

黄芩苷-金属配合物键合肝癌细胞 SMMC-7721 DNA 的微观电学机制研究

谭 贤, 郭 明*, 高小艳

浙江农林大学理学院, 浙江 临安 311300

摘要: **目的** 探讨黄芩苷-金属(钇、镧、铈, Y^{3+} 、 La^{3+} 、 Ce^{3+})配合物(baicalin-metal complexes, BMC)与肝癌细胞 DNA 结合能力的强弱。**方法** 以提取的 SMMC-7721 肝癌细胞 DNA 为靶点,采用循环伏安法和交流阻抗法研究 BMC 与 DNA 的相互作用,探讨二者的作用机制。**结果** BMC 与肝癌细胞 DNA 通过静电作用形成非电活性超分子化合物,结合数(m)为 1,结合常数(β_{BC})为 1.27×10^5 L/mol、 β_{BC-Y} 为 3.46×10^5 L/mol、 β_{BC-La} 为 6.24×10^5 L/mol、 β_{BC-Ce} 为 7.29×10^6 L/mol,黄芩苷(BC)与金属离子配位后与 DNA 的结合能力明显增强,强弱顺序: $BC-Ce > BC-La > BC-Y > BC$ 。**结论** BMC 进入细胞后与 DNA 结合,阻滞 DNA 的复制,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,进而表现出抗肿瘤活性。BMC 与 DNA 结合能力与其细胞毒性一致,具有关联性。

关键词: 黄芩苷; 金属配合物; 肝癌细胞; DNA; 电化学法; 钇; 镧; 铈

中图分类号: R917; R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)19-3447-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.19.016

Micro electrochemical mechanism of baicalin-metal complexes binding with hepatoma SMMC-7721 cell DNA

TAN Xian, GUO Ming, GAO Xiao-yan

School of Science, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an 311300, China

Abstract: Objective The correlation of baicalin-metal (Y^{3+} , La^{3+} , and Ce^{3+}) complexes (BMC) anti-tumor activity and the interactional ability of BMC binding with hepatoma SMMC-7721 cell DNA was investigated. **Methods** Hepatoma SMMC-7721 cells DNA was extracted as a target, cyclic voltammetry and AC impedance were utilized to study the interaction between BMC and DNA, and the interaction mechanism between BMC and DNA was explored. **Results** BMC and hepatoma SMMC-7721 cell DNA formed a non-electroactive supramolecular compounds through mixed-mode of electrostatic interaction, binding number $m = 1$, binding constant $\beta_{BC} = 1.27 \times 10^5$ L/mol, $\beta_{BC-Y} = 3.46 \times 10^5$ L/mol, $\beta_{BC-La} = 6.24 \times 10^5$ L/mol, and $\beta_{BC-Ce} = 7.29 \times 10^6$ L/mol. After BC binding with metal ions, its ability of binding to DNA significantly enhanced, and the strength order: $BC-Ce > BC-La > BC-Y > BC$. **Conclusion** The ability of BMC binding with DNA consists with its cytotoxicity. After BMC binding with SMMC-7721 cell DNA, it could inhibit the cell proliferation and lead to the cell apoptosis, which illustrates the BMC exhibits an anti-tumor activity. The relevant results have given a reference for the study on the new anti-tumor complexes of Chinese materia medica.

Key words: baicalin; metal complexes; hepatoma cells; DNA; electrochemical method; yttrium; lanthanum; cerium

黄芩苷是传统中药黄芩的主要成分,属于黄酮类化合物,分子结构中因含有羟基或羰基等基团而与金属离子有较强的螯合作用,目前已有关于黄芩苷-金属配合物(baicalin-metal complexes, BMC)的报道^[1-5],显示其具有清除自由基、抗氧化、抑菌等生物活性,但 BMC 抗肿瘤研究的文献报道尚少^[6-9],作用机制目前需进一步明确。

生物体内药物分子的生物活性功能是通过它们

与生物大分子的相互作用得以实现。因此,药物分子与生物大分子相互作用一直是药理研究的热点领域,也是人们探索药物分子的生物学效应和功能的基本途径之一^[10-12]。DNA 是生物体的基本遗传物质,为许多的抗癌、抗病毒药物在体内的主要靶向分子,药物分子与 DNA 相互作用后不同程度地导致 DNA 分子结构与功能的变化,进而对 DNA 的复制和表达等功能产生影响^[13-14],因此 DNA 与药物

收稿日期: 2016-04-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20877072); 浙江省科技计划资助项目(2010C33070)

*通信作者 郭 明,男,博士,教师,主要从事活性分子与生物大分子相互作用研究。E-mail: guoming@zafu.edu.cn

分子的相互作用研究对阐述药物的作用机制具有重要指导意义。

目前常用于药物与 DNA 相互作用的方法有紫外可见光谱分析、荧光分析、圆二色谱、线二色谱、凝胶电泳等^[15-19]，而电化学分析法具有灵敏度高、选择性好的特点，且电化学反应与生物反应的相似性使之可模拟生物体内的氧化还原反应，因此，电化学分析法在进行有关 DNA 研究方面，尤其在了解药物与 DNA 的作用机制方面体现了独特的优越性^[20-21]。

本实验以提取的肝癌细胞 DNA 为靶点，利用功能化的多壁碳纳米管 (F-MWCN) 修饰电极，研究合成制备的新型 BMC 与肝癌细胞 DNA 的相互作用，探讨二者的作用方式及机制，为新型抗肿瘤药物的设计提供一种新的思路。

1 材料

1.1 仪器

CHI660C 电化学工作站 (上海辰华仪器有限公司); 三电极系统: 修饰的 CHI104 玻碳电极 ($\Phi=3\text{ mm}$) 为工作电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂电极为对电极; SK3210HP 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); 电子分析天平 (Sartorius 公司); UV-2550 型紫外分光光度计; HF90 型二氧化碳培养箱 (力康生物医疗科技控股有限公司); Thermo Scientific 二级生物安全柜 (赛飞世尔科技公司); CKX31 型倒置显微镜 (Olympus 公司); Bio-Rad 680 酶标仪、Universal Hood II 型凝胶成像分析系统 (Bio-Rad 公司); MLS-3750 高压灭菌器 (Sanyo 公司); 3K15 型离心机 (Sigma 公司); 核酸蛋白分析仪 (Eppendorf 公司); DHG-9123A 电热恒温鼓风干燥箱 (上海恒科技有限公司)。

