

7-羟基黄酮及磷酰化 7-羟基黄酮与 DNA 的弱相互作用荧光法研究

郭玉华¹, 陈晓岚¹, 张 婷¹, 屈凌波^{1, 2*}, 赵玉芬^{1, 3}, 郁有祝¹

1. 郑州大学化学系, 河南省化学生物与有机化学重点实验室, 河南 郑州 450052

2. 安阳师范学院, 河南 安阳 455002

3. 清华大学教育部生命有机磷化学和化学生物重点实验室, 北京 100084

摘 要 以溴化乙锭(EB)为荧光探针, 研究了 7-羟基黄酮及磷酰化 7-羟基黄酮与 DNA 的弱相互作用。实验结果表明, 两种化合物与 DNA 间均存在弱相互作用, 但与 7-羟基黄酮相比, 磷酰化 7-羟基黄酮对 DNA 更具亲和力。随着温度的升高, 7-羟基黄酮及磷酰化 7-羟基黄酮对 DNA-EB 体系的荧光猝灭常数降低, 两种化合物均可与 DNA 形成复合物, 此猝灭过程为静态猝灭。根据 Stern-Volmer 方程和 Scatchard 方程, 常温下 7-羟基黄酮及磷酰化 7-羟基黄酮对 DNA-EB 体系的荧光猝灭常数和它们与 DNA 的固有的结合常数分别为: $K_{q1} = 601 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $K_{q2} = 1381 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; $K_1 = 2.07 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $K_2 = 3.19 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

主题词 EB 探针; DNA; 7-羟基黄酮; 磷酰化 7-羟基黄酮; 荧光猝灭; 弱相互作用

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2006)03-0475-05

核酸和蛋白质一样, 都是生命活动中的生物信息大分子, 作为“遗传大分子”的核酸, 在生物体的生长、繁殖、遗传、变异和转化等生命过程中起着决定性的作用。有关蛋白质、核酸与小分子相互作用的机理, 是目前生命科学、化学和临床医学中共同关注和感兴趣的课题。近年来, 由于医药学和生命科学的发展, 研究小分子与蛋白质及其核酸的相互作用机理过程, 对药代动力学的认识和开发新药有极其重要的意义。黄酮类化合物广泛存在于天然植物中, 是许多中草药的有效成分, 具有广泛的药理活性, 如: 抗心脑血管缺血、抗心律失常、抗自由基、镇痛作用、保护肝脏、抗病毒、抗肿瘤等药理作用^[1, 2]。7-羟基黄酮也具有广泛的生物活性, 尤其是心血管活性, 它在体内副作用较小, 但其作用比较弱^[3]。为了提高其生物活性, 闫丙双等^[4]人合成了其系列酰化衍生物。作为有机磷小分子化合物, 磷酰酯类衍生物大多具有广泛的生物活性^[5], 它们参与生命体的物质转化并在其生命过程中发挥着重要作用, 生物体内绝大多数酶的反应是以它们的磷酰化和去磷酰化来调控的^[6]。作为合成此类物质极有价值的方法, Atherton-Todd 反应已广泛的应用于磷酰胺和磷酸酯的合成^[7, 8], 为了进一步扩大此反应的应用, 我们曾以二乙基磷酰酯作为磷酰化试剂, 通过 Atherton-Todd 反应, 对 7-羟基黄酮进行磷酰化改造, 利用电喷雾电离质谱(ESI-MS)和荧光法研究了 7-羟基黄酮(化合物 I)及其磷酰化产物(化合物 II)与蛋白的弱相互作用, 发现与 7-羟基黄酮相比, 其

