

茜草色素光泽汀与 DNA 相互作用机理的研究

高颜, 李军生, 王倩倩, 李蔚伦, 黄国霞, 闫柳娟
(广西科技大学生物与化学工程学院, 广西柳州 545006)

摘要: 在 pH 7.41 的生理条件下, 以溴化乙锭 (EB) 作为光谱探针, 采用紫外可见光谱和荧光光谱等方法对茜草色素光泽汀 (Luc) 与 DNA 的相互作用机理做了初步探讨。同时还研究了光泽汀对 DNA 分子的热变性以及粘度影响。在碘化钾 (KI) 效应实验中, 以碘化钾作为荧光猝灭剂探讨光泽汀与 DNA 分子之间的相互作用方式。循环伏安法研究光泽汀在玻碳电极上的电化学规律, 根据循环伏安曲线及溴化乙锭对光泽汀与 DNA 作用的影响, 推断光泽汀与 DNA 主要作用方式为嵌插。结果显示: 光泽汀与 DNA 之间相互作用的结合比为 $n(\text{Luc}):n(\text{DNA})=2:1$, Luc-DNA 复合物的表现摩尔吸光系数 $\epsilon=8.12 \times 10^4 \text{ L}(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。在光泽汀存在的条件下, DNA 分子的热变性温度和粘度都会增加, 并且在碘化钾效应实验中可降低碘化钾的荧光猝灭效应, 同时 Luc 的电化学变化规律同 EB 相似。在本实验条件下, 光泽汀与 DNA 分子之间的相互作用方式存在嵌插。

关键词: 光泽汀; 光谱法; 循环伏安法; 嵌插; 机理

文章编号: 1673-9078(2014)12-43-47

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.12.008

A Mechanistic Study on the Interaction between DNA and Lucidin Using Madder Color

GAO Yan, LI Jun-sheng, WANG Qian-qian, LI Wei-lun, HUANG Guo-xia, YAN Liu-juan

(Department of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science Technology, Liuzhou, 545006, China)

Abstract: The mechanism of interaction between lucidin (Luc) and DNA at physiological pH (7.41) was investigated by ultraviolet-visible spectrum and fluorescence spectroscopy, using ethidium bromide (EB) as a probe. The effect of Luc on thermal denaturation and viscosity of DNA was also evaluated. In addition, the interaction between Luc and DNA was explored in a potassium iodide (KI)-mediated fluorescence quenching experiment. Luc was also subjected to electrochemical characterization on a glass carbon electrode, by cyclic voltammetry. Based on the curve obtained by cyclic voltammetry analysis, and the effect of EB on the interaction between Luc and DNA, the interaction was proposed to be mediated via intercalation. The binding ratio of Luc-DNA was determined to be 2:1, and the apparent molar absorption coefficient (ϵ) was determined to be $8.12 \times 10^4 \text{ L}(\text{mol} \cdot \text{cm})$. The presence of Luc increased the thermal denaturation temperature and viscosity of DNA molecules, attenuated the fluorescence quenching effect of KI, and resulted in the display of similar electrochemical properties as EB. Under the conditions used in the present study, Luc was observed to interact with DNA molecules via intercalation.

Key words: lucidin; spectroscopy; cyclic voltammetry; intercalation; mechanism

在印度茜草属植物是古老的民间药用植物, 它具有很多药理活性, 包括抗炎、抗癌、抗病毒等, 其药用价值在于其根部包含的蒽醌类物质。天然的蒽醌类物质通常还具有良好的着色能力, 被广泛用于食品、药品、化妆品、纺织品以及头发的染色^[1]。由于其具有一定的药理功效, 在日本一直以来作为天然食用色素被添加到火腿和香肠中, 1983年, 茜草提取物中的光泽汀首次被报道出具有损伤 DNA 的能力^[1]。

它可以诱导 DNA 单链解旋, 并对细菌和哺乳动物细胞具有诱变性^[2-3]。DNA 是遗传信息的载体, 在生理环境条件下它通常是某些小分子物质作用的主要靶点^[4]。而小分子物质与 DNA 相互作用方式大致可分为静电作用、沟槽结合和嵌插结合三种结合方式。早在 1961 年, Lerman 首次发现具有平面芳香结构的分子能够以嵌插方式与 DNA 结合, 并且这种模式已经被很多具有此类结构的分子所证实^[5]。1990 年, 有报道指出蒽醌类物质的遗传诱变性依赖于其具有的特定结构^[6]。光泽汀是具有平面刚性结构的蒽醌类物质, 它的大小与 DNA 碱基对之间的距离相近, 很容易嵌入到其中。由于食用色素可能成为人体长期并大量摄

