

• 研究论文 •

三联吡啶钌 (III) 光敏损伤 DNA 的 凝胶电泳研究 *

张连文 林维真 韩镇辉 姚思德 ** 林念芸

(中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室 上海 201800)

摘要 采用琼脂糖凝胶电泳研究了以可见光引发的三联吡啶钌 (III) 与 DNA 之间的光敏反应。发现在有氧气条件下, 三联吡啶钌 (III) 经 427~457nm 光照可导致 DNA 的光敏损伤, 其途径主要是通过单线态氧与 DNA 反应引起的碱基损伤, 另外则是通过 DNA 与三联吡啶钌阳离子自由基 ($[\text{Ru}^{2+}(\text{bpy})_2(\text{bpy}^{+\bullet})]^{3+}$) 反应导致碱基损伤而产生的, 而且损伤与 DNA 和联吡啶钌之间的浓度比存在着一定关系。对照单链 DNA 及双链 DNA 光敏损伤结果后发现, 单链 DNA 较双链 DNA 更易于产生光敏损伤, 这可能是由于单链 DNA 中碱基较双链 DNA 中的更为暴露的缘故。

关键词 三联吡啶钌 (III), 光敏损伤, 凝胶电泳, ssDNA, dsDNA

中图分类号 O614.82⁺1, O629.74

随着肿瘤光敏治疗研究的深入, 需要开发光敏效率高、增敏作用强、选择性好、低毒及激发波长向红光延伸的新型光敏剂。具有位点选择性的光敏剂更是其中热点之一。钌类配合物, 作为阳离子型配合物的一种, 能够与 DNA 通过静电作用或者嵌入 DNA 双链的大小沟之间而结合^[1~6]。研究发现, 多种钌的配合物可以在光激发下, 诱发 DNA 的链断裂^[7~9]。文献 [10,11] 报道, 三联吡啶钌 (II) 及二价钌的其它配合物光敏损伤 DNA 主要是通过单线态氧的过程, 它并不嵌入 DNA 双链而只是通过静电引力与之结合, 三联吡啶钌 (II) 三重激发态在水溶液中被氧气猝灭的速率常数为: $K_q=3.79 \times 10^9 \text{ dm} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[12]。通过对光敏损伤核酸大分子的研究后发现, 这种损伤主要与氧气的存在、光敏剂与核酸分子之间的浓度比及离子强度等有关^[9]。

光化学研究发现, 三联吡啶钌 (III) 水溶液在光照下发生分子内电子转移反应: (结构式见图 1)。

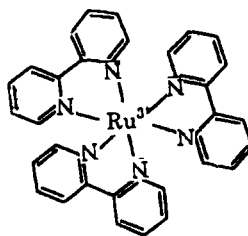
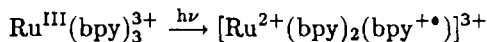


Fig.1 Structure of tris (bipyridine ruthenium(III))



* 国家自然科学基金“九五”重点项目资助 (39830090); 中国科学院“九五”重点项目资助 (KJ952-S1-419)

** 通讯联系人

收稿日期: 初稿 2000-04-02, 修回 2000-04-24

在光激发下,电子从配体联吡啶上转移到中心原子 Ru^{3+} 形成 Ru^{2+} , 同时在联吡啶上出现阳离子自由基, 这一反应的过渡态为激发态, 它的寿命约为 3ps, 无辐射衰减速率常数为 $3 \times 10^{11} s^{-1}$, 激发态能量为 1.76eV^[13]。三联吡啶钉极易水溶, 决定了在体内能较快代谢; 这类物质有着很强的光敏活性, 应用于光敏治疗所需剂量少, 这些特点说明其较低的生物毒性。与卟啉类光敏剂相比, 三联吡啶钉在 430~480nm 范围内存在着两个很强的吸收峰, 而卟啉类物质的最大吸收在 380~410nm 处, 较长的吸收波长意味着其较强的组织穿透性。但是, 关于三联吡啶钉 (III) 与 DNA 的光敏反应研究还未见报道。本文采用凝胶电泳方法检测三联吡啶钉 (III) 光敏损伤 DNA, 旨在定性地阐明损伤机制及影响这一损伤的因素。

