

文章编号:1674-2869(2018)06-0591-06

# *N,N*,-偶联共轭双卟啉化合物与DNA的相互作用

刘 丹<sup>1</sup>, 徐泽彬<sup>1</sup>, 王 凯<sup>\*1,2</sup>, 汪泽江<sup>1</sup>, 吴凤收<sup>1</sup>

1. 武汉工程大学化工与制药学院, 湖北 武汉 430205;

2. 湖北大学化学化工学院, 湖北 武汉 430062

**摘 要:**在我们先前的研究中,合成了三种新化合物,*N,N*-偶联四苯基双卟啉化合物(Por 1)及其Zn配合物(Por 2)和*N,N*-偶联甲基吡啶双卟啉化合物(Por 3)。通过紫外-可见吸收光谱、荧光发射光谱以及圆二色谱等方法,研究了这些卟啉化合物Por 1、Por 2和Por 3与ct-DNA的结合模式。研究表明:Por 1与DNA通过外部沟连和外部堆积模式结合。而Por 2与DNA则是外部沟连和插入模式结合, Por 3可以插入DNA之中,并且能借助于静电作用,与DNA的磷酸骨架进行结合。Por 1~Por 3与ct-DNA的结合常数分别为 $1.84 \times 10^6$  L/mol、 $1.06 \times 10^6$  L/mol和 $8.27 \times 10^5$  L/mol。这些研究为后续的肿瘤细胞光动力活性测试奠定一定的理论基础。

**关键词:**卟啉;共轭双卟啉;ct-DNA;结合模式;相互作用

中图分类号:O627;O614 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2018.06.001

## Study of *N,N*,-Conjugated Bisporphyrins Interacting with DNA

LIU Dan<sup>1</sup>, XU Zebing<sup>1</sup>, WANG Kai<sup>\*1,2</sup>, WANG Zejiang<sup>1</sup>, WU Fengshou<sup>1</sup>

1. School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hubei University, Wuhan 430062, China

**Abstract:** Three new compounds, *N,N'*-conjugated tetraphenyl bisporphyrin (Por 1), their Zn complex (Por 2) and *N,N'*-conjugated bisporphyrin with *N*-methyl pyridine (Por 3) were prepared in our previous studies. The properties of these compounds interacting with calf thymus DNA were investigated by UV-vis, fluorescence and circular dichroism spectroscopy in the present work. The results show that Por 1 interacts with ct-DNA through the groove binding and external stacking modes, while Por 2 binds to DNA with a combination of external stacking with intercalation mode, and Por 3 can insert into DNA and integrate with its phosphate backbone through an electrostatic interaction. The binding constants of Por 1, Por 2 and Por 3 with ct-DNA are calculated to be  $1.84 \times 10^6$  L/mol,  $1.06 \times 10^6$  L/mol, and  $8.27 \times 10^5$  L/mol, respectively. These studies provide a theoretical basis for the subsequent investigation of photodynamic activity tests against tumor cells.

**Keywords:** porphyrin; conjugated bisporphyrin; ct-DNA; binding mode; interaction

卟啉及卟啉衍生物作为一种大分子杂环化合物广泛存在于自然界中,在不同领域如高分子材料,化学催化,靶向药物治疗等都有着重要的应用,并在生命活动中扮演着重要的角色。在光动

力治疗过程中,卟啉扮演着十分重要的角色。卟啉作为光敏剂,受到一定波长的光照射后由单线态基态激发到更高能量的单线态激发态产生<sup>1</sup>O<sub>2</sub>,或者电子和氢的转移到底物分子上成为活性自由

收稿日期:2018-04-17

基金项目:国家自然科学基金(20902071)

作者简介:刘 丹,硕士研究生。E-mail:597817591@qq.com

\*通讯作者:王 凯,博士,教授。E-mail:kaiwang@hubei.edu.cn

引文格式:刘丹,徐泽彬,王凯,等.*N,N*,-偶联共轭双卟啉化合物与DNA的相互作用[J].武汉工程大学学报,2018,40(6):591-596.

