

·学科进展·

抗肿瘤药物与 DNA 相互作用的热动力学规律

沈雪松*[†] 刘义* 赵儒铭* 周传佩* 屈松生*

(* 武汉大学化学学院, 武汉 430072; † 桂林医学院, 桂林 541001)

[摘要] 采用微量热方法, 从热动力学角度, 建立抗肿瘤药物与 DNA 作用的热动力学模型, 计算系列相关的热力学函数。归纳了抗肿瘤药物与 DNA 的作用类型及热动力学特征, 为探讨抗肿瘤药物与 DNA 的作用机制提供了重要信息。

[关键词] 抗肿瘤药物, DNA, 热力学, 热动力学

随着生命科学的飞速发展, 对于核酸三维结构的认识及其遗传信息的研究, 使人们得以从基因表达调控理论的角度, 认识肿瘤细胞的生理及病理特征, 设计和筛选抗肿瘤药物。肿瘤细胞在某种情况下, 表现出基因过度扩增, 蛋白堆积, 细胞无限增殖的无序状态。这种无序状态是由它的基因及其在分子水平上的有序性所决定的。癌基因表达基本上遵守中心法则: 即由 DNA 转录成 RNA, RNA 翻译成蛋白质, 受癌基因调控因子的调控, 而且所有蛋白酶及受体的生物合成都来自于 DNA、RNA 的编码和组装。以核酸为靶设计和筛选抗肿瘤药物, 在 RNA 复制, RNA 转录, 蛋白质翻译等各水平上对癌基因的表达进行阻断, 对肿瘤进行有效抑制。

DNA 是许多抗肿瘤药的靶分子, 抗肿瘤药物通过嵌入、沟槽等方式与肿瘤细胞的 DNA 结合。使肿瘤细胞 DNA 双螺旋链松弛, 分开或断裂, 改变 DNA 模板性质, 阻止形成 DNA 嘌呤与 DNA 依赖型 RNA 聚合酶。同时阻止了 DNA 和 RNA 的合成、复制和转录。因此, 抑制肿瘤细胞的分裂增生, 最终使肿瘤细胞增殖停滞, 或使肿瘤细胞向正常细胞分化, 或诱发肿瘤细胞发生编程性死亡, 从而产生抗肿瘤作用^[1]。

采用微量热方法, 通过高精度、微量化、自动化的量热计, 连续、准确地检测记录抗肿瘤药物与 DNA 生物靶分子之间相互作用过程的热效应变化, 研究过程的反应速率和程度, 同时获得热力学和动

力学信息, 建立热动力学模型, 从热动力学角度, 对抗肿瘤药物与 DNA 的作用机制给出科学合理的定性及定量解析。这些对于探索抗肿瘤药物的作用机理和筛选低毒高效的抗肿瘤药物, 并指导合理用药有重要的理论和应用价值。微量热法对肿瘤细胞生长代谢规律及抗肿瘤药物与 DNA 靶分子作用的研究, 已经成为这一领域关注的热点问题之一。

1 抗肿瘤药物与 DNA 相互作用的热动力学模型

抗肿瘤药物与 DNA 相互作用的微量热研究, 主要采用的量热手段, 有微型间歇反应器 (BR) 与热导式热量计的组合和活塞流反应器 (PFR) 与热导式热量计的组合两类。通过建立 BR 及 PFR 抗肿瘤药物与 DNA 结合的热动力学模型, 研究肿瘤药物与 DNA 结合的热动力学规律, 从而探索其作用机制。

实验研究发现, 无论是 BR 模式或 PFR 模式, 有些抗肿瘤药物与 DNA 的相互作用为快速反应。抗肿瘤药物在对细胞产生刺激数分钟至数十分钟, 即引起早期反应癌基因结构和表达水平的变化。在原癌基因家族中, 早期反应癌基因 (early response oncogenes) 是一类对药物、神经递质和激素等外界刺激引起的传入信息在数分钟内作出反应, 进行表达的基因, 它们通常包括 fos、jun、myc、myb 等基因, 存在于细胞核内。这类癌基因可编码特异的 DNA 结合蛋白, 它们是一些转录调控因子, 可调节多种基因的表