1 实验样品和方法

1.1 药品

采用链长大约 5.5kb 的人工构建双链闭环质粒 DNA: PcDNA, 从克隆此质粒的大肠杆菌 37 °C 摇床培养 24h 抽提而得, 纯化后以 260nm 处吸光度确定其最终浓度为 $4.6 \times 10^{-3} mol \cdot L^{-1}$ 碱基对 (bp)(取 $\epsilon_{260} = 6600 mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)^[14]。E.coli I 限制性核酸内切酶及相应的缓冲溶液购自生工生物工程有限公司; 吡啶、叠氮化钠为 Sigma 公司产品, 联吡啶钉由山东师范大学化学系付红燕博士馈赠并经两次重结晶纯化。NaCl、重水 (99.8%) 均购自上海化学试剂公司。样品用 3 次蒸馏水配制, 电泳过程使用普通蒸馏水。PcDNA 在使用前用 E.coli I 酶线性化。通过在 95 °C 加热 DNA 5min, 然后用冰盐水冷却的方法制取 ssDNA。除非特别说明, 实验所用 DNA 浓度一般指碱基对浓度。

1.2 实验装置和检测方法

实验采用自制氙灯 (380W) 作为光源, 其构造见图 2。在光源与样品池间放一凸透镜, 在样品池前放置中心透过波长为 442nm、波带宽为 30nm 的干涉滤色片, 无干涉滤色片时测得焦点处光强为 $0.69 \times 10^{-6} Einstein \cdot l^{-1} \cdot s^{-1}$ (以 $0.05 mol \cdot L^{-1}$ 的 KI 溶液经光照后测 I_3^- 的浓度标定, 参考 Jortner 的工作曲线^[15]), 联吡啶钉紫外-可见吸收光谱在岛津 UV-210A 双波长分光光度计上测得。

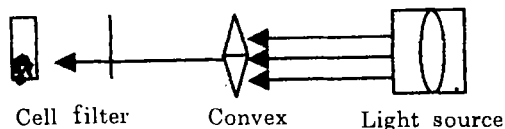


Fig.2 Irradiation apparatus

采用常规琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 光照前后的变化, 结合荧光照相, 得到电泳结果。

2 实验结果

2.1 三联吡啶钉的吸收谱

用岛津 UV-210A 双波长分光光度计测得三联吡啶钉在紫外-可见部分的吸收光谱如图 3。从图 3 可看出, 三联吡啶钉水溶液 (浓度为 $0.071 mmol \cdot L^{-1}$) 在可见光范围内主要有两个吸收带, 其吸收峰分别位于 425nm 和 460nm。由此, 光照时选择一中心透射波长为 442nm、波带宽为 30nm 的干涉滤色片滤光。

2.2 光照量的影响

以 $0.46 mmol \cdot L^{-1}$ DNA 80 μ L 和 $1.0 mmol \cdot L^{-1}$ 三联吡啶钉水溶液 10 μ L 于离心管混合后,

取 $80\mu\text{L}$ 于样品池中, 通氧气 10min, 光照一定时间后取样 $10\mu\text{L}$ 。光照结束后以 $0.3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 哌啶在 90°C 孵育 30min, 然后作凝胶电泳分析 (见图 4), 选择的最佳光照时间为 30min。

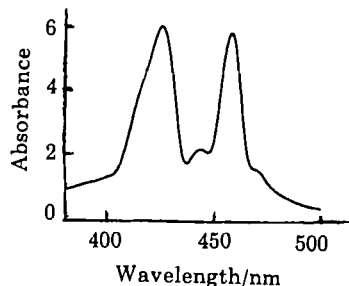


Fig.3 Absorption spectrum of tris(bipyridine) ruthenium(III)