基在细胞组织内扩散,进而破坏组织引起细胞凋亡,对整个细胞造成损伤进行光动力治疗<sup>[1-3]</sup>。

大部分卟啉化合物主要是以 DNA-卟啉复合物的方式与 DNA 可逆的结合,卟啉与 DNA 的相互作用模式是新型药物分子设计、筛选和临床研究的基础,所以在生物活性研究方面十分重要<sup>[4-5]</sup>。可以通过紫外吸收光谱,荧光发射光谱以及圆二色光谱研究卟啉化合物与 DNA 的相互作用模式,目前提出了 3 种主要的相互作用方式<sup>[6]</sup>:a) 嵌插结合;b) 外部结合;c) 外部堆积。随着 DNA 加入卟啉溶液后,卟啉的 *soret* 带出现较大程度的减色(>30%)和一定程度的红移(>5 nm),荧光光谱出现明显的变化,产生负的圆二色谱信号说明卟啉与 DNA 之间为插入模式;如果紫外吸收光谱变化很小,没有明显的减色和红移,荧光强度变化不明显,产生正的圆二色谱信号说明卟啉与 DNA 之间为外部结合模式;当吸收光谱与嵌插作用相似时,荧光强度变化不明显,圆二色谱有等强度的正、负信号,说明卟啉与 DNA 发生外部堆积。

光动力治疗过程中,光的穿透性对光敏剂杀死肿瘤细胞有很大影响。通常光的渗透性与波长和组织深度及其光学特性有很大关系。成年人体内水分占体重的 60%~70%,波长小于 700 nm 的光能够被水分子散射而且会被内源发色团如血红蛋白吸收,波长大于 900 nm 的光可以被水分子吸收<sup>[7-8]</sup>,所以理想药物在 700 nm~950 nm 的近红外区域被激活治疗效果会更显著<sup>[9-10]</sup>。光动力治疗药物的理想激发波长能够有更强的组织穿透性和更少的水分子吸收干扰,而卟啉化合物的 *soret* 带在 400 nm~500 nm 范围内有强吸收,所以其双光子吸收(2-PA)范围应该在 800 nm~1 000 nm 内。卟啉化合物长波长的吸收,高的单线态氧产率及良好的 DNA 结合能力,使得其在双光子光动力治疗(2PA-PDT)中有很大的优势<sup>[11]</sup>。因此,本课题组先前设计并合成了 *N,N*-偶联共轭双卟啉化合物(Por 1)及其 Zn 配合物(Por 2),以及为了改善双卟啉水溶性,进一步制备了 *N,N*-偶联甲基吡啶双卟啉化合物(Por 3),如图 1 所示。为了进一步研究这些亲油性和亲水性双卟啉化合物与 DNA 结合模式的不同,采用紫外-可见吸收光谱、荧光发射光谱以及圆二色谱等光学研究手段来检测目标化合物与 DNA 之间的相互作用,希望为后期体外细胞活性研究提供一定的理论基础。

