以钽的分子氢配合物作 ^1H NMR 探针研究抗癌金属化合物与脱氧鸟苷酸的配位作用*

杨 频 郭茂林 李青山 田燕妮

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

Li Zaiwei Henry Taube

(Department of Chemistry, Stanford University, Stanford, CA94305, USA)

摘要 钽的分子氢配合物 $[\text{trans-}\eta_2\text{Os}(\eta\text{-H}_2)]^{2+}$ (η , 乙二胺) 是一种新的生物分子 ^1H NMR 识别探针. 本文首次以该探针研究了抗癌金属化合物二氯二茂钽、二氯二乙基锡、二乙基邻菲咯啉二氯合锡及顺铂与脱氧鸟苷酸 (dGMP) 在接近生理条件下重水溶液中的配位作用. 结果表明, 前三者主要与 dGMP 的磷酸氧发生强的配位作用, 而顺铂主要与 dGMP 的碱基 N(7) 发生配位作用.

关键词 钽分子氢配合物 ^1H NMR 探针 抗癌金属化合物 脱氧鸟苷酸

钽的分子氢配合物 $[\text{trans-}\eta_2\text{Os}(\eta\text{-H}_2)]^{2+}$ (η 为乙二胺, 见图 1) 是一种新的 ^1H NMR 识别探针, 在特异性识别生物小分子及生物大分子如核苷酸、RNA、氨基酸、多肽、磷酸酯等方面已显示出其优越性及应用前景^[1]. 其特点为 $[\text{trans-}\eta_2\text{Os}(\eta\text{-H}_2)\text{L}]$ 的第六配体 L 为一可置换配体, 可被各种生物分子取代而使 Os 与生物分子的 O, N, S 等位点发生直接的配位作用, 每种配位形式 (不同生物配体配位或同一配体的不同配位点) 都会使 $[\text{trans-}\eta_2\text{Os}(\eta\text{-H}_2)\text{L}]$ 的分子氢配体产生特征的 ^1H NMR 化学位移, 且信号出现在远离一般 ^1H NMR 信号的 $\delta = 0 \sim -20$ 范围内而较易分辨, 因而 $[\text{trans-}\eta_2\text{Os}(\eta\text{-H}_2)]^{2+}$ 是一种有效的生物分子识别探针, 但其应用研究还没有广泛开展起来. 本文首次研究了该探针在探测抗癌金属化合物与核苷酸在水溶液中配位作用方面的应用.

大多数抗癌金属化合物是通过作用于 DNA 而发挥其抗癌作用的. 因而它们与 DNA 的基本结构单元——脱氧单核苷酸, 特别是与脱氧鸟苷酸的配位作用研究是阐明其与 DNA 作用方式的重要步骤. 顺铂、二氯二茂钽、有机锡配合物是三类最重要且最具代表性的抗癌金属化合物. 顺铂主要通过铂与脱氧鸟苷酸的 N(7) 配位而造成 DNA 交联发挥其抗癌作用^[2, 3]. 据推测二氯二茂钽^[4]、有机锡^[5] 配合物也是通过作用于 DNA 而发挥其抗癌作用. 但由于二氯二茂钽及有机锡配合物在水溶液中很不稳定, 因而在水溶液中它们与核苷酸的配位方式仍是未知的^[6, 7]. 本文以 $[\text{trans-}\eta_2\text{Os}(\eta\text{-H}_2)]^{2+}$ 为 ^1H NMR 探针研究了上述 3 类化合物与脱氧鸟苷酸

(dGMP) 在水溶液中的配位作用, 以期为二氯二茂钛、有机锡与单核苷酸的作用方式提供证据。

1 基本原理

探针 $[\text{trans-}\epsilon\text{-n}_2\text{Os}(\eta\text{-H}_2)]^{2+}$ 与 dGMP 的配位作用文献[1]已详细研究。探针可与 dGMP 的磷酸氧及碱基 N(7) 发生配位作用, 前者是动力学优先反应, 在两者混合 10 min 即完成, 其结合常数为 3×10^2 , 在 $\delta = -13.57$ 出现特征峰; 与 N(7) 配位是热力学优先反应, 两者混合 24 h 后探针全部与 N(7) 配位, 结合常数为 2.9×10^3 , 在 $\delta = -9.72$ 出现特征峰。其反应如方程式(1):

