

## [研究简报]

## 二茂钛二甘氨酸盐酸盐与 DNA 作用机理的研究\*

张志刚

杨 频

(南京大学化学系、配位化学国家重点实验室, 南京, 210093) (山西大学分子科学研究所, 太原, 030006)

关键词 二茂钛二甘氨酸盐酸盐, 抗肿瘤, DNA

关键词 O614.41

二氯二茂钛是一种活性很高的抗肿瘤药物, 对它的抗肿瘤机理目前尚无定论. 我们用核磁共振方法研究二氯二茂钛与单核苷酸的成键特点时发现<sup>[1]</sup>, 二氯二茂钛与核苷酸的成键方式既不同于顺铂, 又不同于二氯二茂钨、二氯二茂钼等, 表明其抗肿瘤机理可能与顺铂有明显不同. 由于二氯二茂钛在水中的溶解度不大, 故妨碍了它对与 DNA 作用机理的进一步研究. 最近, 二氯二茂钛与甘氨酸形成的配合物——二茂钛二甘氨酸盐酸盐, 已被成功地合出来<sup>[2]</sup>. 由于它极易溶于水, 且其酸性配体为氨基酸, 因此研究该化合物的抗肿瘤活性及其与 DNA 的作用特点, 对了解二茂钛类化合物的抗肿瘤机理具有重要意义.

## 1 实验部分

1.1 材料和仪器 溴化乙锭(EB)为 Fluka 公司产品, 小牛胸腺 DNA 为北京华美生物工程公司产品, 实验中二者的浓度均通过分光光度计确定. 二茂钛二甘氨酸盐酸盐根据文献<sup>[2]</sup>方法合成. 其它试剂均为分析纯. 岛津 UV-365 型分光光度计; Hitachi-850 型荧光光谱仪.

1.2 二茂钛二甘氨酸盐酸盐与 DNA 混合物 UV 谱的测定 将二茂钛二甘氨酸盐酸盐与小牛胸腺 DNA 以摩尔比 1 : 2 混合( $c_{\text{drug}} = 1.989 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $c_{\text{DNA}} = 3.977 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ), 立即测定其在 200~400 nm 的紫外吸收谱, 并每隔一定时间重复测定其扫描谱. 在测定上述药物与 DNA 的混合物的紫外吸收光谱的同时, 同步测定相同浓度的药物( $c_{\text{drug}} = 1.989 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ )在不同时间间隔的紫外吸收光谱[见图 1(A)、(B)].

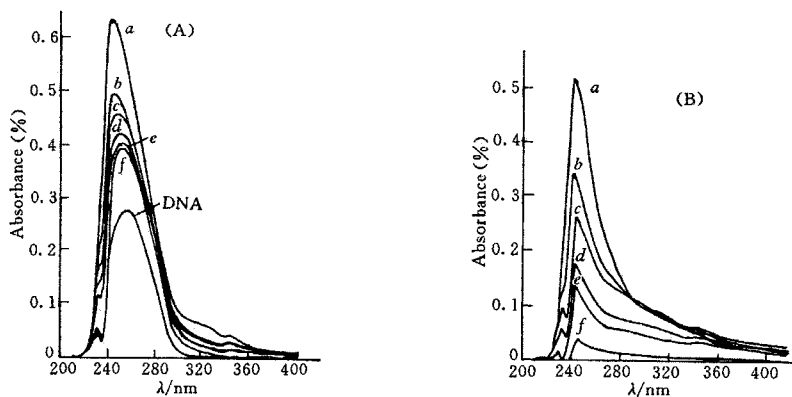


Fig. 1 Absorbance changes of  $\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{NH}_3^+\text{Cl}^-)_2$ -DNA adduct(A) and  $\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{NH}_3^+\text{Cl}^-)_2$ (B)

Time changes in the order: a. 0 h; b. 4.75 h; c. 9.75 h; d. 22.75 h; e. 33.25 h; f. 57.25 h.

收稿日期: 1996-07-23. 联系人: 杨 频. 第一作者: 张志刚, 男, 28 岁, 博士研究生, 讲师.

