

Sm(III)(MTB)₂ 配合物与 DNA 作用的光谱法研究

黎泓波 王兴明* 刘海萍 胡亚敏 杨定明 石荣铭 董发勤

(西南科技大学材料科学与工程学院化学系, 绵阳 621010)

关键词: Sm(III)(MTB)₂ 配合物; 甲基百里酚蓝; 中性红; DNA

中图分类号: O614.337 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2006)09-1695-06

Interaction between Sm(III)(MTB)₂ Complex and DNA by Spectrometry

LI Hong-Bo WANG Xing-Ming* LIU Hai-Ping HU Ya-Min

YANG Ding-Ming SHI Rong-Ming DONG Fa-Qin

(Department of Chemistry, Institute of Materials Science and Engineering, Southwest University of
Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010)

Abstract: The interaction between Sm(III)(MTB)₂ complex and Herring Sperm DNA has been studied by UV-Vis spectral, Fluorescence spectral in buffer solution of Tris-HCl (pH=7.25) using Neutral Red (NR) as a probe. The intercalation and electrostatic manner are confirmed to be the two major modes for interaction between Sm(III)(MTB)₂ complex and Herring Sperm DNA. The balance constant of Sm(III)(MTB)₂ rare earth metal complex and Herring Sperm DNA is $K=4.10 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. The results indicate that biological functions of Herring Sperm DNA are changed to a certain extend due to the interaction between Sm(III)(MTB)₂ rare earth metal complex and Herring Sperm DNA.

Key words: Sm(III)(MTB)₂ complex; methyl thymol blue complexon; Neutral Red; DNA

0 引言

脱氧核糖核酸 DNA 是生物体的重要生命遗传物质,它包含了遗传信息、密码并参与这些信息、密码在细胞内的表达,从而控制生物体的整个正常的生命过程。DNA 分子内遗传信息、密码的错读和 DNA 的损伤,会导致细胞的突变和癌变等^[1]。人们为了从分子水平上理解某些疾病的发病机理,通过分子设计来寻找有效的治疗药物,DNA 往往是科学工作者进行药物设计时的重要靶标。

癌症是人类生命安全的最大威胁之一,现在临床上使用的顺铂等抗癌药物的肾毒性、肠胃毒性及

长期使用所产生的耐药性仍未解决^[2]。Hollis 等认为现在顺铂类药物已经发展到了比较成熟的地步,要想设计出更好的抗肿瘤药物,就得突破顺铂类药物的限制,寻找新一类的抗肿瘤药物^[3]。而小分子及其稀土配合物作为一种潜在的抗癌药物日益引起科学工作者的关注^[4-6]。

荧光染料 EB 是核酸与其键合试剂的相互作用方式的常用探针^[7,8],但 EB 溶液很不稳定,而且是一种强烈的癌症诱变剂^[9]。中性红(NR)是一种常见的生物染料和光谱探针^[10],它也以嵌入作用方式与 DNA 相结合,其作用方式已被荧光光谱法及电化学方法等技术证实^[11-14],且 NR 毒性未见报道,水溶液可长

收稿日期:2006-03-21。收修改稿日期:2006-05-18。

国家自然科学基金资助项目(No.40072020)。

*通讯联系人。E-mail: xmwang_xkd@126.com

第一作者:黎泓波,28岁,男,在读硕士研究生;研究方向:化学生物学。

时间放置,所以 NR 是一种较好的绿色光谱探针。本实验以 NR 作为光谱探针,用紫外-可见光谱、荧光光谱研究了甲基百里酚蓝(MTB)及 Sm(III)(MTB)_2 配合物与鲑鱼精 DNA 的相互作用(尚未见文献报道),探讨了 Sm(III)(MTB)_2 配合物与鲑鱼精 DNA 的作用方式,为开发稀土配合物类型的抗癌药物提供了有益的信息。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UV-210 型紫外可见光谱仪(日本岛津),RF-540 荧光仪(Hitachi, Japan),pHS-2C 型酸度计(成都方舟科技开发公司)。甲基百里酚蓝(MTB, 上海试剂三厂, A.R.), 鲑鱼精 DNA (Sigma 公司, A.R.), 中性红(NR, 上海三爱思试剂有限公司, A.R.), Sm_2O_3 (北京方正稀土科技研究所有限公司, 99.99%), 三羟甲基氨基甲烷(天津市科密欧化学试剂开发中心, A.R.), Tris-HCl 缓冲溶液(配置方法: 准确称取 12.114 g 三羟甲基氨基甲烷, 用二次蒸水溶解并定容至 1000 mL, 用 0.10 mol·L⁻¹ 的 HCl 调节 pH 值), 其他试剂均为分析纯试剂, 水为二次重蒸水。

