

EB 探针研究吩噻嗪类药物与 DNA 的作用

曹 瑛, 李一峻, 高 志, 何锡文*

(南开大学化学系, 天津 300071)

摘要 目的:用光谱探针溴乙锭(EB)研究3种吩噻嗪类药物与DNA的作用。方法与结果:在pH 7.4的溶液中电子吸收光谱与荧光光谱表明,同为精神分裂症治疗药的盐酸氯丙嗪(CPZ)和盐酸三氟拉嗪(TFP)与DNA间存在嵌插作用;有相同功能团的抗组胺药物盐酸异丙嗪(PMZ)与DNA之间为弱的混合作用。结论:一定的离子强度下该嵌插作用会被阻断。

关键词 吩噻嗪类药物; DNA; 溴乙锭探针; 嵌插作用

脱氧核糖核酸(DNA)是生物体内重要的遗传物质。研究小分子物质与DNA的相互作用对以DNA为靶标的药物分子设计有一定意义。目前普遍认为^[1]小分子物质与DNA的非共价键力作用包括静电结合、沟渠结合和嵌插作用3种方式。前两者也可统称非嵌插结合方式。

吩噻嗪类药物是一种治疗精神分裂症或其它心理疾病的药物^[2]。已知吩噻嗪染料亚甲蓝(MB)是一种DNA分子嵌插剂^[3],本文利用溴乙锭(EB)作探针研究了与其有相同功能团的几种吩噻嗪类药物与DNA作用的情况。其中盐酸氯丙嗪(CPZ)和盐酸三氟拉嗪(TFP)用于治疗精神分裂症,盐酸异丙嗪(PMZ)为抗组胺药物。研究表明,虽然3者都有平面吩噻嗪环,但它们与DNA的作用方式不尽相同。此项研究可为该类药物的药理解释及新用途的开发提供信息。

实 验 部 分

1 仪器与试剂

收稿日期:1998-03-09
基金项目:国家自然科学基金(29575200)及国家教委博士点专项基金资助项目(9405518)
*联系人 Tel:(022)23503313, Fax:(022)23502458, E-mail: chemczl@sun.nankai.edu.cn

日本岛津 RF-540 型荧光分光光度计;日本岛津 UV-240 型紫外-可见分光光度计;德国 MY-870 型 pH 计;日本岛津 TB-85 型恒温循环水浴。

CPZ, TFP 和 PMZ 均为临床用药,依据药典方法配置成溶液并定量。小牛胸腺 DNA(ctDNA)购自华美生物工程公司,纯度以 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1.8$ 衡量;浓度由 260 nm 处的吸光度来确定($\epsilon_{260\text{ nm}} = 6600\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$),4℃保存备用^[4]。EB(Sigma 公司)配制成 $1.0 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备溶液,避光保存,使用时稀释成所需浓度。MB 为生物染色剂。实验用缓冲溶液为 Tris-HCl(pH 7.4)。所用水均为 2 次重蒸水。

2 实验方法

取所需浓度的药物 3 ml 于石英比色皿中,滴加 DNA 溶液,混合均匀 2~3 min 后,测定其吸收光谱或荧光光谱。或将所需浓度的 DNA 溶液置于比色皿中,测定滴加药物时的光谱变化。由于每次加入的溶液量远远小于原溶液的量($< 0.3\%$),故可忽略体积效应,认为原溶液的浓度保持不变。

结 果 与 讨 论

1 药物与 DNA 相互作用的紫外-可见吸收光谱

1.1 DNA 对药物吸收光谱的影响

图1为CPZ的电子吸收光谱随DNA浓度增加的变化情况。可以看到,随DNA浓度的增加,CPZ的 $n \rightarrow \pi$ 吸收明显降低,且在306 nm处的最大吸收峰有轻微红移;在约330 nm处形成一等吸收点。由于绝对吸光度变化较小,因此排除CPZ形成新的络合物的可能。据E.C.Long^[5],减色效应、红移

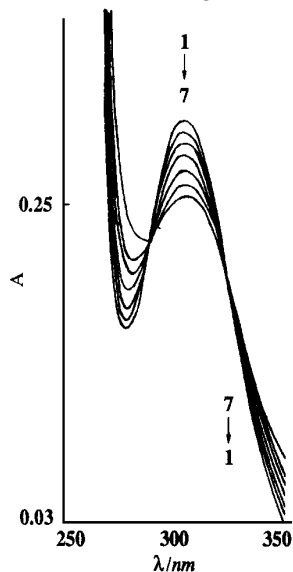


Fig 1 Absorption spectra of CPZ-DNA with DNA as reference. [CPZ] = $7.46 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, [DNA] ($\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) are 0, 8.07, 13.45, 18.83, 24.21, 29.59 and 34.97 for 1 to 7 respectively.

