

顺-[Pt(NH₃)₂Cl₂]与核苷的作用*

唐雯霞 张才芬** 戴安邦

(南京大学络合物化学研究所)

摘 要

用分光光度法研究了 37°C、pH=5.5、0.1M NaClO₄ 介质中 cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂] 和 DNA 组成物——鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷、胞嘧啶核苷及胸腺嘧啶核苷的作用。发现顺-[Pt^{II}(NH₃)₂] 与前三种核苷能生成组成为 1:1、1:2 二种络合物，与胸腺嘧啶核苷不作用。所测得一级和二级表现生成常数，以及作用初速分别有如下大小次序：Guo > Ado > Cyt ≫ Thy；Guo > Ado > Cyt ≫ Thy。在所得结果基础上讨论了顺-[Pt(NH₃)₂Cl₂] 和癌细胞中 DNA 作用的可能方式。

一、引 言

众所周知，铂络合物，尤其顺-[Pt(NH₃)₂Cl₂] 不仅能抑制多种动物实验肿瘤的生长，而且在临床上对生殖泌尿系统癌、头颈部癌有显著的疗效^[1,2]。一系列研究表明，顺-[Pt(NH₃)₂Cl₂] 的抗癌效应在于其与癌细胞中 DNA 相作用，抑制其合成^[3,4]。但是顺-[Pt(NH₃)₂Cl₂] 和 DNA 作用方式迄今仍不清楚。有三种不同看法：(一) 顺-[Pt^{II}(NH₃)₂] 和 DNA 双螺旋体的两条链上的碱基作用，形成链间交叉；(二) 顺-[Pt^{II}(NH₃)₂] 和 DNA 一条链上相邻的鸟嘌呤碱基的 N₇ 作用，形成链内交叉；(三) 顺-[Pt^{II}(NH₃)₂] 和 DNA 上鸟嘌呤的 N₇ 和 C₆O 螯合作用^[5-8]。

为了弄清顺-[Pt(NH₃)₂Cl₂] 和 DNA 的作用方式，本文用紫外分光光度法研究了顺-[Pt(NH₃)₂Cl₂] 和组成 DNA 的四种核苷的作用，测定了形成络合物的组成，一级、二级表现生成常数及络合反应初速，在所得结果基础上讨论了顺-[Pt(NH₃)₂Cl₂] 和 DNA 的可能作用方式。

二、实验部分

顺-[Pt(NH₃)₂Cl₂] 按文献^[9]合成。鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷、胞嘧啶核苷、胸

本文于1980年11月28日收到。

* 辽宁师院仇珍、暨南大学李玉美、常州生化厂陈霓等同志参加部分工作。

** 南京师院化学系。

腺嘧啶核苷分别为 BDH 和 C. Calbiochem La Solla 产品, NaClO_4 (c.p. 试剂) 经重结晶后使用, $4 \times 10^{-4} M$ 顺- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ 溶液、 $4 \times 10^{-4} M$ 核苷溶液, 以及 $1 M \text{NaClO}_4$ 溶液均由二次重蒸馏水配成, 其中顺- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ 溶液在使用前 48 小时配置, 用前在反应温度恒温 12 小时, 其摩尔电导率为 $180 \Omega^{-1} \text{cm}^2 M^{-1}$ (37°C)。不同含量的顺- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ 和核苷的混合液由上述溶液配制, 并使溶液中支持电解质浓度为 $0.1 M \text{NaClO}_4$ 。混合液在 $37^\circ \text{C} \pm 0.2^\circ \text{C}$ 恒温 (在无光条件下) 直到溶液消光在 24 小时内无显著变化, 即可测定其消光及平衡 pH 值。

溶液的紫外光谱在 Uvespek 紫外分光光度计上测定。反应液的差示光谱由平衡后溶液的吸收扣除平衡前溶液的吸收得出。在相应的差示光谱的极大值波长, 用配体浓度递变法测定顺- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ 和核苷作用生成络合物中铂和核苷的比例。在同样波长用改进对应溶液法^[10]测定生成络合物的表观生成常数。由于配体和生成络合物的光谱重叠, 所有求络合物组成和生成常数均采用 $\Delta D = D - \epsilon_A^0 C_A$ 进行。

