

引用格式: 刘冰弥, 张闯, 李丽, 等. 超声结合 4,4-双甲基姜黄素对 DNA 损伤的实验研究[J]. 声学技术, 2020, 39(5): 586-591. [LIU Bingmi, ZHANG Chuang, LI Li, et al. Experimental study on DNA damage induced by ultrasound combined with 4, 4-dimethylcurcumin[J]. Technical Acoustics, 39(5): 586-591.] DOI: 10.16300/j.cnki.1000-3630.2020.05.011

超声结合 4,4-双甲基姜黄素对 DNA 损伤的实验研究

刘冰弥^{1,2}, 张闯¹, 李丽^{1,3}, 刘洋成¹, 栾佳思¹, 刘宇^{1,3}

(1. 辽宁大学药学院, 辽宁沈阳 110036; 2. 辽宁新药研发重点实验室, 辽宁沈阳 110036;
3. 辽宁省天然产物制药工程技术研究中心, 辽宁沈阳 110036)

摘要: 文章以 4',6'-二脒基-2-苯基吲哚为荧光探针, 通过荧光光谱方法研究了超声结合姜黄素类似物 4,4-双甲基姜黄素(dimethylcurcumin, DMCU)对 DNA 的损伤作用, 并采用氧化-萃取分光光度法及活性氧清除剂对超声作用过程中活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)的产生及其种类进行了检测和鉴别。结果表明, 与单独 DMCU 作用或单独超声作用相比, 超声与 DMCU 的协同作用对 DNA 的损伤效应更强, 且损伤程度随超声照射时间和 DMCU 浓度的增加而增大。此外, DMCU 在超声作用下会降解, 且 DMCU 的降解速率和程度与一定条件下的 DNA 损伤程度有关, 说明 DMCU 声化学反应中活性氧的产生是导致 DNA 损伤的原因。结果表明 DMCU 有可能成为一种新结构类型的声敏剂。

关键词: 姜黄素类似物; 声敏性质; 活性氧; 声化学机制; DNA 损伤

中图分类号: TB559

文献标识码: A

文章编号: 1000-3630(2020)-05-0586-06

Experimental study on DNA damage induced by ultrasound combined with 4, 4-dimethylcurcumin

LIU Bingmi^{1,2}, ZHANG Chuang¹, LI Li^{1,3}, LIU Yangcheng¹, LUAN Jiasi¹, LIU Yu^{1,3}

(1. School of Pharmacy, Liaoning University, Shenyang 110036, Liaoning; 2. Liaoning Key Laboratory of New Drug Research & Development, Shenyang 110036, Liaoning; 3. Liaoning Pharmaceutical Engineering Research Center for Natural Medicine, Shenyang 110036, Liaoning)

Abstract: In order to further confirm the sonosensitizing property of 4,4-dimethylcurcumin (DMCU), by taking the 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as a fluorescent probe, the fluorescence and UV-Vis spectrum method is used to study the damage effect of ultrasonic irradiation combining DMCU on DNA. Meanwhile, the production and types of reactive oxygen species (ROS) during ultrasonic action are detected and identified by oxidation-extraction spectrophotometry and reactive oxygen scavengers. In addition, the effects of ultrasonic irradiation time and DMCU concentrations on the sonodynamic damage of DNA are also considered. The results show that the ultrasound combined with DMCU could damage DNA obviously, and the damage degree of DNA increases with the increase of ultrasonic irradiation time and DMCU concentrations. Additionally, DMCU is degraded under ultrasonic irradiation. The rate and extent of DMCU degradation is related to that of DNA damage under certain conditions, which indicates that the generation of reactive oxygen species in the sonochemical reaction of DMCU is responsible for the damage of DNA. The results of this study can provide a strong evidence for the inference of sonosensitizing effectiveness of DMCU.

Key words: curcumin analogues; sonosensitizing property; reactive oxygen; acoustochemical mechanism; DNA damaging

0 引言

姜黄素(Curcumin)是从中国传统中草药的根茎中提取的一种成分, 对多种肿瘤细胞具有抗增殖活

性和诱导凋亡作用, 在体内可抑制肿瘤发生, 具有良好的临床应用潜力^[1]。为提高其体内抗癌活性, 人们对姜黄素结构进行了大量的修饰和改造, 出现了许多活性显著的姜黄素类似物^[2], 但是大多数类似物因体内血药浓度过低或消除迅速而不能发挥治疗作用^[3]。声动力疗法(SonoDynamic Therapy, SDT)是近年兴起的一种极具临床应用前景的肿瘤治疗新方法, 利用肿瘤细胞和正常细胞在氧化还原平衡方面的差异, 通过超声波照射声敏剂(声敏药物)产生协同作用, 提高肿瘤细胞内的活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)水平, 导致细胞死

