

Sm (Ⅲ) -HP 配合物与 DNA 的作用机制*

赵娜¹, 王兴明¹, 黎泓波², 胡亚敏¹, 费丹¹, 丁立生³

(1. 西南科技大学材料科学与工程学院化学系, 四川 绵阳 621010;

2. 湖南大学化学化工学院, 湖南 长沙 410082;

3. 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041)

摘要: 应用紫外-可见光谱法和荧光光谱法并以中性红(NR)作光谱探针研究了 Sm (Ⅲ) HP 配合物与 DNA 的作用机制。研究表明, 血卟啉(HP)与 Sm (Ⅲ) 的配合比 $n_{\text{Sm(Ⅲ)}}:n_{\text{HP}} = 1:1$, Sm (Ⅲ) HP 配合物与 DNA 的结合比 $n_{\text{Sm(Ⅲ)HP}}:n_{\text{DNA}} = 1:1$, Sm (Ⅲ) HP 配合物与 DNA 的结合常数 $K_{30^\circ\text{C}}^0 = 1.67 \times 10^4 \text{ L/mol}$ 。该过程为熵所驱动, 其 $\Delta_r H_m^\circ$ 为 $4.86 \times 10^4 \text{ J/mol}$, $\Delta_r S_m^\circ$ 为 $195.61 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$, 30°C 时 $\Delta_r G_m^\circ$ 为 $-1.06 \times 10^4 \text{ J/mol}$ 。Scatchard 法和探针法研究表明, Sm (Ⅲ) HP 与 DNA 之间的结合方式主要是沟区作用。

关键词: Sm (Ⅲ) HP 配合物; DNA; 中性红; 作用方式

中图分类号: O614.337 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579(2009)04-0061-05

Functionary Mechanism between Sm (Ⅲ) HP Complex and DNA

ZHAO Na¹, WANG Xingming¹, LI Hongbo², HU Yamin¹, FEI Dan¹, DING Lisheng³

(1. Department of Chemistry, Southwest University of

Science and Technology, Mianyang 621010, China;

2. Department of Chemistry, Hunan University, Changsha 410082, China;

3. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: Using neutral red (NR) as a probe, functionary mechanism between Sm (Ⅲ) HP and DNA was studied by UV-vis and fluorescence spectroscopy. The results indicated that the binding ratio of $n_{\text{Sm(Ⅲ)}}:n_{\text{HP}}$ is 1:1, $n_{\text{Sm(Ⅲ)HP}}:n_{\text{DNA}} = 1:1$, and the binding constant of Sm (Ⅲ) HP complex with Herring Sperm DNA was $K_{30^\circ\text{C}}^0 = 1.67 \times 10^4 \text{ L/mol}$. Thermodynamic parameters of enthalpy ($\Delta_r H_m^\circ$), entropy ($\Delta_r S_m^\circ$), and Gibbs free energy ($\Delta_r G_m^\circ$) were calculated to be $4.86 \times 10^4 \text{ J/mol}$, $195.61 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$ and $-1.06 \times 10^4 \text{ J/mol}$, respectively. The results suggested that the process of interaction of Sm (Ⅲ) HP complex and Herring Sperm DNA was driven by entropy. The results of scatchard and probe methods suggested that the primary interaction mode between Sm (Ⅲ) HP and DNA was groove binding.

