

核黄素光敏损伤 DNA 的凝胶电泳*

张连文

(聊城师范学院化学系, 聊城 252059)

林维真 潘景喜 韩镇辉 姚思德** 林念芸

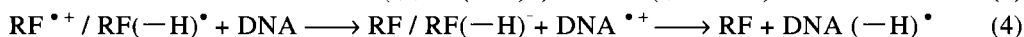
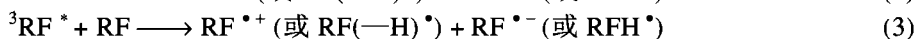
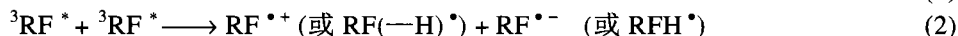
(中国科学院上海原子核研究所辐射化学实验室, 上海 201800)

摘要 以琼脂糖凝胶电泳研究了波长为 427~457 nm 可见光照射下核黄素(VB₂)光敏诱导的质粒 DNA 损伤, 结果发现 DNA 光敏损伤主要与照光量、核黄素和 DNA 浓度比、溶液中的氧气等有关. 在无氧条件下光敏损伤更为显著, 证明 VB₂ 光敏损伤 DNA 主要是通过 VB₂ 激发三重态与 DNA 碱基组分间发生电荷转移导致其产生氧化性损伤实现的. 表明核黄素光敏损伤 DNA 时最佳浓度比为 bp: VB₂ = 3.5: 1. 对照结果表明, 单链 DNA(ssDNA)比双链 DNA(dsDNA)的碱基更易被核黄素敏化发生损伤, 这可能是由于 ssDNA 中碱基暴露的原因.

关键词 光敏治疗 核黄素(VB₂) 琼脂糖凝胶电泳 质粒 DNA

肿瘤的光敏治疗主要是在特定波长光照射下通过光敏剂药物诱导肿瘤细胞 DNA 的碱基发生光氧化性损伤, 然后其损伤被一系列生化反应所固定, 导致肿瘤细胞某些基因失活, 抑制或阻断基因复制或表达, 最终导致细胞死亡, 达到治疗目的. 核黄素将成为这类光敏药物之一. Tyrrell 等人曾报道 DNA 并不吸收 UV-A (320~380 nm)和可见光, 然而, 经过一定剂量的此波段的光照射, 却能引发某些癌变, 原因是一些内源性色素(如核黄素、血卟啉等)的作用^[1]. 这些色素分子吸收一定波长的 UV-A 或可见光后激发产生三重态, 继而通过不同途径诱导 DNA 损伤. 研究发现, 光敏剂主要通过两种途径来引发 DNA 的光敏损伤: 一是光敏剂激发三重态与底物之间通过电子或氢原子转移诱发 DNA 的损伤; 二是光敏剂激发三重态将能量传递给氧分子产生单线态氧或通过电子转移产生超氧阴离子自由基, 继而引发 DNA 的损伤^[2].

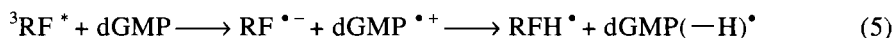
核黄素作为一种内源性的色素, 在光致损伤 DNA 产生突变过程中起着至关重要的作用. 有关它与碱基、核苷酸、多聚核苷酸以及 DNA 作用的瞬态研究, 陆长元等人及国内外其他学者已做了大量的工作. 研究发现, 核黄素光敏损伤 DNA 主要通过下述过程^[3]:



2000-05-18 收稿, 2000-09-29 收修改稿

* 国家自然科学基金 (批准号: 39830090) 与中国科学院 (批准号: KJ952-S₁-419) “九五”重点资助项目

** 联系人(E-mail: zhanglianwen@sohu.com)



瞬态研究表明, DNA 中鸟嘌呤是最容易发生光氧化反应的碱基^[4]. 在光敏损伤 DNA 的过程中, 核黄素的激发三重态(${}^3\text{RF}^*$)和氧化性自由基($\text{RF}^{\cdot+}$)起着关键性作用^[5~7]. 虽然氧气能够有效地猝灭核黄素的三重激发态产生单线态氧和超氧阴离子自由基, 但它们的量子产额较小, 分别是 0.48 和 0.009(可以忽略)^[8], 而且, 单线态氧、核黄素的三重激发态及核黄素氧化性自由基, 与 dGMP 的反应速率常数存在着较大的差距(分别为 5×10^6 对 6.6×10^8 和 $6.2 \times 10^8 \text{ dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{s})$ ^[9], 单线态氧与 DNA 的反应速率常数($7.4 \times 10^5 \text{ dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{s})$)^[10]比核黄素的三重激发态与 DNA 的反应速率常数($1.0 \times 10^7 \text{ dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{s})$)要低两个数量级. 另外, 通过终产物分析认为, 核黄素对 DNA 的光敏损伤是通过电子转移氧化而不是活性氧的途径产生 8-OxodG^[11~13]. 核黄素三重激发态与 ssDNA 和 dsDNA 反应的瞬态研究表明, 核黄素光引发产生的瞬态中间产物与 ssDNA 反应较快, 二者的反应速率常数分别为 5.7×10^7 和 $1.0 \times 10^7 \text{ dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{s})$ ^[1].

对照时间分辨研究结果, 本文采用琼脂糖凝胶电泳对光引发的核黄素光敏 DNA 损伤做了较为详细的研究, 主要目的是为了揭示核黄素对 DNA 的光敏损伤效果、二者的浓度比、溶液中氧气对光敏作用的影响, 以及核黄素敏化损伤 dsDNA 和 ssDNA 的差异, 从而阐明这种损伤的影响因素及损伤机制.

1 材料与方 法

1.1 药 品

采用链长约 5.5 kb 的质粒 DNA, 从克隆此质粒的大肠杆菌 37℃ 摇床培养 24 h 抽提而得, 纯化后以 260 nm 处吸光度确定其最终浓度为 4.6 mmol/L 碱基对(bp)(取 $\epsilon_{260} = 6600 \text{ dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ ^[14]. *Ecoli* I 限制性核酸内切酶购自生工生物工程有限公司; 哌啶为 Sigma 公司产品; 核黄素购自华美生物工程有限公司. 样品用 3 次蒸馏水配制, 电泳过程使用普通蒸馏水. 质粒 DNA 在使用前用 *Ecoli* I 酶消化. 除非特别说明实验所用 DNA 浓度一般为 0.23 mmol/L (碱基对浓度).

1.2 实验装置与检测方法

实验采用氙灯(380 W)作为光源, 构造见图 1. 在光源与样品池间放一凸透镜, 在样品池前放置中心透过波长为 442 nm, 波带宽为 30 nm 的干涉滤色片, 无干涉滤光片时测得焦点处光强为 $0.69 \times 10^{-6} \text{ einstien}/(\text{L} \cdot \text{s})$ (以 0.05 mol/L 的 KI 溶液标定, 参考 Jortner^[15]的工作).

岛津 UV-210A 双波长分光光度计用来测定核黄素在紫外-可见部分的吸收光谱.

以常规琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的光敏损伤效果, 并拍照记录电泳结果.

