

葱醌衍生物与G-四联体相互作用方式的研究

刘玉侠^{1,2} 杜富强^{1,2} 林维真¹ 李文新¹ 林念芸¹

¹ (中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

² (中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 应用紫外-可见分光光度法(Ultraviolet and visible spectrophotometry, UV-Vis), 圆二色谱法(Circular dichroism, CD)和聚丙烯酰胺凝胶电泳法(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)研究了在不同阳离子溶液中形成 G-四联体的构型及其与葱醌衍生物的相互作用方式。研究发现, 不同取代基的葱醌衍生物在溶液中与 G-四联体有不同的相互作用方式及可能的光敏损伤机制, 其中 AQS2 以嵌入的方式与 G-四联体相结合而 2,7-AQS2 则是沟渠结合。

关键词 G-四联体, AQS2, 2,7-AQS2, 圆二色谱, 聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号 O625.46+3, O629.74, O644.12

端粒 DNA 是位于染色体末端的特殊 DNA 结构, 脊椎动物此类结构由高度重复的(TTAGGG)*n* 序列组成^[1], 他们具有防止染色体末端重组、融合和降解的功能^[2]。端粒酶最初发现存在于原生动体内, 是一类逆转录核糖核蛋白酶, 它能够以自身携带的一段 RNA 为模板在染色体端粒末端合成端粒 DNA 并逐渐加入到染色体末端^[3,4], 以补足在每次细胞分裂中丢失的端粒 DNA 而使染色体保持稳定。研究发现, 约 90%的恶性肿瘤细胞都表达有高的端粒酶活性, 而正常体细胞内几乎检测不到^[5], 因此近年来对于端粒酶活性的抑制即成为了设计新型抗肿瘤药物的靶点^[6-9]。

人端粒 DNA 序列中连续鸟嘌呤(GGG)通过 Hoogsteen 氢键形成的平面结构经表面堆积后形成 G-四联体构型^[10], 图 1 为人端粒 DNA 分别在 Na⁺ 和 K⁺ 溶液中形成的具有不同构型 G-四联体的结构示意图, 此种结构的形成与许多重要原癌基因转录调控、染色体重组及一些与 DNA 复制相关疾病都有着密切的关系^[11,12]。研究表明, 如果药物分子能够稳定 G-四联体结构或诱导其形成, 则可使端粒酶难以发挥其逆转录酶活性合成端粒 DNA, 从根本上抑制端粒酶活性和阻断端粒 DNA 合成, 最终导致肿瘤细胞的凋亡或死亡。

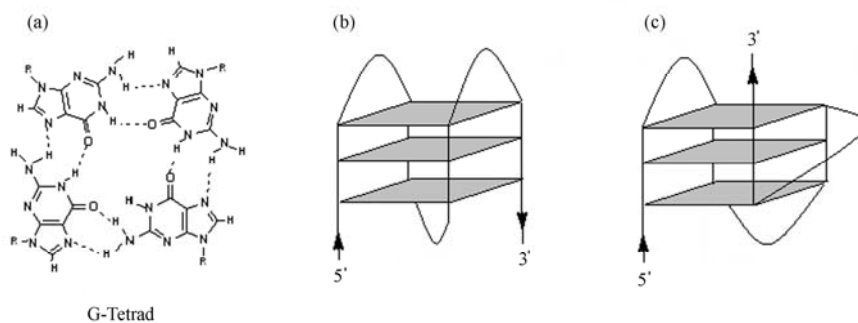


Fig. 1 Schematic diagram of the folding topologies formed from human telomeric sequences
(a)The arrangement of hydrogen bonds between guanines in a G-tetrad;
(b)The Na⁺ stabilized solution structure; (c) The proposed K⁺ stabilized solution structure

