

光谱法研究山奈酚与 ct-DNA 的相互作用^①

肖 晓 张慧娟^② 庞思平^a

(北京理工大学生命学院 北京中关村南大街 5 号 100081)

^a(北京理工大学材料学院 北京中关村南大街 5 号 100081)

摘 要 利用紫外-可见吸收光谱和荧光光谱研究了黄酮类化合物山奈酚与小牛胸腺 DNA(ct-DNA) 之间的相互作用。随着 DNA 的加入,山奈酚的吸收光谱逐渐发生明显的红移和减色效应,通过双倒数法拟合分析,得到山奈酚与 ct-DNA 的结合常数为 1.2×10^4 。山奈酚自身荧光很弱,与 DNA 结合后其荧光明显增强,表明山奈酚可以作为荧光探针来开展与生物大分子相互作用的研究。

关键词 山奈酚;小牛胸腺 DNA(ct-DNA);紫外-可见吸收光谱;荧光光谱

中图分类号:O657.32

文献标识码:A

文章编号:1004-8138(2009)05-1211-04

1 前言

山奈酚(3,4',5,7-四羟基黄酮,结构如图 1 内插图所示)是一种在自然界分布十分广泛的植物次生代谢物,通常可以从茶叶、花椰菜等植物中提取^[1]。该化合物对癌症、心血管疾病等一些常见病或多发病具有显著的治疗和预防作用^[2]。研究药物与蛋白质、核酸等生物大分子的识别相互作用是阐明药物分子抗癌、抗病毒的机理和本质的一个有效途径。近期,马康等人报道了山奈酚与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用^[3]。但是山奈酚与 ct-DNA 相互作用的相关研究还较少。

据报道,癌细胞大多存在于偏酸性环境^[4]。而山奈酚是一种多酚类化合物,在 pH 较高的条件下会发生不同程度的质子解离^[5]。因此,为了更好地模拟癌细胞的酸性环境,并使山奈酚不发生质子解离,本文在 pH=5 的缓冲溶液中,通过紫外-可见吸收光谱和荧光光谱研究了山奈酚与 ct-DNA 的相互作用。

2 仪器与试剂

Cary 50 型紫外-可见光谱仪(美国 Varian 公司);LS55 型稳态荧光光谱仪(美国 Perkin-Elmer 公司);Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司);pH-211 型酸度计(美国 Hanna Instruments 公司);小牛胸腺 DNA(ct-DNA) 购于北京欣经科生物技术有限公司(A260/280nm; ≥ 1.8);山奈酚(Kaempferol)购于南京泽朗医药科技有限公司(HPLC 纯度 $>98\%$);NaCl、NaOH、H₃BO₃、HAc、H₃PO₄ 和无水乙醇均来自北京化工厂(分析纯);实验中所有用水均为超纯水($>18.2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$);缓冲溶液为 pH=5 的 Britton-Robinson(B-R)缓冲液。

ct-DNA 的浓度由 260nm 处消光系数 $\epsilon_{260\text{nm}} = 6600\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 作为参考标准测定^[6]。将

① 庆贺于永忠教授 85 华诞;国家自然科学基金(No. 20772011)资助项目

② 联系人,电话:(010)88683129;手机:(0)13521493397;E-mail:hjzhang@iccas.ac.cn

作者简介:肖晓(1985—),男,成都市人,硕士研究生,主要从事化学小分子与生物大分子相互作用研究工作。

收稿日期:2009-04-23;接受日期:2009-04-27

ct-DNA 加入到超纯水中, 搅拌数小时, 并在 4℃ 下保存过夜, 制得 ct-DNA 储备溶液。将山奈酚溶于含有 3% 乙醇的 B-R 缓冲溶液, 制得山奈酚储备液。紫外-可见吸收光谱扫描范围为 220—460nm。荧光光谱激发波长为 380nm, 扫描范围为 480—650nm。上述实验均在室温下进行。

3 结果与讨论

3.1 紫外-可见吸收光谱

图 1a 给出了山奈酚分子自身 ($5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及其与 ct-DNA ($0-8.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 滴定实验的吸收光谱。对于一般的黄酮类化合物来说, 其分子结构主要包括两部分, 一个是肉桂醛部分, 在吸收光谱中表现为 300—400nm 的吸收带, 称为带 I; 一个是苯甲醛部分, 在吸收光谱中表现为 240—280nm 的吸收带, 称为带 II^[7]。从图 1a 可以看出, 山奈酚具有黄酮类化合物典型的两个特征吸收峰, 带 I 和带 II 分别位于 361nm 和 264nm 处。DNA 的特征吸收为 ~260nm, 因此, 随着 ct-DNA 的逐渐加入 ($0-8.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 260nm 处的吸光度明显增加。由于山奈酚的带 II 被 DNA 的特征吸收所覆盖, 因此下面主要讨论 DNA 的加入对山奈酚带 I 吸收峰的影响。很明显, 随着 DNA 的不断加入, 山奈酚 361nm 处的吸收峰逐渐红移至 375nm, 最大发生了 14nm 的红移, 同时吸光度亦逐渐降低。根据式(1), 计算得到最大可发生 ~33% 的减色效应。

