

表柔比星-镁体系与 DNA 相互作用初步研究

张改清² 杨曼曼³ 席小莉^{*,1} 杨 频¹

(¹ 山西大学分子科学研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

(² 吕梁高等专科学校化学化工系, 吕梁 033000)

(³ 山西大学化学化工学院, 太原 030006)

摘要: 表柔比星是临床上用于治疗快速增殖肿瘤的药物。本文应用紫外、荧光、圆二色、黏度、凝胶电泳等方法研究了表柔比星-Mg²⁺体系与 DNA 的作用。结果发现: 在 pH=7.4 时, 表柔比星可与 Mg²⁺形成稳定体系。加入 DNA 后表柔比星-Mg²⁺体系的紫外吸收明显降低; Scatchard 图表明表柔比星-Mg²⁺体系对溴化乙锭(EB)与 DNA 的结合为竞争性抑制; 同时此体系可使 DNA-EB 体系荧光偏振度增大; 使 DNA 的热变性温度(T_m)上升; 黏度增大; 凝胶电泳表明表柔比星-Mg²⁺体系对 pBR322DNA 有非常好的切割活性; 圆二色谱法表明随着表柔比星-Mg²⁺体系的加入, DNA 碱基间作用能迅速减弱, 二级结构发生了显著的变化。综上所述: 表柔比星-Mg²⁺体系与 DNA 之间为嵌插作用; 且表柔比星-Mg²⁺体系具有更好的切割活性。这些结果, 可为合理改善药效和设计新药提供依据。

关键词: 表柔比星-Mg²⁺体系; CT DNA; Scatchard 图

中图分类号: O614.22

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2011)01-0079-08

Preliminary Research on the Interaction between Epirubicin-Mg²⁺ System and DNA

ZHANG Gai-Qing² YANG Man-Man³ XI Xiao-Li^{*,1} YANG Pin¹

(*Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering (MOE),
Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China*)

(*Department of Chemistry, Liliang High Technological Academy, Liliang, Shanxi 033000, China*)

(*College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China*)

Abstract: Epirubicin is used to treat the fast multiplication cancer. The interaction of Epirubicin-Mg²⁺ system with calf thymus DNA has been investigated using UV spectra, fluorescent spectra, CD, viscosity and gel electrophoresis etc. The results show that, Epirubicin can form constant system with Mg²⁺ in pH=7.4 solution. Hypochromism was observed in the UV spectra of the system in the presence of the DNA. The Scatchard plots showed competitive inhibition against EB binding to DNA. The relative viscosity and thermal deformation temperature of DNA increased with addition of the Epirubicin-Mg²⁺ system. The fluorescence polarization of the DNA-EB system increased with addition of the Epirubicin-Mg²⁺ system. Then the interaction of the Epirubicin-Mg²⁺ system with pBR322 was studied by the method of gel electrophoresis. The result showed that the Epirubicin-Mg²⁺ system could cleave pBR322 DNA very effectively. The energy of base pair has been weakened with addition of the Epirubicin-Mg²⁺ system. So it can be concluded that the binding mode of the Epirubicin-Mg²⁺ system with CT DNA belongs to intercalation action. This work may be usefully applied to elucidating the mechanisms of natural nucleases and drug design.

Key words: epirubicin-Mg²⁺ system; calf thymus DNA; Scatchard plot

收稿日期: 2010-06-21。收修改稿日期: 2010-09-28。

国家自然科学基金资助项目(No.20971081)。

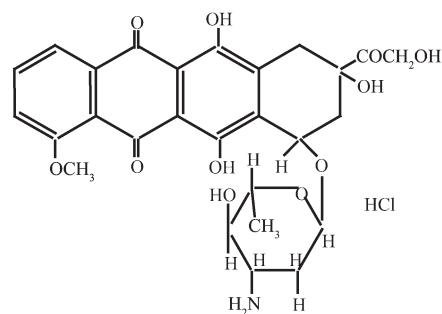
*通讯联系人。E-mail: wanghaiyan@sxu.edu.cn, Tel: 13700501823

新型抗癌药剂的开发和抗癌机理研究,一直是人们争相研究的前沿课题^[1-5]。而许多治疗癌症的药物大都是以 DNA 为靶分子来设计的^[6-7]。全面了解与掌握活性小分子和 DNA 的作用,对药物的设计具有指导作用。表柔比星是一种新的蒽环类抗生素,具有广谱抗肿瘤活性。细胞培养研究表明,该药可迅速透入细胞,进入细胞核,抑制核酸的合成和有丝分裂,常用于治疗包括 L1210 和 P388 白血病、肉瘤 SA180 (团块性,腹水型)、淋巴瘤、乳腺癌、卵巢癌、胃癌,黑色素瘤 B16、乳腺癌、路易斯肺癌以及结肠癌 38 等。在前面的文章中我们课题组研究了表柔比星铜体系与 DNA 的作用^[8],本文应用光谱等手段研究了表柔比星- Mg^{2+} 体系与小牛胸腺 DNA 的作用,发现生命金属镁与表柔比星形成的稳定体系能够与 DNA 发生作用,并引起其一系列的性质变化。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Varian 50bio 型紫外分光光度计;Perkin-Elmer LS-50B 型荧光光谱仪;Shimadzu FTIR8400S 光谱仪,KBr 压片;Biologic MOS-450 圆二色谱仪;Ubbelodthe 黏度计;BECKMAN Φ 50pH 计;小牛胸腺 DNA(华美生物工程公司),溶液纯度以 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1.8$ 衡量,浓度以 260 nm 处的吸光度来确定($\epsilon = 6\,600\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$),于 4℃ 冰箱保存备用;缓冲液由 0.1 mol·L⁻¹ Tris 溶液和 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸配制 (pH=7.2);溴化乙啶 (EB)(舒伯韦公司);盐酸表柔比星 (Epirubicin, Scheme 1) 由济南富创医药科技有限公司提供纯品(含量不低于 99%),其化学名为(7S:9S)-9-羟乙酰基-4-甲氧基-7,8,9,10-四氢-6,7,9,11-四羟基-7-O-(2,3,6-三去氧-3-氨基- α -L-阿拉伯吡喃糖基)-5,12-萘二酮盐酸盐;pBR322 DNA 购自宝生物工程(大连)有限公司,pBR322 DNA 为应用最广的质粒 DNA,是分子克隆技术中的重要载体呈共价闭环环状超螺旋状态,长度为 4363 bp,分子量为 2.88×10^6 Da。本次实验所用 pBR322 DNA 纯度符合两个要求 (1) 含 70% 以上的双链 Covalently closed circular