1.2 药物与试剂

黄芩苷 (质量分数 98%, 批号 93644-912, 上海金穗生物科技有限公司); $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Y}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 均购自于上海安耐吉化学有限公司。

黄芩苷与金属 (Y^{3+} 、 La^{3+} 、 Ce^{3+}) 配合物 (BC-Y、BC-La、BC-Ce) 为本实验室根据文献方法^[22-24]合成自制。

PBS 缓冲液 (0.5 mol/L 磷酸氢二钠与 0.5 mol/L 磷酸二氢钠溶液按不同体积比配制成不同 pH 值的 PBS 缓冲液); 改良型 RPMI 1640 培养基 (HyClone, 赛默飞世尔生物化学制品有限公司); 胰蛋白酶粉剂 (Gibco 公司), 使用前先用 PBS 缓冲液配制成

2.5 mol/L 存放于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 使用时稀释 10 倍; 胎牛血清 (FBS, HyClone, 上海超研试剂有限公司); $1\times\text{PBS}$ (NaCl 8.0 g、 KH_2PO_4 0.2 g、 KCl 0.2 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.58 g 溶解于三蒸水中, 搅拌定容至 1 L, 高温灭菌后于 $-4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用); DNA 提取试剂盒 (博迈德生物科技有限公司); $10\times\text{TBE}$ (Tris 碱 108 g、硼酸 55 g、EDTA 9.3 g, 蒸馏水配成 1 L, 使用时稀释成 $1\times\text{TBE}$)。

1.3 细胞

SMMC-7721 肝癌细胞购于复旦大学肿瘤医学库。

2 方法

2.1 细胞总 DNA 的提取及检验

2.1.1 细胞培养 将 SMMC-7721 细胞常规培养于含 10% FBS 及青霉素和链霉素各 100 U/L 的 RPMI 1640 培养液中, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度恒温培养箱中培养。细胞呈单层贴壁生长, 根据细胞生长状态和生长速度进行换液及传代。

2.1.2 细胞总 DNA 的提取 按试剂盒说明书, 提取细胞总 DNA, 对其进行纯度和浓度分析及 1% 的琼脂糖凝胶电泳观察。最终所得 DNA 于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.1.3 DNA 纯度及浓度检测 参照紫外分光光度计上的核酸分析软件进行。具体步骤如下: 以溶解 DNA 的灭菌水调零; 取 $1\text{ }\mu\text{L}$ 上述提取的 DNA 溶液与 $99\text{ }\mu\text{L}$ 的灭菌水混匀, 即稀释 100 倍, 260、280 nm 处测定样品的吸光度 (A_{260} 、 A_{280}) 值, 计算 DNA 的质量浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。

$$\text{DNA 的质量浓度} = A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 0.05$$

计算 A_{260}/A_{280} 值, 验证 DNA 的纯度 (纯净的 DNA, 其 A_{260}/A_{280} 值在 1.8 附近, 高于 1.8 说明 RNA 未除尽; 低于 1.8 说明有蛋白污染); 用灭菌水将提取的 DNA 稀释为 0.1 g/L, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.1.4 DNA 完整性检测 取 $5\text{ }\mu\text{L}$ 提取的 DNA, 加入 $6\times\text{Loading buffer}$ 上样缓冲液 $1\text{ }\mu\text{L}$, 混合后上样于 1% 琼脂糖凝胶上, 用 DNA Marker DL 2000 作为标准相对分子质量对照, 核酸染料染色, 120 V 电压, 电泳 30 min, 在紫外凝胶成像分析仪上观察、照相、记录。

2.2 BMC 电化学检测方法的建立

F-MWCN 修饰电极的制备: 10 mg 多壁碳纳米管 (MWCN) 溶于 50 mL 浓 HCl 中, 磁力搅拌下加热回流 7 h, 以去除金属催化剂。纯化后的 MWCN 置于 80 mL 酸液 (硝酸-硫酸 1:3) 中, 室温超声

反应 10 h。蒸馏水洗至中性，得到功能化的多壁碳纳米管 (F-MWCN) [25]，干燥成粉末。取 10 mg F-MWCN 溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺中，超声 20 min 使其分散均匀备用。玻碳电极分别用 0.3 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 粉末在抛光布上进行抛光，二次蒸馏水冲洗后将玻碳电极移入超声清洗仪中依次用二次蒸馏水、无水乙醇、二次蒸馏水超声清洗 (5 min/次)，室温晾干。取 5 μL F-MWCN 溶液滴涂至预处理好的玻碳电极表面，自然干燥制成 F-MWCN/GCE 修饰电极。

F-MWCN 修饰电极的表征：采用传统的三电极体系，以 5.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 为氧化还原探针，以修饰电极为工作电极，饱和甘汞电极为参比电极，铂丝为辅助电极，于 0.1 mol/L KCl 电解质溶液中，进行电化学阻抗表征。

BMC 检测方法：常温下，在 CHI660C 电化学分析仪上应用循环伏安法考察 1×10^{-4} mol/L BMC (BMC 的浓度均以黄芩苷计，下同) 在 0.1 mol/L Britton-Robinson (B-R, pH 5.4~8.0) 缓冲液、0.1 mol/L PBS (pH 5.4~8.0) 缓冲液、0.1 mol/L Tris-HCl (pH 5.4~8.0) 缓冲液中的伏安特性，筛选最佳电解质溶液。固定其他实验条件，循环伏安法考察溶液 pH 和扫速对电极响应信号的影响，确定最佳 pH 及扫速，建立 BMC 的检测方法。

