

## 全反式维甲酸合钐( )配合物与 DNA 作用的研究

宋玉民<sup>\*,a</sup> 杨培菊<sup>a</sup> 王流芳<sup>b</sup> 杨美玲<sup>a</sup> 康敬万<sup>a\*</sup>

(<sup>a</sup> 西北师范大学化学化工学院 兰州 730070)

(<sup>b</sup> 兰州大学应用有机国家重点实验室 兰州 730000)

**摘要** 以荧光法、粘度法和圆二色谱法研究了全反式维甲酸合钐( )配合物与 DNA 的作用. 结果表明, 该配合物可使 DNA 的粘度增加, 引起 DNA 圆二色谱中的负峰发生较大变化, 使 EB-DNA 体系的荧光强度降低, DNA 热变性温度升高. 该配合物的荧光强度在 DNA 存在时有较大的增加. 据此推断, 该配合物主要以嵌入方式与 DNA 作用, 这种作用方式可能是该配合物对 HL-60, EJ 癌细胞瘤株有较强抑制作用的原因之一.

**关键词** 全反式维甲酸合钐( ), 小牛胸腺 DNA, 溴化乙锭

## Study on the Interactions between Sm(RA)<sub>2</sub>·Ac 4H<sub>2</sub>O and DNA

SONG, Yu-Min<sup>\*,a</sup> YANG, Pei-Ju<sup>a</sup> WANG, Liu-Fang<sup>b</sup> YANG, Mei-Ling<sup>a</sup> KANG, Jing-Wan<sup>a</sup>

(<sup>a</sup> College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070)

(<sup>b</sup> State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

**Abstract** The interactions between the Sm( ) complex with all-trans retinoic acid [Sm(RA)<sub>2</sub>·Ac 4H<sub>2</sub>O] and calf thymus DNA have been studied by using fluorimetric, viscometric and CD (circular dichroism) methods. DNA has different viscosity, denatured temperature and spectral characteristics in the absence and presence of the complex. Increasing fluorescence is observed for the complex with DNA addition. Quenching fluorescence is also observed for EB-DNA system when the complex is added. The results suggested that the complex can bind to DNA mainly by intercalation, which may be the one of the reasons that the complex can inhibit the HL-60, EJ cancer cell.

**Keywords** Sm(RA)<sub>2</sub>·Ac 4H<sub>2</sub>O, calf thymus DNA, ethidium bromide

通常认为, 小分子与 DNA 的非共价键作用有三种方式: 嵌入作用、沟槽作用和静电结合<sup>[1]</sup>. 研究药物小分子与 DNA 的相互作用方式可以从分子水平上了解抗癌药物的作用机理, 探讨小分子抗癌活性不同的成因以及与 DNA 作用方式之间的联系, 为设计低毒高效的抗癌药物提供理论和实验基础. 研究小分子与 DNA 作用方式的最为广泛和有效的方法是使用光谱法, 因为 DNA 分子中的碱基具有光学活性, 许多小分子本身具有光学活性, 或与 DNA 结合后产生光学活性. 但对于一些吸收光谱比较弱, 或由于其电子跃迁谱带与 DNA 的谱带发生重叠, 而无法用光谱方法来研究的分子, 只要具有一定的电活性, 就有可能用直接或间接的电化学方法进行研究, 获得其它许多方法无法得到的信息. 例如, 基于 DNA 修饰电极发展起来的表面电化学方法, 具有简便、可

靠、DNA 用量少等优点<sup>[2]</sup>. 此外, 还有许多其它物理方法用于研究小分子与 DNA 作用的机理, 如平衡渗析、凝胶电泳及核磁共振方法. 应用核磁共振方法可以对小分子中金属离子与 DNA 作用的结合位点做出较准确的判断<sup>[3]</sup>.

维生素甲类化合物对前白血病及早幼粒白血病有治疗作用<sup>[4]</sup>. 但长期大量服用维生素甲可引起严重中毒, 不能推广使用<sup>[5]</sup>. 只有毒性小的维生素甲酸衍生物才能适用于人群癌症的治疗. 目前关于维生素甲酸抗肿瘤研究国内已有报道, 但全反式维甲酸与稀土及过渡金属配合物的合成及其抗癌活性报道甚少.

