

C₆₀对 DNA 光动力学作用的 FT-Raman 光谱研究*

严庆丰¹ 钱凯先¹ 李文铸²

(浙江大学¹ 生物科学与技术系, ² 物理系 杭州 310027)

提要 采用傅里叶变换激光 Raman 光谱术从分子水平研究了富勒烯 C₆₀对小牛胸腺 DNA 的光动力学作用。结果表明光激发 C₆₀对 DNA 各组分基团均有不同程度的损伤,其中 DNA 的空间构像破坏显著,腺嘌呤次之,骨架磷酸基团、脱氧核糖、嘧啶环等也遭到破坏并导致 DNA 链断裂。这种结果并非由于 C₆₀与 DNA 分子之间直接的电子相互作用,而是通过单线态氧(¹O₂)或·OH, O₂^{·-}等多自由基作用所致。

关键词 富勒烯 C₆₀, DNA, 激光拉曼光谱术, 光动力学作用, 自由基

1 引 言

C₆₀的发现“创立了一个崭新的化学分支,对于诸如天体化学、材料化学和物理学等不同领域具有重要意义”而被授予 1996 年诺贝尔化学奖。Arbogast 等^[1]首先报道光激发 C₆₀可产生极高量子产额的单线态氧(¹O₂),这种化学反应性能极其活泼的活性氧的产生预示着 C₆₀在生命体系中可能存在重要作用。随后这方面研究陆续见诸报道, Sijbesma 等^[2,3]合成的 C₆₀衍生物可以有效抑制爱滋病毒蛋白酶和逆转录酶的活性, Tsuchiya 等^[4]报道光激发 C₆₀可促进小鼠肢芽培养细胞的形成。1992 年以来,我们开展了 C₆₀生物学的实验研究,成功制备水溶性 C₆₀-磷脂酰胆碱包结物^[5],通过对离体培养细胞的研究揭示: C₆₀具有显著的光动力学作用,膜蛋白、膜脂等生物大分子是主要靶分子^[6]。Tukuyama 等^[7]研究发现富勒烯羧酸能专一性剪切 DNA 链的鸟嘌呤(G)基团,表明 DNA 也是 C₆₀光动力学作用的重要靶分子,但是对 DNA 的微观光敏损伤迄今尚未研究。本文通过 FT-Raman 光谱术,从分子水平研究了富勒烯 C₆₀对小牛胸腺 DNA 的光动力学损伤,获取有关脱氧核糖、磷酸骨架和 4 种碱基(A, T, C, G)的结构信息,分析了光激发 C₆₀对 DNA 分子的损伤部位和作用模式,进而探讨其作用的分子机制。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

分别采用改良的电弧法和柱色谱分离法制备和纯化的 C₆₀, 得到纯度 > 99% 的 C₆₀ 黑色固

* 浙江省自然科学基金资助项目。

体粉末;

采用 Li 等^[5]的方法制备和纯化 C₆₀-磷脂酰胆碱, 得到 C₆₀含量约为 100 μg/mL 的 C₆₀-磷脂酰胆碱包结物;

小牛胸腺 DNA 由华美生物工程公司生产。

2.2 主要仪器

傅里叶变换激光拉曼光谱仪(FT-Raman 型, Bio-Rad Co., USA)、数据处理系统(HP vectra VL2, USA)和红外激光器(T10-106C 型, Bio-Rad Co., USA)

2.3 实验方法

光激发处理 DNA 高纯度小牛胸腺 DNA 溶于 pH7.0, 0.02 mol/L 的磷酸缓冲液中, 浓度为 4%。分别加入 C₆₀浓度为 0, 5, 10, 20 μg/mL 的 C₆₀-磷脂酰胆碱溶液, 在冰浴条件下, 用光强 4 000 lux 的碘钨灯隔热光照激发处理 30 min。

激光拉曼光谱检测 将处理组和对照组 DNA 进行真空干燥后, 分别置于内径为 2 mm 的石英管中, 进行激光拉曼光谱检测。其激光功率为 100 mW, 近红外激光波长为 1.064 μm, 扫描范围为 100~1 800 cm⁻¹。获取的 FT-Raman 光谱均是经过 1 000 次扫描累加的结果, Raman 峰的频率位置在 Win-IR 软件系统中直接读出, 分辨率为 4 cm⁻¹。

