

## 圆二色谱研究 VP-16 在溶液中的 构型构象变化及与 DNA 的作用\*

田 瞳 杨明桂 陈能煜\*\*

(兰州大学应用有机化学国家重点实验室 兰州 730000)

**摘 要** 本文测定了抗癌药物 VP-16 及其在体内的代谢产物苦 VP-16, 苦 VP-16 羧基的第一偶合圆二色谱。研究了在不同 pH 条件下 VP-16 在溶液中的异构化和水解现象。通过圆二色谱的改变讨论了不同浓度的药物 VP-16 对小牛胸腺 DNA 的作用。

**关键词** 圆二色谱 VP-16 DNA

二级学科 有机化学 中图法分类号 0621

VP-16, Etoposide 1, 是以鬼臼毒 (podophylotoxin) 为母体合成的抗癌药物, 目前已广泛用于临床。VP-16 在体内可异构化为具顺式内酯环的苦 VP-16, 2. 并进一步开环形成顺式取代的苦 VP-16 羧基, 3; 而化合物 2 和 3 失去了抗癌活性<sup>[1]</sup>。因此, 研究 VP-16 内酯环的构型及分子在溶液中构象的变化对于预测其代谢过程及抗癌活性有重要的意义。圆二色谱是研究药物及生物大分子在溶液中构型和构象变化的重要手段。我们测定了在 37℃ 不同 pH 条件下 VP-16 在溶液中的圆二色谱, 同时也测定了 VP-16 及其代谢产物苦 VP-16 和苦 VP-16 羧基的圆二色谱, 经过对圆二色谱中第一偶合两个分枝大小的比较, 可以看出, 当 pH ≤ 8 时, VP-16 是以反式内酯环的稳定构型存在。当 pH 在 8~10 时, 则发生了反式内酯环向顺式内酯环的构型转变, 而当 pH > 10 时, 则主要以顺式内酯环和顺式开环的羧基形式存在。VP-16 属于作用于细胞 DNA 类的抗癌药物, 我们测定了不同浓度的 VP-16 与小牛胸腺 DNA 作用的圆二色谱, 从图谱中可以看出, 在药物处于低浓度时 (10 μg/ml ~ 30 μg/ml), VP-16 可导致 DNA 双螺旋的部分裂解, 而当药物处于较高浓度时, 则引起 DNA 的变性和结构破坏, 这可能是由于 VP-16 的酚羟基与 DNA 碱基作用的结果。

### 原料与方法

VP-16, 1. 是我们以甘肃所产桃儿七中提取的鬼臼毒为原料合成的。m. p. 246℃ ~ 250℃, 苦 VP-16, 2. 苦 VP-16 羧基 3 是按文献 [1] 合成, 2 的熔点 m. p. 210℃ ~ 212℃; 3 的熔点 m. p. 182℃ ~ 184℃, 与文献 [1] 报道一致。

小牛胸腺 DNA 为上海生化所产品, 用二次蒸馏水配制含 5 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 的缓冲溶液, 用此缓冲溶液配制 100 μg/ml 的 DNA 溶液, 取 5 ml 该浓度的 DNA 溶液加入等体积不同浓度的 VP-16 药液, 于 37℃ 避光放置 24h, 然后进行 CD 谱测定。

圆二色谱用日本 JASCO-20C 型圆二色仪, 在 20℃ 下测定, 样品池为 0.2 cm 厚度, 对于 VP-16 及其苦 VP-16, 苦 VP-16 羧基, VP-16 随溶液 pH 值变化的 CD 谱, 测得的数值以 Δε (L. mol<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>) 表示, 对于 VP-16 分子与小牛胸腺 DNA 的作用, 由于药物分子本身也有圆二色性, 本实验用微机自动减去药物分子的 CD 谱, 直接得到药物作用后的 DNA 的 CD 谱。

VP-16 随着温度和 pH 值变化是用 0.1 mol. dm<sup>-3</sup> 的 HCl 和 0.1 mol. dm<sup>-3</sup> NaOH 来进行调节, 在 37℃ 下恒温 24h 后进行测定的, 如图 1。

