

苯并咪唑衍生的单核钴(II)和单核镍(II)配合物与 DNA 和蛋白质的结合反应性及细胞毒活性研究

陈战芬^{*,1,2} 马艺丹² 华罗光² 张 健²

(¹ 华中科技大学化学与化工学院, 武汉 430074)

(² 湖北师范学院化学与化工学院, 污染物分析与资源化技术湖北省重点实验室,

稀有金属化学湖北省协同创新中心, 黄石 435002)

摘要: 利用紫外吸收光谱、荧光光谱、圆二色光谱(CD)等各种光谱手段对比地研究了由苯并咪唑衍生的单核钴配合物 $[\text{Co}(\text{EDTB})]^{2+}$ (**1**) 和单核镍配合物 $[\text{Ni}(\text{EDTB})]^{2+}$ (**2**) (这里 EDTB 为 *N,N,N',N'*-四(2'-苯并咪唑甲基)-1,2-乙二胺) 与小牛胸腺 DNA (CT-DNA) 和牛血清白蛋白 (BSA) 的相互作用。结果表明, 在生理条件下, 配合物 **1** 和 **2** 均能通过插入方式较强的与 CT-DNA 结合, 诱导 DNA 构象的改变; 且配合物 **1** 对 DNA 的结合能力略强于 **2**, 其结合常数分别为 $K_{b(1)}=3.23 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $K_{b(2)}=2.40 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。配合物与 BSA 相互作用的研究表明, **1** 和 **2** 均能与 BSA 发生较强的相互作用, 结合常数均处在 $10^4 \sim 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; 该结合引起了 BSA 微环境和构象发生变化, 且使 BSA 内源荧光被淬灭, 淬灭机理为静态淬灭。利用 MTT 法研究了配合物 **1** 和 **2** 对小鼠白血病细胞株 P388 和人非小细胞肺癌细胞株 A-549 的体外细胞毒活性, 实验结果表明, 配合物 **1** 和 **2** 对 P388 不敏感, 对 A-549 在高浓度 ($10^{-4} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 下表现出与顺铂相当的细胞毒活性。

关键词: 单核钴配合物; 单核镍配合物; DNA; BSA; 结合反应性; 细胞毒活性

中图分类号: O614.81²; O614.81³

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2014)07-1525-10

DOI: 10.11862/CJIC.2014.240

Reactivities Towards DNA and Protein and Cytotoxic Activities of Benzimidazole Derived Mononuclear Cobalt(II) and Nickel(II) Complexes

CHEN Zhan-Fen^{*,1,2} MA Yi-Dan² HUA Luo-Guang² ZHANG Jian²

(¹ School of Chemistry & Chemical Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

(² Hubei Collaborative Innovation Center for Rare Metal Chemistry, Hubei Key Laboratory of Pollutant Analysis & Reuse Technology, College of Chemistry & Chemical Engineering, Hubei Normal University, Huangshi, Hubei 435002, China)

Abstract: Interactions of benzimidazole derived mononuclear complexes, $[\text{M}(\text{EDTB})]^{2+}$ ($\text{M}=\text{Co}^{2+}$ (**1**) and Ni^{2+} (**2**), EDTB=*N,N,N',N'*-tetrakis(2'-benzimidazolyl methyl)-1,2-ethanediamine), with calf thymus DNA (CT-DNA) and bovine serum albumin (BSA) were been investigated by UV-Vis absorption, fluorescence and circular dichroism (CD). The experimental results suggested that under physiological conditions the two complexes could strongly bind to CT-DNA by the intercalation mode and induce remarkable conformational variations of DNA. And DNA binding ability of **1** is slightly higher than that of **2**, whose binding constants (K_b) are $3.23 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $2.40 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectively. In view of the results of the reactivity towards BSA, complexes **1** and **2** could also strongly interact with BSA with binding constants of $10^4 \sim 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ and induce micro environmental and conformational variation of BSA. The associations between the two complexes and BSA quench the intrinsic

收稿日期: 2013-11-09。收修改稿日期: 2014-03-31。

国家自然科学基金青年(No.21301056); 湖北省教育厅优秀中青年人才科研课题(No.Q20092201); 中国博士后科学基金面上(No.2012M521419)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: chenxf1979@163.com

fluorescence of BSA through a static quenching mechanism. In vitro cytotoxic activities of complexes **1** and **2** against the murine leukemia cell line P388 and the human non-small-cell lung cancer cell line A-549 were studied by MTT assay method. The results indicated that complexes **1** and **2** were not sensitive to the P388 tumor cell line and showed comparable cytotoxicity to cisplatin against the A-549 cell line at high concentrations ($10^{-4} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Key words: mononuclear cobalt(II) complex; mononuclear nickel(II) complex; DNA; BSA; reactivities; cytotoxic activities

0 引言

核酸和蛋白质是生物体的重要组成成份,也是许多药物的药理靶点。在分子水平上研究药物或者配合物小分子与核酸、蛋白质等生物大分子的相互作用,是当前生命科学、药物化学的重要研究课题之一。DNA 作为生命遗传信息的携带者和传递者,是许多抗癌药物的主要作用靶分子,研究外源小分子物质与其的相互作用对于研究致癌化合物的致癌机理和抗癌药物的药理和毒性以及设计合成新型药物方面都有很大的指导意义^[1-2]。蛋白质在生命过程中担当运输、传递、信号传导等多种功能,研究药物分子与蛋白质特别是血清白蛋白的相互作用,有助于了解药物的运输和分布情况,对于阐明药物的作用机制、药代动力学以及药物的毒性都有非常重要的意义^[3]。

苯并咪唑及其衍生物是一种重要的含氮杂环化合物,往往表现出广泛的生物活性,如对 DNA 拓扑异构酶 I 抑制活性、抗癌、杀菌、抗寄生物等活性^[4-6]。近年来,由于含苯并咪唑功能基的有机化合物,具有较强的配位能力及配位构型多样性,使含苯并咪唑配体的配位化学成为十分活跃的研究课题,特别是过渡金属的苯并咪唑类配合物的研究。目前,已经有许多含苯并咪唑的金属配合物被报道具有良好的生物活性,如 DNA 切割、抗肿瘤、酶催化活性等,有些对蛋白质也具有良好的结合性能^[7-10]。一直以来,我们对含多个苯并咪唑的有机配体的金属配合物抱有极大的兴趣。例如,前面我们报道的含多个苯并咪唑配体合成的一个双核镍配合物,表现出良好的 DNA 和蛋白质结合性能,且表现出一定的抗肿瘤活性;由苯并咪唑衍生的单核和三核铜配合物表现出 DNA 结合和切割活性^[8-10]。作为这个领域工作的延续,在本文中,我们利用紫外吸收光谱、荧光光谱、圆二色光谱等方法对比研究了由配体 *N,N,N',N'*-四(2'-苯

