

血卟啉单甲醚对 DNA 损伤的拉曼光谱研究*

刘颂豪 孟耀勇

(华南师范大学激光生命科学研究所以, 广州 510631)

摘 要 利用激光拉曼光谱技术研究了新型光敏剂血卟啉单甲醚对 DNA(脱氧核糖核酸)分子的光动力学损伤。结果表明: DNA 分子由典型 B 型构型变成了一种修饰过的 B'型。连接碱基对的氢键被部分打断, 碱基堆叠也有所瓦解。碱基本身也遭到了破坏, 有脱氨基现象发生。腺嘌呤和胞嘧啶对血卟啉单甲醚的光动力学损伤更敏感。

关键词 血卟啉单甲醚, 脱氧核糖核酸, 光动力学损伤, 拉曼光谱。

1 引 言

激光光动力学治疗癌症是激光在医学中最广泛的应用之一, 但迄今人们对它的治疗机理还不是十分清楚。血卟啉单甲醚(HMME)是一种优秀的光敏剂, 同临床应用的混合血卟啉衍生物(HpD)相比, 它具有光敏化力强, 肿瘤选择性摄入率高、光动力效应强、毒性低、无突变和致畸胎作用。特别是它的短的避光期大大减轻了病人的痛苦, 并使等待重复治疗的间隔大大缩短, 为治疗带来了方便^[1, 2]。DNA 分子是生物体内最重要的大分子, 我们利用激光拉曼光谱研究血卟啉单甲醚对 DNA 分子的损伤作用, 对理解光动力学疗法的机理无疑具有重要意义。

2 实验材料和方法

2.1 样品制备

小牛胸腺 DNA 购自美国 Sigma 公司。血卟啉单甲醚为第二军医大学药物化学研究所研制的纯品。NaCl 和 Na₂SO₄均为分析纯。所用水为二次蒸馏水。本实验共制备了四种样品:

- 1) 8% 小牛胸腺 DNA、0.2 mol/L NaCl、0.04 mol/L Na₂SO₄、10 μg/g 血卟啉单甲醚溶液;
- 2) 0.2 mol/L NaCl、0.04 mol/L Na₂SO₄、10 μg/g 血卟啉单甲醚溶液;
- 3) 8% 小牛胸腺 DNA、0.2 mol/L NaCl、0.04 mol/L Na₂SO₄溶液;
- 4) 0.2 mol/L NaCl、0.04 mol/L Na₂SO₄溶液。

在所有的样品中都加入了0.04 mol/L Na₂SO₄, 这是为了在拉曼光谱中建立一个内标, 以

* 广东省自然科学基金资助项目(974133)。

收稿日期: 1998-12-21

便各样品间可以方便地比较它的光谱强度^[3]。

2.2 拉曼光谱的测定

所用的拉曼光谱仪是法国 Jobin-Yvon 公司制造的 T6400 型, 采用光电倍增管接收信号。光谱分辨率为 4 cm^{-1} 。扫描步长为 1 cm^{-1} , 积分时间为 2s。每个光谱扫描 4 遍求平均, 光谱准确度为 $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ 。激发光源为美国相干公司制造的 750 型氩离子激光器, 输出波长为 514.5 nm, 输出功率 200 mW。所有样品在记录光谱前先照射 40 分钟。

图 1 是四种样品的激光拉曼光谱。图中各光谱的强度都以 SO_4^{2-} 的 982 cm^{-1} 的拉曼线进行了归一化。为了得到纯的受损 DNA 的光谱图, 要扣除血卟啉单甲醚的拉曼光谱, 为此用样品 1) 的光谱减去样品 2) 的。这样作是考虑到光敏剂作为一个催化剂在光动力学过程前后浓度并不改变^[4]。