Key words: Sm (Ⅲ) HP complex; DNA; neutral red; function mode

卟啉及其金属卟啉配合物是一类具有独特的共轭大环结构和易修饰等特性能的多齿配位芳香体系化合物, 也是广泛存在于动植物体内的具有特殊生理活性的化合物, 诸如具有氧传递功能的血红蛋

白、具有储存功能的肌红蛋白、光合作用功能的叶绿素、维生素 B₁₂ 及一些生物酶等都含有卟啉基团。目前关于卟啉与 DNA 作用研究的报道较多^[1-4], 近年来的研究也表明, 卟啉化合物药理过程都涉及

* 收稿日期: 2008-09-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30572254)

作者简介: 赵娜(1983年生)女, 硕士研究生; 通讯作者: 王兴明; E-mail: xmwang_xkd@yahoo.cn

到卟啉与核酸的相互作用。镧系稀土金属卟啉配合物因具有优于 d 过渡金属卟啉配合物的特殊光磁性能而更引起人们浓厚的兴趣, 稀土卟啉配合物与肿瘤细胞及用于运输药物的有效载体(如单克隆抗体、血清白蛋白等)都能选择性结合, 具有抗菌消炎和抗肿瘤作用^[5-6]。为了解 Sm(III) HP 配合物与 DNA 的作用机制, 应用紫外-可见光谱法和荧光光谱法进行研究, 进一步获得了两者相互作用的配合比、结合比、平衡常数和作用方式等一系列数据及信息。由于光谱探针溴化乙锭(EB)有强烈的诱变致癌性, 污染环境, 危害很大, 所以研究中采用毒性低的中性红(NR)作为光谱探针以确定作用机制。该研究对进一步探索 Sm(III) HP 配合物的性质、构型、抗肿瘤作用等有重要意义, 也为 Sm(III) HP 配合物在医学、化学生物学等方面的应用研究奠定一定的理论和科学研究基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UV-3400 分光光度计(日本日立), RF-540 荧光仪(日本岛津), pHs-2C 型酸度计(成都方舟科技开发公司), HH-601 超级恒温水浴(金坛金南仪器厂)。

鲑鱼精 DNA(Sigma 公司, AR), 血卟啉(东京化成工业株式会社, AR), 三氧化二钆(北京方正稀土科技研究所有限公司, $w \geq 99.99\%$), 中性红(上海三爱思试剂有限公司, AR), 三羟甲基氨基甲烷(天津科密欧化学试剂开发中心, AR), 其它试剂均为分析纯, 水为二次重蒸水。

1.2 实验方法

1.2.1 配制 Sm(III) Cl_3 溶液 用浓盐酸将 $\text{Sm}(\text{III})_2\text{O}_3$ 溶解, 小火蒸发掉水和过量的盐酸至白色粉末状, 加 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液配制成一定浓度的 Sm(III) Cl_3 溶液。

1.2.2 紫外-可见光谱法和荧光光谱法 在 1 cm 比色皿中加入 3.00 mL HP 溶液, 用 Sm(III) 溶液进行滴定。与此类似, 用 DNA 溶液滴定 Sm(III) HP 溶液, 用 NR 溶液滴定 Sm(III) HP-DNA 溶液。均摇匀, 放置 5 min, 以试剂空白为参比, 扫描吸收光谱或测定吸光度。滴定时每次加入体积为 10 μL , 因此可忽略体积效应(下同)。各种溶液均用 pH = 7.00 的 Tris-HCl 缓冲溶液配制。

荧光光度法实验步骤与紫外-可见光谱法类似。激发和发射光谱扫描狭缝宽度均为 5.0 nm。

2 结果与讨论

2.1 紫外-可见光谱

2.1.1 吸收光谱与结合比 血卟啉的分子结构见图 1。

固定 HP 溶液的浓度, 改变 Sm(III) 的浓度, 扫描吸收光谱。如图 2 所示, HP 特征吸收峰发生明显减色, 特征吸收峰微弱红移, 并在 338、356 和 396 nm 三处出现等色点。这是 Sm(III) 与 HP 形成了配合物的标志。对于卟啉类配体来说, HP 环上的 4 个 N 原子中有两个相对的 N 原子与 H 相连, 为此降低了分子对称性, 使简并的轨道能级发生分裂, 产生 4 个 Q 带吸收峰。而当配体中心与 Sm(III) 配合后, 大环上 4 个 N 原子均与中心离子配位, 从而使 HP 配合物分子对称性提高、能级靠近, 在紫外可见光谱中表现为 Q 带的减少^[7]。而配合物 Soret 带的红移则可能是由于稀土离子与配体大环分子不在一个平面上, 造成分子的平面度降低, 同时离子对大 π 键又有一定吸引作用, 分散大环上的电子, 两方面的作用都不同程度地影响了 HP 环大 π 键的共轭程度^[8-9]。