国家自然科学基金(20133020、30770506)资助

第一作者: 刘玉侠, 女, 1979年11月出生, 2002年毕业于安徽师范大学, 化学专业, 现为中国科学院上海应用物理研究所读博士研究生

通讯联系人: 林维真

收稿日期: 初稿 2007-12-12, 修回 2008-01-17

醌类化合物广泛存在于生物界, 在生物组织电子传递过程中扮演着重要角色, 其显著的光敏、放射增敏特性使其在肿瘤的放射治疗和光核酸酶杀灭肿瘤研究中备受生物界、医学界注目^[13-15]。蒽醌(Anthraquinone, AQ)及其衍生物是一类重要的光敏剂, 关于其光化学及光生物学行为的研究已有许多文献报道^[16-18], 图2为三种具有不同取代基蒽醌衍生物的结构式。由于AQ衍生物的平面型分子结构、

激发三重态具有较高的激发能和还原电位^[19], 加之可与不同构型的DNA产生选择性结合方式及光切割行为, 使其有望成为氧化性强、选择性好的光切割剂。但至今未见有关AQ-氨磺酰衍生物与G-四联体相互作用方式的研究, 本文采用光谱学方法和光切割法对两者的相互作用做了研究, 为以G-四联体为靶点的新型抗肿瘤药物的研制作一些基础性探索工作。

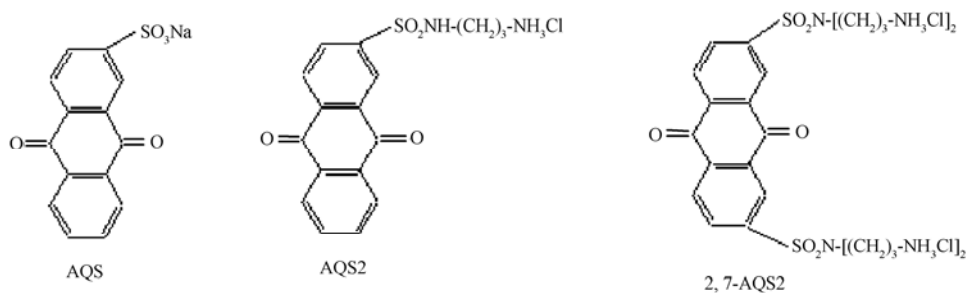


Fig. 2 Structures of anthraquinone derivatives

1 实验材料和方法

1.1 试剂和仪器

合成的寡聚核苷酸经高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)纯化, 由Takara生物公司提供; [γ -³²P] ATP (Adenosine triphosphate) (10mCi/mL) 购自北京福瑞生物工程公司; T4多聚核苷酸激酶和核酸纯化试剂盒购自基因公司; AQS(2-Anthraquinone-2-sulfonic acid sodium salt) 购自TCI, 三次重结晶后作实验用; AQS2和2,7-AQS2根据文献报道方法合成^[14]; 丙烯酰胺, N,N-二甲叉双丙烯酰胺, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) 购自上海生工; 实验溶液使用Millipore纯水新鲜配制。

UV-Vis 双光束分光光度仪, U-3010型, 日本Hitachi公司; 圆二色谱仪, J-810型, 日本Jasco公司; 测序凝胶电泳仪, Sequi-Gen GT型, 美国Bio-Rad公司; 放射自显影仪, 美国Perkin Elmer公司。

1.2 紫外-可见分光光度法

G-四联体由5'-(TAGGGT)₄-3'在磷酸缓冲液(pH=7.2)中于0.1 mol·L⁻¹ Na⁺或K⁺条件下95℃孵育8min, 而后缓慢退火至室温诱导形成。退火后的DNA样品按照一定比例加入到1×10⁻⁴ mol·L⁻¹ AQS2或2,7-AQS2溶液中, 平衡数小时后, UV-Vis仪测其吸光度数值。

1.3 圆二色谱法

实验参数设置: 样品池为0.1 cm石英比色皿; 波长扫描范围为200~450 nm; 扫描速度为100 nm/min; 重复次数3次; 扫描温度25℃。所有样品测试前于室温放置平衡, 所测样品的旋光度数值均扣除缓冲液自身所造成的背景值。

