

巴罗沙星与 DNA 的相互作用及 Mg^{2+} 的影响

钟文英*, 黄琦, 王丹丹, 倪坤仪**

(中国药科大学 分析化学教研室, 江苏 南京 210038)

摘要: 目的 研究巴罗沙星与 DNA 的分子作用机制和 Mg^{2+} 对巴罗沙星与 DNA 相互作用的影响。方法 利用荧光光谱研究巴罗沙星与 DNA 的作用强度并计算热力学数据 ΔH ; 利用紫外光谱、黏度测定、竞争实验、与变性 DNA 作用的比较等方法确定巴罗沙星与小牛胸腺 DNA 的相互作用方式; 利用荧光光谱考察 Mg^{2+} 对巴罗沙星与小牛胸腺 DNA 相互作用的影响。结果 DNA 对巴罗沙星的荧光猝灭常数为 $(5.43 \pm 0.07) \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta H = -8.03 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; Mg^{2+} 使巴罗沙星与 DNA 的作用增强。结论 巴罗沙星以沟槽键合方式与 DNA 相互作用; Mg^{2+} 对巴罗沙星与 DNA 的结合有中介作用。

关键词: 巴罗沙星; 小牛胸腺 DNA; 沟槽键合; Mg^{2+}

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2005)07-0663-05

Interaction between balofloxacin and DNA and the influence of Mg^{2+} on the interaction

ZHONG Wen-ying*, HUANG Qi, WANG Dan-dan, NI Kun-yi**

(Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Abstract: **Aim** To study the binding mode of balofloxacin with DNA and evaluate the influence of Mg^{2+} on the binding between balofloxacin and DNA. **Methods** Fluorescent spectroscopy was used to study the interaction of balofloxacin with DNA and to calculate the thermodynamic constants. UV-Vis spectra, DNA viscosity titration, competition experiment and the effect of dsDNA and ssDNA on the fluorescence intensity were used to identify the binding mode. **Results** Balofloxacin interacted with CT-DNA with a quenching constant of $(5.43 \pm 0.07) \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. The interaction was exothermic with a Van't Hoff enthalpy of $-8.03 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Mg^{2+} cation could enhance the quenching constant between balofloxacin and DNA. **Conclusion** Balofloxacin interacted with CT-DNA in the mode of groove binding and Mg^{2+} could mediate the binding of balofloxacin to DNA.

Key words: balofloxacin; CT-DNA; groove binding; Mg^{2+}

巴罗沙星(balofloxacin)(图1)为新一代广谱氟喹诺酮类抗菌剂,几乎无潜在的光敏反应,对中枢神经系统的不良作用小。同时它又具备口服吸收迅速、组织分布广泛、半衰期适中和耐受性好等优点。喹诺酮类药物以细菌的DNA为作用靶,通过阻碍DNA拓扑异构酶II和IV发挥作用使细菌DNA无

法形成超螺旋,进一步造成染色体的不可逆损害,导致细菌细胞无法分裂增殖。药物分子与DNA作用的方式与二者的分子结构、分子构象及电子云分布密切相关。目前巴罗沙星与DNA相互作用的分子机制尚未见报道。本文采用荧光光谱、紫外光谱、黏度测定、竞争实验、与变性DNA作用的比较等分析方法,研究巴罗沙星与DNA的键合模式,讨论了 Mg^{2+} 对巴罗沙星与DNA相互作用的影响;从分子水平研究巴罗沙星与DNA的作用机制,对合理用药及研制更加高效低毒的抗菌药物具有一定的现实意义。

收稿日期: 2004-10-09.

