

# 荧光光谱法研究对-二甲氨基甲基-杯[8]芳烃与 DNA 相互作用

李来生, 黄志兵, 王宇晓, 刘旭, 李艳萍, 葛小辉

南昌大学分析测试中心, 江西 南昌 330047

**摘要** 首次采用阿霉素作荧光探针研究了水溶性对-二甲氨基甲基-杯[8]芳烃(简称杯[8]胺或 CX8)与小牛胸腺 DNA 相互作用, 并考察了溶液的 pH 值、离子强度及解链 DNA 对 DNA 和杯[8]胺相互作用的影响。实验发现, DNA 能猝灭阿霉素的荧光, 向该体系中加入杯[8]胺时荧光又逐渐增强, 这说明杯[8]胺能与 DNA 的磷氧负离子强烈作用。通过 Scatchard 图等进一步分析发现, 杯[8]胺对 DNA-阿霉素的影响表现为混合模式, 一方面, 在中性或酸性的条件下, 杯[8]胺能中和 DNA 上的磷氧负离子, 导致 DNA 收缩, 从而影响 DNA 的构象, 使嵌入的阿霉素从 DNA 中部分游离出来, 荧光增强; 另一方面, 杯[8]胺与阿霉素也存在静电位点竞争。

**主题词** 荧光法; 光谱探针; 水溶性杯芳烃; 对-二甲氨基甲基-杯[8]芳烃; 小牛胸腺 DNA

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2005)07-1088-04

在分子水平上研究 DNA 与小分子的作用, 对研究 DNA 与药物的作用机理和进行药物设计极为重要。杯芳烃是一类对位烷基苯酚与甲醛缩合的寡聚大环化合物, 实验证实它们能与许多离子和中性分子形成典型的主-客体络合物<sup>[1]</sup>, 其作用方式属非共价超分子作用, 研究其与 DNA 的作用方式, 将有助于更深入地研究药物与 DNA 的作用机理。

水溶性杯芳烃在此领域将有好的应用前景。通常是在杯芳烃上引入磺酸基、磷酸基、羧基等可以获得溶解性较好的杯芳烃衍生物<sup>[2]</sup>, 这不但改善了它们的溶解性, 也增强了其配位能力和选择性, 使其能更好地在各种溶剂中与客体作用, 在溶液状态下具有分子识别功能, 这方面已有较多的报道<sup>[3-6]</sup>。

对-二甲氨基甲基-杯[8]芳烃 [*p*-(N, N-dimethylaminomethyl)calix[8]arene, 以下简称杯[8]胺或 CX8] 的分子结构见图 1, 是一种水溶性杯芳烃。初步研究表明, 该主体分子在溶液状态下通常无荧光, 这更有利于将来客体分子光谱的

研究, 但在研究杯[8]胺与 DNA 作用时必须引入荧光探针。阿霉素是临床上广泛使用的萘环类抗癌抗生素, 文献报道该药物主要是通过嵌入方式与 DNA 作用<sup>[7]</sup>, 因而它应该是一种良好的荧光探针。

这一研究将有利于今后制备新型水溶性杯芳烃荧光探针, 这些探针可通过超分子作用识别和捕集药物客体分子, 并利用此类探针实时地探测光谱信息, 灵敏和动态地指示药物与 DNA 的作用方式。这对某些生命生理现象、人类的遗传变异、癌症等重大疾病的理解及药物开发等都具有重要理论意义和应用价值。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

F-3010 荧光分光光度计(日本日立公司); UV-2501PC 紫外-可见光谱仪(日本岛津公司); UOD1106 元素分析仪(意大利); Magna 550 红外光谱仪(Nicolet 公司); EM-360L 核磁共振仪(Varian 公司)。

水溶性杯[8]胺参照文献方法合成<sup>[8]</sup>, 并通过 IR、元素分析和核磁共振等手段表征了其结构。分析数据如下: m. p. 约 160 °C (分解); IR (KBr), 3 411  $\text{cm}^{-1}$  (O—H), 1 577, 1 439  $\text{cm}^{-1}$  (C—N); 元素分析: 实测值 73.85% (C), 8.12% (H) 与  $\text{C}_{80}\text{H}_{104}\text{N}_8\text{O}_8$  理论值 73.62% (C), 7.98% (H) 相符;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  9.60 (br, s, 1H, OH), 7.23 (s,

