

氧氟沙星和左氧氟沙星与 DNA 的相互作用研究

童裳伦, 张晓翔

浙江大学环境科学研究所, 污染环境修复与生态健康教育部重点实验室, 浙江 杭州 310029

摘要 采用紫外光谱、荧光光谱、荧光偏振以及 $K_3Fe(CN)_6$ 荧光猝灭实验研究了氧氟沙星(Ofloxacin, OFLX)和左氧氟沙星(Levofloxacin, L-OFLX)与小牛胸腺 DNA(ctDNA)的相互作用差异性与作用模式。紫外光谱的结果表明, 当向 OFLX 和 L-OFLX 溶液中加入 ctDNA 并且浓度增大时, OFLX 和 L-OFLX 的吸收光谱都呈现略微的减色效应, 但吸收峰位置没有发生偏移, L-OFLX 的减色效应略强于 OFLX 的减色效应; 从荧光光谱以及 OFLX 和 L-OFLX 的 Scatchard 方程, 获得其键合常数分别为 $1.15 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $3.75 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明 L-OFLX 与 ctDNA 的相互作用要略强于 OFLX 与 ctDNA 的相互作用; 荧光偏振实验、单双链 ctDNA 与药物作用实验、 $K_3Fe(CN)_6$ 荧光猝灭实验都表明 OFLX、L-OFLX 与 ctDNA 的作用模式可能是沟槽结合。

关键词 小牛胸腺 DNA; 左氧氟沙星; 氧氟沙星; 相互作用; 光谱法

中图分类号: O561.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)02-0481-05

引言

手性异构体的物理和化学性质几乎相同, 但是在生理、药理活性以及与 DNA、蛋白质等生物大分子的相互作用方面可能存在较大的差异, 如氧氟沙星, 其左旋氧氟沙星的抗菌活性是右旋的 8~128 倍, 且右旋氧氟沙星的毒性较大^[1]。氧氟沙星(商品名为泰利必妥)是日本于 1982 年开发的具有广谱抗菌活性的新型喹诺酮类药物^[2], 左旋氧氟沙星(商品名为可乐必妥)是旋光性 S(-)的氧氟沙星异构体, 此药对大多数需氧革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有效, 不良反应轻, 细菌耐药性小, 临床应用广泛^[3]。药物小分子与 DNA 的相互作用及所引起的 DNA 序列、构象的变化, 对于设计新药、筛选药物等都具有指导意义。目前研究小分子与 DNA 相互作用的方法主要有: 紫外光谱法^[4]、荧光光谱法^[5]、电化学方法、化学发光法等。本文主要利用紫外光谱法和荧光光谱法研究了左氧氟沙星、氧氟沙星与小牛胸腺 DNA(ctDNA)的作用方式及其差异性。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LS-55 荧光分光光度计(美国 Perkin Elmer), UV-

2401PC 紫外-可见分光光度计(日本 Shimadzu), MP220 型 pH 计(瑞士 Mettler Toledo)。

小牛胸腺 DNA(ctDNA)储备液: ctDNA(Sigma 公司)用二次重蒸水溶解并定容, 摇匀后置于 4 °C 冰箱保存, 放置 24 h 以上使之全部溶解, 由 260 nm 处的吸光度确定其浓度, ϵ_{260} 取 $6600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[6], 测得浓度为 $5.08 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 。单链 DNA(ssDNA): 于 25 mL 比色管中加入一定量 ctDNA 溶液, 在沸水浴中加热 10 min, 取出后置于冰水浴 3 min, 即得到 ssDNA; 氧氟沙星(OFLX)与左旋氧氟沙星(L-OFLX)储备液: 氧氟沙星与左旋氧氟沙星标准品(由杭州药检所提供)用二次重蒸水溶解, 配制成浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 的储备液; 铁氰化钾溶液($K_3Fe(CN)_6$): 铁氰化钾用二次重蒸水溶解并定容, 配制成浓度为 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 并摇匀避光保存; 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液(Tris-HCl): 三羟甲基氨基甲烷(国药集团化学试剂有限公司, 分析纯)用二次重蒸水溶解并用盐酸调节 pH 至 7.0, 配制成浓度为 0.5 mol L^{-1} 的缓冲液; 其他试剂均为分析纯, 并用二次重蒸水配制。

