

新型双萘酰亚胺类化合物与 DNA 作用研究

金礼吉*, 王利平, 邹 薇, 肖 义

(大连理工大学 化工与环境生命学部, 辽宁 大连 116024)

摘要: 运用紫外吸收光谱、荧光光谱和圆二色光谱等技术方法,研究了5种不同长短烷基异硫脲阳离子作为连接臂的新型双萘酰亚胺类化合物(DN2~DN6)与DNA的作用。紫外吸收光谱结果表明,该类化合物能使DNA发生明显的减色效应并伴有微弱的红移现象,其减色效应随化合物烷基链的延长而增强;化合物的荧光可被DNA强烈猝灭,室温下DN3~DN6与DNA的结合常数随烷基链的延长而增大,分别为 1.18×10^5 、 1.36×10^5 、 1.67×10^5 、 2.32×10^5 L/mol;化合物能够将嵌入在DNA中的吡啶橙游离出来,烷基链越长的化合物该作用力也越强;圆二色光谱表明,DNA的双螺旋结构发生了碱基堆积和局部解旋,碱基堆积程度与化合物烷基链的长度成正相关。实验结果表明,DN2~DN6均以嵌入方式与DNA发生作用,其作用强度顺序为DN6>DN5>DN4>DN3>DN2。

关键词: 双萘酰亚胺;嵌入剂;荧光光谱;圆二色光谱

中图分类号: O657.3 **文献标志码:** A

0 引言

1973年,Brana等首次合成了一系列3-硝基单萘酰亚胺类衍生物,这类化合物被证明能有效地嵌入DNA^[1]。在单萘酰亚胺类衍生物中,已经进入临床实验的药物有米托萘胺(Mitonafile)^[2]和氨萘非特(Amonafide)^[3],它们均能嵌入DNA,影响DNA和RNA的功能。20世纪80年代,人们将2个萘环用一个“手臂”连接起来,得到了具有更高细胞毒性和更强DNA结合力的双萘酰亚胺^[4],连接基上的氨基氮原子质子化形成的正离子有利于发生静电作用,从而提高嵌入剂分子与DNA的亲合力,适当的柔性和长度又可确保二者形成稳定的复合物。目前处于临床研究的双萘酰亚胺类化合物主要有依利萘法德(Elinafide)^[5]和Du Pont Merck开发的双萘法德(Bisnafide)^[6]。研究发现,连接基的长度、对称性及其电负性影响双萘酰亚胺类化合物与DNA的结合力。有关双萘酰亚胺连接基种类的研究已成为关注热点^[7-9],但连接基的长度与化合物活性之间的关系尚无系统、深入的研究。本实验通过考察不同长度的烷基异

硫脲阳离子作为连接臂的一系列新型双萘酰亚胺类化合物与DNA的相互作用,分析连接基的长短对双萘酰亚胺类化合物嵌入能力的影响,以期研究DNA与萘酰亚胺嵌入单元和连接基之间的特异性结合提供实验和理论依据,同时也为其他各类化合物的连接基的分子设计奠定基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

TU-1900双光束型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);日立F-4500荧光分光光度计(日本Hitachi公司);J-810型圆二色光谱仪(日本Jasco公司)。

小牛胸腺DNA为Sigma公司产品,UV测得 $A_{260}/A_{280} > 1.8$,表明纯度符合要求,称取一定量配成溶液,测得浓度为 6.67×10^{-4} mol/L,4℃保存;吡啶橙(AO)配制为1 mol/L母液保存;Tris-HCl缓冲溶液(0.02 mol/L,pH7.2)为临时配制;实验用水采用二次蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

本实验中的新型双萘酰亚胺类化合物(DN2

收稿日期: 2011-09-13; 修回日期: 2012-12-20。

基金项目: 大连理工大学理学学科基金资助项目(SFDUT07007)。

作者简介: 金礼吉*(1963-),男,博士,副教授,E-mail:jnlij@dlut.edu.cn。

~DN6)是由大连理工大学化工学院肖义合成的, 并已取得专利^[10], 合成路线如图 1 所示($n=2\sim 6$).

合成的化合物命名为 DN2: N, N'-双(2, 2'-乙基双萘酰亚胺)-S-甲基-异硫脲; DN3: N, N'-双

(3, 3'-丙基双萘酰亚胺)-S-甲基-异硫脲; DN4: N, N'-双(4, 4'-丁基双萘酰亚胺)-S-甲基-异硫脲; DN5: N, N'-双(5, 5'-戊基双萘酰亚胺)-S-甲基-异硫脲; DN6: N, N'-双(6, 6'-己基双萘酰亚胺)-S-甲基-异硫脲.

