

ADE 光诱导原初过程的时间分辨研究：

II. 生物分子复合物中的光化学

潘景喜¹ 林维真¹ 韩镇辉¹ 苗金玲¹ 王文锋¹
姚思德¹ 林念芸¹ 朱大元²

¹(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)

²(中国科学院上海药物研究所 上海 200031)

摘要 利用激光光解结合稳态吸收光谱技术,对放线菌素 D 的模型化合物 ADE 与 DNA 和牛血清蛋白的相互作用进行了系统研究。结果发现, ADE 与 ssDNA、dsDNA 以及 BSA 都能发生非共价结合,并能发生光诱导的电子转移反应。结果表明,放线菌素类化合物有可能被用作 I 型的光敏治疗药物,并将为这类化合物的结构改造提供一些有益的启示。

关键词 放线菌素 D, 激光光解, DNA, BSA, 电子转移

中图分类号 O644

放线菌素 D (AMD) 是一种临床应用的抗癌化疗药物, 它的抗癌作用被认为是由于其能够与双链 DNA (dsDNA) 结合进而阻止了 DNA 的复制引起的^[1,2]。近年来的研究表明, AMD 能够有效抑制人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的反转录^[3,4], 这是由于 AMD 与单链 DNA (ssDNA) 之间发生了选择性结合作用引起的^[5,6]。另外, 光敏剂除了能与 DNA 结合以外, 还能够和蛋白质 (如血清蛋白) 结合形成复合物, 而这种结合会大大影响光敏剂的光物理和光化学性质^[7,8]。Flitter 等^[9]发现这种结合部分抑制了铁氧还蛋白还原酶还原 AMD 成为半醌亚胺自由基的反应。

由于 AMD 的发色团在可见光区有很强的吸收, Zhdanov 等^[10]做了细胞实验, 首次报道了 AMD 的光动力作用可杀死逆转录病毒。利用 EPR 技术研究了 AMD 的光动力作用过程, 发现 AMD 在光激发下可以通过电子转移机制氧化 DNA^[11]。为了更详细地了解 AMD 的光动力作用机制, 对放线菌素 D 的模型化合物 ADE 与生物大分子的稳态相互作用以及 > 与这些分子形成复合物以后的光化学性质进行了研究, 与 AMD 相比, ADE 的分子结构中缺少两个五肽内酯环侧链。这种结构的改变使得 ADE 与 DNA 的相互作用没有了序列选择性, 而且也不能抑制以 DNA 为模板的 RNA 的合成^[12], 但它确实能和双链

DNA (dsDNA) 发生嵌入式结合^[13]。

1 材料和方法

dGMP、BSA 为 SIGMA 公司产品。ssDNA 是由 dsDNA 的溶液在 90°C 的水浴中加热 10min, 然后在冰-盐(KCl)浴中迅速冷却制得。水用新蒸的 3 次蒸馏水, 乙腈经过重蒸, 所有溶液均在使用前新鲜配制。稳态吸收光谱用 Shimadzu UV-210A 型双光束分光光度计记录。激光光解实验所用激光器为 XeCl (308nm) 准分子激光器, 脉冲宽度为 20ns, 单次脉冲最大能量为 40mJ。

2 结果和讨论

2.1 ADE 的稳态吸收

和 AMD 类似, ADE 在可见光区有很强的吸收。图 1 曲线 a 是 ADE 溶于乙腈/水混合溶剂时的吸收光谱, 最大吸收波长 ($\lambda_{\max}$) 为 442nm。当溶液中加入 dsDNA (1.3mmol/L 碱基对) 时, $\lambda_{\max}$ 从 442nm 移至 480nm (见图 1 曲线 b), 红移了 38nm, 而吸收强度明显减弱。和其它平面型有机分子一样, 这种现象被归因于 ADE 的平面型结构插入 dsDNA 碱基对中间, 并形成了非共价相互作用的结果。但有趣的是, 当溶液中的 dsDNA 换成 ssDNA (2.6mmol/L) 时, 却没有观察到和 AMD 相类似的结果 (见图 1 曲线 c)。

