

Tween-80 胶束对茛菪醌类光敏剂基态和激发态的保护作用

刘卫¹, 张红雨^{2,3}, 陈兴荣⁴, 周志祥⁵, 张志义⁵

(1. 蒙自师专高等专科学校, 云南 蒙自 661100; 2. 山东理工大学, 山东省生物信息工程技术研究中心计算生物学实验室, 山东 淄博 255091; 3. 山东师范大学生物系, 济南 250014; 4. 大理医学院药理学系, 云南 大理 671000; 5. 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要:用 Tween-80 非离子型胶束增溶竹红菌甲素、乙素(HA, HB)及金丝桃萹酮(HYP)等茛菪醌类光敏剂,发现该胶束对 HA 的基态和激发态都有保护作用。相对于含水有机体系,HA 在胶束中基态的 pKa 值升高,荧光量子产率增大,光敏反应产生的活性中间体 1O_2 和 $\cdot OH$ 的产额增加,从而提高了其光敏活性,这在光敏损伤作用中具有重要的生物学意义。实验还发现, Tween-80 胶束对 HB 及 HYP 的保护作用与 HA 类似,而且保护作用与茛菪醌的结构有关,这对筛选光敏剂作为光疗药物具有指导作用。

关键词: Tween-80 胶束; 茛菪醌类光敏剂; 竹红菌素; 金丝桃萹酮; 光敏作用; 保护作用

中图分类号: Q632 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2001)04-0761-06

茛菪醌类光敏剂,包括竹红菌甲素(Hypocrellin A, HA)、乙素(Hypocrellin B, HB)及金丝桃萹酮(Hypericin, HYP)等,近年来被广泛研究^[1-3]。它们不但有优良的光敏性质,如: 1O_2 量子产率高^[4]、可产生损伤力极强的 $\cdot OH$ ^[5-7],及在缺氧环境中可产生负离子自由基进行损伤等等^[8],而且易纯化、不聚集、代谢快、副作用小,现已有许多治疗皮肤病的临床报道。近来又发现它们在光照条件下可有效地抑制 HIV 病毒^[9],这些都表明 HA、HB 及 HYP 是潜在的性能优良的光动力治疗药物。

以往的研究大都在均相体系中进行,而由于 HA、HB 及 HYP 的亲脂性,它们倾向于定位在细胞的各种膜系统中进行光敏损伤^[1],因此在均相体系中所获数据应用于生物非均相体系,势必受到一定限制。本文用增溶效果好,受溶液中离子影响小,在医药及食品行业广泛使用的非离子表面活性剂 Tween-80 增溶 HA、HB 及 HYP,制成它们的胶束溶液,研究了它们在非均相体系中的光物理、光化学性质,这对揭示它们在细胞中的光敏作用机制及筛选光疗药物有重要意义。

1 实验部分

1.1 试剂

HA 由云南省微生物研究所赠送,纯度 98%; HB 由中国科学院理化技术研究所提供,纯度 98%; HYP 由第五振军先生赠送,纯度 99%; 2,2,6,6-四甲基哌啶酮(TEMP), 5,5-二甲基-1-吡啶啉-N-氧基(DMPO)均为 Aldrich 公司产品。其余均为国产分析纯试剂。

收稿日期: 2001-02-19

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(39830090)

作者简介: 刘卫,副教授,硕士,电话:(0873)3642686, E-mail: 4728Liuwei@21cn.com

通讯作者: 张红雨,1970年牛,博士,教授,电话: 0533-2780271, E-mail: zhysdu@jn-public.sd.cninfo.net.

1.2 胶束溶液的配制

胶束样品按文献[10]的方法配制,胶束溶液的居占度(Q)定义为光敏剂浓度与胶束浓度的比值。中性胶束体系中 HA、HB 及 HYP 的吸收光谱经测定与有机溶剂中的相似。

1.3 pKa 的测定

用文献[11]的方法,在计算机上对实验数据进行曲线拟合求得 pK_{a1} 、 pK_{a2} 。所用缓冲溶液, pH7.0~pH8.0: 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液; pH8.2~pH10.0: 硼酸-氯化钾-氢氧化钠缓冲液, pH10.2~pH13.0: 甘氨酸-氯化钠-氢氧化钠缓冲液。实验中缓冲液与样品按 4:1 体积比混合。

