

# 铜(II)—去甲斑蝥酸络合物存在下 抗坏血酸对DNA链的断裂作用

李泮海\* 庞貽慧

(北京医科大学药学院物理化学教研室, 北京 100083)

**提要** 本文在 pH 7.40、37℃ 磷酸盐缓冲体系中, 研究了铜(II)的去甲斑蝥酸络合物(Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA)存在下, 不同因素对抗坏血酸(H<sub>2</sub>A)断裂DNA链的影响。实验结果表明, Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA 催化抗坏血酸有氧化过程中产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 进一步发生 Fenton 反应, 生成的 ·OH 是抗坏血酸断裂DNA链的真正物种。但简单的 Fenton 反应不能解释本实验的所有结果。

**关键词** DNA链断裂作用; 抗坏血酸、Cu(II)—去甲斑蝥酸络合物

在过渡金属离子(如 Cu(II)、Fe(III))及其络合物存在下, 抗坏血酸发生有氧化可产生各种活性氧, 对肿瘤细胞产生细胞毒作用<sup>[1,2]</sup>。Bram 等<sup>[3]</sup>曾推测 DNA 是抗坏血酸杀伤肿瘤细胞的作用靶点, 大量文献<sup>[4~6]</sup>也表明, 在 Cu(II)及 Cu(II)络合物存在下, 抗坏血酸能够断裂数种 DNA 链。但对抗坏血酸断裂DNA链的机理还不清楚。本文旨在研究生理条件下, 不同因素对 Cu(II)的去甲斑蝥酸络合物(Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA)催化抗坏血酸有氧化断裂DNA链的影响, 寻找抗坏血酸的催化有氧化对DNA链断裂作用机理赖以建立的证据。

## 材 料 与 方 法

抗坏血酸(AR), 军事医学科学院; 硫酸铜(AR), 用双蒸水重结晶两次; 溴化乙啶, Fluka; 鱼精 DNA、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、琼脂糖均为生化试剂; 去甲斑蝥素, 北京第四制药厂, 按文献<sup>[7]</sup>制备为去甲斑蝥酸; 本文用铜(II)盐与去甲斑蝥酸按摩尔比 1:2 配制的溶液进行反应; 其它试剂为分析纯; 反应体系用水为三次蒸馏水, 电导率为  $(0.8 \pm 0.2) \times 10^{-4} \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ 。

反应在以空气氧饱和的磷酸盐缓冲液(pH 7.40)中进行, 反应体系中DNA的浓度为  $5.000 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  温度  $37 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 反应 2 h, 50mmol/L EDTA·2Na 终止反应。DNA 电泳采用 0.8% 琼脂糖平板凝胶电泳, 电泳缓冲液为 Tris—醋酸系统<sup>[8]</sup>、用东方恒压恒流电泳仪 DF-C、恒压 10 V 电泳 13 h, 溴化乙啶染色, 254 nm 紫外灯下珠江照相机拍摄。

本文于 1990 年 7 月 20 日收到。

\* 现址: 山东省医药工业研究所, 济南 250100

## 结 果

### 一. Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA-H<sub>2</sub>A-DNA-buffer 体系中不同成分对 DNA 链的断裂作用

结果见图 1, Cu(II), Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA, H<sub>2</sub>DCA 本身均无断裂 DNA 链的作用, 抗坏血酸本身对 DNA 链的断裂作用很弱, 在 Cu(II) 或 Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA 存在下, 抗坏血酸有较强的 DNA 链断裂作用。

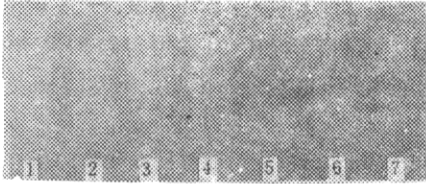


Fig 1. DNA-breaking actions of various components of Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA-H<sub>2</sub>A-DNA-buffer system. 1. Control; 2. [H<sub>2</sub>A] =  $6.250 \times 10^{-5}$  mol/L; 3. [Cu(II)] =  $7.031 \times 10^{-5}$  mol/L; 4. [Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA] =  $7.031 \times 10^{-5}$  mol/L; 5. [Cu(II)] =  $7.031 \times 10^{-5}$  mol/L, [H<sub>2</sub>A] =  $6.250 \times 10^{-5}$  mol/L; 6. [Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA] =  $7.031 \times 10^{-5}$  mol/L, [H<sub>2</sub>A] =  $6.250 \times 10^{-5}$  mol/L; 7. [H<sub>2</sub>DCA] =  $1.406 \times 10^{-4}$  mol/L.

