

抗癌活性络合物[Fe(II)-平阳霉素]的 溶液态构型及活化机理研究

姜军平 郭 瑛 周 晓

(陕西省科学院微生物研究所, 西安 710043)

平阳霉素(pingyangmycin, PYM)是以博莱霉素(bleomycin, BLM) A₅ 为主要组分的混合物, 有独特的抗癌功效, 其抗癌指标高于 BLM A₂, 而毒性却低于 BLM A₂。体外实验表明: BLM 抗肿瘤的主要机制是直接作用于 DNA, 使 GpC 或 GpT 处单链断裂, 其抗癌活性物质是三元络合物 O₂-Fe(II)-BLM 或其内部电荷转移产物 BLM-Fe(III)-O₂⁻。Oppenheimer 等^[1,2]首先用 PMR 法, 根据 Fe(II) 离子对 BLM 各 ¹H-NMR 谱线的展宽效应论证在 Fe(II)-BLM 络合物中, 中心 Fe(II) 为高自旋电子态(S=2)。Burger 等^[3]用 Moessbauer 谱验证了这个重要结论。Oppenheimer 等^[1]根据前人的实验结果, 提出了模拟活化络合物 CO-Fe(II)-BLM 的配位结构, 如图 1 所示, 但未得到令人信服的证据。

及分子结构诸方面均与国外使用的 BLM A₂, B₂ 有很大不同, 因此在前文^[5,6]研究的基础上, 本文就平阳霉素与 Fe²⁺ 所形成的活化络合物的溶液态结构进行了实验确证, 以阐明其降解 DNA 的微观机理。

实 验 部 分

在室温条件下(25 ± 1°C), 在 FX-60Qpft-NMR 仪(日本产)和 FT-80Apft-NMR 仪(美国产)上测取 PYM(天津河北制药厂出品)及 PYM 与 Fe(II), Fe(III) 络合物的常规 ¹H-NMR 谱。并用改变 [Fe²⁺]: [PYM]、[Fe³⁺]: [PYM] 摩尔比浓度的方法, 对金属离子与 PYM 形成的顺磁体系的 D₂O(重氢取代 99.7% 北京化工试剂厂产品)溶液(PD ≈ 6.5) 进行自旋—晶格纵向弛豫时间 T₁, 自旋—自旋横向弛豫时间 T₂ 以及顺磁各向同性位移(ΔH/H)_{iso} [或(ΔV/V)_{iso}] 的测量。

各峰的化学位移是以溶剂 D₂O 中未取代完的 H₂O 质子峰(δ: 4.82) 为内标度量的。在 FX-60Q-NMR 仪上测试所用参数为: 观察频率 59.80 MHz、谱宽 600 Hz, 观察偏置 49.60 KHz、辐射偏置 48.02 KHz。T₁ 是用反转—恢复法(inversion-recovery)测定的, 使用(180°-t-90°-T)_n 的脉冲序列, 观察 90° 脉冲后的自由感应衰减信号(FID)(图 2), 在选取脉冲间隔时, 由于测取的峰较多, 而各质子的 T₁ 相差又较大, 故所选用的参数主要是照顾谱的高低场两端, 以获得较为精细及准确的数值。因两端质

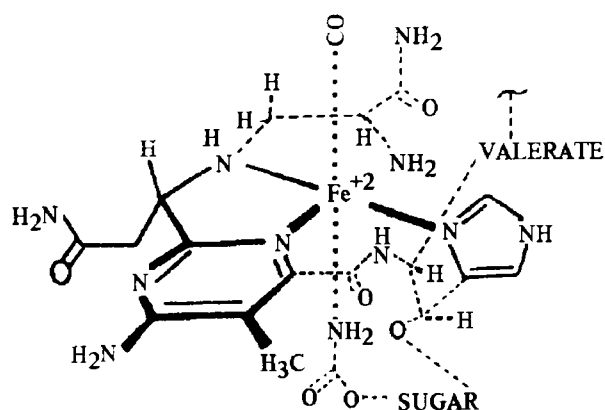


Fig 1 Schematic drawing of the arrangement of ligands in Fe(II)-bleomycin-CO.

