中 国 科 学
1989 年 4 月　　B 辑　　第 4 期

竹红菌甲素光敏作用原初反应的特征*

张志义　臧伦义　徐国瑞　陶能兵　王大辉
（中国科学院生物物理研究所，北京）

摘　要

为了从光生物方面判别竹红菌甲素（Hypocrellin A）的光敏作用，本文用电子自旋共振（ESR）、自旋捕捉和消自旋等方法，探讨了 HA 光敏作用原初反应的特征．不仅观测到它产生 $^1O_2$ 的作用，还首次观察到 O_2^-，·OH 和 HA^- 的产生，并且证实，活性氧产生可转变为非氧自由基生成．根据产生这些活性物质（瞬态产物）的原初反应特征，可能表明，竹红菌甲素对生物系统的光敏损伤机制，不只包括 $^1O_2$ 的作用，而且尚与 O_2^-，·OH 和非氧自由基的多重作用有关．

关键词： 竹红菌甲素，光敏作用，原初反应，瞬态产物，电子自旋共振

竹红菌甲素（Hypocrellin A，简称 HA），是从竹红菌（*Hypocrella bambusae sace*）中分离的主要光敏色素．它是一种新型苝醌衍生物，分子式为 $C_{30}H_{26}O_{10}$[1]．国内学者发现 HA 不仅是一种有效的光疗药物，还是一种优良的光氧化敏化剂[2]．

关于 HA 对生物系统的光敏作用机理，迄今，安静仪等证实，HA 有产生 $^1O_2$ 的作用[3]；郭绳试和程龙生等揭示，它对生物系统的作用"靶"主要是细胞膜，但是 $^1O_2$ 可能不是唯一的作用形式[4,5]．这提示，HA 对生物系统的光敏损伤，不是单一 $^1O_2$ 的作用，而可能还有其他形式的作用．

为弄清这一问题，本文用近代 ESR 技术测定对光敏损伤起关键作用的 $^1O_2$，O_2^-，·OH 及其他自由基等，探明 HA 光敏作用原初反应的特征，并由这些特征，提出 HA 光敏损伤机理．

一、材料和方法

1. 主要试剂　竹红菌甲素由云南省微生物所精制提供．2，2，6，6-四甲基哌啶，A. R. 级，联邦德国 Merk 化学公司产．2，2，6，6-四甲基哌啶-N-氧基和自旋捕捉剂 DMPO 均为美国 Aldrich 化学公司产品．叠氮钠和超氧化物歧化酶为美国 Sigma 化学公司产品，其他均为国产分析纯试剂．

2. 光照条件　选用的可见光光源为卤钨灯．用特制的水冷滤光装置，滤掉紫外线和红

本文 1987 年 11 月 11 日收到，1988 年 9 月 17 日收到修改稿．
* 国家自然科学基金资助项目．

外线,再经透镜聚焦,照射到装入石英毛细管中的样品上,光强为 1.8kW,用 BTY-820 型光辐射仪测定,光照时间用特制的附加装置控制.

3. 实验方法

(1) $^1O_2$ 的测定 用 Lion 等提出的 ESR 方法[6],并加适当改进.

(2) $O_2^{\cdot-}$ 的观测 用自旋捕捉方法[7],以 DMPO 捕捉 $O_2^{\cdot-}$,通过测定 DMPO-$O_2^{\cdot-}$ 自旋加合物的 ESR 参数,推断 HA 光敏作用原初过程产生的 $O_2^{\cdot-}$.

(3) ·OH 的检测 选用以 DMPO 为捕捉剂的自旋捕捉方法和 ESR 技术,通过检测 DMPO-$\dot{O}$H 自旋加合物而确定 ·OH 的存在.

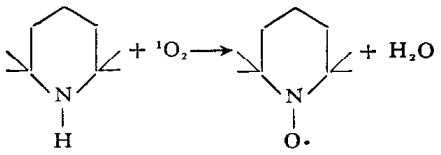
(4) $HA^{\cdot-}$ 的探测 参照 Moan 的方法[8]. 依据 $HA^{\cdot-}$ 同稳定氮氧自由基反应,消除其自旋的 ESR 测定,确定 $HA^{\cdot-}$ 的产生.

