

钌(II)配合物合成、表征与 DNA 相互作用及其抗氧化性研究*

徐 丽, 何 娟, 闻伴康, 罗简胜, 潘堪尚
(广东药学院医药化工学院, 广东中山 528458)

摘要: 设计合成一个新的钌(II)多吡啶配合物 $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{DBHIP})](\text{ClO}_4)_2$ {dip = 4, 7-二苯基-1, 10-邻菲咯啉; DBHIP = 2-(3, 5-二溴-4-羟基苯)咪唑 [4, 4-f]-(1, 10-邻菲咯啉)}, 采用元素分析, 质谱和 ^1H NMR 对其进行表征。用电子吸收光谱、黏度测试、Job-plot 荧光滴定法研究配合物与 CT DNA 作用, 结果表明配合物以经典的插入模式与 DNA 键合。采用琼脂糖凝胶电泳实验研究配合物诱导 pBR322DNA 断裂。同时也研究配合物在高浓度情况下使 pGL3 DNA 缩合。

关键词: 钌(II)配合物; DNA 缩合; DNA 键合

中图分类号: O627 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2012)01-0072-05

Synthesis, Characterization, DNA-binding and Antioxidant Activity Studies of Ruthenium (II) Complex

XU Li, HE Juan, WEN Bankang, LUO Jiansheng, PAN Kanshang

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China)

Abstract: A novel ruthenium (II) polypyridyl complex $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{DBHIP})](\text{ClO}_4)_2$ (dip = 4, 7-diphenyl-1, 10-phenanthroline, DBHIP = 2-(3, 5-dibromo-4-hydroxyphenyl)imidazo [4, 5-f] [1, 10] phenanthroline) was synthesized and characterized. The DNA-binding property of the complex was investigated by spectroscopic methods and viscosity measurement. The results indicated that the complex interacted with DNA through intercalative mode. The photocleavage of pBR322 DNA by Ru (II) complex was investigated. The complex induced the aggregation of plasmid pGL3 DNA by Gel retardation assay. The antioxidant activity of the ligand and the complex was also performed.

Key words: ruthenium complex; DNA condensation; DNA-binding

钌多吡啶金属配合物具有丰富的光物理、光化学性质, 能够用来设计 DNA 分子探针, DNA 分子光开关和特定位置的 DNA 断裂试剂^[1]。近年来的研究表明钌(II)多吡啶金属配合物还具有断裂和压缩 DNA 特性^[2-3]。随着人们对金属配合物与 DNA 作用的深入研究, 普遍认为小分子化合物与 DNA 的作用方式有共价结合和非共价结合, 非共价结合包括静电作用、面式结合和插入结合三种作

用机理, 而许多重要的应用要求配合物以插入方式与 DNA 结合。本文设计合成了一个新颖的钌(II)多吡啶配合物。在后续的研究中采用元素分析, 质谱和 ^1H NMR 对其进行表征, 用电子吸收光谱、黏度测试、Job-plot 荧光滴定法等手段系统研究配合物与 DNA 作用机理。通过凝胶电泳实验进一步研究该配合物诱导 pBR322DNA 断裂及压缩 pGL3 DNA。

* 收稿日期: 2011-07-09

基金项目: 广东药学院师资队伍经费资助项目; 广东药学院大学生创新实验资助项目

作者简介: 徐丽(1979年生), 女, 博士, 讲师; E-mail: xuli473@163.com

1 实验材料, 仪器与方法

1.1 试剂和仪器

所用化学试剂均为分析纯, 使用前未经进一步纯化。小牛胸腺 DNA 购自华美公司, 配合物用 5 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl (pH = 7.2) 缓冲溶液配制。LCQ 电喷雾质谱仪 (ESMS, Finnigan), Perkin-Elmer240 元素分析仪, Bruker DRX-500 型核磁共振仪, Shimadzu UV-2501 PC 型紫外-可见光谱仪, Ubbelodde 黏度测定仪。