假设抗癌金属化合物 D 可与 dGMP 发生类似反应:

若将抗癌金属化合物加入探针与 dGMP 混合液, 则药物可与探针竞争 dGMP 的配位位点(磷酸氧位点或碱基(N7)位点)。若药物与 dGMP 的磷酸氧配位则会使 $[\text{trans-}\epsilon\text{-n}_2\text{Os}(\eta\text{-H}_2)\text{-dGMP(O)}]$ 分解而表现为 $\delta = -13.57$ 的 ^1H NMR 峰降低或消失; 若药物与 dGMP 的碱基 N(7) 配位, 则会使 $[\text{trans-}\epsilon\text{-n}_2\text{Os}(\eta\text{-H}_2)\text{-dGMP(N}_7)]$ 分解, 表现为 $\delta = -9.72$ ^1H NMR 峰降低或消失。因此根据此两峰的变化情况即可判断药物在 dGMP 上的结合位点。

2 材料与方法

探针 $[\text{trans-}\epsilon\text{-n}_2\text{Os}(\eta\text{-H}_2)][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ 按文献[8]方法合成, 二氯二茂钛(Cp_2TiCl_2 , TDC)、二乙基邻菲咯啉二氯合锡 $[\text{Et}_2\text{SnCl}_2(\text{phen})]$ 、二氯二乙基锡 $(\text{Et}_2\text{SnCl}_2)$ 分别按文献[9~11]方法合成并鉴定, 顺式二氯二氨合铂 $[\text{cis-}(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}_2]$ 为山东齐鲁制药厂产品, 2'-脱氧核苷-5'-单磷酸二钠盐(dGMPNa₂)为 Sigma 公司产品, 其余试剂为分析纯。

在严格除氧充氮条件下测定 dGMP、探针及药物按 1:1:1 混合(浓度均为 0.01 mol/L, pD=7.0)作用一定时间的 ^1H NMR 谱。NMR 谱用 Bruke AM-500 MHz 超导核磁共振仪测定, D₂O 作溶剂、DSS 为内标。

3 结果与讨论

3.1 探针与 dGMP 的配位作用

两者作用情况与文献[1]研究结果基本一致, 作用 10 min 时, 探针主要与 dGMP 的磷酸氧配位, 其特征峰为 $\delta = -13.56$ 及 -13.57 双重峰, 同时少量探针与 dGMP 的 N(7) 及溶剂 D₂O 也有配位, 表现为特征峰 $\delta = -9.72$ 及 $\delta = -13.18$ 的小峰。24 h 后, 探针已完全与 dGMP 的 N(7) 配位, 在 0~-20 范围内表现为 $\delta = -9.72$ 的特征峰及 $\delta = -7.74$ 的小峰, 后者是少量探针与 dGMP 配位的反式构型转化为顺式构型的结果, 见图 1。

图 1 探针 $[\text{trans-}\epsilon\text{-n}_2\text{Os}(\eta\text{-H}_2)\text{L}]$ 的结构

3.2 以探针研究二氯二茂钛(TDC)与 dGMP 的配位作用

由图 2 可见,三者反应 10 min 时,探针与 dGMP 磷酸氧配位的峰($\delta = -13.57$)已完全消失,探针与 dGMP 的 N(7) 配位及与 D_2O 配位的峰基本不变,且在 $\delta = -13.16$ 处出现一探针与 Cl^- 配位的新峰¹⁾, 24 h 后的 1H NMR 峰基本与 10 min 时相同. 上述结果表明,探针已不能与 dGMP 的磷酸氧配位,这必然是 TDC 中钛与 dGMP 配位而占据了其磷酸氧位点的结果. 探针与 dGMP 的 N(7) 配位的 1H NMR 峰未受影响,表明 dGMP 的 N(7) 位点仍与探针配位, TDC 未与 dGMP 的 N(7) 配位. $\delta = -13.16$ 处探针与 Cl^- 配位峰的出现,是由于 TDC 的氯解离下来与探针配位的结果.

