

用单分子技术研究抗癌药物顺铂 对 DNA 结构的影响*

侯锡苗 张兴华 魏孔吉 季超 窦硕星 王渭池 李明 王鹏业[†]

(中国科学院物理研究所软物质物理实验室 北京凝聚态物理国家实验室 北京 100190)

摘要 文章作者用磁镊与原子力显微镜研究了抗癌药物顺铂对单个 DNA 分子结构的影响. 当顺铂浓度较低时, DNA 链变得柔软, 驻留长度从~52 nm 显著缩短到~15 nm; 当顺铂浓度较高时, DNA 表现出凝聚现象. 基于单分子拉伸和原子力显微镜(AFM)成像两方面的实验结果, 文章作者提出一个顺铂导致的 DNA 变软(softening)–成环(looping)–缩短(shortening)–凝聚(condensing)模型(简称为 SLSC 模型)来解释观察到的 DNA 凝聚, 并认为通过远程交联使 DNA 形成小环结构是铂类抗癌药物作用的重要特征.

关键词 抗癌药物, 顺铂, DNA, 磁镊, 原子力显微镜, 单分子

Effects of the anticancer drug cisplatin on DNA structure studied by single-molecule methods

HOU Xi-Miao ZHANG Xing-Hua WEI Kong-Ji JI Chao

DOU Shuo-Xing WANG Wei-Chi LI Ming WANG Peng-Ye[†]

(Laboratory of Soft Matter Physics, Beijing National Laboratory for Condensed Matter Physics,
Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract The structural properties of single DNA molecules treated with the anticancer drug cisplatin were studied with magnetic tweezers and atomic force microscopy (AFM). Under the effect of low-concentration cisplatin (tens of μM), the DNA became more flexible, with the persistence length decreased significantly from ~52 to ~15 nm. At a high drug concentration (hundreds of μM), a DNA condensation phenomenon was observed. Based on the experimental results from both single-molecule and AFM studies, we propose a cisplatin-induced DNA softening-looping-shortening-condensing model to explain this kind of DNA condensation. We think the observed micro-loop structure formation of DNA due to distant crosslinks may be an important feature of the effect of platinum anticancer drugs.

Keywords anticancer drug, cisplatin, DNA, magnetic tweezers, atomic force microscopy, single molecule

1 顺铂: 小分子的强大抗癌功能

顺铂(cisplatin)的发现是一个意外收获. 1965年, Rosenberg 在研究电场对细菌生长的影响时, 注意到异常现象: 大肠杆菌细胞形成大约为正常细胞 300 倍

长的纤维. 进一步研究证实, 是铂电极电解形成的铂盐(主要是顺铂)导致了细胞的纤维化生长. 后续研究

* 国家自然科学基金(批准号: 10834014, 10674173)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2009CB930704)资助项目
2009-04-17 收到

[†] 通讯联系人. Email: pywang@aphy. iphy. ac. cn

发现,顺铂能够抑制肿瘤细胞的生长,从而引起了人们对金属配合物抗肿瘤功能的重视^[1].

顺铂是目前使用最为广泛的抗癌药物之一,具有广谱的抗肿瘤活性.在临床上它被用于治疗膀胱癌、前列腺癌、肺癌、头颈部癌、乳腺癌、恶性淋巴瘤和白血病等,并且被公认为是治疗睾丸癌和卵巢癌的一线药物.

药用顺铂为含有甘露醇和氯化钠的冻干粉.用注射用水配制的溶液每毫升含顺铂 1mg (浓度约为 3.3 mM), NaCl 9mg, 甘露醇 10mg, pH 为 3.5—5.5. 20 世纪 80 年代,第二代铂类抗癌药物卡铂(carboplatin)被合成出来.它的生化性质、抗肿瘤活性都与顺铂接近,但肾毒性小,消化道反应低,治疗小细胞肺癌的效果比较好,并且与顺铂没有交叉耐药性.1996 年,第三代铂类抗癌药奥沙利铂(oxaliplatin)上市,它对大肠癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、乳腺癌等都具有显著的抑制作用^[2].这三代铂类抗癌药物的结构如图 1 所示.