\* 甘肃省自然科学基金 ZR97-099 号资助

\*\* 通讯联系人

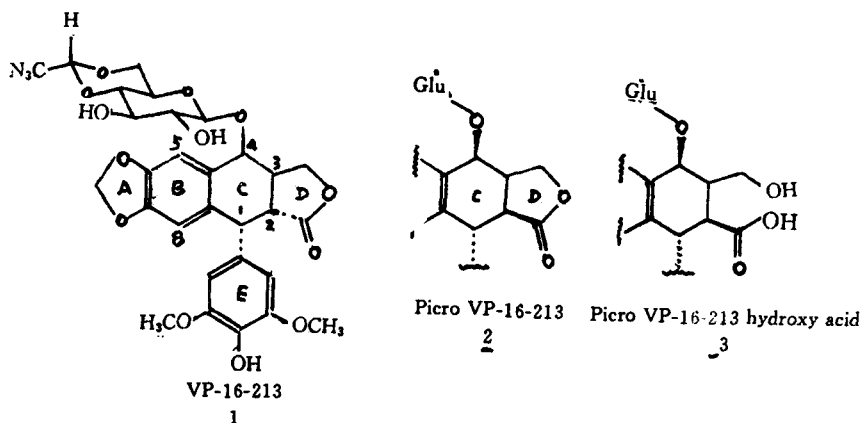


图1 VP-16、苦 VP-16 和苦 VP-16 羟基酸 3 的结构

## 结果与讨论

### 1. VP-16 及其代谢产物苦 VP-16, 苦 VP-16 羟基酸的圆二色谱

Strife 指出<sup>[1]</sup>: VP-16, 1 极容易代谢成其内

酯环异构化产物苦 VP-16, 2 并进一步使内酯环打开生成苦 VP-16 羟基酸 3, 其变化情况依据溶液 pH 条件不同而改变, 如图 2, 3, 4 所示。

我们测定了 VP-16, 1, 苦 VP-16, 2 和苦 VP-16 羟基酸 3 的圆二色谱中第一偶合谱带 (250~350nm), 其图谱及数据如图 3 及表 1 所示。

