

高频超声照射下血卟啉镓配合物对脱氧核糖核酸的损伤

王 君^{*,1} 熊大珍¹ 张朝红² 张向东¹ 陈立江³ 赵红丹¹ 邢志强¹ 徐 锐¹

(¹ 辽宁大学化学系, 沈阳 110036)

(² 辽宁大学环境系, 沈阳 110036)

(³ 辽宁大学制药系, 沈阳 110036)

摘要: 用紫外-可见(UV-Vis)光谱和荧光(FL)光谱研究了高频超声波激活血卟啉镓(HP-Ga)配合物对脱氧核糖核酸(DNA)的损伤, 并探讨了超声波照射时间、HP-Ga 浓度、溶液酸度和离子强度等因素对 DNA 损伤的影响。结果表明, 在一定条件下, DNA 的损伤程度随着超声波照射时间的增加和 HP-Ga 浓度的增大而加剧, 而溶液酸度和离子强度的影响则较为复杂。

关键词: 超声波; 血卟啉镓(HP-Ga)配合物; 损伤; 脱氧核糖核酸(DNA)

中图分类号: O614.37⁺1; O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2007)03-0479-05

Damage of Deoxyribonucleic Acid under High Frequency Ultrasonic Irradiation in the Presence of Hematoporphyrin-Ga Complex

WANG Jun^{*,1} XIONG Da-Zhen¹ ZHANG Zhao-Hong² ZHANG Xiang-Dong¹ CHEN Li-Jiang³

ZHAO Hong-Dan¹ XING Zhi-Qiang¹ XU Rui¹

(¹Chemical Department, Liaoning University, Shenyang 110036)

(²Environmental Department, Liaoning University, Shenyang 110036)

(³Pharmaceutical Department, Liaoning University, Shenyang 110036)

Abstract: The damage of deoxyribonucleic acid (DNA) under the action of hematoporphyrin-Ga (HP-Ga) complex activated by ultrasound was detected by means of ultraviolet-visible (UV-Vis) and fluorescence (FL) spectroscopy, and the influences of ultrasonic irradiation time, HP-Ga concentration, solution acidity and ionic strength were also discussed. The results showed that under a certain condition, the damage of DNA could be enhanced with the increase of ultrasonic irradiation time and HP-Ga concentration. However, the influences of solution acidity and ionic strength on the damage of DNA were more complicated.

Key words: ultrasound; hematoporphyrin-Ga (HP-Ga) complex; damage; deoxyribonucleic acid (DNA)

0 引 言

研究表明,某些血卟啉衍生物(Hematoporphyrin derivative, HPD)对肿瘤细胞有较强的亲和力,结合光照用较小的剂量就可以达到治疗肿瘤的目的^[1,2]。这是因为 HPD 可以被光激活,通过与氧分子(O₂)之

间的能量交换产生具有氧化能力极强的单线态氧(¹O₂),从而杀死肿瘤细胞。1978年,Dougherty等人把这种肿瘤治疗方法称为光动力学疗法(Photodynamic treatment, PDT)^[3]。由于光在生物组织中的穿透能力低, PDT 疗法主要用于人体表面或浅层肿瘤的治疗。超声波具有极强的穿透能力且聚焦技术已经成熟,

收稿日期: 2006-11-20。收修改稿日期: 2007-01-09。

国家自然科学基金项目(No.20371023)和辽宁省教育厅自然科学基金项目(No.2004C018)资助。

*通讯联系人。E-mail: wangjun890@126.com

第一作者: 王 君, 男, 46岁, 教授, 博士; 研究方向: 无机材料和超声化学。

因此,采用超声波抑制肿瘤的生长和破坏肿瘤细胞,尤其是治疗深层组织肿瘤已经引起国内外的普遍关注。1989 年,日本学者梅村晋一郎(Umemura)等人首次在国际会议上报道了用超声波激活血卟啉(HP)杀伤肿瘤细胞的初步尝试,并把这种方法称为声动力学疗法(Sonodynamic treatment, SDT)^[4-6]。实验表明,HP 本身无抗肿瘤活性,但被超声波激活后能产生强烈的抗肿瘤效应,而且超声波装置简单,造价低廉,便于临床应用。因此,SDT 疗法在肿瘤治疗方面比 PDT 疗法有更加广阔的应用前景。