1.2 实验方法

1.2.1 配制 SmCl_3 溶液

用浓盐酸将 Sm_2O_3 溶解, 小火蒸发掉水和过量的盐酸至白色粉末状, 加 Tris-HCl 缓冲溶液配制成一定浓度的 SmCl_3 溶液。

1.2.2 紫外-可见光谱法

在 1 cm 比色皿中, 加入 3.60 mL pH=7.25 的 Tris-HCl 缓冲溶液配制的相关溶液, 以试剂空白为参比, 通过滴定法扫描吸收光谱或测定吸光度。滴定时每次加入体积为 10 μL , 因此可忽略体积效应。

1.2.3 荧光光度法

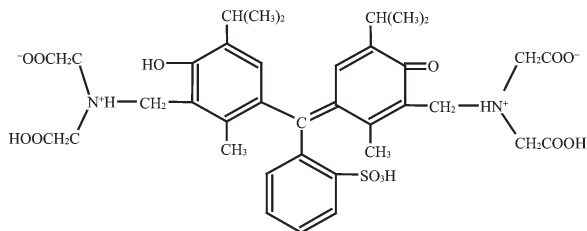
在一系列 10 mL 比色管中, 分别加入一定量的 pH=7.25 的 NR-DNA 溶液, 再加入 MTB 或 Sm(III)(MTB)_2 溶液, 用 pH=7.25 的 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至刻度, 摇匀, 放置 20 min, 扫描荧光光谱或测定荧光强度, 激发和发射光谱扫描的狭缝宽度均为 5.0 nm。

在 1 cm 比色皿中, 加入 3.60 mL DNA 溶液或 Sm(III)(MTB)_2 -DNA 溶液, 用 NR 溶液进行滴定, 摇匀, 放置 20 min, 扫描荧光光谱或测定荧光强度。滴定时每次加入体积为 10 μL , 因此可忽略体积效应。激发和发射光谱扫描狭缝宽度均为 5.0 nm。

2 结果与讨论

2.1 紫外-可见光谱法

甲基百里酚蓝(MTB)的分子结构见图式 1, 其 pK 分别为 $\text{pK}_{\text{H}_2\text{L}^+} < 0$ 、 $\text{pK}_{\text{H}_2\text{L}^{3-}} = 7.20$ 、 $\text{pK}_{\text{H}_2\text{L}^{4-}} = 11.15$ 、 $\text{pK}_{\text{HL}^{5-}} = 13.40$ 。



图式 1 MTB 结构示意图

Scheme 1 Structure of MTB

2.1.1 摩尔比法测定配合物的结合比

在 pH=7.25 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 固定 MTB 的浓度, 改变 Sm 的浓度, 在配合物最大吸收峰 571 nm 处, 以试剂空白作参比测定吸光度, 平行测定 5 次的平均结果如图 1。即 MTB 与 Sm 形成了 2:1 型配合物 Sm(III)(MTB)_2 。由 MTB 的分子结构(见图式 1)可知, MTB 分子中的 2 个羧酸根带负电荷的氧原子和磺酸基上的氧原子可能为配位原子, 因此 Sm(III)(MTB)_2 的空间构型估计为八面体。根据 Beer 定律, 配合物 Sm(III)(MTB)_2 在溶液中的吸光度可表达为 $A = \varepsilon b C$ 。式中 A 代表 Sm(III)(MTB)_2 的吸光度, ε 代表 Sm(III)(MTB)_2 的摩尔吸光系数, C 代表 Sm(III)(MTB)_2 的浓度, b 代表比色皿的厚度。因此, 根据图 1 计算求得 Sm(III)(MTB)_2 的表观摩尔吸光系数 $\varepsilon = 2.01 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