根据稀土离子具有抗炎、杀菌、镇痛的药理作用, 本课题组合成了维甲酸与稀土元素的配合物, 并对其抗肿瘤活性进行了体外实验<sup>[6]</sup>. 部分配合物可抑制 EJ 细胞 HL-60 及 K562

\* E-mail: Songym@nwnu.edu.cn

Received January 27, 2003; revised and accepted April 21, 2003.

甘肃省自然科学基金 (No. ZS021-A25-005-Z) 和西北师范大学科技创新工程基金资助项目.

细胞的增殖,使  $P_{21}$ ,  $P_{53}$  基因表达下降,部分新配合物对超氧阴离子自由基及羟基自由基的清除作用强于配体.其中以钐(Ⅱ)、钐(Ⅲ)的配合物对 HL-60, E 癌细胞瘤株的抑制作用强于配体维甲酸<sup>[6]</sup>.据报道配合物具有比配体单一有效成分更显著的药效,一些抗炎、抗凝血药物与稀土配位后可以增强其疗效<sup>[7]</sup>.生物学实验表明,DNA 是许多抗癌药物在体内的主要靶分子.对这种疗效的增强与其配合物与 DNA 的作用方式之间联系报道不多.本文采用了荧光法、粘度法和圆二色谱法研究了抗肿瘤活性较高的全反式维甲酸合钐(Ⅱ)配合物  $[Sm(RA)_2 \cdot Ac \cdot 4H_2O]$  与 DNA 在生理条件下的相互作用,试图从分子水平上探讨配体配合物抗肿瘤活性不同的成因以及 DNA 作用方式之间的联系.

## 1 实验

### 1.1 主要仪器及试剂

RF-540 荧光分光光度计(日本岛津公司),UV-3400 紫外分光光度计(日本岛津公司),pHS-3C 型酸度计(上海第二分析仪器厂),乌贝路德粘度计,小牛胸腺 DNA(CT DNA 华美生物工程公司),UV 谱测定  $A_{260}/A_{280}$  大于 1.8,溴化乙锭(EB)购自华美生物工程公司,其它试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水,缓冲溶液为 50 mmol/L Tris-5 mmol/L NaCl, pH = 7.08 的溶液.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA 对 $Sm(RA)_2 \cdot Ac \cdot 4H_2O$ 配合物荧光光谱的影响

称取一定量的钐(Ⅱ)配合物,先用 DMF 溶解,后加入缓冲溶液,配制成浓度为  $1 \times 10^{-3}$  mol/L 的溶液.取该溶液 3 mL,在激发波长为 424 nm,激发狭缝和发射狭缝为 10 nm 条件下扫描其荧光光谱.在该溶液中加入不同量的 DNA ( $2 \times 10^{-3}$  mol/L) 溶液,摇匀 0.5 h 后在上述条件下扫描  $Sm$ -DNA 体系荧光发射谱图.

#### 1.2.2 $Sm$ 配合物对 EB-DNA 体系荧光强度的影响

在 EB-DNA 体系 ( $c_{EB}/c_{DNA} = 10$ ) 中,加入不同量的  $Sm$  配合物,0.5 h 后,在上述条件下扫描其荧光发射谱图.

#### 1.2.3 EB 对 $Sm$ (Ⅱ)配合物-DNA 体系荧光强度的影响

在  $Sm$ (Ⅱ)配合物-DNA ( $c_{Sm}/c_{DNA} = 10$ ) 体系中,加入不同量的 EB ( $1 \times 10^{-3}$  mol/L),0.5 h 后,在给定的条件下扫描其荧光发射谱图.

#### 1.2.4 粘度研究

取 DNA ( $2 \times 10^{-3}$  mol/L) 溶液 7.5 mL,加入不同量的  $Sm$ (Ⅱ)配合物和缓冲溶液,溶液的总体积为 15 mL,混合后分别于 1 h, 48 h, 96 h 测其粘度.采用同样的方法配制 EB-DNA 溶液,在相应时间测其粘度.