2.3 BMC 与肝癌细胞 DNA 相互作用的性能分析

BMC 与 DNA 相互作用的检测指标：通过应用循环伏安法检测 DNA 与不同浓度 BMC 的相互作用，获得电子转移系数 (α) 和电子转移速率常数 (k_s) 及二者相互作用的结合数 (m) 和结合常数 (β)，进而分析 BMC 与 SMMC-7721 细胞 DNA 相互作用性能。

3 结果与分析

3.1 SMMC-7721 细胞总 DNA 的提取及检验

提取 SMMC-7721 细胞总 DNA，并进行凝胶电泳检测，结果见图 1。核酸电泳显示仅有一条亮带出现，且经紫外分光光度计检测得该 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值为 1.78，说明该 DNA 片段完整、纯度较高，满足后续实验要求。

3.2 BMC 的电化学分析方法考察

3.2.1 F-MWCN 修饰电极的表征 F-MWCN/GCE 修饰电极的交流阻抗表征结果见图 2。可知，a 为裸电极交流阻抗，界面电子传递阻力很大，b 为 F-MWCN 修饰电极，b 比 a 界面电子传递阻力明显

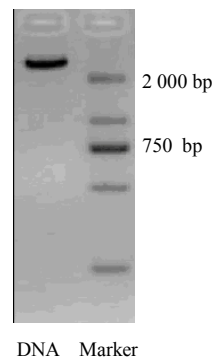


图 1 SMMC-7721 细胞总 DNA 提取的核酸电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of SMMC-7721 cells for DNA extraction

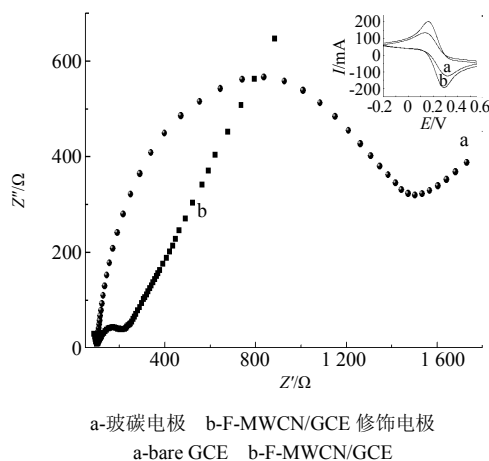


图 2 不同电极在含 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ -KCl 溶液中的交流阻抗图
Fig. 2 Electrochemical impedance spectrum of different modified electrodes measured in $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ -KCl solution

减少，这是因为功能化的碳纳米管极易被溶剂润湿，能形成较好的电极/溶液界面，能加速氧化还原物质与电极间的电子转移。由图 2 右上方的循环伏安图可知，F-MWCN 修饰电极具有更好的氧化反应可逆性，可用于电极检测反应。

3.2.2 检测方法的优化 实验考察了多种缓冲溶液作为支持电解质时 BMC 的电化学行为，结果显示，BMC (BC-Ce) 在 PBS 缓冲溶液中峰形对称，基线稳定，电极反应可逆性较好，因此实验选择 PBS 缓冲溶液为底液 (BC-Y、BC-La 的电化学行为相似)。BC-Ce 检测结果见图 3。

溶液的 pH 值是影响峰电流和峰电压的重要因素之一。本实验考察 BMC 在 PBS 缓冲溶液 (pH 5.4~8.0) 中的伏安特性，结果见图 4。

如图 4 所示， I 随溶液 pH 值的增大先增大后减小，当 pH 值为 7.4 时 BMC (BC-Ce) 的 I 出现最大值，且峰形对称性最好，可逆性最好，因此本实

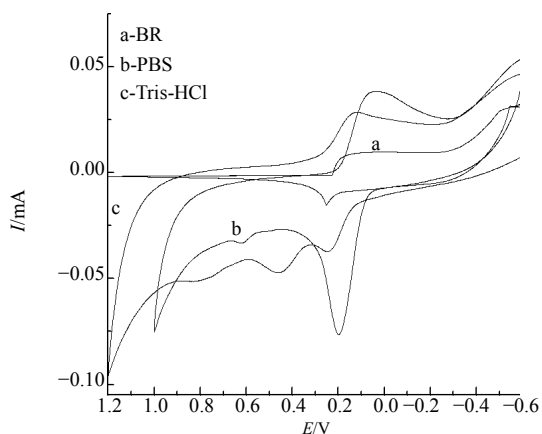


图 3 不同缓冲液循环伏安图 ($C_{BC-Ce}=3.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$)
 Fig. 3 Cyclic voltammogram of various buffers ($C_{BC-Ce} = 3.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$)

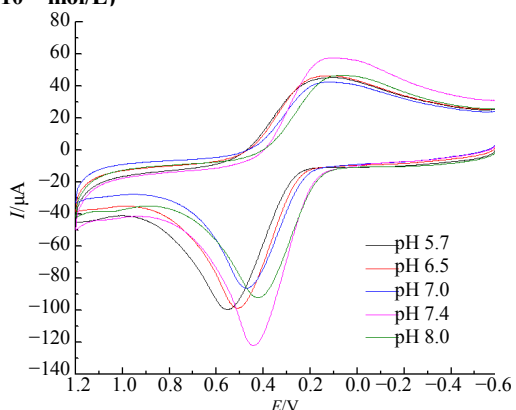


图 4 BMC (BC-Ce) 在不同 pH 的 PBS 缓冲溶液中的循环伏安图 ($C_{BC-Ce}=3.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$)

Fig. 4 Cyclic voltammogram of BMC (BC-Ce) in various PBS buffer solutions with different pH values ($C_{BC-Ce} = 3.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$)

验选择在 pH 值 7.4 的 PBS 缓冲溶液中实验。

扫描速率 (50、100、150、200、250、300、350、400 mV/s) 对 BMC 在电极上响应信号的影响结果见图 5。随着扫速的增加, BMC 的峰电流均相应增加, 峰电流与扫描速率的一次方呈良好的线性关系, 说明 3 种配合物在 F-MWCN 修饰电极表面均发生了受吸附控制的氧化还原反应。本实验均在最佳条件下进行。