1.4 光切割法

采用经典的磷酸化方法标记^[20]、纯化寡聚核苷酸, 而后在0.1 mol·L⁻¹ Na⁺溶液中退火形成G-四联体(方法同上)。样品于365 nm波长下室温照射30 min, 而后离心沉淀, 冻干; 随后将需派啉处理的样品组于90℃孵育30 min, 再迅速置于冰水中。上样样品包括Maxam-Gilbert化学测序的标志物A+G均加入含有变性剂的上样缓冲液, 90℃ 5 min后冰水中骤冷。样品分别上样于20%变性聚丙烯酰胺凝胶中, 恒电压持续电泳约2.5 h, 放射自显影检测电泳结果。

2 结果和讨论

2.1 圆二色谱法检测G-四联体结构的形成

圆二色谱法是一种有效的用于分析G-四联体结构的光谱学方法^[21,22]。前期研究结果^[23]表明, CD谱图显示G-四联体平行结构的特征吸收为: 260 nm正峰和240 nm负峰; 反平行结构则具有以下特征

吸收:约 290 nm 处的正峰,265 nm 的负峰和 246 nm 处较小的正峰,特征吸收峰的确定为分析 G-四联体的构型提供了重要的依据。图 3 所示为人端粒 DNA 24nt [(TAGGGT)₄]常温下分别在 0.1 mol·L⁻¹ Na⁺和 K⁺溶液中所形成 G-四联体的 CD 谱图, Na⁺溶液条件下,以 295 nm 的正峰和 265 nm 的负峰为特征的 G-四联体结构与文献中报道的 G-四联体反平行篮式构型相符^[24];与 Na⁺溶液不同, K⁺溶液条件下测到的是 288 nm 的正峰、270 nm 的肩峰及 232 nm 的负峰,这说明在不同阳离子诱导下形成了不同构型的 G-四联体,由此可见,溶液中阳离子半径大小对 G-四联体的构型起着决定性作用。目前 K⁺溶液中 G-四联体的构型仍是个备受关注的前沿课题,我们的研究表明 24nt [d(TAGGGT)₄]在 K⁺溶液中形成了单一构型的 G-四联体,并与 Luu 等前期阐明的与 24nt 结构相近似 23nt^[25]的 G₄ 构型相一致,即结构中第 1, 2, 4 条链相互平行而第 3 条链与之方向相反。

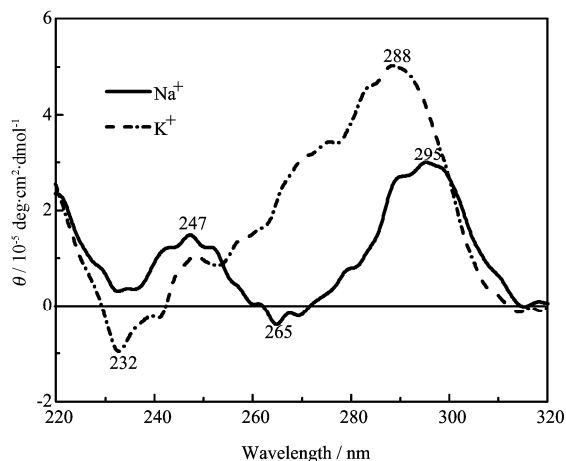


Fig. 3 CD spectra of G-quadruplexes formed from 24nt[d(TAGGGT)₄] sequence in the presence of 0.1 mol·L⁻¹ Na⁺ or K⁺ at 25°C

2.2 紫外-可见分光光度法检测AQ衍生物与G-四联体的相互作用

紫外-可见分光光度法是一种常用的用于检测小分子与 DNA 相互作用方式的光谱学方法,具有离域 π 键的小分子与 DNA 相互作用时会产生红移和减色效应,当两者以嵌入方式相结合时这种现象较沟渠结合时更加明显^[26]。本实验中,我们通过直接滴定法研究了 AQ 衍生物与不同构型 G-四联体的相互作用方式,图 4 所示为 AQS2 与 Na⁺溶液中形成的 G-四联体相互作用的紫外-可见光谱图,其余的结果见表 1。由于 AQS 自身所带的负电荷使其与