收稿日期: 2014-05-27

基金项目: 广西自然科学基金 (2010GXNSFA013134)

作者简介: 高颜 (1990-), 女, 硕士, 研究方向: 分子生物学

通讯作者: 李军生 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 分子生物学

入的物质, 研究其潜在毒性对人们的生命安全具有重要的意义。而探讨小分子物质与 DNA 的相互作用机理通常需要借助某些有机染料作为荧光探针^[7]。二苯胺蓝、溴化乙锭、中性红和耐尔蓝等有机染料是探讨小分子物质与 DNA 结合方式时常用的荧光探针。本实验选用溴化乙锭作为荧光探针, 在 pH 7.41 条件下探究光泽汀与 DNA 的相互作用机理。如图 1 所示, 由于光泽汀的平面刚性结构, 从而具备独特的荧光性质和电化学性质, 因此本文选择光谱法和循环伏安法可以有效的研究光泽汀与 DNA 之间的相互作用。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

F320 荧光分光光度计, 天津港东科技发展股份有限公司; PHS-25CW 微型精密酸度计, 上海思龙科学仪器有限公司; Cary 60 紫外可见分光光度计, Agilent, 美国。

光泽汀, 上海复奇医药; 鲑鱼精 DNA, sigma 公司, 其纯度以 A260/A280>1.8 衡量, 浓度用 260 nm 处的吸光度来确定 ($\epsilon=6600 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$); 溴化乙锭, 北京拜尔迪生物技术有限公司; BR 缓冲溶液 (pH 7.41)。所用试剂皆为分析纯。实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 试验方法

1.2.1 紫外可见光谱法

在 1 cm 比色皿中, 加入 3 mL 一定浓度 Luc 溶液, 通过滴定的方法扫描电子吸收光谱及测定吸光度。每次滴加 10 μL , 因此可以忽略体积效应。

配制 Luc-DNA 和 DNA 溶液, 水浴加热, 从 30 $^{\circ}\text{C}$ 升温至 100 $^{\circ}\text{C}$, 每隔 5 $^{\circ}\text{C}$ 测定体系吸光度, 做 $A_0/A\sim t$ 图。

1.2.2 荧光光谱法

在 1 cm 比色皿中, 加入一定量 EB 溶液, 用 DNA 溶液滴定扫描荧光光谱, 再固定 DNA 溶液浓度, 滴加 EB 溶液扫描荧光光谱。

在 1 cm 比色皿中, 加入 3 mL EB-DNA 溶液, 用一定浓度 Luc 溶液滴定, 扫描荧光光谱。

1.2.3 循环伏安法

以 pH 7.41 BR 缓冲液为底液, 加入一定量 $1\times 10^{-3} \text{ mol/L}$ Luc 溶液, 用上述三电极系统, 改变扫速、底液及 pH 值, 分别测定相应的循环伏安曲线。仪器条件: 起始电位-0.6 V, 最高电位 1.0 V, 最低电位-0.6 V, 取样间隔 0.001 V, 静止时间 2 S。

在 4.5 mL pH7.41 BR 缓冲液中, 加入 0.5 mL $1\times 10^{-3} \text{ mol/L}$ Luc 溶液, 用上述三电极系统测定体系的循环伏安曲线; 然后加入不同量的鲑鱼精 DNA, 充分作用后测定相应的循环伏安曲线。仪器条件: 扫描速度 0.3 V/s, 起始电位-1.5 V, 最高电位 0.8 V, 最低电位-1.5 V, 取样间隔 0.001 V, 静止时间 2 S。

2 结果与讨论

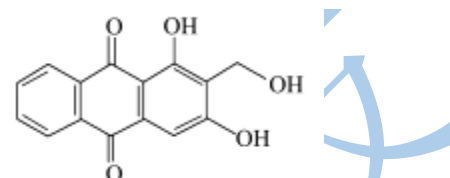


图 1 光泽汀的分子结构

Fig.1 Molecular structure of lucidin (Luc)