三、数据处理

对应溶液法是分光光度法计算逐级稳定常数的较常用的方法, 其主要原理是利用相同 ϵ_M 的对应溶液具有相同的 $[A]$ 和 \bar{n} 值来计算逐级稳定常数。

$$\begin{aligned}
 D &= \epsilon_M^0 [M] + \sum_{j=1}^N \epsilon_j \cdot \beta_j [A]^j + \epsilon_A^0 [A] \\
 &= \epsilon_M^0 [M] + \sum_{j=1}^N (\epsilon_j - j\epsilon_A^0) \beta_j [M][A]^j + \epsilon_A^0 [A], \\
 \epsilon_M &= \frac{D - \epsilon_A^0 C_A}{C_M} = \frac{\epsilon_M^0 + \sum_{j=1}^N (\epsilon_j - j\epsilon_A^0) \beta_j [A]^j}{1 + \sum_{j=1}^N \beta_j [A]^j}. \quad (1)
 \end{aligned}$$

$$\bar{n} = \frac{\sum_{j=1}^N j \beta_j [A]^j}{1 + \sum_{j=1}^N \beta_j [A]^j}, \quad (2)$$

其中: $D = d/l$ (d 为溶液光密度, l 为吸收层厚度);

$\epsilon_M^0, \epsilon_A^0, \epsilon_j$ ——分别为金属离子、配体和络合物 MA_j 的摩尔消光系数;

ϵ_M ——金属离子的表观摩尔消光系数;

β_j —— MA_j 的积累稳定常数。

由于 $C_A = [A] + \bar{n} \cdot C_M$,

则 $\left(\frac{\partial C_A}{\partial C_M} \right)_{\epsilon_M} = \bar{n}$ 。

当将 ϵ_M 相同的对应溶液的 C_A 对 C_M 作图应为直线, 其斜率和截距应为相应的 \bar{n} 和 $[A]$ 值,

$$\text{设: } Z_1 = \frac{[A]}{n} = \frac{1 + \beta_1[A] + \beta_2[A]^2 + \dots + \beta_j[A]^j}{\beta_1 + 2\beta_2[A] + \dots + j\beta_j[A]^{j-1}} \quad (3)$$

将 Z_1 对 $[A]$ 作图, 外推到 $[A] \rightarrow 0$ 得截距为 $\frac{1}{\beta_1}$.

$$\begin{aligned} \text{再设: } Z_2 &= \frac{[A]}{\frac{n}{[A]} - \beta_1} \\ &= \frac{1 + \beta_1[A] + \beta_2[A]^2 + \dots + \beta_j[A]^j}{(2\beta_2 - \beta_1) + (3\beta_3 - \beta_1\beta_2)[A] + \dots + (j\beta_j - \beta_1\beta_{j-1})[A]^{j-2} - \beta_1\beta_j[A]^{j-1}} \quad (4) \end{aligned}$$

将 Z_2 对 $[A]$ 作图, 外推 $[A] \rightarrow 0$, 截距为 $\frac{1}{2\beta_2 - \beta_1^2}$, 并求出 β_1, β_2 , 余类推.

反应初速的数据处理如下:

$$D_t = \varepsilon_M^0 \left\{ C_M - \sum_{j=1}^N [MA_j] \right\} + \sum_{j=1}^N \varepsilon_j [MA_j] + \varepsilon_A^0 \left\{ C_A - \sum_{j=1}^N j [MA_j] \right\},$$

D_t : 时间为 t 时溶液的消光.

当 $t \rightarrow 0$ 时, 将 D_t 对 t 微分, 并可忽略络合物 MA_j ($j \geq 2$) 的生成. 则

$$\left(\frac{dD_t}{dt} \right)_{t=0} = \frac{d[MA]}{dt} (\varepsilon_1 - \varepsilon_A^0 - \varepsilon_M^0)$$

由于测定波长下 $\varepsilon_{\text{Cis-Pt}}$ 为 0, 所以

$$\frac{d[MA]}{dt} = \left(\frac{dD_t}{dt} \right)_{t=0} \frac{1}{\varepsilon_1 - \varepsilon_A} \quad (5)$$

四、实验结果

顺- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ 与鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷、胞嘧啶核苷和胸腺嘧啶核苷的混合反应液, 分别在 37°C 下 (生理条件) 恒温 9 (Guo)、29 (Ado)、28 (Cyt) 昼夜后的差示光谱见图 1, 并分别在 293nm (Cis-Pt-Guo)、283nm (Cis-Pt-Ado)、289nm (Cis-Pt-Cyt) 出现极大值. 而顺- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ 和胸腺嘧啶核苷的混合液恒温 50 昼夜后光谱不发生变化, 说明顺- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ 仅和 Guo、Ado、Cyt 有络合作用, 和 Thy 不作用.

