

文章编号: 1000-5013(2012)01-0039-05

6-位脂肪胺取代的萘酰亚胺衍生物 与 DNA 的相互作用

解丽娟

(华侨大学 分子药理学研究所, 福建 泉州 362021)

摘要: 利用紫外可见光谱、荧光光谱、圆二色谱和粘度测试,考察了 8 个 6-位脂肪胺取代的萘酰亚胺衍生物与小牛胸腺 DNA 的相互作用. 研究表明:小牛胸腺 DNA 对与其结合能力强的化合物 3a~3d 有荧光猝灭作用,对与其结合能力弱的 3e~3h 有荧光增强效应;圆二色谱显示这些萘酰亚胺化合物能引起 DNA 二级结构发生不同的变化. 在紫外-可见吸收光谱和粘度测试中,这些化合物与 DNA 的相互作用没有差别. 综合光谱学和粘度测试的结果,推断这些化合物是通过嵌插方式与 DNA 结合,由于结构不同,它们与 DNA 之间作用程度存在差异.

关键词: 萘酰亚胺; 小牛胸腺 DNA; 光谱; 粘度; 相互作用; 嵌插方式

中图分类号: R 961

文献标志码: A

小分子化合物与 DNA 相互作用的研究一直是引人关注的领域^[1-3]. 通过研究小分子化合物与 DNA 的相互作用,一方面可以了解引起 DNA 结构变化和影响其生理功能的因素;另一方面可以从分子水平了解小分子抗肿瘤化合物的作用机制,从而为防治肿瘤发生及开发新的高效抗肿瘤药物提供指导. 萘酰亚胺类衍生物是一类著名的 DNA 嵌入剂和拓扑异构酶 II 型抑制剂,对多种人和鼠的肿瘤细胞具有较高的抗肿瘤活性^[4-8]. 近年来,因发现萘酰亚胺类化合物具有抗多药耐药性^[7],对其研究日益引起人们的关注. 文献[9-11]分别报道了不同结构的 6-位脂肪胺取代的萘酰亚胺衍生物,但并未深入研究报道的萘酰亚胺衍生物与 DNA 的相互作用. 萘酰亚胺衍生物与 DNA 发生非共价结合后,两者的物理性质都会发生明显的变化,通过测定其变化,可以定性、定量地评价萘酰亚胺衍生物与 DNA 的结合过程,确定结合模式^[12-15]. Long 等^[12]提出并证明需要融合几组实验技术才能很好地确定化合物与 DNA 的结合模式. 这些实验技术包括:1) 评价 DNA 螺旋变化;2) 反映 DNA 和结合的化合物之间的电性作用;3) 确定分子嵌入 DNA 的取向. 本文利用紫外吸收光谱、荧光发射光谱、圆二色谱和粘度测试法,分别考察包括文献[9-11]报道在内的 8 个 6-位脂肪胺取代的萘酰亚胺衍生物与 DNA 的相互作用.

1 实验部分

1.1 原料与仪器

原料及溶剂均为市售分析纯,缓冲溶液自行配制;小牛胸腺 DNA(CT-DNA,美国 Sigma 公司);柱色谱硅胶(200-300 目,山东青岛海洋化工厂).

HP1100LC/MSD 型质谱仪(美国 HP 公司),GCT CA156 型和 LCT 型质谱仪(英国 Micromass 公司),Nicolet 20DXB 型 FR-IR 红外光谱仪(美国 Nicolet 公司),Varian INOVA 400 型核磁共振仪(400 MHz,TMS 为内标,美国 Varian 公司),X-6 型显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司),F-4500 型荧光分光光度计(日本日立公司),BS-210S 型万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司),UV-3100 型分光光度计(日本岛津公司),J-810 型圆二色谱仪(日本 Jasco 公司).

收稿日期: 2011-09-19

通信作者: 解丽娟(1971-),女,工程师,主要从事小分子抗肿瘤药物及基因载体的研究. E-mail: xielijuan@hqu.edu.cn.

1.2 6-位脂肪胺取代的萘酰亚胺衍生物的合成

图1为8个6-位脂肪胺取代的萘酰亚胺衍生物结构图. 图1中:3a,3b,3c和3f被Antonini等^[10], Wu等^[11]和Norton等^[9]分别报道过.