#### 1.2.5 热变性研究

配制 DNA-EB 溶液 ( $c_{DNA}/c_{EB} = 20$ ) 和 DNA-EB- $Sm$ (Ⅱ)配合物溶液 ( $c_{DNA}/c_{EB} = 20$ ,  $c_{EB} = c_{Sm}$ ) 在不同温度下测其荧光强度.

#### 1.2.6 $Sm$ (Ⅱ)配合物对 DNA 的 CD 谱的影响

取浓度为  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 的 DNA 溶液,扫描其 CD 谱,加入 0.1 mL  $Sm$  配合物溶液 ( $1 \times 10^{-4}$  mol/L) 反应 0.5 h 后再扫描其 CD 谱图.

## 2 结果与讨论

### 2.1 DNA 对 $Sm$ (Ⅱ)配合物荧光强度的影响

在 DNA 存在下, $Sm$ (Ⅱ)配合物的荧光光谱图如图 1 所示.由图 1 可以看出,在 DNA 的存在下, $Sm$ (Ⅱ)配合物的荧光强度有较大增加,发射峰位没有发生变化,产生了明显的增色效应.增色效应是由于 DNA 碱基与嵌入其间的小分子产生电子相互作用引起的<sup>[8,9]</sup>. $Sm$ (Ⅱ)配合物是不溶于水的,当进入到 DNA 的疏水区域时,减小了水分子对其的碰撞,也可导致荧光强度的增加.DNA 的加入引起  $Sm$ (Ⅱ)配合物荧光强度增加的现象,和已知的一些嵌入试剂在 DNA 存在时荧光强度增加的现象是一致的<sup>[10,11]</sup>,由此初步推测, $Sm$ (Ⅱ)配合物可能嵌入到 DNA 碱基对中.

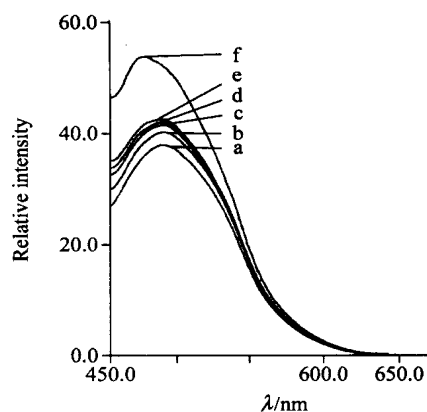


图 1  $Sm$  配合物的荧光光谱图

Figure 1 Fluorescence spectra of  $Sm$ (Ⅱ) complex [ $Sm(RA)_2 \cdot Ac \cdot 4H_2O$  system (excited at 424 nm, 3 mL solution)]

a— $1 \times 10^{-3}$  mol/L  $Sm(RA)_2 \cdot Ac \cdot 4H_2O$ ; b—a+0.1 mL DNA ( $1 \times 10^{-3}$  mol/L); c—a+0.2 mL DNA; d—a+0.3 mL DNA; e—a+0.4 mL DNA; f—a+0.5 mL DNA.

### 2.2 $Sm$ (Ⅱ)配合物对 EB-DNA 体系荧光强度的影响

EB 本身的荧光很弱,但嵌入 DNA 双螺旋结构后荧光强度显著增强.如果在 EB-DNA 体系中加入的有机小分子 M 也能与 DNA 发生类似于 EB 的嵌入作用,这个小分子就会与 EB 竞争同 DNA 的结合位点,使 EB-DNA 体系的荧光强度减弱.一般认为当 EB-DNA 体系的荧光强度减弱 50%,且  $c_M/c_{DNA} < 100$  时,M 与 DNA 发生了类似于 EB 的嵌入作用<sup>[12,13]</sup>. $Sm$ (Ⅱ)配合物对 EB-DNA 体系荧光强度影响的结果如图 2 所示,在不同量的  $Sm$ (Ⅱ)配合物存在下,EB-DNA 体系的最大发射波长没有发生移动,其荧光强度随 ( $c_{Sm}/c_{DNA}$ ) 的比值  $R$  的增大而减小.从实验中发现,当  $R = 15$ , EB-DNA 体系的

荧光强度已降到了原来的 50 % 以下,说明  $\text{Sm}(\text{ })$  配合物发生了类似于 EB 的嵌入作用.  $\text{Sm}(\text{ })$  配合物的加入,取代了 EB-DNA 复合物体系中的相当数量的 EB 分子,导致了 EB-DNA 体系荧光强度的较大降低,说明配合物与 EB 发生了相当程度的竞争反应.

