

[Article]

www.whxb.pku.edu.cn

胆固醇修饰富勒烯/ γ -环糊精包结复合物的生物活性

高云燕^{1,*} 刘丽华¹ 欧植泽^{1,*} 李 嫻² 杨国强³ 王雪松²

(¹西北工业大学理学院应用化学系, 西安 710072; ²中国科学院理化技术研究所, 光化学转换与功能材料重点实验室, 北京 100090; ³中国科学院化学研究所, 光化学重点实验室, 北京 100190)

摘要: 采用 Bingel-Hirsch 反应合成了胆固醇修饰的富勒烯(CHL-C₆₀), 通过核磁共振(NMR)、质谱(MS)、元素分析对 CHL-C₆₀ 的化学结构进行了表征. γ -环糊精(γ -CD)对甾环具有较强的包结能力, 能够与 CHL-C₆₀ 形成包结复合物 (CHL-C₆₀/ γ -CD), 从而有效提高 CHL-C₆₀ 的水溶性. 紫外-可见吸收光谱和荧光光谱研究结果表明, CHL-C₆₀ 能够从 γ -CD 的疏水空腔中解离出来, 与人血清白蛋白(HSA)及牛血清白蛋白(BSA)形成稳定的复合体, 其结合常数分别为 5.73×10^4 和 $7.05 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. 无氧条件下, CHL-C₆₀/ γ -CD 通过光诱导电子转移作用断裂 pBR322 质粒脱氧核糖核酸(DNA), 其效率可达 60.5%.

关键词: 富勒烯; 环糊精包结物; 血清白蛋白; DNA 断裂

中图分类号: O641

Biological Activity of a Cholesterol Modified Fullerene/ γ -Cyclodextrin Inclusion Complex

GAO Yun-Yan^{1,*} LIU Li-Hua¹ OU Zhi-Ze^{1,*} LI Yi² YANG Guo-Qiang³ WANG Xue-Song²

(¹Department of Applied Chemistry, School of Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, P. R. China;

²Key Laboratory of Photochemical Conversion and Optoelectronic Materials, Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, P. R. China; ³Key Laboratory of Photochemistry, Institute of Chemistry,

Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, P. R. China)

Abstract: A cholesterol modified fullerene (CHL-C₆₀) was synthesized using the Bingel-Hirsch reaction and was characterized by nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectra (MS), elemental analysis (EA). Results of UV-Vis spectrum and fluorescence spectrum indicate that CHL-C₆₀ forms an inclusion complex with γ -cyclodextrin (γ -CD) due to the strong interaction between γ -cyclodextrin and the steroid ring. The water solubility of CHL-C₆₀ is enhanced significantly. CHL-C₆₀ can dissociate from cyclodextrin and subsequently bind to human serum albumin (HSA) and bovine serum albumin (BSA) with association constants of 5.73×10^4 and $7.05 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectively. The efficiency of desoxyribonucleic acid (DNA) photocleavage for CHL-C₆₀/ γ -CD is as high as 60.5% under anaerobic conditions, which is caused by photoinduced electron transfer from pBR322 plasmid DNA to CHL-C₆₀.

Key Words: Fullerene; Cyclodextrin inclusion complex; Serum albumin; DNA cleavage

C₆₀ 是目前研究得比较多的一种富勒烯化合物. 其独特的三维共轭结构赋予了它特殊的物理和化学性质, 有望在材料科学、生物、医药等领域得到广泛

的应用^[1-3]. C₆₀ 衍生物所具有的生物活性越来越受到人们的重视, 其中包括抗肿瘤、抗艾滋病病毒、酶活性抑制、DNA 的选择性断裂、清除自由基等活性. 作

Received: August 28, 2009; Revised: November 12, 2009; Published on Web: January 5, 2010.

*Corresponding authors. Email: gaoyunyan@nwpu.edu.cn, ouzhize@nwpu.edu.cn; Tel: +86-29-88431677.

The project was supported by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, the Ministry of Education, China (N9YK0003, N9YK0005), Foundation for Fundamental Research of Northwestern Polytechnical University, China (W018113), and Ao Xiang Foundation for Youth Teachers of Northwestern Polytechnical University, China (R0120).

教育部留学回国人员科研启动基金(N9YK0003, N9YK0005)、西北工业大学基础研究基金(W018113)、西北工业大学翱翔之星项目(R0120)资助

为药物或药物载体是 C_{60} 衍生物最具前景的应用领域之一^[4-5]。有文献报道, 将 C_{60} 与金刚烷^[6]、类黄酮^[7]、二氢嘧啶^[8]、芳基哌嗪^[9]等具有生物活性的基团相连接, 可以开发出具有新的生物活性的药物。药物与血浆蛋白质相互作用是决定药物在体内分布和发挥作用的一个重要因素^[10-11]。研究 C_{60} 衍生物与血浆蛋白质的相互作用, 有助于了解取代基团对富勒烯衍生物在体内的分布、生物代谢途径的影响^[12-13], 为设计、合成新型富勒烯 C_{60} 药物提供重要理论基础。

由于富勒烯具有强烈的疏水性, 使得富勒烯衍生物在水溶液中的溶解度非常低。利用富勒烯与亲水性聚合物^[14-15]、有机染料^[16-17]、杯芳烃^[18]或环糊精^[19-22]形成超分子体系是改善富勒烯及其衍生物水溶性的一种重要方法。目前, 环糊精对富勒烯衍生物的包结作用研究还比较少^[22]。