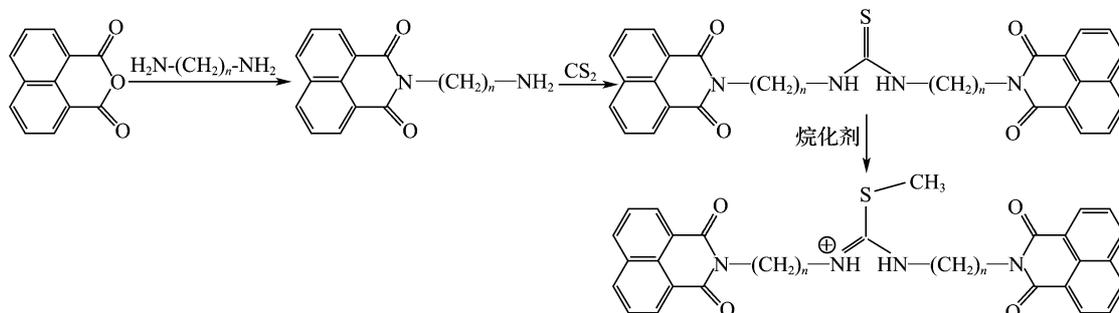


图 1 新型双萘酰亚胺类化合物的合成路线

Fig. 1 The synthesis route for the novel bis-naphthalimide derivatives

1.2 实验方法

1.2.1 紫外吸收光谱 在一系列 10 mL 比色管中分别加入终浓度为 $10\ \mu\text{mol/L}$ 的 DN2~DN6, 再加入不同体积的 DNA 溶液, 用 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至刻度后摇匀, 室温放置 15 min 后, 以相应的 Tris-HCl 缓冲溶液为参比, 扫描 300~400 nm 的紫外吸收光谱.

1.2.2 荧光光谱

(1) DNA 对化合物荧光光谱的影响

在一系列 10 mL 比色管中分别加入终浓度为 $10\ \mu\text{mol/L}$ 的 DN2~DN6, 再加入不同体积的 DNA 溶液, 用 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至刻度后摇匀, 室温放置 15 min 后, 以 344 nm 为激发波长, 扫描 320~650 nm 的荧光光谱, 激发与发射狭缝均为 5 nm, 扫描速度为 2 400 nm/min.

(2) 化合物和 AO 对 DNA 的竞争结合实验

在一系列 10 mL 比色管中依次加入相同体积的 AO 溶液、DNA 溶液, 用 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至刻度后摇匀, 室温放置 15 min 后, 再于上述比色管中分别加入一定体积的 DN2~DN6, 每次加入溶液后摇匀并放置 15 min, 以 502 nm 为激发波长, 扫描 450~750 nm 的荧光光谱.

1.2.3 圆二色光谱 在一系列 10 mL 比色管中加入相同体积的 DNA 溶液, 再分别加入一定体积的 DN2~DN6, 使化合物与 DNA 的物质的量比分别为 0.02、0.04、0.10、0.20、0.50 和 1.00, 用 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至刻度后摇匀并放置 15 min, 于圆二色光谱仪上扫描 220~350 nm 的摩尔椭圆度 θ .