收稿日期: 2019-06-17; 修回日期: 2019-09-05

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究经费资助项目(LJC201908)、辽宁省自然科学基金资助计划(2019-MS-153)、辽宁大学大学生创新创业计划训练项目经费支持。

作者简介: 刘冰弥(1974-), 女, 湖北天门人, 副教授, 研究方向为药物化学。

通讯作者: 刘宇, E-mail: liuyu0710@163.com

亡^[4-6], 这种协同作用产生的效果比单独药物作用更强。因而, 使用更小剂量的声敏药物结合超声波照射就能达到治疗效果。针对大多数抗癌活性显著的姜黄素类似物都存在体内血药浓度低的缺点, 设想从姜黄素类似物中筛选出声敏剂, 利用超声与低浓度姜黄素类似物的协同作用达到抗肿瘤效果。

姜黄素、羟基乙酰化姜黄素、4,4-双甲基姜黄素(dimethylcurcumin, DMCU)的分子结构如图 1 所示。研究发现姜黄素及其衍生物羟基乙酰化姜黄素(见图 1)均具有声敏性^[7-8]。我们合成的姜黄素类似物 4,4-双甲基姜黄素^[9], 其化学结构与姜黄素及羟基乙酰化姜黄素差异较小, 因此推测 DMCU 具有声敏性。先前的研究已经证实了 DMCU 可与小牛胸腺双链 DNA 以沟槽结合模式形成稳定的复合物, 且两者的距离在 2~8 nm 范围内^[10]。研究表明, 当 ROS 与 DNA 之间的距离在 1.5~9 nm 范围内时, 可直接攻击 DNA, 造成 DNA 损伤^[11]。因而, 认为超声结合 DMCU 产生的 ROS 可有效损伤 DNA, 从而引起 DNA 构象发生变化。为了验证上述推测, 本文以 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)作为检测 DNA 分子构象变化的荧光探针, 利用荧光光谱技术研究超声波照射结合 DMCU 对 DNA 的损伤作用, 从而为 ROS 的产生及其作用提供依据。另一方面, 鉴于 ROS 生成被认为是 SDT 的主要机制, 本文在模拟人体生理条件下采用氧化-萃取分光光度法^[12]检测超声过程中产生的 ROS, 并使用 ROS 清除剂鉴别 ROS 种类, 从而对超声作用条件下 DMCU 损伤 DNA 的声化学机制进行初步探讨。

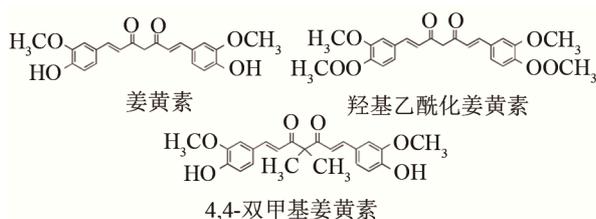


图 1 姜黄素、羟基乙酰化姜黄素、4,4-双甲基姜黄素(DMCU)的分子结构

Fig.1 The molecular structures of curcumin and hydroxyl-acetylated curcumin, and 4,4-dimethylcurcumin (DMCU)

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

KQ-500DE 型数控超声仪(昆山超声仪器有限公司), 频率为 40 kHz, 功率为 200 W。UV-2550 紫外可见分光光度计(Shimadzu Co., 日本); F-7000 荧光光谱仪(Hitachi High-Technologies Co., 日本); AL204 电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限

公司); PHS-3TC 酸度计; 微量进样器。

脱氧核糖核酸(小牛胸腺 DNA, 北京奥博星生物技术责任有限公司产品)储备液浓度为 $7.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; DMCU(实验室自制)储备液浓度为 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris, AR, 天津市博迪化工有限公司); 4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(DAPI, AR, 上海浩然生物技术有限公司)浓度为 $7.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 二苯卡巴肼(DPCI, AR, 国药集团化学试剂有限公司)储备液浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 抗坏血酸(Vc, AR, 国药集团化学试剂有限公司); 甘露醇(D-Mann, AR, 天津博迪化工股份有限公司); L-组氨酸(L-His, AR, 天津市光复精细化工研究所), 三种清除剂的储备液浓度均为 $5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验用水为二次蒸馏水, 其余试剂均为市售分析纯。实验中所有超声作用过程均避光操作, 水温均保持在 35~37 °C。

