

新型竹红菌甲素与钒氧离子配合物的制备  
及光敏性质研究

杨 超<sup>1,2</sup>,马 菲<sup>3</sup>,唐 静<sup>1,2</sup>,韩丽娜<sup>1,2</sup>,魏少华<sup>2</sup>,周 林<sup>2</sup>,周家宏<sup>1,2</sup>,  
沈 健<sup>2</sup>,葛学峰<sup>1</sup>

(1. 南京师范大学分析测试中心,江苏 南京 210023)  
(2. 江苏省生物功能材料重点实验室,江苏 南京 210023)  
(3. 南京师范大学地理科学学院,江苏 南京 210023)

[摘要] 采用紫外-可见吸收光谱和荧光光谱系统研究了竹红菌甲素和钒氧离子之间的相互作用,实验结果表明,与竹红菌甲素相比,新型配合物的紫外光谱吸收峰红移且吸收峰强度增加,荧光强度降低,具有一定的光敏产生单线态氧及光敏损伤 CT DNA 的能力. 采用透射电镜对其粒径大小进行测定,结果表明纳米粒的平均粒径在 60 nm 左右,单分散性质良好. 因此,该配合物的形成将进一步推动竹红菌甲素在光动力疗法中的应用.  
[关键词] 竹红菌甲素-钒氧配合物,单线态氧,光敏损伤,CT DNA  
[中图分类号] O657 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2013)01-0064-04

Preparation of a New Hypocrellin A-vanadyl(VO<sup>2+</sup>-HA) Complex and  
Its Photosensitive Property Studies

Yang Chao<sup>1,2</sup>,Ma Fei<sup>3</sup>,Tang Jing<sup>1,2</sup>,Han Lina<sup>1,2</sup>,Wei Shaohua<sup>2</sup>,Zhou Lin<sup>2</sup>,Zhou Jiahong<sup>1,2</sup>,  
Shen Jian<sup>2</sup>,Ge Xuefeng<sup>1</sup>

(1. Analysis and Testing Center,Nanjing Normal University,Nanjing 210023,China)  
(2. Key Laboratory of Biofunctional Materials of Jiangsu Province,Nanjing 210023,China)  
(3. School of Geography Science,Nanjing Normal University,Nanjing 210023,China)

**Abstract:**The interaction between hypocrellin A (HA) and vanadyl (VO<sup>2+</sup>) was analyzed by UV-Vis and fluorescence spectra. The experiments results showed that HA and VO<sup>2+</sup> can form a stable complex in aqueous solution. The complex exhibited obvious red shift, decreased absorbance and fluorescence intensity. Also, it possessed the ability of produce singlet oxygen and photodamage CT DNA. Then, the TEM was used to obtain the grain diameter of the new complex. The particle with mid-diameter of 60 nm was clearly observed. So the synthesis of the complex can further promote the application of HA in photodynamic treatment.  
**Key words:** hypocrellin A-vanadyl complex, singlet oxgen, photodamage, CT DNA

竹红菌甲素(HA)是我国首次发现并应用于临床的新型光疗药物,因具有易纯化、化学修饰性好、光毒性高、抗肿瘤、杀灭病原菌、从正常组织排除速度快等优点而被公认为一种极有应用前景的光疗药物<sup>[1,2]</sup>. 但其水溶性差的问题限制了它在临床中的应用. 据文献报道<sup>[3,4]</sup>,与金属离子配位可以有效地改善HA的光敏性质.  
钒是生命与非生命体系中必需的一种微量元素,在生物体系中钒主要以+4 和+5 价态存在,它们易形成钒氧基(VO<sup>2+</sup>),VO<sup>2+</sup>可与 O、N、S 等配体形成稳定的配合物,研究发现钒化合物具有抗癌<sup>[5]</sup>、杀精<sup>[6]</sup>及抗炎作用<sup>[7]</sup>等. 因此,本文采用 HA 和 VO<sup>2+</sup>进行配位形成 VO<sup>2+</sup>-HA 配合物(图 1),并对其光谱性质及光敏

性质进行研究.

