

竹红菌乙素光动力作用调控胶原蛋白中吡啶啉交联含量: 光动力治疗纤维化症机制的初探

张举成^{①②}, 刘卫^{①②*}, 易中周^{①②}, 陈瑞^②, 李应^①, 闵勇^{①②}

① 云南省天然药物与化学生物学重点实验室, 蒙自 661100;

② 红河学院理学院, 蒙自 661100

* 联系人, E-mail: hhusci@163.com

2008-12-19 收稿, 2009-04-16 接受

云南省自然科学基金(编号: 2005C0078M)和红河学院硕博科研启动项目(编号: XSS07012)资助项目

摘要 纤维化症的典型特征之一是, 在纤维化组织中不易生物降解的吡啶啉交联模式的胶原蛋白含量异常增加, 由于胶原蛋白的积累而导致纤维化, 因此, 吡啶啉交联含量异常升高也能作为诊断器官纤维化的重要标志. 竹红菌乙素是我国特产的一种天然光敏剂, 对肿瘤、病毒和微血管类疾病的光动力活性高, 并具有暗毒性低、组织代谢快等优点. 本文从分子层次对竹红菌素光动力治疗纤维化症进行了研究, 证明明胶中有类似于胶原蛋白中的吡啶啉交联结构, 可以用作胶原蛋白的模型物; 竹红菌乙素与明胶分子在暗环境下结合后, 通过光敏化竹红菌乙素选择性破坏明胶中的吡啶啉交联结构, 暗示竹红菌乙素光动力作用有可能用于调控胶原蛋白中的吡啶啉交联模式的含量, 使之趋于正常化, 从而达到治疗纤维化症的目的.

关键词
竹红菌乙素
光动力作用
胶原蛋白
吡啶啉交联
纤维化症

光动力疗法是联合利用光(激光)和药物(光敏剂)定位杀伤病灶的一种无创或微创疗法, 目前已成功应用于多种肿瘤和一些常见微血管类疾病的临床治疗^[1~4]; 此外, 由于光敏化产生化学活泼物(活泼态氧、自由基)反应的广谱性, 在多种类型疾病的光动力治疗方面有广阔的应用前景^[5,6]. 在目前国际上研究的三大类光敏剂(卟啉、酞菁、花靛)中, 竹红菌素的光活性较高、暗毒性低、体内代谢快, 成为备受关注的一类新型光敏剂. 竹红菌素是从我国云南寄生在野生箭竹上的一种真菌——竹红菌(*Hypocrella bambusae*)中分离得到的花靛类光敏色素, 主要包括竹红菌甲素(HA)和竹红菌乙素(HB), 其分子结构见图 1. 20 世纪 80 年代以来, 我国在竹红菌素光物理、光化学和光生物学等基础研究方面形成了系统的学科积累^[7~9], 并针对临床需求制备了竹红菌素-蛋白水溶性纳

米粒子^[10]. 近年的研究表明, 竹红菌素在光动力治疗微血管类疾病方面有特殊的优势^[3,4,11]. 随着研究发展和深入, 光动力疗法必将大大拓宽其适应症范围.

纤维化症是一类常见、多发性疾病, 其形成的生理学过程是组织对急、慢性损伤不正确的生理修复结果^[12~14], 目前尚无特效的治疗方法. 最近, 人们通过动物实验发现, 光动力疗法对增生性疤痕的清除有肯定的疗效. 在基础研究方面, 人们发现在肝、肾、肺、皮肤等组织纤维化过程中具有一个共同的特点: 胶原蛋白的合成和降解不平衡, 合成胶原蛋白难于降解, 造成胶原蛋白(包括 I, III, IV 等类型)在组织中不可逆转地累积^[13,15~18]. 纤维化组织中胶原蛋白难于降解决定于其交联方式, 在生物合成中, 胶原蛋白的交联一般通过两种途径实现: ϵ -醛赖氨酸途径和羟

