

(2-(4'-噻唑基)苯并咪唑)(L-丙氨酸根)铜(II)配合物的合成、表征、抑菌活性及与DNA的作用

朱丽, 卢艳梅, 区志镔, 乐学义
(华南农业大学理学院, 广东广州510642)

摘要:合成了新的三元铜(II)配合物: $[Cu(TBZ)(L-Ala)(H_2O)]ClO_4$ [其中, TBZ = 2-(4'-噻唑基)苯并咪唑, L-Ala = L-丙氨酸根]. 通过元素分析、摩尔电导率、红外光谱及电子吸收光谱对该配合物进行了表征. 用试管二倍稀释法研究了配合物的抗菌活性, 发现配合物对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (G+)、枯草杆菌 *Bacillus subtilis* (G+)、沙门氏杆菌 *Salmonella typhi* (G-) 和大肠埃希菌 *Escherichia coil* (G-) 具有良好的抑制作用. 另外, 采用电子吸收光谱、荧光光谱、圆二色光谱、粘度测定及琼脂凝胶电泳方法研究了配合物与小牛胸腺 DNA (CT-DNA) 的作用. 结果表明, 配合物可能以插入方式与 CT-DNA 作用, 在维生素 C 存在下通过羟自由基 ($\cdot OH$), 单线态氧 (1O_2) 或者 1O_2 类似物切割 pBR322 DNA 双螺旋结构.

关键词:铜(II)配合物; 2-(4'-噻唑基)苯并咪唑; L-丙氨酸; DNA; 抑菌活性

中图分类号: O625.6

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2012)04-0574-06

Synthesis, Characterization, Antibacterial Activities and DNA Interaction of Ternary Copper(II) Complex with 2-(4'-Thiazolyl) Benzimidazole and L-Alaninate

ZHU Li, LU Yan-mei, OU Zhi-bin, LE Xue-yi

(College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A new ternary copper(II) complex: $[Cu(TBZ)(L-Ala)(H_2O)]ClO_4$ [TBZ = 2-(4'-thiazolyl) benzimidazole, L-Ala = L-alaninate], was synthesized and characterized by elemental analysis, molar conductivity, infrared absorption spectrum, and electronic absorption spectrum. The complex was assayed against gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) and gram-negative (*Salmonella typhi*, *Escherichia coil*) bacteria by double dilution method, and the interaction of the complex to DNA was investigated by electronic absorption spectrometry, fluorescence spectrometry, CD spectrometry, viscosity measurement and agarose gel electrophoresis. The results indicated that the complex had good antibacterial activity, which could be bound to CT-DNA (calf thymus DNA) by intercalative mode, cleave pBR322 DNA in the presence of vitamin C in the involvement of the hydroxyl radical, and possibly singlet oxygen.

Key words: ternary copper(II) complex; 2-(4'-thiazolyl) benzimidazole; L-alanine; DNA; antibacterial activity

苯并咪唑衍生物具有良好的生物活性, 可作为 这些化合物与某些过渡金属离子结合形成配合物时
抗菌、抗病毒和杀虫剂以及抗癌药物等^[1-2], 尤其是 可提高其生物活性, 并且这种活性可能与化合物对

收稿日期: 2011-12-01

作者简介: 朱丽(1978—), 女, 博士研究生; 通信作者: 乐学义(1961—), 男, 教授, 博士, E-mail: lexyc@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金(10151064201000016); 华南农业大学校长基金(4900K07283)

DNA 的作用有关,因此苯并咪唑衍生物金属(尤为过渡金属)配合物与 DNA 相互作用及其应用受到人们广泛关注^[3-7]. 另外,人们研究发现,当在金属配合物中插入 L- α -氨基酸等生物配体时,能够增强药物对生物细胞膜的渗透作用等,从而进一步提高配合物的生物活性^[8],因此研究含 L- α -氨基酸及苯并咪唑衍生物过渡金属配合物有重要意义.

本文以重要的苯并咪唑衍生物 2-(4'-噻唑基)苯并咪唑(图 1)作为第 1 配体,L-丙氨酸为第 2 配体,重要生命元素铜(II)作为中心离子合成了新的三元配合物 $[\text{Cu}(\text{TBZ})(\text{L-Ala})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ [其中 TBZ=2-(4'-噻唑基)苯并咪唑,L-Ala=L-丙氨酸根](以下简称配合物). 通过二倍试管稀释法研究了配合物的抑菌活性,并采用电子吸收光谱、荧光光谱、圆二色光谱、粘度测定及琼脂凝胶电泳等方法研究了该配合物与 DNA 的相互作用,为研制新型高效抗菌剂提供科学依据.