3 实验结果

3.1 小牛胸腺 DNA 的 FT-Raman 光谱标定

图 1 所示为实验测得的正常小牛胸腺 DNA 的 FT-Raman 光谱, 我们对其中重要的 Raman 峰在表 1 作了标定, 主要参考了核苷酸、聚核苷酸和 DNA 固态纤维的 Raman 光谱结果^[8-10]。拉曼谱线的强度与散射中心(基团和化学键)的数目成正比, 当散射中心因光动力损伤而发生变化时其强度降低甚至消失。为便于分析, 根据 Raman 峰的高度和半高宽度, 将它们分为三级: 一级峰高而尖锐, 是判断基团存在与否的最重要特征谱线; 二级峰相对较宽, 强度较低, 但它仍是明确而显著的; 三级峰常常较小, 标定时容易被忽视, 须特别细致。

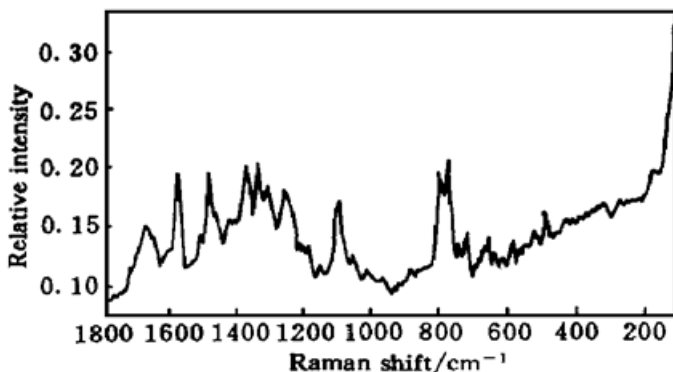


图 1 正常小牛胸腺 DNA FT-Raman 光谱
(100~1 800 cm⁻¹)

Fig. 1 FT-Raman spectrum of calf thymus DNA
(100~1 800 cm⁻¹)

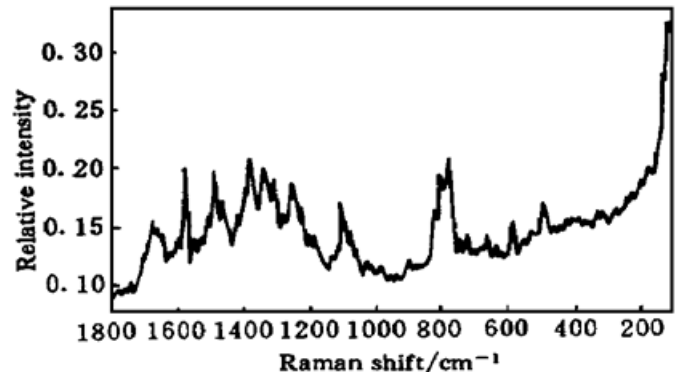


图 2 可见光处理的小牛胸腺 DNA FT-Raman 光谱(100~1 800 cm⁻¹)

Fig. 2 FT-Raman spectrum of calf thymus DNA only irradiated with a visible light (100~1 800 cm⁻¹)

图 2 所示为单纯光照, 不经 C₆₀-磷脂酰胆碱处理的小牛胸腺 DNA 的 FT-Raman 光谱, 除新出现标定为 C 型 DNA 二酯磷酸伸长振动的 875 cm⁻¹ Raman 峰和一些三级小峰外, 整个图