并咪唑甲基)-1,2-乙二胺(EDTB)合成的单核钴配合物和单核镍配合物(化学结构见图 1)与小牛胸腺 DNA(CT-DNA)和牛血清白蛋白(BSA)的相互作用;利用 MTT [3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基溴化四唑]法测定配合物 **1** 和 **2** 对小鼠白血病细胞株 P388 和人非小细胞肺癌细胞株 A-549 的体外细胞毒性。

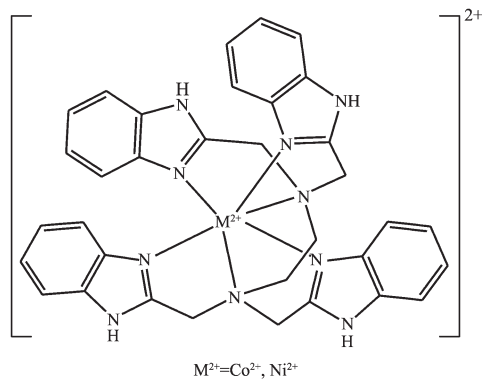


图 1 单核钴配合物 $[\text{Co}(\text{EDTB})]^{2+}$ (**1**)和单核镍配合物 $[\text{Ni}(\text{EDTB})]^{2+}$ (**2**)的化学结构

Fig.1 Chemical structures of the cationic cores of mononuclear complexes $[\text{Co}(\text{EDTB})]^{2+}$ (**1**) and $[\text{Ni}(\text{EDTB})]^{2+}$ (**2**)

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

小牛胸腺 DNA(CT-DNA),牛血清白蛋白(BSA),三羟甲基氨基甲烷(Tris)和溴化乙锭(EB)购自 Sigma 公司。所有其它试剂均为国内市售分析纯,使用前未进一步纯化。水为 MILIPORE 处理过的超纯水。配体 EDTB 按照文献^[11]提供的方法合成。紫外光谱用 Hitachi U-3010 紫外可见光谱仪测定,荧光光谱在 Hitachi F-4500 荧光光谱仪上测定,CD 光谱在 JASCO J-810 自动光谱仪上测定。pH 值用 PHS-3 精密 pH 计记录。

1.2 配合物[Co(EDTB)]²⁺ (1)和[Ni(EDTB)]²⁺ (2)的合成和表征

称取 EDTB(0.58 g, 1 mmol), 加入到 10 mL 的无水乙醇中, 在 60 °C 搅拌下向其中滴加 Co(ClO₄)₂·6H₂O(0.37 g, 1 mmol)的乙醇溶液, 用三乙胺调节反应溶液 pH 至偏碱性, 继续反应 4 h, 冷却过滤, 得到棕红色固体。产率 60.0%。ESI-MS (*m/z*): Calcd. 319.81, Found: 319.53 for [EDTB+Co]²⁺; Calcd. 638.63, Found: 638.53 for [EDTB-H+Co]⁺; Calcd. 738.16, Found: 738.53 for [EDTB+Co+ClO₄]⁺. Element analysis (%) Calcd. for C₃₄H₃₂N₁₀CoCl₂O₈: C, 48.68; H, 3.82; N, 16.71. Found: C, 48.73; H, 3.88; N, 16.72.

称取 EDTB(0.58 g, 1 mmol), 加入到 10 mL 的无水乙醇中, 在 60 °C 搅拌下向其中滴加 Ni(ClO₄)₂·6H₂O(0.26 g, 1 mmol)的乙醇溶液, 用三乙胺调节反应溶液 pH 至偏碱性, 继续反应 4 h, 冷却过滤, 得到棕红色固体。产率 66.0%。ESI-MS (*m/z*): Calcd. 319.69, Found: 319.20 for [EDTB+Ni]²⁺; Calcd. 638.38, Found: 637.60 for [EDTB-H+Ni]⁺; Calcd. 724.45, Found: 725.53 for [EDTB-2H+Ni+CH₃CH₂OH+H₂O+Na]⁺. Element analysis (%) Calcd. for C₃₄H₃₂N₁₀NiCl₂O₈: C, 48.68; H, 3.82; N, 16.71. Found: C, 48.63; H, 3.98; N, 16.82.

1.3 光谱法研究配合物与 DNA 的相互作用

两个配合物与 DNA 间的相互作用利用紫外可见光谱、荧光光谱和圆二色光谱等进行研究。CT-DNA 的储存液在 Tris-HCl 的缓冲溶液 (5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl/50 mmol·L⁻¹ NaCl, pH=7.4) 中配制得到。DNA 的浓度通过测定其在 260 nm 处的吸光度来确定 (DNA 在 260 nm 处的摩尔消光系数为 6 600 L·mol⁻¹·cm⁻¹^[12]), 且在 260 和 280 nm 处的吸收强度之比 (*A*₂₆₀/*A*₂₈₀) 为 1.8~1.9, 表明该 DNA 样品不含蛋白质^[13]。该储备液在 4 °C 保存且使用不超过 4 d。配合物 1 和配合物 2 的初溶液在 10% 乙醇和 90% 的缓冲溶液 (5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl/50 mmol·L⁻¹ NaCl, pH 7.4) 中配制, 初浓度为 2.5 mmol·L⁻¹。

固定配合物的浓度在 25 μmol·L⁻¹, 将 CT-DNA 溶液分别按一定的比例 (*c*_{DNA}/*c*_{complex} = 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7) 加入到配合物的溶液中。记录每个比例下的紫外吸收光谱。在实验中为了消除 CT-DNA 本身的吸收的影响, 相应的 DNA 溶液作为参比溶液。

向 CT-DNA-EB 体系中滴加配合物 1 或 2, 在室

温下测定每次滴加样品 (每次 10 μL) 后的荧光光谱 (激发波长为 526 nm, 发射波长范围 540~750 nm)。在室温下, 固定 CT-DNA 的浓度在 1.5×10⁻⁴ mol·L⁻¹, 将配合物 1 或 2 溶液分别按一定的比例 (*c*_{complex}/*c*_{DNA} = 0.0125, 0.025, 0.075, 0.125, 0.175 和 0.225) 加入到 DNA 的溶液中, 记录每次的 CD 光谱。扫描波长范围为 220~320 nm, 扫描速度 10 nm·min⁻¹, 数据记录间隔 0.1 nm, 每次扫描背景均被自动扣除。

