

阿司匹林与 DNA 相互作用的光谱研究

刘炜, 毕和平, 张连华, 汤颖, 陈光英

(1. 海南师范大学化学与化工学院, 海南省热带药用植物化学重点实验室, 海南海口 571158; 2. 西安石油大学化学化工学院, 陕西西安 710065)

摘要 [目的] 研究阿司匹林(ASP)与DNA相互作用的机理。[方法] 在pH值为4.5的Tris-HCl缓冲溶液体系中,应用荧光光谱法和紫外光谱技术研究ASP和DNA分子间的相互作用;利用Stern-Volmer方程探讨DNA对阿司匹林的荧光猝灭机制。[结果] DNA与ASP之间存在较强的相互作用,25℃时结合常数为 2.17×10^6 L/mol,结合位点数为1.773 5,结合方式是ASP通过嵌入结合的方式与DNA结合。[结论] 该研究可为进一步研究ASP的药理活性提供重要信息。

关键词 阿司匹林;DNA;荧光猝灭;机制

中图分类号 O657.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)15-06837-02

Study on the Interaction between Aspirin and DNA by Spectrometric Method

LIU Wei et al. (Hainan Key Lab. of Tropical Medicinal Herb and Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hainan Normal University, Haikou, Hainan 571158)

Abstract [Objective] The research aimed to study the interaction mechanism between aspirin and DNA. [Method] The interaction of aspirin and DNA was studied using UV spectrometry and fluorescence spectrometry. The quenching mechanism of fluorescence of aspirin by DNA was discussed through Stern-Volmer equation. [Result] The results showed that there were strong interaction between aspirin and DNA. The binding constant was 2.17×10^6 L/mol at 25℃. The number of binding sites was 1.773 5. And aspirin binded with DNA in a mode of intercalative binding with the result of UV-VIS spectrum. [Conclusion] This study could provide important information for further study about the pharmacological activity of aspirin.

Key words Aspirin; DNA; Fluorescence quenching; Mechanism

非金属小分子物质特别是一些药物分子与DNA的相互作用,会影响到DNA的生理和物理化学性质,改变DNA的转录和复制,从而起到抗病毒、抗肿瘤的效果。在医药研究中,DNA与靶向分子相互作用的研究不仅可以阐述一些抗肿瘤、抗病毒药物及致癌物的作用机理,而且对进一步指导新型药物的设计合成研究都具有重要意义^[1-2]。药物分子与DNA作用的方式主要有:外部静电结合、沟槽结合和嵌入结合。具有选择性的沟槽结合和嵌插作用是药物分子与DNA相互作用研究的重点^[3]。

阿司匹林(Aspirin, ASP)化学名为乙酰水杨酸,现已广泛用于解热镇痛、抗风湿,预防暂时性脑缺血及中风,治疗脑血栓,防治心绞痛和心肌梗塞等,有关阿司匹林与DNA相互作用的研究尚未见报道。笔者利用荧光光谱法与紫外光谱法研究ASP与DNA相互作用的机理,为进一步研究该药物的药理活性提供了重要信息。

1 材料与方

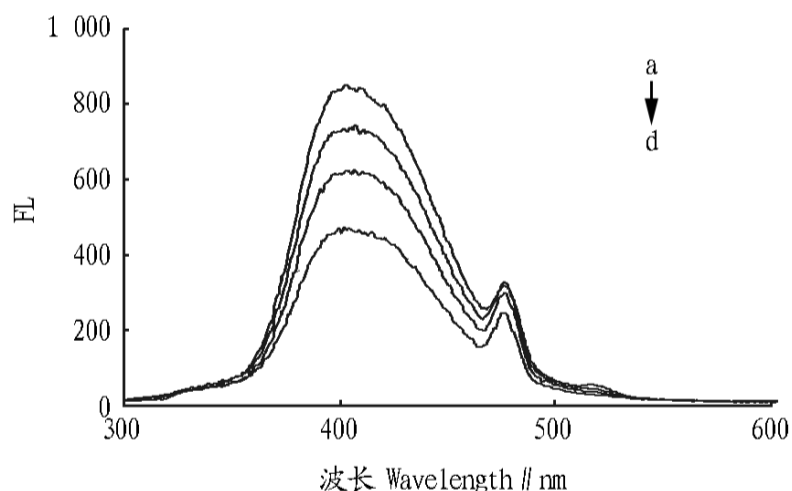
1.1 仪器、试剂 RF-5301 荧光分光光度计(Shimadzu, Japan);双光束紫外可见分光光度计(Hitachi, Japan);PHSJ-4A型pH计(上海精密科学仪器有限公司);微量注射器(上海精密仪器有限公司);FA1604型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司);鲑鱼精DNA(Sigma公司);阿司匹林(浓度 10^{-3} mol/L,中国药品生物制品检定所产品);其他试剂均为分析纯试剂,试验用水均为二次蒸馏水。

