痈囊腔菌素 A 的光物理和光敏化特性

李 聪 何严萍* 欧灵澄 田茂军 饶之坤 郭孟璧

(云南大学化学与材料工程学院, 云南大学生物制药创新人才培养基地, 昆明 650091. * 联系人, E-mail: yphe@ynu.edu.cn)

摘要 以竹红菌甲素(HA)和竹红菌乙素(HB)为参比, 系统地研究了实验室生物合成制备的花醌类化合物-痈囊腔菌素 A (EA)的光物理和光敏化特性. 结果表明 EA 光敏可产生单重态氧, 其量子产率为 0.98, 高于 HB ($\Phi = 0.84$). 同时通过吸收光谱分析了 EA 在无氧条件下半醌负离子的产生, 通过纳秒时间分辨瞬态吸收光谱研究了 EA 的三重态 T-T 吸收, 得到了 EA 在环己烷溶剂中的瞬态吸收光谱, 测定了 EA 三重态寿命, 并采用基线漂白法确定了 EA 的 T-T 摩尔消光系数.

关键词 痈囊腔菌素 A 荧光光谱 吸收光谱 单重态氧 半醌负离子自由基 三重态

花醌类化合物是一类分布于自然界生物中的光敏色素, 因其具有良好的光敏杀伤肿瘤细胞和抑制艾滋病病毒(HIV-2)的作用, 作为一种新型的光敏剂及光疗药物, 越来越引起人们的关注^[1-4]. 但由于天然资源的局限限制了该类药物的开发应用. 我们利用生物催化合成的方法合成了一类花醌化合物-痈囊腔菌素A(EA)、竹红菌甲素(HA)、竹红菌乙素(HB) (图 1), 其中EA为主要成分, 含量达 0.2%^[5,6]. 目前, 对 HA, HB的结构、性质、光物理、光化学及光生物活性研究已有广泛而深入的研究^[7-9]. 但对EA, 至今仅见关于其分离及结构的报道^[10,11], 其他方面研究较少. 本课题组通过对EA的结构修饰和改性试验、癌细胞的杀伤活性及光敏活性研究^[12-16], 发现EA用于抗肿瘤的治疗有着很好的开发和应用前景. 本文以HA, HB为对照, 对EA的光物理特性进行了研究, 为该花醌化合物的深入开发研究提供理论依据.

1 实验

1.1 材料

HA从竹红菌中提取, 使用前用三氯甲烷及石油醚重结晶两次. HB由HA脱水而得. EA采用实验室生物合成法制备^[6]. 9,10-diphenylanthracene (9,10- DPA) 购于Aldrich公司, 并在充Ar, -20°C 保存. 1,4-二氮杂二环^[2.2.2]辛烷(DABCO)等购于Sigma公司. 二甲基亚砜 (DMSO)和其他有机溶剂均为分析纯, 购于北京试剂公司. 所用溶液均为使用前新鲜配制, 根据实验需要在溶液中分别充以氩气、氧气、空气.

1.2 光谱测试

紫外-可见吸收光谱用 Shimadzu UV-1601 分光光度计测定; 荧光光谱用 Hitachi F-4500 荧光光谱仪测

定. 瞬态吸收光谱由纳秒级闪光光解仪测定, 激发激光器为 Q-switched Nd:YAG laser (Continuum Surelite, 波长为 532 nm), 脉宽为 7 ns, 检测光源为脉冲氙灯, 信号由 Edinburgh Lp900 和 Tektronix TDS 3012B 示波器记录采集.

1.3 实验方法

脂水分配比的测定: 将适量化合物溶于等体积的正辛醇和磷酸缓冲液(PBS)中, 超声充分混匀 2 min, 然后转移到离心机中离心 10 min 使两相充分分离, 再分别测定两相的吸收光谱, 有机相和水相中 λ_{max} 处的吸收值 A 之比即为该物质的脂水分配系数.