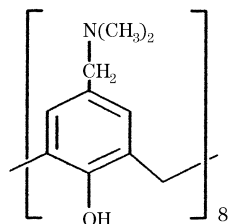


Fig. 1 The chemical structure of *p*-(N, N-dimethylaminomethyl) calix [8] arene

收稿日期: 2004-03-18, 修订日期: 2004-05-28

基金项目: 江西省教委基金资助项目(JJ2003-73-16)和江西省自然科学基金资助项目(9920024)

作者简介: 李来生, 1962年生, 南昌大学分析测试中心教授

2H, ArH), 4.25 (br, d, 2H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.52 (s, 2H, ArCH<sub>2</sub>N), 2.88 (s, 6H, NCH<sub>3</sub>)。配制浓度为  $1.00 \times 10^{-4}$  mol · L<sup>-1</sup> 的杯[8]胺溶液; 小牛胸腺 DNA(北京百泰生物技术公司,  $A_{260}/A_{280} = 1.96$ ), 用 50 mmol · L<sup>-1</sup> 的 NaCl 溶液配制 100 μg · mL<sup>-1</sup> 的 DNA 溶液(浓度为  $1.86 \times 10^{-4}$  mol · L<sup>-1</sup>,  $\epsilon_{260} = 6\ 600$  L · mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>)。盐酸注射用阿霉素(浙江海门制药厂), 配制  $1.72 \times 10^{-5}$  mol · L<sup>-1</sup> 阿霉素溶液, 缓冲液为 Tris-HCl(pH 7.0), 其他试剂均为分析纯, 所用水为二次蒸馏水。配好的溶液保存于冰箱(4 °C)中备用。

## 1.2 实验方法

向 5.0 mL 试管中加入一定量的阿霉素溶液和 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.0), 再分别加入不同量的 DNA 溶液。

向 5.0 mL 试管中加入一定量的阿霉素溶液, Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.0) 和 DNA 溶液, 然后, 加入不同体积的杯[8]胺溶液, 用水定容至刻度, 摇匀。分别对上述混合液进行荧光光谱扫描(发射和激发光谱带通宽度均为 10 nm, 荧光池厚度为 1 cm)。

在某一固定浓度的杯[8]胺溶液中加入相同量的 DNA 和不同量的阿霉素, 固定最佳激发波长和最佳发射波长( $\lambda_{ex} = 502$  nm,  $\lambda_{em} = 562$  nm), 测量加入不同量阿霉素时的荧光强度, 按 Scatchard 方程进行数据处理。

## 2 结果与讨论

### 2.1 荧光光谱特性

实验发现, 在溶液中阿霉素有荧光, 其最大荧光激发光谱和发射光谱分别为 502 nm 和 562 nm, 杯[8]胺本身在溶液中不发荧光, 向阿霉素溶液中逐渐加入杯[8]胺, 体系的荧光光谱及荧光强度没有变化, 表明杯[8]胺与阿霉素可能没有发生作用; 向阿霉素溶液中逐渐加入 DNA 溶液, 体系的荧光强度降低, 但荧光光谱峰位几乎不变, 这是由于阿霉素与 DNA 发生了嵌入作用的结果, 与文献报道一致<sup>[7]</sup>。但当向 DNA-阿霉素体系中加入杯[8]胺时, 发现体系的荧光强度逐渐增强, 但荧光光谱峰位也几乎不变(见图 2), 显然杯[8]胺与 DNA 发生了作用。这可能是由于在溶液状态下杯[8]胺的氨基被部分质子化, 它与 DNA 表面的磷酸基团发生静电作用, 释放了由磷酸基团排斥作用而产生的静电紧张, 从而使 DNA 收缩呈球形<sup>[9]</sup>, 螺距发生变化使得阿霉素不能稳定地嵌入 DNA 中, 部分阿霉素被挤出, 而表现为游离阿霉素光谱, 故荧光强度增强。