甾体化合物是存在于生物体内的一类天然、无毒的化合物, 已用于改善聚合物、卟啉、核酸或蛋白质等的生物相容性, 可提高细胞对相应化合物的吸收效率^[23-24]。近年来, 甾体修饰 C_{60} 衍生物的生物活性引起了人们的关注, 如改变质膜的物理状态或降低癌细胞的生存率^[25-27]。本文合成了胆固醇修饰的 C_{60} 衍生物 CHL- C_{60} , 利用甾体化合物与环糊精具有较强的结合能力的特点^[28], 采用环糊精包结作用增加 CHL- C_{60} 的水溶性, 研究了 CHL- C_{60} / γ -CD 与血清蛋白的作用以及光损伤 DNA 等生物活性。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

γ -环糊精(γ -CD)、1,8-二氮杂环[5,4,0]十一烯-7 (DBU)、富勒烯 C_{60} 、*N,N*-二甲胺基吡啶(DMAP)、人血清白蛋白(HSA, Fraction V)、牛血清白蛋白(BSA)、pBR322 质粒 DNA 均购自 Sigma 公司, 美国; 胆固醇、丙二酸、2,6-二环己基碳二亚胺(DCC)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)均为国药集团化学试剂有限公司分析纯试剂, 使用前未经进一步处理; 其余试剂均为分析纯, 购自北京化工厂。所用有机溶剂均经过无水处理后, 使用前重蒸。水溶液配制采用二次蒸馏水配制。所用缓冲溶液均为 Tris-HCl 溶液(10 mmol·L⁻¹, pH 7.2)。

所用仪器: Hitachi UV-3010 紫外可见吸收光谱仪, 日本; Hitachi F-4600 型荧光光谱仪, 日本; Bio-Rad Universal Hood II 凝胶成像系统, 美国; 北京六一 DYCP-44N 凝胶电泳仪。

1.2 合成

化合物 **2**: 将丙二酸(1 g, 9.6 mmol), 胆固醇(化合物 **1**, 7.4 g, 19.13 mmol), *N,N*-二甲胺基吡啶(0.122 g, 1 mmol)溶解于干燥的二氯甲烷和 *N,N*-二甲基甲酰胺的混合溶液中(1/1, V/V)。冷却到 0 °C, 通氮气条件下逐滴滴加 2,6-二环己基碳二亚胺(4.37 g, 21.2 mmol), 上述混合溶液在室温下搅拌过夜。经柱层析分离得到化合物 **2**, 产率为 73%。¹H NMR (CDCl₃)测定得: 5.37(s, 2H), 4.68(m, 2H), 3.32(s, 2H), 2.35-0.65(m, 86H); MS (MALDI-TOF)测定得: *m/z* 841.5(理论值以 C₅₇H₉₂O₄ 计算为 840.7)。元素分析: 分子式 C₅₇H₉₂O₄ 计算值(%)为 C, 81.37; H, 11.02; 实测值(%)为 C, 81.56; H, 11.31。

化合物 **3**(CHL- C_{60}): 将 C_{60} (36 mg, 0.05 mmol), 化合物 **2**(37.0 mg, 0.44 mmol)、CBr₄(22.6 mg, 0.068 mmol)溶解于新蒸干燥甲苯中, 通入氮气条件下滴加 DBU(12.2 mg, 0.08 mmol)的甲苯溶液, 溶液逐渐由紫色变为酒红色。避光搅拌 24 h 后, 将反应溶液减压蒸馏至干。采用柱层析分离得到化合物 **3**, 产率 25%。¹H NMR (CS₂, D₂O 锁场)测定得: 5.65(s, 2H), 5.08(s, 2H), 2.68(m, 4H), 2.25-1.12(m, 76H), 1.09(m, 6H)。¹³C NMR(100MHZ, CS₂, D₂O 锁场)测定得: 161.86, 161.81, 145.80, 145.74, 145.46, 145.41, 145.38, 145.32, 144.98, 144.95, 144.91, 144.85, 144.78, 144.15, 143.34, 142.51, 142.46, 142.09, 142.03, 141.18, 141.13, 139.38, 139.34, 139.13, 139.06, 124.01, 76.95, 72.12, 72.04, 52.8, 52.7, 57.25, 57.19, 42.77, 42.71, 40.47, 40.41, 38.58, 38.52, 37.68, 37.62, 37.07, 37.01, 36.90, 36.84, 36.41, 36.37, 32.81, 32.77, 32.35, 32.28, 30.49, 29.13, 29.10, 28.78, 28.74, 28.42, 28.37, 25.18, 25.14, 24.60, 24.56, 23.48, 23.45, 23.23, 23.20, 21.79, 21.74, 19.87, 19.82, 19.40, 19.35, 12.52, 12.47。MS (MALDI-TOF)测定得: *m/z* 1559.1 (理论值以 C₁₁₇H₉₀O₄ 计算为 1559.6)。元素分析测定得: 分子式 C₁₁₇H₉₀O₄ 计算值(%)为 C, 90.08; H, 5.82。实测值(%)为 C, 90.14; H, 5.86。

1.3 CHL- C_{60} 的 γ -环糊精包合物溶液制备

CHL- C_{60} / γ -环糊精包合物水溶液的制备按照文献方法^[16,29]进行, 具体过程如下: 将不同质量的 CHL- C_{60} (0.1-2 mg)加入到 20 mL γ -环糊精(200 μ mol·L⁻¹)的 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.2)中, 室温下超声(200 W)1.5 h, 然后避光搅拌过夜。未溶解的 CHL- C_{60} 采用高速离心(6000 r·min⁻¹)15 min 的方法除去。将未

溶解的 CHL-C₆₀ 溶于甲苯中, 通过紫外-可见光谱检测, 可以得知被 γ -环糊精包结的 CHL-C₆₀ 的量. 得到的 CHL-C₆₀/ γ -CD 包结物缓冲溶液直接用于光谱测定, 与血清白蛋白的作用以及 DNA 光损伤等实验.