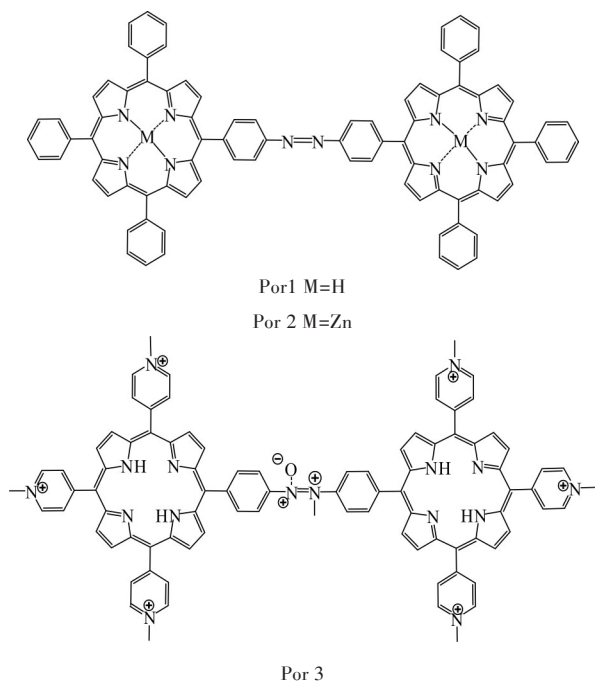


图 1 卟啉化合物的结构

Fig. 1 Structures of porphyrins

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

Cary UV-100 紫外-可见光谱仪;PTI QM-4/2005 荧光光谱仪;JASCO J-720 圆二色光谱仪;pHS-828 pH 计(合肥卓尔仪器仪表有限公司)。

三种卟啉化合物参照先前合成的方法制备<sup>[12]</sup>。小牛胸腺 DNA(ct-DNA)(Sigma-Aldrich 公司),根据吸光光谱来测定其浓度,又  $\epsilon_{260} = 6\,600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,通过公式计算得 ct-DNA 浓度为  $4.74 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。水为纯化水,试剂均为国药集团化学试剂有限公司生产。

测定环境为大气压和  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。紫外-可见吸收光谱,荧光发射光谱,圆二色谱的测试均在浓度为 0.05 mol/L Tris-HCl 和 0.1 mol/L NaCl (pH=7.4) 的缓冲溶液中进行。

### 1.2 光谱测试

1.2.1 紫外-可见光谱测试 在 3 mL 样品池中加入 27  $\mu\text{L}$  1 mmol/L 卟啉储备液和 3 mL Tris-HCl 缓冲溶液,稀释卟啉溶液至浓度为 9  $\mu\text{mol/L}$ 。在 350 nm~500 nm 范围内测定其紫外吸收后,以 ct-DNA 滴定卟啉溶液,每次滴定后充分混合 5 min,再测定此混合溶液的紫外吸收光谱,样品池厚度为 1 cm。

1.2.2 荧光光谱测试 在 3 mL 样品池中加入 27  $\mu\text{L}$  1 mmol/L 卟啉储备液和 3 mL Tris-HCl 缓冲溶液,稀释卟啉溶液至浓度为 9  $\mu\text{mol/L}$ 。则在 600 nm~800 nm 范围内测定荧光发射光谱后,以 ct-DNA 滴

定卟啉溶液,每次滴定后充分混合 5 min,再测定此混合溶液的荧光发射光谱,样品池厚度为 1 cm。卟啉 1、2、3 的激发波长设置为 427 nm,419 nm,424 nm。激发狭缝和发射狭缝设置为 10 nm。

1.2.3 圆二光谱测试 取卟啉储备液于 ct-DNA 溶液中混合,定容稀释至浓度为 18 μmol/L,加入样品池中。 $r=n(\text{Porphyrin}):n(\text{DNA})$ , $r=0.05$ 。在 400 nm~500 nm 范围内测量,CD 光谱带宽度为 1 nm,灵敏度为 10 mdeg,分辨率为 0.1 nm,扫描速度为 100 nm/min,样品池为 1 cm,扫描空白缓冲液用于校正基线。

