

## VP-16 与 DNA 分子间电子转移的光谱学研究

张 蕤<sup>1</sup>, 史 钧<sup>1,2</sup>, 汪世龙<sup>1\*</sup>, 孙晓宇<sup>1</sup>, 张超杰<sup>1</sup>

1. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092

2. 安徽科技学院, 安徽 蚌埠 233100

**摘 要** 运用脉冲辐解和圆二色谱技术, 对用于治疗肿瘤的依托泊甙(VP-16)与鸟苷酸(GMP)和小牛胸腺 DNA 分子间电子转移的光谱进行了探讨。用脉冲辐解技术发现了 VP-16 与 GMP 之间的电子转移, 测得两者之间的反应速率常数为  $3.16 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 并对它们的吸收光谱进行了归属, 同时用圆二色谱技术发现了 VP-16 与小牛胸腺 DNA 之间相互作用。从而为医学工作者进一步了解和探讨 VP-16 的抗肿瘤机理提供了直接的理论依据。

**主题词** 鬼臼毒素; VP-16; 脉冲辐解; 抗肿瘤活性; 圆二色谱

中图分类号: R914.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2006)11-1977-04

### 引 言

鬼臼毒素(podophyllotoxin, PPT)是从小檗科鬼臼属植物鬼臼的根茎中分离得到的一种木脂素, 用于民间药物治疗已有 1000 多年历史<sup>[1]</sup>。1972 年, 半合成的依托泊甙(etoposide, VP-16)(结构如图 1)研究成功并进入临床, 证明了 VP-16 是一种高活性的抗癌药物。有的文献报道 VP-16 的抗癌机理可能与拓扑异构酶 II 有关; 而 Ross 等人提出 VP-16 类化合物对 DNA 的一种自由基作用机理, 即在生物体内, 通过对结构中 E 环的生物氧化反应, 生成一种半醌酮式的自由基中间体而进一步发挥作用, 但上述两种说法的作用机理至今都还没有直接证据进行解释。本实验室在鬼臼毒素及其衍生物 VP-16 分子本身有关活性的研究方面已做了大量的工作<sup>[2-5]</sup>, 已观测到 VP-16 与酪氨酸(Tyr, 拓扑异构酶 II 的关键氨基酸)之间的电子转移反应, 证实了 VP-16 的抗癌机理与拓扑异构酶 II 有关, 通过破坏酶中的酪氨酸起到抗癌作用<sup>[6]</sup>, 与第一种提法相吻合。本文运用脉冲辐解和圆二色谱技术, 对用于肿瘤治疗的依托泊甙(VP-16)与鸟苷酸(GMP)、小牛胸腺 DNA 分子间的电子转移进行了探讨。发现了 VP-16 与 GMP, Tyr 之间的电子转移和 VP-16 与小牛胸腺 DNA 分子间的相互作用, 从而对 VP-16 类化合物在生物体内的自由基作用机理进行了进一步证实, 从另一方面揭示了其抗癌机理。

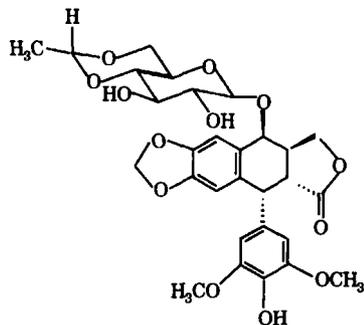


Fig 1 Molecular structure of VP-16

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

VP-16、鸟苷酸(GMP)和小牛胸腺 DNA 皆从 Sigma 公司购置, 购入后用高效液相色谱检测未发现任何杂质, 直接使用; 叔丁醇使用前经蒸馏纯化; 高氯酸、氢氧化钠和磷酸盐均为分析纯, 用于调节溶液的 pH 值;  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{N}_2$  为 99.99% 的高纯气体, 用于溶液脱氧或将水合电子转换成羟基自由基, 所有的溶液均用三次蒸馏水配制。所有的实验都在室温(约 20 °C)下进行。

#### 1.2 仪器和方法

脉冲辐解所用的电子束脉冲由电子加速器产生, 能量为 10 MeV, 脉冲宽度为 8 ns。单脉冲剂量为 10~50 Gy 连续可调, 用  $\text{N}_2\text{O}$  饱和的  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KSCN 水溶液作为脉冲

