

吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配合物的合成及其DNA切割活性

何大青^a 蒋尚飞^b 陈煜^a 文丽君^{a*} 唐一迪^a 李芯宇^a

(海南医学院^a药学院;^b基础医学与生命科学学院 海口 571199)

摘要 以5,6-二甲基-2,3-吡嗪二甲酰胺和芹菜素为混合配体,与醋酸铜以溶剂热法合成吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配合物;该配合物通过紫外光谱、红外光谱、差热-热重分析及X射线粉末衍射(XRD)等进行表征。采用酶切实验及琼脂糖凝胶电泳法,研究该铜配合物对DNA的切割活性;凝胶电泳结果表明,不加入任何还原剂时,当质量浓度为0.0592 g/L时,该配合物对超螺旋pBR 322DNA表现出显著的DNA切割活性,且随质量浓度的增加,切割活性增强。这为人工核酸酶的研究提供了例证及开阔了思路。

关键词 吡嗪二甲酰胺;芹菜素;配合物;合成;DNA切割活性

中图分类号:O622.6

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2017)10-1172-05

DOI:10.11944/j.issn.1000-0518.2017.10.170124

人工核酸酶在基因药物设计和分子生物学研究领域具有重要的科学意义,因此人工核酸酶的设计和酶模拟方面的研究引起了广泛关注并取得了重要进展^[1]。由于与核酸有关的多种天然酶的活性部位含有两个或两个以上协同作用的金属离子,因此科研人员对多核金属配合物作为核酸模拟酶进行了广泛的研究^[2-5]。研究表明,双核或多核铜配合物分子中含有两个或两个以上的铜金属中心,增强了配合物进行DNA切割时的选择性和切割效率^[4]。5,6-二甲基-2,3-吡嗪二甲酰胺是一个优良的多齿配体,能形成多种金属配合物^[6-8],芹菜素是一种天然抗氧化剂,分子中也有多个配位氧原子,本文尝试设计合成以5,6-二甲基-2,3-吡嗪二甲酰胺为桥联配体,芹菜素为端基配体的双核铜配合物,在紫外、红外、热重、X射线粉末衍射等结构表征的基础上考察该配合物在不加任何还原剂的情况下,对超螺旋pBR 322DNA的切割活性,旨在发现具优良活性的人工金属核酸酶。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器、SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司);DZF-6021型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);TENSOR27型傅里叶变换红外光谱仪(德国Bruker公司);UV100P型紫外可见光光度计(上海凤凰光学仪器有限公司);Q600型热重分析仪(SDT,美国TA仪器公司);D8 Advance型X射线衍射仪(德国布鲁克公司)。凝胶电泳实验在Tanon EPS 300型电泳仪(上海天能科技有限公司)上完成。

酶切实验用的是加了10 mL核酸染料的GoldView I型的TBE琼脂糖凝胶(北京瑞达恒辉科技发展有限公司);pBR322 DNA购自MBI Fermentas;2,3-二甲基-5,6-二氰基吡嗪(99%),美国Aldrich公司;芹菜素(纯度>95%),陕西慧科植物开发公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris-base),美国RT公司;丙酮、NaOH、30% H₂O₂、甲醇、一水合乙酸铜(Cu(CH₃COO)₂·H₂O)、无水乙醇,均为分析纯试剂,购自广州化学试剂厂。

1.2 吡嗪二甲酰胺的合成

参考文献[6]方法,将0.316 g(0.002 mol)2,3-二甲基-5,6-二氰基吡嗪加到三颈烧瓶中,再加入

2017-04-21收稿,2017-06-05修回,2017-07-03接受

海南省自然科学基金项目(20152040);国家级大学生创新创业项目(201511810009);海南医学院校级大学生创新创业项目(HYCX2014015)

通讯联系人:文丽君,副教授;Tel:0898-66893781;E-mail:wenlijun3467@163.com;研究方向:配合物药物合成及其生物活性

32 mL质量分数为 5% 的 NaOH 水溶液和 32 mL 丙酮,电磁搅拌;滴加 14 mL 质量分数为 10% 的 H_2O_2 溶液至三颈烧瓶,15 min 内滴加完毕,升温至 50 $^{\circ}\text{C}$,继续搅拌反应。溶液颜色从棕褐色经棕黄色、黄色变至透明浅黄,最后随着反应的进行,颜色又逐渐加深直至变为棕褐色,约 6 h 后停止反应,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下减压蒸馏除丙酮,残余物用甲醇洗涤,析出沉淀,抽滤,烘干,得黄色粉末状固体^[6]。

