

## 研究简报

# 22 甲基 21, 42 萘醌对 DNA 光敏损伤的诱导作用

张连文<sup>1</sup>, 林维真<sup>2</sup>, 姚思德<sup>2</sup>, 林念芸<sup>2</sup>(1. 聊城师范学院 化学系, 山东聊城 252059; 2. 中国科学院 上海原子核研究所  
辐射化学开放实验室, 上海 8002204 邮政信箱 201800)

**摘要:** 选择波长 337 nm 的激光作为激励光源, 借助凝胶电泳研究了 22 甲基 21, 42 萘醌诱导的 DNA 光敏损伤。结果表明: 在氧气饱和、脱氧条件下光敏损伤显著, DNA 损伤主要与光子剂量、核酸与萘醌浓度比及 DNA 存在形式有关。

**关键词:** 22 甲基 21, 42 萘醌; 光敏损伤; 琼脂糖凝胶电泳

文章编号: 10003231(2002)052035206 中图分类号: O64 文献标识码: A

近几十年来, 关于醌类物质的研究屡有报道, 它们不单在有氧呼吸及光合作用的能量传递过程中起着重要作用, 许多醌类物质亦具有其它生物活性, 某些外源性醌类衍生物作为抗生素或抗肿瘤药物已应用于医疗。22 甲基 21, 42 萘醌(MQ, 即维生素 K<sub>3</sub>) 是一种重要的光敏剂, 对其光化学性质及生化作用的研究早有文献报道<sup>[2,4]</sup>, Fisher 等人曾报道过 MQ 对细胞的光敏杀伤作用<sup>[5]</sup>, Waggoner 等人报道了 MQ 光敏诱导 DNA 产生单链断裂<sup>[6]</sup>。马建华等通过研究 22 甲基 21, 42 萘醌光敏损伤各种碱基、核苷酸及 DNA 的瞬态反应过程, 认为 MQ 光敏损伤各种碱基、核苷酸均能产生相应碱基的阳离子自由基; 光敏损伤 DNA 只产生鸟嘌呤的阳离子自由基(因为 MQ 激发三重态与几种碱基的反应活性存在着一定的差异, 鸟嘌呤是最易受损伤的碱基, 这是由鸟嘌呤较低的氧化还原电位决定的)<sup>[1]</sup>。

本文研究了 22 甲基 21, 42 萘醌诱导产生 DNA 光敏损伤的几种影响因素, 并与瞬态分析结果相互印证, 增强了研究结果的说服力。

## 1 材料与方 法

收稿日期: 200211223; 修回日期: 200202214; 通讯联系人: 姚思德、林维真

基金项目: 中国自然科学基金委/九五 0 重点项目(39830090); 中国科学院/九五 0 重点项目(KJ9522S2419)

作者简介: 张连文(1973-), 男, 助教, 主要从事光敏剂的光化学性质和 DNA 的光敏损伤研究。

E-mail: zhanglianwen@sohu.com.

<sup>1</sup> 马建华. 醌类光敏剂电子转移光氧化 DNA 及其组分的激光光解研究(博士论文). 上海: 中国科学院上海原子核研究所, 1999.

### 1.1 样品与试剂

实验所用 DNA 为链长 5.5 Kb 的质粒 DNA, DNA 浓度为 4.6 mmol/L (取  $E_{260} = 6600 \text{ (mol/L)}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )<sup>[7]</sup>. *E. coli* 核酸内切酶购自华美生物工程有限公司, 吡啶、2,4-二甲基-6-萘醌分别为 Sigma 公司和 Fluka 公司产品, 其它试剂购自上海生物工程有限公司. 质粒 DNA 在使用前用 *E. coli* 核酸内切酶切, 得线性化双链 DNA, 实验所用 DNA 浓度一般指碱基对浓度.

### 1.2 仪器及方法

采用氮分子激光器作为激励光源, 提供波长 337 nm、脉宽 20 ns 的脉冲激光, 单脉冲最大能量为 5 mJ (由激光计量计测得), 本实验中单脉冲能量为 2 ~ 3 mJ. DNA 样品(水溶液)在石英样品池中进行光照, 为减小实验误差, 采取增加照光次数的方法, 并通过控制充电时间, 使单脉冲激光加亮值保持在一定范围内. 除非特别说明, 样品光照后加入吡啶 (浓度为 0.3 mmol/L), 置于 90 °C 水浴中恒温 30 min. 借助琼脂糖凝胶电泳检测实验结果并拍照片记录, 所用琼脂糖质量分数为 0.7 %, 采用 TAE 电泳缓冲溶液, 以 EB 染色制胶.

ssDNA 通过 95 °C DNA 解链, 冰盐水骤冷的方法制得.

