

光谱法研究替诺昔康与小牛胸腺 DNA 相互作用

马 喆

中国医科大学附属盛京医院 药学部, 辽宁 沈阳 110004

摘要: 目的 研究替诺昔康与小牛胸腺 DNA (ctDNA) 之间的相互作用。方法 借助紫外光谱和荧光光谱考察了替诺昔康与 ctDNA 之间的相互作用, 同时通过热变性研究、黏度法试验考察了替诺昔康与 ctDNA 的相互作用模式。结果 ctDNA 加入使替诺昔康紫外光谱出现轻微减色效应, 且随着 ctDNA 浓度的增大, 减色效应变强; 替诺昔康的加入使 ctDNA-盐酸小檗碱发生荧光猝灭, 且其猝灭程度具有浓度相关性。替诺昔康对于 ctDNA 溶液的黏度和热变性温度影响不大。结论 替诺昔康与 ctDNA 是以沟槽方式结合, 并且替诺昔康可以使 ctDNA-盐酸小檗碱发生静态荧光猝灭。

关键词: 替诺昔康; 小牛胸腺 DNA; 相互作用; 沟槽结合

中图分类号: R969.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2020)08 - 1532 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.08.006

Interaction between tenoxicam and calf thymus DNA by spectroscopy

MA Zhe

Department of Pharmacy, Shengjing Hospital China Medical University, Shenyang 110004, China

Abstract: Objective To study the interaction between tenoxicam (TNX) and calf thymus DNA (ctDNA). **Methods** The interaction mechanism and mode of TNX with ctDNA were investigated by UV-vis absorption and fluorescence spectroscopy, and DNA thermal denaturation and viscosimetric methods were also adopted. **Results** After adding ctDNA, the UV-vis spectroscopy of TNX showed a slight hypochromicity, which was further intensified with the increase of ctDNA concentration. As the same time, TNX could quench the fluorescence of ctDNA-berberine hydrochloride and its effect was concentration dependent. However, the relative viscosity and melting of ctDNA didn't show significant change with the adding of TNX solution. **Conclusion** The binding between TNX and ctDNA is groove mode, and TNX quenches the fluorescence of ctDNA-BR by static quenching.

Key words: tenoxicam; calf thymus DNA; interaction; groove binding

脱氧核糖核酸 (DNA) 作为遗传信息和基因表达的载体, 不仅控制着生物体的生长发育、繁殖等正常的生命活动, 而且在一些疾病的发生如癌变的过程中起重要作用, 因此 DNA 也是很多药物在体内发挥作用的重要靶标^[1-4]。基于此, 研究药物分子与 DNA 的相互作用可追根溯源从分子水平深层次地研究药物的作用机制, 有助于体外筛选药物、开发新药尤其是抗肿瘤药物等研究的顺利进行。据报道, DNA 与靶向药物分子的结合方式大多为非共价结合, 可分为静电作用、沟槽结合、嵌插结合 3 种方式^[1, 5]。非甾体抗炎药是仅次于抗感染药的临床第二类常用药^[6], 除了解热镇痛作用外, 近年来临床研究发现其在预防胃癌、阿尔兹海默症的防治中发挥重要作用^[7-8]。替诺昔康为苯噻嗪酰胺类非甾体

抗炎药, 能选择性抑制环氧酶-2, 具有良好的耐受性, 因此临床治疗中普遍应用^[9-10]。本研究通过光谱法、热力学理论等方法研究小牛胸腺 DNA (ctDNA) 与替诺昔康的相互作用, 为阐述药物的治病机制、作用方式提供支持, 而且对于药物筛选、新药开发及推进靶向药物的研究与开发具有十分重要的意义。

1 材料

UV-2550 型紫外 - 可见分光光度计 (日本岛津公司); F-7000 型荧光光谱仪 (日本日立公司); AL204 型分析天平 (上海梅特勒 - 托利多仪器有限公司); 乌氏黏度计 (上海垒固仪器有限公司); DK-S22 型电热恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司)。