2 结果与讨论

2.1 DNA 对化合物紫外吸收光谱的影响

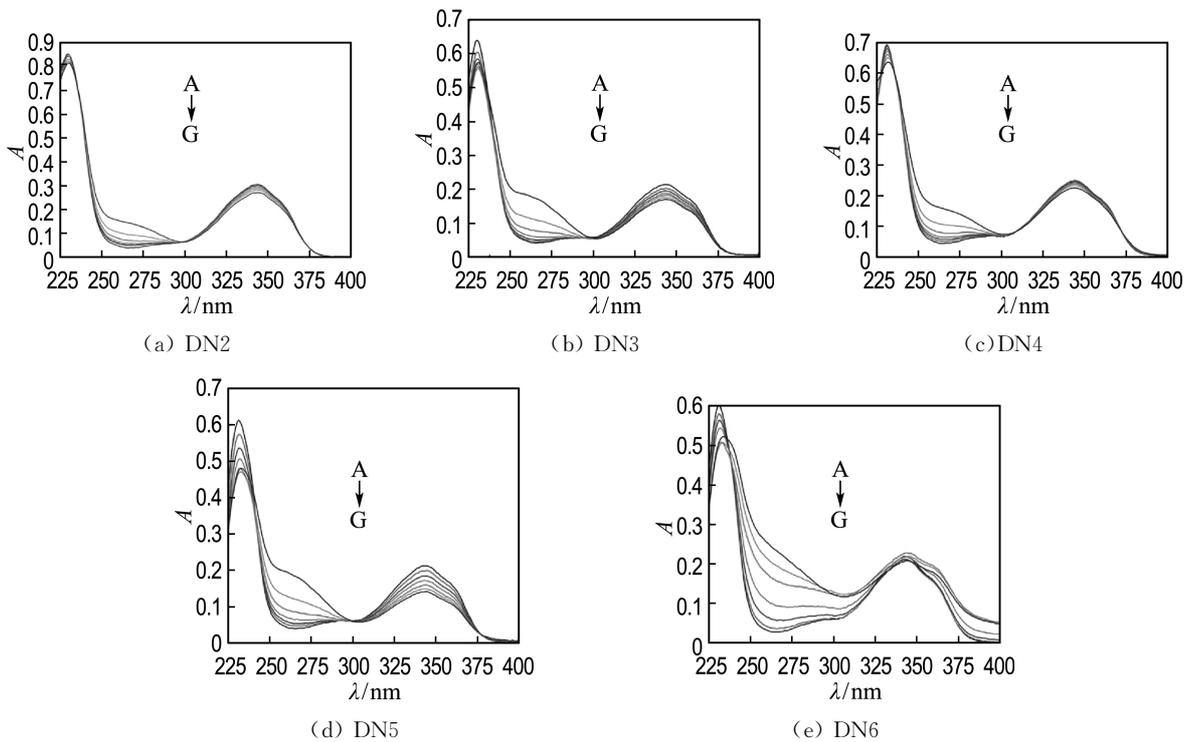
化合物 DN2~DN6 在 231 和 343 nm 处有特征吸收峰(见图 2), 随着 DNA 的加入, 化合物的吸收峰在 231 nm 处均出现明显的减色效应, 根据减色率计算公式: 减色率 = $(A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%$, 其中 A_0 为未加 DNA 时化合物的吸光度(各化合物初始浓度相同), A_1 为加 DNA 后化合物吸光度(各化合物中 DNA 浓度保持一致), 当 DNA 浓度为 $2.00\ \mu\text{mol/L}$ 时, DN2~DN6 的减色率分别为 6.1%、16.3%、15.8%、21.7% 和 25.2%, 且均伴有微弱的红移现象, 化合物 DN6 的减色效应最为显著, 说明烷基链的长短起到了重要作用. 化合物分子中的芳环平面插入到 DNA 碱基对之间^[11], 化合物的 π 轨道与碱基的 π 轨道发生耦合, 使部分电子填充进来, 导致 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁几率减小, 从而产生减色效应^[12]; 化合物的烷基链越长, 异硫脲基团对其电子云的吸引力就越强, 芳环共轭体系的电子云密度就越低, 有助于化合物的芳环与 DNA 碱基平面之间发生堆积作用^[13], 因此在总体变化趋势上, 化合物的减色效应随其烷基链的延长而增强.

2.2 DNA 对化合物荧光光谱的影响

由荧光光谱结果可见, 5 种化合物均具有较强的内源性荧光, 其中 DN2 在 400 nm 处有较强特征发射峰, 而其他 4 种化合物在 495 nm 处有较强特征发射峰(见图 3), 这种差异性可能是由异硫脲基团的电荷分布所致. 随着 DNA 的加入, 各