1.4 CHL-C₆₀ 与血清白蛋白相互作用的荧光光谱测定

配制浓度为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血清白蛋白 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.2)备用. 固定血清白蛋白的浓度为 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别加入不同浓度的 CHL-C₆₀/ γ -CD 溶液. 混合后静置 12 h, 然后采用 295 nm 的光激发, 研究 CHL-C₆₀ 对血清白蛋白的荧光猝灭作用. CHL-C₆₀ 与血清白蛋白的结合常数 K_a 采用最小二乘法对式(1)进行非线性拟合得到^[30-31]:

$$\Delta F = F_0 - F = (\alpha([\text{SA}] + [\text{CHL-C}_{60}] + 1/K_a) - (\alpha^2([\text{SA}] + [\text{CHL-C}_{60}] + 1/K_a)^2 - 4\alpha^2[\text{SA}] \cdot [\text{CHL-C}_{60}]))^{1/2} \quad (1)$$

式(1)中 F_0 和 F 分别为 CHL-C₆₀/ γ -CD 加入前后血清白蛋白的荧光强度, $[\text{SA}]$ 为相应血清白蛋白(serum albumin)的摩尔浓度. 利用 ΔF 对 CHL-C₆₀ 的浓度作图求取血清白蛋白与 CHL-C₆₀ 的结合常数 K_a .

1.5 DNA 断裂实验

取 30 μL pBR322 DNA 溶液(pH 7.2, 0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)与等体积的 CHL-C₆₀/ γ -CD 复合物溶液(CHL-C₆₀, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; γ -CD, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)混合, 室温下通 N_2 除氧 15 min. 在暗处静置或用高压汞灯(采用滤光片滤掉 $\lambda < 300 \text{ nm}$ 的光)光照 10 至 30 min. 利用 0.9% 的琼脂糖凝胶电泳对 DNA 进行分离, 溴乙啶染色后, 采用 Bio-Rad Universal Hood II 凝胶成像系统测定各 DNA 组分的荧光强度. 通过荧光强度比较, 可获得超螺旋结构 DNA(Form I, supercoiled)和带切口的 DNA(Form II, nicked)的相对百分含量. 通过式(2)求取 DNA 的损伤率($d(\%)$)^[32]:

$$d = ((F_{\text{II}} - F_{\text{I0}}) / F_{\text{I0}}) \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中 F_{I0} 和 F_{II} 分别为光照前后带切口 DNA 的荧光强度, F_{I0} 为光照前超螺旋 DNA 的荧光强度.

2 结果与讨论

2.1 化合物合成

Bingel-Hirsch 反应具有产率高、反应条件温和、活泼亚甲基前体易得等特点, 已成为广泛使用的 C₆₀ 化学修饰方法之一^[33-35]. 首先通过酯化反应合成胆固醇的丙二酸酯(化合物 2), 然后在 DBU 和 CBr₄ 存在条件下与 C₆₀ 进行 Bingel-Hirsch 反应, 得到胆固醇修饰富勒烯衍生物 3(CHL-C₆₀), 具体合成步骤见

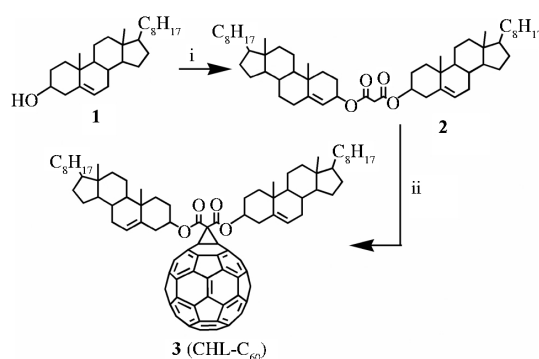


图 1 化合物 3 (CHL-C₆₀) 的合成步骤

Fig.1 Synthesis of compound 3 (CHL-C₆₀)

reaction conditions: i) malonic acid, N,N' -dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), dimethyl formamide (DMF)- CH_2Cl_2 ; (1/1, V/V), 0 $^\circ\text{C}$; ii) C₆₀, CBr₄, 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene (DBU), toluene, room temperature

图 1. 利用 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)等方法对目标化合物 CHL-C₆₀ 进行鉴定.

^{13}C NMR 结果显示, 在 δ 为 139–146 区间有 21 个 C₆₀ 的特征峰, 其中 13 个峰各包含 2 个碳原子, 8 个峰各包含了 4 个碳原子, 这与文献报道的 Bingel-Hirsch 反应产物具有 C_{2v} 对称性相符^[36-37]; 同时酯羰基的特征峰也出现在 δ 161.8 左右. 从 ^1H - ^{13}C 异核单量子相干谱(HSQC)二维核磁谱(图 2)中也可见 δ 为 5.65 (=CH) 与 124.0, δ 为 5.08(CH—O—CO) 与 76.9 处, 给出相关的甾环化合物特征峰^[38]. 基质辅助 MALDI-TOF MS 数据证明了 CHL-C₆₀ 分子离子峰的存在. 这些结果表明, 在 CHL-C₆₀ 中胆固醇基团与 C₆₀ 通过共价键连接.