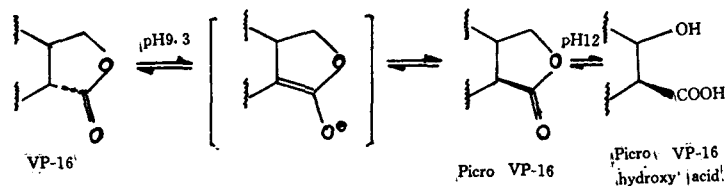


图2 VP 16 在溶液中的转化

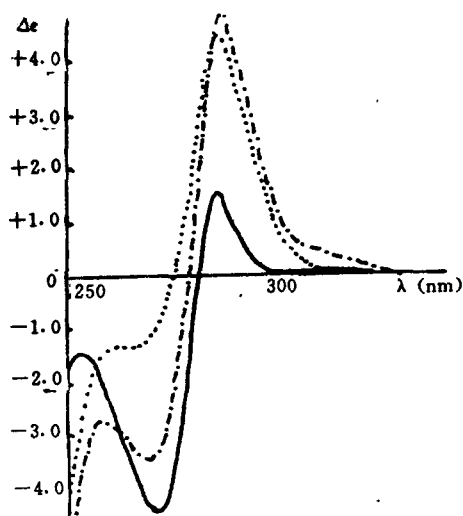


图3 化合物 1. 2. 3 的第一偶合 CD 谱

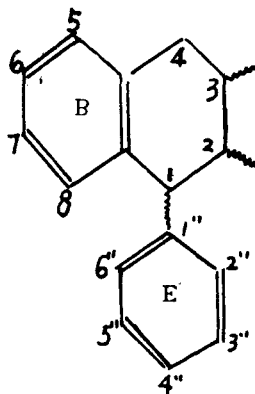


图4 芳基四氢喹类化合物的结构

表1 化合物1, 2, 3, 的第一偶合圆二色谱及在C<sub>2</sub>处相应的构型

化合物	第一分枝	第二分枝	$\Delta\epsilon_1$  与  $\Delta\epsilon_2$   绝对值大小比较	$\frac{\Delta\epsilon_2}{\Delta\epsilon_1}$	C <sub>2</sub> 处构型
	$\Delta\epsilon_1$ ( $\lambda^{\max}_{\text{nm}}$ )	$\Delta\epsilon_2$ ( $\lambda^{\max}_{\text{nm}}$ )			
1	+1.59 (286)	-4.74 (271)	$\Delta\epsilon_1$   <   $\Delta\epsilon_2$	0.36	$\alpha$
2	+4.55 (286)	-1.36 (266)	$\Delta\epsilon_1$   >   $\Delta\epsilon_2$	3.35	$\beta$
3	+4.49 (287)	-3.48 (270)	$\Delta\epsilon_1$   >   $\Delta\epsilon_2$	1.41	$\beta$

从表1及图3中看出,对于VP-16,第一偶合谱中第一分枝 $\Delta\epsilon_1$ 的绝对值小于第二分枝 $\Delta\epsilon_2$ 的绝对值;对于苦VP-16和苦VP-16羧基,则第一分枝 $\Delta\epsilon_1$ 的绝对值大于第二分枝的 $\Delta\epsilon_2$ 的绝对值。Hulbert分析了芳基四氢萘类化合物的圆二色谱与其结构之间的关系后指出<sup>[2]</sup>:(1)在280nm处第一偶合的符号反映了芳基取代环在C<sub>1</sub>处的绝对构型,即芳基取代E环处于1 $\beta$ 位时负的第一偶合,芳基取代基E环处于1 $\alpha$ 位为正的第一偶合。(2)在280nm处第一偶合两个分枝 $\Delta\epsilon$ 绝对值的大小反映了C<sub>2</sub>原子的绝对构型及C<sub>1</sub>位取代苯环的构象,当第一分枝 $\Delta\epsilon_1$ 的绝对值大于第二分枝 $\Delta\epsilon_2$ 的绝对值时,C<sub>2</sub>上的取代基为 $\beta$ 构型,C<sub>1</sub>位的苯环处于准e键,而当第一分枝 $\Delta\epsilon_2$ 绝对值小于第二分枝 $\Delta\epsilon_2$ 的绝对值时,C<sub>2</sub>上的取代基为 $\alpha$ 构型,C<sub>1</sub>位的苯环处于准a键。

根据Hulbert的规则及化合物1、2、3、的第一

偶合圆二色谱,可以看出:对于VP-16,第一分枝 $\Delta\epsilon_1$ 的绝对值小于第二分枝 $\Delta\epsilon_2$ 的绝对值,C<sub>2</sub>上取代基处于 $\alpha$ 构型,C<sub>1</sub>位苯环E处于准a键构象,这是VP-16保持抗癌活性所必需的。对于苦VP-16和苦VP-16羧基,第一分枝 $\Delta\epsilon_1$ 绝对值大于第二分枝 $\Delta\epsilon_2$ 的绝对值,C<sub>2</sub>上取代基处于 $\beta$ 构型C<sub>1</sub>位苯环E处于准e键构象,这时苦VP-16与苦VP-16羧基均失去抗癌活性。从苦VP-16与苦VP-16羧基第一偶合两个分枝绝对值大小的比值中可以看出,苦VP-16的比值远大于苦VP-16羧基的比值,这是由于苦VP-16羧基的内酯环打开,从而使C-2位羧基有较大的旋转空间,C<sub>1</sub>位苯环E由准e键向准a键过渡。