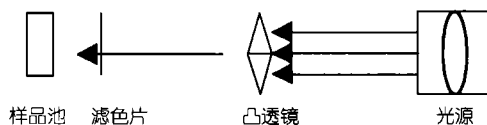


图 1 可见光辐照装置

2 结 果

2.1 照射光波长的选定

利用双波长分光光度计测得 0.04 mmol/L 的核黄素水溶液在 300~700 nm 之间的吸收谱(图

1) 部分工作已 成 文

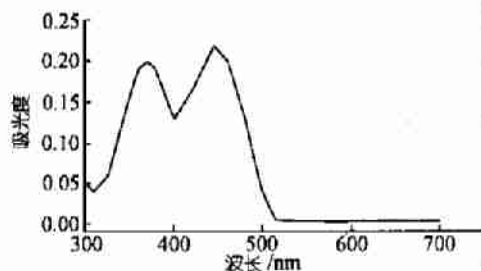


图 2 紫外-可见光吸收谱(0.04 mmol/L 的核黄素水溶液)

溶液以空气饱和, 光照 30 min, 观察光敏效果的变化. 实验结果(图 4)表明, 在一定的浓度范围内, 随着核黄素量的增加, 经电泳后的特征条带逐渐消失并伴随出现 DNA 碎片亮带, 但当超过了这一浓度比($r = \text{bp}/\text{VB}_2$) < 1 : 3, VB_2 浓度的增加反而会使特征条带再次出现, 减弱了光敏损伤.

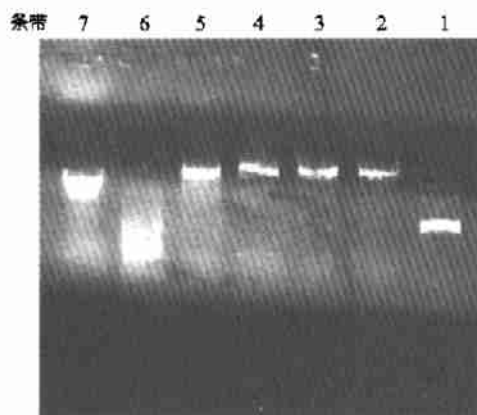


图 3 照光量对 DNA 光敏损伤的影响
光照一定浓度的核黄素和 DNA 混合溶液, 不同时间取样. 1 示 $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$ 对照, 2~7 分别示 0, 5, 15, 30, 60, 60 min 光照, 7 号样品光照后没有处理

2.4 氧气的影响

混合 0.23 mmol/L DNA 和 0.065 mmol/L 核黄素, 分别以空气饱和、通氮气及氧气 10 min, 光照 20 min, 经相同方法处理后得到电泳结果(图 5), 表明氧气存在时 DNA 的特征条带没有消失, 而通氮气的样品特征条带消失并伴随产生 DNA 碎片亮带. 说明溶液中的氧气会使光敏效果降低, 除氧溶液中能发生有效的的光敏损伤.

2.5 bp/VB_2 浓度比的影响

以核黄素浓度为 0.0266 mmol/L ($A_{442} = 0.246$), 改变 DNA 的量, 混匀后通氮气 10 min, 光

2), 从图中可以看出核黄素在这段范围内存在两个吸收峰(370 和 445 nm), 因此本实验中选择了透射波长为 427~457 nm 的干涉滤色片滤光.

2.2 照光量的影响

将 0.23 mmol/L 样品 DNA 和 0.055 mmol/L 核黄素混合, 空气饱和, 光照不同时间, 然后加 0.3 mol/L 哌啶, 并在 90°C 水浴中孵育 30 min, 做凝胶电泳分析^[2, 16, 17](图 3). 选择光照时间为 30 min.

