

文章编号: 1000-5862(2014)01-0006-05

光谱法研究 PBBHAMF 与小牛胸腺 DNA 的相互作用

王瑞玲, 徐丽繁, 邓承雨, 黄小艳, 黄振钟*

(江西师范大学化学化工学院, 江西 南昌 330022)

摘要: 以小牛胸腺 DNA 为研究对象, 探讨了 4'-苯基-3-溴-8-[N,N-二(2-羟基乙基)氨基甲基]黄酮(PBBHAMF)与小牛胸腺 DNA 之间的相互作用模式. 在以吖啶橙(AO)为荧光探针的实验中, DNA-AO 复合物的荧光被 PBBHAMF 猝灭, 其猝灭过程主要为静态猝灭; DNA 的存在使 PBBHAMF 的紫外光谱发生了减色效应, DNA 的粘度增大, CD 光谱 274 nm 处信号发生变化, 这些都能判断 PBBHAMF 与 DNA 发生了嵌插结合. 此外, 红外光谱结果表明 PBBHAMF 与 DNA 还存在静电结合.

关键词: 4'-苯基-3-溴-8-[N,N-二(2-羟基乙基)氨基甲基]黄酮; 小牛胸腺 DNA; 荧光光谱; 圆二色谱; 红外光谱

中图分类号: O 657.3

文献标志码: A

0 引言

自 20 世纪 20 年代始, 人们就开始把槲皮素^[1]等黄酮类物质应用于临床. 至 60 年代末, 人们发现黄酮类化合物具有广谱的药理活性, 如抗炎、抗病毒、强心和镇痛等作用. 到了 70 年代, 研究者又发现此类化合物在抗衰老、抗氧化、免疫调节和抗肿瘤上疗效显著^[2]. 随着现代科学技术的发展, 天然药物的开发已由民间途径转向分子途径, 除了从天然植物中寻找新的黄酮类单体, 人们还不断具有针对性地对黄酮类化合物进行结构改造或修饰, 加强对其构效关系的研究^[3], 使其作为新药开发的先导化合物. 前期的一些研究工作发现, 天然黄酮类化合物在 2 个苯环(A 环和 B 环)上往往被羟基、甲氧基所取代, 取代基不同时, 化合物的活性也相差较大, 当在黄酮 4'-位、8-位上引入取代基时, 能提高此类化合物的活性^[4].

DNA 是生物体内重要的组成物质, 是遗传信息的主要载体, 同时也是抗癌、抗肿瘤药物最主要的生物靶目标. 药物小分子与 DNA 的相互作用能损伤癌细胞中的 DNA, 阻断癌细胞的分裂与扩散, 从而导致癌细胞的死亡. 因此, 研究 DNA 的结构和功能, 可以从分子水平上了解生命现象的本质, 解释药物的

作用机理. 近年来, 以一些以抗癌和抗肿瘤药物为配体的小分子与 DNA 相互作用的研究十分活跃. 吖啶橙(AO)能够嵌插到 DNA 2 个相邻的碱基对之间, 与 DNA 结合后其荧光强度显著增强^[5]. 如果药物小分子具有类似的嵌插结合方式, 会与 AO 竞争 DNA 上的结合位点, 使部分 AO 游离出来, 导致 DNA-AO 复合物的荧光强度降低.

本文合成了 4'-苯基-3-溴-8-[N,N-二(2-羟基乙基)氨基甲基]黄酮(PBBHAMF), 并以小牛胸腺 DNA 为研究对象, 通过紫外光谱、荧光光谱、圆二色谱和红外光谱探讨了 PBBHAMF 与 DNA 之间的相互作用模式, 为研究此类黄酮类化合物的药理活性提供了理论依据.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

FE20 型便携式 pH 计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); LS-55 荧光分光光度计(美国 Perkin-Elmer); Lambda 35 紫外-可见分光光度计(美国 Perkin-Elmer); MOS-450 圆二色谱仪(法国 Biologic); FT-IR 6700 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet); 乌氏粘度计(上海前锋橡塑玻璃制品厂).

小牛胸腺 DNA(Sigma 公司), 储备液配制: 溶于

收稿日期: 2013-09-16

基金项目: 江西省教育厅 2012 年度科技课题(GJJ12201)资助项目.

