

药物与 DNA 的相互作用研究

I. 小檗碱作为 DNA 的发光开关及 pH 的影响

赵长春 于俊生*

(南京大学化学系, 南京 210093)

章杰兵[✓]

(南京军区后勤部药品检验所, 南京 210002)

Q523.02

R282.71

用荧光光谱法研究了小檗碱与 DNA 的键合作用。发现小檗碱插入到 DNA 双螺旋中使小檗碱较弱的荧光带($\lambda_{em}=520\text{ nm}$)的荧光强度显著提高。在 $\text{pH}=3.00$ 附近, 小檗碱-DNA 体系的荧光增强到原来发射强度的 69 倍(I/I_0)。在 $\text{pH}=3.00$ 和 $\text{pH}=7.20$ 时, 测得小檗碱与 DNA 的本征键合常数分别为 $3.00 \cdot 10^5$ 和 2.04×10^5 , 二者的键合比分别为每分子小檗碱 11.05 和 4.78 个碱基对。

关键词:

小檗碱

DNA

荧光光谱

黄连

小分子与 DNA 的相互作用研究已引起人们的广泛兴趣和关注^[1-6]。测定小分子与 DNA 的亲合力及键合选择性有利于阐明这些小分子与 DNA 的选择键合作用以及理解其键合机理, 从而对于新的高效低毒药物的设计, 新药筛选, 化疗及放疗试剂的改型换代都有十分重要的意义。目前研究使用的小分子多为一些药物分子^[1-4], 配合物^[5-6]以及某些荧光探针。直接选用中药有效成分与 DNA 作用的研究报道较少。本文选用小檗碱(中药黄连的主要有效成分)作为探针, 用荧光光谱方法研究了小檗碱与 DNA 的相互作用。实验发现, 小檗碱象由 DNA 控制的发光开关一样, 有 DNA 存在时, 小檗碱的荧光显著增强。

1 实验部分

1.1 仪器

LS-50B 型荧光/发光光谱仪(Perkin-Elmer 公司), 联有 Epson 386 计算机及专用数据管理支持软件, 1 cm 方型石英荧光池, 该仪器的激发光谱具有自动校正功能。UV-240 型紫外可见分光光度计(Shimadzu 公司)。PXJ-1B 型数字式离子计(江苏电分析仪器厂)。

1.2 试剂

盐酸小檗碱从中药黄连中提取, 并经多次重结晶, 其含量按《中国药典》1995 年版二部的的方法测定, 并与标准纯品对照, 纯度不小于 99.0%。小檗碱的结构见图 1。小牛胸腺 DNA(上海长阳制药厂), 使用前按标准方法纯化^[12], 并在缓冲溶液中透析 24 小时, 最后经紫外吸收光谱

收稿日期: 1997-01-17。 收修改稿日期: 1997-04-28。

江苏省自然科学基金资助课题。

* 通讯联系人。

第一作者: 赵长春, 男, 25 岁, 硕士研究生; 研究方向: 分子光谱及分析

在 260 nm 处的摩尔吸光系数 $6600 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 确定其浓度。DNA 储备液置于暗处 4℃ 保存不超过一星期。其它试剂均为分析纯。所有溶液均为二次亚沸蒸馏水配制。

1.3 方法

荧光测量是在不同 pH 下进行。在 pH = 1.00 到 pH = 9.20 之间, 使用 Clark-Lubs 缓冲溶液 (KCl , KH_2PO_4 , KH_2PO_4 , H_3BO_3 , NaOH , 盐酸); 在 pH = 10.20 到 pH = 11.20, 使用 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲溶液; pH = 12.80, 使用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 饱和溶液。缓冲溶液及盐的最终浓度达 $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 。荧光测量的激发波长 $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$, 激发和发射狭缝均为 5 nm, 发射单色器扫速为 500 nm/min , 所有实验在 $10 \pm 0.5^\circ \text{C}$ 下进行。