2 结果与讨论

2.1 紫外-可见光谱测试

在紫外-可见吸收光谱中,采用不同浓度 ct-DNA 与卟啉化合物结合观察吸收峰的变化,浓度范围分别为 0 μmol/L、0.79 μmol/L、1.57 μmol/L、3.14 μmol/L、6.24 μmol/L、9.29 μmol/L、12.31 μmol/L、18.23 μmol/L、24.00 μmol/L、29.63 μmol/L、35.11 μmol/L、40.46 μmol/L、50.79 μmol/L、60.63 μmol/L、79.00 μmol/L、99.79 μmol/L。观察卟啉 Soret 带吸光度以及最大吸收波长的变化,由表 1 和图 2 可知,所有卟啉样品的 Soret 带的吸光度出现了一定程度的减色并伴随着红移。这是由于卟啉大环结构中  $\pi^*$  的共轭体系能够与 DNA 碱基共轭体系中的  $\pi$  发生电子堆积,引起电荷的转移,导致能级降低,从而致使  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁能级变小产生红移现象。同时电子转移后的  $\pi$  轨道因为部分充满电子,减小了  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁的几率,产生减色效应<sup>[13]</sup>。卟啉 1 有较大幅度的减色(>40%),没有出现明显的红移(<5 nm),初步推断与 DNA 的相互作用模式为表面堆积的外部键合模式。卟啉 2 的减色程度为 68%,并且有较为明显的红移现象(6 nm),说明卟啉 2 与 DNA 相互作用模式为插入和外部结合并存。卟啉 3 减色程度不明显并且没有出现红移现象,初步推断卟啉 3 与 DNA 的相互作用模式为外部键合模式。

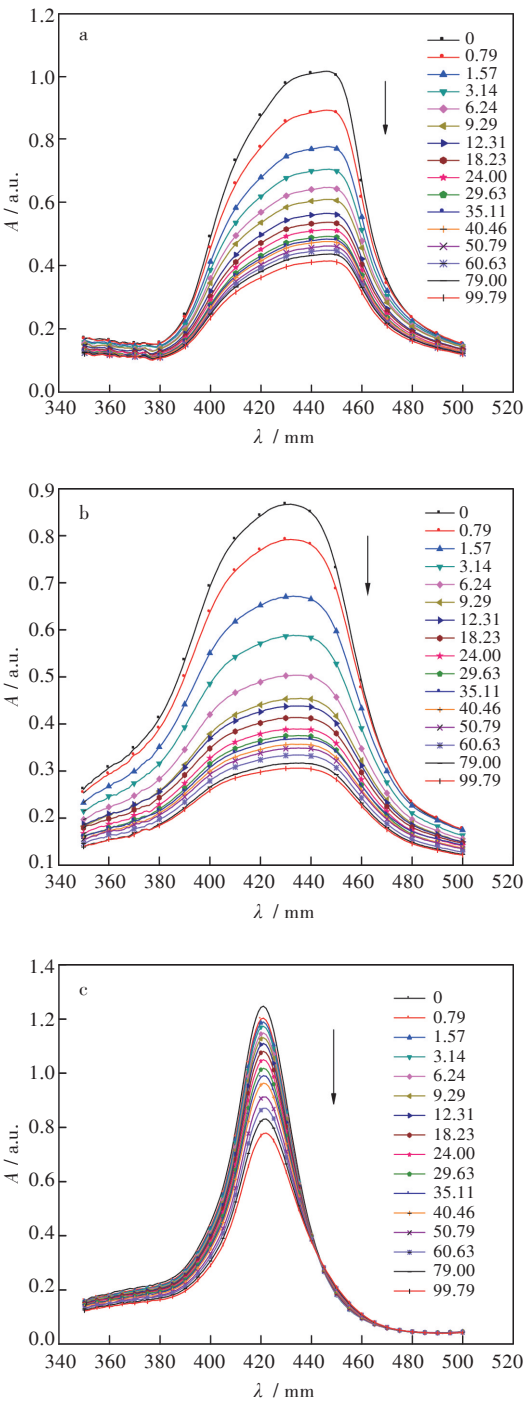


图2 ct-DNA 结合卟啉的紫外可见吸收光谱:(a)卟啉 1, (b)卟啉 2,(c)卟啉 3  
Fig 2 UV-Vis absorption spectra of ct-DNA combined with porphyrin :(a)Por 1,(b)Por 2,(c)Por 3