收稿日期: 2020-05-29

作者简介: 马 喆, 女, 药剂师, 研究方向为药品调剂与合理用药。E-mail: 447048176@qq.com

ctDNA (北京奥博星生物技术责任有限公司), 经 UV 光谱检验 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} > 1.8$, 纯度符合要求; 盐酸小檗碱 (批号 M060714, 常州亚邦制药有限公司); 替诺昔康 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 110102, 三涇医药化工有限公司); 其他试剂均为分析纯, 实验用水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 替诺昔康储备液的制备 精密称取 21 mg 替诺昔康, 溶于 2 mL 无水乙醇, 用 NaCl-Tris-HCl 缓冲溶液定容至 25 mL, 得替诺昔康储备液 I。量取 0.1 mL 储备液 I, 用 NaCl-Tris-HCl 缓冲溶液稀释到 10 mL, 即为 2.5×10^{-5} mol/L 替诺昔康储备液。

2.1.2 ctDNA 储备液的制备 精密称取 23 mg ctDNA, 加 NaCl-Tris-HCl 缓冲溶液溶解, 定容于 10 mL 量瓶中, 即 ctDNA 储备液 (浓度为 2.5×10^{-2} mol/L), 放置于冰箱中, $0 \sim 4$ °C 储存备用。

2.1.3 盐酸小檗碱溶液的配制 精密称取 50.9 mg 盐酸小檗碱, 用少量无水乙醇溶解, NaCl-Tris-HCl 缓冲溶液定容至 25 mL, 即得。

2.1.4 ctDNA-盐酸小檗碱溶液的制备 精密称取 ctDNA 9.28 mg, 用 NaCl-Tris-HCl 缓冲溶液溶解, 向其中加入 1.4 mL, 浓度为 5.0×10^{-3} mol/L 盐酸小檗碱溶液, 用 NaCl-Tris-HCl 缓冲液定容至 100 mL, 使盐酸小檗碱质量浓度为 7.0×10^{-5} mol/L。

2.2 替诺昔康与 ctDNA 相互作用的紫外光谱

向比色皿中加入 2.5 mL 替诺昔康储备液 (2.5×10^{-5} mol/L), 用微量注射器逐次滴入 2.5×10^{-2} mol/L ctDNA 储备液 10 μ L, 使体系中 ctDNA 浓度分别为 0.0、 1.0×10^{-4} 、 2.0×10^{-4} 、 3.0×10^{-4} 、 4.0×10^{-4} 、 5.0×10^{-4} mol/L, 以对应浓度的 ctDNA 溶液为参比。溶液混匀静置 5 min 后, 在 200~600 nm 测定替诺昔康的紫外吸收光谱。结果见图 1。可见 ctDNA 的加入使替诺昔康的吸光度降低, 即出现减色效应, 说明替诺昔康与 ctDNA 之间发生相互作用, 形成了二元复合物。据报道, DNA 与药物分子以嵌插方式和沟槽作用结合时, 紫外光谱会发生变化, 若出现减色效应 ($\geq 35\%$) 并且伴随红移现象 (≥ 10 nm), 说明药物分子与 DNA 以嵌插方式结合, 否则为沟槽作用^[1, 11-12]。ctDNA 与替诺昔康相互作用的紫外光谱中虽有减色效应出现, 但是其减色强度较弱, 明显 $< 35\%$, 因此推断替诺昔康与 ctDNA 可能以沟槽作用相结合。

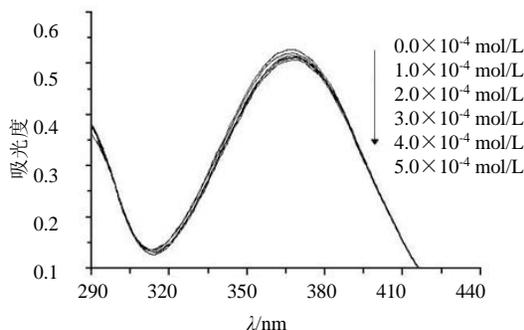


图 1 ctDNA 浓度对替诺昔康紫外光谱的影响

Fig. 1 Effects of the ctDNA concentration on UV-vis spectra of tenoxicam (TNX)

