

放线菌素 D 光敏产生活性氧的 EPR 研究

潘景喜^① 张素萍^② 屠铁成^① 韩镇辉^①
蔡喜臣^① 姚思德^{①*} 林念芸^①

(^①中国科学院上海原子核研究所, 上海 201800; ^②中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘要 放线菌素 D 是一种和双链 DNA 和单链 DNA 都能发生选择性结合的抗生素, 而这种结合作用大大增加了 DNA 的光敏性. 利用电子顺磁共振(EPR)和自旋捕捉技术, 对放线菌素 D 光动力作用过程中产生的活性氧进行了系统研究, 发现无论是在溶液中还是在与 DNA 形成复合物以后, $^1\text{O}_2$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 都是重要的活性产物, 而且两者的产额存在竞争关系. 实验结果说明, 放线菌素 D 的光敏作用是通过能量转移(II 型机制)和电子转移(I 型机制)两种反应途径进行的. 当在溶液中氧自由存在时, 以能量转移形成 $^1\text{O}_2$ 为主; 而当和 DNA 形成复合物时, 放线菌素 D 的激发态与 DNA 之间的电子转移反应成为主要的反应途径.

关键词 放线菌素 D EPR 活性氧 光动力作用

放线菌素 D(Actinomycin D, 简称 AMD)是目前研究的最广泛的抗生素之一, 它是属于放线菌素族的一种抗生素, 由两个五肽内酯环侧链与其发色团相连(图 1). 各种放线菌素的差异, 主要是多肽侧链中的氨基酸及其排列顺序的不同. AMD 具有多种生物和药理活性, 也是一种临床有效的抗肿瘤药物.

研究表明, AMD 能与双链 DNA(dsDNA)强烈结合, 而且其具有平面刚性芳香结构的发色团能够插入碱基对之间, 与碱基以非共价结合, 使 DNA 链伸长. 这又会干扰以 DNA 为模板的 RNA 合成, 这就是 AMD 抗癌作用的理论基础^[1-3]. 近年的研究表明, AMD 能够有效抑制 HIV 病毒的反转录^[4,5], 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^[6,7].

由于 AMD 的发色团在可见光区有很强的吸收, 研究它的光敏性质, 特别是与 DNA 形成复合物以后的光敏性质, 是很有必要的, 因为这有可能解释 AMD 的毒副作用是否部分来源于它的光毒性, 而且有可能为 AMD 开发为光动力治疗药物提供理论依据. 事实上, Zhdanov 等人已经做了细胞水平的实验^[8], 这是关于 AMD 光动力作用的首次报道, 研究发现 AMD 在可见光照下, 能够杀死逆转录病毒, 而没有光照的对照组细胞未受影响. 我们以前的研究表明, AMD 可以和 DNA 发生光诱导的电子转移氧化反应^[9]. 为了更深入了解 AMD 光动力作用的原初过程, 我们利用电子顺磁共振(Electron Paramagnetic Resonance, 简称 EPR)和自旋捕捉技术, 对该过程中产生的活性中间体, 特别是活性氧, 进行了系统研究, 并对其光动力作用的机制进行了探讨.

1 实验材料和方法

放线菌素 D(98%)、小牛胸腺 DNA(dsDNA)为 Sigma 公司产品. 5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物(5,5-Dimethyl-1-Pyrroline-N-oxide, 简称 DMPO), 2,2,6,6-四甲基哌啶(2,2,6,6-tetramethylpiperidine, 简称 TEMP), 1,4-二氮杂二环[2·2·2]辛烷(1,4-Diazabicyclo[2·2·2]octane, 简称 DABCO)为 Aldrich 公司产品. NADH, 超氧化物歧化酶(SOD), 组氨酸均从上海生工生物试剂公司购得. ssDNA 是由 dsDNA 的溶液在 90℃ 的水浴中加热 10 min, 然后在冰-盐(KCl)浴中迅速冷却制得. 水用新蒸的三次蒸馏水, 所有溶液均在使用前新鲜配制. 除非特别说明, 本实验中所用溶剂为二甲亚砜和磷酸缓冲溶液(体积比 1/1, pH 7.0)组成的混合溶剂.

稳态吸收光谱用 Shimadzu UV-210A 型双光束分光光度计记录.