引用格式: 张举成, 刘卫, 易中周, 等. 竹红菌乙素光动力作用调控胶原蛋白中吡啶啉交联含量: 光动力治疗纤维化症机制的初探. 科学通报, 2009, 54: 2076~2081

Zhang J C, Liu W, Yi Z Z, et al. The molecular mechanism of photodynamic therapy to fibrosis: Regulation on the pyridinoline cross-link formation in collagen. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0419-5

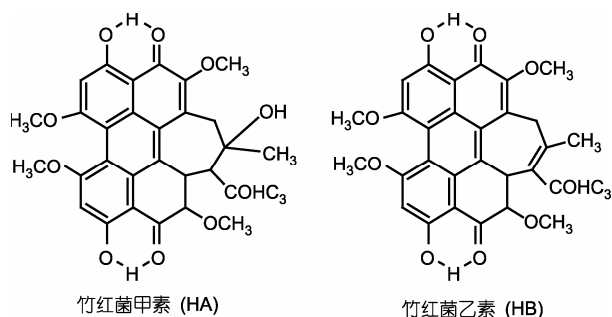


图1 竹红菌甲素(HA)、竹红菌乙素(HB)的分子结构

醛赖氨酸途径^[18]。组织纤维化过程中会发生从 ϵ -醛赖氨酸途径向羟醛赖氨酸途径转变,造成难以生物降解的交联吡啶啉含量的增加和累积,最终导致两种途径的失衡^[18~22]。纤维化组织胶原蛋白中异常高的吡啶啉含量已经被作为临床诊断和治疗的参考依据^[13,23~25]。人们尝试利用药物切断胶原蛋白中的吡啶啉交联键使纤维化逆转,发现补骨脂素紫外光照射下导致纤维化皮肤中吡啶啉含量减少^[26],其他利用光动力治疗纤维化症的报道不多见。

明胶是胶原蛋白变性的产物,广泛应用于食品、工业和医药领域。在蛋白质样品中,340 nm的荧光发射峰作为色氨酸残基存在的特异标志;但在传统影像和医药行业使用的小牛皮、骨生产的精品明胶中,未检测到色氨酸残基的特异荧光发射峰,而检测到胶原蛋白中吡啶啉交联模式在392 nm的特异性荧光发射峰。295 nm激发、395 nm的荧光峰通常用作表征胶原蛋白中吡啶啉交联结构的荧光探针^[27~31]。因此,明胶样品可以方便地作为研究胶原蛋白中吡啶啉交联态的模型材料。本文研究了HB分子与明胶结合和光诱导相互作用,发现HB光敏化能有效降低明胶的392 nm荧光,降低交联态吡啶啉含量,表明HB的光动力作用对于降低交联吡啶啉含量、调节两种交联途径的平衡和治疗纤维化症有重要意义。

1 实验

(i) 原料。竹红菌乙素(HB)是通过竹红菌甲素(HA)失水制备而得,其纯度通过薄层色谱检测。明胶来源于原中国科学院感光化学研究所使用的小牛骨胶(影像用明胶),用磷酸缓冲溶液溶解配制成浓度为12.5 g/L的胶状液体^[32]。磷酸缓冲溶液(PBS)用50 mmol/L KH_2PO_4 和50 mmol/L K_2HPO_4 调节pH为7.4(为生理pH值)。实验中用到的所有溶液都为新鲜配制。

(ii) HB-明胶溶液的制备。文献报道竹红菌乙素在水中的最大溶解度为8.8 $\mu\text{mol/L}$,为了防止团聚,实验浓度为8 $\mu\text{mol/L}$ ^[32]。首先将定量明胶溶解于pH为7.4的PBS溶液中,浓度为12.5 g/L。竹红菌乙素DMSO的浓溶液(3.8 mmol/L)通过微量注射器缓慢注射到明胶溶液中(快速加入会造成聚集),在摇床上持续振摇直至反应完成。