4. ESR 测定 装入石英毛细管中的试样,在美国出品的 Uarian E-109 波谱仪 (X 波段,微波频率≈9160MHz, 调制频率 100kHz) 上,在 20±2℃ 时进行测定. 调制幅度视不同对象而异,一般范围为 0.2—2 × 10^{-4}T; 微波功率不大于 10mW 以避免饱和;记录的波谱为微波吸收曲线对磁场强度的一次微分曲线.

二、结果和分析

1. HA 产生活性氧 ($^1O_2$, $O_2^{\cdot-}$ 和 ·OH) 的作用

(1) 单线态氧 为了证实 HA 光敏作用原初过程产生 $^1O_2$ 的作用,本文选用了与以往常规方法[3]不同的测定 $^1O_2$ 的 Lion 等提出的 ESR 方法[6]. 以往的常规方法费时、灵敏度低、专一性差,而 Lion ESR 法的优点是简便、灵敏度高、专一性强,该法的原理可以通过以下反应式表示:



由反应式可知,通过 ESR 测定由 2, 2, 6, 6-四甲基哌啶与 $^1O_2$ 反应产生的稳定氮氧自由基 2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-N-氧基,便可确定 HA 是否产生了 $^1O_2$.

1) 缺氧实验 当在充氮除氧的乙醇溶液 (HA 1.0 × 10^{-5}mol/L, 2, 2, 6, 6-四甲基哌啶 5.8 × 10^{-2}mol/L) 中试验时,通过 ESR 测定,没有观察到新产生的 2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-N-氧基的 ESR 信号,换言之,在缺氧条件下,虽经光照,也不产生 $^1O_2$.

2) 空气饱和溶液 在上端开口的石英毛细管中进行光照试验,结果观察到新产生的 2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-N-氧基的三重谱线 ESR 信号,并且该信号随光照时间增强.

为了证实产生的 ESR 信号是 2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-N-氧基自由基,将它的 ESR 参数 g 因子,线宽 ΔH, 分裂常数 a_N 与对照样品相比较(见表 1),两者的 ESR 参数是一致的,这表明 HA 光敏反应原初过程产生了 $^1O_2$.

3) 光敏剂对比实验 为了进一步证实 HA 产生 $^1O_2$ 的作用,在完全相同条件下,对几种光敏剂进行光照对比实验.

结果(图 1)表明,不加入光敏剂,即使光照也不产生新的稳定氮氧自由基的 ESR 信号,即

不产生 $^1O_2$。因已知亚甲基蓝和荧光素有产生 $^1O_2$ 的作用，故获悉 HA 也有产生 $^1O_2$ 的作用，不过在同等条件下，HA 具有更优良的特性，一是产额高，二是没观察到通过 $^1O_2$ 产生的自敏氧化作用。

表 1　在含 HA 和 2，2，6，6-四甲基哌啶的乙醇溶液中光照产生的氮氧自由基和对照的 2，2，6，6-四甲基哌啶-N-氧基的 ESR 参数

自由基	g	a_H ($\times10^{-4}$T)	a_N ($\times10^{-4}$T)
光照产生的氮氧自由基	2.0056±0.0003	1.33±0.05	16.17±0.05
对照的氮氧自由基	2.0056±0.0003	1.34±0.05	16.23±0.05

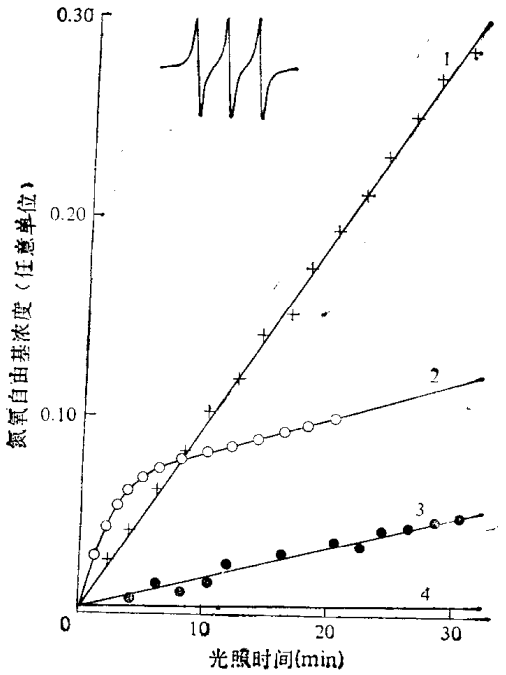


图 1　氮氧自由基浓度和光照时间的关系

(1——竹红菌甲素 (HA)，2——亚甲基蓝 (MB)，3——荧光素 (Fluorescein)，在空气饱和乙醇溶液中，三种光敏剂的浓度均为 1.0×10^{-5}mol/L；2，2，6，6-四甲基哌啶浓度 5.8×10^{-2}mol/L，4——无光敏剂)

