

萘基修饰二乙烯三胺配体的合成、铜离子键合及核酸酶活性

安 燕 刘思东 朱 艳 黄华珍 计亮年 毛宗万*

(中山大学化学与化学工程学院, 广州 510275)

摘要: 本文合成了两个具有平面萘环的二乙烯三胺配体: 4-(α -萘甲基)-二乙烯三胺(L^1)和 4-(β -萘甲基)-二乙烯三胺(L^2), 用元素分析、NMR 和 ESI-MS 等技术分别对它们进行了表征。通过电位滴定研究了这些配体的酸离解常数, 它们与 Cu(II) 离子结合的配位水分子的酸离解常数 pK_a 值, 与未修饰的二乙烯三胺的铜配合物相比, 配合物的配位水分子的酸离解常数 pK_a 值分别降低了 1.09 和 0.59。这有利于配合物在接近生理 pH 值条件下对磷酸二酯键进行亲核活化。通过观察配体及其铜配合物对小牛胸腺 DNA 的粘度影响, 证明配体和配合物可能以插入和部分插入两种方式与 DNA 作用。在无任何还原物质存在的条件下研究了两个配体的铜配合物对质粒 pBR322 DNA 的断裂, 结果表明两个配合物都能够有效切割超螺旋 DNA 为缺刻型 DNA, 且 L^1 的铜配合物具有更高的核酸酶活性。

关键词: 二乙烯三胺; 铜离子; DNA 作用; DNA 断裂

中图分类号: O614.121; O641.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2006)08-1387-05

Diethylenetriamine Derivatives Modified with Naphthalene: Synthesis, Copper(II) Complexes and Their Nuclease Activities

AN Yan LIU Si-Dong ZHU Yan HUANG Hua-Zhen JI Liang-Nian MAO Zong-Wan*

(School of Chemistry & Chemical Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275)

Abstract: Two diethylenetriamine derivatives modified with planar naphthalene ring, 4-(α -naphthylmethyl)-diethylenetriamine and 4-(β -naphthylmethyl)-diethylenetriamine, were synthesized and characterized by elemental analysis, NMR and MS techniques. Their behaviors in solution and Cu(II) binding were determined by potentiometric titration. The presence of hydrophobic rings markedly lowers the pK_a values of Cu²⁺-coordinated water molecules by a factor of 1.09 and 0.59, with pK_a values of 8.4 for [Cu(L^1)(H₂O)₂]²⁺ and 8.9 for [Cu(L^2)(H₂O)₂]²⁺, respectively, comparing with the corresponding one of unmodified diethylenetriamine ($pK_a \sim 9.49$). The affinity to calf thymus DNA of the ligands and their Cu(II) complexes was studied by viscosity experiments. Both ligands and their copper complexes can interact with CT DNA by insert mode. In the absence of H₂O₂ or any reducing agent, supercoiled plasmid pBR322 DNA cleavage by Cu(II) complexes was studied. The result shows that the Cu(II) complex of L^1 is with higher nuclease activity.

Key words: diethylenetriamine; copper ion; DNA affinity; DNA cleavage

在生物工程及医药研究领域, 如何模拟核酸酶对 DNA 的水解断裂一直是人们关注的重点。近年来报道了许多各式各样的模拟体系, 其中有单核化合

物、双核配合物和多核的催化体系^[1-4], 包括许多铜配合物被用作核酸断裂的高效切割试剂。Cu(II)配合物切割核酸包括水解机理和氧化还原机理, 或者两

收稿日期: 2006-06-15。收修改稿日期: 2006-07-27。

国家和广东省自然科学基金(No.20231010, 04009703)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: cesnzw@mail.sysu.edu.cn; Tel: 020-84113788; Fax: 020-84112245