磷酰化产物对蛋白更具亲和力^[9, 10]。初步的活性测试也显示磷酰化黄酮比黄酮对肿瘤 HELA 细胞更具抑制活性^[11, 12]。为观察化合物 I 及化合物 II 与 DNA 是否也存在这种现象, 本文进一步比较研究了两种化合物与 DNA 的弱相互作用。DNA 作为一种重要的细胞受体, 许多药物是通过与 DNA 结合来改变 DNA 的复制, 从而抑制肿瘤细胞的生长, 这是设计新的更加有效的抗癌药物的基础。抗癌药物的活性决定于它们与 DNA 的结合方式和它们之间的亲和力^[13-15]。因此研究 DNA 与各类药物及具有药效的小分子相互作用, 对于认识药物作用机理以及新药设计有极其重要的价值, 研究磷酰化黄酮与 DNA 的相互作用对于进一步理解其抗肿瘤活性的机理也就显得意义重大, 本文通过荧光法, 以 EB 为荧光探针, 详细研究比较了 7-羟基黄酮及其磷酰化产物与小牛胸腺 DNA(ctDNA)的相互作用, 阐明了其结合类型及其结合常数, 进一步丰富了磷酰化黄酮作用机理的研究。化合物 II 的合成见 Schemel I。

1 实验部分

日立 F-4500 型荧光分光光度计; HP8453 紫外光谱仪; 恒温水浴锅; pH211 型酸度计; $8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 7-羟基黄酮(Sigma 公司); 称取 7-羟基黄酮, 用 V(甲醇): V(水) = 1:1 的体系溶解; $8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酰化 7-羟基黄酮(本

收稿日期: 2004-12-26, 修订日期: 2005-05-11

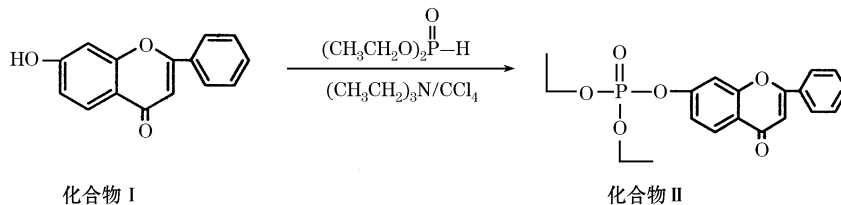
基金项目: 国家自然科学基金(20472076)资助项目

作者简介: 郭玉华, 女, 1979 年生, 郑州大学化学系硕士研究生

* 通讯联系人

实验室合成): 称取磷酸化 7-羟基黄酮, 用 $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 1 : 1$ 的体系溶解; $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (含 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH 7.2); $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 小牛胸腺 DNA (ctDNA) (华美生物工程公司产品, 经 UV 谱检验 $A_{260}/A_{280} > 1.9$, 表明纯度符合要求); 称取 ctDNA, 用上述缓冲液配

制, 浓度用 $\epsilon_{260} = 6\,600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 确定; $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴化乙锭 (EB) (Sigma 公司); 用 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ EB 溶液稀释; 其余试剂均为分析纯, 实验用水为 Milli-Q 纯水。



Scheme 1 synthesis of compound II

2 结果与讨论

2.1 EB 及 DNA-EB 荧光光谱

向 5 mL 刻度试管中加入 0.1 mL $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EB 溶液, 并加入不同体积的 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA 溶液, 用水定容至刻度, 摇匀。在荧光分光光度计上进行激发光谱和发射光谱的扫描。图 1 是 DNA 对 EB 荧光强度的影响, 由图可以看出, 在水溶液中 EB 荧光强度很弱, 其最佳 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 503/600 \text{ nm}$, 加入 DNA 后荧光强度显著增加, 最佳 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 528/588 \text{ nm}$, 当 DNA 与 EB 浓度比为 40 : 1 时, 荧光强度不再变化, 因此 DNA 与 EB 的最佳结合比为 40 : 1。在最佳激发波长下 7-羟基黄酮及磷酸化 7-羟基黄酮都不发荧光。

