

竹红菌甲素锌、镁络合物 某些光敏性质的研究

孙继山 张 莉 张志义

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

摘要 本文主要对竹红菌甲素的锌和镁离子络合物的原初光敏反应和自敏氧化能力进行分析, 并与未络合的竹红菌甲素做了比较。实验证实: 甲素经络合后的吸收光谱分别在 628 nm(镁)和 620 nm(锌)出现一新吸收峰, 与此同时, 原 540 nm 和 580 nm 的吸收峰下降或消失。研究证明络合后的活性氧(包括单线态氧, 超氧阴离子自由基)产率下降, 下降幅度随着金属离子的比例增加而增加。深入研究证明活性氧产率下降的原因是电子传递受到阻碍。镁和锌络合物自氧化速率分别比甲素大 8.2 倍和 3.0 倍。

关键词 竹红菌甲素, 原初光敏反应, 活性氧, 顺磁共振

引 言

竹红菌甲素(Hypocrellin A)以下简称甲素(HA), 是我国首次发现并用于临床的一种脂溶性萘醌类光敏化剂^[1]。其敏化机制已有人做了研究, 安静仪认为敏化性质属需氧的光动力型^[2], 张志义用顺磁方法证明了包括多种活性氧和非氧自由基在内的多重作用^[3]。作为光敏化剂, 甲素虽然有许多优点, 比如不易自敏氧化, 优良的溶解性能, 量子产率高等, 但也有不足之处, 其中最主要的是吸收波长较短, 这很大程度上妨碍其发挥作用^[4]。本文试图在甲素溶液中加入二价金属离子, 使其光谱红移以解决上述问题, 但红移后活性氧产率如何, 需要进行研究。另外, 甲素的电子转移机制至今仍未搞清, 本文用 ESR 方法在这些方面做些研究。由于活性氧产率与疗效直接相关, 所以本实验结果可供临床参考。

材 料 与 方 法

1. 材料

甲素由云南微生物研究所提供, 经薄层层析, 丙酮重结晶纯化后使用。

5,5'-二甲基-1-吡咯啉氮氧化合物(DMPO), Aldrich 产品, 2,2,6,6-四甲基哌啶氮氧自由基(TEMPO), Sigma 产品, 其余均为国产分析纯试剂。

2. 方法

(1) 络合物制备: 乙酸镁和乙酸锌溶于水, 然后与溶有甲素的二甲基亚砷溶液混合。

(2) $^1\text{O}_2$ 和 O_2^- 的测定按张志义方法^[3], 用于定量测量的毛细管经过严格挑选, 误差不超过 5%, 每个样品至少重复两次。

(3) 自氧化测量: 甲素及其络合物光照后, 加入过量的 EDTA 以去除金属离子, 然后做波长扫描并测量 475 nm 的吸收值, 失活速率按准一级动力学公式计算。

(4) 除特别说明外, 所有样品 $\text{DMSO}:\text{H}_2\text{O} = 3:1(\text{V/V})$ 。

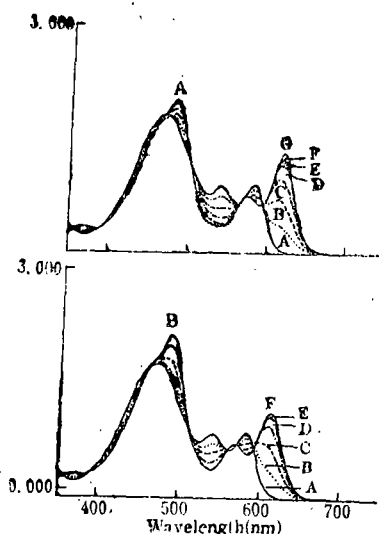


Fig 1. The absorption spectra of HA complex with various molecular ratios of magnesium(A) and zinc (B) ions. The concentration of HA is 0.075 mmol/L (A) HA:Mg, A 1:0, B 2:1, C 1:1, D 1:2, E 1:4, F 1:6, G 1:10 (B) HA:Zn, A 1:0, B 2:1, C 1:1, D 1:2, E 1:4, F 1:6

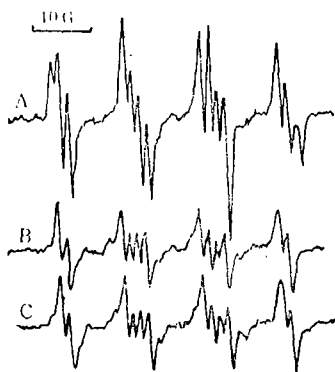


Fig 2. The ESR spectra of HA (A) and its complex with magnesium (B) and zinc (C) ions at molecular ratio of 1:2. The concentrations of HA and DMPO are 5 mmol/L and 80 mmol/L respectively.