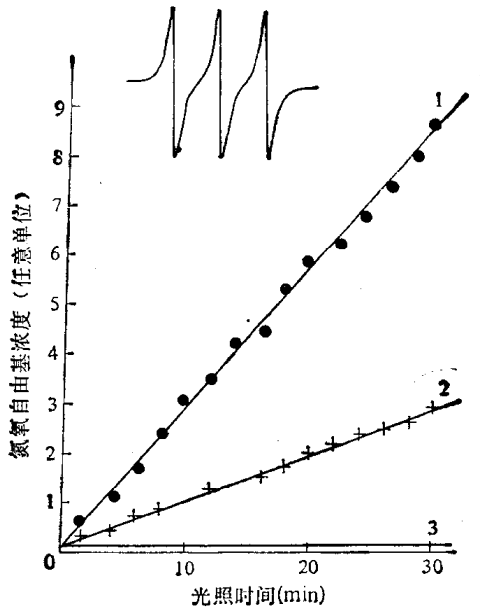


图 2　在氘化乙醇和叠氮存在时，氮氧自由基浓度随光照时间的变化

(HA 浓度 1.0×10^{-5}mol/L；2，2，6，6-四甲基哌啶浓度 5.8×10^{-2}mol/L，1——CH_3CH_2OD，2——CH_3CH_2OH，3——$CH_3CH_2OH + NaN_3$(4.0×10^{-2}mol/L)

4）消除和增强 ESR 信号试验　为了进一步证实 HA 产生 $^1O_2$ 的作用，又做了加入叠氮钠的试验，其结果是消除了新产生的稳定氮氧自由基的 ESR 信号；在氘化乙醇溶剂中，观察到该 ESR 信号大大增强(图 2)。由于叠氮钠是 $^1O_2$ 的消除剂，而在氘化试剂中 $^1O_2$ 的寿命延长，故两个试验都验证了 HA 产生 $^1O_2$ 的作用。

(2) 超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$)　本文利用比 SOD 方法更灵敏的自旋捕捉技术，测定 HA 光敏作用原初过程产生的 $O_2^{\cdot-}$。通过测定生成的 DMPO-$O_2^{\cdot-}$ 自旋加合物的 ESR 参数 g 因子和超精细结构推断出 $O_2^{\cdot-}$。试验在各种有机溶剂中进行，HA 浓度为 1.0×10^{-5}mol/L，DMPO

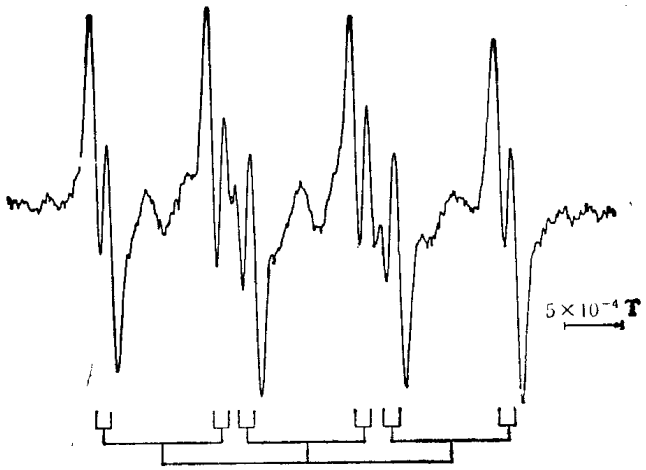


图3 在二甲基亚砜中 DMPO-$O_2^{\cdot-}$ 自旋加合物的 ESR 波谱

表2 在不同有机溶剂中 DMPO-$O_2^{\cdot-}$ 自旋加合物的 ESR 参数

溶 剂	Z* (kcal/mol)	g	a_N ($\times10^{-4}$T)	$a_{H\beta}$ ($\times10^{-4}$T)
甲醇	83.6	2.0060	13.5	10.5
乙醇	79.6	2.0058	13.3	10.3
丙酮	71.3	2.0058	13.0	9.2
二甲基亚砜	71.1	2.0057	12.9	10.3
苯	68.5	2.0058	12.7	6.9

* Z: Koswer Z value.