1.3 吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配合物的合成

将 0.199 g 醋酸铜溶于 30 mL 无水乙醇中,超声溶解,置于三颈烧瓶;将 0.097 g 2,3-二甲基-5,6-吡嗪二甲酰胺溶于 60 mL 无水乙醇中,超声溶解;将 0.27 g 芹菜素溶于 100 mL 无水乙醇中,超声溶解;将上述 2,3-二甲基-5,6-吡嗪二甲酰胺溶液滴加到醋酸铜溶液中,溶液由蓝色逐渐变为绿色,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 40 min 后滴加芹菜素溶液,反应液慢慢变为黄绿色溶液,50 $^{\circ}\text{C}$ 下继续反应 10 h,反应液变为黄绿色浑浊,静置,抽滤,洗涤,干燥得 0.33 g 黄绿色粉末。

1.4 DNA 切割活性测试

配制 0.592 g/L 的吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配合物水溶液,将 2 μL 的超螺旋 pBR322DNA (151 $\mu\text{g/L}$) 与适量体积的铜配合物溶液混合,用 pH = 7.4 的 Tris-HCl (1 mol/L) 缓冲溶液定容至 20 μL 。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中反应 2 h,利用核酸染料染色质量分数 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分析切割结果。电泳液为 TBE buffer (0.5 X),电压 100 V,电泳图用凝胶成像系统分析。

2 结果与讨论

2.1 吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配合物的表征

2.1.1 紫外光谱

以无水乙醇为溶剂,测得配体 5,6-二甲基-2,3-吡嗪二甲酰胺、芹菜素及其铜配合物的紫外光谱如图 1。由图 1 可知,配体吡嗪二甲酰胺在 205 nm 处,芹菜素在 210 nm 处的最大吸收峰,与铜配位后移至 209 nm 处,芹菜素在 286 nm 处的吸收峰与铜配位后移至 269 nm 处,配合物兼具两个配体的峰形特点,相对于两个配体,结构又略有改变。

2.1.2 配合物的红外光谱

采用 KBr 压片法,对吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配合物进行红外光谱扫描,结果如图 2。由图 2 可知,配合物包含了两个配体的特征吸收峰,且有所位移。相对于配体^[6,9],吡嗪二甲酰胺上 N—H 键的伸缩振动吸收峰低波数移动到 3404 cm^{-1} 处,与芹菜素在 3291 cm^{-1} 处的羟基伸缩振动与铜配位后高波数移动位置重合,说明吡嗪二甲酰胺中 N 原子和芹菜素中的羟基氧原子参与配位;—CONH₂ 的 C—N 伸缩振动吸收峰位于 1434 cm^{-1} 处,也低波数移动 26 cm^{-1} ,进一步说明酰胺中 N 原子参与配位。芹菜素分子中位于 1651 cm^{-1} 处 C=O 的特征吸收峰低波数移动 24 cm^{-1} 至 1627 cm^{-1} 处,这说明该羰基氧原子参与了配位,降低了羰基的双键性,向低波数移动。组峰 1596、1535 和 1485 cm^{-1} 为芳香苯环及吡嗪环的骨架振动,相对于配体均有所低波数方向移动,这说明芹菜素的苯环骨架在与铜配位后,形成了一个新环而使共轭效应增强,及吡嗪环氮原子可能参与配位。吡嗪环的特征吸收峰从 1122 cm^{-1} 迁移到 1173 cm^{-1} ,说明吡嗪环的氮原子参与了配位;芹菜素分子中 C—O—C 键的振动频率 1039 和 1104 cm^{-1} 基本保持不变,表明 C 环醚键没有开环;600 cm^{-1} 以下的低频指纹区可认为是 Cu-配位原子的弯曲振动和伸缩振动吸收。