2.3 核黄素浓度的影响

取 DNA 浓度为 0.23 mmol/L, 改变核黄素的量,

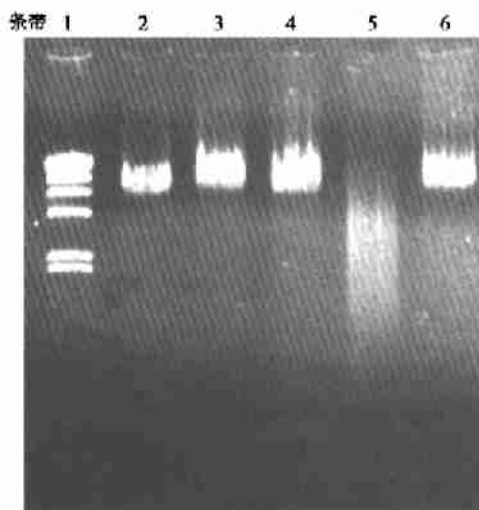


图 4 核黄素浓度对光敏效果的影响
以空气饱和, 光照 30 min, DNA 浓度为 0.23 mmol/L, 改变核黄素的浓度使 VB_2 : DNA 分别为 0, 0.12, 0.24, 0.36, 0.48, 对应的条带号分别是 2~6, 1 示 $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$ 对照

照 20 min, 经热、哌啶处理后做凝胶电泳. 结果发现: 当 $bp/VB_2 = 3.5 : 1$ 时, DNA 特征条带消失, 并在前方出现 DNA 碎片亮带, 标志着 DNA 的断裂, 表明此浓度比时光敏效果最为显著. 作为对照的 DNA 水溶液光照 45 min, 同样处理后电泳, 未发现 DNA 断裂现象(图 6).

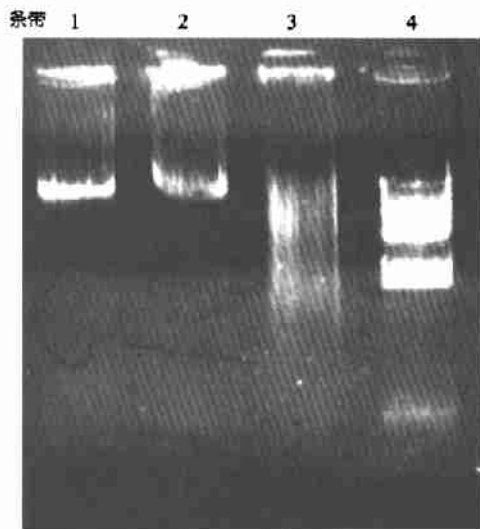


图5 氧气对光敏损伤效果的影响

光照 20 min, 核黄素浓度为 0.23 mmol/L, VB_2 和 DNA 的浓度比为 1 : 3.5, 分别通 N_2 , O_2 10 min, 或以空气饱和, 对应条带是: 1(O_2), 2(空气), 3(N_2), 4 示 λ DNA/*Hind* III 对照

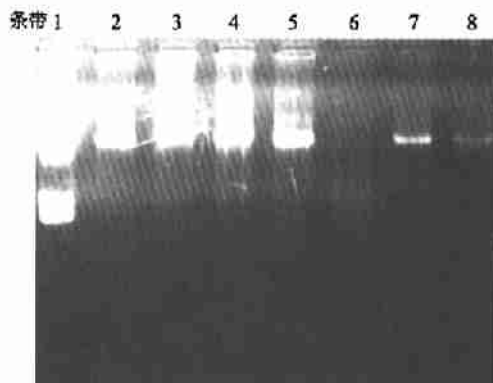


图6 浓度比 r (bp/VB_2) 对于核黄素光敏损伤 DNA 的影响

通氮气 10 min, 光照 20 min, 核黄素浓度为 0.0266 mmol/L ($A_{442} = 0.246$). 3-8 分别表示 $r = 7, 6, 5, 3.5, 2.5, 1.7$, 1 示 λ DNA/*Hind* III 对照, 2 示不加核黄素光照 45 min 的样品对照

