

含双 dppz 配体的钌(II)配合物与 G-四联体的相互作用研究

孙 静* 陈嘉曦 林海玲 刘喜秀 陈文浩 钟东伟

(广东医学院药学院, 东莞 523808)

摘要: 应用紫外-可见吸收光谱、荧光光谱、热变性、圆二色谱等方法在 K^+ 溶液中研究了富含鸟嘌呤的 G-四联体($AG_3(T_2AG_3)_3$)与钌(II)配合物 $[Ru(L)(dppz)_2](PF_6)_4$ ($L=5,5'$ -二(三正丁胺基甲基)-2,2'-联吡啶离子, $dppz=$ 二吡啶并[3,2- $a':2'$,3'- c]吩嗪)的相互作用。紫外和荧光滴定实验表明,配合物与 G-四联体之间存在较强的亲和力,拟合得到的结合常数可达 10^7 ;从热变性实验可以看出,该配合物能够有效地稳定 DNA 的四螺旋结构。

关键词: dppz; 钌(II)配合物; G-四联体

中图分类号: O614.82+1; Q523.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2012)01-0045-05

Interaction between G-Quadruplex and the Ru(II) Complex with Two dppz Ligands

SUN Jing* CHEN Jia-Xi LIN Hai-Ling LIU Xi-Xiu CHEN Wen-Hao ZHONG Dong-Wei

(School of Pharmacy, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China)

Abstract: In this work, the interaction between the guanine-rich oligomer $AG_3(T_2AG_3)_3$ quadruplex and the Ru(II) complex $[Ru(L)(dppz)_2](PF_6)_4$ ($L=5,5'$ -di(1-(tributylammonio)methyl)-2,2'-dipyridyl cation, $dppz=$ dipyrido[3,2- $a':2'$,3'- c]phenazine), has been studied by UV-Visible, fluorescence, DNA melting, and circular dichroism (CD) in K^+ buffer. Both UV-Vis and fluorescence experiments showed that the complex bound to the DNA more tightly, the intrinsic binding constant could reach 10^7 . The DNA melting indicated that the complex can induce the stabilization of quadruplex-DNA.

Key words: dppz; Ru(II) complex; G-quadruplex

0 引 言

人类基因组中富含鸟嘌呤(G),它们通过 Hoogsteen 氢键容易形成四螺旋结构,这种四螺旋结构的 DNA 能够抑制端粒酶的活性。过去的 10 多年间,G-四联体引起了研究者的极大兴趣,因其在 80%以上的肿瘤细胞中表达有高的端粒酶活性,而正常体细胞内几乎测不到^[1-3]。研究表明,能够诱使端粒 DNA 形成 G-四联体结构及可以稳定这种结构的药物均可能成为有效的化疗药物。与其它以端粒酶本身为靶点的抑制剂相比,首先以 G-四联体为靶

点的小分子化合物直接破坏了端粒酶的催化位点,因而能更为迅速地减缓细胞增殖,四联体结构的形成不仅抑制端粒的延长,诱导细胞衰老,而且还能抑制某些癌细胞基因的表达;其次 G-四联体结构的特异性使药物具备了更强的选择性,从而降低了传统药物的细胞毒性;因此由端粒 DNA 所形成的四联体结构已经成为开发端粒酶抑制剂的新靶点^[4-5]。从目前的研究结果来看,金属配合物由于其多变的结构,使得它们能够堆积在 G-四联体末端平面上,且有很好的重叠性,并且配合物所携带的正电荷有利于其与 DNA 的磷酸骨架相互作用,增强其稳定

收稿日期:2011-06-23。收修改稿日期:2011-09-01。

国家自然科学基金(No.21101034),广东医学院博士启动基金(No.B2009003),广东医学院大学生创新课题(No.2010ZYDM002)基金资助项目。