2.1.3 X 射线衍射分析 图 3 为吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配合物的 X 射线粉末衍射图谱。由图 3 可看出,配合物特征衍射峰的位置 (2θ) 为:8.009 $^{\circ}$ 、18.967 $^{\circ}$ 、25.821 $^{\circ}$ 、27.739 $^{\circ}$ 和 43.999 $^{\circ}$ 。另外,配合物的衍射峰强度较弱,有宽化现象,说明配合物的粒径较小,导致衍射弥散。

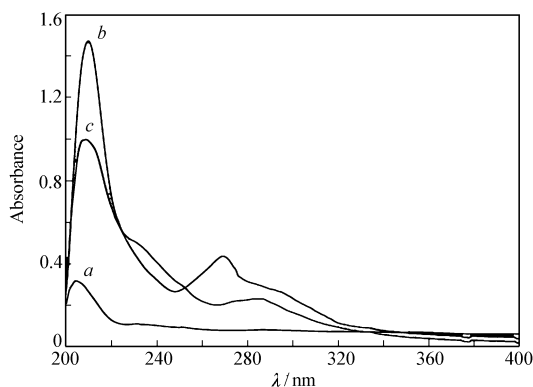


图 1 吡嗪二甲酰胺(a)、芹菜素(b)及配合物(c)的紫外光谱

Fig. 1 UV Spectra of pyrazinedimethylformamide (a), apigenin (b) and their Cu complex (c)