3.3 BMC 与 DNA 的相互作用分析

根据建立的方法体系, 检测不同浓度 DNA (0、5、10、20、30、40、50 mol/L) 与 BMC 在 F-MWCN/GCE 电极上的循环伏安曲线, 结果见图 6。以 DNA 浓度为横坐标, E_{pc} 为纵坐标, 进行线性拟合, 结果见图 7 和表 1。

由图 6 可知, $-0.3 \sim 0.6 \text{ V}$ 电位内 DNA 在 F-MWCN 修饰电极上几乎没有峰电流产生; 由前述

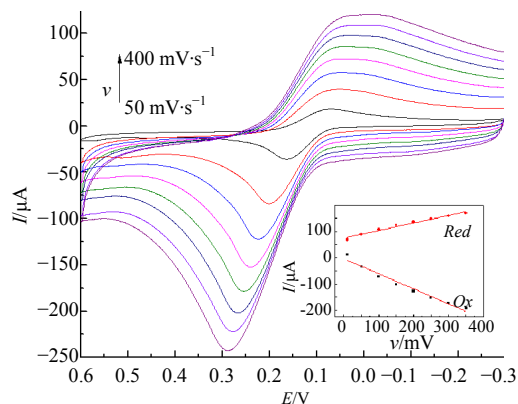


图 5 BMC (BC-Ce) 在不同扫描速率下的循环伏安图
 Fig. 5 Cyclic voltammogram of BMC (BC-Ce) at different scanning rates

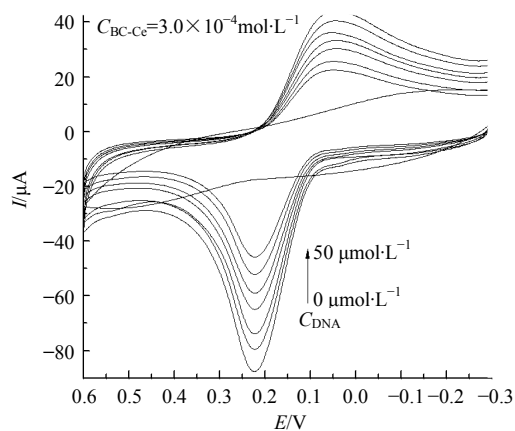


图 6 不同浓度 DNA 与 BMC 在 F-MWCN/GCE 电极上的循环伏安曲线

Fig. 6 Cyclic voltammograms of DNA and BMC at different concentration in F-MWCN/GCE electrode

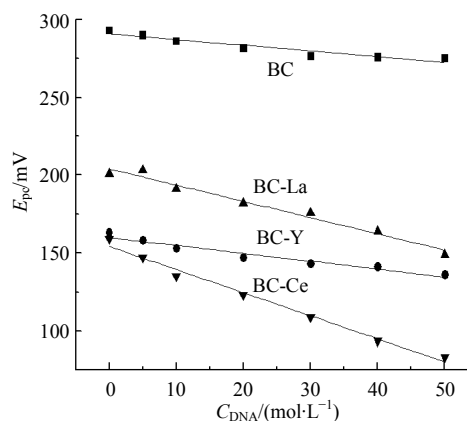


图 7 不同浓度 DNA 与 BMC 相互作用线性拟合
 Fig. 7 Linear fitting of interactions between DNA and BMC at different concentration

表 1 不同浓度 DNA 与 BMC 相互作用线性拟合

Table 1 Linear fitting of interactions between DNA and BMC at different concentration

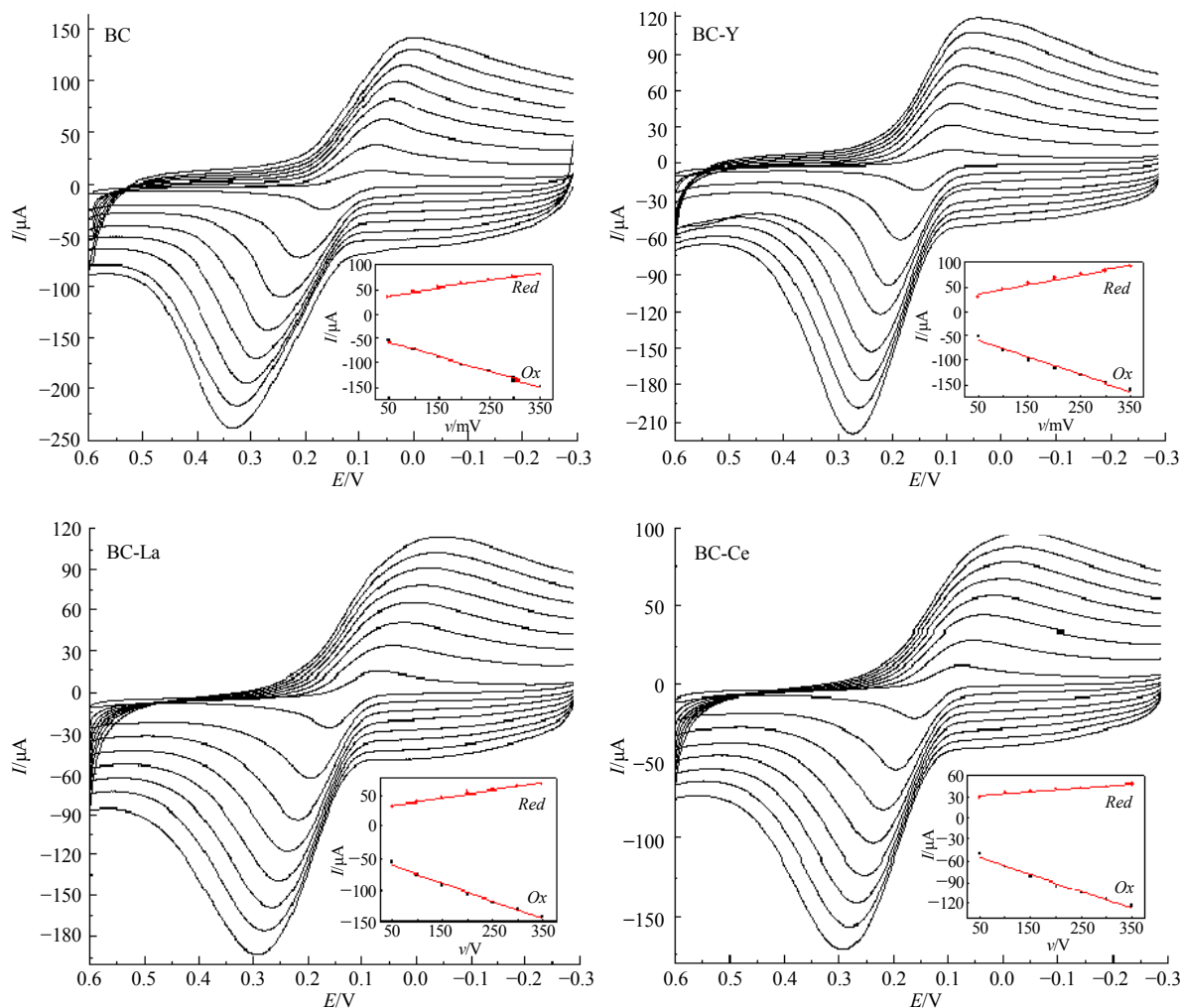
化合物	方程	<i>r</i>	标准差	<i>N</i>	<i>P</i>
BC	$E_{pc} = -0.363 0 C + 290.809 7$	0.9874	1.506 6	7	<0.001
BC-Ce	$E_{pc} = -1.484 2 C + 154.206 5$	0.9973	2.051 8	7	<0.001
BC-La	$E_{pc} = -1.044 0 C + 204.045 6$	0.9979	2.070 6	7	<0.001
BC-Y	$E_{pc} = -0.506 8 C + 159.936 8$	0.9988	1.448 9	7	<0.001