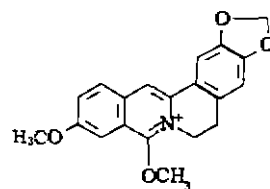


图 1 小檗碱的结构

Fig. 1 Structure of the berberine ion

2 结果与讨论

2.1 DNA 对小檗碱的敏化作用

固定小檗碱的浓度, 改变 DNA 的浓度, DNA 对小檗碱的荧光敏化作用见图 2。图 2 中小檗碱的浓度为 $2.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, DNA 的浓度自下而上分别从 0, 2.00×10^{-5} 变到 $3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 。由图可以看到, 随着 DNA 浓度的增大, 原来小檗碱的最大发射波长处 ($\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$) 的荧光强度没有变化, 而小檗碱原来较弱的发射带 ($\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ 附近) 的荧光强度逐渐增强。达到键合饱和时, 荧光强度提高到原来强度的 69 倍 (pH = 3.00)。这种现象表明, 小檗碱与 DNA 有较强的相互作用。似乎小檗碱是由 DNA 控制的发光开关, 有 DNA 存在时发光增强, 无 DNA 时荧光几乎消失, 显示了很好的光敏性能。

2.2 小檗碱与 DNA 结合常数的测定

药物分子与 DNA 的结合作用较为复杂, 因此测定小分子与 DNA 的结合常数也就显得十分重要。根据 DNA 与小分子键合的复杂性, McGhee 和 Hippel^[7]提出了一种修正的 Scatchard 方程为:

$$\gamma/C_F = K(1 - n\gamma)[(1 - n\gamma)/(1 - (n-1)\gamma)]^{n-1}$$

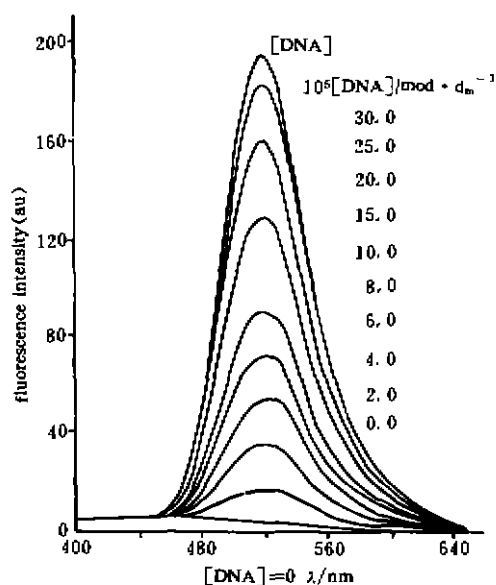


图 2 在不同 DNA 浓度下, 盐酸小檗碱 ($2.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) 的荧光光谱 pH = 3.00, 激发波长为 $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ berberine with various concentration of calf thymus DNA in pH = 3.00 buffer solution for excitation at 365 nm.

其中 K_i 是本征结合常数, n 是以 DNA 碱基对表示的结合位的数目, C_f 是游离的药物分子的浓度, $\gamma = C_b/[DNA]$, C_b 是已结合的药物分子的浓度, $C_b = C_T - C_f$, C_T 是加入的药物分子总浓度。根据上述方程, 用 γ/C_f 对 γ 作图, 通过最佳的非线性最小平方拟合得图 3。从图 3 由 γ/C_f 轴的截距得到 pH=3.00 时小檗碱与 DNA 的本征结合常数为 $3.00 \times 10^5 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, pH=7.20 时的本征结合常数为 $2.04 \times 10^5 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ 。由 γ 轴截距分别得到在两种 pH 条件下的 $n=11.03$ 和 4.78。这个结果与用荧光强度差值对 $[DNA]/[小檗碱]$ 作图求得的参数基本一致。这样大的结合常数表明, 小檗碱分子与 DNA 有较高的亲和力。

2.3 pH 对小檗碱与 DNA 相互作用的影响

图 4 是在不同 pH 下, 随着 DNA 与小檗碱浓度比值的变化体系荧光强度的变化 ($\lambda_{em}=520 \text{ nm}$)。可以看到, 随 $[DNA]/[小檗碱]$ 比值的增大, 体系的荧光强度逐渐增大。当 DNA 的浓