2.2 实验方法

2.2.1 DMCU 的降解及超声时间的研究

将 7 个规格均为 25 mL 的容量瓶, 编号为 1~7 号。先向每个容量瓶加入相同体积的 DMCU 储备液, 用缓冲液定容。将上述溶液分别转移至规格为 50 mL 的锥形瓶中, 封口后, 超声作用分别 0、1、2、3、4、5、6 h。超声作用结束后, 测定紫外吸收光谱。

2.2.2 超声波照射 DMCU 溶液产生 ROS 的测定

取 6 个规格均为 50 mL 的容量瓶, 分别标为 1~6 号, 依次向其中加入不同体积的 DMCU 储备液, 再加入同体积 DPCI 储备液, 用缓冲溶液定容。移取 25 mL 上述溶液至规格为 50 mL 的锥形瓶中, 封口后超声作用 3 h。剩余溶液避光保存。在超声作用过程中每隔半小时将每个锥形瓶按顺时针方向移位一次, 消除因不同位点超声强度略有差异导致的机械误差。超声作用结束后, 用苯与四氯化碳的混合溶液(体积比 1:1)对两组溶液进行萃取, 移取有机层溶液测定紫外吸收光谱。实验重复 3 次。

2.2.3 超声作用前后 DMCU 对 DNA 损伤程度比较

取 6 个规格均为 25 mL 的容量瓶, 编号为 a~f。向 a、b、c、d 中分别加入同体积的 DMCU 储备液, 再向 c、d、e、f 中加入同体积的 DNA 储备液, 用缓冲液定容。将 b、d、f 中的溶液分别转移至规格为 50 mL 的锥形瓶中, 封口后超声作用 3 h, a、c、e 瓶避光保存。超声作用结束后, 检测 a~f 溶液的紫外吸收光谱。

另取 4 个规格均为 25 mL 的容量瓶, 编号为 g~j, 分别加入同体积 DNA 储备液, 在 g 和 h 中加入

同体积 DMCU 储备液, 然后向 4 个瓶中加入缓冲液, 使得每瓶中的溶液体积均为 20 mL。将 j 和 h 中的溶液转移至规格为 50 mL 的锥形瓶中, 封口超声作用 3 h。另外两瓶溶液避光保存。超声作用结束后, 分别向这 4 瓶溶液中加入 DAPI 储备液。检测 a~d 及 g~j 溶液在 275 nm 波长处激发的荧光光谱。

2.2.4 DMCU 浓度对 DNA 损伤程度的影响

取 7 个规格为 50 mL 的容量瓶, 编号为 a~g。依次向其中加入不同体积 DMCU 储备液, 再加入同体积 DNA 储备液, 最后加入缓冲液使每瓶中的溶液体积均为 40 mL。分别移取上述溶液 20 mL 至规格为 50 mL 的锥形瓶, 封口超声作用 3 h。在超声作用过程中, 每隔半小时将锥形瓶按顺时针方向移动一次, 以消除不同位点对超声强度造成的误差。剩余溶液避光保存。超声作用结束之后, 分别向这 14 份溶液中加入同体积的 DAPI 储备液, 检测 275 nm 波长处激发的荧光光谱。

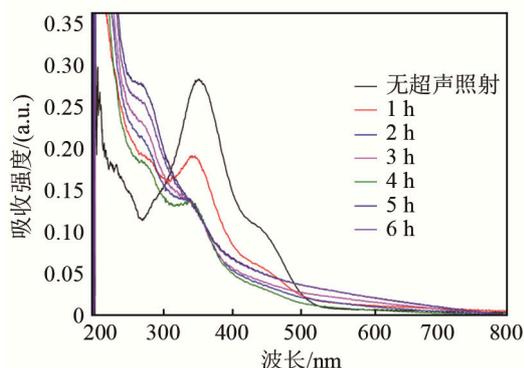
2.2.5 ROS 的种类

选择产生 ROS 量最大的 DMCU 浓度进行实验。取 4 个 50 mL 容量瓶, 先加入一定体积 DPCI 和 DMCU 储备液, 再向其中 3 瓶分别加入同体积的 Vc、L-His 和 D-Mann 储备液, 剩下一瓶溶液不加清除剂。超声作用 3 h 后对所有溶液进行萃取, 移取有机层溶液测定紫外吸收光谱。实验重复 3 次。

