

用自旋捕捉技术检测争光霉素 A_6 产生的活泼自由基

刘芳 张清刚 呼俊改

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

提要 本文用自旋捕捉技术与 ESR 相结合的方法, 研究了争光霉素 A_6 - Fe^{2+} 复合物产生的活泼自由基。结果发现用 NOS 自旋捕捉剂可检测到该体系所产生的超氧阴离子自由基。在水溶剂中用 PBN 自旋捕捉到了羟基自由基。根据 PBN-OH 自旋加合物在水溶剂和甲醇溶剂中的超精细分裂常数, 进一步确证了羟基自由基的生成。

关键词 争光霉素 A_6 ; 自旋捕捉; 电子自旋共振; 自由基

争光霉素 A_6 (简称 A_6) 是博来霉素类的抗癌抗生素。我们曾经证实 A_6 能够选择性地抑制小鼠腹水肝癌细胞 DNA 的合成, 而对正常肝细胞和骨髓细胞则无明显的抑制作用⁽¹⁾。其原因与 A_6 对癌细胞膜的作用具有明显的选择性有关⁽²⁾, 但其作用机理至今尚未见报道。Sugiura 等⁽³⁾ 和 Oberley 等⁽⁴⁾ 曾经用自旋捕捉法指出, 博来霉素在 Fe^{2+} 参与下可以产生 O_2^- 和 $\cdot OH$ 自由基; 但是, 由于受自旋捕捉剂的限制, 对 O_2^- 和 $\cdot OH$ 自由基的产生尚缺乏有力的实验证据。本文使用 NOS 和 PBN 两种自旋捕捉剂, 首次研究了我国研制的争光霉素 A_6 与亚铁离子复合物所产生的 O_2^- 和 $\cdot OH$ 自由基, 进一步阐明了 A_6 药理与自由基作用的关系。

材料与方 法

试剂 争光霉素 A_6 为天津河北制药厂产品。苯基-N-特丁基氮酮(PBN)为中国科学院长春应用化学研究所恽勤同志惠赠。吡啶胺氮氧自由基、吡啶酮氮氧自由基和吡啶醇氮氧自由基(均为 2,2,6,6-四甲基吡啶-N-氧基的衍生物, 以下简称 TEMPOL) 由作者合成⁽⁵⁾。带有二氧化硫阴离子的氮氧化物(简称 NOS)按文献⁽⁶⁾制备。其它试剂均为分析纯级商品。

ESR 波谱测定 用 NOS 自旋捕捉 O_2^- 是参照 Argese 等人方法⁽⁶⁾。PBN 自旋捕捉 A_6 - Fe^{2+} 复合物所产生的 $\cdot OH$ 的检测参照 Sugiura 与 Kikuchi 法⁽³⁾。使用 Varian E-109 型 ESR 仪(X-波段, 100 KHz 调制, 微波功率 10 mW, 室温 15°C)测定 ESR 波谱。其自旋加合物波谱均以锰标的 ESR 谱的第 3, 4 条超精细谱峰的距离为标准。

结果与讨论

一. 用 NOS 自旋捕捉 A_6 产生的 O_2^- 自由基

用吡啶醇等氮氧自由基(TEMPOL)分别制备了 NOS(见反应式 1)。其手续为: 将连二

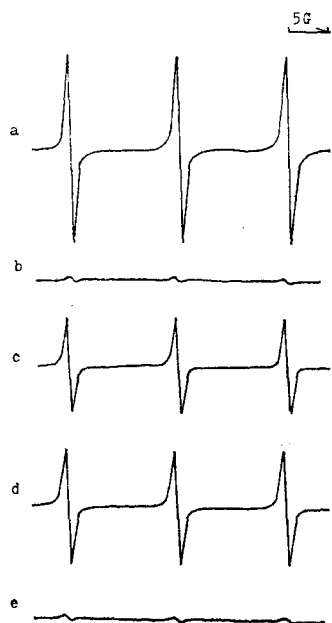
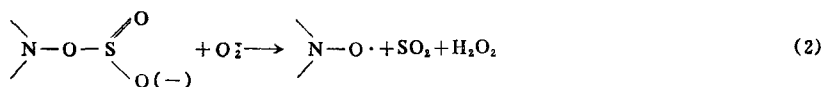
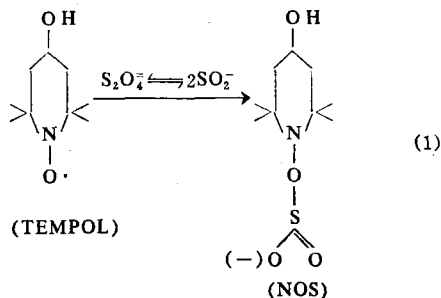


Fig 1. Quenching and regeneration of ESR spectra of 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl piperidinoxyl (TEMPOL). a. TEMPOL; b. TEMPOL+Na₂S₂O₄(NOS); c. NOS+A₆-Fe²⁺; d. NOS+NaOH/DMSO; e. NOS+A₆-Fe²⁺+SOD.