3 结果与讨论

图 2 给出了小牛胸腺 DNA 分子的拉曼光谱与经血卟啉单甲醚光动力学作用后的差分光谱。最显著的变化是 833 cm^{-1} 的谱线发生了位移, 这一点在图 3 中可以更直接的观察到。小牛胸腺 DNA 分子的 833 cm^{-1} 谱线在经血卟啉单甲醚光动力学作用后移到了 839 cm^{-1} 。由于 833 cm^{-1} 被指定为糖磷酸脊骨的振动模式, 它对构型的变化极为敏感。由 833 cm^{-1} 位移到 839 cm^{-1} 这一事实说明, 尽管 DNA 还保持着 B 型的构型, 也就是说它的糖环折叠还是保持着

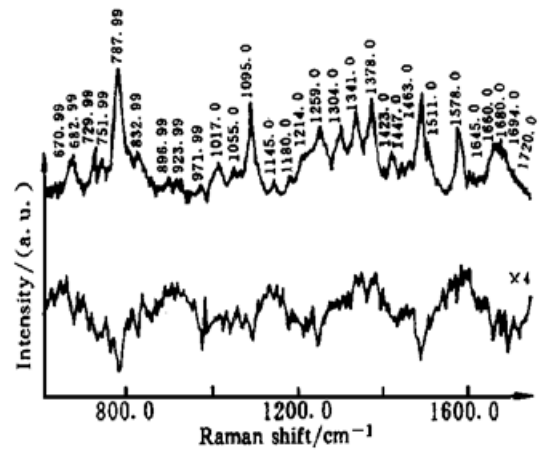


Fig. 1 Raman spectra of the four samples. (a) 8% calf thymus DNA in 0.2 mol/L NaCl, 0.04 mol/L Na_2SO_4 , 10 $\mu\text{g/g}$ HMME solution, (b) 0.2 mol/L NaCl, 0.04 mol/L Na_2SO_4 , 10 $\mu\text{g/g}$ HMME solution, (c) 8% calf thymus DNA in 0.2 mol/L NaCl, 0.04 mol/L Na_2SO_4 solution, (d) 0.2 mol/L NaCl, 0.04 mol/L Na_2SO_4 solution

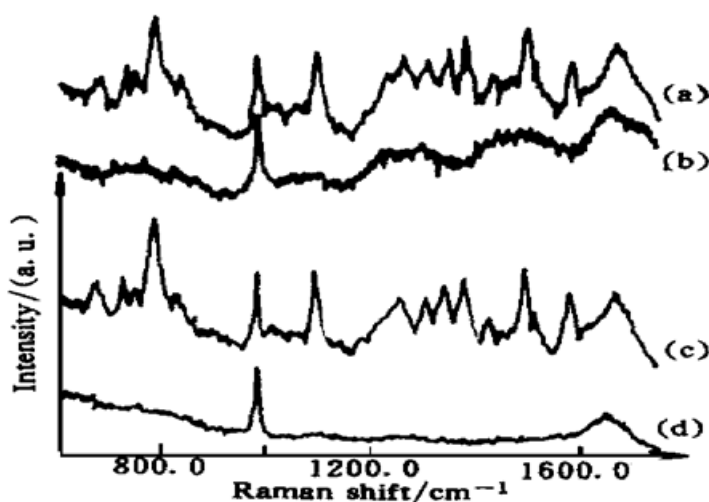


Fig. 2 Upper line is Raman spectrum of calf thymus DNA, lower line is the difference spectrum of calf thymus DNA and calf thymus DNA damaged by HMME(the former minus the latter)

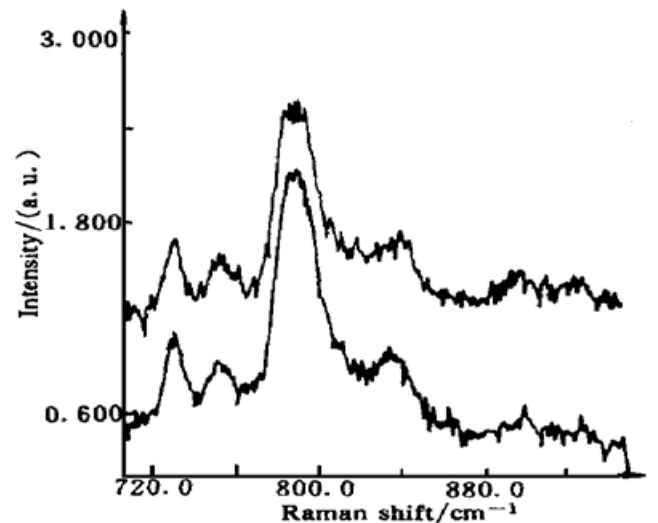


Fig. 3 Comparison of Raman spectra for calf thymus DNA (upper) and calf thymus DNA damaged by HMME(lower)