3. 光照

(1) ESR 样品测试使用 1 kW 氙灯光源, 平行光束经滤光片滤去 400 nm 以下紫外光后照到距光源约 1 m 的样品腔内。使用 Varian E-109 波谱仪在 X 波段, 微波频率 9123 MHz, 微波功率 10 mW, 调制 1 G 的仪器参数下测定, 增益视情况而定。

(2) 自氧化试验使用 1 kW 卤素灯光源, 光照时剧烈通氧。光强为 1 kW/m^2 , 使用日立 U-3200 紫外分光光度计在 475 nm 处测吸收值。

(3) 近单色光照射使用电子所制作的干涉滤光片(中心波长透光率大于 65%, 半高宽小于 10 nm)。

结果与讨论

1. 甲素与锌、镁络合后的吸收光谱

图 1 A、1 B 分别是甲素与不同比例的镁和锌络合后的吸收光谱。络合后甲素在 540 nm 和 580 nm 两个峰的吸收值下降, 而在 628 nm (镁) 和 620 nm (锌) 出现新吸收峰, 加入等量的乙酸吸收光谱基本不变。这说明络合后甲素原有的内氢键被络合金属离子的盐键和配位键取代。

当 $\text{DMSO:H}_2\text{O} = 3:1$ 时, 根据摩尔比率法测定镁和锌与甲素的表观络合比均为 2 左右。增加 DMSO 比例, 此值下降并随着 DMSO 趋于 100% 而趋于 1。由此判断甲素与锌、镁络合可能是线性的。这与甲素结构和 O, O' 给电子螯合特性是一致的。因此, 螯合形成的共轭体系是吸收光谱红移的原因。

2. 甲素及其络合物光敏产生活性氧的种类及相对效率

(1) 图 2 为 DMPO 捕捉甲素及其络合物活性氧的 ESR 图谱。由图谱分析, 无论是甲素还是甲素的金属络合物, 信号均以 $\text{DMPO/O}_2^{\cdot -}$ 为主^[5]。由于加成物的浓度与其 ESR 信号的峰高以及线宽的平方成正比^[6], 而本工作捕捉的信号线型和线宽基本不变, 所以, 可用峰高近似的比较产生自由基的多少。由图 3 可见: 甲素的信号明显大于其络合物, 络合金属离子比例增加, 信号强度下降。

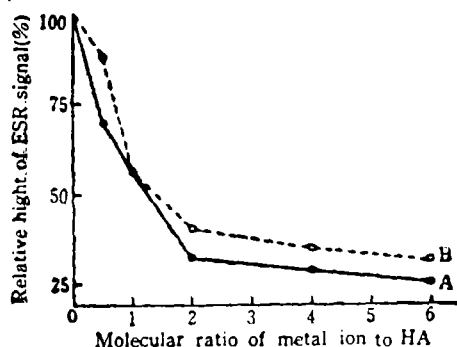


Fig 3. The relative height of ESR signals of HA complex with magnesium (A) and zinc (B) ions at various molecular ratios. The height of ESR signal of HA is defined as 100%. Concentrations of HA and DMPO are the same as Fig 2.

Tab 1. The relative amplitude (%) of ESR signals of HA and its complex with magnesium and zinc ions after 2 minutes illumination at wavelength of 535 and 620 nm by using interference filter. The light intensity is 80 W/m^2 and concentration of HA is 5 mmol/L .

Wavelength (nm)	Samples (%)				
	HA	HA:Mg		HA:Zn	
		1:2	1:4	1:2	1:4
535	100	33	26	35	27
620	100	39	31	35	35

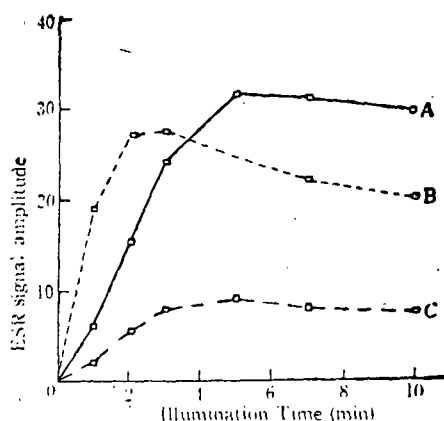


Fig 4. The comparison of the ability to producing singlet oxygen among HA (A), magnesium complex (B) and zinc (C) complex at molecular ratio of 1:2 (HA: metal ions). The concentrations of HA and 2,2,6,6-tetramethyl piperidine are 5 mmol/L and 170 mmol/L respectively.

