

阿霉素-铁(Ⅲ)配合物的电化学特征 及其与 DNA 结合作用研究*

王宏飞 杨 频[†] 李青山 郭 强[†]

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

摘要 采用示波极谱法和循环伏安法研究了 3 价铁离子 Fe(Ⅲ) 与阿霉素(ADM) 配合物的电化学特性. 在生理 pH 条件下, Fe(Ⅲ) 与 ADM 形成 2:1 的稳定配合物, Fe(Ⅲ) 的配位使 ADM 在更负的电势下才能还原, 这与其心脏毒性减轻密切相关. 采用线性扫描、吸收光谱和凝胶电泳法研究了 ADM-Fe(Ⅲ) 配合物与 DNA 的结合作用, ADM-Fe(Ⅲ) 配合物仍保留了 ADM 插入结合的特征, 并形成一种稳定的 DNA-Fe(Ⅲ)-ADM 的三元结合物.

关键词 阿霉素, 3 价铁离子配合物, 心脏毒性, DNA 损伤

阿霉素(Adriamycin, ADM)是癌症化疗中所用的最重要的药物之一, 对多种人体肿瘤表现出活性. 但由于具有严重的心脏毒性而使其临床应用受到限制^[1]. ADM 的结构如图 1 所示. Quelamycin 是一种阿霉素 3 价铁离子的配合物, 它是在生理 pH 条件下, 混合 FeCl₃ 和 ADM 而得到的^[2]. 它与 ADM 相比虽有相同的抗癌活性, 却表现出明显低的心脏毒性^[3]. 这种铁配合物由于在临床治疗中的优点而引起人们去从毒性的角度来分析 ADM 和 ADM-Fe(Ⅲ) 的药理作用. ADM-Fe(Ⅲ) 配合物中的 ADM 不能被 NADPH 脱氢酶还原, 这种心脏毒性与其氧化还原性质有关, 所以我们首先采用电化学方法研究比较了 ADM 与 ADM-Fe(Ⅲ) 配合物的电化学行为的差异.

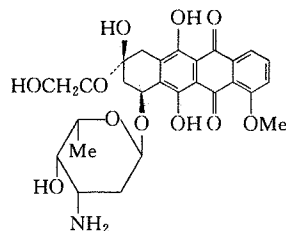


Fig. 1 Structure of ADM

Someya 等^[4]报道加入 ADM、还原剂和 Fe(Ⅲ) 后导致了对 DNA 的损伤. Eliot^[5] 的研究表明, ADM-Fe(Ⅲ) 配合物与 DNA 形成稳定的结合物, 即使在 EDTA 存在时也不分解, 并能用色谱柱分离. 在硫醇存在时, 对 DNA 切割可以得到一定长度的碱基片段. 要搞清这些反应的机制, 就必须搞清 Fe(Ⅲ) 与 ADM 的配位性质和 ADM、Fe、DNA 三者结合反应的过程. 通常认为核酸是醌类抗癌药物的细胞作用靶位, 为了阐明 ADM 的抗癌机理, 对 ADM 与 DNA 结合作用已有报道^[6]. 显然, ADM-Fe(Ⅲ) 配合物与 DNA 结合作用的研究不仅对认识醌类药物作用机理, 而且对化学合成核酸酶的设计都有重要意义. 本文用电化学、吸收光谱、凝胶电泳法对 Fe(Ⅲ) 与 ADM 的配位性质及其与 DNA 的结合反应进行了研究和分析.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

阿霉素(由上海医药工业研究院提供, 纯度为 97%); Calf thymus DNA(Sigma 产品);

收稿日期: 1996-04-16. 联系人: 杨 频. 第一作者: 王宏飞, 男, 27 岁, 博士研究生.

* 国家自然科学基金、山西省自然科学基金资助课题.

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (北京化工厂, A. R.); H_2O_2 (天津东方化工厂, A. R.). JP-2 示波极谱仪(成都仪器厂); BAS-100A 电化学分析仪(Bioanalytical system, Inc. U. S. A.); DYY-III 型电泳仪(北京六一仪器厂).

