

三种卟啉类药物对 DNA 光敏损伤的比较*

许以明 徐国瑞 杨先春** 张志义

(中国科学院生物物理所, 北京)

摘要 本工作用激光喇曼光谱从分子水平就三种卟啉类药物对小牛胸腺 DNA 的光敏损伤进行了比较。结果表明, 对小牛胸腺 DNA 损伤最强的是光卟啉 YHPD, 而 Photofrin II 和血卟啉 BHPD 分别居第二、第三位。

关键词 卟啉类光敏药物, DNA, 光敏损伤, 喇曼光谱, 激光

利用卟啉类光敏药物诊治癌症是一种新方法。目前这种技术在很多国家已获得很大成功^[1]。我国已研制出优于美国 Photofrin II 的卟啉类药物—杨州光卟啉^[2]。目前国内外的科研工作者正从各个角度探讨各种卟啉类光敏药物的药效及其治疗癌症的机理, 为该药物的改进和研制, 为癌症的诊治, 提供了可靠的依据^[3,4]。本工作用激光喇曼光谱从分子水平就光卟啉 YHPD、Photofrin II 和血卟啉 BHPD 对小牛胸腺 DNA 的光敏作用进行了比较。

实验与结果

本实验在美国 Spex 1401 型 Ramanlog 5 喇曼光谱仪上进行。数据处理系统为美国的 Datamate DMIA, 光源为美国光谱物理公司生产的 165 型氩离子激光器。激发光波长 514.5 nm, 狭缝宽度 4 cm⁻¹。扫描范围 400—1750 cm⁻¹。

实验所用的小牛胸腺 DNA 为德国 SERVA 公司生产的高纯度纤维。溶于 0.01 mol/L 二钾磷酸钠(Sodium cacodylate)和 0.001 mol/L EDTA 溶液中, pH 7。三种卟啉类药物: 光卟啉(YHPD)、血卟啉(BHPD)和 Photofrin II 分别为扬州生化制药厂、北京医药工业研究所和美国 Photofrin Medical Inc 的产品。

三种光敏药物的浓度为 0.0125、0.025、0.0375、0.05 μg/ml, 分别加到 4% 的小牛胸腺 DNA 溶液中。然后注入 2 mm 内径的石英管中, 并置于喇曼光谱仪的样品台上。光照此混合溶液约 1 h, 获得 13 张喇曼光谱图。为了清晰和易于比较仅展示 5 张。如图 1 所示: 当药物浓度为 0.05 μg/ml 时, 加入 YHPD 和 Photofrin II 的小牛胸腺 DNA 的谱图中, 指定为骨架和碱基的各个基团的谱线已经消失。而加入 BHPD 的谱图中, 各类谱线大部份仍然存在, 不过已有很大的变化。如图 2、3、4 所示。指定为 PO₂⁻ 对称伸张的 1094 cm⁻¹ 谱线^[5]位移到 1081 cm⁻¹, 且其强度明显下降。一般地说该谱线对 DNA 构象的变化是不敏感的, 当 DNA 的构象发生变化甚至热

* 国家自然科学基金资助课题 ** 北京石油化工科学院

变性时,它的强度保持不变。因此往往把它作为“内标”^[6]。它的强度明显下降意味着DNA构型的变化和链的断裂。这与受 γ 射线辐照而发生链断裂的小牛胸腺DNA的喇曼光谱类似。其在 785 cm^{-1} 的砷酸二酯 PO_2 对称伸张谱线的强度也陡然下降。以上说明DNA的骨架受到损伤,有

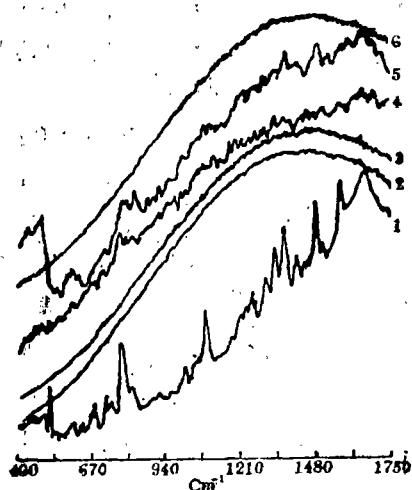


Fig 1. Raman Spectroscopy of Photosensitization of drugs of Porphyrins on Calf Thymus DNA ($400-1750\text{ cm}^{-1}$)

(1) Calf Thymus DNA (4%), (2) $0.05\text{ }\mu\text{g/ml}$ Photofrin II + (1), (3) $0.05\text{ }\mu\text{g/ml}$ YHPD + (1); (4) $0.05\text{ }\mu\text{g/ml}$ BHPD + (1), (5) $0.0375\text{ }\mu\text{g/ml}$ Photofrin II + (1), (6) $0.035\text{ }\mu\text{g/ml}$ YHPD + (1).