1.2 方法 在10 ml容量瓶中,依次用微量注射器加入固定量的ASP溶液和不同量的DNA溶液,随后均加入等量pH值4.5的Tris-HCl缓冲溶液并用二次蒸馏水稀释到刻度,摇匀,在荧光仪上进行荧光光谱和吸收光谱的测定。荧光激发波

长为290 nm,荧光发射波长为405 nm,狭缝宽均为5 nm。

2 结果与分析

2.1 DNA存在下ASP的荧光光谱 图1为DNA存在下ASP的荧光发射光谱,从图1可以看出,ASP在405 nm(ex=290 nm)处有一最大发射峰,DNA的存在可使ASP最大荧光发射峰的荧光强度发生猝灭,当DNA浓度增大时,猝灭程度逐渐增强,表明DNA和ASP可能形成了复合物。



注:a, 2×10^{-5} mol/L ASP;b, a + 7.2×10^{-5} mol/L DNA;c, a + 1.44×10^{-4} mol/L DNA;d, a + 2.16×10^{-4} mol/L DNA。下同。

Note:a, 2×10^{-5} mol/L ASP;b, a + 7.2×10^{-5} mol/L DNA;c, a + 1.44×10^{-4} mol/L DNA;d, a + 2.16×10^{-4} mol/L DNA. The same as below

图1 DNA存在下ASP的荧光发射光谱

Fig.1 The fluorescence emission spectra of ASP with the presence of DNA

2.2 猝灭机制 由荧光猝灭的Stern-Volmer方程^[4]:

$$F_0/F = 1 + K_{sv} \cdot c \quad (1)$$

式中, F_0 为未加入猝灭剂时荧光物质的荧光强度; F 为猝灭剂浓度等于 c 时荧光物质的荧光强度, K_{sv} 称为Stern-Volmer猝灭常数,求出在298 K时,DNA对ASP的Stern-Volmer猝灭常数 K_{sv} 为 4.210 L/mol(相关系数为0.977 1),同时温度升高,其 K_{sv} 基本不变。如果对动态猝灭来说,其猝灭常数随

基金项目 海南省重点科技项目(070207);海南师范大学博士启动基金资助项目(103307);海南省教育厅项目(Hj2009-39);海南省有机化学重点学科开放基金。

作者简介 刘炜(1978-),女,湖北枣阳人,博士,讲师,从事药物分析研究。

收稿日期 2009-04-13

温度升高将会升高,因此上述结果表明 DNA 对 ASP 的荧光猝灭不是由于分子间动态碰撞所引起,而是因为形成复合物所产生的静态猝灭。

2.3 DNA 与 ASP 二元络合物的组成及其结合常数 根据静态猝灭公式^[5]:

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K + n \log c_M \quad (2)$$

式中, F_0 与 F 分别代表总的和游离态的药物的荧光强度, K 为 ASP 与猝灭剂之间的结合常数(L/mol), c_M 为猝灭剂的平衡浓度, n 为结合位点数。由式(2)分别作出 ASP-DNA 体系的关系图(图2),通过斜率和外推截距可以求出 ASP 与猝灭剂之间的结合常数和结合位点数。25℃ 时 ASP 与 DNA 之间的结合常数为 2.17×10^6 L/mol, 结合位点数为 1.773 5, 线性相关系数为 0.990 9。