Scheme 1 表柔比星(Epirubicin)结构式

form I (RFI); (2) 在 TE Buffer(pH 8.0)条件下: $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} \geq 1.8$ 。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 表柔比星- Mg^{2+} 体系的吸收光谱特征

1.2.1.1 表柔比星- Mg^{2+} 体系的制备及其红外、吸收光谱特征

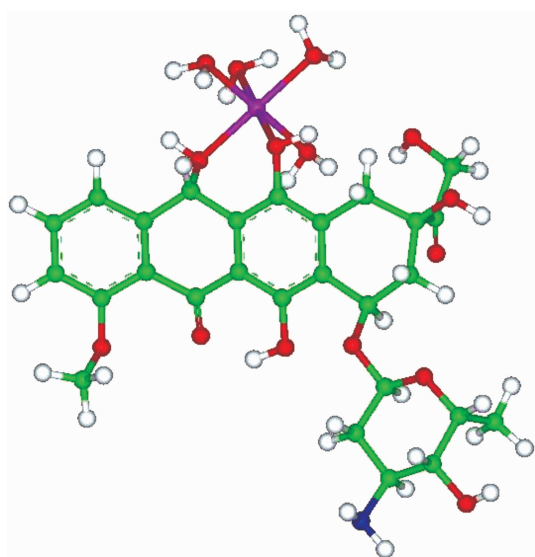
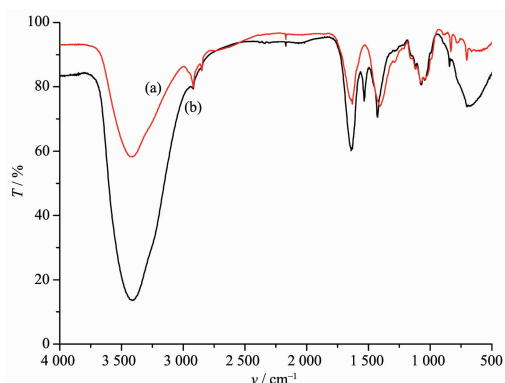
将 $MgCl_2$ 和药物表柔比星(Epirubicin)分别配成 $1\times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,然后将表柔比星溶液逐滴滴加入 $MgCl_2$ 溶液中,在一定酸度及波长条件下,测定溶液的吸光度。将所得吸光度对 c_R/c_M 作图。当药物的量较小时,金属离子没有被完全配合。随着药物的量逐渐增加,金属离子与药物配合、直至饱和,这时药物的量再增多吸光度也不会增大。运用外推法得一交点,从交点向横坐标作垂线,对应的 c_R/c_M 比值就是表柔比星镁体系的配合比 n 。实验发现在 pH=7.4 时 Mg^{2+} 可与表柔比星形成 1:1 的稳定体系(以下简称为 Epirubicin- Mg^{2+} system);同时采用连续变化法作对照,测定了此体系的表观摩尔吸光系数,表观稳定常数及组成比,其具体数据见表 1,可见两者都支持 Mg^{2+} 和表柔比星可形成 1:1 的稳定体系;进而应用分子模拟优化得到如图 1 示出的配位形式。

由图 2 可看出,表柔比星在 $3\,427.632\text{ cm}^{-1}$ 处的峰值经过与镁作用后变为 $3\,416.667\text{ cm}^{-1}$;在 $1\,633.771\text{ cm}^{-1}$ 处的峰变为 $1\,640.351\text{ cm}^{-1}$;在 $1\,407.895\text{ cm}^{-1}$ 处的峰值变为 $1\,429.825\text{ cm}^{-1}$;以上结果表明表柔比星与 Mg^{2+} 结合后, C=O、-OH 峰均发生了一定的变化。同时,在 $1\,537.281\text{ cm}^{-1}$ 及 673.112

表 1 表柔比星镁体系的有关参数

Table 1 Parameter of Epirubicin metal system

Epirubicin metal system	Apparent molar absorptivity $\epsilon / (\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{L})$	Apparent stability constant $K / (\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	Metal:ligand
Epirubicin- Mg^{2+} system (pH=7.4)	$(3.26\pm 0.02)\times 10^{-4}$	$(1.15\pm 0.01)\times 10^{-9}$	1:1

图 1 最优化的表柔比星-Mg²⁺体系的结构Fig.1 Optimized structure of the Epirubicin-Mg²⁺ system图 2 表柔比星及表柔比星-Mg²⁺体系的 IR 光谱图Fig.2 IR spectra of Epirubicin (a) and Epirubicin-Mg²⁺ (b)

cm⁻¹处又出现了 2 个新的峰, 其中 673.112 cm⁻¹ 处的峰有可能是金属与配合物中的配位键 M-L 所产生的振动^[9]。

1.2.1.2 表柔比星及表柔比星-Mg²⁺体系与 DNA 的吸收光谱

以缓冲溶液作为空白对照液, 样品池为表柔比星或表柔比星-Mg²⁺, 浓度 c 均固定为 15 μmol·L⁻¹, 然后向此样品池中逐次加入 DNA 溶液, 使得 $c_{\text{DNA}}/c_{\text{Epirubicin-Mg}^{2+}}=0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1$ 。在室温下, 反应 30 min 后, 进行紫外扫描。