1.2 紫外光谱

于 25 mL 比色管中依次加入 1 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲溶液, 1.0 mL $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ OFLX 溶液(A 组)、L-OFLX 溶液(B 组), 一定量的 ctDNA 溶液, 定容至 10 mL 后摇匀, 室温放置 15 min。以相应试剂的空白为参比,

收稿日期: 2009-02-06, 修订日期: 2009-05-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(20577039)和浙江省杰出青年团队基金项目(R507212)资助

作者简介: 童裳伦, 1969 年生, 浙江大学环境科学研究所副教授 e-mail: cltong@zju.edu.cn

在紫外-可见分光光度计上记录 OFLX 药物在 240~320 nm 范围内的紫外吸收光谱,狭缝宽度为 1.0 nm。

1.3 荧光光谱

于 25 mL 比色管中依次加入 1 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲溶液, 1.0 mL $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ OFLX 溶液(A组)、L-OFLX 溶液(B组), 一定量的 ctDNA 溶液, 定容至 10 mL 后摇匀, 室温放置 15 min。于 1 cm 石英比色池, 以 285 nm 为激发波长, 扫描 350~550 nm 波长范围内的荧光光谱, 激发和发射狭缝宽度均为 10 nm。

1.4 荧光偏振

上述用于荧光光谱测定的溶液, 同时测量其偏振荧光强度, 再按下列公式计算其荧光偏振 P

$$P = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + GI_{VH})$$

其中: I_{VV} 和 I_{VH} 为垂直偏振光激发后的垂直偏振和水平偏振的发射光强度。 G 为仪器校正因子, $G = I_{HV} / I_{HH}$, I_{HV} 和 I_{HH} 为水平偏振光激发下的垂直偏振和水平偏振光的发射光强度。

1.5 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 荧光猝灭

于 25 mL 比色管中依次加入 1 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲溶液, 1.0 mL $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ OFLX 溶液(A组), 一定浓度 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1.0 mL $2.54 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ctDNA 溶液, 定容至 10 mL 后摇匀, 室温放置 15 min。于荧光光度计上测量其荧光强度, 同时做不加 DNA 溶液的试剂空白作比较。(L-OFLX 溶液)(B组)与 A 组同样操作。

2 结果与讨论

2.1 紫外光谱

OFLX, L-OFLX 与不同浓度的 ctDNA 作用后, OFLX-ctDNA 与 L-OFLX-ctDNA 体系的紫外光谱如图 1 所示。

由图 1 可知, OFLX 和 L-OFLX 溶液在 287 nm 处有吸收峰, 当向 OFLX 和 L-OFLX 溶液中加入 ctDNA 并且浓度增大时, OFLX 和 L-OFLX 的吸收光谱都呈现略微的减色效应, 但吸收峰位置没有发生偏移, 这种略微的减色现象表明嵌入生色团电子态与 DNA 发生相互作用^[7], 但作用程度较弱, 相比较而言 L-OFLX 的减色效应略强于 OFLX 的减色效应。这表明 L-OFLX 与 DNA 的作用要略强于 OFLX。

2.2 荧光光谱

由图 2 可见, OFLX 和 L-OFLX 的荧光峰都在 450 nm 处, ctDNA 对 OFLX 和 L-OFLX 的荧光都有较强的猝灭作用, 并随 ctDNA 浓度的增加猝灭趋势增大, 同时两者的猝灭趋势强弱也有一定差异, L-OFLX 的猝灭趋势略强于 OFLX 的猝灭趋势, 即 L-OFLX 与 ctDNA 的相互作用比 OFLX 略强, 这与紫外光谱得到的结论一致。从图中还可以观察到 OFLX 和 L-OFLX 的荧光峰都没有产生位移。