可知, BMC 本身可产生一对氧化还原峰; BMC 与 DNA 相互作用后, 其氧化还原峰电流均明显下降, 且随着 DNA 浓度的增大, 此现象更加明显, 呈现良好的线性拟合; 此外, 峰电位发生不同程度的位移。根据 Bard 理论^[26]: 当配合物与 DNA 发生作用时, 若峰电位负移, 说明配合物与 DNA 发生静电作用, 若峰电位正移, 则说明为插入作用。以此可判断出 BC 及 3 种 BMC 与 DNA 均发生了不同程度

的静电作用, 且静电作用大小依次为 BC-Ce、BC-La、BC-Y、BC。

3.4 BMC 与 DNA 相互作用机制的探讨

3.4.1 电子转移数(*n*)的测定 研究扫描速率(50、100、150、200、250、300、350、400、450、500 mV/s)对相互作用后电极响应信号的影响, 可求得 BMC 与 DNA 相互作用过程中的 *n*, 结果见图 8, 线性回归方程见表 2。



$C_{BMC} = 3.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, C_{DNA} = 5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

图 8 扫描速率对峰电流的影响

Fig. 8 Effect of scanning rates on peak current

表 2 扫描速率对峰电流影响数据的拟合方程

Table 2 Fitting equations of effect of scanning rates on peak current

化合物	方程	r	标准差	N	P
BC	$I_{pc}=0.1802v+42.7886$	0.9938	2.0100	7	<0.0001
	$I_{pa}=-0.3657v-43.0514$	-0.9980	1.9700	7	<0.0001
BC-Ce	$I_{pc}=0.0546v+29.7681$	0.9718	1.3266	7	<0.0001
	$I_{pa}=-0.2484v-41.0296$	-0.9918	3.2198	7	<0.0001
BC-La	$I_{pc}=0.1114v+29.9271$	0.9936	1.2653	7	<0.0001
	$I_{pa}=-0.2847v-446.1471$	-0.9939	3.1549	7	<0.0001
BC-Y	$I_{pc}=0.1912v+26.7081$	0.9832	3.5537	7	<0.0001
	$I_{pa}=-0.0347v-43.7031$	-0.9915	4.5494	7	<0.0001

结果表明,还原峰电流和氧化峰电流均随着扫描速率的增大而增强,且均与扫描速率呈良好的线性关系,说明 BMC 及 BC 与 DNA 相互作用后在 F-MWCN 修饰电极表面的电极反应没有多大变化,仍是受吸附控制。

根据 Laviron 理论^[27],BMC 及 BC 与 DNA 相互作用后在 F-MWCN 修饰电极上的吸附符合 Langmuir 吸附等温式,即

$$I_{pc} = \frac{n^2 F^2 A \Gamma_{\tau} v}{4RT} = \frac{nFQv}{4RT}$$

$Q=nFA\Gamma_{\tau}$ 为循环伏安单一过程的峰面积(以电量计),上式表明,无需知道电极表面吸附量及电极面积的绝对值,只需测得某扫描速率下循环伏安图上的峰面积即可求得 n 。实验在 100 mV/s 扫描速率下测得 BMC 与 DNA 相互作用后的 I_{pc} 和峰面积 A_h ,求得加入 DNA 后参与电极反应的电子数 $n=1$,见表 3。

表 3 BMC 与 DNA 相互作用的 I_{pc} 、 A_h 及 n

Table 3 I_{pc} , A_h , and n of interactions between DNA and BMC

化合物	$I_{pc}/\mu A$	$A_h/\mu C$	n
BC	5.737	4.902	1.201
BC-Ce	3.678	3.887	1.230
BC-La	4.099	4.662	0.903
BC-Y	4.662	3.611	1.045