通讯作者 * Tel: 86-25-84860396,
E-mail: wenyingsh@163.com

** Tel: 86-25-83318799,
E-mail: nikunyi@hotmail.com

材料和方法

仪器与试剂 日本岛津 RF-5301 荧光光谱仪, 岛津 UV-3100 紫外-可见分光光度计, pH S-25 型酸度计(上海伟业仪器厂), 乌氏粘度计(上海亚太技术玻璃公司)。

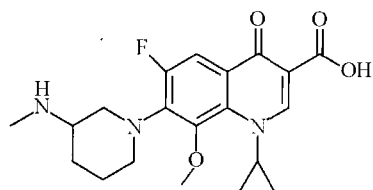


Figure 1 Structure of balofloxacin

巴罗沙星储备溶液浓度为 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (先溶于 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液, 再用二次蒸馏水定容), 使用前用二次水稀释至所需浓度; 小牛胸腺 DNA (CT-DNA, 美国 Sigma 公司), 取适量 CT-DNA 溶于含 $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液中, 浓度以吸收系数 $\epsilon(p)_{260} = 6\ 600$ 确定^[1]。经 UV 光谱检验 $A_{260}/A_{280} > 1.8$, 表明纯度符合要求^[1], DNA 储备液置于冰箱中 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存; 溴化乙锭 (EB) 储备液的浓度为 $1.77 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (美国 Sigma 公司); 缓冲液均为 $10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 溶液 (pH 7.00); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及其他试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

荧光光谱及热力学数据测定 在 1.00 cm 石英池中准确加浓度为 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 巴罗沙星溶液入 3.00 mL , 逐渐滴加微升量的 CT-DNA 溶液, 混合平衡后, 记录荧光光谱, $\lambda_{\text{ex}} = 284 \text{ nm}$, 扫描范围为 $390 \sim 550 \text{ nm}$ 。测定 293K 和 310K 时巴罗沙星与 CT-DNA 作用的荧光光谱, 得到两种温度下的猝灭常数, 计算 $\Delta H, \Delta S$ 。

吸收光谱 于 1.00 cm 石英比色皿中准确加入 $40.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 巴罗沙星溶液 3.00 mL , 逐渐滴加微升量的 CT-DNA 溶液, 混合均匀平衡后, 记录紫外光谱, 扫描范围为 $220 \sim 400 \text{ nm}$ 。

盐效应 在含不同浓度 NaCl 的巴罗沙星溶液中, 依次加入同量一定浓度的 CT-DNA 溶液, 测定荧光光谱, 比较盐效应对巴罗沙星和 DNA 相互作用的影响。

黏度测定 水浴保持恒温 $20\text{ }^\circ\text{C}$, 吸取 CT-DNA ($62.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 10.00 mL 置乌氏黏度计中, 用秒表记录滴下时间。依次滴加微升量的巴罗沙星溶液, 用气泡混匀, 记录滴下时间。每个溶液滴下时间重复测量 3 次, 每次相差不超过 0.2 s , 取平均值。

以 η/η_0 对 $C_{\text{drug}}/C_{\text{DNA}}$ 作图 (η : 比粘度; η_0 : 本质粘度)。

竞争实验 配制 DNA-EB ($C_{\text{DNA}} = 22.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{EB}} = 8.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液, 依次滴加微升量巴罗沙星溶液, 测定每次加入后的荧光光谱, $\lambda_{\text{ex}} = 521 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 589 \text{ nm}$ 。

变性 DNA 的影响 将天然的双股 DNA (dsDNA) 在 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴中加热 8 min , 然后放入冰浴中迅速冷却, 再回复至室温, 即可得到变性单股 DNA (ssDNA)。在 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 巴罗沙星溶液 3.00 mL 中逐渐滴加微升量的 ssDNA, 混匀平衡后, 记录荧光光谱, $\lambda_{\text{ex}} = 284 \text{ nm}$, λ_{em} 扫描范围为 $390 \sim 550 \text{ nm}$ 。

金属离子影响 实验采用荧光滴定法, 将微升量的 CT-DNA 溶液滴加到含 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$ 的加替沙星溶液 ($2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中, 测定荧光光谱, $\lambda_{\text{ex}} = 284 \text{ nm}$, λ_{em} 扫描范围为 $390 \sim 550 \text{ nm}$ 。

