

# 纳米 TiO<sub>2</sub> 载体 对竹红菌甲素光敏损伤 DNA 的增敏研究

王 薇<sup>1,2</sup> 周 林<sup>1</sup> 唐 静<sup>2</sup> 杨 超<sup>2</sup> 魏少华<sup>2</sup> 冯玉英<sup>1</sup> 周家宏<sup>1</sup>

(1. 南京师范大学分析测试中心, 江苏省生物功能材料重点实验室, 江苏 南京 210046)

(2. 南京师范大学化学与材料科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 采用溶胶-凝胶法制备竹红菌甲素/二氧化钛纳米粒. 结果表明, 竹红菌甲素被成功包裹于二氧化钛纳米粒内部. 与竹红菌甲素水溶液相比, 包裹后的样品紫外吸收峰红移至光疗窗口(600~900 nm), 并且在有氧条件下光敏损伤 CT-DNA 的能力增强.

[关键词] 竹红菌甲素 二氧化钛 光敏损伤 小牛胸腺 DNA

[中图分类号] O657.3 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2011)04-0060-04

## Photosensitization Studies of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles to Photocleavage Capacity of Hypocrellin A

Wang Wei<sup>1,2</sup> Zhou Lin<sup>1</sup> Tang Jing<sup>2</sup> Yang Chao<sup>2</sup> Wei Shaohua<sup>2</sup> Feng Yuying<sup>1</sup> Zhou Jiahong<sup>1</sup>

(1. Analysis & Testing Center, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(2. School of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

**Abstract:** Hypocrellin A molecules were successfully encapsulated in titanic nanoparticles by sol-gel method. On comparison with free hypocrellin A solution, encapsulated sample extended its absorption into longer wavelength, and showed superior photocleavage capability to calf thymus DNA.

**Key words:** Hypocrellin A, titanic nanoparticles, photocleavage, calf thymus DNA

竹红菌甲素(HA 图 1)是一种非卟啉类光敏剂,因其优良的长波长吸收能力以及较高的活性氧产率而受到广泛的关注<sup>[1,2]</sup>. 竹红菌素在 600~900 nm 的光疗窗口吸收很弱,这使得它在临床上的应用受到了极大的限制. 据文献报道,将竹红菌甲素吸附在纳米二氧化钛表面可以使 HA 的紫外吸收峰发生红移,并在光疗窗口内出现了新的吸收峰<sup>[3]</sup>. 因为二氧化钛具有较强的还原能力以及优良的电子传递能力,在光照条件下可以产生一系列活性氧物质<sup>[4,5]</sup>,对 HA 起到了增敏的作用. 然而,被吸附在纳米二氧化钛表面的 HA 处于亚稳定状态. 当周围条件(如 pH 和温度)发生改变时,HA 分子容易从二氧化钛表面解聚,使得体系的稳定性和光动力活性降低. 因此,研究稳定的二氧化钛/竹红菌甲素体系对其光动力性质的研究有着极其重要的意义.

本文采用溶胶-凝胶法制备竹红菌甲素/二氧化钛纳米粒,并将其与竹红菌甲素水溶液进行比较. 不同于吸附体系,包裹后的样品相对稳定,不会因为周围环境的改变而将被包裹的物质释放出来,但却允许活性氧物质通过纳米粒表面的孔道进行扩散<sup>[6]</sup>. 光谱研究表明,竹红菌甲素已成功包裹于二氧化钛纳米粒内部,主吸收峰红移至光疗窗口,且包

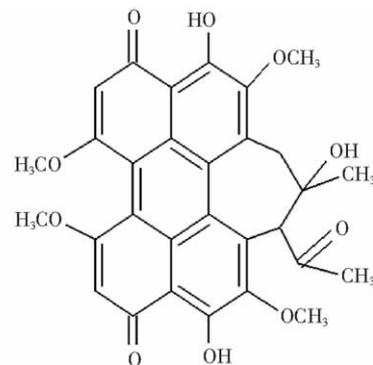


图 1 竹红菌甲素结构图

Fig.1 Structure of hypocrellin A

收稿日期: 2011-03-25.

基金项目: 国家自然科学基金(20603018).

通讯联系人: 周家宏, 博士后, 教授, 研究方向: 光化学与功能材料的研究. E-mail: zhoujiahong@njnu.edu.cn

裹后样品在有氧条件下对 CT DNA 的光敏损伤能力强于 HA 水溶液.

## 1 试验部分

### 1.1 试剂

小牛胸腺脱氧核糖核酸(CT DNA)和溴化乙啶(EB)购自 Sigma 公司; 钛酸四丁酯, 甲醇, 冰醋酸均为国产分析纯. 用二甲基亚砜(DMSO)溶剂溶解竹红菌甲素, 配置成 15 mmol/L 母液避光保存.