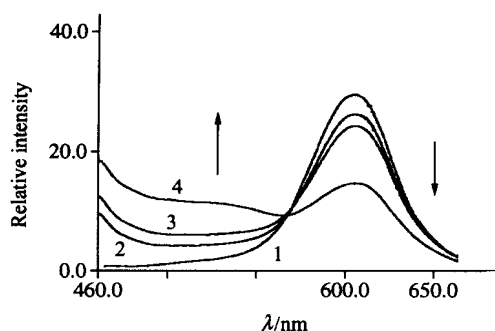


图 2  $\text{Sm}$  配合物对 EB-DNA 体系荧光光谱的影响图

**Figure 2** Effect of  $\text{Sm}(\text{III})$  complex on the emission spectra [EB-DNA system ( $5 \times 10^{-4}$  mol/L DNA,  $1 \times 10^{-3}$  mol/L EB) in the absence (1) and presence (2, 3, 4) of increasing amounts of  $1 \times 10^{-3}$  mol/L  $\text{Sm}(\text{RA})_2 \cdot \text{Ac} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.025 mL per scan), sample excited at 424 nm]

### 2.3 EB 对 $\text{Sm}(\text{III})$ 配合物-DNA 体系荧光强度的影响

为了进一步考察  $\text{Sm}(\text{III})$  配合物与 DNA 的作用方式,在  $\text{Sm}(\text{III})$  配合物-DNA ( $c_{\text{Sm}}/c_{\text{DNA}} = 10$ ) 体系中加入 EB,结果如图 3 所示.当加入 EB 时,发现  $\text{Sm}(\text{III})$  配合物-DNA 体系的发射波长没有发生变化,其荧光强度随 EB 的增加而下降.而在 590 nm 处出现了 EB-DNA 体系的荧光发射峰,峰强度随着 EB 的增加而迅速增大.加入 EB 使得  $\text{Sm}(\text{III})$  配合物-DNA 体系荧光强度降低,说明 EB 分子可能取代了  $\text{Sm}(\text{III})$  配合物

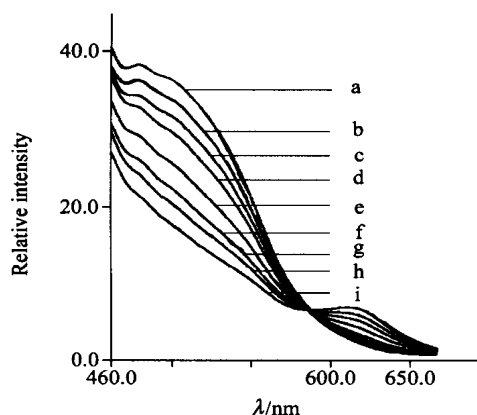


图 3 EB 对  $\text{Sm}$  配合物-DNA 体系荧光光谱的影响

**Figure 3** Effect of EB on the emission spectra of  $\text{Sm}(\text{III})$  complex-DNA system (excited at 424 nm, 5 mL solution)

a— $1 \times 10^{-4}$  mol/L DNA,  $1 \times 10^{-3}$  mol/L  $\text{Sm}(\text{RA})_2 \cdot \text{Ac} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; b—a + 0.025 mL EB; c—a + 0.075 mL EB; d—a + 0.125 mL EB; e—a + 0.225 mL EB; f—a + 0.325 mL EB; g—a + 0.425 mL EB; h—a + 0.525 mL EB; i—a + 0.625 mL EB

DNA 体系中部分配合物分子,形成了 EB-DNA 复合物体系,导致了  $\text{Sm}(\text{III})$  配合物-DNA 体系荧光强度的降低和标志 EB-DNA 新体系形成的新峰的出现. EB 能使  $\text{Sm}(\text{III})$  配合物-DNA 体系在 490 nm 处的荧光产生猝灭现象,而且猝灭程度随 EB 浓度的增加而加大,由此推断,  $\text{Sm}(\text{III})$  配合物与 DNA 的作用方式与 EB 与 DNA 作用方式应该是相似的,均为嵌入方式<sup>[2]</sup>.