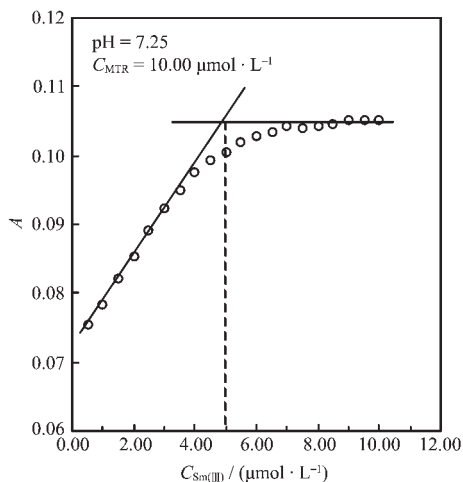


图 1 摩尔比法

Fig.1 Molar ratio method

2.1.2 摩尔比法测定 Sm(III)(MTB)₂-DNA 的结合比

在 pH=7.25 的 Tris-HCl 缓冲溶液中,固定 Sm(III)(MTB)₂ 的浓度,改变 DNA 的浓度,在 Sm(III)(MTB)₂-DNA 复合物最大吸收峰 604 nm 处,以试剂空白作参比测定吸光度,结果如图 2。表明 Sm(III)(MTB)₂ 与 DNA 形成了 1:1 型复合物。

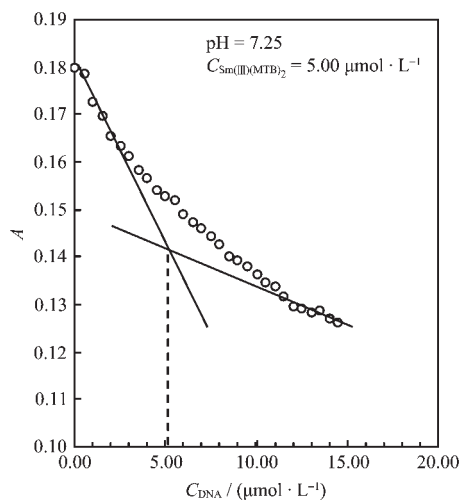


图 2 摩尔比法
Fig.2 Molar ratio method

2.1.3 双倒数法测定结合常数

紫外-可见光谱法是研究小分子及其稀土配合物与核酸相互作用的最常用、方便的方法。固定 Sm(III)(MTB)₂ 配合物浓度,每次等体积 DNA 溶液滴定,扫描吸收光谱。由双倒数公式^[15]作图,如图 3 所示。

$$1/(A_0 - A) = 1/A_0 + 1/(K \times A_0 \times C_{\text{DNA}})$$

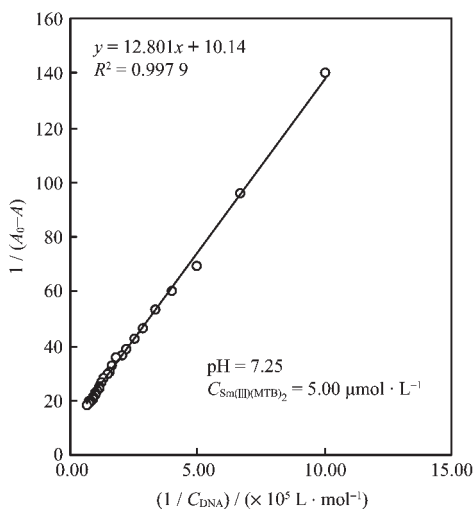
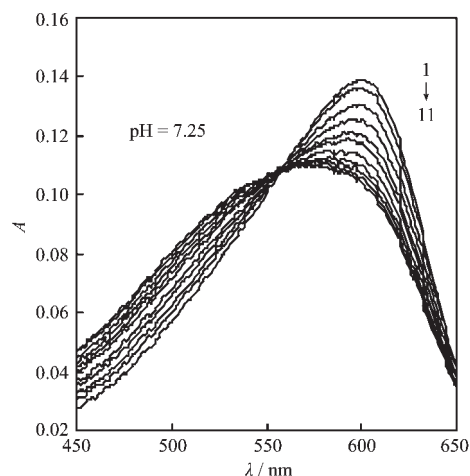