收稿日期: 2005-09-06, 修订日期: 2005-12-09

基金项目: 国家自然科学基金(30570376)和上海市科委基础研究项目(06JC14068)资助

作者简介: 张 蕤, 女, 1963 年生, 同济大学生命科学与技术学院博士后 \* 通讯联系人

电子计量剂, 在 480 nm 处取摩尔消光系数  $\epsilon[(\text{SCN})_2]$  为  $7600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 本工作选用的脉冲电子平均剂量为 10 Gy, 检测和数据处理方法见文献<sup>[7, 8]</sup>。本实验所用到的圆二色谱仪是由日本 JASCO 公司生产, 型号为 J715。

## 2 结果与讨论

### 2.1 依托泊甙 (VP 16) 与 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 的作用

取浓度为  $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 VP 16, 加入  $2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的过硫酸钾 ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) 和  $2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的特丁醇, pH 为 7, 通氮气饱和 20 min, 进行脉冲辐解实验, 可得到如图 2 所示的瞬态吸收光谱图。

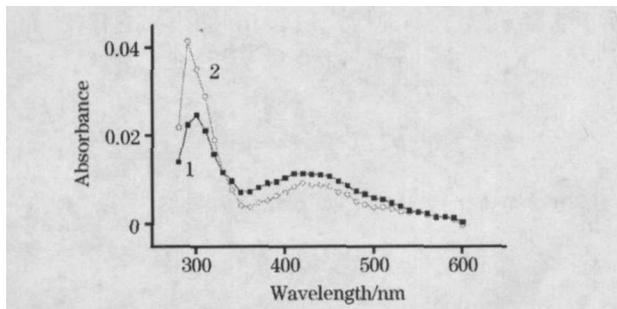
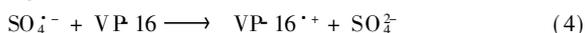
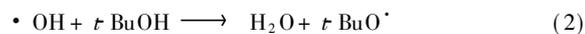
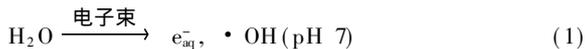


Fig 2 The transient absorption spectra after pulse radiolysis of  $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  VP 16 aqueous solution with  $2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  *t* BuOH and  $2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  saturated with  $\text{N}_2$  at pH 7  
1: 10  $\mu\text{s}$ ; 2: 50  $\mu\text{s}$

由图 2 可以看出, 其瞬态吸收谱图在 290nm 和 450nm 两处有吸收峰。氢自由基的量子产额在 pH 等于 7 时可忽略不计, 羟基自由基与特丁醇反应如(2)式所示, VP 16 水溶液经电子束激发后, 初级粒子只剩下水合电子, 且过硫酸钾与水合电子反应速率常数为  $1.2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , VP 16 与水合电子反应的速率常数为  $2.71 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ <sup>[4]</sup>, 在本实验条件下, 水合电子应先与过硫酸钾反应生成  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ , 氧化性自由基  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  再氧化 VP 16 生成 VP 16 的阳离子自由基。450 nm 处吸收峰为  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  的特征吸收峰, 因此 290 nm 处吸收峰应为 VP 16 的阳离子自由基, 该阳离子吸收峰的位置与激光光解的实验结果相符<sup>[9]</sup>。其反应机理如下所示。



改变 VP 16 的浓度分别为  $1 \times 10^{-4}$ ,  $8 \times 10^{-5}$ ,  $6 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-5}$  和  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 可得到一系列 290 nm 吸收峰的表现生成速率常数, 然后用表观速率常数对浓度作图, 其斜率即为 VP 16 与  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  反应的绝对速率常数, 其值为  $4.04 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

### 2.2 VP 16 与 GMP 之间的电子转移

取浓度为  $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 VP 16, 加入  $2 \times 10^{-2}$

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的过硫酸钾、 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 GMP 和  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的特丁醇, pH 为 7, 通氮气饱和 20 min, 进行脉冲辐解实验, 可得到如图 3 所示的瞬态吸收光谱图。

