入方式。

2.4.2 5FuAA 和 5FuAACu 对 DNA-EB 荧光猝灭方式的判断

在一系列 DNA-EB 溶液中加入不同浓度的 5FuAA 和 5FuAACu 溶液,以荧光强度 $F_0/F(F_0$ 、 F 分别为不存在和存在 5FuAA、5FuAACu 时的荧光强度),对猝灭剂浓度 C_0 作图(图 2)。根据经典的荧光猝灭理论^[8],无论动态猝灭或静态猝灭, F_0/F 对 C_0 作图均得一直线。由图 2 看出,以 5FuAACu 和

5FuAA 的浓度分别对 EB-DNA 体系的荧光强度作图均得到曲线。因此,认为 5FuAA 和 5FuAACu 对 DNA-EB 体系的荧光猝灭并非单纯的动态猝灭或静态猝灭,而可能是两种猝灭方式共同作用的结果。

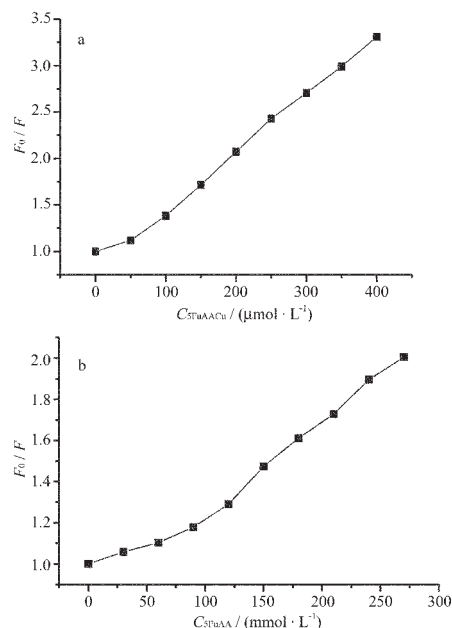


图 2 5FuAACu(A)和 5FuAA(B)对 EB-DNA 体系荧光的影响

Fig.2 Effect of 5FuAACu (A) and 5FuAA (B) on the fluoresce of EB-DNA system

2.5 5FuAACu 配合物和 EB 对 DNA 粘度的影响

光谱数据是必要的,但不足以支持药物与 DNA 的键合方式,因此我们采用粘度测试,经典的插入方式使 DNA 的双螺旋更加稳定,并且链增长。因此相对粘度有明显的升高,而当 DNA 与药物发生静电模式作用时,DNA 的双螺旋结构无明显改变,DNA 链长度不变,因此相对粘度变化不明显^[9]。为进一步确定 5FuAACu 与 DNA 的键合方式。用乌贝路德粘度计在 27℃下测定了 DNA 在 EB 和 5FuAACu 配合物存在时的粘度变化,结果列于表 2。

表 2 DNA 相对粘度的变化

Table 2 Variation of the relative viscosity (η_r) of DNA

$C / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$		η_r	
		1 h	48 h
EB	0.00	1.000	1.000
	0.10	1.206	1.253
5FuAACu	0.00	1.000	1.000
	0.10	0.993	1.036
	0.20	0.988	1.029
	0.30	0.982	1.023
	0.40	0.981	1.010

由表 2 可以看出, DNA 与 5FuAACu 作用后粘度变化不明显。这说明该配合物与 DNA 的作用方式可能是非嵌入结合。

2.6 5FuAA 及其 Cu 配合物与 DNA 作用时的循环伏安图

无论 DNA 存在与否 5FuAA 均无氧化还原峰, 5FuAACu 具有电活性(图 3)。在 5FuAACu 中加入 DNA 溶液后, 发现随 DNA 量的增加, 配合物的氧化还原峰电流明显下降, 说明配合物与 DNA 发生了作用。峰电位略有负移, 这种现象与 $[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{3+}$ 和 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ 在 DNA 存在下的电化学行为一致^[10,11]。而这些配合物与 DNA 均以静电模式结合, 故进一步说明了 5FuAACu 与 DNA 是以静电吸附的方式结合。铜(II)离子是一个二价的金属离子, 它的引入可使配体的氧化还原特性发生改变, 从而使配合物与 DNA 的静电吸附作用加强。

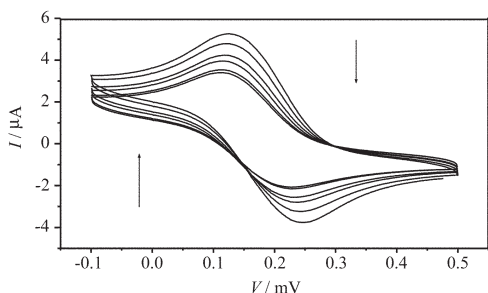


图 3 5FuAACu-DNA 体系的循环伏安图

Fig.3 Cyclic voltammetry of 5FuAACu-DNA system

2.7 5FuAACu 配合物对 DNA 的切割作用

图 4 为不同浓度的 5FuAACu 与 pBR322 DNA 在 pH=7.44 的缓冲介质中于 37 °C 恒温避光反应 3 h 后的电泳图谱。可见在无外加共反应物的条件下, 随着配合物浓度的增大, pBR322DNA 的缺刻开环型和线型 DNA 在不断增多, 而超螺旋型在逐渐减少。上述结果表明: 5FuAACu 配合物能导致 pBR322 DNA 双链断裂。