DNA 相互作用时并没有明显的吸光度数值变化,从表 1 中结果可以看出, AQ 衍生物中取代基的不同是产生吸光度变化的主要原因,其中侧链一个正电荷取代物的 AQS2 与 G-四联体相互作用时减色效应明显高于四个正电荷取代物的 2, 7-AQS2, 由此可以推断两者以不同的方式与 G-四联体相互作用,其中,前者以嵌入的方式相互作用而后者则是采取了沟渠结合的方式。

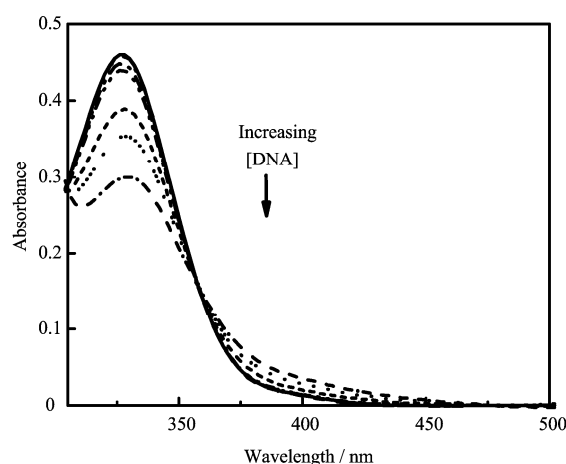


Fig. 4 UV-Vis titration of AQS2 with d(TAGGGT)₄ in the presence of Na⁺. [AQS2]=1×10⁻⁴ mol·L⁻¹

Table 1 Extinction coefficients and percent hypochromicity for AQ derivatives dissolved in cacodylate buffered salines and bound to G-quadruplex

Quinone	ϵ_{buffer} /10 ⁻³ L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹	ϵ_{DNA} /10 ⁻³ L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹	hypochromicity/%	
			G ₄ (Na ⁺)	G ₄ (K ⁺)
AQS2	4.6	3.1	39.0	33.8
2,7AQS2	5.6	4.2	12.3	13.0

2.3 圆二色谱法检测AQ衍生物与G-四联体的相互作用

用圆二色谱法可进一步判定 AQ 衍生物与 G-四联体的相互作用方式,这是由于 CD 谱图中谱形和吸光度的变化能够很好地显示小分子与 DNA 的结合方式,当两者以沟渠方式相结合时会产生较嵌入方式更强的 CD 信号^[26]。由于 AQ 衍生物与 G-四联体自身在本实验波段下均无任何 CD 信号,因此可以直接根据 CD 谱图变化判断小分子与 G-四联体的结合方式,图 5 的实验结果表明, AQS2 的加入并没有引起 G-四联体吸光度的变化,而 2,7-AQS2 的加入则产生了相对较强的吸光度变化。分析得知,

CD 谱图中正的吸光度数值是由 AQ 衍生物与 G-四联体形成的复合体所产生, 此种结构的形成使 2,7-AQS2 分子对平面偏振光的主轴发生偏转, 从而引起旋光度变化, 由此可见二者与 G-四联体相互作用方式的不同是出现不同强度旋光度变化的主要原因。结合 UV-Vis 的结果, 更加证实了我们的推论: AQS2 和 2,7-AQS2 分别以嵌入和沟渠结合的方式与 G-四联体相互作用。

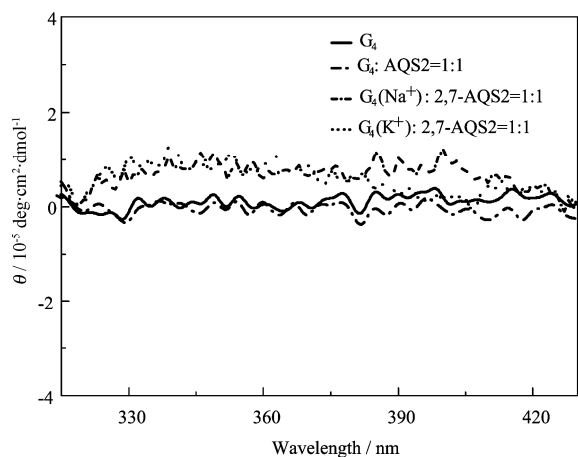


Fig. 5 Induced CD signals for AQ derivatives with d(TAGGGT)₄ in the presence of Na⁺ or K⁺