分别在差示光谱极大值波长, 用配体浓度递变法测得顺- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ -Nu (核苷) 体系中所生成络合物的组成见图 2.

由图 2 可见, 顺- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ 和前三种核苷形成 1:2 的络合物. 由于顺- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ 在溶液中有以下水合平衡:



而顺- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 的酸式解离常数为 $\text{pk}_1 = 5.6$, $\text{pk}_2 = 7.2$. 在体系的平衡 pH 时 ($\text{pH} = 5.5 \pm 0.4$), 铂主要以顺- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 状态存在, 此外尚有部分顺- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{H}_2\text{O}(\text{OH})]^+$ 存在^[11]. 核苷的 $\text{pk}_{\text{Guo}} = 1.6, 9.16$, $\text{pk}_{\text{Ado}} = 3.45$, $\text{pk}_{\text{Cyt}} = 4.22$. 在平衡 pH 条件下, 均以中性核苷分子形式存在. 溶液中的络合平衡可以下式

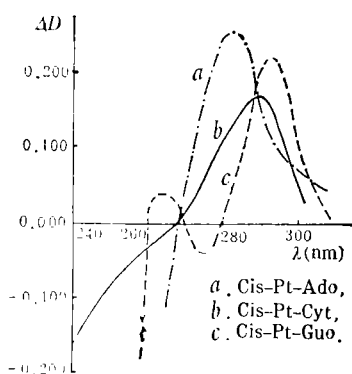


图1 Cis-Pt-核苷的差吸收光谱*
 $C_{\text{Cis-Pt}} = 3.00 \cdot 10^{-5} M, C_A = 8.50 \cdot 10^{-5} M$.

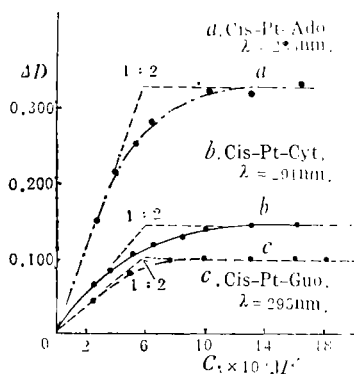
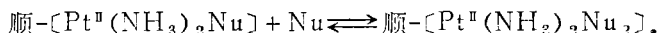
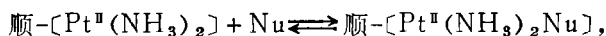


图2 Cis-Pt-核苷的 $\Delta D \sim C_A$ 图
 $C_{\text{Cis-Pt}} = 3.00 \cdot 10^{-5} M$

表示:



其表观逐级生成常数分别为:

$$K_1 = \frac{[\text{顺} - \text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Nu}]}{[\text{顺} - \text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2][\text{Nu}]}, K_2 = \frac{[\text{顺} - \text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Nu}_2]}{[\text{顺} - \text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Nu}][\text{Nu}]}.$$

式中, $[\text{顺} - \text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2]$ —— $[\text{顺} - \text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2^{2+}]$ 和 $[\text{顺} - \text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{H}_2\text{O}(\text{OH})^+]$ 的浓度和; $[\text{顺} - \text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Nu}]$ —— 可能生成的各种 1:1 络合物浓度总和。

图3—6是对溶液法求顺- $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2]$ 和胞嘧啶核苷的表观络合常数的 $\epsilon_M \sim C_{\text{Cyt}}$ 、 $C_{\text{Cis-Pt}} \sim C_{\text{Cyt}}$ 、 $Z_1 \sim [\text{Cyt}]$ 、 $Z_2 \sim [\text{Cyt}]$ 图。由 $\epsilon_M \sim C_{\text{Cyt}}$ 图求得对应溶液的 $C_{\text{Cis-Pt}} \sim C_{\text{Cyt}}$ 值, 由 $C_{\text{Cis-Pt}} \sim C_{\text{Cyt}}$ 图求得对应溶液的 \bar{n} 和 $[\text{Cyt}]$ 值, 再按式(2)计算 Z_1 , 并将 Z_1 对 $[\text{Cyt}]$ 作图, 外推到 $[\text{Cyt}] = 0$, 则得到截距 $\frac{1}{\beta_1} = 1.61 \times 10^{-5}$ 再由 β_1 等按(4)计算得 Z_2 , 由 Z_2 对 $[\text{Cyt}]$ 作图, 外推到 $[\text{Cyt}] = 0$, 由截距 3.1×10^{-10} 求得 β_2 。计算得的 \bar{n} 、 $[A]$ 、 Z_1 、 Z_2 值列于表1。