(iii) 光谱的测量。紫外吸收光谱和荧光光谱分别用UV-1601紫外分光光度计(岛津,日本)和F-4500荧光光谱仪(岛津,日本)测定。HB的荧光激发波长为470 nm,明胶的荧光激发波长为295 nm。样品在进行荧光测定前在暗处放置10 min至室温。

(iv) 照射。在1 cm $\times$ 1 cm的石英比色皿中的样品溶液,按照实验要求分别被氧气、氩气饱和,然后用滤掉低于470 nm光的450 W中压钠灯照射。比色皿所处位置光强用紫外/可见辐照计测量为100 mW/cm^2 。

2 结果

2.1 明胶的吸收和荧光光谱

对于蛋白质样品,用295 nm的光激发样品产生340 nm的荧光峰,通常将该荧光峰归属于色氨酸残基^[33]。图2中给出明胶液体的吸收(a)和荧光(295 nm激发)光谱(b)。图2(b)中无340 nm荧光发射峰,证明样品中不含色氨酸残基;而峰值为392 nm的强荧光发射可能是吡啶啉交联结构存在的证据。Cole等人^[28,29]也从小牛皮制备的明胶中检测到295 nm激发、395 nm发射的交联吡啶啉特征荧光。在生物体内纤维化过程中,胶原蛋白碳端的交联结构将以吡啶啉交联为主^[34,35],吡啶啉交联结构如图3所示。明胶来源于胶原蛋白,二者具有相似的氨基酸组成。因为纤维化症的重要标志是胶原蛋白中吡啶啉交联模式异常增高、失衡,以上光谱特征可见明胶可以作为一个适当的研究模型物。

2.2 竹红菌乙素与明胶的结合

将6.3 μL HB的DMSO溶液(3.8 mmol/L)加入到3 mL明胶溶液(12.5 g/L)中,在摇床上振摇、反应,随反应时间变化的HB吸收光谱及荧光光谱如图4所示,其中插图显示荧光强度值随时间的变化曲线。

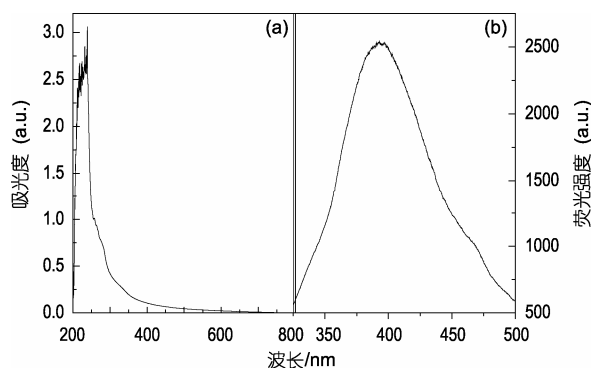


图 2 明胶在 PBS 溶液(pH 7.4)中的吸收光谱(a)和荧光光谱(b)

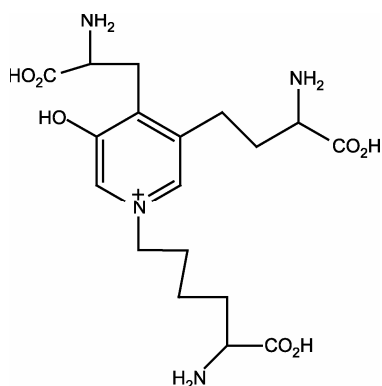


图 3 吡啶啉的结构^[35]