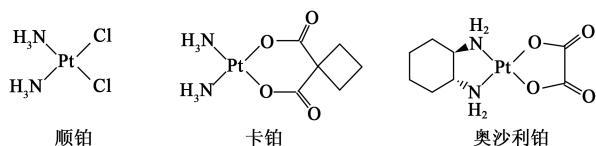


图 1 三代铂类抗癌药顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)

人们普遍认为,顺铂的细胞毒性(cytotoxicity)来自于它和 DNA 形成的加合物(adduct).当水合的顺铂分子遇到 DNA 后,顺铂上的水分子极易被鸟嘌呤(guanine)或腺嘌呤(adenine)的 N7 原子取代,在 DNA 上形成单臂加合物(mono-adduct)和双臂加合物(di-adduct)^[1](见图 2).顺铂—DNA 单臂加合物有一个自由的手臂,抓住相邻的碱基就形成双臂加合物.目前已知的顺铂与 DNA 的交联方式主要包括同一条链内部的交联(intrastrand crosslink),链内交联发生的比例为:65% 1,2-d(GpG), 25% 1,2-d(ApG), 5—10% 1,3-d(GpNpG).除此之外,还有少部分两条链间的交联(interstrand crosslink).X 射线衍射显示,顺铂—DNA 加合物 1,2-d(GpG)使 12bp 双链 DNA 向大沟(major groove)方向弯折 50°,并且上下两个相邻的鸟嘌呤间形成 30°二面角^[3].可见,顺铂能够结合 DNA,在 DNA 同一条链或两条链间形成交联,使 DNA 双螺旋向大沟方向明显弯曲,并且在药物结合位点附近有局部解旋.

顺铂在生物学上的影响极其复杂^[1].顺铂—DNA 加合物通过几种方式与细胞内的蛋白相互作用

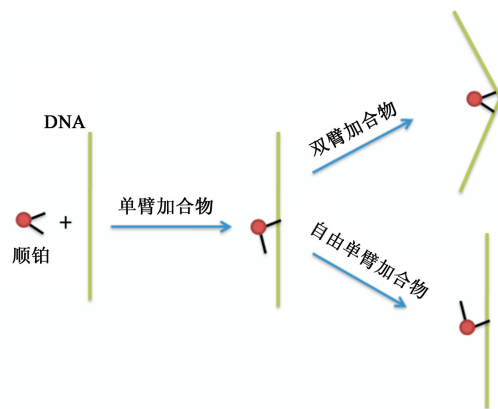


图 2 顺铂与 DNA 的结合方式:单臂加合物与双臂加合物

用,如挟持转录因子,抑制 DNA 转录;阻断 DNA 或 RNA 聚合酶的移动,抑制 DNA 或 RNA 的聚合;结合其他蛋白,屏蔽 DNA 修复酶的正常修复.与蛋白的作用又会进一步激活细胞信号转导通路,引起细胞周期停滞、细胞凋亡、细胞死亡等过程(图 3).

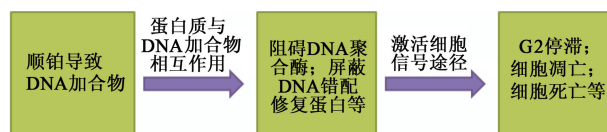


图 3 顺铂对细胞生命过程的影响

在这篇文章中,我们将介绍用磁镊(magnetic tweezers)与原子力显微镜(AFM)相结合的方法在单分子层次研究顺铂对 DNA 力学性质(mechanical property)、DNA 结构特征(structural property)以及 DNA 凝聚状态的影响^[4].单分子技术在研究 DNA 与配体相互作用时的优势表现为:可以实时观察变化的过程;可以对 DNA 进行操纵;可以使用长链 DNA,与晶体结构或电泳等技术相比,更加接近细胞里的真实 DNA.

2 较低浓度顺铂使 DNA 链变得柔软

长链 DNA 在结构上具有柔性,但如果在小尺度上进行观察(几十纳米),局部的 DNA 链又像一个刚性的杆,难以弯曲.因此,可以近似将 DNA 链看作一条弹性杆,用蠕虫链(worm-like chain, WLC)模型来刻画它在承受外界拉力时表现出的弹性^[5].在 WLC 模型中,DNA 被看作是一个半柔性的链,刚性由驻留长度(persistence length)来反映.驻留长度越大,说明刚性越强.轮廓长度(contour length)是对应于较大拉

伸力下 DNA 结构形变前的伸直长度. 以前实验测量出单个 DNA 分子的驻留长度大约为 50 nm, 轮廓长度大约为 16.5 μm . DNA 分子上静态的弯折 (static bending) 以及由热运动引起的动态弯折 (thermal induced dynamic bending) 都会引起驻留长度的变化.