表 4 扫速对峰电位影响数据的拟合方程

Table 4 Fitting equations of effect of scanning rates on peak potential

化合物	方程	r	标准差	N	P	$\Delta E_{pc}/V$	α	k_s/s^{-1}
BC	$E_{pc}=-0.0862\lg v+0.2295$	-0.9830	0.0161	7	<0.0001	0.113	0.27	1.17
BC-Ce	$E_{pc}=-0.0486\lg v+0.1224$	-0.9967	0.0039	7	<0.0001	0.068	0.65	0.33
BC-La	$E_{pc}=-0.0455\lg v+0.1189$	-0.9838	0.0083	7	<0.0001	0.077	0.44	0.57
BC-Y	$E_{pc}=-0.0581\lg v+0.1894$	-0.9927	0.0071	7	<0.0001	0.027	0.41	0.86

3.4.2 α 和 k_s 的测定 由上述可知, DNA 与 BMC 相互作用后为准可逆吸附反应,根据 Laviron 理论,可得公式:

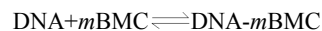
$$E_{pc} = E^0 - \frac{2.303RT}{\alpha nF} \lg v$$

电子转移速率常数 k_s 可由公式算出^[28]:

$$\lg k_s = \alpha \lg(1-\alpha) + (1-\alpha) \lg \alpha - \lg \frac{RT}{nFv} - \alpha(1-\alpha) \frac{nF\Delta E_{pc}}{2.303RT}$$

在一定的扫描速率范围内,以 E_{pc} 对 $\lg v$ 作图得一直线,由直线斜率求出 α ,进而计算出 k_s ,结果见表 4。表 4 对比表 2 发现,体系中加入 DNA 后,电化学参数 α 和 k_s 均发生了显著变化。由此可推断 BMC 及 BC 与 DNA 确实发生了一定的相互作用,且形成了一种非电活性的超分子化合物,从而使得溶液中游离的 BMC 及 BC 浓度减少,峰电流降低。

3.4.3 m 和 β 的测定 对于 BMC 及 BC 与 DNA 相互作用形成的非电活性超分子化合物,可根据参考文献报道^[29]求算其相互作用的 m 及其 β 。假设 BMC 及 BC 与 DNA 只形成缔合物 DNA- m BMC,即:



$$\beta = \frac{[DNA-mBMC]}{[DNA][BMC]^m}$$

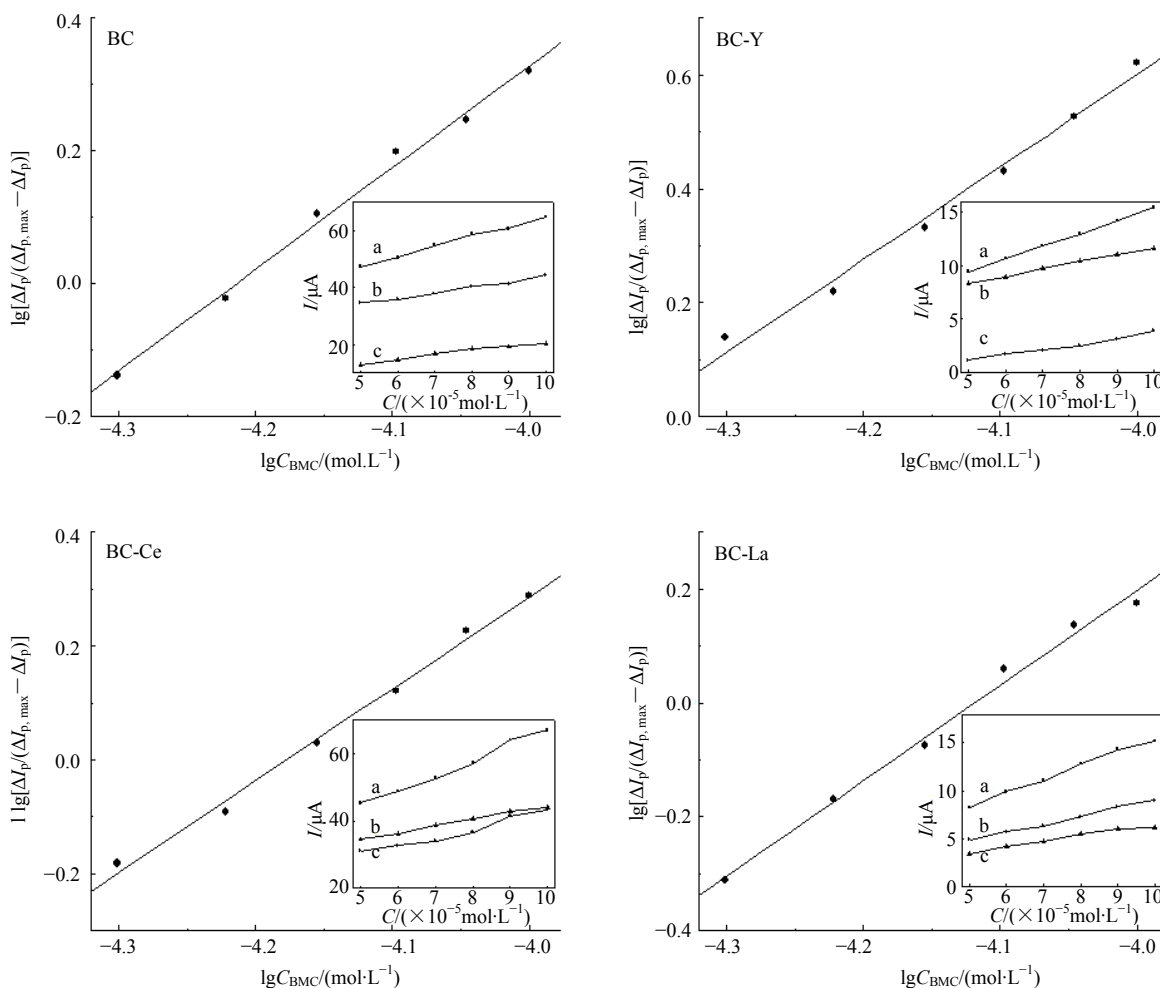
根据文献报道^[29]所导出的方程,可得到 BMC 与 DNA 作用过程符合公式:

$$\lg \frac{\Delta I_p}{\Delta I_{p,\max} - \Delta I_p} = \lg \beta + m \lg C_{\text{BMC}}$$