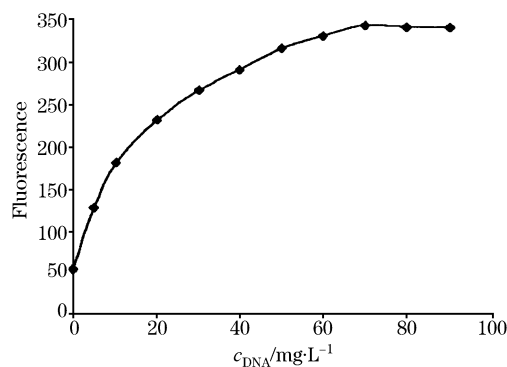


Fig. 1 The effect of DNA on the fluorescence intensity of EB
 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 528/588 \text{ nm}$

2.2 7-羟基黄酮、磷酸化 7-羟基黄酮与 DNA 作用方式研究

2.2.1 7-羟基黄酮、磷酸化 7-羟基黄酮与 DNA-EB 相互作用的荧光研究

在 12 支比色管中, 依次加入 0.7 mL $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA 溶液, $20 \mu\text{L}$ $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EB, 在前 6 支比色管中分别加入不同量的 $8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 7-羟基黄酮, 后 6 支比色管中加入对应的与 7-羟基黄酮相同量的 $8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸化 7-羟基黄酮, 将比色管置于恒温水浴锅中分别调节水温至 25 和 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 测其荧光发射光谱, 见图 2(a), (b) (狭缝(带宽) $E_x = E_m = 5 \text{ nm}$)。

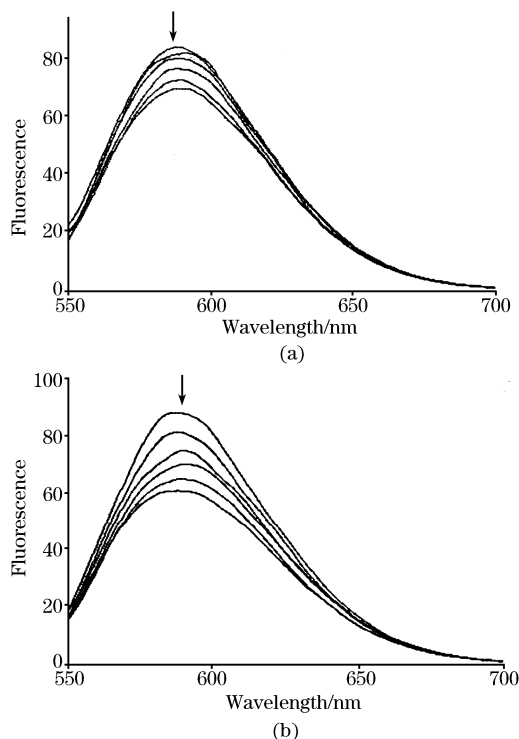


Fig. 2 The effect of 7-hydroxyflavone, diethyl flavon-7-yl phosphate on the fluorescence spectra of DNA-EB system

$\lambda_{\text{ex}} = 528 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550-700 \text{ nm}$;

(a), 7-hydroxyflavone; (b), diethyl flavon-7-yl phosphate

由图 2 可知, 随着 7-羟基黄酮、磷酸化 7-羟基黄酮浓度的增加, DNA-EB 588 nm 左右的荧光发射峰逐渐降低, 表明更多的 7-羟基黄酮和磷酸化 7-羟基黄酮与 DNA 发生了作用, 影响了 EB 与 DNA 的作用。但相同浓度的 7-羟基黄酮和磷酸化 7-羟基黄酮相比, 磷酸化 7-羟基黄酮使 DNA-EB 588 nm 左右的荧光发射峰降低更多, 说明磷酸化 7-羟基黄酮与 DNA 的作用可能比 7-羟基黄酮更强。

为了解这种猝灭过程, 先按 Stern-Volmer 方程^[6]处理, 即 $F_0/F = 1 + K_q[Q]$ 式中 F_0 是不加猝灭剂时体系的荧光强度, F 是加入猝灭剂时体系的荧光强度, K_q 是猝灭常数, $[Q]$ 是猝灭剂浓度。以 F_0/F 对 7-羟基黄酮和磷酸化 7-羟基