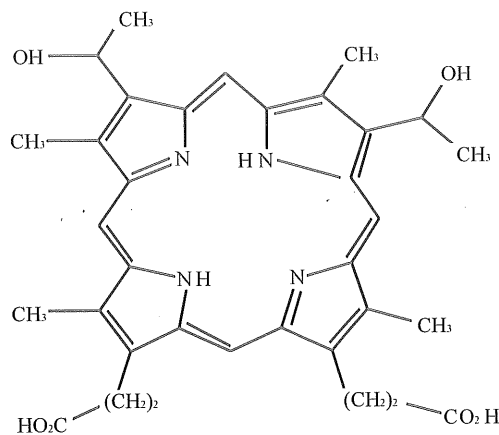


图 1 血卟啉分子结构式

Fig. 1 Structure of hematoporphyrine

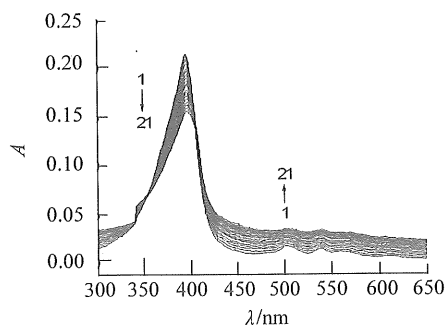


图 2 Sm(III) 对 HP 的吸收光谱的影响

Fig. 2 Influence of the absorption spectra of Sm(III) on HP

$c_{\text{HP}} = 3.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; $c_{\text{Sm(III)}} = 1.2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$
(10 μL per scan, 1 ~ 21; 0 ~ 200 μL)

固定 HP 的浓度, 改变 Sm(III) 的浓度, 在 502 nm 处测定吸光度, 结果如图 3 所示。即实验测得 Sm(III) 与血叶啉的结合比^[10]为 $n_{\text{Sm(III)}}:n_{\text{HP}}=1:1$ 。

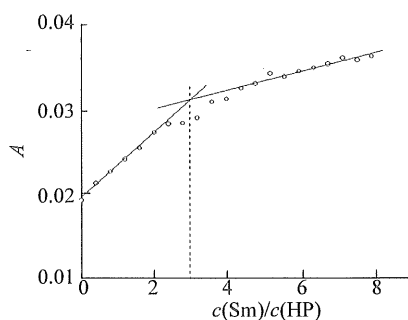


图3 Sm(III) 和 HP 的摩尔比法 (pH=7.00)

Fig. 3 Mole ratio method of Sm(III) and HP

$$c_{\text{HP}} = 3.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$$

同理, 固定 DNA 的浓度, 改变 Sm(III) HP 配合物的浓度, 可求得 Sm(III) HP 配合物与 DNA 的结合比 $n_{\text{Sm(III)HP}}:n_{\text{DNA}}=1:1$ 和 Sm(III) HP-DNA 的表观摩尔吸光系数 $\varepsilon = 1.60 \times 10^5 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。

2.1.2 中性红为探针研究 Sm(III) HP 与 DNA 的相互作用 配制 $n_{\text{Sm(III)HP}}:n_{\text{DNA}}=1:1$ 的复合物溶液, 静置 15 min, 在此复合物中加入 NR, 其吸收光谱变化如图 4 所示, 在 360 nm 和 396 nm 处出现了等色点, 这是由于 NR 与 Sm(III) HP-DNA 形成了新的平衡体系^[11]。在 537 nm 左右处的吸光度随着 NR 的加入而增加, 此处为 NR-DNA 产生的吸收峰, 表明 NR 是嵌插于 DNA 的碱基对中的。

