

铈的 α -噻吩甲酰三氟丙酮-哌啶配合物与 DNA 的键合研究

张改清^{1,2} 阴彩霞^{*2} 霍方俊³ 吴艳波² 杨 频^{*2}

(¹ 吕梁高等师范专科学校化学系, 吕梁 033000)

(² 山西大学分子科学研究所, 山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

(³ 山西大学应用化学研究所, 太原 030006)

摘要: 合成了 α -噻吩甲酰三氟丙酮-哌啶合铈($\text{CeTTA}_4 \cdot \text{HP}$)配合物, 测定其晶体结构, 并用紫外光谱、荧光光谱、热变形、电化学、粘度和理论模拟研究了配合物与 DNA 的键合特性。结果表明: 化合物与 DNA 以插入模式进行作用。

关键词: α -噻吩甲酰三氟丙酮-哌啶合铈($\text{CeTTA}_4 \cdot \text{HP}$); 配合物; 晶体结构; 光谱; 键合特性

中图分类号: O614.33² 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2009)05-0428-05

DNA-Binding Spectra Studies of Complex Ce(III) with 2-Thenoyltrifluoroacetone-Piperidine Ligands

ZHANG Gai-Qing^{1,2} YIN Cai-Xia^{*2} HUO Fang-Jun³ WU Yan-Bo² YANG Pin^{*2}

(¹Department of Chemistry, Lüliang Teachers College, Lüliang, Shanxi 033000)

(²Institute of Molecular Science, Key Lab of Chemical Biology and Molecular Engineering(MOE),
Shanxi University, Taiyuan 030006)

(³Research Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract: A kind of Ce(III) complex with $\text{TTA}_4 \cdot \text{HP}$ (TTA = 2-Thenoyltrifluoroacetone, HP = Piperidine) has been synthesized and characterized. DNA-binding properties of $\text{CeTTA}_4 \cdot \text{HP}$ were investigated using UV spectra, fluorescent spectra, thermal denaturation, CV (cyclic voltammetry), viscometry and molecular modeling. The results showed that the binding-mode between $\text{CeTTA}_4 \cdot \text{HP}$ and DNA is intercalation.

Key words: 2-thenoyltrifluoroacetone-piperidine Ce(III) ; complex; crystal structure; spectra; DNA-binding properties

近年来, 对小分子与核酸等生物大分子的作用研究, 一直是热门的研究领域^[1-6]。金属配合物与 DNA 作用时, 常会诱发许多化学和生物效应, 因此它可作为 DNA 结构和构象探针, 并为选择配合物类抗癌药物提供理论指导。小分子配合物与 DNA 作用是通过一系列弱相互作用进行: 如在碱基对之间芳香杂环基团的插入, 由此产生 π -堆积作用从而稳定 DNA; 通过形成氢键和范德华力与 DNA 的双螺旋沟结合; 配合物阳离子与 DNA 中磷酸基团的氧负离子静电结合。配合物与 DNA 相互作用, 会引起各自的

性质变化, 借助适当的实验手段对其研究, 可以准确的阐明其作用机理。稀土- α -噻吩甲酰三氟丙酮-哌啶配合物早在 20 多年前就被合成^[7,8], 并给出了其中一些配合物的 X 射线晶体结构分析结果^[8]。然而, 人们多数的兴趣集中于把它们作为发光材料、生物组织探针和核磁位移试剂^[9,10], 且对这些方面, 从实验上和理论上研究都较多^[11,12]。本文通过 X 射线衍射表征了铈的 α -噻吩甲酰三氟丙酮-哌啶配合物结构, 并用紫外光谱、荧光光谱、热变形、电化学、粘度和理论模拟等手段, 研究了其与小牛胸腺 DNA 的结合机制。

收稿日期: 2008-09-01。收修改稿日期: 2008-12-15。

国家自然科学基金(No.20801032)、山西省归国基金(2008)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: yincx@sxu.edu.cn; yangpin@sxu.edu.cn