2.3 替诺昔康与 ctDNA 相互作用的荧光猝灭机制

向荧光样品池中加入 1.0×10^{-4} mol/L ctDNA-盐酸小檗碱溶液 2.5 mL, 然后向其中逐次加入 5 mL 替诺昔康储备液 (2.5×10^{-3} mol/L), 使体系中替诺昔康浓度分别对应为 0.0、 0.5×10^{-5} 、 1.0×10^{-5} 、 1.5×10^{-5} 、 2.0×10^{-5} 、 2.5×10^{-5} 、 3.0×10^{-5} 、 3.5×10^{-5} mol/L。溶液混匀静置 5 min 后, 设定激发波长为 365 nm, 激发/发射狭缝宽为 5 nm, 扫描 250~700 nm 的荧光发射光谱, 20 °C 下测定 ctDNA-盐酸小檗碱-替诺昔康体系的荧光发射光谱。

由文献可知, 盐酸小檗碱自身荧光极弱, 当以嵌插方式与结合后, 其荧光强度显著增强, 因此盐酸小檗碱常被作为荧光探针用于药物与相互作用的研究。本课题组前期工作发现^[11], 当盐酸小檗碱浓度为 7.0×10^{-5} mol/L 时 ctDNA-盐酸小檗碱体系荧光强度最大, 因此后续试验均在该浓度下开展。研究发现替诺昔康本身不发射荧光, 与 ctDNA 溶液混合后亦不发射荧光, 因此借助盐酸小檗碱为荧光探针, 考察替诺昔康与的相互作用情况。

不同浓度的替诺昔康存在时, ctDNA-盐酸小檗碱-替诺昔康体系的荧光发射光谱见图 2。可见, 随着替诺昔康浓度的增加, ctDNA-盐酸小檗碱体系的荧光逐渐被猝灭, 说明替诺昔康与 ctDNA-盐酸小檗碱发生了相互作用。

一般引起 ctDNA-盐酸小檗碱发生荧光猝灭现象, 原因可能有以下几种^[11]: (1) 替诺昔康与盐酸小檗碱竞争结合 ctDNA 上的位点, 替诺昔康的加入量越多, 原本结合在 ctDNA 上的盐酸小檗碱被替诺昔康置换出来的就越多, 使 ctDNA-盐酸小檗碱体系的荧光强度降低。(2) 替诺昔康、ctDNA 竞争结合盐酸小檗碱, 导致原本与 ctDNA 结合的盐酸小檗

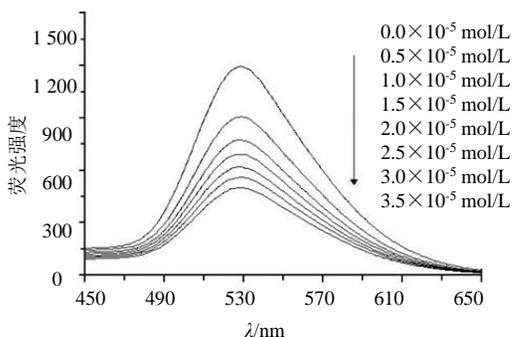


图 2 替诺昔康对 ctDNA-盐酸小檗碱荧光猝灭光谱图
Fig. 2 Fluorescence quenching plots of TNX on ctDNA-BR

碱浓度下降,促使 ctDNA-盐酸小檗碱发生荧光猝灭。(3)替诺昔康与 ctDNA-盐酸小檗碱体系形成新的无荧光现象的复合物即 ctDNA-盐酸小檗碱-替诺昔康,导致体系荧光强度下降。然而,紫外光谱已经证明替诺昔康与 ctDNA 的结合不是嵌插方式,因此替诺昔康与盐酸小檗碱不存在竞争;此外,随着替诺昔康的加入盐酸小檗碱的荧光光谱没有发生明显的变化,表明替诺昔康与盐酸小檗碱之间不存在相互作用,由此基本排除了原因(1)、(2),即替诺昔康与 ctDNA-盐酸小檗碱间发生相互作用,且形成无荧光的复合物。