第一作者: 安 燕, 女, 26 岁, 博士研究生; 研究方向: 生物无机化学。

种途径兼而有之^[5]。通常,在有还原物质或 H_2O_2 等附加试剂存在的条件下,核酸会以氧化还原的机理断裂。氧化还原断裂伴随产生容易扩散的氧自由基中间体。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,致使它们不能再连接酶连接而很难被进一步利用,从而大大限制了其应用。因此,与氧化还原断裂相比,水解断裂具有反应条件温和、产物单一、较高的序列特异性和断裂核酸可再连接等优点。在水解断裂中,与金属离子配位的氢氧基对磷酸二酯键的亲核进攻在核酸水解中起着关键的作用^[6],这就意味着,配位水分子的 $\text{p}K_{\text{a}}$ 值是一个非常重要的因素。

对于铜(II)这样具有氧化还原活性的金属离子来讲,饱和胺类配体比非饱和胺类配体(如吡啶类)更适合于用作水解断裂的研究。目前核酸酶活性最高的是一个饱和三胺的铜配合物,其具有非常低的 $\text{p}K_{\text{a}}$ 值(7.3)^[7]。另一个饱和三胺常见配体(二乙烯三胺, dien)的金属配合物因其 $\text{p}K_{\text{a}}$ 值较高,核酸水解能力不强^[8],其修饰物则很少见。为了设计出具有低 $\text{p}K_{\text{a}}$ 值和高 DNA 亲和力的铜配合物,本文分别用 α -甲基萘和 β -甲基萘对 dien 的 4-N 位置进行了修饰(见图 1),并进行了它们与 Cu(II)的键合、DNA 作用及其核酸酶活性研究。

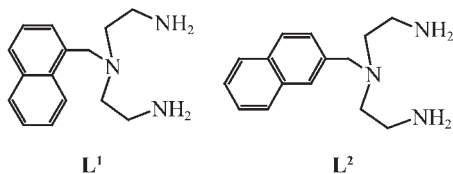


图 1 配体结构图

Fig.1 Structure formula for ligands

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂

二乙烯三胺使用前重蒸干燥。 α -(氯甲基)-萘和 β -(溴甲基)-萘购自 Aldrich。1,7-二邻苯二甲酰基-二乙烯三胺依文献方法合成^[9]。小牛胸腺 DNA(CT DNA) 购自华美生物工程公司。溴乙锭 (EB) 购自 Fluka 公司;pBR322 DNA,三羟甲基氨基甲烷(Tris),氯化钠, N -2-羟乙基哌嗪- N' -2-乙磺酸钠(HEPES Sodium Salt),乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA Disodium Salt),均购自上海生工生物工程有限公司。其他试剂均为市售分析纯试剂。实验用水均为去离子重蒸水。

1.1.2 仪器

Elementar Vario EL 元素分析仪,Varian INOVA 核磁共振仪(500 MHz),紫外-可见分光光度计(CARY 100),LCQ DECA XP 液相色谱-质谱联用仪(配备 ESI 和 APCI),Metrohm 751 GPD Titrino 自动电位滴定仪,电脑三恒多用电泳仪(DYY-12 型)。

1.2 配体的制备

1.2.1 1,7-二邻苯二甲酰基-4-(α -萘甲基)-二乙烯三胺(L^1)

将 1,7-二邻苯二甲酰基-二乙烯三胺(18.15 g, 0.05 mol)和 α -(氯甲基)-萘(8.83 g, 0.05 mol)溶于 150 mL 无水乙醇,在充分搅拌下,向其中加入 7.8 g 无水碳酸钠和 0.3 g 碘化钾,回流 24 h。然后将反应液倒入 1000 mL 冰水中,随之产生白色沉淀。抽滤收集沉淀,用无水乙醇重结晶得到白色粉末 22.83 g,产率 90.7%。元素分析实验值(%):C,73.66;H,5.20;N,8.21;按 $\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$ 计算的理论值(%):C,73.93;H,5.01;N,8.35。