化合物的荧光光谱均呈现有规律的猝灭，这是由于化合物嵌入 DNA 碱基对产生电荷转移，进而改变自身激发态的电子态，导致荧光强度降

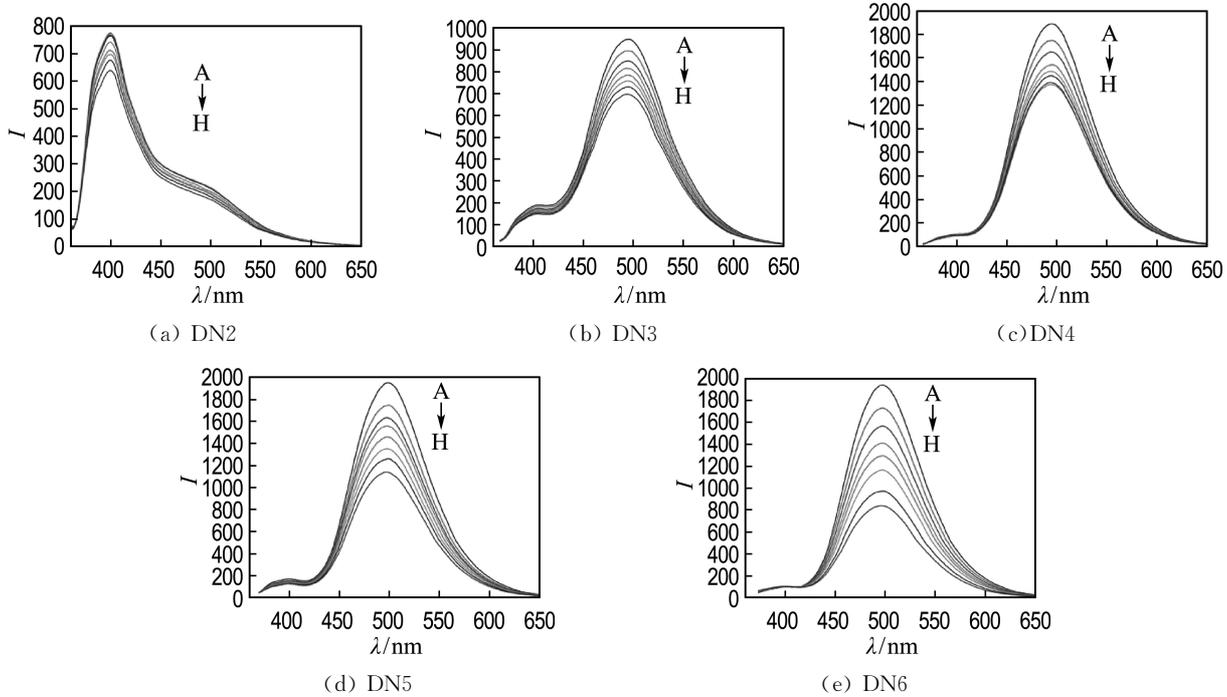
低^[14]。经比较分析发现，DNA 对化合物的猝灭作用随烷基链的延长而增强，这与紫外吸收光谱实验结果相一致。



$c(\text{DN2} \sim \text{DN6}) = 10 \mu\text{mol/L}$; $A \sim G$ $c(\text{DNA})$: 0, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00 $\mu\text{mol/L}$

图 2 DNA 对 DN2~DN6 的紫外吸收光谱 (pH=7.2)

Fig. 2 The UV absorption spectra of the DNA to DN2-DN6 (pH = 7.2)



$c(\text{DN2} \sim \text{DN6}) = 10 \mu\text{mol/L}$; $A \sim H$ $c(\text{DNA})$: 0, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.38, 2.76, 5.52 $\mu\text{mol/L}$

图 3 DNA 存在下 DN2~DN6 的荧光光谱

Fig. 3 The fluorescence spectra of DN2-DN6 in the presence of DNA

2.3 DNA 对化合物荧光的猝灭方式

荧光猝灭分为动态猝灭和静态猝灭两类,根据经典的荧光猝灭理论,如果猝灭是单一的静态或动态过程,以 F_0/F 对 $c(\text{DNA})$ 作图将得到一条直线,若非直线,则为混合猝灭方式^[15].如图 4 所示,本实验结果均符合直线关系,说明反应体系中只存在一种荧光体,即猝灭剂 DNA 和荧光体双萘酰亚胺类化合物之间形成了不发荧光的基态络合物,据此推断两者的猝灭方式不是动态猝灭,而是形成化合物-DNA 复合物的静态猝灭.根据 Stern-Volmer 方程^[15-16]

$$F_0/F = 1 + K_{sv} c(Q)$$

计算得猝灭常数 $K_{sv}(\text{DN3-DNA}) = 0.46 \times 10^5 \text{ L/mol}$, $K_{sv}(\text{DN4-DNA}) = 0.42 \times 10^5 \text{ L/mol}$, $K_{sv}(\text{DN5-DNA}) = 1.00 \times 10^5 \text{ L/mol}$, $K_{sv}(\text{DN6-DNA}) = 2.05 \times 10^5 \text{ L/mol}$,其中 $c(Q)$ 为猝灭剂 DNA 的浓度. DN2 的特征发射波长与其他 4 种化合物不一致,因此未对其进行相关计算.