国家自然科学基金(39830090)资助

第一作者:潘景喜,男,1973 年 3 月出生,1996 年毕业于山东大学化学系,获理学学士学位,后于 2001 年中国科学院上海原子核研究所博士毕业,获理学博士学位

收稿日期:初稿 2001-12-18,修回 2002-07-24

ssDNA 的加入,不但没有使 ADE 的吸收光谱红移,反而有一点蓝移(2nm),而且吸收强度也没有减弱,而是有所增强。这说明 ADE 与 ssDNA 作用的方式和 AMD 的半嵌入方式是完全不同的。其实,Chatterjee 等^[14]在研究卟啉类化合物 H_2T_4CPP 和 DNA 的相互作用时也观察到了类似现象,他们认为这是由于光敏剂与 DNA 发生了外部结合作用并引起 DNA 螺旋结构的部分解离引起的,所以我们认为 ADE 与 ssDNA 的作用也可以归因于这种作用方式。

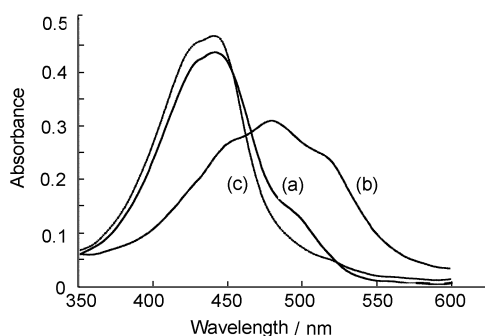


Fig.1 Absorption spectra of ground state from. (a) 0.02mmol/L ADE in acetonitrile aqueous solution (1:2). (b) 0.02mmol/L ADE + 1.3mmol/L dsDNA (per base pair) in the same solution. (c) 0.02mmol/L ADE + 2.6mmol/L ssDNA (per base pair) in the same solution.

2.2 ADE 与牛血清蛋白 (BSA) 的相互作用

AMD 能够与牛血清蛋白 (BSA) 结合。牛血清蛋白 (BSA) 是一种蛋白模型,它的分子结构中含有 583 个氨基酸残基,其中有 78 个氨基酸容易被氧化(2 个色氨酸、4 个甲硫氨酸、17 个组氨酸、20 个酪氨酸和 35 个半胱氨酸)^[15]。Baptista 等^[7]发现,当 BSA 以共价键与光敏剂结合以后,大大增加了三芳基甲烷类染料的荧光产额和寿命、系间窜跃效率和光反应活性。

2.2.1 稳态吸收光谱 当 ADE 的溶液中加入 BSA 时,吸收光谱的变化如图 2 所示。从图 2 中可以看出,单独的 BSA 和 ADE 在 330nm 附近都没有明显吸收,但当两者加在一起后,该处出现了一个新的吸收峰(见图 2 曲线 c)。同时,450nm 左右的吸收减弱,我们认为这都是由于 ADE 与 BSA 发生了非共价结合作用引起的。

2.2.2 激光光解研究 图 3 给出了含 ADE 和 BSA 的溶液激光光解的瞬态吸收光谱。0.1 μ s 时应该是 $^3ADE^*$ 的瞬态吸收,但由于存在与稳态吸收光谱相对应的光漂白,使得 $^3ADE^*$ 在 330nm 处的吸收峰没有表现出来。随着时间的延长,伴随着 $^3ADE^*$ 的消失,出现了 ADE $^-$ 的特征吸收谱(360nm 和 560nm)。