1.2.2 Scatchard 图及荧光偏振度

在荧光测定中, 固定 DNA 浓度为 2.5 μmol·L⁻¹, 逐次滴加表柔比星及表柔比星-Mg²⁺体系, 使得 $c_{\text{Epirubicin}}/c_{\text{DNA}}=c_{\text{Epirubicin-Mg}^{2+}}/c_{\text{DNA}}=0, 0.25, 0.5, 1.0$ 。室温下, 反应 30 min 后, 再将 100 μg·mL⁻¹ EB 溶液加入上

述表柔比星及表柔比星-Mg²⁺体系, 激发波长 520 nm, 狭缝宽度 6 nm, 测定其荧光发射谱。数据按 Scatchard 方程^[10]处理, 以 r/c 对 r 作图(r 是与 DNA 分子中每个核苷酸成键的 EB 分子数, c 是游离 EB 的浓度)。

在荧光偏振度测定中, 固定 EB-DNA 浓度为 2.5 μmol·L⁻¹, 使得表柔比星及表柔比星-Mg²⁺体系的浓度分别为, $c_{\text{Epirubicin}}/c_{\text{EB-DNA}}=c_{\text{Epirubicin-Mg}^{2+}}/c_{\text{EB-DNA}}=0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27$ 。室温下, 反应 30 min 后, 利用荧光仪的偏振功能, 取激发波长 520 nm, 狭缝宽度 6 nm, 测定其荧光发射谱。数据按下式计算^[11]

$$P = (F_{\text{VV}} - F_{\text{VHG}}) / (F_{\text{VV}} + F_{\text{VHG}}) G = F_{\text{HV}} / F_{\text{HH}}$$

式中, P 为偏振度, F_{VV} 和 F_{VH} 分别为垂直偏振光激发下的垂直偏振发射光强度和水平偏振发射光强度; F_{HV} 和 F_{HH} 分别为水平偏振光激发下的垂直偏振发射光强度和水平偏振发射光强度。

1.2.3 热变性研究

配制 DNA-EB 溶液($c_{\text{DNA}}/c_{\text{EB}}=20$)和 DNA-EB-Epirubicin($c_{\text{DNA}}/c_{\text{EB}}=20, c_{\text{EB}}=c_{\text{Epirubicin}}$)及 DNA-EB-(Epirubicin-Mg²⁺)($c_{\text{DNA}}/c_{\text{EB}}=20, c_{\text{EB}}=c_{\text{Epirubicin-Mg}^{2+}}$)溶液, 在不同温度下测定其荧光强度。

1.2.4 黏度测定

小牛胸腺 DNA 浓度固定为 1 mmol·L⁻¹, 表柔比星及表柔比星-Mg²⁺体系浓度依次增大, 温度恒定在 (28±0.1) °C, 反应 30 min 后, 进行测量。数据以 $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ 对表柔比星及表柔比星-Mg²⁺体系浓度作图。 η 代表 DNA 在出现表柔比星及表柔比星-Mg²⁺体系时黏度, η_0 代表 DNA 单独存在时的黏度。

1.2.5 表柔比星-Mg²⁺体系与质粒 pBR322 作用的电泳实验

在 20 μL 5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 7.40, 5mmol·L⁻¹ NaCl)缓冲液中, 加入一定体积(即不同浓度)的表柔比星及表柔比星-Mg²⁺和 pBR322 溶液, 混匀, 然后在 37 °C 恒温水浴中恒温 4 h, 通过加入 EDTA 和溴酚蓝终止反应, 然后应用琼脂糖凝胶电泳分析结果、从中选出表柔比星-Mg²⁺浓度为 1.0×10⁻⁵ mol·L⁻¹ 做时间梯度实验, 体系恒温分别为 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 h。然后应用琼脂糖凝胶电泳分析结果(图谱做为支持材料), 然后选出 4 h 为合适时间做羟基自由基清除剂实验。