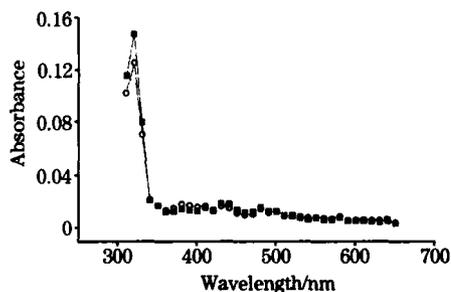
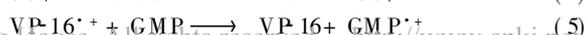
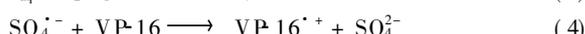
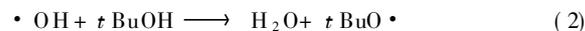
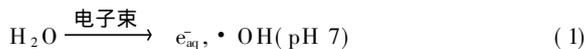


Fig 3 The transient absorption spectra after pulse radiolysis of  $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  VP 16 aqueous solution with  $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GMP,  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  *t* BuOH and  $2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  saturated with  $\text{N}_2$  at pH 7  
1: 10  $\mu\text{s}$ ; 2: 15  $\mu\text{s}$

以上各浓度的选择是根据竞争原理。初级粒子水合电子既同溶质分子 VP 16 反应又同溶质分子过硫酸钾、GMP 反应, 本实验的设计思路是首先让水合电子与过硫酸钾反应生成氧化性自由基  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ , 再让氧化性自由基  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  氧化 VP 16 生成 VP 16 的阳离子自由基, VP 16 的阳离子再氧化 GMP。过硫酸钾与水合电子反应的  $k_1$  为  $1.2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , VP 16 与水合电子反应的  $k_2$  为  $2.71 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 选择 VP 16 的浓度为  $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 过硫酸钾的浓度为  $2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 使水合电子绝大部分与过硫酸钾反应生成氧化性自由基  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ ;  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  与 VP 16 反应的  $k$  为  $4.04 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  与 GMP 反应的  $k$  为  $2.3 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 选择 VP 16 的浓度为  $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , GMP 的浓度为  $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 使  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  绝大部分与 VP 16 反应生成 VP 16 的阳离子自由基, 此 VP 16 阳离子自由基再氧化 GMP。

由图 3 可以看出, 其瞬态吸收谱图的最大吸收在 320, 450 nm。380 nm 处有一小的生成, 在图 4 与图 5 中可以更清楚地观察到 380 nm 处有一新的瞬态粒子的生成。在本实验条件下, pH 等于 7, 氢自由基的量子产额可忽略不计, 羟基自由基与特丁醇反应(如式 2 所示), VP 16 水溶液经电子束激发后, 初级粒子只剩下水合电子, 水合电子与过硫酸钾反应生成  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ , 氧化性自由基  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  再氧化 VP 16 生成 VP 16 的阳离子自由基, VP 16 的阳离子自由基再氧化 GMP。450 nm 处吸收峰为  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  的特征吸收峰, 320 nm 处吸收峰为 VP 16 的阳离子自由基, 380 nm 的吸收峰应为 GMP 阳离子的吸收峰, 且与文献报道的一样<sup>[10]</sup>。其反应机理如下所示。



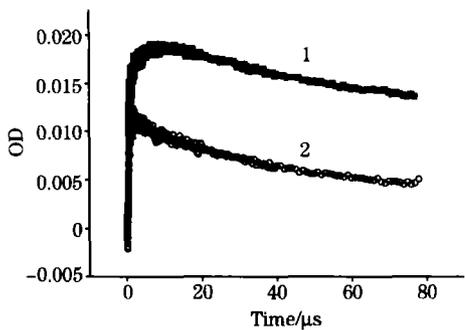


Fig 4 The transient formation and decay traces of  $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  VP-16 aqueous solution saturated with  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} t\text{-BuOH}$  and  $2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  saturated with  $\text{N}_2$  at pH 7 at 380 nm  
1: GMP; 2: No GMP