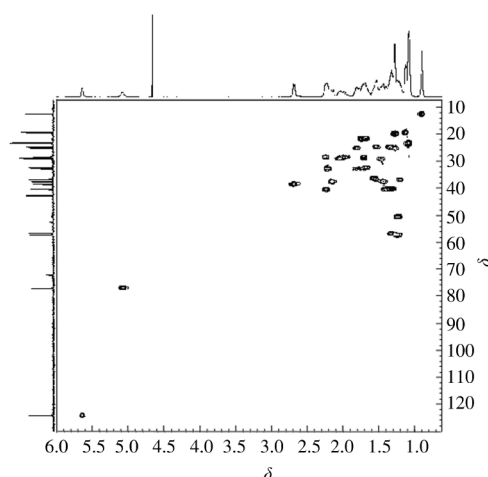


图 2 CHL-C₆₀ 的 ^1H - ^{13}C 异核单量子相干谱(HSQC)谱图
Fig.2 ^1H - ^{13}C heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectrum of CHL-C₆₀

2.2 CHL-C₆₀ 的紫外-可见吸收光谱

CHL-C₆₀ 在普通有机溶剂中, 如四氢呋喃(THF)、氯仿、甲苯中都有较好的溶解度, 但在水中的溶解度很低($<1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). 加入 γ -CD, 在超声波条件下可以使 CHL-C₆₀ 在水中的溶解度大幅度增加($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). 对照实验表明, 未经修饰的 C₆₀ 在 γ -CD ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的缓冲溶液中进行超声、搅拌, 不能获得水溶性的 C₆₀/ γ -CD 包结物. 文献报道 C₆₀ 的环糊精包结物一般需在有机溶剂、高速振动或沸水浴等比较剧烈的条件下进行^[19-22]. 环糊精对甾环化合物具有较强的包结能力, 其结合常数达到 10^3 - $10^4 \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ ^[28]. 因此在 γ -CD 存在下, CHL-C₆₀ 在水中的溶解度增加, 主要来自于 γ -CD 对 CHL-C₆₀ 中胆固醇基团的包结作用. 但是 β -环糊精对 CHL-C₆₀ 在水中的溶解度影响较小. 这可能是 γ -环糊精比 β -环糊精具有更大的空腔, 能够更好地容纳侧链修饰的甾环衍生物^[39-40], 这使得加入 γ -环糊精能够有效增溶 CHL-C₆₀.

图 3 为在不同溶剂条件下 CHL-C₆₀ 的紫外-可见吸收谱图. 在 THF 中 CHL-C₆₀ 的吸收峰位于 257, 326 和 426 nm 处. 在缓冲溶液中的吸收峰红移至 269.5 和 333 nm, 同时 426 nm 处的吸收峰消失; 加入 HSA 或 BSA 后, CHL-C₆₀/ γ -CD 的吸收明显增强. 为了消除血清白蛋白在紫外区有吸收的影响, 在参比溶液中也加入了同等浓度的血清白蛋白, 因此吸收光谱的变化主要来源于 CHL-C₆₀ 与血清白蛋白之间的相互作用.

2.3 CHL-C₆₀ 与血清白蛋白相互作用的荧光光谱

血清白蛋白是血清中含量最高的一种蛋白质,

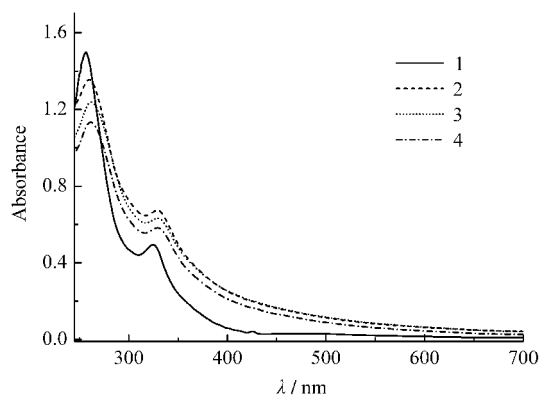


图 3 CHL-C₆₀($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的紫外-可见吸收光谱

Fig.3 UV-Vis spectra of CHL-C₆₀($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

(1) THF; (2) buffer solution(pH 7.2), HSA($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), γ -CD($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (3) buffer solution(pH 7.2), BSA($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), γ -CD($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (4) buffer solution(pH 7.2), γ -CD($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

也是多种药物的有效载体. 研究富勒烯衍生物与血清白蛋白的相互作用对了解富勒烯在体内的输送和代谢途径具有重要的意义^[41-43]. 血清白蛋白中色氨酸残基的内源性荧光($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=295/342$)对环境变化非常敏感, 常用于研究血清蛋白与有机化合物的相互作用. 由图 4 可以看出, 加入 CHL-C₆₀/ γ -CD 后, HSA(图 4(a)) 和 BSA 的内源荧光强度有规律地降低. 对照实验表明, 即使加入高浓度的 γ -CD($1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 也不影响血清白蛋白的荧光. 这表明, 荧光猝灭作用主要来自于 CHL-C₆₀ 与血清白蛋白之间的相互作用, 即 CHL-C₆₀ 可以从 γ -CD 的疏水空腔中解离出来, 继而与血清白蛋白发生作用(式(3)).