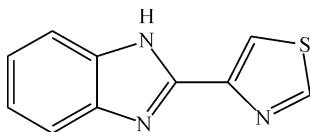


图 1 2-(4'-噻唑基)苯并咪唑的分子结构式

Fig. 1 Molecular structure of 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Vario EL 元素分析仪(ELEMENTAR 公司); ACATAR 360 FT-IR 型红外光谱仪(美国 Nicolet 公司); Shimadzu UV-2550 型紫外/可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司); DDS-12A 型电导率仪(上海宇隆仪器有限公司); F-4500 荧光光谱仪(日本 HITACHI 公司); JASCO-810 型圆二色光谱仪(日本 JASCO 公司); 乌氏粘度计(上海晶菱玻璃有限公司); BIO-RAD 凝胶成像系统(BIO-RAD Laboratories-Segrate 意大利米兰).

2-(4'-噻唑基)苯并咪唑、L-丙氨酸、小牛胸腺 DNA(CT-DNA)、溴化乙啶(EB)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、抗坏血酸(Vit C)、琼脂糖凝胶和质粒 pBR322DNA 均为生化试剂,其他试剂为市售分析纯. 研究配合物与 DNA 相互作用时,底液 Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液为:10 mmol·L⁻¹ Tris + 50 mmol·L⁻¹ NaCl 缓冲液(pH=7.2), Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液为:4.5×10⁻² mol·L⁻¹ Tris + 4.5×10⁻² mol·L⁻¹ H₃BO₃ + 1 mol·L⁻¹ EDTA(pH=8.3), CT-DNA 浓度按照文献[9]方法确定.

供试菌种:金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (G+), 枯草杆菌 *Bacillus subtilis* (G+), 沙门氏杆菌 *Salmonella typhi* (G-), 大肠埃希菌 *Escherichia coli* (G-)由华南农业大学农学院广东省植物分子育种重点实验室提供.

1.2 配合物的合成与表征

称取 0.5 mmol 丙氨酸溶于 5 mL 双蒸水中并用 0.5 mmol NaOH 中和搅拌得溶液 A;将 0.5 mmol TBZ 溶于 20 mL 无水乙醇中,加热搅拌下加入 1.0 mL 0.5 mol·L⁻¹ Cu(ClO₄)₂ 溶液,反应 15 min,得溶液 B;将以上 2 种溶液混合,待加热搅拌回流 30 min 后冷却至室温,过滤,静置滤液,15 d 后析出蓝色晶体. 过滤并依次用少量水、乙醇洗涤,空气中干燥后置于干燥器中保存. 通过 KBr 压片测定配合物在 400~4 000 cm⁻¹ 范围内的红外光谱,测定配合物甲醇溶液的电子吸收光谱,以及对配合物进行元素分析,从而对配合物的结构进行表征.

1.3 抑菌试验

应用试管二倍稀释法测定配合物最小抑菌浓度(MIC). 取 10 支(10 mL)消毒试管并进行编号. 首先往 10 支消毒并已编号的试管(10 mL)中分别加入 1.0 mL 营养肉汤,然后将 1.0 mL 待测样品加入到 1 号试管内,振荡摇匀后,从 1 号试管吸取 1.0 mL 溶液加入到 2 号试管,再从 2 号试管吸取 1.0 mL 溶液加入到 3 号试管,一直到 9 号试管,再从 9 号试管内吸取 1.0 mL 溶液弃去. 10 号试管不加待测样品. 在 10 支试管中均加入 20 μ L 菌液,然后将 10 支试管放入培养箱,在相对湿度>80%和温度为 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 24 h 后取出观察,并记录试验现象.

1.4 配合物与 CT-DNA 作用

1.4.1 电子吸收光谱测定 以 Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液作空白对照液,测定标题配合物在 200~400 nm 范围内的电子吸收光谱. 然后,在恒定配合物浓度为 1×10⁻⁴ mmol·L⁻¹下,依次往空白池和样品池中加入等体积的 CT-DNA 溶液,使 CT-DNA 与配合物的浓度比值不断增加,室温下作用 6 min 后,在相同波长范围内扫描.