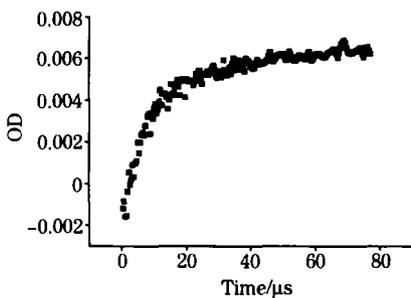


Fig 5 The net contribution of transient formation traces at 380 nm of Fig 4

由图 4 所示, 加入 GMP 后 380 nm 的生成较未加 GMP 时缓慢得多, 可见 380 nm 处的 GMP 阳离子自由基吸收峰是 VP-16 阳离子与 GMP 之间发生电子转移生成的, 从图 4 中可以看到扣除 VP-16 影响的 GMP 阳离子的生成曲线, 其生成曲线符合一级反应, 按一级动力学拟合得其表观生成速率常数为  $4.60 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ , 拟合系数为 0.974。

改变 VP-16 的浓度, 可得到一系列 380 nm 吸收峰的表观生成速率常数, 如表 1 所示, 用表观速率常数对浓度作图, 直线斜率即为 VP-16<sup>+</sup> 与 GMP 反应的绝对速率常数, 其值为  $3.16 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

Table 1 The  $K_{\text{obs}}$  at different concentration VP-16 at 380 nm by pulse radiolysis

$c / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.8	1.0	1.25	1.5	1.7
$K_{\text{obs}} / \mu\text{s}^{-1}$	0.0388	0.046	0.051	0.0612	0.0692

由以上实验结论可知, VP-16 的阳离子自由基可氧化 DNA 中的 GMP, 从而导致肿瘤细胞 DNA 的损伤, 因而 VP-16 的抗肿瘤机理可能是体内的一种电子传递过程, 即体内氧化电位高的酶(如核黄素的氧化电位为  $2.04 \text{ V}^{[11]}$ , 被称为体内生物氧化还原的架桥酶), 可氧化 VP-16 为 VP-16 的阳离子, VP-16 的阳离子再氧化 GMP, 导致肿瘤细胞的损伤。

2.3 VP-16 与小牛胸腺 DNA 间的相互作用研究

取浓度为  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的小牛胸腺 DNA, 加入磷酸缓冲溶液, 使溶液的 pH 值为 7, 进行圆二色谱实验。为减少误差, 每个样品进行两遍扫描, 最后由计算机处理得出的 CD 谱如图 6 所示, 其中, 在 260~300 nm 之间有一强正峰, 在 250 nm 左右有一强负峰, 200~240 nm 之间有一弱的正峰, 与文献中报道的小牛胸腺 DNA 相吻合<sup>[12]</sup>。

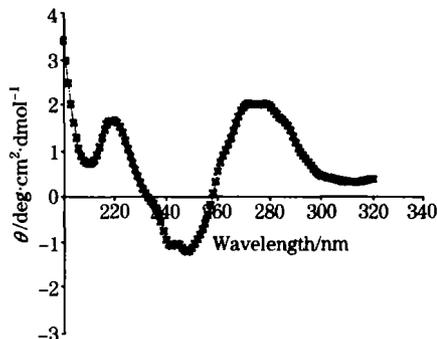


Fig 6 The Circular dichroism spectra of  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DNA

取浓度为  $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 VP-16, 加入磷酸缓冲溶液, 使溶液的 pH 值为 7, 进行圆二色谱的实验。所得圆二色谱图如图 7 所示: VP-16 在 210 nm 处有一强正峰。

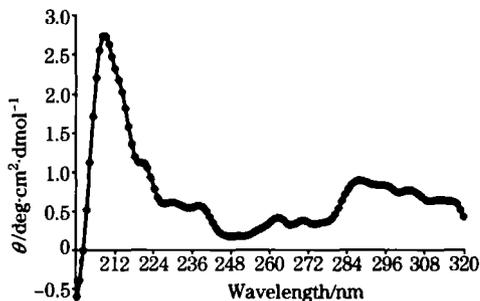


Fig 7 The Circular dichroism spectra of  $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  VP-16

若取含有  $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  VP-16,  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DNA 的溶液, 加入磷酸缓冲溶液, 使溶液的 pH 值为 7, 进行实验, 其圆二色谱图如图 8 所示。