1.2.2 1,7-二邻苯二甲酰基-4-(β -萘甲基)-二乙烯三胺(L^2)

制备方法同 1.2.1,得产物 17.38 g,产率 65.5%。元素分析实验值(%):C,70.04;H,5.05;N,7.96;按 $\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ 计算的理论值(%):C,70.18;H,5.32;N,7.92。

1.2.3 4-(α -萘甲基)-二乙烯三胺高氯酸盐($\text{L}^1 \cdot 3\text{HClO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

向盐酸(80 mL, 9 mol·L⁻¹)和醋酸(20 mL)的混合液中缓慢加入 1,7-二邻苯二甲酰基-4-(α -萘甲基)-二乙烯三胺(10.06 g, 0.02 mol),回流 6 h。待反应液冷却至室温,抽滤除去白色沉淀,滤液旋转蒸发至干。产物溶于 150 mL 无水乙醇,放置直至白色沉淀析出。滤出固体,用冷无水乙醇洗涤,真空干燥,得产品 5.53 g,产率 91.4%。将产品溶于 NaOH 水溶液(20 mL, 2.0 mol·L⁻¹),溶液用氯仿(4 × 15 mL)萃取,有机相用无水 Na_2SO_4 干燥。旋转蒸发除去溶剂,得浅黄色油状物。将其溶于 2:1 的乙醚-乙醇,滴加高氯酸,搅拌至产生沉淀。滤出沉淀,用冷无水乙醇洗涤,真空干燥,得产品 2.3 g,产率 19.8%。元素分析实验值(%):C,30.75;H,4.81;N,7.17;按 $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3 \cdot 3\text{HClO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 计算的理论值(%):C,31.02;H,4.86;N,7.24。电喷雾质谱(+离子)实验值:244.3(100%);[(L^1)H⁺]理论值:244.4(100%)。核磁共振氢谱(D_2O , 500 MHz): δ_{H} (ppm) 7.642~8.218(m, 7.33H, ArH), 4.542

(s, 2.39H, NCH₂Ar), 3.251~3.257(t, 8H, NCH₂CH₂N)。

1.2.4 4-(β-萘甲基)-二乙烯三胺高氯酸盐(L²·4HClO₄·3H₂O)

制备方法同 L¹, 得产物 9.44 g, 产率 67.5%。元素分析实验值(%): C, 25.74; H, 4.91; N, 5.78; 按 C₁₅H₂₁N₃·4HClO₄·3H₂O 计算的理论值(%): C, 25.77; H, 4.47; N, 6.01。电喷雾质谱(+离子)实验值: 244.3(100%); [(L²)H⁺]⁺理论值: 244.4 (100%)。核磁共振氢谱(D₂O, 500 MHz): δ_H (ppm) 7.626~8.119(m, 6.65H, ArH), 4.542(s, 2.39H, NCH₂Ar), 3.432~3.522(t, 8H, NCH₂CH₂N)。

1.3 电位滴定实验

所用仪器为 Metrohm 751 GPD Titrino 自动电位滴定仪, 配备 Metrohm 电极。根据 Gran^[10]方法, 使用标准缓冲液对电极进行校正, 并通过酸碱滴定实验检验校正结果。所有滴定实验均在氮气保护下进行, 温度控制在 35.0 ± 0.1 °C, 离子强度用 NaClO₄ 调节为 0.10 mol·L⁻¹。准备 25 mL 待滴定水溶液, 其中含 1.00 mmol·L⁻¹ 的配体, 3.00 mmol·L⁻¹ 的 HClO₄, 0.1 mol·L⁻¹ 的 NaClO₄, 用 0.1 mol·L⁻¹ 的标准 NaOH 滴定液对其进行滴定, 来测定配体的酸离解常数; 在测定配合物稳定常数和配位水的 pK_a 值时, 向待滴定液中加入 1.00 mmol·L⁻¹ 的铜(II)离子。所有实验均平行测定 2 次取平均值, 偏差小于 1%。滴定数据用 PSEQUAD^[11,12] 程序进行分析, 计算出各平衡常数。