1.4 配合物与 BSA 的相互作用

浓度为 3 mmol·L⁻¹ 的 BSA 初溶液是在缓冲溶液 (50 mmol·L⁻¹ Tris/50 mmol·L⁻¹ NaCl, pH=7.4) 中配制, 该初溶液在 0~4 °C 保存且使用不超过 4 d。配合物 1 或 2 的初溶液在 10% 乙醇和 90% 的缓冲溶液 (50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl/50 mmol·L⁻¹ NaCl, pH=7.4) 中配制, 初浓度为 1 mmol·L⁻¹。在荧光测试中, 将 0.5 mL 30 μmol·L⁻¹ BSA 加入到一系列 10 mL 的测试管中, 向其中加入不同体积的配合物初溶液, 用 Tris-HCl 缓冲溶液将混合物稀释至 5 mL。BSA 最终浓度为 3.0 μmol·L⁻¹, 配合物的最终浓度为 1.5~15 μmol·L⁻¹。混匀试样在 289, 299, 309 K 下放置 20 min 后测量其发射波长, 激发波长为 280 nm; 发射波长范围为 280~500 nm; 激发和发射狭缝宽度均设置为 2.5 nm。对于同步荧光, 激发范围设置为 250~310 nm, 激发和发射的扫描间隔设置为 Δλ=15 nm 和 Δλ=60 nm。在室温下扫描 BSA 溶液及其与配合物混合后的紫外可见光谱, 扫描范围为 200~400 nm。在 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl/50 mmol·L⁻¹ NaCl 缓冲溶液中, 分别测定 BSA 及 BSA 与配合物混合液的圆二色光谱, 其中 BSA 的浓度为 0.3 μmol·L⁻¹, 配合物的浓度为 1.5 μmol·L⁻¹ 和 3.0 μmol·L⁻¹, 扫描范围为 200~250 nm, 扫速 10 nm·min⁻¹, 数据记录间隔 0.1 nm, 每次扫描背景均被自动扣除。

1.5 细胞毒活性

配合物的体外细胞毒活性用小鼠白血病细胞株 P388 和人非小细胞肺癌细胞株 A-549 进行测试。这些细胞在添加了 10% (V/V) 热灭活的胎儿牛血清、2 mmol·L⁻¹ 谷氨酰胺、100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 μg·mL⁻¹ 链霉素的 RPMI-1640 培养基中培养, 培养气氛为 37 °C 下高湿度的 95% 空气和 5% CO₂。配合物对细胞的生长抑制活性用 MTT [3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基溴化四唑] 法测定^[14]。将从指数生长期采集的细胞接种到 96-孔培养板中, 使其粘附 24 h, 然后按浓度梯度加入待研究的化合物, 使化合物最

终形成的浓度分别为 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} 和 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。96-孔培养板再孵化 48 h, 然后向每个孔井中加入浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液 20 μL 后继续孵化 4 h, 然后加入 100 μL “三组分溶液” (10% SDS-5% 异丁醇-12 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl)。培养板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育过夜, 在酶标仪上测定 570 nm 波长下溶液的光密度值 OD (参比波长为 450 nm)。药物对肿瘤细胞的药效用下列公式评估:

$$\text{抑制率} = (\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{药物}}) / \text{OD}_{\text{对照}} \times 100\%$$

2 结果和讨论

2.1 配合物的合成与表征

单核钴配合物和单核镍配合物均是由配体 EDTB 和相应的高氯酸盐在乙醇中合成得到。配体 EDTB 与 Co^{2+} 和 Ni^{2+} 所形成的配合物的电喷雾质谱

如图 2 所示。在图 2a 中, 在 m/z 为 319.53, 638.53 和 738.53 的分子离子峰, 分别归属为 $[\text{EDTB} + \text{Co}]^{2+}$; $[\text{EDTB} - \text{H} + \text{Co}]^{+}$ 和 $[\text{EDTB} + \text{Co} + \text{ClO}_4]^{+}$ 。这 3 个峰的同位素分布方式都与 Isopro 3.0 模拟的结果相一致。在图 2b 中, 在 m/z 为 319.20, 637.60 和 725.53 的分子离子峰, 分别归属为 $[\text{EDTB} + \text{Ni}]^{2+}$; $[\text{EDTB} - \text{H} + \text{Ni}]^{+}$ 和 $[\text{EDTB} - 2\text{H} + \text{Ni} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^{+}$ 。这 3 个峰的同位素分布方式与 Isopro 3.0 模拟的结果相一致。从电喷雾质谱结果可以看出, 配体 EDTB 与高氯酸钴和高氯酸镍均能形成单核金属配合物, 而且配合物在溶液中主要是以 $[\text{Co}(\text{EDTB})]^{2+}$ 和 $[\text{Ni}(\text{EDTB})]^{2+}$ 的形式存在。从文献可以推测配合物 $[\text{Co}(\text{EDTB})]^{2+}$ (1) 和 $[\text{Ni}(\text{EDTB})]^{2+}$ (2) 的结构如图 1 所示^[15-17], Co^{2+} 和 Ni^{2+} 分别与来自 EDTB 分子的 4 个苯并咪唑氮原子和 2 个亚胺基氮原子配位, 形成 1 个六配位的八面体结构。

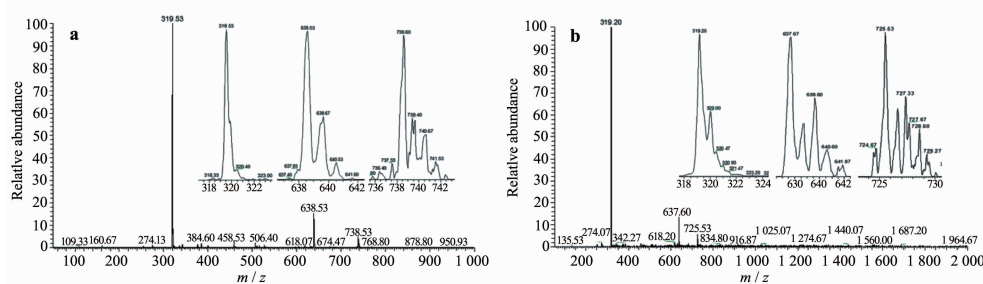


图 2 配合物 $[\text{Co}(\text{EDTB})]^{2+}$ (a) 和 $[\text{Ni}(\text{EDTB})]^{2+}$ (b) 在甲醇中的电喷雾质谱图