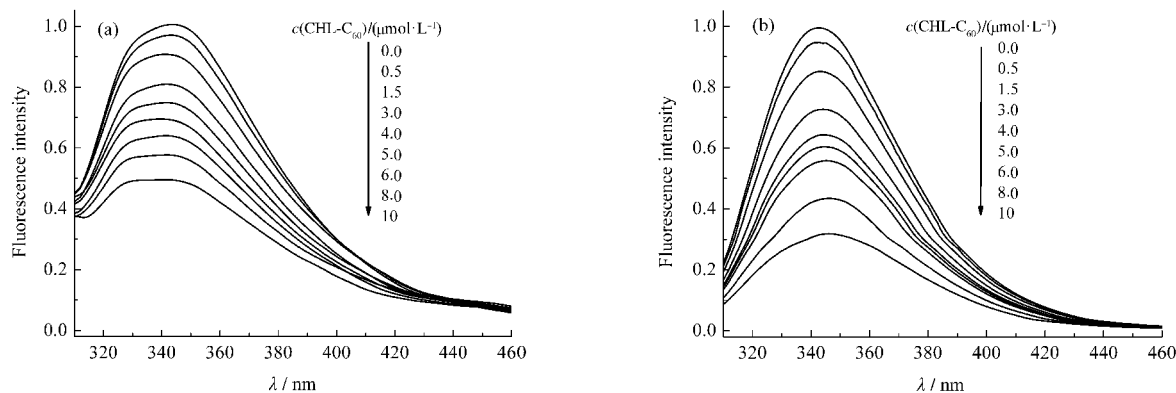
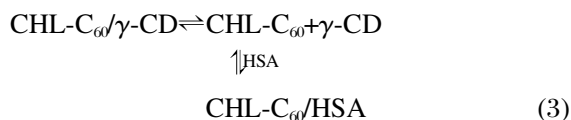


图 4 加入 CHL-C₆₀/ γ -CD 溶液对人血清白蛋白(a)和牛血清白蛋白(b)的荧光猝灭作用

Fig.4 Fluorescence quenching of human serum albumin (HSA) (a) and bovine serum albumin (BSA) (b) upon addition of CHL-C₆₀/ γ -CD solution

The concentration ratio for CHL-C₆₀ and γ -CD is 1:10, $\lambda_{\text{ex}}=295 \text{nm}$

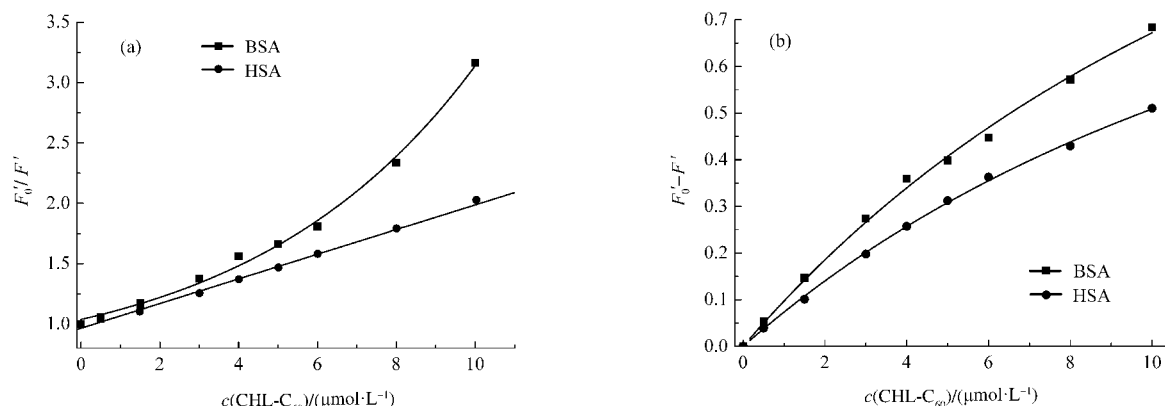


图5 (a) CHL-C₆₀与HSA、BSA相互作用的Stern-Volmer图及(b)利用非线性最小二乘法对其荧光强度变化进行拟合
Fig.5 (a) Stern-Volmer plots of the interaction of CHL-C₆₀ with HSA, BSA and (b) non-linear least squares analysis of the change in fluorescence intensity of serum albumin

$\lambda_{ex}=342\text{ nm}$

为了进一步研究 CHL-C₆₀ 与血清白蛋白的作用机理, 采用 Stern-Volmer 方程(式(4))对上述荧光猝灭过程进行分析^[44]:

$$\frac{F_0'}{F'} = 1 + K_q \tau_0 [\text{CHL-C}_{60}] \quad (4)$$

式(4)中 F_0' 和 F' 分别为加入猝灭剂 CHL-C₆₀ 前后血清白蛋白在 342 nm 处的荧光强度, K_q 为荧光猝灭速率常数, τ_0 为血清白蛋白的荧光寿命. 本文对 HSA 及 BSA 的相对荧光强度 F_0'/F' 对猝灭剂 CHL-C₆₀ 的浓度作图得图 5. 由图 5 可见, 对 HSA, 其相对荧光强度 F_0'/F' 对猝灭剂 CHL-C₆₀ 的浓度呈良好的线性关系(相关系数 $R=0.9969$), 说明该体系内只有一种猝灭过程. 直线的斜率为 $1.02 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 一般生物大分子的荧光寿命为 $\tau_0 = 1 \times 10^{-8} \text{ s}$ ^[45], 计算得到猝灭速率常数 K_q 约为 $1.02 \times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭速率常数 ($2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)^[44], 表明上述猝灭过程不是动态猝灭, 而有可能是静态猝灭. 紫外-可见吸收光谱(图 3)表明, 在基态条件下 CHL-C₆₀ 与 HSA 存在强烈的相互作用, 进一步证明是静态猝灭机理. 对于 BSA, F_0'/F' 与 CHL-C₆₀ 浓度作图得到了一条偏向 y 轴的曲线. 这表明, CHL-C₆₀ 对 BSA 的荧光猝灭作用同时存在动态猝灭和静态猝灭两种机理^[46-47]. 加入 BSA 后, CHL-C₆₀ 在紫外-可见光区的吸收发生明显变化, 也说明 CHL-C₆₀ 与 BSA 能形成稳定的复合物(图 3). 荧光猝灭实验结果表明, CHL-C₆₀ 能够与 HSA 和 BSA 形成稳定的富勒烯/蛋白质复合物, 富勒烯与色氨酸残基的电子转移作用可能是 CHL-C₆₀ 猝灭血清白蛋白荧光的重要原因^[48-49].