荧光猝灭作用因猝灭机制不同通常可分为动态猝灭和静态猝灭。动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间的相互作用, 其作用过程遵循 Stern-Volmer 方程^[5]

$$F_0/F - 1 = K_q \tau_0 [D] = K_{SV} [D] \quad (1)$$

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

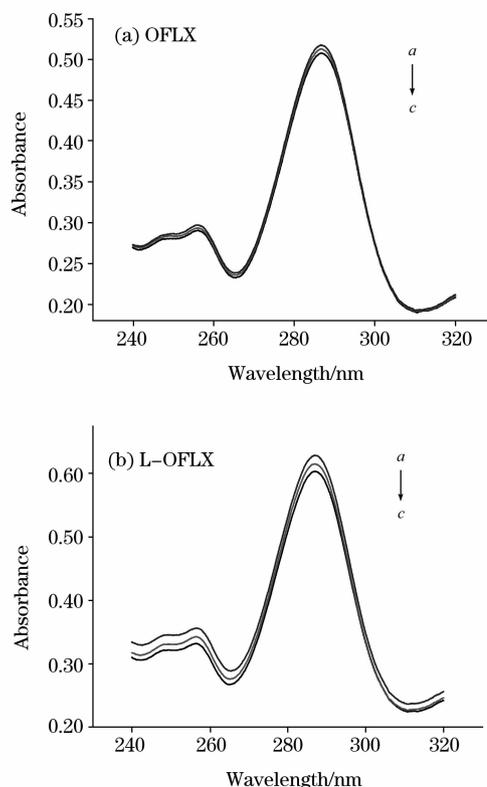


Fig. 1 Absorption spectra of pure (L-)OFLX and (L-)OFLX-ctDNA complexes in aqueous solution at room temperature. Line a represents the pure (L-)OFLX aqueous solution; Lines b-c are the above (L-)OFLX aqueous solutions in the presence of ctDNA with the concentrations of 3.81, 12.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. (L-)OFLX: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0

剂浓度等于 $[D]$ 时荧光物质的荧光强度; K_q 为双分子猝灭过程的速率常数; τ_0 为没有猝灭剂存在下荧光分子的平均寿命(生物大分子的 τ_0 约为 10^{-8}); K_{SV} 称为 Stern-Volmer 猝灭常数。

以 OFLX 和 L-OFLX 最大发射波长 450 nm 处的荧光强度按式(1)作线性回归, 得到 ctDNA 对 OFLX 和 L-OFLX 的 Stern-Volmer 猝灭常数 K_{SV} 分别为 $5.7 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $7.4 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (相关系数分别为 0.992 9, 0.994 7), 则其双分子速率常数 K_q 分别为 $5.7 \times 10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $7.4 \times 10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。通常各类猝灭剂对生物大分子最大扩散控制的碰撞猝灭常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 本实验结果 OFLX 和 L-OFLX 的猝灭常数都远大于这一值。由此可以确定 ctDNA 对 OFLX 和 L-OFLX 的猝灭并非分子间动态碰撞所致, 而是由于形成复合物所引起的静态猝灭。同时, 从所得的数据来看, L-OFLX 的猝灭作用略大于 OFLX 的猝灭作用, 这也表明 L-OFLX 和 OFLX 在与 ctDNA 作用中存在一定的差异。

Scatchard 方程是适用于求小分子与生物大分子之间结合常数的关系式^[8]。通过 Scatchard 方程作图可求得 OFLX 和 L-OFLX 和 DNA 间的键合常数。

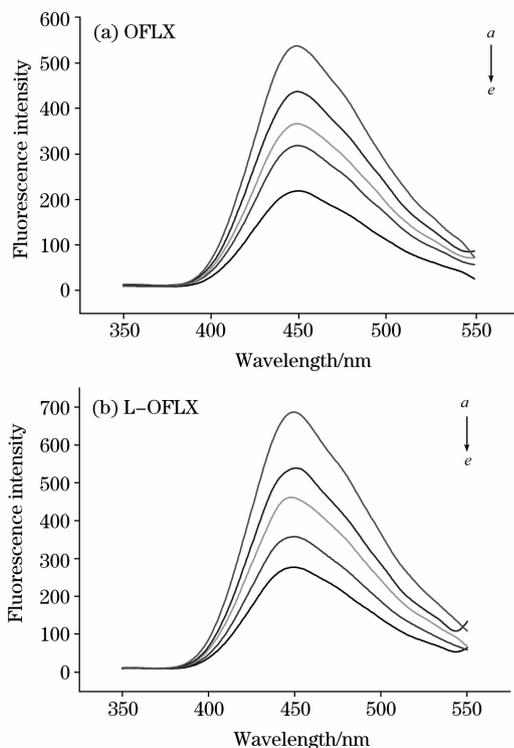


Fig. 2 Emission spectra of pure (L-)OFLX and (L-)OFLX-ctDNA complexes in aqueous solution at room temperature. Line a represents the pure (L-)OFLX aqueous solution; Lines b-e are the above (L-)OFLX aqueous solutions in the presence of ctDNA with the concentrations of 2.54, 7.62, 12.7, 25.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. OFLX: $6.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7.0