\* 国家自然科学基金、配位化学国家重点实验室基金及山西省青年科学基金资助课题.

将小牛胸腺 DNA ( $c_{\text{DNA}} = 3.977 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ) 与二茂钛二甘氨酸盐酸盐以不同的摩尔比混合 ( $c_{\text{drug}} : c_{\text{DNA}} = 0, 0.25, 0.50, 1.00$ ), 然后将它们在室温下置于暗处反应 48 h. 相同浓度的药物也同时放置并分别以其作参比, 测定不同摩尔比的药物与 DNA 的混合物在 200~400 nm 区间内的紫外吸收谱[见图 2(A)].

1.3 二茂钛二甘氨酸盐酸盐与 DNA-EB 复合物的光度测定 将上述 DNA 与不同摩尔比的药物混合物于 24 °C 恒温, 以  $3.736 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  的 EB 对它们分别进行光度滴定, 测定荧光强度并进行数据处理得 Scatchard 方程点, 作  $r/c \sim r$  曲线得 Scatchard 图[图 2(B)].

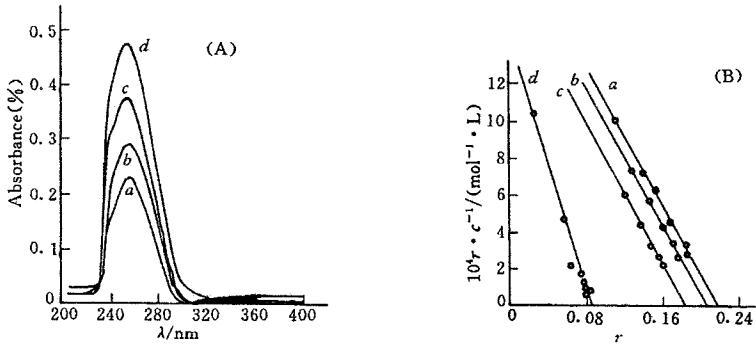


Fig. 2 Absorbance changes of  $\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{NH}_3^+\text{Cl}^-)_2$ -DNA adduct with  $\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{NH}_3^+\text{Cl}^-)_2$  concentrations (A) and fluorescence Scatchard plots of the binding of EB to DNA in the absence and presence of  $\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{NH}_3^+\text{Cl}^-)_2$  (B)

The ratio of  $\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{NH}_3^+\text{Cl}^-)_2$  to DNA increases in the order of 0, 0.25, 0.50, 1.00 for a—d respectively.

## 2 结果与讨论

2.1 二茂钛二甘氨酸盐酸盐对 DNA 的不可逆键合 由图 1(B)可见, 二茂钛二甘氨酸盐酸盐的吸收峰随着时间的推移而迅速降低, 这是由于它在溶液中发生水解所致, 但在图 1(A)中, 药物和 DNA 的混合物的吸收峰降低的幅度却很小. 当过了 57.25 h 后, 药物自身的吸收虽已变得很小, 但药物与 DNA 的混合物的紫外吸收却依然很强, 其吸光度值比单纯的药物和 DNA 的吸光度值的总和还要大得多. 这表明药物与 DNA 有强烈的成键作用, 正是由于药物与 DNA 形成了稳定的不可逆的 DNA-药物加合物, 才抑制了药物自身的水解.

2.2 DNA 的紫外吸收随药物浓度的变化 由图 2(A)可见, 药物与 DNA 的混合物的紫外吸收随着药物浓度的不断增大而逐渐升高. 当  $c_{\text{drug}} : c_{\text{DNA}} = 1 : 1$  时, 混合物的紫外吸收值达到最大值(由于当  $c_{\text{drug}} : c_{\text{DNA}} = 2 : 1$  时, DNA 几乎全部沉淀, 混合物几乎没有吸收, 图中未包括). 实验发现, 混合物的吸光度值的变化并非由于溶液 pH 值的变化所致. 所以, 体系吸光度值的不断增大可能有两种解释: (1) 药物与 DNA 之间形成了稳定的加合物, 这种稳定的加合物的形成抑制了药物自身的水解, 而且这种加合物的生成量越大, 则对药物自身水解的抑制作用越强. 因而药物浓度的升高使形成的药物-DNA 加合物的量加大, 从而使体系的吸光度不断增大. (2) 药物与 DNA 的作用破坏了 DNA 的双螺旋结构, 从而导致了 DNA 的增色效应. 无论是上述任何一种原因, 或是二者兼而有之, 都充分表明随着体系中药物浓度的增大, 药物与 DNA 之间的作用变得越来越强烈. 由于当药物与 DNA 的摩尔比为 1 : 1 时, 体系的吸光度值达到最大值; 而当药物与 DNA 的摩尔比为 2 : 1 时, DNA 几乎已全部沉淀, 因而, 我们推测药物与 DNA 形成了摩尔比为 1 : 1 的加合物.