## 2 研究结果

### 2.1 2,4-二甲基-6-萘醌的吸收波长

配制 0.5 mmol/L 的 MQ 水溶液, 用 UV 210A 紫外-可见双波长分光光度仪 (岛津, 日本) 测得其在 300 ~ 700 nm 范围内的吸收谱 (见图 1). 表明 MQ 的最大吸收在 330 nm. 在固定浓度的 MQ 溶液中, 加入不同量的 DNA, 比较 330 nm 处的吸收, 结果显示吸收值没有发生改变.

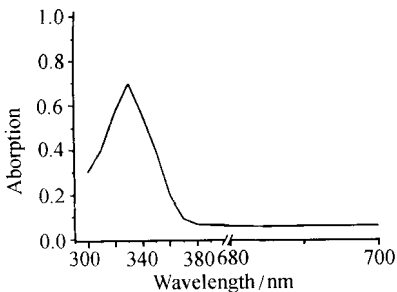


图 1 0.5 mmol/L 2,4-二甲基-6-萘醌的吸收光谱  
The absorption spectrum of 0.5 mmol/L 2-methyl, 4-naphthoquinone

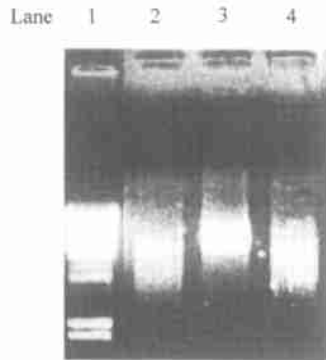


图 2 氧气影响

条带 1) 4 分别表示 KDNA/Hin d 330 nm、氧气饱和和照激光 30 次、对照 (不照激光)、氮气饱和和照激光 30 次

Oxygen effect

lane 1 is the marker KDNA/Hin d 330 nm, lane 2, 4 are samples irradiated for 30 times and saturated with oxygen or nitrogen respectively, lane 3 is a contrast without laser irradiation

## 2.2 氧气的影响

配制 MQ 和 DNA 混合溶液,二者浓度分别为 0.7 mmol/L 和 0.46 mmol/L. 依下列条件进行实验: 1. 空气饱和, 不照激光(作为对照); 2. 氮气饱和, 照激光 30 次; 3. 氧气饱和, 照激光 30 次. 电泳结果见图 2.

## 2.3 光子剂量的影响

配制 MQ 和 DNA 的混合溶液 150 LL, 二者浓度分别为 0.7 mmol/L 和 0.46 mmol/L, 在氮气饱和条件下, 照激光不同次数, 各取样 15 LL. 电泳结果见图 3.

## 2.4 浓度比的影响

配制 1.3 mmol/L 的 MQ 溶液和 1 mmol/L 的 DNA 溶液, 取 MQ 溶液 20 LL, 然后分别加入 DNA 溶液 0 LL、10 LL、15 LL、20 LL、30 LL, 并加水至总体积为 50 LL, 氮气饱和条件下照激光 30 次. 电泳结果见图 4.

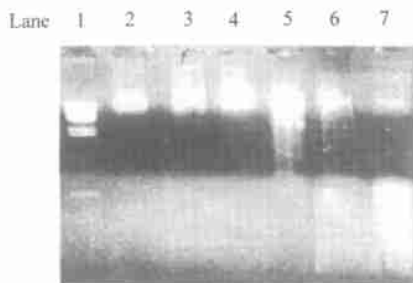


图 3 光子剂量的影响

条带 1 表示 KDNA/Hin d N N N, 条带 2 表示照激光 60 次不做哌啶处理, 条带 3) 7 表示照激光不同的次数: 0、10、20、30、40、60

Effect of photon dosage

lane 1 is the marker KDNA/Hin d N N N, lane 2 is irradiated 60 times and without the piperidine treatment, lane 3- 7 are samples irradiated for 0, 10, 20, 30, 40, 60 times respectively