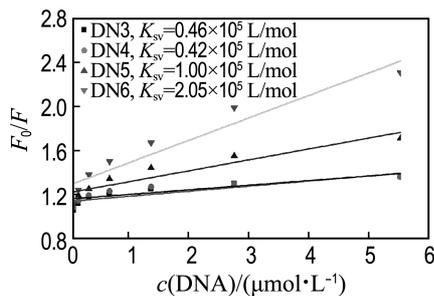


图 4 DN3~DN6 的 Stern-Volmer 方程线性拟合

Fig. 4 The linear fitting of Stern-Volmer equation of DN3-DN6

双萘酰亚胺类化合物与 DNA 分子中某一位点作用时,体系中发生作用的小分子与未发生作用的小分子之间处于一种平衡状态,这种平衡状态可以用以下方程进行描述:

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K + n \lg c(Q)$$

式中: n 为结合位点数, K 为结合常数. 以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg c(Q)$ 进行一元线性回归,得到线性方程(图形见图 5),由表 1 可见, DN3~DN6 的结合常数与结合位点均逐渐增大,表明烷基链越长的化合物与 DNA 的结合能力越强.

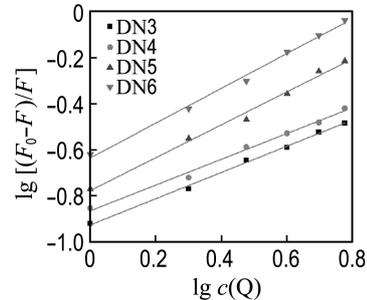


图 5 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg c(Q)$ 的工作曲线

Fig. 5 The working curve of $\lg[(F_0 - F)/F]$ to $\lg c(Q)$

2.4 化合物与 AO 对 DNA 的竞争结合实验

如图 6 所示,激发波长为 502 nm 时, AO 在 534 nm 处有一特征吸收峰(曲线 a),加入 DNA 后, AO 的吸收峰降低(曲线 b),即 DNA 对 AO 发生了猝灭作用,这是 AO 嵌入到 DNA 的碱基对中所致;随后在 AO-DNA 体系中加入不同浓度的各类化合物,结果见图 6 中(c)、(d),化合物在此激发波长下于 505 nm 处出现了一个特征吸收峰.实验结果表明, DN2 对体系的荧光影响最小,即与 AO 竞争能力最弱; DN3~DN6 在 534 nm 处的荧光强度有不同程度的上升,说明化合物能够将 AO-DNA 体系中的 AO 脱离 DNA 碱基对,成为游离状态,使 AO 的吸收峰增强.对比分析可知化合物与 AO 的竞争能力随烷基链的延长而增强,即 $\text{DN6} > \text{DN5} > \text{DN4} > \text{DN3} > \text{DN2}$.