亚硫酸钠溶液(3×10^{-3} mol/L)逐滴加至吡啶醇氮氧自由基(10^{-2} mol)的磷酸缓冲液中(0.1 mol/L, pH 8.0), 直至吡啶醇氮氧自由基的 ESR 波谱完全消失, (此时, ESR 仪器的增益为 1×10^{-4}) 即获得 NOS 自旋捕捉剂。

在 NOS 存在下, 分别加入可专一产生 O₂⁻ 的碱性二甲基亚砷 (NaOH/DMSO) 试剂⁽⁷⁾ 和争光霉素 A₆-Fe²⁺ 体系, 在 ESR 仪器增益恒定的条件下, 于室温(15°C)即刻观察到 ESR 波谱的产生, 其原理见反应式 2。实验结果分别列于表 1 和图 1。



Tab 1. Formation of O₂⁻ in Bleomycin A₆-Fe²⁺ system as detected by NOS

Compd	Reactive condition	ESR spectra
TEMPOL		Isometric triplet
TEMPOL	Na ₂ S ₂ O ₄ (to obtain NOS)	Quenched
NOS	5 mmol NaOH/DMSO, 1% H ₂ O	Regenerated
NOS	5 mmol NaOH/DMSO, 50 mmol NaN ₃	Regenerated
NOS	5 mmol NaOH/DMSO, 25 mmol V _E	No
NOS	A ₆ -Fe ²⁺ (0.1 mmol, 1:1)	Regenerated
NOS	A ₆ -Fe ²⁺ (0.1 mmol, 1:1), SOD	No
NOS	3% H ₂ O ₂ , 30 min	No

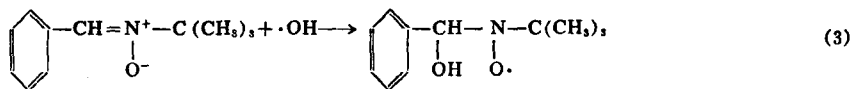
上述实验结果表明 NOS 可以专一地与 O₂⁻ 反应, 使 TEMPOL 再生。超氧化物歧化酶 (SOD) (250 μg/ml) 则可完全抑制该反应。NaN₃ (5×10^{-2} mol) 对本反应没有明显的干扰。3% H₂O₂ 在本反应条件下, 对 NOS 再生也无明显的影响。总之, 以上实验从不同角度证明了争光霉素 A₆-Fe²⁺ 复合物的体系可以产生 O₂⁻ 自由基; 而 O₂⁻ 可以专一地氧化 NOS 使氮氧自由基

再生, ESR 波谱重新出现。

已知 O_2^- 是生物氧化和某些药物代谢过程中产生的重要自由基, 具有很高的活性, 寿命又极短, 难于用一般的自旋捕捉剂如 PBN, DMPO 等去捕捉^(3,4)。由 Argese 等人⁽⁶⁾ 提出的用 NOS 检测 O_2^- 的方法既较为专一, 操作也很简便。我们的实验则进一步证实除了吡啶胺氮氧自由基之外, 使用任何的稳定的氮氧自由基, 均可以制备 NOS 自旋捕捉剂。

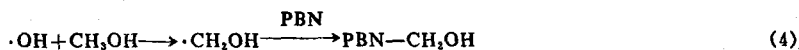
二. 用 PBN 自旋捕集 A_6 产生的 $\cdot OH$ 自由基

图 2 是 PBN 自旋捕集 A_6-Fe^{2+} 体系中产生的 $\cdot OH$ 自由基的 ESR 波谱。反应是在磷酸缓冲液 (0.5 mol/L, pH 8.6) 中进行。各反应物的终浓度为 PBN 0.5 mol, A_6-Fe^{2+} 复合物 1:1 (0.25 mmol)。反应如下式(3)。



在上述实验条件下, 获得的 PBN-OH 自旋加合物的 ESR 波谱(图 2), 是由未偶电子与 ^{14}N 及一个 β -H 相互作用产生的三组两重峰。其波谱参数分别为: $g=2.0057$, $a_N=15.33\text{G}$, $a_\beta^H=2.80\text{G}$ 。与文献报道的数值相近⁽⁸⁾。此外, 若在上述反应体系中, 抽去某一反应物, 仅仅含有 PBN- A_6 , PBN- Fe^{2+} 或 PBN- H_2O_2 时, 均未发现任何 ESR 信号。

为了证实 PBN 捕捉的确系 $\cdot OH$ 自由基, 我们改变其反应介质以检测它的次级反应, 即用含 60% 甲醇的磷酸缓冲液作为溶剂, 其它各反应物的终浓度为: PBN 0.7 mol, A_6-Fe^{2+} 复合物为 1:1 (0.4 mmol)。反应如下式(4)。



上述次级反应只有在 $\cdot OH$ 存在下方能进行。在前述 ESR 仪器实验条件下得到图 3 所示的三组两重峰谱。显然, 它也是未偶电子与 ^{14}N 及一个 β -H 相作用的结果, 但 a_N 和 a_β^H 的分裂常数均稍有加宽。 $g=2.0057$, $a_N=15.59\text{G}$, $a_\beta^H=3.58\text{G}$ 。

