

阿克拉霉素 A 与 DNA 作用的光谱学研究

胡敏^{1,2}, 张镇西^{1*}, 沈国励³, 刘娅莉³

1. 西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室, 生物医学工程研究所, 陕西 西安 710049
2. 西安交通大学理学院应用化学系, 陕西 西安 710049
3. 湖南大学化学化工学院, 化学生物传感器与计量学国家重点实验室, 湖南 长沙 410082

摘要 文章研究了阿克拉霉素 A (ACR) 吸收光谱和荧光光谱特性及其与 DNA 的相互作用。研究结果表明, ACR 荧光光谱和吸收光谱受 pH 值影响较大, 且随 DNA 加入产生减色效应。通过计算, ACR 与 DNA 的结合常数比单纯以嵌入式与 DNA 结合的蒽醌类化合物大约 1~2 个数量级为 $2.7 \times 10^6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 结合位点数为 0.67 碱基对, ACR 与 DNA 结合方式复杂, ACR 为非经典嵌入剂。

主题词 阿克拉霉素 A; DNA; 荧光光谱

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-0593(2006)09-1668-04

引言

通常可与 DNA 在体外直接发生作用的小分子 90% 可用于抗癌治疗, 而体外研究比活体内研究周期短费用低。因此研究小分子与 DNA 作用方式对从分子水平上了解抗癌药物作用机理, 对致癌物质的发现, 特效抗癌药的设计、筛选^[1-3] 有非常重要的意义。利用荧光分析法能简单快速地研究一些小分子与 DNA 相互作用的机理^[4,5] 和对 DNA 的含量进行测定^[6]。

阿克拉霉素 (ACR) 为一种蒽环类抗肿瘤抗生素, 其结构如图 1 所示。1975 年阿克拉霉素从 *Streptomyces galilaeus* (*Streptomyces galilaeus* var) 中分离出来。与柔红霉素和阿霉素不同, ACR 有 3 个糖基连到四环结构上。ACR 在抑制 DNA 浓度的 0.1 倍时也能抑制 RNA 的合成。阿克拉霉素在蒽环类抗肿瘤抗生素中对白血病细胞的分化诱导作用最强。ACR 抗癌谱广, 可用于抗急性白血病、胃癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌等。ACR 抗癌性好, 但有一定的毒性如恶心和呕吐等。程圭芳等^[7] 用电化学方法研究了 ACR 氧化还原代谢机理指出其较小心脏毒性的可能原因。本文研究了 ACR 荧光光谱和吸收光谱特性, 并利用荧光光谱和吸收光谱研究其与 DNA 的作用。研究表明: 在低浓度时, ACR 与 DNA 分子的作用方式为嵌入式; 高浓度时, ACR 与 DNA 结合方式复杂。通过计算, ACR 与 DNA 的结合常数为 $2.7 \times 10^6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 结合位点数为 0.67 碱基对。

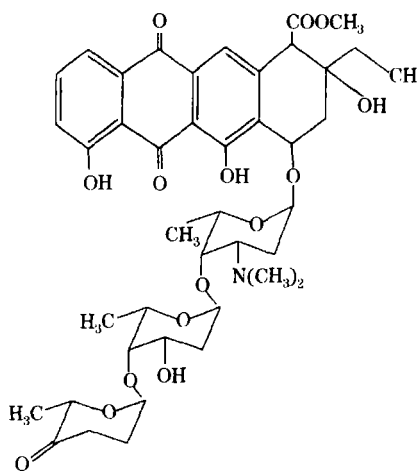


Fig 1 Structure of acclacinomycin (ACR)

1 仪器与试剂

M850 型荧光分光光度计 (UitacM); UV-1100 紫外-可见分光光度计 (北京瑞利分析仪器公司)。小牛胸腺 DNA (ctDNA) (华美生物工程公司, 北京), 用 $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液配制为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水溶液, 于 0~4 °C 下保存, UV-Vis 光谱测定 $A_2/A_1 > 1.8$ 。

阿克拉霉素 A (ACR) (深圳万乐药业有限公司) 配制成 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水溶液避光保存。溴化乙锭 (EB) (华美