1.4 粘度测试

样品均溶解在缓冲溶液 (5 mmol·L⁻¹ Tris 和 50 mmol·L⁻¹ NaCl, pH=8.1) 中。取稀释后的 CT DNA 溶液用紫外-可见分光光度计测定其在 260 和 280 nm 处的吸光度, 如果 A₂₆₀/A₂₈₀=1.8~1.9, 说明基本上不含蛋白质^[13], 不需进一步处理。CT DNA 的浓度以碱基对的浓度计算, 测定其在 260 nm 处的吸光度, 然后根据 DNA 在 260 nm 处的摩尔吸光系数值 6 600 L·mol⁻¹·cm⁻¹ 来确定 DNA 的浓度^[14]。DNA 溶液的粘度用乌氏粘度计测定。测量时将温度恒定在 27 ± 0.1 °C。测试时固定 CT DNA 的浓度为 0.3 mmol·L⁻¹, 逐渐增加配合物的浓度。测试液的相对粘度按公式 $\eta = (t - t_0) / t_0$ 计算, 其中 t₀ 为缓冲溶液流经毛细管所需的时间, t 为 DNA 溶液(含浓度不等的配合物)流经毛细管的时间。以 (η/η₀)^{1/3} 对配合物的浓度作图^[15], 可以观察到配合物对 DNA 粘度的影响。其中 η₀ 为未与配合物混合的 DNA 溶液的相对粘度。

1.5 DNA 断裂

样品均溶解在缓冲溶液(20 mmol·L⁻¹ HEPES 和

20 mmol·L⁻¹ NaClO₄, pH=8.1) 中, 配合物浓度为 180 μmol·L⁻¹ 反应温度为 37 ± 0.1 °C, 反应结束加 4 μL 终止液(溴酚蓝, 50%甘油, 2 mmol·L⁻¹ EDTA) 终止反应, 将样品加在 0.9% 的琼脂糖凝胶样品孔中, 在 70 mV 电压下电泳 120 min, 电泳结束将凝胶放入 EB 溶液中染色 5 min, 取出凝胶, 在紫外灯下拍照, 观察配合物对 pBR322 质粒 DNA 的断裂情况。

2 结果与讨论

2.1 铜离子键合与溶液中的物质分布

通过电位滴定实验测定了配体的酸离解常数(K_a)、配体与铜离子结合的稳定常数(K_{ML})和配位水分子的酸离解常数(pK_a), 所得结果列于表 1。

表 1 平衡常数列表

Table 1 Table of the equilibrium constants

Species / Reaction	dien ^[16]	L ¹	L ²
		lgK _a	
L + H ⁺ = HL ⁺	10.18	9.38	9.40
HL ⁺ + H ⁺ = H ₂ L ²⁺	9.41	9.06	9.27
H ₂ L ²⁺ + H ⁺ = H ₃ L ³⁺	4.83	3.12	3.03
		lgK _{ML}	
L + [Cu(H ₂ O) ₆] ²⁺ = [Cu(L)(H ₂ O) ₅] ²⁺	16.55	12.7	13.3
		pK _a	
[Cu(L)(H ₂ O) ₅] ²⁺ = [Cu(L)(H ₂ O) ₄ OH] ⁺ + H ⁺	9.49	8.4	8.9
[Cu(L)(H ₂ O)OH] ⁺ = [Cu(L)(OH) ₂] + H ⁺	—	9.7	10.0

图 2 是配体的物种分布曲线。结果显示, 在所测定的 pH 值范围内, 两配体均可结合 3 个质子。前 2 个质子离解常数几乎相等, 均在偏碱性的范围内, 第 3 个质子离解常数的 pH 却显著降低到 3 左右。这种行为在多胺化合物中较为常见, 这是由于前 3 个胺基质子化后, 胺基上正电荷的静电排斥作用使第 3 个质子难以结合。