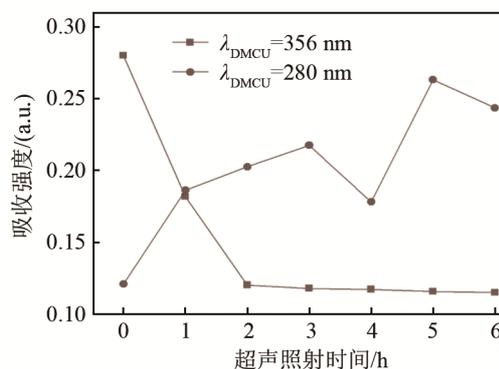
3 结果与讨论

3.1 DMCU 的降解及超声时间的确定

浓度为 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DMCU 溶液在不同超声作用时间的紫外吸收光谱以及在波长 356 nm 和 280 nm 处的吸光强度如图 2(a)、2(b)所示。在 200~550 nm 波长范围内, DMCU 在波长 356 nm 处出现了最强吸收峰。经超声波照射后 DMCU 发生了降解, 在波长 280 nm 附近出现了新的吸收峰, 可能是含有双 α, β -不饱和酮结构的 DMCU 分子降解生成了含单个 α, β -不饱和酮结构的化合物分子。根据图 2(b)可获得 DMCU 在这两个波长处的吸收强度随超声作用时间变化曲线。如图 2(b)所示, 随着超声波照射时间的增加, DMCU 在波长 356 nm 处的吸收强度迅速下降, 2 h 后趋于稳定, 表明 DMCU 已经完全降解; 在波长 280 nm 处的吸收强度随着超声时间的增加而升高, 3 h 后吸收强度存在较明显的波动。因此, 将后续实验中的超声作用时间设定为 3 h。



(a) 不同超声照射时间的吸收光谱



(b) 波长 356 nm 和 280 nm 处吸收强度随超声照射时间的变化

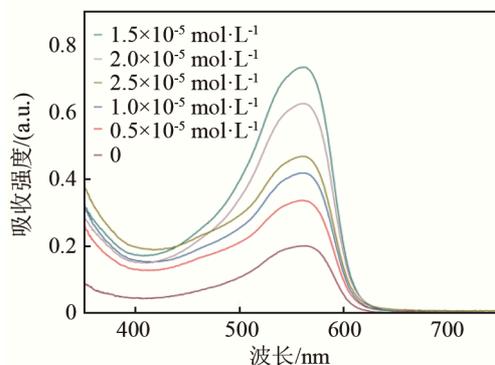
图 2 DMCU 降解的吸收光谱以及 DMCU 在波长 356 nm 和 280 nm 处的吸光度随超声照射时间的变化

Fig.2 (a) Absorption spectra of DMCU degradation and (b) the absorbance changes of DMCU solution at 356 nm and 280 nm with different ultrasonic irradiation times

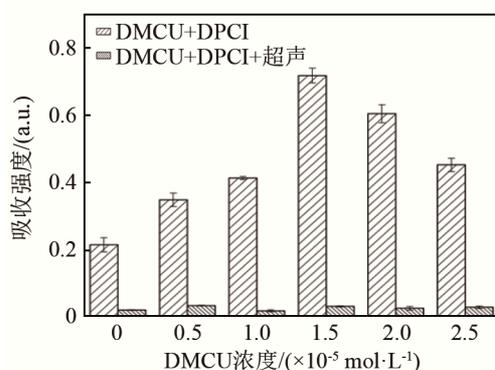
3.2 超声作用条件下 DMCU 浓度与 ROS 的产量关系

氧化-萃取分光光度法是一种简单有效的检测 ROS 的方法, 水溶性的 DPCI 可被 ROS 氧化成不溶于水的 1,5-二苯基卡巴腓(Diphenylcarbazone, DPCO), 通过有机溶剂萃取出的 DPCO 在波长 563 nm 处, 吸收光谱有最大吸收峰, 且吸收强度与 ROS 的产量呈正相关性^[12]。图 3(a)描述了超声波照射不同浓度 DMCU 溶液的过程中生成的 DPCO 的吸收光谱图。由图 3(a)中可以看出, 超声照射 3 h 的有机层溶液均在波长 563 nm 处有明显的吸收峰, 表明溶液中均产生了 ROS。此外, 单纯超声作用虽然也能使溶液中产生 ROS, 但产量较低, 加入 DMCU 后 ROS 明显增多。图 3(b)中比较了超声照射和未经超声照射两种情况下, 不同浓度的 DMCU 溶液在波长 563 nm 处的吸收值, DPCI 浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 超声作用时间为 3 h, 数据用三个实验的平均值 \pm 标准差表示。如图 3(b)所示, 未经超声照射的不同浓度的 DMCU 溶液在波长 563 nm 处的吸收值差别不大, 但与超声照射组相比差异明显。另外, 随着 DMCU 浓度增大, ROS 产量逐渐