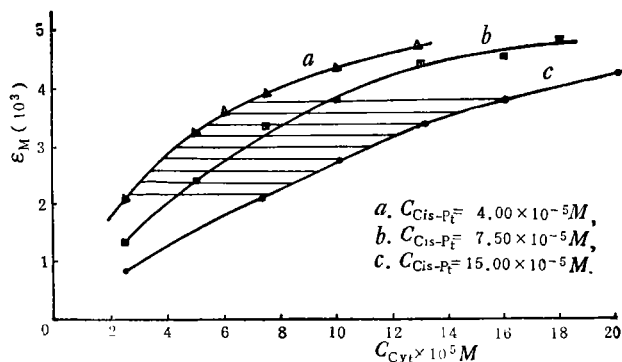


图3 $\epsilon_M \sim C_{\text{Cyt}}$ 图(37°C 35昼夜达平衡后在 $\lambda = 291\text{nm}$ 测定)

* 避光条件下, 37°C 恒温平衡后测定。

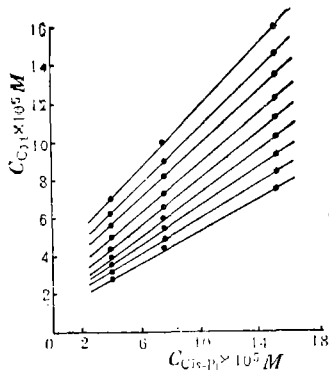


图 4 C_{Cyt} ~ C_{Cis-Pt} 图

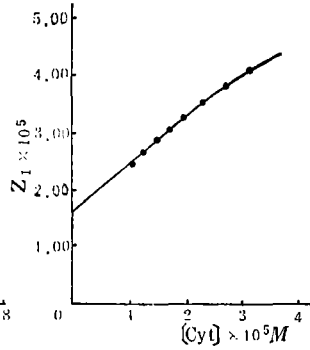


图 5 Z₁ ~ (Cyt) 图

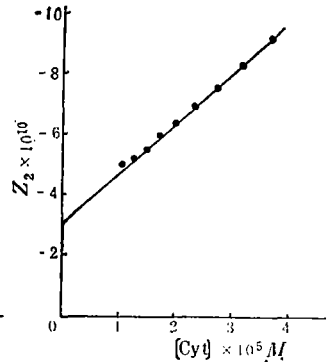


图 6 Z₂ ~ (Cyt) 图

表 1 由对应溶液的浓度计算顺-(Pt^{II}(NH₃)₂)和 Cyt 体系的 \bar{n} 、[A]、Z₁、Z₂ 值

$\epsilon_M \times 10^{-3} M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$C_A \times 10^{-5} M$			\bar{n}	[A] $\times 10^5 M$	Z ₁ $\times 10^5$	Z ₂ $\times 10^{10}$
	$C_M = 15.00 \times 10^{-5} M$	$C_M = 7.50 \times 10^{-5} M$	$C_M = 4.00 \times 10^{-5} M$				
2.20	7.53	4.40	2.77	0.432	1.05	2.43	-5.0
2.40	8.37	4.90	3.16	0.474	1.26	2.66	-5.2
2.60	9.26	5.40	3.55	0.519	1.48	2.85	-5.5
2.80	10.25	5.98	3.99	0.569	1.72	3.02	-6.0
3.00	11.20	6.60	4.45	0.614	1.99	3.24	-6.4
3.20	12.23	7.25	4.97	0.660	2.33	3.53	-6.9
3.40	13.35	8.02	5.55	0.709	2.72	3.84	-7.6
3.60	14.60	8.89	6.20	0.764	3.14	4.11	-8.3
3.80	16.00	9.80	6.91	0.826	3.61	4.37	-9.2

用同样的方法分别测得顺-(Pt^{II}(NH₃)₂)和鸟嘌呤核苷及腺嘌呤核苷的表现一级、二级生成常数，列于表 2。

顺-(Pt^{II}(NH₃)₂)和三种核苷反应的 D_t ~ t 图见图 7，其计算得反应初速见表 3。

表 2 顺-(Pt^{II}(NH₃)₂)和核苷形成络合物的 K₁、K₂

	Guo	Ado	Cyt	Thy
K ₁	2.1 × 10 ⁶	2.0 × 10 ⁶	6.2 × 10 ⁴	—
K ₂	1.0 × 10 ⁵	1.7 × 10 ⁵	5.2 × 10 ⁸	—
β ₂	2.1 × 10 ¹¹	3.4 × 10 ¹¹	3.2 × 10 ⁸	—