2.4 AQ衍生物光敏损伤G-四联体的凝胶电泳结果

为了更好地研究 AQ 衍生物与 G-四联体的相互作用方式, 光敏损伤实验中选取结构明确的 Na⁺条件下形成的 G-四联体为对象, 常温下此结构以反平行篮式构型存在。我们以 Maxam-Gilbert 化学测序法的 A+G 作为 Marker 检测了两种 AQ 衍生物光敏损伤 G-四联体的断裂位点, 图 6 所示的凝胶电泳结果表明两种不同的 AQ 衍生物在给定波长下光敏损伤 G-四联体的断裂位点存在差异, 主要表现为 2,7-AQS2 光敏损伤定位于每个重复序列中所有的碱基上, 其中 TT 碱基处出现了相对 AGGG 较弱的损伤条带; 而 AQS2 的光敏损伤则主要发生在 AGGG 上。Henderson 等^[27]指出: 2,7-AQS2 结合在 DNA 茎环结构的环区及茎环结合处, 进而在 UV 光照下发生选择性光敏损伤。比较实验中 G-四联体与文献中的 DNA 茎环结构, 可以推断: 2,7-AQS2 结合于 G-四联体的平面及环区之间, 在紫外光照射下其三重激发态电子转移氧化 G-四联体 DNA, 在碱性物质的水解下最终导致链断裂, 而不同碱基电离电位的差异是导致产生不同损伤产额的重要原因。

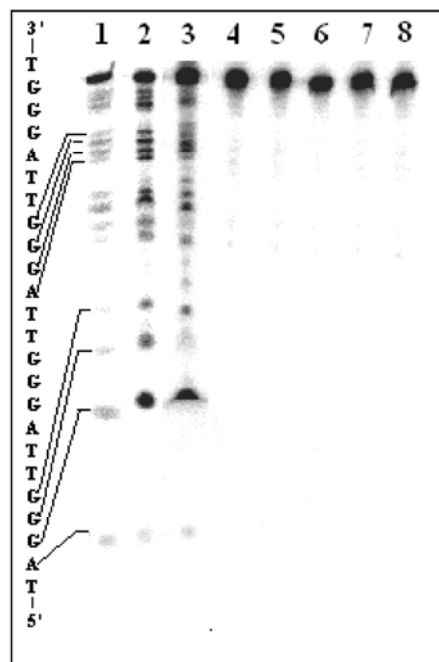


Fig. 6 Gel electrophoresis pattern of the AQ derivatives-induced photosensitized damage to G-quadruplex. Lane 1, Maxam-Gilbert sequencing reaction A+G; lane 2, irradiation of DNA for 30 min in the presence of $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AQS2 and with piperidine treatment; lane 3, the same as 2, but with $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,7-AQS2; lane 4, irradiation of DNA without AQ derivatives, treated with piperidine; lane 5, the same as 2, but without piperidine treatment; lane 6, the same as 3, but without piperidine treatment; lane 7, irradiation of DNA for 30 min; lane 8, DNA control

3 结论

综上所述, 蒽醌类衍生物 AQS2 和 2,7-AQS2 与 G-四联体以不同的结合方式相互作用, 进而诱导产生不同的光化学行为及相应的光敏损伤机制差异。其中, 前者与 G-四联体以嵌入的方式相互作用, 而后者则以沟渠结合的方式相互作用。

参考文献

- 1 Rezler E M, Bearss D J, Hurley L H. *Curr Opin Pharmacol*, 2002, **2**(4): 415-423
- 2 Neidle S, Harrison R J, Reszka A P, *et al.* *Pharmacol Ther*, 2000, **85**(3): 133-139
- 3 Blackburn E H. *Annu Rev Biochemistry*, 1992, **61**(38): 113-129
- 4 Chen J L, Blasco M A, Greider C W. *Cell*, 2000, **100**(5): 503-514
- 5 Shay J W, Bacchetti S. *Eur J Cancer*, 1997, **33**(5): 787-791
- 6 Mergny J L, Riou J F, Mailliet P, *et al.* *Nucleic Acids Res*,