此外, 由图 3 可以看出, 当向阿霉素和杯[8]胺混合液中逐渐加入 DNA 溶液时, 体系的荧光猝灭程度比没有杯[8]胺存在时要小的多, 这也说明了 DNA 与杯[8]胺优先发生了作用。

### 2.2 溶液酸度的影响

为了考察溶液酸度对杯[8]胺与 DNA 作用的影响, 分别选用了 pH 2.5, 4.0, 7.0 的缓冲液, 实验发现, 酸度对阿霉素本身的荧光光谱影响很小。从图 4(a)可见, 随着溶液的酸度增大, DNA-阿霉素的荧光强度增大, 这意味着当酸度增大时, DNA 的磷酸负离子之间的静电排斥力减小, 收缩成球

形, 这样嵌入的阿霉素的量随之减少, 主要表现为游离阿霉素的荧光光谱。

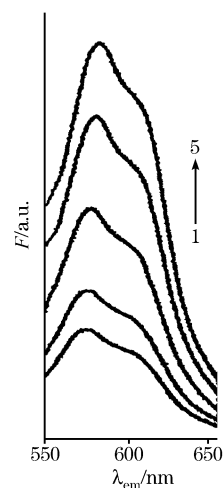


Fig. 2 The influence of the calix [8] arene on the emission spectra of DNA-ADM in Tris-HCl (pH = 7.0) buffers ( $\lambda$ : Wavelength;  $F$ : Intensity)

$c_{(DNA)} = 1.86 \times 10^{-5}$  mol · L<sup>-1</sup>,  $c_{(ADM)} = 1.72 \times 10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup>  
The concentration of the calix[8] arene: 1, 0.0; 2,  $2.0 \times 10^{-6}$ ; 3,  $3.0 \times 10^{-6}$ ; 4,  $6.0 \times 10^{-6}$ ; 5,  $1.0 \times 10^{-5}$  mol · L<sup>-1</sup>

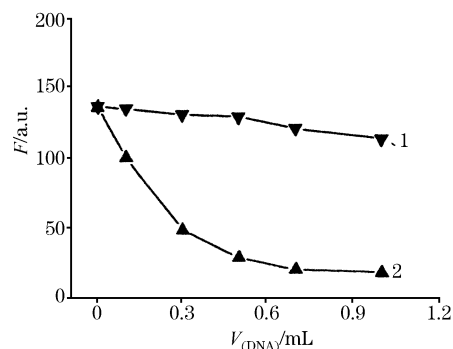


Fig. 3 The influence of DNA on the fluorescence intensity of ADM

$c_{(DNA)} = 1.86 \times 10^{-4}$  mol · L<sup>-1</sup>,  $c_{(ADM)} = 1.72 \times 10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup>,  
 $c_{CX8} = 3.0 \times 10^{-5}$  mol · L<sup>-1</sup>

1, ADM + calix [8] arene + DNA; 2, ADM + DNA

从图 4(a)可知, 不同酸度的条件下, 随着杯[8]胺的加入, DNA-阿霉素体系的荧光强度均有增强的趋势, 这进一步说明静电作用是杯[8]胺与 DNA 结合的主要作用力, 同时随着杯[8]胺的加入, DNA 的磷酸负离子被中和, DNA 进一步收缩导致阿霉素游离出来。说明 DNA 对阿霉素的嵌入位点随酸度不同而数量不同, 酸度越高嵌入位点越少, 当 pH 2.5 时, 这时的嵌入位点很少, 所以杯[8]胺的加入对 DNA-阿霉素的荧光强度影响很小, 几乎表现为一个平台。

### 2.3 DNA 盐效应

在阿霉素溶液中加入一定量的  $4.0$  mol · L<sup>-1</sup> NaCl 溶液, 然后逐渐加入 DNA 溶液, 结果发现, 不加 NaCl 时, 体系的荧光随 DNA 的加入而猝灭的更明显, 这说明了在高盐