由于国产的平阳霉素(PYM)在生物活性

子谱峰的弛豫信息对结构的判断及机理的阐明很重要,而中间峰(δ : 4~5)主要是脂环糖上各 ^1H 的共振峰,它们对配位环境的影响不大。且由于它们的构象比较复杂,数目又多,故分辨不好,影响了 T_1 及 T_2 值测定的准确性。

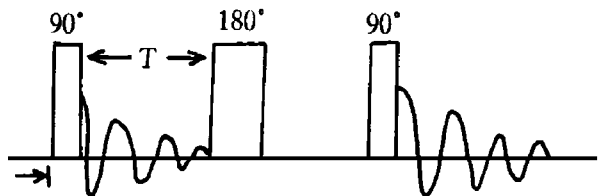


Fig 2 $(180^\circ-t-90^\circ-T)_n$ pulse sequence and FID signal.

样品制备及数据处理

将 PYM 20 mg 溶于 D_2O 0.3 ml 中,通高

纯氮 15 min, 迅速密封。测定标准 ^1H 谱, T_1 , T_2 值后再于氮气中,用 $10\ \mu\text{l}$ 的微量进样器分 2 次加入配制好的金属离子盐的 D_2O 溶液,每次加后进行重复测定 T_1 , T_2 值。最后,按化学计量加入 Fe^{2+} , Fe^{3+} D_2O 溶液,以获得 1:1 的 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 与 PYM 络合物,测定 ^1H 谱及 T_2 和 $\Delta\nu$ 。数据处理程序参照文献^[5,6]进行。

在实验中,为保证络合的完全性及络合形式的唯一性,将 $[\text{Fe}^{2+}]:[\text{PYM}]$ 、 $[\text{Fe}^{3+}]:[\text{PYM}]$ 维持在 5×10^{-3} 左右,且不用 $[\text{M}^{n+}]:[\text{PYM}]=1:1$ 的试样去测试 $1/T_{\text{ip}}$ 。测定及计算结果见表 1~4。

Tab 1 Paramagnetic effects of Fe^{2+} on nuclear spin relaxation rates of proton resonances of PYM (first, $f_1 = 3.03 \times 10^{-2}$)

δ	8.28	8.11	7.50	5.37	5.11	4.82	3.93	3.12	2.21	2.10	1.86	1.24	
Belong	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	H_2O	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
T_1	0.52	0.19	0.50	0.88	0.91	1.31	0.12	0.23	0.12	0.21	0.42	0.12	
T_2	0.324	0.389	0.216	n	n	n	n	n	n	0.158	n	0.078	
$1/T_{\text{ip}}$	1.622	1.198	4.804	0.039	b	b	0.615	1.667	1.223	n	1.190	0.595	2.083
$1/fT_{\text{ip}}$	53.53	39.55	158.6	1.294	b	b	20.30	55.01	40.36		39.29	19.64	68.76
$r(\times 10^{-10}\ \text{m})$	6.18	6.49	5.15	11.48	b	b	7.26	6.41	6.47		[6.5]	7.30	5.92

n. Instrument can't be determined; b. Not to be counted because of experimental error.

Tab 2 Paramagnetic effects of Fe^{2+} on nuclear spin relaxation rates of proton resonances of PYM (second, $f_2 = 6.06 \times 10^{-2}$)

δ	8.46	8.30	8.15	7.56	5.38	5.26	4.82	4.17	3.95	3.34	3.14	2.83	2.10	1.86	1.18
Belong	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	H_2O	(7)		(8)		(9)	(10)	(11)	(12)
T_1	0.50	0.13	0.09	0.44	0.32	0.50	0.61	0.15	0.11	0.08	0.20	0.09	0.18	0.32	0.11
T_2	0.29	0.16	0.22	0.27	n	n	n	n	n	n	n	n	0.13	n	0.08
$1/T_{\text{ip}}$	1.281	7.39	10.65	0.31	b	b	1.491	2.82	2.42	9.05	1.88	1.11	1.984	1.34	2.84
$1/fT_{\text{ip}}$	21.04	122.0	175.8	5.15	b	b	24.6	46.54	40.00	149.4	30.94	18.34	32.74	22.10	46.08
$r(\times 10^{-10}\ \text{m})$	7.00	5.22	4.91	8.85	b	b	6.82	6.13	6.29	5.05	6.56	7.16	[6.5]	6.94	6.12

Tab 3 Paramagnetic effects of Fe^{3+} on nuclear spin relaxation rates of proton resonances of PYM (first, $f_1 = 6.09 \times 10^{-3}$)

