

三元 TBZ/HPB-铜(II)-L-蛋氨酸配合物的合成、 表征、抑菌活性及与 DNA 的作用

卢艳梅¹ 区志斌¹ 刘海峰^{1,2} 乐学义^{*,1,2}

(¹ 华南农业大学理学院应用化学系, 广州 510642)

(² 华南农业大学生物材料研究所, 广州 510642)

摘要: 本文合成了 2 个新的三元铜(II)配合物: [Cu(TBZ)(L-Met)(H₂O)]ClO₄·H₂O (**1**)和[Cu(HPB)(L-Met)]ClO₄ (**2**) [TBZ=2-(4'-噻唑基)苯并咪唑, HPB=2-(2-吡啶)苯并咪唑, L-Met=L-蛋氨酸]。通过元素分析、摩尔电导率、IR、UV-Vis 及电喷雾质谱对这些配合物进行了表征。用二倍稀释法研究了配合物的抗菌活性, 发现配合物对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, G+), 枯草杆菌(*Bacillus subtilis*, G+), 沙门氏杆菌(*Salmonella*, G-)和大肠杆菌(*Escherichia coli*, G-)具有良好的抑制作用。采用电子吸收光谱、荧光光谱、粘度测定及琼脂凝胶电泳方法研究了配合物与 DNA 的相互作用, 结果表明, 配合物以插入方式与 DNA 作用, 在维生素 C 存在下通过羟自由基·OH, 单线态氧 ¹O₂ 或者 ¹O₂ 类似物如 Cu-O₂, 切割 pBR322 DNA 双螺旋结构。

关键词: 铜(II)配合物; 2-(4'-噻唑基)苯并咪唑; 2-(2-吡啶)苯并咪唑; DNA; 抑菌活性

中图分类号: O614.121 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-4861(2011)04-0704-07

Syntheses, Characterization, Antibacterial Activities of Ternary Copper(II) Complexes with 2-(4'-Thiazolyl)benzimidazole/2-(2-pyridyl)benzimidazole and L-Methionine and Their Interaction with DNA

LU Yan-Mei¹ OU Zhi-Bin¹ LIU Hai-Feng^{1,2} LE Xue-Yi^{*,1,2}

(¹Department of Applied Chemistry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(²Institute of Biomaterial, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Two new ternary copper(II) complexes: [Cu(TBZ)(L-Met)(H₂O)]ClO₄·H₂O (**1**) and [Cu(HPB)(L-Met)]ClO₄ (**2**) [TBZ=2-(4'-thiazolyl)benzimidazole, HPB=2-(2-pyridyl)benzimidazole, L-Met=L-methionine], were synthesized and characterized by elemental analysis, molar conductivity, IR, UV-Vis spectroscopy and ES-MS. The complexes were assayed against gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) and gram-negative (*Salmonella*, *Escherichia coli*) bacteria by doubling dilutions method, and the interaction of the complexes to DNA was investigated by electronic absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, viscosity measurements and agarose gel electrophoresis. The results indicated that the complexes could bind to DNA by intercalative mode, and cleave pBR322 DNA in the presence of vitamin C in the involvement of the hydroxyl radical, and may be a singlet oxygen or a singlet oxygen-like entity such as copper-peroxide Cu-O₂, with the order of the binding ability and cleavage activity of the complexes to DNA: complex **2**>**1**.

Key words: ternary copper(II) complex; 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole; 2-(2-pyridyl)benzimidazole; DNA; antibacterial activity

收稿日期: 2010-09-25。收修改稿日期: 2010-11-21。

广东省科技计划项目(No.2009B020312010), 广东省自然科学基金(No.10151064201000016)及华南农业大学 211 工程项目(No.2009B010100001)资助。

*通讯联系人。E-mail: lexifu@163.com, Tel: 08620-85287010

小分子特别是过渡金属配合物与 DNA 的键合和分子识别特性使其有可能作为 DNA 结构探针、化学核酸酶、药物和杀菌剂等而具有广泛的应用前景^[1-14]。研究发现,苯并咪唑衍生物具有杀菌、抗癌等活性^[15-16],尤其是这些化合物与某些金属形成配合物时可进一步提高其生物活性^[17-19],因此苯并咪唑衍生物过渡金属配合物与 DNA 相互作用及其应用受到人们广泛关注^[20-26]。*L*- α -氨基酸是重要的生物配体,当在金属配合物中插入这类氨基酸后,不仅有助于提高配合物的生物活性,而且能够提高配合物在水中的溶解性,从而有助于减小配合物因水溶性差而导致细胞对药物吸收效果不好等不足之处^[27],因此研究含 *L*- α -氨基酸及苯并咪唑衍生物过渡金属配合物具有重要意义。