黄酮浓度作图, 得到 7-羟基黄酮和磷酸化 7-羟基黄酮对 DNA-EB 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图[图 3(a), (b)], 图中 1 均为 25 °C, 2 均为 37 °C。由图 3(a), (b) 可见, 直线有很好的相关性, 且随温度的升高直线斜率 K_q 即猝灭常数均降低。图 3(a) 中 $K_{37\text{ °C}} = 547\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $K_{25\text{ °C}} = 601\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; 图 3(b) 中 $K_{37\text{ °C}} = 1\ 253\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $K_{25\text{ °C}} = 1\ 381\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。根据经典的荧光猝灭理论, 无论动态猝灭或静态猝灭, F_0/F 对 $[Q]$ 作图将得到直线且与温度有关^[17]。由于动态猝灭起因于扩散运动, 所以随温度的升高荧光猝灭会更严重, 荧光猝灭常数应增大。相反, 静态猝灭是由于荧光物质与猝灭剂形成了复合物, 温度升高降低了复合物的稳定性, 所以随温度升高静态猝灭应减弱, 荧光猝灭常数应减小。由此可以判断 7-羟基黄酮和磷酸化 7-羟基黄酮对 DNA-EB 的猝灭是由于 7-羟基黄酮和磷酸化 7-羟基黄酮与 DNA 相互作用形成了复合物而引起的静态猝灭。

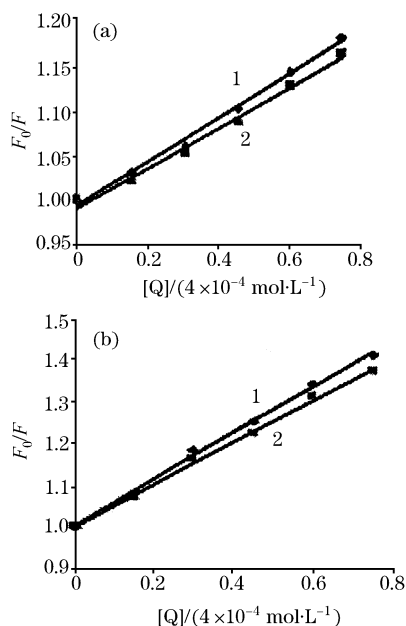


Fig. 3 Stern-Volmer plots of 7-hydroxyflavone, diethyl flavon-7-yl phosphate and DNA-EB system at different temperature

1, 25 °C; 2, 37 °C; a, 7-hydroxyflavone;

b, diethyl flavon-7-yl phosphate

为了更好地比较 7-羟基黄酮和磷酸化 7-羟基黄酮与核酸作用的强弱, 图 4 是在 25 °C 时 7-羟基黄酮和磷酸化 7-羟基黄酮对 DNA-EB 体系的荧光猝灭曲线。以 F_0/F 对 7-羟基黄酮浓度得到直线 2, 直线 2 的斜率 $K_2 = 601$, 相关系数 $r_2 = 0.997$; 而以 F_0/F 对磷酸化 7-羟基黄酮浓度得到直线 1, 直线 1 的斜率显著增加, $K_1 = 1\ 381$, 相关系数 $r_1 = 0.999$ 。这些变化进一步说明 7-羟基黄酮和磷酸化 7-羟基黄酮对 DNA-EB 的猝灭仅是静态猝灭一种过程, 并且可以推断 7-羟基黄酮和磷酸化 7-羟基黄酮通过一种方式与 DNA 结合^[18]。而且通过比较图 4 中两条直线的斜率, 进一步说明与 7-羟基黄酮相比, 磷酸化 7-羟基黄酮与 DNA 的作用更强。