图 3 双倒数法
Fig.3 Double reciprocal method

式中 A_0 和 A 分别为加入 DNA 前后药物的吸收, K 为结合常数。由图 3 得到 Sm(III)(MTB)₂ 与 DNA 的结合常数 $K = 4.10 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

2.1.4 Sm(III)(MTB)₂ 与 DNA 作用的吸收光谱

具有双螺旋结构的 DNA 分子含有芳环碱基和磷酸生色基团, DNA 的碱基及磷酸氧是许多药物的作用位点。固定 Sm(III)(MTB)₂ 的浓度,逐渐增加 DNA 的浓度,测定各溶液的吸收光谱,如图 4 所示。由图可知,随着 DNA 浓度的增大(图中曲线由 1 → 11),它们的吸收峰降低,峰变宽,并出现了等吸收点,同时最大吸收峰蓝移(由 601 nm → 582 nm)。因此认为 DNA 与 Sm(III)(MTB)₂ 配合物结合形成了复合物。而增色效应、减色效应和等吸收点是 DNA 特有的与其双螺旋结构密切相关的光谱性质^[16], 主要说明 DNA 与 Sm(III)(MTB)₂ 间发生了一定的嵌插作用。



$C_{\text{Sm(III)(MTB)}_2} = 5.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $C_{\text{DNA}} = 0.18 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
(10 μL per scan), 1~11: 0~100 μL

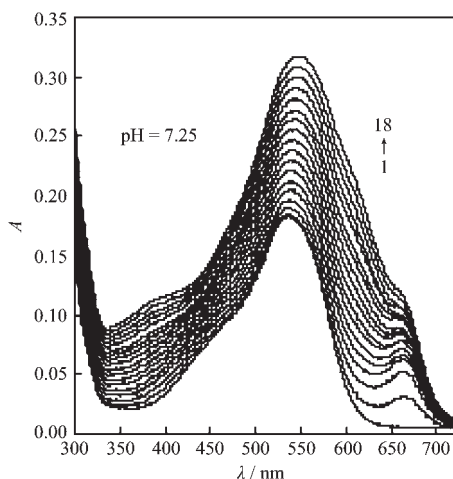
图 4 电子吸收光谱

Fig.4 Electronic absorption spectra

2.1.5 NR 为探针研究 Sm(III)(MTB)₂ 配合物与 DNA 的相互作用

当向 NR-DNA 溶液中加入 Sm(III)(MTB)₂ 后, NR-DNA 的吸光度增加,最大吸收峰红移(536 nm → 550 nm),如图 5 所示。实验中我们知道 NR-DNA 复合物和 Sm(III)(MTB)₂ 配合物在 $\lambda = 669 \text{ nm}$ 处都没吸收峰,但当在 NR-DNA 复合物溶液滴加 Sm(III)(MTB)₂ 配合物时,产生了一个新的吸收峰,这可能是 Sm(III)(MTB)₂ 配合物中的钐稀土离子由于有富余的配位空间而与 DNA 骨架上的磷酸氧发生配位作用,使 DNA 的构象发生了某种扰动,这样也影响了 NR 与 DNA 之间的结合,从而导致新的吸收峰出现,随着 Sm(III)(MTB)₂

配合物加入,增色效应减弱。而最大吸收峰红移,这可认为是 Sm(III)(MTB)_2 的大环 π^* 共轭体系与 DNA 碱基的大 π 共轭体系之间发生强烈的相互作用,产生 π 电子堆积,其 π^* 空轨道与碱基的 π 电子轨道发生偶合,使能级下降,导致 π - π^* 跃迁能减小,产生红移。



$C_{\text{DNA}}=5.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $C_{\text{NR}}=5.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 $C_{\text{Sm(III)(MTB)}_2}=0.18 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (10 μL per scan),
 1~18: 0~170 μL