1.2 实验方法

紫外-可见吸收光谱实验中, 在参比池和样品池中分别加入等量的 DNA 以消除 DNA 本身的吸收, 当配合物的电子吸收光谱不再变化, 此时吸收滴定达到饱和。配合物与 DNA 结合常数根据下列方程求得^[4]

$$\frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)}$$

式中, ε_a , ε_f , ε_b 分别是配合物与 DNA 结合、自由配合物和配合物与 DNA 结合达到饱和时的摩尔吸光系数, K 为结合常数。测量黏度时, 温度固定在 (25 ± 0.1) °C。测试液配制方法: 固定 DNA 的浓度, 逐渐增加配合物的浓度, 相对黏度按下式计算

$$\eta = (t - t_0)/t_0$$

式中, t_0 为缓冲溶液流经毛细管所需时间, t 为 DNA 溶液 (含不同浓度的配合物) 流经毛细管所需时间。以 $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ 对结合比率 r ($r = [\text{Ru}] / [\text{DNA}]$) 作图。 η_0 为未加配合物的溶液的相对黏度; 配合物与 CT DNA 结合比的计算通过 job-plot 荧光滴定曲线获得。配制钌配合物和 CT DNA 的混合溶液, 使 [配合物] / [CT DNA] 的比值按一定的比例逐步递增, 但保持它们的总浓度为 50 μmol/L。在 500 ~ 750 nm 范围监测配合物的荧光光谱变化。用 460 nm 光源激发, 记录发射光波峰和发光强度。通过 Job-plot 曲线找到配合物与 CT DNA 结合比。

1.3 琼脂糖凝胶电泳光断裂实验及配合物压缩 pGL3 DNA

将 0.5 μg/μL pBR322 质粒 DNA 溶液原液稀释为 0.1 μg/μL, 在 0 °C 下保存。用 TBE 电泳缓冲液 (pH 7.5) 配制 ρ = 1.2% 的琼脂糖凝胶。向容量 200 μL 的 eppendorf 微量反应管加入 1 μL pBR322DNA 溶液, 加入缓冲液, 并加入 1 μL 一定浓度的配合物溶液, 再混匀并使反应液的终体积保

持在 10 μL。然后用 365 nm 波长的紫外光下照射 30 min 后, 加入 10 × loading buffer 凝胶载样缓冲液 1 μL。加样并使用成都比郎 BG-Power-600 型通用电泳仪在 90 V, 75 mA 的恒压恒流下电泳 90 min, 结果用 Alpha Innotech IS-5500 全自动紫外与可见分析装置拍摄, 并用 BANDSCAN 生物图像分析系统进行处理。

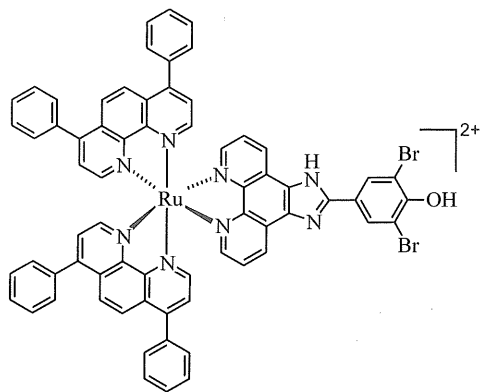
1.4 抗氧化机理实验

抗氧化机理实验是依据 Fenton 体系产生羟基自由基, 研究配合物 (DMF 介质中溶解) 对清除羟基自由基的效果, 进而推测配合物的抗氧化活性^[5]。实验测试的 5 mL 溶液中含有如下物质: 番红精 (28.5 μmol/L), EDTA-Fe (II) (100 μmol/L), 双氧水 (44.0 μmol/L), 所测试的配合物 (0.2 ~ 1.4 μmol/L) 和磷酸盐缓冲液 (67 mmol/L)。测试溶液在 37 °C 水浴中孵育 30 min 后, 在 520 nm 波长下测试吸光度值 3 次, 求平均值。依据公式 $(A_i - A_0) / (A_c - A_0) \times 100\%$ 计算配合物对羟基自由基的清除率而得知配合物的抗氧化能力的大小。式中, A_i 是测试配合物存在时的吸光度值, A_c 是配合物、EDTA-Fe (II) 和双氧水不存在时的吸光度值, A_0 是配合物不存在时的吸光度值。