荧光量子产率: 荧光量子产率(Φ_s)的计算以 Rh6G($\Phi_R=0.97$, 乙醇溶液)为参照计算. 荧光发射光谱以 470 nm为激发波长激发, 550 到 750 nm处探测, 并保证样品的吸光度数值不超过 0.1. 荧光量子产率通过公式(1)计算^[17]:

$$\frac{\Phi_s}{\Phi_R} = \frac{A_s}{A_R} \times \frac{(\text{OD})_R}{(\text{OD})_s} \times \frac{n_s^2}{n_R^2}, \quad (1)$$

其中, S 和 R 分别代表样品和参照物; Φ 为荧光量子产率, A 代表荧光峰的积分面积, 均由仪器工作站上所附软件直接积分而得; OD 为激发波长处的吸光度; n 代表溶剂的折射率.

单重态氧量子产率: 样品的单重态氧($^1\text{O}_2$)量子产率用 Diwu 和 Lown 的 9,10-DPA 漂白方法测定^[18], 9,10-DPA 作为单重态氧的受体, 它的消耗可以通过吸收光谱在 376 nm 处的 OD 值降低来检测. 光源是 500 W 高压汞灯, 用滤光片得到 436 nm 的单色光.

T-T 吸收摩尔消光系数: 采用基态漂白法来确定 EA 和 HA 的 T-T 吸收摩尔消光系数^[19].

图 1 HA、HB、EA 的化学结构

2 结果与讨论

2.1 脂水兼溶性研究

临床上评估一种药物的两亲性, 往往采用测量药物在有机相与水相中的脂水分配比, 即PC值. 在实验中两亲性的测量可以用正辛醇和PBS缓冲液(pH 7.4)中的脂水分配系数(PC)来表征. 从PC值来看, 它越大, 表示化合物的脂溶性会越强. 临床上脂溶性强的药物由于不能溶于血相中而难于直接静脉注射给药, 而完全水溶的光动力药物由于缺乏对细胞的吸附而造成其光活性非常低^[17]. 以前文献报道HA和HB的脂水分配比(PC值)分别为 41.6, 46.4^[20]. 我们按照文献的方法对EA的脂水分配比进行了测试, 研究发现在水相中EA的吸收光谱为零, 表明EA的脂溶性非常强, 在水中几乎不溶. 因此, 为了使EA达到光动力药物静脉注射的要求, 需要对EA进行化学修饰增加其水溶性或者采用双亲性的材料包封制备可水溶性的药物制剂.

另外, 研究发现 EA 在 DMSO 中溶解性较好, 容易配制成高浓度的样品(2 mg/mL), 因此以下实验研究均在 DMSO 溶液中进行.

2.2 吸收光谱

图 2 为 EA, HA 和 HB 在 DMSO 溶液中相同浓度下(5 $\mu\text{mol/L}$)的吸收光谱.

EA, HA 和 HB 吸收值最高处的摩尔消光系数见表 1.

表 1 EA, HA 和 HB 在 DMSO 溶液中吸收摩尔消光系数

样品	EA	HA	HB
$\lg \epsilon$	4.39 (468.5 nm)	4.36 (475 nm)	4.32 (470 nm)

2.3 荧光光谱

图 3 为 EA, HA 以及 HB 在 DMSO 溶液中相同浓度(5 $\mu\text{mol/L}$)下的荧光发射光谱.

图 2 EA, HA 和 HB 在 DMSO 溶液中的吸收光谱

图 3 EA, HA 和 HB 在 DMSO 溶液中的荧光发射光谱
浓度均为 5 $\mu\text{mol/L}$, 激发波长均为 470 nm

室温下测得 EA, HA 和 HB 在 DMSO 溶液中的荧光量子产率分别为 0.11, 0.11 和 0.08.