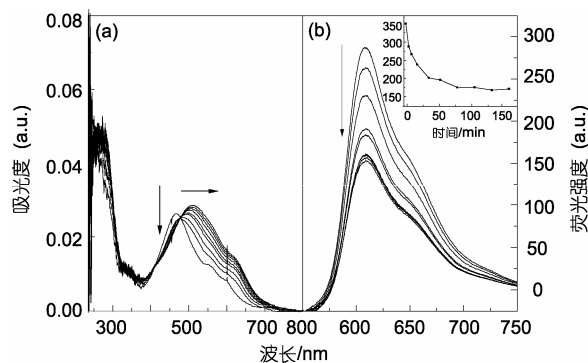


图 4 HB(8 $\mu\text{mol/L}$)在明胶 PBS 溶液(12.5 g/L)中的吸收光谱(a)和荧光光谱(b)随时间的变化

(a) 已扣除明胶溶液本身的吸收; (b) 已扣除明胶溶液本身的荧光, 激发波长为 470 nm; pH 7.4, 时间点: 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 150 和 180 min, 箭头表示变化方向. 插图为荧光强度随时间的变化

图 4 显示反应过程中吸收峰从 465 nm 红移到 508 nm, 在 478 nm 出现一个等吸收点; 而荧光强度随反应时间增加而降低, 90 min 后基本不再改变, 证明反应完成. 随着反应时间增加, 荧光发射强度出

现降低. 图中表现出吸收增强, 表明 HB 结合到明胶的疏水微区, 而荧光猝灭的特征说明分子间形成氢键而削减 HB 分子内氢键^[36,37].

2.3 HB 对吡啶啉交联的光降解

明胶作为变性胶原蛋白, 在溶液中同样以三螺旋模式存在^[38]. 利用波长大于 470 nm 的光(选择激发 HB)照射明胶样品(有、无 HB 和充氧或除氧), 随照射时间荧光光谱的变化如图 5 所示. 从图中可见, 氧气和 HB 同时存在下造成 392 nm 的荧光下降最快, 说明光敏化产生的单线态氧、超氧阴离子自由基、羟自由基是使交联吡啶啉降解的主要活泼物种, 即交联吡啶啉的降解主要归因于 HB 诱发的光动力作用, 这与 HB 光动力诱发人血清蛋白中色氨酸的荧光猝灭是一致的^[33]. 在除氧条件下, 荧光强度也有一定程度的下降, 这归因于 HB 光敏剂和生物分子自由基的 I 型反应. 从以上特征可见, 吡啶啉交联物的降解主要通过 Type II 型机制, 而 I 型机制也起一定作用. 如前所述, 纤维化症的分子病理基础是胶原蛋白中交联结构的吡啶啉含量增加, 使得组织中的胶原蛋白难于生物降解、累积、发生纤维化病变. 本文结果显示, 通过 HB 诱发的光动力作用, 有可能调控吡啶啉交联含量、实现胶原蛋白交联过程的平衡和纤维化症的“微创”治疗. 显然, 透彻阐明吡啶啉交联光降解的分子机制尚需更深入的研究.

2.4 明胶对 HB 自漂白的影响

由于光敏化产生的自由基和活性氧的强反应活性, 这些活性物也可能与光敏剂自身反应, 使之发生光漂白. 图 6 给出在缓冲液充氧的条件下, 明胶存在与否 HB 的光漂白性质. 图 6(a)整个光谱区都随光照时间而下降, 表明 HB 分子被氧化为检测波长区无明显吸收的小分子; 与图 6(a)相比, 明胶存在下 HB 自身光漂白程度大大降低, 同时 300~400 nm 区间的吸收增加. 这不仅说明生物靶分子的存在减少活性物种与光敏剂自身的反应, 另一方面也说明 II 型反应可以将 HB 氧化为无可见吸收的小分子, 而 I 型反应只能产生中间产物. 对照图 5 的结果, 提示了光敏剂在生物靶体存在下的光动力作用特征.