图 2 探针、TDC 与 dGMP 作用的 1H NMR 谱

(a) 10 min, (b) 24 h

3.3 以探针研究 $Et_2SnCl_2(phen)$ 与 dGMP 的配位作用

由图 3 可见,三者刚反应 10 min 时, -13.56 处因锇与 dGMP 的磷酸氧结合所产生的 1H NMR 峰强度相对于单独探针与 dGMP 作用时的峰强度已明显减弱,反应 6 h 后,此峰已完全消失. 并且刚反应 10 min 时,又产生了一个位移 -13.15 的新峰. 这是因为在混合体系中, $Et_2SnCl_2(phen)$ 和探针之间存在着与 dGMP 的配位竞争. 由于 $Sn(IV)$ 为硬 Lewis 酸,而 $Os(II)$ 则为软 Lewis 酸,因而在 $Et_2SnCl_2(phen)$ 与探针竞争磷酸根时,磷酸根氧原子与 $Sn(IV)$ 键合能力强而优先与 $Sn(IV)$ 键合,而探针中 $Os(II)$ 不再与磷酸氧原子配位,导致了 -13.56 处峰在反应 6 h 后消失. 至于 -13.15 处新峰的出现则是氯原子与探针中 $Os(II)$ 配位的结果,证明在反应过程中 $Et_2SnCl_2(phen)$ 中氯原子已被取代离去. 与单独探针与 dGMP 作用比较,混合体中 $\delta = -9.67$ 处这一因探针与 dGMP 碱基 N(7) 结合而产生的 1H NMR 峰,在整个反应过程中未受到明显影响,另外反应 24 h 后在 $\delta = -7.85$ 处的峰是 $Os(II)$ 与碱基 N(7) 配位所产生的顺式异构体^[1],表明探针与碱基 N(7) 的配位未受到 $Et_2SnCl_2(phen)$ 的影响. 上述结果表明, $Et_2SnCl_2(phen)$ 与 dGMP 作用时,其氯原子离去, $Sn(IV)$ 结合到 dGMP 的磷酸氧原子上,难以与碱基 N(7) 配位.

3.4 以探针研究 Et_2SnCl_2 与 dGMP 的配位作用

由图 4 可见,在反应 10 min 时,混合体系中 -13.56 处 1H NMR 峰就已完全消失. 表明 Et_2SnCl_2 与 dGMP 作用时,锡已与磷酸根氧原子配位,而探针与磷酸氧的配位已解离. 与 $Et_2SnCl_2(phen)$ 和 dGMP 反应体系类似. 在反应 10 min 时,在 -13.17 处也出现了氯与探针配

1) Li Zaiwei. Ph D Thesis, Stanford University, 1993

图3 探针、 $\text{Et}_2\text{SnCl}_2(\text{phen})$ 与dGMP作用的 ^1H NMR谱

(a) 10 min, (b) 6 h, (c) 24 h

位的特征峰,表明 Et_2SnCl_2 在与dGMP作用时,氯原子已解离下来。此外,在整个反应过程中 $\delta = -9.68$ 处的探针与dGMP的N(7)配位特征峰未受到 Et_2SnCl_2 的影响,表明锡没有与碱基N(7)发生配位。

3.5 以探针研究顺铂(*cis*-DDP)与dGMP的配位作用

顺铂与GMP或dGMP在水溶液中的配位情况被广泛研究^[12, 13],结果表明铂主要与鸟嘌呤的N(7)配位。本实验的目的主要在于检验本文方法的可靠性。图5为顺铂、探针和dGMP三者反应10 min及24 h后的 ^1H NMR谱。可见反应10 min时,dGMP磷酸氧与探针配位的峰($\delta = -13.57$)及 D_2O 与探针配位峰($\delta = -13.18$)未受影响,而探针与碱基N(7)配位的特征峰($\delta = -9.74$)比起单独dGMP与探针作用时的峰已明显减弱(图中虽有一小峰,但其强度太小,仪器已不能给出其积分面积),表明顺铂不与探针竞争磷酸氧位点,而是竞争N(7)位点,24 h后,N(7)配位的峰仍很小,且探针与dGMP N(7)配位顺式构型特征峰($\delta = -7.75$)也未出现,表明顺铂抑制了探针与dGMP N(7)的配位。以上结果表明,顺铂与dGMP的N(7)发生了配位,而与磷酸氧未发生配位作用,与文献[12, 13]结果一致,证明了本文用 $[\text{trans-en}_2\text{Os}(\eta\text{-H}_2)]^{2+}$ 作 ^1H NMR探针研究抗癌金属化合物与dGMP配位作用方法的可靠性。