国家自然科学基金资助项目。
本文于 1999 年 5 月 7 日收到。

达,从而将外界信号与基因表达改变偶联起来。因此肿瘤细胞的增殖、分化和死亡与抗肿瘤药物引起早期反应癌基因的快速表达密切相关。当肿瘤细胞受到抗肿瘤药物作用后,激活信号转导通路,引起这类癌基因首先表达,并通过表达产物再参与调控其他基因的转录,表征抗肿瘤活性^[2]。

对于抗肿瘤药物与 DNA 的快速反应,可以在短时间内达到平衡状态,即设 B 为抗肿瘤药物的小分子化合物



则其表观结合常数为 K

$$K = \frac{nx c^\phi}{(1-x)(c_{A0} - nx c_{B0})} \quad (2)$$

式中 n 为 DNA 核酸上的结合位点数(即 1 分子 B 结合 DNA 的碱基对数); x 为 B 与 DNA 的结合率; c^φ 为标准摩尔浓度(c^φ = 1mol · L⁻¹); c_{A0}, c_{B0} 分别为 DNA 和抗肿瘤药物 B 的初始摩尔浓度

若确定了 K、n、x 的数值,根据下列热力学关系式,可分别求得 B 与 DNA 相互作用的摩尔结合 Gibbs 函数(ΔG_m)和摩尔结合熵(ΔS_m)

$$\Delta G_m = -RT \ln K \quad (3)$$

$$\Delta S_m = (\Delta H_m - \Delta G_m)/T \quad (4)$$

在上述(2)、(3)、(4)热力学关系式中, K、n、x、ΔH_m 均为待求的物理量。为了求解,根据微量热实验手段的差异,建立了如下 2 类热动力学模型:

1.1 BR 热动力学模型

根据热力学原理,对于 BR 检测系统,有

$$x = \Delta H_{ma} / \Delta H_m \quad (5)$$

式中 ΔH_{ma} 为 B 与 DNA 相互作用的表观结合焓; ΔH_m 为 B 与 DNA 作用的摩尔结合焓(亦称摩尔键合焓,即 1mol B 键合 n mol DNA 时的焓变); H_{ma} 可由下式计算:

$$\Delta H_{ma} = Q_\infty / (c_{B0} \cdot V) \quad (6)$$

式中 Q_∞ 为 B 与 DNA 相互作用的总热效应,可由实验测得。将(5)、(6)代入(2)式整理,有

$$K = \frac{c \Delta H_{ma} \Delta H_m}{(\Delta H_m - \Delta H_{ma})(c_{A0} \Delta H_m - n c_{B0} \Delta H_{ma})} \quad (7)$$

将 3 组不同的实验数据(c_{A0}, c_{B0}, ΔH_{ma})代入(7)式,以计算机 Mathcad 软件(版本 6.0),拟合 K、ΔH_m、n 值,尔后根据(3)、(4)式求得 ΔG_m 及 ΔS_m 值。

1.2 PFR 热动力学模型

根据热力学原理,对于 PFR 检测系统,有

$$x = P / (2F c_{B0} \Delta H_m) \quad (8)$$

式中 P 为 B 与 DNA 相互作用的真实输出热功率; F 为活塞流反应器中试样的流速。P 可由下式计算:

$$P = \mu(P_a - P_c) \quad (9)$$

式中 μ 为校正因子; P_a 为反应体系达到稳态后的表观输出热功率; P_c 为相同流速条件下对照实验实测输出热功率。将(8)、(9)式代入(2)式有:

$$K = \frac{2c \Delta H_m P}{(2F c_{B0} \Delta H_m - P)(2F c_{B0} \Delta H_m - n P)} \quad (10)$$

在(10)式中代入 3 组不同的实验数据(c_{A0}, c_{B0}, F, P)以计算机 Mathcad 软件(版本 6.0),拟合 K、ΔH_m、n 值后,再根据(3)、(4)式,求得 ΔG_m、ΔS_m 值^[3]。