C2-endo 折叠, 但已有结构变化, 不再是一个典型的 B 型构型。事实上, 它的结构变得同富含 AT 碱基对的 DNA 分子的结构更接近^[3]。被指定为脊骨振动模式的 897 cm^{-1} 、 924 cm^{-1} 、 1145 cm^{-1} 的谱线都有所增强, 这同脊骨结构发生了变化是一致的。 1095 cm^{-1} 被指定为 $\text{O}=\text{P}=\text{O}$ 的反对称振动, 它的频率不变, 强度稍有下降, 但在 $1082\sim 1088\text{ cm}^{-1}$ 间并未发现有新峰, 这说明 DNA 链被打断情形并不明显^[5]。

碱基的振动模式主要分布在 1200 cm^{-1} 以上。从图2可以看出这个范围的谱线的强度变化有增有减。强度增加明显的是 1304 cm^{-1} 、 1341 cm^{-1} 和 1378 cm^{-1} 。 1304 cm^{-1} 和 1341 cm^{-1} 源于腺嘌呤, 1378 cm^{-1} 源于腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)^[3]。由于属于碱基振动的拉曼谱线的强度明显地受到碱基堆叠的影响, 在螺旋结构形成或单链核酸中碱基的自重叠发生时, 碱基振动谱线强度会明显下降, 即为拉曼减色效应(Raman hypchromism)^[5]。所以 1304 cm^{-1} 、 1341 cm^{-1} 和 1378 cm^{-1} 谱线的增强说明 DNA 分子的碱基堆叠结构发生了变化, 部分碱基堆叠发生了瓦解。发生强度明显减弱的谱线有 683 cm^{-1} 、 730 cm^{-1} 、 751 cm^{-1} 、 1259 cm^{-1} 、 1491 cm^{-1} , 这些峰分别属于 G(鸟嘌呤)、A、T、C(胞嘧啶)、G^[3]。由于拉曼谱线的强度又与散射中心的数目成正比, 谱线强度降低说明散射中心的数目减少。 1259 cm^{-1} 和 1492 cm^{-1} 的大幅度下降, 说明 G 和 C 遭到严重损害。

由于水的强烈干扰, 在 $1600\sim 1800\text{ cm}^{-1}$ 范围内的谱线很难详细分辨和指定。但对碱基的简正分析和实验研究有助于对这些谱线进行分析。从图2的差分光谱可看到 1660 cm^{-1} 峰有所下降, 而 1660 cm^{-1} 被指定为 T 的 $\text{C}_2=\text{O}$ 振动, 它的下移说明连接 T 的氢键断裂^[6]。 1680 cm^{-1} 、 1694 cm^{-1} 和 1720 cm^{-1} 分别指定为 A 的 NH_2 ^[7]、G(C-O 和 C-C) 和 G(C=O) 振动^[8]。 1680 cm^{-1} 的下降, 说明 A 发生了脱氨基作用。自由基对 DNA 的损伤同光动力学的一个重要的作用就是脱氨基作用^[9], 所以本实验同光动力学的自由基理论^[4]是一致的。 1694 cm^{-1} 和 1720 cm^{-1} 强度的减弱, 说明 G 遭到了破坏。

根据碱基谱线的强度变化, 作者认为血卟啉单甲醚的光动力学过程中对 G、C 的损害较 A、T 更严重, 使得 DNA 分子中的 A、T 碱基对同 G、C 碱基对的比例有所增加, 导致了 DNA 构型更接近富含 A、T 碱基对的 DNA 分子, 这一点也被 O-P-O 的对称振动模式从 833 cm^{-1} 移动到了 839 cm^{-1} 所证实。