1.4 1O_2 和 $\cdot OH$ 的测定

1O_2 的测定用 Lion 的方法^[12],即用 ESR 检测 TEMP 捕捉 1O_2 形成的 TEMPO 自由基信号,并通过比较相同条件下不同光敏剂 TEMPO 信号的大小,确定其产生 1O_2 能力的高低。用 DMPO 捕捉 $\cdot OH$ ^[13],测定其自旋加合物 [DMPO-OH]· ESR 信号的方法检测产生的 $\cdot OH$,并通过比较 ESR 信号的大小,确定光敏剂产生 $\cdot OH$ 能力的高低。

1.5 仪器测试条件

吸收光谱用日立 U-3200 紫外、可见分光光度计测定。荧光光谱的测定在日立-F4500 型荧光分光光度计上进行。狭缝宽度 $E_x = 5nm$, $E_m = 5nm$,用各光敏剂最大吸收处的波长作为激发光的波长。

ESR 测定在 Varian E-109 谱仪(X波段,调制频率 100kHz)上进行,中心磁场 0.325 T,调制幅度 1.0×10^{-4} T,微波功率 5mW,时间常数 0.128s。测定温度 $20 \pm 1^\circ C$,记录一次微分谱。光照用 1kW 卤钨灯作光源,用特制装置滤去红外线和紫外线,只用可见光照射,辐照度 $300W/m^2$,用国产 BTY-820 型光辐射仪测定。

2 结果与讨论

2.1 胶束对 HA 基态的保护作用

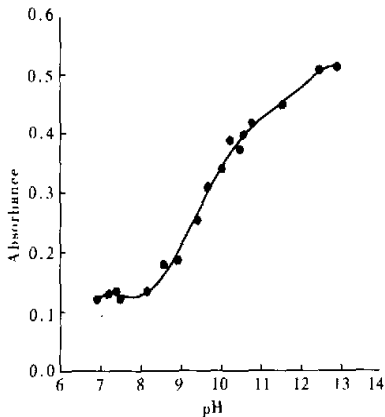


Fig.1 Absorbance of HA (640nm) as a function of pH in Tween-80 micellar system

固定 HA 的浓度 ($30 \mu mol/L$),改变 Tween-80 胶束体系的 pH 值,则 640nm 处吸收值的变化如图 1 所示。经曲线拟合求出在 Tween-80 胶束体系中 $pK_{a1} = 9.47$, $pK_{a2} = 11.73$,该值显著大于 HA 在均相体系中的 pK_a 值 ($pK_{a1} = 8.22$, $pK_{a2} = 11.00$)^[14]。这可能源于胶束对 HA 分子有一定隔离作用,使得水相中的羟基负离子不易与 HA 的酚羟基接触而使其解离,也即胶束对基态 HA 有一定的保护作用。由此可推测,在细胞的非均相环境中,由于 pK_a 值升高,HA 形成负离子的能力降低,这可以减低其自氧化的速率,提高其光敏活性。

2.2 胶束对花靛光敏剂激发态的保护作用

2.2.1 胶束对单重激发态的保护作用

由于水对竹红菌素激发态有很强的猝灭作用^[10],因此当溶剂中含大量水时(DMF与H₂O,体积比1:9),HA和HB的荧光量子效率显著下降(降低80%左右),但胶束非均相体系中的HA、HB荧光量子效率明显高于含水均相体系[图2(a)、(b)].这是由于胶束可减少HA、HB分子与水分子的接触,因而可以保护一部分HA、HB分子的激发态,故使其荧光量子效率明显高于含水均相体系,所以胶束对HA、HB的单重激发态也有保护作用.同时从图2(a)、(b)还可看出胶束体系HA、HB的荧光量子效率仍低于DMF有机体系,说明胶束中一部分HA、HB仍有机会与水分子接触,使其一部分激发态被猝灭掉.Tween-80胶束对HYP单重态的保护作用类似于HA、HB,但保护作用较小,原因是HYP中含较多的酚羟基,倾向于定位在胶束囊泡中靠近水的一侧,故比HA、HB受水的影响大.若以胶束溶液中光敏剂的荧光强度与DMF中荧光强度的比值衡量胶束对激发态的保护作用,则胶束对三种光敏剂单重激发态的保护作用为HA(86%)>HB(81%)>HYP(74%).这种差别的原因在于卟啉侧环结构及环上酚羟基的数目影响到敏化剂在胶束囊泡中的定位,从而使胶束对不同结构敏化剂的保护作用不同.