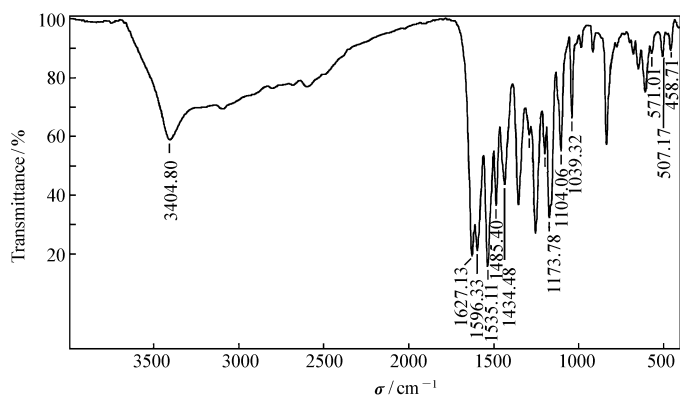


图 2 吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配合物的红外光谱

Fig. 2 IR Spectrum of pyrazinedimethyl form amide bridged apigenin Cu complex

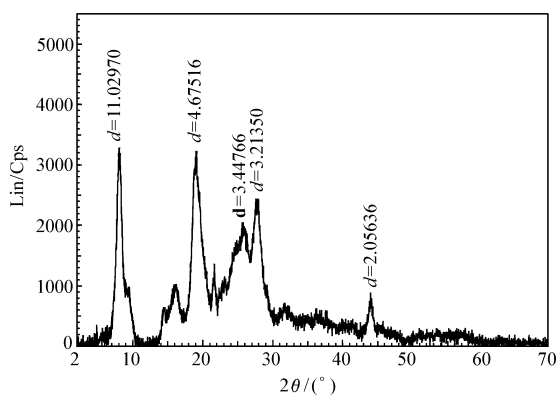


图 3 吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配合物的 X 射线粉末衍射图

Fig. 3 XRD pattern of pyrazinedimethylformamide bridged apigenin Cu complex

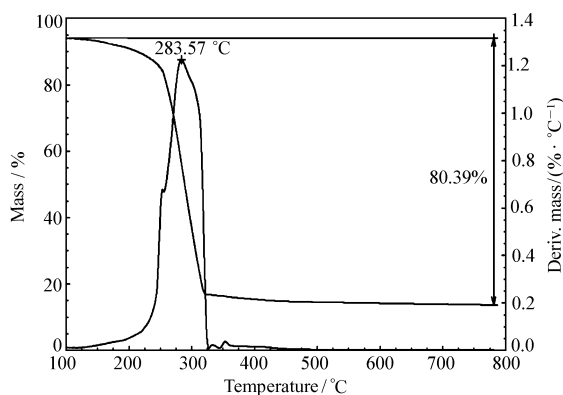
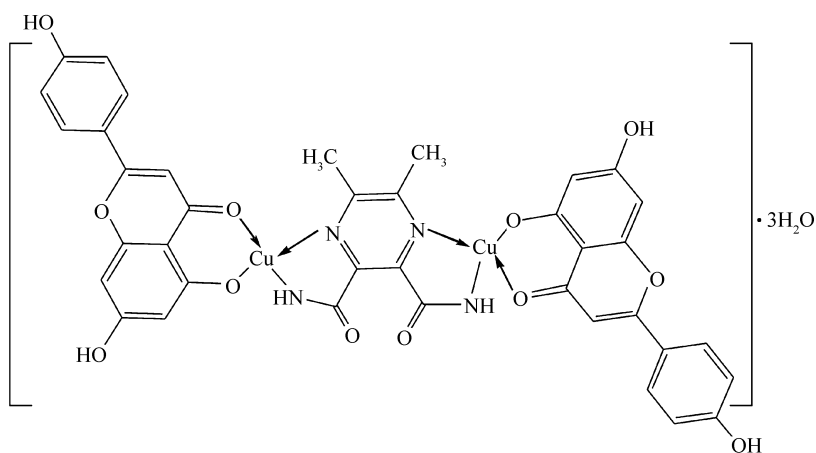


图 4 吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配合物的热重分析图

Fig. 4 DSC-TGA of pyrazinedimethylformamide bridged apigenin Cu complex

2.1.4 热重分析 吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配合物的热重分析如图 4 所示。由图 4 可以看出,配合物在 100 °C 以内之间出现第一失重阶段,失重率约为 5.2%,这可能为分子中的水。第二失重阶段在 200 ~ 320 °C 之间,此时配体迅速燃烧分解,芳环骨架断裂,失重率为 80.39%,与失去两个配体分子相当;最终分解产物是铜的氧化物,约为 17.5%。推测配合物的可能组成为 $[\text{Cu}_2(\text{C}_8\text{N}_4\text{H}_8\text{O}_2) \cdot 2(\text{C}_{15}\text{O}_5\text{H}_{10}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$,其可能结构如 Scheme 1 所示。

Scheme 1 Proposed structure of complex $[\text{Cu}_2(\text{C}_8\text{N}_4\text{H}_8\text{O}_2) \cdot 2(\text{C}_{15}\text{O}_5\text{H}_{10}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$

2.2 吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配合物的 DNA 切割活性研究

2.2.1 配合物浓度对切割活性的影响 用琼脂糖凝胶电泳实验研究了吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配

合物在 $\text{pH} = 7.4$, 温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的生理条件下, 对 pBR322 DNA 的切割活性, 实验结果如图 5 所示。由图 5 可见, 随着配合物浓度的增大, DNA 的切割活性增强。当不加配合物时, DNA 主要以超螺旋 I 型, 少量线性 III 型存在; 加入配合物后, 当浓度为 0.0592 g/L 时, 体系中 DNA 超螺旋 I 型比重减少、缺刻 II 型明显出现, 表明在低浓度时配合物就有显著切割活性; 随着配合物浓度的增大, 超螺旋 I 型含量逐渐减少, 而缺刻 II 型和线性 III 型所占比重逐渐增加, 当配合物浓度增大到 0.296 g/L 时, I 型 DNA 几乎全转化成为 II 型 DNA 和 III 型 DNA。以上结果表明, 吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配合物在较低的浓度下即表现出 DNA 的切割活性, 且随浓度的增加, 切割活性增强。

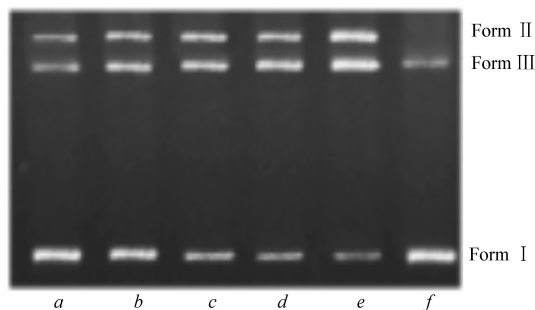


图 5 配合物浓度对切割活性的影响

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis patterns for the cleavage of pBR322 DNA by pyrazinedimethylformamide bridged apigenin Cu complex with different concentrations $\rho(\text{DNA}) = 0.151\text{ mg/L}$, $\rho(\text{Cu complex})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$: a. 0.0296; b. 0.0592; c. 0.0888; d. 0.1184; e. 0.148; f. 0