*通讯联系人。E-mail: sjsunjing@yahoo.cn

性,从而抑制端粒酶活性,因此越来越多的过渡金属配合物被设计用来研究其与 G-四联体作用^[6-10]。

Ru(II)配合物能够很好的与 DNA 结合,特别是 Barton 等在 1990 年合成得到的 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$,这种具有分子光开关性质的明星配合物,其配体 dppz 能够插入到双螺旋 DNA 的碱基对中并能够稳定 DNA 的结构^[11-13]。此外,石硕等的研究还发现,对于 5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3' ($\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$) 和 5'-CCCTAACCCTAACCCTAACCCT-3' 这两种序列的 DNA, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 同样表现出了显著的“光开关”性质^[10],并且无论在 K^+ 或者 Na^+ 溶液中,配合物更倾向与 $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$ 形成的四联体作用。当然,这类研究仍然是比较传统的含有两个非插入配体和一个插入配体的配合物,对于含有两个插入配体和一个非插入配体的配合物研究的则相对较少。我们曾报道了该配合物与小牛胸腺 DNA 的作用,在与双螺旋 DNA 的作用中,配合物表现出了较高的活性^[14]。在本文中,我们主要研究该配合物与 $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$ 的相互作用。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

5,5'-二甲基-2,2'-联吡啶购自 Sigma-Aldrich 公司,配合物参照文献^[14]制备,结构如图 1 所示。 $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$ 购自上海生工,经过 PAGE 分离纯化获得,其余均为市售分析纯试剂,用前未做进一步处理;实验用溶液使用 Millipore 纯水配制,所有实验用缓冲溶液均含有 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{EDTA}(\text{pH}=7.0)$ 。配合物与 DNA 相互作用的电子吸收光谱、荧光光谱、热

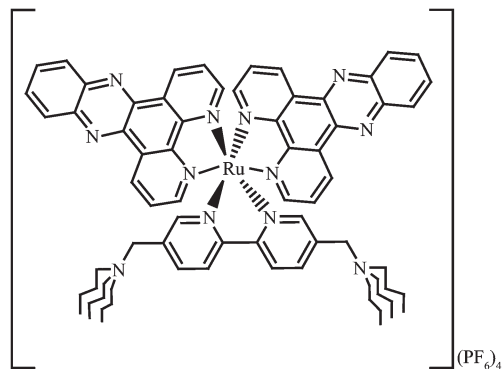


图 1 钌(II)配合物的结构图

Fig.1 Molecular structure of Ru(II) complex

变性实验、结合比实验和 CD 光谱均在这种缓冲溶液中进行。

将 $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$ 溶于上述缓冲液中,加热至 90°C ,并保持 $5\sim 10 \text{ min}$,自然冷却至室温,放到冰箱中保持 4°C 48 h ,以备用。G-四联体浓度的确定^[15]DNA 浓度以碱基对的摩尔浓度计,用紫外可见分光光度计测量 DNA 在 260 nm 的吸光度值 A_{260} ,摩尔消光系数值 ε 为 $2.16 \times 10^5 \text{ mol} \cdot (\text{quadruplex})^{-1} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ 。DNA 的浓度按下式计算:

$$C_{\text{DNA}} = K \cdot A_{260} / 2.16 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$$

电子吸收光谱用 Perkin-Elmer Lambda-850 紫外可见光谱仪,发射光谱用 Perkin-Elmer Ls55 荧光光谱仪,圆二色(CD)谱用 JASCO J-810 圆二色谱仪测得。

1.2 配合物与 G-四联体作用的电子吸收光谱

在紫外-可见吸收光谱仪中,参比池中放入 3.00 mL 缓冲溶液,样品池中放置相同体积的 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 配合物溶液。用微量进样器每次向参比池和样品池中分别加入相同体积 DNA 溶液,使 G-四联体与配合物浓度比值($C_{\text{DNA}}/C_{\text{Ru}}$)按一定的比例递增,混匀约 5 min 后,在 $200\sim 700 \text{ nm}$ 的范围内监测配合物的电子吸收光谱的变化。

1.3 配合物与 G-四联体作用的荧光光谱

配合物与 G-四联体发光实验配制钌配合物溶液($2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),用微量加样器每次往样品池中加入相同体积的 DNA 溶液,使 DNA 与配合物浓度比值($C_{\text{DNA}}/C_{\text{Ru}}$)按一定的比例递增,直至饱和。每次混和均匀约 5 min 后,在 $500\sim 750 \text{ nm}$ 范围监测配合物的荧光光谱变化,用 453 nm 光源激发,记录发射光波峰和发光强度。