$\Delta I_{p,\max}$ 为加入 DNA 前后的最大峰电流差, ΔI_p 为加入 DNA 前后的峰电流差。做 $\lg [\Delta I_p/(\Delta I_{p,\max} - \Delta I_p)]$ 与 $\lg C_{\text{BMC}}$ 关系曲线, 根据斜率和截距可分别求出 m 和 β , 结果见图 9 和表 5。

根据斜率求得 BC 及 3 种 BMC 与 DNA 相互作用

的结合数 m 分别为 0.63、0.71、0.77、0.76, 表明 4 种物质与 DNA 可能形成 1:1 型的非电活性超分子化合物。为验证此推论的正确性, 设 m 分别为 1、2、3, 并对其分别作相应的 $1/\Delta I_p \sim 1/C_{\text{BMC}}$ m 关系曲线, 由直线的斜率和截距分别求出 $\Delta I_{p,\max}$ 和 β 。结果表明 4 种物质均在 $m=1$ 时, $\Delta I_{p,\max}$ 与实验所测数值接近, 因此 4 种物质均与 DNA 形成 1:1 复



a- $C_{\text{DNA}} = 0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ b- $C_{\text{DNA}} = 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ c- $\Delta I_p = I_{\text{pa}} - I_{\text{pc}}$

图 9 $\lg [\Delta I_p/(\Delta I_{p,\max} - \Delta I_p)]$ 与 $\lg C_{\text{BMC}}$ 的关系图

Fig. 9 Relationship between $\lg [\Delta I_p/(\Delta I_{p,\max} - \Delta I_p)]$ and $\lg C_{\text{BMC}}$

表 5 $\lg [\Delta I_p/(\Delta I_{p,\max} - \Delta I_p)]$ 与 $\lg C_{\text{BMC}}$ 关系曲线的拟合方程

Table 5 Relationship curves of fitting equations between $\lg [\Delta I_p/(\Delta I_{p,\max} - \Delta I_p)]$ and $\lg C_{\text{BMC}}$

化合物	方程	r	标准差	N	P	m	$\beta/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$
BC	$Y=1.528\ 9X+6.443\ 3$	0.997 1	0.014 8	6	<0.001	0.63	1.27×10^5
BC-Y	$Y=1.612\ 7X+6.736\ 9$	0.996 9	0.016 0	6	<0.001	0.71	3.46×10^5
BC-La	$Y=1.672\ 7X+6.888\ 7$	0.995 6	0.019 9	6	<0.001	0.77	6.24×10^5
BC-Ce	$Y=1.620\ 8X+7.083\ 4$	0.993 8	0.022 9	6	<0.001	0.76	7.29×10^6

合物的推论可靠。由表 5 可知, BMC 及 BC 与 DNA 结合常数的大小顺序为 $\beta_{\text{BC-Ce}} > \beta_{\text{BC-La}} > \beta_{\text{BC-Y}} > \beta_{\text{BC}}$ 。

4 讨论

BMC 在 F-MWCN 修饰电极上的电极过程为吸附控制的由 1 个电子和 1 个质子参加的准可逆电极反应; 加入肝癌细胞 SMMC-7721DNA 后, BMC 及 BC 和 DNA 通过静电作用形成一非电活性的超分子化合物 DNA-BMC, 电极过程仍为受吸附控制的准可逆电极反应, 通过比较是否加入 DNA 反应前后 α 和 k_s 的变化, 可从理论上说明 DNA 与 BMC 及 BC 确实发生了相互作用, 通过计算获得 DNA-BMC 的 $m=1$, $\beta_{\text{BC}}=1.27 \times 10^5 \text{ L/mol}$ 、 $\beta_{\text{BC-Y}}=3.46 \times 10^5 \text{ L/mol}$ 、 $\beta_{\text{BC-La}}=6.24 \times 10^5 \text{ L/mol}$ 、 $\beta_{\text{BC-Ce}}=7.29 \times 10^6 \text{ L/mol}$, 即 BMC 与 DNA 结合作用的强弱为 $\text{BC-Ce} > \text{BC-La} > \text{BC-Y} > \text{BC}$ 。BMC 与 DNA 结合能力与其细胞毒性一致, 具有关联性, 说明 BMC 进入细胞后与 DNA 结合, 阻滞 DNA 的复制, 抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡, 进而表现出抗肿瘤活性^[5,30]。本研究的重点是通过电化学的方法探讨 BMC 与肝癌 DNA 的结合能力, 至于整体动物水平的疗效等, 本实验室也做了相关细胞与动物实验, 如 MTT、荧光定量 RT-PCR、蛋白印迹、裸鼠肝癌模型等^[30-31], 体内外实验均显示 BMC 可能是新型抗肿瘤药物的潜在化合物, 本研究相关结果为新型抗肿瘤中药配合物研究提供参考。