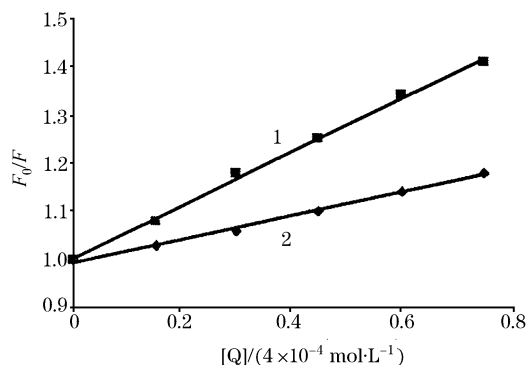


Fig. 4 The emission quenching of addition of diethyl flavon-7-yl phosphate (1) and 7-hydroxyflavone (2) to DNA-EB system at 25 °C

2.2.2 Scatchard 图实验

用 EB 作荧光探针, 研究 7-羟基黄酮、磷酸化 7-羟基黄酮与 DNA 的反应。EB 与 DNA 的结合特性可用 Scatchard 方程^[19-21]描述: $\gamma/c_f = K(n - \gamma)$, 式中 γ 是平均每个核苷酸分子键合 EB 的比率, 即 $\gamma = c_b/c_{\text{DNA}}$ (c_b 为与 DNA 结合的 EB 浓度), n 是每个核苷酸上的成键位点数, K 是每一位点固有的结合常数, c_f 是游离 EB 的浓度。 γ 及 c_f 根据下列公式算出:

$$I_0 = K_b c_b + K_f (c_0 - c_b)$$

$$c_b = (I_0 - K_f c_0) / K_b - K_f$$

$$c_f = K_f (c_0 - c_b)$$

公式中 I_0 为加入 EB 后体系产生的荧光强度, K_b , K_f 是由实验确定的常数 ($K_b = 6.5 \times 10^7\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; $K_f = 8.73 \times 10^6\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$), c_0 为加入的 EB 浓度。

在 10 支比色管中依次加入 0.5 mL $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA 溶液, 在前 5 支比色管中依次加入 $0.55\text{ mL } 8 \times 10^{-4}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 7-羟基黄酮, 后 5 支比色管中依次加入 $0.55\text{ mL } 8 \times 10^{-4}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸化 7-羟基黄酮, 20 min 后, 以 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EB 溶液滴定, 分别测量 588 nm 处的荧光强度, 计算出 Scatchard 方程点, 以 γ/c 对 γ 作图得到两条直线, 如图 5。

由图 5(a), (b) 根据直线的斜率和截距, 可求得 7-羟基黄酮-DNA-EB 体系及磷酸化 7-羟基黄酮-DNA-EB 体系核苷酸上每一位点固有的结合常数 K 分别为: $2.07 \times 10^4\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $3.19 \times 10^4\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; 每个核苷酸上的成键位点数 n 分别为: 0.54, 0.45。

2.2.3 离子强度对黄酮-DNA-EB 体系荧光强度的影响

在 20 支比色管中依次加入 0.7 mL $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA, $20\ \mu\text{L } 100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EB 溶液, 前 10 支比色管中依次加入不同浓度的 NaCl 溶液, 再依次加入 $0.75\text{ mL } 8 \times 10^{-4}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 7-羟基黄酮; 后 10 支比色管中依次加入与前面相同浓度的 NaCl 溶液, 再依次加入 $0.75\text{ mL } 8 \times 10^{-4}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸化 7-羟基黄酮, 测定各管的荧光强度 F , 以 F/F_0 对 NaCl 浓度作图 (F_0 为含 $0.02\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的缓冲溶液中 7-羟基黄酮-DNA-EB 及磷酸化 7-羟基黄酮-DNA-EB 体系的荧光强度; F 为加入不同浓度的 NaCl 后体系的荧光强度), 如图 6。