1.2.6 圆二色谱(CD)的测定

室温下, 取 2.5 mL 的 DNA($c_{\text{DNA}}=2.59 \times 10^{-4}$ mol·

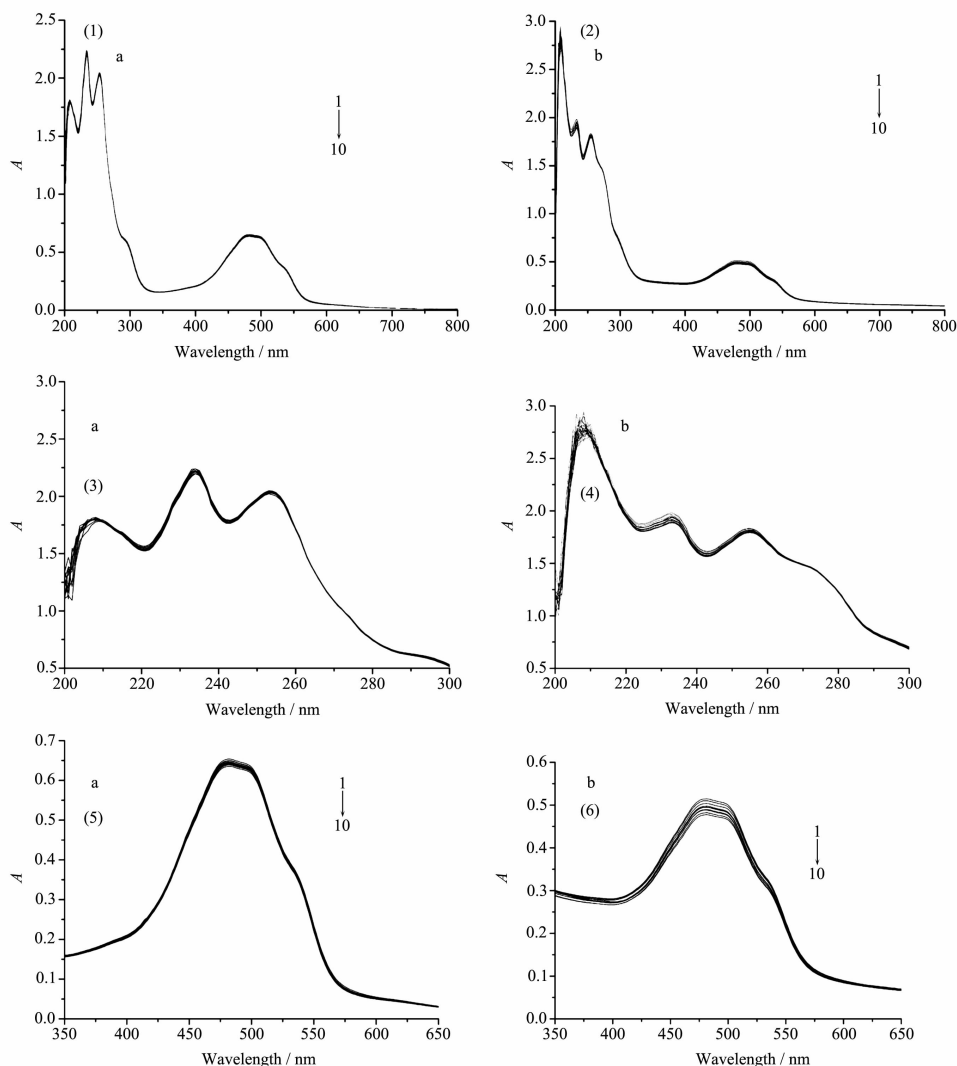
L⁻¹)溶液于一系列 10 mL 比色管中,然后依次加入不同体积的表柔比星及表柔比星-Mg²⁺体系溶液,定容后震荡摇匀,测定圆二色谱;以相应的 Tris-HCl 缓冲溶液为参比溶液,样品池为 1 cm 石英吸收池。

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱研究

图 3 中 a 为表柔比星与 DNA 作用的紫外吸收光谱,b 为表柔比星-Mg²⁺体系与 DNA 作用的紫外吸

收光谱,每个图中曲线 1 为表柔比星及表柔比星-Mg²⁺的紫外吸收光谱,曲线 2~10 为它们中加入 DNA 后的紫外吸收光谱,由图可见当加入 DNA 后表柔比星-Mg²⁺的最大吸收峰强度减小。根据文献报道^[12-14],当小分子以嵌入方式结合于 CT-DNA 双螺旋碱基对之间时,其吸收光谱表现出减色效应;当小分子以静电方式结合于 CT-DNA 时,其吸收光谱表现出增色效应;因此,此时表柔比星-Mg²⁺与 CT-DNA 之间的相互作用应以嵌入方式为主。



(a) Epirubicin; (b) Epirubicin-Mg²⁺; $c_{\text{DNA}}/c_{\text{Epirubicin-Mg}^{2+}}=0$ (1), 0.1 (2), 0.3 (3), 0.5 (4), 0.7 (5), 0.9 (6), 1.1 (7), 1.3 (8), 1.7 (9), 1.9 (10); (1), (2) UV spectrum of 200~800; (3), (4) UV spectrum of 200~300 nm; (5), (6) UV spectrum of 350~650 nm; Arrow shows that the absorbance changes with increasing DNA concentration

图 3 表柔比星及表柔比星-Mg²⁺与 DNA 的紫外吸收谱

Fig.3 UV absorption spectra of Epirubicin Epirubicin-Mg²⁺ increasing concentration of DNA

2.2 Scatchard 图及荧光偏振度研究

2.2.1 表柔比星-Mg²⁺及表柔比星对 DNA-EB 抑制作用类型分析

利用表柔比星-Mg²⁺体系存在下 DNA 与 EB 作用的 Scatchard 图,可判别表柔比星-Mg²⁺体系的作用方式^[10]。每个图最右侧线为单独 EB 与 DNA 的

Scatchard 线。

图 4 显示,在不同浓度的表柔比星- Mg^{2+} 体系存在下,Scatchard 图是几条不平行的直线。表明随着

表柔比星- Mg^{2+} 体系浓度的增大,DNA 与 EB 的结合常数发生变化,因此,表柔比星- Mg^{2+} 体系与 EB 在 DNA 上的结合位点是竞争型的。