1.2 药物对EB-DNA吸收光谱的影响

当加入DNA后,EB的吸光度降低,最大吸收峰红移,这是EB的平面菲罗啉环嵌插于DNA堆积的碱基对中所致^[6]。当向EB-DNA溶液中加入CPZ后,EB的最大吸收增加,且红移的峰向原位回复(图3)。这说明CPZ的存在破坏了EB与DNA的嵌插作用。

相同情况下,TFP与CPZ类似,但变化程度较小;而PMZ对EB-DNA的吸收光谱影响不大。

从电子吸收光谱的变化可初步判断CPZ与DNA发生了嵌插作用,而TFP和PMZ与DNA的作用尚无法判断。

2 药物与DNA作用的荧光光谱

EB本身仅有很弱的荧光,与DNA作用生色团嵌插入DNA碱基对中后荧光大大增强。该现象可作为研究小分子物质与DNA作用的探针。

CPZ可明显降低EB-DNA的荧光强度(图4A)。可以看出,无论CPZ的浓度是高还是低,对EB-DNA的作用方式是不变的。DNA浓度越高,

现象及等色点的形成是该物质与DNA发生嵌插作用的标志。

同为吩噻嗪类药物的TFP的电子吸收光谱随DNA浓度增加只存在减色效应(图2);而PMZ的电子吸收光谱随DNA浓度的增加几乎不发生变化。

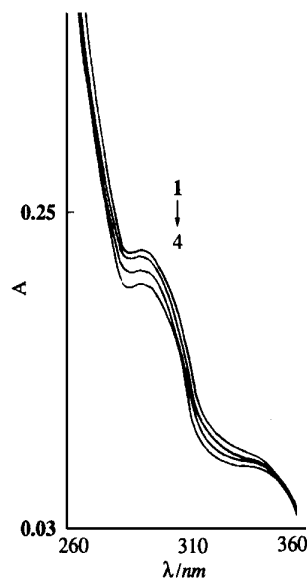


Fig 2 Absorption spectra of TFP-DNA with DNA as reference. [TFP] = $7.40 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, [DNA] ($\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) are 0, 2.69, 8.07 and 13.45 for 1 to 4 respectively.

CPZ对EB-DNA的荧光猝灭效率越低。说明CPZ和EB有相同的DNA作用位点,即CPZ与DNA为嵌插作用。

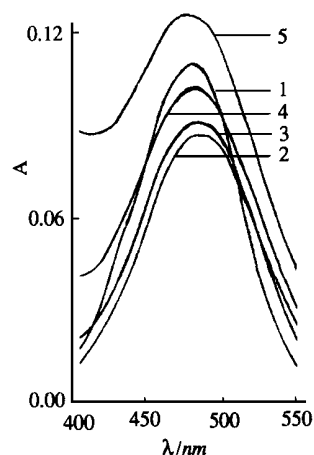


Fig 3 Absorption spectra of EB. 1. In water; 2. In the presence of DNA, [DNA] = $2.73 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3 ~ 5. EB-DNA-CPZ, [CPZ] ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) are 0.17, 0.35 and 0.52 for 3 to 5 respectively.

TFP 和 PMZ 则不同(图 4B,4C)。当药物浓度较低时,对 EB-DNA 的荧光猝灭不明显;而当药物超过一定浓度后,其猝灭效率大大增加。说明低浓度时,药物对 EB-DNA 的作用无很大影响,即此时药物与 DNA 的作用位点与 EB 不同,当属非嵌插

作用。但当药物浓度增加时,其与 DNA 的作用影响了 EB-DNA。这可能有两个原因:(1)药物与 DNA 的非嵌插作用使 DNA 的骨架聚拢,将嵌插于 DNA 的 EB 分子挤出;(2)较高浓度时,药物与 DNA 发生嵌插作用,将 EB 分子置换出来。