近 10 年来,国内外学者对 SDT 疗法进行了大量的研究并取得了初步的成效,但这些工作都是以肿瘤细胞为攻击目标,通过损伤细胞膜使肿瘤细胞坏死来达到治疗肿瘤的目的^[7-9]。实际上,正常细胞膜和肿瘤细胞膜之间的差别是相当小的,抑制和杀死肿瘤细胞应以攻击具有各种功能的蛋白质和容易使药物具有靶向性的 DNA 为目标。DNA 是细胞中最重要的遗传物质。随着分子生物学和分子药理学的发展,临床上使用的许多抗肿瘤药物都以 DNA 为主要作用靶点^[10],通过与肿瘤细胞中的 DNA 相互作用破坏其结构,进而影响其基因的调控与表达。如果通过超声波激活 HP 和 HPD 等导致 DNA 损伤,那么就有可能造成自然情况下肿瘤细胞的凋亡。本文通过紫外-可见(UV-Vis)光谱和荧光(FL)光谱观察血卟啉镓(HP-Ga)配合物的存在下超声波对 DNA 的损伤,为推动分子水平的 SDT 疗法提供有意义的参考。

1 实验部分

1.1 仪器设备

超声波照射装置(频率 1.65 MHz,功率 25 W,自制,如图 1 所示);紫外-可见(UV-Vis)光谱仪(Lambda-17 型,美国 Perkin-Elmer 公司);荧光(FL)光谱仪(LS-45 型,美国 Perkin-Elmer 公司)。

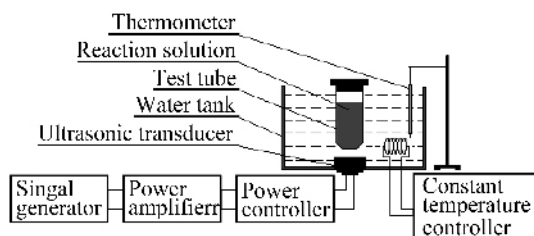


图 1 超声波照射装置

Fig.1 Apparatus of ultrasonic irradiation

1.2 试剂

小牛胸腺脱氧核糖核酸(CT DNA,北京奥博星生物技术责任有限公司),使用时未经进一步纯化,在 0~4 °C 下配成 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液,其准确浓度由 260 nm 处的吸光度确定($\epsilon_{260}=1.31 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);血卟啉(HP,Sigma 公司产品,在 0~4 °C 下配成 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液);血卟啉-镓配合物(HP-Ga,按照文献^[11]合成,在 0~4 °C 下溶于磷酸盐缓冲溶液配成 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液)。实验用水为二次蒸馏水,其余均为市售分析纯试剂。

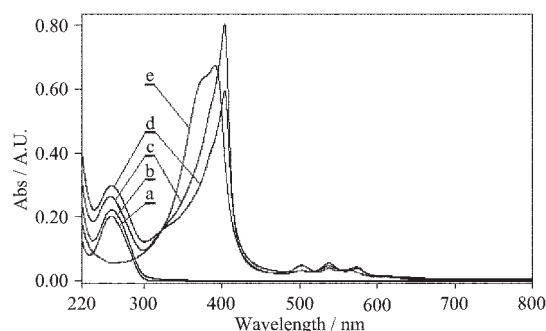
1.3 实验方法

体系温度控制在 $25.0 \pm 0.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。取 5 个容量瓶分别标记为 a,b,c,d 和 e。a,b,c 和 d 分别加入 10.00 mL 浓度为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DNA 溶液,其中 c 和 d 加入 5.00 mL 浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HP-Ga 溶液,而 e 只加 HP-Ga。所有容量瓶都用磷酸缓冲溶液(pH=6.8~7.2)稀释至 50.00 mL。将 b 和 d 放入超声波照射装置,2.0 h 后测定 5 个样品的 UV-Vis 光谱和 FL 光谱,判断 HP-Ga 与 DNA 的相互作用以及结合超声波对 DNA 的损伤。另外,改变超声波照射时间、HP-Ga 浓度、溶液酸度和离子强度等,考察这些因素对 DNA 损伤的影响。

2 结果与讨论

2.1 超声波照射下 DNA+HP-Ga 溶液的 UV-Vis 光谱和 FL 光谱

从图 2 可以看出,单纯 DNA 和 HP-Ga 分别在 260 nm 和 391 nm 处有强的吸收峰(图 2 中 a 和 e)。



a: DNA(without irradiation); b: DNA (with irradiation); c: DNA + HP-Ga(without irradiation); d: DNA + HP-Ga(with irradiation); e: HP-Ga (without irradiation).