1.4 配合物与 G-四联体作用的结合比实验

配制配合物和 G-四联体的混合溶液,使 $C_{\text{DNA}}/C_{\text{Ru}}$ 的比值按一定的比例逐步递增,但保持它们的总浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,同样用 453 nm 光源激发,在 $500\sim 750 \text{ nm}$ 范围监测荧光光谱最大值的变化。

1.5 配合物对 G-四联体热变性的影响实验

DNA 热变性实验使用安装了 Peltier PTP-6($\pm 0.1^\circ\text{C}$)温控仪的 Lambda-850 紫外光谱仪来完成。配制含有 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 配合物的 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 G-四联体溶液以及不含配合物的 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 G-四联体溶液,放入冰箱过夜,测试前先在测量的起始温度下恒温 30 min 。用缓冲溶液扫基线,并用其相应浓度的配合物溶液作参比,测定在 295 nm 处, DNA 在配合物存在和不存在时,不同温度下的吸光度,温度范围为 $40\sim 90^\circ\text{C}$,升温梯度为 2°C ,升温速度为 $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.6 配合物与 G-四联体作用的 CD 光谱

测试前,先扫描缓冲溶液作基线校正。样品池中放置 2 mL 的 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ G-四联体溶液,用微量进样器每次向池中加入相同体积的配合物溶液,使 DNA 与配合物浓度比值($C_{\text{DNA}}/C_{\text{Ru}}$)按一定的比例递增,混匀约 5 min 后,在 200~450 nm 的范围内监测配合物 CD 光谱的变化。

2 结果与讨论

2.1 配合物与 G-四联体相互作用的电子吸收光谱

电子吸收光谱是一种常用于检测小分子与 DNA 相互作用的光谱学方法。当配合物与 DNA 作用时会导致配体所处环境发生改变,结合强弱可通过光谱扰动的变化反应出来。配合物与 DNA 作用的滴定吸收光谱如图 2 所示。与 DNA 作用后,配合物的 MLCT 峰红移为 3 nm,减色率为 7.04%;而 282 nm 处的 $\pi-\pi^*$ 跃迁峰的减色更明显,为 18.69%,这些光谱变化表明配合物与 DNA 之间存在较强的相互作用。

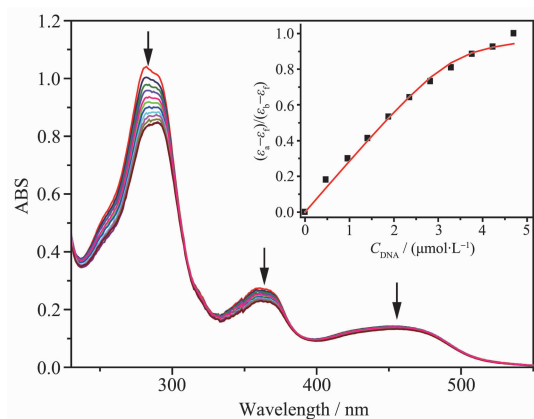


图 2 配合物与 G-四联体作用后的紫外可见光谱图
 $C_{\text{Ru}}=10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{DNA}}=0 \sim 4.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ from top to bottom; Arrows refer to the change in absorbance upon increasing the DNA concentration

图.2 Absorption spectra of the complex increasing concentration of with increasing amounts of G-quadruplex

为了定量的比较配合物与 DNA 作用的强弱,通过紫外滴定光谱实验,以配合物在 453 nm 处的吸光度变化,按下列方程计算出配合物与 DNA 作用的结合常数 K 。

$$(\varepsilon_a - \varepsilon_f) / (\varepsilon_b - \varepsilon_f) = (b - (b^2 - 2K_b^2 C_i C_{\text{DNA}} / s)^{1/2}) / (2K_b C_i)$$

$$b = 1 + K_b C_i + K_b C_{\text{DNA}} / (2s)$$

式中, C_{DNA} 为 G-四联体的浓度, ε_f , ε_a 和 ε_b 分别是配

合物游离、与各浓度 DNA 结合时以及与 DNA 结合饱和时的摩尔吸光系数; C_i 为配合物总浓度, s 为键合位点的大小, K_b 为曲线拟合的结合常数。配合物与 DNA 结合的常数为 $(1.82 \pm 0.70) \times 10^7 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ ($s = 0.84 \pm 0.04$), 表明配合物与 DNA 之间存在较强的作用。与明星分子 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ ($K = 10^5$)^[10] 相比, 配合物表现出更强的作用力, 同时也表明对该 G-四联体具有更强的选择性, 这可能与配合物阳离子所带的高电荷有关, 含季铵盐侧臂的联吡啶离子作为配体的存在, 增加了 DNA 与配合物之间的静电作用。