第一作者: 张改清, 女, 32 岁, 讲师; 研究方向: 生物无机化学, 结构化学。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Beckman $\Phi 50$ 精密 pH 酸度计; Hewlett Packard HP-8453 紫外光谱仪; 微量进样口和微量进样枪, PO-120 石英比色皿; Hitachi F-2500 荧光光谱仪, 激发波长为 267 nm, 扫描速度为 $1500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 记录发射波长范围 283~560 nm, 狭缝宽度 $E_x=E_m=10 \text{ nm}$; CHI-660B 电化学工作站, 电解池采用三电极体系, 热解石墨电极为工作电极 (EPG), 铂丝为辅助电极, 饱和甘汞电极 (SCE) 为参比电极, 所有电化学测量均在 10 mL 的电解池中进行, 溶液通过通入 N_2 除去氧气, 电极表面滴加 $2 \mu\text{L}$ CT DNA ($7.77 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液, 于空气中晾干, 再用二次蒸馏水冲洗干净; Bruker SMART 5.0 CCD X 射线四圆衍射仪; 化合物和 CT DNA 的键合模式采用 Insight~II 软件包在 SGI 工作站开展。

$\text{CeTTA}_4 \cdot \text{HP}$ 按文献^[11]方法合成, CTDNA 购自华美公司, 不需要进一步纯化, 其它试剂均为分析纯试剂。缓冲溶液: $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl/ $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH 7.2, 用于配合物与 CT DNA 的光谱研究, 所有的溶液均用二次蒸馏水配制。

1.2 晶体结构测定

取 $0.4 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm}$ 红色晶体置于 Bruker SMART 5.0 CCD X 射线四圆衍射仪圆心位置, 用石墨单色化的 $\text{Mo } K\alpha$ ($\lambda=0.71073 \text{ nm}$) 辐射为光源, 在 $2.35^\circ \leq \theta \leq 25.01^\circ$ 范围内, 以 $\omega/2\theta$ 扫描方式, 在 298(2)K 下收集到 12189 个衍射点, 其中 4910 个为独立衍射点。晶体结构由直接法 (SHELXS97) 解

出, 初始结构经全部矩阵最小二乘法做数轮修正, 找出全部非氢原子坐标, 确认残余峰不再有非氢原子后, 做各向异性温度因子处理。C 原子和 N 原子上的氢由差值 Fourier 合成给出。最终偏差因子 $R_1=0.0950$, 晶体属单斜晶系, 空间群 $P2_1/n$, $a=13.996(3) \text{ nm}$, $b=11.071(2) \text{ nm}$, $c=14.579(3) \text{ nm}$, $\beta=94.96(3)^\circ$, $Z=2$, $V=2250.5(8) \text{ nm}^3$, $D_x=1.625 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$, $\mu=1.294 \text{ mm}^{-1}$, $F(000)=1082$, $S=1.075$ 。

2 结果与讨论

2.1 晶体结构

由于晶体生长速度太快, 哌啶上的 C 原子无序, 晶体数据参数见表 1。因为晶体质量不好, 我们看到高的 R 值 (0.0950), 但是 Ce-O 键长很规则。在给定的图 1 中, 为了给出一个清晰的结构图, 氢原子