2.3 氧气的影晌

配制浓度比 (bp/Ru^{3+}) 为 4:1 的 DNA ($0.4\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与联吡啶钌的混合溶液, 取 $50\mu\text{L}$ 于样品池中, 分别通氮气及氧气 10min, 然后光照 30min, 以无光照的样品作对照, 经哌啶处理后作凝胶电泳分析 (见图 5)。结果发现, 在有氧气存在的条件下光敏损伤效果增强。

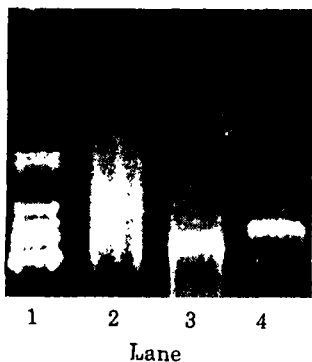


Fig.5 Oxygen effect

Gassing the same sample solution with different gas and irradiated them the equal time lane 1-4 stand for λ IIDNA, oxygen saturated, nitrogen saturated and sample without irradiation separately

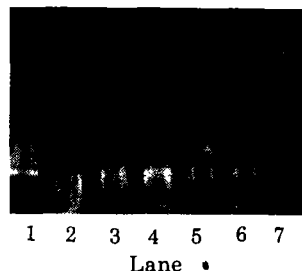


Fig.4 Irradiating time effect

Irradiated the solution consisted of 0.11mmol Tris-(bipyridine)-ruthenium(III) and $0.4\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DNA, the result shows the effect on DNA damage according to different irradiating time lane 1 and 2~7 stand for λ IIDNA and samples irradiated 0, 10, 20, 30, 45, 60minutes

2.4 单线态氧的验证

配制浓度比 (bp/Ru^{3+}) 为 4:1 的 DNA ($0.4\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与联吡啶钌的混合溶液, 取 $40\mu\text{L}$ 于样品池中, 分别通氧气 10min. 其中一样品中加入 2mol 的叠氮化钠; 另用重水配制上述浓度比的溶液以空气饱和, 并以相同配比的空气饱和水溶液作为对照。各样品的光照时间均为 30min, 光照处理后用凝胶电泳检测, 结果见图 6。

2.5 浓度比的影响

配制不同浓度比的 DNA 和联吡啶钌的混合溶液, 各通氧气 10min, 光照 30min, 经哌啶处理后做凝胶电泳, 结果如图 7。由图 7 可见, 当浓度比 bp/Ru^{3+} 的值约为 5:1 时, 样品 DNA 特征条带消失, 而在前方出现一条 DNA 碎片亮带, 标志着 DNA 的断链, 而其他几种浓度比的样品电泳后则没有类似现象。这表明当浓度比 bp/Ru 的值约为 5:1 时, 光敏的效果最显著。

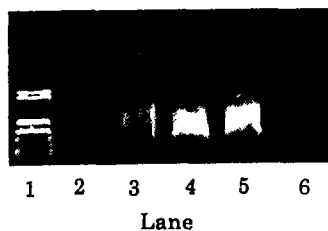


Fig. 6 Singlet oxygen detection

All the samples containing $0.071\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-(bipyridine)-ruthenium(III) and 0.035mmol DNA were irradiated 30 minutes. Lane 1 stand for the λ IIIDNA, lane 2, 3 stand for the samples saturated with oxygen for 10 minutes, $\text{NaN}_3(2\text{mol})$ was added into the No.3 sample. No.4 saturated with nitrogen for 10 minutes, No.5 and 6 are both air saturated and solved in water and heavy water separately

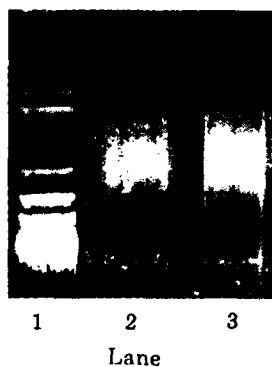


Fig. 8 Ionic strength effect

Both the samples containing 0.4mmol DNA and 0.1mmol Tris-(bipyridine)-ruthenium (III) were irradiated for 30min. Lane 1 stand for λ IIIDNA, lane 3 stand for the sample added with $25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl and lane 2 without NaCl