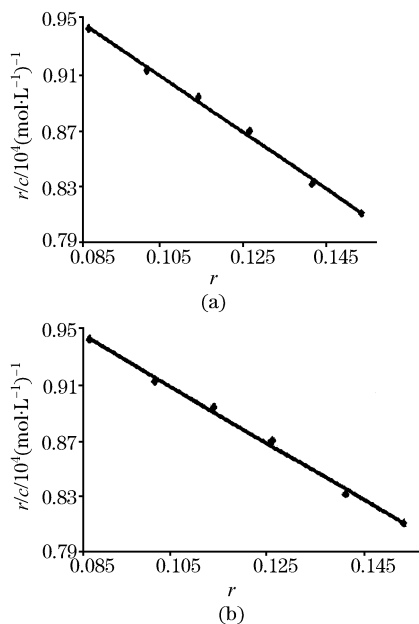


Fig. 5 Fluorescence Scatchard plot at the same concentration of 7-hydroxy flavone and diethyl flavon-7-yl phosphate (a), 7-hydroxyflavone; (b), diethyl flavon-7-yl phosphate

由图 6 可以看出, 随盐浓度的增大, 两体系的荧光强度均显著降低。这是由于 Na^+ 等盐类阳离子以静电引力的方式与 DNA 上的负电荷的磷酸基相互作用, 中和了 DNA 上所带的负电荷, 使 DNA 分子收缩, 把 EB 分子挤出来, 从而使荧光强度显著降低^[22]。

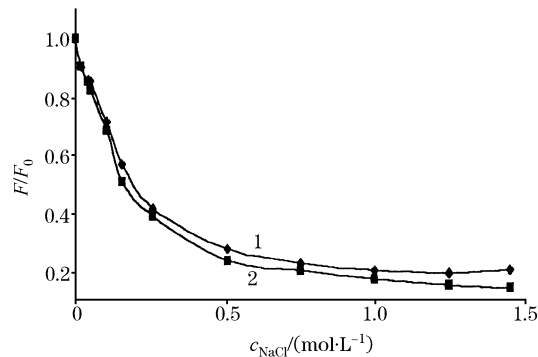


Fig. 6 Effects of ionic strength on the fluorescence intensity of flavones-DNA-EB systems 1, 7-hydroxyflavone; 2, diethyl flavon-7-yl phosphate

3 结 论

实验结果表明: 7-羟基黄酮及磷酸化 7-羟基黄酮与 DNA 间均存在弱相互作用, 但与 7-羟基黄酮相比, 7-羟基磷酸化黄酮对 DNA 更具亲和力。另外, 我们又对 7-羟基磷酸化黄酮和 7-羟基黄酮进行了与 HELA 细胞抑制活性的初步研究, 结果表明 7-羟基磷酸化黄酮比 7-羟基黄酮具有更强的抑制活性, 从细胞水平上得到了验证。总之, 荧光法研究 7-羟基黄酮及磷酸化 7-羟基黄酮与 DNA 间的弱相互作用, 为探讨磷酸化黄酮的作用机理和设计、筛选更具活性的化合物提供了参考依据。