升高, 当 DMCU 浓度为 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ROS 产量达到最大, 原因可能是当浓度高于 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后, 溶液中过多的 DMCU 阻滞了声致发光的传导, 导致产生的 ROS 减少。



(a) 不同 DMCU 浓度的吸收光谱



(b) 在无超声照射下 DPCO 在 563 nm 处吸光强度

图 3 (a) 浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPCI 与不同浓度 DMCU 混合的溶液中产生的 DPCO 的吸收光谱; (b) 在 3 小时超声照射和无超声照射下 DPCO 在 563 nm 处的吸光度变化

Fig.3 (a) Absorption spectra of the generated DPCO in the mixed solutions of DPCI ($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and DMCU (different concentrations) and (b) the absorbance changes of DPCO at 563 nm under 3 hours of ultrasonic irradiation or non-irradiation

3.3 超声照射前后 DMCU 及 DMCU+DNA 溶液的吸收光谱

在 DNA 溶液和 DMCU 溶液浓度均为 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, DNA、DMCU 及 DNA+DMCU 溶液在超声照射和无照射条件下的吸收光谱如图 4 所示。从图 4 可知, 单独 DNA 溶液的特征吸收峰值在 261 nm 处, 而 DNA 与 DMCU 混合液在波长 261 nm 处的吸收强度显著提高, 说明加入 DMCU 后的 DNA 溶液发生了明显的增色效应, 表明 DMCU 与 DNA 形成了复合物 DNA-DMCU。超声作用条件下单独 DNA 溶液相较于无超声照射的溶液表现出增色效应, 表明 DNA 受到了损伤, 其构型发生了变化。其原因可以解释为超声照射过程中溶液中产生了具有高氧化活性的 ROS, 它们在短时间内攻击近旁的 DNA 分子, 使得 DNA 分子的空

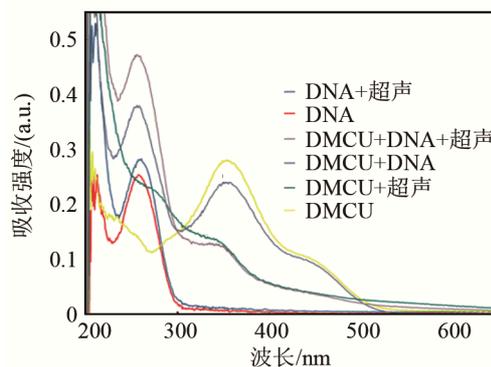


图 4 DNA、DMCU 及 DNA+DMCU 溶液在 3 小时超声照射和无照射条件下的吸收光谱

Fig.4 Absorption spectra of DNA, DMCU and DNA+DMCU solutions under 3 hours of ultrasonic irradiation or non-irradiation

间结构遭到破坏, 双螺旋结构展开, DNA 的碱基对被暴露出来, 导致其特征吸收峰处的吸收强度增大^[13]。此外, 由于 DMCU 的降解产物与 DNA 的吸收谱带部分重叠, 因而不能通过比较超声前后 DNA 与 DMCU 混合溶液在波长 261 nm 处附近的吸收强度判断 DNA 的受损程度。因此, 我们借助荧光探针通过荧光光谱法来进行比较。

3.4 超声照射前后 DMCU 存在下 DNA 损伤程度的对比

文献[10]已经证实, 在模拟生理条件下 DMCU 与 DNA 可形成复合物 DNA-DMCU, 且其可与 DNA 小沟结合的荧光探针 DAPI 发生竞争取代反应。在 360 nm 的激发波长下, DNA-DAPI 复合物的最强发射峰出现在波长 460 nm 附近^[14], 超声前后的 DMCU 溶液在波长 400~500 nm 范围内均有荧光, 因而对复合物的荧光强度可产生干扰。当将激发波长设定为 275 nm, DNA、DMCU、DAPI 溶液浓度均为 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 超声波照射前后的 DNA 与 DMCU 混合溶液 c 与 d 及单纯 DMCU 溶液 a 与 b 的最强荧光发射峰均出现在波长 350 nm 附近, 而 DNA-DAPI 复合物在波长 463 nm 处出现最强发射峰 (见图 5)。因此, 我们选择 275 nm 作为激发波长, 以消除其他物质对 DNA-DAPI 复合物荧光强度的影响。

由图 5 可知, 以 DAPI 作为荧光探针, 超声照射的 DNA 溶液 j 相较于无超声照射的 DNA 溶液 i 在波长 463 nm 处的荧光强度有所下降, 表明单独超声波照射仅对 DNA 分子造成轻微损伤。此外, 在无超声照射条件下, 先将 DMCU 加入到 DNA 溶液, 然后再加入 DAPI 荧光探针, 由此形成的混合溶液 g 在波长 463 nm 处的荧光强度明显低于 DNA+DAPI 混合溶液 i, 表明在溶液 g 中, DMCU 先与 DNA 发生了相互作用, 与一定量的 DNA 分子