萘酰亚胺衍生物的具体合成方法:将4-溴-1,8-萘酐(277 mg, 1 mmol)和N,N-二甲基乙二胺(112 μL , 1.2 mmol)溶于20 mL乙醇中,加热回流2 h,减压蒸除溶剂,得到中间体.该中间体(174 mg, 0.5 mmol)与要取代的脂肪胺(2 mmol)和碳酸钾(69 mg, 0.5 mmol)溶于15 mL的乙二醇单甲醚中,加热回流8~12 h;粗产物经硅胶柱层析精制,得到目标产物.最后,产物的结构经过高分辨质谱、核磁(氢谱和碳谱)、红外光谱的表征和验证.

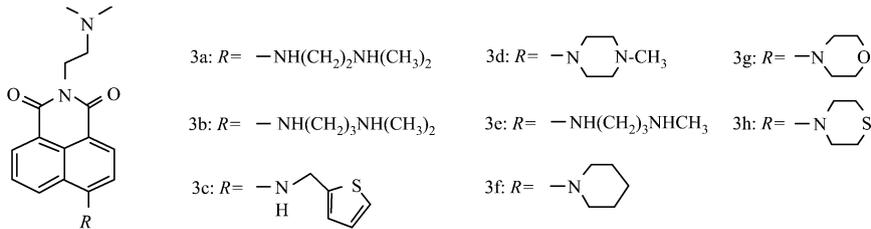


图1 6-位脂肪胺取代萘酰亚胺衍生物的结构

Fig.1 Structure of 6-aliphatic amine substituted naphthalimide derivatives

1.3 测定方法^[12-15]

1.3.1 紫外吸收光谱测定 紫外滴定实验在UV-3100型分光光度计上进行,使用1 cm石英吸收池,温度为25 $^{\circ}\text{C}$.首先用空白溶剂(30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.5的Tris-HCl缓冲溶液)对仪器进行基线校正,测量200~600 nm范围内浓度为50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的萘酰亚胺衍生物的紫外吸收谱;然后,往溶液中滴加CT-DNA,改变其与萘酰亚胺衍生物的浓度比值.每次加完DNA后混合数遍,以使DNA和萘酰亚胺衍生物充分接触、反应;放置10 min后,使两者反应达到平衡并测量、记录光谱数据.

1.3.2 荧光发射光谱测定 取0.1 mL精确配制的,浓度为0.1~1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的萘酰亚胺衍生物DMSO溶液,与30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的Tris-HCl(pH=7.5)缓冲溶液混合于10 mL的容量瓶中,制备两组萘酰亚胺衍生物的Tris-HCl-DMSO溶液.其中一组为加入小牛胸腺DNA(CT-DNA)的Tris-HCl溶液,另一组为不含DNA的相同浓度化合物的溶液,萘酰亚胺衍生物的浓度保持在1.0~10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,CT-DNA的浓度为50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,定容,室温避光放置一夜.将得到的一组样品液和空白对照液分别置于1 cm石英比色池中进行测试,扫描速度为1 200 $\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$,激发波长为最大吸收值,激发狭缝宽度5 nm,发射狭缝宽度5 nm,测其荧光发射谱.

1.3.3 圆二色谱测定 将浓度为10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的萘酰亚胺衍生物加入到100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的CT-DNA溶液中,比较化合物在加入DNA前后所引起的DNA自身圆二色谱(CD)谱图的变化.实验条件:扫描范围为200~600 nm;扫描速度为500 $\text{nm} \cdot \text{s}^{-1}$;响应时间为0.5 s;狭缝宽度为2 nm;积累次数为2次;CD谱的样品池厚度为1.0 cm.