基于 2-(4'-噻唑基)苯并咪唑(TBZ)(图 1)与 2-(2-吡啶)苯并咪唑(HPB)(图 2)是 2 个重要的苯并咪唑衍生物,具有良好的抗寄生虫、抗菌和抗真菌活性等^[20-22],本文合成了 2 个含有 2-(4'-噻唑基)苯并咪唑(TBZ)/2-(2-吡啶)苯并咪唑(HPB)及 *L*-蛋氨酸的铜(II)三元配合物[Cu(TBZ)(*L*-Met)(H₂O)]ClO₄·H₂O (**1**)和[Cu(HPB)(*L*-Met)]ClO₄ (**2**)[TBZ=2-(4'-噻唑基)苯并咪唑,HPB=2-(2-吡啶)苯并咪唑,*L*-Met=*L*-蛋氨酸],通过元素分析、摩尔电导率、IR、UV-Vis 光谱及电喷雾质谱对配合物的结构进行了表征,用二倍稀释法研究了配合物的抑菌活性,并采用电子吸收光谱、荧光光谱、粘度测定及琼脂凝胶电泳方法研究了配合物与 DNA 的相互作用。

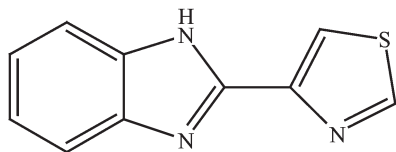


图 1 2-(4'-噻唑基)苯并咪唑(TBZ)的分子结构式

Fig.1 Molecular structure of 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole

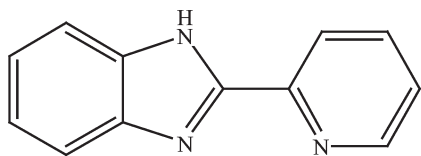


图 2 2-(2-吡啶)苯并咪唑(HPB)的分子结构式

Fig.2 Molecular structure of 2-(2-pyridyl)benzimidazole

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

配体 2-(2-吡啶)苯并咪唑(HPB)、Cu(ClO₄)₂·6H₂O

分别参照文献^[28-29]方法制备。*L*-蛋氨酸(*L*-Met)、2-(4'-噻唑基)苯并咪唑(TBZ)、抗坏血酸(Vit C)、溴化乙啶(EB)、小牛胸腺 DNA(CT-DNA)、琼脂糖凝胶、质粒 pBR322DNA 和三羟甲基氨基甲烷(Tris)均为生化试剂,其他为市售分析纯试剂。研究配合物与 DNA 相互作用时,底液为 10 mmol·L⁻¹ Tris+50 mmol·L⁻¹ NaCl 缓冲液 (pH=7.2),TBE 电泳缓冲液为:4.5×10⁻² mol·L⁻¹ Tris+4.5×10⁻² mol·L⁻¹ H₃BO₃+1 mol·L⁻¹ EDTA(pH=8.3),参照文献方法^[30]确定 CT-DNA 浓度。ACATAR 360 FTIR 型红外光谱仪(KBr 压片),美国 Nicolet 公司;Vario EL 元素分析仪,ELEMENTAR 公司;DDS-12A 型电导率仪,上海宇隆仪器有限公司;Shimadzu UV-2550 型紫外/可见分光光度计,日本 Shimadzu 公司;F-4500 荧光光谱仪,日本 HITACHI 公司;乌氏粘度计,上海晶菱玻璃有限公司;移液枪,大龙医疗设备(上海)有限公司;凝胶电泳池,大连捷迈科贸有限公司;BIO-RAD 凝胶成像系统,BIO-RAD Laboratories-Segrade 意大利米兰;LCQ^{DECA} 液质联用仪,美国 FINNIGAN 公司。

1.2 配合物的合成

称取 0.5 mmol TBZ(HPB)溶于 20 mL 无水乙醇中,加热搅拌下加入 1.0 mL 0.5 mol·L⁻¹ Cu(ClO₄)₂ 溶液,反应 15 min,得溶液 A;称取 0.5 mmol *L*-Met 溶于 5 mL 双蒸水中,加热,得溶液 B;把溶液 B 加入溶液 A 中,加热搅拌回流 30 min;反应结束后,冷却混合液至室温,过滤,静置滤液,10 d 后析出蓝色晶体。过滤并依次用少量水、乙醇洗涤,空气中干燥后置于干燥器中保存。

配合物 **1**:IR(KBr), ν /cm⁻¹:3 431(s,br),3 258(m),3 092(m),1 621(vs),1 387(s),1 524(w);UV-Vis, λ /nm (ϵ /(L·mol⁻¹·cm⁻¹)):243(14 694),301(18 197),619(196);EA(%), Found: C,32.80; H,3.38; N,11.82;Calc for C₁₅H₂₁O₈N₄CuS₂Cl(%):C,32.79;H,3.18;N,11.89。ES-MS(甲醇, m/z):432.1([Cu(TBZ)(*L*-Met)(H₂O)]⁺)。

配合物 **2**:IR(KBr), ν /cm⁻¹:3 438(s,br),3 263(m),2 914(m),1 638(vs),1 396(s),1 486(w);UV-Vis, λ /nm (ϵ /(L·mol⁻¹·cm⁻¹)):239(26 241),325(27 001),627(301);EA(%), Found: C,40.19; H,3.81;N,11.08;Calc for C₁₇H₁₉O₆N₄CuS₂Cl(%):C,40.24;H,3.75;N,11.05。ES-MS(甲醇, m/z):405.9([Cu(HPB)(*L*-Met)]⁺)。