2 抗肿瘤药物与 DNA 作用的机制和热力学参数

根据所建立的热动力学模型,通过对一系列抗肿瘤药物与 DNA 作用的微量热数据进行拟合解析,可以得到不同抗肿瘤药物与 DNA 相互作用的热力学参数。这些精确的热力学信息,说明抗肿瘤药物与 DNA 分子结合过程中,熵焓补偿效应是普遍存在的。熵和焓数据可以成为比结构参数和平衡参数更好的数学基础^[4],还能成为反应计量学和不同结合位点的可能历程提供重要的参考依据,对于抗肿瘤药物与 DNA 分子的反应机制和分子识别有重要作用。现将系列抗肿瘤药物与 DNA 作用的热力学参数列于表 1。

顺铂是一种使 DNA 链发生链内交联,抑制 DNA、RNA 和蛋白质合成的化疗药物,作为广谱抗肿瘤药物成功地用于临床。日本 Kagamoto 等应用流动微量热计和差示扫描热量计(DSC),研究了顺铂与 DNA 作用的热力学规律,得到相关的热力学参数^[5]。由表 1 中所列数据显示,顺铂与 DNA 作用时,有很大的表观结合常数。因为发生了共价相互作用,释放出很大的摩尔结合焓, DNA 的复制作用受到抑制。有文献认为,用顺铂处理肿瘤细胞(例如人恶性白血病细胞 HL-60、U937、KG-1 等),能引起早期反应癌基因 C-jun 基因表达增加,可能通过蛋白激酶 C(PKC)依赖的通路来介导,抑制 DNA 或蛋白质合成有关酶的活性,或在 DNA 或蛋白质合成过程中掺入其中,使之合成无功能的 DNA 或蛋白质而抑制肿瘤细胞的生长^[6]。热动力学研究结果与文献报道是十分吻合的。

阿霉素(Adriamycin, ADM)、博来霉素(Bleomycin, BLM)、道诺霉素(Dunomycin)等,是一类品种繁多在临床上广泛使用的抗肿瘤抗生素药物。

表1 抗肿瘤药物与DNA作用的热力学参数

体系	k dm ³ ·mol ⁻¹	ΔG kJ·mol ⁻¹	ΔH kJ·mol ⁻¹	ΔS J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹	n
Cisplatin + DNA	2.2 × 10 ⁴	-25	7.6	110	0.6
BLM + dsDNA	2.58 × 10 ⁵	-26.2	-11	47.6	5.38
ADM + dsDNA	1.14 × 10 ⁵	-30	-46	-52	5.26
ADM + DNA(GC42%)	1.4 × 10 ⁶	-35	-11	80	0.21
ADM + poly(A)poly(U)	1.3 × 10 ³	-29	-3.4	86	1.0
ADM + poly(I)poly(C)	4.9 × 10 ⁴	-27	-1.4	86	1.0
PF + DNA(GC42%)	8.0 × 10 ⁵	-34	-30	12	0.17
PF + poly(A)poly(U)	8.0 × 10 ⁵	-34	-32	6.7	0.25
PF + poly(I)poly(C)	2.0 × 10 ⁵	-31	-25	20	0.06
ADM-Fe ³⁺ -Vc-O ₂ + dsDNA	1.59 × 10 ⁵	-30.9	-41.3	-33.5	5.74
9-AA + DNAI		-33	-26	24	
9-AA + DNAIL		-32	-21	38	
9-AA + DNALII		-32	-17	50	
Quinacrine + DNAI		-31	-16	48	
Quinacrine + DNAIL		-32	-25	40	
Quinacrine + DNALII		-32	-20	49	