EPR 波谱用 Varian E-112 型波谱仪在室温下测定(X 波段, 微波频率 9.17 GHz). 光源为 500 W 氙灯, 用玻璃滤色片截去 400 nm 以下的光. 将 AMD 与捕捉剂混合溶液定量注入标准的石英扁平样品池中, 根据实验需要分别充氮气或氧气 20 min, 然后在 EPR 谐振腔内光解并直接测试. 本实验中测 $^1\text{O}_2$ 时所用的 EPR 参数: 微波功率, 5 mW; 调制幅度, 1×10^{-4} T; 时间常数, 0.128 s; 增益, 10^4 . 测 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 时: 微波功率, 30 mW; 调制幅度, 1×10^{-3} T; 时间常数, 0.25 s; 增益, 6.3×10^4 .

2 结果与讨论

2.1 稳态吸收光谱

AMD(0.015 mmol/dm^3)在中性溶液中的紫外可见吸收光谱如图 2-1 所示, 其最大吸收波长

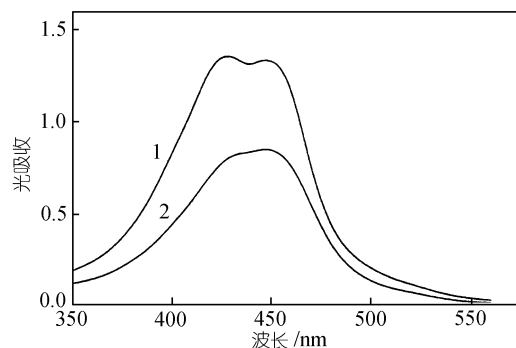


图 2 紫外可见吸收光谱

1 示 AMD(0.015 mmol/dm^3); 2 示同 1, 只是加入 1 mmol/dm^3 dsDNA(碱基对)

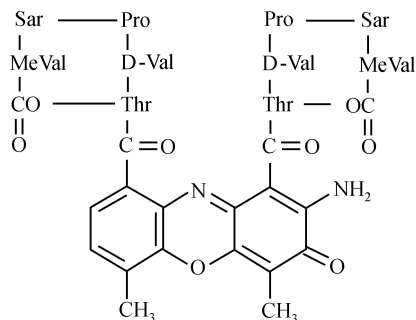


图 1 放线菌素 D 的分子结构式

(λ_{max})为 435 nm. 当溶液中加入 dsDNA (1 mmol/dm^3 碱基对)时, AMD 的吸收明显减弱(图 2-2), 同时 λ_{max} 从 435 nm 变为 448 nm, 红移了 13 nm. 这种结果主要是因为 AMD 与 dsDNA 结合以后, 它的发色团插入碱基对之间, 并由形成的非共价相互作用(主要是氢键)引起的. 当 AMD 的溶液中加入 ssDNA 时, 也观察到类似结果 ($\lambda_{\text{max}} = 446 \text{ nm}$). 由于其吸收光谱与加入 dsDNA 时几乎重合, 故没有示出.

2.2 AMD 光敏产生单线态氧

单线态氧($^1\text{O}_2$)是大多数光敏剂起作用的主要活性中间体. 目前已应用于临床的光动力治疗药物——卟啉类光敏剂就主要是通过 $^1\text{O}_2$ (即 II 型机制)起作用的. $^1\text{O}_2$ 非常活泼,

未给出). 这些实验都说明 $O_2^{\cdot-}$ 是由 AMD 的光敏作用产生的.

当体系中加入 DNA 时, DMPO- $O_2^{\cdot-}$ 复合物的信号增强, 特别是 ssDNA 的加入, 使该信号明显增强, 说明 $O_2^{\cdot-}$ 产额的增加是由于 AMD 的激发态(AMD *)与 DNA 发生了反应, 很可能是发生了电子转移反应, 也就是说, AMD * 从 DNA 上得到一个电子后, 形成 AMD 的阴离子自由基(AMD $^{\cdot-}$), 然后又将电子传递给 O_2 生成 $O_2^{\cdot-}$. 同时, DNA 由于失去一个电子后形成其阳离子自由基(DNA $^{+\cdot}$), 最终会导致 DNA 的链断裂^[13]. 虽然, Kittler 等人认为 AMD 的单线态和 DNA 的 4 种碱基发生电子转移反应都是放热的^[14], 但是这里不能确定是不是通过这种中间体起作用的, 可能 AMD 单线态和三线态的贡献都是不能忽略的.