3 结论

明胶溶液在 295/392 nm 的激发/发射对证明明胶分子中存在吡啶啉交联模式而不存在色氨酸残基,

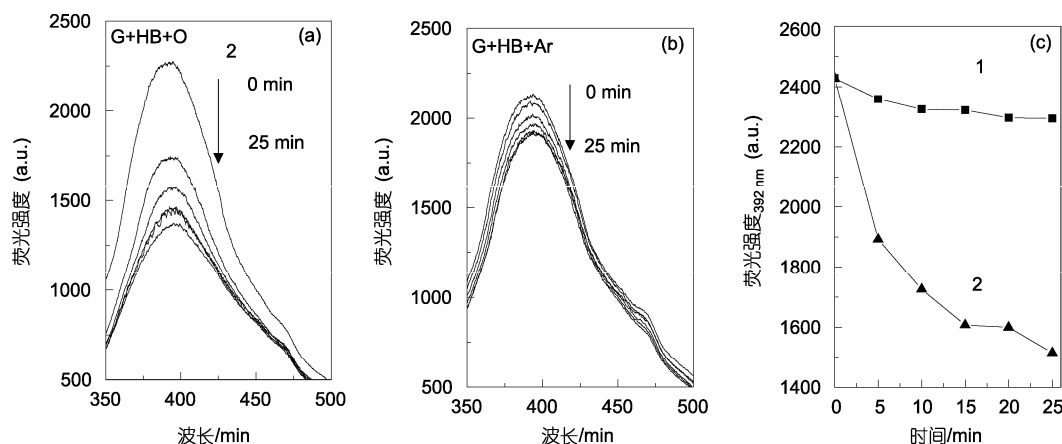


图5 明胶在 HB 存在和不存在条件下, 反应液分别用氧气、氩气饱和, 经照射后的荧光光谱

(a) 明胶和 HB 及氧气同时存在时的荧光光谱; (b) 明胶和 HB 及氩气同时存在时的荧光光谱; (c) 392 nm 处荧光强度随照射时间的变化, 1 为氩气饱和, 2 为氧气饱和