1 实验部分

1.1 试剂

HA 由中国科学院理化技术研究所制备,纯度在 96% 以上,使用前用丙酮重结晶后以 DMSO 配制成  $2\times 10^{-3}$  mol/L,母液避光保存. 硫酸氧钒 ( $\text{VOSO}_4\cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) 购自 Sterm Chemicals,使用前配制成  $2\times 10^{-3}$  mol/L 的母液. 9,10-二苯基蒽丙酸钠盐 (9,10-ADPA) 购自 Sigma 公司,配制成  $6.76\times 10^{-3}$  mol/L 的母液. CT DNA 购自 Sigma 公司,将一定量 CT DNA 加入到二次水中,4℃ 下搅拌 12 h,制得  $7.5\times 10^{-5}$  mol/L CT DNA 储备液. EB 购自 Fluka Biochemika,其浓度依据其消光系数 ( $\varepsilon_{480}=5\ 850$  L/(mol·cm)) 确定,配制成  $1.2\times 10^{-2}$  mol/L 的母液. 水为二次水. 实验均在室温、避光、有氧条件下进行.

1.2 仪器

紫外可见吸收光谱和荧光光谱实验分别采用 Varian 公司 Cary5000 型紫外可见光谱仪和 Perkin-Elmer 公司 LS-50B 型荧光光谱仪,透射电镜采用 HITACH H-7650 型电子显微镜,工作电压 120 kV.

1.3  $\text{VO}^{2+}$ -HA 配合物的制备

室温条件下,分别取 200  $\mu\text{L}$   $2\times 10^{-3}$  mol/L 的 HA 和 200  $\mu\text{L}$   $2\times 10^{-3}$  mol/L 的  $\text{VOSO}_4\cdot n\text{H}_2\text{O}$  储备液,在试管中混匀,避光条件下搅拌 10 min 即可.

1.4  $\text{VO}^{2+}$ -HA 配合物的理化性质研究

使用透射电镜研究纳米粒粒径及单分散性. 检测过程中对照品使用 DMSO 助溶的 HA 水溶液,并通过比较配位前后 HA 的紫外可见光谱(200 ~ 800 nm)及荧光光谱(激发波长为 470 nm)判断配位是否成功.

1.5 单线态氧量子产率的测定

每 3 mL 样品加入 50  $\mu\text{L}$   $6.76\times 10^{-3}$  mol/L 的单线态氧捕捉剂 ADPA,470 nm LED 光源条件下照射,每隔 5 min 检测一次紫外光谱,通过紫外光谱 379 nm 处(ADPA 特征峰)的变化规律,计算配位前后 ADPA 猝灭相关速率常数  $k$ .

1.6 光敏损伤 CT DNA

向 3 mL EB-CT DNA ( $[\text{EB}]=200\ \mu\text{M}$ ,  $[\text{DNA}]=75\ \mu\text{M}$ ) 的混合体系中加入  $\text{VO}^{2+}$ -HA,对照组为 3 mL EB-CT DNA 的混合体系中加入 HA,待其作用完全后,利用 470 nm LED 灯进行光照,每隔 5 min 检测一次样品的荧光强度.

2 结果与讨论

2.1 水相中形貌分析

从图 2 中可见 HA 和  $\text{VO}^{2+}$  进行配位形成的  $\text{VO}^{2+}$ -HA 配合物的粒径大约为 60 nm,单分散性良好. 图 2 显示颗粒近乎球形,主要是因为与  $\text{VO}^{2+}$  配位后,形成的  $\text{VO}^{2+}$ -HA 配合物长链结构具有不对称性,含有亲水性且易形成分子间氢键的—OH 基和疏水性的— $\text{OCH}_3$  基,在水相中,— $\text{OCH}_3$  基的疏水作用力及—OH 基间形成的分子间氢键会诱导  $\text{VO}^{2+}$ -HA 配合物长链状结构发生扭曲盘旋,最终在水相中形成纳米颗粒结构.