些地方发生了链的断裂。在 808 cm^{-1} 的谱线,指定为 Poly (A)和 Poly (C)等多核苷酸的砷酸二酯 PO_2 的对称伸张振动谱线^[7]。这是溶液中出现多核苷酸的迹象。在 840 cm^{-1} 的谱线,指定为修改的B型构象^[8]。也可能是 PolydAT 的砷酸二酯 PO_2 反对称的伸张振动谱线^[9]。约有3根谱线消失,它们是:指定为鸟嘌呤环的伸张振动在 682 cm^{-1} 的谱线;在 1258 cm^{-1} 指定为腺嘌呤、胞嘧啶环的伸张振动谱线;在 1444 cm^{-1} 指定为脱氧核糖的谱线^[5,10]。指定为包括碱基之间氢键在内的胸腺嘧啶羰基 $\text{C}=\text{O}$ 伸张振动的谱线从 1669 cm^{-1} 位移到 1659 cm^{-1} ,说明DNA的氢键已有断裂^[10]。其它的指定为各个碱基基团的伸张振动谱线几乎都发生了位移和强度的明显下降。这是它们受到损伤的表征。在所有的条件相同的情况下,各谱线的强度变化往往与它们所代表的基团受损伤的程度及损伤后该基团的喇曼活性有关。上述结果表明对小牛胸腺DNA损伤最弱的是血卟啉BHPD。

当光敏药物的浓度为 $0.035\text{ }\mu\text{g/ml}$ 时,加入光卟啉YHPP的小牛胸腺DNA的各个喇曼谱线已消失。加入 Photofrin II 的DNA的各类谱线虽然存在但变化很大。如图1中5、6所示。其中消失的谱线有指定为腺嘌呤和胞嘧啶的 1258 cm^{-1} 的谱线;指定为脱氧核糖在 1444 cm^{-1} 的谱线;在 1019 cm^{-1} 指定为 $\text{C}-\text{O}$ 伸张振动的谱线及指定为腺嘌呤的伸张振动在 1511 cm^{-1} 的谱线。其骨架 PO_2^- 和砷酸二酯 PO_2 对称伸张振动谱线以及包括碱基间氢键在内的胸腺嘧啶羰基 $\text{C}=\text{O}$ 伸张振动的谱线的变化明显,其情况与加入 $0.05\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的BHPD的DNA类似。其它的指定为各个碱基基团的伸张振动和砷酸一脱氧核糖,脱氧核糖的伸张振动谱线也都有明显的变化一位移和强度下降。上述结果说明对小牛胸腺DNA的损伤,光卟啉YHPD强于Photofrin II。曹恩华等人在血卟啉、YHPD和Photofrin II对肿瘤细胞的光敏损伤的比较中也得到同样的结果^[11]。

当光敏药物的浓度为 $0.0125\text{ }\mu\text{g/ml}$ 时,加入 Photofrin II 和BHPD的小牛胸腺DNA的各个喇曼谱线与天然小牛胸腺DNA相比位置变化很小,指定为各个碱基的谱线强度略有下降并且前者比后者的强度弱。说明对该DNA的损伤 Photofrin II 比BHPD强,并且此时DNA受到的损伤并没有危及它的碱基间的氢键及磷酸骨架。而加入YHPD的DNA的指定为包括碱基间氢键在内的胸腺嘧啶羰基 $\text{C}=\text{O}$ 伸张振动的谱线从 1669 cm^{-1} 位移到 1658 cm^{-1} 。说明有碱基间氢键的断裂^[10]。并且其指定为各个碱基的谱线强度弱于前二者。说明它对DNA的损伤比前二者强。

当光敏药物的浓度为 $0.025\text{ }\mu\text{g/ml}$ 时,加入BHPD的小牛胸腺DNA除了指定为碱基的谱线强度继续下降外,其它的谱线变化很小。加入 Photofrin II 的DNA除了指定为碱基的谱线继续下降外,指定为包括碱基间氢键在内的胸腺嘧啶羰基 $\text{C}=\text{O}$ 伸张振动的谱线从 1669 cm^{-1} 位移到 1651 cm^{-1} ,说明它有碱基间氢键的断裂^[10]。其它谱线变化也很小。而加入YHPD的DNA变化