Fig.2 ESI-MS spectra of $[\text{Co}(\text{EDTB})]^{2+}$ (a) and $[\text{Ni}(\text{EDTB})]^{2+}$ (b) in methanol

2.2 配合物与 DNA 的相互作用

很多研究指出 DNA 是细胞内金属药物的主要作用靶点^[18]。因此在这里利用紫外-可见光谱, 荧光

光谱和圆二色光谱研究配合物 1 和 2 与 DNA 的相互作用。图 3 给出了配合物 1 和 2 (固定浓度为 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在不同浓度的 CT-DNA 存在下的紫外吸收

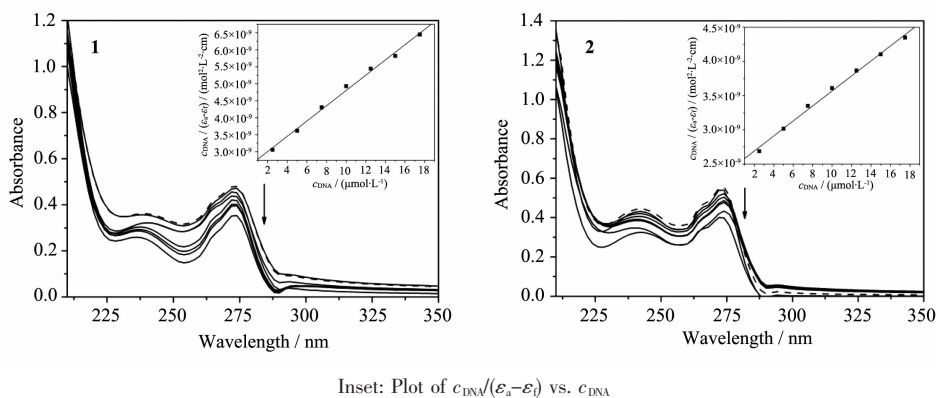


图 3 在 25 $^{\circ}\text{C}$, 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH=7.4) 条件下, 不同浓度 CT-DNA 存在下配合物 1 和 2 的紫外吸收光谱

Fig.3 Absorption spectra of complexes 1 and 2 ($c_{\text{complex}} = 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the absence and presence of increasing amount of CT-DNA (2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 and 17.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) at room temperature in Tris-HCl/NaCl buffer solution (pH=7.4)

光谱。对于 **1**, 处于 238 和 272 nm 的吸收峰归属为配体内的 $\pi-\pi^*$ 跃迁, 它们的吸收强度随着 DNA 浓度的增加而减少, 且略有红移, 这说明了配合物 **1** 与 DNA 发生了相互作用且作用方式是插入作用^[19]。因为配体 EDTB 苯并咪唑平面插入到 DNA 碱基对中, 发生 π 电子堆积, 使其 π^* 空轨道与碱基的 π 电子轨道发生偶合, 能级下降, 从而导致 $\pi-\pi^*$ 跃迁能减小, 产生红移现象; 同时, 偶合后的 π^* 轨道因部分填充电子, 使 $\pi-\pi^*$ 跃迁几率减小, 产生减色效应。对于 **2**, 在其紫外吸收光谱中, 观察到同样的紫外吸收减色效应和红移现象, 所以类似于 **1**, 单核镍配合物 **2** 也能与 DNA 发生相互作用且作用方式也是插入作用。为了定量衡量配合物与 DNA 的结合强弱, 利用如下的方程可以求出配合物与 CT-DNA 相互作用的结合常数 K_b ^[20]。

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

其中 ε_f 为游离配合物在指定波长的摩尔消光系数; ε_b 为配合物与 DNA 结合后在该波长的摩尔消光系数; ε_a 为反应体系在该波长的表现摩尔消光系数。以 $c_{\text{DNA}}/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ 对 c_{DNA} 作图(如图 3 内嵌图), 得到这 2 个配合物的结合常数 $K_{b(1)} = 3.23 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $K_{b(2)} = 2.40 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。由此可见 **1** 和 **2** 的结合常数在同一数量级, 配合物 **1** 对 DNA 的结合能力略大于配合物 **2**。但是却与以经典插入方式与 DNA 结合的 EB ($K_b = 1.23(\pm 0.07) \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$)^[21] 相比小一个数量级, 说明配合物 **1** 和 **2** 与 DNA 可以以插入方式结合, 但是插入作用的强度较弱。这可能是由于配合物虽然富含平面性的苯并咪唑, 但是它们却没有 EB 的平面性好所造成的。

为了进一步研究配合物 **1** 和 **2** 的 DNA 结合性能和可能的作用方式, 我们用溴化乙锭(EB)作为探针研究了它们的结合过程。EB 是已知的 DNA 插入剂, 它与 DNA 结合后引起荧光强度的显著增加, 而如果从 DNA 中置换出 EB, 又会引起荧光强度的减弱^[22]。图 4 是 CT-DNA-EB 体系(虚线)及其中加入配合物 **1** 或 **2**(实线)后的荧光发射光谱(激发波长为 526 nm)。随着配合物 **1** 或 **2** 浓度的增加, DNA-EB 体系在 592 nm 的荧光发射强度明显下降且最终达到饱和而不再下降, 这说明了配合物 **1** 或 **2** 均能置换出绝大多数与 DNA 结合的 EB 而与 DNA 结合。在图 4 中的插图是配合物 **1** 或 **2** 对 DNA-EB 体系静态荧光淬灭的线性拟合图(F_0/F vs c_{complex}), 从图可以看出在淬灭浓度范围内表现均近乎直线的关系。根据 Stern-Volmer 方程(后文公式 2)可求得淬灭常数 $K_{sv(1)} = 1.28 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $K_{sv(2)} = 1.02 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 这说明配合物 **1** 或 **2** 都对 CT-DNA 有较强的亲和性^[23]而且配合物 **1** 对 DNA 的亲性和略高于配合物 **2**, 这与紫外吸收光谱得出的结果一致。

另外利用 CD 光谱来研究配合物 **1** 或 **2** 与 DNA 结合对 DNA 构象的影响。图 5 显示的是 CT-DNA 自身和向其中加入配合物 **1** 或 **2** 的 CD 光谱图。图中 245 nm 处的负峰归属为 B-DNA 的右手螺旋, 275 nm 处的正峰归属为 DNA 碱基对的 $\pi-\pi$ 堆积作用引起的^[24]。对于 **1**(如图 5a), 当 c_1/c_{DNA} 比从 0 增加到 0.175 时, 其正峰椭圆率明显减少且有红移现象; 而负峰椭圆率有上下波动, 但总的趋势是减少且伴随着红移现象。这表明配合物 **1** 与 CT-DNA 发生了相互作用, 并诱导 B 型 DNA 有部分向 Z 型