化合物	紫外-可见吸收	荧光发射	在soret区域的CD正峰 / 在soret区域的CD负峰 /	
	[减色 / %] / [红移Δλ / nm]	[减色 / %] / [红移Δλ / nm]	nm	nm
Por 1	59.2/2	26.7/(-2/-1)	493,446	483,409
Por 2	68.0/6	37.1/(0/2)	493,455	476,427
Por 3	33.4/1	37.5/(+13)	492,473,455,444,431	480,411

结合常数  $K$  可以表示卟啉与 DNA 的结合能力。根据文献  $K$  值可由下列方程式计算得出<sup>[14]</sup>:

$$c/\Delta\varepsilon_{ap} = c/\Delta\varepsilon + 1/(\Delta\varepsilon K)$$

其中  $c$  代表 DNA 的浓度,单位为 mol/L;  $\Delta\varepsilon_{ap}=|\varepsilon_A-\varepsilon_F|$ ;  $\Delta\varepsilon=|\varepsilon_B-\varepsilon_F|$ ;  $\varepsilon_A=A_{obs}/[\text{Porphyrin}]$ ;  $\varepsilon_B$  和  $\varepsilon_F$  分别表示 DNA-卟啉复合物的消光系数和未与 DNA 结合的自由卟啉的消光系数。 $c/\Delta\varepsilon_{ap}$  和  $c$  之间具有一定的线性关系可线性拟合得出方程。为确保 DNA 与卟啉作用充分,线性拟合的准确性,通常从  $r=1.1$  开始获取数据。线性拟合得到直线后,将斜率  $1/\Delta\varepsilon$  与截距  $1/(\Delta\varepsilon K)$  相除可计算得到  $K$  值(如表 2)。当结合常数  $K$  在  $10^6\sim 10^7$  则说明为插入模式,结合常数  $K$  在  $10^5$  左右则说明为外部结合模式。

表 2 卟啉 1、2、3 的结合常数

Tab. 2 Binding constants of Por1, Por2 and Por3

化合物	结合常数 $K / (\text{L/mol})$	相关系数 $R\text{-Square}$
Por 1	$1.84\times 10^6$	0.999 5
Por 2	$1.06\times 10^6$	0.991 7
Por 3	$8.27\times 10^5$	0.995 5

从表 2 中可以看出 Por 3 的结合常数最小, Por 1 和 Por 2 与 DNA 的结合能力均强于 Por 3, 结合紫外吸收光谱表明与 DNA 为外部键合的结合模式。根据文献可得 EB 与 DNA 的结合常数为  $5.54\times 10^5\text{ L/mol}$ <sup>[6]</sup>, 故比较表中数据可知 Por1、2、3 与 DNA 的结合能力明显强于 EB。

2.2 荧光发射光谱

利用不同浓度的 ct-DNA 来滴定卟啉化合物, 得到荧光发射光谱如图 3 和表 1 所示, 3 个卟啉的荧光强度随着 ct-DNA 浓度的增加都有不同程度的减弱, Por 1 发生了一定程度的蓝移, Por 2, Por 3 都发生了一定程度的红移。这是由于卟啉环与金属 Zn 形成配位化合物, 使得卟啉共轭体系中电子云密度降低或者与金属本身的轴向配位有关。在低浓度 ct-DNA 下, Por 3 荧光强度开始降低, 这是由于卟啉在 DNA 表面的自堆积。在高浓度 ct-DNA 下, 荧光强度有很大程度的增强同时伴有明显的红移现象, 并且在 663 nm 处卟啉发射峰的双峰开始裂缝明显, 出现了强的荧光发射, 这是由于卟啉插入到 DNA 碱基对里, 导致所处环境变为疏水性所致, 进而使得卟啉自堆积能力降低, Por 3 从聚集体转变为单一态使得荧光强度增加<sup>[15]</sup>。结果表明, Por 3 与 DNA 之间存在着多种结合模式, 这种结合模式会因为 ct-DNA 浓度的不同而发生变化。