图 2 不同条件下 DNA,HP-Ga 和 DNA+HP-Ga 溶液的 UV-Vis 光谱

Fig.2 UV-Vis spectra of DNA, HP-Ga and DNA + HP-Ga solutions at different conditions

无超声波照射时,由于 HP-Ga 与 DNA 之间有一定的相互作用,使 DNA 分子轴向伸长,导致 260 nm 处的吸收峰显示增色效应(图 2 中 c),同时,HP-Ga 的吸收峰红移到 405 nm 处。超声波照射时,HP-Ga 被激活,产生对 DNA 有损伤作用的物质使 DNA 出现局部解旋或长链断裂等损伤。损伤后的 DNA 碱基对暴露在外,能够吸收更多的紫外光,使其在 260 nm 处的吸收峰显著增强(图 2 中 d),相反,HP-Ga 的吸收峰则大幅度降低。这说明 HP-Ga 的结构也遭到了破坏。单独超声波照射时,DNA 的吸收峰只有微弱的增色效应(图 2 中 b),说明其损伤程度远远低于超声波和 HP-Ga 的协同作用。另外,Ga(III)离子结合超声波对 DNA 的作用完全等同于单独超声波照射时的情况,这说明 Ga(III)离子不具备催化活性。

FL 光谱也证实了这种变化。如图 3 所示,加入 DNA 后,HP-Ga 原本位于 600~650 nm 范围内的发射峰降低同时伴随微小的红移,并且在 550~600 nm 间出现了新的荧光发射峰。这证明了 HP-Ga 与 DNA 间存在相互作用^[12-14]。而这种相互作用会引起 HP-Ga 分子的刚性程度增强,从而增加了它的三线态辐射跃迁几率,表现在室温磷光增强^[15]。而基态的三线态氧分子($^3\text{O}_2$)获得这部分能量则变成了激发态的单线态氧分子($^1\text{O}_2$)。超声波代替激发光对 HP-Ga 具有同样的作用。随着超声照射时间的增长,DNA 受损解旋,结构改变,导致荧光发射峰不断降低,8.0 h 时几乎消失。另外,HP-Ga 在超声波照射下荧光发射峰也