## 2. pH值对VP-16在溶液中构象的影响

我们测定了VP-16在37℃不同pH值的第一偶合CD谱,其结果见表2,图5。

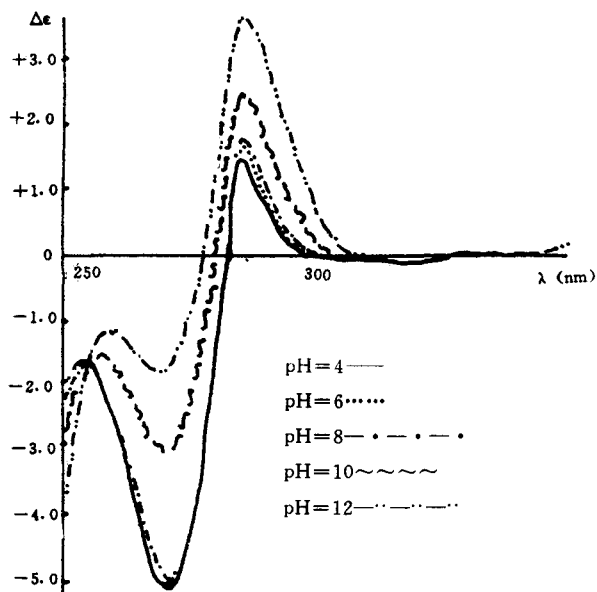


图5 VP-16在37℃时不同pH时的第一偶合CD谱

表2 VP-16在37℃时不同pH值第一偶合CD谱及C<sub>2</sub>内酯环的主要构型

pH值	第一分枝	第二分枝	$\Delta\epsilon_1$  与  $\Delta\epsilon_2$   绝对值大小比较	$\frac{\Delta\epsilon_2}{\Delta\epsilon_1}$	C <sub>2</sub> 内酯环 处主要构型
	$\Delta\epsilon_1$ ( $\lambda^{\max}_{\text{nm}}$ )	$\Delta\epsilon_2$ ( $\lambda^{\max}_{\text{nm}}$ )			
4	+1.52 (286)	-5.08 (271)	$\Delta\epsilon_1$   <   $\Delta\epsilon_2$	0.30	$\alpha$
6	+1.67 (286)	-5.08 (272)	$\Delta\epsilon_1$   <   $\Delta\epsilon_2$	0.33	$\alpha$
8	+1.89 (286)	-4.85 (271)	$\Delta\epsilon_1$   <   $\Delta\epsilon_2$	0.40	$\alpha$
10	+2.62 (286)	-3.03 (270)	$\Delta\epsilon_1$   <   $\Delta\epsilon_2$	2.86	$\alpha/\beta$
12	+3.64 (286)	-1.78 (270)	$\Delta\epsilon_1$   >   $\Delta\epsilon_2$	2.04	$\beta$

由图 5 中可看出,在 37℃,随着 pH 值逐渐增大,第一偶合 CD 谱中第一分枝  $|\Delta\epsilon_1|$  逐渐增大而第二分枝  $|\Delta\epsilon_2|$  逐渐减小,  $|\frac{\Delta\epsilon_1}{\Delta\epsilon_2}|$  比值逐渐增加,当 pH 在 4~8 之间时,  $|\frac{\Delta\epsilon_1}{\Delta\epsilon_2}| < 0.50$ , 这时 C<sub>2</sub> 位取代内酯环以稳定的  $\alpha$  构型存在, C<sub>1</sub> 位 E 环以稳定的准 a 键构象存在, VP-16 保持着抗癌活性, 如图 5 中 pH=4、6、8 曲线所示。当 pH=10 时,  $0.5 < |\frac{\Delta\epsilon_1}{\Delta\epsilon_2}| < 1.0$  从图 5 中可以看出, 第一分枝  $|\Delta\epsilon_1|$  有明显增大而第二分枝  $|\Delta\epsilon_2|$  有明显减小, 说明 C<sub>2</sub> 位内酯环取代已从  $\alpha$  构型部分转化到  $\beta$  构型, C<sub>1</sub> 位 E 环由准 a 键部分转化到准 e 键, VP-16 开始失去抗癌活性。pH=12 时,  $|\frac{\Delta\epsilon_1}{\Delta\epsilon_2}| > 1$ , 从图 5 中可以看出, 第一分枝  $|\Delta\epsilon_1|$  已超过第二分枝  $|\Delta\epsilon_2|$ , 此时 C<sub>2</sub> 位内酯环取代已完全转化为  $\beta$  构型, 而 C<sub>1</sub> 位苯环 E 环完全转化为 e 键构象, VP-16 转化为苦 VP-16 而失去抗癌活性。以上分析与 Hulbert 等对芳基四氢萘类木脂素圆二色谱第一偶合谱中两分枝大小与取代芳环构象的分析<sup>[2]</sup>是一致的。