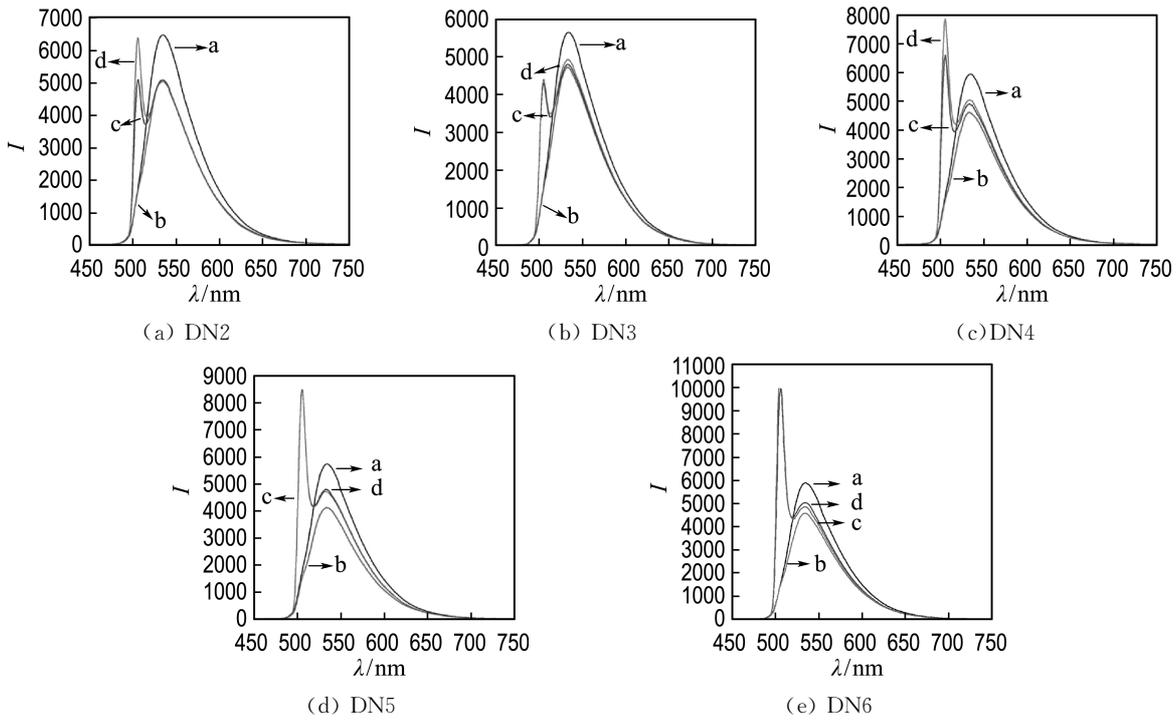
2.5 圆二色光谱

DNA 在 200~300 nm 有典型的 B-型构象^[17],从圆二色光谱(CD 光谱)分析结果可见(见图 7),正峰表示 DNA 的碱基堆积程度,负峰表示 DNA

表 1 DN3~DN6 对 DNA 的结合常数 K 与结合位点数 n

Tab. 1 Binding constants K and binding sites n of the interaction between DN2-DN6 and DNA

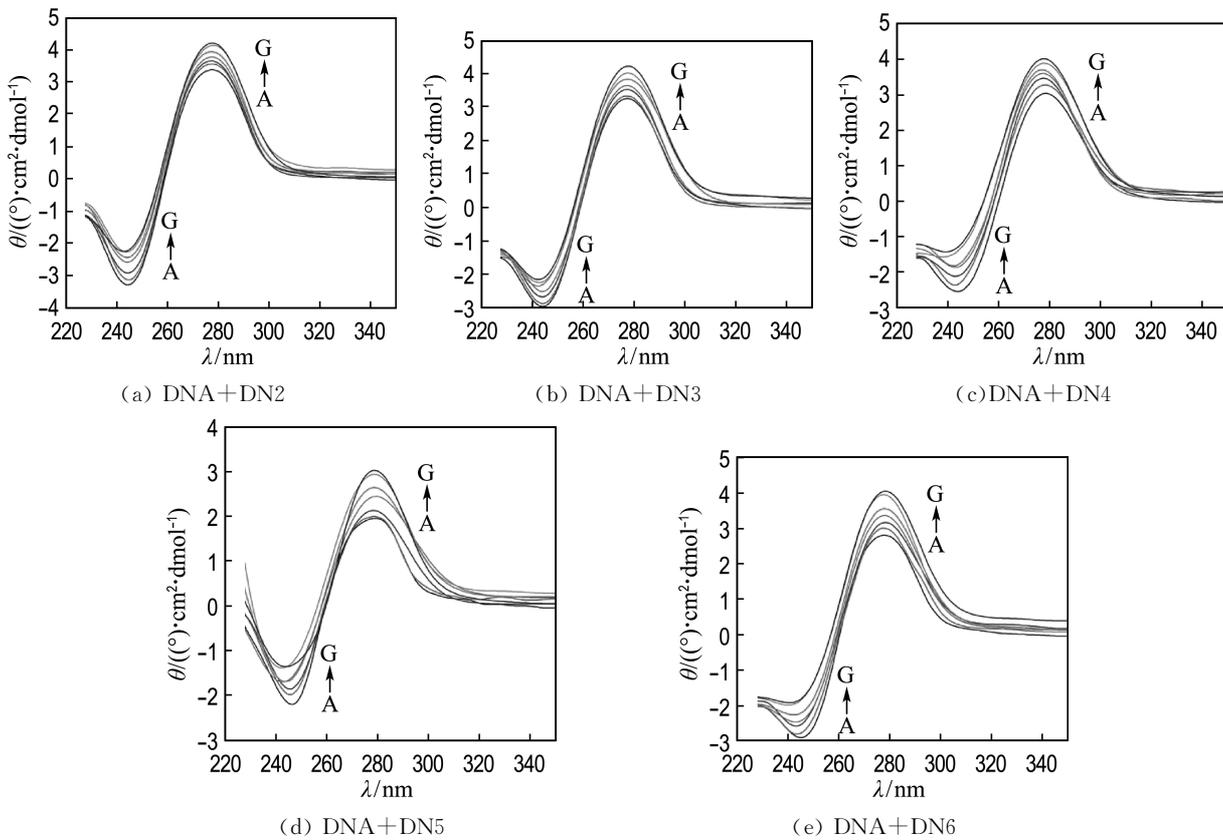
体系	线性方程	R^2	$K/(10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n
DN3-DNA	$y = -0.927 + 0.570x$	0.996 3	1.18	0.570
DN4-DNA	$y = -0.865 + 0.560x$	0.990 7	1.36	0.560
DN5-DNA	$y = -0.778 + 0.713x$	0.990 4	1.67	0.713
DN6-DNA	$y = -0.635 + 0.756x$	0.993 3	2.32	0.756