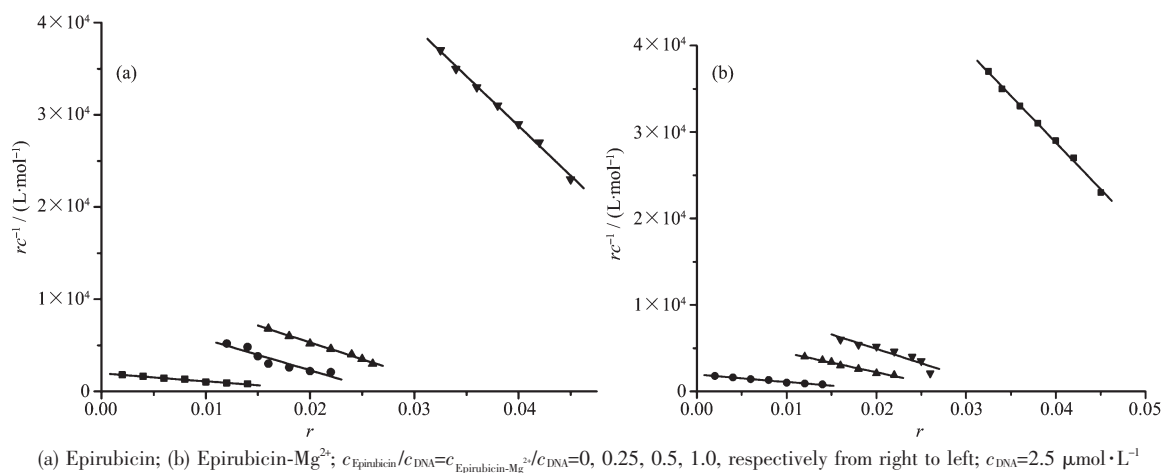


图 4 不同浓度的表柔比星及表柔比星- Mg^{2+} 体系存在下 DNA 与 EB 作用的 Scatchard 图

Fig.4 Fluorescence Scatchard plots of increasing concentration of complex

2.2.2 表柔比星- Mg^{2+} 及表柔比星对 DNA-EB 体系荧光偏振度的影响

偏振荧光强度与分子转动的速度成反比,复合物分子量大,旋转慢,偏振荧光强;游离标记抗原的分子量小,偏振荧光弱。在粘度小的溶剂(如水)中,由于小分子旋转扩散很快,其荧光偏振一般很小。

而当小分子荧光体嵌入到 DNA 的碱基对中时,其转动受阻,导致小分子转动速度变慢,因而荧光偏振会随之变大^[15]。由图 5 可以看出,表柔比星- Mg^{2+} 体系加入到 DNA-EB 体系中时, P 值上升,这是由于表柔比星- Mg^{2+} 体系和 EB 竞争,使得少量 EB 从 DNA 分子中游离出来,从而使 P 值上升。

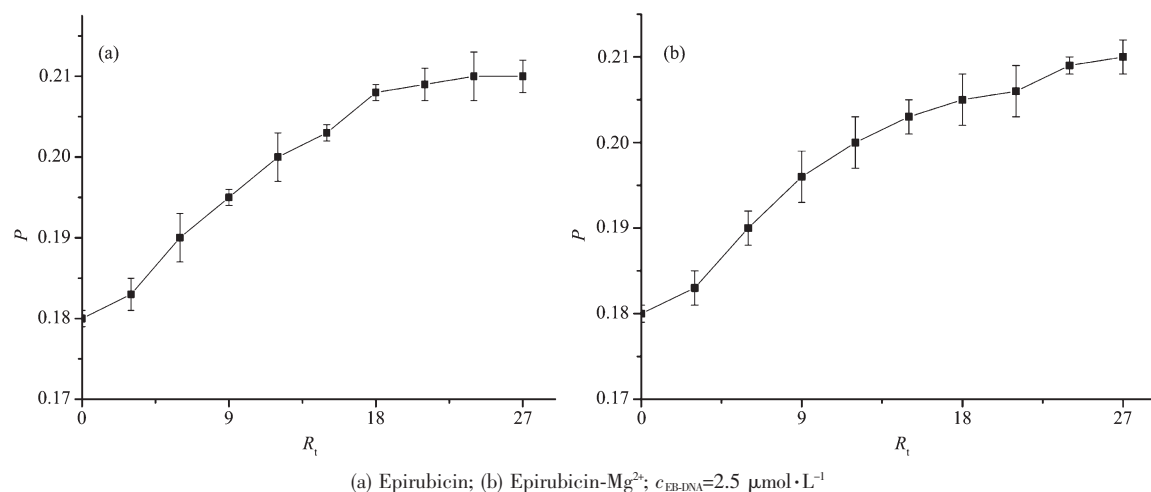


图 5 表柔比星及表柔比星- Mg^{2+} 体系对 DNA-EB 体系荧光偏振度的影响

Fig.5 Fluorescence polarization of DNA-EB system increased with addition of the Epirubicin and Epirubicin- Mg^{2+} system

2.3 CT-DNA 的热变性实验

通过测定 DNA 的热变性温度(T_m),可以发现表柔比星- Mg^{2+} 体系与 DNA 的作用模式(嵌插或外部键合)。若它们与 DNA 发生插入反应,将稳定 DNA 的双链结构,并使 T_m 急剧上升;若它们仅与 DNA 发

生外部键合时,则 T_m 上升幅度较小或不上升^[16]。在本实验条件下,DNA 的 T_m 为 84°C 。当 DNA 与表柔比星作用后,其 T_m 为 86°C ;当 DNA 与表柔比星- Mg^{2+} 体系作用后,其 T_m 为 88.5°C 。这表明表柔比星- Mg^{2+} 系的加入,增加了双螺旋构象的稳定性。

2.4 黏度研究

具有光学活性的光物理探针对于探讨键合模式一般可以提供必要的但不是充分的证据^[17]。在缺乏晶体数据的情况下,黏度测定一般被认为是确定键合模式最有力的证据之一^[18]。从图 6 可以看出, DNA 与表柔比星及表柔比星- Mg^{2+} 体系相互作用后,黏度值均升高。黏度对分子长度变化非常敏感。当表柔比星- Mg^{2+} 体系以经典插入方式与 DNA 相互作用时, DNA 相邻碱基对的距离会增大以容纳插入

的表柔比星- Mg^{2+} 体系分子,导致 DNA 螺旋伸长,相应 DNA 黏度增加。DNA 本身是一多聚阴离子,在溶液中,由于负电荷之间的相互静电排斥,使 DNA 大分子较为伸展,而当表柔比星- Mg^{2+} 体系阳离子与 DNA 带负电荷的磷酸氧基团以静电作用结合时,使得 DNA 的负电荷被部分中和,导致 DNA 螺旋收缩,分子长度变小,相应 DNA 黏度降低。因此,图 6 表明表柔比星及表柔比星- Mg^{2+} 体系均以插入方式与 DNA 相互作用。