注: cisplatin-顺铂 BLM-博来霉素 ADM-阿霉素 PF-原黄素 9-AA-氨基 Quinacrine-阿的平

抗肿瘤抗生素与DNA相互作用时,采用嵌入DNA碱基对的方式,破坏DNA的模板功能,阻止转录过程,抑制DNA、RNA及蛋白质合成的同时,也改变癌基因的结构或影响癌基因的表达。日本的Kano和Baba等人,应用LKB间歇微量热计配合吸收光谱研究了阿霉素分别与小牛胸腺DNA, poly(dA, dU)和poly(dI, dC)相互作用的热力学性质,测定了一系列相应的热力学参数^[7]。美国的Rcmeta等,先后利用等温间歇微量热计和一种新型停流式微量热计,结合光谱法系统地研究了道诺霉素与DNA相互作用的摩尔结合焓,摩尔结合Gibbs函数和结合位点数,两种方法测定的摩尔结合焓能很好吻合^[8]。美国的Crothers等利用Omega滴定微量热计结合光谱及荧光技术,研究了道诺霉素与DNA作用的序列特异性,并比较了道诺霉素与几种聚核苷酸及小牛胸腺DNA作用的各种热力学函数变化^[9]。武汉大学屈松生等,采用间歇式微量热计和活塞流微量热计,结合光谱法、循环伏安法等技术,研究了阿霉素、博来霉素等抗肿瘤药物与DNA的相互作用机制和一系列热力学性质,实验结果证明:ADM与DNA作用是较大的放热反应,并伴随着显著的熵减。显示ADM是以典型的嵌入方式与DNA相互结合时,由于ADM-DNA复合物比独立的DNA和ADM分子更为有序,因此导致一定程度的熵减。有文献认为,ADM是DNA拓扑异构酶的一种嵌入型抑制剂。DNA拓扑异构酶(DNA topoisomerases, ToPo),普遍存在于生物界。它催化超螺旋DNA的解旋反应,是直

接参与或影响DNA复制、转录以及细胞分裂时同源染色体分离的重要酶型。嵌入型抑制剂通过其分子中类似嘌呤或嘧啶碱基的多环结构,嵌入到ToPo与DNA结合部分的双链之间,干扰酶将DNA断端重新接合的正常功能,并进一步造成DNA的链断裂损伤^[10],此结论证实了热力学研究结果的正确性。BLM与dsDNA的作用是较小的放热反应,并伴随着较小程度的熵增。表明BLM分子是部分嵌入到dsDNA的相邻碱基之间,剩余部分留在沟槽内,引起DNA的超螺旋结构松弛甚至反旋,导致一定程度的熵增。这些热力学性质,从热力学角度证实了抗肿瘤抗生素对DNA的嵌入机制。ADM-Fe³⁺-Vc-O₂体系、BLM-Fe³⁺-O₂体系、(phen)₂Cu²⁺体系,是一些复合体系,其以对DNA的切割机制,而具有抗肿瘤活性。实验结果证明:ADM-Fe³⁺-Vc-O₂体系,通过活化ADM和羟自由基两种平行的方式同时切割DNA, DNA断裂反应为放热量很大的反应。BLM-Fe³⁺-O₂体系,是DNA氧化断裂的启动因子,通过氧化脱氧核糖的方式使DNA单链和双链断裂,表现为很大的放热反应(ΔH_m = -581 kJ·mol⁻¹)^[11]。经Hitachi635A型高效液相色谱仪证实, DNA已被切割成很小的碎片。(phen)₂Cu²⁺体系与DNA的作用是以沟槽方式与其6个碱基对结合, DNA成开环型。反应为较快的放热反应和焓驱动反应^[3]。

关于中草药有效成分的抗肿瘤研究已有大量报道。二氢骆驼蓬碱和骆驼蓬碱是两种生物碱,作为新型抗肿瘤药物已用于临床实验。王保怀等人用微

量热法测定了这 2 种生物碱与 DNA 作用的摩尔焓变,从作用的热焓及热谱角度研究其抗肿瘤活性及作用机理。实验结果表明:骆驼蓬碱与 DNA 作用的摩尔焓变为二氢骆驼蓬碱的 3 倍。芳香性稠环化合物与 DNA 嵌插作用强弱主要取决稠环的平面程度和稠环上的电子云密度,一组同系化合物的生物活性伴随其与 DNA 的结合强度的增大而增大,骆驼蓬碱应有更强的抗肿瘤活性^[12]。

3 抗肿瘤药物与 DNA 的作用类型及热力学特征

在生理条件下, DNA 以被水分子包围的双螺旋形式存在^[13]。根据其结构特点,综合微量热研究及其他相关研究的众多信息,可以对抗肿瘤药物与 DNA 作用的类型和热力学特征归纳如下。