### 2.4 EB 和 $\text{Sm}(\text{III})$ 配合物对 DNA 粘度的影响

当 DNA 与药物发生插入模式作用时, DNA 的双螺旋结构更加稳定,并且链增长,因此相对粘度有明显地升高<sup>[14]</sup>.为进一步确定  $\text{Sm}(\text{III})$  配合物与 DNA 的作用方式,用乌贝路德粘度计在 20 测定了 DNA 在 EB,  $\text{Sm}(\text{III})$  配合物存在时的粘度变化,结果列于表 1.

表 1 DNA 相对粘度的变化

**Table 1** Variation of the relative viscosity of DNA with the concentration of EB and  $\text{Sm}(\text{III})$  complex

$c/ (10^{-4} \text{ mol L}^{-1})$		$\frac{\eta}{\eta_0}$		
		1 h	48 h	96 h
EB	0.0	1.000	1.000	1.000
	1.0	1.136	1.181	1.302
	2.0	1.287	1.337	1.468
	3.0	1.336	1.451	1.590
	4.0	1.469	1.455	1.736
Sm	0.0	1.000	1.000	1.000
	1.0	1.040	1.116	1.315
	2.0	1.094	1.168	1.357
	3.0	1.116	1.217	1.418
	4.0	1.118	1.211	1.435

<sup>a</sup> 相对于  $10^{-3}$  mol/L DNA.

由表 1 可以看出, DNA 的相对粘度随着 EB 和  $\text{Sm}(\text{III})$  配合物浓度的增加而增大,说明  $\text{Sm}(\text{III})$  配合物与 DNA 的作用方式确实类似于 EB 与 DNA 的作用方式,为嵌入式.在相同浓度下 EB 存在时, DNA 相对粘度的增加要比  $\text{Sm}(\text{III})$  配合物存在下的要大,说明  $\text{Sm}(\text{III})$  配合物的嵌入作用比 EB 的嵌入作用要弱.这和  $\text{Sm}$  配合物与 EB 竞争结合 DNA 的荧光法试验结果是一致的.

### 2.5 DNA 热变性研究

由于 EB 这类嵌入试剂的作用能增加 DNA 双螺旋构象的稳定性,并使 DNA 的变性温度  $T_m$  值显著上升<sup>[15,16]</sup>.配制一组 DNA-EB 溶液,配制一组 DNA-EB- $\text{Sm}(\text{III})$  溶液,由水浴加热,从 20 升温至 96,每隔 5 测量体系的荧光强度,并以  $F_{20}/F_t$  对  $t$  作热变性曲线,得到 DNA 与 EB 结合时的变性温度  $T_m$  为 84,而在加入配合物后,  $T_m$  为 88.说明配合物的加入,增加了双螺旋构象的稳定性.

### 2.6 CD 法研究 $\text{Sm}$ 配合物与 DNA 的相互作用

CD 光谱是研究有机化合物和生物大分子的构型构象和三维空间结构的强有力工具,可根据 DNA 的 CD 光谱在其它

药物分子存在时的外型变化,判断药物与 DNA 的作用方式<sup>[11,17]</sup>. DNA 的 CD 谱中处于 275 nm 的正峰是由碱基的堆积而产生的,处于 245 nm 处的负峰则是由于 DNA 螺旋结构产生的<sup>[18]</sup>. 图 4 是 DNA 和 Sm(Ⅱ)配合物-DNA 的 CD 谱图. 加入 Sm(Ⅱ)配合物后, DNA 的 CD 谱图发生了明显的变化. 242 nm 处的负峰几乎全部消失,说明 Sm(Ⅱ)配合物的加入使 DNA 双螺旋解开,构象发生了改变,分子出现变性<sup>[11]</sup>. 而正峰强度有所增加. DNA 正峰的增加可能是配合物的插入增加了 DNA 稳定性所致.