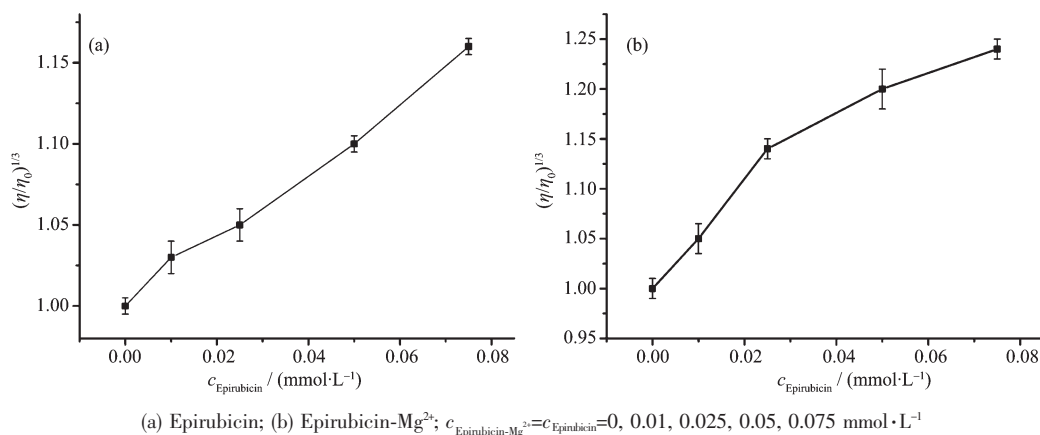


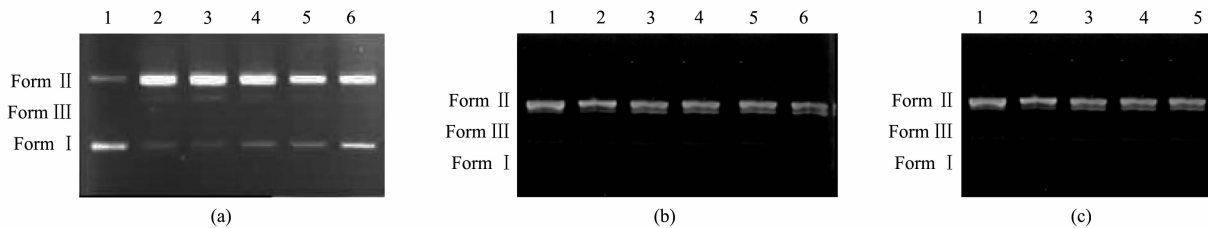
图 6 表柔比星及表柔比星- Mg^{2+} 体系在不同的浓度下对 DNA 黏度的影响

Fig.6 Effect of the increasing concentration of complex on the relative viscosity DNA

2.5 凝胶电泳分析

为了比较表柔比星及表柔比星- Mg^{2+} 体系与 DNA 的相互作用,设计了 3 个凝胶电泳实验。在 $20 \mu\text{L}$ $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.40, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl) 缓冲液中,加入一定体积的表柔比星或表柔比星- Mg^{2+} 和 pBR322 溶液,混匀,然后在 37°C 恒温水浴中恒温 4 h,通过加入 EDTA 和溴酚蓝终止反应,然后应用琼脂糖凝胶电泳分析结果,得图 7。图 7a 为

表柔比星切割 pBR322DNA 的凝胶电泳图;图 7b 为表柔比星- Mg^{2+} 体系切割 pBR322DNA 的凝胶电泳图;图 7c 为羟基自由基清除剂存在下表柔比星- Mg^{2+} 体系切割 pBR322DNA 的凝胶电泳图;由图 7a 可看出,当表柔比星浓度达到 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有线性出现,但不明显,而当浓度达到 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时线性逐渐减弱,超螺旋 DNA(form I, CCC 带)又在逐渐增加;由图 7b 可看出,当表柔比星- Mg^{2+} 体系达到



(a) Electrophorogram of Epirubicin with pBR322DNA, Lane 1: DNA control; Lane 2~6: $c_{\text{Epirubicin}}=5, 10, 20, 30, 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (b) Electrophorogram of Epirubicin- Mg^{2+} with pBR322DNA, Lane 1: DNA control; Lane 2~6: $c_{\text{Epirubicin-Mg}^{2+}}=5, 10, 20, 30, 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, (c) Cleavage of pBR322DNA by Epirubicin- Mg^{2+} in the presence of radical scavengers, Lane 1: DNA control; Lane 2: $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Epirubicin- Mg^{2+} ; Lane 3: $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Epirubicin- $\text{Mg}^{2+}+0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMSO; Lane 4: $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Epirubicin- $\text{Mg}^{2+}+0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol; Lane 5: $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Epirubicin- $\text{Mg}^{2+}+2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MeOH

图 7 表柔比星及表柔比星- Mg^{2+} 体系在不同的浓度下与 pBR322DNA 作用的电泳图

Fig.7 Results of electrophoresis of pBR322 DNA in the presence of varying concentrations of epirubicin and epirubicin- Mg^{2+} system