$$H\% = (A_{\text{free}} - A_{\text{bound}}) / A_{\text{free}} \quad (1)$$

式中 A_{bound} ——不同混合比例条件下的吸光度; A_{free} ——不加 ct-DNA 条件下的吸光度。

上述变化表明山奈酚与 ct-DNA 发生了很强的相互作用。而且, 在 382nm 处还出现一个等吸收点, 表明山奈酚与 DNA 的结合是一个典型的自由态向结合态转变的过程。针对 361nm 处的吸光度变化, 利用双倒数线性拟合法并由式(2)^[9], 我们确定了山奈酚与 ct-DNA 相互作用的结合常数。

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta A_{\text{max}}} + \frac{1}{(K_b \cdot \Delta A_{\text{max}} \cdot [\text{DNA}])} \quad (2)$$

式中, ΔA ——山奈酚在 ct-DNA 存在时的吸光度与自身吸光度的差值; A_{max} ——吸光度值最大变化量; K_b ——结合常数; $[\text{DNA}]$ 是 ct-DNA 的浓度。拟合结果如图 1b 所示, 显示非常好的线性关系, 计算得到的结合常数 K_b 为 1.2×10^4 。

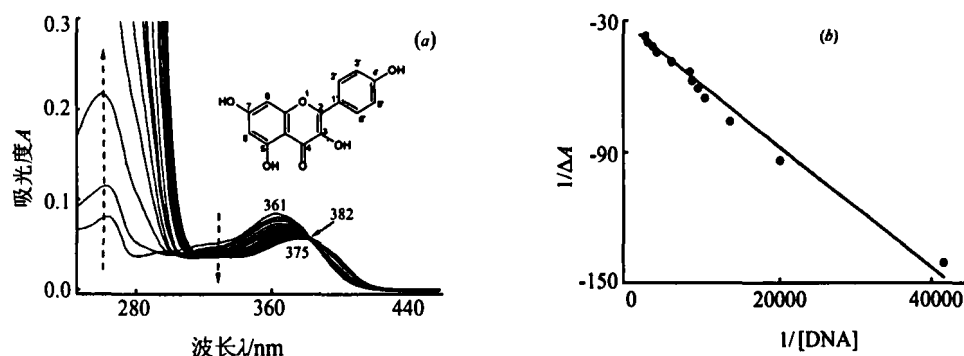


图 1 (a) ct-DNA ($0-8.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 滴定山奈酚 ($5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的吸收光谱, 内插图为山奈酚的分子式; (b) 双倒数法线性拟合 ct-DNA 与山奈酚结合常数

3.2 荧光光谱

对于黄酮类化合物来说, 一般会在 ~530nm 处观察到激发态下分子内质子转移 (ESIPT) 引起的荧光峰^[10]。图 2 给出了在 380nm 激发波长下, 山奈酚自身及其与 DNA 相互作用后的荧光光谱图。可以看出, 山奈酚自身在 524nm 处呈现较弱的 ESIPT 荧光。随着 DNA 的加入, 荧光逐渐增强, 同时伴随着峰位置的红移 (最大红移至 535nm), 该红移现象与吸收光谱的结果是一致的。荧光强

度的显著增加是由于加入 DNA 后,与山奈酚发生了很强的相互作用;导致山奈酚分子所处的微环境发生改变。这表明山奈酚是一类荧光性质对环境敏感的化合物,我们可以利用它作为荧光探针来研究与 DNA 等生物大分子的识别相互作用。

3.3 山奈酚与 ct-DNA 的结合模式分析

药物分子与双链 DNA 的相互作用方式主要有两种:插入结合和沟区结合^[11]。对于分子平面性和刚性较好的药物,通常通过插入方式与 DNA 结合,这种结合方式会导致药物分子自身光谱性质发生明显变化,例如吸收光谱较大程度的红移和减色效应、荧光光谱的显著增强或降低等;对于分子具有一定柔性的药物,由于能够适应 DNA 沟区的曲率半径,则可能以沟区结合方式为主,这一结合方式一般会使药物分子产生较小程度的光谱变化。对于山奈酚与 ct-DNA 相互作用的体系,我们观察到山奈酚分子很强的吸收峰红移和减色效应,以及荧光峰的显著增强现象。因此,推测山奈酚主要以插入到碱基对之间的方式与 DNA 结合。为了获得更直接的证据,我们目前还在进行 NMR 等相关实验研究。

4 结论

本文采用紫外-可见吸收光谱和荧光光谱法,研究了山奈酚与 ct-DNA 在 pH=5 的缓冲溶液中的相互作用。实验结果表明,山奈酚能够自发地与 ct-DNA 结合,结合常数为 1.2×10^4 ,推测相互作用模式为插入结合。本研究为研究癌细胞病理条件下药物与生物大分子的相互作用提供了可行的路线和实验依据。

