

顺铂与 F-肌动蛋白的结合方式的 LMCT 谱研究

王夔 曾慧慧* 王剑 李荣昌

(北京医科大学药学院, 北京, 100083)

本文根据顺铂及顺铂与 F-肌动蛋白电子光谱中电荷转移谱带研究了顺二氨合铂(II)离子与 F-肌动蛋白的结合方式及构型。将所得光谱解析为个别吸收谱带, 并与按不同构型、不同配位原子计算结果相比较, 结果表明, 铂以平面四方构型主要与两个氨分子、一个硫和一个氨基氮配位。

关键词: 顺铂, F-肌动蛋白, 配位, LMCT 谱。

一直认为顺铂 [*cis*-Pt(NH₃)₂Cl₂] 的抗癌作用是其水解产物与 DNA 分子中鸟嘌呤碱基配位引起交联所致。我们曾指出, 当顺铂或其水解物进攻细胞时, 细胞的应答是细胞内各种不同分子参与的多种反应的总结果^[1]。在细胞的靶分子中, 细胞骨架蛋白受影响较大。苏雅炯等^[2]用罗丹明-鬼笔环肽标记细胞丝状肌动蛋白确定了顺铂配合物会引起它的重组和解体, 这种变化可能在抑制或杀伤癌细胞中起作用。因此, 有必要在分子水平上研究顺铂与有关蛋白的相互作用以及铂结合引起的蛋白构象变化。本文根据 UV 差谱研究了顺铂和肌动蛋白的相互作用的电荷转移谱带; 并用 LMCT 跃迁能公式归属了在 UV 谱上测得的 LMCT 跃迁; 从而确定了顺铂和肌动蛋白存在着相互作用, 得出了结合产物的构型和配位基团。

实 验

仪器 用岛津 UV260 紫外可见分光光度计, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳仪。

试剂和材料 肌动蛋白(F-actin)按 Pardee 等报道^[3]从家兔骨髓肌中用丙酮提取, 并经聚合、解聚、再聚合法制备。所得肌动蛋白用电泳法鉴定, 呈现单带, 与标准分子量系列比较, 产物相对分子量为 42000, 与 F-肌动蛋白一致。纯度符合要求。

三磷酸腺苷二钠(Na₂ATP)和叠氮化钠(NaN₃)为 Merck 试剂, 顺铂(DDP)为齐鲁制药厂产品, 巯基乙醇为化学试剂, 其余试剂均为分析纯试剂。

测试方法 为测定顺铂结合 F-肌动蛋白形成的配合物的 LMCT 谱, 配制了顺铂浓度为 $1.7 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、F-肌动蛋白浓度为 $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 pH=7.4(磷酸缓冲溶液浓度为 $0.85 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)混合溶液。混合后避光放置不同时间, 室温下记录 200—400 nm 范围光谱。

测 试 结 果

LMCT 结果见图 1(3h 以前的光谱略去)。由图 1 可见, 代表 NH₃ 配位的 230 nm 峰位基本不变, 而在 250—350 nm 范围宽峰表现略有不同。6h 以后趋于稳定。