表 3. 顺-(Pt^{II}(NH₃)₂)和核苷作用的初速

核苷	极大值波长	ϵ_{MA}	ϵ_A	$\left(\frac{dD_t}{dt}\right)_{t=0}$	$\frac{d[MA]}{dt}, M \text{ min}^{-1}$
Guo	293	3630	1390	11.5 × 10 ⁻⁵	5.1 × 10 ⁻⁸
Ado	283	5700	1234	5.0 × 10 ⁻⁵	1.1 × 10 ⁻⁸
Cyt	283	7100	1810	4.5 × 10 ⁻⁵	8.5 × 10 ⁻⁹

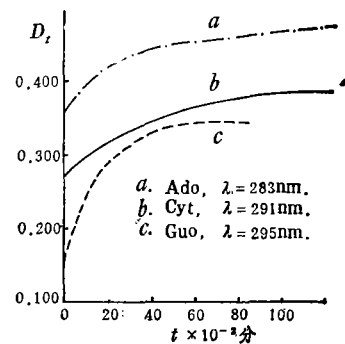


图 7. Cis-Pt-核苷的 D_t ~ t 图

C_{Cis-Pt} = 5.00 × 10⁻⁵ M,
C_A = 5.00 × 10⁻⁵ M.

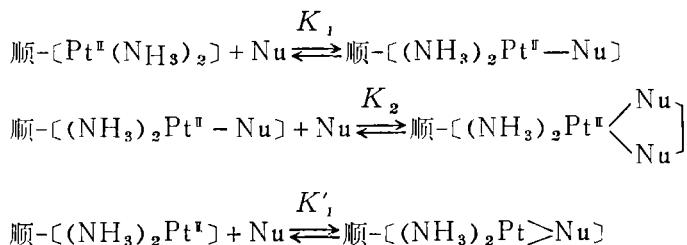
五、讨 论

由表2可见,本文所测得顺-[Pt^{II}(NH₃)₂]和鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷和胞嘧啶核苷作用的一级和二级表观生成常数有以下次序:



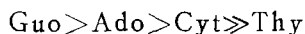
因此从热力学观点看顺-[Pt^{II}(NH₃)₂]优先地作用于鸟嘌呤和腺嘌呤核苷,其次与胞嘧啶核苷,和胸腺嘧啶不作用。

根据顺-[Pt^{II}(NH₃)₂]和三种核苷作用的 K_1 略大于 K_2 ,可以认为顺-[Pt^{II}(NH₃)₂]和此三种核苷作用所形成的1:1络合物中,核苷仅和Pt单纯络合,其间不形成稳定螯合物。这是由于对以下反应说, $K_1 > K_2$ 。



若一级络合物中Pt和核苷分子形成螯合环,则其 K'_1 必然大于 K_1 ,亦即 $K'_1 \gg K_2$ 。因此 $K_1 \geq K_2$ 时,则可排除一级络合物中稳定螯合环的形成。

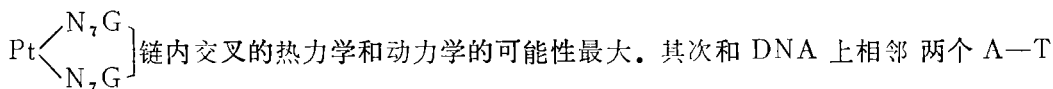
从络合物生成速度看,顺-[Pt^{II}(NH₃)₂]和四种核苷生成络合物初速有以下次序:



因此,从动力学观点看,顺-[Pt^{II}(NH₃)₂]优先和鸟嘌呤核苷作用,其次和腺嘌呤核苷作用,也不排除和胞嘧啶核苷的作用。

从以上观点可推广到对顺-[Pt(NH₃)₂Cl₂]和DNA的作用位置和键合方式的讨论。可以认为由顺-[Pt(NH₃)₂Cl₂]转变生成的顺-[Pt^{II}(NH₃)₂]对DNA链上的胸腺嘧啶不作用,而对Guo、Ado作用的热力学选择性比Cyt大,但从动力学观点看将优先作用于DNA链上的鸟嘌呤,其次作用于腺嘌呤,也不排除和胞嘧啶的作用。