参考文献

- [1] Olszewska M. Separation of Quercetin, Sexangularetin, Kaempferol and Isorhamnetin for Simultaneous HPLC Determination of Flavonoid Aglycones in Inflorescences, Leaves and Fruits of Three Sorbus Species[J]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **48**(3): 629—635.
- [2] Cos P, De Bruyne T, Apers S *et al.* Phytoestrogens, Recent Developments[J]. *Planta. Med.*, 2003, **69**(7): 589—599.
- [3] 马康, 陈晓青, 陈景文. 荧光光谱法研究三种黄酮类化合物与 BSA 的相互作用[J]. *光谱实验室*, 2008, **25**(4): 662—668.
- [4] Ceccarini C, Eagle H. pH as a Determinant of Cellular Growth and Contact Inhibition[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971, **68**(1): 229—233.
- [5] Jovanovic S V, Steenken S, Tosic M *et al.* Flavonoids as Antioxidants[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**(11): 4846—4851.
- [6] Hao Y M, Shen H X. Application of Aluminium (III) Complex with Salicylidene-*o*-Aminophenol to the Fluorometric Determination of Nucleic Acids[J]. *Spectrochim. Acta A*, 2000, **56**(5): 1013—1020.
- [7] Mabry T J, Markham K R, Thomas M B *et al.* *The Systematic Identification of Flavonoids*[M]. New York: Springer-Verlag, 1970. 1—354.
- [8] Anantha N V, Azam M, Sheardy R D *et al.* Porphyrin Binding to Quadruplexed T4G4[J]. *Biochemistry*, 1998, **37**(9): 2709—2714.
- [9] Tang B, Ma L, Wang H Y *et al.* Study on the Supramolecular Interaction of Curcumin and Beta-Cyclodextrin by Spectrophotometry and Its Analytical Application[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**(6): 1355—1361.
- [10] Zhu A P, Wang B Y, White J O *et al.* The Effect of Pressure on the Excited-State Intramolecular Proton Transfer of Polyhydroxyflavone[J]. *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**(3): 895—898.
- [11] I. Haq. Thermodynamics of Drug-DNA Interactions[J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002, **403**(1): 1—15.

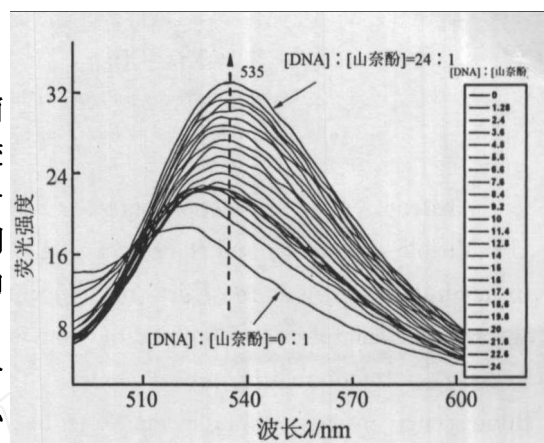


图2 ct-DNA($0-1.2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
滴定山奈酚($5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的荧光光谱
激发波长, 380nm

A Spectroscopic Study of Interaction between Kaempferol and ct-DNA

XIAO Xiao ZHANG Hui-Juan PANG Si-Ping*

(School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, P. R. China)

a(School of Material Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, P. R. China)

Abstract The interaction between kaempferol and calf thymus DNA (ct-DNA) was studied by UV-Visible absorption and fluorescence spectroscopies. With the increasing amount of ct-DNA added to kaempferol, obvious red shift and hypochromic effect were observed in the UV-Visible absorption spectra of kaempferol. The binding constant between kaempferol and ct-DNA was obtained as 1.2×10^{-4} by double-reciprocal analysis. Compared to the weak fluorescence of kaempferol, the fluorescence intensity was evidently enhanced with the combination to ct-DNA, indicating that kaempferol could be used as a fluorescence probe to investigate the interactions with biomacromolecules.

Key words Kaempferol; ct-DNA; UV-Visible Absorption Spectroscopy; Fluorescence Spectroscopy

2010 年《光谱实验室》征订启事

2010 年《光谱实验室》，双月刊，16 开，每册 320 页，单月 25 日出版，每份年订价为 300 元（1—6 期），零售价为：50 元/本。

欲订阅的读者请到当地邮电局（所）办理订阅手续，邮发代号为 82-863。错过时间者，可直接通过电子邮件（发到 gpsys@263.net）与本编辑部联系订阅。

《光谱实验室》编辑部

本刊可上网查阅

由于本刊在 2001—2009 年被《中国核心期刊（遴选）数据库》收录，全文上网，因此，读者、作者均可直接上网查阅。网址：

<http://www.periodicals.net.cn>

<http://www.wanfangdata.com.cn>

<http://gpsys.periodicals.net.cn>

<http://gpss.chinajournal.net.cn>