浓度 0.1mol/L。

图3示出在二甲基亚砜中光照获得的该自旋加合物的典型 ESR 谱，它的超精细结构展现出 3 × 2 × 2 重谱线，初始三重分裂来自 ^{14}N 核，而次级二重分裂分别来自一个 β 质子和一个 γ 质子，其中 γ 质子是捕捉后附加的。通过热衰变实验，求得 DMPO-$O_2^{\cdot-}$ 半寿命为 40min。

在甲醇、乙醇、苯等溶液中光照，也获得与在 DMSO 中相类似的 DMPO-$O_2^{\cdot-}$ 的 ESR 谱。

由表2可知，尽管溶剂不同，但自旋加合物的 g 因子都是相同的，这表明它们都同源于 DMPO-$O_2^{\cdot-}$ 自旋加合物，换言之，以 DMPO 捕捉的都是 $O_2^{\cdot-}$。至于其超精细分裂常数大小的差异，则是由于溶剂极性不同，即溶剂效应引起的。

因 SOD 可消除 $O_2^{\cdot-}$ ($2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$)，故在 DMSO 中加入一定量的 SOD 后，结果消除了 DMPO-$O_2^{\cdot-}$ 自旋加合物的 ESR 信号，从而更加证实了 HA 光敏作用原初过程产生了 $O_2^{\cdot-}$。

(3) 羟基自由基 (·OH) 前面的实验已证明 HA 光敏作用原初过程产生 $^1O_2$ 和 $O_2^{\cdot-}$ 的作用，本实验是检测 $^1O_2$ 和 $O_2^{\cdot-}$ 可能演化生成的 ·OH[9,10]。

首先进行对照实验，以 DMPO 捕捉由 Fenton 反应[10]产生的 ·OH，测定 DMPO-OH 自旋加合物的 ESR 参数。实验体系为乙腈溶剂，并加入少量水，体积比为 7:1，不加入 HA，而加入 10μl 30%的 H_2O_2，硫酸亚铁胺浓度为 2.5×10^{-4}mol/L，DMPO 浓度为 0.04mol/L。测得的 DMPO-$\dot{O}$H 自旋加合物的 g 因子，分裂常数 a_N 和 a_H^β 列于表3。

而后，在不加 H_2O_2 和硫酸亚铁胺，而加入 HA(1.0×10^{-2}mol/L) 的同样实验体系，经光照观察 HA 光敏作用原初过程产生的 ·OH。结果其 DMPO 自旋加合物的 ESR 参数与对照的完全一致（表 3）。这表明，在 HA 光敏作用原初过程中产生了 ·OH。

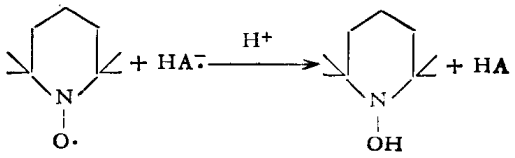
表 3　Feton 反应(对照)和 HA 光敏作用(实验)生成的 DMPO-OH 自旋加合物的 ESR 参数

自旋加合物 (DMPO-OH)	g	a_N ($\times 10^{-4}$T)	a_H ($\times 10^{-4}$T)
对照	2.0053	14.0	14.0
实验	2.0054	13.9	13.9

光照前，在上述实验体系中加入 ·OH 消除剂甲酸钠 (0.01mol/L)，表征 DMPO-OH 自旋加合物的 1:2:2:1 四重 ESR 谱线完全消失，这进一步证实了 HA 光敏作用原初过程产生 ·OH 的作用。