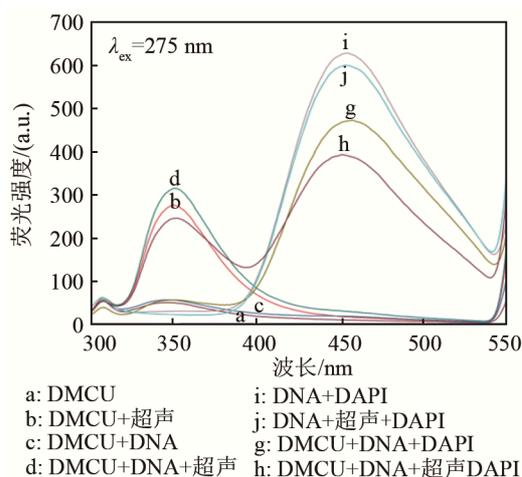


图5 DMCU、DNA+DAPI、DNA+DMCU+DAPI 溶液在 3 小时超声照射和无照射条件下的荧光光谱

Fig.5 Fluorescence spectra of DMCU, DNA+DAPI and DNA+DMCU+DAPI solutions under 3 hours of ultrasonic irradiation or non-irradiation

形成了几乎无荧光的复合物 DNA-DMCU，后加入的 DAPI 与该复合物上 DMCU 发生竞争取代反应，将一部分 DMCU 取代下来，同时形成强荧光的 DNA-DAPI 复合物。由于溶液 i 和 g 中 DNA 浓度相同，则 g 中与 DAPI 相结合的 DNA 分子数量少于 i 中的 DNA 分子数量，因而形成强荧光的 DNA-DAPI 复合物少于 i 溶液。然而，超声照射后的 DNA+DMCU 混合溶液再加入 DAPI 荧光探针，由此形成的混合溶液 h 在波长 463 nm 附近的荧光强度比无超声照射的混合溶液 g 更低。因此可以推测，除了 DMCU 结合造成的 DNA 损伤外，超声结合 DMCU 产生的协同效应也对 DNA 产生了损伤。通过 4 种溶液体系在 463 nm 附近的荧光强度值可知，由溶液 g→h 的荧光强度差值大于由溶液 i→g 的差值，表明超声结合 DMCU 产生的协同效应可使 DNA 发生严重损伤，且效果比单独使用超声波照射或单独使用 DMCU 更好。

3.5 DMCU 浓度对 DNA 损伤程度的影响

为了进一步考察超声条件下 DMCU 浓度对 DNA 损伤的影响，以 DAPI 作为荧光探针通过荧光光谱比较了超声照射(3 h)和无超声照射条件下 DNA 的损伤程度，结果如图 6 所示。实验中，DNA 和 DAPI 的浓度均为 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在无超声波照射和超声波照射(3 h)两种条件下，在波长 463 nm 处的荧光强度都随着 DMCU 浓度升高而降低，表明随着 DMCU 浓度的增加，DMCU 与结合在 DNA 分子上的荧光探针 DAPI 发生了竞争取代，致使 DNA-DAPI 复合物减少，从而导致荧光强度降低，但超声照射组荧光强度降低的程度比未照射超声

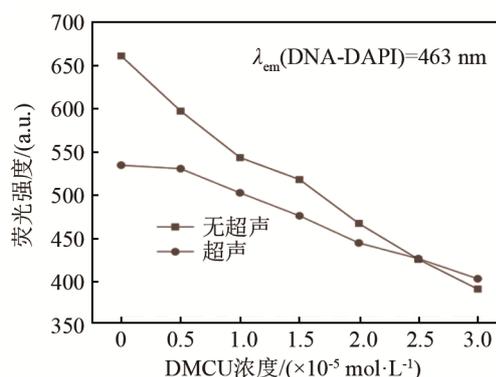


图6 在 3 小时超声照射和无照射条件下，以 DAPI 为探针的不同浓度 DMCU 与 DNA 混合溶液在 463 nm 处荧光强度对比
Fig.6 Comparison of the fluorescence intensity at 463 nm of the mixed solution of DNA and DMCU (different concentrations) with DAPI as a probe under 3 hours of ultrasonic irradiation or non-irradiation

