

有机金属钌抗癌药物与 G-四链体 DNA 的相互作用研究

吴 魁, 胡文兵, 罗 群, 熊少祥, 汪福意

(中国科学院化学研究所, 北京分子科学国家实验室, 北京 100190)

Investigation of Interactions between Organometallic Ruthenium Anticancer Complexes and G-quadruplex DNA

WU Kui, HU Wen-bing, LUO Qun, XIONG Shao-xiang, WANG Fu-yi

(Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Institute of Chemistry,

Chinese Academy of Science, Beijing 100190, China)

Abstract: Guanine-rich sequence TTAGGG can form G-quadruplex(G4) at the end of human telomeres, which protect chromosomal ends from unwanted recombination and degradation and inhibit the activity of telomerase enzyme. The telomerase was shown to be active in 85%-90% of human cancer cells, but inactive in healthy and somatic cells. DNA is the potential target of organometallic ruthenium(II) anticancer complexes. It is of great importance to study the interaction of ruthenium complex with the senior structural DNA G4. The present work focused on investigating the interactions between organometallic ruthenium complexes and G-quadruplex. The pilot studies show that NH_4^+ can stabilize the G4 structure to reduce the binding of biphenyl ruthenium complexes to guanine bases, but the inhibitory effects disappeared as the concentration of ruthenium complexes increases. This result suggests that the coordination of ruthenium complexes may distort and even unwind the G-quadruplex so that further coordination of ruthenium to the linear DNA fragment occurred.

Key words: HPLC; MS; organometallic ruthenium complexes; anticancer agents; G-quadruplex

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0101-02

癌症是威胁人类生命的重要疾病之一。钌基有机金属配合物是近年来研究较多的一种新型的细胞毒性抗癌药物,它与顺铂类似,也是以DNA作为药物靶点,高选择性的与鸟嘌呤的N7结合,钌基有机金属配合物水溶性较好,毒副作用低,并且与顺铂没有交叉抗药性,具有较好的临床应用前景。端粒酶通过识别并结合于富含G的端粒末端,以自身为模板,逆转录合成端粒,它在85%~90%的癌细胞中都存在,但在正常细胞中却检测不到,这很有可能是癌细胞“不死”的重要因素。但是一旦端粒末端富G的单链序列形成G四链体(G4)却能阻止端粒酶发挥作用,因此把端粒作为治疗癌症的靶标已经引起了广泛的研究兴趣。研究钌基金属药物与G4的作用能为设计合成新的端粒酶抑制剂提供一定的理论依据,也为拓宽钌基金属药物的药物靶点提供了有益的药理学理论依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Micromass 四极杆-飞行时间串联质谱仪(Q-TOF): 美国 Waters 公司产品,配有电喷雾离子源

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20745002, 90713020)、科技部 973 重大基础研究项目(批准号: 2007CB935601)资助

作者简介: 吴 魁, 男, 博士研究生, 分析化学专业。E-mail: wukui@iccas.ac.cn

通信作者: 汪福意, 男, 研究员, 博士生导师, 从事分析化学及药物设计研究。E-mail: fuyi.wang@iccas.ac.cn

(ESI) 和 Masslynx V4.0 数据处理系统; Agilent 1200 系列高效液相色谱仪。[(η^6 -bip)Ru(en)Cl][PF₆] (bip=biphenyl; en=ethylenediamine) 根据文献合成, 化学结构示于图 1; G-quadruplex: 22-mer 5'-AGGG(TTAGGG)₃-3' (I) (HPLC 纯化): Takara 公司产品; TEAA (1 mol·L⁻¹): AppliChem 公司产品; 乙腈(色谱纯): Tedia 公司产品; 醋酸铵、Tris 和甲醇(分析纯); 水: Millipore 超纯水。