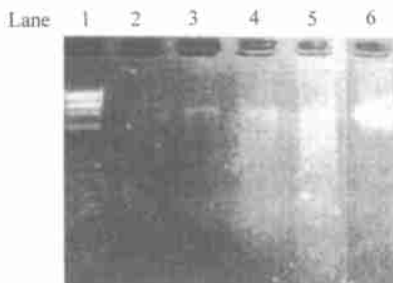


图 4 浓度比的影响

条带 1 表示 KDNA/Hin d N N N, 条带 2 无 DNA 作对照, 条带 3) 6 分别表示 MQ/bp= 2.6、1.73、1.3、0.9

Effect of the ratio

lane 1 is the marker KDNA/Hin d N N N, lane 2 is a contrast without DNA, lane 3- 6 are samples with the ratio MQ/ bp= 2.6、1.73、1.3、0.9

## 2.5 ssDNA 与 dsDNA 光敏损伤结果对比

将制备的 ssDNA( 碱基浓度 0.8 mmol/L) 分成两份, 一份 20 LL 加等体积的水, 作为对照; 另一份 80 LL 加等体积 1.3 mmol/L 的 MQ 溶液. 氮气饱和条件下, 加 MQ 的样品溶液照激光 20 次, 然后分为 4 份, 各取 15 LL, 依下列条件进行实验: 不处理、90 e 恒温 30 min、加哌啶、加入哌啶且 90 e 恒温 30 min. 以相同碱基浓度的 dsDNA 经相同方法处理进行实验, 通过凝胶电泳比较两种不同形式 DNA 的光敏损伤效果. 实验结果见图 5.

## 3 讨论

紫外2可见吸收图谱显示, 在 300) 700 nm 范围内, MQ 只存在一个吸收峰, 位于 330 nm 附近. 为此, 本研究采用波长为 337 nm 的激光作为激励光源激发 MQ 产生它的激发态.

激光激发使 MQ 产生其激发三重态, 后者通过一系列复杂的过程与碱基发生反应从

而造成 DNA 的损伤. 图 2 显示, 氮气饱和条件下, 样品 DNA 条带消失, 出现由不同分子

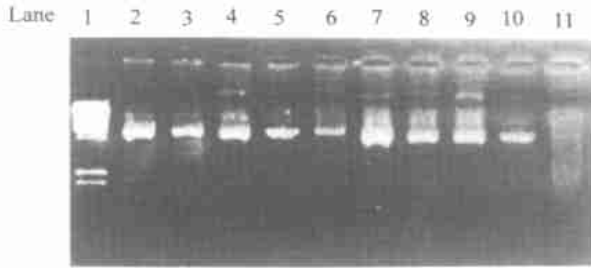


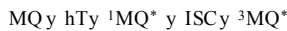
图 5 光敏损伤 ssDNA 与 dsDNA

条带 1 表示 KDNA/Hin d  $\overline{NNN}$ , 条带 2) 6 表示 dsDNA, 7) 11 表示 ssDNA, 2、7 不照激光作对照, 其它均照激光 20 次. 3、8 不处理; 4、9 只做热处理; 5、10 只加哌啶; 6、11 哌啶加热处理

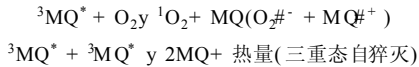
Photosensitization damage of ssDNA and dsDNA

lane 1 is the marker KDNA/Hin d  $\overline{NNN}$ , lane 2- 6 are dsDNA samples, lane 7- 11 are ssDNA samples, 2, 7 are contrast without laser irradiation, other samples are all irradiated for 20 times. 3, 8 are not disposed after irradiation; 4, 9 only incubated at 90 e; 5, 10 only disposed with piperidine; 6, 11 treated with piperidine and incubated at 90 e  
量 DNA 碎片形成的亮带, 而氧气饱和条件下仍隐约可见该 DNA 条带(可能溶液中分子氧的存在会减弱光敏损伤). 这一过程可解释如下:

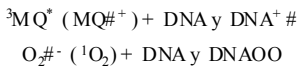
激发阶段:



转移阶段:



反应阶段:



无论激发三重态、单重态氧还是超氧阴离子自由基, 都有极高的反应活性, MQ 激发三重态与 DNA 反应可以夺取碱基上的电子, 从而产生碱基阳离子自由基; 单重态氧则易于和 DNA 分子中的鸟嘌呤反应, 经内过氧化物中间态生成 8 羟基鸟苷并进而转变为更加稳定的咪唑啉酮和 唑酮<sup>[8]</sup>. 超氧阴离子自由基、单重态氧、MQ 激发三重态与 dGMP 的反应速率常数存在着较大的差距(分别为:  $< 10^6 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $5 @ 10^6 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  和  $5.9 @ 10^9 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )<sup>[1, 9, 10]</sup>, 这可以从理论上解释为什么氧气的存在会减弱 MQ 激发三重态对 DNA 的损伤. 本实验结果表明: MQ 光敏损伤 DNA 可以通过激发态与底物直接反应或通过氧的参与与底物间接反应.

在除氧条件下, MQ 激发三重态成为导致 DNA 光敏损伤的主要因素. 但激发三重态在溶液中并不稳定, 它会通过多种途径衰减而回到基态. 在 DNA 溶液中, MQ 会以一定比例镶嵌到 DNA 双链大沟之中, 马建华等人用圆二色谱方法测定了 MQ 嵌入小牛胸腺 DNA 时的浓度比为 bp/MQ= 1.5B1. 本研究中紫外吸收表明 DNA 的加入并没有引起 MQ 在 330 nm 处吸收值的变化, 因此不会由于 DNA 的加入而影响 MQ 激发三重态的量子产率. 图 4 显示, 与其它条件下相比, 当 bp/MQ= 1B1.3 时, 光敏损伤最为显著. 这可能是由于 bp/MQ < 1B1.3 时, 有较多的 MQ 游离于溶液中, 当激光作用时, 会产生较多的 MQ 激发三重态(在一定浓度范围内, 受一定剂量激光激发所产生激发态的量与光敏剂

的浓度成正比), 部分 MQ 与 DNA 的嵌合阻碍了激发三重态与深藏于核酸双链内部的碱基之间的反应; 另一方面, 游离 MQ 和嵌合 MQ 各自产生的激发态会发生反应, 得到基态产物或低反应活性的瞬态粒子, 致使光敏损伤效果减弱. 随着 DNA 量的增加, 游离 MQ 的量逐渐减少, 激发光主要被嵌合 MQ 吸收产生激发三重态, 由于 MQ 嵌合于核酸双链中, 较短的作用距离使得 MQ 激发三重态很容易与碱基反应导致 DNA 损伤. 当 DNA 量超出了一定浓度, 由于多余 DNA 的存在, 电泳结果中显示出该 DNA 条带.

图 5 表明, 较之 dsDNA, MQ 激发三重态更易诱导 ssDNA 产生损伤, 这应归因于 ssDNA 中碱基暴露的特点, 碱基的暴露使它更易于和 MQ 的激发三重态发生反应而受到损伤. 在 dsDNA 中, 由于碱基组分在 DNA 双链内部, 外面有核糖和磷酸, 虽然平面型结构的 MQ 分子可以通过范德华力(应该有部分氢键)嵌入 DNA 双链的大沟中而减小与碱基之间的作用距离, 但这种作用距离与氢键相比还是太大了. ssDNA 则不同, 由于碱基的暴露, 使 MQ 以氢键与其结合成为可能, 从作用距离讲, 以氢键结合的 MQ 激发三重态更有利于与碱基发生反应. 从图 5 可以看出, 无论哪种形式的 DNA, 光照后不处理、不加哌啶处理或者只加哌啶而不经加热处理, 均无 DNA 碎片产生. 说明 DNA 断链并不是光敏损伤的直接结果, 光敏损伤只是发生于 DNA 链的某些碱基上, 受损伤碱基在链上的丢失, 使得碱性条件下的 DNA 链更加不稳定, 最终导致 DNA 链断裂.

#### 4 结论

综上所述, 光激发 MQ 诱导的 DNA 光敏损伤与光子剂量、氧气的存在、DNA 链的存在形式等有很大关系. 光子剂量越大, 碱基组分越是暴露, DNA 越是易于发生光敏损伤. 从理论上讲, 在活体细胞的某一阶段中, 尤其是早期肿瘤细胞, 由于细胞不断分裂, DNA 的不断复制, 碱基的暴露会给反应活性物质更多的进攻机会, 这也正是光敏治疗前期肿瘤的优势. 另外, 鉴于一些实体瘤细胞中氧的缺乏<sup>[11, 12]</sup>, 也可用 MQ 对这类肿瘤的光敏治疗做一些初步的探索.