3.1 嵌入型和热力学特征

含有平面结构的药物分子嵌入到 DNA 分子的相邻碱基之间,并在 2 个碱基之间滑动,从而使超螺旋的紧密结构变成松弛的状态^[14]。这种作用方式是药物分子与碱基之间的范德华作用力、疏水作用和 π 电子相互作用等弱键力的综合结果。主要破坏使 DNA 结构稳定的碱基堆积力。这种作用不都具备选择性,有典型嵌入和部分嵌入的差异。典型嵌入,药物与 DNA 的结合过程表现为较大的放热反应,伴随着一定程度的熵减,为焓驱动反应。部分嵌入,反应放热较小并伴随着较小程度的熵增。

3.2 沟槽类型和热力学特征

药物分子以沟槽方式与 DNA 结合,可将 DNA 沟槽中的水分子等释放出来,由于空间位阻的因素而引起 DNA 构型的转变。其键合过程表现为较小的放热反应,并伴随着较大程度的熵增,为熵驱动反应。

3.3 共价结合类型和热力学特征

药物分子与 DNA 分子以共价方式结合,其键合过程表现为较大的放热反应,亦为焓驱动反应。

3.4 切割类型和热力学特征

药物分子与 DNA 分子以切割方式结合, DNA 单链断裂。其切割过程将表现为放热反应,放热的程度与切割 DNA 的程度有关。若切割 DNA 仅使之成开环或线性状态,则放热量较小;若切割 DNA 为游离碱基碎片,则放热量就将大大增加^[15]。

3.5 药物分子与 DNA 分子存在的作用均属于弱键力

药物分子上带正电的基团与 DNA 双螺旋链上

带负电磷酸残基之间的静电作用;药物分子进入 DNA 双螺旋的沟区与碱基之间的氢键作用;药物分子进入 DNA 双螺旋的沟区与碱基之间的疏水作用;芳香性药物分子进入 DNA 双螺旋的沟区与芳香族碱基之间的 π 电子作用;药物分子与 DNA 分子的范德华引力等,其作用能量在范德华力($40 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)和($8 \sim 50 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)之间,药物分子与 DNA 分子相互作用的摩尔反应焓是多种弱键作用的综合结果^[12]。从分子水平来看生命现象,上述弱作用键力是一种决定性的因素,形成了各种生物大分子功能所要求的空间结构,因而决定了基因转录、调控的主要分子机制。微量热方法测定的是体系中所有热效应的总和^[16]。

参 考 文 献

- [1] Committee to Survey Opportunities in the Chemical Sciences et al, Opportunities in Chemistry. USA National Academy Press, 1985.
- [2] 魏小龙,茹祥斌等. 抗肿瘤药物对早期反应癌基因的作用研究进展. 国外医学药学分册, 1997, 24(4): 197—200.
- [3] 梁毅,屈松生等. 非咯啉铜切割 DNA 反应的微量热法研究. 化学学报, 1998, 56: 1145—1152.
- [4] Wadso I et al. Isothermal microcalorimetry for the characterization of interactions between drugs and biological materials. *Thermochimica Acta*, 1995, 267: 45—59.
- [5] Kagemoto et al. Thermodynamic characterization of binding of DNA with cisplatin in aqueous solution by calorimetry. *Thermochimica Acta*, 1991, 190: 191.
- [6] Rubin E, Kharbanda S, Gunji H et al. cis-Di-aminedi chloroplatinum (II) induces c-jun expression in human myeloid leukemia cells: potential involvement of a protein kinase c-dependent signaling pathway. *Cancer Res*, 1992, 52(4): 878—882.
- [7] Kano K, Baba Y, Kagemoto A. Thermodynamic studies on the interaction between nucleic acid and drug by calorimetry. *Thermochim Acta*, 1985, 88: 323.
- [8] Remeta D P, Mudd C P, Bweger R L et al. Thermodynamic Characterization of Daunomycin-DNA Interactions: Comparison of Complete Binding Profiles for a Series of DNA Host Duplexes. *Biochemistry*, 1993, 32(19): 50—64.
- [9] Roche C J, Thomson J A, Crothes D M. Site Selectivity of Daunomycin. *Biochemistry*, 1994, 33(4): 926.
- [10] 吕星,夏寿萱等. 作用于 DNA 拓扑异构酶的抗癌药研究. 国外医学药学分册, 1992, 19(4): 201—205.
- [11] 梁毅,汪存信,屈松生等. 博来霉素催化切割 DNA 反应的微量热法研究. 中国化学会第九届全国化学热力学和热分析学术论文集暨北京国际华夏热分析和量热学术论文集. 北京, 1998, 47—48.
- [12] 王保怀,张有民,杨铭等. 微量热法研究两种生物碱与 DNA 的嵌插作用. *物理化学学报*, 1994, 10(1): 82.
- [13] Kornberg A. The synthesis of DNA, scientific American Inc. 1968.