浓度条件下, DNA 构象发生了变化, 使得嵌入位点减少, 故荧光猝灭程度减小。当向体系中逐渐加入不同量的杯[8]胺溶液时, 发现体系的荧光强度受杯[8]胺浓度影响小, 这与低盐浓度的情况不同[见图 4(b)], 这可能是随着盐溶液的加入即离子强度增大,  $\text{Na}^+$  等盐类阳离子部分中和了 DNA 表面的磷氧负离子, 导致 DNA 分子收缩<sup>[9]</sup>, 使得 DNA 可与杯[8]胺作用的位点减少, 故杯[8]胺的加入对上述体系的荧光影响不明显, 这更进一步说明了 DNA 与杯[8]胺之间作用方式主要是以静电作用为主。

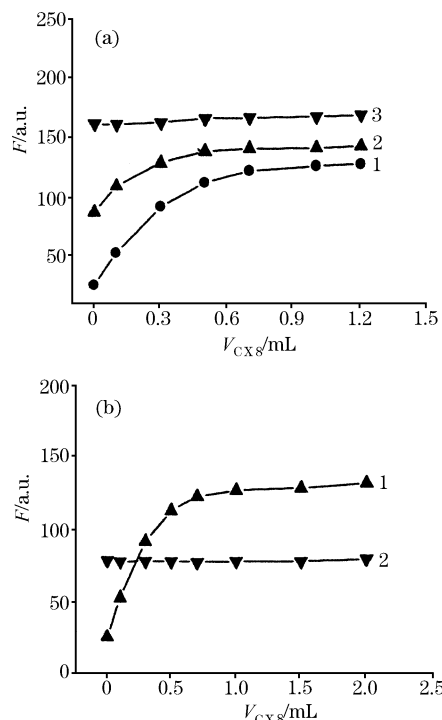


Fig. 4 The influence of calix [8] arene on the fluorescence intensity of DNA-ADM in the different pH value (a) and in the NaCl solution (b)

$$c_{\text{(DNA)}} = 1.86 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, c_{\text{(ADM)}} = 1.72 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, \\ c_{\text{CX8}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, c_{\text{NaCl}} = 4.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

(a), 1, pH 7.0; 2, pH 4.0; 3, pH 2.5

(b), 1, DNA+ADM+CX8; 2, DNA+ADM+NaCl+CX8

#### 2.4 DNA 解链后的影响

通常 DNA 是以双螺旋方式存在的, 本实验将 DNA 在沸水中加热 30 min, 冷却后用于实验。当向阿霉素溶液中加入解链的 DNA 时, 体系的荧光强度猝灭的程度要比加入正常 DNA 时的猝灭程度大, 这是由于 DNA 解链后, 单链 DNA 与阿霉素的作用除了嵌入作用外, 还包括部分的静电作用, 这两种作用的结果使得阿霉素荧光猝灭程度更大, 而正常 DNA 与阿霉素的作用主要是以嵌入作用为主。

由图 5 可以看出, 当向解链的 DNA-阿霉素溶液中逐渐加入杯[8]胺时, 体系的荧光强度开始变化不大, 然后逐渐增强, 但增加的幅度要比正常 DNA 条件下小。这可能是由于, DNA 解链后, 有更多的静电作用位点提供给阿霉素和杯[8]胺, 因而彼此之间相互影响较小; 另一方面, 解链后的

DNA 虽然有更多的磷氧负离子暴露出来, 与杯[8]胺之间的静电作用增强, 但此时它们之间的静电作用不能使 DNA 发生收缩即不能使 DNA 的构象发生改变(因为 DNA 已部分解链), 因而将阿霉素从 DNA 中挤出的可能性很小。