1.4.2 荧光光谱测定 以 Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液作溶剂,配制 EB 浓度为 4.8 μ mol·L⁻¹、CT-DNA 浓度为 5.5 μ mol·L⁻¹ 的溶液,放置 4 h 后测定该体系的荧光强度. 然后,保持 EB 和 CT-DNA 浓度不变,逐渐增加配合物的浓度,室温下作用 5 min 后,在同样波长范围内扫描. 仪器测量参数:激发波长为 525 nm,扫描速度为 240 nm·s⁻¹,波长范围为 550~650 nm.

1.4.3 圆二色光谱测定 固定 CT-DNA 浓度为 100

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 逐渐增加配合物浓度, 在同样波长范围内, 测定其圆二色 (CD) 光谱. 扫描速度 $100 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 波长范围 $200 \sim 320 \text{ nm}$, 累计扫描 5 次.

1.4.4 粘度试验 恒定温度为 $(29.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$, 以 Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液作为溶剂, 固定 CT-DNA 浓度为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 依次增大配合物浓度, 并测定溶液流经毛细管的时间. 由公式 $\eta = (t - t_0)/t_0$ (式中, t_0 为缓冲溶液流经毛细管所需时间, t 为含不同浓度配合物的 CT-DNA 溶液流经毛细管所需的时间) 计算 CT-DNA 溶液相对粘度 (η), 然后以 $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ 对 $c_{\text{配合物}}/c_{\text{DNA}}$ (η_0 为未加配合物时 CT-DNA 溶液的比粘度) 作图. 每个样品溶液至少重复测定 3 次, 取平均值.

1.5 配合物对 pBR322DNA 的切割作用

固定 pBR322 DNA 为 200 ng , 逐渐增加配合物的浓度及 50 倍于配合物浓度的还原剂 Vit C, 然后用 Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液定容至 $17 \mu\text{L}$, 28°C 下放置 2 h 后, 加入 $3 \mu\text{L}$ 上样缓冲液 [含 0.25% (w) 溴酚蓝和 50% (w) 甘油的水溶液], 在 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶和 TBE 电泳缓冲液中电泳 (100 V) 40 min . 溴酚蓝作为电泳过程指示剂, Gold View ($4 \sim 5 \mu\text{L}$) 作为凝胶着色剂, 电泳结果在凝胶成像分析系统上照相. 为了探索配合物切割 DNA 的作用机理, 在上述相同条件下, 分别将 $4 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜 (DMSO)、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,2,6,6-四甲基-4-哌啶酮 (TMP) 或叠氮钠 (NaN_3) 与 pBR322 DNA 混合作用 15 min , 再加入配合物及 Vit C, 进行电泳和照相.

2 结果与分析

2.1 配合物表征

配合物 $\text{C}_{15} \text{H}_{21} \text{O}_8 \text{N}_4 \text{CuS}_2 \text{Cl}$ 元素分析, 实验值/%: C, 33.31; H, 3.19; N, 11.85; 理论值/%: C, 33.20; H, 3.21; N, 11.91. 元素分析结果与理论值基本吻合, 表明推测的配合物组成与实际一致. 测得配合物甲醇溶液的摩尔电导率为 $115 \text{ S} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 由此推测配合物为 1:1 型电解质^[10].

测得配合物红外光谱 (KBr), ν/cm^{-1} : $3443 (\text{s}, \text{br})$, $3267 (\text{m})$, $3059 (\text{m})$, $1647 (\text{vs})$, $1391 (\text{s})$, $1521 (\text{w})$. 3443 cm^{-1} 处强的吸收峰归属于配位 H_2O 的 $\nu_{-\text{OH}}$; 3059 cm^{-1} 及 3267 cm^{-1} 处吸收带归属于 $-\text{NH}_2$ 的 2 个不对称分裂吸收峰 $\nu_{-\text{NH}}$, 表明 L -丙氨酸根的 $-\text{NH}_2$ 参与了配位; 1647 cm^{-1} 及 1391 cm^{-1} 分别归属于 $-\text{COO}^-$ 的不对称伸缩振动 $\nu_{\text{COO}^-}^{\text{as}}$ 和对称伸缩振动 $\nu_{\text{COO}^-}^{\text{s}}$, 且之间差值: $\Delta\nu(\nu_{\text{COO}^-}^{\text{as}} - \nu_{\text{COO}^-}^{\text{s}}) > 200 \text{ cm}^{-1}$, 表明 L -Ala 的 $-\text{COO}^-$ 为单齿配位基

团^[11]. 另外, 1521 cm^{-1} 处吸收归属于配体 TBZ 的 $\text{C}=\text{N}$ 伸缩振动.