图 5 电子吸收光谱

Fig.5 Electronic absorption spectra

2.2 荧光光谱法

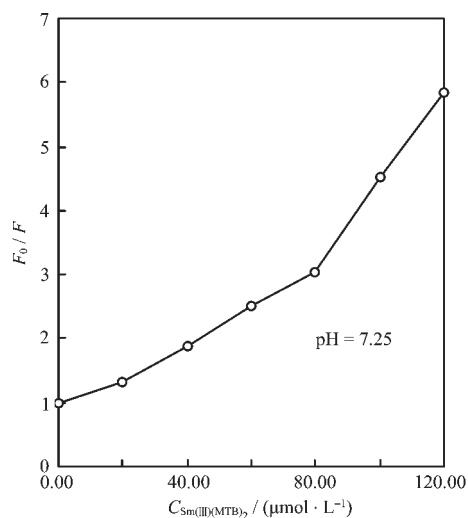
2.2.1 荧光猝灭法判断作用方式

测定不同浓度的 Sm(III)(MTB)_2 配合物存在下 DNA-NR 体系的荧光强度和在不同浓度的 MTB 存在下 DNA-NR 体系的荧光强度,根据 Stern-Volmer 方程:

$$F_0/F - 1 = K_q \cdot C_q$$

式中 F_0 与 F 分别为猝灭剂不存在和存在时体系的荧光强度, K_q 是 Stern-Volmer 猝灭常数, C_q 为猝灭剂浓度。以 F_0/F 对猝灭剂浓度 C_q 作图,得到了对 Sm(III)(MTB)_2 配合物和 MTB 分别在 DNA-NR 中的荧光猝灭曲线,结果见图 6 和图 7。根据经典的荧光猝灭理论^[7],无论静态猝灭或动态猝灭, F_0/F 对猝灭剂浓度 C_q 作图均应得到一条直线。由图 6 和图 7 可知,无论以 Sm(III)(MTB)_2 配合物的浓度对 DNA-NR 体系的 F_0/F 作图,还是以 MTB 的浓度对 DNA-NR 体系的 F_0/F 作图,实验得到的猝灭曲线均不是直线。因此认为猝灭剂对 DNA-NR 体系荧光猝灭并非单纯的动态或静态猝灭,而是两种猝灭方式共同作用的结果。这有两种可能性:(1) MTB 或 Sm(III)(MTB)_2

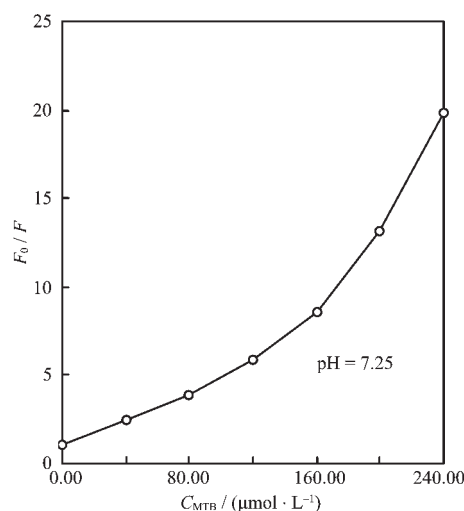
与 DNA-NR 的非嵌插作用使 DNA 的骨架聚拢,将嵌插于 DNA 的 NR 分子挤出;(2) MTB 或 Sm(III)(MTB)_2 与 DNA 发生嵌插作用,将 NR 分子置换出来。实验表明 MTB 和 Sm(III)(MTB)_2 配合物与 DNA 的作用方式为非嵌插作用和嵌插作用两种方式。



$C_{\text{DNA}}=20.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $C_{\text{NR}}=4.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 6 Sm(III)(MTB)_2 对 NR-DNA 的荧光猝灭曲线

Fig.6 Fluorescence quenching curve of the Sm(III)(MTB)_2 complex to NR-DNA



$C_{\text{DNA}}=20.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{NR}}=4.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 7 MTB 对 NR-DNA 体系的荧光猝灭曲线