组更大。以上结果表明，在一定时长的超声波照射条件下，随着 DMCU 浓度升高，ROS 产量增多，因而有更大的几率破坏 DNA 分子，导致在波长 463 nm 处的荧光强度降低，为超声结合 DMCU 协同产生的 ROS 对 DNA 造成了进一步损伤的结论提供了有力的证据支撑。

3.6 ROS 种类的鉴别

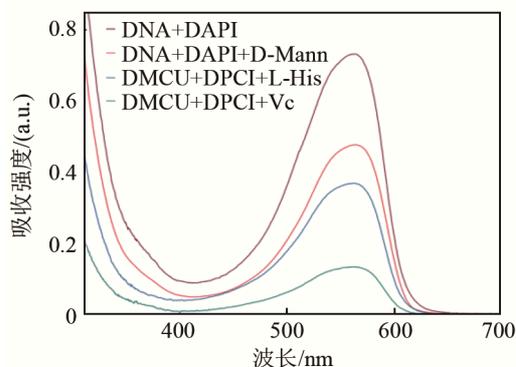
为了鉴定 ROS 种类，本文选取 Vc、L-His 和 D-Mann 三种 ROS 清除剂进行研究。不同类型 ROS 清除剂对 DPCO 吸收值的影响如图 7(a)所示。

实验中 DPCI 浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，DMCU 浓度为 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，D-mann、L-His、Vc 的浓度为 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，作用时间为 3 h。数据用 3 个实验的平均值 ± 标准差表示。*表示 $P < 0.05$ ，与对照溶液(DMCU+DPCI+US)相比有显著差异，NS 表示 D-Mann 组与 L-His 组之间无显著差异。Vc 可以清除所有种类的 ROS^[15]；L-His 是单线态氧($^1\text{O}_2$)和羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除剂^[6]；而 D-Man 则只能清除溶液中的 $\cdot\text{OH}$ ^[17]。

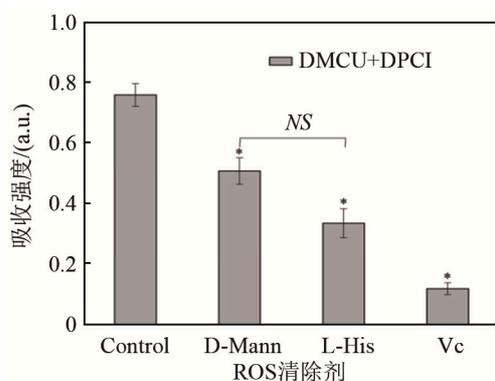
如图 7(a)所示，在加入 Vc 后，DPCO 吸收值明显降低，降低的程度与 ROS 清除剂对不同种类 ROS 清除的程度有关，因此可推测混合溶液中将 DPCI 氧化为 DPCO 的物质主要为 ROS。

根据图 7(b)，经计算可知，L-His 与 D-Man 两种清除剂对 DPCO 的吸收值之比 $P > 0.05$ 。因此，二者对 DPCO 吸收值的影响并无显著差别，表明超声结合 DMCU 产生的 ROS 主要含有 $\cdot\text{OH}$ 。最近，香港中文大学的 XU C S 小组分别用 $^1\text{O}_2$ 清除剂叠氮化钠和 $\cdot\text{OH}$ 清除剂硫脲证实了经超声波照射的姜黄素溶液中产生了 $^1\text{O}_2$ 和 $\cdot\text{OH}$ 两种类型的 ROS^[18]，与本实验结果具有部分一致性。此外，有研究发现

单纯对脱氧水超声产生的 ROS 类别主要为 $^1\text{O}_2$ ，结合本实验结果，我们认为 $\cdot\text{OH}$ 的产生与超声介导 DMCU 的降解相关。



(a) 超声照射 DPCI-DMCU 混合溶液产生的 DPCO 在不同 ROS 清除剂存在下的吸收光谱



(b) 563 nm 处 DPCO 的吸光度

图 7 (a) 在 3 小时超声照射和存在不同 ROS 清除剂的条件下 DPCI-DMCU 混合溶液产生的 DPCO 的吸收光谱；(b) 不同 ROS 清除剂对 563 nm 处 DPCO 的吸光度的影响

Fig.7 (a) Absorption spectra of the generated DPCO of DPCI-DMCU mixed solutions in the presence of different ROS scavengers and 3 hours of ultrasonic irradiation and (b) the effects of the different ROS scavengers on the absorbance of DPCO at 563 nm