试验测得配合物电子吸收光谱, λ/nm ($\epsilon/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$): $243 (15241)$, $301 (19798)$, $633 (132)$. 在配合物甲醇溶液的电子光谱中, 紫外区 243 nm 和 251 nm 处 2 个强吸收峰均归属于配体 TBZ 的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁. 与自由配体相比, 最大吸收峰的位置未发生明显改变, 但强度有所减弱, 归因于 TBZ 上的氮原子配位后引起配体芳环上电子云密度的降低. 另外, 633 nm 处弱而宽的吸收峰归属于中心 Cu (II) 离子的 $d \rightarrow d$ 跃迁, 并由此推测配合物在甲醇溶液中具有变形四方锥结构.

综合上述分析可以推测, 标题配合物分子式为: $[\text{Cu}(\text{TBZ})(L\text{-Ala})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$.

2.2 配合物抑菌活性

将化合物配制成质量浓度为 1024 及 $640 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的原液, 通过试管二倍稀释法形成浓度梯度. 细菌最终接种量为 $5 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 37°C 条件下培养 24 h , 测得 $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 、TBZ 和配合物抑制细菌最低质量浓度 (MIC), 结果见表 1.

表 1 化合物抑制细菌生长的最低质量浓度 (MIC)
Tab. 1 Minimal inhibitory concentrations (MIC) of the compounds for the assayed bacteria $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

| 化合物 | 枯草杆菌 | 金黄色葡萄球菌 | 沙门氏杆菌 | 大肠埃希菌 |
|-----------------------------|------|---------|-------|-------|
| $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ | 320 | 320 | 256 | 256 |
| TBZ | 320 | 320 | 512 | 320 |
| 配合物 | 128 | 160 | 160 | 128 |

表 1 中试验数据表明: 对于所有 4 种菌种, 配合物所需最低抑菌浓度均比 $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 和 TBZ 的低, 表明配合物抗菌活性高于 $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 及 TBZ, 这可能主要归因于配合物分子中中心金属铜 (II) 离子与配体之间的协同作用, 与文献 [4] 报道的结论一致.

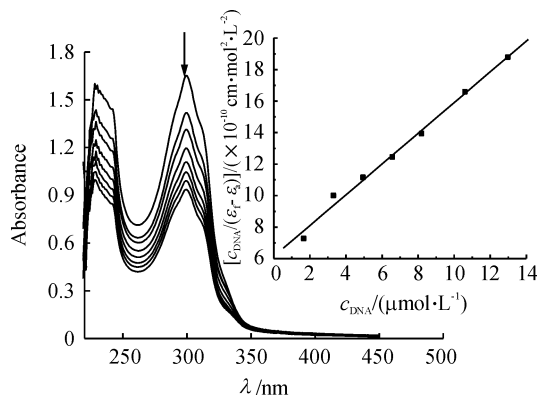
2.3 配合物与 CT-DNA 的相互作用

为了初步探索配合物抑菌作用机理, 本文通过光谱学、流体力学等方法研究了配合物与 DNA 的作用.

2.3.1 电子吸收光谱 电子吸收光谱是研究配合物与 DNA 作用的最常用方法之一. 在 $210 \sim 400 \text{ nm}$ 范围内, 标题配合物均出现了 2 个吸收峰, 归属于 $2-(4'-\text{噻唑基})$ 苯并咪唑的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁吸收. 配合物与 CT-DNA 相互作用的吸收光谱滴定曲线如图 2 所示. 图 2 表明, 配合物在 $210 \sim 400 \text{ nm}$ 波长范围内吸收峰强度随着 CT-DNA 浓度增加而发生明显的减色效应, 说明配合物与 CT-DNA 之间可能发生了插入作用, 并根据以下方程式可定量求得两者间的结合常数 K_b ^[12]:

$$c_{\text{DNA}}/(\varepsilon_a - \varepsilon_f) = c_{\text{DNA}}/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f),$$

其中, c_{DNA} 为 CT-DNA 的浓度, ε_a 为配合物的表观摩尔吸光系数, ε_f 和 ε_b 分别为自由配合物的摩尔吸光系数和完全结合后的配合物的摩尔吸光系数. 以 $c_{\text{DNA}}/(\varepsilon_f - \varepsilon_a)$ 对 c_{DNA} 作图(图 2 中插图), 由斜率与截距的比值获得结合常数 $K_b = 1.439 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 此值比经典插入试剂溴乙锭(EB)的 K_b 值($1.4 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$)^[8] 小 1 个数量级, 表明标题配合物对 DNA 的插入作用较弱.