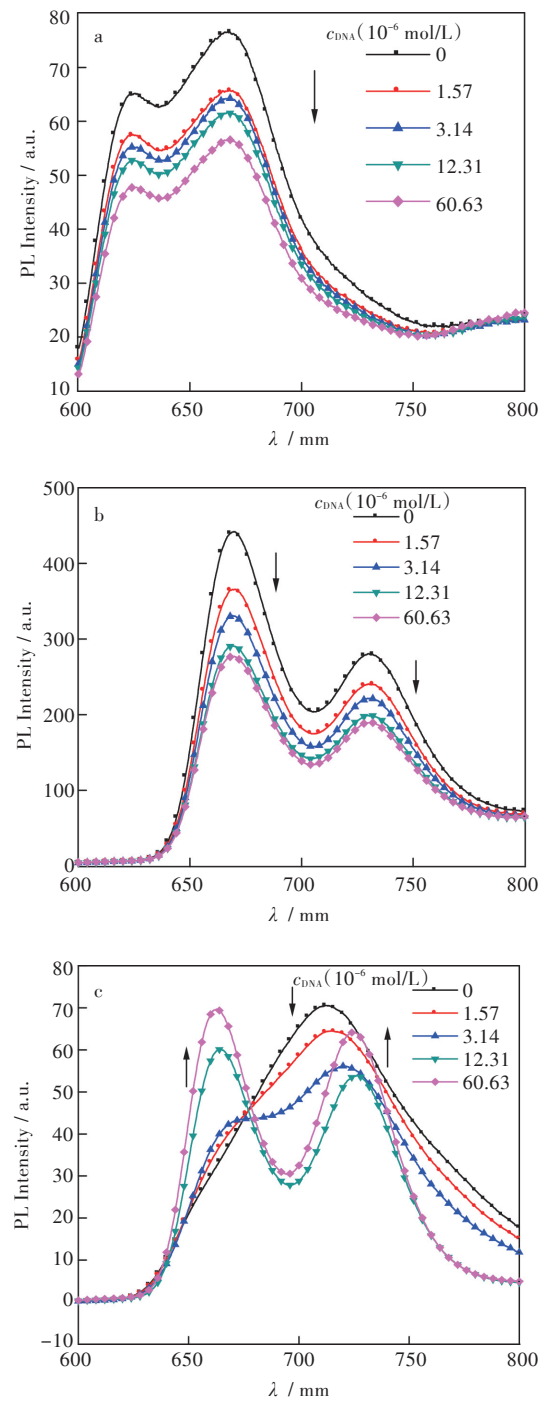


图 3 ct-DNA 结合卟啉的荧光发射光谱:  
(a) 卟啉 1, (b) 卟啉 2, (c) 卟啉 3  
Fig. 3 Fluorescence emission spectra of ct-DNA combined with porphyrin: (a) Por 1, (b) Por 2, (c) Por 3

2.3 圆二色谱

圆二色谱是研究卟啉化合物与 DNA 结合模式最直接的方法之一。当 DNA 与卟啉化合物相互作用后, 在卟啉 *soret* 区域产生的信号可以判断其结合模式。ICD 信号为正, 表明分子的长轴与短链 DNA 的碱基对间处于平行的几何位置, 卟啉与 DNA 为外部小沟结合模式; ICD 信号为负, 表明分