2.1 紫外可见光谱法

2.1.1 吸收光谱

Luc 与 Luc-DNA 在 pH 7.41 的 BR 缓冲溶液中的电子吸收光谱如图 2 所示, 在 Luc 中滴加 DNA 后 (由于在 Luc 的特征峰处 DNA 的电子吸收光谱呈一条直线, 因此未在图中表示出), Luc 的特征峰明显降低, 并且有微弱的红移, 这表明 Luc 与 DNA 之间发生了相互作用。

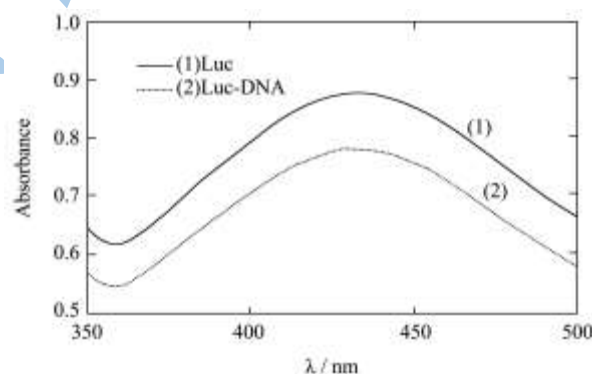


图 2 Luc 与 DNA 相互作用的吸收光谱

Fig.2 Absorption spectra of the interaction between Luc and DNA

注: $c(\text{DNA})=1.77\times 10^{-4} \text{ mol/L}$; $c(\text{Luc})=2\times 10^{-4} \text{ mol/L}$; pH=7.41; (1) Luc (2) Luc-DNA。

2.1.2 Luc 与 DNA 的结合比

在 pH 7.41 的 BR 缓冲溶液中, 固定 Luc 的浓度, 逐滴加入 DNA 溶液, 在 431 nm 处测定体系吸光度值。随着 DNA 浓度增加, 体系吸光度值呈下降趋势, 当 DNA 浓度达到 $1\times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 时, 体系吸光度变化趋于一致, 结果如图 3 所示, 这表明 Luc 与 DNA 形成了 $n(\text{Luc}):n(\text{DNA})=2:1$ 型复合物^[8]。根据 Beer 定律, 可

以知道 Luc-DNA 型复合物在溶液中的吸光度可以表示为 $A=εbc$ ，公式中 A 代表 Luc-DNA 型复合物的吸光度， $ε$ 代表 Luc-DNA 的摩尔吸光系数，c 代表 Luc-DNA 的浓度，b 为比色皿厚度。经计算可得 Luc-DNA 的表观摩尔吸光系数 $ε=8.12 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。

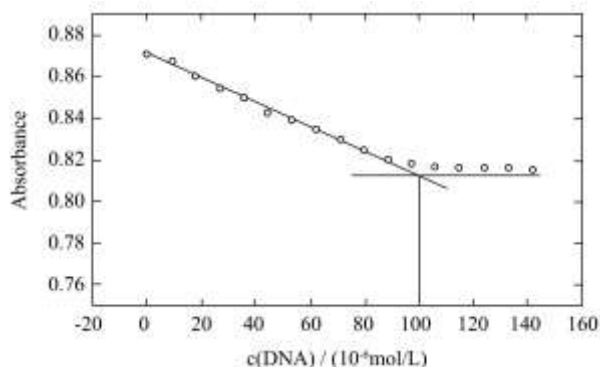


图 3 Luc-DNA 体系的摩尔比图

Fig.3 Molar ratio plot of the Luc-DNA system

注：c(Luc)= $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ；pH=7.41。

2.1.3 热变性研究

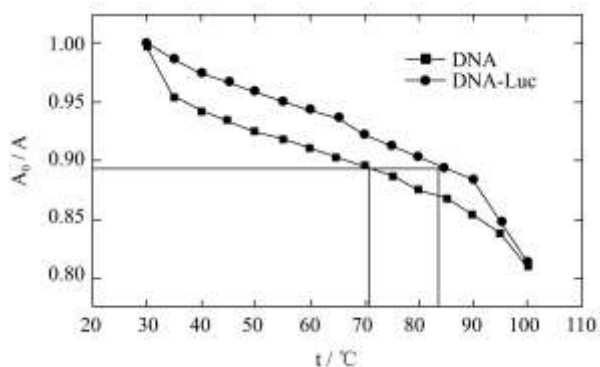


图 4 Luc 对 DNA 热变性曲线的影响

Fig.4 Effect of Luc on the thermal denaturation curve of DNA

注：c(Luc)= $1.25 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ；c(DNA)= $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。