(2) 在泛光条件下金属络合物产生自由基的效率低于未络合甲素, 在波长范围较窄的光的情况下又如何呢? 本工作选择透光中心为 535 nm 和 620 nm 的干涉滤光片进行试验, 是由于在这两个波长甲素与其络合物的光吸收值差别较大(见图 1)。调整光源距离使两个波长的光通量相等。同样地, 以峰高近似地表示产生自由基的多少。结果列于表 1。由此可见, 在这两个波长光照下, 金属络合物的效率均低于未络合甲素。因为在 620 nm 吸收值随金属比例增加而增加(见图 1), 但信号强度不变或下降, 这清楚地说明光敏效率随加入金属离子的量增加而下降。

(3) 上面已经看到金属络合物不利于 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的产生, 本文还研究了光敏产生 $^1\text{O}_2$ 的效率, 结

果如图 4 所示。无论是甲素还是其络合物均能光敏生成 $^1\text{O}_2$, 但数量却明显差异, 甲素最多, 镁络合物次之, 锌络合物最少, 三条曲线均呈上凸型, 经线宽分析, 这是因含氧量下降而引起的消自旋所致, 张志义在这方面有详尽的研究^[3]。

3. $\text{O}_2^{\cdot -}$ 下降原因初探

(1) 本工作设计以下试验, 首先在无氧条件下(通氮气)光照甲素和甲素金属络合物, 结果甲素样品有一很强的顺磁信号, 其 g 值为 2.003 , 饱和功率约 3 mW , 而且比较稳定(半衰期约 12.2 min), 初步判断该信号为半醌自由基 $\text{HA}^{\cdot -}$, 甲素金属络合物没有这一信号, 为证明 $\text{HA}^{\cdot -} \rightarrow \text{O}_2^{\cdot -}$ 的电子转移, 在光照之后迅速在黑

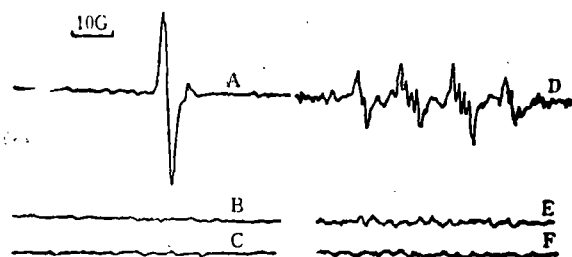


Fig 5. The ESR spectra of HA (A) and its complex with magnesium (B) and zinc (C) ions at molecular ratio of 1:2 after 1 minute illumination in anaerobic condition. Having illuminated, the samples were added with DMPO and bubbled with oxygen promptly in dark and their ESR spectra were D, E, F corresponding to A, B, C. The concentrations of HA and DMPO are the same as Fig 2.

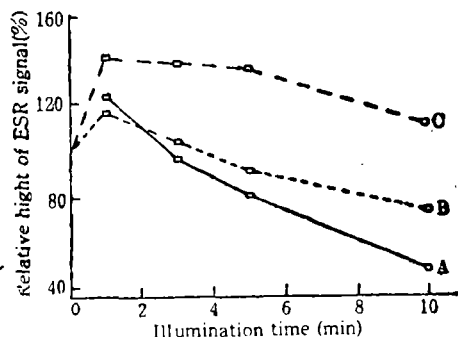


Fig 6. Change of height of ESR signals of TEMPO (initial concentration 1.2 mmol/L) during illumination in the presence of 16 mmol/L hydroquinone and HA (A), HA complex with magnesium (B) and zinc (C) ions at ratio of 1:2. The concentration of HA was 5 mmol/L and samples were illuminated in anaerobic condition.

暗条件下通入氧气和捕捉剂,然后测量 ESR 信号,结果前者有而后者没有。以上结果见图 5,这确切地证明了 $O_2^{\cdot-}$ 主要由 $HA\cdot$ 的电子转移产生的,由此推论,甲素金属络合物产率下降是由于络合后严重阻碍 $HA\cdot$ 的产生或破坏其稳定性所致,其原因可能是甲素被金属离子络合后原内氢键破坏,共振结构丧失,从而形成不了稳定的半醌自由基^[8]。

(2) 为了进一步验证甲素金属络合物阻碍了 $HA\cdot$ 的产生,本工作使用 Moan 的消自旋方法检查甲素及其络合物产生 $HA\cdot$ 的相对水平^[9]。结果如图 6 所示,很明显,甲素消自旋水平大于其络合物,光照后信号先上升再下降,这可能是残存氧所致,这与 Reszka 在有氧体系研究血卟啉阴离子自由基的结果相似^[10]。