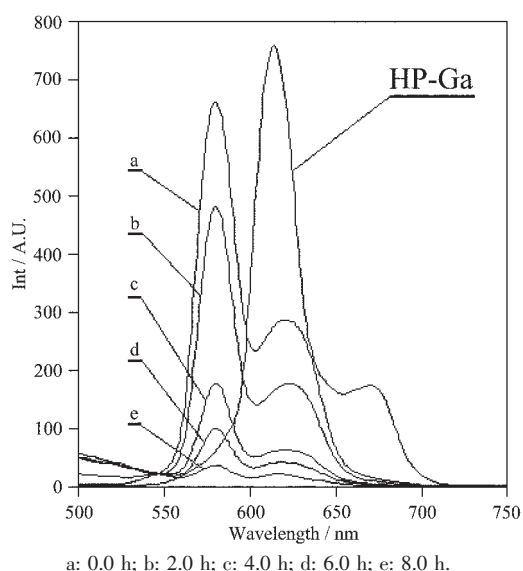


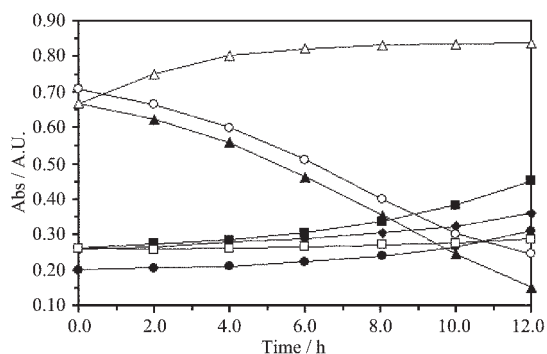
图3 不同照射时间 DNA+HP-Ga 溶液 FL 光谱

Fig.3 Fluorescence spectra of DNA+HP-Ga solutions at different irradiation time

不断降低,进一步证明了 HP-Ga 的消耗。

2.2 超声波照射时间对 DNA 损伤的影响

DNA 与 HP-Ga 和 HP 的浓度都为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 磷酸盐缓冲溶液浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 7.0, 改变超声波照射时间,变化范围为 0~12 h,照射时间对 DNA 损伤的影响见图 4。从图 4 可以看出,随着照射时间的增加,DNA 与 HP-Ga 和 DNA 与 HP 溶液中 DNA 的吸收峰变化类似,都表现在随照射时间增加而增强,而 HP-Ga 和 HP 的吸收峰减弱。区别是在超声照射下,DNA 与 HP-Ga 溶液中 DNA 吸收峰的增色效应强于 DNA 与 HP 溶液中的 DNA,而 HP-Ga 的减色效应强于 HP。分析可知,相同浓度条件下,超声波照射时间越长,产生的 $^1\text{O}_2$ 越多,DNA 分子受损伤越严重。HP-Ga 与 HP 相比,由于 Ga(III)离子的存在而使该配合物带有正电荷,增强了与 DNA 的相互作用,同时改变了 HP 的电子结构,提高了其声动力催化活性。



■:DNA(和 HP-Ga 与 irradiation, 260 nm); □:DNA (和 HP-Ga without irradiation, 260 nm); ◆:DNA(和 HP with irradiation, 260 nm); ▲:HP-Ga (and DNA with irradiation, 405 nm); △:HP-Ga (and DNA without irradiation, 405 nm); ●:DNA (with irradiation, 260 nm); ○:HP(和 DNA with irradiation, 405 nm)。

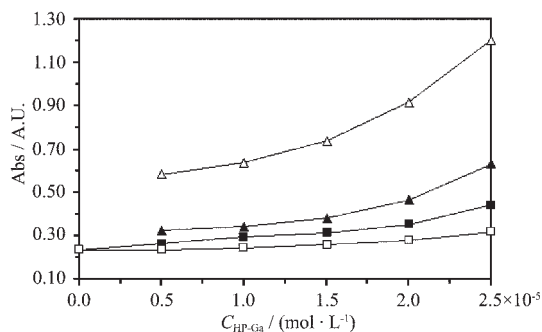
图4 DNA+HP-Ga, DNA+HP 和 DNA 溶液的吸光度随照射时间的变化

Fig.4 Changes of absorbance of DNA+HP-Ga,DNA+HP and DNA solutions with irradiation time

2.3 HP-Ga 浓度对 DNA 损伤的影响

改变 HP-Ga 的浓度,变化范围为 $0.5 \times 10^{-5} \sim 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,其他条件同 2.2。从图 5 可以看出,随着 HP-Ga 浓度的增加,无超声照射时,DNA 的吸收峰变化不明显。超声波照射后,DNA 的吸收峰有所增加。另外,根据文献可知不仅卟啉环的性质、取代基团以及中心金属离子决定卟啉与 DNA 分子的成键模式^[16],而且浓度也影响着卟啉对 DNA 的作用位点和作用模式。当 HP-Ga 浓度较高时,主要是 HP-

Ga 在 DNA 表面的自组装作用,而当浓度较低时,二者之间主要是 HP-Ga 在 DNA 双螺旋间的局部堆叠作用^[7]。因此,超声照射时不同的作用模式对 DNA 的损伤程度也不同。

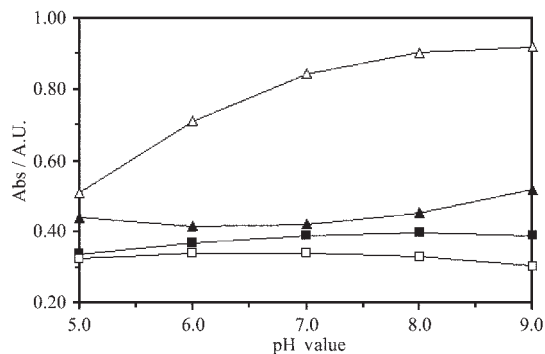


■:DNA (and HP-Ga with irradiation 2 h, 260 nm); □:DNA (and HP-Ga without irradiation, 260 nm); ▲:HP-Ga (and DNA with irradiation 2 h, 405 nm); △:HP-Ga (and DNA without irradiation, 405 nm).