#### 参考文献:

- [1] Loeffl I, Kan Y, Amittage B, et al. Interactions of formate ion with triplet of anthraquinone, 1,4-naphthoquinone, benzophenone-2-carboxylate and benzophenone-2-sulfonate[J]. J. Phys. Chem., 1991, 95: 442324430.
- [2] Fisher G, Land E J. Photosensitization of pyrimidines by 2-methylnaphthoquinone in water: a laser flash photolysis study[J]. Photochem. Photobiol., 1983, 37: 22-32.
- [3] Patel K B, Willson R L. Semiquinone free radicals and oxygen. Pulse radiolysis study of one electron transfer equilibria[J]. J. Chem. Soc., Faraday Trans., 1973, 69: 8142825.
- [4] Wagner J R, Vanlier J E, Johnston L J. Quinone sensitized electron transfer photooxidation of nucleic acids: chemistry of thymine and thymidine radical cations in aqueous solution[J]. Photochem. Photobiol., 1990, 52: 3332343.
- [5] Fisher G J, Watts M E, Patel K B, et al. Sensitization of ultraviolet radiation damage in bacterial and mammalian cells[J]. Br. J. Cancer, 1978, 37: Suppl. 0. 1112114.
- [6] Wagner J R, Cadet J E, Fisher G J. Photooxidation of thymine sensitized by 2-methyl-2,4-naphthoquinone: analysis of products including three novel photodimers[J]. Photochem. Photobiol., 1984, 40: 5892597.
- [7] Daniele Praseuth, Alain Gaudemer, Jean-Baptiste Verlhac, et al. Photocleavage of DNA in the presence of synthetic water-soluble porphyrins[J]. Photochem. Photobiol., 1986, 6: 7172724.

- [8] Changyuan Lu, Weizhen Lin, Wenfeng Wang, et al. Riboflavin(Vb<sub>2</sub>) photosensitized oxidation of 2-deoxyguanosine 5'-monophosphate(dGMP) in aqueous solution: a transient intermediates study[J]. Phys. Chem. Chem. Phys., 2000 (2): 3292335.
- [9] Lee P C C, Rodgers M A J. Laser flash photokinetic studies of rose bengal sensitized photodynamic interactions of nucleotides and DNA[J]. Photochem. Photobiol., 1987, 45: 79286.
- [10] Chim Shen, Christopher S Foote. Reactivity toward singlet oxygen of a 7,8-dihydro-2-oxoguanosine (8-hydroxyguanosine) formed by photooxidation of a guanosine derivative[J]. J. Am. Chem. Soc., 1995, 117: 643926442.
- [11] 高远红, 杨伟志, 徐国镇. 肿瘤乏氧问题的研究现状[J]. 国外医学肿瘤学分册, 1999, 26(5): 270273.  
Gao Y H, Yang W Z, Xu G Z. The study on hypoxia problem of tumor[J]. Foreign Medical Sciences Section on Oncology, 1999, 26(5): 270273.
- [12] J Martin Brown, Amato J Giaccia. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy[J]. Cancer Research, 1998, 58: 140821416.

## DNA PHOTSENSITIZATION DAMAGE INDUCED BY 2-METHYL-2,6-NAPHTHONINONE

ZHANG Lianwen<sup>1</sup>, LIN Weizhen<sup>2</sup>, YAO Sude<sup>2</sup>, LIN Nianyun<sup>2</sup>

(1. Department of Chemistry, Liaocheng Teachers University, Shandong Liaocheng 252059, P. R. China;

2. Laboratory of Radiation Chemistry, Shanghai Institute of Nuclear Research, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, P. R. China)

**Abstract:** By laser irradiation( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ) and agarose gel electrophoresis, DNA photosensitization damage induced by 2-methyl-2,6-naphthionone(MQ) was studied in this paper. Both samples saturated with  $\text{N}_2$  and  $\text{O}_2$  can be damaged markedly, this damage was prominently related to the concentration ratio of DNA/MQ, the photon dosage and DNA form.

**Key words:** 2-methyl-2,6-naphthionone(MQ); photosensitization damage; agarose gel electrophoresis