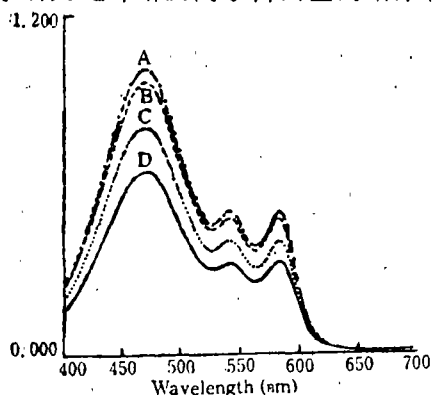


Fig 7. The absorption spectra of HA control (A) (in dark), HA (B) and HA complex with zinc (C) and magnesium (D) ions at ratio of 1:2 after 20 minutes exposure under 1000 W/m². The concentration of HA is 0.5 mmol/L

Tab 2. The relative absorption values and rate constants of autooxidation at 475 nm of HA and its complex with magnesium and zinc ions at different illumination time under 1000 W/m². The concentration of HA is 0.5 mmol/L

Samples (%)	Illumination time (min)				k (Autooxide) min ⁻¹
	0	5	10	20	
HA	100	—	97	95	0.0025
HA-Mg(1:2)	100	89	79	65	0.0229
HA-Zn(1:2)	100	99	90	80	0.0101

4. 自氧化水平的比较

激发态甲素与基态氧作用可使甲素氧化而退色, 据根这一特性可判断自氧化情况, 试验结果如图7所示, 金属络合物的自氧化水平远远大于甲素, 其中镁络合物又明显大于锌络合物, 因此, 从这一角度上看甲素被金属离子络合后性能变坏。光照不同时间后, 各样品在475 nm处的吸收值(稀释10倍)以及自氧化速率分别是甲素的9.2倍和4.0倍。耗氧试验表明, 当金属离子与甲素摩尔比为2:1时, 镁和锌络合物的耗氧速率分别比甲素快38%和20%左右。金属络合物自氧化水平与其耗氧水平有相关性, 表明一部分氧用于自敏氧化。如何解释金属络合物易自敏氧化这一现象有待于深入研究。

参 考 文 献

- [1] Y. T. Chen and X. Y. Wan, *Ke Xue Tong Bao*, 26, 1040 (1981).
- [2] 安静仪, 张曼华, *中国科学 (B)*, (11), 975 (1981).
- [3] 张志义, 臧伦义等, *中国科学 (B)*, (4), 361 (1989).
- [4] D. Kessel, *Int. J. Radiat. Biol.*, 49, 901 (1986).
- [5] E. Finkelstein, G. M. Rosen and E. J. Rauckman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 200, 1 (1980).
- [6] K. Reszka, P. Kolodziejczyk and W. Lown, *Free Radical Biol. Med.*, 5, 63 (1988).
- [7] T. L. Zweier, *Biochim. Biophys. Acta*, 839, 209 (1985).
- [8] A. Ashnagar, J. M. Bruce, P. L. Dutton and R. C. Prince, *Biochim. Biophys. Acta*, 801, 351 (1984).
- [9] J. Moan, *Acta Chem. Scand.*, 34(B), 519 (1980).
- [10] K. Reszka and R. C. Sealy, *Photochem. Photobiol.*, 39, 293 (1984).

(稿件收到日期: 1990年3月7日)

THE STUDIES ON SEVERAL PHOTSENSITIZING CHARACTERISTICS OF HA AND ITS COMPLEXES WITH MAGNESIUM AND ZINC IONS

Sun Jishan, Zhang Li and Zhang Zhiyi
(*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing*)

ABSTRACT Several properties, including absorption spectra, active oxygen production and the rate of autooxidation of HA and its complexes with magnesium and zinc ions, were investigated and compared in this paper. New absorption peaks at 620 nm (Zn) and 628 nm (Mg) appeared in HA-Zn and HA-Mg complex solutions respectively, while the original peaks at 540 nm and 580 nm in HA solution reduced, or even though disappeared at higher molecular ratio of metal ion to HA. These phenomena suggested that the intra-hydrogen bond between carbonyl and hydroxyl groups of HA were replaced by bivalent cations. ESR data indicated that efficiency of both singlet oxygen and superoxide anion radical reduced significantly in the solution of HA complexes compared with that of HA. A simple test we designed proved the direct electron transferring from semiquinone radical of HA to oxygen. However, the formation of semiquinone radical of HA was inhibited by magnesium or zinc ions and then resulted in reduction of superoxide anion radicals. The rate constants of autooxidation of HA-Mg and HA-Zn complexes were 8.2 and 3.0 times bigger than that of HA.

KEYWORDS Hypocrellin A, Primary photosensitizer-induced reaction, Active oxygens, ESR