1.3 抑菌试验

采用试管二倍稀释法测定配合物最小抑菌浓度(MIC)。所用菌株为:金黄色葡萄球菌

(*Staphylococcus aureus*, G+), 枯草杆菌(*Bacillus subtilis*, G+), 沙门氏杆菌(*Salmonella*, G-), 大肠杆菌(*Escherichia coli*, G-), G+为革兰氏阳性, G-为革兰氏阴性(由华南农业大学农学院-广东省植物分子育种重点实验室提供)。取 10 支(10 mL)消毒试管并进行编号。往每支试管中分别加入 1.0 mL 营养肉汤, 然后把 1.0 mL 待测样品加入到 1 号管内, 振荡摇匀后, 从 1 号管吸取 1.0 mL 溶液加入到 2 号管, 再从 2 号管吸取 1.0 mL 溶液加入到 3 号管, 一直到 9 号管, 再从 9 号管内吸取 1.0 mL 溶液弃去。10 号管不加待测样品。在 1 号管到 10 号管中分别加入 20 μL 菌液, 其中 10 号管作为阳性对照管, 然后将 10 支试管放入恒温恒湿培养箱, 在相对湿度大于 80% 和温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h 后取出观察, 记录现象。

1.4 配合物与 CT-DNA 作用

1.4.1 电子吸收光谱

以 Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液为空白对照液, 测定标题配合物在 200~400 nm 之间的吸收光谱。然后, 依次往空白池和样品池中加入等体积的 CT-DNA 溶液, 使 DNA 与配合物的浓度比值不断增加, 室温下反应 6 min 后在同样波长范围内扫描。配合物浓度为 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.4.2 荧光光谱

溴化乙啶 (EB) 与 CT-DNA 加入到 5 mL Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液中, 放置 4 h。在扫描速度为 240 $\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$ 和 525 nm 为激发波长条件下, 测定 EB-CT-DNA 体系在 550~650 nm 波长区间的荧光强度。然后, 依次增加标题配合物浓度, 室温下反应 5 min 后在同样同样波长范围内扫描。系列试样溶液中 EB 浓度为 4.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CT-DNA 浓度为 5.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.4.3 粘度试验

温度恒定在(29.0 $\pm$ 0.1) $^{\circ}\text{C}$, CT-DNA 浓度固定为 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 依次增大配合物浓度。相对粘度按公式 $\eta=(t-t_0)/t_0$ 为缓冲溶液流经毛细管所需时间, t 为含不同浓度配合物的 DNA 溶液流经毛细管所需的时间)计算。以 $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ 对 $C_{\text{Complex}}/C_{\text{DNA}}(\eta_0$ 为未加配合物时 DNA 溶液的比粘度)作图。

1.5 配合物对 pBR322DNA 的切割作用

将 200 ng pBR322 DNA 与不同浓度的配合物以及 50 倍于配合物浓度的还原剂 Vit C 混合, 然后用 Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液定容至 17 μL , 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 2 h 后, 加入 3 μL Loading buffer(含 0.25% 溴

酚蓝和 50% 甘油的水溶液), 在 0.8% 琼脂糖凝胶和 TBE 电泳液(45 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris+45 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_3BO_3 +1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH=8.3)中电泳(100 V) 40 min。Gold View(4~5 μL)作为凝胶着色剂, 溴酚蓝作为电泳过程指示剂, 电泳结果在 BIO-RAD 紫外检测仪下观察并拍照。为了探索配合物切割 DNA 的作用机理, 先分别将 4 μL DMSO、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,2,6,6-四甲基-4-哌啶酮(TMP)和 NaN_3 与 200 ng pBR322 DNA 混合作用 15 min, 再加入配合物及 Vit C, 28 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 2 h 后, 进行电泳。

2 结果与讨论

2.1 配合物表征

元素分析结果与理论值基本吻合, 由此推测的配合物组成与实际一致。测得配合物 1、2 在甲醇溶液中的摩尔电导率分别为 81.5 和 103 $\text{S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$, 表明配合物均为 1:1 型电解质^[31]。

用 KBr 压片测定配合物红外光谱。结果表明, 配合物 1、2 在 3430 cm^{-1} 附近强的吸收峰归属于结晶 H_2O 的 ν_{OH} ; 2914~3263 cm^{-1} 范围内 2 个强吸收带归属于 $-\text{NH}_2$ 的 2 个不对称分裂吸收峰 ν_{NH} , 表明 $-\text{NH}_2$ 参与了配位; 1700~1750 cm^{-1} 范围内没有任何吸收带, 表明 *L*-Met 的羧基参与了配位, 且 $\Delta\nu(\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)-\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-))>200\text{ cm}^{-1}$, 表明 $-\text{COO}^-$ 为单齿配体基团^[32]。另外, 配合物在 1500 cm^{-1} 附近都有吸收, 归属于配体 TBZ(HPB)上的 C=N 伸缩振动。