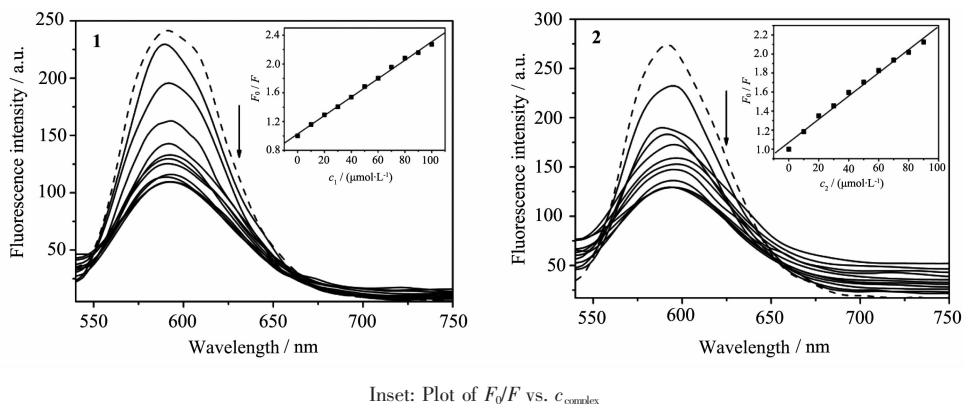


图 4 CT-DNA-EB 体系($c_{\text{DNA}}=c_{\text{EB}}=1.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 虚线)及其中加入配合物 **1** 或 **2**($1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 每增加 $10 \mu\text{L}$ 扫描一次, 实线)后的荧光光谱(激发波长为 526 nm)

Fig.4 Fluorescence emission spectra ($\lambda_{\text{ex}}=526 \text{ nm}$) of CT-DNA-EB system ($c_{\text{DNA}}=c_{\text{EB}}=1.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the absence (dashed line) and presence (solid line) of complexes **1** and **2** ($1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \mu\text{L}$ per scan)

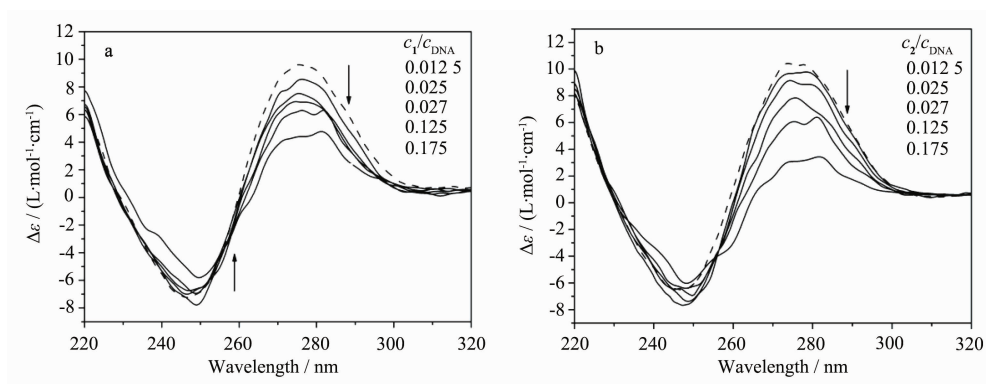


图 5 CT-DNA($1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 虚线)及其中分别加入配合物 **1**(a)和 **2**(b)(实线)的 CD 光谱图

Fig.5 CD spectra of CT-DNA ($1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the absence (dashed line) and presence (solid line) of complexes **1** (a) and **2** (b)

DNA 转化。但是由于在这个实验条件下没有观察到 CD 光谱的反转,所以在溶液中还是以 B 型 DNA 为主。一般而言,小分子与 DNA 的简单沟槽结合和静电作用对碱基堆积和螺旋性影响很小,而插入作用会同时增大正、负峰的强度,使 CT-DNA 的右旋 B 构型更稳定^[25]。在这里,也许是由于配合物 **1** 与 DNA 结合后形成的单链 DNA 的部分碱基不能匹配,导致 DNA 原有的碱基堆积变得疏松和 DNA 双螺旋一定程度的解旋,从而在 CD 光谱上呈现正负峰降低^[26]。这也说明配合物 **1** 与 DNA 之间的作用并非单一的插入作用,可能同时存在静电作用。对于 **2**,有着类似于 **1** 的变化趋势。这说明配合物 **1** 和 **2** 都能够有效的诱导 DNA 构象转变,且转变方式是一样的。

2.3 配合物与 BSA 的相互作用

血清白蛋白(SA)是血浆中含量最多的一种蛋白质,在体液中它可以起到运输脂肪酸、氨基酸、类固醇激素、金属离子和许多药物等小分子的作用,同时

维持血液正常的渗透压。血清白蛋白与药物分子相互作用的研究,有助于了解药物在体内的运输及作用机制,对全面阐明小分子化合物与蛋白质的结合规律和机制有重要意义^[27-28]。由于牛血清白蛋白(BSA)与人血清白蛋白(HSA)的相似度较高,只相差 1 个色氨酸残基,并且 BSA 容易获得,价格便宜,因此广泛使用 BSA 来研究蛋白质与小分子的相互作用。在这里首先利用荧光光谱法研究配合物 **1** 和 **2** 与 BSA 的相互作用。图 6 显示的是配合物 **1** 和 **2** 在 299 K 时对 BSA 的内源荧光产生的影响。由图可以看出,随着配合物 **1** 和 **2** 浓度的增加,BSA 在 345 nm 处的荧光强度均逐渐减小最后达到完全淬灭。这说明了配合物 **1** 和 **2** 均能与 BSA 发生相互作用而淬灭其内源荧光。

小分子对蛋白质的荧光淬灭通常分为静态淬灭和动态淬灭,一般可根据不同温度下淬灭常数的变化趋势来判断。如果淬灭常数随着温度的升高而增大,表明该淬灭过程主要为动态淬灭,而静态淬灭的