子的长轴与短链 DNA 的碱基对间处于垂直的几何位置,卟啉与 DNA 为插入的结合模式;出现一正一负的信号,说明卟啉与 DNA 为外部堆积的结合模式。

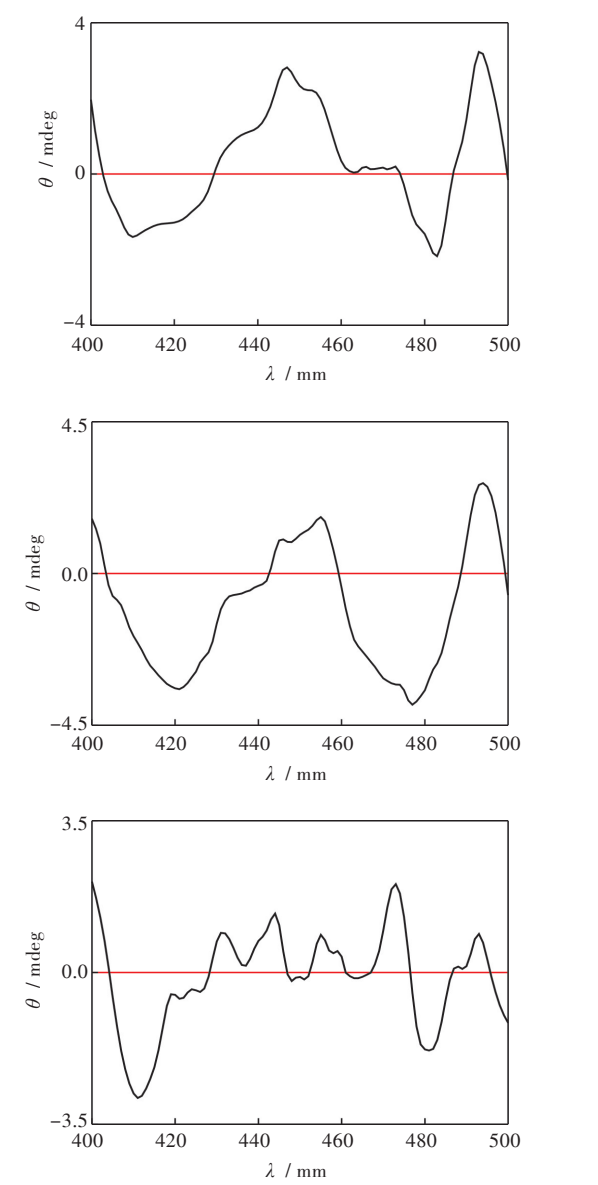


图4 DNA 结合卟啉的CD光谱:(a) 卟啉1,(b) 卟啉2,(c) 卟啉3

Fig. 4 Circular dichroism spectra of ct-DNA combined with porphyrin:(a) Por1, (b) Por2, (c) Por3

如图4和表1所示, Por 1 在409 nm处有一个较强的负峰,在446 nm处有一个强的正峰,同时在483 nm和493 nm处有两个大小相同的正负峰,说明 Por 1 与 DNA 结合模式为外部沟连和外部堆积并存。 Por 2 在427 nm,476 nm处有很强的负峰,说明 Por 2 与 DNA 的主要结合模式为插入模式。 Por 3 在411 nm处出现较强的负信号峰,而在431 nm~473 nm处有两个较弱的正峰及480 nm与

492 nm处的正负信号峰,说明 Por 3 与 DNA 之间既有插入也有外部堆积的相互作用,且可能由于多个正电荷与 DNA 磷酸负离子骨架之间的相互作用存在着静电作用<sup>[16]</sup>。这一结果与紫外可见吸收光谱和荧光发射光谱的 ct-DNA 滴定实验结果一致。

### 3 结 语

针对三种 N,N'-偶联共轭双卟啉化合物进行了紫外可见吸收光谱,荧光发射光谱,圆二光色谱的 DNA 测试,通过观察光谱变化值和诱导信号研究其与 DNA 的结合模式。结果表明, Por 1 与 DNA 的结合模式是外部沟连以及外部堆积; Por 2 能与 DNA 通过外部沟连模式作用,也可以插入到 DNA 中; Por 3 可以插入 DNA,并且能够在 DNA 表面进行自身堆积通过与 DNA 磷酸骨架的静电相作用。以上结论为后续的体外细胞实验奠定基础,为共轭双卟啉的研究提供理论依据。

#### 参考文献:

[1] CASTANO A P, DEMIDOVA T N, HAMBLIN M R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization [J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2004, 1(4): 279-293.