2.3 二茂钛二甘氨酸盐酸盐对 DNA-EB 复合物的抑制类型分析 著名的 Scatchard 方程<sup>[3]</sup>

为  $r/c=K(n-r)$ ，式中， $r$  是与 DNA 分子中每个核苷酸成键的 EB 分子数， $n$  是每个核苷酸上的结合位点数， $K$  是与位点关联的固有结合常数， $c$  是游离 EB 的浓度。

以荧光光谱确定  $r$  值，得到在二茂钛二甘氨酸盐酸盐存在下的关于 EB 与 DNA 成键特点的 Scatchard 图[图 2(B)]。由图 2(B)可见，随着二茂钛二甘氨酸盐酸盐浓度的不断增加，直线在横坐标轴上的截距( $n$ )不断变小，其斜率( $K$ )在二茂钛二甘氨酸盐酸盐与 DNA 的摩尔比为 0.25、0.50 时保持不变，而在摩尔比为 1.0 时增大。据文献报道，EB 有时可以诱导 DNA 构象的变化，使 DNA 的双螺旋结构发生改变，从而形成一处能与 EB 更有效地键合的结合位点数明显变少的新构象<sup>[4]</sup>。我们推测，二茂钛二甘氨酸盐酸盐可能起了类似于上述 EB 的作用，同样诱导了 DNA 构象的变化。结果随着二茂钛二甘氨酸盐酸盐浓度的增大，EB 与 DNA 键合得越来越有效，因此 EB 与 DNA 的结合常数增大。

**2.4 二茂钛二甘氨酸盐酸盐的抗肿瘤活性** 我们曾以氘标记 DNA 合成特殊前体掺入法研究了二茂钛二甘氨酸盐酸盐的体外抗肿瘤活性，发现二茂钛二甘氨酸盐酸盐对艾氏腹水癌有很高的活性。对艾氏腹水癌的抑制率为 50% 时，二茂钛二甘氨酸盐酸盐的浓度为  $4.0 \times 10^{-6}$  mol/L。而据文献<sup>[5]</sup>报道，对艾氏腹水癌的抑制率为 50% 时，二氯二茂钛的浓度为  $5 \times 10^{-4}$  mol/L。因此，二茂钛二甘氨酸盐酸盐比二氯二茂钛具有更高的抗肿瘤活性，同时也表明以氨基酸配体取代二氯二茂钛上的卤素配体，以改善其水溶性和生物利用率，并进而提高这类化合物的抗肿瘤活性的药物设计思路是完全可行的。紫外光谱和荧光光谱的研究表明，二茂钛二甘氨酸盐酸盐可与 DNA 形成摩尔比为 1:1 的稳定的不可逆加合物，但其作用方式却既不同于顺铂，又不同于其它金属茂类化合物，这进一步支持了我们以前的结论<sup>[1]</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 Zhigang Zhang, Pin Yang, Maolin Guo. *Trans. Met. Chem.*, 1996, **21**: 322
- 2 Klapoekte T. M., Koepf H., Tornieporth-Oetting I. C.. *Organometallics*, 1994, **13**: 3 628
- 3 Lepecq J. -B., Paoletti C.. *J. Mol. Biol.*, 1967, **27**: 87
- 4 Bresloff J. L., Crothers D. M.. *Biochem.*, 1981, **20**: 3 547
- 5 Koepf-Maier P.. *Prog. Clin. Biochem. Med.*, 1989, **10**: 151