根据以上结果, 选择反应时间 24h, 测定上述溶液的光谱。为消除游离顺铂的影响, 在仪

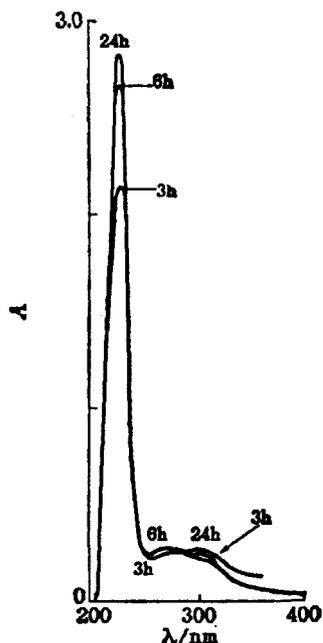


图1 顺铂(DDP)与肌动蛋白作用 3h, 6h, 24h后紫外光谱

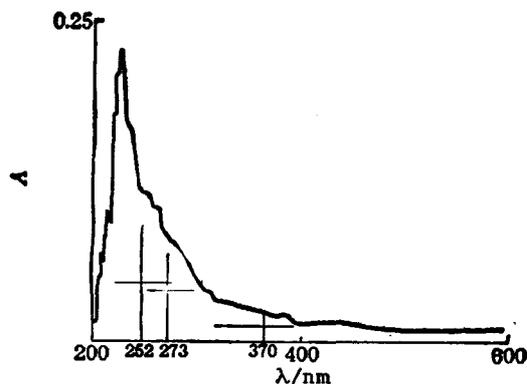


图2 顺铂(DDP)与肌动蛋白作用 24h的 UV 差谱 (曲线下十字代表拆分出的谱带, 横线代表半峰宽, 竖线代表峰高)

器上减去了同浓度顺铂的对应光谱, 并以同浓度肌动蛋白为空白, 所得差示光谱见图 2.

用计算机程序^[4]拆分得以下几个吸收带:

峰高(A)	最大吸收波长(nm)	半峰宽(nm)
0.016	370	30
0.073	273	9
0.112	252	18
0.282	230	10

在同样条件下测定顺铂谱(图 3), 有三个吸收带, 除 230 nm 外, 250—350 nm 范围有两个带, 拆分结果为:

峰高(A)	最大吸收波长(nm)	半峰宽(nm)
0.153	300	18
0.100	273	9

为测定非键轨道至跃迁轨道的间隔 ΔOE , 还测定了顺铂在 pH 7.4(Tris-HCl)溶液中的可见光谱(见图 3), 由 d-d 跃迁 λ_{max} 值求出 ΔOE 为 17094 cm^{-1} .

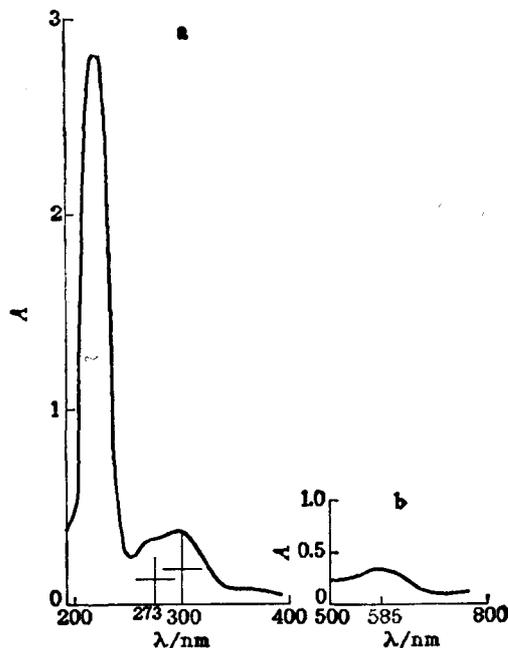


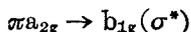
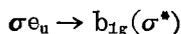
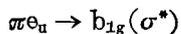
图3 (a) 无 Cl^- 存在下顺铂的紫外光谱 (b) 在 Tris-HCl 中顺铂的可见光谱
(曲线下十字解释同图2)

理论处理及讨论

结果表明, 在无 Cl^- 存在下, 顺铂和肌动蛋白的反应产物, 在紫外区有 $\text{L} \rightarrow \text{M}$ 电荷转移谱带. 根据谱带的数目和位置与理论计算峰值比较, 可以确定配合物中配位原子及其构型.

顺铂为 D_2 分子, 它的两个离去基团若被不同原子取代会使对称性进一步降低; 但是 Chatt 等^[5]对 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_n\text{Cl}_{4-n}]^{n-2}$ ($n=0-4$) 的 UV 谱研究表明, 当 n 从 0—4 变化时, 光谱形状大体相似, 带数相等, 仅 λ_{max} 有些差异. 因此可认为, 顺铂分子中一个或两个 Cl^- 被其它原子取代时, 只要是接近平面正方形构型, 应与按 D_{4h} 分子轨道理论推出的 $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ LMCT 允许跃迁一致.