1.2 实验方法

取适量的 ADM 母液(由摩尔消光系数 $\epsilon_{480} = 11\,500 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 测定浓度), 用缓冲液(50 mmol/L Tris, 150 mmol/L KCl, pH=7.5) 稀释至 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 倒入 10 mL 小烧杯中. 取一定量 0.05 mol/L Fe^{3+} 离子加入 ADM 溶液中, 在 $-0.4 \text{ V} \sim -1.0 \text{ V}$ 范围内做线性扫描和循环伏安图.

分别测定依次加入 ADM、Calf thymus DNA、 Fe^{3+} 和依次加入 ADM、 Fe^{3+} 、Calf thymus DNA 的溶液样品的吸收光谱和线性扫描图.

在 Eppendorf 管中依次分别加入一定浓度的 pBR322DNA、ADM、 Fe^{3+} 、Vc、 H_2O_2 或 ADM、 Fe^{3+} 、pBR322DNA、Vc、 H_2O_2 . 终体积为 20 μL , 在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中恒温反应 1 h, 点样于平板凝胶样品孔中. 琼脂糖凝胶浓度为 1%, 含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 EB, 电泳缓冲液为 45 mmol/L TBE, pH=8. 控制 100 V 电压电泳 2~3 h, 在紫外灯下照相.

2 结果与讨论

2.1 ADM-Fe(III)配合物的电化学行为

向 ADM 溶液中逐渐滴加 Fe^{3+} 离子, 在 -0.74 V (*vs.* SCE) 产生 1 个新的还原峰, -0.65 V 的还原峰对应于母体环酞氧的还原^[7]. 随着 Fe^{3+} 加入量的增加, -0.65 V 的还原峰不断下降, -0.74 V 的还原峰不断升高, 不同 $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{ADM}]$ 比时, 两峰电流大小如图 2 所示. 由图 2 可知, 当 $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{ADM}] > 2$ 时, 两峰电流变化很小. 因此, Fe^{3+} 可与 ADM 形成 2:1 的配合物, 且 ADM 中酞基氧一定参与了配位. 我们认为 Fe^{3+} 是与 ADM 羟基和酞基氧螯合配位的. 由于 Fe^{3+} 的配位, 使得还原 ADM 需要更多的能量, 所以在更负的还原电势下可形成一个新的还原峰. 两峰峰电位差 ΔE_p 不依赖于溶液 pH 值和 Fe^{3+} 的浓度, 所以配合物不离解而直接以配合物的形式还原^[8]. 加入表面活性剂(十二烷基磺酸钠)后配合物的还原峰电流下降; 温度系数分别为 2.1%/ $^\circ\text{C}$ (9~27 $^\circ\text{C}$) 和 $-1.09\%/^\circ\text{C}$ (27~48 $^\circ\text{C}$), 表明配合物的还原峰具有吸附性^[9].

为了进一步探讨 ADM-Fe(III)配合物的电极反应, 我们又测定了 ADM 和 ADM-Fe(III)体系的多次循环伏安图[图 3(A)和(B)]. ADM 具有氧化峰和还原峰, 表明电极反应有可逆性. Fe^{3+} 与 ADM 具有很高的稳定常数^[10], Fe^{3+} 与其配位后使部分 ADM 在更负的电势下还原. 一旦配合物中的 ADM 被还原, 吸附在电极表面还原形的 ADM 与 Fe^{3+} 解离, 它们将表现与自由 ADM 相同的电化学行为. 所以, 我们认为 Fe^{3+} 与 ADM 配位后, 将使 ADM 在更负的电势下还原, 这有效地阻止了酶把 ADM 还原成其半酞或氢酞形式, 以及在分子氧存在时的氧化还原链式反应, 而这种反应产生的自由基对细胞是致命的^[11]. 这与 ADM- Fe^{3+} 配合

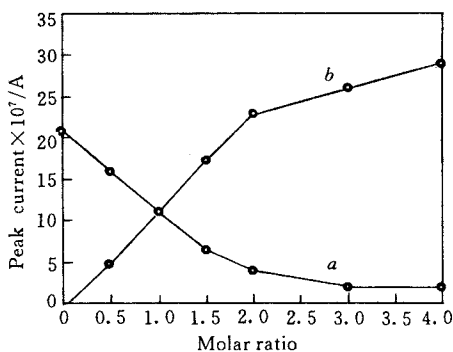


Fig. 2 Reduction peak current at different molar ratios of Fe(III)/ADM

a. ADM at -0.65 V ;

b. ADM-Fe(III) at -0.74 V .