比较本文研究的4种抗癌金属化合物,二氯二茂钛、二氯二乙基锡、二乙基邻菲咯啉二氯

图 4 探针、 Et_2SnCl_2 与 dGMP 作用的 ^1H NMR 谱

(a) 10 min, (b) 6 h, (c) 24 h

图 5 探针、顺铂与 dGMP 作用的 ^1H NMR 谱

(a) 10 min, (b) 24 h

合锡及顺铂与 dGMP 作用的结果可以发现,前三者作用情况类似,都是通过配位氯原子的离去,金属离子与 dGMP 的磷酸氧原子发生配位作用,而顺铂则是配位氯原子离去后铂与鸟嘌呤的 N(7) 发生配位作用.前三者中 Ti, Sn 皆为 +4 氧化态,为典型的硬 Lewis 酸,因而表现

出易与硬碱磷酸氧键合, 其中二氯二茂钽和二氯二乙基锡与 dGMP 磷酸氧的反应很迅速, 10 min 即使探针与 dGMP 磷酸氧配位的特征峰 $\delta = -13.57$ 消失, 即配位作用在 10 min 已完成, 而 $\text{Et}_2\text{SnCl}_2(\text{phen})$ 与 dGMP 的反应则慢得多, 6 h 才完成. 原因之一可能是双氮配体邻菲咯啉与 Et_2SnCl_2 配位后, 因其给电子效应使 $\text{Et}_2\text{SnCl}_2(\text{phen})$ 中锡的 Lewis 酸性变软, 降低了它与探针中钽竞争硬碱磷酸氧的能力. 另一个原因可能是 $\text{Et}_2\text{SnCl}_2(\text{phen})$ 的配位氯原子在水中解离较慢且 $\text{Et}_2\text{SnCl}_2(\text{phen})$ 有较大的空间位阻所致. 顺铂中 Pt 为 +2 氧化态, 为典型的软 Lewis 酸, 故易与软碱 N(7) 配位, 因而能与探针竞争 N(7) 位点, 使探针与 N(7) 的结合减少, 而对探针与磷酸氧的结合影响不大.

本文结果表明, 用分子氢配合物 $[\text{trans-}\eta_2\text{Os}(\eta\text{-H}_2)]^{2+}$ 作 ^1H NMR 识别探针研究抗癌金属化合物与核苷酸的键合方式是可行的. 因其与 dGMP 磷酸氧的键合常数为 3×10^2 , 与碱基 N(7) 的键合常数为 2.9×10^3 , 具有适中的稳定性, 且前者是动力学优先反应, 两者与探针配位后分子氢配体的特征峰相距很远很容易分辨, 且探针水溶性很好, 这些特点为 $[\text{trans-}\eta_2\text{Os}(\eta\text{-H}_2)]^{2+}$ 作为水相 ^1H NMR 识别探针提供了诸多便利条件. 该探针可用于探测金属离子是否结合在磷酸氧上; 对于碱基杂环氮, 由于它与 Os(II) 亲和较强, 凡不能取代之的较硬金属离子, 都不能用此探针试剂检测, 除非加大被测物的浓度. 在检测水溶液中金属离子或药物与核苷酸磷酸氧的配位作用方面, 目前尚无很好的方法. ^{31}P NMR 谱虽然提供了一种手段, 但某些金属与磷酸氧的配位引起的 ^{31}P NMR 化学位移很小, 甚至小于 1, 无法判断是由于核苷酸构象变化或氢键作用所致还是金属配位所致, 因而 ^{31}P NMR 谱有其局限性^[14, 15], 用本探针可很容易地作出金属与磷酸氧是否发生配位的判断.