δ	8.29	8.11	8.07	7.43	5.36	5.21	4.82	3.93	3.12	2.10	1.86	1.20
Belong	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	H_2O	(7)	(8)	(10)	(11)	(12)
T_1	2.59	1.49	0.89	0.56	2.17	4.52	5.55	0.13	0.20	0.22	0.51	0.14
$1/T_{\text{ip}}$	0.089	0.026	0.689	0.315	0.196	n	0.065	1.026	0.833	0.974	0.206	0.476
$1/fT_{\text{ip}}$	14.67	4.266	113.1	51.74	32.23	n		168.4	136.8	159.9	33.89	78.19

Tab 4 Paramagnetic effects of Fe³⁺ on nuclear spin relaxation rates of proton resonances of PYM(second, $f_2 = 1.22 \times 10^{-2}$)

δ	8.30	8.11	8.08	7.42	4.97	4.82	4.15	3.93	3.13	2.10	1.85	1.20
Belong	(1)	(2)	(3)	(4)		H ₂ O	(7)		(8)	(10)	(11)	(12)
T ₁	2.78	1.53	1.30	0.58	4.38	5.13	0.145	0.15	0.22	0.20	0.56	0.14
1/Tip	0.063	0.008	0.334	0.254	n	0.08	1.896	0.606	0.379	1.429	0.031	0.476
1/fTip	5.25	0.703	27.87	21.13	n	6.67	158.0	50.5	31.56	119.0	2.611	39.68

结果与讨论

从表 1 和表 2 可见, Fe(II)的顺磁弛豫及顺磁位移效应较强, 说明它以高自旋态形式与 PYM 结合。从计算得到的相对距离 r 说明: ①在中性介质中, Fe(II)-PYM 与 Cu(II)-PYM 在配位结构形式上很不相同, 咪唑氮原子[体现在(2), (4)¹H 的 T₁ 上]没有参与配位作用, 从 $\delta \sim 1.20$ 处的甲基峰弛豫变化可推断甲基戊酯链上的氮原子或氧原子可能参与了配位作用; ②从配位作用强度上看, Fe(II)-PYM 中脂环糖上的¹H 较之 Cu(II)-PYM 中的¹H 距中心离子更近, 说明配位作用程度在轴向位置有所加强; ③从配位球微环境对称性来分析, 由于 H¹ 和 H⁴ 距差增大, 可推知 Fe(II)-PYM 的配位场对称性较 Cu(II)-PYM 有所降低; ④从与介质 H₂O 的交换, 配位作用方面考察, 可发现 H₂O 质子距顺磁中心的 r 缩短, 与糖体上各¹H 的 r 相近, 说明配位球附近有 H₂O 分子可能参与与配位原子的交换作用, 同时也反映出整个 Fe(II)-PYM 络合体系的空间结构较 Cu(II)-PYM 松散, 从这一点上讲, 它可能是具有活性作用的原因之一。

Fe(II)-PYM 中各¹H 的谱峰随 f 的变化其位移值也发生变化。随着 f 的增大, 低场区的(2), (4)两¹H 峰皆向更低场移动, 而(1), (3)两¹H 峰 δ 几乎不变。在高 f 时还有向低场移动的趋势。位于高场区($\delta < 4.5$)的几个峰, 也是随 f 的增大稍向高场区移动。计算得到的这种位移特征与弛豫特征相对距离之间的关系是: 向高场位移的¹H, 相对中心 Fe(II)离子距离较近, 而向低场位移的¹H, 相对距离较远。造成

这种现象的主要原因是由于 Fe(II)离子 d 的轨道电子向配位基团的空轨道反馈引起。而在 Cu(II)-PYM 中却没有发生这种情况。故可推测, 这可能与 PYM 的激活作用有关。Fe(II)-PYM 活化络合物在 D₂O 溶液中的平均构型、构象, 示于图 3。

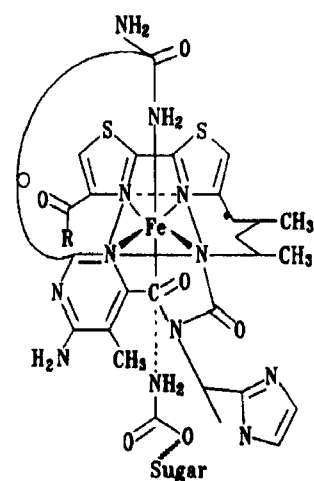


Fig 3 Coordination structure of Fe(II)-PYM in solution.