有很多的方式可以实现 DNA 的单分子拉伸, 例如微吸管、液流、分子梳、光镊、磁镊等. 我们这里用的是磁镊. 将 DNA (48,502 bp, 长度为 16.2 μm) 修饰, 使其两端分别带有一个生物素 (biotin) 和一个地高辛素 (digoxigenin). 通过抗原与抗体的相互作用, 生物素的一端与表面覆盖着链霉亲和素 (streptavidin) 的磁球相连, 地高辛素一端与铺着抗地高辛素 (anti-digoxigenin) 的小池子侧壁相连. 这样, 单个 DNA 分子一端连接上顺磁小球, 另一端连接到样品池壁上. 通过磁场就可对 DNA 施加拉伸力.

实验中, 我们首先在恒定拉力下 (大约 1.3 pN) 实时记录加入顺铂后 DNA 长度随时间的变化, 大约 4 小时后达到稳定. 接着对此时的 DNA 进行力与伸长关系曲线的测量. 图 4 显示了几条不同 DNA 的代表性曲线, 分别为不加药物的 DNA (作为对比)、与浓度为 15.4 μM 顺铂反应过的 DNA 以及浓度为 77 μM 顺铂反应过的 DNA. 用 WLC 模型拟合这些曲线, 得到 DNA 的驻留长度分别为 52.4 nm, 25.0 nm 和 15.0 nm, 轮廓长度分别为 16.4 μm , 16.6 μm 和 16.6 μm . 这些结果告诉我们, 当 DNA 分子与顺铂充分反应后, 驻留长度明显缩短, 而轮廓长度基本不变.

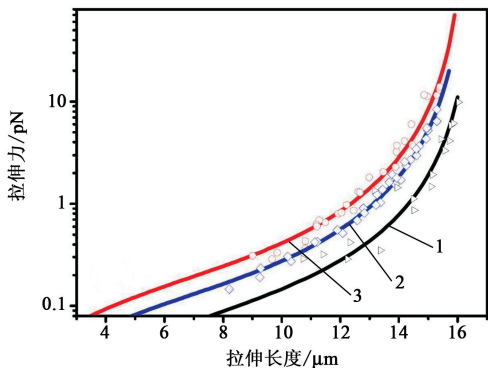


图 4 顺铂浓度较低时 DNA 的单分子实验. 3 条曲线表示不同的顺铂浓度: 曲线 1 是单纯 DNA 的力与伸长曲线 (作为对比, 没有药物); 曲线 2 对应 15.4 μM 顺铂浓度; 曲线 3 对应 77 μM 顺铂浓度. 离散点为实验数据, 实线为 WLC 模型的拟合曲线

为直接观察顺铂对 DNA 结构的影响, 我们用 AFM 扫描与浓度为 77 μM 的顺铂 ([顺铂]: [DNA 碱基对数目] ≈ 0.5) 反应后的 DNA 分子 (采用分子梳技术将其铺展到云母片上^[6], 以便观察). 图 5(a) 为未

加药物的 DNA. 和顺铂反应 6 小时后, DNA 上出现一些局部弯折 (见图 5(b)), 对应着顺铂在 DNA 上形成的使 DNA 弯折的加合物. 上面观察到的 DNA 形貌与单分子实验结果互相吻合, 它们共同揭示出 DNA 的驻留长度缩短了. 反应 12 小时后, DNA 变得更加卷曲 (见图 5(c) 和 (d)). 仔细观察, 会发现 DNA 上面出现许多小鼓包 (tiny globules), 尺寸约为 20 nm, 高度约为 1 nm (单个双链 DNA 在云母片上的高度约为 0.5 nm). 我们认为这些鼓包是 DNA 上的小环结构 (micro-loop), 形成方式与以前所知道的相邻碱基间的交联 (GpG, ApG, GpNpG) 不同. 本文后面将有对这种结构的证实, 以及对其形成原因的讨论.