文献报道^[30,50]富勒烯具有合适的空间尺寸, 能够与血清白蛋白或富勒烯抗体的疏水空腔结合, 形成比例为 1:1 的复合物. 利用 342 nm 处的荧光变化对 CHL-C₆₀ 的浓度作图, 采用非线性最小二乘法进行数据拟合(图 5(b)), 计算得到 CHL-C₆₀ 与 HSA, BSA 的结合常数 K_a 分别为 $5.73 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($R=$

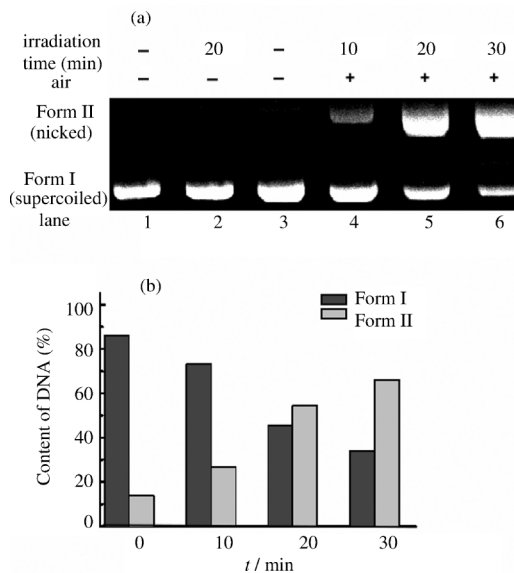


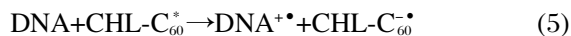
图6 pBR322 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图(a)及 CHL-C₆₀/ γ -CD 复合物存在条件下超螺旋结(Form I)和带切口(Form II) DNA 的相对含量随光照时间的变化(b)
Fig.6 Agrose gel electrophoretic patterns of pBR322 plasmid DNA (a) and the change in relative amount of supercoiled (Form I) and nicked (Form II) DNA upon irradiation time in the presence of CHL-C₆₀/ γ -CD complex (b)

lane 1: no reagent in $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.2); lane 2: γ -CD ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); lane 3-6: CHL-C₆₀ ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), γ -CD ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

0.9991)和 $7.05 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($R=0.9972$). 良好的非线性关系拟合程度表明, CHL- C_{60} 与 HSA, BSA 均形成了 1:1 的复合物.

2.4 CHL- $\text{C}_{60}/\gamma\text{-CD}$ 对 DNA 的光损伤作用

富勒烯是一类优良的电子受体, 在受到光激发后接受电子能力更强. 研究发现富勒烯能与胺类化合物^[51]以及 DNA 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 等具有生物活性的物质^[52]发生电子转移作用, 从而在光电器件、生物科学领域表现出广泛的应用前景. 本文采用 pBR322 质粒 DNA 作为模型化合物, 研究 CHL- $\text{C}_{60}/\gamma\text{-CD}$ 对 DNA 的光损伤作用. 在暗处静置时, 无论是否加入 CHL- $\text{C}_{60}/\gamma\text{-CD}$, DNA 的组成未发生变化(图 6(a), 第 1、3 泳道). 加入 CHL- $\text{C}_{60}/\gamma\text{-CD}$, 并采用汞灯光照($\lambda > 300 \text{ nm}$)时, DNA 的组成发生了明显变化(图 6(a), 第 4、6 泳道). 随着光照时间的增加, 超螺旋结构 Form I 型 DNA 含量由 86.2% 逐渐降低至 34.0%, 而带切口 Form II 型 DNA 含量由 13.8% 逐渐升高至 66.0% (图 6(b)). 光照 30 min 后, CHL- C_{60} 对 pBR322 质粒 DNA 的光损伤效率达到 60.5%. 对照实验表明, 加入 $\gamma\text{-CD}$ 光照 20 min, DNA 的含量不发生变化(图 6(a), 第 2 泳道), 说明 DNA 的光损伤主要来自于 CHL- C_{60} 和 pBR322 质粒 DNA 之间的相互作用. 无氧条件下, 富勒烯衍生物能够通过光诱导电子转移反应断裂 DNA^[14]. 文献报道^[53]富勒烯被杯芳烃包结后, 仍然可以通过电子转移反应损伤 DNA. 说明形成主-客体超分子既可以增强富勒烯及其衍生物的水溶性, 又保持了富勒烯光照断裂 DNA 的能力. 本文采用高压汞灯光照样品, 能够有效地激发 CHL- C_{60} , 处于激发态的 CHL- C_{60} 与 DNA 发生电子转移反应(式(5)),



从而导致 DNA 的断裂. 文献报道^[54] C_{60} 及其衍生物在有氧条件下, 可通过超氧负离子和单重态氧光损伤 DNA, 研究 CHL- C_{60} 在有氧条件下对 DNA 的光损伤作用将有助于更进一步地了解其生理活性.