图 5 DNA+HP-Ga 溶液的吸光度随 HP-Ga 浓度的变化
Fig.5 Changes of absorbance of DNA+HP-Ga solutions with HP-Ga concentration

2.4 溶液酸度对 DNA 损伤的影响

很多因素可以导致人类体液的 pH 值发生变化,因此,探讨酸度对 DNA 损伤的影响是必要的。调节溶液的 pH 值,变化范围为 5.0~9.0,其他条件同 2.2。如图 6 所示,无论有无超声照射,随着 pH 值的增加,DNA 的吸收峰都呈现出先升高后降低的趋势,但前者的吸光度要远远大于后者,表现出明显的增色效应。这说明酸性和碱性条件既不利于 HP-Ga 与 DNA 的结合,也不利于 HP-Ga 对 DNA 的损伤。



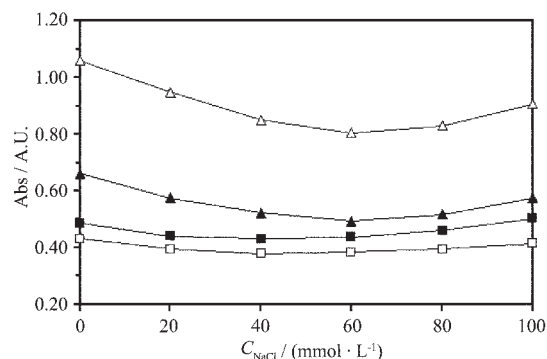
■:DNA (and HP-Ga with irradiation 2 h, 260 nm); □:DNA (and HP-Ga without irradiation, 260 nm); ▲:HP-Ga (and DNA with irradiation 2 h, 405 nm); △:HP-Ga (and DNA without irradiation, 405 nm).

图 6 DNA+HP-Ga 溶液的吸光度随 pH 值的变化
Fig.6 Changes of absorbance of DNA+HP-Ga solutions with pH values

酸性条件下,DNA 中的磷酸电荷被中和,使其碱基对收缩,导致 HP-Ga 难以靠近,即使超声波照射也不会对 DNA 造成太大的损伤。且 HP-Ga 容易相互靠近形成双聚体,使吸光度大幅度下降。碱性环境时则由于 HP-Ga 与 OH⁻结合,同样无法靠近 DNA 而使其损伤程度减小。因此,pH 值的变化导致 DNA 和 HP-Ga 化学结构和疏水性能改变,同时也使二者作用机理发生变化,从而使 DNA 损伤程度不同。

2.5 离子强度对 DNA 损伤的影响

由于钠离子浓度的不断变化,各种细胞才能够生存和延续。本研究采用 NaCl 调节溶液的离子强度,观察其对 DNA 损伤的影响。NaCl 浓度的变化范围为 0~100 mmol·L⁻¹,其它条件同上。一般情况下,随着钠离子浓度的增加,DNA 磷酸骨架间的静电斥力减小,从而使 DNA 链结构收缩^[18]。此时 HP-Ga 难以插入到 DNA 碱基对之间,使两者之间的相互作用减弱。如图 7 所示,有超声照射时,随着钠离子浓度的增加,溶液中 DNA 的吸收峰略有降低。进一步增加钠离子浓度,使更多的 HP-Ga 以单体的自由形式出现,这样较容易靠近 DNA,使其损伤程度略有增加。



■:DNA (and HP-Ga with irradiation 2 h, 260 nm); □:DNA (and HP-Ga without irradiation, 260 nm); ▲:HP-Ga (and DNA with irradiation 2 h, 405 nm); △:HP-Ga (and DNA without irradiation, 405 nm).

图 7 DNA+HP-Ga 溶液的吸光度随 NaCl 浓度的变化
Fig.7 Changes of absorbance of DNA+HP-Ga solutions with NaCl concentration

2.6 超声波损伤 DNA 机理的探讨

关于超声波激活 HPD 杀死肿瘤细胞的机理,一些研究者认为超声波对 HPD 有类似激光的激活过程,并产生相似的产物如单线态 ¹O₂,过氧化物和氢氧自由基等^[19,20]。DNA 和 HPD 之间通过弱的相互作用相互靠近,同时又促使 HPD 更容易被激活。但对于 HPD 利用的是超声空化时产生的热能还是光能还有待进一步的研究。目前普遍认为“声致发光”和