2.2 配合物与 G-四联体相互作用的荧光光谱研究

荧光法是一种比较灵敏的测试方法, 广泛用于研究配合物与 DNA 的相互作用。若钌(II)多吡啶配合物在某种条件下发荧光, 当加入 DNA 后荧光增强, 说明配合物与 DNA 发生某种方式的结合。荧光增强幅度的大小, 一般反映配合物与 DNA 作用的强弱, 但不能作为配合物是否以插入方式与 DNA 结合的判据。荧光增强的原因在于 DNA 保护了配合物, 使之不受水分子的进攻。配合物的荧光滴定曲线见图 3, 在加入 DNA 后, 配合物的荧光增强幅度为原来的 6.4 倍, 说明配合物受到 DNA 很好的保护。

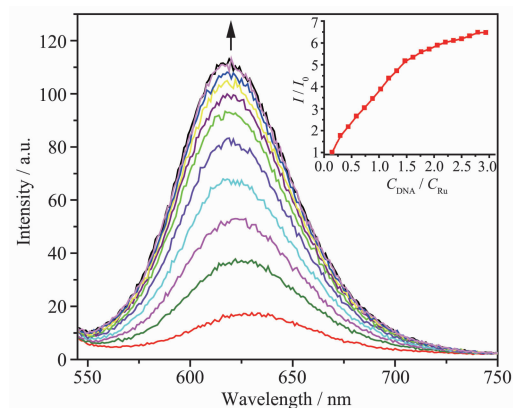


图 3 配合物与 G-四联体作用的荧光强度变化图
 $C_{\text{Ru}}=2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{DNA}}=0 \sim 5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Arrow refers to the emission intensity changes upon increasing DNA concentrations

图.3 Emission spectra of the complex in buffer with increasing amounts of G-quadruplex

我们同时用 McGhee-von Hippel 法^[16-17]对荧光滴定数据进行了拟合, 得到拟合常数 $K = (1.33 \pm 0.91) \times 10^7$ ($n = 0.65 \pm 0.05$), 如图 4。与从吸收光谱中得到的键合常数进行比较发现, 尽管出于计算方法的不同, 两套键合常数之间会存在差异, 两个键合常数都说明配合物能够很好的与 G-四联体作用。

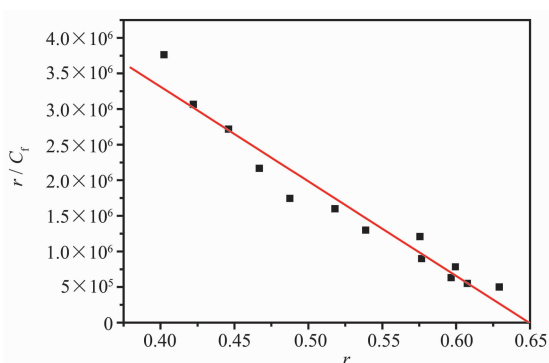
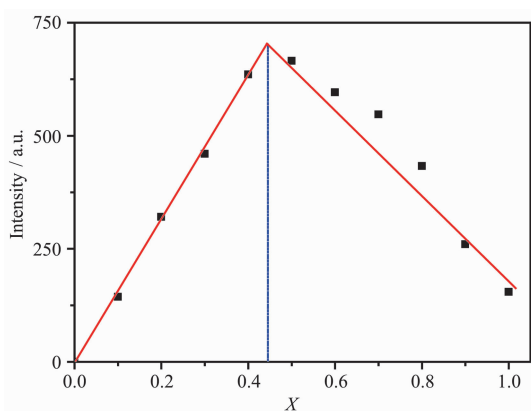