明显, PO_2^- 对称伸张在 1094 cm^{-1} 的谱线^[5]位移到 1088 cm^{-1} , 并且强度陡然下降。在 781 cm^{-1} 指定为砷酸二脂 PO_2 的谱线强度下降明显, 指定为修改的 B 型构象在 840 cm^{-1} ^[8]。说明该 DNA 发生了链的断裂。其指定为包括碱基间氢键在内的胸腺嘧啶的羰基 $\text{C}=\text{O}$ 伸张振动的谱线从 1669 cm^{-1} 位移到 1640 cm^{-1} 说明它有碱基间氢键的断裂^[10]。该 DNA 消失的谱线有四根, 指为脱氧核糖在 1444 cm^{-1} 的谱线; 在 1019 cm^{-1} 指定为 $\text{C}-\text{O}$ 伸张振动的谱线; 在 1258 cm^{-1} 指定为腺嘌呤、胞嘧啶的谱线和在 682 cm^{-1} 指定为鸟嘌呤的谱线。其它的谱线变化也较明显。

综上所述, 在本实验条件下, 对小牛胸腺 DNA 损伤最强的是光卟啉 YHPD。Photofrin II 和血卟啉 BHPD 分别居第二、第三位。主要是由于它们的化学组成不同造成的^[12]。因此进一步探讨卟啉类光敏药物的有效组份及其光敏特性已势在必行。

张志义、陶能兵等人的研究结果为光卟啉 YHPD 临床应用效果优于血卟啉 BHPD 提供了某些依据^[13]; 他们发现同样条件下 YHPD 的单线态氧 $^1\text{O}_2$ 的产额比 BHPD 低, 但产生羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的能力却强于 BHPD, 并认为高活性的 $\cdot\text{OH}$ 可能在卟啉类药物的光敏损伤中起重要作用。因为羟基自由基具有强烈的氧化脱氢作用, 在它的作用下 DNA 不仅进行解聚作用生成核苷酸, 而且还生成氨和无机砷酸盐。出现自由的嘌呤和嘧啶化合物^[14]。这些结果为改进和设计新的光敏药物提供了依据。

曹恩华和辛淑敏同志提供了 Photofrin II 和小牛胸腺 DNA。在此深表感谢。

参 考 文 献

- [1] J. Moan, et al., *Tumor Res.*, 15, 1(1980).
- [2] 王耐勤等, *药学报*, 21, 7(1986).
- [3] 庞素珍等, *生物物理学报*, 3(2), 120(1987).
- [4] E. R. Lochmann, and A. Micheler, in: *Physico-Chemical Properties of Nucleic Acids*, Vol. I, Academic Press, London, 1973, p. 223-267.
- [5] Bram, Edward G, et al., *Infrared and Raman Spectroscopy*, 1 Part C, 1977, p. 824.
- [6] P. R. Cary, *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*, A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, publishers, New York, 1982.
- [7] A. T. Tu, *Raman Spectroscopy in Biology*, John Wiley and Sons, Inc., U. S. A. 1982, p. 138.
- [8] Small, Enoch W. et al., *Biopolymers*, 10, 1394(1971).
- [9] D. C. Goodwin, and J. Brahms. *Nucleic Acids Research*, 5, 835 (1978).
- [10] E. Stephenc, and P. L. Warner, *Biopolymers*, 14, 257(1975).
- [11] 曹恩华等, *辐射研究与辐射工艺学报*, 5(4), 19(1987).
- [12] 刘永隆等, *药学报*, 19, 706(1984).
- [13] 陶能兵, 张志义等, 第二届全国光生物学术讨论会论文集, 苏州, 第 11 页, 1988 年.
- [14] H. M. 米赫林, *生物氧化*, 科学出版社, 第 332 页, 1959 年. (稿件收到日期: 1988 年 11 月 21 日)

CAMPARISON OF THE PHOTSENSITIVE DAMAG OF THREE DRUGS OF PORPHYRINS ON CALF THYMUS DNA

Xu Yiming, Xu Guori, Yang Xianchun and Zhang Zhiyi

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

ABSTRACT In this work, the photosensitive damages of three drugs of Porphyrins (YHPD, BHPD and Photofrin II) on Calf Thymus DNA were compared by Laser Raman spectroscopy at molecular level. It is indicated that the damage of YHPD on Calf Thymus DNA is the strongest, and then the Photofrin II, and the third BHPD.

KEY WORDS Photosensitive drugs of Porphyrins, DNA, Photosensitive damages, Raman spectroscopy, Laser