2.2 光谱性质研究

图 3 显示, $\text{VO}^{2+}$ -HA 与 DMSO 助溶的 HA 水溶液在 400 ~ 700 nm 范围内都有 3 个吸收峰.  $\text{VO}^{2+}$ -HA 在此范围内的吸收峰位于 489 nm、550 nm 及 595 nm 处,DMSO 助溶的 HA 水溶液在此范围内的吸

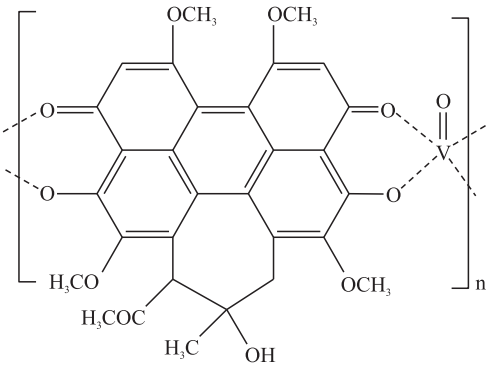


图 1  $\text{VO}^{2+}$ -HA 配合物结构图  
Fig. 1 Structure for  $\text{VO}^{2+}$ -HA complex

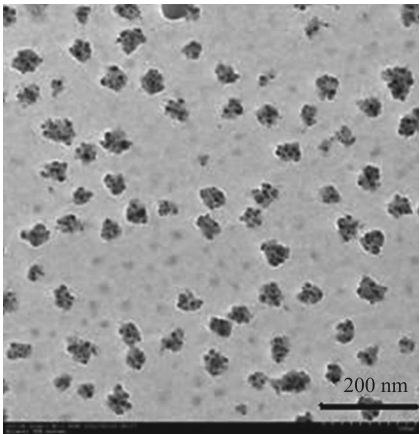


图 2  $\text{VO}^{2+}$ -HA 透射电镜图  
Fig. 2 TEM image of  $\text{VO}^{2+}$ -HA complex

收峰位于 470 nm、546 nm 和 591 nm 处。配位后峰位整体向长波长移动,吸光度有所上升。

从配位前后 HA 的荧光光谱(图 4)中可知,DMSO 助溶的 HA 水溶液在此范围内的荧光峰在 603 nm 处,峰强度为 226.62,VO<sup>2+</sup>-HA 中的 HA 在此范围内的荧光峰在 621 nm 处,峰强度为 39.6,配位后的荧光峰强度降低,且向长波长方向移动。由此我们可以断定,由于金属离子的络合,从而对 HA 的荧光强度产生了一定程度的猝灭,这种猝灭可能是由于在 HA 与 VO<sup>2+</sup>之间发生了能量或者电子转移造成的<sup>[8]</sup>。以上光谱性质表明了 HA 与 VO<sup>2+</sup>发生配位,形成了新的配合物。

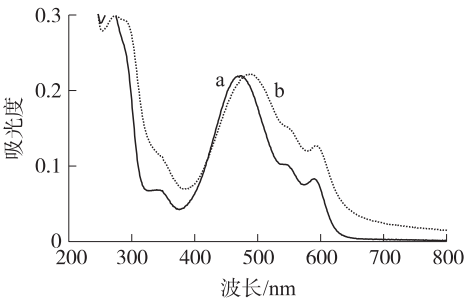


图 3 (a)DMSO 助溶的 HA 与(b)VO<sup>2+</sup>-HA 水溶液的紫外光谱比较

Fig.3 The comparison of absorption spectra of (a) HA/DMSO and (b) VO<sup>2+</sup>-HA complex in water

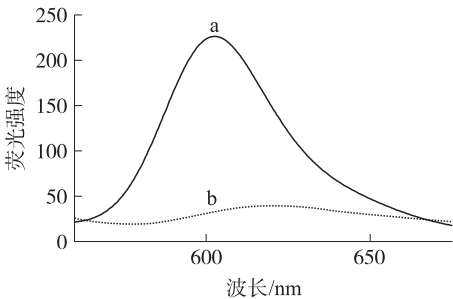


图 4 (a)DMSO 助溶的 HA 与(b)VO<sup>2+</sup>-HA 水溶液的荧光光谱比较

Fig.4 The comparison of fluorescence spectra of (a) HA/DMSO and (b) VO<sup>2+</sup>-HA complex in water