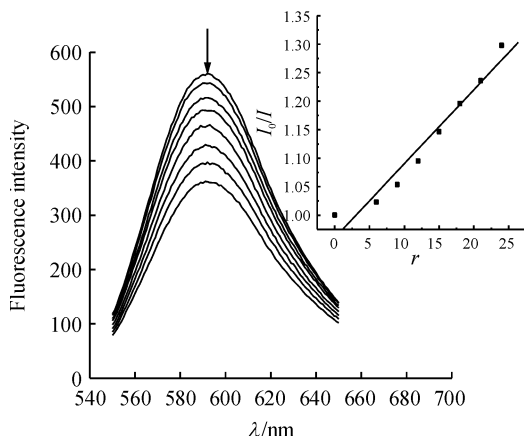


↓: 表示紫外吸光度随着 CT-DNA 浓度增加而变化; 配合物浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 由上到下 DNA 浓度依次为: 0、1.661、3.311、4.951、6.579、8.197、10.604 和 $12.987 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 插图表示 $c_{\text{DNA}}/(\varepsilon_f - \varepsilon_a)$ 与 c_{DNA} 随着用 DNA 滴定配合物而变化.

图 2 配合物在不同 CT-DNA 浓度下的电子吸收光谱图

Fig. 2 Absorption spectra of the complex upon addition of CT-DNA

2.3.2 荧光光谱 荧光光谱被广泛地应用于研究配合物与 DNA 之间的相互作用. 测得配合物与 CT-DNA 作用的溴化乙锭(EB)荧光光谱如图 3 所示.



↓: 表示荧光吸光度随着配合物浓度增加而变化; 从上到下配合物浓度依次为: 0、0.118 2、0.177 1、0.235 8、0.294 5、0.353 1、0.411 5 和 $0.469 9 \text{ Mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 插图表示 I_0/I 随着用配合物滴定 EB-CT-DNA 而变化.

图 3 配合物对 EB-DNA 体系荧光光谱的影响

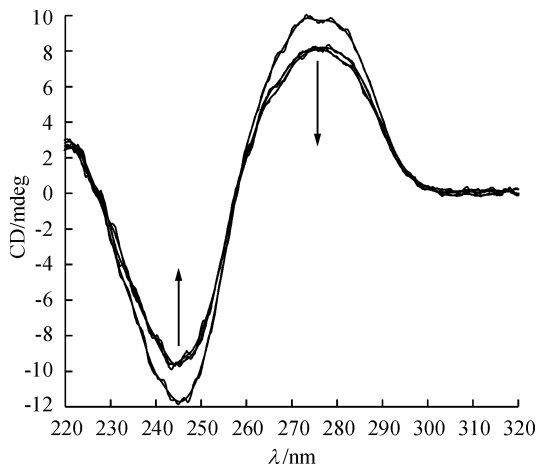
Fig. 3 Effects of the complex on the fluorescence spectra of EB-DNA system

由图 3 可以看出, 随着配合物浓度增加, EB-CT-DNA 体系的荧光强度被显著地淬灭, 表明配合物分子将 EB 从 EB-CT-DNA 复合物中挤出, 由此推测配合物可能对 CT-DNA 发生了插入作用. 由以上滴定试验, 应用经典 Stern-Volmer 方程可以求得配合物取代 EB 而与 CT-DNA 作用的淬灭常数 K_{sq} ^[12]:

$$I_0/I = 1 + K_{\text{sq}}r,$$

其中, I_0 和 I 分别为未滴加配合物和滴加配合物时 EB-CT-DNA 体系的荧光强度, r 为配合物与 CT-DNA 的浓度比. 将 I_0/I 对 r 作图获得一条直线(图 3 中插图), 其斜率为 K_{sq} 值, 即 0.088 43. 此值比文献报道的配合物的 K_{sq} 值^[13] 小得多, 表明配合物对 CT-DNA 只有较弱的插入作用, 与以上电子吸收光谱研究结果一致.