铜配合物的物种分布曲线见图 3。与 dien 相比, 修饰后的配体的铜配合物的稳定常数相对较低。配合物的电子吸收光谱显示其最大吸收峰在 810 nm, 说明铜离子具有近似的三角双锥构型, 也就是说有 2 个水分子与铜离子配位, 这与电位滴定结果吻合。L¹ 和 L² 的铜配合物的配位水分子的 pK_a 值分别为 8.4(1) 和 8.9(1), 比 dien 配合物的配位水分子 pK_a 值 (9.49) 降低了, 且 L¹ 降低的尤为显著, 原因是由于萘环产生局部疏水环境所致。因此, 配位的水分子在弱碱性溶液中可以部分去质子, 这有利于配位氢氧基对磷酸二酯键的亲核活化, 从而导致磷酸二酯键

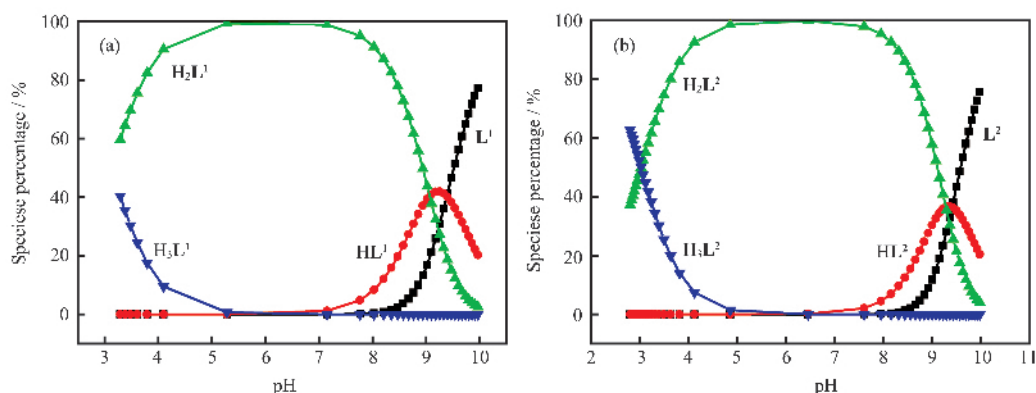


图 2 配体的物种分布曲线

Fig.2 Species distribution curves of ligands

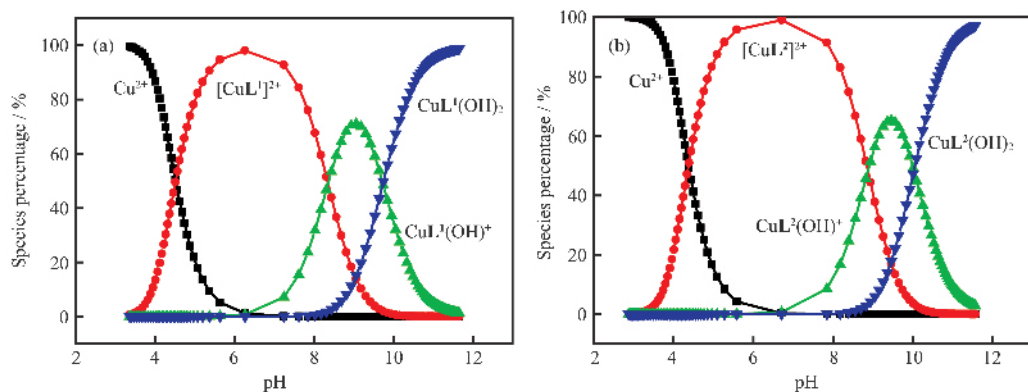


图 3 铜配合物的物种分布曲线

Fig.3 Copper(II)-containing species distribution curves of the ligands

的水解断裂。

2.2 配体及其铜配合物与 CT DNA 作用的粘度分析

粘度测定法被认为是在缺乏晶体数据的情况下确定键合模式最有力的证据之一^[17,18]。粘度值对分子长度变化非常敏感,当配合物通过经典插入方式与

DNA 作用时,DNA 相邻碱基对的距离会变大以容纳插入配体,导致 DNA 双螺旋伸长,DNA 溶液的粘度增加;当以静电、沟面结合等非插入方式与 DNA 作用时,DNA 溶液的粘度无明显变化;以部分插入方式与 DNA 作用时,则可能使 DNA 碱基对的相对位置发生变化,导致双螺旋发生扭曲,使 DNA 溶液

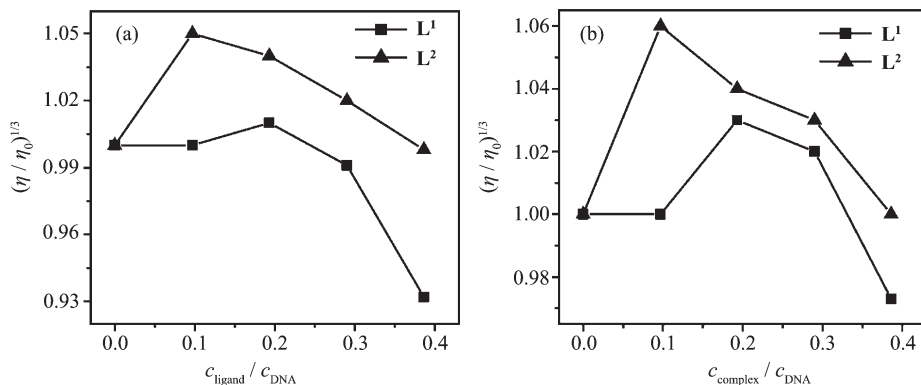


图 4 CT DNA 相对粘度随配体及配合物加入量的变化(a)配体,(b)配合物

Fig.4 Effect of ligands and complexes on the relative viscosity of CT DNA