- 2002, **30**(4): 839-865
- 7 Sun D, Thompson B, Cathers B E, *et al.* J Med Chem, 1997, **40**(14): 2113-2116
- 8 Kerwin S M. Curr Pharm Des, 2000, **6**(4): 441-478
- 9 Neidle S, Parkinson G. Nat Rev Drug Discov, 2002, **1**(5): 383-393
- 10 Simonsson T. Biochemistry, 2001, **382**(4): 621-628.
- 11 Han H, Langley D R, Rangan A, *et al.* J Am Chem Soc, 2001, **123**(37): 8902-8913
- 12 Arthanari H, Bolton P H, Chem Biol, 2001, **8**(3): 221-230
- 13 郑秀龙, 金一尊, 沈瑜. 肿瘤治疗增敏药, 上海: 科技文献出版社, 2002. 254-265
ZHENG Xiulong, JIN Yizun, SHEN Yu. Sensitizing drugs for cancer therapy, Shanghai: Science and Technology Literature Press, 2002. 254-265
- 14 Armitage B, Yu C, Devadoss C, *et al.* J Am Chem Soc, 1994, **116**(22): 9847-9859
- 15 Breslin D T, Schuster G B. J Am Chem Soc, 1996, **118**(10): 2311-2319
- 16 Armitage B, Schuster G B. Photochem Photobiol, 1997, **66**(2): 164-170
- 17 Loeff I, Rabani J, Treinin A. J Am Chem Soc, 1993, **115**(20): 8933-8942
- 18 Gasper S M, Schuster G B. J Am Chem Soc, 1997, **119**(52): 12762-12771
- 19 Bisby R H, Parker A W. J Am Chem Soc, 1995, **117**(21): 5664-5670
- 20 Maxam A M, Gilbert W. Methods Enzymol, 1980, **65**(1): 499-560
- 21 Lu M, Guo Q, Kallenbach N R. Biochemistry, 1993, **32**(2): 598-601
- 22 Balagurumoorthy P, Brahmachari S K, Mohanty D, *et al.* Nucleic Acids Res, 1992, **20**(15): 4061-4067
- 23 Seenisamy J, Rezler E M, Powell T J, *et al.* J Am Chem Soc, 2004, **126**(28): 8702-8709
- 24 Ambrus A, Chen D, Dai J, *et al.* Nucleic Acids Res, 2006, **34**(9): 2723-2735
- 25 Luu K N, Phan A T, Kuryavyi V, *et al.* J Am Chem Soc, 2006, **128**(30): 9963-9970
- 26 Breslin D T, Yu C, Ly D, *et al.* Biochemistry, 1997, **36**(34): 10463-10473
- 27 Henderson P T, Armitage B, Schuster G B. Biochemistry, 1998, **37**(9): 2991-3000

Studies on the interaction of AQ derivatives with G-quadruplexes

LIU Yuxia^{1,2} DU Fuqiang^{1,2} LIN Weizhen¹ LI Wenxin¹ LIN Nianyun¹

¹(Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

²(Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

ABSTRACT The structure of G-quadruplexes formed in different cation solutions and the corresponding mode of interaction with AQ derivatives have been studied using Ultraviolet and visible spectrophotometry(UV-Vis), Circular dichroism(CD) and Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE). The results reveal that mono- and tetracation- substituted anthraquinone derivatives, AQS2 and 2,7-AQS2, bind to G-quadruplexes with different mode resulting in dissimilar photodamage mechanisms. The former appears to bind to G-quadruplexes through intercalation while the latter associates with a groove.

KEYWORDS G-quadruplex, AQS2, 2,7-AQS2, Circular dichroism, Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)

CLC O625.46+3, O629.74, O644.12