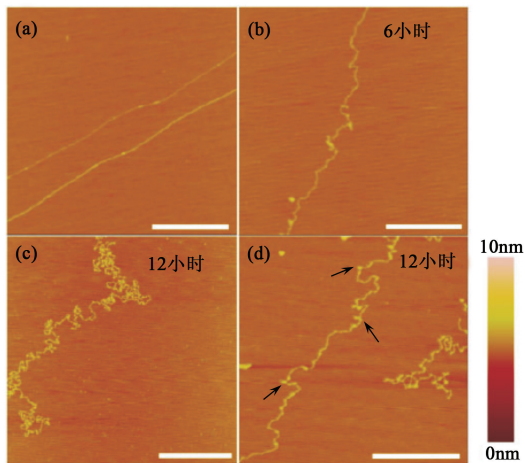


图 5 与顺铂反应不同时间后的 DNA 的 AFM 成像 [(a) 未与顺铂反应的 DNA: 在云母片上, DNA 被拉直; (b) 与顺铂反应 6 小时的 DNA: DNA 上出现局部弯折; (c), (d) 与顺铂反应 12 小时的 DNA: DNA 卷曲越来越厉害, 并且伴随着一些微小结构的形成 (小鼓包, 如箭头所指). 图中所有标尺均为 500 nm]

此外, 我们还选择了 2 kb 的较短 DNA, 在顺铂浓度较低 (15.4 μM , 反应 1 小时) 的情况下, 用 AFM 研究了顺铂对 DNA 轮廓长度的影响, 这时较短链的轮廓比较容易追踪. 统计结果显示, 自由状态的 DNA 轮廓长度为 656.8 nm, 和顺铂反应过的 DNA 的轮廓长度为 653.1 nm. 由此可见, 在这一浓度下, 顺铂虽然能够使 DNA 弯折, 但对 DNA 轮廓长度的改变却极小, 这与本文上面所述的磁镊实验结果是一致的.

顺铂能够导致 DNA 结构和驻留长度的变化, 这与顺铂与 DNA 的结合方式有关. 我们知道, 顺铂在 DNA 同一条链上交联, 交联方式主要包括 1,2-d (GpG), 1,2-d (ApG), 1,3-d (GpNpG) 三种, 此外还可以形成少量两条链间的交联, 这些交联使 DNA 向大沟方向大约弯曲 50°. 根据理论计算^[7], 这种局部弯

折会导致 DNA 驻留长度缩短.事实上,也存在其他一些和 DNA 结合的配体,虽然结合方式不同,却都能缩短 DNA 的驻留长度^[8],例如单分子实验就曾揭示过和 DNA 小沟结合的偏端霉素 A(distamycin-A)、和大沟结合的 α 螺旋肽链(α -helical peptide)、插入 DNA 的 EtBr 分别将 DNA 的驻留长度缩短到 26.7, 29.4, 20.7nm,而我们将单分子方法应用于定量研究顺铂对 DNA 驻留长度改变的影响.

3 较高浓度顺铂导致 DNA 长度收缩: 一个奇异的现象

曾有文献报道过顺铂与 DNA 相互作用时出现的 DNA 缩短现象:例如,将 260 bp 的短链 DNA 与顺铂在 37°C 时避光反应 24 小时,做 AFM 扫描时,发现 DNA 的轮廓长度缩短了 30%^[9];在 1978 年报道的一个很早的工作中,研究者用电镜观察到使用高浓度顺铂时,DNA 明显缩短^[10].虽然缩短现象已被揭示,但至今仍缺乏合理的解释.此外,这种缩短的结构在研究顺铂与 DNA 的结合模式时很少被提及.

我们利用磁镊定量记录 DNA 缩短的过程:首先将 DNA 与池壁及顺磁球连接好,接着注入 770 μ M 顺铂溶液,然后将磁力调节到大约 1pN,使 DNA 处于比较自由的状态.我们观察到 DNA 的伸长量在 100 分钟内从 12 μ m 迅速缩短到不足 3 μ m.这一缩短过程是不可逆的,即使将磁力增加到 20pN,也只能将凝聚的 DNA 拉长至最大限度 11 μ m,依然远远小于 DNA 的完整长度 16.5 μ m.作为对比实验,保持实验过程不变,只是将外力自始至终维持在最大值 20 pN,使 DNA 处于高度拉伸状态.此时我们观察到,即使在高浓度顺铂中,DNA 也不缩短.上面结果表明:导致 DNA 缩短的新结构在 DNA 始终受大的外力时(20pN)难以形成;然而,新结构一旦在小力下形成,即使 20pN 的大力也无法将其解开.