粘度减小^[17,18]。

电位滴定的结果显示, 在 pH 值为 8.0~9.5 的范围内, 铜配合物主要以 $[\text{Cu}(\text{L})(\text{OH})]^+$ 的形式存在。因此, 我们在研究配合物与 DNA 的作用和对 DNA 的水解时选择 8.1 的 pH 值, 此时自由铜离子和 $\text{CuL}(\text{OH})_2$ 物种可以忽略。通过测定配体及配合物对 CT DNA 粘度的影响来揭示它们与 DNA 的作用模式, 测得的相对粘度图见图 4。图 4 表明, 随着配体和配合物加入量增加, DNA 的相对粘度变化趋势先增加后减小, 由此我们推测: 配体和配合物可能以插入和部分插入两种方式与 DNA 作用。当配体和配合物浓度较低时, DNA 双螺旋结构中容纳插入的空位较多, 配体和配合物主要以插入模式与 DNA 作用, 结果导致 DNA 粘度随着配体和配合物浓度的增加而增加; 然而, 随着配体和配合物浓度升高, DNA 的空位不断减少, 当浓度达到一定值时, 使得配体和配合物主要以部分插入模式与 DNA 作用, 结果导致 DNA 粘度随着配体和配合物的浓度增加而减少。

2.3 配合物的核酸酶活性

图 5 是 $180 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的配合物在溶液 pH=8.1 时不同反应时间下断裂 pBR322 DNA 的电泳图。由图中可见, 反应 1 h 后就会有线型的 Form III DNA 出现, 此时超螺旋型的 Form I 还没完全转变为缺刻型的 Form II, 这一现象可以作为证明双链断裂存在的有力证据。另外还可以看出, L^1 的配合物对 DNA 的断裂效果比 L^2 好, 尤其是在反应 24 h 后, L^1 的配合物已经可以将 Form I 全部断裂完。这是由于 L^1 铜配合物的配位水分子的 pK_a 值(8.4)比 L^2 的铜配合物(8.9)低, 其配位水分子更容易去质子化, 在 pH 恒定的弱碱性溶液中, $[\text{Cu}(\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})\text{OH}]^+$ 的浓度比