Fig.7 Fluorescence quenching curve of the MTB to NR-DNA

2.2.2 NR 为荧光探针研究 Sm(III)(MTB)_2 与 DNA 的作用方式

以 NR 为荧光探针研究 Sm(III)(MTB)_2 配合物与 DNA 的相互作用,因为 NR 能嵌入到双螺旋 DNA

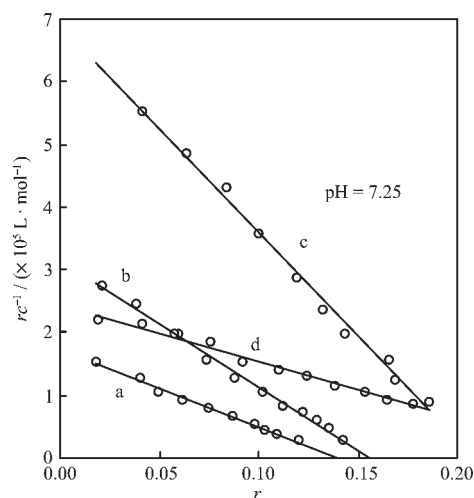
链的碱基对之间,使荧光强度增强^[12]。

在 Sm(III)(MTB)₂-DNA 体系中滴加 NR,引起荧光强度变化,因此利用 Sm(III)(MTB)₂ 配合物存在下 NR 与 DNA 作用的 Scatchard 图可判别配合物与 DNA 的作用方式。即 NR 与 DNA 作用的特点可用 Scatchard 方程阐述^[7]:

$$r/c = K(n-r)$$

式中 r 为每个核苷酸结合 NR 的分子数, c 为 NR 游离浓度, n 为 r 最大值, K 为单个位点固有的键合常数。以 r/c 对 r 作图,得一直线。若该直线与不存在 Sm(III)(MTB)₂ 配合物下 NR 的 Scatchard 图有相同的 n 值,则该物质与 DNA 的作用方式为嵌插方式;若与 NR 的 Scatchard 图有相同的 K 值,则该物质与 DNA 的作用为非嵌插方式;若该直线与 NR 的 Scatchard 图的 K 和 n 均不同,则该物质与 DNA 的作用为混合方式。不同浓度 Sm(III)(MTB)₂ 配合物存在下的 Scatchard 图中 K 值和 n 值的变化表明(如图 8 和表 1):Sm(III)(MTB)₂ 配合物无论在高浓度还是在低浓度时,其 K 和 n 值都发生改变,表明其与 DNA 之间的作用为混合作用模式,即非嵌插和一定的嵌插方式两种作用方式。在高浓度时 NR 的 K 值减小,这是除了 Sm(III)(MTB)₂ 配合物以非嵌插方式与 DNA 碱

基作用外,与 NR 发生一定程度的竞争作用使 NR 的 K 值相应减小。



$$C_{\text{Sm(III)(MTB)}_2} = 20.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}; C_{\text{DNA}} = 2.50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1};$$

$$C_{\text{NR}} = 0.40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ (10 } \mu\text{L per scan)}; \text{Rt} = C_{\text{Sm(III)(MTB)}_2} / C_{\text{DNA}};$$

$$\text{a: Rt}=0.00; \text{b: Rt}=0.16; \text{c: Rt}=0.48; \text{d: Rt}=0.54$$

图 8 Sm(III)(MTB)₂ 配合物与 NR-DNA 体系相互作用的 Scatchard 图

Fig.8 Scatchard plots of the interaction between Sm(III)(MTB)₂ complex and NR-DNA

表 1 Sm(III)(MTB)₂ 配合物与鲑鱼精 DNA 的相互作用的 Scatchard 方程

Table 1 Data of Scatchard Equation of the interaction between Sm(III)(MTB)₂ complex and DNA

Curve in Fig.8	$C_{\text{Sm(III)(MTB)}_2} / C_{\text{DNA}}$	Scatchard equation	$K / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n
a	0.00	$1.74 \times 10^5 - 1.24 \times 10^6 X$	1.24×10^6	0.14
b	0.16	$3.16 \times 10^5 - 2.08 \times 10^6 X$	2.08×10^6	0.16
c	0.48	$6.92 \times 10^5 - 3.31 \times 10^6 X$	3.31×10^6	0.21
d	0.54	$2.45 \times 10^5 - 9.14 \times 10^5 X$	9.14×10^5	0.27