1.5 配合物 [Ru (dip)₂ (DBHIP)] (ClO₄)₂ 的合成与表征

称取 *cis*-[Ru (dip)₂Cl₂] · 2H₂O 0.436 g (0.5 mmol) 和 DBHIP 0.235 g (0.5 mmol) 放入 30 mL 乙二醇中, 加热至 150 °C 氩气保护下反应 8 h, 得红色清液^[6-7]。冷却至室温, 过滤, 加 40 mL 水稀释后, 加入 NaClO₄ 的饱和溶液即产生大量红色沉淀, 抽滤, 干燥。将干燥后的粗产品用少量乙腈溶解, 用中性氧化铝 (200 目) 柱分离。用乙腈-甲苯 (V:V = 3:1) 混合溶剂淋洗下收集红色组分。然后减压, 蒸去溶剂, 得红色晶体。产率 65%。C₆₇H₄₂N₈Br₂O₉Cl₂Ru 元素分析计算值 (w/%): C, 56.08; H, 2.95; N, 7.81%; 实测值 (w/%): C, 55.94; H, 2.76; N, 8.02%。ES-MS (CH₃OH) *m/z*: 1 335.5 [(M-ClO₄)]⁺, 1 235.7 [(M-2ClO₄-H)]⁺, 618.3 [(M-2ClO₄)]²⁺。¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 9.13 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 8.47 (s, 4H), 8.34 (d, 4H, *J* = 5.5 Hz), 8.27 (d, 2H, *J* = 5.0 Hz), 8.18 (d, 4H, *J* = 5.5 Hz), 7.91 (s, 2H), 7.82 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz), 7.71 ~ 7.58 (m, 20H)。

配合物的结构见图 1。

图 1 配合物 $[Ru(dip)_2(DBHIP)]^{2+}$ 的结构Fig. 1 Structure of complex $[Ru(dip)_2(DBHIP)]^{2+}$

2 结果与讨论

2.1 配合物与 DNA 相互作用的电子光谱研究

随着小牛胸腺 DNA 加入, 配合物的电子吸收光谱发生减色和一定程度红移。对于配合物, 金属到配体电荷跃迁 (MLCT) 峰 (460 nm), 在室温时减色率为 22.3%, 红移 3 nm (图 2), 这是因为配合物的插入配体插入到 DNA 碱基对之间, 与碱基对发生 π 电子堆积后, 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 $\pi-\pi^*$ 跃迁能量减小, 产生红移; 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。配合物与 DNA 作用的结合常数为 $K = 1.91 \times 10^4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 配合物与 DNA 的结合常数与经典的嵌入键合配合物的键合常数 ($1.1 \times 10^4 \sim 4.8 \times 10^4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相近, 这一结果说明配合物与 DNA 之间可能是通过插入作用结合的。

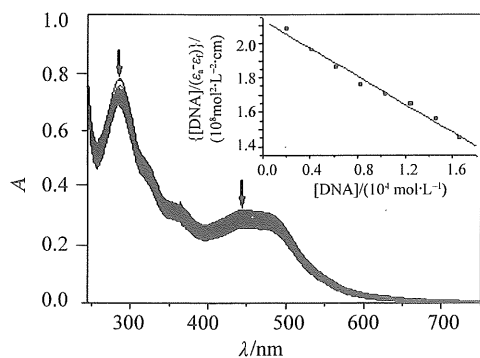
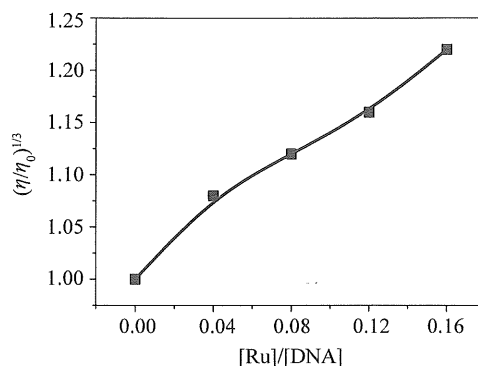