1.3.4 粘度测试 将CT-DNA溶于Tris-HCl缓冲溶液(30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.5)中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存;全部溶解后,在超声仪中震荡10 min,用PVDF膜(孔径0.45 μm)过滤,以滤去不溶物,配制的CT-DNA浓度为100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[16].粘度测定在乌氏粘度计上进行,放置于恒温水域槽中,水浴保持恒温25 $^{\circ}\text{C}$.吸取10 mL,100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的CT-DNA置于粘度计中,用秒表记录滴下时间.然后,分别滴加浓度为1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的萘酰亚胺衍生物溶液,使其浓度和DNA浓度的比值逐渐增加,用吸耳球鼓泡以混匀溶液;记录萘酰亚胺衍生物滴下时间并重复测量3次,每次相差不超过0.2 s,取其平均值.以 $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ 是相对于萘酰亚胺衍生物浓度与DNA浓度的比值作图.其中: η 表示滴加萘酰亚胺衍生物后DNA的相对运动粘度; η_0 表示没有萘酰亚胺衍生物时DNA的相对运动粘度^[17].

2 结果与分析

2.1 紫外吸收光谱分析

萘酰亚胺衍生物3a的紫外吸收光谱(UV-Vis),如图2所示.图2中:A为吸光度;曲线1~10的

DNA 与萘酰亚胺衍生物的浓度比值分别为 0.02, 0.04, 0.06, 0.10, 0.14, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 1.00.

由图 2 可以发现:随着 CT-DNA 的不断滴加,萘酰亚胺衍生物 3a 的特征吸收带呈现明显的减色效应,不过并没有出现吸收峰位置红移和等吸收点,这表明萘酰亚胺衍生物与 DNA 的碱基电子产生相互作用.

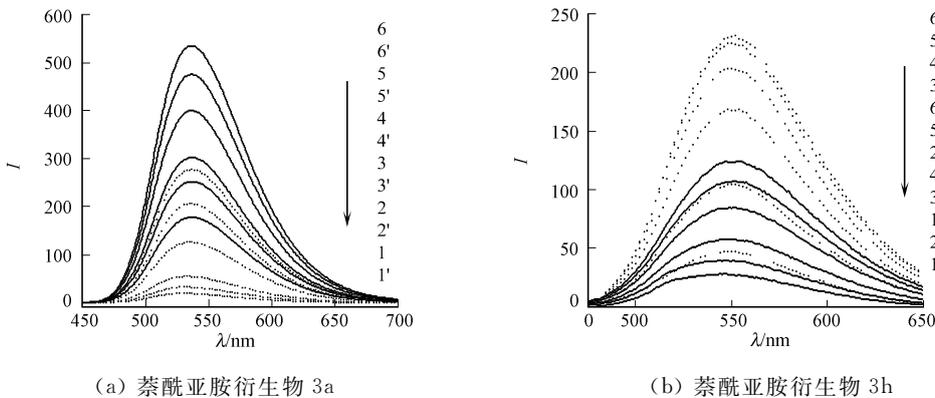
其他萘酰亚胺衍生物的紫外吸收光谱在逐渐滴加 CT-DNA 后也呈现类似的现象,表明不同 6-位脂肪胺取代的萘酰亚胺衍生物可能与 DNA 以相同或近似的方式相结合.

2.2 荧光发射光谱分析

萘酰亚胺衍生物 3a, 3h 与 CT-DNA 相互作用的荧光发射谱,如图 3 所示. 图 3 中: I 为荧光强度; 曲线 1~6 的萘酰亚胺衍生物浓度分别为 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 20.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 曲线 1'~6' 则在上述萘酰亚胺衍生物浓度下均加入 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DNA. 从图 3 可知:像大多数

DNA 嵌入剂一样,随着 CT-DNA 的不断滴加,萘酰亚胺衍生物的荧光强度不断下降,发射峰没有位移变化. 萘酰亚胺衍生物 3b, 3c 和 3d 在滴加 CT-DNA 后,其荧光发射谱也产生相似的荧光淬灭现象. 然而,萘酰亚胺衍生物 3e, 3f, 3g 和 3h 在滴加 CT-DNA 后,其荧光发射谱呈现明显的荧光增强现象.