UV-Vis 光谱表明, 配合物甲醇溶液在紫外区均有 2 个较强的吸收峰, 归属于配体的 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁。与自由配体相比, 最大吸收峰的位置未发生改变, 但强度有所减弱, 归因于 TBZ/HPB 上的氮原子配位后引起配体上电子云密度的降低。与配体相比, 配合物 1、2 分别在 619 和 627 nm 处出现了一个新的弱而宽的吸收峰, 归属于配合物分子中心 Cu(II) 离子的 $d\rightarrow d$ 跃迁。

用甲醇作溶剂测得配合物 ES-MS。结果表明, 配合物 1 的 ES-MS 具有正离子峰 $m/z=432.1$, 表明配合物分子中存在配离子 $[\text{Cu}(\text{TBZ})(\text{L-Met})(\text{H}_2\text{O})]^+$; 而配合物 2 的 ES-MS 具有正离子峰 $m/z=405.9$, 推测该配合物分子中存在配离子 $[\text{Cu}(\text{HPB})(\text{L-Met})]^+$ 。

综合上述配合物的元素分析、摩尔电导率、红外光谱、UV-Vis 光谱及 ES-MS 分析结果, 并分别参考类似配合物^[33-34], 可推测配合物 1、2 分子式为: $[\text{Cu}(\text{TBZ})(\text{L-Met})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1) 和 $[\text{Cu}(\text{HPB})(\text{L-Met})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (2)。

Met)]ClO₄ (2),分别为变形四方锥和平面正方形结构,如图3所示。

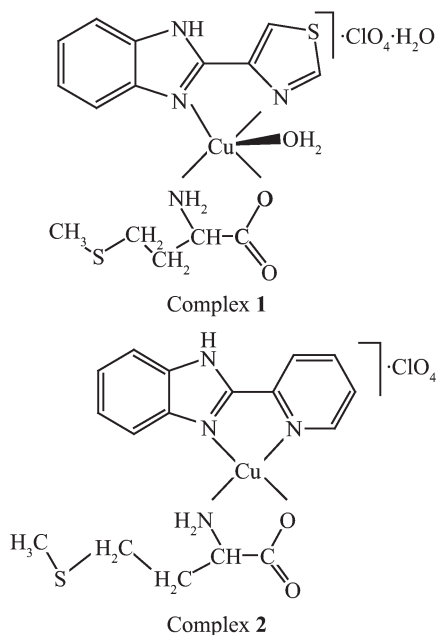


图3 配合物1、2的可能分子结构

Fig.3 Possible molecular structures of the complexes

2.2 抑菌活性

将化合物配成浓度为1 024、800及640 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的原液,通过二倍稀释法配制系列浓度溶液,细菌最终接种量为 $5 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养24 h,测得 $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 、TBZ、HPB和配合物抑制细菌最低浓度(MIC),结果见表1。

表1 化合物抑制细菌生长的最低浓度

Table 1 Minimal inhibitory concentrations (MIC, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) of the compounds for the assayed bacteria

Compound	<i>Bacillus subtilis</i> , G+	<i>Staphylococcus aureus</i> , G+	<i>Salmonella</i> , G-	<i>Escherichia coli</i> , G-
$\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$	320	320	256	256
TBZ	320	320	512	320
HPB	256	200	256	160
Complex 1	160	160	160	160
Complex 2	50	64	64	80

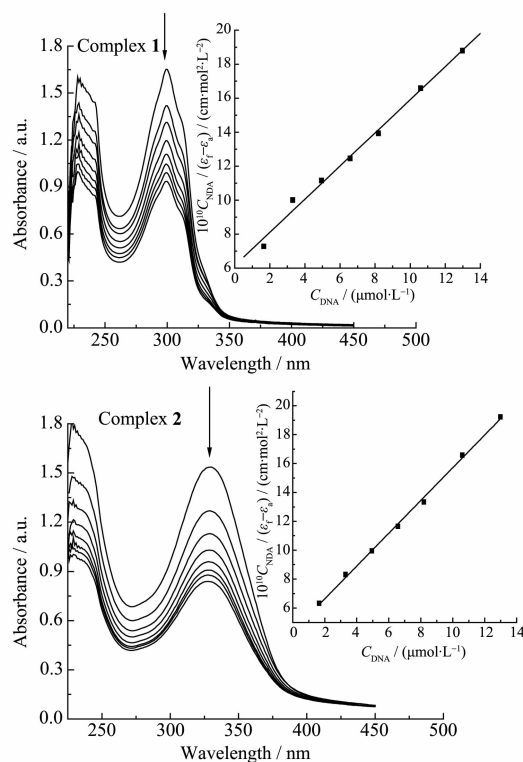
表1中实验数据表明:配合物抑菌活性均高于 $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 及2-取代苯并咪唑配体(TBZ/HPB),这可能是由于金属离子与配体之间协同作用的结果。另外,对所有细菌,配合物2的MIC值小于配合物1,表明2-取代苯并咪唑配体本身的性质对配合物抑菌活性有重要影响,2-取代苯并咪唑配体抑菌活性越强,其对应的配合物抑菌活性就越强。