图 4 配合物与 G-四联体作用的荧光 Scatchard 图

Fig.4 Scatchard plot of the fluorescence titration data of the complex bound to G-quadruplex

2.3 配合物与 G-四联体作用的结合比计算

在 K^+ 的缓冲溶液中, G-四联体可使配合物的荧光强度增强, 配合物与 DNA 的结合比例通过 Job plots 获得, 如图 5。通过荧光强度的改变, 我们发现交叉点在 0.44 左右, 所以配合物与 DNA 的结合比例大致为 1:1。



X: mole fraction of complex added to DNA

图 5 配合物与 G-四联体的结合比例图

Fig.5 Job plot using luminescence data for the complex and G-quadruplex

2.4 配合物对 G-四联体热变性的影响

Scaria 等^[18]指出, G-四链体与单链 DNA 的紫外吸收光谱在 280 nm 左右有一个等吸收点(isoabsorbed point), 在波长大于 285 nm 时, G-四链体的紫外吸收值大于单链核酸, 二者吸收值的差距在 295 nm 处达到最大。据此, Mergny 等^[19]在 295 nm 下对多种能够形成 G-四链体的寡核苷酸序列进行了紫外吸收测定, 发现根据该波长下测定的 G-四链体热变性曲线, 不仅能够检测 G-四链体的形成及解链, 而且能够准确的得出 G-四链体的熔点(T_m)及其它热力学常数。因此, 在本实验中采用 295 nm 作为检测

波长。

图 6 给出了 DNA 在未加配合物前和加入配合物后的热变曲线, 从图中可以得到 G-四联体在含有 K^+ 的缓冲溶液中的熔点为 68.9 °C, 使 $C_{Ru}/C_{DNA}=1:1$ 后, 熔点升至 75.6 °C, 升高幅度为 6.7 °C。熔点如此明显的升高可以表明插入配体 dppz 极有可能与 DNA 的碱基发生了较强的 $\pi-\pi$ 堆积作用, 从而提高了 G-四链体结构的稳定性。由于抑制端粒酶的活性和稳定四链体结构有密切的关系, 因此配合物有可能发展成为潜在的端粒酶抑制剂。

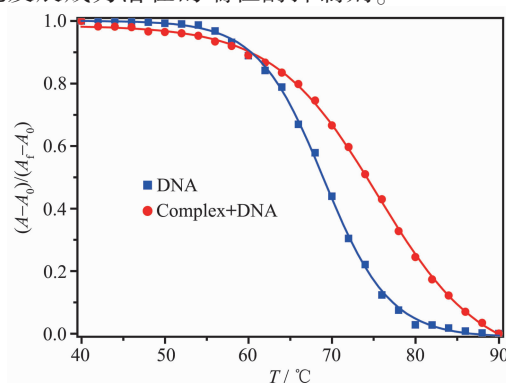
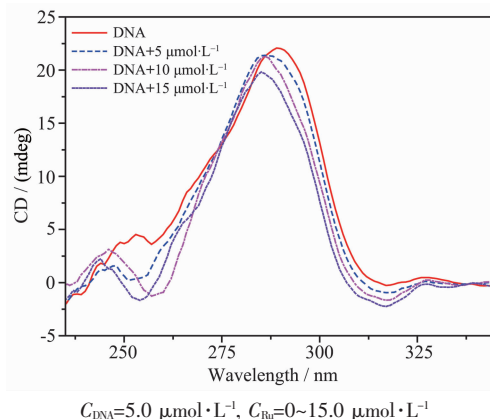


图 6 G-四联体在无配合物(■)和有配合物(●)存在下的热变性曲线图

Fig.6 Normalized UV melting curves of G-quadruplex in the absence (■) or presence of the complex (●)

2.5 配合物与 G-四联体作用的 CD 光谱研究

在药物小分子与 DNA 相互作用的研究中, CD 光谱是一项非常有用的技术, 因为 CD 光谱对于小分子与 DNA 作用的模式非常敏感, 它可以反映出 DNA 的构象变化。 K^+ 可以诱导和稳定人体端粒 DNA 形成平行和反平行结构, 然而, 对于光谱学的



$C_{DNA}=5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $C_{Ru}=0\sim 15.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 7 在无配合物与有配合物存在下 G-四联体的 CD 光谱图