通信作者: 黄振钟(1963-), 男, 江西赣州人, 教授, 硕士, 主要从事光学分析研究.

一定量的 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液,通过测量其在波长 260 nm 处的吸光度,并根据此波长处的摩尔吸收系数 $\varepsilon_{260} = 6\,600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 确定其浓度为 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,低温 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 暗处储存;AO 购自 Sigma 公司,配置成 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,使用时进行稀释;4'-苯基-3-溴-8-[*N,N*-(2-羟基乙基)氨基甲基]黄酮(参考文献[6-11]设计合成,其单晶结构见图1): $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,工作时稀释至所需浓度; pH 值为 7.40 的 Tris-HCl 缓冲液; $0.50 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液。

1.2 实验方法

AO-DNA 复合物的配置:取 8.0 mL $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AO 和 16.0 mL $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA 溶液于 100 mL 容量瓶中,用缓冲液定容,超声 1 h 混合均匀。

于 10 mL 比色管中,加入一定量的 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBBHAMF, 1.0 mL AO-DNA 复合物 ($c(\text{AO}) = 4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c(\text{DNA}) = 3.2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),最后用 pH 值为 7.40 的 Tris-HCl 缓冲液定容,摇匀,恒温静置 30 min,在 500 ~ 600 nm 波长范围内扫描 AO-DNA 复合物与 PBBHAMF 相互作用下的荧光光谱。

在 200 ~ 500 nm 波长范围内测定 AO-DNA-PBBHAMF 复合物混合溶液的紫外吸收光谱,并测定相应浓度的游离 AO-DNA 的紫外光谱。

以相同浓度的 Tris-HCl 缓冲溶液为空白,扫描加入 PBBHAMF 前后 DNA 的 CD 光谱。

取 40 μL DNA 与 DNA-PBBHAMF 溶液于 ZnSe 上,自然风干,以同浓度的 Tris-HCl 缓冲溶液为空白,扫描其红外吸收光谱。

2 结果与讨论

2.1 PBBHAMF 的表征

PBBHAMF 的单晶结构如图 1 所示。

2.2 DNA 对 PBBHAMF 紫外光谱的影响

在小分子与 DNA 相互作用过程中,若是 DNA 诱导小分子的紫外吸收光谱出现减色效应或红移,则表明二者发生了嵌插作用^[12]。图 2 为扣除相应浓度游离 DNA 后 PBBHAMF-DNA 的紫外差谱示意图。由图 2 可见,加入不同浓度的 DNA 后, PBBHAMF 的紫外光谱出现减色效应,说明 PBBHAMF

可能是以嵌插的方式与 DNA 相互作用。

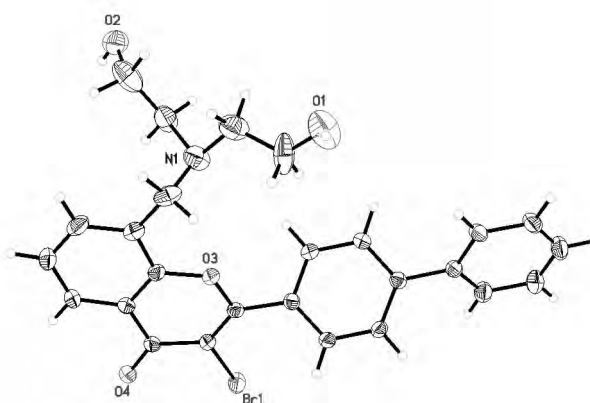
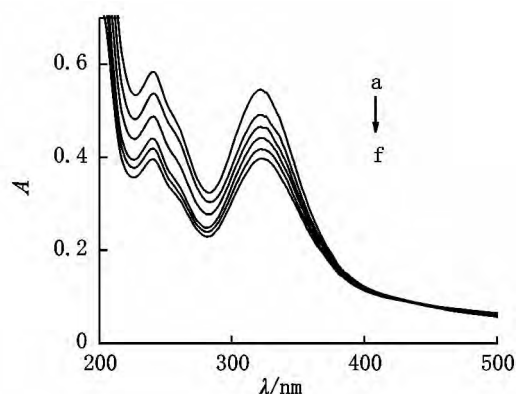