a: $c(\text{AO}) = 10 \mu\text{mol/L}$; b: a+DNA ($3.4 \mu\text{mol/L}$); c, d: b+DN2~DN6, $c(\text{DN2} \sim \text{DN6}) = 10, 0, 20, 0 \mu\text{mol/L}$

图 6 DN2~DN6 对 AO-DNA 体系荧光光谱的影响

Fig. 6 The effect of DN2-DN6 on the fluorescence of AO-DNA system



$c(\text{DNA}) = 150 \mu\text{mol/L}$, A~G: $R(c(\text{DN2} \sim \text{DN6})/c(\text{DNA})) = 0, 0.02, 0.04, 0.10, 0.20, 0.50, 1.00$

图 7 化合物 DN2~DN6 对 DNA 的 CD 光谱的影响

Fig. 7 The effect of DN2-DN6 on the CD spectra of DNA

的螺旋松散程度. DNA 的圆二色光谱在 276 和 243 nm 处分别有一个正峰和负峰, DN2~DN6 的加入均可引起 DNA 的圆二色光谱正峰的增强和负峰的减弱, 表明该类化合物都能嵌入 DNA 分子中^[18]. 经对比分析可知, 化合物的正峰和负峰强度增加和减弱程度随连接基长度的增加而上升, 即 DN2<DN3<DN4<DN5<DN6. 由此推测, 化合物嵌入 DNA 影响 DNA 的双螺旋结构和碱基堆积力, 其作用强度随烷基链的延长而增强.

3 结 论

研究表明, 烷基异硫脲阳离子作为连接基的新型双萘酰亚胺类化合物主要以嵌入方式与 DNA 发生作用, 在 DN2~DN6 五种化合物中, 烷基链的长短直接影响嵌入基团的电子云密度和化合物自身的柔性, 烷基链越长化合物的柔性越强, 对 DNA 的嵌入能力也越强, 即 DN6>DN5>DN4>DN3>DN2.

参 考 文 献:

- [1] Brana M F, Cacho M, Gradillas A, *et al.* Intercalators as anticancer drugs [J]. **Current Pharmaceutical Design**, 2001, **7**(17):1745-1780.
- [2] Rosell R, Carles J, Abad A, *et al.* Phase I study of mitonafide in 120 hours continuous infusion in non small cell lung cancer [J]. **Investigational New Drugs**, 1992, **10**(3):171-175.
- [3] Malviga V K, Liu P Y, Alberts D S, *et al.* Evaluation of amonafide in several cancer, phase II. A SWOG study [J]. **American Journal of Clinical Oncology**, 1992, **15**(1):41-44.
- [4] Brana M F, Castellano J M, Moran M, *et al.* Bis-naphthalimides. 2. Synthesis and biological activity of 5, 6-acenaphthalimidoalkyl-1, 8-naphthalimidoalkyl amines [J]. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 1995, **30**(3):235-239.
- [5] Bousquet P F, Brana M F, Conlon D, *et al.* Preclinical evaluation of LU 79553: a novel bis-naphthalimide with potent antitumor activity [J]. **Cancer Research**, 1995, **55**(5):1176-1180.
- [6] Nitiss J L, Zhou J, Rose A, *et al.* The bis (naphthalimide) DMP-840 causes cytotoxicity by its action against eukaryotic topoisomerase II [J]. **Biochemistry**, 1998, **37**(9):3078-3085.
- [7] Eric V Q, Tine M, Patrick D, *et al.* 2, 2, 2-Trichloro-N-({2- [2-(dimethylamino) ethyl]-1, 3-dioxo-2, 3-dihydro-1H-benzo [de]iso-quinolin-5-yl} carbamoyl) acetamide (UNBS3157), a novel nonhematotoxic naphthalimide derivative with potent antitumor activity [J]. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2007, **50**(17):4122-4134.
- [8] Marta S, Agata S M, Kamila K, *et al.* Synthesis and in vitro biological evaluation of new polyamine conjugates as potential anticancer drugs [J]. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2010, **45**(12):5744-5751.
- [9] Ferreira R, Baleizao C, Munoz-Molina J M, *et al.* Photophysical study of bis (naphthalimide)-amine conjugates: toward molecular design of excimer emission switching [J]. **The Journal of Physical Chemistry A**, 2011, **115**(6):1092-1099.
- [10] 肖 义, 金礼吉. 甲基异硫脲阳离子作为连接基的脱氧核糖核酸双嵌入剂; 中国: CN200610045945.0 [P]. 2006-03-03.
XIAO Yi, JIN Li-ji. DNA bi-intercalator using methyl isothiurea cation as linker; CN200610045945.0 [P]. 2006-03-03.
- [11] Tysoe S A, Morgan R J, Baker A D, *et al.* Spectroscopic investigation of differential binding modes of Δ - and λ -Ru (bpy)₂ (ppz)²⁺ with calf thymus DNA [J]. **The Journal of Physical Chemistry**, 1993, **97**(8):1707-1711.
- [12] 吕 娟, 王公轲, 张贵生, 等. 光谱法研究柔红霉素衍生物与 DNA 相互作用 [J]. **光谱学与光谱分析**, 2010, **30**(5):1324-1328.
LV Juan, WANG Gong-ke, ZHANG Gui-sheng, *et al.* Study on the interaction between DNR-D3 (daunorubicin derivative) and ctDNA by spectroscopic methods [J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, 2010, **30**(5):1324-1328. (in Chinese)
- [13] 林秋月, 陆晓红, 陈建荣, 等. 吡啶酰胺与 DNA 作用的光谱法研究 [J]. **光谱学与光谱分析**, 2008, **28**(6):1359-1363.
LIN Qiu-yue, LU Xiao-hong, CHEN Jian-rong, *et al.* Synthesis and DNA-binding properties of