4 结论

本文以 DAPI 为荧光探针，利用荧光光谱技术研究了 4,4-双甲基姜黄素(DMCU)存在条件下超声波照射对 DNA 的损伤，考察了药物浓度对 DNA 损伤程度的影响，并对相关机制进行了初步探索。结果表明，超声结合 DMCU 产生的协同效应对 DNA 损伤的程度比单纯 DMCU 和单纯超声都要大。声化学机制研究表明，超声与 DMCU 协同作用过程中种类为羟基自由基的活性氧的产生与超声介导 DMCU 的降解相关。本论文的研究结果一方面尝试为天然活性产物的药物化学研究结果开辟新的应用领域，另一方面希望为新型声敏剂的筛选和开发提供理论依据和实践基础。

参 考 文 献

- [1] VALLIANOU N G, EVANGELOPOULOS A, SCHIZAS N, et al. Potential anticancer properties and mechanisms of action of curcumin[J]. *Anticancer Research*, 2015, **35**(2): 645-651.
- [2] VYAS A, DANDAWATE P, PADHYE S, et al. Perspectives on new synthetic curcumin analogs and their potential anticancer properties[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2013, **19**(11): 2047-2069.
- [3] MAHRAN R I, HAGRAS M M, SUN D, et al. Bringing curcumin to the clinic in cancer prevention: a review of strategies to enhance bioavailability and efficacy[J]. *The AAPS Journal* 2017, **19**(1): 54-81.
- [4] ROSENTHAL I, SOSTARIC J Z, RIESZ P. Sonodynamic therapy-a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound[J]. *Ultrasonics sonochemistry* 2004, **11**(6): 349-363.
- [5] FERIL Jr L B, KONDO T, UMEMURA S, et al. Sound waves and antineoplastic drugs: the possibility of an enhanced combined anticancer therapy[J]. *Journal of Medical Ultrasonics* 2002, **29**(4): 173-187.
- [6] WAN G Y, LIU Y, CHEN B W, et al. Recent advances of sonodynamic therapy in cancer treatment[J]. *Cancer Biology and Medicine*, 2016, **13**(3): 325-338.
- [7] PANG X, XU C S, JIANG Y, et al. Natural products in the discovery of novel sonosensitizers[J]. *Pharmacology & therapeutics* 2016, **162**: 144-151.
- [8] ZHENG L B, LI Y, LI X L, et al. Combination of hydroxyl acetylated curcumin and ultrasound induces macrophage autophagy with anti-apoptotic and anti-lipid aggregation effects[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2016, **39**(5): 1746-1760.
- [9] LIU B M, XIA M Y, JI X L, et al. Synthesis and antiproliferative effect of novel curcumin analogues[J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2013, **61**(7): 757-763.
- [10] LIU B M, BAI C L, ZHANG J, et al. In vitro study on the interaction of 4, 4-dimethylcurcumin with calf thymus DNA[J]. *Journal of Luminescence*, 2015, **166**: 48-53.
- [11] WISEMAN H, HALLIWELL B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer[J]. *Biochemical Journal*, 1996, **313**(Pt 1): 17-29.
- [12] WANG J, GUO Y W, GAO J Q, et al. Detection and comparison of reactive oxygen species (ROS) generated by chlorophyllin metal (Fe, Mg and Cu) complexes under ultrasonic and visible-light irradiation[J]. *Ultrasonics sonochemistry*, 2011, **18**(5): 1028-1034.
- [13] WANG Q, WU Q, WANG J, et al. Spectroscopic investigation on interaction and sonodynamic damage of Riboflavin to DNA under ultrasonic irradiation by using methylene blue as fluorescent probe[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, **117**: 754-762.
- [14] KAPUŚCIŃSKI J, SKOCZYLAŚ B. Simple and rapid fluorimetric method for DNA microassay[J]. *Analytical biochemistry*, 1977, **83**(1): 252-257.
- [15] YU T H, BAI J, HU K, et al. The effect of free radical scavenger and antioxidant on the increase in intracellular adriamycin accumulation induced by ultrasound[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2003, **10**(1): 33-35.
- [16] YUMITA N, NISHIGAKI R, SAKATA I, et al. Sonodynamically induced antitumor effect of 4-formyloxymethylidene-3-hydroxy-2-vinyl-deuterio-porphyrin(ix)-6,7-diaspartic acid (ATX-S10)[J]. *Cancer Science*, 2000, **91**(2): 255-260.
- [17] DESESSO J M, SCIALLI A R, GOERINGER G C. D-mannitol, a specific hydroxyl free radical scavenger, reduces the developmental toxicity of hydroxyurea in rabbits[J]. *Teratology*, 1994, **49**(4): 248-59.
- [18] XU C S, IP M, LEUNG A W, et al. Sonodynamic bactericidal activity of curcumin against foodborne bacteria[J]. *Hong Kong Medical Journal*, 2018, **24**(5): 43-44.