由于二氯二茂钽、有机锡抗癌配合物在水溶液中的高度不稳定性, 其在水溶液中与核苷酸的配位情况至今仍不清楚. 本文首次提供了上述配合物在水溶液中与核苷酸配位的证据. 结果表明, 与顺铂不同, 钽、锡主要与核苷酸的磷酸氧发生稳定的、强的配位作用, 而与碱基 N(7) 难以发生配位作用. 但本文结果不能排除钽、锡与碱基 N(7) 发生弱的配位作用的可能性. 其与磷酸氧发生强的配位作用是否为其具有抗癌活性的主要原因尚需进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Li Z W, Taube H. Use of a dihydrogen osmium complex as a versatile ^1H NMR recognition probe. *Science*, 1992, 256: 210~213
- 2 Sundquist W I, Lippard S J. The coordination chemistry of platinum anticancer drugs and related compounds with DNA. *Coord Chem Rev*, 1990, 100: 293~322
- 3 Umapathy P. The chemical and biochemical consequences of the binding of the antitumor drug cisplatin and other platinum group metal complexes to DNA. *Coord Chem Rev*, 1989, 95: 129~181
- 4 Koepf-Maier P, Koepf H. Non-platinum-group metal antitumor agents: history, current status and perspectives. *Chem Rev*, 1987, 87: 1137~1152
- 5 Saxena A K. Organotin compounds and cancer chemotherapy. *Coord Chem Rev*, 1989, 95: 109~123
- 6 Toney J H, Marks T J. Hydrolysis chemistry of the metallocene dichlorides $\text{M}(\eta\text{-C}_3\text{H}_5)_2\text{Cl}_2$, $\text{M}=\text{Ti}, \text{V}, \text{Zr}$. Aqueous kinetics, equilibria, and mechanistic implications for a new class of antitumor agents. *J Am Chem Soc*, 1985, 107: 947~953
- 7 Kuo L Y, Kanatzidis M G, Sabat M *et al.* Metallocene antitumor agents. Solution and solid-state molybdenocene coordination chemistry of DNA constituents. *J Am Chem Soc*, 1991, 113: 9020~9045

- 8 Li Z W, Taube H. Modulation of physical and chemical properties of $\eta\text{-H}_2$ complexes of osmium ammines by facile substitution. *J Am Chem Soc*, 113: 8 946 ~ 8 947
- 9 Wilkinson G, Birmingham J M. Bis-cyclopentadienyl compounds of Ti, Zr, V, Nb and Ta. *J Am Chem Soc*, 1954, 76: 4 281 ~ 4 284
- 10 Crowe A J, Smith P J. The synthesis and tin-119 m Mössbauer spectra of some diorganotin dihalide and dipseudohalide complexes with nitrogen- and oxygen-donor ligands. *J Organomet Chem*, 1982, 224: 223 ~ 235
- 11 Crowe A J, Smith P J, Atassi G. Investigation into the antitumor activity of organotin compounds, I Diorganotin dihalide and dipseudohalide complexes. *Chem-Bio Interact*, 1980, 32: 171 ~ 182
- 12 Inagaki K, Dijt F J, Lempers E L M *et al.* Bulky ligand subsituent effect on the reaction of 5'-GMP with Pt(1, 3-diamine). Rotation of 5'-GMP about the Pt-N bond and kinetic effects. *Inorg Chem*, 1988, 27: 382 ~ 387
- 13 Okamoto K, Behnam V, Phanviet M T *et al.* FT-IR and ^1H NMR spectroscopic studies of C2'-endo, C3'-endo sugar ring conformations in 5'-GMP and 3'-GMP nucleotides and their platinum complexes. *Inorg Chim Acta*, 1986, 123: L3 ~ L5
- 14 Marzilli L G, Reily M D, Heyl R B *et al.* Evidence for similar structural changes on binding of platinum anti-tumor agents to DNA and nucleosomes. *FEBS*, 1984, 176: 389 ~ 392
- 15 Toney J H, Brock C P, Marks T J. Aqueous coordination chemistry of vanadocene dichloride, $\text{V}(\eta\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2$, with nucleotides and phosphoesters. Mechanistic implication for a new class of antitumor agents. *J Am Chem Soc*, 1986, 108: 7 263 ~ 7 274