结果

1 巴罗沙星和 DNA 相互作用的荧光光谱及热力学研究

图 2 为在巴罗沙星溶液中滴加微升量的 CT-DNA 溶液所观察到的荧光光谱变化情况。从图 2 中可以看出, 随着 CT-DNA 浓度的增大, 巴罗沙星的荧光强度被强烈猝灭, 猝灭程度达 46.8% 以上。根据 Stern-Volmer 方程^[2]:

$$F_0/F = 1 + K_{\text{SV}}[Q] \quad (1)$$

式中, F_0 和 F 分别是 DNA 不存在和存在时的荧光强度, $[Q]$ 为猝灭剂的浓度, 此处为 DNA 的浓度, K_{SV}

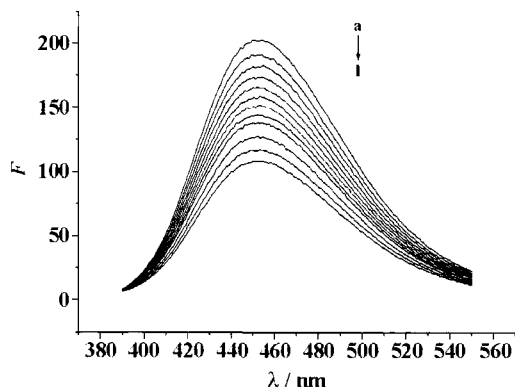


Figure 2 Fluorescence emission spectra of $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balofloxacin in buffer solution (pH 7.00, $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$) with increasing concentration of CT-DNA. DNA concentration: 0 to $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (a to l). $\lambda_{\text{ex}} = 284 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 453 \text{ nm}$

为 Stern-Volmer 猝灭常数,代表猝灭剂对药物荧光的猝灭效率。以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图(图 3),由斜率得 $K_{SV} = (5.43 \pm 0.07) \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (293 K), Stern-Volmer 图为直线,说明只有一种猝灭机制发生,静态或动态猝灭^[3]。

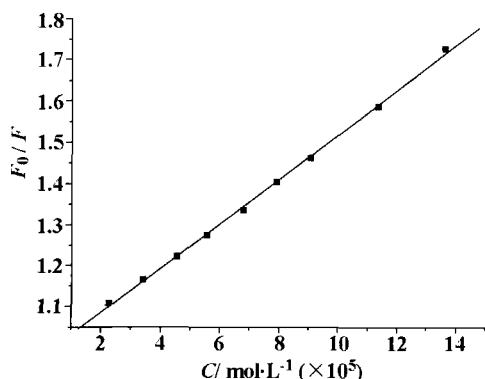


Figure 3 Stern-Volmer plot of balofloxacin-DNA interaction

区分动态猝灭和静态猝灭的常用方法有温度效应、吸收光谱和荧光寿命测定 3 种^[3]。在 293 K 和 310 K 时,巴罗沙星与 CT-DNA 作用的猝灭常数 K_{SV} 分别为 $5.43 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $4.63 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。可以看出,温度升高,猝灭常数减小,因此该猝灭过程为静态猝灭;由 Van't Hoff 方程求得 $\Delta H = -8.03 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S = 45 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$, 负的焓变说明巴罗沙星与 CT-DNA 的反应是放热反应,可自发进行。

2 巴罗沙星和 DNA 相互作用的键合模式

2.1 巴罗沙星和 DNA 相互作用的吸收光谱

巴罗沙星在紫外区内有 2 个吸收峰,在巴罗沙星溶液中,逐渐滴加微量量的 CT-DNA。随着 CT-DNA 浓度的增加,2 个吸收峰均产生减色效应,这表明巴罗沙星和 DNA 发生了相互作用,由于 DNA 的加入对巴罗沙星的吸收峰位置没有影响,未出现等吸收点,因此巴罗沙星与 DNA 间不是嵌插作用模式^[4]。

2.2 盐效应

选择 NaCl 改变体系的离子强度。随着离子强度的升高,显然 CT-DNA 对巴罗沙星猝灭程度 F_0/F 并无多大变化(图 4)即离子强度的改变对巴罗沙星-DNA 体系没有影响。因为 Na^+ 等盐类阳离子能以静电作用方式与 DNA 的带负电荷的磷酸基发生强烈的相互作用,如果体系中巴罗沙星与 DNA 存在静电作用, Na^+ 的增多必将与巴罗沙星发生竞争,从而减弱巴罗沙星与 DNA 之间的作用,使荧光猝灭程度减弱。因此,实验现象表明巴罗沙星与 CT-DNA