### 1.2 仪器

紫外光谱使用美国 Varian 公司 Cary5000 型的紫外-可见吸收光谱仪; 荧光光谱使用 Elmer 公司的 LS 50B 型荧光光谱仪.

### 1.3 二氧化钛包裹竹红菌甲素纳米粒的制备

取竹红菌甲素母液 12  $\mu\text{L}$ , 将其溶解于甲醇(15 mL)、冰醋酸(100  $\mu\text{L}$ )和钛酸四丁酯(200  $\mu\text{L}$ )的混合溶液中. 在避光搅拌的条件下, 向混合溶液中分次缓慢滴加二次蒸馏水. 滴加完成后继续避光搅拌, 然后静置陈化, 直至得到稳定的透明溶液. 真空泵旋转蒸发除去甲醇溶剂后, 加入二次蒸馏水, 得到稳定的竹红菌甲素/二氧化钛纳米体系(HATN). 此时竹红菌甲素的浓度为 9  $\mu\text{M}$ . 同样条件下, 取 12  $\mu\text{L}$  的 15 mmol/L 竹红菌甲素母液溶液于适量二次蒸馏水中, 得到等浓度的竹红菌甲素水溶液.

### 1.4 与 CT DNA 稳态作用检测

将 CT DNA 溶解在醋酸铵(10 mmol/L 醋酸铵, 100 mmol/L 氯化钠, pH = 7)的缓冲溶液中, 冰水浴搅拌过夜. 所得的 DNA 母液在 0 $^{\circ}\text{C}$  超声. 通过紫外光谱仪将其稀释成与 HA 同浓度的 DNA 溶液(9  $\mu\text{M}$ ), 逐量加入到 HA 水溶液和包裹样品中, 检测其紫外谱图变化.

### 1.5 CT DNA 光敏损伤检测

将 CT DNA 与 EB 按 1:1 的比例混合均匀检测荧光. 待荧光稳定后加入检测样品(包裹样品和水溶液样品), 待荧光稳定后, 光照样品并每隔 2 min 记录其荧光变化.

## 2 结果与讨论

### 2.1 HATN 纳米粒的光谱分析

如图 2 所示, HA 水溶液在 400 ~ 600 nm 范围内有 3 个吸收峰, 分别位于 471 nm、545 nm 和 589 nm. 当 HA 分子被包裹在二氧化钛纳米粒内部时, 仍可以观察到 3 个吸收峰, 但是峰位发生了不同程度的红移, 分别位移到 509 nm、567 nm 和 609 nm, 且摩尔消光系数增大. 这是因为被包裹后 HA 分子与 TiO<sub>2</sub> 二者之间通过氢键形成了某种络合物. 包裹后的样品在 619 nm 处出现新的吸收峰, 这使得竹红菌甲素的光响应范围扩展到了 600 ~ 900 nm 的光疗窗口, 能更有效地应用于光动力疗法.

荧光光谱试验(图 3)表明, HA 水溶液在 600 nm 处有一发射峰. 当 HA 分子被包裹在二氧化钛纳米粒内部后, 峰位发生红移, 该现象进一步验证了 HA 与 TiO<sub>2</sub> 之间形成络合. 此外, 包裹后样品的荧光强度明

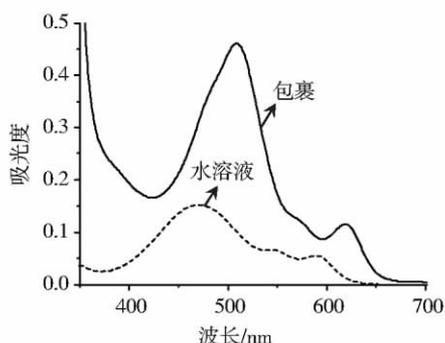


图 2 同浓度(9  $\mu\text{M}$ )的 HA 水溶液和 HATN 纳米粒水溶液的紫外吸收光谱

Fig.2 UV-vis absorption spectra of HA with the same concentration in the aqueous solution and encapsulated inside titanic nanoparticles