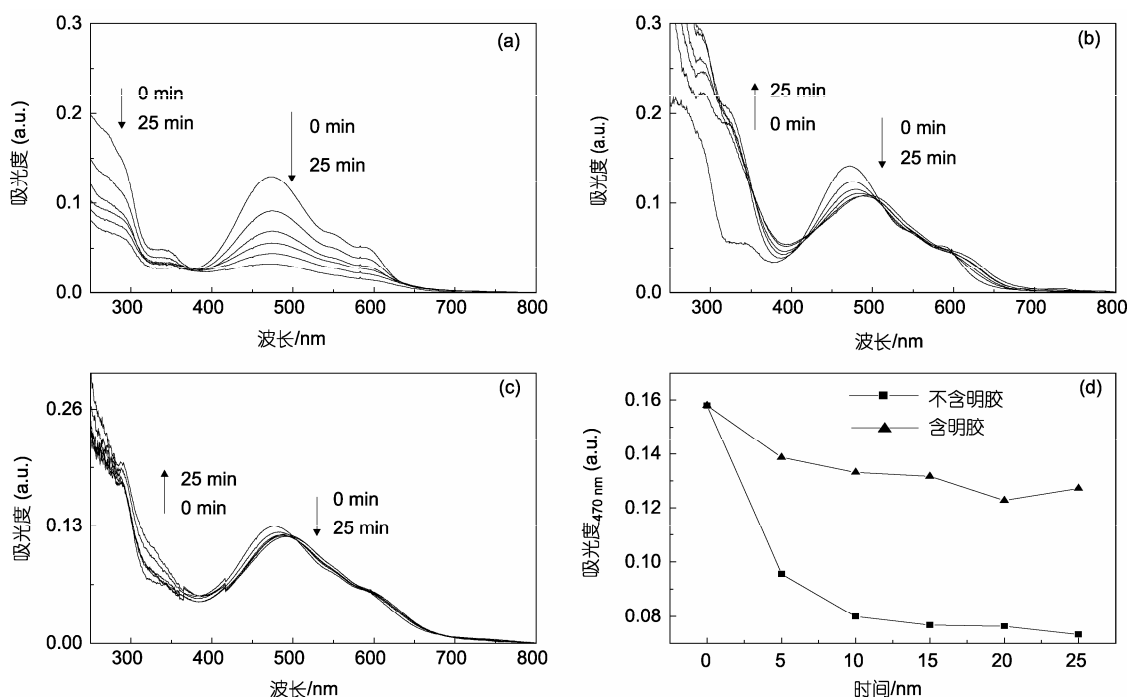


图6 HB 在不同条件下的吸收光谱

(a) HB 在没有明胶存在下氧气饱和后, 被照射样品的吸收光谱; (b) HB 在有明胶的条件下氧气饱和后, 被照射样品的吸收光谱; (c) HB 在有明胶的条件下用氩气去氧后, 被照射样品的吸收光谱; 箭头表示变化方向; (d) 中两条线分别为有明胶和没有明胶条件下, 氧气都存在时 HB 的光自漂白情况

可以用作光动力削减吡啶啉交联含量、调控胶原蛋白交联平衡的研究模型。发现 HB 光敏化有效降低明胶样品中交联吡啶啉的含量, 提示 HB 光动力作用有可能适用于调控胶原蛋白的组成平衡, 从而实现纤维

化症的无创治疗。尽管无外源靶体存在时 HB 会发生严重的自身光漂白, 但外源靶体的存在会形成对光敏剂的“保护”, 从而更大程度地保持光敏剂在生物体内的光动力作用。