2.3 配合物与CT-DNA的相互作用

为了初步探索配合物抑菌作用机理,本文通过光谱学、流体力学等方法研究了配合物与CT-DNA的作用。

2.3.1 电子吸收光谱

电子吸收光谱是研究小分子化合物与CT-DNA相互作用的最常用和最有效的方法之一。在210~400 nm范围内,标题配合物均出现了2个吸收峰,归属于2-取代苯并咪唑配体的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁峰。配合物与CT-DNA相互作用的吸收光谱滴定曲线如图4所示。



Arrows show the absorbance changing upon the increase in DNA concentration; plots of $C_{\text{DNA}} / (\epsilon_1 - \epsilon_2)$ vs C_{DNA} for the titration of the complexes with DNA; $C_{\text{complex}} = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{DNA}} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$, 0, 1.661, 3.311, 4.951, 6.579, 8.197, 10.604, 12.987

图4 配合物在不同DNA浓度下的电子吸收光谱图

Fig.4 Absorption spectra of the complexes upon addition of DNA

结果表明,随着CT-DNA浓度增加,配合物在210~400 nm波长范围内吸收峰强度显著减弱。这可能归因于配体插入到CT-DNA碱基之间,导致配体的 π 空轨道与碱基的 π 轨道发生偶合,偶合后的 π 轨道因部分填充电子,使 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁几率减小,从而产生减色效应^[35]。

另外,通过CT-DNA对配合物的电子光谱滴定

试验,能够根据以下方程式求得配合物与 CT-DNA 的结合常数:

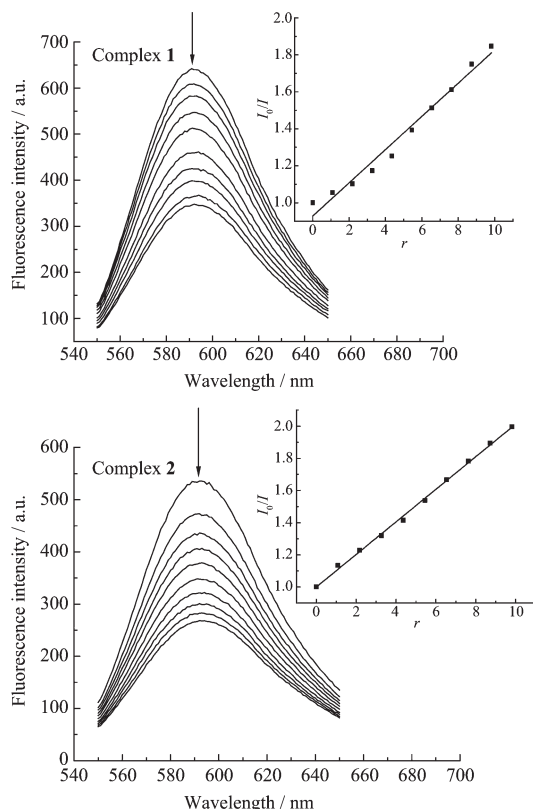
$$C_{\text{DNA}}/(\varepsilon_a - \varepsilon_f) = C_{\text{DNA}}/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)$$

其中, C_{DNA} 表示 CT-DNA 的浓度, ε_a 、 ε_f 和 ε_b 分别表示 $A_{\text{obsd}}/C_{\text{Gt}}$ 、自由配合物的摩尔吸光系数和完全结合后的配合物的摩尔吸光系数,以 $C_{\text{DNA}}/(\varepsilon_f - \varepsilon_a)$ 对 C_{DNA} 作图,斜率与截距的比值即为配合物与 DNA 的结合常数 K_b ^[36]。配合物 **1**、**2** 的 K_b 值分别为 1.584×10^5 和 $2.601 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,表明配合物 **2** 与 CT-DNA 的相互作用强于配合物 **1**,这可能主要归因于 HPB 的芳环面积大于 TBZ,有助于配合物插入到 DNA 的碱基对之间。

2.3.2 荧光光谱

荧光光谱被广泛的应用于研究配合物与 DNA 之间的相互作用。测得配合物与 CT-DNA 作用的溴化乙啶 (EB) 荧光光谱如图 5 所示。

从图中可以看出,随着配合物浓度增加,EB-



Arrows show the absorbance changing upon the increase in complex concentration; plots of I_0/I vs r for the titration of DNA with the complexes; $C_{\text{complex}} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 5.92, 11.84, 17.7, 23.6, 29.5, 35.4, 41.3, 47.2, 53.0