配制一定浓度 DNA 和 Luc-DNA 溶液，水浴加热，温度从 30 °C 逐渐升至 100 °C。每隔 5 °C 测定体系吸光度值，作 $A_0/A \sim t$ 的热变性实验曲线求 T_m ，其中 T_m 被称为 DNA 的熔解温度，即可以使 DNA 的双螺旋结构解旋一半时的温度，它是衡量 DNA 分子稳定性的指标之一。由图 4 可以看出，DNA 与 Luc 结合后，热变性温度由 71 °C 升高至 83 °C，这就说明 Luc 与 DNA 之间存在嵌插作用，这种嵌插作用使 DNA 双螺旋结构的稳定性增加，熔解温度升高。

2.2 荧光光谱法

2.2.1 EB 与 DNA 的结合特性

如图 5 所示，单独的 DNA 样品溶液几乎没有荧光，同时单独的 EB ($6.67 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) 溶液荧光强度也很微弱，而当 DNA 加入到 EB 溶液时，溶液体系荧光

强度明显增强。基于此，选择 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ DNA 和 $6.67 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ EB 作为恒定体系探讨光泽汀与 DNA 之间的相互作用。

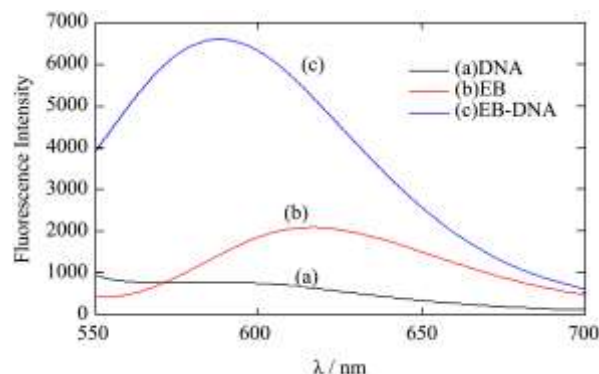


图 5 EB 与 DNA 结合特性

Fig.5 Characteristics of EB-DNA binding

Note: The concentration of DNA was $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, the concentration of EB was $6.67 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, respectively.

2.2.2 荧光光谱

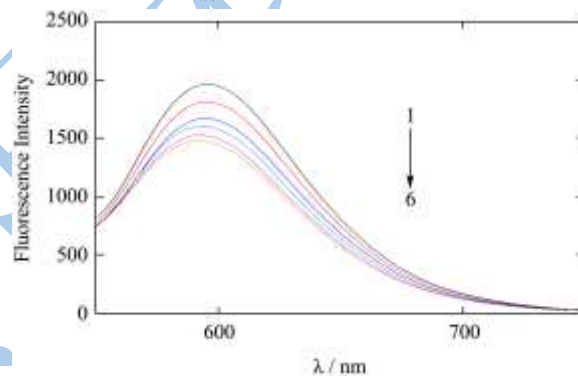


图 6 Luc 对 DNA-EB 体系荧光强度的影响

Fig.6 Effect of Luc on the fluorescence intensity of the DNA-EB complex

Note: c(EB)= $6.67 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, c(DNA)= $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; c(Luc)/(10^{-6} mol/L): curves 1-6: 0, 3.33, 9.99, 16.65, 23.31, 29.97.

EB 是一种典型的 DNA 嵌入剂，它可以嵌入到 DNA 分子中两个相邻的碱基对之间，因此 DNA 的加入会使 EB 荧光强度增强^[9]。EB 通常作为荧光探针探讨小分子物质与 DNA 的相互作用方式。向 EB 溶液中加入 Luc 溶液时，EB 荧光强度无明显变化，这说明 Luc 与 EB 之间无相互作用。而向 EB-DNA 体系中逐滴加入 Luc 时，EB-DNA 体系发生荧光猝灭，猝灭程度与 Luc 的加入量呈相关性（如图 6）。这说明 Luc 能够将 EB 从与 DNA 的结合位点上置换出来，即 Luc 可能与 DNA 发生嵌插作用。