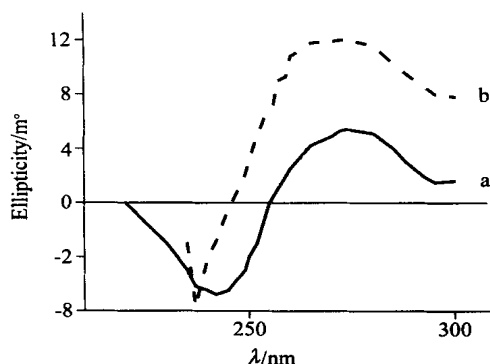


图 4 Sm 配合物对 DNA 的 CD 谱的影响

Figure 4 Sm complex effect on CD spectra of calf thymus DNA  
a—DNA ( $1 \times 10^{-4}$  mol/L); b—a + Sm(RA)<sub>2</sub>·Ac·4H<sub>2</sub>O

## 2.7 荧光猝灭方式判断

测定不同浓度的 Sm(Ⅱ)配合物存在下 EB-DNA 体系的荧光强度和在不同浓度的 EB 存在下 Sm(Ⅱ)-DNA 体系的荧光强度,以  $F_0/F$  ( $F_0$  与  $F$  分别为猝灭剂不存在和存在时体系的荧光强度)对猝灭剂浓度  $[Q]$  作图,结果见图 5 和图 6. 根据经典的荧光猝灭理论<sup>[19]</sup>,无论静态猝灭或动态猝灭,  $F_0/F$  对猝灭剂浓度作图均应得到一条直线. 由图 5, 6 看出,无论以 Sm(Ⅱ)配合物的浓度对 EB-DNA 体系荧光强度作图,还是以 EB 的浓度对 Sm(Ⅱ)配合物-DNA 体系的荧

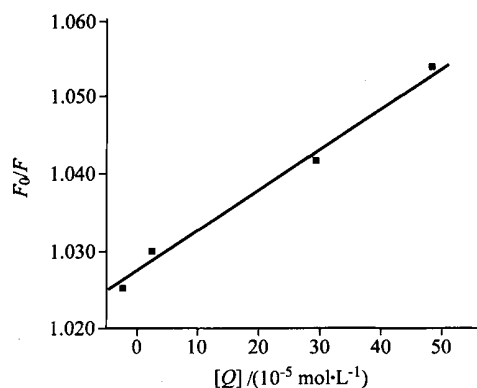


图 5 Sm 配合物对 EB-DNA 体系的荧光猝灭

Figure 5 Fluorescence quenching of SmrDNA system by EB

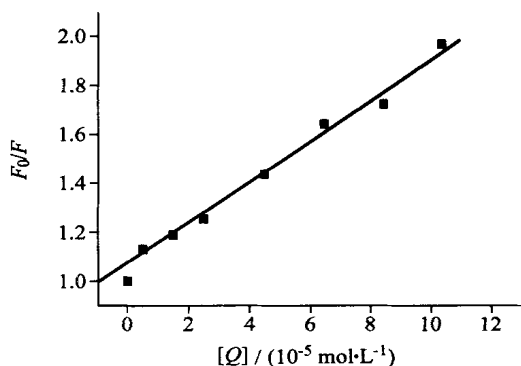


图 6 EB 的对 Sm 配合物-DNA 体系的荧光猝灭

Figure 6 Fluorescence quenching of EB-DNA system by Sm(RA)<sub>2</sub>·Ac·4H<sub>2</sub>O

光强度作图,实验得到的猝灭曲线均符合经典的猝灭理论, Sm(Ⅱ)配合物与 DNA 只存在一种主要的作用方式.

## 3 结论

本文结合光谱法及粘度法研究全反式维甲酸合钐(Ⅱ)配合物与 DNA 的相互作用. 结果表明,该配合物在 DNA 存在时的一些光谱性质类似于其它嵌入试剂<sup>[8~13]</sup>. 该配合物的存在还可以引起 DNA 粘度的增加和热变性温度的升高,这也是药物与 DNA 发生插入模式作用时引起 DNA 重要物理参数变化的反映之一<sup>[14~16]</sup>. 据此推测,该配合物主要以嵌入方式与 DNA 作用,这种作用方式可能是该配合物对某些癌细胞瘤株有较强抑制作用的原因之一. 本文的研究为从分子水平上探讨配体和配合物抗肿瘤活性不同的成因与 DNA 作用方式之间的联系提供了有价值的信息.