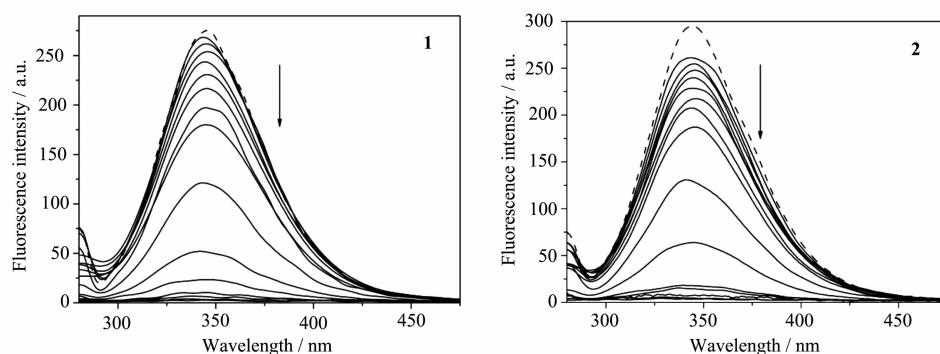


图 6 在 299 K, pH=7.4 和不同浓度配合物 **1** 或 **2** 存在下 BSA 体系($3.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}}=280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=345 \text{ nm}$)的荧光光谱

Fig.6 Fluorescence spectra of BSA ($3.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}}=280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=345 \text{ nm}$) in the absence (dashed line) and presence (solid line) of complexes **1** or **2** ($1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 12.0, 15.0, 30.0, 60.0, 90.0, 120.0, 150.0, 180.0, 210.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) at 299 K and pH=7.4

淬灭常数会随着温度升高而降低^[29]。在这里为了研究配合物 **1** 和 **2** 对 BSA 的荧光淬灭机理,应用下面的 Stern-Volmer 方程对不同温度下配合物 **1** 和 **2** 对 BSA 的荧光淬灭数据进行处理^[30]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}c_Q = 1 + k_q\tau_0c_Q \quad (2)$$

式中 F_0 和 F 分别是表示不加和加入配合物时体系的荧光强度; K_{SV} 为 Stern-Volmer 淬灭常数; c_Q 为淬灭剂的浓度; k_q 为荧光淬灭速率常数; τ_0 为不存在淬灭剂时荧光生物大分子的平均寿命,生物大分子的荧光平均寿命一般约为 10^{-8} s^[31]。

将 F_0/F 对 c_Q 作图(如图 7),由图看出在不同温度下配合物 **1** 和 **2** 对 BSA 荧光淬灭的 Stern-Volmer 图均呈现良好的直线关系,这表明这 2 个配合物对 BSA 荧光强度的淬灭过程均是单一淬灭机理^[32]。由图 7 中直线的斜率及截距可求出 K_{SV} 和 k_q , 计算结

果见表 1。从表中数据可以看出,随着温度的升高,2 个配合物的 K_{SV} 均是下降的,而且 2 个配合物对 BSA 的荧光淬灭速率常数 k_q 的数值在 10^{12} 数量级,远大于由扩散和碰撞引起的动态淬灭的 k_q 值 (2.0×10^{10} L·mol⁻¹·s⁻¹)。由此可见,配合物 **1** 和 **2** 对蛋白质 BSA 的荧光淬灭作用不是动态淬灭,而是它们与 BSA 形成基态复合物,导致蛋白质内源性荧光的淬灭,其淬灭过程为静态淬灭。这一结论也在紫外可见吸收光谱中得到证实。在 BSA 的紫外可见光谱中,BSA 在 278 nm 附近的吸收是由色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基中 $\pi-\pi^*$ 和 $n-\pi^*$ 跃迁引起的^[33]。当向 BSA 溶液中加入配合物 **1** 和 **2** 时,发现 BSA 在 278 nm 处的吸收峰分别蓝移了 5 nm(**1**)和 4 nm(**2**),这就证明了配合物 **1** 和 **2** 对 BSA 的荧光淬灭是通过形成复合物的静态淬灭过程^[34]。

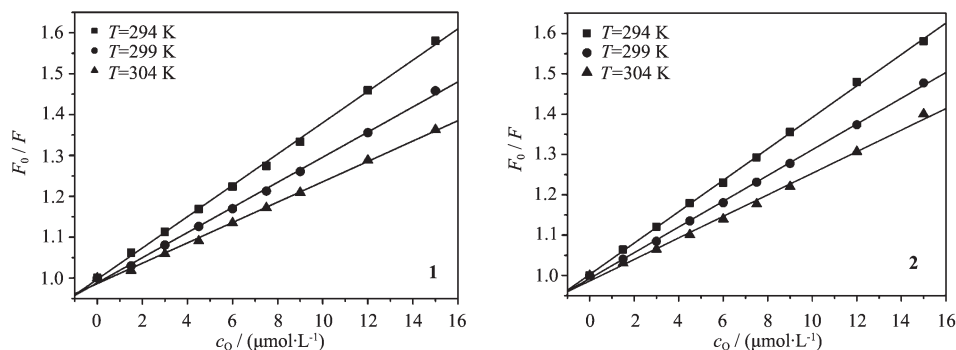


图 7 在不同温度, pH=7.4 下配合物 **1** 或 **2** 对 BSA 荧光淬灭的 Stern-Volmer 图

Fig.7 Stern-Volmer plots for the quenching of BSA ($3.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) by complex **1** or **2** ranging from 0 to $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ at different temperatures (294 K, 299 K, and 309 K) and pH=7.4

表 1 配合物 **1** 和 **2** 与 BSA 相互作用的 Stern-Volmer 淬灭常数(K_{sv}),淬灭速率常数(k_q),结合常数(K_A)和结合位点数(n)

Table 1 Stern-Volmer quenching constants (K_{sv}), quenching rate constants (k_q), binding constants (K_A) and number of binding sites (n) for the interaction of complex **1** or **2** with BSA

Complex	T / K	$K_{sv} / (\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$k_q / (\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	$K_A / (\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	n
1	294	$3.8(\pm 0.02) \times 10^4$	$3.8(\pm 0.02) \times 10^{12}$	$3.40(\pm 0.02) \times 10^4$	0.93
	299	$3.1(\pm 0.02) \times 10^4$	$3.1(\pm 0.02) \times 10^{12}$	$1.62(\pm 0.03) \times 10^5$	1.12
	304	$2.5(\pm 0.02) \times 10^4$	$2.5(\pm 0.02) \times 10^{12}$	$5.88(\pm 0.02) \times 10^5$	1.02
2	294	$3.9(\pm 0.02) \times 10^4$	$3.9(\pm 0.02) \times 10^{12}$	$1.10(\pm 0.02) \times 10^4$	0.99
	299	$3.2(\pm 0.02) \times 10^4$	$3.2(\pm 0.02) \times 10^{12}$	$2.15(\pm 0.02) \times 10^5$	0.95
	304	$2.7(\pm 0.02) \times 10^4$	$2.7(\pm 0.02) \times 10^{12}$	$3.99(\pm 0.01) \times 10^5$	1.03