图 5 配合物对 EB-DNA 体系荧光光谱的影响

Fig.5 Effects of the complexes on the fluorescence spectra of EB-DNA system

CT-DNA 体系的荧光强度被显著地淬灭,这归因于配合物分子将 EB 从 EB-CT-DNA 复合物中挤出,即配合物对 CT-DNA 的插入作用^[37]。通过配合物对 EB-DNA 体系荧光光谱的滴定实验,可以应用经典 Stern-Volmer 方程求得配合物取代 EB 而与 CT-DNA 作用的淬灭常数 K_{sq} ^[38]

$$I_0/I = 1 + K_{\text{sq}}r$$

其中, I 和 I_0 分别表示滴加和未滴加配合物时 EB-CT-DNA 体系的荧光强度, r 表示配合物与 CT-DNA 的浓度比。以 I_0/I 对 r 作图获得一条直线(图 5 中插图),直线的斜率即 K_{sq} 值。由此获得配合物 **1**、**2** 的 K_{sq} 值分别为 0.089 8 和 0.101 2,表明与 DNA 作用大小次序为:配合物 **2**>**1**,与上述电子吸收光谱测定结果一致。

2.3.3 粘度测定

粘度法被认为是在缺乏晶体结构数据情况下确定配合物与 DNA 键合模式最有力的证据之一^[39]。DNA 粘度对其链长度变化非常敏感。当配合物以静电、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, DNA 溶液的粘度降低;而通过经典插入方式与 DNA 作用时, DNA 溶液的粘度增加。CT-DNA 相对比粘度随配合物加入量的变化如图 6 所示。

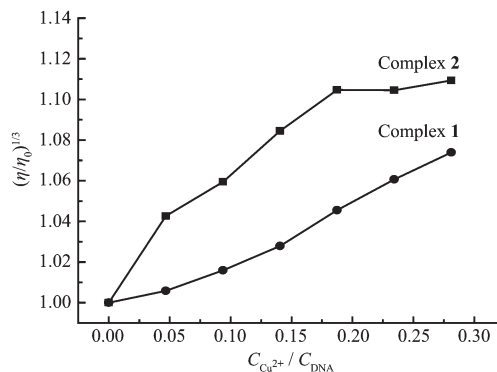


图 6 DNA 相对粘度随配合物加入量的变化

Fig.6 Effect of increasing amounts of the complexes on the relative viscosity of CT-DNA

结果表明,随着配合物加入量的增加,CT-DNA 溶液的相对比粘度增大,由此推测配合物通过配体 HPB 或 TBZ 以插入方式与 CT-DNA 作用。据 CT-DNA 溶液相对比粘度的变化幅度推得配合物与 CT-DNA 插入作用的强弱为:配合物 **2**>**1**,与上述电子吸收光谱和荧光光谱分析的结果一致。

2.4 配合物对 pBR322 DNA 的切割作用

完整的 pBR322 DNA 通常呈超螺旋型 (I 型),

当其中一条链上出现一个切口(即单链断裂)时就变为切口环形(Ⅱ型),而当两条链在同一位置都发生断裂时就变为线型(Ⅲ型)。这3种构型 pBR322DNA

在电泳过程中具有不同的迁移速率,通常Ⅰ型迁移速率最快,Ⅲ型次之,Ⅱ型最慢^[40]。28℃下,配合物对 pBR322DNA 的切割作用如图7所示。



DNA=200 ng, 1: DNA, 2: DNA+1 mmol·L⁻¹ Vit C, 3: DNA+1 mmol·L⁻¹ Vit C +20 μmol·L⁻¹ Cu(ClO₄)₂, 4: DNA+1 mmol·L⁻¹ Vit C +20 μmol·L⁻¹ TBZ, 5: DNA+1 mmol·L⁻¹ Vit C +20 μmol·L⁻¹ HPB, 6: DNA+20 μmol·L⁻¹ complex 1, 7: DNA+20 μmol·L⁻¹ complex 2, 8: DNA+1mmol·L⁻¹ Vit C +20 μmol·L⁻¹ complex 1, 9: DNA+1 mmol·L⁻¹ Vit C +20 μmol·L⁻¹ complex 2

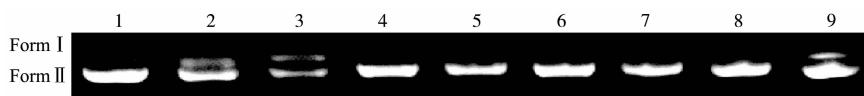
图7 配合物切割 pBR322 DNA 的凝胶电泳图

Fig.7 Agarose gel electrophoresis for the cleavage of pBR322 DNA by the complexes in the presence of Vit C

结果表明,抗坏血酸、配合物、或 Cu(ClO₄)₂、TBZ 及 HPB 在存在抗坏血酸时,均未对 pBR322 DNA 显示出明显的切割作用,但2个配合物在存在抗坏血酸时,能将 pBR322 DNA 共价闭环的超螺旋构型(Form I)切割成缺刻构型(Form II),且切割作用大小为配合物 2>1,与上述配合物对 DNA 的插入作用大

小一致,由此推测这种割作用可能与配合物对 DNA 的插入作用有关。

为进一步探索配合物对 DNA 切割的作用机制,在活性氧·OH 自由基清除剂(DMSO)及单线态氧 ¹O₂ 清除剂(TMP 和 NaN₃)存在下,研究了配合物对 pBR322 DNA 的切割作用(图8)。