3 结 论

以中性红 (NR) 作为光谱探针,通过光谱法研究了 pH=7.25 的 Tris-HCl 缓冲溶液中,MTB 及 Sm(III)(MTB)₂ 配合物与鲑鱼精 DNA 的作用,求得了 Sm(III)(MTB)₂ 配合物与 DNA 作用的结合常数。Sm(III)(MTB)₂ 配合物分子中 MTB 的 3 个苯环之间有一 sp^2 杂化的碳原子,该碳原子的 p 轨道与 3 个苯环的大 π 轨道平行重叠形成平面结构,虽不是刚性平面,但却是 Sm(III)(MTB)₂ 配合物可以与 DNA 以嵌插方式作用的结构依据。中性红(NR)是较好的绿色光谱探针,Sm(III)(MTB)₂ 配合物具有一定的生物活性,可能具有潜在的抗肿瘤功能。

参考文献:

- [1] Holmlin R E, Dandliker P J, Barton J K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1997,36:2714~2730
- [2] Krakoff I H. *Cancer Treat. Rev.*, **1979**,**63**:1523~1530
- [3] Hollis L S. in "Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy". ed. by Howell S B, New York: Plenum Press, **1991**.116
- [4] WANG Min(王 敏), LI Yi-Zhi(李一志), LI Qin-Xi(李勤喜), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2000**, **16**(5):710~714
- [5] LI Jin-Zhou(李锦州), AN Yu-Mei(安郁美), WANG Tian-Chi(王天赤), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2004**,**20**(8):983~986

- [6] ZHANG Yong-Pin(张永平), FAN Li-Yan(范丽岩), TANG Ning(唐宁), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2001**,**17**(3):427~430
- [7] Lepecq J B, Paoletti C. *J. Mol. Biol.*, **1967**,**27**:87~106
- [8] JIN Lan(靳兰), YANG Pin(杨频), LI Qing-Shan(李青山). *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao(Chemical Journal of Chinese Universities)*, **1996**,**17**(9):1345~1347
- [9] LI Jian-Wu(李建武), YANG Rui-Yuan(杨瑞元). *Principle and Methods of Biochemistry Laboratory(生物化学实验原理和方法)*. Beijing: Peking University Press, **1994**.
- [10] WANG Zhen-Xin(王振新), ZHANG Zhi-Ling(张智玲), LIU Dian-Jun(刘殿骏), et al. *Spectrochimica Acta Part A*, **2003**, **59**:949~956
- [11] CAO Ying(曹瑛), HE Xi-Wen(何锡文). *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao(Chemical Journal of Chinese Universities)*, **1998**,**19**(5):714~716
- [12] CAO Ying(曹瑛), LI Yi-Jun(李一俊), HE Xi-Wen(何锡文). *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao(Chemical Journal of Chinese Universities)*, **1999**,**20**(5):709~712
- [13] ZHOU Jia-Hong(周家宏), JIANG Hui-Jun(姜慧君), FENG Yu-Ying(冯玉英), et al. *Yinyong Huaxue(Chinese Journal of Applied Chemistry)*, **2001**,**18**(12):994~997
- [14] LIU Dian-Jun(刘殿骏), WANG Zhen-Xin(王振新), DONG Shao-Jun(董绍俊). *Fenxi Shiyanshi(Chinese Journal of Analysis Laboratory)*, **2002**,**21**(4):54~57
- [15] Purcell M, Neault J F, Riahi T. *Biochem. Biophys. Acta*, **2000**,**1478**(1):61~68
- [16] SHEN Tong(沈同). *Biochemistry(生物化学)*. Beijing: People's Education Press, **1980**.135~136
- [17] CHEN Guo-Zhen(陈国珍), HUANG Xian-Zhi(黄贤智), ZHENG Zhu-Zi(郑朱梓), et al. *Fluorescence Analytical Method(荧光分析法)*. Beijing: Science Press, **1990**.263