参考文献

- Webber J, Herman M, Kessel D, et al. Photodynamic treatment of neoplastic lesions of the gastrointestinal tract. *Langenbeck Arch Surg*, 2000, 385: 299—304
- Zhang J, Cao E H, Li J F, et al. Photodynamic effects of hypocrellin A on three human malignant cells by inducing apoptotic cell death. *J Photochem Photobiol, B: Biol*, 1998, 43: 106—111
- 刘凡光, 顾英, 于常青, 等. 光敏剂漂白特性在鲜红斑痣光动力治疗中的作用. *中国激光医学杂志*, 2002, 11: 137—140
- 王开, 顾瑛, 刘凡光, 等. 光动力疗法治疗鲜红斑痣在临床应用中应注意的几个问题. *中国激光医学杂志*, 2002, 11: 190—192
- Dougherty T J, Gomer C J, Henderson B W, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer I*, 1998, 90: 889—905[doi]
- Diwu Z J. Novel therapeutic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins. *Photochem Photobiol*, 1995, 61: 529—539
- 蒋丽金. 竹红菌素的结构, 性质, 光化学反应及反应机制(I)—竹红菌素的结构和性质. *科学通报*, 1990, 35: 1608—1616
- 蒋丽金. 竹红菌素的结构, 性质, 光化学反应及反应机制(II)—红菌素的反应. *科学通报*, 1990, 35: 1681—1690
- 蒋丽金, 何玉英. 竹红菌素类光敏剂的光物理、光化学及光生物. *科学通报*, 2000, 45: 2019—2032
- Zhao B Z, Xie J, Zhao J Q. A novel water-soluble nanoparticles of hypocrellin B and their interaction with a model protein—C-phycocyanin. *BBA-Gen Subjects*, 2004, 1670: 113—120[doi]
- 黄乃艳, 刘凡光, 顾瑛, 竹红菌素 B 的两种剂型用于鲜红斑痣光动力治疗的动物实验研究. *激光生物学报*, 2007, 16: 359—363
- Dennis A H, David R E. Molecular site specificity of pyridinoline and pyrrole cross-links in Type I collagen of human bone. *J Biol Chem*, 1996, 271: 26508—26516[doi]
- Trojanowska M, LeRoy E C, Krieg B E T. Pathogenesis of fibrosis: type I collagen and the skin. *J Mol Med*, 1998, 76: 266—274[doi]
- Cleutjens J P, Verluyten M J, Smiths J F, et al. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol*, 1995, 147: 325—338
- Milani S, Herbst H, Schuppan D, et al. *In situ* hybridization for procollagen type I, III and IV mRNA in normal and fibrotic rat liver; evidence for predominant expression in nonparenchymal liver cells. *Hepatology*, 1989, 10: 84—92
- Tsukamoto H, Matsuoka M, Blanter W, et al. Ito cell activation during progression of alcoholic liver fibrosis. In: Wisse E, Knook D L, McCuskey R S, eds. *Cells of the Hepatic Sinusoid*. Leiden: Kupffer Cell Foundation, 1991, 3: 453—456
- Gäbele E, Brenner D A, Rippe R A. Liver fibrosis: Signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci*, 2003, 8: 69—77[doi]
- van der Slot-Verhoeven A J, van Dura E A, Attema J, et al. The type of collagen cross-link determines the reversibility of experimental skin fibrosis. *BBA-Mol Basis Dis*, 2005, 1740: 60—67
- Bailey A J, Bazin S, Sims T J, et al. Characterization of the collagen of human hypertrophic and normal scars. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 405: 412—421
- Ricard-Blum S, Bresson-Hadni S, Vuitton D A, et al. Hydroxypyridinium collagen cross-links in human liver fibrosis: Study of alveolar echinococcosis. *Hepatology*, 1992, 15: 599—602[doi]
- Last J A, King T E, Nerlich A G, et al. Collagen crosslinking in adult patients with acute and chronic fibrotic lung disease. Molecular markers for fibrotic collagen. *Am Rev Respir Dis*, 1990, 141: 307—313
- van der Slot A J, Zuurmond A M, van den Bogaardt A J, et al. Increased formation of pyridinoline cross-links due to higher telopeptide lysyl hydroxylase levels is a general fibrotic phenomenon. *Matrix Biol*, 2004, 23: 251—257[doi]
- Hayasaka A, Iida S, Suzuki N, et al. Pyridinoline collagen cross-links in patients with chronic viral hepatitis and cirrhosis. *J Hepatol*, 1996, 24: 692—698[doi]
- Robins S P, Stewart P, Astbury C, et al. Measurement of the cross linking compound, pyridinoline, in urine as an index of collagen degradation in joint disease. *Ann Rheum Dis*, 1986, 45: 969—973[doi]
- Ištók R, Bély M, Stančíková M, et al. Evidence for increased pyridinoline concentration in fibrotic tissues in diffuse systemic sclerosis. *Clin Exp Dermatol*, 2001, 26: 545—547[doi]
- Brinckmann J, Neess C M, Gaber Y, et al. Different pattern of collagen cross-links in two sclerotic skin diseases: lipodermatosclerosis and circumscribed scleroderma. *J Invest Dermatol*, 2001, 117: 269—273
- Eastoe J E. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochem J*, 1955, 61: 589—600
- Cole C G B, Roberts J J. Gelatine fluorescence and its relationship to animal age and Gelatine colour. *SA J Food Sci Nutr*, 1996, 8: 139—143