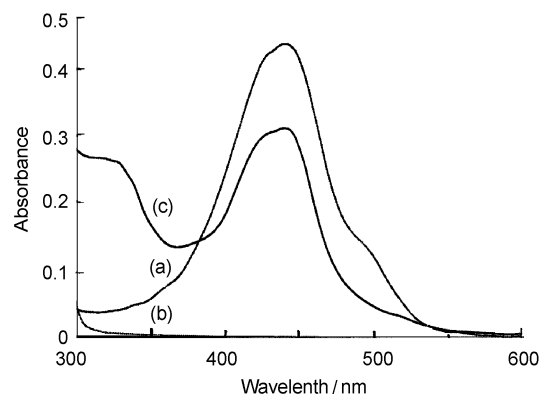


Fig.2 Absorption spectra of ground state from. (a) 20 μ mol/L ADE in acetonitrile aqueous solution (1:1), (b) 40 μ mol/L BSA in the same solution, (c) 20 μ mol/L ADE + 40 μ mol/L BSA in the same solution.

从图 3 的插图中可以看出,360nm 和 510nm 处的生成衰减曲线明显不同,510nm 处为 $^3ADE^*$ 的衰减,而 360nm 处应该是 $^3ADE^*$ 衰减和 ADE $^-$ 生成的叠加。由于 360nm 处有光漂白的影响,我们取 560nm 处分析 ADE $^-$ 的生成与 $^3ADE^*$ 的关系。从图 4 中可

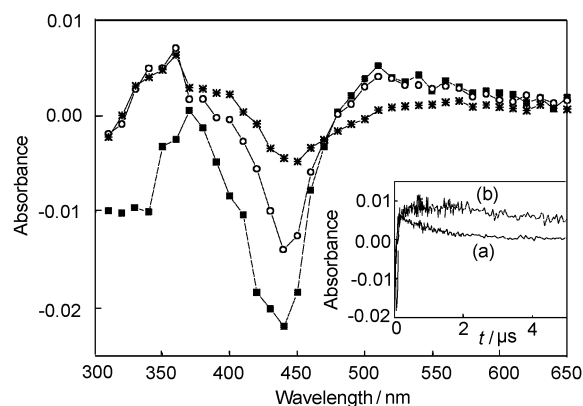


Fig.3 Transient absorption spectra from N_2 saturated solution containing 40 μ mol/L ADE + 80 μ mol/L BSA. at 0.1 μ s, 0.5 μ s and 3 μ s * after the laser flash. Insert: buildup-decay traces obtained, at (a) 510nm and (b) 360nm.

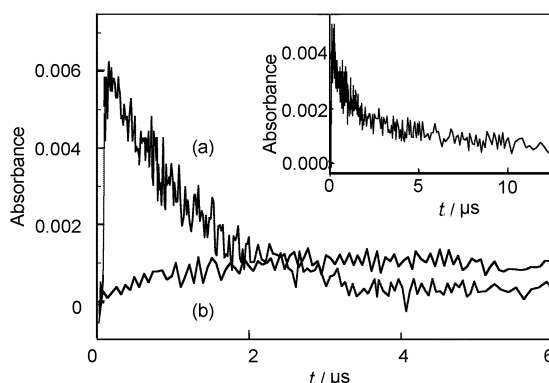


Fig.4 Buildup-decay traces from N_2 saturated solution containing 40 μ mol/L ADE + 80 μ mol/L BSA obtained after the laser flash at (a) 510nm and (b) computer simulated trace by subtracting the overlap of at 560nm from it at 510nm. Insert: buildup-decay traces obtained at 560nm.