图1 PBBHAMF 的单晶结构图



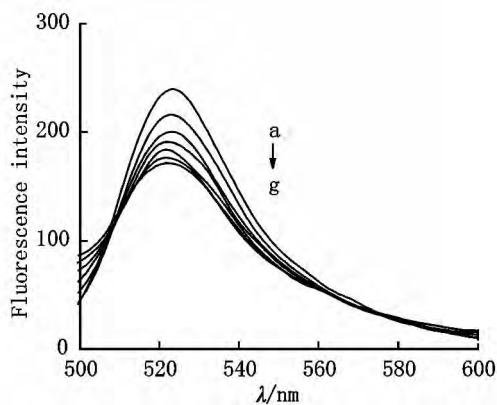
$c(\text{PBBHAMF}) = 5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c(\text{DNA}) / (10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ a~f: 0 2.0 4.0 6.0 8.0 10.0.

图2 扣除相应浓度游离 DNA 后 PBBHAMF-DNA 的紫外差谱

2.3 PBBHAMF 对 DNA-AO 荧光的影响

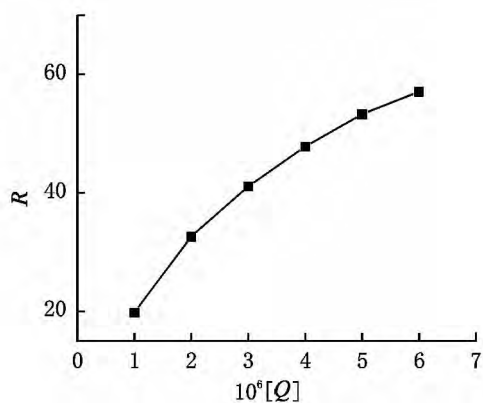
图 3 为加入 PBBHAMF 前后 DNA-AO 的荧光光谱稳图,由图 3 可见,增加 PBBHAMF 的浓度, DNA-AO 的荧光强度逐渐降低,表明 PBBHAMF 与 AO 之间存在竞争关系,能够将一部分 AO 分子从 DNA 碱基对中置换出来,从而导致 DNA-AO 荧光强度的降低。

通过 DNA-AO 的荧光抑制率 R 可以衡量 PBBHAMF 与 DNA 作用的强弱^[13], $R = [1 - (I_c - I_a) / (I_b - I_a)] \times 100\%$, 其中 I_a 、 I_b 、 I_c 分别为 AO、DNA-AO 体系及 PBBHAMF-DNA-AO 体系的荧光强度。抑制率高低反映了 PBBHAMF 与 DNA 结合的强弱。图 4 是不同浓度 PBBHAMF 存在时 DNA-AO 的荧光抑制率示意图,当 PBBHAMF 浓度不断增大时,抑制率有增大的趋势,在 PBBHAMF 的浓度达到 $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, DNA-AO 的荧光抑制率增至 57% 左右。



$c(\text{DNA}) = 3.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c(\text{AO}) = 4.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c(\text{PBBHMF}) / (10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$, $a \sim g$: 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 respectively.

图3 加入 PBBHMF 前后 DNA-AO 的荧光光谱



$c(\text{DNA}) = 3.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c(\text{AO}) = 4.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c(\text{PBBHMF}) / (10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$, $a \sim g$: 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0.

图4 PBBHMF 对 DNA-AO 体系的荧光抑制率

根据 Stern-Volmer 方程 $F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$ 作 PBBHMF 对 DNA 的 Stern-Volmer 图(见图 5), 计算出 298 K 时的荧光猝灭常数 K_q 为 $5.78 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 大于各类猝灭剂对生物