2.3.3 圆二色光谱 DNA 是手性大分子, CD 光谱中有 2 个特征的吸收峰, 即 275 nm 附近的正峰和 245 nm 附近的负峰. 当配合物与 DNA 作用, 尤其是插入到 DNA 碱基对之间时, DNA 构象会发生变化, 从而引起 DNA 的 CD 光谱发生变化^[14]. 因此, CD 光谱是研究配合物与 DNA 相互作用的重要方法. 标题配合物与 CT-DNA 相互作用的 CD 光谱如图 4 所示.



CT-DNA 浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 按箭头方向配合物与 CT-DNA 浓度的比值依次为: 0、0.2、0.4.

图 4 配合物对 CT-DNA 圆二色光谱的影响

Fig. 4 Effects of the complex on CD spectra of CT-DNA

由图 4 可以看出, CT-DNA 的正、负 CD 峰均随着配合物浓度增大而减弱, 表明配合物与 CT-DNA 之间发生了作用, 并且这种作用可能与配合物对 CT-DNA 的插入作用有关.

2.3.4 粘度测定 粘度测定被认为是在缺乏晶体结构数据情况下确定配合物与 DNA 作用模式的重要手段之一^[15]. 当配合物以静电、沟面结合等非插入方式与 DNA 作用时, DNA 溶液的粘度无明显变化;

以部分插入方式与 DNA 作用时,会导致 DNA 双螺旋扭结, DNA 溶液的粘度降低;而以插入方式与 DNA 作用时,会导致 DNA 双螺旋伸长, DNA 溶液的粘度增加. 配合物对 CT-DNA 相对比粘度的影响如图 5 所示.

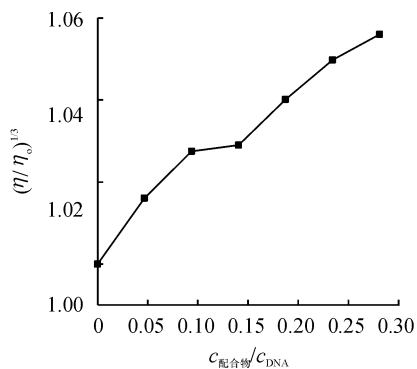


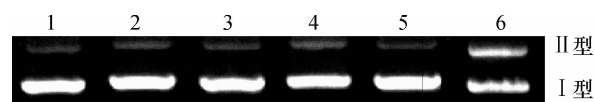
图 5 配合物对 CT-DNA 相对比粘度的影响

Fig. 5 Effects of the complex on the relative viscosity of CT-DNA

结果表明,随着配合物浓度增大, CT-DNA 溶液的相对比粘度增加,由此推测配合物以插入方式与 CT-DNA 作用^[15],与上述光谱方法得出的结论一致.

2.4 配合物对 pBR322 DNA 的切割作用

琼脂糖凝胶电泳是研究配合物对 DNA 切割作用的重要方法. pBR322 DNA 有 3 种构型,即共价闭环超螺旋型(I型)、缺刻环形(II型)以及线型(III型).这 3 种 pBR322 DNA 构型在电泳过程中具有不同的迁移速率,通常 I 型结构最为紧密,迁移速率最大,III型次之,而 II 型结构比较松散,迁移速率最小. 28 °C 条件下,测得配合物对 pBR322 DNA 的切割作用如图 6 所示.



1: 200 ng pBR322 DNA; 2: 200 ng pBR322DNA + 1.25 mmol · L⁻¹ 抗坏血酸; 3: 200 ng pBR322 DNA + 1.25 mmol · L⁻¹ 抗坏血酸 + 25 μmol · L⁻¹ 高氯酸铜; 4: 200 ng pBR322 DNA + 1.25 mmol · L⁻¹ 抗坏血酸 + 25 μmol · L⁻¹ 2 - (4' - 噻唑基) 苯并咪唑; 5: 200 ng pBR322 DNA + 25 μmol · L⁻¹ 配合物 [Cu(TBZ)(L-Ala)(H₂O)]ClO₄; 6: 200 ng pBR322 DNA + 1.5 mmol · L⁻¹ 抗坏血酸 + 25 μmol · L⁻¹ 配合物 [Cu(TBZ)(L-Ala)(H₂O)]ClO₄.