2. HA 产生 HA^- 阴离子自由基的作用

为了证实在缺氧条件下 HA 产生 HA^- 的作用，选用消自旋的 ESR 方法，其反应式为：



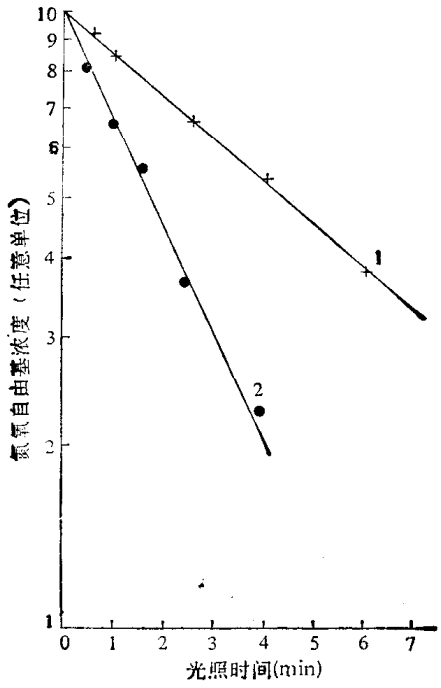


图 4　在缺氧的 HA(1.0×10^{-3}mol/L) DMSO 溶液中光照时，2，2，6，6-四甲基哌啶-N-氧基氮氧自由基（起始浓度 2.6×10^{-3}mol/L）的衰减

（1——未加还原剂，2——加入邻苯二酚 (1.0×10^{-2}mol/L)）

试验在缺氧(通 N_2) 的 DMSO 溶液中进行，HA 1.0×10^{-3}mol/L，2，2，6，6-四甲基哌啶-N-氧基 2.6×10^{-3} mol/L，邻苯二酚 1.0×10^{-2}mol/L，一种试验加入还原剂，另一种不加入还原剂，两种试验如不加入 HA，则都没有观察到消自旋现象.

由图 4 可见，随着光照时间的增长，稳定氮氧自由基的浓度减少，并呈指数衰减，加入还原剂则衰减更快. 这意味着产生 $HA^{\cdot}$ 的量随光照时间而增加，加入还原剂，由于提供了更多的电子，故 $HA^{\cdot}$ 产额增加，消自旋更多.

以上结果揭示，HA 光敏作用原初过程，在缺氧条件下确实产生了 $HA^{\cdot}$.

3. 由活性氧向非氧自由基机制的转变

本文利用前述的测定 $^1O_2$ 和观测 $HA^{\cdot}$ 相结合的方法，在同一个封闭式的试验样品体系(乙醇溶液，HA7.0×10^{-2}mol/L，2，2，6，6-四甲基哌啶 5.8×10^{-2}mol/L) 中，观测到HA光敏作用原初过程，活性氧产生转变为非氧自由基生成.

图 5 表明，随着光照时间，稳定氮氧自由基增加的直线上升部分，是 $^1O_2$ 产生和增加的过程，而氮氧自由基浓度衰减部分，是 $HA^{\cdot}$ 产生和增加的过程. 图中转折点则意味着 O_2 的耗尽，开始了转变过程.

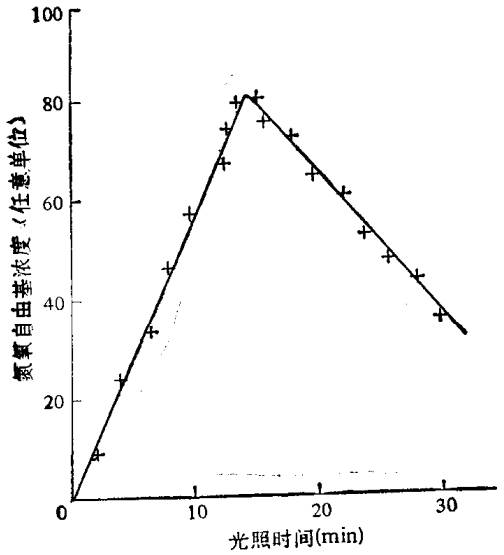


图 5 在密封的空气饱和乙醇溶液中，光照产生的氮氧自由基浓度由增加转变为衰减的变化过程

(HA 浓度 7.0×10^{-3}mol/L；2，2，6，6-四甲基哌啶浓度 5.8×10^{-2} mol/L)