物低的心脏毒性密切相关.

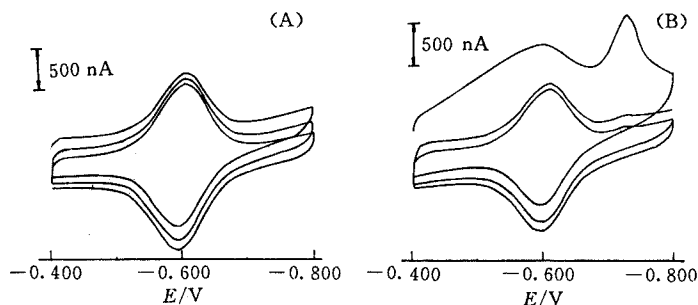


Fig. 3 Cyclic voltammogram of ADM and ADM-Fe(III)

(A) 1.0×10^{-5} mol/L ADM; (B) 1.0×10^{-5} mol/L ADM + 2.0×10^{-5} mol/L Fe(III).

2.2 ADM-Fe(III)配合物与DNA的结合作用

2.2.1 吸收光谱 图4(A)为ADM先与DNA溶液混合再滴加一定量的 Fe^{3+} 和先将ADM与 Fe^{3+} 结合,再与DNA溶液混合的吸收光谱图.天然DNA在350 nm到600 nm之间无吸收峰.当ADM与DNA结合后,ADM的480 nm吸收峰降低并红移,吸收峰的红移是醌类药物与DNA插入结合的证据^[12],吸收峰的变化说明了ADM发色团受到了结合DNA的影响. ADM先与DNA结合再加入 Fe^{3+} 离子,体系的吸收光谱变化较小[图4(A)曲线d],吸收峰略高于ADM-DNA体系的吸收峰. ADM先与 Fe^{3+} 结合,再与DNA结合,体系的吸收峰明显低于ADM-DNA体系的吸收峰[图4(A)曲线e].体系中加入的物种相同、浓度相同,仅由于加入 Fe^{3+} 的顺序不同,吸收光谱呈现明显的差别.这说明了ADM以醌环平面插入DNA碱基对之间后,醌氧被DNA碱基和磷酸骨架包埋,然后再加入 Fe^{3+} ,阻碍了 Fe^{3+} 与ADM的配位.所以,体系的吸收光谱变化较小.如果 Fe^{3+} 先与ADM配位结合, Fe^{3+} 的配位影响ADM的发色团,而且它们可以一起插入到DNA碱基对之间,或者形成DNA磷酸氧-Fe(III)-ADM的三元配合物.从而使ADM-Fe(III)-DNA体系的吸收光谱与ADM-DNA体

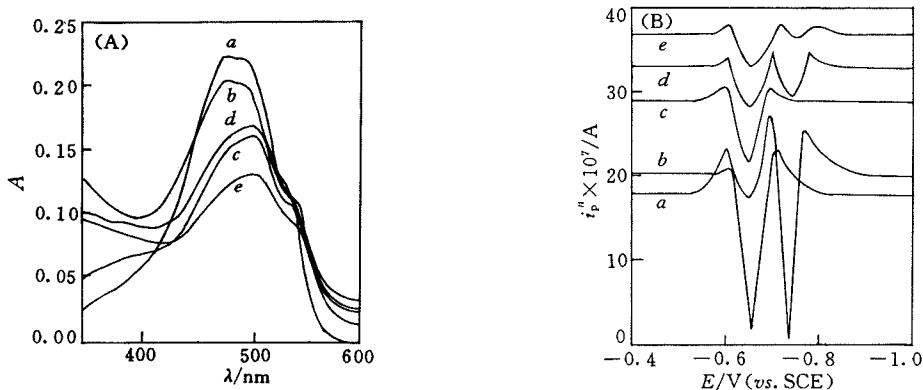


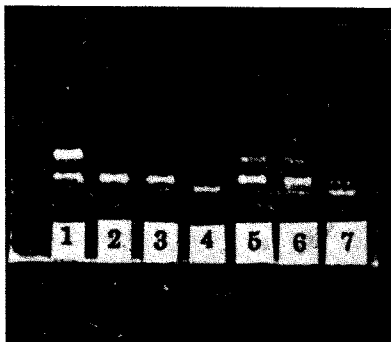
Fig. 4 Absorption spectra (A) and linear sweep voltammogram (B) of system of ADM-DNA-Fe(III) and ADM-Fe(III)-DNA