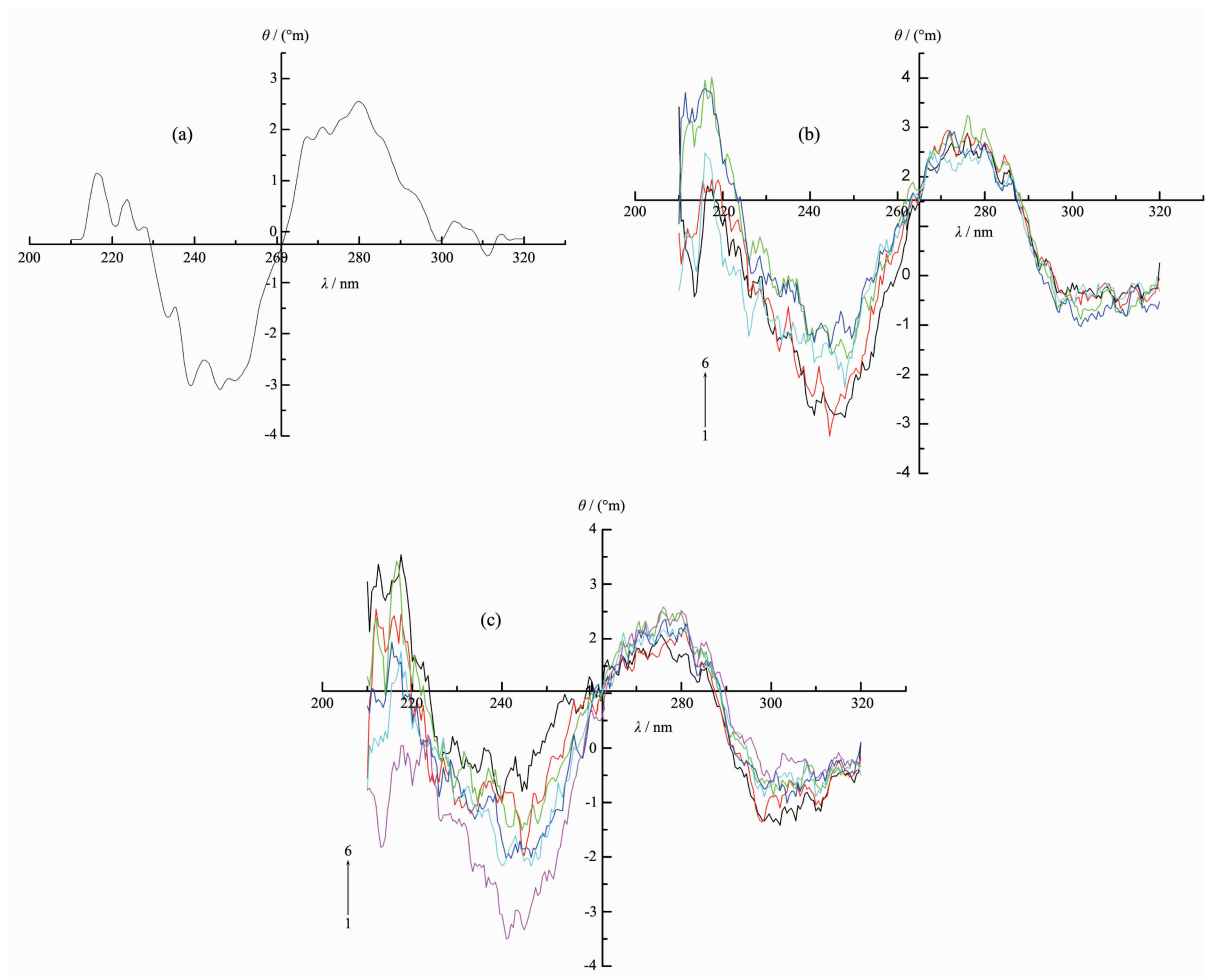
5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有线性(form III, linear 带)出现,当表柔比星- Mg^{2+} 体系达到 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时线性很明显,并且随着表柔比星- Mg^{2+} 体系浓度增大,线性逐渐增加,说明表柔比星- Mg^{2+} 体系具有较高的切割质粒 DNA 的活性。由图 7c 可看出,当 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DMSO,甘油或 2.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲醇加入到表柔比星- Mg^{2+} 与 DNA 的反应体系并温育 4 h, DNA 的切割几乎没受影响(在切割误差范围内)。由此可见,反应没有产生羟基自由基,推测表柔比星- Mg^{2+} 对质粒 DNA 的作用可能是水解切割。

2.6 CD 谱分析

DNA 的 CD 谱主要来自最邻近的碱基间的相互作用,碱基间作用能的减小,意味着“碱基堆积力”变小了,碱基堆积变得疏松了^[20-21],因而可以用 CD 谱来观察。表柔比星- Mg^{2+} 体系与 DNA 中相邻的 2 个碱基结合后,有可能使原先平行的 2 个碱基平

面相互倾斜,也可能改变碱基相互旋转的角度,这样,就破坏了原先碱基间极其规律的堆积方式,导致碱基堆积无规化,必然减少其相互作用能,使 CD 峰值改变,峰位移动。与此同时,表柔比星- Mg^{2+} 体系的作用也会使碱基间的距离,相对位置稍有改变,这种构型的变化也必然影响碱基的相互作用,使 CD 谱发生变化。

图 8a 是 CT-DNA 溶液的 CD 光谱,位于 277 nm 的正峰是由碱基的堆积产生的,而 245 nm 的负峰则对应于 DNA 双螺旋结构的 B 型构象。当向 CT-DNA 溶液中加入表柔比星后(见图 8b),DNA CD 图谱中的正负峰均发生了一定的变化,其中负峰的变化大于正峰;当向 CT-DNA 溶液中加入表柔比星- Mg^{2+} 体系后(见图 8c),正负峰也都发生了很大的变化,可以看出,图 8c 的变化幅度要大于图 8b,碱基间作用能递减,特别是 245 nm 处的负峰向正峰方



(a) DNA; (b) Epirubicin+DNA; (c) Epirubicin- Mg^{2+} +DNA; $c_{\text{Epirubicin-Mg}^{2+}}=c_{\text{Epirubicin}}=0, 5, 10, 20, 30, 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 8 表柔比星及表柔比星- Mg^{2+} 体系在不同的浓度下与 CT-DNA 作用的 CD 谱