为进一步研究替诺昔康与 ctDNA-盐酸小檗碱间相互作用机制,对荧光数据进行计算。一般来说荧光猝灭可分为静态猝灭和动态猝灭,若替诺昔康对 ctDNA-盐酸小檗碱的荧光猝灭属于动态猝灭,则其作用过程应遵循 Stern-Volmer 方程^[13],其中 F_0 、 F 表示有、无替诺昔康存在时 ctDNA-盐酸小檗碱溶液的荧光强度, K_{SV} 是 Stern-Volmer 猝灭常数, $[Q]$ 为替诺昔康浓度, K_q 是由扩散控制的双分子动态猝灭速率常数, τ_0 是生物大分子内源性荧光寿命,约为 1×10^{-8} s。

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1)$$

$$K_{SV} = K_q \times \tau_0 \quad (2)$$

根据公式(1)以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图,得到回归方程 $Y = 0.4701 X + 1$ ($R^2 = 0.9826$)。该直线的斜率即为动态猝灭常数,得替诺昔康的 $K_{SV} = 4.7 \times 10^4$ L/mol,由式(2)得 $K_q = 4.7 \times 10^{12}$ L/mol·s。一般认为,各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为 2.0×10^{10} L/mol·s^[13],替诺昔康对 ctDNA 动态猝灭速率常数大于此值,故猝灭过程不是由动态碰撞引起的,而是属于静态猝灭。

对于形成复合物的静态猝灭,可以根据

Lineweaver-Burk 双倒数方程^[11]求算出结合常数:

$$\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{F_0} + \frac{1}{K_{LB} F_0 [Q]} \quad (3)$$

式中, F_0 和 F 代表有无替诺昔康时 ctDNA-盐酸小檗碱体系在 527 nm 处的荧光强度, $[Q]$ 代表替诺昔康的浓度, K_{LB} 代表结合常数。以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $F_0 [Q]^{-1}$ 作图,得回归方程 $Y = 1.3168 X + 1.3614$ ($R^2 = 0.9838$)。根据直线斜率可得结合常数 $K_{LB} = 1.03 \times 10^5$ L/mol。

2.4 替诺昔康与 ctDNA 相互作用的结合方式

2.4.1 单双链 DNA 研究

将双链 DNA (dsDNA) 在 100 °C 的水浴锅中加热 30 min,然后放置于冰水浴中快速冷却 10 min,即可得变性单链 DNA (ssDNA)。依照 2.3 项下操作,用荧光光谱仪考察 ssDNA 与替诺昔康的相互作用情况。按 Lineweaver-Burk 双倒数方程计算得到的结合常数 $K_{LB} = 3.89 \times 10^4$ L/mol,而 dsDNA-盐酸小檗碱与替诺昔康相互作用结合常数 $K_{LB} = 1.03 \times 10^5$ L/mol。显然,替诺昔康与 ssDNA 的结合作用要弱于替诺昔康与 dsDNA,对此现象的解释则归结为替诺昔康与 ctDNA 主要以沟槽作用结合。由于沟槽作用是指小分子药物与 ctDNA 大沟或小沟的碱基对边缘直接结合^[1],而 dsDNA 解链后沟槽结构遭到破坏,虽然 ssDNA 在溶液中以线团形状存在,在线团表面形成的许多凹点可与小分子发生氢键作用,因此替诺昔康对 ssDNA-盐酸小檗碱的荧光仍存在猝灭,但是与 dsDNA 相比替诺昔康与 ssDNA-盐酸小檗碱结合的几率还是小得多。

2.4.2 DNA 热熔链实验

在 250 mL 量瓶中加入 1×10^{-2} mol/L ctDNA 溶液 1.25 mL 和 2.5×10^{-3} mol/L 替诺昔康溶液 1 mL,用 Tris-HCl-NaCl 缓冲液稀释、定容,转移至 100 mL 锥形瓶中,固定于恒温水浴槽中。调节水浴锅温度 20~100 °C,间隔 2~5 °C 取样品,在 260 nm 波长下测得吸光度值。常温下, DNA 双螺旋结构是较稳定的结构,但是当将其加热到一定温度时,其双螺旋结构会发生裂解,使其紫外光谱中 260 nm 处的吸光度值增加,即发生增色效应。DNA 解旋一半时达到的温度称为 DNA 的热变性温度 (T_m),当小分子药物与 DNA 相互作用时,其结构受到影响也会使 T_m 值产生变化。若小分子与 DNA 以嵌插方式结合时, T_m 升高 5~8 °C,小分子与 DNA 以沟槽或静电方式结合时, T_m 变化不大^[11]。因此,为了进一步确证替诺昔康与