2.4 AMD 阴离子自由基(AMD $^{\cdot-}$)的直接检测

前面实验中我们把 $O_2^{\cdot-}$ 的产生归因于 AMD $^{\cdot-}$ 与 O_2 之间发生的电子传递反应, 也就是说 AMD $^{\cdot-}$ 是 $O_2^{\cdot-}$ 的前体. 那么, 当体系中没有 O_2 时, 能否直接看到 AMD $^{\cdot-}$ 的信号呢? 为了验证

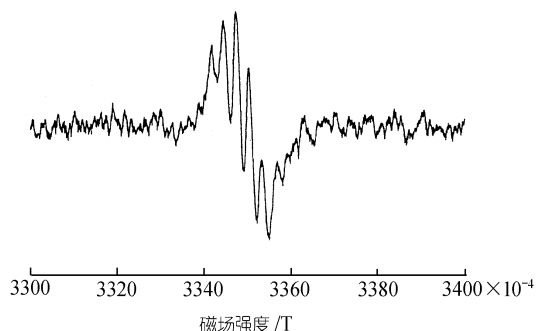


图 6 AMD 阴离子自由基(AMD $^{\cdot-}$)的 EPR 信号
样品(0.2 mmol/dm 3)中加入 1 mmol/dm 3 NADH. EPR 参数: 微波功率, 10 mW; 调制幅度, 1×10^{-4} T; 时间常数, 0.064 s; 增益, 5×10^4

实验条件(pH 7.0)下, AMD $^{\cdot-}$ 以质子化的半醌亚胺自由基存在.

3 结论

通常认为, 光敏反应主要包括 I 型和 II 型两种机制^[16]. 光敏剂吸收光后, 形成激发态, 它能与底物或溶剂反应生成敏化剂阴离子自由基, 随后经电子转移反应产生超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)(I 型机制)或与基态分子氧发生能量转移产生单重态氧(1O_2)(II 型机制).

我们的研究发现, AMD 的光动力作用是通过 I 型和 II 型两种机制进行的, 反应机理总结

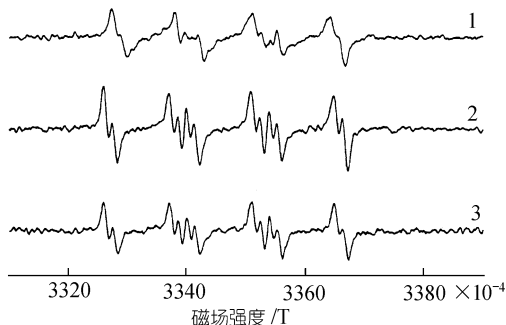
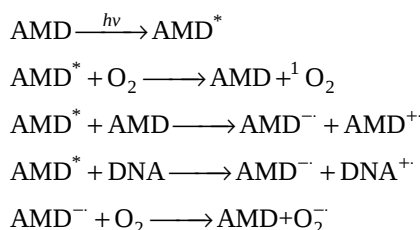


图 5

1 示含 0.2 mmol/dm 3 AMD 和 40 mmol/dm 3 DMPO 的样品 (pH 7.0)光照 5 min 后形成的 EPR 波谱信号; 2 示其他条件同 1, 只是加入 2 mmol/dm 3 ssDNA(碱基); 3 示其他条件同 1, 只是加入 1 mmol/dm 3 dsDNA(碱基对). EPR 参数: 微波功率, 30 mW; 调制幅度, 1×10^{-3} T; 时间常数, 0.25 s; 增益, 6.3×10^4

这一点, 我们将通 N_2 除氧的 AMD(0.2 mmol/dm 3)溶液在谐振腔内进行光照并同时检测, 确实看到了 EPR 信号, 而且 4 min 时达到最大, 但该信号很弱, 而且衰减很快(图未给出). 为了增强信号强度, 对该信号进行归属, 我们往体系加入了常用的电子给体 NADH(1 mmol/dm 3)用以增加 AMD $^{\cdot-}$ 的产额, 结果如图 6 所示, 该信号和 Flitter 等人^[15]用铁氧还蛋白还原酶(Ferredoxin reductase)还原 AMD 形成的 AMD $^{\cdot-}$ 的 EPR 信号完全一致, 证明了 AMD $^{\cdot-}$ 的存在. 同文献中一样, 在我们的

如下:



在溶液中, AMD 的光敏作用主要通过 II 型机制进行, 当与 DNA(特别是 ssDNA)形成复合物以后, I 型机制(AMD^{*}直接与 DNA 发生电子转移反应)变得不可忽略, 而成为一种与 II 型机制竞争的重要反应途径.