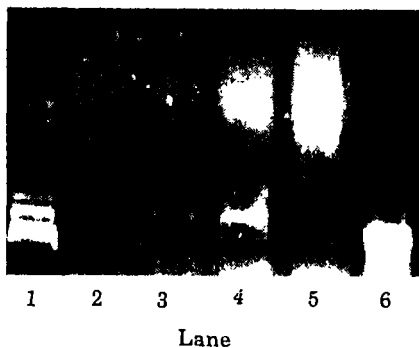


Fig. 7 The bp/Ru^{3+} ratio effect With the same concentration of Tris-(bipyridine)-ruthenium(III)($0.071\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), changed the DNA concentration to detect the ratio effect. Lane 2-6 stand for the $r(\text{bp}/\text{Ru}^{3+})=1, 2, 3, 2, 5, 6$ separately, and lane 1 stand for λ IIIDNA

2.6 离子强度的影响

取一定量的 DNA 和联吡啶钌溶液, 使两者的终浓度分别为 $0.4\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在该混合溶液中加入 NaCl 溶液使其终浓度为 $25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 经光照、电泳后拍照得到如图 8 的结果。结果表明, NaCl 的加入, 对 DNA 的光敏损伤产生了负影响, 从一定程度上减弱了这种损伤。

2.7 三联吡啶钌(III)光敏单链 DNA 和双链 DNA 损伤的比较

各配碱基浓度为 $0.8\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dsDNA 和 ssDNA 溶液, 都加入 $0.1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的联吡啶钌, 通氧气 10min 后, 光照 20min, 经吡啶孵育处理, 做凝胶电泳分析, 以经同样处理的 dsDNA 作对照, 结果见图 9。图 9 表明, 在同样的处理条件下, ssDNA 较之 dsDNA 更容易发生光敏损伤。

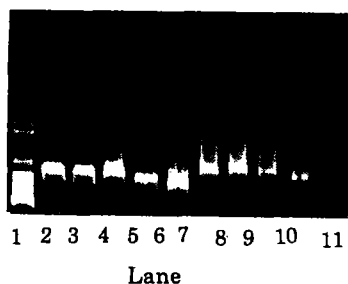


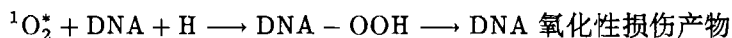
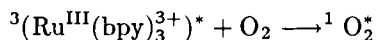
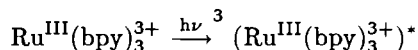
Fig.9 Photo-damage ssDNA and dsDNA

All the samples contained the same concentration, $[\text{base}] = 0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for DNA and $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for Tris-(bipyridine)-ruthenium(III), and were irradiated for 20 minutes. lane 1 is λ IIIDNA, lane 2-6 stand for dsDNA and 7-11 for ssDNA. lane 2, 7 stand for DNA without sensitizer; 3 and 8 stand for the samples without post-treatment; 4 and 9 only incubated at 90°C for 30 minutes; 5 and 10 treated only with piperidine ($0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 6 and 11 were added $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ piperidine and incubated at 90°C for 30 minutes

3 讨 论

在通氧条件下测定 DNA 损伤程度与样品光照量的关系, 发现光照 30min 已显著引发 DNA 的光敏损伤, 而且随着光照时间延长, 即光照量增加, DNA 损伤量增多。

在氧气饱和的条件下, 经光照的 DNA 电泳后发现其特征条带消失, 而在同样实验条件下通氮气及不光照的两个对照样品电泳图谱中仍然存在着这一条带。这一现象表明氧气的存在促进了这种损伤。推测这种损伤的主要途径是:

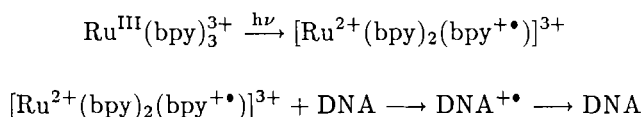


而由联吡啶钌的激发态直接与 DNA 的碱基组分发生反应的可能性很小。

叠氮化钠是单线态氧的有效猝灭剂之一^[16], 图 6 结果表明, 在同样的条件下, 加有叠氮化钠的 DNA 样品在凝胶电泳过程中, DNA 亮迹的速度较不加叠氮化钠的样品明显减慢, 表明含叠氮化钠样品中 DNA 链断裂片段较同样条件下无叠氮化钠的大, 损伤程度小。单线态氧是损伤 DNA 的主要活性物质之一, 叠氮化钠对单线态氧的猝灭减弱了这种光敏损伤的程度, 这说明单线态氧是导致联吡啶钌光敏损伤 DNA 的主要途径。单线态氧在重水中有着比普通水中更长的半衰期, 在一定的时间里, DNA 会与更多的单线态氧发生作用而受到损伤^[16]。从图 6 中可以看出: 光照相同时间, 通氧的 2 号样品比氧气饱和的 5 号样品损伤程度显著; 且 DNA 在重水中比水中受损伤程度深, 这进一步验证了单线态氧在这一损伤过程中的作用。同时, 在通氮条件及叠氮化钠猝灭的条件下, 光敏损伤仍然在一定程度上发生, 暗示了单线态以外的损伤途径的存在。

由图7可以看出,当浓度比 bp/Ru³⁺ 的值为 5:1 时,样品 DNA 的特征条带消失,在电泳方向的前方出现一条 DNA 碎片的亮带,而其他几种浓度比的样品电泳后则没有类似现象。在样品 2~7 号中,随着 DNA 量的增加,光敏损伤的程度加深,2 号样条带很模糊是由于 DNA 量太少,而并不是损伤的原因;7 号样所加 DNA 量的增加使得其特征条带十分明显,这并不表示没有任何的损伤产生,但极少的 DNA 碎片亮带出现说明其损伤的效率显著减弱。这表明 DNA 的损伤不仅受氧气存在的影响,与光敏剂和 DNA 的浓度比也存在着一定的关系。当这一浓度比为 $r=1/5$ 时,光敏损伤效率最佳,而小于或大于这一比例则损伤效率降低。这可能是当大于这浓度比时,增加了溶液中光敏剂分子相互碰撞的机会,光敏剂三重态发生自猝灭,从而降低了瞬态产物的实际浓度,并不随之增加 DNA 光敏损伤量。而小于这一浓度比时,由于 DNA 量的增加,增加了溶液的黏度,在一定程度上限制了瞬态产物的运动,反而降低了实际参加反应 DNA 的浓度,使得 DNA 光敏损伤量降低。

改变离子强度从一定程度上对光敏损伤效率产生了负影响。这表明联吡啶钌与 DNA 间存在静电相互作用,也可能通过激发态电子转移氧化 DNA:



氧化性损伤产物反应物之间的距离对于它们的反应速度影响很大。由于离子强度的增加,阳离子型的联吡啶钌与 DNA 分子变得相对疏远,使光敏损伤的程度减弱。

实验结果发现,联吡啶钌主要产生 DNA 链上某些碱基位点的光敏损伤,根据文献报道这些位点主要集中在鸟嘌呤碱基上^[17],而不是链的直接断裂。因此,光照后的 DNA 未经哌啶处理而直接电泳,其特征条带并未消失。ssDNA 比 dsDNA 在同样的处理条件下,产生更多的光敏损伤,这主要因 ssDNA 的碱基较之 dsDNA 更为暴露而导致更多碱基光敏损伤的缘故。