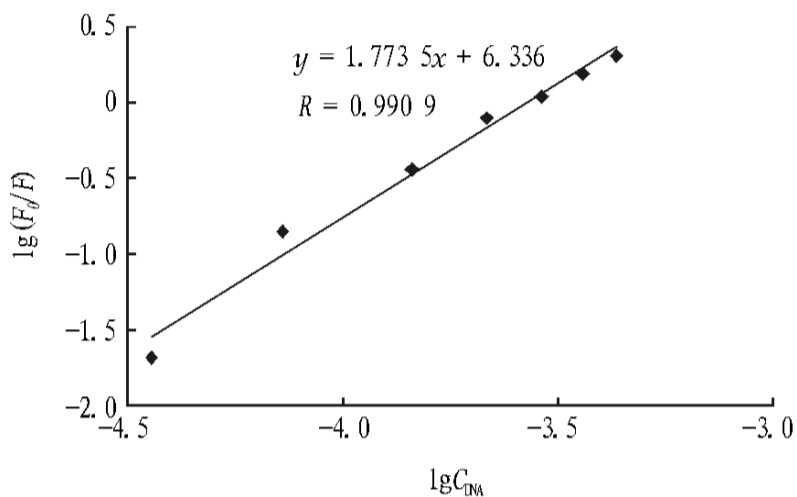


图2 25℃ 下 ASP-DNA 体系的 $\log[(F_0 - F)/F] - \log C$ 工作曲线

Fig. 2 The working curve of $\log[(F_0 - F)/F]$ to $\log C$ of ASP-DNA at 25

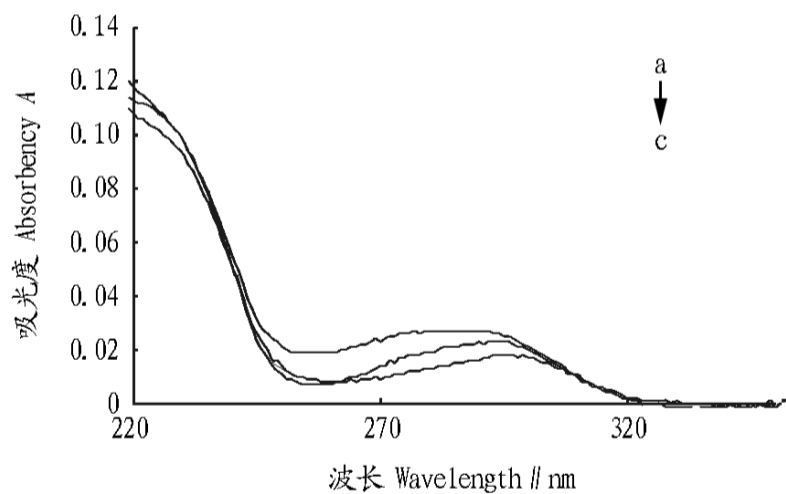


图3 不同DNA浓度下ASP的紫外吸收光谱

Fig. 3 UV spectra of ASP with different concentration of DNA

2.4 ASP 与 DNA 作用机理 药物小分子与 DNA 的作用有 3 种基本模式^[3]: 静电作用,即小分子中带正电的部分与 DNA 中带负电的磷酸根骨架发生静电引力作用; 插入作用,具有平面结构的小分子插入到 DNA 双螺旋结构的碱基对中; 沟槽结合,小分子通过 DNA 分子中的大沟槽及小沟槽与 DNA 的碱基发生作用。根据 ASP 与 DNA 反应的紫外吸收谱图(图3),随着 DNA 浓度的增大,ASP 的紫外吸收峰发

生了红移,吸收强度也逐渐减小。由于药物在有 DNA 存在时出现减色效应、红移现象是该物质与 DNA 发生插入作用的标志^[6-7]。产生减色效应的原因是 DNA 碱基对与插入药物分子间发生电子堆积,使后者空轨道上也有一定的电子填充,从而使药物分子荷电跃迁(MICT)的几率减小^[8],因此 ASP 与 DNA 可能是以嵌入式相结合,即通过疏水作用力嵌入到 DNA 双螺旋的碱基对之间。