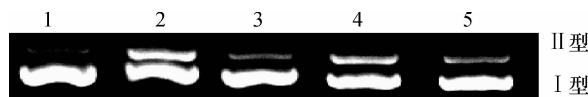
图 6 配合物切割 pBR322 DNA 的凝胶电泳图

Fig. 6 Agarose gel eletrophoresis for the cleavage of pBR322 DNA by the complex in the presence of Vit C

图 6 表明,抗坏血酸、配合物或在抗坏血酸存在下, Cu(ClO₄)₂ 及 TBZ 对 pBR322 DNA 均未显示出明显的切割作用,只有配合物与抗坏血酸共存条件下才能将 pBR322 DNA 的超螺旋构型切割成缺刻构

型.

为了进一步揭示配合物切割 DNA 的作用机制,在活性氧 · OH 自由基清除剂二甲基亚砜(DMSO)及单线态氧¹O₂清除剂 2,2,6,6-四甲基-4-哌啶酮(TMP)或叠氮钠(NaN₃)存在下,研究了配合物对 pBR322 DNA 的切割作用(图 7).



1: 200 ng pBR322 DNA; 2: 200 ng pBR322DNA + 1.5 mmol · L⁻¹ 抗坏血酸 + 25 μmol · L⁻¹ 配合物 [Cu(TBZ)(L-Ala)(H₂O)]ClO₄; 3: 200 ng pBR322 DNA + 1.5 mmol · L⁻¹ 抗坏血酸 + 25 μmol · L⁻¹ 配合物 [Cu(TBZ)(L-Ala)(H₂O)]ClO₄ + 4 μL 二甲基亚砜; 4: 200 ng pBR322 DNA + 1.5 mmol · L⁻¹ 抗坏血酸 + 25 μmol · L⁻¹ 配合物 [Cu(TBZ)(L-Ala)(H₂O)]ClO₄ + 100 μmol · L⁻¹ 2,2,6,6-四甲基-4-哌啶酮; 5: 200 ng pBR322 DNA + 1.5 mmol · L⁻¹ 抗坏血酸 + 25 μmol · L⁻¹ 配合物 [Cu(TBZ)(L-Ala)(H₂O)]ClO₄ + 100 μmol · L⁻¹ 叠氮钠.

图 7 加入抑制剂后配合物切割 pBR322 DNA 的凝胶电泳图
Fig. 7 Cleavage of pBR322 DNA in the presence of the complex and inhibitor DMSO, TMP, or NaN₃

由图 7 可见,在加入 DMSO(第 3 泳道)、TMP(第 4 泳道)或 NaN₃(第 5 泳道)后,配合物对 pBR322 DNA 的切割能力减弱,即 DMSO、TMP 或 NaN₃ 对配合物切割 DNA 有抑制作用.由此推测配合物对 pBR322 DNA 的切割作用可能与羟基自由基 · OH,单线态氧¹O₂ 或者单线态氧¹O₂ 类似物有关^[16].

3 讨论与结论

本文合成和表征了新的三元配合物: [Cu(TBZ)(L-Ala)(H₂O)]ClO₄,并研究了该配合物的抑菌活性及与 DNA 的作用.该配合物分子与文献[8]报道的配合物 [Cu(phen)(L-Thr)(H₂O)](ClO₄)类似,具有变形四方锥配位结构,并以插入方式与 DNA 作用.但与 [Cu(phen)(L-Thr)(H₂O)](ClO₄)不同的是,在 Vit C 存在下,该配合物切割 DNA 既与羟基自由基 · OH 有关,又可能与单线态氧¹O₂ 或其类似物有关.与配体 TBZ 及铜(II)盐 Cu(ClO₄)₂ 相比,该配合物对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、沙门氏杆菌和大肠埃希菌等具有良好的抑制作用,这既与中心铜(II)离子与芳香杂环配体 TBZ 的 π-协同作用有关,又可能依赖于药物分子中插入了 L-丙氨酸,因为 L-α-氨基酸配体能够增强药物分子对生物细胞膜的渗透作用、减弱其在生物

体内毒副性、提高水溶性而增强细胞对药物吸收效果等,从而可进一步提高配合物的抗菌活性. 另外,该配合物抗菌活性可能与配合物对生物体内DNA的抑制作用有关,有关详细作用机制有待于进一步研究.