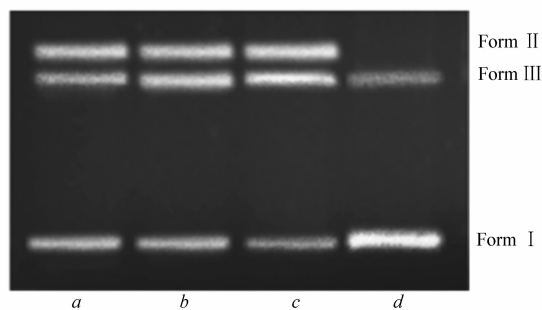


图 6 酶切时间对切割活性的影响

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis patterns for the cleavage of pBR322 DNA by pyrazinedimethylformamide bridged apigenin Cu complex for different times $\rho(\text{DNA}) = 0.151\text{ mg/L}$; $\rho(\text{Cu complex})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$: a ~ c. 0.0592; d. 0; Time/h: a. 2; b. 4; c. 6; d. 2

2.2.2 酶切时间对切割活性的影响 在 $\text{pH} = 7.4$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 配合物浓度为 0.0592 g/L 的条件下, 反应时间对 DNA 切割活性的影响, 实验结果如图 6 所示。由图 6 可知, 吡嗪二甲酰胺桥联芹菜素铜配合物的 DNA 切割效率随着时间的增大而增加(超螺旋 I 型逐渐减小, 而缺刻 II 型, 线性 III 型逐渐增多), 说明反应时间的延长有利于增强配合物切割 DNA 的活性。

2.2.3 加入 H_2O_2 对切割活性的影响 有报道^[4]在做 DNA 切割实验时加入了还原剂 H_2O_2 , 本文尝试在 $\text{pH} = 7.4$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及不同配合物浓度条件下, 加入 $2\text{ }\mu\text{L}$ H_2O_2 , 2 h 后观察电泳图, 发现无条带出现, 此时应是 pBR322 DNA 已经发生了降解所致。

3 结 论

本文以溶剂热法合成了以 5,6-二甲基-2,3-吡嗪二甲酰胺为桥联配体, 芹菜素为端基配体的铜配合物, 该配合物的可能组成为 $[\text{Cu}_2(\text{C}_8\text{N}_4\text{H}_8\text{O}_2) \cdot 2(\text{C}_{15}\text{O}_5\text{H}_{10}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$, 并经紫外光谱、红外光谱、热重分析及 X 射线粉末衍射等进行表征。由酶切法及琼脂糖凝胶电泳实验研究了该配合物对 pBR322 DNA 的切割活性。结果表明不加还原剂时, 该配合物即表现出核酸酶的特性, 对 DNA 有明显的切割作用; 并随着配合物浓度的增大或反应时间的延长, 对 DNA 的切割活性有所增强; 若加还原剂 H_2O_2 时, pBR322 DNA 很快发生降解, 配合物对 DNA 切割机理有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Jingjing, SHAO Ying, WEI Li, *et al.* Design of Artificial Nucleases and Studies of Their Interaction with DNA[J]. *Sci China (Ser B)*, 2009, **39**(3): 194-207 (in Chinese).
张晶晶, 邵莺, 韦丽, 等. 人工核酸酶的设计和与核酸的相互作用[J]. *中国科学(B辑)*, 2009, **39**(3): 194-207.
- [2] Zhao Y M, Zhu J H, He W J, *et al.* Oxidative DNA Cleavage Promoted by Multinuclear Copper Complexes: Activity Dependence on the Complex Structure[J]. *Chem Eur J*, 2006, **12**(25): 6621-6629.
- [3] BIAN Hedong, XU Jingyuan, GU Wen, *et al.* Synthesis, Crystal Structure and Properties of Oxanide Bridged Binuclear Copper(II) Complex[J]. *Acta Sci Nat Univ Nankai*, 2003, **36**(1): 80-83 (in Chinese).