图 2 Tris - HCl 缓冲溶液中配合物与 DNA 作用紫外可见光谱变化图

Fig. 2 UV-vis spectra of CT DNA complexes in Tris-HCl buffer upon

2.2 黏度测试

配合物与小牛胸腺 DNA 以插入方式结合时, DNA 溶液的黏度增加, 以部分插入方式与 DNA 结合时, DNA 溶液的黏度降低; 以静电或沟面方式结合时, DNA 溶液的黏度变化不大。图 3 表示配合物与 DNA 作用黏度变化图。配合物是典型的 DNA 插入试剂, 与 DNA 溶液作用时黏度明显升高。

图 3 恒温 (25 ± 0.1) °C, 当溶液中 $[DNA] = 0.25 \text{ mmol/L}$ 时, 按照一定比例增加配合物浓度得到的黏度变化图Fig. 3 Effect of i complex amount on the relative viscosity of calf thymus DNA at (25 ± 0.1) °C
[DNA] = 0.25 mmol/L

2.3 配合物与 CT DNA 相互作用的结合计量比

我们采用了 Job-plot 荧光滴定法确定配合物与 CT DNA 作用比例 (如图 4)^[8]。不同比例但总浓度保持一致的系列配合物-DNA 混合样品进行荧光光谱测定。读取配合物的特征发射峰值, 将发射峰值对配合物的百分含量作图, 拟合线的拐点相应 x 轴读数即为饱和反应的配合物的含量。结果显示配合物和 CT DNA 的 Job-plot 拟合线的拐点对应 x 值为 0.63 即配合物与 CT DNA 的结合比例为 2:1。

2.4 配合物的不同浓度梯度对质粒 DNA 的光切割影响

质粒 DNA 通常有 3 种构型: Form I 为共价闭环超螺旋型, 其结构紧密, 电泳迁移速率最快; Form II 为开环缺刻型, 双链中的一条出现了一个至几个切口, 其结构松散, 电泳迁移速率最慢; Form III 型为开放的线状结构, DNA 双链在同一部位被切断, 电泳迁移速率介于前两者。在相同条件下, 利用琼脂糖凝胶电泳法研究了在不同浓度情况下的配合物 $[Ru(dip)_2(DBHIP)](ClO_4)_2$ 与 DNA 结合并经紫外线照射后对 DNA 的切割情况, 实验结果见图 5。由图可知, 在 365 nm 的紫外线照射

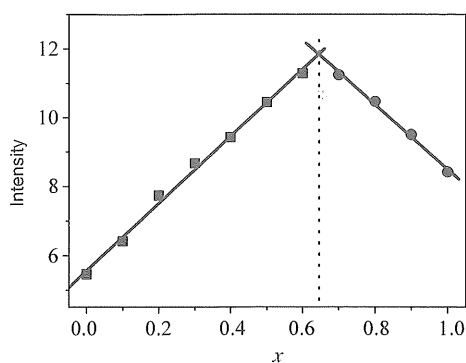


图 4 配合物与 DNA job-plot 荧光曲线图

Fig. 4 Job plot of CT DNA complex with CT DNA in Tris - HCl buffer

下, 不同浓度的 $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{DBHIP})](\text{ClO}_4)_2$ 都具有光切割 DNA 的性质。研究表明随着浓度的增加, 配合物对 DNA 切割作用越来越强。图中 pBR322 DNA 的 Form I 型的量随着配合物浓度的上升不断被切割转化为 Form II 型。