## References

- Kumar, C. V.; Asuncion, E. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8547.
- Zhang, R.-Y.; Pang, D.-W.; Cai, R.-X. *Chem. J. Chin. Univ.* **1999**, *20*, 1201 (in Chinese).  
(张蓉颖, 庞代文, 蔡汝秀, 高等学校化学学报, **1999**, *20*, 1201.)
- Yang, P.; Guo, M.-L.; Li, Q.-S.; Tian, Y.-N. *Sci. China, Ser. A* **1996**, *26*, 304.  
(杨频, 郭茂林, 李青山, 田燕妮, 中国科学(A 辑), **1996**, *26*, 304.)
- Han, R. *Acta Pharm. Sinica* **1984**, *19*, 555 (in Chinese).  
(韩锐, 药学报, **1984**, *19*, 555.)
- Cai, H.-F. *Acta Pharm. Sinica* **1981**, *16*, 678 (in Chinese).  
(蔡海芙, 药学报, **1981**, *16*, 678.)
- Liu, Y.-M.; Wang, Z.-P.; Zhang, Z.-H. *J. Coord. Chem.* **1999**, *4*, 44.

- 7 Jiang, D.-H. *Chin. J. Inorg. Chem.* **1995**, *11*, 15 (in Chinese).  
(蒋德和, 无机化学学报, **1995**, *11*, 15.)
- 8 Long, E. C.; Barton, J. K. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 271.
- 9 Chen, G.-Z.; Huang, X.-Z.; Xu, J.-G. *Fluorescence Analysis*, Science Press, Beijing, **1990**, p. 118 (in Chinese).  
(陈国珍, 黄贤智, 许金钩, 荧光分析法, 科学出版社, 北京, **1990**, p. 118.)
- 10 Yang, P.; Gao, F. In *Principle of Bioinorganic Chemistry*, Science Press, Beijing, **2002** (in Chinese).  
(杨频, 高飞, 生物无机化学原理, 科学出版社, 北京, **2002**.)
- 11 Lu, J.-X.; Zhang, G.-Z.; Huang, Z.-N.; Zhao, P. *Acta Chim. Sinica* **2002**, *60*, 967 (in Chinese).  
(卢继新, 张贵珠, 黄志娜, 赵鹏, 化学学报, **2002**, *60*, 967.)
- 12 Li, L.-S.; Huang, W.-D.; Wang, L.-P. *Acta Chim. Sinica* **2002**, *60*, 98 (in Chinese).  
(李来生, 黄伟东, 王丽苹, 化学学报, **2002**, *60*, 98.)
- 13 Li, W.-Y.; Zhu, S.-T.; He, X.-W. *Acta Chim. Sinica* **2002**, *60*, 105 (in Chinese).  
(李文友, 朱守田, 何锡文, 化学学报, **2002**, *60*, 105.)
- 14 Han, G.-Y.; Yang, P. *Acta Chim. Sinica* **2001**, *59*, 925 (in Chinese).  
(韩高义, 杨频, 化学学报, **2001**, *59*, 925.)
- 15 Chaires, J. B. *Biochemistry* **1986**, *25*, 8364.
- 16 Kumar, C. V.; Asuncion, E. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 854.
- 17 Peng, X.-B.; Cai, J.; Yuan, G.-Q. *Acta Chim. Sinica* **2001**, *59*, 746 (in Chinese).  
(彭小彬, 蔡洁, 袁高清, 化学学报, **2001**, *59*, 746.)
- 18 Wang, Z.-X.; Liu, D.-J.; Dong, S.-J. *Chin. J. Chem.* **2001**, *19*, 662.
- 19 Yang, P. *Introduction to Bioinorganic Chemistry*, Xi'an Jiaotong University Press, Xi'an, **1991**, pp. 155 ~ 156 (in Chinese).  
(杨频, 生物无机化学导论, 西安交通大学出版社, 西安, **1991**, pp. 155 ~ 156.)

(A0301274 SHEN, H.; LU, Z. S.)