为进一步证明切割机理, 采用加入羟基自由基捕捉剂(DMSO, 甘油, MeOH)判断 DNA 切割是否经过产生羟基自由基的途径。如图 5 所示: 当加入 DMSO、甘油或甲醇时, 几乎不抑制配合物对 DNA 的切割。由此可见: 反应不是由于 Fenton 氧化剂导致的 DNA 降解^[12,13], 反应中没有产生羟基自由基·OH。因此 5FuAACu 对 DNA 的切割不是由羟基自由基引起的, 而 5FuAACu 对 DNA 的切割可能是水解切割。

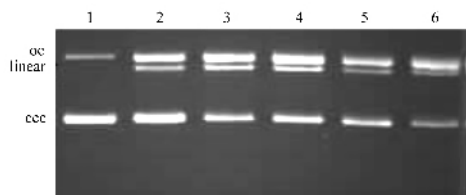


图 4 配合物对 pBR322 DNA 的切割电泳图

Fig.4 Agarose gel electrophoresis patterns for the cleavage of pBR322 DNA by various concentrations of 5FuAACu

Cleavage conditions: 37 mmol·L⁻¹ DNA; 25 mmol·L⁻¹ NaCl in 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl buffer; pH=7.44; 37 °C for 3 h.

Lane 1: DNA control;

Lane 2: DNA+0.012 mmol·L⁻¹ 5FuAACu;

Lane 3: DNA+0.024 mmol·L⁻¹ 5FuAACu;

Lane 4: DNA+0.036 mmol·L⁻¹ 5FuAACu;

Lane 5: DNA+0.048 mmol·L⁻¹ 5FuAACu;

Lane 6: DNA+0.060 mmol·L⁻¹ 5FuAACu.

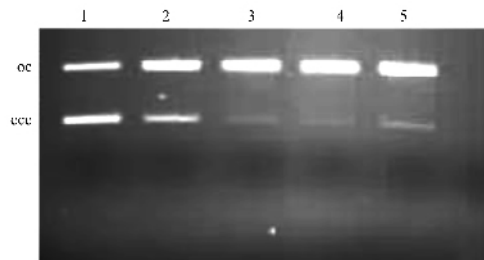


图 5 自由基吸附剂对 5FuAACu 的影响

Fig.5 Cleavage of pUC18/19 by 5-Fu-Cu in the presence of radical scavengers

Cleavage conditions: pUC18/19; 0.06 mmol·L⁻¹ 5FuAACu; 25 mmol·L⁻¹ NaCl in 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl buffer; pH=7.44; 37 °C for 3 h.

Lane 1: DNA control;

Lane 2: 5FuAACu;

Lane 3: 5FuAACu +2 mol·L⁻¹ MeOH;

Lane 4: 5FuAACu +0.4 mol·L⁻¹ DMSO;

Lane 5: 5FuAACu +0.4 mol·L⁻¹ glycerol.

2.8 5FuAA 及其 Cu 配合物与 DNA 作用时对紫外吸光度的影响

我们研究了在 DNA 存在下 5FuAA 及其 Cu 配合物的紫外光谱, 发现随着 DNA 量的增加 5FuAA 及 5FuAACu 的紫外吸光度呈逐步增加的趋势, 且两图的抛物线相似, 表明这两种物质与 DNA 的结合方式相似。

参考文献:

[1] WANG Liu-Fang, YANG Zheng-Yin, PENG Zhou-Ren, et al.

- J. Coord. Chem.*, **1993**,**28**(2):167~172
- [2] HUANG Su-Qiu(黄素秋), JIANG Zhao-Ci(姜照慈), LI Le-Zhen(李乐真), et al. *Yaoxue Xuebao(Acta Pharmaceutica Sinica)*, **1991**,**26**(6):415~419
- [3] HUANG JIAN(黄 健). *Thesis for the Master of Lanzhou University*(兰州大学硕士论文). **1998**,40~50
- [4] Geary W J, et al. *Coord. Chem. Rev.*, **1971**,**7**:113~118
- [5] Nakamoto K(中本一雄), Translated by HUANG De-Ru(黄德如), WANG Ren-Qing(汪仁庆). *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compound, Third Edition*(无机和配位化合物 X 红外和拉曼光谱 第三版). Beijing: Chemical Industry Press, 1986.251~255
- [6] CHEN Yao-Zu(陈耀祖). *Organic Analysis* (有机分析). Beijing: Higher Education Press, **1983**.607~610
- [7] LI Lai-sheng(李来生), HUANG Wei-Dong(黄伟东), WANG Li-Ping(王丽苹), et al. *Huaxue Xuebao(Acta Chimica Sinica)*, **2002**,**60**(1):98~104
- [8] CHEN Guo-Zhen(陈国珍). *Florescence Analyse* (荧光分析法). Beijing: Science Press, 1990.112~114
- [9] ZHANG Qian-Ling(张黔玲), LIU Jian-Hong(刘剑洪), REN Xiang-Zhong(任祥忠), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese Journal of Inorganic Chemistry)*, **2003**,**19**(6):645~649
- [10] Carter M T, Rodriguez M, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**,**111**:8901~8911
- [11] Challa V Kumar, Jacqueline, Barton K, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**,**107**:5518~5523
- [12] LIU Chang-Lin(刘长林), YU Si-Wang(余四旺), XU Hui-Bi(徐辉碧), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese Journal of Inorganic Chemistry)*, **2000**,**16**(3):374~384
- [13] ZHANG Shou-Chun (张寿春), SHAO Ying(邵 颖), TU Chao(涂 超), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese Journal of Inorganic Chemistry)*, **2004**,**20**(10):1159~1164