由于配合物 **1** 和 **2** 对 BSA 的荧光淬灭属于静态淬灭,可以利用下面的 Scatchard 公式对配合物 **1** 或 **2** 对 BSA 之间结合常数 K_A 及结合位点数 n 进行计算^[30]:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg c_Q \quad (3)$$

将 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg c_Q$ 作图,求得在不同温度下配合物 **1** 和 **2** 与 BSA 的结合常数和结合位点数见

表 1。由表 1 可以看出,配合物 **1** 和 **2** 与 BSA 的结合常数均处在 $10^4 \sim 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 说明配合物 **1** 和 **2** 与 BSA 之间存在较强的结合能力。而且 2 个配合物与 BSA 的结合常数均随着温度的升高而升高,说明配合物 **1** 和 **2** 与 BSA 的结合均是吸热过程。另外配合物 **1** 和 **2** 与 BSA 作用的结合位点数约等于 1,说明它们之间只存在 1 个结合位点。

为了进一步研究配合物 **1** 和 **2** 与 BSA 的结合对蛋白质结构和构象产生的影响,在这里利用同步荧光和圆二色光谱分别对配合物与 BSA 的反应体系进行了相应的研究。据文献^[35]可知, $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 的同步荧光表现的是蛋白质中酪氨酸(Tyr)残基的特征荧光,而 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 的同步荧光是蛋白质中色氨酸

(Trp)残基的特征荧光。同步荧光光谱最大发射波长的移动,表明残基所处环境的极性和疏水性改变。当 $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 时 BSA 在不同浓度的配合物 **1** 存在下的同步荧光光谱如图 8 所示。随着配合物 **1** 的加入,Tyr 和 Trp 残基的荧光强度不断降低,Tyr 残基最大发射波长红移(从 285 nm 移到 287 nm),Trp 残基最大发射波长位置没有发生明显的移动,这说明配合物 **1** 与 BSA 的相互作用引起 Tyr 残基所处微环境的极性增加和疏水性降低,对 Trp 残基所处的微环境影响很小。当配合物 **2** 加入 BSA 溶液中时,也有类似于 **1** 的同步荧光光谱变化。这说明配合物 **1** 和 **2** 都能引起 BSA 中 Tyr 微环境发生变化,进而引起 BSA 构象发生变化。

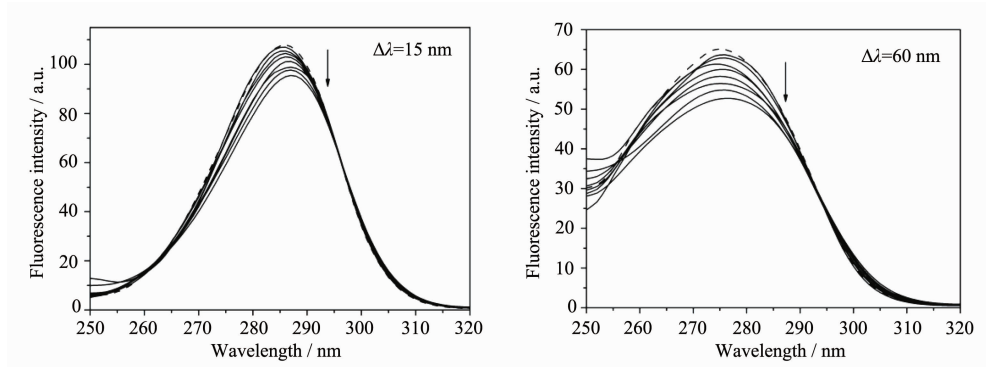


图 8 当 $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 时 BSA 在不同浓度的配合物 **1** 存在下的同步荧光光谱图

Fig.8 Synchronous spectra of BSA ($3.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the presence of increasing amounts of complex **1** (0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 9.0, 12.0, 15.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) at $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ and $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$

图 9 显示了 BSA 在结合配合物 **1** 前后的 CD 谱图。图中,BSA 在 208 和 222 nm 处有 2 个负的吸收峰,这是 BSA 中 α -螺旋结构的 CD 光谱特征峰^[36]。加

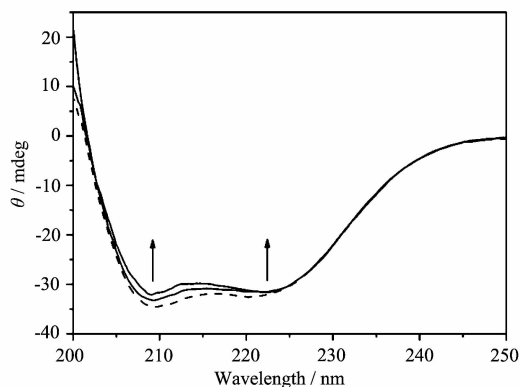


图 9 配合物 **1** 对 BSA 的圆二色光谱的影响

Fig.9 Far-UV CD spectra of BSA ($0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the absence (dashed line) and presence (solid line) of complex **1** (1.5 and $3.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

入配合物 **1** 后,使得 BSA 在 208 和 222 nm 两处的负峰峰高振幅都有一定程度的减弱。配合物 **2** 也有类似的变化趋势。这说明这 2 个配合物都能与 BSA 的主肽链上的氨基酸残基发生相互作用,破坏蛋白质内部的氢键,使 BSA 肽链部分伸展,从而诱导 BSA 二级结构的改变。

2.4 体外细胞毒性测定

利用 MTT 法测定配合物 **1** 和 **2** 对小鼠白血病细胞株 P388 和人非小细胞肺癌细胞株 A-549 的体外细胞毒性,选择顺铂作为参照,结果如图 10 所示。配合物 **1** 和 **2** 对细胞株 P388 不敏感,在整个测试浓度范围内几乎没有表现出明显的抑制效果。对细胞株 A-549,在低浓度($<10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)下,配合物 **1**、**2** 和顺铂均未表现出明显抑制作用;在高浓度($\geq 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)下,配合物 **1** 和 **2** 有类似于顺铂的细胞毒性。例如,当配合物的浓度为 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,配合物 **1** 对 A-549 的抑制率超过 40%,配合物 **2** 对 A-