### 二. 抗坏血酸浓度及 Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA 浓度对抗坏血酸断裂 DNA 链的影响

随着抗坏血酸浓度的增大, DNA 链断裂增强(图 2A)。DNA 链的断裂程度并不随 Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA 浓度的增大而增强, 当 Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA 浓度达到一定程度后, 增大了的 Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA 浓度反而使 DNA 链的断裂程度有所降低(图 2B)。

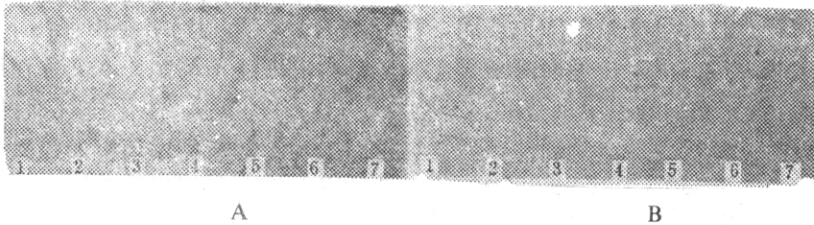


Fig 2. A. DNA-breaking action of various concentrations of H<sub>2</sub>A in the presence of  $7.031 \times 10^{-5}$  mol/L Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA. 1. Control; 2.  $1.563 \times 10^{-5}$  mol/L; 3.  $3.125 \times 10^{-5}$  mol/L; 4.  $6.250 \times 10^{-5}$  mol/L; 5.  $9.375 \times 10^{-5}$  mol/L; 6.  $1.250 \times 10^{-4}$  mol/L; 7.  $1.563 \times 10^{-4}$  mol/L. B. Effects of concentrations of Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA on the DNA-breaking action of  $6.250 \times 10^{-5}$  mol/L H<sub>2</sub>A. 1. Control; 2.  $2.109 \times 10^{-5}$  mol/L; 3.  $1.266 \times 10^{-4}$  mol/L; 4.  $2.461 \times 10^{-4}$  mol/L; 5.  $4.922 \times 10^{-4}$  mol/L; 6.  $1.969 \times 10^{-3}$  mol/L; 7.  $3.938 \times 10^{-3}$  mol/L.

### 三. O<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对抗坏血酸断裂 DNA 链的影响

图 3 表明, Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA 存在下, 抗坏血酸对 DNA 链的断裂作用在通氮气时消失, 说明该断裂作用必须有氧气的存在, 即与抗坏血酸的有氧化密切相关。在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下, 抗坏血酸对 DNA 链的断裂作用可以不需要 O<sub>2</sub> 的存在, 但 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 本身无断裂 DNA 链作用。

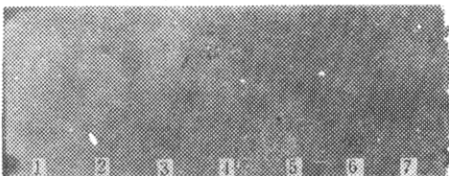


Fig 3. Effects of hydrogen peroxide and oxygen gas on the DNA-breaking action. 1. Control; 2. [Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA] =  $7.031 \times 10^{-5}$  mol/L, [H<sub>2</sub>A] =  $3.125 \times 10^{-5}$  mol/L; 3. 2+ N<sub>2</sub>; 4. 2+  $1.250 \times 10^{-4}$  mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 5. 4+ N<sub>2</sub>; 6. [Cu(II)/H<sub>2</sub>DCA] =  $7.031 \times 10^{-5}$  mol/L, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] =  $1.250 \times 10^{-4}$  mol/L; 7. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] =  $1.250 \times 10^{-4}$  mol/L.