ctDNA 以沟槽作用结合, 利用紫外分光光度计考察替诺昔康对 ctDNA 的 T_m 影响, 结果见图 3。可见加入替诺昔康后, ctDNA 的 T_m 没有显著的变化, 表明替诺昔康与 ctDNA 的结合不是嵌插方式, 而是沟槽结合。

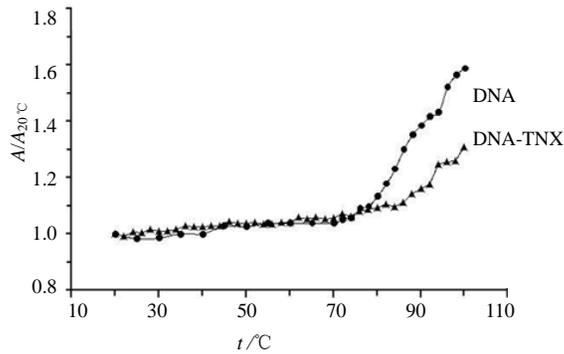


图 3 替诺昔康对 ctDNA 热变性影响的曲线
Fig. 3 Melting temperature curves of the effects of TNX on ctDNA

2.4.3 黏度实验 在 $(25.0 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 超级恒温槽中, 向黏度计中加入 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ctDNA 溶液 20 mL, 逐次加入 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 替诺昔康储备液 20 μL , 测量 3 次体系的流动时间计算平均值。加入替诺昔康后 ctDNA 的相对黏度按公式 $\eta = (t - t_0) / t_0$ 计算, 式中 t_0 、 t 分别为 ctDNA 溶液及不同替诺昔康比例的 ctDNA-替诺昔康溶液流经毛细管所需的时间, η_0 为无替诺昔康时 ctDNA 溶液的相对黏度, 以 $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ 对 $[\text{替诺昔康}]/[\text{ctDNA}]$ 作图, 见图 4。

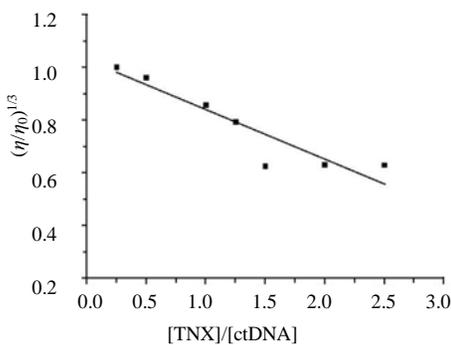


图 4 不同替诺昔康浓度对 ctDNA 体系黏度的影响
Fig. 4 Effect of the TNX concentration on ctDNA viscosity

一般来说, 若 DNA 与小分子药物以静电作用或沟槽作用结合时, 会使双螺旋结构出现扭转、弯曲, 使 DNA 的相对黏度降低或保持不变; 若 DNA 与药物分子以嵌插作用结合, 插入的药物分子会使

DNA 相邻碱基对间的距离增大, 从而伸长扭曲 DNA 双螺旋结构, 导致相对黏度增大^[14]。可以看出, 替诺昔康的加入使得 ctDNA 溶液的黏度降低, 表明替诺昔康与 ctDNA 的作用不是嵌插结合, 而是沟槽结合。