2.4 光诱导产生活性物种的研究

(1) 有氧条件下单重态氧的产生. 单重态氧是一种高反应活性的物种^[18]. 本实验以 HB 为参比, 测定了 EA 单重态氧量子产率. 图 4 所示为光敏氧化

9,10-DPA吸收变化对光照时间所作的图,照射波长为436 nm,溶剂为DMSO. 在EA和氧存在下,光照时9,10-DPA发生迅速的褪色反应,而在暗处或光照不含氧或光敏剂的溶液时观察不到9,10-DPA的漂白,这些结果说明EA光敏产生单重态氧. 当单重态氧的猝灭剂DABCO加入到体系中时,光氧化9,10-DPA的反应被强烈抑制,猝灭实验进一步证实了单重态氧的产生. 通过图4可以看出在充氧的DMSO溶液中,3种样品的单重态氧产生的能力依次为EA>HA>HB. 单重态氧是通过光敏剂的三重态与基态氧之间的能量转移产生的(式(4)),属于Type II型反应. 我们取HB在苯中的单重态氧量子产率0.84为参照,根据实验曲线测算出EA的单重态氧量子产率为0.98.

图4 利用DPA漂白法测定单重态氧的形成

曲线1~3分别为EA, HA和HB在含有DPA(0.3 mmol)的DMSO溶液中,充氧条件下374 nm处吸收随时间的变化. 曲线4为与曲线1同等条件下加入DABCO(10 mmol/L)后的变化趋势

(2) 无氧条件下半醌负离子的产生. 当光照EA (50 μmol/L)和NADH (30 μmol/L)的去氧DMSO溶液时,样品的颜色由红色变为绿色. 图5为光照过程中产生的吸收光谱变化曲线.

从吸收光谱可以看出,随光照时间的增加,470, 528和570 nm处的吸收峰不断下降,同时630 nm左右出现一个新的吸收峰,且随光照时间增加而吸收峰明显增强,吸收光谱图上同时出现一个等吸收点(580 nm). 既然该反应是在强还原剂和无氧条件下发

图5 含有50 μmol/L EA和30 μmol/L NADH的去氧DMSO溶液,随着光照时间(0, 5, 10, 20, 30, 40 s)吸收光谱的变化趋势

图中虚线是光照后样品充氧15 min后的吸收光谱

图6 EA (a)和HA (b)在环己烷溶液中不同时间的瞬态吸收光谱

生,因此可以推断该中间产物来源于EA的光还原生成的半醌负离子(EA^{•-}).得到的光还原产物在无氧条件下非常稳定,通氧后吸收光谱恢复到原来的状态(图5虚线).

(3) 三重态T-T吸收. 用532 nm的激光光解EA和HA的环己烷溶液,得到如图6所示的时间分辨瞬

态吸收光谱图. 对于 EA, 瞬态吸收光谱(图 6(a))在 380, 510, 610 nm 左右出现 3 个吸收带. 在 400~500 nm 之间呈现一个很大的负吸收, 这是由于在此区间所产生的瞬态物种的吸收小于母体消耗所造成的吸收损失, HA 的瞬态吸收光谱(图 6(b))在 380, 520, 610 nm 出现 3 个吸收带, 同 EA 相似在 400~500 nm 之间呈现一个很大的负吸收.

采用基态漂白法来确定 EA 和 HA 的 T-T 吸收摩尔消光系数, 如图 7 所示.

图 7 EA 和 HA 的 T-T 吸收摩尔消光系数

图 8 为 EA 三重态吸收衰减曲线, 从图中拟合求得 EA 三重态寿命 5.2 μ s, 长于 HA 与 HB 三重态寿命(分别为 4.5 和 4.0 μ s), 这说明了为什么 EA 具有较高单重态氧量子产率.

图 8 痼囊腔菌素 A(EA)三重态衰减曲线

综合上述结果, EA 光敏化可产生半醌负离子自由基及单重态氧, 较 HA 及 HB 具有更高的光敏活性, 是一个值得进一步研究的光敏化剂.

致谢 感谢中国科学院化学研究所分子科学中心光化学重点实验室的资助. 本工作为国家自然科学基金(批准号: 20262007)及云南省自然科学基金(批准号: 2000C0106M)资助项目.