2.2.3 KI 效应实验

碘化钾(KI)属于阴离子猝灭剂，当小分子物质与 DNA 发生嵌插作用时，碘离子(I⁻)会对 DNA 双螺旋结构中的碱基磷酸骨架产生排斥作用，这会减弱 KI 对

小分子物质的荧光猝灭作用(如图 7 插图(a)所示);相反,如果不含 DNA 的情况下, KI 与小分子物质(Luc)单独作用,会增加其荧光猝灭强度^[10](如图 7 插图(b)所示)。从图 7 中可以发现 KI 对 DNA-Luc 体系的荧光猝灭程度明显小于对 Luc 的荧光猝灭程度,进一步证明 Luc 与 DNA 以嵌插模式与 DNA 结合。

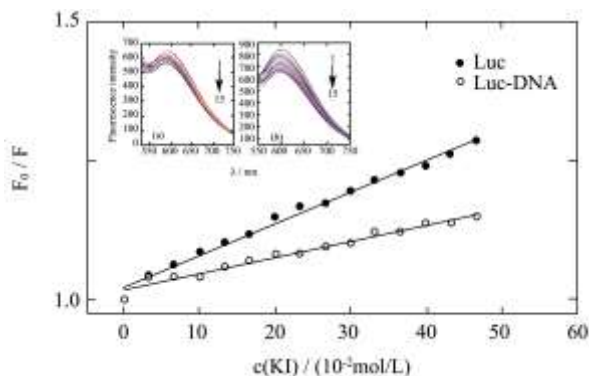


图 7 KI 对 Luc 及 Luc-DNA 荧光光谱的影响

Fig.7 Effect of KI on Luc and Luc-DNA complex fluorescence spectra

Note: $c(\text{Luc})=1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $c(\text{DNA})=2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $c(\text{KI})(1 \times 10^{-5} \text{ mol/L})=0, 3.33, 6.66, 9.99, 13.32, 16.65, 19.98, 23.31, 26.64, 29.97, 33.3, 36.63, 39.96, 43.29$ and 46.62 respectively.

2.3 Luc 对 DNA 粘度的影响

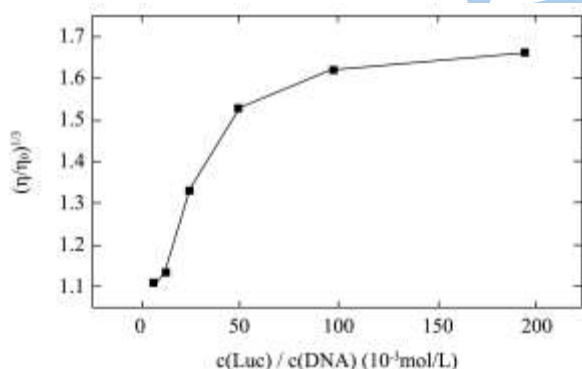


图 8 Luc 对 DNA 粘度影响

Fig.8 Effect of Luc on the relative viscosity of DNA

在研究小分子物质 Luc 与 DNA 之间的相互作用时,粘度法是判断其与 DNA 作用方式的主要手段之一^[11]。当小分子物质与 DNA 发生嵌插作用时会使 DNA 双螺旋结构伸长,进而使其粘度增加。如果小分子与 DNA 以静电吸附或沟槽键合的方式结合,则其对 DNA 粘度变化影响不明显。图 8 为 Luc 对 DNA 相对粘度的影响曲线。由图可以看出,随着 Luc 浓度的增加, DNA 粘度不断增大,因此可以证实 Luc 与 DNA 之间的作用方式存在嵌插。

2.4 循环伏安法

图 9 为光泽汀氧化峰电流 I_{pa} 对 $v^{1/2}$ 的关系曲线。可以看出,当扫数大于 0.05 V/s 时, I_{pa} 与 $v^{1/2}$ 呈线性关系,表明此时光泽汀的电化学反应主要受扩散控制^[12],而其他化学反应的影响较小。当扫数为 0.3 V/s 时,其峰高变化趋势较明显,因此我们选择 0.3 V/s 扫数下的循环伏安图谱进行分析。

