

金属细菌叶绿素与 DNA 的相互作用

王梦亮*, 常如波, 刘滇生

(山西大学 现代化学研究所, 山西 太原 030006)

关键词: 金属; 细菌叶绿素; DNA; 紫外可见光谱; 电泳

中图分类号: R916.2 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)11 - 1054 - 03

Interaction of metal complexes of bacterial chlorophyll with DNA

WANG Meng-liang*, CHANG Ru-bo, LIU Dian-sheng

(Institute of Modern Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: **Aim** Understanding the modes and activities of metal bacterial chlorophylls as PHD sensitizers with DNA. **Methods** The modes and activities of the interaction of DNA and metal complexes of bacterial chlorophyll, which have been prepared by extraction and synthesis reaction, have been discussed according to the ultraviolet-visible spectrum and nucleic acid electrophoresis. **Results** It indicates that the system of DNA and metal complexes have enhanced the interaction by the ultraviolet-visible spectrum. At the same time, it also indicates that metal complexes of bacterial chlorophyll and DNA have different combining way and have strong cutting effect in illumination by the nucleic acid electrophoresis. **Conclusion** This paper proved that metal bacterial chlorophylls as PHD sensitizers have great advantage.

Key words: metal; bacterial chlorophyll; DNA; ultraviolet-visible spectrum; electrophoresis

卟啉及其金属配合物的生物活性研究已日益引起人们的关注^[1,2],一些金属卟啉配合物不仅具有抗病毒、抗细菌的生物活性,而且在肿瘤的光动力疗法(PDT)中具有诱人的前景。大量研究结果表明,卟啉及其金属配合物的生物活性与其能够和DNA相互作用有关。

细菌金属叶绿素是一种在结构和功能上都不同于植物叶绿素的卟啉类化合物,作为金属配体的研究国内外还未见报道。与植物叶绿素相比,其卟啉环3,4位没有双键,侧链也有明显不同,因此具有不同的光谱性质,其特征吸收位于350~400 nm和750~800 nm,在400~700 nm的可见光区域没有吸收。若将细菌叶绿素的金属配体化合物用于肿瘤的诊断和治疗,就可用750 nm以上的近红外线作为治

疗光源,大大增加了在组织中的穿透能力,可直接用于体内组织的诊断和治疗,同时,减少了治疗后的可见光光敏反应。从理论上讲,细菌叶绿素取代其他卟啉与金属形成的配合物比其他卟啉配合物在PDT领域更具有优越性。因此对此类配合物与DNA相互作用的研究便具有重要的理论意义和应用前景。

本文以细菌叶绿素为配体,合成了4种金属细菌叶绿素,并观察了其对K562和HL60两种白血病细胞生长的影响,结果表明,4种金属细菌叶绿素都有很强的抑瘤作用,光照可以明显提高其抑瘤率。为了探索其作用机制,本文对金属细菌叶绿素与小牛胸腺DNA的相互作用进行了初步研究。

实验部分

仪器、试剂与材料 日本岛津紫外-可见分光光度仪UV-265, DYY-6B型稳压稳流电泳仪,小牛胸腺DNA(上海华美生物制品公司),其他试剂均为国产分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

收稿日期: 2004-11-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20171030).

* 通讯作者 Tel: 86 - 351 - 7016078, Fax: 86 - 351 - 7016048,

E-mail: mliwang@sxu.edu.cn

1 金属细菌叶绿素的合成

光照厌氧培养的球形红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas sphaeroides*),按文献 [3, 4] 方法提取纯化细菌叶绿素,按文献 [5] 合成 4 种金属细菌叶绿素即铜细菌叶绿素 (CuBchl)、镍细菌叶绿素 (NiBchl)、钴细菌叶绿素 (CoBchl) 和锌细菌叶绿素 (ZnBchl)。

2 与 DNA 的相互作用实验

2.1 紫外光谱法 DNA 溶解在 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液中,其准确浓度由 $\epsilon_{260} = 6\,600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \times \text{cm}$ 处的吸收度确定。 A_{260}/A_{280} (A_{260} , A_{280} 分别为 260 nm 和 280 nm 处的吸收度) 为 1.8,金属细菌叶绿素用甲醇溶解。通过紫外可见光谱仪分别检测 DNA、金属细菌叶绿素、DNA 金属细菌叶绿素混和体系的吸收光谱。

2.2 核酸电泳法 光照对 DNA 剪切作用的影响:分两组,一组为 1% DNA 对照与 DNA 金属细菌叶绿素混和体系直接电泳。另一组在同样条件下,

100 W 白炽灯 50 cm 光照 30 min,再电泳。琼脂糖凝胶电泳,电压按常规。

不同光照波长对 DNA 剪切作用的影响:分别用特定范围波长的蓝光、绿光、黄光和红光 30 W 近距离 (15 cm) 照射 30 min,进行电泳,其他条件同上。