2.6 核黄素对 ssDNA 和 dsDNA 的光敏损伤比较

将样品 DNA 置于 95℃ 水浴中加热 5 min, 然后在冰盐水中骤冷, 制备 ssDNA. 以 0.46 mmol/L (碱基浓度) 的 ssDNA 和 0.065 mmol/L 的核黄素混合, 通氮气脱氧, 光照 15 min, 以相同碱基浓度的 dsDNA 和 0.065 mmol/L VB_2 溶液光照后作为对照, 经一系列相同条件处理后进行电泳. 发现只用 0.3 mol/L 哌啶室温下处理 30 min 或单以 90℃ 水浴孵育 30 min, 光照过的 ssDNA 和 dsDNA 电泳条带中均未发现特征条带消失, 如同时以 0.3 mol/L 哌啶在 90℃ 水浴孵育 30 min, 实验中 ssDNA 特征条带消失并产生了 DNA 碎片亮带, 相同条件下 dsDNA 特征条带没有消失. 这表明 ssDNA 较之 dsDNA 更易在光照条件下为核黄素诱发产生损伤(图 7).

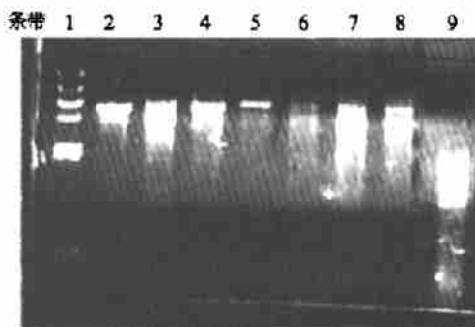


图7 核黄素光敏损伤 ssDNA 和 dsDNA 除氧条件下, 光照 15 min. 2-5 对应 dsDNA 样品, 6-9 对应 ssDNA 样品. 2, 6 只经光照; 3, 7 光照后水浴处理; 4, 8 光照后哌啶处理; 5, 9 光照后哌啶处理并 90℃ 孵育 30 min. 1 示 λ DNA/*Hind* III 对照

3 讨论

核黄素的紫外-可见光最大光吸收在 445 nm 附近. 为了得到最大量子产额的激发态, 获得

有效的光敏损伤,同时考虑医疗应用的安全性,本实验选择了中心波长在 442 nm,波带宽为 30 nm 的干涉滤色片.

相同条件下,随光照时间延长,电泳中出现的 DNA 碎片亮带越发明显,当光照至 60 min,特征条带完全消失.图 3 中 5,6 两号样品光照时间一致,只是热孵育时 6 号样无 0.3 mol/L 吡啶,结果表明只有加了吡啶的受照 DNA 才发生 DNA 链断裂,这是因为核黄素的光敏损伤仅是在 DNA 碱基上引起了损伤和修饰,并不直接导致链断裂;而加入吡啶并辅以热孵育,导致了吡啶敏感位点上碱基的损伤脱落,并进一步在该处发生链断裂.

在一定浓度范围内,光敏损伤程度随着溶液中核黄素比例的增加而加强,而过多则会减弱这种损伤,这可以解释为核黄素激发态自身猝灭所致.主要反应有:



从浓度太大时引起损伤程度的减弱这一现象可以推测这种光敏损伤最有可能通过核黄素激发态三重态途径:



若通过其氧化性自由基 $\text{RF}^{\bullet+}$ 与 DNA 作用,则自猝灭能够产生大量氧化性自由基,且在与 dGMP 反应时,这种氧化性自由基的反应速率常数基本等同于三重激发态,因此不应减弱光敏损伤.

溶液中的氧气会削弱光敏损伤,据此可以推测核黄素对 DNA 的光敏损伤主要通过其三重态与 DNA 反应引起,而不是通过活性氧的途径.这是因为核黄素的三重激发态被氧气猝灭而产生的单线态氧的寿命比核黄素的三重激发态寿命短(核黄素的三重激发态和单线态氧的半衰期分别是 $t_{1/2} = 8.6$ 和 $t_{1/2} = 4.2 \mu\text{s}$)^[9, 18],而且它与 DNA 的反应速率常数($7.4 \times 10^5 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$)^[10]比核黄素的三重激发态与 DNA 直接反应的速率常数($1.0 \times 10^7 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$)低很多,单线态氧可能在损伤 DNA 之前已衰减为不具损伤活性的 O_2 .