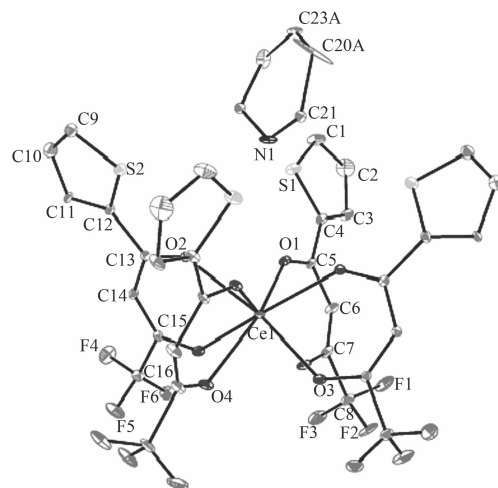


图 1 化合物的晶体结构

Fig.1 Crystal structure of $\text{CeTTA}_4 \cdot \text{HP}$

表 1 配合物的晶体学数据

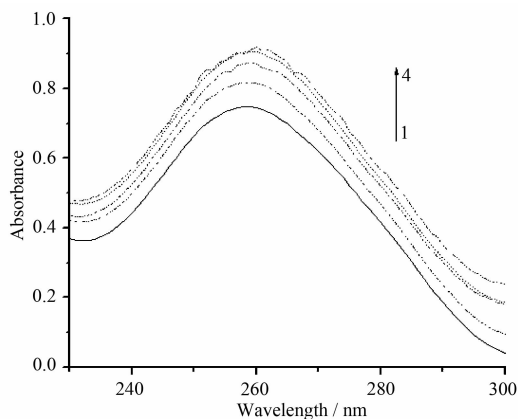
Table 1 Crystallographic data and structure refinement parameters of complex

Crystal	$\text{CeTTA}_4 \cdot \text{HP}$	Empirical formula	$\text{C}_{37}\text{H}_{28}\text{CeF}_{12}\text{NO}_8\text{S}_4$
Formula weight	1110.92	T / K	298(2)
Crystal system	Monoclinic	Space group	$P2_1/n$
a / nm	1.3996(3)	V / nm^3	2.2505(8)
b / nm	1.1071(2)	Z	2
c / nm	1.4579(3)	$\theta / (^\circ)$	2.35~25.01
$\beta / (^\circ)$	94.96(3)	$F(000)$	1082
$D / (\text{g} \cdot \text{cm}^{-3})$	1.625	Size / mm^3	$0.40 \times 0.20 \times 0.20$
Index ranges	$-16 \leq h \leq 14$ $-10 \leq k \leq 13$ $-16 \leq l \leq 17$	$R[I > 2\sigma]$	$R_1=0.0950$, $R_w=0.2327$
Absorption coefficient / mm^{-1}	1.294	$R(\text{all data})$	$R_1=0.1495$, $R_w=0.2688$
R_{int}	0.0598	Largest diff. peak and hole / $(\text{e} \cdot \text{nm}^{-3})$	883, -458

被忽略。从晶体结构看, 哌啶离子通过强的 $N \cdots H_2 \cdots O$ 氢键作用基于 $N \cdots O$ 距离 3 nm。这个作用很强, 使得化合物在溶液中是稳定存在而不被解离。

2.2 紫外光谱

电子吸收光谱是研究金属化合物和 DNA 之间键合模式的有效方法^[13-15]。如果键合模式是插入, 插入的配体的 π^* 能与碱基对耦合, 这样降低了 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁能导致了增色效应。另一方面, 耦合的 π 轨道部分被电子填满, 这样降低了跃迁几率伴随有减色效应^[16]。“增色效应”和“减色效应”都是涉及 DNA 双螺旋的光谱特征。光谱的变化反应了 DNA 被药物键合后构型和结构的变化。减色效应来自于 DNA 双螺旋的收缩以及构型的变化, 然而增色效应来自于 DNA 双螺旋的破坏^[17]。图 2 是在 260 nm 处, $CeTTA_4 \cdot HP$ 浓度的变化与 DNA 之间的一系列反应。如图所示, 随着 $CeTTA_4 \cdot HP$ 浓度的增加, DNA 的吸收在增加, 这是典型的“增色效应”。结果表明: 在化合物与 DNA 作用后, DNA 双螺旋结构得到破坏。初步认为化合物与 DNA 之间存在插入作用。



Line 1~4: 1×10^{-6} , 1.5×10^{-5} , 1.35×10^{-4} , $1.60 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $CeTTA_4 \cdot HP$