参 考 文 献

- Hudson J B, Imperial V, Haugland R P, et al. Antiviral activities of photoactive perylenequinones. *Photochem Photobiol*, 1997, 65(2): 352~354
- Miller G G, Brown K, Ballangrud A M, et al. Perclinical assessment of hypocrellin B and hypocrellin B derivatives as sensitizers for photodynamic therapy of cancer: progress update. *Photochem Photobiol*, 1997, 65(4): 714~722
- Hirayama J, Ikebuchi K J, Kwon H W, et al. Photo-inactivation of virus infectivity by hypocrellin A. *Photochem photobiol*, 1997, 66(5): 697~700
- Hudson J B, Zhou J, Chen J, et al. Hypocrellin A, from hypocrellin bambuase, is phototoxic to human immunodeficiency virus. *Photochem Photobiol*, 1994, 60(3): 253~255
- 李聪, 汪汉卿, 陈远藤, 等. 花醌类化合物的生物合成. *热带作物学报*, 1998, 19(增刊): 44~47
- 刘为忠, 陈远藤. 花醌类化合物产生菌发酵工艺研究. *云南大学学报(自然科学版)*, 2000, 22(5): 389~391
- 蒋丽金. 竹红菌素的结构、性质、光化学反应及反应机制. *科学通报*, 1990, 21: 1608~1616
- Hu Y Z, An J Y, Jiang L J, et al. Spectroscopic study on the photoreduction of hypocrellin hypocrellin A: generation of semiquinone radical anion and hydroquinone. *J Photochem Photobiol A Chem*, 1995, 89: 45~51[DOI]
- Zou W, An J Y, Jiang L J. Damage to Pbr322DNA photosensitized by hypocrellin A in liposomes and its derivative in solution. *J Photochem Photobiol B Biol*, 1996, 33: 73~78[DOI]
- Lousbery R J, Salemink C A. Pigments of elsinoe species. Part I. Structure of elsinochromes A, B, and C. *J Chem Soc C*, 1969, 81: 1219~1227
- 曹槐, 李聪, 刘世熙, 等. 痼囊腔菌素 A 的结构. *化学学报*, 2000, 58(7): 821~824
- 黄坤, 朱洪友, 李聪, 等. 痼囊腔菌素 A 的溴代反应及产物的光敏活性研究. *云南大学学报(自然科学版)*, 2003, 25(4): 352~354
- Ma L, Tai H, Li C, et al. Photodynamic inhibitory effects of three perylenequinones on human colorectal carcinoma cell line and primate embryonic stemcell line. *WJ*, 2003, 9(3): 485~490
- 李云川, 陈永宽, 李聪, 等. 痼囊腔菌素 A 对人体 Hce-8693 盲肠癌细胞作用的体外研究. *云南大学学报(自然科学版)*, 2004, 26(3A): 105~107
- 宋建新, 台虹, 李聪, 等. Bcl-2, Bax 在痼囊腔菌素 A 诱导人盲肠癌细胞凋亡中研究. *云南大学学报(自然科学版)*, 2004, 26(3A): 115~118
- Chen Y K, Li C, Tai H, et al. Photochemistry of amino substituted elsinochrome A: ESR study on the photogeneration of active radical species. *Chin J Magn Reson*, 2003, 20(2): 167~172
- Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence spectroscopy*. New York: Kluwer Academic/ Plenum, Publishers, 1999
- Diwu Z J, Lown J W. Photosensitization with anticancer agents. 12. Perylene quinonoid pigments, a novel type of singlet oxygen sensitizer. *J Photochem Photobiol A Chem*, 1992, 64: 273~287[DOI]
- Hu Y Z, An J Y, Qin L, et al. Studies of the triplet state properties of hypocrellin A by nanosecond flash photolysis. *J Photochem Photobiol A Chem*, 1994, 78: 247~251[DOI]
- Foote C S. Reactive oxygen species in chemistry. In: Quintanilha A ed. *Biology and Medicine*. New York: Plenum, 1988. 97~116

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/972005-1334>

(2005-08-24 收稿, 2005-12-06 接受)