a. 1.0×10^{-5} mol/L ADM; b. a + 2.0×10^{-5} mol/L Fe(III); c. a + 1.0×10^{-4} mol/L DNA;
d. c + 2.0×10^{-5} mol/L Fe(III); e. b + 1.0×10^{-4} mol/L DNA.

系明显不同. 显然, 加入 Fe^{3+} 的顺序不同, ADM 与 DNA 的结合作用方式或结合作用强度是不同的. 同时, 也证明了 ADM-Fe(III) 配合物是以 Fe^{3+} 配位端与 DNA 发生结合作用的.

2.2.2 线性扫描 天然 DNA 在 $-0.4\text{ V} \sim -1.0\text{ V}$ 之间无还原峰产生, 将 ADM 加入 DNA 后, ADM 的还原峰明显降低. 这说明 ADM 以醌氧环平面插入 DNA 碱基对之间, 被包埋而无法进行电极还原. ADM 先与 DNA 结合, 再加入 Fe^{3+} , -0.74 V 配合物的还原峰较大[图 4(B)曲线 *d*]; 而 ADM 先与 Fe^{3+} 结合, 再加入 DNA, -0.74 V 配合物的还原峰很小[图 4(B)曲线 *e*], 这说明 Fe^{3+} 与 ADM 的配位增强了 ADM 与 DNA 的结合强度, 从而使得自由 ADM 或者 ADM-Fe(III) 的浓度减小.

2.2.3 凝胶电泳 pBR322 DNA 有两条电泳带, 即走在前面的 CCC 带和后面的 OCC 带. 单独 Fe^{3+} 或 $1 \times 10^{-4}\text{ mol/L H}_2\text{O}_2$ 不引起 pBR322 DNA 的损伤. 单独 ADM 或 ADM-Fe(III) 配合物只引起 pBR322 DNA CCC 带的略微减少, OCC 带的略微增多. Fe^{3+} 、 H_2O_2 、Vc 共存时, Vc 还原 $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$, Fe^{2+} 与 H_2O_2 发生 Fenton 反应产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基对 pBR322 DNA 造成极强的切割. 浓度相同时, ADM 先与 Fe^{3+} 配位结合再与 pBR322 DNA 反应, 对 DNA 的剪切程度(图 5 的 5、6、7 道)比 ADM 先与 pBR322 DNA 结合, 再加入 Fe^{3+} 的弱(图 5 的 2、3、4 道). 5 道中同时存在明显的 CCC 带和 OCC 带, 而在 2 道中 CCC 带消失; 6 道有弱 CCC 带, 而 3 道 CCC 带完全消失; 7 道有弱的 OCC 带, 而 4 道 OCC 带完全消失, 此时 DNA 被切成小的碎片, 切割反应最强烈. Fe^{3+} 与 ADM 配位结合后, 它们将一起插入到 DNA 碱基对之间, Fe^{3+} 将一定程度地被 DNA 碱基和磷酸骨架所包埋; 或者与 DNA 磷酸氧原子配位形成以 Fe^{3+} 为中介的三元配合物, 这时 Fe^{3+} 离子的自由度降低, 离子的化学反应性降低. 而如果 ADM 先与 DNA 结合, ADM 母环羟基和醌基氧被 DNA 包埋, Fe^{3+} 与 ADM 配位结合的几率减少, Fe^{3+} 将表现更大的自由性, 易被 Vc 还原, 从而对 DNA 产生更大程度的剪切. 这与前两者的实验结果也是一致的.