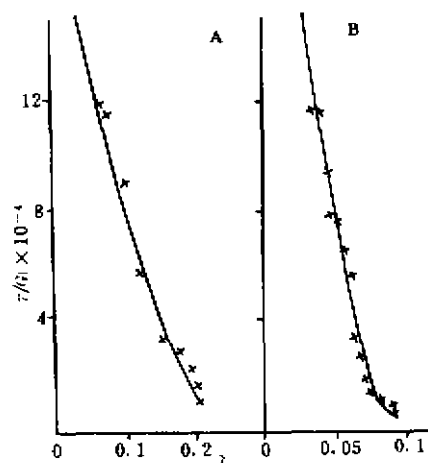


图 3 盐酸小檗碱与 DNA 相互作用的 Scatchard 图 ($10 \pm 0.5^\circ \text{C}$)

Fig. 3 Scatchard plots of binding isotherms for the berberine with calf thymus DNA in buffer solution at $10 \pm 0.5^\circ \text{C}$

A: pH=7.20 B: pH=3.00

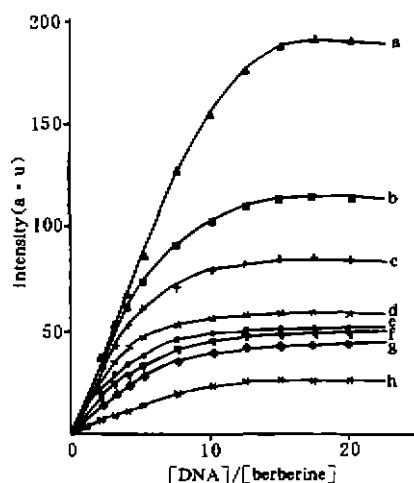


图 4 在不同 pH 条件下, 荧光强度差与 $[DNA]/[小檗碱]$ 的关系曲线激发波长为 $\lambda_{ex}=365 \text{ nm}$, 测量波长为 520 nm 。

Fig. 4 Plots of fluorescence intensity difference vs $[DNA]/[berberine]$ in various pH buffer solution for excitation at 365 nm and monitoring at 520 nm .

pH=(a)3.00, (b)4.00, (c)5.20, (d)7.20, (e)9.20, (f)10.20, (g)11.20, (h)12.80, respectively

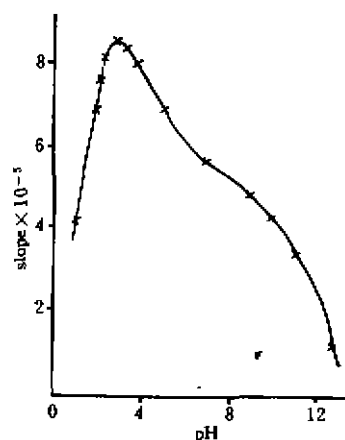


图 5 随 $[DNA]$ 的增加, 小檗碱的荧光增强斜率与 pH 的关系曲线。激发波长为 $\lambda_{ex}=365 \text{ nm}$, 发射波长为 $\lambda_{em}=520 \text{ nm}$

Fig. 5 Slopes of fluorescence enhancement vs. pH profile of $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ berberine with addition of calf thymus DNA for excitation at 365 nm and emission at 520 nm .

度足够大时,荧光强度增加缓慢,逐渐接近一个常数。但是在不同的 pH 条件下,荧光增强的程度不同。图 5 进一步表明溶液 pH 与小檗碱-DNA 体系荧光强度间的变化关系。图 5 的纵轴是以不同 pH 条件下体系的荧光强度随 DNA 增大而增强的线性部分的斜率表示的。由图 5 可以看出,当 pH 逐渐由碱性变到酸性时,荧光强度逐渐增大,在 pH=3.00 附近,荧光最强。当 pH 更小时,体系的荧光显著下降。但是在同样的 pH 范围内(pH=1.00~12.80),小檗碱本身的荧光强度几乎不受影响。这充分说明小檗碱的荧光增强是由于与 DNA 作用的结果。同时也表明,小檗碱与 DNA 的键合作用强烈受到 pH 的影响。