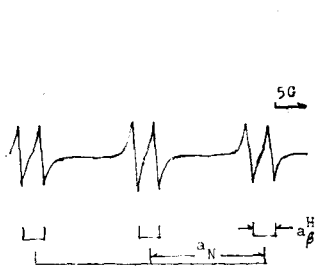


Fig 2. The ESR spectrum of the spin-trapped $\cdot OH$ radical generated in the A_6-Fe^{2+} system in the presence of PBN in water. Spectra parameter: $g=2.0057$, $a_\beta^H=2.80\text{G}$, $a_N=15.33\text{G}$. Conditions of ESR spectroscopy: microwave power 10 mW, modulation amplitude 0.5 G, time constant 0.125 s, scan time 8 min.

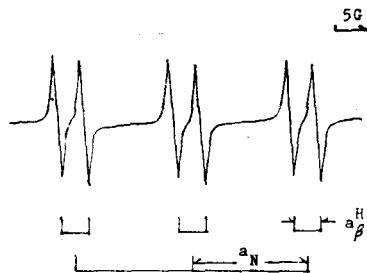


Fig 3. The ESR spectrum of the hydroxymethyl radical adduct produced by the reaction of PBN and methyl alcohol with A_6-Fe^{2+} system. Spectra Parameter:

$$g=2.0057, a_N=15.59\text{G}, a_\beta^H=3.58\text{G}$$

争光霉素是一种含醌的抗生素, 在起药性作用时, 首先需要二价铁离子参与, 将其活化至一活性中间体, 进而产生 O_2^- 和 $\cdot OH$ 自由基⁽⁹⁾。以往, 由于受自旋捕捉剂的种类和作用的限制, 对 O_2^- 产生的直接证据尚感不足; 此外, 由于 PBN 在自旋捕集 $\cdot OH$ 和 $\cdot OOH$ 时具

有同样的 g 因子, a_n^H 的分裂值也近似⁽³⁾, 所以, 也需用次级反应来进一步确证 $\cdot\text{OH}$ 的存在。本文使用能专一地与 O_2^- 起反应的 NOS 和能与 PBN 产生次级反应的醇试剂, 确证了我国研制的争光霉素 A_6 在 Fe^{2+} 参与下, 可以迅速地产生 O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ 自由基。结合我们先对 A_6 的研究结果^(1,2), 可以认为 A_6 在杀伤癌细胞过程中, O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ 自由基是起着非常重要的作用。至于 A_6 的有限的毒副作用则可用 SOD, 维生素 E 等清除。

参 考 文 献

1. 刘芳, 等. 争光霉素 A_6 对小鼠腹水肝癌细胞核酸蛋白质合成的影响. 抗生素 1985, 10:39.
2. 刘芳, 等. 争光霉素 A_6 对小鼠腹水肝癌细胞膜选择性作用的 ESR 波谱的研究. 波谱学杂志 1986, 3:331.
3. Sugiura Y and Kikuchi T. Formation of superoxide and hydroxy radicals in iron(II)-bleomycin-oxygen system: ESR detection by spin trapping. *J Antibiotics* 1978, 31:1310.
4. Oberley LW and Buettner GR. The production of hydroxyl radical by bleomycin and iron(II). *FEBS Letters* 1979, 97:47.
5. 张清刚, 等. 顺丁烯二酰亚胺氮氧自由基的合成及自旋标记的血清白蛋白. 生物化学与生物物理学报 1980, 12:331.
6. Argese E, et al. Reaction of dithionite with nitroxides: A new possible spin trapping agent of superoxide ion. *Inorg Chim Acta* 1981, 56:L 69.
7. Hyland K. et al. Superoxide dismutase assay using alkaline dimethylsulfoxide as superoxide anion generating system. *Anal Biochem* 1983, 135:280.
8. Harbour JR, et al. An ESR study of the spin adducts of $\cdot\text{OH}$ and $\text{HO}_2\cdot$ radicals with nitrones in the ultraviolet photolysis of aqueous hydrogen peroxide solutions. *Can J Chem* 1974, 52:3549.
9. 李文杰. 自由基与博来霉素的毒性. 生命的化学 1986, 6:17.

DETECTION OF SUPEROXIDE AND HYDROXY RADICALS FORMED IN BLEOMYCIN A_6 - Fe^{2+} SYSTEM BY SPIN TRAPPING

F Liu, QG Zhang and JG Hu

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

ABSTRACT The active radicals produced in Bleomycin A_6 - Fe^{2+} system have been studied by combination of spin trapping technique with ESR spectroscopy. It was found that the superoxide radicals could be detected by NOS in the above system. The hydroxyl radicals could be trapped by PBN in aqueous solution. In accordance with the parameters of ESR spectra of spin adducts of PBN-OH in aqueous and methyl alcohol solutions, the production of $\cdot\text{OH}$ radical have been further demonstrated.

Key words Bleomycin A_6 ; Spin trapping; ESR; Free radical