1. $0.5\ \mu\text{g}$ pBR322 DNA alone;
2. DNA + $2.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L ADM}$ + $1.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L Fe(III)}$ + $5 \times 10^{-5}\text{ mol/L H}_2\text{O}_2$, Vc;
3. DNA + $2.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L ADM}$ + $2.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L Fe(III)}$ + $5 \times 10^{-5}\text{ mol/L H}_2\text{O}_2$, Vc;
4. DNA + $2.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L ADM}$ + $4.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L Fe(III)}$ + $5 \times 10^{-5}\text{ mol/L H}_2\text{O}_2$, Vc;
5. $2.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L ADM}$ + $1.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L Fe(III)}$ + DNA + $5 \times 10^{-5}\text{ mol/L H}_2\text{O}_2$, Vc;
6. $2.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L ADM}$ + $2.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L Fe(III)}$ + DNA + $5 \times 10^{-5}\text{ mol/L H}_2\text{O}_2$, Vc;
7. $2.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L ADM}$ + $4.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L Fe(III)}$ + DNA + $5 \times 10^{-5}\text{ mol/L H}_2\text{O}_2$, Vc.

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis results of system of ADM-DNA-Fe(III) and ADM-Fe(III)-DNA

总之, Fe^{3+} 的配位使 ADM 在更负的电势下才能还原, 这可能有效地阻止酶把 ADM 还原成其半醌或氢酯形式以及在分子氧存在时的氧化还原链式反应, 这与其心脏毒性减轻密切相关. ADM-Fe(III) 配合物仍保留了 ADM 与 DNA 插入结合的特征, 并形成一种稳定的 DNA-Fe(III)-ADM 的三元结合物.

参 考 文 献

- 1 Myers C. E., Mcguine W., Liss R. H. *et al.*. Science, 1977, **197**: 165
- 2 Gosalvez M.. U. S. Pat. Appl., 758 446, 1977
- 3 Gosalvez M., Blance M. F., Vivero C. *et al.*. Eur. J. Cancer, 1978, **14**(11): 1 185
- 4 Someya A., Tanaka N.. J. Antibiot., 1979, **32**: 839
- 5 Eliot H., Gianni L., Myers C.. Biochemistry, 1984, **23**: 928
- 6 Sinha B. K., Trush M. A., Kennedy K. A. *et al.*. Cancer Research, 1984, **44**: 535
- 7 Rao G. M., Lown J. W., Plambeck J. M.. J. Electrochem. Soc., 1978, **125**(4): 535
- 8 GAO Xiao-Xia(高小霞). Polarographic Catalysis Wave(极谱催化波), Beijing: Science Press, 1991: 142
- 9 YAO Xiu-Ren(姚修任), ZHANG Li-Qun(张立群). Figures of Polarographic Catalysis Wave(极谱催化波图谱), Beijing: Geology Press, 1988: 16
- 10 May P. M., Williams G. K., Williams D. R.. Eur. J. Cancer, 1980, **16**(9): 1 275
- 11 Reszka K., Hartley J. A., Kolodziejczyk P. *et al.*. Biochem. Pharm., 1989, **38**: 4 253
- 12 Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z., Traganos F. *et al.*. Biochem. Pharm., 1981, **30**: 231

Electrochemistry Characteristics of Adriamycin-Fe(Ⅲ) Complex and Its Interaction with DNA

WANG Hong-Fei, YANG Pin[†]*, LI Qing-Shan, WU Qiang[†]

(Department of Chemistry, Nanjing University; State Key Lab. of Coordination Chemistry, Nanjing, 210093; Institute of Molecular Science, Shanxi University[†], Taiyuan, 030006)

Abstract Electrochemistry characteristics of adriamycin-Fe(Ⅲ) complex was studied by the methods of osilpolarograph and cyclic voltammetry. At physiological pH, Fe(Ⅲ) binds with ADM to form a complex of 2 : 1 stoichiometry. ADM was reduced at a more negative potential when it was complexed with Fe(Ⅲ), which is close related to the low cardiac toxicity of the complex. The interaction model of ADM-Fe(Ⅲ) complex with DNA was studied by the methods of spectroscopy, electrochemistry and electrophoresis. The complex preserves the DNA intercalation characteristics, and binds to DNA to form a ternary complex composed of DNA, Fe(Ⅲ) and ADM.

Keywords Adriamycin, Fe(Ⅲ) complex, Cardiac toxicity, DNA damage

(Ed. : G, X)