2.3 单线态氧检测

在光敏剂的研究中,单线态氧的检测尤为重要。图 5(a)和图 5(b)分别是光照 9,10-ADPA 和 HA

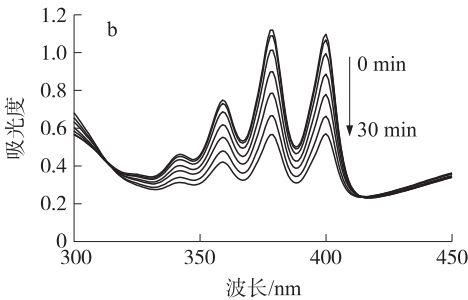
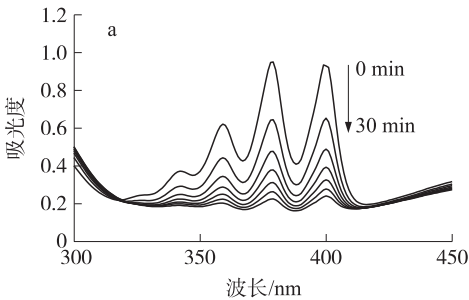


图 5 (a)DMSO 助溶的 HA 水溶液和(b)VO<sup>2+</sup>-HA 水溶液的单线态氧检测

Fig.5 The singlet oxygen detection of (a) HA/DMSO and (b) VO<sup>2+</sup>-HA complex in water

(图 5a)或者 VO<sup>2+</sup>-HA 配合物(图 5b)的有氧水溶液时 9,10-ADPA 的紫外可见吸收光谱。由图可见,随着光照时间的延长,ADPA 的特征峰逐渐降低,这是因为 ADPA 与单线态氧生成内过氧化物 ADPAO<sub>2</sub> 的原因<sup>[9,10]</sup>。通过图 6 我们可以计算出 DMSO 助溶的 HA 水溶液和 VO<sup>2+</sup>-HA 配合物产生单线态氧的相关速率常数分别为 4.65×10<sup>-2</sup>/min (R=0.96581) 和 2.23×10<sup>-2</sup>/min (R=0.95117)。

2.4 VO<sup>2+</sup>-HA 对 CT DNA 的光敏损伤作用

以 EB 为荧光探针研究了 VO<sup>2+</sup>-HA 对 CT DNA 的光敏损伤效率(图 7)。通过比较图 7 中的曲线 a 和曲线 b 可以看出,在有氧条件下,光照 30 min 后,DMSO 助溶的 HA 水溶液使 EB 在 CT DNA 中的结合位点降低 21.87%,而在同样的条件下,VO<sup>2+</sup>-HA 复合物使 EB 结合位点下降 11.91%,说明在有氧条件下 VO<sup>2+</sup>-HA 对 CT DNA 的光敏损伤能力低于 HA。

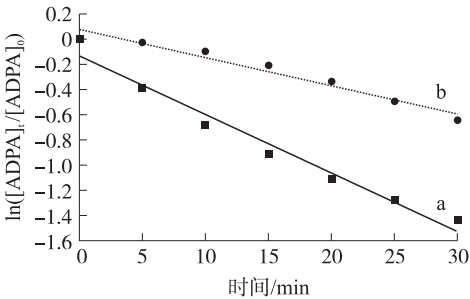


图 6 (a)DMSO 助溶的 HA 水溶液和(b)VO<sup>2+</sup>-HA 水溶液的单线态氧产生速率常数比较

Fig.6 Comparison of the singlet oxygen generation speed constant of (a) HA/DMSO and (b) VO<sup>2+</sup>-HA complex in water

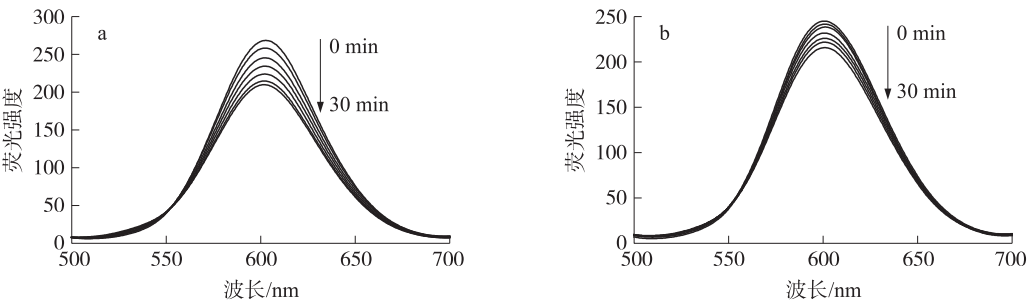


图 7 有氧条件下(a)HA 和(b)  $\text{VO}^{2+}$ -HA 对 CT DNA 的光敏损伤荧光发射光谱

Fig. 7 Photoinduced cleavage CT DNA by(a) HA and(b)  $\text{VO}^{2+}$ -HA with the aerobic treatment