收稿日期: 2005-06-16, 修订日期: 2005-09-18

基金项目: 国家自然科学基金 (20205005, 20205004) 和西安交通大学自然科学基金资助项目

作者简介: 胡敏, 女, 1971 年生, 西安交通大学理学院讲师 *通讯联系人

生物工程公司,北京)配制成 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水溶液。主要缓冲液为 pH 6.0 柠檬酸-NaOH 缓冲液, pH 系列缓冲液 (Britton-Robinson) 由 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合酸 ($\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{HAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$) 与 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 配制而成。其他试剂为分析纯。实验用水为二次重蒸水。其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

(1) 吸收光谱

于 10 mL 比色管中加入 1.0 mL pH 缓冲溶液、一定量 ACR 和 ctDNA 稀释至刻度, 摇匀。以相应试剂空白作参比, 在 UV-1100 紫外-可见分光光度计上测量。

(2) 荧光实验

于 10 mL 比色管中加入 1.0 mL 不同 pH 缓冲溶液、一定量 ACR 和 ctDNA 稀释至刻度(或再加入其他试剂), 摇匀, 测量荧光强度。

3 结果与讨论

3.1 ACR 的光谱特性

3.1.1 吸收光谱性质

在中性条件及 $\text{pH} < 8.5$ 时, 溶液呈黄色, ACR 在 434 nm 处有最大吸收, 且随着 ACR 浓度的增加而增大, 吸收值与 ACR 浓度在一定范围内呈良好的线性关系; 而在 $\text{pH} > 9.5$ 时, 溶液呈浅粉色, 最大吸收峰移至 510 nm。在 $\text{pH} 8.5 \sim 9.5$ 时, ACR 的酸式碱式结构同时存在, 在 434, 510 nm 处有两个吸收峰。

3.1.2 荧光性质

与其他蒽醌类抗癌药物^[8]相似, ACR 也具有荧光特性。但其发射的荧光强度比阿霉素、吡柔比星小, 最大激发、发射波长也较短。ACR 的发射谱线的波长为 578 nm, 有两个激发谱峰, 分别为 260 和 434 nm, 且随着 ACR 浓度的增加, ACR 的荧光强度逐渐增大。

3.1.3 pH 对荧光光谱的影响

带有离子化基团的荧光分子都具有激发和发射光谱与其离子化基团所处状态有密切相关的特性^[9]。由图 2 看出

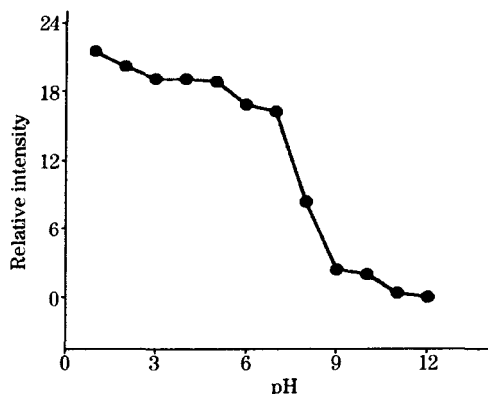


Fig 2 Influence of pH on the fluorescence intensity of ACR, ACR at $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

ACR 的荧光强度受 pH 的影响较大, 随 pH 增大而减小。在 $\text{pH} 8 \sim 9$ 时, 荧光强度发生急剧变化, 这说明在 ACR 环状结构中 $-\text{OH}$ 基团的离子化。ACR 在 $\text{pH} < 8$ 时, 即在酸性条件下, ACR 发射荧光, 而在 $\text{pH} > 9$ 时, 即 ACR 在碱性条件下基本无荧光。

3.2 ACR 与 DNA 的相互作用

3.2.1 DNA 对 ACR 的吸收光谱影响

如图 3 所示, 由于 DNA 碱基对与嵌入的 ACR 间产生较强的电子相互作用, 在 pH 6.0 的条件下, ACR 的最大吸收波长随着 DNA 浓度的增加, 其特征吸收峰不断减小, 产生了明显的减色效应, 同时 ACR 最大吸收峰发生了红移, 并在 469 nm 处出现了等吸收点, 说明 ACR 与 DNA 的相互作用形成了新的络合物, 此时体系中可能存在如下平衡: $n\text{ACR} + \text{DNA} = \text{DNA} \cdot (\text{ACR})_n$ 。在 $\text{pH} 5 \sim 9$ 条件下, DNA 对 ACR 的吸收光谱都产生明显的减色效应, 这说明 ACR 的酸式和碱式结构都能与 DNA 结合。