#### 四. SOD, CAT 和羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 清除剂对 $\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{DCA}$ 存在下抗坏血酸断裂 DNA 链的影响

实验结果表明,  $\cdot\text{OH}$  清除剂如 Tris、甲酸、水杨酸、乙酸钠、硫氰酸钾等对 DNA 链的断裂具有一定程度的抑制作用; 其它  $\cdot\text{OH}$  清除剂如苯甲酸、碘化钾、DMSO、甘露醇等的抑制作用很弱; SOD 几乎无抑制作用; CAT 能完全抑制 DNA 链的断裂。

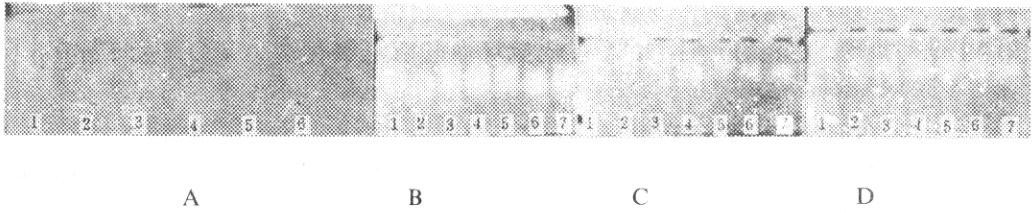


Fig 4. A. Effects of CAT, SOD and  $\cdot\text{OH}$  scavengers on the DNA-breaking action of ascorbic acid in the presence of  $\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{DCA}$ .  $[\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{DCA}] = 7.031 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $[\text{H}_2\text{A}] = 6.250 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ . 1. Control; 2. 0.1000 mol/L butan-1-ol; 3. 0.1000 mol/L isopropanol; 4. 0; 5. 0.1000 mg/ml CAT; 6. 0.1000 mg/ml SOD. B ~ D. Effect of  $\cdot\text{OH}$  scavengers on the DNA-breaking action of ascorbic acid in the presence of  $\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{DCA}$ .  $[\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{DCA}] = 7.031 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $[\text{H}_2\text{A}] = 3.125 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $[\cdot\text{OH} \text{ scavenger}] = 2.000 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ . B. 1. Control; 2. Ethanol; 3. Mannitol; 4. Sucrose; 5. Glucose; 6. DMSO; 7. 0. C. 1. Control; 2. Formic acid; 3. Tris; 4. Histidine; 5. t-Butyl alcohol; 6. Urea; 7. 0. D. 1. Control; 2. 0; 3. Salicylic acid; 4. Sodium acetate; 5. Potassium thiocyanate; 6. Benzoic acid; 7. Potassium iodide.

#### 五. $\text{Cu}(\text{II})$ 络合剂对抗坏血酸断裂 DNA 链的影响

EDTA、氨三乙酸 (NTA)、二乙三胺五乙酸 (DETPA) 对  $\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{DCA}$  存在下抗坏血酸断裂 DNA 链有相当大的抑制作用 (图 5)。



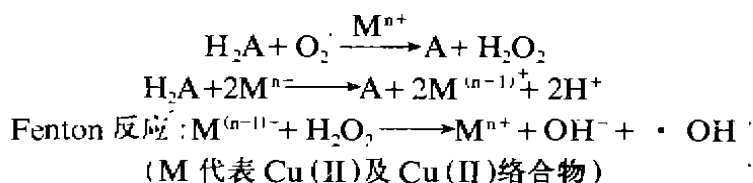
Fig 5. Effects of chelating agents on the DNA-breaking action of ascorbic acid in the presence of  $\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{DCA}$ .  $[\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{DCA}] = 7.031 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $[\text{H}_2\text{A}] = 3.125 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ . 1. Control; 2. 0; 3.  $6.250 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  EDTA; 4.  $1.875 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$  NTA; 5.  $1.250 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  NTA; 6.  $1.857 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$  DETPA; 7.  $1.250 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  DETPA.