- three compounds containing pyridinecarboxamide [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, **28**(6):1359-1363. (in Chinese)
- [14] XIE Li-juan, XU Yu-fang, WANG Fang. Synthesis of new amonafide analogues via coupling reaction and their cytotoxic evaluation and DNA-binding studies [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, **17**(2):804-810.
- [15] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等. 荧光分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, *et al.* *Fluorescence Analysis* [M]. Beijing: Science Press, 1990. (in Chinese)
- [16] 胡兴, 张国文, 李蔚博, 等. 农药异丙威与小牛胸腺DNA的作用研究[J]. *分析科学学报*, 2010, **26**(2):195-198.
- HU Xing, ZHANG Guo-wen, LI Wei-bo, *et al.* Studies on the interaction of aminocarb with calf thymus DNA [J]. *Journal of Analytical Science*, 2010, **26**(2):195-198. (in Chinese)
- [17] ZHOU Ying-lin, LI Yuan-zong. Studies of interaction between poly(allylamine hydrochloride) and double helix DNA by spectrol methods [J]. *Biophysical Chemistry*, 2004, **107**(3):273-281.
- [18] Maheswari P U, Palaniandavar M. DNA binding and cleavage properties of certain tetrammine ruthenium (II) complexes of modified 1, 10-phenanthrolines-effect of hydrogen-bonding on DNA-binding affinity [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2004, **98**(2):219-230.

Research on interaction of novel bis-naphthalimide derivatives with DNA

JIN Li-ji*, WANG Li-ping, ZOU Wei, XIAO Yi

(Faculty of Chemical, Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: The interaction of the five novel bis-naphthalimide derivatives (DN2-DN6) linked by methyl-isothiourea cation with DNA is investigated by UV absorption spectra, fluorescence spectra and circular dichroism (CD) spectra. The experimental results from UV absorption spectra show that when DNA is added, the hypochromic effect and faint red shift are observed in the absorption peak of DN2-DN6, and the longer the linker is, the more obvious the hypochromic effect is. The fluorescence of the compounds can be strongly quenched by DNA. The binding constants between DN3-DN6 and DNA increase with the alkyl chain's extension, they are 1.18×10^5 , 1.36×10^5 , 1.67×10^5 , 2.32×10^5 L/mol, respectively. The compounds can free the acridine orange which intercalates into DNA base pairs, and the force becomes stronger with the linker's extension. The CD spectrum results show that the double helix structure of DNA comes forth base stacking and unwinding locally, and the degree of base stacking is positively correlated with the length of alkyl chain. All experimental results show that DN2-DN6 bound to DNA by the intercalating binding mode and the order of intensity is DN6 > DN5 > DN4 > DN3 > DN2.

Key words: bis-naphthalimide; intercalator; fluorescence spectra; circular dichroism spectra