从图 3 看出: 咪唑环距配位中心较远。推测该络合物与 DNA 发生结合作用时, 它将首当其冲, 其电子结构将受到较大影响, 与文献^[4]报道相符。

此外, Fe(III)离子对 PYM 中各¹H 的弛豫影响较特殊。它对低场区的几个¹H 峰影响较小, 若假设其弛豫变化主要是由偶极-偶极相互作用所致, 则所得的相对距离 r 表明, 只有甲基嘧啶氮和糖体末端的酰基可能参与了配位作用, 其它质子距中心的 r 都在 $7.00 \sim 15 \times 10^{-10}$ m 之间, 没有规整的配位结构, 表明直接用 Fe(III)与 PYM 作用以形成络合物是困难的, 这与前人^[7]所得的光谱实验结果相符。

由各¹H 位移与 f 的变化情况看出, Fe(III)与 Fe(II)离子变化情况的基本趋势一样, 但程

度加强,特别是在高 f 值时,位移差别非常明显,2 个二噻唑质子的弛豫也明显增强,故说明它与 Fe(III)产生了相互作用。

通过位移情况比较分析,Fe(II)-PYM 络合物经氧化后,其 Fe(III)离子与 PYM 的化学键合能力加强,这可能是 Fe(III)-PYM 络合物稳定性很高,而生物学活性很低的一个重要原因,也与我们的稳定常数实验测定数据和电位分析数据(另文报道)相一致。

关键词 平阳霉素; 铁络合物; $^1\text{HNMR}$; 顺磁效应

参 考 文 献

1 Oppenheimer NJ, Rodriguez LO, Hecht SM. Structural studies of "active complex" of bleomycin: assignment of ligands to the ferrous ion in a ferrous-

bleomycin-carbon monoxide complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**:5616

2 Dabrowiak JC, Greenaway FT, Grulich R. Transition-metal binding site of bleomycin A_2 . A carbon-13 nuclear magnetic resonance study of the zinc (II) and copper (II) derivatives. *Biochemistry*, 1978, **17**:4090

3 Burger RM, Kent TA, Horwitz SB, *et al.* Moessbauer study of iron bleomycin and its activation intermediates. *J Biol Chem*, 1983, **258**:1559

4 Antholine WE, Petering DH, Saryan LA, *et al.* Interactions among iron (II), bleomycin, Lewis bases, and DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**:7517

5 姜军平,郭瑛. 平阳霉素与 Mn^{2+} 络合物的 $^1\text{HNMR}$ 弛豫研究. 中国抗生素杂志, 1996, **21**:61

6 郭瑛,姜军平. 铜离子与平阳霉素络合物的配位构型及活化机理研究. 中国抗生素杂志, 1997, **22**:58

7 Melnyk DL, Hoywitz SB, Peisach J. Redox potential of iron bleomycin. *Biochemistry*, 1981, **21**:5327

CONFIGURATION IN SOLUTION AND ACTIVITY MECHANISM STUDIES ON THE ANTICANCER Fe(II)-PINGYANGMYCIN(PYM) COMPLEX

Jiang Junping(Jiang JP), Guo Ying(Guo Y) and Zhou Xiao(Zhou X)

(Microbiology Institute, Shanxi Academy of Sciences, Xi'an 710043)

ABSTRACT In order to elucidate the micro-configuration and mechanism of anticancer activity of Fe(II)-PYM complex in solution, the coordination of high spin paramagnetic ferrous ion, Fe(II), and Pingyangmycin, (PYM) was studied in D_2O solution by using the paramagnetic ion probe principle and PMR technique and compared with the inactive complexes, e. g., Cu(II)-PYM and Fe(III)-PYM. The basic configuration parameter of the complexes were determined. When the pyrimidine methyl proton was close to the central ion, 6.5×10^{-10} m was taken as standard, the absolute distance between the central ion and other protons or ligand could be calculated. Results showed that, in Fe(III) solution, the proton of pyrimidine methyl and the terminal acyl group of the sugar moiety were closer to the central ion, but other protons were relaxed and the distance was between 7.0×10^{-10} m and 15×10^{-10} m. In the case of Fe(II) complex, the distance of the central ion and the ligand group was between 4.91×10^{-10} m and 8.85×10^{-10} m. The distinctive structure diversity with those of inactive complexes was observed and the relationship of the activity mechanism was postulated.

KEY WORDS Pingyangmycin; Iron complex; $^1\text{HNMR}$; Paramagnetic effect