2.5 DNA 对 ASP 荧光猝灭的工作曲线 DNA 在一定浓度范围内($0 \sim 2.88 \times 10^{-4}$ mol/L)对 ASP 的荧光强度有线性猝灭的作用,工作曲线的线性方程及相关系数为 $y = -16.459x + 854.550$, $R = 0.9934$ (图4)。

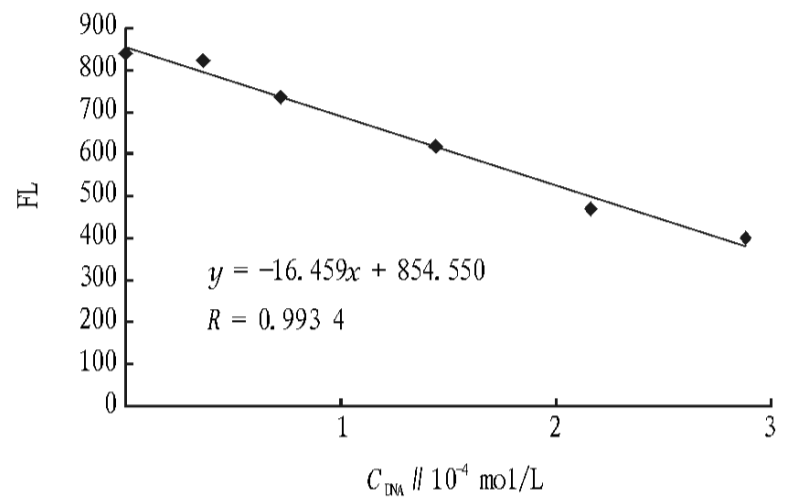


图4 DNA 对 ASP 荧光猝灭的工作曲线

Fig. 4 The fluorescence quenching working curve of ASP by DNA

3 结论

用荧光法和紫外吸收光谱法研究了 DNA 与阿司匹林的相互作用,结果表明,DNA 与 ASP 之间存在较强的相互作用,25℃ 时结合常数为 2.17×10^6 L/mol, 结合位点数为 1.773 5, 结合方式是 ASP 通过嵌入结合的方式与 DNA 结合。

参考文献

- [1] VRANA O, BRABEC V. Electrochemical analysis of antitumor platinum drugs and their complexes with DNA[J]. *BoelectrochemBoenerg*, 1988, 19(1): 145 - 160.
- [2] ZHAO Y D, PANG D W, WANG Z L, et al. Electrochemical studies of antitumor drugs I. Fundamental electrochemical characteristics of an iron(III) Schiff base complex and its interaction with DNA[J]. *Acta Chimica Sinica*, 1998, 56(2): 178 - 183.
- [3] 蒋治良, 刘绍璞, 赵保刚, 等. $CoFe_2O_4$ 纳米粒子的共振散射光谱研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2002, 22(4): 615 - 618.
- [4] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等. 荧光分析法[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1990: 201 - 212.
- [5] 冯喜增, 金瑞祥, 曲芸, 等. 各种离子对血卟啉与牛血清白蛋白相互结合反应的影响研究[J]. *高等学校化学学报*, 1996, 17(6): 866 - 869.
- [6] KUMAR C V, BARTON J K, TURRON J. Photophysics of ruthenium complexes bound to double helical DNA[J]. *J Am Chem Soc*, 1985, 107: 5518 - 5523.
- [7] KUMAR C V, ASUNCION E H. DNA binding studies and site selective fluorescence sensitization of an arthyl probe[J]. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 8547 - 8553.
- [8] TYSOES A, MORGAN R J, BAKER T C, et al. Spectroscopic investigation of differential binding modes of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{ppz})_2]^+$ with calf thymus DNA[J]. *J Phys Chem*, 1993, 97: 1707 - 1711.