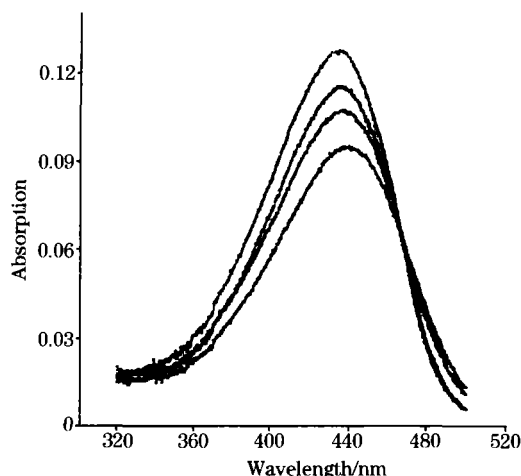


Fig 3 Influence of DNA on the absorption spectra of ACR; ACR $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; DNA at 0, 15, 30, 45 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

3.2.2 DNA 对 ACR 的荧光猝灭

由于 DNA 在近中性条件下能稳定存在, ACR 在偏弱碱性条件下荧光很弱, 实验选用 pH 6.0 的体系测量。ACR 的最大激发和发射波长分别为 434 和 578 nm。随着 ct-DNA 的不断加入, ACR 的荧光强度逐渐减小。这说明 DNA 分子与 ACR 发生了作用, 引起 ACR 的荧光猝灭。

3.2.3 荧光偏振

当 ACR 在粘度较小的纯水溶剂中时, ACR 可在溶剂中自由转动, 所以其荧光偏振值较小。溶液中存在 DNA 时, ACR 与 DNA 结合, 使 ACR 的微环境发生改变, ACR 分子转动受阻, 分子转动速度变慢导致荧光偏振变大。由图 4 可以看出, ACR 的荧光偏振值随溶液中 DNA 浓度的增大而增大。

3.2.4 DNA-EB ACR 荧光猝灭方式的判别

在 DNA-EB 溶液中加入不同浓度的 ACR, 以 I_0/I 对 ACR 的浓度作图(见图 5)。 I_0/I 随 ACR 的浓度增加而增大。

表明 ACR 与 DNA 的结合位点与 EB 相同即 ACR 与 EB 竞争结合 DNA。EB 为典型嵌入剂, 因此 ACR 与 DNA 结合方式存在嵌入式。ACR 是否只此一种方式与 DNA 结合呢? 图 6 为药物对 DNA - EB 荧光猝灭的 Scatchard 图。

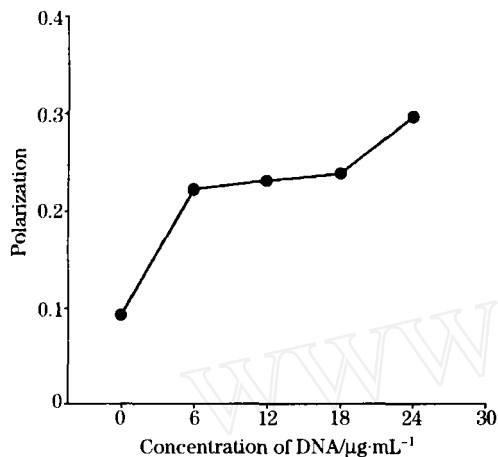


Fig 4 Influence of ct-DNA on the fluorescence polarization of ACR, ACR at $1 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

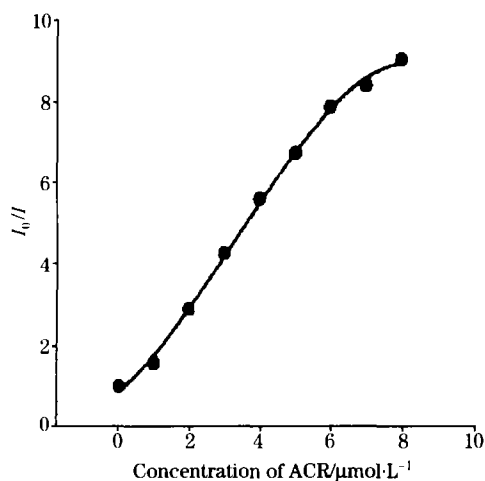


Fig 5 Influence of the quantity of ACR on EB-DNA, EB at $4 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; DNA at $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