图 2 CT DNA 的紫外变化图

Fig.2 UV spectra of CT DNA with increasing of $[CeTTA_4 \cdot HP]$

2.3 荧光光谱

已知 EB 常用作 DNA 结构检测探针^[18]。化合物 $CeTTA_4 \cdot HP$ 自身在 536 nm 处有荧光, 因此在 DNA 的存在下, 可以通过化合物 $CeTTA_4 \cdot HP$ ($2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在 536 nm 处的荧光减弱或者增强直接检测 DNA。图 3 是化合物 $CeTTA_4 \cdot HP$ 随着 DNA 浓度增加荧光发射谱的变化, 我们发现化合物在 536 nm 处的荧光强度在逐渐增加。这种现象表明化合物和 DNA 之间存在插入模式。因此, 推断 $CeTTA_4$

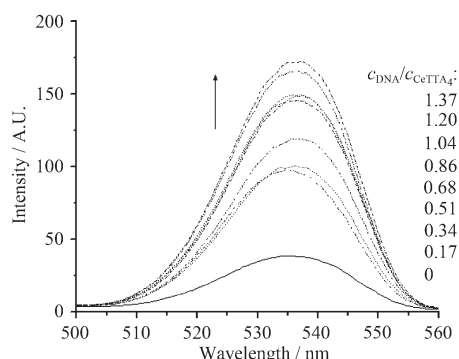


图 3 化合物的荧光变化图

Fig.3 Fluorescence emission spectra(excited at 267 nm) of $CeTTA_4 \cdot HP$ complex with increasing concentrations of DNA

插入到 DNA 双链的碱基对导致荧光增强^[19,20]。

2.4 热变形

关于化合物和 DNA 之间的键合强有力的证据还可以通过 DNA 熔点的研究获得。小分子插入到 DNA 双链明显增加了 DNA 的熔点: 双链变成单链的 DNA^[21,22]。DNA 在 260 nm 消光系数, 双链结构小于单链结构^[23,24], 因此, 螺旋的熔化导致在此波长处吸收的增强。这样, 螺旋到缺刻转化的温度可以通过测定 DNA 在 260 nm 的吸收确定, 这个温度叫熔点 (T_m)。然而, 如果 T_m 有轻微的增加 ($\Delta T_m < 0.6 \text{ } ^\circ\text{C}$), 则说明小分子与 DNA 的磷酸骨架之间存在非特异静电作用^[25]。在化合物存在和不存在下 DNA 的熔点曲线显示在图 4 中。单独的 DNA 的熔点是 $80 \text{ } ^\circ\text{C}$ (a), 有化合物存在下 DNA 的熔点为 $85 \text{ } ^\circ\text{C}$ 。因此, 我们可以推断 $CeTTA_4 \cdot HP$ 与 DNA 通过插入方式作用。

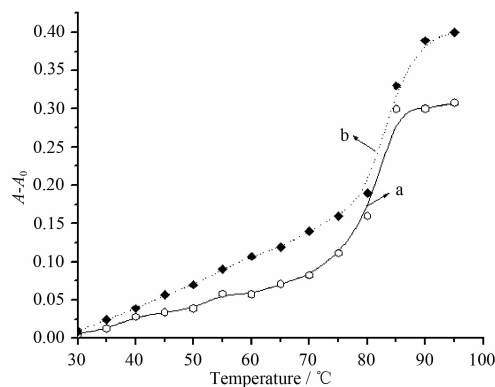


图 4 在化合物存在下 DNA 的紫外熔点曲线

Fig.4 UV melting curves recorded at 260nm for DNA in the absence (a) and presence of $CeTTA_4 \cdot HP$ (b)