788 cm^{-1} 是所有谱线中强度减弱最大的谱线, 由于它的复杂性故最后来讨论它。实际上 788 cm^{-1} 谱线是两个振动模式共同产生的, 这一点在重水溶液中就看得很清楚, 该峰明显地裂变成两个峰^[5]。利用非线性最小二乘法曲线拟合分析可以得知 788 cm^{-1} 是由 782 cm^{-1} 和 791 cm^{-1} 组成, 782 cm^{-1} 被指定为 C 振动, 而 791 cm^{-1} 属于 DNA 脊骨振动^[3]。那么 788 cm^{-1} 谱线的大幅度下降主要是由哪个振动的变化引起的呢? 788 cm^{-1} 强度随着 C 含量减少明显下降, 而 791 cm^{-1} 随 C、G 含量的减少只有轻微的下落^[3], 所以可认为 788 cm^{-1} 强度的下降主要缘于 C 的振动模式 782 cm^{-1} 谱线减弱。

综上所述, 血卟啉单甲醚对小牛胸腺 DNA 分子的光动力学损伤, 使得 DNA 分子由典型的 B 型构型变成了一种修饰过的 B' 型。连接碱基对的氢键被部分打断, 碱基堆叠也有所瓦解。碱基本身也遭到了破坏, 有脱氨基现象发生。腺嘌呤和胞嘧啶对血卟啉单甲醚的光动力学损伤更敏感。

参 考 文 献

- [1] 许德余, 陈文晖, 张 浩等. 光动力治癌新药血卟啉单甲醚(HMME)的研究. 中国激光医学杂志, 1993, 2(1) ·3~ 7
- [2] 顾 瑛, 李峻亨, 王 开等. 血卟啉用于光动力疗法治疗鲜红斑痣的初步临床研究. 中国激光医学杂志, 1996, 5(4) ·201~ 204
- [3] Wattell R M, Harrell J T. Characteristics and variations of B-type DNA conformations in solution: A quantitative analysis of Raman band intensities of eight DNAs. *Biochemistry*, 1986, 25 ·2664~ 2671
- [4] Liu S H, Hui L K, Zhang J R *et al.*. The photosensitized mechanism of hematoporphyrin derivatives (HPD) in cancer therapy. *Proc. SPIE*, 1984, 492 ·518~ 524
- [5] Small E W, Peticolas W L. Conformational dependence of the Raman scattering intensities from polynucleotides. III. order-disorder changes in helical structures. *Biopolymers*, 1971, 10 ·1377~ 1416
- [6] Spiro T G. *Raman Spectra and the Conformations of Biological Macromolecules*, Wiley-Interscience, 1987. 81~ 133
- [7] Majoube M. Adenine residue: a normal-coordinate analysis of the vibrational spectra. *Biopolymers*, 1985, 24 ·2357~ 2369
- [8] Majoube M. Guanine residue: a normal-coordinate analysis of the vibrational spectra. *Biopolymers*, 1985, 24 ·1075~ 1087
- [9] 方允中, 李文杰. 自由基与酶, 北京: 科学出版社, 1989. 279

Photodynamic Damages of DNA with HMME Probed by Raman Spectroscopy

Liu Songhao Meng Yaoyong

(*Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631*)

(Received 21 December 1998)

Abstract Hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) is a new photosensitizer with higher photosensitizing ability stronger photodynamic effects and selective uptake into tumor tissue. We analysed photodynamic damages of DNA with HMME as photosensitizer by Raman spectroscopy and obtained at following conclusions: The conformation of DNA has changed from normal B form to modified B' form. A part of hydrogen-bonds between two bases of pair were broken. The base stacking collapsed to some extent and bases were damaged. Guanine and cytosine were more sensitive to HMME.

Key words hematoporphyrin monomethyl ether, DNA, photodynamic damages, Raman spectrum.