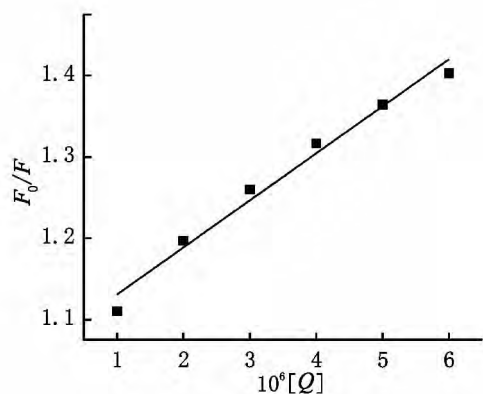
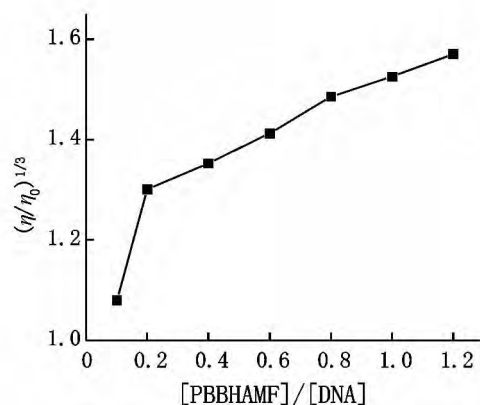


图5 PBBHMF 对 DNA-AO 体系的 Stern-Volmer 图

分子最大扩散碰撞猝灭速率常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 说明 PBBHMF 与 DNA-AO 体系之间的猝灭类型主要为静态猝灭.

2.4 粘度实验

粘度增大是小分子与 DNA 发生嵌插作用的主要标志之一^[14]. 嵌插结合会使 DNA 相邻碱基对之间的距离增大, 导致双螺旋伸长, 粘度增加, 而静电和沟区结合的分子对粘度影响不大. 图 6 为加入不同浓度的 PBBHMF 对 DNA 的粘度的影响, 从图 6 可以看出, 随着 PBBHMF 浓度的增大, DNA 粘度升高, 证明 PBBHMF 与 DNA 发生了嵌插作用.

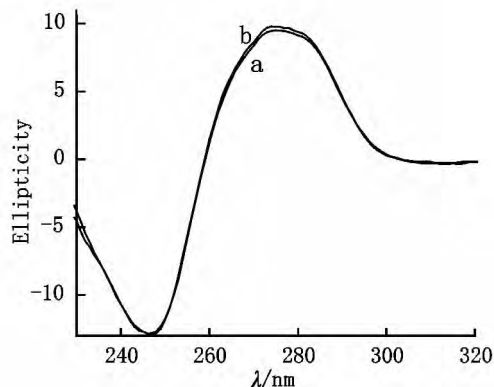


$c(\text{DNA}) = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

图6 不同浓度的 PBBHMF 对 DNA 粘度的影响

2.5 CD 光谱

一些药物小分子与 DNA 作用后旋光性会发生变化, 利用圆二色光谱可获得一定的结构信息, 除此之外, 还可以推断小分子与 DNA 的结合方式及获得 DNA 构象变化信息. 245 nm 附近的负峰是 B 构型



$c(\text{DNA}) = 3.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c(\text{PBBHMF}) = 3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

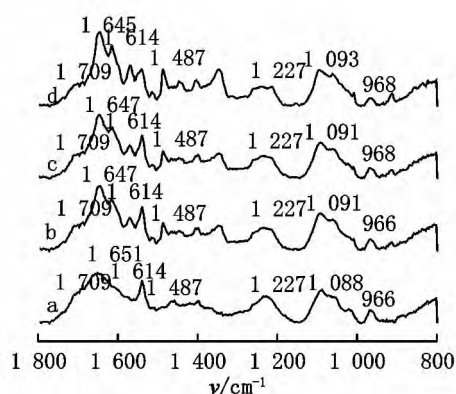
图 7 加入 PBBHMF 前(a)后(b) DNA 的圆二色谱 DNA 右手螺旋的特征, 而 274 nm 附近的正峰则是由于碱基堆积形成的. 图 7 是加入 PBBHMF 前后

DNA 的圆二色谱,从图7可以看出,加入 PBBHAMF 后没有影响245 nm处的 CD 信号强度,说明在 PB-BHAMF 与 DNA 的结合过程中,DNA 的右手螺旋所受影响不大,而 274 nm 处的信号强度有细微增加,说明 PBBHAMF 与 DNA 之间发生了嵌插作用^[15]。