$$c_F = c_T(I/I_0 - q)/(1 - q) \quad (2)$$

$$c_B = c_T - c_F \quad (3)$$

$$r/c_F = Kn - Kr \quad (4)$$

其中 c_F 表示游离的药物浓度, c_B 表示结合的药物浓度, c_T 表示药物的总浓度, I 表示不同浓度 DNA 存在时药物的荧光强度, I_0 表示 DNA 不存在时药物的荧光强度, q 表示游离态药物与结合态药物的荧光量子产率比。以 I/I_0 对 $1/c_{\text{DNA}}$ 作图获得一直线, q 为直线截距。式(4)中 r 为 DNA 上每个核苷酸结合药物的分子数, K 是每个位点的键合常数, n 是每个核苷酸上的最大键合位点数。以 r/c_F 对 r 作图, 得到 OFLX 和 L-OFLX 的 Scatchard 图。实验获得其键合常数分别为 $1.15 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $3.75 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, L-OFLX 的键合常数比 OFLX 的键合常数略大。

2.3 单双链 ctDNA 与 OFLX 药物的相互作用

当 OFLX 和 L-OFLX 的浓度为 $6.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 分别研究了单、双链 ctDNA 与 OFLX 和 L-OFLX 的相互作用。实验数据利用式(1), 以 $F_0/F-1$ 对 $[D]$ 作图, 得到相应的猝灭曲线, 如图 3 所示。

由图 3 可见, ssDNA 对 OFLX 和 L-OFLX 的猝灭作用都略大于 dsDNA 的作用。由于在静电或嵌插作用模式下, ssDNA 对小分子的猝灭作用与 dsDNA 相比, 应为不变(静

电作用模式下, 都是与 DNA 骨架上的磷酸基团发生作用)或猝灭减弱(由于 dsDNA 制取 ssDNA 时双螺旋结构被破坏)。因此可以推断单双链 DNA 与 OFLX 和 L-OFLX 的作用模式为沟槽结合。由 dsDNA 变性得到的 ssDNA 虽然大小沟槽被破坏了, 但由于 ssDNA 是以线团状形式存在于溶液中, 在线团的表面形成了可以与小分子发生氢键作用的许多凹点, 所以 ssDNA 对 OFLX 和 L-OFLX 仍存在猝灭作用。

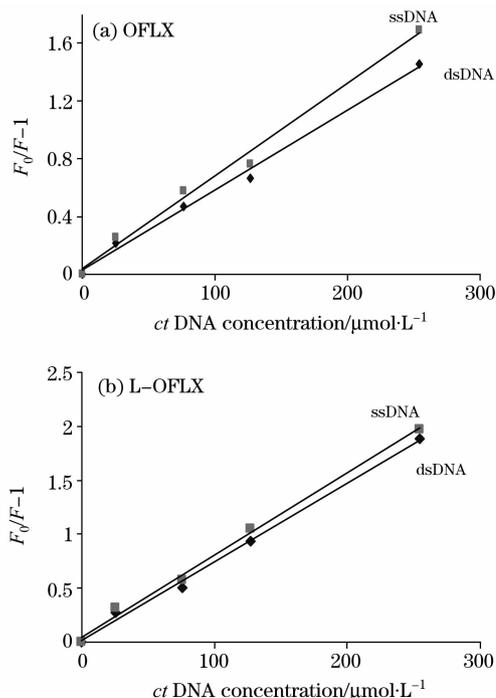


Fig. 3 Fluorescence quench of (L-)OFLX by ssDNA and dsDNA. (L-)OFLX: $6.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0