药物存在时的 Scatchard 直线的 n 与 EB 的 Scatchard 直线得到的 n 值相同, 则该物质与 DNA 的作用为嵌插方式; 若与 EB 的 Scatchard 图有相同的 K 值, 则该物质与 DNA 的作用为非嵌插方式; 若该直线与 EB 的 Scatchard 图的 K 和 n 均不同, 则该物质与 DNA 的作用为混合方式^[10]。当 ACR 不存在时, EB-DNA 的结合常数 $K_0 = 1.1 \times 10^6 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n = 0.43$ 碱基对; 当 ACR 为 $2 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, EB-DNA 体结合常数 $K_1 = 8.0 \times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n = 0.43$ 即 n 值基本不变, 而 K 值变小。Scatchard 图呈显竞争结合模式, 即 ACR 与 DNA 的结合位点与 EB 相同, ACR 主要以嵌入方式与 DNA 结合。当 ACR 为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, EB-DNA 体系 $K_2 = 4.6 \times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n = 0.35$ 即 n , K 值都改变。Scatchard 图呈显混合型模式, 即竞争结合方式和非竞争结合方

式同时存在。ACR 浓度高时, 与 DNA 结合存在多种方式。与吡柔比星^[8]相似, ACR 由一个具有刚性平面结构的蒽醌环和一个复杂的含糖侧链组成, 由吡柔比星与 DNA 结合方式可推知 ACR 的蒽醌环嵌入 DNA 的碱基对中, 而其含糖基的侧链插入 DNA 的沟槽中。

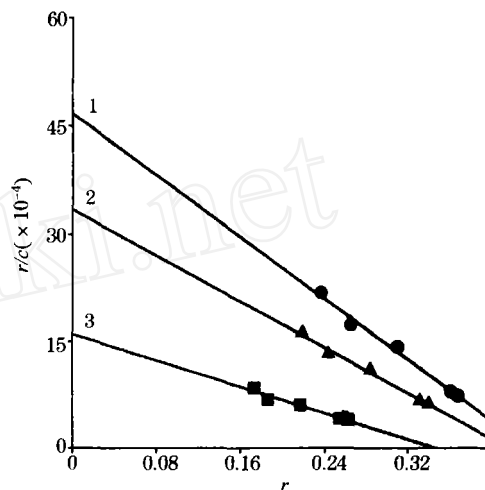


Fig 6 Scatchard plot ct-DNA at $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

1: in the absence of ACR; 2 and 3: in the presence of ACR with the concentration of $2 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively

3.2.5 ACR 与 ct-DNA 结合常数及结合位点数

按照文献^[11, 12]计算得出 ACR 与 DNA 的结合常数为 $K = 2.7 \times 10^6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $n = 0.67$ 碱基对。与 Misumi 用可见光谱研究 ACR 与 DNA 的结合常数基本一致。小分子与 DNA 分子的基本作用方式有三种, 为静电吸附作用、与 DNA 沟槽作用和嵌入作用^[12]。小分子与 DNA 为嵌入式结合时大多含有刚性平面结构, 可嵌入 DNA 的碱基对中。小分子与 DNA 分子结合通常同时存在多种作用方式。此时, 小分子化合物与核酸作用的结合常数往往较大。如双嵌入剂和带有较复杂侧链的单嵌入剂与 DNA 沟槽有特异的接触时, 通常结合常数较高。一般蒽醌类药物与 DNA 结合常数约为 $\sim 10^4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[13], 而 ACR 与 DNA 的结合常数为 $10^6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由此可推知, ACR 为非经典式嵌入剂。ACR 由一个含蒽醌基团的刚性平面和一个含糖的复杂侧链组成。ACR 的蒽醌环堆积嵌入 DNA 的碱基对中为嵌入型, 但不同于经典小分子嵌入剂的是其复杂含糖侧链含有氢键作用位置使其与体系非融合性盘绕的多个糖环插入 DNA 链磷酸骨架中。