结果与讨论

1 金属细菌叶绿素与 DNA 相互作用的紫外可见光谱

图 1 为 DNA 与细菌叶绿素、脱镁细菌叶绿素以及不同种类金属细菌叶绿素相互作用的紫外可见吸收光谱,曲线 a 和曲线 b 分别代表金属细菌叶绿素或细菌叶绿素和 DNA 溶液的紫外可见吸收光谱,曲线 c 为金属细菌叶绿素或细菌叶绿素和 DNA 溶液混合体系的紫外可见吸收光谱。如图所示,虽然金属细菌叶绿素没有像植物叶绿素明显的可见区域吸收峰,但也出现了卟啉类化合物的特征谱带。

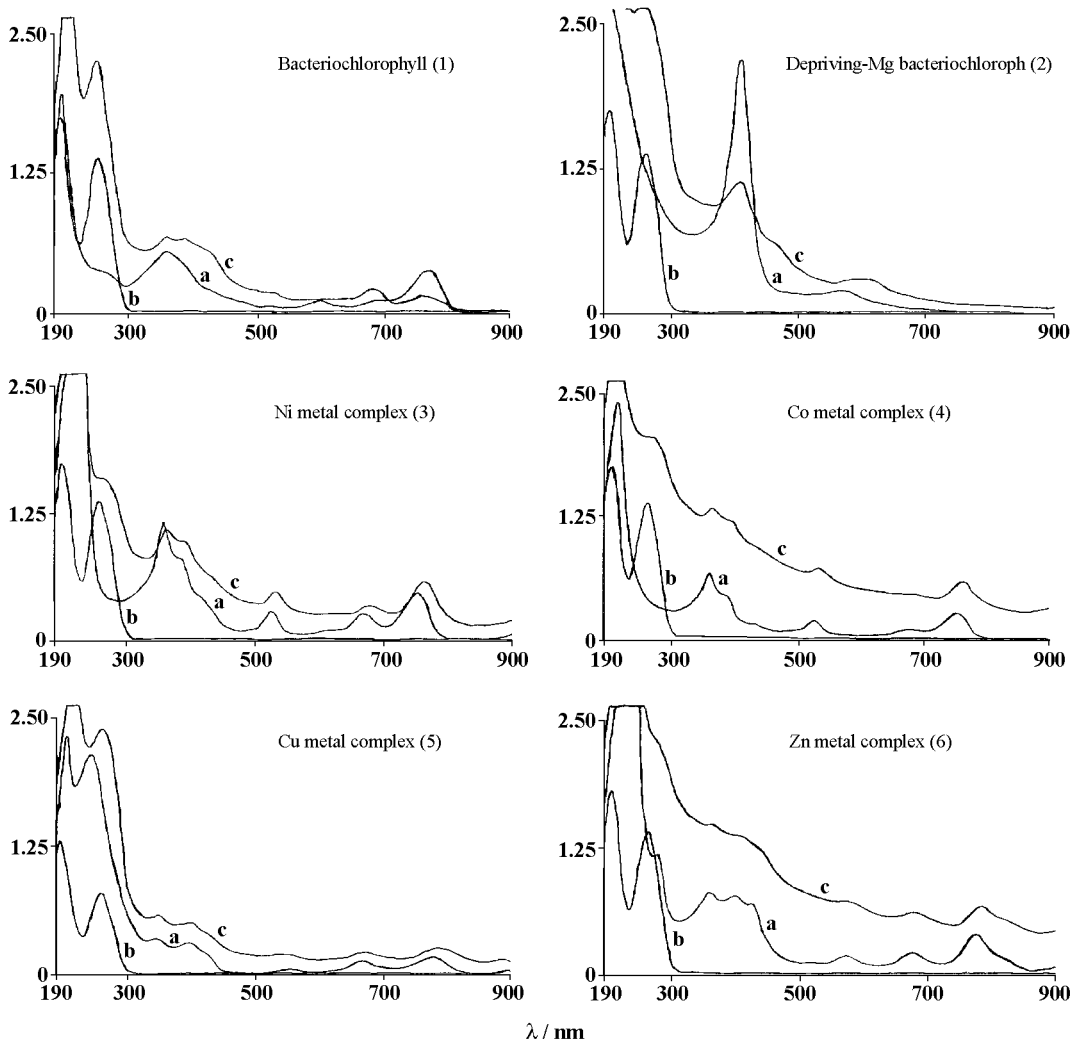


Figure 1 Ultraviolet-visible spectrum of DNA and metal complexes

曲线 a 基本都有 5 个吸收谱带, 它们是 1 个大峰 (即 $Soret$ 谱带), 4 个小峰 (即 Q 谱带), 曲线 b 只在紫外光区有 2 个吸收带, 分别在 196 nm 和 258.8 nm 处, 这是 DNA 分子中 4 种碱基吸收带叠加的结果, 是 DNA 的典型紫外吸收谱带。而就金属细菌叶绿素和 DNA 混合体系 (曲线 c) 而言, 卟啉的特征吸收峰 $Soret$ 带和 Q 带均不同程度地红移, 其中 $Soret$ 带最大红移 12.4 nm, Q 带最大红移 7 nm, 表明细菌叶绿素卟啉大环与 DNA 碱基之间发生了强烈的相互作用。图谱 2、3 还显示金属细菌叶绿素和 DNA 混合体系 (曲线 c) 的 $Soret$ 吸收带显著弱于其金属细菌叶绿素 (曲线 a), 这是由于 DNA 链的相互缠结使结合在链上的金属细菌叶绿素的运动受到了限制。同时, 各图金属细菌叶绿素和 DNA 混合体系 Q 谱带的 4 个带的相对强度与其相应金属细菌叶绿素的比较, 发生了显著变化。因为卟啉类化合物紫外-可见光谱 Q 带的数目和形状反映了其分子结构的对称性, 这表明金属细菌叶绿素卟啉大环与 DNA 碱基间的相互作用使叶绿素卟啉分子构型的对称性发生了变化。另外, 脱镁叶绿素的图谱显示其 Q 带基本消失, 这是因为脱镁后, 卟啉大环的平面度升高。

2 金属细菌叶绿素与 DNA 相互作用的核酸电泳研究

电泳结果表明, 光照前, Ni , Zn 和细菌叶绿素复合体系在胶孔下方有大块的亮带, 说明其与 DNA 间有强烈的相互结合, 这种结合对 EB 和 DNA 结合无竞争性抑制。 Co , Cu 和脱镁细菌叶绿素体系其 DNA 带很弱或基本没有, 可能是和 EB 结合方式相同, 在 DNA 链上竞争性结合, 使 DNA 无法荧光显色; 而光照后, DNA 带亮度整体减弱, Ni , Zn 和细菌叶绿素复合体系在上方的大块的亮带消失, 说明光照后, DNA 被金属细菌叶绿素所剪切。

分别以蓝光、绿光、黄光和红光照射金属细菌叶绿素复合体系后的电泳结果显示, 红光照射后, DNA 的荧光显著减弱, 且产生了大量的 DNA 小片段, 说明金属细菌叶绿素能吸收红光能量并耦联到 DNA 的降解, 这与金属细菌叶绿素的主要吸收峰位于红