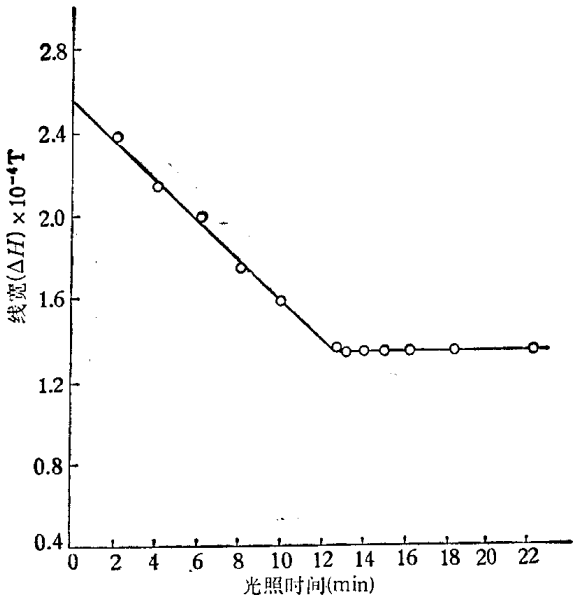


图 6 在密封的空气饱和乙醇溶液中，光照产生的氮氧自由基的 ESR 谱线宽 (ΔH)，随光照时间的变化

(HA 浓度为 7.0×10^{-3}mol/L；2，2，6，6-四甲基哌啶浓度为 5.8×10^{-2} mol/L)

转变的关键条件是体系中 O_2 的耗尽，因为只有 O_2 耗尽，$^1O_2$ 和 $O_2^{\cdot-}$ 的产生才有可能终止，$HA^{\cdot}$才能产生. 为了证实在光照大约 14min 时，O_2 是否耗尽，本文同时测定了产生的稳定氮氧自由基的 ESR 谱线宽度随光照时间的变化.

由图 6 可见，随着光照时间的增加，线宽 ΔH 逐渐减小，意指实验体系中的 O_2，由于 $^1O_2$ 及 $O_2^{\cdot-}$ 的增加而不断减少，当光照至大约 14min 时，ΔH 不再变化，表明 O_2 的耗尽，这恰巧与图 5 中的转折时间相吻合. 因而，这更加证实了由活性氧产生转变为非氧自由基的机制.

三、讨　论

竹红菌甲素（HA）属于4，9-二羟基苝-3，10-醌的衍生物[1]，作为光敏药物，它是第一个苝醌衍生物[11]．由于它的光敏特性优良，光疗皮肤顽症效果显著，所以引起国内外学者的很大兴趣，从各个方面，探讨它的光敏特性和作用机理，但是，就其光敏损伤机制而言，目前只查明，它的作用"靶"主要是细胞膜[4,5]，并且 $^1O_2$ 可能是其中的一种作用形式[3]．

本文从光生物学方面，为了阐明 HA 的光敏损伤机制，用 ESR 近代技术，探讨了 HA 光敏作用原初反应的特征．实验结果表明，HA 不仅有产生 $^1O_2$ 的作用，还具有产生 $O_2^{\cdot-}$，·OH 和非氧自由基 $HA^{\cdot-}$ 的作用，并且在一定条件下，还可从活性氧产生向非氧自由基生成转变．由 HA 光敏作用原初反应的特征判别，HA 的光敏损伤作用，并不是单一的 $^1O_2$ 作用机制，而是 $^1O_2$，$O_2^{\cdot-}$，·OH 和 $HA^{\cdot-}$ 等多重作用机制．

由于 $^1O_2$ 和 ·OH 是强氧化剂，它们在细胞膜损伤中可能起最重要的作用．另外，$O_2^{\cdot-}$ 可演变为 ·OH，并能产生电子转移光氧化，所以也可能是重要的损伤因素．

在 ESR 测定中，曾得到何润根、卢景芬、呼俊改同志的协助，深致谢意．

参　考　文　献

[1] 万象义等，科学通报，**25**(1980)，24：1148．
[2] 安静仪等，科学通报，**30**(1985)，18：1397．
[3] 安静仪等，中国科学 B 辑，1985，11：975．
[4] 程龙生等，实验生物学报，**18**(1985)，1：89．
[5] 郭绳武等，生物物理学报，**3**(1987)，1：69．
[6] Lion, Y. et al., *Nature*, **263** (1976), 442.
[7] JohnR. Harbour & Mcchael L. Hair, *The Journal of Physical Chemistry*, **82** (1978), 1397.
[8] Moan, J., *Acta Chemica Scandinavia* B, **34** (1980), 519.
[9] 赖根柱等，化学通报，1984，6：12—13．
[10] Lai Ching-San and Laurence, H. P., *Arch. Biochim. Biophys.*, **190** (1978), 1:27—38.
[11] Chen Wei-Shin et al., *Liebigs Ann. Chem.*, 1981, 1880.