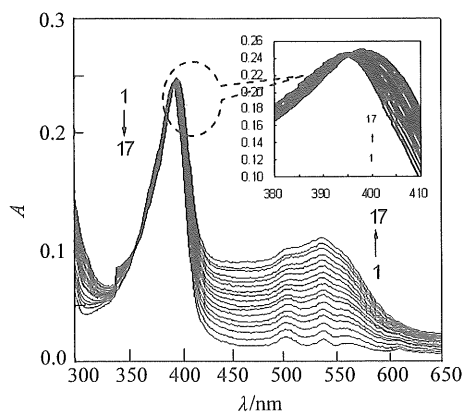


图4 NR 对 Sm(III) HP-DNA 吸收光谱的影响

Fig. 4 Influence of the absorption spectra of NR on Sm(III) HP-DNA

$$c_{\text{NR}} = 2.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}; c_{\text{DNA-Sm(III)HP}} = 2.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L},$$

(10 μL per scan, 1 ~ 17: 0 ~ 160 μL)

2.1.3 双倒数法 紫外-可见吸收光谱法是研究配合物与核酸相互作用的最常用的方法。在温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 时, 固定 Sm(III) HP 浓度, 改变 DNA 浓度, 在 502 nm 处测定吸光度。根据双倒数公式^[12]:

$$\frac{1}{A_0 - A} = \frac{1}{A_0} + \frac{1}{K \times A_0 \times c_{\text{DNA}}} \quad (1)$$

式中 A_0 和 A 分别为加入 DNA 前后体系的吸光度, K 为结合常数。实验结果如图 5 (a) 所示, 计算得到 30 $^{\circ}\text{C}$ 时结合常数 $K^{\ominus} = 1.67 \times 10^4 \text{ L/mol}$ 。同样测定 40 $^{\circ}\text{C}$ 时体系吸光度, 如图 5 (b) 所示, 得结合常数 $K^{\ominus} = 6.91 \times 10^4 \text{ L/mol}$ 。根据下列热力学方程计算反应的焓变 $\Delta_r H_m^{\ominus}$ 、自由能 $\Delta_r G_m^{\ominus}$ 和熵变 $\Delta_r S_m^{\ominus}$ 。

$$\lg K^{\ominus} = \frac{-\Delta_r H_m^{\ominus}}{2.303RT} + \frac{\Delta_r S_m^{\ominus}}{2.303R} \quad (2)$$

$$\Delta_r G_m^{\ominus} = -RT \ln K^{\ominus} = \Delta_r H_m^{\ominus} - T \Delta_r S_m^{\ominus} \quad (3)$$

通过计算求得 Sm(III) HP 与 DNA 相互作用的 $\Delta_r H_m^{\ominus}$ 为 $4.86 \times 10^4 \text{ J/mol}$, $\Delta_r S_m^{\ominus}$ 为 $195.61 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$, 30 $^{\circ}\text{C}$ 时 $\Delta_r G_m^{\ominus}$ 为 $-1.06 \times 10^4 \text{ J/mol}$ 。因此推测 Sm(III) HP 与 DNA 之间可以相互作用^[13-14], 其相互作用的驱动力为熵。