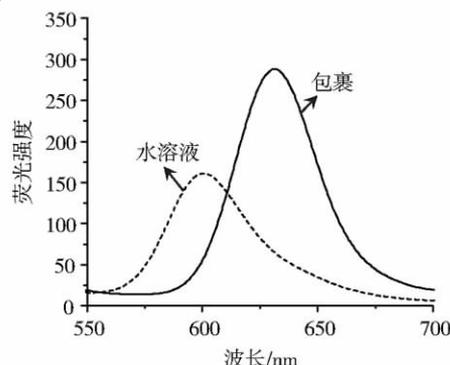


图 3 同浓度(9  $\mu\text{M}$ )的 HA 水溶液和 HATN 纳米粒水溶液的荧光发射光谱

Fig.3 Fluorescence emission spectra of HA with the same concentration in the aqueous solution and encapsulated inside titanic nanoparticles

显增强,这是因为水溶液中的 HA 分子容易被周围的水分子猝灭,使其荧光强度降低.而当 HA 分子被包裹在二氧化钛纳米粒的内部时,载体内部的疏水环境减少了水分子对它的影响,从而具有较强的荧光强度<sup>[7,8]</sup>.这有力地证明了 HA 分子已成功的包裹在了二氧化钛纳米粒内部.

### 2.2 与 CT DNA 的稳态相互作用

固定 HA 水溶液和 HATN 溶液的浓度不变,不断增加 CT DNA 的浓度,样品的紫外吸收强度显著降低(图 4).这说明 HA 水溶液和 HATN 溶液与 CT DNA 之间均存在较强的作用力.从图 4(C)中可以看出,相同浓度的 HA 水溶液与 HATN 溶液相比较,当加入相同浓度的 CT DNA 溶液后,它们的相互作用百分比分别为 18.18% 和 15.32%,HA 水溶液与 CT DNA 之间的作用力强于包裹样品.这是因为 HA 分子可以通过疏水作用力或氢键嵌入 CT DNA 的双螺旋结构中;而当 HA 分子被包裹在载体内部后, TiO<sub>2</sub> 阻挡了 HA 分子与 CT DNA 之间的直接接触.

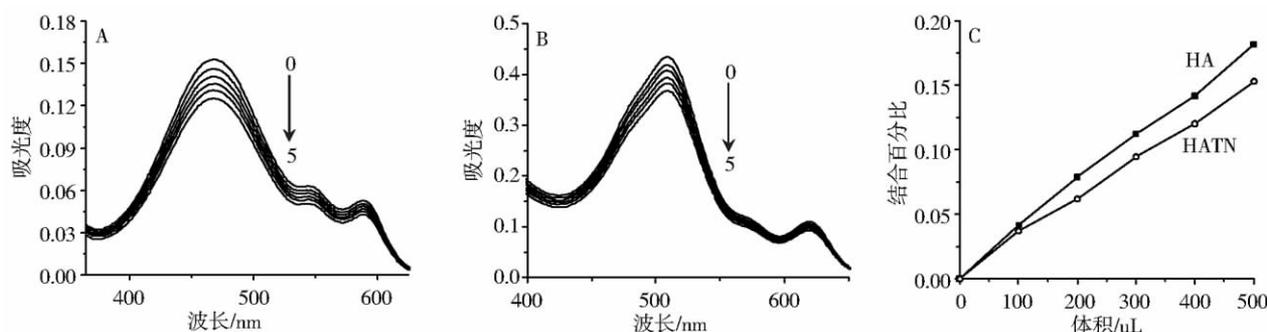


图 4 相同浓度(9 $\mu$ M)的(A)HA 和(B)HATN 与 CT DNA 稳态相互作用的紫外吸收光谱;(C)与 CT DNA 相互作用百分比图  
Fig4 UV-Vis absorption spectra of (A) HA and (B) HATN with increasing amount of CT DNA; (C) Binding percentage of HA and HATN with increasing amount of CT DNA

### 2.3 光敏损伤 CT DNA 能力

EB 分子是一种经典的 DNA 探针,它可以嵌插入 DNA 的双螺旋结构而使其荧光显著增强<sup>[9]</sup>.光敏剂光敏损伤 DNA 将导致 DNA 的双螺旋结构断裂或解旋,使得 EB 分子从嵌插于 DNA 的位点脱离,混合溶液的荧光强度降低.因此,通过检测 EB-CT DNA 混合溶液的荧光强度变化可定量地比较光敏剂对 DNA 的光敏损伤能力<sup>[10,11]</sup>.

从图 5(C)可以看出,在有氧条件下光照 10 min 后,HA 水溶液与包裹样品的 CT DNA 光敏损伤程度分别为 14.91% 和 15.72%.在有氧条件下包裹样品的光敏损伤能力强于 HA 水溶液.这是因为二氧化钛纳米粒本身在光照条件下能产生活性氧,对 HA 发挥了增敏效应,最终导致包裹后的样品对 DNA 的损伤能力强于 HA 水溶液.