从这些结果我们推测, 临床上使用 AMD 时, 对于正常组织(如皮肤)应尽量避免光, 以减少光毒性反应发生, 而对于病灶区(如肿瘤)应增加光照, 以增强 AMD 的疗效. 另外, AMD 可能成为一种潜在的抗 HIV 病毒的光疗药物, 因为 AMD 能够和其逆转录过程中的重要中间体 ssDNA 结合形成复合物, 并能在可见光激发下, 与其发生电子转移反应, 最终导致 ssDNA 的损伤和断裂.

参 考 文 献

- White R J, Phillips D R. Transcriptional analysis of multisite drug-DNA dissociation kinetics: Delayed termination of transcription by actinomycin D. *Biochemistry*, 1988, 27: 9122 ~ 9132
- Kamitori S, Takusagawa F. Crystal structure of the 2:1 complex between d(GAAGCTTC) and the anticancer drug actinomycin D. *J Mol Biol*, 1992, 225: 445 ~ 456
- Wilson W D, Jones R L, Zon G, et al. Actinomycin D binding to oligonucleotides with 5'd(GCGC)3' sequence. Definitive ¹H and ³¹P NMR evidence for two distinct d(GC) 1:1 adducts and for adjacent site binding in a unique 2:1 adduct. *J Am Chem Soc*, 1986, 108: 7113 ~ 7114
- Gabbara S, Davis W R, Hupe L, et al. Inhibitors of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry*, 1999, 38: 13070 ~ 13076
- Rill R L, Hecker K H. Sequence-specific actinomycin D binding to single-stranded DNA inhibits HIV reverse transcriptase and other polymerases. *Biochemistry*, 1996, 35: 3525 ~ 3533
- Wadkins R M, Jovin T M. Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA. *Biochemistry*, 1991, 30: 9469 ~ 9478
- Wadkins R M, Jares-Erijman E A, Klement R, et al. Actinomycin D binding to single-stranded DNA: Sequence specificity and hemi-intercalation model from fluorescence and ¹H NMR spectroscopy. *J Mol Biol*, 1996, 262: 53 ~ 68
- Zhdanov V M, Yershov F I. Photodynamic and fluorochromic properties of the antibiotic actinomycin D. *J Cell Physiol*, 1965, 65: 433 ~ 434
- Pan J X, Liu Y, Zhang S P, et al. Photodynamic action of actinomycin D: An EPR spin trapping study. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1527: 1 ~ 3
- Cadet J, Teoule R. Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals. *Photochem Photobiol*, 1978, 2: 661 ~ 667
- Lion Y, Delmelle M, van de Vorst A. New method of detecting singlet oxygen production. *Nature*, 1976, 263: 442 ~ 443
- Manring L E, Kramer M K, Foote C S. Interception of O₂^{•-} by benzoquinone in cyanoaromatic-sensitized photooxygenations.

Tetrahedron Lett, 1984, 25: 2523 ~ 2526

- 13 Angelov D, Spassky A, Berg M, Cadet J. High-intensity UV laser photolysis of DNA and purine 2'-deoxyribonucleotides: Formation of 8-oxopurine damage and oligonucleotide strand cleavage as revealed by HPLC and gel electrophoresis studies. J Am Chem Soc, 1997, 119: 11373
- 14 Kittler L, Lober G, Gollmick F A, et al. Redox processes during photodynamic damage of DNA: III. Redox mechanism of photosensitization and radical reaction. Bioelectrochem Bioenerg, 1980, 7: 503 ~ 511
- 15 Flitter W D, Mason R P. The enzymatic reduction of actinomycin D to a free radical species. Arch Biochem Biophys, 1988, 267(2): 632 ~ 639
- 16 Henderson R W, Dougherty T J. How does photodynamic therapy work? Photochem Photobiol, 1992, 55: 145 ~ 157