3 讨论

本实验采用紫外光谱法和荧光光谱法考察了替诺昔康与 ctDNA 间相互作用, 结果表明替诺昔康与 ctDNA 形成基态复合物, 从而导致 ctDNA-盐酸小檗碱荧光发生了静态猝灭作用。众所周知, DNA 溶液的黏度与 DNA 长度密切相关, 当 DNA 链增长时, 溶液黏度增加; 反之, 则黏度下降, 因此, 黏度试验是用于判断小分子药物与 DNA 结合模式最重要手段之一。本研究发现, 替诺昔康可降低 ctDNA 溶液的黏度, 因此排除嵌插作用。进一步研究发现, 替诺昔康并没有导致 ctDNA 的 T_m 发生显著的变化。而一般情况下, 如果小分子药物以插入模式与 DNA 结合时, 配体插入碱基对之间可发生稳定的 $\pi-\pi^*$ 堆积作用, 进而可促使 DNA 的 T_m 显著升高, 因此进一步证实替诺昔康与 ctDNA 间相互作用并非插入模式。此外, 对比单、双链 DNA 与替诺昔康相互作用研究发现, 替诺昔康与 ssDNA 间的结合作用明显小于替诺昔康与双链 DNA 间的结合作用, 也从另一个角度证明二者间相互作用方式并非静电或插入模式。

综合实验结果, 充分证实替诺昔康与 ctDNA 的作用方式为沟槽结合, 即替诺昔康与 ctDNA 碱基对的边缘发生了相互作用。本实验对进一步开发替诺昔康、了解其抗炎机制, 对 DNA 的损害及其毒副作用考察和全面评价非甾体类抗炎药的安全性能等方面研究提供科学依据有积极意义。

参考文献

- [1] 李俊芬. 喹啉、异喹啉类生物碱发光探针与相互作用的研究 [D]. 太原: 山西大学, 2008.
- [2] 曹晓丽, 郝俊旭, 刘彬, 等. 光谱法研究盐酸二氧丙嗪与 DNA 的相互作用 [J]. 药学研究, 2018, 37(2): 75-77.
- [3] 许明玲, 张晨, 林泳佳, 等. 盐酸异丙嗪与 DNA 相互作用的光谱学研究 [J]. 药学研究, 2017, 36(11): 630-633.
- [4] 曹晓丽, 王新, 张麒, 等. 灿烂甲酚蓝与 DNA 结合模式的荧光光谱法研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报, 2019(3): 261-264.
- [5] 蔡健, 贺玉婷, 李红霞, 等. 2-(2-吡啶基)苯并噻唑

- 的 Mn(II)、Zn(II)、Co(II)的金属配合物的合成以及与 DNA 相互作用的研究 [J]. 生物化工, 2019, 5(4): 46-50.
- [6] 李健和, 胡 焰, 曹俊华, 等. 非甾体抗炎药物注射制剂的开发与临床应用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2013, 32(3): 167-176.
- [7] 臧永红, 张 晶, 李思远, 等. 非甾体抗炎药防治阿尔茨海默病的研究进展 [J]. 实用医药杂志, 2018, 35(12): 1134-1137.
- [8] 高宇飞, 张腊红, 方家恒, 等. 非甾体抗炎药在预防胃癌中的研究进展 [J]. 健康研究, 2019, 39(4): 432-434, 438.
- [9] 彭梦侠, 姚婉清, 陈梓云. 红外光谱法结合判别分析法对抗风湿类中成药中替诺昔康的快速筛查 [J]. 理化检验: 化学分册, 2018, 54(11): 1241-1245.
- [10] 武 钊, 王茹林, 陈 静, 等. β -环糊精衍生物对 TNX 的增溶作用 [J]. 中国药物与临床, 2010, 10(1): 68-69.
- [11] 王冬晶. 金刚乙胺类希夫碱的合成及生物活性研究 [D]. 沈阳: 辽宁大学, 2012.
- [12] Kumar C V, Asuncion H E. DNA binding studies and site selective fluorescence sensitization of an anthryl probe [J]. *Am Chem Soc*, 1993, 115: 8547-8553.
- [13] 毛红艳, 刘雪雪, 张长征. 靛玉红与 DNA 相互作用的荧光光谱研究 [J]. 光散射学报, 2018, 30(1): 84-88.
- [14] Bera R, Sahoo B K, Ghosh K S, *et al.* Studies on the interaction of isoxazolcurcumin with calf thymus DNA [J]. *Int J Biol Macromol*, 2008, 42: 14-21.