2.5 电化学

图 5 是化合物 $CeTTA_4 \cdot HP$ 在裸石墨电极 EPG

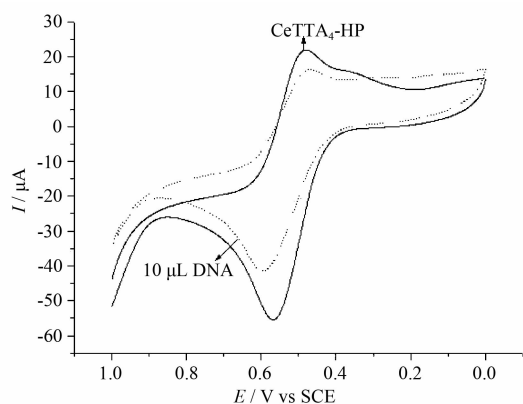


图5 化合物与 DNA 作用的 CV 图

Fig.5 CV curves of CeTTA₄·HP in present of EPG and DNA/EPG

(实线)和 DNA/EPG(虚线)的循环伏安图。在裸石墨电极上, 阳极峰电位 E_{pa} 和阴极峰电位 E_{pc} 分别为 0.568 V 和 0.479 V(对饱和甘汞电极)。阳极峰和阴极峰电位相差 89 mV, 这表明存在一个准可逆的氧化还原过程。在裸电极上, 式量电位 $(E_{pc}+E_{pa})/2$ 为 0.523 V。同样浓度的 CeTTA₄·HP 与在裸 EPG 上的峰电流相比, 在 DNA/EPG 上有一个向正极轻微的移动($c_{DNA}=4\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在化合物与 DNA 的 3 种键合模式中, Bard^[26]曾经报告说, 当小分子插入到 DNA 时, $E_{1/2}$ 会向正向移动, 表明两者之间存在插入作用。

2.6 粘度研究

粘度测定一般被认为是确定键合模式最有力的证据之一。水合动力参数反映了由于插入, 碱基对的距离会增大, 导致 DNA 螺旋伸长。图 6 显示了比较粘度的结果和化合物与 DNA 之间键合模式的关系^[27,28]。图中显示 DNA 的粘度随着化合物与 DNA 的物质的量比率增加而增大。

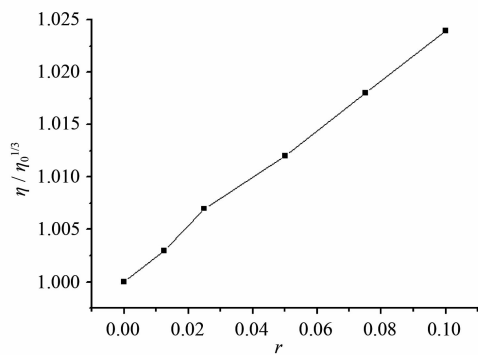


图6 在化合物存在下 DNA 的粘度图

Fig.6 Effect of the increasing concentration of bound ligand on the relative viscosity of DNA

2.7 理论模拟

模拟结果揭示了化合物和 DNA 之间存在插入模式(不包括哌啶), 芳香噻吩基团在 DNA 大沟处插入, 化合物和 DNA 之间存在经典的插入作用。图 7 显示, 化合物的主要部分停留在 DNA 的大沟, 噻吩基团已经插入到 DNA 的碱基堆。

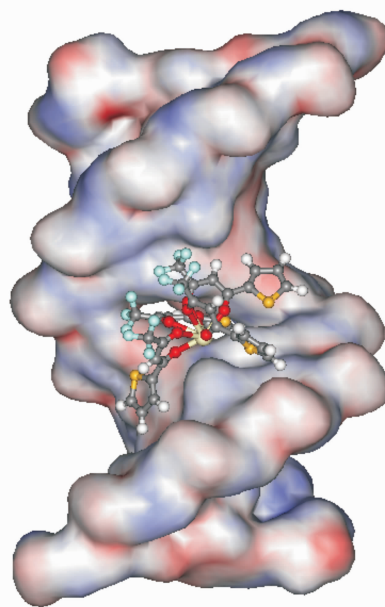


图7 化合物与 DNA 选择的键合模式

Fig.7 Optimized binding mode of complex-DNA association

本文合成了 CeTTA₄·HP 并通过 X 射线衍射对其结构进行了表征, 利用紫外、荧光、热变形、电化学、粘度和理论模拟等多种手段研究了化合物与 DNA 相互作用。综上所述, 可以初步推断配合物和 DNA 之间以插入方式作用。