2.6 红外光谱

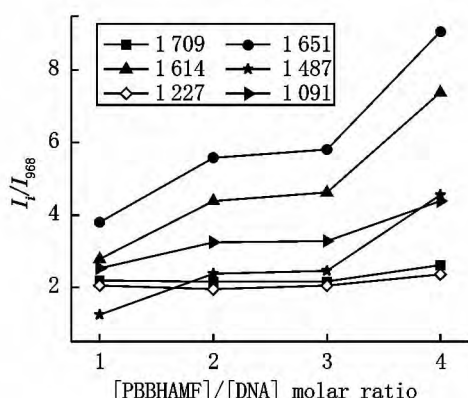
与小分子相互作用时,DNA 的红外光谱在 800 ~ 1 800 cm^{-1} 范围内有如下特征吸收带:1 487, 1 614, 1 651, 1 709 cm^{-1} 分别对应胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶和鸟嘌呤的伸缩振动,1 091 和 1 227 cm^{-1} 分别为磷酸基团的对称和不对称伸缩振动吸收峰,966 cm^{-1} 是脱氧核糖的 C—C 振动吸收峰,并将它作为 B 型 DNA 的内在标准峰^[16]。

图8为加入不同浓度 PBBHAMF 后 DNA 各特



$c(\text{DNA}) = 2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $r([\text{PBBHAMF}]/[\text{DNA}]) = 0$ (a), 1/10 (b), 1/20 (c), 1/30 (d)。

图8 加入不同浓度 PBBHAMF 后 DNA 各特征峰的红外谱



$c(\text{DNA}) = 2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $r([\text{PBBHAMF}]/[\text{DNA}]) = 0, 1/10, 1/20, 1/30$ 。

图9 不同 PBBHAMF/DNA 摩尔比时
各特征峰的相对振动强度 R

征峰的红外谱图。图9为不同 PBBHAMF/DNA 摩尔比时各特征峰的相对振动强度 R ($R = I_i/I_{968}$, I_i 为

DNA 特征峰的振动强度, I_{968} 为 DNA 968 cm^{-1} 处的振动强度)。由图9可知,DNA 与 PBBHAMF 相互作用后,1 091, 1 487, 1 614, 1 651 cm^{-1} 处的振动增强,推测 PBBHAMF 嵌入 DNA 的碱基对中,其中 1 487, 1 614, 1 651 cm^{-1} 处振动强度变化较大,可能是 PBBHAMF 嵌入到 DNA 的碱基对中,与胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶上的活跃位点作用^[17]。同时,1 227 cm^{-1} 处磷酸基团的不对称振动发生了移动,1 091 cm^{-1} 磷酸基团的对称伸缩振动增强,该特征峰的变化表明 PBBHAMF 与 DNA 磷酸骨架存在静电作用。

3 结论

以小牛胸腺 DNA 为研究对象,探讨了 PBBHAMF 与 DNA 之间的相互作用模式。在以 AO 为荧光探针的实验中,DNA-AO 复合物的荧光被 PBBHAMF 猝灭,其猝灭过程主要为静态猝灭。PBBHAMF 的存在使紫外光谱发生了减色效应,DNA 的粘度增大,CD 光谱 274 nm 处信号改变,这些都显示 PBBHAMF 与 DNA 发生了嵌插结合。此外,FT-IR 光谱分析表明 PBBHAMF 与 DNA 还存在静电结合。

4 参考文献

- [1] 陈乃富. 蒽类黄酮类化合物的提取及其抗氧化作用[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(11): 63-66.
- [2] Medina J H, Viola H, Wolfman C, et al. Overview-flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands[J]. Neurochemical Research, 1997, 22(4): 419-425.
- [3] Sanderson J T, Hordijk J, Denison M S, et al. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells[J]. Toxicological Sciences, 2004, 82(1): 70-79.
- [4] Daskiewicz J, Depeint F, Viornery L, et al. Effects of flavonoids on cell proliferation and caspase activation in a human colonic cell line HT29: an SAR study[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2005, 48(8): 2790-2804.
- [5] 陈秀英, 彭孝军. DNA 分子荧光探针[J]. 染料与染色, 2004, 41(6): 315-320.
- [6] Barrero A F, Herrador M M, Arteaga P, et al. Resorcinol derivatives and flavonoids of Ononis matrix subspecies ramosissima[J]. Journal of Natural Products, 1997, 60(2): 65-68.