### 讨 论

实验结果表明, 在  $\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{DCA}$  存在下, 抗坏血酸对 DNA 链的断裂作用需要氧气的存在, 这说明抗坏血酸有氧氧化是抗坏血酸断裂 DNA 链所必须的;  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在时, 可以不需要  $\text{O}_2$  的存在, CAT 能够完全抑制 DNA 链的断裂, 说明  $\text{H}_2\text{O}_2$  在坏血酸断裂 DNA 链过程中起了重要作用。但  $\text{H}_2\text{O}_2$  本身无断裂 DNA 链能力。SOD 几乎无抑制作用, 提示  $\text{O}_2^-$  并不是断裂 DNA 链的直接参与者。抗坏血酸本身断裂 DNA 链的能力很弱。  $\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{DCA}$  存在下, 抗坏血酸有较强的 DNA 链断裂作用, 说明  $\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{DCA}$  参与了抗坏血酸断裂 DNA 链的过程。根据以上分析, 本文认为, 在  $\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{DCA}$  存在下, 抗坏血酸对 DNA 链断裂作用的加强是由于抗坏血酸的催化有氧氧化过程中产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  进一步发生 Fenton

反应生成的羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 造成的。

$\text{Cu}(\text{II})$  及  $\text{Cu}(\text{II})$  络合物催化抗坏血酸有氧化产生  $\cdot\text{OH}$  的机理目前看来比较趋向于一致<sup>[4,9,10]</sup>。



按照上面的机理,  $\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{DCA}$  催化抗坏血酸有氧化产生  $\cdot\text{OH}$  的 Fenton 反应为:



但  $\cdot\text{OH}$  清除剂对抗坏血酸断裂 DNA 链的影响实验表明, 某些  $\cdot\text{OH}$  清除剂如苯甲酸、DMSO、碘化钾、甘露醇等浓度高于抗坏血酸近 700 倍时也几乎无抑制作用。因而仅用这种由 Fenton 反应产生  $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{OH}$  攻击 DNA 链造成 DNA 链断裂的简单 Fenton 反应机理不能解释 DNA 链断裂实验的全部结果。正确机理的提出, 有待于进一步的研究。

### 参 考 文 献

1. Samuni A. On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. *Eur J Biochem* 1983; 137:119.
2. Kimoto E. et al. Enhancement of antitumor activity of ascorbic acid against Ehrlich ascites tumor cells by the copper-glycylhistidine complex. *Cancer Res* 1983; 43:824.
3. Braun S. et al. Vitamin C preferential toxicity for malignant melanoma cells. *Nature* 1980; 284:629.
4. Chiou SN. DNA- and protein- scission activity of ascorbic acid in the presence of copper ion and copper-peptide complex. *J Biochem* 1983; 94:1259.
5. Aronovitch J. et al. Ascorbic acid oxidation and DNA scission catalyzed by iron and copper chelates. *Free Rad Res Commun* 1987; 2:241.
6. Kobayashi S. et al. DNA damage induced by ascorbic acid in the presence of  $\text{Cu}(\text{II})$ . *Biochim Biophys Acta* 1988; 949:143.
7. 李荣昌, 等. 去甲斑蝥酸与金属离子络合作用的研究. *分子科学与化学研究* 1983;(1):39.
8. 蔡良琬, 等. 核酸研究技术(上). 北京:科学出版社, 1987:120~121.
9. Morgan AR. et al. The mechanism of DNA strand breakage by vitamin C and superoxide and the protective role of catalase and superoxide dismutase. *Nucl Acids Res* 1976; 3:1139.
10. Inoue H. et al. Disulfide cleavage and insulin denaturation by active oxygen in the copper/ascorbic acid system. *Chem Pharm Bull* 1986; 34:1075.

## DNA – BREAKING ACTION OF ASCORBIC ACID IN THE PRESENCE OF Cu(II)/DEMETHYLCANTHARIC ACID COMPLEX

PH Li and YH Pang

*(Physical Chemistry Department, School of Pharmaceutical Sciences, Beijing Medical University, Beijing 100083)*

**ABSTRACT** Effects of various factors on the DNA – breaking action of ascorbic acid in the presence of Cu(II)/demethylcantharic acid complex were studied in phosphate buffer (pH 7.40), at  $37.0 \pm 0.1$  °C. It was shown that  $\cdot\text{OH}$  produced from Fenton reaction of  $\text{H}_2\text{O}_2$  which can be formed from the oxidation of ascorbic acid was responsible for the DNA – breaking action of ascorbic acid and the simple Fenton reaction cannot explain all the results.

**key words** DNA – breaking action; Ascorbic acid; Cu(II)/demethylcantharic acid complex