参考文献:

- [1] Mokhir A A, Kraemer R. *Bioconjugate chem.*, **2003**,**14**(5): 877~883
- [2] Cheng C C, Fu W C H, Hung K C, et al. *Nucl. Acids. Res.*, **2003**,**31**(8):2227~2233
- [3] Liu F, Wang K, Bai G. et al. *Inorg. Chem.*, **2004**,**43**(5):1799~1806
- [4] Wu T Z, Yuan L J. *Inorg. Biochem.*, **2004**,**98**(1):41~45
- [5] Liu J, Mei W J, Lin L J, et al. *Inorg. Chim. Acta*, **2004**,**357**(1):285~293
- [6] Tse W C, Boger D L. *Acc. Chem. Res.*, **2004**,**37**:61~69
- [7] XU Gung-Zhi(徐广智), SUN Jia-Bin(孙家斌), LIANG De-Sheng(梁德声), et al. *Chinese Science Bulletin (Kexue*

- Tongbao*), **1982,27**:768
- [8] DOU Shi-Qi(窦士琦), ZHONG Na-Tian(钟纳天). *Chinese Science Bulletin(Kexue Tongbao)*, **1983,28**:1151
- [9] Gschneidner K A Jr, Byring L. *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths, Vol 3 and 4*, Amsterdam, New York, Oxford: North-Holland Publishing Company, **1979**.
- [10] SUN Jia-Bin(孙家镔), CHEN Shi-Di(陈式隼), WANG Pei-Lan(王培兰). *Chem. J. Chinese Universities (Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, **1983,4**(3):385-389
- [11] YANG Pin(杨频), WANG Yue-Kui(王越奎). *Science in China, Series B(Zhongguo Kexue, B Ji)*, **1986,9**:912~924
- [12] YANG Pin(杨频), WANG Yue-Kui(王越奎). *Acta Chimica Sinica(Huaxue Xuebao)*, **1986,44**:14~21
- [13] Barton J K, Raphael A L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984,106**:2172~2176
- [14] Kelly T M, Tossi A B, McConnell D J, et al. *Nucleic Acids Res.*, **1985,13**:6017~6034
- [15] Tysoe S A, Morgan R J, Baker A D, et al. *J. Phys. Chem.*, **1993,97**(8):1707~1711
- [16] Pyle A M, Rehmann J P, Meshoyrer R, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989,111**:3051~3058
- [17] Li Q S, Yang P, Wang H F, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **1996,64**:181~195
- [18] Yang J, Ma J F, Liu Y C, et al. *J. Mol. Struct.*, **2003,646**:55~60
- [19] Biver T, Secco F, Tinè M. R, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2004,98**:33~40
- [20] HE Zhong-Xiao(何忠效), GU Yu(顾郁). *Science in China Series B(Zhongguo Kexue, B Ji)*, **1989,12**:1257~1262
- [21] Li Y Q, White J, David S, et al. *Biotechnol. Prog.*, **2001,17**:348~354
- [22] Zeynep D, Ralph P, Jan A R S, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004,126**:4762~4763
- [23] Thierry D. *J. Photochem. & Photobio. B: Biology*, **2006,82**:45~52
- [24] Silvestri A, Barone G, Ruisi G, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2004,98**:589~594.
- [25] Foloppel M P, Rault S, Thurston D E, et al. *J. Med. Chem.*, **1996,31**:407~410
- [26] Carter M T, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989,111**:8901~8911
- [27] Satyanarayana S, Dabrowiak J C, Chaires J B. *Biochemistry*, **1992,31**:9319~9324
- [28] Sigman D S, Mazuder A, Perrin D M. *Chem. Rev.*, **1993,93**:2295~2316