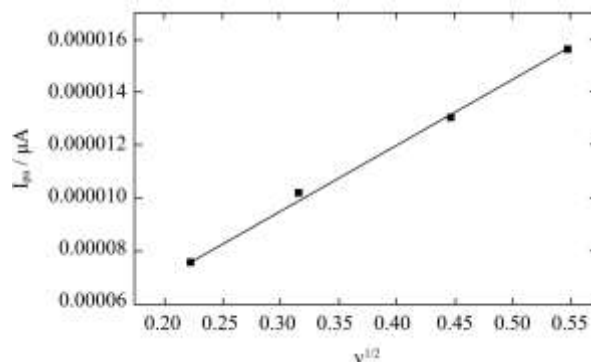


图 9 光泽汀氧化峰电流 I_{pa} 对 $v^{1/2}$ 的关系曲线

Fig.9 Relationship curve of oxidation peak current, I_{pa} , and $v^{1/2}$ of Lucidin

向 $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的 Luc 溶液中加入不同量 DNA 时,其循环伏安曲线如图 10 所示, Luc 氧化还原峰电流随加入 DNA 量的增加而逐渐降低,且没有新的氧化还原峰出现,这表明 Luc 与 DNA 相互作用时形成非电活性化合物或者由于生成物分子量增大,扩散系数变小^[13]。

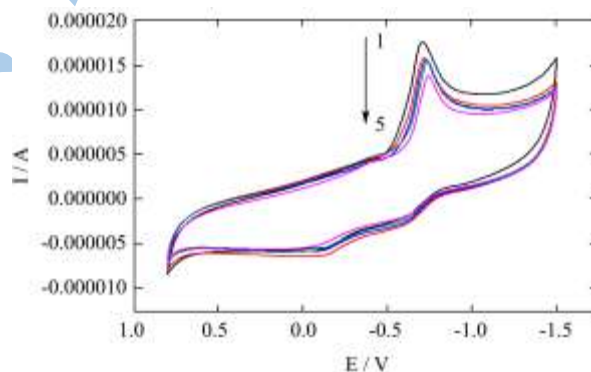


图 10 光泽汀与 DNA 伏安作用曲线

Fig.10 The cyclic voltammetric (CV) curve indicating interaction between Luc and DNA

注: $C_{\text{Luc}}=1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; $C_{\text{DNA}} 1-5 / (\text{mol/L}): 0; 6.12 \times 10^{-6}; 1.2 \times 10^{-5}; 2.353 \times 10^{-5}; 4.533 \times 10^{-5}$ 。

加入 EB 后体系的氧化还原峰发生偏移,但趋势依然清晰可见。如图 11 所示,加入 DNA 后, Luc 的氧化峰电流减小,随着 EB 的加入又有所增加。排除 EB 与 Luc 反应后,认为 EB 的加入能够占据部分与 Luc 作用的 DNA 作用位点,从而能够释放出一定量游离的 Luc,使得溶液中 Luc 的浓度有所增加,导致了峰电流增大。这说明 Luc 和 EB 与 DNA 可能具有相

同的作用方式, 而 EB 与 DNA 发生的是嵌插作用^[14], 进而证明 Luc 与 DNA 可能发生嵌插作用。

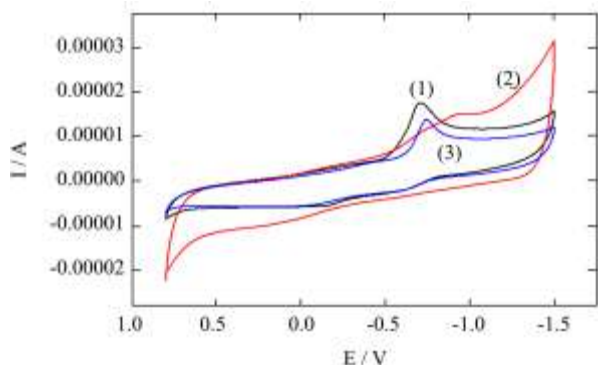


图 11 EB 对 Luc-DNA 体系循环伏安曲线的影响

Fig.11 Effect of EB on CV curves of the Luc-DNA system

注: 1. $\text{Luc}=1\times 10^{-4}$ mol/L; 2. $1+4.533\times 10^{-5}$ DNA+ 5.556×10^{-5} mol/L EB; 3. $1+4.533\times 10^{-5}$ DNA。