光波长区相一致。蓝光、绿光、黄光照射后的电泳结果表明, DNA 的荧光也有所减弱, 但减弱的程度与红光相比相差较大, 且产生的 DNA 小片段数量很少, 说明在此条件下, 金属细菌叶绿素几乎没有对 DNA 的光切割作用。

结论

金属细菌叶绿素和 DNA 之间有较强相互作用。金属细菌叶绿素与 DNA 结合后使卟啉吸收峰发生红移, 可达 788.8 nm。电泳显示金属细菌叶绿素与 DNA 间的结合作用至少有两种方式 (EB 竞争型和非 EB 竞争型)。光照下, 细菌叶绿素对 DNA 有强烈的剪切作用。进一步用特定波长照射, 发现在 700 nm 以上的红光照射下, 金属细菌叶绿素对 DNA 的剪切作用最为有效。在利用细菌金属叶绿素对肿瘤进行光动力学治疗时, 就可用 750 nm 以上的近红外线作为治疗光源, 大大增加了在组织中的穿透能力, 可直接用于体内组织的诊断和治疗, 同时, 减少了治疗后的可见光光敏反应。

References

- [1] Liu HY, Hu XM, Yin X, *et al.* Molecular installation of metalloporphyrin [J]. *J Inorg Chem* (无机化学学报), 1998, 14(4): 371 - 386.
- [2] Hong FS, Wei ZG, Zhao WG, *et al.* Determination of coordination structure on metal-substituted chlorophyll a by spectroscopy [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2001, 28(3): 381 - 386.
- [3] Li SJ, Wang LB, Wu JG, *et al.* Synthesis and spectrum of Mn (II) metal chlorophyll and Mn (III) metal chlorophyll [J]. *Spectrosc Spectrom Anal* (光谱学与光谱分析), 1997, 17(4): 55 - 59.
- [4] Yang SY. Separation and purification of chlorophyll by micrystal cellulose column [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理通讯), 1983, 19(2): 45 - 47.
- [5] Yamashita H, Inoue H. Determination of zinc (II) chlorophylls and derivatives by high performance liquid chromatography with fluorometric detection [J]. *Anal Sci*, 1991, 27(7): 1371 - 1374.