2.4 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 荧光猝灭

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 是一类荧光猝灭剂, 通过考察其对小分子荧光的猝灭作用可以判断小分子与 DNA 的作用方式。如果是静电作用, OFLX 和 L-OFLX 将沿着 DNA 的外壁与 DNA 发生作用, 此时 OFLX 和 L-OFLX 分子是裸露在溶液中的, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的存在对 (L-)OFLX-DNA 体系的荧光猝灭作用应等同于对 (L-)OFLX 的猝灭; 如果是嵌插作用, (L-)OFLX 分子嵌入到 DNA 双螺旋结构中而受到 DNA 的保护, 将不被 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 猝灭, 在猝灭曲线中呈一条近水平直线。由图 4 可见, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的存在对 (L-)OFLX-DNA 体系的荧光猝灭能力略小于对 (L-)OFLX 的猝灭, 这表明 (L-)OFLX 与 DNA 间的作用不是静电或嵌插作用方式, OFLX 只是被部分地保护起来, 提示是沟槽结合^[9]。

2.5 荧光偏振

在粘度小的溶剂(如水)中, 由于小分子旋转扩散很快, 其荧光偏振一般很小。而当小分子荧光体与 DNA 发生嵌插作用时, 其转动受阻, 导致小分子转动速度变慢, 因而荧光偏振会随之变大。而小分子仅仅与 DNA 磷酸骨架或在其沟槽处发生作用, 并不能引起荧光偏振的显著增加^[10]。

由图 5 可以看出, DNA 的加入并没有引起荧光偏振的

显著增加, OFLX 和 L-OFLX 的荧光偏振也不随着 DNA 浓度的变化而发生较大变动, 总体呈现稳定趋势。由此可以推断, OFLX 和 L-OFLX 与 ctDNA 的作用方式应该是静电或沟槽结合, 而非嵌插结合。

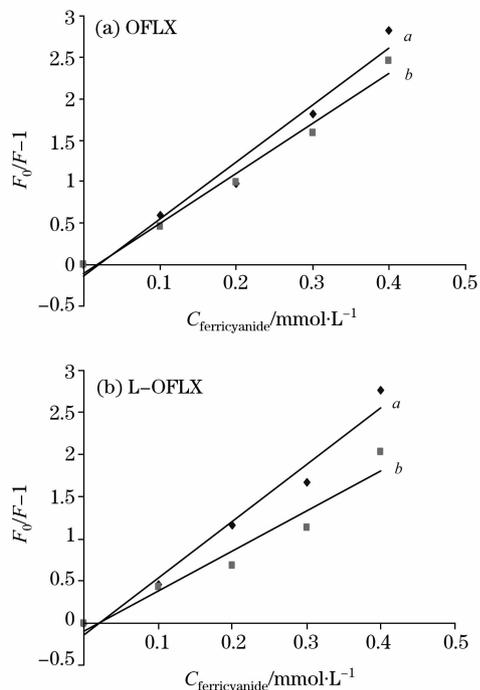


Fig. 4 Emission quenching of pure (L-)OFLX and (L-)OFLX-ctDNA complexes induced by ferricyanide in aqueous solution at room temperature. (a) pure (L-)OFLX; (b) (L-)OFLX-ctDNA; (L-)OFLX: $6.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ctDNA: $2.54 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; F_0 and F are the emission intensities without ferricyanide and with ferricyanide, respectively; pH 7.0

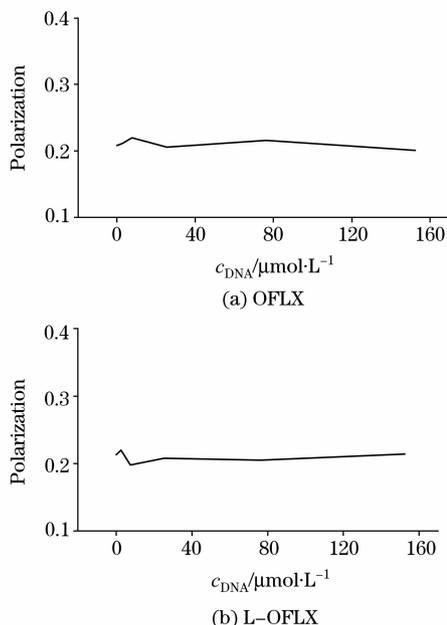


Fig. 5 Effect of ctDNA concentration on the fluorescence polarization of (L-)OFLX in aqueous solution at room temperature. (L-)OFLX: $6.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 7.0