3 结论

运用多种试验方法对光泽汀与 DNA 的相互作用机理进行初步探讨。试验结果表明, 光泽汀与 DNA 相互作用的光谱性质与 EB 嵌入剂相似。在光泽汀存在条件下, DNA 分子的热变性温度及粘度都有所增加。这是光泽汀分子与 DNA 发生嵌插作用的重要物理参数反映。通过 KI 荧光猝灭实验也验证了光泽汀与 DNA 分子以嵌插方式进行结合。电化学试验证实光泽汀与 DNA 共存时循环伏安曲线类似溴化乙锭 (EB) 嵌入剂。由于茜草色素光泽汀与 DNA 之间存在嵌插作用, 因此可能存在危害人类身体健康的潜在毒性。而此类物质作为天然食用色素被人们大量使用, 这意味着我们更应该重视其食用的安全性。本文通过多种实验手段探究其致毒机制, 为这类物质在食品科学、食品化学、生物医学等领域的发展提供了一定的参考依据。

参考文献

[1] Yasui Y, Takeda N. Identification of a mutagenic substance, in *Rubia tinctorum* L. (madder) root, as lucidin [J]. Mutation Research, 1983, 121(3-4): 185-190

[2] Westendorf J, Pfau W, Schulte A. Carcinogenicity and DNA adduct formation observed in ACI rats after long-term treatment with madder root, *Rubia tinctorum* L. [J]. Carcinogenesis, 1998, 19(12): 2163-2168

[3] Westendorf J, Poginsky B, Marquardt H, et al. The genotoxicity of lucidin, a natural component of *Rubia tinctorum* L., and lucidinyethylether, a component of ethanolic *Rubia* extracts [J]. Cell Biology and Toxicology,

1988, 4(2): 225-239

[4] Gao E J, Wu Q, Wang C S, et al. Synthesis, interaction with double-helical DNA and biological activity of new Pt (II) and Pd (II) complexes with phenylglycine [J]. Journal of Coordination Chemistry, 2009, 62(21): 3425-3437

[5] Lerman L S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines [J]. Journal of Molecular Biology, 1961, 3(1): 18-30

[6] Westendorf J, Marquardt H, Poginsky B, et al. Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones [J]. Mutation Research, 1990, 240(1): 1-12

[7] Bi S Y, Qiao C Y, Song D Q, et al. Study of interactions of flavonoids with DNA using acridine orange as a fluorescence probe [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006, 119(1): 199-208

[8] Tysoe S A, Morgan R J, Baker A D, et al. Spectroscopic investigation of differential binding modes of Δ - and Λ -Ru(bpy)₂(ppz)₂²⁺ with calf Thymus DNA [J]. Journal of Physical Chemistry, 1993, 97(8): 1707-1711

[9] 陈秀英, 彭孝军. DNA 分子荧光探针[J]. 化学通报, 2004, 41(6): 43-47

CHEN Xiu-ying, PENG Xiao-jun. DNA fluorescence probes [J]. Chemistry Online, 2004, 41(6): 43-47

[10] Ma Y, Zhang G, Pan J. Spectroscopic studies of DNA interactions with food colorant indigo carmine with the use of ethidium bromides as a fluorescence probe [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(43): 10867-10875

[11] 周庆华, 杨频. 二(2-苯并咪唑亚甲基)胺合铜(II)配合物与 DNA 作用方式的光谱研究[J]. 化学学报, 2005, 63(1): 71-74

ZHOU Qing-hua, YANG Pin. Study on the binding mode of a Cu(II) complex with DNA [J]. Acta Chimica Sinica, 2005, 63(1): 71-74

[12] 牛淑妍, 张书圣, 马立波, 等. 茜素红 S 与脱氧核糖核酸相互作用的电化学研究[J]. 分析化学, 2004, 32(9): 1234-1236

NIU Shu-yan, ZHANG Shu-sheng, MA Li-bo, et al. Electrochemical studies on the interaction between alizarin red S and deoxyribonucleic acid [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2004, 32(9): 1234-1236

[13] Rodriguez M, Bard A J. Electrochemical studies of the interaction of metal chelates with DNA. 4. Voltammetric

and electrogenerated chemiluminescent studies of the interaction of Tris (2, 2'-bipyridine) osmium (II) with DNA [J]. Analytical Chemistry, 1990, 62(24): 2658-2662

[14] Lippard S J. Chemistry and molecular biology of platinum anticancer drugs [J]. Pure and Applied Chemistry, 1987, 59(6): 731-742

现代食品科技