间的相互作用不是一种静电作用。

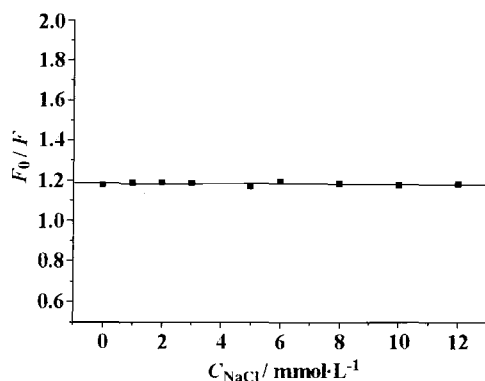


Figure 4 Influence of ionic strength on quenching efficiency. $C_{\text{drug}} = 2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{DNA}} = 43.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.3 黏度测定

对许多典型的核酸嵌插剂(如溴化乙锭)的研究发现,生色团嵌插入 DNA 碱基和双螺旋骨架的扭曲伸长会使溶液黏度增大。而沟槽键合, DNA 溶液黏度不会发生明显变化^[5]。本文考察了巴罗沙星与小牛胸腺 DNA 作用前后, DNA 黏度的变化情况(图 5),结果显示与巴罗沙星的作用并没有影响 DNA 的黏度。说明巴罗沙星与 DNA 的作用没有引起 DNA 双螺旋骨架的扭曲变化,所以作用方式应为沟槽键合。

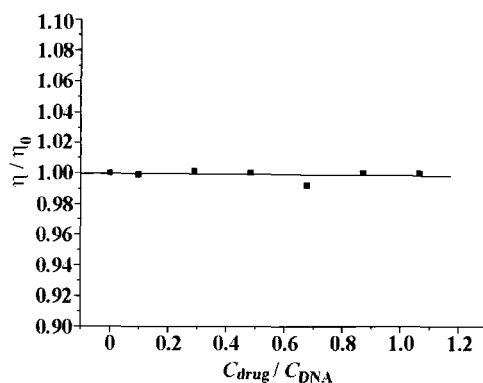


Figure 5 Effects of balofloxacin on the viscosity of DNA solution. Balofloxacin was titrated into a $62.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ calf thymus DNA solution at $20 \text{ }^\circ\text{C}$

2.4 以 EB 为荧光探针测定巴罗沙星与 DNA 的作用

EB 是一种具有平面分子结构,能与 DNA 双链发生典型嵌插作用的荧光染料,其本身荧光极弱,插入 DNA 双链后荧光强度大大增强。如果其他化合物与 DNA 发生类似的作用,就会竞争其结合位点,

减弱 EB-DNA 体系的荧光,通常以 $C_{\text{drug}}/C_{\text{DNA}} < 100$ 为限,将荧光强度减弱大于 50% 作为化合物是否与 DNA 发生嵌插作用的判据^[6]。由图 6 可知,随着巴罗沙星的浓度的增加,EB-DNA 荧光强度有所减弱,键合饱和时,体系的荧光强度只降低 31.4%, 未达 50% 的判据,故巴罗沙星并未发生嵌插作用竞争 EB 的结合位点。巴罗沙星使 DNA-EB 体系荧光降低可能是因为巴罗沙星使 DNA 的双螺旋构象受到一定的影响,降低了 EB 对 DNA 的稳定作用。

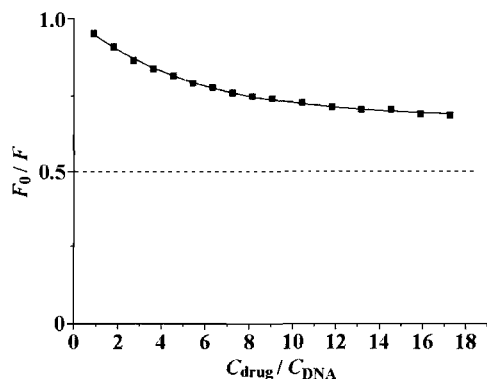


Figure 6 Effect of concentration of balofloxacin on the fluorescence intensity for EB-DNA