图 4 给出了平面正方形 $\text{MX}_4(D_{4h})$ ($\text{X} = \text{Cl}^-, \text{Br}^-, \text{H}_2\text{O}, \text{NH}_3$) 分子轨道能级图, 由图 4 可知, 中心离子取平面正方形构型时允许的 LMCT 跃迁有^[6]:



其中 $a_{2g} \rightarrow b_{1g}(\sigma^*)$ 跃迁可能是 e_u 电子振动活化所致^[6].

顺铂在无 Cl^- 存在下, 配位的 Cl^- 可以被溶剂水取代, 在 pH 7.4 的磷酸缓冲溶液中的光谱有三个吸收带, 可估计其水解物仍取平面正方形构型.

顺铂和肌动蛋白作用后的光谱有四个吸收带, 如其作用产物仍取平面正方形, 则溶液中可能含两种或更多种物种, 当然还不能排除形成五配位的配合物的可能.

d^8 组态中心离子形成 M-P (P 代表蛋白) 配合物时, LMCT 跃迁能 E 的近似方程为^[7]:

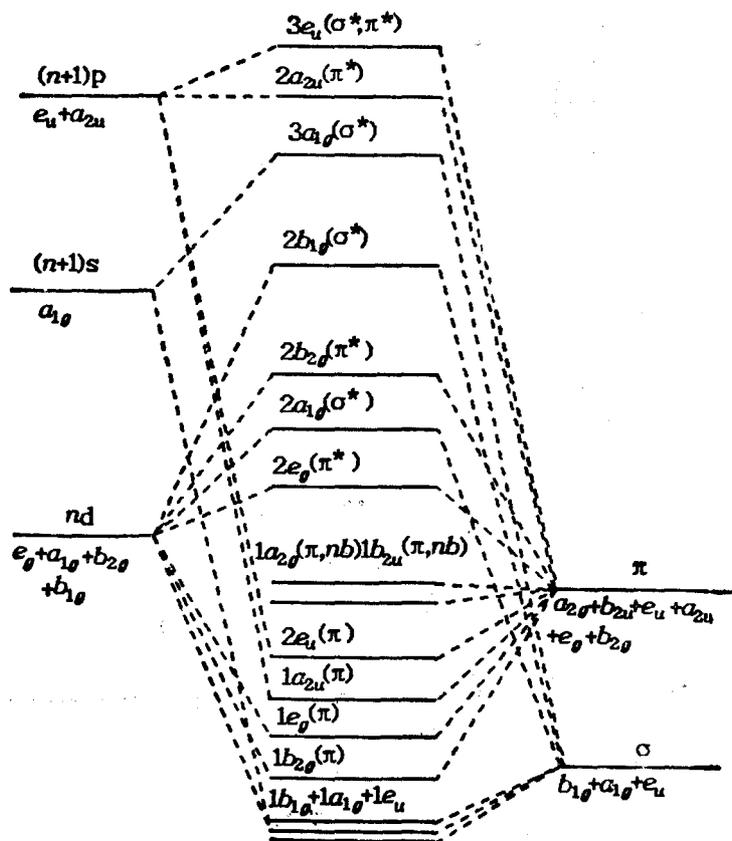


图4 平面正方形分子轨道能级图

$$E_{LMCT(\text{cm}^{-1})} = 3 \times 10^4 [X_L - X_M] + \Delta OE - \frac{4}{3} D \quad (1)$$

其中 X_L 和 X_M 是配位基团和中心离子轨道的光学电负性，在不同构型中不同 X_L 和 X_M 已有报道^[6]，我们从顺铂 d-d 跃迁求得 ΔOE 为 17094 cm^{-1} 。按理论推算^[6]，如果 Pt^{2+} 为五配位的四方锥形时， ΔOE 值为 13504 cm^{-1} ； D 为 Racah 参数，其值约等于 $7B$ ^[6]；对 Pt^{2+} ， $B = 600 \text{ cm}^{-1}$ ^[6]；在配位状态下， B' 取值为 $0.8B$ ^[6]。 $-\frac{4}{3} D$ 反映了跃迁前后自旋成对能变化，一般只考虑中心离子由 d^n 形成 d^{n+1} 组态时的变化。将上述参数值和轨道光学电负性 X_L 和 X_M 的文献值^[6]代入公式(1)，计算出不同配位原子与 Pt^{2+} 结合时产生的吸收带波长值。表1和表2列出分别按四配位平面正方形和五配位四方锥形算出的结果。