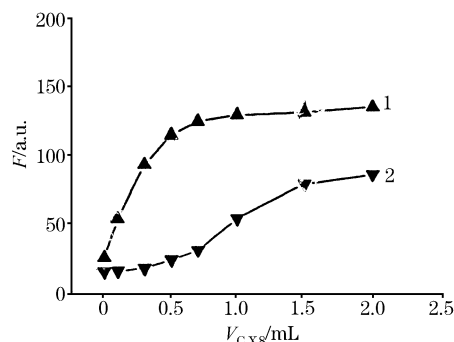


Fig. 5 The influence of the calix [8] arene on the fluorescence intensity of unlinking DNA-ADM and normal DNA-ADM

$$c_{\text{(DNA)}} = 1.86 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, c_{\text{(ADM)}} = 1.72 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, \\ c_{\text{CX8}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

1, Normal DNA; 2, Unlinking DNA

#### 2.5 Scatchard 图

Scatchard 方程可用于描述生物大分子(如 DNA 等)与其他小分子之间的作用方式<sup>[10]</sup>, 其表达式为:

$$r/c = K(n - r)$$

其中  $r$  表示 DNA 上平均每个核苷酸结合阿霉素(ADM)分子数,  $n$  表示每个核苷酸上的成键位点数,  $K$  表示每个位点固有的结合常数,  $c$  表示游离的阿霉素(ADM)的浓度。众多的实验表明, 可用 Scatchard 方程来判别小分子与 DNA 的结合方式, 当小分子以插入方式与 DNA 键合时, Scatchard 图中  $n$  值不变而  $K$  值改变(竞争型); 当小分子通过非插入方式与 DNA 键合时,  $K$  值不变而  $n$  变小(非竞争型); 当小分子与 DNA 的结合存在插入和非插入两种方式, 则表现为混合型,  $K$  值及  $n$  值都将改变<sup>[11, 12]</sup>。

上述研究已表明, 杯[8]胺对阿霉素的荧光光谱变化影响很小, 可认为它们之间无直接作用。

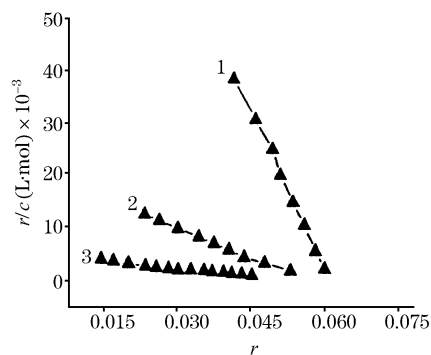


Fig. 6 Scatchard plot of DNA in the calix [8] arene

$$c_{\text{(DNA)}} = 1.86 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, c_{\text{(ADM)}} = 1.72 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \\ 1, c_{\text{CX8}} = 4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; 2, c_{\text{CX8}} = 6.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; \\ 3, c_{\text{CX8}} = 1.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

从 Scatchard 图(见图 6)可以看出,随着杯[8]胺的浓度增加,阿霉素与 DNA 固有的结合常数  $K$  迅速减小,同时  $n$  值变化相对较小,这说明了杯[8]胺和阿霉素与 DNA 之间可能发生了插入和非插入两种作用方式即混合型作用模式,即说明阿霉素与 DNA 之间的作用是以嵌入作用为主,同时也存在少部分的静电作用。

一方面,由于杯[8]胺是一类非平面大环化合物,与 DNA 发生嵌入作用的可能性很小,杯[8]胺通过强烈的静电作用中和了 DNA 上的磷酸负电荷,导致 DNA 收缩成球形,螺距变小,阿霉素与 DNA 嵌入作用变得松弛, $K$  减小,部分阿霉素游离,故荧光强度增加。

另一方面,杯[8]胺能与阿霉素存在直接的静电作用位点竞争,使  $K$  值和  $n$  值都发生变化,但变化的程度不同,这说明各种作用力的贡献不同。由于属混合作用模式,故杯

[8]胺与 DNA 之间作用方式涉及到疏水性作用和氢键作用是可能的,这有待于进一步研究。

本工作与医学有关,是一项很有意义的工作。先前,沈景山<sup>[13]</sup>等曾以盐酸小檗碱(BR)为荧光探针研究了抗癌药物与 DNA 的相互作用。

### 3 结 论

综上所述,水溶性的杯[8]胺与 DNA 之间主要存在强烈的静电作用,从 Scatchard 图中可看出,杯[8]胺对 DNA-阿霉素光谱的影响呈混合模式,一方面,杯[8]胺通过静电作用使 DNA 收缩成球形,使阿霉素与 DNA 的结合常数减小,部分嵌入的阿霉素游离;另一方面,杯[8]胺与小部分阿霉素存在静电作用位点竞争。