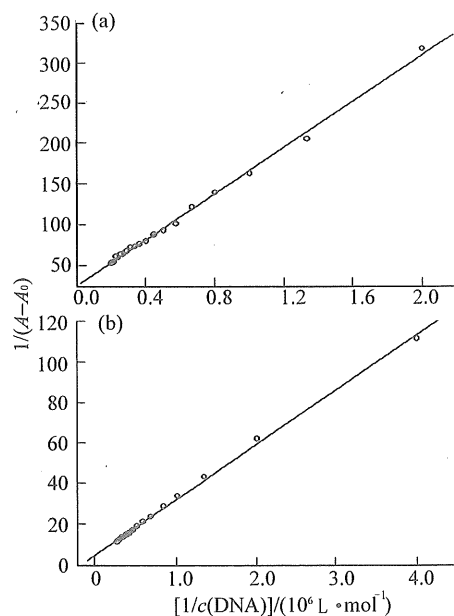


图5 双倒数法

Fig. 5 Double reciprocal method

$$c_{\text{Sm(III)HP}} = 5.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}, \text{ pH} = 7.00,$$

(a) 30 $^{\circ}\text{C}$; (b) 40 $^{\circ}\text{C}$

2.2 荧光光谱研究

2.2.1 NR 探针研究 Sm (Ⅲ) HP 配合物与 DNA 相互作用 NR 为一共轭平面稠环分子, 能专一性地插入 DNA 双螺旋内部的碱基对之间, 使荧光显著增强。固定 DNA-NR 的浓度, 加入 Sm (Ⅲ) HP 溶液。如图 6 所示, 随着 Sm (Ⅲ) HP 的加入, 荧光强度增强, 且在 593、601 和 698 nm 处出现等荧光强度点。这表明 Sm (Ⅲ) HP 与 DNA 的结合为非嵌插作用方式。

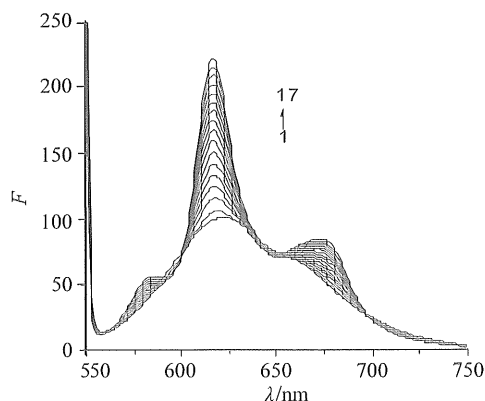


图 6 Sm (Ⅲ) HP 对 DNA-NR 的荧光光谱的影响

Fig. 6 Influence of fluorescence spectra of Sm (Ⅲ) HP on DNA-NR (pH = 7.00)

$c_{\text{DNA}} = 2.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; $c_{\text{NR}} = 3.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$

$c_{\text{Sm(Ⅲ)HP}} = 7.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

(10 μL per scan, 1 ~ 17: 0 ~ 160 μL)

2.2.2 Scatchard 法研究 Sm (Ⅲ) HP 与 DNA 的作用方式 以 NR 为荧光探针研究 Sm (Ⅲ) HP 与 DNA 的作用方式, 由于 NR 能嵌入到双螺旋 DNA 链的碱基对之间, 改变体系的荧光强度。在 Sm (Ⅲ) HP-DNA 体系中滴加 NR, 引起荧光强度变

化, 因此利用 Sm (Ⅲ) HP 存在下 NR 与 DNA 作用的 Scatchard 图可判别配合物与 DNA 的作用方式。NR 与 DNA 作用的特点可用 Scatchard 方程阐述^[15]:

$$r/c = K(n - r)$$

式中 r 为每个核苷酸结合 NR 的分子数, c 为 NR 游离浓度, n 为 r 最大值, K 为单个位点固有的结合常数。以 r/c 对 r 作图, 得一直线。若该直线与不存在 Sm (Ⅲ) HP 的 Scatchard 图有相同的 n 值, 则该物质与 DNA 的作用方式为嵌插方式; 若与 NR 的 Scatchard 图有相同的 K 值, 则该物质与 DNA 的作用为非嵌插方式; 若该直线与 NR 的 Scatchard 图的 K 和 n 均不同, 则该物质与 DNA 的作用为混合方式。