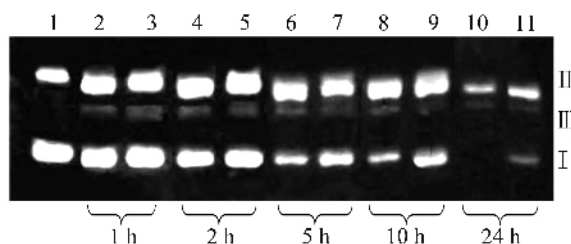
$[\text{Cu}(\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})\text{OH}]^+$ 的浓度高, 因此更有利于配位氢氧基对磷酸二酯键的亲核活化从而加速磷酸二酯键的水解断裂。

3 结 论

分别用 α -甲基蔡和 β -甲基蔡对二乙烯三胺进行了修饰, 得到了 2 个蔡环修饰的二乙烯三胺配体。与未修饰的二乙烯三胺及其铜配合物相比, 电位滴定研究表明, 修饰后配体的铜配合物的配位水分子的酸离解常数 pK_a 值明显降低。粘度实验结果表明, 配体和配合物以插入和部分插入两种方式与小牛胸腺 DNA 作用。通过凝胶电泳实验对配合物断裂质粒 DNA 的实验结果表明, L^1 的铜配合物的核酸酶活性明显高于 L^2 的铜配合物。

参考文献:

- [1] Mancin F, Scrimin P, Tecilla P, Tonellato U. *Chem. Commun.*, **2005**:2540~2548
- [2] Suh J. *Acc. Chem. Res.*, **2003**, **36**:562~570
- [3] Sreedhara A, Cowan J A. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2001**, **6**:337~347
- [4] Chen C H B, Milne L, Landgraf R, et al. *Chem. Bio. Chem.*, **2001**, **2**:735~740
- [5] Sigman D S, Mazumder A, Perrin D M. *Chem. Rev.*, **1993**, **93**:2295~2316
- [6] Williams N H, Takasaki B, Wall M, et al. *Acc. Chem. Res.*, **1999**, **32**:485~493
- [7] Sissi C, Mancin F, Gatos M, et al. *Inorg. Chem.*, **2005**, **44**:2310~2317
- [8] Yang P, Ren R, Guo M L, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2004**, **9**(4):495~506
- [9] Fu H, Zhou Y H, Chen W L, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, **128**:4924~4925
- [10] Gran G. *Acta Chem. Scand.*, **1950**, **4**:559~571
- [11] Gans P, Sabatini A, Vacca A. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1985**:1195~1120
- [12] David J L. *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*. New York: Plenum Press, **1985**.ch.8
- [13] Marmur J. *J. Mol. Biol.*, **1961**, **3**:208~218
- [14] Reichmann M E, Rice S A, Thomas C A, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, **76**:3047~3053
- [15] Cohen G, Eisenberg H. *Biopolymers*, **1969**, **8**:45~55
- [16] Gampp H, Sigel H, Zuberhuhler A D. *Inorg. Chem.*, **1982**, **21**:1190~1195
- [17] Satyanarayana S, Dabrowiak J C, Chaires J B. *Biochemistry*, **1992**, **31**:9319~9324
- [18] Satyanarayana S, Dabrowiak J C, Chaires J B. *Biochemistry*, **1993**, **32**:2573~2584



1: DNA control; 2, 4, 6, 8, 10: CuL^1 ; 3, 5, 7, 9, 11: CuL^2

图 5 $180 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的配合物断裂 $38 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pBR322 DNA 的凝胶电泳图

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of $38 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pBR322 DNA treated with $180 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ complexes