参考文献:

- [1] WRIGHT J B. The chemistry of the benzimidazoles[J]. Chem Rev, 1951, 48(3): 397-541.
- [2] OBDULIA S G, Horacio L S, Francisco S B, et al. Cytotoxic activity, X-ray crystal structures and spectroscopic characterization of cobalt(II), copper(II) and zinc(II) coordination compounds with 2-substituted benzimidazole[J]. J Inorg Biochem, 2009, 103(9): 1204-1213.
- [3] MOTHILAL K K, KARUNAKARAN C, RAJIENDRAN A, et al. Synthesis, X-ray crystal structure, antimicrobial activity and photodynamic effects of some thiabendazole complexes[J]. J Inorg Biochem, 2004, 98(2): 322-332.
- [4] 周晓华, 吴海雷, 骆锦强, 等. 2-胺乙基苯并咪唑金属配合物的合成、表征和抑菌活性研究[J]. 华南农业大学学报, 2011, 32(3): 122-124.
- [5] DEVEREUX M, O'SHEA D, KELLETT A, et al. Synthesis, X-ray crystal structures and biomimetic and anticancer activities of novel copper(II) benzoate complexes incorporating 2-(4'-thiazolyl) benzimidazole (thiabendazole), 2-(2-pyridyl) benzimidazole and 1, 10-phenanthroline as chelating nitrogen donor ligands[J]. J Inorg Biochem, 2007, 101(6): 881-892.
- [6] EL-SHERIF A A, JERAGH B J A. Mixed ligand complexes of Cu(II)-2-(2-pyridyl)-benzimidazole and aliphatic or aromatic dicarboxylic acids; Synthesis, characterization and biological activity[J]. Spectrochim Acta: Part A, 2007, 68(3): 877-882.
- [7] CHEN Zhan-fen, WANG Xiao-yong, LI Yi-zhi, et al. Comparison of DNA binding and cleavage abilities between mono- and trinuclear copper(II) complexes of benzimidazole derivatives[J]. Inorg Chem Commun, 2008, 11(11): 1392-1396.
- [8] ZHANG Shou-chun, ZHU Yang-guang, TU Chao, et al. A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of 1, 10-phenanthroline and L-threonine with DNA nuclease activity[J]. J Inorg Biochem, 2004, 98(12): 2099-2106.
- [9] CATER M T, RODRIGUEZ M, BARD A J. Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA; 2; Tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1, 10-phenanthroline and 2, 2'-bipyridine[J]. J Am Chem Soc, 1989, 111(24): 8901-8911.
- [10] GEARY W J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds[J]. Coord Chem Rev, 1971, 7(1): 81-122.
- [11] NAKAMOTO K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds[M]. 4th ed. New York: John Wiley and Sons Inc, 1986:257.
- [12] CHEN Jia-yang, REN Xiang-xiang, LE Xue-yi, et al. Synthesis, characterization and nuclease activity of ternary copper(II) complexes containing dipyrido[3, 2-a:2, 3-c] phenazine and L- α -amino acids[J]. Chim J Chem, 2010, 28(11): 2179-2187.
- [13] LI Hong, LE Xue-yi, PANG Dai-wen, et al. DNA-binding and cleavage studies of novel copper(II) complex with L-phenylalaninate and 1, 4, 8, 9-tetra-aza-triphenylene ligands[J]. J Inorg Biochem, 2005, 99(12): 2240-2247.
- [14] LINCOLN P, TUIE E, NORDEN B. Short-circuiting the molecular wire: Cooperative binding of Δ -[Ru(phen)₂ dp-pz]²⁺ and Δ -[Rh(phi)₂bipy]³⁺ to DNA[J]. J Am Chem Soc, 1997, 119(6): 1454-1455.
- [15] SATYANARAYANA S, DABROWIAK J C, CHAIRES J B. Tris(phenanthroline) ruthenium(II) enantiomer interactions with DNA: Mode and specificity of binding[J]. Biochemistry, 1993, 32(10): 2573-2584.
- [16] GONZÁLEZ-ÁLVAREZ M, ALZUET G, GARCÍ-GIMÉNEZ J L, et al. Biological activity of flavonoids copper complexes[J]. Z Anorg Allg Chem, 2005, 631(11): 2181-2187.

【责任编辑 李晓卉】