核黄素的三联环平面结构特征及环上能够形成氢键的 N, O 元素的存在,表明其嵌入核酸双链的可能性.当核黄素的相对浓度较大,即 bp/VB_2 值较小时,由于未嵌入核黄素的量较大,较嵌入核黄素优先吸收光能而被激发.三重态的自猝灭,以及嵌入核黄素导致的空间阻力使光敏损伤不显著.当 bp/VB_2 约为 3.5 : 1,嵌入核黄素达到饱和,吸收光后产生的激发三重态很容易与碱基反应.但 DNA 的量超出这一范围继续增大时,由于嵌入核黄素的减少,而使得碱基发生光敏反应的机会大大减少.这说明核黄素光敏损伤 DNA 时, DNA 和核黄素的最佳浓度比为 3.5 : 1.

单、双链 DNA 的对比研究表明,它们的损伤机制一致,光敏损伤的结果只是诱导了碱基的损伤,而不是链断裂,但相同条件下 ssDNA 更易被损伤.这可能是因为 ssDNA 较之 dsDNA,其大部分碱基由于没有配对而暴露于外,更易与核黄素三重激发态反应而被损伤的缘故.这种假说是否成立,是否有其他因子作用,还需要设计实验做进一步的探讨.

综上所述,核黄素在脱氧条件下,经 442 nm 波长可见光照射,能够诱导 DNA 链上的碱基损伤,凝胶电泳研究结果与时间分辨瞬态研究结果的一致性^[3, 5~7, 11~13]为瞬态研究的结论提供了佐证.本文的结果揭示了三重激发态是核黄素光敏损伤 DNA 的主要过程.核黄素光敏损伤 DNA 的机理与文献报道的某些卟啉类光敏剂存在着显著的区别,卟啉类主要通过单线态氧等

活性氧的途径导致 DNA 的损伤, 在氧气充足的条件下光敏效果更佳^[19, 20]。某些实体瘤细胞由于处于缺氧状态而降低了肿瘤光动力治疗的疗效, 乏氧细胞对光动力治疗的抗拒性困扰着许多医疗工作者^[21~23], 本研究结果为这类肿瘤的光敏治疗提供了可靠的理论依据。核黄素光敏损伤 DNA 不需氧参与的特点, 在医疗方面应有良好的应用前景。

4 结论

核黄素作为一种内源性色素, 具有对人体无毒副作用的优点。在脱氧条件下, 以 427~457 nm 波长可见光照射而诱发质粒 DNA 碱基损伤, 其损伤经哌啶热处理后, 以琼脂糖凝胶电泳检测, 观测到 DNA 链断裂。研究发现核黄素的光敏作用主要与照光量(20~30 min 最佳)、光敏剂与 DNA 碱基对的浓度比(1:3.5 最佳)、样品中的氧气等有关, 无氧条件有利于核黄素对 DNA 的光敏损伤。证明了 VB₂ 光敏损伤 DNA 主要是通过 VB₂ 激发三重态与 DNA 碱基组分作用导致后者产生氧化性损伤实现的, 这对于乏氧肿瘤细胞的光敏治疗十分有意义。并发现了 ssDNA 与 dsDNA 的光敏损伤遵循相同的机理, 但 ssDNA 比 dsDNA 更易发生光敏损伤。