3 结 论

采用 Bingel-Hirsch 反应合成了胆固醇修饰富勒烯 C_{60} 衍生物(CHL- C_{60}), 通过核磁共振、质谱、元素分析等多种手段对 CHL- C_{60} 的化学结构进行了表征. β -环糊精对 CHL- C_{60} 在水中的溶解度影响较小, 而 $\gamma\text{-CD}$ 可以通过包结 CHL- C_{60} 中侧链修饰的甾环,

形成 CHL- $\text{C}_{60}/\gamma\text{-CD}$ 包结复合物, 增强 CHL- C_{60} 的水溶性. 加入 HSA 或 BSA 后, CHL- $\text{C}_{60}/\gamma\text{-CD}$ 的吸收明显增强; 同时 CHL- $\text{C}_{60}/\gamma\text{-CD}$ 能猝灭 HSA 和 BSA 的内源性荧光, 说明 CHL- C_{60} 与血清白蛋白之间具有较强的相互作用, 即 CHL- C_{60} 可以从 $\gamma\text{-CD}$ 的疏水空腔中解离出来, 继而与血清白蛋白发生作用. 采用非线性最小二乘法对加入 CHL- C_{60} 后血清白蛋白的荧光变化数据进行拟合, 良好的非线性关系拟合程度表明 CHL- C_{60} 与 HSA, BSA 均形成了 1:1 的复合物, 其结合常数分别为 5.73×10^4 和 $7.05 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. 光照条件下, CHL- $\text{C}_{60}/\gamma\text{-CD}$ 通过光诱导电子转移作用对 DNA 进行有效的光损伤. 结果表明, 通过与 $\gamma\text{-CD}$ 形成主-客体超分子既可以增强富勒烯衍生物 CHL- C_{60} 的水溶性, 又保持了 CHL- C_{60} 的与蛋白质结合、光照断裂 DNA 等生物活性.

致谢: 作者对中国科学院化学研究所向俊锋副研究员在核磁测试工作中给予的大力帮助表示感谢.

References

- Guldi, D. M.; Illescas, B. M.; Atienza, C. M.; Wielopolski, M.; Martin, N. *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*: 1587
- Thompson, B. C.; Frechet, J. M. J. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2008**, *47*: 58
- Guo, Z.; Li, Y.; Zhu, D. *Prog. Chem.*, **1998**, *10*: 1 [郭志新, 李玉良, 朱道本. 化学进展, **1998**, *10*: 1]
- Pantarotto, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2004**, *4*: 805
- Cataldo, F.; Ros, T. D.; Medicinal chemistry and pharmacological potential of fullerenes and carbon nanotubes. Dordrecht: Springer, 2008
- Bar-Shir, A.; Engel, Y.; Gozin, M. *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*: 2660
- Torre, M. D. L.; Rodrigues, A. G. P.; Tome, A. C.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. *Tetrahedron*, **2004**, *60*: 3581
- Suarez, M.; Verdecia, Y.; Illescas, B.; Martinez-Alvarez, R.; Alvarez, A.; Ochoa, E.; Seoane, C.; Kayali, N.; Martin, N. *Tetrahedron*, **2003**, *59*: 9179
- Illescas, B. M.; Martinez-Alvarez, R.; Fernandez-Gadea, J.; Martin, N. *Tetrahedron*, **2003**, *59*: 6569
- Fiehn, C.; Kratz, F.; Sass, G.; Muller-Ladner, U.; Neumann, E. *Ann. Rheum. Dis.*, **2008**, *67*: 1188
- Mishra, P. P.; Datta, A. *Biophys. Chem.*, **2006**, *121*: 224
- Li, Q.; Xiu, Y.; Zhang, X.; Liu, R.; Du, Q.; Sun, X.; Chen, S.; Li, W. *Chin. Sci. Bull.*, **2001**, *46*: 909 [李晴暖, 修雁, 张晓东, 刘瑞丽, 杜倩倩, 孙晓光, 陈绍亮, 李文新. 科学通报, **2001**, *46*: 909]
- Nakamura, E.; Isobe, H. *Acc. Chem. Res.*, **2003**, *36*: 807