分析萘酰亚胺衍生物结构可以发现,萘酰亚胺衍生物 3a, 3b 和 3d 都有富含电子的叔胺氮原子存在,在测试条件下氮原子易质子化,使得萘酰亚胺衍生物容易和带负电荷的 DNA 相结合. 萘酰亚胺衍生物 3c 尽管不含有这种氮原子,分子中的噻吩基团是苯的生物异构体,即富含电子,同时也容易容纳负电荷. 因此,萘酰亚胺衍生物 3a~3d 容易与 DNA 相结合,发生电子转移和能量转移,导致发射光谱产生荧光猝灭现象. 另外,萘酰亚胺衍生物 3e~3h 的结构没有这种特征,因此它们像溴化乙锭(EB)这种典型的 DNA 嵌入剂一样,在与 DNA 结合后荧光发射谱呈现荧光增强.



(a) 萘酰亚胺衍生物 3a

(b) 萘酰亚胺衍生物 3h

图 3 萘酰亚胺衍生物与 CT-DNA 相互作用的荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence spectra of interaction between naphthalimide derivatives and CT-DNA

萘酰亚胺衍生物与 DNA 之间的表观结合常数 K_b , 可以利用 Scatchard 方程^[18-19]求得. 经计算,萘酰亚胺衍生物 3a~3h 的每一位点固有的结合常数分别为 0.194, 0.231, 0.183, 0.226, 0.048, 0.018, 0.025, 0.018 $\text{ML} \cdot \text{mol}^{-1}$, 即萘酰亚胺衍生物 3a, 3b, 3c 和 3d 与 DNA 之间的结合常数值明显高于萘酰亚胺衍生物 3e, 3f, 3g 和 3h 与 DNA 之间的结合常数值. 这个结果支持了关于导致萘酰亚胺衍生物发射光谱呈现差异的解释.

2.3 圆二色谱分析

在 CT-DNA 溶液中分别滴加萘酰亚胺衍生物 3a, 3d 和 3h, 其圆二色谱如图 4 所示. 图 4 中: θ 为摩尔椭圆度; DNA 浓度为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 萘酰亚胺衍生物 3a, 3d 和 3h 的浓度为 10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 小图为诱导圆二色谱(ICD). 图 4 对应于 B 型 CT-DNA 的二级结构构象.

从图 4 可知: 279 nm 处的正峰是由于 DNA 的碱基对堆积而产生的, 247 nm 处的负峰是由于 DNA

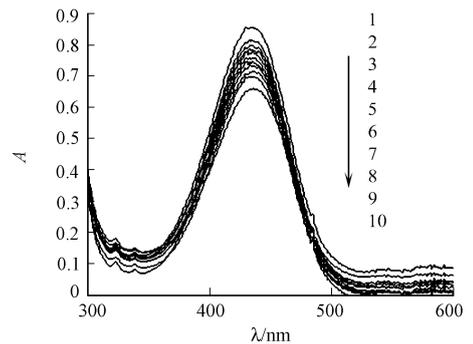


图 2 萘酰亚胺衍生物与 CT-DNA 相互作用的紫外吸收光谱

Fig. 2 UV-vis absorption spectra of interaction between naphthalimide derivatives and CT-DNA

的双螺旋结构而产生的. 在 CT-DNA 溶液中分别滴加萘酰亚胺衍生物 3a, 3d 和 3h 后, 萘酰亚胺衍生物 3a 和 3d 均引起 CT-DNA 的 CD 谱中正、负峰的摩尔椭圆度绝对值增加, 标志萘酰亚胺衍生物嵌入 DNA 碱基对后使碱基堆积增强, 双螺旋更紧凑; 萘酰亚胺衍生物 3h 引起 CD 谱中正峰的摩尔椭圆度绝对值增加, 负峰的摩尔椭圆度绝对值下降. 这个现象进一步表明, 萘酰亚胺衍生物因取代基不同导致其和 DNA 结合存在差异.

在萘酰亚胺衍生物紫外最大吸收位置能够观察到诱导圆二色谱吸收带. 由图 4 右上角的 ICD 放大图可以看到: 萘酰亚胺衍生物的 ICD 信号的摩尔椭圆度绝对值不超过 $1.0 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$. 通常, DNA 嵌入剂的 ICD 信号值较小, 最大不超过 $10.0 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$. 因此, 可以确定萘酰亚胺衍生物是通过嵌插方式与 DNA 结合的. 根据 ICD 图谱可以得到 DNA 与嵌入剂结合的角度取向和位置信息. 当嵌入剂的药效团与 DNA 双螺旋的对称轴平行 ($\gamma=0^\circ$) 时, 产生正的 ICD 信号; 当嵌入剂的药效团与 DNA 双螺旋的对称轴垂直 ($\gamma=90^\circ$) 时, 产生负的 ICD 信号^[20-21]. 结果显示: 萘酰亚胺衍生物的药效团即萘酰亚胺母体环与 DNA 双螺旋的对称轴是垂直的.