表1 与 Pt^{2+} 结合的不同配位原子按平面正方形计算得到吸收谱带波长

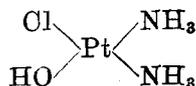
配位原子	S	NH_2R	Cl	OR	NH_3
吸收峰位 (nm)	370	252	298	273	230

表2 与 Pt^{2+} 结合不同配位原子按五配位(四方锥形)计算得到的吸收谱带波长

配位原子	S	Cl	OR	NH_2R	NH_3
吸收峰位 (nm)	421	333	302	273	256

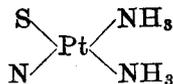
与表1、2比较，可知顺铂在 pH 7.4 (磷酸缓冲液)中所表现的三个 LMCT 谱带 230 nm，

273 nm 和 300 nm 依次相当于 Pt^{2+} 与氨分子、氧原子和氯离子配位:



此形式符合在无外加 Cl 抑制水解情况下顺铂的化学活性^[10].

将顺铂与肌动蛋白作用后 LMCT 光谱的吸收带波长与理论计算值(表 1 和表 2)比较, 可见与表 1 吻合, 说明在顺铂与肌动蛋白作用后, Pt 配位仍取平面正方形, 除两个 NH_3 仍与铂配位外, 还有 S, NH_2R 或 OR 可能配位. 现有很多的报告指出, 蛋白质与 Pt 最易形成 Pt—S 键, Pt—N 键次之. 因此配位形式应为:



由于谱带数目为 4, 而配合物是四配位的, 可知在顺铂-肌动蛋白反应后溶液中物种不是单一的. 因有表征 Pt—O 配位的谱带, 故不能排除有以下形式



从蛋白质是多配位大分子配体来看, Pt 以不同方式配位是可以理解的.

参 考 文 献

- [1] Wang, K., *Pure Appl. Chem.*, **1988**, *60*, 1279.
- [2] 罗世荣, 陶家平, 何其华, 李 华, 杨 芳, 苏雅娟, *生物化学与生物物理进展*, **1991**, *18*, 200.
- [3] Pardee, J. D.; Spudich, J. A. "*Method in cell biology*", Vol. 24, Academic Press, New York, **1982**, p. 277.
- [4] 张永锋, 李健民, *计算机与应用化学*, **1994**, *1*, 235.
- [5] Chatt, J.; Gamlen, G. A.; Orgel, L. E., *J. Chem. Soc.*, **1958**, 486.
- [6] Lever, A. B. P., "*Inorganic Electronic Spectroscopy*", 2nd Edn., Elsevier, Amsterdam, **1984**, p. 203.
- [7] (a) Jorgensen, C. K., "*Orbital in Atoms and Molecules*", Academic Press, London, **1962**, p. 80.
(b) 周永洽, 胡绪英, 车云霞, 申洋文, *化学学报*, **1991**, *49*, 59.
- [8] 张洋麟, 康 衡, "配位化学", 中南工业大学出版社, 湖南, **1986**, p. 247.
- [9] 山崎一雄, 山寺秀雄, "无机化学全书"别卷, 错体(上), 丸善株式会社, 东京, **1977**, p. 69.
- [10] Baslo, F.; Pearson, R. G. 著, "无机反应机理", 陈荣梯, 姚允斌译, 科学出版社, 北京, **1987**, p. 211.

Study on the Binding Mode of *cis*-Platin to F-Actin on the Basis of LMCT Spectra

Wang, Kui Zeng, Hui-Hui* Wang, Jian Li, Rong-Chang

(School of Pharmaceutical Science Beijing Medical University, Beijing, 100083)

Abstract

The binding mode and configuration of *cis*-dichloro diammino platinum (II) with F-actin were studied on the basis of charge transfer bands in the electronic spectra of *cis*-platin and *cis*-platin—F-actin. The spectra were resolved to individual absorption bands and were compared with the calculated values corresponding to different binding configurations and ligating atoms. The results indicate a square planar configuration with two ammonia nitrogen, one sulfur and one amino nitrogen binding to platinum.