为直接观察 DNA 缩短过程中形成的新结构,我们将 DNA 与浓度为 770 μ M 的顺铂反应([顺铂]:[DNA 碱基对数目] \approx 5),然后用 AFM 进行扫描.通过扫描经过不同反应时间后的 DNA,我们得到了 DNA 结构随时间的变化.反应 1 小时后,DNA 变得卷曲[见图 6(a)],与没有药物时 DNA 在云母表面的伸展状态形成鲜明对比,如图 5(a)所示.此时观察到的卷曲与低浓度顺铂时观察到的结构[77 μ M,如图 5(b)所示]也有所不同:除了局部弯折,局部凝聚也出现了,如图 6(a)中箭头所指.随着反应时间的增加,

DNA 变得越来越卷曲,越来越紧密,局部结构越来越多[见图 6(b)和(c)].反应时间达到 6 小时或者更长时,DNA 看上去像一串凝聚物的聚集[见图 6(d)和(e)].最后,反应时间达到 12 小时,DNA 凝聚成为一个致密的颗粒,高度约为 6 nm,尺寸约为 100 nm[见图 6(f)].

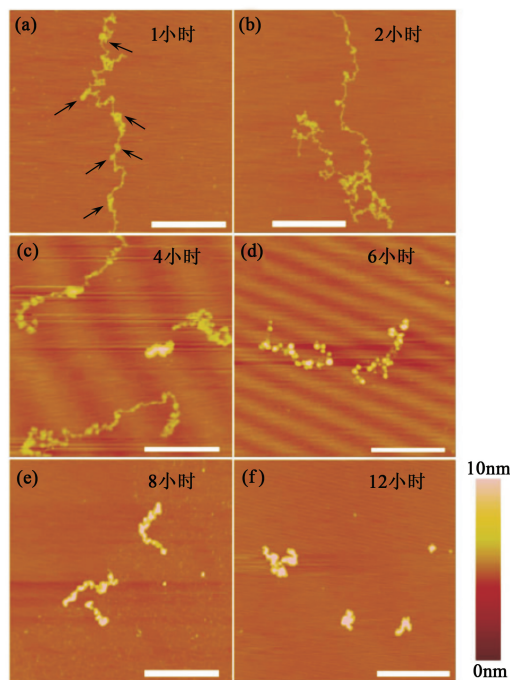


图 6 与 770 μ M 顺铂反应后的 DNA 的 AFM 扫描结果 [(a) 反应时间为 1 小时,箭头所指为局部凝聚;(b)反应 2 小时;(c)反应 4 小时;(d)反应 6 小时;(e)反应 8 小时;(f)反应 12 小时.所有标尺均为 500nm]

4 DNA 凝聚的模型假设

结合单分子和 AFM 成像两方面的实验结果,我们提出一个变软(softening)—成环(looping)—缩短(shortening)—凝聚(condensing)模型(简称为 SLSC 模型,见图 7)来解释顺铂引起的 DNA 缩短现象.顺铂能够和 DNA 形成双臂加合物,如 1,2-d(GpG), 1,2-d(ApG), 1,3-d(GpNpG),也能够形成单臂加合物,而后者依然有一个自由位点来结合 DNA 上的其他碱基.由于 DNA 在溶液中的热涨落,即使在序列上相距较远的两个位点也可能在空间上相距很近.前面实验已经看到,由于顺铂的存在,使得 DNA 的驻留长度明显变短,DNA 链变得柔软.另外,溶液中较高浓度的顺铂还有可能同时起到屏蔽 DNA 上负电荷排斥的作用.这都加大了 DNA 序列上相距较远的两个位点在空间上相距很近的概率.因此,如果这两个位点其中之一与顺铂形成了单臂加合物,另一个位点就有可能

被顺铂的悬空臂捕捉到,形成远程交联.这种远程交联的结果正是我们在 $77\mu\text{M}$ 顺铂中所观察到的小环[见图 5(d)].当顺铂浓度更高时,小环进一步被交联,使 DNA 长度缩短,并最终凝聚成致密的颗粒[见图 6(f)].

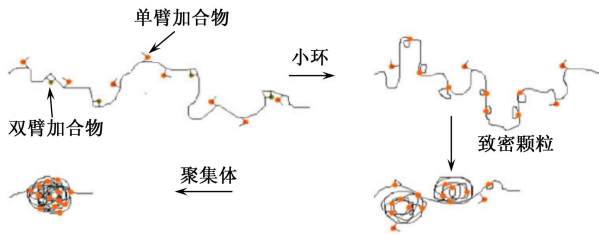


图7 我们提出的顺铂导致的 DNA 变软(softening)一成环(looping)一缩短(shortening)一凝聚(condensing)模型(简称为 SLSC 模型).首先,顺铂在 DNA 上形成双臂加合物和单臂加合物.由于 DNA 的热涨落,原本在序列上相距较远的两个碱基有可能被顺铂交联起来,形成小环.进一步的远程交联使得 DNA 成为一串凝聚物的聚集,并最终凝聚成一个致密的颗粒