参考文献

- [1] Orzechowska B, Jatzak B, Chaber R, *et al.* Baicalin from the extract of *Scutellaria baicalensis* affects the innate immunity and apoptosis in leukocytes of children with acute lymphocytic leukemia [J]. *Int Immunopharm*, 2014, 23(2): 558-567.
- [2] Chen H J, Gao Y, Wu J L, *et al.* Exploring therapeutic potentials of baicalin and its aglycone baicalein for hematological malignancies [J]. *Cancer Lett*, 2014, 354(1): 5-11.
- [3] 刘衍季, 何小燕, 刘晓华, 等. 黄芩苷铜和铝配合物的合成及其生物活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(9): 1296-1301.
- [4] Li D J, Zhu M, Xu C, *et al.* Characterization of the baicalein-bovine serum albumin complex without or with Cu^{2+} or Fe^{3+} by spectroscopic approaches [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46(2): 588-599.
- [5] 袁瑞娟, 王贝贝, 赵爽, 等. 黄芩苷锌配合物的合成及其对人宫颈癌 HeLa 细胞抑制作用 [J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(9): 625-628.
- [6] 张齐熊 陈 剡. 新型黄芩苷稀土金属配合物的合成及其抗肿瘤活性与 DNA 的相互作用 [J]. 合成化学, 2013, 21(2): 137-140.
- [7] 武荣兰, 封 顺, 王吉德, 等. 黄芩苷及其金属配合物的抗氧性研究 [J]. 科技导报, 2005, 24(1): 36-37.
- [8] 胡 默. 黄芩苷铜稳定性分析及对小鼠肝损伤影响的研究. [D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [9] Xue T, Li F J, Zhu L, *et al.* Study on the electrochemical behavior of anticancer herbal drug rutin and its interaction with DNA [J]. *J Electroanal Chem*, 2008, 621(1): 1-6.
- [10] 路萍萍, 孟志云, 王敏伟, 等. 表面等离子共振技术测定药物与人血清蛋白的相互作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2007, 21(2): 147-151.
- [11] Wei X, Hao Q L, Zhou Q, *et al.* Interaction between promethazine hydrochloride and DNA and its application in electrochemical detection of DNA hybridization [J]. *Electrochim Acta*, 2008, 53(24): 7338-7343.
- [12] Wang L P, Lin L, Ye B X. Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA [J]. *J Pharm Biomed*, 2006, 42(5): 625-629.
- [13] 徐 丽, 陈 禹, 巫佳焕, 等. 钆多吡啶配合物与 DNA 作用及抗肿瘤活性 [J]. 无机化学学报, 2013, 29(3): 613-620.
- [14] Yu F S, Ding Y B, Gao Y W, *et al.* Fluorescence enhancement effect for the determination of DNA with calcein-cetyl trimethyl ammonium bromide system [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 625(2): 195-200.
- [15] 关郁芳, 雷丹丹, 谭玉荣, 等. 食品有害物质与 DNA 相互作用的体外研究方法 [J]. 食品科学, 2013, 34(7): 302-306.
- [16] Sanchez-Carrasco S, Delcros J G, Moya-Garcia A A, *et al.* Study by optical spectroscopy and molecular dynamics of the interaction of acridine-spermine conjugate with DNA [J]. *Biophys Chem*, 2008, 133(1/3): 54-65.
- [17] Guo Y J, Chao J B, Pan J H. Study on the interaction of 5-pyridine-10,15,20-tris-(p-chlorophenyl) porphyrin with cyclodextrins and DNA by spectroscopy [J]. *Spectrochim Acta A*, 2007, 68(2): 231-236.
- [18] 刘振佳, 司伊康, 陈晓光. 园二色谱测定技术在小分子化合物与 DNA 相互作用研究中的应用 [J]. 药学报, 2010, 45(12): 1478-1484.
- [19] Rauf S, Gooding J J, Akhtar K, *et al.* Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction [J]. *J Pharm Biomed*, 2005, 37(2): 205-217.
- [20] 高铭徽, 韦明元, 郭良宏. 电化学方法研究小分子与核酸相互作用的进展 [J]. 生态毒理学报, 2010, 4(5): 481-490.

- [21] 李思睿, 董慧茹, 毕鹏宇. 黄芩苷-Fe(II)配合物的合成及表征 [J]. 北京化工大学学报, 2006, 33(2): 97-99.
- [22] 邓毅, 赵爱华, 尹龙萍, 等. 黄芩苷-铬(III)配合物的合成与表征 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(1): 38-39.
- [23] 王学军, 刘雄, 刘峰林. 黄芩苷稀土配合物的合成与表征 [J]. 中医学报, 2009, 37(5): 66-68.
- [24] 史巧霞, 王瑞琼, 杜丽东. 黄芩苷铈、钇配合物的镇痛抗炎作用研究 [J]. 西部中医药, 2013, 26(6): 13-15.
- [25] Du D, Chen S Z, Cai J, *et al.* Electrochemical pesticide sensitivity test using acetylcholines-terase biosensor based on colloidal gold nanoparticle modified sol-gel interface [J]. *Talanta*, 2008, 74(4): 766-772.
- [26] Feng Q, Li N Q, Jiang Y Y. Electrochemical studies of porphyrin interacting with DNA and determination of DNA [J]. *Anal Chim Acta*, 1997, 344(1/2): 97-104.
- [27] 张祖训, 汪尔康. 电化学原理和方法 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [28] How G T S, Pandikumar A, Ming H N, *et al.* Highly exposed {001} facets of titanium dioxide modified with reduced grapheme oxide for dopamine sensing [J]. *Sci Rep*, 2014, doi: 10.1038/srep05044.
- [29] Carter M T, Rodriguez M, Bard A J. Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine [J]. *J Am Chem Soc*, 1989, 111(24): 8901-8911.
- [30] 郭明, 伍周玲, 王春歌, 等. 黄芩苷-金属配合物的合成及其抗肿瘤活性研究 [J]. 药科学报, 2014, 49(3): 337-345.
- [31] 高小艳. 黄芩苷-铈、镧、钇三种金属络合药物合成、表征及抗肿瘤活性研究 [D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2015.

• 封面图片介绍 •

凤仙花果实



凤仙花 *Impatiens balsamina* 是凤仙花科 (Balsaminaceae) 凤仙花属一年生草本植物, 披针形的叶子互生, 长约 10 cm, 顶端渐尖, 边缘有锐齿, 基部楔形; 叶柄附近有几对腺体。花期为 6~8 月, 花二三朵同生叶腋, 不整齐, 花萼有一距, 呈角状向下弯曲, 花形似蝴蝶, 花色有粉红、大红、紫、白、黄、洒金等。椭圆形蒴果, 有白色茸毛, 成熟时弹裂为 5 个旋卷的果瓣; 种子多数, 球状, 黑色, 状似桃形, 成熟时外壳自行爆裂, 将种子弹出, 自播繁殖。

种子 (急性子): 甘, 温, 有小毒, 活血通经, 祛风止痛, 外用解毒; 花: 甘, 温, 归肾经, 有小毒, 活血通经, 祛风止痛, 外用解毒; 全株: 味苦、辛, 性温; 根: 味甘, 性平。