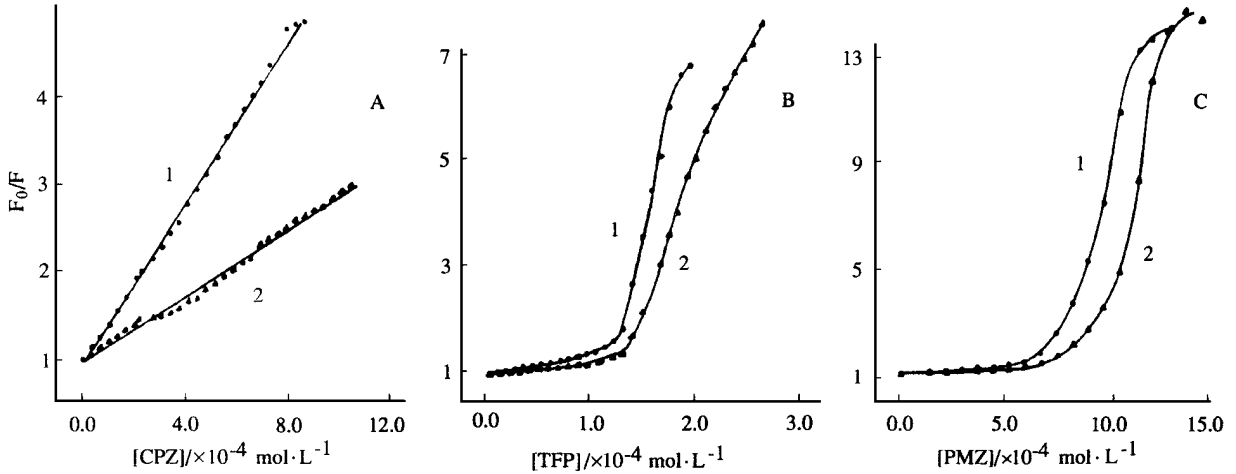


Fig 4 Fluorescence quenching of EB-DNA by phenothiazine drugs ($\lambda_{ex} = 542 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 586 \text{ nm}$). A. CPZ; B. TFP; C. PMZ. $[EB] = 1.00 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 1. $[DNA] = 8.07 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2. $[DNA] = 1.88 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

3 药物与 DNA 作用的 Scatchard 图

EB 还可以指示药物与 DNA 的作用方式^[6]。根据 Scatchard 方程:

$$r/c = K(n - r) \quad (1)$$

式中, r 为平均每个核苷酸已结合的 EB 分子数; c 为未结合的 EB 浓度; K 为结合常数; n 为每个核苷酸能结合的 EB 分子数。以 r/c 对 r 作图, 得一直线。若该直线与 EB 的 Scatchard 图有相同的 n 值, 则该物质与 DNA 的作用为嵌插方式; 若与 EB 的 Scatchard 图有相同的 K 值, 则该物质与 DNA 的作用为非嵌插方式; 若该直线与 EB 的 Scatchard 图的 K 和 n 均不同, 则该物质与 DNA 的作用为混合方式。

由 Scatchard 方程, 得到 EB 与 DNA 的 K 值为 $1.10 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, n 为 4.5, 与文献^[6]数据基本一致。从表 1 可以看出, 存在 CPZ 与 TFP 时的 Scatchard 直线与不存在时有相同的 n 值, 存在 PMZ 时 K, n 值均发生了变化。因此可认为, CPZ 和 TFP 与 DNA 之间存在嵌插作用, PMZ 与 DNA

之间为混合作用。作为比较, 本文同时研究了 MB 与 DNA 之间的作用方式, 所得的 Scatchard 直线与不存在时有相同的 n 值, 这与文献^[6]报道 MB 与 DNA 之间的作用为嵌插方式相一致。根据表 1, 3 种药物与 DNA 结合的强弱依次为 $CPZ > TFP > PMZ$ 。

4 离子强度对药物与 DNA 作用的影响

由于 DNA 骨架荷负电, 因此溶液离子强度由于静电作用对小分子与 DNA 的作用有影响。由表 1 看出, 离子强度 (NaCl) 的增加没有改变 EB-DNA 的作用常数, 说明 Na^+ 与 DNA 的作用不影响 EB 与 DNA 的嵌插作用。CPZ, TFP 存在时情况与之类似, 这也说明了两与 DNA 的嵌插作用方式。但对 PMZ 来说, Na^+ 的增加对它与 DNA 的作用影响很大, K, n 均发生变化, 且 K 值与不存在药物时 EB-DNA 的 K 值相等。说明 PMZ 与 DNA 间静电作用为主。由此进一步证明对前述 3 种药物与 DNA 作用方式的推断, 即 CPZ 和 TFP 与 DNA 之间存在嵌插作用, PMZ 与 DNA 间为混合作用。