### 参 考 文 献

- [1] Zhang L, Godinez L A, et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34: 235.
- [2] Alam I, Gutsche C D. *J. Org. Chem.*, 1990, 55: 4487.
- [3] Shikai S, Kawabata H, Matsuda T. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1990, 63: 1272.
- [4] Arnaud N F, Fuangwasdi S, Notti A, et al. *Angewandte Chemie*, 1998, 37: 112.
- [5] Yamamoto H, Shinkai S. *Chem. Lett.*, 1994, (6): 1115.
- [6] HAN Bao-hang, LIU Yu, CHEN Rong-ti(韩宝航, 刘 育, 陈荣梯). *Acta Chim. Sinica(化学学报)*, 2001, 59: 550.
- [7] LI Wen-you, XU Jin-gou(李文友, 许金钩). *Analytical Chemistry: Achievements and Challenges(分析化学的成就与挑战)*. Chongqing: Southwest Normal University Press(重庆:西南师范大学出版社), 2000. 371.
- [8] Gutsche C D, Nam K C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110: 6153.
- [9] LI An-zhi, DING Mei, YU Hai-ying, et al(李安之, 丁 玫, 于海鹰, 等). *Acta. Physico-Chimica Sinica(物理化学学报)*, 1992, 8(2): 207.
- [10] LI Lai-sheng, HUANG Wei-dong, YAN Yuan(李来生, 黄伟东, 鄢 远). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2001, 21(5): 685.
- [11] GUO Mao-lin, YANG Pin, YANG Bin-sheng, et al(郭茂林, 杨 频, 杨斌盛, 等). *Chinese Science Bulletin(科学通报)*, 1995, 40(13): 1187.
- [12] JIN Lan, YANG Pin, LI Qing-shan(靳 兰, 杨 频, 李青山). *Chem. J. Chinese Univ. (高等学校化学学报)*, 1996, 17(9): 1345.
- [13] SHEN Jing-shan, SUN Dan-dan, FU Lian-chun, et al(沈景山, 孙丹丹, 付连春, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 25(2): 232.

## Study on the Interaction of Water-Soluble *p*-(N, N-Dimethylaminomethyl)calix[8]arene with DNA by Fluorescent Spectrometry

LI Lai-sheng, HUANG Zhi-bing, WANG Yu-xiao, LIU Xu, LI Yan-ping, GE Xiao-hui

The Center of Analysis and Testing, Nanchang University, Nanchang 330047, China

**Abstract** The interaction of water-soluble *p*-(N, N-dimethylaminomethyl)calix[8]arene (CX8) with DNA was studied using adriamycin(ADM) as a probe by fluorescent spectrometry. The effect factors such as, pH of solution, salt effect and unlinking DNA on the spectra were also investigated. The interaction mechanism was proposed. The authors observed that the fluorescence of ADM was quenched by calf thymus DNA, and the fluorescence intensity of DNA-ADM enhanced with the increasing of the CX8 gradually. The result indicates that the strong electrostatic interaction between the oxyphosphate anion of DNA and the CX8 existed. According to the plot of scatchard, the results imply that the influence of CX8 on interaction of DNA-ADM belongs to mixed model, on the one hand, in the condition of neutral and acidity, the oxyphosphate anion of DNA can be neutralized by CX8 partially, which induced the contraction of DNA and the conformational change of DNA, which led to release ADM from DNA partially, on the other hand, the CX8 can also compete the electrostatic sites with ADM directly.

**Keywords** Fluorescent spectrometry; Spectroscopic probe; Water-soluble calixarene; *p*-(N, N-dimethylaminomethyl)calix[8]arene; DNA

(Received Mar. 18, 2004; accepted May 28, 2004)