### 3. VP-16 与小牛胸腺 DNA 作用的研究

我们测定了不同浓度的 VP-16 与小牛胸腺作用的圆二色谱, 其结果如图 6 所示。

由图 6 可看出, 当 VP-16 加入小牛胸腺 DNA 溶液中时, 可以明显地引起小牛胸腺 DNA 圆二色谱的改变, 当 VP-16 药液浓度为 10~30ug/ml 时, DNA 圆二色谱中 272nm 处正峰明显减小, 而 244nm 的负峰也有所减弱, 当 VP-16 药液浓度增至 50ug/ml~100ug/ml 时, DNA 圆二色谱谱形中振幅的变化已不明显, 而 272nm 处的正峰显著红移至 281nm, 244nm 处的负峰也显

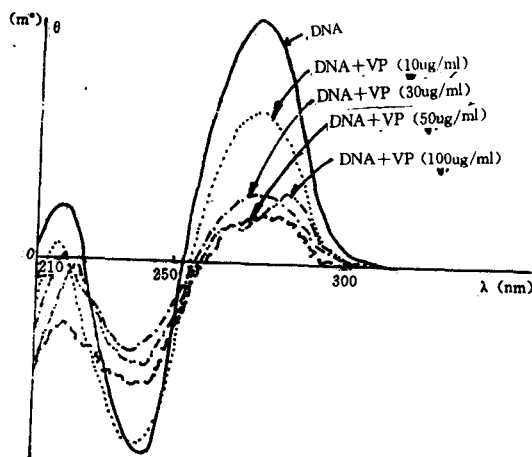


图 6 小牛胸腺 DNA (—) 及 DNA 与 VP-16 的复合物与不同浓度 VP-16 的圆二色谱  
DNA 浓度 50ug/ml; VP-16 浓度 (.....) 10ug/ml;  
(- · - · - ·) 30ug/ml;  
(~ ~ ~) 50ug/ml; (— · — · — ·) 100ug/ml;

著红移至 249nm, 这是 DNA 双链逐步解开而变性的标志<sup>[3]</sup>。VP-16 分子中 A、B、C 的大环系统有可能是插入 DNA 双螺旋中的特有的近似平面结构, 而 E 环中酚羟基及糖环上二级醇羟基有可能与 DNA 分子中碱基形成氢键, VP-16 引起小牛胸腺 DNA 的解旋可能与此有关, 因为这些点已被证明是药物分子作用与 DNA 的关键部位<sup>[4]</sup>。

### 参 考 文 献

1. Strife R. J and Jardine I; J, Chromatography, 1980, 182: 211
2. Hulberl P. B et al, J. CHEM. Res (M) 1981: 401
3. Clarke M. J et al, Inorg, Chim, Acta 1986, 124: 13
4. 韩锐. 肿瘤的化学预防及药物治疗 (第一版) 北京, 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版. 1991: 278, 217

## Studies of Configuration and Conformation of VP-16 in Solution and the action on DNA by Circular Dichroism

Tian Xuan, Yang Minggui, Chen Nengyu

(The National Laboratory of Applied

Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou, 730000)

**Abstract** The first couplet CD spectra of anticancer drug VP-16 and its metabolism products picro VP-16, picro VP-16 hydroxy acid in solution was measured. The epimerization and hydrolysis of VP-16 at different pH values at 37℃ were discussed by CD spectra. The action of VP-16 in different concentration on calf thymus DNA were discussed by CD spectra.

**Key words** Circular Dichroism, VP-16, DNA