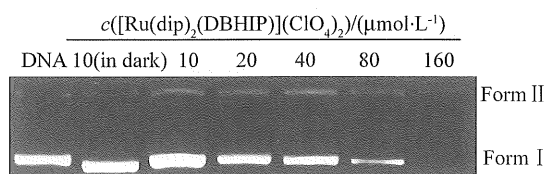


图 5 在 365 nm 的紫外光照射 30 min 后不同浓度配合物对 pBR322 质粒 DNA 进行光切割的凝胶电泳图

Fig. 5 Photoactivated cleavage of pBR 322 DNA in the absence and presence of different concentrations of Ru (II) complex after irradiation at 365 nm for 30 min

2.5 配合物压缩 pGL3 DNA

配合物与超螺旋质粒 pGL3 DNA 作用后, 如果能诱导 DNA 发生缩合, DNA 体积将增大, 因而在凝胶中的迁移速率减少, 迁移距离变短。随着配合物的浓度的增加, DNA 的迁移距离逐渐减少直至为零, 配合物能压缩 DNA^[9]。图 6 为配合物压缩 pGL3 DNA 的凝胶电泳实验图。从图中可以看出, 在配合物的浓度 $\leq 4 \text{ mmol/L}$ 时, 随着浓度的不断增大, Form I 逐渐变少; 随着浓度逐渐增大到 6 mmol/L 时, Form I 已经完全消失。

2.6 配合物抗氧化机理研究

人体内的氧化还原反应主要是通过羟基自由基和超氧阴离子引起 DNA 的损伤。这种损伤是导致人衰老而且被认为是破坏性最强的损伤。因此, 消除此类自由基是抗氧化性实验的主要目标。我们根

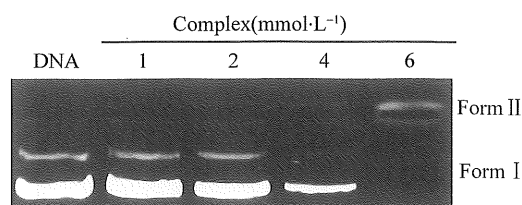


图 6 配合物压缩 DNA 凝胶电泳图

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis retardation assay of DNA condensation induced by complex

据配合物消除羟基自由基能力的大小考察配合物的抗氧化能力大小 (图 7)。当配体形成配合物以后, 抗氧化能力明显增强。

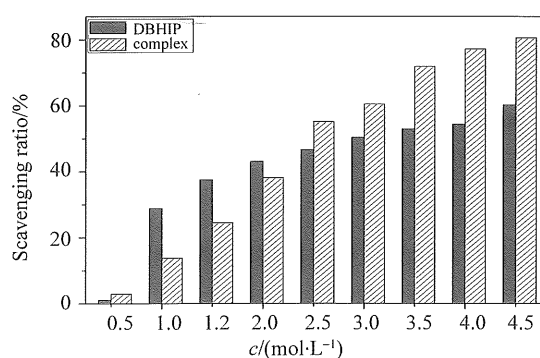


图 7 配体和配合物抗氧化能力图, 实验数据重复 3 次
Fig. 7 Scavenging effect of ligand and complex on hydroxyl radicals. Experiments were performed in triplicate

3 结 语

本文合成了钌一个新的 (II) 多吡啶配合物 $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{DBHIP})](\text{ClO}_4)_2$, 用元素分析、质谱和 ¹H NMR 进行表征, 通过电子吸收滴定、黏度和 Job-plot 荧光滴定实验研究配合物与 DNA 作用, 结果表明配合物与 DNA 之间以插入方式结合。进一步通过凝胶电泳实验研究表明配合物诱导 pBR322 DNA 断裂及压缩 pGL3 DNA。抗氧化性实验表明配合物在较低浓度时显示出较高的清除羟基自由基的能力, 同时它的抗氧化能力强于配体。这主要是因为配体键合到中心金属离子形成配合物增强了配体的抗氧化性能。

参考文献:

- [1] MAHESWARI P U, PALANIANDAVAR M. DNA binding and cleavage activity of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{diimine})]\text{Cl}_2$ complexes[J]. Inorg Chim Acta, 2004, 357(4): 901 - 912. (下转第 81 页)