以看出, 560nm 处的吸收中扣除 $^3\text{ADE}^*$ 的贡献后, 得到单纯 $\text{ADE}^{\cdot-}$ 的生成曲线 (见图 4 曲线 b), 它与 510nm 处纯净的 $^3\text{ADE}^*$ 的衰减基本是同步的, 也就是说, $\text{ADE}^{\cdot-}$ 主要是由 $^3\text{ADE}^*$ 与 BSA 发生电子转移反应生成的。

3 结论

利用纳秒级激光光解结合稳态吸收光谱技术, 对放线菌素 D 的模型化合物 ADE 与 DNA 和牛血清蛋白的相互作用进行了系统研究。在与 DNA 及其组分作用的过程中发现, $^3\text{ADE}^*$ 与它们反应的速率常数小于 $10^7 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

另外发现, ADE 与 BSA 结合以后, 不但引起 ADE 稳态吸收光谱的变化, 而且 $^3\text{ADE}^*$ 能被 BSA 有效地猝灭, 从而生成 ADE 的半醌亚胺自由基, 这是一个单电子转移过程。从实验结果看, $\text{ADE}^{\cdot-}$ 主要来自于 $^3\text{ADE}^*$, 但由于 ADE 与 BSA 以非共价键结合形成了复合物, 这使得 ADE 的激发单重态 ($^1\text{ADE}^*$) 与 BSA 发生电子转移反应成为可能。虽然没有直接观察到这个反应过程, 但根据文献[3]的报道, 这个过程也是应该存在的。本文的研究结果表明, 放线菌素类化合物有可能被用作 I 型的光敏治疗药物, 并将为这类化合物的结构改造提供一些有益的启示。

参考文献

- White R J, Phillips D R. *Biochemistry*, 1988, **27**(26): 9122-9132
- Sobell H M. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1982, **82**: 5328-

5331

- Gabbara S, Davis W R, Hupe L *et al.* *Biochemistry*, 1999, **38**(40): 13070-13076
- Rill R L, Hecker K H. *Biochemistry*, 1996, **35**(11): 3525-3533
- Wadkins R M, Jovin T M. *Biochemistry*, 1991, **30**(39): 9469-9478
- Wadkins R M, Jares-Erijman E A, Klement R *et al.* *J Mol Biol*, 1996, **262**: 53-68
- Raptista M S, Indig G L. *J Phys Chem B*: 1998, **102**(23): 4678-4688
- Atherton S J, Beaumont P C. *J Phys Chem*, 1987, **91**(15): 3993-3997
- Flitter W D, Mason R P. *Arch Biochem Biophys*, 1988, **267**(2): 632-639
- Zhdanov V M, Yershov F I. *J Cell Physiol*, 1965, **65**: 433-434
- Pan J X, Liu Y, Zhang S P *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1527** (1-2): 1-3
- Ascoli F, Savino M. *Nature*, 1968, **217**: 162
- Ascoli F, Savino M, Liquori A M. *Nature*, 1968, **217**: 162-164
- Chatterjee S R, Shetty S J, Devasagayam T P A *et al.* *J Photochem Photobiol Biol*, **B**: 1997, **41**(1-2): 128-135
- Hirayama N, Akashi S, Furuya M *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **173**(2): 639

A TIME-RESOLVED STUDY ON THE PHOTODYNAMIC PRIMARY PROCESS OF ADE:

II. PHOTOCHEMISTRY IN BIOMOLECULAR COMPLEXES

PAN Jingxi¹ LIN Weizhen¹ HAN Zhenhui¹ MIAO Jinling¹ WANG Wenfeng¹
YAO Side¹ LIN Nianyun¹ ZHU Dayuan²

¹(Laboratory of Radiation Chemistry, Shanghai Institute of Nuclear Research, the Chinese Academy of Science, Shanghai 201800)

²(Shanghai Institute of Materia Medica, the Chinese Academy of Science, Shanghai 200031)

ABSTRACT By use of laser flash photolysis and steady state absorption techniques, a systematic study was carried out on the interaction of ADE, which is a kind of model compound of actinomycin D, with DNA and BSA. Non-covalent binding was found between ADE and ssDNA, dsDNA and BSA, and photoinduced electron transfer reaction was observed. These results indicate that actinomycines might be used as type I photodrugs in the future and will be helpful for structure modification of this kind of compound.

KEYWORDS Actinomycin D, Laser flash photolysis, DNA, BSA, Electron transfer

CLC O644