1.2 测试条件

DNA 样品溶于水得 2 mmol·L⁻¹ 溶液。Agilent 1200 HPLC: 流动相 A 为水(含 20 mmol·L⁻¹ TEAA 溶液), B 为乙腈(含 20 mmol·L⁻¹ TEAA 溶液); PLRP-S 色谱柱(50×2.1 mm)。MS 直接进样, 流速 10~20 μ L·min⁻¹, ESI 离子源, 喷雾电压 -2.5 kV, Cone 电压 -42 kV, 源温度 100 °C, 碰撞能量(CE) -9.9 kV。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 研究钌基化合物与 G-quadruplex 的相互作用

随着钌基化合物的浓度增加, 在 Tris 缓冲液中, 钌化合物与线性 DNA 结合的量迅速增加; 而在 NH₄Ac 溶液中, DNA 片断以四链体形式存在, 钌与 DNA 反应的程度显著降低, 示于图 2。

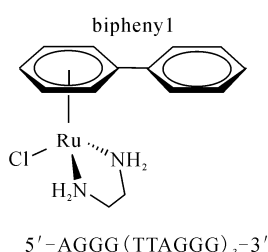


图 1 有机金属钌化合物的结构及 DNA 片段的序列

Fig.1 Structures of ruthenium complexes and sequence of strand I

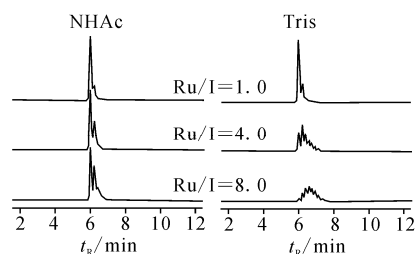


图 2 钌化合物{(η^6 -bip)Ru(en)}²⁺与链 I 的反应: 50 mmol·L⁻¹ 醋酸铵 (pH 7) 溶液(左图), 20 mmol·L⁻¹ Tris (pH 7) 缓冲液(右图); Ru 与 DNA (I) 的摩尔比分别为 1:1、4:1 和 8:1

Fig.2 HPLC for the interaction of {(η^6 -bip)Ru(en)}²⁺ and DNA in NH₄AC and Tris buffer (pH 7)

2.2 MS 研究钌基化合物与 G-quadruplex 的相互作用

如图 3 所示, 在 NH₄Ac 溶液中, MS 检测到了含有 NH₄⁺ 的一系列质谱峰, 表明链 I 形成了 G 四链体。在 Ru 浓度较低时, 由于 G N7 形成氢键, 结合到 G4 上的 Ru 的量较少; 而当 Ru 的浓度增加到 G4 的 8.0 倍时, G4 的构型可能已经破坏, N7 暴露出来使 Ru 的结合量明显增加。

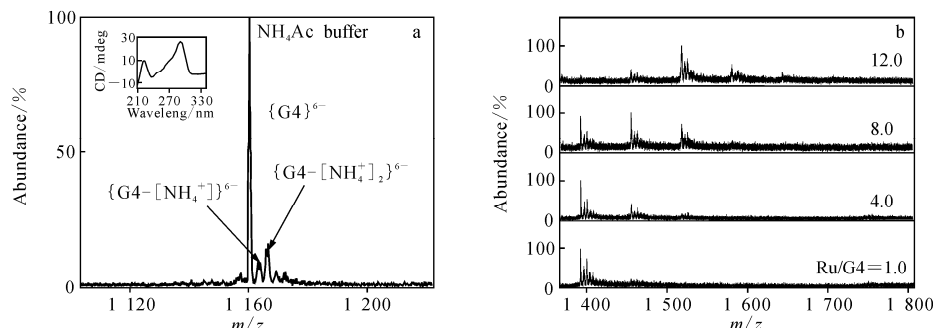


图 3 钌化合物{(η^6 -bip)Ru(en)}²⁺与链 I 的反应。链 I 在醋酸铵 (pH 7) 溶液(左图)的质谱图; 右图为{(η^6 -bip)Ru(en)}²⁺与 G4 (I) 的在不同比例下反应的质谱图, Ru 与 G4 的摩尔比分别为 1.0, 4.0, 8.0 和 12.0

Fig.3 MS spectra for: strand I(G4) in NH₄Ac solution (left inset); the interaction of {(η^6 -bip)Ru(en)}²⁺ with G4 at different molar ratio(right inset)