谱与空白对照组无明显差异,表明短时间可见光照射对 DNA 的 FT-Raman 光谱影响不显著。

3.2 光激发 C₆₀-磷脂酰胆碱对 DNA 的 FT-Raman 光谱影响

图 3 所示为经浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C₆₀-磷脂酰胆碱光激发处理的 DNA FT-Raman 光谱,几乎所有谱线的强度均比对照组 DNA 降低,表明光照激发 C₆₀对 DNA 各基团均有不同程度的损伤,这些 Raman 峰的标定和变化列于表 1。其中变化最显著的是标定为 B 型 DNA 骨架振动的 806 cm^{-1} Raman 峰,它由对照组的一级峰,在处理组中消失,同时新出现了标定为 A 型 DNA 对称二酯磷酸伸长振动的 811 cm^{-1} Raman 峰,和标定为 C 型 DNA 二酯磷酸伸长振动的 872 cm^{-1} Raman 峰,表明 DNA 的构像发生显著变化。标定为羰基 C=O 伸张振动在 1 667 cm^{-1} 的二级 Raman 峰向低波数移位到 1 663 cm^{-1} ,同时强度显著降低,表明该 DNA 已有部分碱基间氢键断裂,双螺旋解开,使它含有单链 DNA。标定为腺嘌呤环振动的 1 338 cm^{-1} 一级 Raman 峰移位到 1 335 cm^{-1} ,二级 Raman 峰 1 306 cm^{-1} 不仅向低波数移位 6 cm^{-1} ,而且谱线明显降低,表明腺嘌呤环的损伤严重。值得注意的是,标定为 PO₂ 基团对称伸张的一级峰 1 100 cm^{-1} 的位置和强度均无明显变化,表明 DNA 的脱氧核糖-磷酸骨架仍保持完整,即没有发生单、双链 DNA 的切断。与此相对应,标定为脱氧核糖-磷酸振动的 499 cm^{-1} , 1 146 cm^{-1} 谱线变化不明显。上述结果表明,光激发低浓度 C₆₀即可严重破坏 DNA 的空间构像,腺嘌呤也遭到破坏,脱氧核糖、骨架磷酸基团和嘧啶环的损伤相对较轻。而 FT-Raman 光谱中新出现的三个二级峰 272 cm^{-1} , 495 cm^{-1} 和 1 468 cm^{-1} 被标定为 C₆₀的特征频率,另有许多三级小峰的出现表明整个化学环境不再单纯,可能发生基团的修饰。

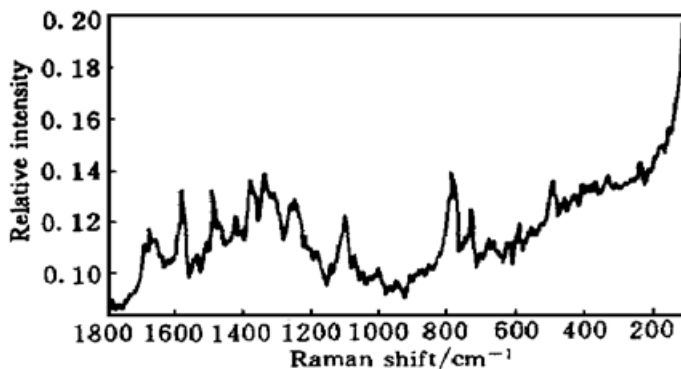


图 3 经 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C₆₀-磷脂酰胆碱光激发处理的小牛胸腺 DNA FT-Raman 光谱(100~ 1 800 cm^{-1})

Fig. 3 FT-Raman spectrum of photodynamic damage of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C₆₀-phosphatidylcholine to calf thymus DNA (100~ 1 800 cm^{-1})

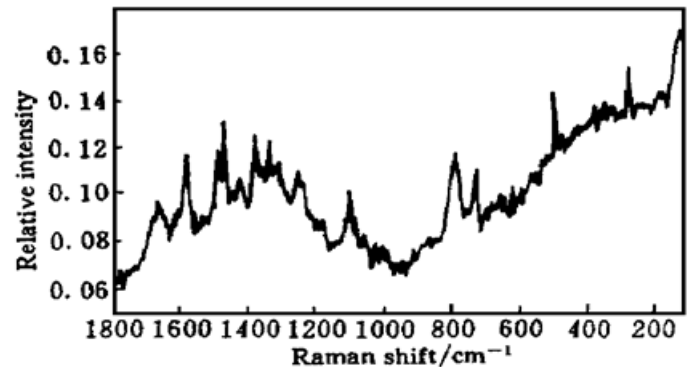


图 4 经 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C₆₀-磷脂酰胆碱光激发处理的小牛胸腺 DNA FT-Raman 光谱(100~ 1 800 cm^{-1})

Fig. 4 FT-Raman spectrum of photodynamic damage of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C₆₀-phosphatidylcholine to calf thymus DNA (100~ 1 800 cm^{-1})