[2] ZHU S Z, YAO S, WU F S, et al. Platinated Porphyrin as a new organelle and nucleus dual-targeted photosensitizer for photodynamic therapy [J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2017, 15 (27) : 5764-5771.

[3] YAO S, ZHENG Y M, JIANG L J, et al. Methylene violet 3RAX-conjugated porphyrin for photodynamic therapy: synthesis, DNA photocleavage, and cell study [J]. RSC Advances, 2018(8): 4472-4477.

[4] TAKASHI M, KAZUYUKI H, YUMI S, et al. Synthesis, structure and thermal stability of fully hydrophobic Porphyrin-DNA conjugates[J]. Tetrahedron Letters, 2007, 48(48): 8514-8517.

[5] JIA T, JIANG Z X, WANG K, et al. Binding and photocleavage of cationic Porphyrin-phenylpiperazine hybrids to DNA [J]. Biophysical Chemistry, 2006, 119: 295-302.

[6] SARI M A, BATTIONIJ P, DUPRE D, et al. Interaction of cationic Porphyrins with DNA: importance of the number and position of the charges and minimum structural requirements for intercalation [J]. Biochemistry, 1990, 29(17): 4205-4215.

[7] JELINKOVA H, PASTA J, SULC J, et al. Anterior eye tissue transmission for the radiation with the wavelength

- from eye safe region[J]. *Laser Physics Letters*, 2005, 2 (12): 603.
- [8] KUIMOV M K, COLLINS H A, BALAZ M, et al. Photophysical properties and intracellular imaging of water-soluble Porphyrin dimers for two-photon excited photodynamic therapy [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2009, 7(5): 889–896.
- [9] OCHSNER M. Light scattering of human skin: a comparison between zinc (II) —phthalocyanine and photofrin II® [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1996, 32(1): 3–9.
- [10] EICHLER J, KNOF J, LENA H. Measurements on the depth of penetration of light (0.35–1.0  $\mu\text{m}$ ) in tissue [J]. *Radiation and Environmental Biophysics*, 1977, 14(3): 239–242.
- [11] SAMKOE K S, CLANCY A A, KAROTKI A, et al. Complete blood vessel occlusion in the chick chorioallantoic membrane using two-photon excitation photodynamic therapy: implications for treatment of wet age-related macular degeneration [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2007, 12(12):034025.
- [12] XU Z B, YU F Q, WU F S, et al. Synthesis, DNA photocleavage, singlet oxygen photogeneration and two photon absorption properties of ruthenium-phenanthroline Porphyrins [J]. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2015, 19: 1046–1052.
- [13] 王凯, 林笑, 万幸, 等. 钌-菲罗啉卟啉的合成及其与 DNA 相互作用研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2012, 33(12): 2663–2669.
- [14] TADAYUKI U, KANYA H, MASAHICO T, et al. Binding of meso-tetraKis (N-methylpyridinium) Porphyrin to double helical RNA and DNA-RNA hybrids [J]. *Inorganic Chemistry*, 1997, 36 (8) : 1676–1683.
- [15] YANG K, ZHANG X, YANG F, et al. DNA Photocleavage and binding modes of methylene violet 3RAX and its derivatives: effect of functional groups [J]. *Australian Journal of Chemistry*, 2017, 70: 830–836.
- [16] WANG K, JIN Q, ZHANG X L, et al. Synthesis, DNA photocleavage and singlet oxygen measurement of cationic bisporphyrins [J]. *Journal of the Korean Chemical Society*, 2013, 57 (2):246–251.

本文编辑:张 瑞