参 考 文 献

- 1 Tyrrell R M, Keyse S M. New trends in photobiology: the interaction of UV-a radiation with culture cells. *J Photochem Photobiol*, 1990, 4: 349~361
- 2 Ito K, Inoue S, Yamamoto K, et al. 8-hydroxydeoxyguanosine formation at the 5'-site of 5'-GG-3' sequences in double-strand DNA by UV radiation with riboflavin. *J Bio Chem*, 1993, 268(18): 13221~13227
- 3 Lu C Y, Wang W F, Lin W Z, et al. Generation and photosensitization of the oxidized radical of riboflavin: a laser flash photolysis study. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 2000, 52(1-3): 111~116
- 4 Sugiyama H, Saito I. Mechanism of DNA strand cleavage by antitumor and antibiotics. *J Am Chem Soc*, 1996, 118: 7063~7068
- 5 Knowles A. Flavine sensitized photooxidation of nucleotides, II participation of the flavin triplet. *Photochem Photobiol*, 1971, 13: 225~236
- 6 Kasai H, Yamaizumi Z, Berger M, et al. Photosensitized formation of 7, 8-dihydro-8-2'-deoxyguanosine(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in DNA by riboflavin: A non singlet oxygen mediated reaction. *J Am Chem Soc*, 1992, 114: 9692~9694
- 7 Midden W R, Wang S Y. Singlet oxygen generation for solution kinetic: clean and simple. *J Am Chem Soc*, 1983, 105: 4129~4135
- 8 Krishna C M, Uppuluri S, Riesz P, et al. A study of the photodynamic efficiencies of some eye lens constituents. *Photochemistry Photobiology*, 1991, 54: 51~58
- 9 Lu C Y, Lin W Z, Wang W F, et al. Riboflavin(VB₂) photosensitized oxidation of 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate (dGMP) in aqueous solution: a transient intermediate study. *Phys Chem Chem Phys*, 2000, 2: 329~335
- 10 Kino K, Saito I, Sugiyama H. Product analysis of GC-specific photooxidation of DNA via electron transfer: 2-amino imidazole as a major guanine oxidation product. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 7373
- 11 Davila J, Harriman A. Photosensitized oxidation of biomaterials and related model compounds. *Photochem Photobiol*, 1989, 50: 29~35
- 12 Heelis P F, Parsons B J, Thomas B, et al. One-electron oxidation of flavin's triplet state as studied by laser flash photolysis. *J Chem Soc, Chem Commun*, 1985, 14: 954~955
- 13 Cadet J, Decarroz C, Wang S Y, et al. Mechanism and products of photosensitized degradation of nucleic acids and related model compounds. *J Chem Isr*, 1983, 23: 420~429
- 14 Mahler H R, Cordes E H. *Nucleic Acids. Biological Chemistry*. New York: Harper Row, 1966. 159

- 15 Jortner J, Ottolenghi M, Levine R, et al. The photochemistry of the iodide ion in aqueous solution. *J Phys Chem*, 1961, 65: 1232~1238
- 16 Croke D T, Perrouault L, Sari M A, et al. Structure-activity relationships for DNA photo-cleavage of cationic porphyrins. *J Photochem Photobiol*, 1993, 18: 41~51
- 17 Stemp E D A, Arkin M R, Barton J K. Oxidation of guanine in DNA by Ru(phen)₂(dppz)³⁺ using the flash-quenching technique. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 2921~2925
- 18 Michael A, Rodgers J. Solvent induced deactivation of singlet oxygen: additivity relationships in nonaromatic solvents., *J Am Chem Soc*, 1983, 105(20): 6201~6205
- 19 Chatter S R, Shetty S J, Devasagayam T P A, et al. Photocleavage of plasmid DNA by the porphyrin meso-tertrkis [(4-carboxymethyleneoxy)Phenyl]porphyrin. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 1997, 41: 128~135
- 20 Kawanishi S, Inoue S, Sano S, et al. Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (II) in the presence of hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 1986, 261: 6090~6095
- 21 郑秀龙, 金一尊, 沈 瑜. 肿瘤治疗增敏药. 上海: 上海科学技术出版社, 1996. 37
- 22 高元红, 扬伟志, 徐国慎. 肿瘤乏氧问题的研究现状. *国外医学肿瘤学分册*, 1999, 26(5): 270~273
- 23 Brown J M, Giaccia A J. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Research*, 1998, 58: 1408~1416