图 4 所示为当 C₆₀浓度增加到 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其它条件保持不变, DNA 的 FT-Raman 光谱表明它所受到的损伤进一步加强。如标定为胞嘧啶振动的 Raman 峰从 1 255 cm^{-1} 移位到 1 248 cm^{-1} , 标定为 C-O 伸长振动的 Raman 峰从 1 011 cm^{-1} 移位到 1 000 cm^{-1} , 向低波段方向位移达 11 cm^{-1} 之多; 标定为腺嘌呤环振动的 537 cm^{-1} Raman 峰谱图消失,同时消失的还有标定为鸟嘌呤振动的 622 cm^{-1} Raman 峰,以及在 499 cm^{-1} , 1 146 cm^{-1} 标为脱氧核糖-磷酸的谱线,在 1 184 cm^{-1} 标定为碱基外 C-N 振动的谱线,在 752 cm^{-1} , 667 cm^{-1} 标定为胸腺嘧啶的谱线,和在 1 460 cm^{-1} 标定为脱氧核糖的谱线等等。上述结果表明高浓度 C₆₀对 DNA 的光

敏损伤作用是非常强烈的,它不仅严重破坏 DNA 的高级结构,而且对各种基团都会造成严重损伤。

表 1 小牛胸腺 DNA 激光拉曼光谱标定(100~ 1 800 cm^{-1})

Table 1 Assignment of Raman spectra of photodynamic damage of C_{60} to calf thymus DNA (100~ 1 800 cm^{-1})

DNA	frequency/ cm^{-1}			assignment
	A_1^*	A_2^{**}	A_3^{***}	
499	499	497		deoxyribose-phosphate
537	538	538		A
622	622	624		G
643	644	640	648	deoxyribose
667	665	669	665	T, G
683	683	684	683	G
730	730	728	728	A
752	752	746	747	T
783	782	785	783	O- P- O symmetric stretch
806	807			B-type diester stretch
		811	815	A-type diester stretch
844	840			deoxyribose-phosphate
	875	872	877	C-type diester stretch
1 011	1 011	1 010	1 000	C- O stretch
1 053	1 054	1 063	1 064	C- O stretch
1 100	1 100	1 100	1 109	O- P- O symmetric stretch
1 146	1 147	1 144		deoxyribose-phosphate
1 184	1 187	1 180		base external C- N stretch
1 255	1 255	1 259	1 248	C
1 306	1 306	1 300	1 303	A
1 338	1 337	1 335	1 336	A
1 375	1 373	1 373	1 372	T, A, G
1 416	1 416	1 419	1 422	A, G
1 460	1 460	1 460		deoxyribose
1 483	1 483	1 485	1 483	G, A
1 575	1 574	1 577	1 576	G, A
1 667	1 667	1 663	1 670	C= O stretch

* A_1 : 4% DNA only irradiated with visible light; ** A_2 : 4% DNA+ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C_{60} -phosphatidylcholine;

*** A_3 : 4% DNA+ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C_{60} -phosphatidylcholine.

4 讨 论

激光拉曼光谱可以灵敏地反映分子内各种基团振动的特征,以及某基团受化学环境影响产生的微小振动差异。傅里叶变换拉曼光谱仪(Fourier transform Raman spectroscopy)以低能量的红外光源代替紫外光或可见光,提高了光的穿透力,降低热效应,从而减少对样品的损伤;并且利用傅里叶变换技术,对样品进行快速重复扫描和信号累加,大大提高了信噪比,成为目前探测生物大分子结构的最有力工具之一。

通过测定 C₆₀光照激发处理前后小牛胸腺 DNA 的 FT-Raman 光谱,发现 C₆₀的光敏损伤首先表现为对 DNA 空间结构的破坏,表明碱基间堆集力减弱。而同链的相邻碱基之间的堆集力恰恰为形成最强的氢键提供了条件,两种作用力相互协同,形成一种稳定的结构,如果一种作用力被消除,则另一种作用力大为削弱,于是双螺旋解开,产生单链 DNA^[12];同时 DNA 的各个组分基团,如骨架磷酸二酯、脱氧核糖和碱基(A, T, C, G)等也受到不同程度损伤,其中腺嘌呤和鸟嘌呤的 Raman 峰强度降低更为显著,腺嘌呤可能变为尔后迅速降解的次黄嘌呤而脱离了 DNA 链,并且随着 C₆₀浓度的提高,这种光敏损伤加剧。然而我们并没有观察到如 Tokuyama 等人^[8]报道的对鸟嘌呤碱基的专一性破坏,也没有发现特定基团的增色性,进一步提示我们, C₆₀并未插入到 DNA 双链间特定序列部位, C₆₀与 DNA 分子间不发生直接的电子相互作用,这也可以从 C₆₀的结构上得到阐明,作为完全对称的球状分子显然与脱氧核糖-磷酸骨架缺乏亲和力,而疏水的碱基处于螺旋内侧,其相邻碱基间 0.34 nm 的间隙对直径 0.74 nm 的 C₆₀来说又太小了。我们采用电子自旋共振技术,直接测定氧自由基,发现光照射 C₆₀可产生羟自由·OH 和超氧阴离子 O₂^{·-},表明 C₆₀对 DNA 的损伤不是单一的¹O₂作用,而是多自由基机制。