Fig.7 CD spectra of G-quadruplex in the absence and presence of the complex

解释,如 CD 信号出现减色、形状的改变以及峰宽的变化还是存在很大的争议^[20]。图 7 给出了 G-四联体在配合物存在和不存在时的 CD 信号,随着配合物的加入,290 nm 处的最大吸收峰移到 285 nm 左右且强度也有所减弱,这表明配合物有使 DNA 形成反平行结构的倾向,在 295 nm 左右出现的正峰也同样说明这一点^[21-22]。此外,在这种高离子强度的溶液中,DNA 的构型并没有发生明显的变化。

综合考虑配合物的结构和 G-四联体的作用,我们推测它们之间可能的作用模式与具有类似结构的配合物 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 以及 $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{dppz}-\text{COOH})(\text{N}^{\text{C}})\text{JCF}_3\text{SO}_3]^{7-}$ 相似,采用末端堆积的模式,具体的作用细节还需要经过进一步的研究。

3 结 论

利用紫外-可见吸收光谱滴定得到了配合物与 G-四联体作用的结合常数为 1.82×10^7 ; 荧光光谱滴定实验显示加入 DNA 后,配合物在缓冲溶液中的荧光强度增幅为 6 倍多;热变性实验表明,在配合物的存在下 DNA 的熔点升高可达到 6.7 °C。这些结果证实,配合物可以与 DNA 发生较强作用,能够稳定 DNA 的四联体结构,并对这种结构有选择性。结合比实验证明配合物与 DNA 的结合比为 1:1。同时,由于抑制端粒酶的活性和稳定四螺旋结构有密切的关系,配合物有可能成为潜在的端粒酶抑制剂。尽管如此,在 K^+ 溶液中,配合物并没有改变 DNA 的构型。

参考文献:

- [1] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, et al. *Science*, **1994**, **266**:2011-2015
- [2] Shay J W, Bacchetti S. *Eur. J. Cancer*, **1997**, **33**:787-791
- [3] Kelland L R. *Anticancer Drugs*, **2000**, **11**:503-513
- [4] Burger A M, Dai F, Schultes C M, et al. *Cancer Res.*, **2005**, **65**:1489-1496
- [5] Gabelica V, Baker E S, Teulade-Fichou M P, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, **129**:895-904
- [6] Bertrand H, Bombard S, Monchaud D, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2007**, **12**:1003-1014
- [7] Ma D L, Che C M, Yan S C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, **131**:1835-1846
- [8] Kielyk R, Fakhoury J, Moitessier N, et al. *Chem. Eur. J.*, **2008**, **14**:1145-1154
- [9] Talib J, Green C, Davis K J, et al. *Dalton Trans.*, **2008**:1018-1026
- [10] Shi S, Geng X T, Zhao J, et al. *Biochimie*, **2010**, **92**:370-377
- [11] Friedman A E, Chambron J C, Sauvage J P, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, **112**:4960-4962
- [12] Friedman A E, Kumar C V, Turro N J, et al. *Nucleic Acids Res.*, **1991**, **19**:2595-2602
- [13] Hartshorn R M, Barton J K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, **114**:5919-5925
- [14] Sun J, Wu S, Chen H Y, et al. *Polyhedron*, **2011**, **30**:1953-1959
- [15] Rajput C, Rutkaite R, Swanson L, et al. *Chem. Eur. J.*, **2006**, **12**:4611-4619
- [16] Scatchard G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1949**, **51**:660-672
- [17] McGhee J D, von Hippel P H. *J. Mol. Biol.*, **1974**, **86**:469-489
- [18] Scaria P V, Shire S J, Shafer R H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, **89**:10336-10340
- [19] Mergny J L, Phan A T, Lacroix L. *FEBS Lett.*, **1998**, **435**:74-78
- [20] Lane I A N, Chaires J B, Grayl R D, et al. *Nucleic Acids Res.*, **2008**, **36**:5482-5515
- [21] Goncalves D P N, Rodriguez R, Balasubramanian S, et al. *Chem. Commun.*, **2006**:4685-4687
- [22] Goncalves D P N, Ladame S, Balasubramanian S, et al. *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, **4**:3337-3342