参 考 文 献

- [1] HUANG He-sheng, MA Chuan-geng, CHEN Zhi-wu(黄河胜, 马传庚, 陈志武). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2000, 25(10): 589.
- [2] LIU Zhong-ze(刘仲则). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药), 1987, 18(1): 178.
- [3] WANG Xiao-li, XU Ming-xia, XIE Yi-nong(王晓莉, 徐鸣夏, 谢益农). West China J. Pharm. Sci. (华西药理学杂志), 1999, 14(5-6): 309.
- [4] YAN Bing-shuang, SUN Tie-min, WU Zhen-qing(阎炳双, 孙铁民, 武振卿). Chin. J. Med. Chem. (药物化学杂志), 1994, 4(1): 36.
- [5] CHEN Ru-yu, LIU Lun-zu(陈茹玉, 刘纶祖). Research on Organic Phosphorus(有机磷化学研究). Beijing: Higher Education Press(北京: 高等教育出版社), 2002.
- [6] Macado V G, Bunton C A, Zucco C, et al. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2000, (2): 169.
- [7] Ossaid B, Soufiaoui M, Garrgues B. Synthetic Comm, 1995, 25: 871.
- [8] Zeng J N, Xue C B, Chen Q W, et al. Bioorg. Chem., 1989, 17: 434.
- [9] Chen X L, Qu L B, Zhang T, et al. Supramolecular Chem., 2004, 16(1): 67.
- [10] CHEN Xiao-lan, YU Fei, QU Ling-bo, et al(陈晓岚, 于斐, 屈凌波, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2004, 62(3): 188.
- [11] Chen X L, Qu L B, Zhang T, et al. Anal. Chem., 2004, 76(1): 211.
- [12] Zhang T, Chen X L, Qu L B, et al. Bioorgan. Med. Chem., Accepted and in press.
- [13] Friedman A E, Kumar C V, Turro N J, et al. Nucl. Acids Res., 1991, 19: 2595.
- [14] Pyle A M, Morii T, Barton J K. J. Am. Chem. Soc., 1990, 112: 9432.
- [15] Barton J K, Goldberg J M, Kumar C V, et al. J. Am. Chem. Soc., 1986, 108: 2081.
- [16] Efinck R, Ghiron C A. Anal. Biochem., 1981, 114: 199.
- [17] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, XU Jin-gou, WANG Zun-ben(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 许金钩, 王尊本). The Methods of Fluorescence Analysis(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1975.

- [18] Zeng Y B, Yang N, Liu W S, et al. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2003, 97: 258.
- [19] Lepecq J B, Paoletti C J. *Mol. Biol.*, 1967, 27: 87.
- [20] Howe G M, Wu K C, Bauer W R. *Biochemistry*, 1976, 15(19): 339.
- [21] PENG Jun-feng, LING Jian-ya, ZHANG Han-xing, ZHANG Chang-kai(彭俊峰, 凌建亚, 张晗星, 张长铠). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(7): 858.
- [22] LI Lai-sheng, WANG Li-ping, HUANG Wei-dong, et al(李来生, 王丽苹, 黄伟东, 等). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2002, 30(6): 675.

Study on the Non-Covalent Interaction of 7-Hydroxy Flavone and Its Phosphate with DNA by Fluorescence Method

GUO Yu-hua¹, CHEN Xiao-lan¹, ZHANG Ting¹, QU Ling-bo^{1,2*}, ZHAO Yu-fen^{1,3}, YU You-zhu¹

1. Key Laboratory for Bio-Chemistry and Organic Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Anyang Teachers College, Anyang 455002, China

3. Key Laboratory for Bio-organic Phosphorus Chemistry, Ministry of Education, Department of Chemistry, School of Life Sciences and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract The non-covalent interaction of 7-hydroxy flavone and its phosphate with DNA was studied using ethidium bromide (EB) as a probe. The result showed that both 7-hydroxy flavone and its phosphate could form non-covalent complexes, but the phosphorylated flavonoid showed higher binding affinity with DNA than 7-hydroxy flavone did. Experiments demonstrated that the higher the temperature, the lower the slope of quenching curve of DNA-EB in the presence of different amounts of 7-hydroxy flavone and its phosphate. It was confirmed that the combinations of DNA with 7-hydroxy flavone and its phosphate were a single static quenching process. According to the Stern-Volmer equation and Scatchard equation the quenching constants and the intrinsic binding constants of 7-hydroxy flavone and its phosphate were measured respectively, they were $K_{q1} = 601 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $K_{d2} = 1.381 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; $K_1 = 2.07 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $K_2 = 3.19 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectively.

Keywords EB probe; DNA; 7-hydroxy flavone; Diethyl flavon-7-yl phosphate; Fluorescence quenching; Non-covalent interaction

(Received Dec. 26, 2004; accepted May 11, 2005)

* Corresponding author