Fig.8 Effect of the increasing concentration of Epirubicin and Epirubicin- Mg^{2+} on the CD

向的移动的趋势非常明显,因而可以认为此 DNA 的构象有从 B 型 DNA 转向 A 型 DNA 的趋势^[21],即表柔比星-Mg²⁺体系的加入使得 CT-DNA 的二级结构发生了很大的变化。

3 结 论

本文应用光谱法、粘度法、圆二色谱等方法研究了表柔比星-Mg²⁺体系与 DNA 的相互作用。结果表明:在 pH=7.4 时,表柔比星可与 Mg²⁺形成稳定体系。加入 DNA 后,表柔比星-Mg²⁺体系的紫外吸收明显降低;Scatchard 图表明表柔比星-Mg²⁺体系对溴化乙锭(EB)与 DNA 的结合为竞争性抑制;同时此体系可使 DNA-EB 体系荧光偏振度增大;使 DNA 的热变性温度(T_m)上升;黏度增大;圆二色谱法表明随着表柔比星-Mg²⁺体系的加入,DNA 碱基间作用能迅速递减。电泳结果表明:表柔比星-Mg²⁺体系能在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下将 pBR322DNA 切割出明显的线性。并且通过自由基捕捉剂 4 h 的温育,未观察到自由基产生。从而表明,表柔比星-Mg²⁺体系比单纯的表柔比星具有良好的切割活性。综合以上实验现象得出:表柔比星-Mg²⁺体系与 DNA 之间为嵌插作用;同时此体系对 pBR322DNA 有非常好的切割活性;另外它还能使 DNA 碱基间作用能迅速递减,使 DNA 的二级结构发生变化,即有可能使 DNA 的构象由 B 型转向 A 型。这些结果,可为合理改善药效和设计新药提供依据,为从分子水平上探讨药物及表柔比星-Mg²⁺体系抗肿瘤活性不同的成因及其与 DNA 作用方式之间的联系提供了有价值的信息。

参考文献:

- [1] Mokhir A A, Kraemer R. *Bioconjugate Chem.*, **2003**,**14**(5): 877-883
- [2] Liu F, Wang K, Bai G, et al. *Inorg. Chem.*, **2004**,**43**(5):1799-1806
- [3] Okamoto A, Tanabe K, Saito I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**,**124**(35):10262-10263
- [4] Wu J Z, Yuan L. *J. Inorg. Biochem.*, **2004**,**98**(1):41-45
- [5] SONG Yu-Min(宋玉民), YANG Pei-Ju(杨培菊), WANG Liu-Fang(王流芳), et al. *Acta Chim. Sin. (Huaxue Xuebao)*, **2003**, **61**(8):1266-1270
- [6] YANG Pin(杨频), GAO Fei(高飞). *The Principle of Bioinorganic Chemistry*(生物无机化学原理). Beijing: Science Press, **2002**:47-53
- [7] ZHAO Lin(赵琳), WU Bao-Yan(吴宝燕), GAO Li-Hua(高丽华), et al. *Acta Chim. Sin. (Huaxue Xuebao)*, **2006**,**64**(13): 1402-1406
- [8] XI Xiao-Li(席小莉), YANG Man-Man(杨曼曼), YANG Pin(杨频), et al. *Acta Chim. Sin. (Huaxue Xuebao)*, **2008**,**66**(10): 1181-1186
- [9] YANG Pin(杨频), GAO Fei(高飞). *The Principle of Bioinorganic Chemistry*(生物无机化学原理). Beijing: Science Press, **2002**:356
- [10] Yang P, Guo M L. *Met.-Based Drugs*, **1998**,**5**(1):41-58
- [11] CHEN Guo-Zhen(陈国珍), HUANG Xian-Zhi(黄贤智), XU Jin-Gou(徐金钩). *Fluoresomm Spectrometry*(荧光光谱). Beijing, Science Press, **1990**:24
- [12] Tu C Y, Luo Z D, Chen G, et al. *Crystal. Growth*, **1995**,**152**(3):235-237
- [13] LI Wen-You(李文友), ZHU Shou-Tian(朱守田), HE Xi-Wen(何锡文), et al. *Acta Chim. Sin. (Huaxue Xuebao)*, **2002**,**60**(1):105-108
- [14] WANG Xing-Ming(王兴明), LI Hong-Bo(黎泓波), HU Ya-Min(胡亚敏), et al. *Acta Chim. Sin. (Huaxue Xuebao)*, **2007**, **65**(2):140-146
- [15] Mulqueen P T, Horrocks W D. *Biochemistry*, **1985**,**24**(23): 6639-6645
- [16] JIN Lan(靳兰), YANG Pin(杨频), LI Qing-Shan(李青山). *Chem. J. Chinese Universities (Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, **1996**,**17**(9):1345-1348
- [17] Sigma D S, Mazuder A, Perrin D M. *Chem. Rev.*, **1993**,**93**(6):2295-2316
- [18] Satyanarayana S, Dabrowiak J C, Chaires J B. *Biochemistry*, **1992**,**31**(39):9319-9324
- [19] Pang D W, Abruna H D. *Anal. Chem.*, **1998**,**70**(15):3162-3169
- [20] XIAO Mei-Ying(肖枚英). *J. Capital Normal Univ.: Nat. Sci. Ed. (Shoudu Shifan Daxue Xuebao: Ziran Kexueban)*, **1996**, **17**(4):43-46
- [21] TU Zeng-Hong(屠曾宏), WANG Mei-Ying(王美瑛), SHEN Chun-Yi(沈春镒), et al. *Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis (Aibian Jibian Tubian)*, **1993**,**5**(2):15-19
- [22] YANG Pin(杨频), GAO Fei(高飞). *The Principle of Bioinorganic Chemistry*(生物无机化学原理). Beijing: Science Press, **2002**:343-354