- 14 Gao, Y.; Ou, Z.; Chen, J.; Yang, G.; Wang, X.; Zhang, B.; Jin, M.; Liu, L. *New J. Chem.*, **2008**, **32**: 1555
- 15 Ungurenasu, C.; Airinei, A. *J. Med. Chem.*, **2000**, **43**: 3186
- 16 Gao, Y.; Ou, Z.; Yang, G.; Liu, L.; Jin, M.; Wang, X.; Zhang, B.; Wang, L. *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.*, **2009**, **203**: 105
- 17 Balbinot, D.; Atalick, S.; Guldi, D. M.; Hatzimarinaki, M.; Hirsch, A.; Jux, N. *J. Phys. Chem. B*, **2003**, **107**: 13273
- 18 Kunsagi-Mate, S.; Szabo, K.; Bitter, I.; Nagy, G.; Kollar, L. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, **45**: 1387
- 19 Zhang, Y.; Gao, X. *Chin. J. Appl. Chem.*, **2007**, **24**: 1 [张奕, 高翔. 应用化学, **2007**, **24**: 1]
- 20 Liu, Y.; Wang, H.; Liang, P.; Zhang, H. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2004**, **43**: 2690
- 21 Ikeda, A.; Doi, Y.; Hashizume, M.; Kikuchi, J.; Konishi, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, **129**: 4140
- 22 Komatsu, K.; Fujiwara, K.; Murata, Y.; Braun, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**: 2963
- 23 Zhu, X.; Nichifor, M. *Acc. Chem. Res.*, **2002**, **35**: 539
- 24 Mehta, G.; Muthusamy, S.; Maiya, B. G.; Sirish, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1996**: 2421
- 25 Li, L.; Hu, Y.; Wu, Y.; Yue, J.; Yang, F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2001**: 617
- 26 Felder-Flesch, D.; Rupnicki, L.; Bourgogne, C.; Donnio, B.; Guillon, D. *J. Mater. Chem.*, **2006**, **16**: 304
- 27 Felder-Flesch, D.; Bourgogne, C.; Gallani, J. L.; Guillon, D. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, **46**: 6507
- 28 Wallimann, P.; Marti, T.; Furer, A.; Diederich, F. *Chem. Rev.*, **1997**, **97**: 1567
- 29 Ehli, C.; Rahman, G. M. A.; Jux, N.; Balbinot, D.; Guldi, D. M.; Paolucci, F.; Marcaccio, M.; Paolucci, D.; Melle-Franco, M.; Zerbetto, F.; Campidelli, S.; Prato, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, **128**: 11222
- 30 Belgorodsky, B.; Fadeev, L.; Ittah, V.; Benyamini, H.; Zelner, S.; Huppert, D. T.; Kotlyar, A. B.; Gozin, M. *Bioconjugate Chem.*, **2005**, **16**: 1058
- 31 Liu, Y.; Li, B.; Han, B.; Wada, T.; Inoue, Y. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1999**: 563
- 32 Zou, W.; An, J.; Jiang, L. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1996**, **33**: 73
- 33 Camps, X.; Hirsch, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**: 1595
- 34 Wang, G. W.; Zhang, T. H.; Li, Y. J.; Lu, P.; Zhan, H.; Liu, Y. C.; Murata, Y.; Komatsu, K. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, **44**: 4407
- 35 Peng, R. F.; Wang, G. W.; Shen, Y. B.; Li, Y. J.; Zhang, T. H.; Liu, Y. C.; Murata, Y.; Komatsu, K. *Synth. Commun.*, **2004**, **34**: 2117
- 36 Possamai, G.; Menna, E.; Maggini, M.; Carano, M.; Marcaccio, M.; Paolucci, F.; Guldi, D. M.; Swartz, A. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2006**, **5**: 1154
- 37 Zhang, T. H.; Lu, P.; Wang, F.; Wang, G. W. *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, **1**: 4403
- 38 Nakamura, H.; Ueno, M.; Lee, J. D.; Ban, H. S.; Justus, E.; Fan, P.; Gabel, D. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, **48**: 3151
- 39 Tan, Z. J.; Zhu, X. X.; Brown, G. R. *Langmuir*, **1994**, **10**: 1034
- 40 Uekama, K.; Fujinaga, T.; Hirayama, F.; Otagiri, M.; Yamasaki, M. *Int. J. Pharm.*, **1982**, **10**: 1
- 41 Zhao, G.; Zhang, P.; Wei, X.; Yang, Z. *Anal. Biochem.*, **2004**, **334**: 297
- 42 Qu, X.; Komatsu, T.; Sato, T.; Glatter, O.; Horinouchi, H.; Kobayashi, K.; Tsuchida, E. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, **19**: 1556
- 43 Zhang, X. F.; Shu, C. Y.; Xie, L.; Wang, C. R.; Zhang, Y. Z.; Xiang, J. F.; Li, L.; Tang, Y. L. *J. Phys. Chem. C*, **2007**, **111**: 14327
- 44 Lakowicz, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Plenum Press, 1993: 258
- 45 Lakowicz, J. R.; Weber, G. *Biochemistry*, **1973**, **12**: 4161
- 46 Eda, Y.; Itoh, K.; Ito, Y. N.; Kawato, T. *Tetrahedron*, **2009**, **65**: 282
- 47 Lucio, M.; Nunes, C.; Gaspar, D.; Golebska, K.; Wisniewski, M.; Lima, J. L. F. C.; Brezesinski, G.; Reis, S. *Chem. Phys. Lett.*, **2009**, **471**: 300
- 48 Liu, Y.; Wang, H.; Chen, Y.; Ke, C.; Liu, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, **127**: 657
- 49 Storhoff, J. J.; Lazarides, A. A.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Schatz, G. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, **122**: 4640
- 50 Benyamini, H.; Shulman-Peleg, A.; Wolfson, H. J.; Belgorodsky, B.; Fadeev, L.; Gozin, M. *Bioconjugate Chem.*, **2006**, **17**: 378
- 51 Gao, Y. Y.; Ou, Z. Z.; Yang, G. Q.; Wang, X. S.; Zhang, Z. B.; Li, S. M. *Acta Phys.-Chim. Sin.*, **2009**, **25**: 74 [高云燕, 欧植泽, 杨国强, 王雪松, 张智斌, 礼嵩明. 物理化学学报, **2009**, **25**: 74]
- 52 Mikami, K.; Matsumoto, S.; Ishida, A.; Takamuku, S.; Suenobu, T.; Fukuzumi, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, **117**: 11134
- 53 Ikeda, A.; Hatano, T.; Kawaguchi, M.; Suenaga, H.; Shinkai, S. *Chem. Commun.*, **1999**: 1403
- 53 Yamakoshi, Y.; Umezawa, N.; Ryu, A.; Arakane, K.; Miyata, N.; Goda, Y.; Masumizu, T.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, **125**: 12803