5 影响 DNA 凝聚的因素

根据上面实验,我们认为,小环的形成主要受两方面因素的影响:药物浓度和反应时间. AFM 扫描显示,当药物浓度为 $15.4\mu\text{M}$ 时,即使反应时间为 48 小时, DNA 上也只有弯折,没有小环; DNA 与 $77\mu\text{M}$ 顺铂反应 6 小时,也很少出现小环[见图 5(b)];反应 12 小时, DNA 上就出现了较多小环,但是依然没有大的结构[见图 5(c)和(d)];当 DNA 与 $770\mu\text{M}$ 顺铂反应时,即使反应时间仅有 1 小时, DNA 上也有许多新的结构[见图 6(a)].

我们认为,当顺铂浓度为几十微摩尔,与 DNA 反应时间为 12 小时左右时, DNA 上出现小环结构是药物作用的一个显著特征.以前,人们普遍认为,顺铂通过在 DNA 同一条链或两条链间的相邻位点形成交联来改变 DNA 的结构,我们的工作证实了远程交联也是顺铂与 DNA 相互作用的重要方面.

我们猜测:当 DNA 链被顺铂交联成致密凌乱的一团而又难以打开时, DNA 合成酶, RNA 合成酶, DNA 解旋酶, DNA 修复酶的工作都可能受到严重影响甚至抑制,进而影响到 DNA 的复制过程和细胞周期.这种 DNA 整体结构变化带来的效应还有待进一步研究证实.

6 结束语

我们用磁镊研究了抗癌药物顺铂对单个 DNA 分子力学性质的影响.和自由的 DNA 相比,经过顺铂修饰的 DNA 变得比较柔软,驻留长度从 $\sim 52\text{ nm}$ 减小到 $\sim 15\text{ nm}$,与以前所知道的顺铂与 DNA 的结合方式相一致,即顺铂在 DNA 上形成链内或链间交联,使 DNA 向大沟方向弯曲,这种稳定的弯角导致 DNA 驻留长度的缩短.用 AFM 扫描与同样浓度顺铂反应过的 DNA,我们观察到 DNA 变得卷曲,出现许多局部弯折.此外, AFM 实验还定量地证实了低浓度顺铂对 DNA 的轮廓长度影响不大.

我们工作的重要之处在于,发现并证实了顺铂与 DNA 相互作用的另一种方式: DNA 在顺铂作用下形成小环结构,并最终凝聚.在磁镊实验中, DNA 的伸长在加入高浓度药物后迅速缩短,即使用较大拉伸力 (20 pN) 也无法将凝聚后的 DNA 拉开. AFM 扫描揭示出 DNA 凝聚的具体过程:首先,在 DNA 序列上相距较远的两个位点被顺铂交联在一起,形成尺寸大约为 20 nm 的小环.然后, DNA 进一步被交联,出现大的结构,并最终凝聚成为致密的颗粒.小环结构的出现是顺铂与 DNA 相互作用的重要特征.这一工作将有助于在分子层次上深入理解铂类抗癌药物的肿瘤治疗机理,或许对设计新的药物也将有所启示.

参考文献

- [1] Kartalou M, Essigmann J M. *Mutat. Res.*, 2001, 478: 1
- [2] 尤启东. 药物化学. 北京:化学工业出版社, 2004. 524 [Long Q D. *Medicinal Chemistry*. Beijing: Chemical Industry Press, 2004. 524 (in Chinese)]
- [3] Takahara P M, Frederick C A, Lippard S J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 12309
- [4] Hou X M, Zhang X H, Wei K J *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37: 1400
- [5] Bouchiat C, Wang M D, Allemand J F *et al.* *Biophys. J.*, 1999, 76: 409
- [6] Liu Z G, Li Z, Zhou H L *et al.* *Microsc. Res. Tech.*, 2005, 66: 179
- [7] Yan J, Marko J F. *Phys. Rev. E*, 2003, 68: 011905
- [8] Sischka A, Toensing K, Eckel R *et al.* *Biophys. J.*, 2005, 88: 404
- [9] Onoa G B, Cervantes G, Moreno V *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 1998, 26: 1473
- [10] Macquet J P, Butour J L. *Biochimie*, 1978, 60: 901