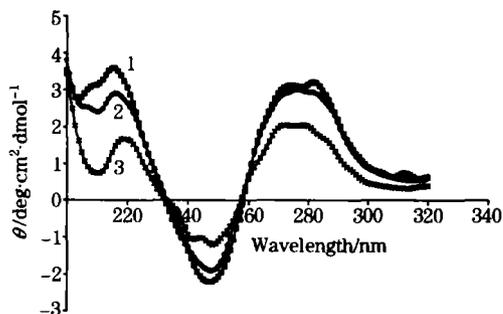


Fig 8 The Circular dichroism spectra of  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DNA with different concentration of VP-16

1: VP-16( $0.02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 2: VP-16( $0.03 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 3: DNA

由图 8 可以看出, 加入 VP-16 后, DNA 在 250 nm 处的负峰和 270~300 nm 处的正峰都同时显著的增大, 这可能是由于 VP-16 与 DNA 之间的某种相互作用而引起的图形的变化。随着溶液中 VP-16 浓度的提高, DNA 的正峰与负峰的

峰高依次增加。从圆二色谱的实验结果来看, VP-16 与 DNA 之间存在着某种相互作用, 这种相互作用使得 VP-16 对 DNA 分子的电荷转移氧化变得更有效, 从而可解释为较好的治疗肿瘤效应。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Yalowich J C, Ross W E. *Cancer Research*, 1985, 45(4): 1651.
- [ 2 ] WANG Shi long, YAO Si de, WANG Mei, et al(汪世龙, 姚思德, 王 玫, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 1998, 18(1): 15.
- [ 3 ] WANG Shi long, WANG Mei, SUN Xiao-yu, et al(汪世龙, 王 玫, 孙晓宇, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2003, 23(3): 481.
- [ 4 ] SUN Xiao-yu, ZHANG Chao jie, WANG Shi long, et al(孙晓宇, 张超杰, 汪世龙, 等). *Science in China B*(中国科学, B 辑), 2002, 32(2), 148.
- [ 5 ] Wang Shi long, Yao Si de, Wang Mei, et al. *Radiation Phys. Chem.*, 1998, 53: 623.
- [ 6 ] Tadafumi T, Katsuhiko F, Makoto N. *Chem. Pharm. Bull.*, 1992, 40(2): 2720.
- [ 7 ] LIU Shi heng, WANG Shi long, SUN Xiao-yu, et al(刘士 , 汪世龙, 孙晓宇, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2005, 25(5): 776.
- [ 8 ] Yao Si de, Zhang Jia shan, Lin Nian yun. *Radiation Phys. Chem.*, 1995, 46: 105.
- [ 9 ] Buxton G V, Greenstock C L. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1988, 17(2): 513.
- [ 10 ] Luis Pedro candeias, Steen Steeken. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115: 2437.
- [ 11 ] Kishore K, Moorthy P N, Guha S N. *Radiation Phys. Chem.*, 1991, 38: 119.
- [ 12 ] Hanlon S, Brudno S, Wu T T, et al. *Biochemistry*, 1975, 14: 1648.

## Studies on the Electron Transfer between Etoposide (VP-16) and DNA

ZHANG Rui<sup>1</sup>, SHI Jun<sup>1,2</sup>, WANG Shi long<sup>1\*</sup>, SUN Xiao-yu<sup>1</sup>, ZHANG Chao jie<sup>1</sup>

1. School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China

2. Anhui Science and Technology University, Bengbu 233100, China

**Abstract** In the present study, the electron transfer between Etoposide (VP-16) and GMP or DNA was investigated using pulse radiolysis and circular dichroism technology. The electron transfer between VP-16 and GMP was found, and the reaction rate constant was determined as  $3.16 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  by pulse radiolysis. The authors found the interaction of VP-16 and DNA using the technology of circular dichroism. This study has provided theoretical reference for further study on the anti-tumor mechanism of VP-16.

**Keywords** Podophyllotoxin; Etoposide (VP-16); Pulse radiolysis; Anti-tumor activity; Circular dichroism

(Received Sep. 6, 2005; accepted Dec. 9, 2005)

\* Corresponding author