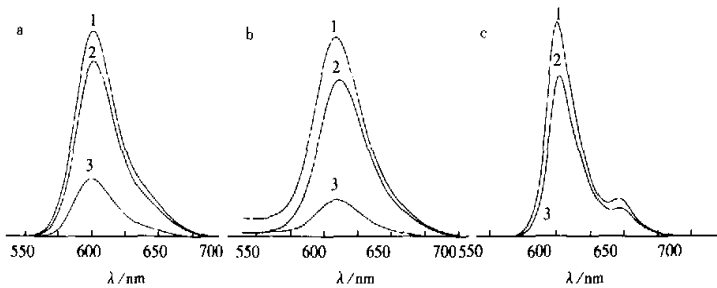


Fig. 2 Fluorescencespectrum of HA, HB and HYP in different systems. (a) HA (1.26×10^{-5} mol/L): 1. DMF; 2. Tween-80 micelle; 3. DMF-H₂O (1:9 v/v). (b) HB (1.26×10^{-5} mol/L): 1. DMF; 2. Tween-80 micelle; 3. DMF-H₂O (1:9 v/v). (c) HYP (1.26×10^{-5} mol/L): 1. DMF; 2. Tween-80 micelle; 3. DMF-H₂O (1:9 v/v)

由于光敏剂的三重激发态由单重激发态经系间窜跃产生,因此水对HA、HB及HYP单重激发态的猝灭作用会使三种光敏剂三重激发态的产额降低,进而可能导致它们在含大量水的活细胞中进行光敏损伤时,其活性显著下降.但本文的实验表明胶束对HA、HB及HYP的单重激发态有明显的保护作用,因此可以推测当HA、HB及HYP定位于各种膜系统进行光敏损伤时,膜将起到与胶束相似的保护作用,从而使三种光敏剂仍保持相当高的光敏活性.

2.2.2 胶束对¹O₂相对产率的影响

在DMF-水(体积比为1:9)的均相体系中,光照含TEMP和光敏剂(0.12mmol/L)的实验样品,可检测到一个三重分裂的ESR信号,其 a_N (1.602×10^{-3} T), g (2.00539)与商品TEMPO的 a_N (1.603×10^{-3} T), g (2.00536)一致,说明溶液中有TEMPO生成.在不光照条件下,则无ESR信号产生,这证明光照HA、HB及HYP均产生了¹O₂.

由图3.4可看出,随光照时间延长,TEMPO的ESR信号逐渐增大.由于TEMPO信号强度与其浓度基本成正比,本文用光照一定时间(7min)后体系TEMPO信号的大小作为光敏剂产生

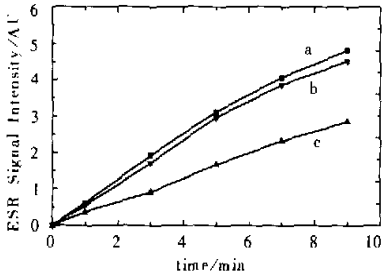


Fig.3 TEMPO ESR signal intensity as a function of irradiation time in Tween - 80 micellar system. a. HA (1.26×10^{-4} mol/L), $Q = 1$; b. HB (1.26×10^{-4} mol/L), $Q = 1$; c. HYP (1.26×10^{-4} mol/L), $Q = 1$

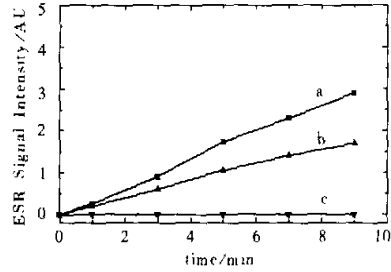


Fig.4 TEMPO ESR signal intensity as a function of irradiation time in DMF - H₂O system (1:9 v/v). a. HA (1.26×10^{-4} mol/L); b. HB (1.26×10^{-4} mol/L); c. HYP (1.26×10^{-4} mol/L)

$^1\text{O}_2$ 的相对产率。若以 Tween - 80 胶束体系中 HA 为 1, 则胶束体系中 HB 为 0.95, HYP 为 0.57, 而 DMF - 水 (体积比 1:9) 均相体系中 HA 为 0.57, HB 为 0.40, HYP 为 0, 表明非均相胶束体系产生 $^1\text{O}_2$ 的作用明显强于水均相体系, 且在两种体系中产生 $^1\text{O}_2$ 的作用均是 HA > HB > HYP, 这与以往文献报道的均相有机体系中的结果相似^[5,15]。这说明与胶束对 HA、HB、HYP 单重激发态的保护作用相应, 胶束使它们产生 $^1\text{O}_2$ 的作用增强, 且增强的程度也与胶束对它们单重态的保护作用一样, 受花酰侧环的结构及酚羟基数目的影响。