Tab 1 Data of Scatchard equation of the interaction between drugs and DNA

Drug	[NaCl]/ mol·L ⁻¹	Scatchard equation	Regression coefficient	K/ L·mol ⁻¹	n
No drugs	0	$y = 2.42 \times 10^5 - 1.10 \times 10^6 x$	- 0.990	1.10×10^6	4.5
	0.05	$y = 2.23 \times 10^5 - 1.19 \times 10^6 x$	- 0.985	1.19×10^6	5.3
CPZ	0	$y = 1.34 \times 10^5 - 5.99 \times 10^5 x$	- 0.995	5.99×10^5	4.5
(R _t = 5.3)	0.05	$y = 1.19 \times 10^5 - 5.84 \times 10^5 x$	- 0.997	5.84×10^5	4.9
TFP	0	$y = 1.90 \times 10^5 - 8.82 \times 10^5 x$	- 0.986	8.82×10^5	4.6
(R _t = 5.3)	0.05	$y = 1.70 \times 10^5 - 8.88 \times 10^5 x$	- 0.989	8.88×10^5	5.2
PMZ	0	$y = 1.93 \times 10^5 - 9.22 \times 10^5 x$	- 0.990	9.22×10^5	4.8
(R _t = 6.7)	0.05	$y = 2.06 \times 10^5 - 1.14 \times 10^6 x$	- 0.991	1.14×10^6	5.5
MB	0	$y = 2.03 \times 10^5 - 9.11 \times 10^5 x$	- 0.981	9.11×10^5	4.5
(R _t = 0.08)					

Note: R_t = [drug]/[DNA].

结 论

光谱研究表明,虽然吩噻嗪类药物与 DNA 存在相互作用,但由于结构的不同药物与 DNA 的作用方式也不同。精神分裂症用药 CPZ 和 TFP 与 DNA 之间存在着嵌插作用,CPZ 与 DNA 的作用强于 TFP。而 PMZ 虽与 CPZ 有相同的功能团,但药理作用与之完全不同。本文研究表明,PMZ 与 DNA 间有弱的相互作用,该作用在一定的离子强度下会被阻断,这可能是由于 PMZ 侧链的异丙基与 DNA 作用的位阻大于 CPZ 的正丙基所致。

参 考 文 献

- 1 陈勇,李元宗,常文保,等. DNA 分子嵌插剂. 分析科学学报, 1994, **10**: 67
- 2 Horn AS. Dopamine receptors. In: Hansch C, ed. *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Oxford: Pergamon Press, 1990. 287
- 3 Beddard GS, Kelly JM, van der Putten WJM. Picosecond study of the luminescence and transient absorption of methylene blue-polynucleotide complexes. *J Chem Soc, Chem Commun*, 1990, **19**: 1346
- 4 Pyle Am, Rehmann JP, Meshoyrer CV, et al. Mixed-ligand complexes of ruthenium: factors governing binding to DNA. *J Am Chem Soc*, 1989, **111**: 3051
- 5 Long EC, Barton JK. On demonstration DNA intercalation. *Accounts Chem Res*, 1990, **23**: 273
- 6 Reinhardt CG, Krugh TR. A comparative study of ethidium bromide complexes with dinucleotides and DNA: direct evidence for intercalation and nucleic acid sequence preferences. *Biochemistry*, 1978, **17**: 4845

THE INTERACTION BETWEEN PHENOTHIAZINE DRUGS AND DNA BY ETHIDIUM BROMIDE PROBS

Cao Ying(Cao Y), Li Yijun(Li YJ), Gao Zhi(Gao Z) and He Xiwen(He XW)

(Department of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

ABSTRACT AIM: The interaction between phenothiazine drugs and DNA was studied with ethidium bromide(EB) probe by electronic absorption and fluorescence spectra. **METHODS AND RESULTS:** Both chlorpromazine hydrochloride(CPZ) and trifluoperazine hydrochloride(TFP) in buffer solution at pH 7.4 can intercalate into DNA. Promethazine hydrochloride(PMZ), which has the similar group as CPZ, can weakly bound to DNA by mixture modes. **CONCLUSION:** This interaction can be inhibited if high concentration of ions exists.

KEY WORDS phenothiazine drugs; DNA; EB probe; intercalation