- 29 Uchiyama A, Ohishi T, Takahashi M, et al. Fluorophores from aging human articular cartilage. *J Biochem*, 1991, 110: 714—718
- 30 Moriguchi T, Fujimoto D. Crosslink of collagen in hypertrophic scar. *J Invest Dermatol*, 1979, 72: 143—145[doi]
- 31 David R E, Ian R D, Kirk V. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. *Biochem J*, 1988, 252: 495—500
- 32 宋立明. 色素与生物分子的相互作用及利用竹红菌素的光谱响应识别生物分子的微环境. 博士学位论文. 北京:中国科学院化学研究所, 2006. 48
- 33 赵宝忠. 色素/蛋白相互作用及竹红菌素光动力药物的实用化研究. 博士学位论文. 北京: 中国科学院化学研究所, 2005. 83
- 34 Robins S P, Duncan A. Cross-linking of collagen location of pyridinoline in bovine articular cartilage at two sites of the molecule. *Biochem J*, 1983, 215: 175—182
- 35 Robins S P. Cross-linking of collagen isolation, structural characterization and glycosylation of pyridinoline. *Biochem J*, 1983, 215: 167—173
- 36 Song L M, Xie J, Zhang C X, et al. Recognition of various biomolecules by the environment-sensitive spectral responses of hypocrellin B. *Photochem Photobiol Sci*, 2007, 6: 683—688[doi]
- 37 Song L M, Zhao B Z, Xie J, et al. Interactions of hypocrellin B with hyaluronan and photo-induced interactions. *BBA-Gen Subjects*, 2006, 1760: 333—339[doi]
- 38 Wüstneck R, Wetzel R, Buder E, et al. The modification of the triple helical structure of gelatin in aqueous solution I—The influence of anionic surfactants, pH-value, and temperature. *Colloid Polym Sci*, 1988, 266: 1061—1067[doi]

· 动态 ·

第五届中美有机化学教授交流会议在兰州召开

2009年6月29~30日,由兰州大学功能有机分子化学国家重点实验室主办的第五届中美有机化学教授交流会议:有机化学与化学生物学(The 5th SINO-US Symposium on Organic Chemistry)在兰州大学顺利召开。

中美有机化学教授协会(Chinese-Americans Professors Association, CAPA)创办于2002年,2007年在美国佐治亚州正式注册,王炳和、蒲林和黄震是协会的创办人。在过去的几年中,中美化学教授学术交流会已经举办4届:第一届于2005年在南开大学举办、第二届于2006年在上海有机所举办、第三届于2007年在武汉大学举办、第四届于2008年在北京大学举办。今年由兰州大学承办,2010年将由浙江大学承办。CAPA还和美国化学会(American Chemical Society, ACS)共同组织过两次学术研讨会:2003年在纽约,2007年在波士顿。

本次会议延续了“广泛交流、深入研讨、增加合作”的原则和一贯传统。会议期间,与会代表们紧紧围绕“有机化学和化学生物学”两个会议主题,分别就有机化学与药物化学领域的许多研究热点问题作了深入细致的探讨,并对今后开展有机化学和药物化学等研究领域的国际合作进行了认真仔细的磋商。

中美有机化学教授会议是旅美有机化学、化学生物学教授与国内化学研究工作者相互进行学术交流、增加合作机会及加深彼此友谊的平台。本次功能有机分子化学国家

重点实验室负责承办的第五届中美有机化学教授会议,是近年来有机化学学科水平较高,规模较大的一次国际会议,得到了国家自然科学基金委员会及兰州大学的大力支持。来自美国、德国等多个国家的18位国际知名的专家学者及北京大学、复旦大学、中国科学院上海有机化学研究所等多所著名高校和研究机构的66位专家学者共154人出席了此次会议,其中包括国际著名化学期刊《德国应用化学》(Angew Chem)的主编 Peter-Goelitz 教授和美国化学会期刊《有机快报》的副主编 Hungwen Liu 教授等国际著名专家学者。Peter-Goelitz 教授介绍了 Angew Chem 的基本情况,指出近年来来自中国的投稿越来越多,数量已经跃居世界第一位,但录用率却非常低。Angew Chem 是一份在化学研究者心目中颇有影响力的期刊,历史悠久,此次主编的来访,是一个相互增进了解的机会。《中国科学:化学》编辑部主任朱晓文参会并作了会议发言,向与会代表汇报了《中国科学》出版社近两年来的改革举措。

本次会议的成功举办,对提高有机化学各个子学科领域的研究发展,促进化学生物学、药物化学、有机化学合成及方法学以及材料化学等学科的进一步发展将起到积极的推动作用。

艾星涛

(《科学通报》编辑部)