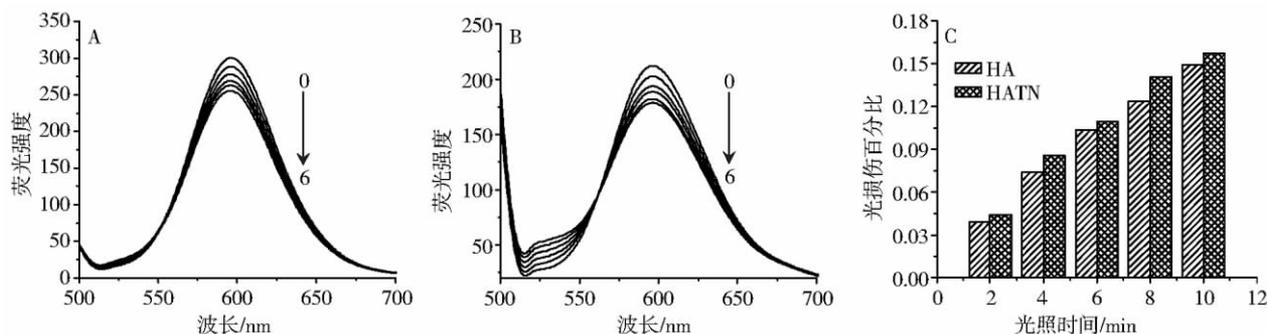


图 5 有氧条件下(A)HA 水溶液和(B)HATN 光敏损伤 CT DNA 相互作用的荧光发射光谱 0-6:光照 0 min,2 min,4 min,6 min,8 min,10 min;(C)光敏损伤百分比图

Fig5 Emission spectra of (A) HA and (B) HATN in the presence of EB-CT DNA systems with illumination from 0 min to 10 min; (C) photodegrade percentage of HA and HATN by photocleavage of ethidium bromide to the damaged CT DNA

### 3 结论

本文通过溶胶-凝胶法成功将竹红菌甲素分子包裹在二氧化钛纳米粒内部, 形成一个稳定的二氧化钛/竹红菌甲素复合体系. 实验结果表明, 包裹后样品的紫外吸收峰红移至光疗窗口, 并且有氧条件下对 CT DNA 的光敏损伤能力有所增强.

#### [参考文献]

- [1] Roy I, Ohulchanskyy T Y, Pudavar H E, et al. Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anti-cancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(26): 7860-7865.
- [2] Zhou J H, Zhou L, Dong C, et al. Preparation and photodynamic properties of water-soluble hypocrellin A-silica nanospheres [J]. *Mater Lett*, 2008, 62(17/18): 2910-2913.
- [3] Zhou Z Y, Qian S P, Yao S D, et al. Photo sensitization of a colloidal TiO<sub>2</sub> semiconductor system with hypocrellin B [J]. *Dyes Pigments*, 2001, 51: 137-144.
- [4] Xu S J, Shen J Q, Chen S, et al. Active oxygen species (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) generation in the system of TiO<sub>2</sub> colloid sensitized by hypocrellin B [J]. *J Photochem Photobio B*, 2002, 67(1): 64-70.
- [5] Kathiravan A, Renganathan R. Photoinduced interaction between colloidal TiO<sub>2</sub> nanoparticles and calf thymus-DNA [J]. *Polyhedron*, 2009, 28: 1374-1378.
- [6] Zhou Z X, Qian S P, Yao S D, et al. Electron transfer in colloidal TiO<sub>2</sub> semiconductors sensitized by hypocrellin A [J]. *Radiat Phys Chem*, 2002, 65(3): 241-248.
- [7] Zhou L, Dong C, Wei S H, et al. Water-soluble soft nano-colloid for drug delivery [J]. *Mater Lett*, 2009(63): 1683-1685.
- [8] Zhou L, Zhou J H, Dong C, et al. Water-soluble hypocrellin A nanoparticles as a photodynamic therapy delivery system [J]. *Dyes Pigments*, 2009, 82: 90-94.
- [9] 魏少华, 卢珊, 季春. p-HPcZn 与 CT DNA 相互作用 [J]. *应用化学*, 25(7): 763-767.
- [10] Zhou L, Liu J H, Wei S H, et al. DNA combining and photocleaving preoperties of photosensitizer-encapsulated silica nanoparticles [J]. *Monatsh*, 2009, 140: 1167-1170.
- [11] Xia S Q, Zhou J H, Chen J R, et al. A tyrosine-modified hypocrellin B with affinity for and photodamaging ability towards calf thymus DNA [J]. *Chem Comm*, 2003(23): 2900-2901.

[责任编辑: 顾晓天]