2.2.3 胶束对 $\cdot\text{OH}$ 相对产率的影响

由于本文研究的胶束体系和水均相体系都有大量水存在, O_2^- 易发生歧化反应生成 H_2O_2 ,

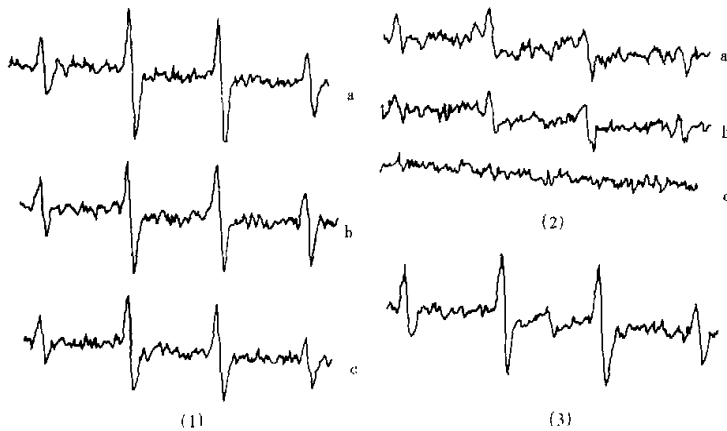


Fig.5 ESR signal of $\cdot\text{OH}$ trapped by DMPO in different systems. (1) Tween - 80 micelle, a. HA (1.26×10^{-4} mol/L), $Q = 1$; b. HB (1.26×10^{-4} mol/L), $Q = 1$; c. HYP (1.26×10^{-4} mol/L), $Q = 1$. (2) DMF - H₂O (1:9 v/v) a. HA (1.26×10^{-4} mol/L); b. HB (1.26×10^{-4} mol/L); c. HYP (1.26×10^{-4} mol/L). (3) H₂O₂ (1%), Fe²⁺ (0.25mmol/L), DMPO (0.1mol/L)

故本实验用 DMPO 未捕捉到光敏剂经电子转移产生的 O_2^- , 但由 O_2^- 经 Fenton 反应产生的损伤力极强的 $\cdot OH$ 却很容易被 DMPO 捕捉到, 因此本文用 $\cdot OH$ 产率间接表示卟吩类光敏剂激发态经电子传递产生自由基的能力。

图 5 示出在一定时间 (1 min) 内, DMPO 捕捉 $\cdot OH$ 后产生的 ESR 信号, 其 ESR 参数 ($\alpha = \alpha_H^2 = 1.49 \times 10^{-3} T$, $g = 2.0054$) 与用 DMPO 捕捉 H_2O_2 经 Fenton 反应产生的 $\cdot OH$ 而生成的 [DMPO-OH] \cdot 的 ESR 参数 ($\alpha = \alpha_H^3 = 1.50 \times 10^{-3} T$, $g = 2.0054$) 一致, 证实样品中确有 $\cdot OH$ 产生。

如以 ESR 信号的第二条峰的高度表征 HA、HB、HYP 产生 $\cdot OH$ 的相对产率, 且以胶束体系中 HA 为 1.0, 则在 Tween-80 胶束体系中 HB 为 0.96、HYP 为 0.86, 而在水均相体系中 HA 为 0.42、HB 为 0.26、HYP 为 0。可见三种光敏剂产生 $\cdot OH$ 的作用也是非均相体系强于水均相体系, 且 $HA > HB > HYP$, 与胶束对单重态的保护作用及对产生 1O_2 的增强作用一致。

由以上结果可以看出, Tween-80 胶束对卟吩类光敏剂的激发态有明显的保护作用, 卟吩类光敏剂的侧环及环上酚羟基的数目对其在胶束囊泡中的定位有一定影响, 导致胶束对其激发态保护作用的不同。

3 结 论

竹红菌素在生物体系进行光动力作用时, 与胶束结构类似的细胞膜将保护其基态和激发态, 大大增加最具生物学意义的 1O_2 和 $\cdot OH$ 的产率, 这都会显著提高光敏效果。另外, 在非均相体系中, 侧环影响卟吩类光敏剂的定位能力, 从而间接影响其光敏活性。因此在阐述光敏剂对生物体的光动力作用机制时, 必须考虑非均相体系对基态和激发态的保护作用; 此外在筛选作为光敏药物使用的光敏剂时, 由于其在生物体内的非均相环境中产生作用, 筛选过程还要考虑其在非均相环境中的定位能力。