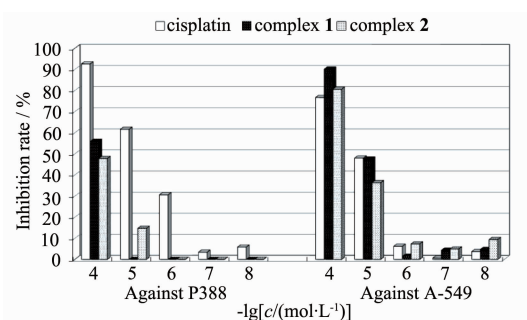


图 10 配合物 1 和 2 对小鼠白血病细胞株 P388 和人非小细胞肺癌细胞株 A-549 的体外细胞毒活性(顺铂作为对照)

Fig.10 In vitro cytotoxic activities of complexes 1 and 2 against the murine leukemia cell line P388 and the human non-small-cell lung cancer cell line A-549 with cisplatin as a positive control

549 的抑制率超过 30%(顺铂的抑制率为 48%);当配合物的浓度为 $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,配合物 1 对 A-549 的抑制率超过 85%,配合物 2 对 A-549 的抑制率超过 80%(顺铂的抑制率为 77%)。总而言之,配合物 1 和 2 对 A-549 表现出一定的细胞毒活性且配合物 1 对 A-549 的细胞毒活性略高于 2。这也可能与 DNA 结合能力有一定的关系。

3 结 论

本文对比地研究了苯并咪唑衍生的单核钴配合物 $[\text{Co}(\text{EDTB})]^{2+}(\mathbf{1})$ 和单核镍配合物 $[\text{Ni}(\text{EDTB})]^{2+}(\mathbf{2})$ 与小牛胸腺 DNA(CT-DNA)和牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。配合物 1 和 2 均能与 DNA 和 BSA 发生较强的相互作用,诱导 DNA 和 BSA 构象发生改变。它们与 DNA 的作用方式包含插入作用,且配合物 1 对 DNA 的结合能力略强于 2。配合物 1 和 2 与 BSA 的结合引起了 BSA 内源荧光的淬灭,且淬灭机理为静态淬灭。体外细胞毒活性实验表明配合物 1 和 2 对小鼠白血病细胞株 P388 不敏感,对人非小细胞肺癌细胞株 A-549 在高浓度($10^{-4} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)下表现出与顺铂相当的细胞毒活性。

感谢:中国科学院上海药物研究所国家新药筛选中心为本文两个化合物所做的细胞毒活性测试,特此致谢。

参考文献:

[1] Jung J, Lippard S J. *Chem. Rev.*, **2007**,**107**:1387-1407
[2] Krishnamoorthy P, Sathyadevi P, Butorac R R, et al. *Dalton*

Trans., **2012**,**41**:4423-4436
[3] Groessl M, Terenghi M, Casini A, et al. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2010**,**25**:305-313
[4] Pilch D S, Xu Z, Sun Q, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**,**94**:13565-13570
[5] El Rashedy A A, Aboul-Enein H Y. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2013**,**13**(3):399-407
[6] Tanious F A, Hamelberg D, Bailly C, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**,**126**:143-153
[7] Liu C L, Wang M, Zhang T L, et al. *Coord. Chem. Rev.*, **2004**,**248**:147-168
[8] Chen Z F, Wang X Y, Zhu Y G, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2007**,**101**:1894-1902
[9] Chen Z F, Wang X Y, Li Y Z, et al. *Inorg. Chem. Commun.*, **2008**,**11**:1392-1396
[10] Chen Z F, Zhang J, Liu C L. *Biomaterials*, **2013**,**26**:827-838
[11] Hendriks H M J, Birker P J M W, Rijn J V, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**,**104**:3607-3617
[12] Reichmann M E, Rice S A, Thomas C A, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**,**76**:3047-3053
[13] Marmur J. *J. Mol. Biol.*, **1961**,**3**:208-218
[14] Alley M C, Scudiero D A, Monks A, et al. *Cancer Res.*, **1988**, **48**:589-601
[15] Chen Z F, Liao Z R, Li D F, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2004**,**98**:1315-1318
[16] WANG Li (王莉), WEI Li-Mei (魏丽梅), ZHANG Yong (张勇), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (无机化学学报)*, **2011**,**27**(1):125-130
[17] QIN Shi-Dong (覃事栋), FENG Si-Si (冯思思), ZHANG Hong-Mei (张红梅), et al. *Acta Chim. Sin. (化学学报)*, **2005**,**63**(13):1155-1160
[18] Tanious F A, Hamelberg D, Bailly C, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**,**126**:143-153
[19] Baldini M, Belicchi-Ferrari M, Bisceglie F, et al. *Inorg. Chem.*, **2004**,**43**:7170-7179
[20] Wolfe A, Shimer Jr. G H, Meehan T. *Biochemistry*, **1987**,**26**: 6392-6396
[21] Psomas G, Raptopoulou C P, Iordanidis L, et al. *Inorg. Chem.*, **2000**,**39**:3042-3048
[22] Kumar C V, Barton J K, Turro N J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, **107**:5518-5523
[23] Lakowicz J R, Weber G. *Biochemistry*, **1973**,**12**:4161-4253
[24] Nakanishi K, Berova N, Woody R W. *Circular Dichroism: Principles and Applications*. New York: Wiley-VCH, **1994**: 23-540
[25] Uma V, Elango M, Nair B U. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2007**,**22**: 3484-3490
[26] Zaludová R, Zakovska A, Kaspárková J, et al. *Eur. J.*

- Biochem.*, **1997**,**246**:508-517
- [27]Timerbaev A R, Hartinger C G, Aleksenko S S, et al. *Chem. Rev.*, **2006**,**106**:2224-2248
- [28]Espósito B P, Najjar R. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**,**232**:137-148
- [29]Samari F, Hemmateenejad B, Shamsipur M, et al. *Inorg. Chem.*, **2012**,**51**:3454-3464
- [30]Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York : Springer, **2006**
- [31]Lakowicz J R, Weber G. *Biochemistry*, **1973**,**12**:4161-4170
- [32]Eftink E R, Ghiron C A. *J. Phys. Chem.*, **1976**,**80**:486-493
- [33]Tysoe S A, Morgan R J, Baker A D, et al. *J. Phys. Chem.*, **1993**,**97**:1707-1711
- [34]Daja D S, Bhuvanesh N S P, Nataraja K. *Dalton Trans.*, **2012**,**41**:4365-4377
- [35]Samari F, Hemmateenejad B, Shamsipur M, et al. *Inorg. Chem.*, **2012**,**51**:3454-3464
- [36]Zhang J, Wang X J, Yan Y J, et al. *J. Agric. Food Chem.*, **2011**,**59**:7506-7513