“热点激发”可用于解释这种激活的原因^[21]。最近的研究认为,产生单线态 $^1\text{O}_2$ 的主要诱因是超声空化后“热点”的高温效应^[22]。另外,超声波照射能够导致较宽波长范围光的产生,这些光会激发作为光敏剂的HPD从而产生单线态 $^1\text{O}_2$ 的可能性也是有的。由于Ga(III)离子与HP结合,不但改变了HP与DNA的作用方式,也提高了HP的声动力催化活性,使HP-Ga对DNA表现出明显的损伤作用。

3 结 论

类似于光的激发,高频超声波照射时,HP-Ga能够产生单线态 $^1\text{O}_2$ 及其它一些自由基导致DNA的损伤。损伤的程度随着超声波照射时间的延长和HP-Ga浓度的增加而增大,而分别随着酸度和离子强度的增加先增大和减小,后又减小和增大。从实验结果可以获得启示,如果选择对肿瘤细胞具有靶向聚集性且能够穿过细胞膜的卟啉类化合物结合超声波照射,比较容易地直接破坏肿瘤细胞内的DNA。在进一步研究的基础上或许不失为一种可行的肿瘤治疗方法。

参考文献:

- [1] Lipson R L, Baldes E J, Olsen A M, et al. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **1961**,**26**:1~12
- [2] Lipson R L, Gray M J, Baldes E, et al. *J. Cancer*, **1967**,**20**: 2255~2257
- [3] Dougherty T J, Kaufman J H, Goldfarb A, et al. *Cancer Res.*, **1978**,**38**(8):2628~2635
- [4] Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, et al. *Jpn. J. Cancer Res.*, **1990**,**81**(3):304~308
- [5] Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, et al. *Jpn. J. Cancer Res.*, **1989**,**80**(2):219~222
- [6] Umemura S, Yumita N, Nishigaki R, et al. *Jpn. J. Cancer Res.*, **1990**,**81**(9):962~966
- [7] Umemura S, Kawabata K, Sasaki K, et al. *Ultrason. Sonochem.*, **1996**,**3**(3):S187~S191
- [8] Umemura S, Yumita N, Umemura K, et al. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1999**,**43**(5):389~393
- [9] Naoto N, Norio M. *Life Sciences*, **2002**,**72**(3):321~328
- [10] ZHANG Ru-Ying(张蓉颖), PANG Dai-Wen(庞代文), CAI Ru-Xiu(蔡汝秀), et al. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chemical Journal of Chinese Universities)*, **1999**,**20**(8):1210~1217
- [11] Umemura S, Yumita N, Umemura K, et al. *Inorg. Chim. Acta*, **1997**,**263**(1~2):161~170
- [12] Lipscomb L A, Zhou F X, Presnell S R, et al. *Biochem.*, **1996**, **35**(9):2818~2823
- [13] LING Lian-Sheng(凌连生), YANG Xi(杨洗), HE Zhi-Ke(何治柯), et al. *Fenxi Kexue Xuebao(Journal of Analytical Science.)*, **2001**,**17**(1):11~15
- [14] KANG Jing-Wan(康敬万), WU Hai-Xia(吴海霞), LU Xiao-Quan(卢小泉), et al. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chemical Journal of Chinese Universities)*, **2005**,**26**(6):997~1001
- [15] YUAN Wen(袁雯), JIN Wei-Jun(晋卫军), DONG Chuang(董川). *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao(Chemical Journal of Chinese Universities)*, **2001**,**22**(6):922~924
- [16] Marzilli L G. *New J. Chem.*, **1990**,**14**(3):409~120
- [17] Mukundan N E, Pethö G, Dixon D W, et al. *Inorg. Chem.*, **1994**,**33**:76~87
- [18] Pasternack R F, Brigandi R A, Abrams M J, et al. *Inorg. Chem.*, **1990**,**29**:4483~4489
- [19] Worthington A E, Thompson J, Rauth A M, et al. *Ultrasound. Med. Biol.*, **1997**,**23**(7):1095~1103
- [20] Miyoshi N, Igarashi T, Riesz P. *Ultrason. Sonochem.*, **2000**,**7**(3):121~124
- [21] WANG Jun(王君), HAN Jian-Tao(韩健涛), ZHANG Yang(张杨), *Zhongguo Zhongliu(Bulletin of Chinese Cancer)*, **2003**,**12**(6):339~341
- [22] SHANG Zhi-Yuan(尚志远), SHI Huan-Wen(石焕文), LIU Yuan-Sheng(刘渊声), et al. *Huaxue Xuebao(Acta Chimica Sinica)*, **2004**,**62**(14):1277~1280