- 边贺东,徐靖源,顾文,等. 草酰胺桥联的双核铜配合物的合成,晶体结构及 DNA 切割研究[J]. 南开大学学报(自然科学版),2003,**36**(1):80-83.
- [4] ZHANG Shouchun, SHAO Ying, TU Chao, *et al.* A Novel Dinuclear Copper Complex with Potent Nuclease Activity[J]. *Chinese J Inorg Chem*, 2004, **20**(10):1159-1164 (in Chinese).
张寿春,邵颖,涂超,等. 新型双核铜配合物的结构及 DNA 切割活性[J]. 无机化学学报,2004,**20**(10):1159-1164.
- [5] LU Jilin, LIU Xuewen, ZHANG Dashun, *et al.* DNA Cleavage of Copper(II) Macrocyclic Polyamine Complex[J]. *J Sichuan Norm Univ(Nat Sci)*, 2013, **36**(1):111-114 (in Chinese).
卢基林,刘学文,张大顺. 一种大环多胺铜配合物的 DNA 切割活性研究[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2013,**36**(1):111-114.
- [6] WEN Lijun, WANG Ying, LI Haixia, *et al.* Synthesis and Antibacterial Activity of 5,6-Dimethyl-2,3-Pyrazinedimethylformamide-Cu[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2016, **33**(9):1056-1060 (in Chinese).
文丽君,王英,李海霞,等. 5,6-二甲基-2,3-吡嗪二甲酰胺-铜配合物的合成及其抗菌活性[J]. 应用化学,2016,**33**(9):1056-1060.
- [7] WEN Lijun, WANG Ying, LI Haixia, *et al.* Synthesis and Antibacterial Activity of 5,6-Dimethyl-2,3-Pyrazinedimethylformamide-Co[J]. *J Hainan Norm Univ(Nat Sci)*, 2016, **29**(3):300-303 (in Chinese).
文丽君,王英,李海霞,等. 5,6-二甲基-2,3-吡嗪二甲酰胺-钴配合物的合成及其抗菌活性研究[J]. 海南师范大学学报(自然科学版),2016,**29**(3):300-303.
- [8] WEN Lijun, WANG Ying, LI Haixia, *et al.* Study on Synthesis and Antibacterial Activity of 5,6-Dimethyl-2,3-Pyrazinedimethylformamide-Ni[J]. *Guangdong Chem Ind*, 2015, **42**(20):53-54 (in Chinese).
文丽君,王英,李海霞,等. 5,6-二甲基-2,3-吡嗪二甲酰胺-镍配合物的制备及其抗菌活性研究[J]. 广东化工, 2015,**42**(20):53-54.
- [9] ZHU Jinchan. Investigation on Synthesis, Characterization and Biological Activity of 3 Kinds Flavonoid-Cu Complexes [D]. Guilin:Guangxi Normal University, 2008 (in Chinese).
朱金蝉. 3种黄酮铜配合物的合成及其生物活性研究[D]. 桂林:广西师范大学,2008.

Synthesis and DNA Cleavage Activity of Pyrazinedimethylformamide Bridged Apigenin Copper(II) Complex

HE Daqing^a, JIANG Shangfei^b, CHEN Yu^a, WEN Lijun^{a*}, TANG Yidi^a, LI Xinyu^a
(^aCollege of Pharmacy; ^bInstitute of Basic Medicine and Life Science,
Hainan Medical College, Haikou 571199, China)

Abstract Pyrazinedimethylformamide bridged apigenin copper(II) complex was prepared by solvothermal method with 5,6-dimethyl-2,3-pyrazinedimethylformamide and apigenin as mixed ligands and copper(II) acetate. The complex was characterized by ultra-violet and infrared spectroscopies, and thermogravimetric analysis. The DNA cleavage behavior of pyrazinedimethylformamide bridged apigenin copper(II) complex has been investigated by agarose gel electrophoresis. The results suggest that the complex can promote the cleavage of pBR322 DNA in the absence of any reducing reagent.

Keywords pyrazinedimethylformamide; apigenin; complex; synthesis; DNA cleavage activity

Received 2017-04-21; Revised 2017-06-05; Accepted 2017-07-03

Supported by Natural Science Foundation of Hainan Province(No.20152040), the National Training Project of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduate(No.201511810009), the Hainan Medical College's Training Project of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduate(No. HYCX2014015)

Corresponding author: WEN Lijun, associate professor; Tel:0898-66893781; E-mail:wenlijun3467@163.com; Research interests: complexes drug synthesis and biological activity