- [4] KUDO T, HATAI K, SEINO A. *Nocardia seriolae* sp. nov. causing nocardiosis of cultured fish[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1988, 38: 173 - 178.
- [5] CHEN S C, LEE J L, LAI C C, et al. Nocardiosis in sea bass, *Lateolabrax japonicus*, in Taiwan [J]. Journal of Fish Diseases, 2000, 23(5): 299 - 307.
- [6] ISIK K, CHUN J, HAH Y C, et al. *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 49: 833 - 837.
- [7] KUSUDA R, TAKI H, TAKEUEHI T. Studies on a nocardial infection of culture yellow tail II. Characteristics of *Nocardia kampfachi* isolated from a gill - tuberculosis of yellow tail[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1974, 10: 369 - 373.
- [8] CHEN S C, TUNG M C. A epizootic in large mouth bass, *Micropterus salmoides*, Lacepede caused by *Nocardia asteroides* in freshwater pond in southern Taiwan[J]. Journal of Chinese Society of Veterinary Science, 1991, 17: 15 - 22.
- [9] FRIEDMAN C S, BEAMAN B L, CHUN J, et al. *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48: 237 - 246.
- [10] SHIMAHARA Y, NAKAMURA A, NOMOTO R, et al. Genetic and phenotypic comparison of *Nocardia seriolae*, isolated from fish in Japan[J]. Journal of Fish Diseases, 2008, 31: 481 - 488.
- [11] SHIMAHARA Y, HUANG Y F, TSAI M A, et al. Genotypic and phenotypic analysis of fish pathogen, *Nocardia seriolae*, isolated in Taiwan[J]. Aquaculture, 2009, 294: 165 - 171.
- [12] 彭开松, 余锐萍, 祁克宗, 等. 暗纹东方鲀脂肪肝并发诺卡氏菌病[J]. 水产科学, 2008, 27 (12): 629 - 632.
- [13] 王瑞旋, 刘广锋, 王江勇, 等. 养殖卵形鲳鲹诺卡氏菌病的研究[J]. 海洋湖沼通报, 2010, 1: 52 - 58
- [14] 王国良, 袁思平, 金珊. 网箱养殖大黄鱼诺卡氏菌病的初步研究[J]. 水产学报, 2006, 30 (1): 103 - 107.

(上接第 75 页)

- [2] LIU Y J, LIANG Z H, LI Z Z, et al. Cellular uptake, cytotoxicity, apoptosis, antioxidant activity and DNA binding of polypyridyl ruthenium(II) complexes [J]. J Organomet Chem, 2011, 696: 2728 - 2735.
- [3] SUN B, GUAN J X, XU L, et al. DNA condensation induced by ruthenium (II) polypyridyl complexes [Ru(bpy)₂(PIPSH)]²⁺ and [Ru(bpy)₂(PIPNH)]²⁺ [J]. J Inorg Chem, 2009, 48: 4637 - 4639.
- [4] WOLF A, SHIMER Jr G H, MEEHAN T. Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA [J]. Biochemistry, 1987, 26: 6392 - 6396.
- [5] HICKMAN J A. Apoptosis induced by anticancer drugs [J]. Cancer Metast Rev, 1992, 11: 121 - 139.
- [6] SULLIVAN B P, SALMON D J, MEYER T J. Mixed phosphine 2,2'-bipyridine complexes of ruthenium [J]. Inorg Chem, 1978, 17: 3334 - 3341.
- [7] LIU Y J, ZENG C H, LIANG Z H, et al. Synthesis of ruthenium(II) complexes and characterization of their cytotoxicity *in vitro*, apoptosis, DNA-binding and antioxidant activity. [J] Eur J Med Chem, 2010, 45: 3087 - 3095.
- [8] JOB P. Formation and stability of inorganic complexes in solution [J]. Ann Chim (Paris), 1928, 9: 113 - 203.
- [9] MANN A. DNA condensation by poly-L-lysine at the single molecule level; role of DNA concentration and polymer length [J]. Journal of Controlled Release, 2008, 125: 252 - 262.