综上所述,三联吡啶钌(III)在氧气存在的条件下,经 427~457nm 波长的可见光激发而诱发 DNA 链上碱基损伤,这种损伤主要通过其激发三重态与氧作用产生的单线态氧的途径,氧气的存在是产生这种损伤的关键因素,另外由三重激发态通过分子内电子跃迁产生的自由基可能是导致这种损伤的因素之一。三联吡啶钌(III)与 DNA 分子之间的浓度比也是影响这种光敏损伤的重要因素,实验显示,当这一浓度比值(bp/Ru³⁺)为 5:1 时,即一个光敏剂分子对五个碱基对时光敏损伤最为显著。在同样的反应和处理条件下,ssDNA 较之 dsDNA 更易被光敏剂所损伤。

参 考 文 献

- 1 Barton J K. *Science*, 1986, **233**:727-734
- 2 Barton J K, Mgoldberg J, Kumar C *Vet al.* *J Am Chem Soc*, 1986, **108**:2081-2088
- 3 Pyle A M, Rehmann J P, Meshourer R *et al.* *J Am Chem Soc*, 1989, **111**:3051-3058
- 4 Hiort C, Norden B, Rodfer A. *J Am Chem Soc*, 1990, **112**:1971-1982
- 5 Kelly J M, Tossi A B, Meconnell D J *et al.* *Nucl Acids Res*, 1985, **13**:6017-6034
- 6 Kumar C V, Barton J K, Turro N J. *J Am Chem Soc*, 1985, **107**:5518-5523
- 7 Barton J K. *J Biomol Struct Dyn*, 1983, **1**:621-632
- 8 Stradoski C, Gorner H, Currell L J *et al.* *Biopolymers*, 1987, **26**:189-201

- 9 Gorner H, Tossi A B, Stradowski C *et al.* J Photochem Photobiol B: Biol, 1988, 2:67-89
- 10 Mei H Y, Barton J K. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85:1339-1343
- 11 Chrisiane Sentafne, Jean-Claude Chambron, Jean-Pierre Sauvage *et al.* J Photochem Photobiol B: Biol, 1994, 26:165-174
- 12 Zahir K, Haim A. J Photochem Photobiol A: Chem, 1992, 63:167-172
- 13 Pushpito K G, Bruce S B, Mei C, *et al.* J Am Chem, 1984, 106:4772-4783
- 14 Mahler H R, Cordes E H. Nucleic Acids Biological Chemistry, New York: Harper Row Edt, 1966, 159
- 15 Jortner J, Ottolenghi M, Levine R *et al.* J Phys Chem, 1961, 65: 1232-1238
- 16 Zheng R L. Free Radical Biology (in Chinese), 1992, 36-37
- 17 Kruk N N, Dzhagarov B M, Galievsky V A *et al.* J Photochem Photobiol B, Biol, 1998, 42:181-190

AN ELECTROPHORESIS STUDY OF DNA PHOTOSENSITIZATION DAMAGE BY TRIS(BIPYRIDINE) RUTHENIUM(III)

ZHANG Lianwen LIN Weizhen HAN Zhenhui YAO Side** LIN Nianyun

(Laboratory of Radiation Chemistry, Shanghai Institute of Nuclear Research, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

ABSTRACT The photosensitization effects of tris(bipyridine)ruthenium-(III) on DNA caused by visible light has been studied by using of agarose electrophoresis. In the presence of oxygen, it was found that DNA strand break, which amount was related to the concentration ratios of DNA and tris-(bipyridine)-ruthenium-(III), the DNA fragments appearing induced by tris-(bipyridine)-ruthenium-(III) irradiated with the light wavelength ranged at 427-457nm via base damage mainly resulted from the reaction of DNA with singlet oxygen, which was produced from the reaction between ground state oxygen and excite state of tris-(bipyridine)-ruthenium-(III), and via that from the reaction with cation radical of tris-(bipyridine)-ruthenium-(III). It also shown that the ssDNA did more easily break than that of dsDNA, which might be due to the more base accessible in ssDNA.

KEYWORDS Tris-(bipyridine)-ruthenium(III), Photosensitization damage, Electrophoresis, ssDNA, dsDNA

CLC O614.82⁺¹, O629.74

Supported by the National Natural Science Foundation of China (39830090) and by the Research Foundation of Chinese Academy of Sciences (KJ952-S1-419)

**Corresponding Author