2.4 粘度测试分析

萘酰亚胺衍生物对 CT-DNA 溶液粘度的影响, 如图 5 所示. 图 5 中: DNA 浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 反应温度为 $(25 \pm 0.1)^\circ\text{C}$. 由图 5 可知, 随着萘酰亚胺衍生物 3a, 3c, 3d, 3e 和 3h 的滴加, 都会引起 DNA 溶液的粘度不断增加, 证明萘酰亚胺衍生物确实与 DNA 发生嵌插结合.

3 结束语

综合光谱测试和粘度测试的结果可以确定, 6-位脂肪胺取代的萘酰亚胺衍生物是通过嵌插方式与 DNA 相结合. 不过, 因为萘酰亚胺衍生物结构不同, 它们与 DNA 结合程度存在差异. 其中, 含有富电子基团的萘酰亚胺衍生物与 DNA 结合能力强, 没有这种取代基团的萘酰亚胺衍生物与 DNA 结合能力较弱, 结果这两类萘酰亚胺衍生物与 DNA 作用后荧光光谱和 CD 谱呈现不同的现象.

参考文献:

- [1] LI Nan, MA Ying, YANG Cheng, et al. Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods[J]. *Biophys Chem*, 2005, 116(3): 199-205.
- [2] MAHESWARI P U, RAJENDIRAN V, STOECKLI-EVANS H, et al. Interaction of $\text{rac-}[\text{Ru}(5,6\text{-dmp})_3]^{2+}$ with DNA: Enantiospecific DNA binding and ligand-promoted exciton coupling[J]. *Inorg Chem*, 2006, 45(1): 37-50.
- [3] WANG Bo-chu, TAN Jun, ZHU Lian-cai. Selective binding of small molecules to DNA: Application and perspectives [J]. *Colloid Surface B*, 2010, 79(1): 1-4.
- [4] BRAÑA M F, CACHO M, GRADILLAS A, et al. Intercalators as anticancer drugs[J]. *Curr Pharm Des*, 2001, 7(17): 1745-1780.
- [5] BRAÑA M F, RAMOS A. Naphthalimides as anticancer agents: Synthesis and biological activity[J]. *Curr Med Chem-Anti-Cancer Agents*, 2001, 1(3): 237-255.
- [6] 朱虹, 丁健. 萘酰亚胺类化合物作为抗肿瘤药物的研发现状[J]. *中国新药杂志*, 2007, 16(10): 742-747.
- [7] INGRASSIA L, LEFRANC F, KISS R, et al. Naphthalimides and azonafides as promising anti-cancer agents[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(10): 1192-1213.