- [7] Daskiewicz J ,Bayet C ,Barron D. Rearrangement of 5-*O*-prenyl flavones: a selective access to 6-*C*-(1 ,1-dimethylallyl) -and 8-*C*-(3 ,3-dimethylallyl) -flavones [J]. Tetrahedron Letters 2001 ,42(41) : 7241-7244.
- [8] Bhardwaj D K ,Bansal M C ,Bhalla S ,et al. Synthesis of 3 , 5 , 6 , 7 , 2' , 3' , 4'-heptahydroxyflavone [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences ,Part A ,1988 ,53: 635-637.
- [9] Daskiewicz J B ,Bayet C ,Barron D. Regioselective syntheses of 6-(1 ,1-dimethylallyl) -and 8-(3 ,3-dimethylallyl) chrysin [J]. Tetrahedron 2002 ,58(18) : 3589-3595.
- [10] Gobbi S ,Cavalli A ,Rampa A ,et al. Lead optimization providing a series of flavone derivatives as potent nonsteroidal inhibitors of the cytochrome P450 aromatase enzyme [J]. Journal of Medicinal Chemistry ,2006 ,49 (15) : 4777-4780.
- [11] Kuksa V ,Buchan R ,Lin P K T. Synthesis of polyamines , their derivatives ,analogues and conjugates [J]. Synthesis , 2000(9) : 1189-1207.
- [12] Long E C ,Barton J K. On demonstrating DNA intercalation [J]. Accounts of Chemical Research ,1990 ,23(9) : 271-273.
- [13] 蔡志强 韩金多 李亮 ,等. 茶多酚与 DNA 相互作用的初步探讨 [J]. 江苏石油化工学院学报 ,2002 ,14(3) : 25-27.
- [14] Satyanarayana S ,Dabrowiak J C ,Chaires J B. Tris (phenanthroline) ruthenium (II) enantiomer interactions with DNA: mode and specificity of binding [J]. Biochemistry ,1993 ,32(10) : 2573-2584.
- [15] Kashanian S ,Askari S ,Ahmadi F ,et al. In vitro study of DNA interaction with clodinafop-propargyl herbicide [J]. DNA and Cell Biology 2008 ,27(10) : 581-586.
- [16] Nafisi S ,Bonsaii M ,Maali P ,et al. β -Carboline alkaloids bind DNA [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 2010 ,100(2) : 84-91.
- [17] Tyagi G ,Charak S ,Mehrotra R. Binding of an indole alkaloid ,vinblastine to double stranded DNA: a spectroscopic insight in to nature and strength of interaction [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology ,2012 ,108 (1) : 45-82.

Spectroscopic Studies on the Interaction between PBBHAMF and Calf Thymus DNA

WANG Rui-ling ,XU Li-fan ,DENG Cheng-yu ,HUANG Xiao-yan ,HUANG Zhen-zhong*

(College of Chemistry and Chemical Engineering ,Jiangxi Normal University ,Nanchang Jiangxi 330022 ,China)

Abstract: The interaction between 4'-phenyl-3-bromo-8-[*N* , *N*-bis (2-hydroxyethyl) aminomethyl] flavone (PBBHAMF) and calf thymus DNA(ct-DNA) has been studied. PBBHAMF could quench the fluorescence of the AO-DNA complex with the use of acridine orange(AO) as a fluorescent probe ,the quenching mechanism is mainly a static quenching procedure. When bound to DNA ,PBBHAMF shows hypochromism in absorption spectra ,that means intercalation of PBBHAMF into DNA. Moreover ,the increase in relative viscosity and the CD spectral change in 274 nm also support that the major binding mode is an inserting interaction. The FT-IR spectroscopy demonstrates that electrostatic attraction exists between PBBHAMF and DNA simultaneously.

Key words: 4'-phenyl-3-bromo-8-[*N* , *N*-bis(2-hydroxyethyl) aminomethyl] flavone; calf thymus DNA; fluorescence spectroscopy; circular dichroism spectroscopy; FT-IR

(责任编辑: 刘显亮)