2.5 变性 DNA 与巴罗沙星的相互作用

在同浓度的巴罗沙星溶液中分别加入不同量的 dsDNA 和 ssDNA,由图 7 可知,两种 DNA 都对巴罗沙星的荧光有猝灭作用,且单链 DNA 对巴罗沙星的猝灭作用较双链 DNA 强。而嵌插作用是分子直接插入到双螺旋 DNA 的碱基对之间,若 DNA 发生变性,成为 ssDNA,则嵌插作用不能实现,猝灭程度会明显降低^[7]。本实验结果说明巴罗沙星与 CT-DNA 之间不是嵌插作用。

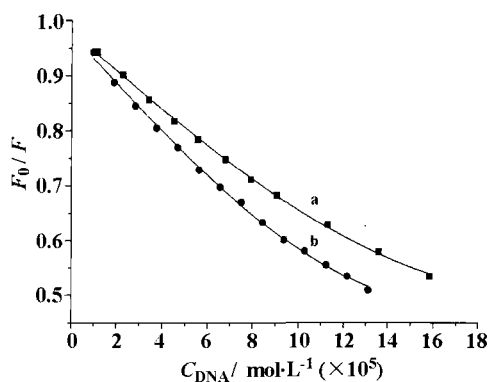


Figure 7 Effect of dsDNA and ssDNA on the fluorescence intensity. $C_{\text{drug}} = 2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

上述实验结果均表明,巴罗沙星与 CT-DNA 之

间不是静电作用,也不是嵌插作用,而是沟槽作用。

3 Mg^{2+} 对巴罗沙星和 DNA 相互作用的影响

考虑到在真核细胞液内, Mg^{2+} 的浓度一般为 $1 \sim 2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 本文选择 Mg^{2+} 的浓度 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 巴罗沙星浓度 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 Mg^{2+} -巴罗沙星二元体系中,逐渐滴加已知浓度的 DNA 溶液,观察荧光光谱变化(图 8)。利用式(1)计算了猝灭常数 $K_{\text{SV}} = (1.74 \pm 0.12) \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。与 Mg^{2+} 不存在时 DNA 对巴罗沙星溶液的荧光猝灭常数 $K_{\text{SV}} = (5.43 \pm 0.07) \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 相比较, K_{SV} 有明显增强,表明 Mg^{2+} 使巴罗沙星分子和与 DNA 的作用增强。

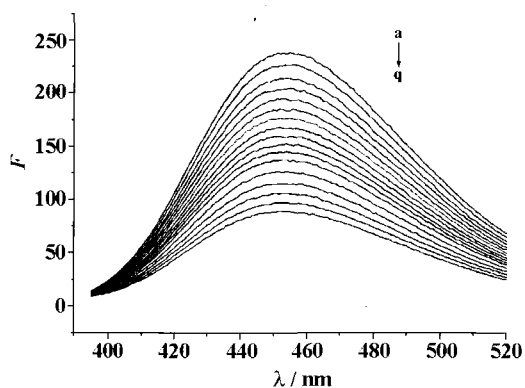


Figure 8 Fluorescence emission spectra of $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balofloxacin in $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$ solution (pH 7.00) with increasing concentration of CT-DNA. DNA concentration (a to q): 0, 0.011, 0.023, 0.034, 0.045, 0.056, 0.068, 0.079, 0.091, 0.10, 0.11, 0.12, 0.15, 0.17, 0.19, 0.22, 0.26 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. $\lambda_{\text{ex}} = 284 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 453 \text{ nm}$

讨论

目前普遍认为:小分子药物与 DNA 以非共价键的作用主要有静电结合、沟槽键合和嵌插键合 3 种方式:静电结合没有选择性,药物作用于磷酸骨架;沟槽键合是分子与 DNA 的大沟或小沟的碱基对边缘直接作用;嵌插键合是平面或近乎平面的芳香环嵌入碱基对之间^[8]。从巴罗沙星的分子结构看出不存在巴罗沙星正离子,且溶液离子强度变化对其相互作用无影响,可排除静电作用方式;紫外光谱试验结果表明巴罗沙星与 DNA 之间的作用不具备嵌插键合的特征,竞争实验结果表明,巴罗沙星和典型嵌插剂 EB 作用于 DNA 的不同位点,ssDNA 与巴罗沙星的作用比 dsDNA 更强。这一实验现象和黏度测定试验结果进一步确定,巴罗沙星与 CT-DNA 之