4 结束语

综上所述, ACR 的荧光强度和吸收光强受 pH 值影响大。在中性条件 ctDNA 存在下, ACR 的吸收光谱发生明显的减色效应且最大吸收波长红移。ACR-DNA 与 EB 以及 EB-DNA 与 ACR 体系的荧光变化, 表明 ACR 与 DNA 作用含有嵌入式。ACR 猝灭 EB-DNA 体系得到的 Scatchard 图表

明, ACR 低浓度时主要以嵌入方式与 DNA 的结合, 高浓度时为混合模式, 即 ACR 为非经典嵌入剂。通过计算 ACR 与 DNA 的结合常数比单纯以嵌入式与 DNA 结合的蒽醌类化

合物大约两个数量级, 为 $2.7 \times 10^6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 结合位点数为 0.67 碱基对。印证了 ACR 为非经典嵌入剂。

参 考 文 献

- [1] LIU Liu, ZHANG Hai-tao, WANG Yun-pu (刘 流, 张海涛, 王云普). Chinese Journal of Organic Chemistry (有机化学), 2003, 23 (6): 570.
- [2] JIN Lan, YANG Pin (靳 兰, 杨 频). Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报), 1996, 17: 1140.
- [3] YAN Xun-ling, DONG Rui-xin, WANG Qi-r-guo, et al (闫循领, 董瑞新, 王秋国, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25 (1): 58.
- [4] YU Ying, WU Lin, TAN Li-xian (俞 英, 吴 霖, 谭丽贤). Chinese Journal of Analytical Chemistry (分析化学), 2004, 32 (5): 628.
- [5] SHEN Jing-shan, SUN Dan-dan, FU Lian-chun, et al (沈景山, 孙丹丹, 付连春, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25 (2): 232.
- [6] LI Wen-you, WU Hui-ling, HE Xi-wen, et al (李文友, 吴会灵, 何锡文, 等). Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报), 2003, 24 (10): 1787.
- [7] CHENG Gui-fang, DING Min, ZHAO Jie, et al (程圭芳, 丁 敏, 赵 洁, 等). Acta Chimica Sinica (化学学报), 2004, 62 (14): 1299.
- [8] HU Min, YANG Xin, JIN Wei-jun, et al (胡 敏, 杨 欣, 晋卫军, 等). Acta Pharmaceutica Sinica (药理学学报), 1999, 34 (8): 608.
- [9] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al (陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorescence Analytical Method (荧光分析法). Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 1990.
- [10] CAO Ying, LI Yi-jun, GAO Zhi, et al (曹 瑛, 李一峻, 高 志, 等). Acta Pharmaceutica Sinica (药理学学报), 1999, 34 (4): 276.
- [11] Kumar C V, Asuncion E H. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115: 8547.
- [12] McGhee J D, Ron Hippel P H. J. Mol. Biol., 1974, 86: 469.
- [13] LI Yong, LI Yuan-zong, CHANG Wei-bao (李 勇, 李元宗, 常文保). Journal of Analytical Science (分析科学学报), 1994, 10: 67.

Studies on Aclacinomycin Spectral Characters and the Interaction between Aclacinomycin and DNA by Spectroscopic Method

HU Min^{1,2}, ZHANG Zhen-xi^{1*}, SHEN Guo-li³, LIU Ya-li³

1. The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, Institute of Biomedical Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China
2. Department of Applied Chemistry, School of Science, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China
3. State Key Laboratory for Chemo/Biosensing Technology and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China

Abstract The interaction of aclacinomycin (ACR) and DNA was investigated by fluorescence spectrum, and the characteristics of the fluorescence and absorption of aclacinomycin (ACR) were studied. The results indicate that there are two situations: in the case that the concentration ratio of ACR to DNA is small, the ACR is intercalated into the stacked base pairs of DNA; in the other case that the concentration ratio of ACR to DNA is great, the interaction between ACR and DNA is complex. The binding constant of the interaction between ACR and DNA, calculated by the fluorescence titration method, is $2.7 \times 10^6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and the binding site number is about 0.67 base pairs.

Keywords Aclacinomycin; DNA; Fluorescence

(Received Jun. 16, 2005; accepted Sep. 18, 2005)

* Corresponding author