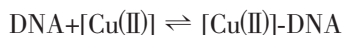
DNA=200 ng, 1: DNA, 2: DNA+1.0 mmol·L⁻¹ Vit C +20 μmol·L⁻¹ complex 1, 3: DNA+1.0 mmol·L⁻¹ Vit C +20 μmol·L⁻¹ complex 2, 4: DNA+1.0 mmol·L⁻¹ Vit C +20 μmol·L⁻¹ complex 1 +4 μL DMSO, 5: DNA+1.0 mmol·L⁻¹ Vit C +20 μmol·L⁻¹ complex 2+4 μL DMSO, 6: DNA+1.0 mmol·L⁻¹ Vit C +20 μmol·L⁻¹ complex 1 +100 μmol·L⁻¹ TMP, 7: DNA+1.0 mmol·L⁻¹ Vit C +20 μmol·L⁻¹ complex 2+100 μmol·L⁻¹ TMP, 8: DNA+1.0 mmol·L⁻¹ Vit C +20 μmol·L⁻¹ complex 1+100 μmol·L⁻¹ NaN₃, 9: DNA+1.0 mmol·L⁻¹ Vit C +20 μmol·L⁻¹ complex 2 +100 μmol·L⁻¹ NaN₃

图8 加入抑制剂后配合物切割 pBR322 DNA 的凝胶电泳图

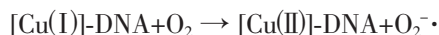
Fig.8 Cleavage of pBR322 DNA by the complexes in the presence of an inhibitor DMSO, TMP, or NaN₃

由图8可知,在没有 DMSO、TMP 或 NaN₃ 存在的条件下,2个配合物都能将 pBR322 DNA 共价闭环的超螺旋构型(Form I)切割成缺刻构型(Form II)(第2,3泳道)。然而,羟自由基·OH 抑制剂 DMSO 的加入可明显抑制配合物对 pBR322 DNA 的切割作用(第4,5泳道),表明切割作用与羟自由基·OH 有关;另外,加入单线态氧 ¹O₂ 抑制剂 TMP 后,配合物对 pBR322 DNA 的切割被明显抑制(6,7泳道),表明切割作用还可能涉及到单线态氧 ¹O₂ 或者其类似物,用另一单线态氧 ¹O₂ 抑制剂 NaN₃ 试验也得到了类似的结果(第8,9泳道)。综合以上分析结果,推测两配合物切割 pBR322 DNA 涉及到羟基自由基·OH、单线态氧 ¹O₂ 或者单线态氧 ¹O₂ 类似物,可能的反应历程如下:

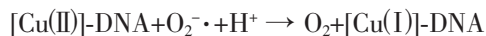
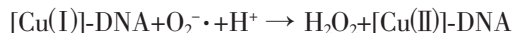
配合物(以[Cu(II)]表示)首先与 DNA 作用,然后在 Vit C 作用下被还原:



而 [Cu(I)]-DNA 中 Cu⁺易被空气中 O₂ 氧化产生 O₂⁻·(Haber-Weiss 反应第一步)^[41]:



标题配合物与本课题组所报道的芳胺铜(II)氨基酸配合物有着类似的配位组成和结构,可能具有超氧化物歧化酶(SOD)活性^[42],因而能有效地催化 O₂⁻·歧化产生 H₂O₂ 和 O₂:



接着 H₂O₂ 氧化 [Cu(I)]-DNA 产生活性氧物种,如羟自由基·OH、单线态氧 ¹O₂ 或其类似物,例如 Cu-O₂^[43],这些活性氧物种能进攻并切割 pBR322 DNA 双螺旋结构^[1,42-45]。

参考文献:

- [1] Jiang Q, Xiao N, Shi P F, et al. *Coord. Chem. Rev.*, **2007**, **251**(15/16):1951-1972