间以沟槽键合方式发生相互作用,即巴罗沙星分子与 DNA 的小沟的碱基对边缘发生作用。

喹诺酮类药物与 DNA 的分子作用机制目前有一些不同的报道:有人^[9]认为药物分子和 DNA 直接发生相互作用,即 DNA 碱基和药物分子或药物分子二聚体通过氢键相互作用;有人^[10]提出药物分子和 DNA 由 Mg^{2+} 中介,通过形成药物- Mg^{2+} -DNA 三元络合物发生作用, Mg^{2+} 可增强药物分子与 DNA 的相互作用。本实验结果表明, Mg^{2+} 的存在使巴罗沙星对 DNA 的结合作用有所增强,它可以促进巴罗沙星与 DNA 的相互作用。 Mg^{2+} 可与巴罗沙星分子中羧基和羰基上的氧原子络合,形成 1:1 的基态二元络合物,使巴罗沙星分子刚性增强,增强其荧光发射。在此二元络合物中滴加 DNA,其作用程度大于巴罗沙星与 DNA 的作用。作者认为 Mg^{2+} 可能作为巴罗沙星分子与 DNA 相互作用的桥梁,形成了巴罗沙星- Mg^{2+} -DNA 三元络合物,即 Mg^{2+} 既与喹诺酮类药物分子中的羧基和羰基上的氧原子络合,又与 DNA 分子的磷酸基团作用。类似现象在其他一些喹诺酮类药物中也有报道。

药物与 DNA 相互作用的研究是认识某些疾病的致病机制和药物的治疗机制的基础,同时在阐明 DNA 结构和功能方面具有重要意义,也是药物体外筛选的重要手段。研究巴罗沙星与 DNA 的分子作用机制,对合理用药、研制更加高效低毒的喹诺酮类抗菌药物具有重要意义。

References

- [1] Zhong WY, Yu JS, Huang WL, *et al.* Spectroscopic studies of interaction of chlorobenzylidene with DNA [J]. *Biopolymers*, 2001, **62**(6):315-323.
- [2] Chen GZ, Huang XZ, Xu JG, *et al.* *Fluorescence Analysis* (荧光分析法) [M]. Beijing: Science Press, 1990. 118.
- [3] Zhan XW, Zhao FL, Li KA. Studies on the reaction between ciprofloxacin and bovine serum albumin [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 1999, **20**(7):1063-1067.
- [4] Cao Y, He XW. Studies of interaction between safranin T and double helix DNA by spectral methods [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 1998, **54A**(6):883-892.
- [5] Breslin DT, Coury JE, Anderson JR, *et al.* Anthraquinone photorelease structure determines its mode of binding to DNA and the cleavage chemistry observed [J]. *J Am Chem Soc*, 1997, **119**(21):5043-5044.
- [6] Liao JP, Liu GD, Huang SS. Fluorescence analysis of water-soluble metal complexes of schiff-base with DNA [J]. *J Instrum Anal* (分析测试学报), 2001, **20**(3):5-8.
- [7] Liu RT, Yang JH, Wu X. Study of the interaction between nucleic acid and oxytetracycline-Eu³⁺ and its analytical application [J]. *J Lumin*, 2002, **96**:201-209.
- [8] Liu J, Luo GA, Wang YM, *et al.* Research development of the interaction of small molecules with nucleic acids [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2001, **36**(1):74-78.
- [9] Shen LL, Baranowski J, Pernet AG. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: specificity and cooperativity of drug binding to DNA [J]. *Biochemistry*, 1989, **28**(9):3879-3885.
- [10] Palù G, Valisena S, Ciarrochi G, *et al.* Quinolone binding to DNA is mediated by magnesium ions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(20):9671-9675.
- [1] Zhong WY, Yu JS, Huang WL, *et al.* Spectroscopic studies of interaction of chlorobenzylidene with DNA [J].