3 结论

文中  $\text{VO}(\text{SO}_4)_2$  水溶液与 HA 反应形成了新型的  $\text{VO}^{2+}$ -HA 配合物. 与 DMSO 助溶的 HA 水溶液相比, 配合物的紫外吸收光谱发生了红移且吸光度有所增加, 荧光强度降低, 具有一定的产生单线态氧及光敏损伤 CT DNA 的能力. 虽然  $\text{VO}^{2+}$ -HA 配合物产生单线态氧及光敏损伤 CT DNA 的能力低于 DMSO 助溶的 HA 水溶液, 但  $\text{VO}^{2+}$ -HA 在水中的溶解性明显高于 HA<sup>[11]</sup>. 以上结果表明新型配合物  $\text{VO}^{2+}$ -HA 在光动力治疗领域中具有一定的应用潜能.

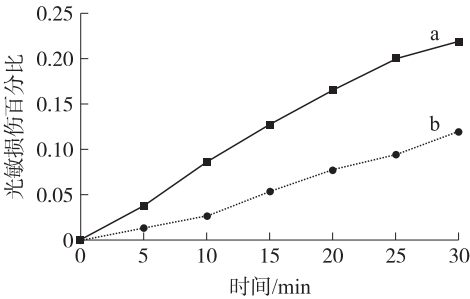


图 8 有氧条件下(a)HA 和(b)  $\text{VO}^{2+}$ -HA 对 CT DNA 的光敏损伤百分率比较

Fig. 8 Photosensitized cleavage percentage of CT DNA by(a) HA and(b)  $\text{VO}^{2+}$ -HA under the aerobic condition

[ 参考文献 ]

[1] 刘岩岩,王雪松,张宝文. 竹红菌素类光动力药物[J]. 化学进展,2008,20(9):1 345-1 352.

[2] 徐尚杰. 新型光动力药物-竹红菌甲素衍生物的研究与进展[J]. 科学通报,2003,48(10):1 005-1 015.

[3] Zeng Z H,Zhou J H,Zhang Y,et al. Photodynamic properties of hypocrellin A, complexes with rare earth trivalent ions;role of the excited state energies of the metal ions[J]. J Phys Chem B,2007,111(10):2 688-2 696.

[4] Zhou J H,Xia S Q,Chen J R,et al. The photodynamic property improvement of hypotectellin A by chelation with lanthanum ions [J]. Chem Comm,2003:1 372-1 373.

[5] Ghosh P,Dcruz O J,Narla R K,et al. Apoptosis-inducing vanadocene compounds against human testicular cancer[J]. Clin Cancer Res,2000,6(4):1 536-1 545.

[6] Evangelou A,Karkabounas S,Kalpouzos G,et al. Comparison of the therapeutic effects of two vanadium complexes administered at low dose on benzo pyrene-induced malignant tumors in rats[J]. Cancer Lett,1997,119(2):221-225.

[7] Krejsa C M,Nadler S G,Esselstyn J M,et al. Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. Redox independent activation of NF- $\kappa$ B[J]. J Biol Chem,1997,272(17):11 541-11 549.

[8] Sun Y,Zheng Y,Lei W H,et al. Oxovanadium(IV) based hypocrellin B complexes with enhanced photodynamic activity[J]. Dalton Trans,2012,41:651-657.

[9] Yan F,Kopelman R. The embedding ofmeta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin into silica nanoparticle platforms for photodynamic therapy and their singlet oxygen production and pH-dependent optical properties[J]. Photochem and Photobiol,2003,78(6):587-591.

[10] Tang W,Xu H,Kopelman R,et al. Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue-containing nanoparticle platforms[J]. Photochem and Photobiol,2005,81(2):242-249.

[11] Yang C,Ma F,Tang J,et al. Synthesis of vanadyl-hypocrellin A complex and its photodynamic properties research[J]. Bioorg Med Chem Lett,2012,22,5 003-5 007.