参考文献:

- [1] Diwu Z, Lawn JW. Hypocrellins and their uses in photosensitization[J]. *Photochem Photobiol*, 1990, 52: 609-616
- [2] Diwu Z. Novel therapeutic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins[J]. *Photochem Photobiol*, 1995, 61: 529-539.
- [3] 张红雨, 张志义. 卟吩衍生物光敏作用的构效关系及其应用前景[J]. *自由基生命科学进展*, 1999, 7: 41-47.
- [4] Diwu Z, Lawn JW. Photosensitization by anticancer agents. 12. Perylenequinonoid pigments, a novel type of singlet oxygen sensitizer[J]. *J Photochem Photobiol A: Chem*, 1992, 64: 273-287.
- [5] Wang Y, Zhang Z. Relationship between photosensitizing activities and chemical structure of hypocrellin A and B[J]. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 1992, 14: 207-217.
- [6] 张红雨, 张志义, 王大辉, 等. 在胶束非均相体系中竹红菌乙素光敏作用特征的 ESR 研究 [J]. *生物物理学报*, 1996, 12: 345-349.
- [7] 张红雨, 张志义, 力谦, 等. 溴代对竹红菌乙素光敏活性的影响[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 1997, 15: 75-79.
- [8] 赵红霞, 张红雨, 张志义, 等. 金丝桃酮与竹红菌甲素光敏作用及暗反应特征的比较 [J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 1997, 15: 149-154.
- [9] Hudson J B, Zhou J, Chen J, et al. Hypocrellin, from *Hypocrella bambuse*, is phototoxic to human immunodeficiency virus[J]. *Photochem Photobiol*, 1994, 60: 253-255.
- [10] 何景珠, 蒋险峰, 王尊元. 在胶束中竹红菌甲素的光物理特性[J]. *感光科学与光化学*, 1992, 10: 193-199.

- [11] 胡义镇, 安静仪, 蒋丽金. 水溶性竹红菌素及电子转移中间体的光谱研究[J]. 中国科学(B辑), 1993, 23: 449 - 457.
- [12] Lon Y, Delmelle M, Van de Vorst A, et al. New method of detecting singlet oxygen production[J]. *Nature*, 1976, 263: 442 - 443.
- [13] Harbour JR, Hair MJ. Detection of superoxide ions in nonaqueous media. Generation by photolysis of pigment dispersions[J]. *J Phys Chem*, 1987, 82: 1397 - 1399.
- [14] 张红雨, 张志义. 花脞类光敏剂激发态 pKa 值的测定[J]. 科学通报, 1997, 42: 1428 - 1431.
- [15] 张红雨, 赵红霞, 张志义. 用 ESR 方法研究光敏作用的动态过程[J]. 中国科学(C辑), 1997, 27: 398 - 403.

PROTECTIVE EFFECT OF TWEEN - 80 MICELLE ON GROUND AND EXCITED STATES OF PERYLENEQUINONOID PHOTOSENSITIZERS

LIU Wei¹, ZHANG Hong - yu^{2,3}, CHEN Xing - rong⁴, ZHOU Zhi - xiang⁵, ZHANG Zhi - yi¹

(1. Mengzi Teachers' Institute, Yunnan Mengzi 661100, China; 2. Laboratory for Computational Biology, Shandong Provincial Research Center for Bioinformatic Engineering and Technique, Shandong University of Technology, Zibo 255091, China; 3. Department of Biology, Shandong Teachers' University, Jinan 250014, China; 4. Department of Medicine, Dali Medical School, Dali 671000, China; 5. Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: In this work, hypocrellins A and B (HA, HB), and hypericin (HYP) were dispersed in Tween - 80 micelle. It was found that the micelle had protective effect on ground state and excited state of HA. Compared with HA in water - contained organic solvents, the pigment in micelle had higher pKa value and higher fluorescence quantum yield. Moreover, the quantum yield of active species produced from photosensitization, 1O_2 and $\cdot OH$, increased as well. As a result, the photosensitivity of HA was enhanced. The protective effect of Tween - 80 micelle on HB and HYP was similar to that on HA, and the protective effect was related to the molecular structures of perylenequinonoid photosensitizers. This provided information for screening better photosensitizers for photodynamical therapy.

Key Words: Tween - 80 micelle; Perylenequinonoid photosensitizers; Hypocrellins; Hypericin; Photosensitization; Protective effect