综上所述,除细胞质膜、细胞器外, DNA 也是 C₆₀光动力学作用的主要靶分子, FT-Raman 光谱所提供的关于 DNA 分子构像及各组分基团的损伤情况,为阐明 C₆₀光动力学作用的分子机制提供了科学的依据。

致谢 感谢中国科学院上海有机化学研究所聂崇实研究员在 FT-Raman 测试中给予的支持和帮助。

参 考 文 献

- 1 Arbogast J. W., Darmanayan A. P., Foote C. S. *et al.*. Photophysical properties of C₆₀. *J. Phys. Chem.*, 1991, **95**(1) : 11~ 12
- 2 Sijbesma R., Srdanov G., Wudl F. *et al.*. Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**(15) : 6510~ 6512
- 3 Friedman S. H., DeCamp D. L., Sijbesma R. P. *et al.*. Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**(15) : 6506~ 6509
- 4 Tsuchiya T., Yamakoshi Y. N., Miyata N. A. A novel promoting action of fullerene C₆₀ on the chondrogenesis in rat embryonic limb bud cell culture system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, **206**(3) : 885~ 894
- 5 Li W. Z., Qian K. X., Huang W. D. *et al.*. Water soluble C₆₀ liposome and the biological effect of C₆₀ to human cervix cancer cells. *Chin. Phys. Lett.*, 1994, **11**(4) : 207~ 210
- 6 Huang W. D., Qian K. X., Tan H. Q. *et al.*. The effect of buckyball C₆₀ irradiation on the fluidity of erythrocyte membranes. *Acta Biochimical et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报), 1996, **28**(3) : 138~ 142 (in Chinese)
- 7 Tokuyama H., Yamago S., Nakamura E. *et al.*. Photoinduced biochemical activity of fullerene carboxylic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**(17) : 7918~ 7919
- 8 Fujiwara M., Hamaguchi H., Tasumi M. Measurements of spontaneous Raman scattering with Nd⁺⁺ YAG 1064 nm laser light. *Appl. Spectroscopy*, 1986, **40**(2) : 137~ 139
- 9 Grygon C. A., Spiro T. G. UV resonance Raman spectroscopy of nucleic acid duplexes containing A-U and A-T base pairs. *Biopolymers*, 1990, **29** : 707~ 715
- 10 Perno J. R., Grygon C. A., Spiro T. G. Ultraviolet Raman excitation profiles for the nucleotides and for the nucleic acid duplexes Poly(rA)-Poly(rU) and Poly(dG-dC). *J. Phys. Chem.*, 1989, **93**(15) :

5672~ 5678

- 11 Chase B. . Fourier transform Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 1987, **59**(14) : 881A~ 889A
12 Turpin P. Y., Laigle C. A., Jolles B. . DNA structures studies by resonance Raman spectroscopy. *J. Mol. Stru.*, 1989, **214** : 43~ 70

Studies of the Photodynamic Effects of Fullerene (C₆₀) on DNA by FT-Raman Spectroscopy

Yan Qingfeng¹ Qian Kaixian¹ Li Wenzhu²

(¹Department of Biological Science and Biotechnology,

²Department of Physics, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract The photodynamic effects of fullerene (C₆₀) on the calf thymus DNA with FT-Raman spectroscopy at the molecular level has been studied in this paper. The spectrum showed that the photoexcited C₆₀ damaged almost all of the component groups of DNA to different extents. The conformation of DNA has been changed considerably by weakening the bases stacking and hydrogen bond, meanwhile the adenine and guanine are destroyed greatly. With increasing the concentration, C₆₀ induced a cleavage of the DNA strand by damaging the phosphate backbone and deoxyribose. The photodynamic damage to DNA by photoexcited C₆₀ was induced from singlet oxygen (¹O₂) and $\cdot\text{OH}$, O₂^{·-}.

Key words fullenene (C₆₀), DNA, Raman spectroscopy, photodynamics, free radicals