3 结论

在紫外吸收光谱中, L-OFLX 的减色效应略强于 OFLX 的减色效应; 在荧光光谱中, L-OFLX 的猝灭作用略强于 OFLX 的猝灭作用, 并且作图计算所得的键合常数也是 L-OFLX 的略大, 这些都说明了 L-OFLX 与 ctDNA 的相互作用要略强于 OFLX 与 ctDNA 的相互作用。荧光偏振实验、单双链 ctDNA 与药物作用实验、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 荧光猝灭实验所得到的结果都支持 OFLX 和 L-OFLX 与 ctDNA 的作用是沟槽结合这一结论。

参 考 文 献

- [1] HONG Jian-wen, HU Chang-qin, SHENG Long-sheng(洪建文, 胡昌勤, 盛龙生). Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志), 2003, 23(2): 155.
- [2] TONG Chang-lun, XIANG Guang-hong, HUANG Di-jin, et al(童裳伦, 项光宏, 黄迪金, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2004, 32(5): 619.
- [3] SHAN Ai-lian, LÜ Yuan, LI Jia-tai(单爱莲, 吕媛, 李家泰). The Chinese Journal of Clinical Pharmacology(中国临床药理学杂志), 1997, 13(2): 115.
- [4] Tong C L, Hu Z, Liu W P. J. Agric. Food Chem., 2005, 53(16): 6207.
- [5] Xiang G H, Tong C L, Lin H Z. J. Fluoresc., 2007, 17(5): 512.
- [6] Hu Z, Tong C L. Anal. Chim. Acta, 2007, 587(2): 187.
- [7] Long E C, Barton J K. Acc. Chem. Res., 1990, 23(9): 271.
- [8] Chaires J B, Dattagupta N, Crothers D M. Biochemistry, 1982, 21(17): 3933.
- [9] LI Jin-huan, AI Shi-yun, SHI Wei-jie, et al(李金焕, 艾仕云, 时俊杰, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2009, 29(3): 726.
- [10] Kumar C V, Asuncion E H. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115(19): 8547.

Study on the Interaction of Ofloxacin and Levofloxacin with DNA

TONG Chang-lun, ZHANG Xiao-xiang

Institute of Environmental Science, Ministry of Education Key Laboratory of Environmental Remediation and Ecological Health, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

Abstract The interaction of ofloxacin (OFLX) and levofloxacin (L-OFLX) with calf thymus DNA (ctDNA) was studied by absorption spectra, fluorescence spectra, fluorescence polarization, and $K_3Fe(CN)_6$ quenching tests to show the interaction differences and binding modes. The experimental results of absorption spectra indicated that when ctDNA was added to the solution of OFLX or L-OFLX and its concentration was increased, the hypochromic effects in the absorption spectra of OFLX or L-OFLX were observed, and no changes in its maximum absorption wavelengths were found. Fluorescence spectroscopy was an appropriate method to study the interactions between small molecule ligands and biomacromolecule. From the measurements of emission peaks, transfer efficiency of energy, lifetime and so on, a vast amount of information about the interaction will be given. The experimental results indicated that the fluorescence quenching effects of OFLX and L-OFLX were not initiated by the dynamic collision according to the Stern-Volmer equation, and caused by the static quenching of compounds formation. From the Scatchard equation, its association constants were obtained for OFLX and L-OFLX to be 1.15×10^5 and $3.75 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectively. On the basis of the absorption spectra and the association constants, it was showed that the interaction between L-OFLX and ctDNA was stronger than that of OFLX and ctDNA. There are three modes for the binding of small molecules to DNA double helix: electrostatic binding, groove binding and intercalative binding. The interaction modes between OFLX, L-OFLX and ctDNA were studied by fluorescence polarization, the $K_3Fe(CN)_6$ quenching tests and so on. The results showed that the interaction modes of OFLX and L-OFLX with ctDNA were both groove binding.

Keywords Calf thymus DNA; Levofloxacin; Ofloxacin; Interaction; Spectroscopy

(Received Feb. 6, 2009; accepted May 8, 2009)