2.4 小檗碱与 DNA 键合模型的探讨

小檗碱是黄连、黄柏等中药的主要有效成分。国内曾开展了某些药物及制剂中小檗碱的分析测定^[8,9]及临床研究。文献^[10]曾报道,在各种 pH 条件下,小檗碱的吸收光谱没有发生谱移。我们在各种实验 pH 条件下所记录的荧光光谱表明,小檗碱水溶液的发射谱既没有谱移,其发射强度也基本上没有变化。根据文献^[10,11]小檗碱的发射光谱基本来自分子中的异喹啉部分的¹L₁和¹L₂带。而且在水溶液中,发射带¹L₁和¹L₂基本是简并的。随着 DNA 加入到小檗碱的溶液中,¹L₂发射带的强度显著增加,而¹L₁带的强度基本没有变化。实验中我们测量了不同极性溶剂中小檗碱的发射光谱,结果表明,在疏水环境中,小檗碱的发射光谱呈现出一定的结构特征,此时除了¹L₂带的荧光明显增强外,¹L₁带的发射强度也有不同程度的增加。由此推测小檗碱与 DNA 的相互作用可能是小檗碱的异喹啉端插入到 DNA 双螺旋的沟槽中。由于 DNA 分子碱基的层层堆积以及互补碱基之间的氢键形成,从而给小檗碱分子插入的异喹啉端提供了一个几乎完全疏水的环境。另一方面,由于 DNA 双螺旋沟槽的空间有限,再加上小檗碱分子结构的空腔效应,因此插入 DNA 的部分,其环境也受到插入程度的影响。因而在 DNA 的碱基作用下仅敏化了¹L₂带的发射强度,提高了荧光量子产率。从静电作用看,小檗碱的正电荷与 DNA 的磷酸基端的负电荷存在着一定的静电作用也对二者的键合有贡献。但是,在小檗碱与 DNA 较高结合常数的诸多影响因素中,DNA 碱基对与小檗碱的相互作用应是主要贡献。

综上所述,DNA 对小檗碱荧光的显著敏化作用使得小檗碱充分当了一个由 DNA 控制的发光开关。这个现象不仅有助于探索小檗碱抗菌、治病的机理,而且利用二者相互作用的性质,可进一步开发小檗碱-DNA 光传感研究及相互检测,这方面的工作正在进行。

参 考 文 献

- [1] Dervan, P. B. *Science* **1986**, **232**, 464.
- [2] Wade, W. S.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, **109**, 1574.
- [3] Moser, E.; Dervan, P. B. *Science*, **1987**, **238**, 645.
- [4] Horne, D. A.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, **112**, 2435.
- [5] Turro, C.; Bossmann, S. H.; Jenkins, Y.; Barton, J. K.; Turro, N. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, **117**, 9026.
- [6] Brun, A. M.; Harriman, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, **116**, 10383.
- [7] McGhee, J. D.; Von Hippel, P. H. *J. Mol. Biol.*, **1974**, **86**, 469.
- [8] 王永珍,李建新,吴启南. *中药通报*, **1988**, **13**, 217.
- [9] 赵一兵,郭祥群,许金钩,陈国珍. *高等学校化学学报*, **1993**, **14**, 625.
- [10] Gasparec, Z.; Komorsky Iovric, S.; Iovric, M. *Can. J. Chem.*, **1982**, **60**, 970.
- [11] Chao, S. C.; Tretzel, J.; Schneider, F. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, **101**, 134.

[12] Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.

INTERACTION OF DRUGS WITH DNA

I. BERBERINE AS LUMINESCENT SWITCHES FOR CALF THYMUS DNA AND EFFECTS OF pH

Zhao Changchun Yu Junsheng

(Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

Zhang Jiebing

(Nanjing Military Areas Institute for Drug Control, Nanjing 210002)

The binding of berberine to calf thymus DNA has been investigated by fluorescence spectroscopy, the intercalation of berberine into calf thymus DNA leads to a dramatic enhancement of the photoluminescence of the drug at 520 nm. The fluorescence sensitization by DNA is depended on the pH in solution, maximum in emission intensity is 69 fold (I/I_0) at pH=3.00. The intrinsic binding constants between berberine and DNA are determined as $3.00 \times 10^5 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ (pH=3.00) and $2.04 \times 10^5 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ (pH=7.20) respectively. The estimated site sizes are of 11.05 and 4.78 base pairs at two pH.

Keywords: berberine DNA fluorescence spectroscopy