通过研究溶液中有和无 NaCl 两组实验进行对照, 其 K 值和 n 值的变化表明 (见表 1), K 和 n 均发生变化, 因此 Sm (Ⅲ) HP 配合物与 DNA 之间为混合作用方式。另外在 Sm (Ⅲ) HP 配合物存在时, 有 NaCl 的溶液比无 NaCl 的溶液的 n 值大。表明 Sm (Ⅲ) HP 配合物与 DNA 的结合主要是沟区作用, 即 Sm (Ⅲ) HP 配合物与 DNA 沟区中的碱基对之间的范德华力和氢键作用, 而嵌插作用和静电作用是很次要的作用^[16]。

综上所述, Sm (Ⅲ) HP 与 DNA 的结合常数 $K_{30^\circ\text{C}}^\ominus = 1.67 \times 10^4 \text{ L/mol}$ 和 $K_{40^\circ\text{C}}^\ominus = 6.91 \times 10^4 \text{ L/mol}$, 该过程的 $\Delta_r H_m^\ominus$ 为 $4.86 \times 10^4 \text{ J/mol}$, $\Delta_r S_m^\ominus$ 为 $195.61 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$, 30°C 时 $\Delta_r G_m^\ominus$ 为 $-1.06 \times 10^4 \text{ J/mol}$, 其相互作用的驱动力为熵。中性红 (NR) 作为光谱探针和 Scatchard 法指出 Sm (Ⅲ) HP 与 DNA 之间的作用机制主要是沟区作用, 即 Sm (Ⅲ) HP 配合物与 DNA 沟区中的碱基对之间的范德华力和氢键作用。

表 1 Sm (Ⅲ) HP 与鲐鱼精 DNA 的相互作用的 Scatchard 方程

Table 1 Scatchard Equation of the interaction between Sm (Ⅲ) HP and DNA

Curve	$c_{\text{Sm(Ⅲ)HP}}/c_{\text{DNA}}$	$\rho (\text{NaCl}) / \%$	Scatchard 方程	$K/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n
a	0.00	0.5	$1.66 \times 10^6 - 7.43 \times 10^6 X$	7.43×10^6	0.22
		0	$1.72 \times 10^6 - 6.34 \times 10^6 X$	6.34×10^6	0.27
b	0.20	0.5	$1.39 \times 10^6 - 1.48 \times 10^6 X$	1.48×10^6	0.94
		0	$1.85 \times 10^6 - 2.38 \times 10^6 X$	2.38×10^6	0.78
c	0.40	0.5	$2.75 \times 10^6 - 2.06 \times 10^6 X$	2.06×10^6	1.33
		0	$3.33 \times 10^6 - 2.83 \times 10^6 X$	2.83×10^6	1.18
d	0.60	0.5	$4.06 \times 10^6 - 2.30 \times 10^6 X$	2.30×10^6	1.77
		0	$5.45 \times 10^6 - 3.40 \times 10^6 X$	3.40×10^6	1.60
e	0.80	0.5	$6.31 \times 10^6 - 3.48 \times 10^6 X$	3.48×10^6	1.81
		0	$5.05 \times 10^6 - 2.78 \times 10^6 X$	2.78×10^6	1.82

致谢: 本文得到了西南科技大学分析测试中心的支持, 在此表示衷心感谢!

参考文献:

- [1] PING Z, LIANCAI X, JINWANG H, et al. Cationic porphyrin - anthraquinone dyads: Modes of interaction with G-quadruplex DNA[J]. *Dyes and Pigments*, 2009, 83(1): 81 - 87.
- [2] CHUNYING W, GAOYI H, GUOQING J, et al. Study on the interaction of porphyrin with G-quadruplex DNA[J]. *Biophysical Chemistry*, 2008, 137(1): 19 - 23.
- [3] HONG L, WENJIE M, ZHENGHE X, et al. Electrochemistry of a novel monoruthenated porphyrin and its interaction with DNA [J]. *J Electroanalytical Chemistry*, 2007, 600(2): 2007 - 2015.
- [4] KAI W, SHITAO F, LEI W, et al. Porphyrin dimers and their interaction with DNA [J]. *Mendeleev Communications*, 2007, 17(1): 37 - 39.
- [5] 李雅, 韩士田, 刘彦钦, 等. 卟啉化合物的应用研究进展[J]. *河北工程大学学报*, 2007, 24(3): 56 - 59.
- LI Y, HAN S T, LIOU Y Q, et al. Advances in application of porphyrin chemistry[J]. *J Hebei University of Engineering*, 2007, 24(3): 56 - 59.
- [6] CHARLES W. *Electronic Absorption Spectra of Chlorophylls* [M]. London: Academic Press, 1978: 211.
- [7] 刘淑清, 孙浩然, 徐吉庆, 等. 四(4-N-吡啶基)卟啉衍生物的合成及表征[J]. *应用化学*, 2000, 17(3): 260 - 263.
- LIU S Q, SUN H R, XU J Q, et al. Synthesis and characterization of meso-tetrakis(4-pyridyl) porphyrin derivatives[J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2000, 17(3): 260 - 263.
- [8] 张海容, 郭祀远, 李琳, 等. 光谱法研究硫酸酯化壳聚糖与DNA的作用机理[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(11): 2294 - 2298.
- ZHANG H R, GUO S Y, LI L, et al. Study on the binding mode of sulfated chitosans with nucleic acids using spectral analysis[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, 27(11): 2294 - 2298.
- [9] LEE L K, SABELLI N H, LEBRETON P R. Theoretical characterization of phthalocyanine, tetraazaporphyrin, tetrabenzoporphyrin, and porphyrin electronic spectra[J]. *J Physical Chemistry*, 1982, 86: 3926 - 3931.
- [10] 迟燕华, 庄稼, 董发勤, 等. 3-[二(羧甲基)氨基]-1,2-二羟基蒽醌与蛋白质作用的研究[J]. *化学学报*, 2000, 58(1): 82 - 85.
- CHI Y H, ZHUANG J, DONG F Q, et al. The Study on the reaction between 3-[di(carboxymethyl)aminomethyl]-1,2-dihydroxyanthraquinone and bovine serum albumin[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2000, 58(1): 82 - 85.
- [11] 申少斌, 郑秀荣, 宋玉民, 等. O-(硫杂蒽酮-[2]-基)-氧乙酸的合成、表征及与DNA作用的研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(8): 1580 - 1583.
- SHEN S B, ZHENG X R, SONG Y M, et al. Synthesis and characterization of thioxanthone-2-yl-oxyacetate and its combination with ct-DNA [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, 27(8): 1580 - 1583.
- [12] PURCELL M, NEAULT J F, RIAHI T. Interaction of taxol with human serum albumin [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2000, 1478(1): 61 - 68.
- [13] ROSS D P, SABRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions-forced contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20: 3096 - 3102.
- [14] 王建红, 程鹏飞, 孙心齐, 等. N-(茄呢基哌嗪烷基)蒽甲胺的合成及其与DNA作用的研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(7): 1398 - 1402.
- WANG J H, CHENG P F, SUN X Q, et al. Synthesis of N-(Solanesylpiperazine-alkyl)-9-anthracenemethylamines and its interaction with DNA [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, 27(7): 1398 - 1402.
- [15] LEPECQ J B, PAOLETTI C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1967, 27(1): 87 - 106.
- [16] 黎泓波, 王兴明, 阮开敏, 等. Sm(III)(BCB)₃与DNA的相互作用机理[J]. *中南大学学报: 自然科学版*, 2008, 39(2): 239 - 245.
- LI H B, WANG X M, RUAN K M, et al. Mechanism of interaction between Sm(III)(BCB)₃ and DNA [J]. *J Cent South Univ: Science and Technology*, 2008, 39(2): 239 - 245.