考虑到DNA双螺旋体结构中同一链上相邻两个鸟嘌呤碱基上N₇间相距为3.4Å,正与顺-[Pt^{II}(NH₃)₂]²⁺相匹配,可以认为顺-[Pt^{II}(NH₃)₂]和DNA产生



碱基对产生链间交叉的可能性也存在。也不排除其它空间可能的由胞嘧啶参加的交链形成。但由于 $K_1 \geq K_2$,因此不支持顺-[Pt^{II}(NH₃)₂]和一个G的N₇,C₆O螯合机制。

此种看法与最近的Kelman用核酸内切配研究Cis-Pt和噬菌体DNA作用所得结论^[12],和用密度离心法研究Poly G、Poly C、Poly G-C,鼠肝DNA与顺-[Pt^{II}(NH₃)₂]作用所得结果^[13],以及一系列物理、化学方法研究Cis-Pt和核酸所得结果一致^[14]。

参 考 文 献

- [1] Cleare, M. J., *Coord. Chem. Rev.*, **12**, 349 (1974)
- [2] Cleare, M. J., *Platinum Metals Rev.*, **21**(2), 56 (1977).
- [3] Howle, J. A., Gale, G. R., *Biochem. Pharm.*, **19**, 2757 (1970).
- [4] Harder, H. C., Rosenberg, B., *Int. J. Cancer*, **6**, 207 (1970).
- [5] Roberts, J. J., Pascoe, J. M., *Nature*, **235**, 282 (1972).
- [6] Stone, P. T., Kelman, A. D., Sinex, F. M., *Nature*, **251**, 736 (1974).
- [7] Roos, I. A. G., *Chem-Biol. Interact.*, **16**, 39 (1977).
- [8] Millard, M. M., Macquet, J. P., Theophanide, T., *Biochimica et Biophys Acta*, **402**, 166 (1975).
- [9] Dhara, S. C., *Indian J. Chem.*, **8**, 193 (1970).
- [10] Ahrland, S., *Acta Chem. Scand.*, **5**, 199 (1951).
- [11] Bjerrum, G., Schwarzenbach, G., Sillen, L. G., "Stability Constants", Part 1, Organic Ligands, The Chemical Society, London, 1957.
- [12] Kelman, A. D., Buchbinder, M., *Biochimie*, **60**, 893 (1978).
- [13] Stone, P. J., Kelman, A. D., Sinex, F. M., Bhargava, M. M., Halvorson, H. O., *J. Mol. Biol.*, **104**, 793 (1976).
- [14] Kelman, A. D., Peresic, H. J., Stone, P. J., *J. Clin. Hemated. Oncol., Part 1*, **7**, 440 (1977).

THE REACTION OF $\text{cis}-(\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2)$ ON NUCLEOSIDES

Tang Wenxia, Zhang Caifen and Tai An-pang

(Coordination Chemistry Institute, Nanjing University, Nanjing)

ABSTRACT

The interaction of $\text{cis}-(\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2)$ with guanosine, adenosine, cytidine and thymidine, as constituents of DNA, was studied spectrophotometrically at pH 5.5, 37°C in the presence of 0.1M NaClO_4 . It was found that the first three nucleosides formed 1:1 and 1:2 complexes with $\text{cis}-(\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2)$, whose apparent stability constants and initial rate of formation are given as follows:

	Guo	Ado	Cyt
K_1	2.1×10^6	2.0×10^6	6.2×10^4
K_2	1.0×10^5	1.7×10^5	5.2×10^3
β_2	2.1×10^{11}	3.4×10^{11}	3.2×10^8
$\frac{d[\text{MA}]}{dt} \text{ M min}^{-1}$	5.1×10^{-8}	1.1×10^{-8}	8.5×10^{-9}

Thymidine showed no interaction with $\text{cis}-(\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2)$.

On the basis of the above findings, a possible mode of reaction of $\text{cis}-(\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2)$ with DNA in the cancer cells is discussed. Thermodynamically and kinetically, it is considered most probable that cross links were formed between $\text{cis}-(\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2)$ and nucleosides in DNA, e. g., guanosine,

$(\text{NH}_3)_2\text{Pt} \begin{matrix} \diagup \text{N}_7 \text{G} \\ \diagdown \text{N}_7 \text{G} \end{matrix}$, and it seems unlikely that a chelate was formed with

any one nucleoside, e. g., $(\text{NH}_3)_2\text{Pt} \begin{matrix} \diagup \text{N}_7 \\ \diagdown \text{OC}_6 \end{matrix} \text{G}$.