- [14] Lerman L S. Interaction of DNA and proflavine: A Small-Angle X-Ray Scattering Study. *Mol. Biol.*, 1961, 3:18.
- [15] Sigman D S. chen C-hB, Chemical Nucleases: New Reagennts in

Molecular Biology Annu. Rev. Biochem., 1990, 59:207.

- [16] 杨铭. 以 DNA 为靶小分子药物研究的分子识别. *北京医科大学学报*, 1998, 30(2):97-99.

THERMOKINETIC RULES OF MUTUAL EFFECT BETWEEN ANTITUMOUR DRUGS AND DNA

Shen Xuesong*[†] Liu Yi* Zhao Ruming* Zhou Chuanpei* Qu Songsheng*

(* Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072; † Guilin Medical College, Guilin 541001)

Abstract Using the means of microcalorimetry, from the view of thermokinetics, we established thermokinetic model of mutual effect between antitumour drugs and DNA, calculated mutual thermodynamic function. Coeluding types of effect and specilities of thermokinetics were summerised, which provide important information for the exploration of the effect mechanism between antitumour drugs and DNA.

Key words antitumour drugs, DNA, thermodynamics, thermokinetics

·资料·信息·

机械工程学科组织专家研讨科学前沿及优先资助领域

由国家自然科学基金委员会工程与材料科学部机械学科组织的“机械工程科学前沿及优先领域研讨会”于1999年12月上旬在广州召开。

会议期间,17位专家作了大会发言,27位专家作了分组发言。在研讨过程中,代表们就机械工程科学的前沿领域、学科交叉、新的学科生长点、优先资助领域的遴选原则和基金资助政策等方面提出了很好的建议。

与会专家认为,未来机械工程科学发展的总趋势将是交叉综合化、数字智能化、微型精密化、清洁高效化、柔性集成化。精密高效低成本成形和加工技术、网络制造、虚拟制造、柔性智能自动化制造技术、智能机器人及虚拟仪器设备、微型机电系统、仿生机械和制造技术将日趋成熟并被市场所接受;可重构制造系统的理论和适合中国国情的制造模式将得到完善和发展;在机构学、摩擦学、仿生机械和仿生制造等领域的学术界,我国将进入世界先进行列;在与现代物理学和化学相关的计量、测试和仪器等领域,将有可能取得世界水平的创新成果。

与会专家认为,面对我国加入WTO所伴随的机遇与挑战,机械工程科学作为一门工程应用科学,除了加强基础理论和前沿领域(如微型机械系统、智能机械结构等)的研究外,还应重视能够带动国家支柱产业的关键技术基础和国外对我国进行封锁的高新技术研究(如先进的制造工艺及装备、精密测量仪器等),这对于提高我国的综合国力具有重要意义。

关于“十五”优先资助领域,与会专家认为,应当选择有优势和特色的学科前沿领域;选择国民经济和机械工程中的重要、具有突破性和带动性的关键科学问题作为研究课题;选择有发展前景的跨学科交叉新领域;在与国家其他研究计划不重复资助的条件下进行遴选。对“九五”已立重点项目并可能取得新突破的少数前沿领域,应当选择新的研究内容和关键科学问题继续给予支持。

(工程与材料科学部 雷源忠 黎明 供稿)