- [2] Biver T, Secco F, Venturini M. *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, **252**(10/11):1163-1177
- [3] Garoufis A, Hadjikakou S K, Hadjiliadis N. *Coord. Chem. Rev.*, **2009**, **253**(9/10):1384-1397
- [4] Bencini A, Lippolis V. *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, **254**(17/18):2096-2180
- [5] REN Xiang-Xiang(任祥祥), WANG Cai-Xia(王彩霞), LU Yan-Mei(卢艳梅), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2010**, **26**(5):891-898
- [6] ZHOU Jian-Liang(周建良), CHUN Xiao-Gai(春晓改), ZHOU Lin-Jiao(周琳姣), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2010**, **26**(4):645-650
- [7] Patra A K, Bhowmick T, Roy S, et al. *Inorg. Chem.*, **2009**, **48**(7):2932-2943
- [8] Jiang J, Tang X L. *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, **104**(5):583-591
- [9] Efthimiadou E K, Karaliota A, Psomas G. *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, **104**(4):455-466
- [10] LU Yan-Mei(卢艳梅), LE Xue-Yi(乐学义). *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2011**, **27**(2):199-213
- [11] LI Hong(李红), LE Xue-Yi(乐学义), WU Jian-Zhong(吴建中), et al. *Acta Chim. Sin. (Huaxue Xuebao)*, **2003**, **61**(2):245-250
- [12] DING Yang(丁杨), REN Xiang-Xiang(任祥祥), ZHUANG Chu-Xiong(庄楚雄), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2009**, **25**(4):656-662
- [13] GU Qin(古琴), LE Xue-Yi(乐学义), XIE Yun(谢韵), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2006**, **22**(4):757-760
- [14] JIANG Qin(姜琴), SHI Peng-Fei(施鹏飞), ZHU Yang-Guang(朱阳光), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2009**, **25**(4):589-595
- [15] Wright J B. *Chem. Rev.*, **1951**, **48**(3):397-541
- [16] Bhattacharya S, Chaudhuri P. *Curr. Med. Chem.*, **2008**, **15**(18):1762-1777
- [17] Choquesillo-Lazarte D, Covelo B, Gonzalez-Perez J M, et al. *Polyhedron*, **2002**, **21**(14/15):1485-1495
- [18] Mothilal K K, Karunakaran C, Rajendran A, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, **98**(2):322-332
- [19] REN Xiang-Xiang(任祥祥), LU Yan-Mei(卢艳梅), LE Xue-Yi(乐学义). *Chem. Bull. (Huaxue Tongbao)*, **2010**, **73**(6):551-555
- [20] Devereux M, McCann M, O' Shea D, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, **98**(6):1023-1031
- [21] Devereux M, O' Shea D, Kellett A, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2007**, **101**(6):881-892
- [22] El-Sherif A A, Jeragh B J A. *Spectrochim. Acta Part A*, **2007**, **68A**(3):877-882
- [23] Gumus F, Eren G, Acik L, et al. *J. Med. Chem.*, **2009**, **52**(5):1345-1357
- [24] Saha D, Das S, Bhaumik C, et al. *Inorg. Chem.*, **2010**, **49**(5):2334-2348
- [25] Lezcano M, Soufi W A L, Novo M, et al. *J. Agric. Chem.*, **2002**, **50**(1):108-112
- [26] Delescluse C, Piechock M P, Ledirac N, et al. *Biochem. Pharmacol.*, **2001**, **61**(4):399-407
- [27] Zhang S C, Zhu Y G, Tu C, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, **98**(12):2099-2106
- [28] Yue S M, Xu H B, Ma J F, et al. *Polyhedron*, **2006**, **25**(3):635-644
- [29] The Chemical Society of Japan. Translated by AN Jia-Ju(安家驹), CHEN Zhi-Chuan(陈之川). *Handbook of Inorganic Compounds: Vol.2* (无机化合物手册:第2册), Beijing: Chemistry Industry Press, **1986**:513
- [30] Cater M T, Rodriguez M, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, **111**(24):8901-8911
- [31] Geary W J. *Coord. Chem. Rev.*, **1971**, **7**(1):81-122
- [32] Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. 4th Edition*, New York: John Wiley and Sons Inc., **1986**:257
- [33] SONG Zhi-Jun(宋智君), LE Xue-Yi(乐学义), LI Hong(李红), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2005**, **21**(4):527-530
- [34] ZHOU Xiao-Hua(周晓华), LE Xue-Yi(乐学义), LI Ming-Hua(李明华). *Chem. J. Chinese Universities (Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, **2000**, **21**(5):681-682
- [35] Tysoe S A, Baker A D, Strekas T C. *J. Phys. Chem.*, **1993**, **97**(8):1707-1711
- [36] Wolfe A, Jr. Shimer G H, Meehan T. *Biochemistry*, **1987**, **26**(20):6392-6396
- [37] Selvakumar B, Rajendiran V, Maheswari P U, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, **100**(6):316-330
- [38] Lakowicz J R, Webber G. *Biochemistry*, **1973**, **12**(21):4161-4170
- [39] ZHOU Qing-Hua(周庆华), YANG Pin(杨频). *Acta Chim. Sin. (Huaxue Xuebao)*, **2005**, **63**(1):71-74
- [40] SHEN Tong(沈同), WANG Jing-Yan(王镜岩), ZHAO Bang-Ti(赵邦悌). *Biochemistry* (生物化学). Beijing: People Education Press, **1983**.
- [41] Thederahn T B, Kuwabara M D, Larsen T A, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, **111**(13):4941-4946
- [42] LIAO Sheng-Rong(廖升荣), LE Xue-Yi(乐学义), LIN Qing-Bin(林庆斌), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2006**, **22**(2):203-206
- [43] Goynes T E, Sigman D S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, **109**(9):2846-2848
- [44] Ferrer S, Ballesteros R, Sambartolomé A, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, **98**(8):1436-1446
- [45] González-A'lvarez M, Alzuet G, García-Giménez J, et al. *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **2005**, **631**(11):2181-2187