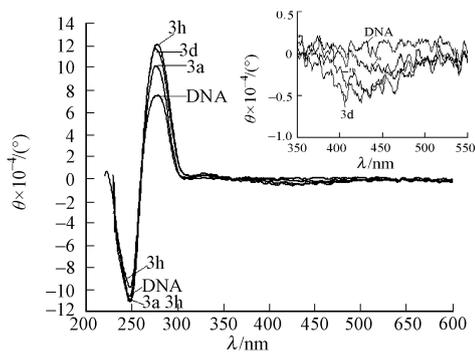


图 4 萘酰亚胺衍生物与 CT-DNA 相互作用的圆二色谱图

Fig. 4 CD spectra of interaction between naphthalimide derivatives and CT-DNA

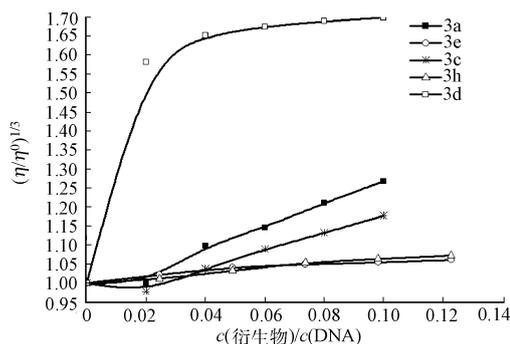


图 5 萘酰亚胺衍生物对 CT-DNA 溶液粘度的影响

Fig. 5 Effect of naphthalimide derivatives on CT-DNA viscosity

- [8] LÜ Min, XU Hui. Overview of naphthalimide analogs as anticancer agents[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(36): 4797-4813.
- [9] NORTON J T, WITSCHI M A, HUANG Sui, et al. Synthesis and anticancer activities of 6-amino aconafide derivatives[J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2008, 19(1): 23-36.
- [10] ANTONINI I, VOLPINI R, BEN D D, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of new mitonafide derivatives as potential antitumor drugs[J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(18): 8440-8446.
- [11] WU Ai-bin, XU Yu-fang, QIAN Xu-hong, et al. Novel naphthalimide derivatives as potential apoptosis-inducing agents; Design, synthesis and biological evaluation[J]. *Eur J Med Chem*, 2009, 44(11): 4674-4680.
- [12] IHMELS H, OTTO D. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA: General principles and recent developments[J]. *Top Curr Chem*, 2005, 258: 161-204.
- [13] LONG E C, BARTON J K. On demonstrating DNA intercalation[J]. *Acc Chem Res*, 1990, 23(9): 271-273.
- [14] PALCHAUDHURI R, HERGENROTHER P J. DNA as a target for anticancer compounds: Methods to determine the mode of binding and the mechanism of action[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(6): 497-503.
- [15] WHEATE N J, BRODIE C R, ALDRICH-WRIGHT J R, et al. DNA intercalators in cancer therapy: Organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis[J]. *Mini-Rev Med Chem*, 2007, 7(6): 627-648.
- [16] NISHIMURA T, OKOBIRA T, KELLY A M, et al. DNA binding of tilorone; ¹H NMR and calorimetric studies of the intercalation[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(27): 8156-8163.
- [17] LI Feng, CUI Jing-nan, QIAN Xu-hong, et al. Molecular design, chemical synthesis, and biological evaluation of '4-1' pentacyclic aryl/heteroaryl-imidazonaphthalimides[J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(15): 5114-5121.
- [18] SCATCHARD G, ANN N Y. The Attractions of proteins for small molecules and ions[J]. *Acad Sci*, 1949, 51(4): 660-672.
- [19] GUPTA M, ALI R. Fluorescence studies on the interaction of furocoumarins with DNA in the dark[J]. *J Biochem*, 1984, 95(5): 1253-1257.
- [20] 杨源源, 张志超, 盛辉, 等. 一种茈并杂环有机小分子嵌入 DNA 的几何学模式研究[J]. *高等学校化学学报*, 2007, 28(3): 453-457.
- [21] 刘振佳, 司伊康, 陈晓光. 圆二色谱测定技术在小分子化合物与 DNA 相互作用研究中的应用[J]. *药学报*, 2010, 45(12): 1478-1484.

Interaction between 6-Aliphatic Amine Substituted Naphthalimide Derivatives and DNA

XIE Li-juan

(Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: The DNA-binding behavior of eight 6-aliphatic amine substituted naphthalimide derivatives was investigated by UV-vis absorption spectra, fluorescence spectra, circular dichroism (CD) and viscosity measurement. The significant fluorescence quenching of 3a, 3b, 3c and 3d having stronger DNA-binding efficiency was observed upon addition of DNA, while the significant fluorescence enhancement of 3e, 3f, 3g and 3h having weaker DNA-binding efficiency was seen. CD results indicated that the change the secondary DNA structure induced by the derivatives was different. In UV-vis and viscosity measurement, no obvious difference in the interaction of the derivatives and DNA was found. Taking the spectra and viscosity measurement results, it was concluded that the naphthalimide derivatives bound to DNA via intercalation and there was differential in the degree of the interaction.

Keywords: naphthalimide; calf thymus DNA; spectra; viscosity; interaction; intercalated binding

(责任编辑: 陈志贤 英文审校: 刘源岗)