

洛美沙星对 Bloom 综合征解旋酶生物学特性影响的机理研究*

骆 衡^{1, 2)} 陈 祥^{1, 3)} 丁 玫¹⁾ 杨齐心¹⁾ 许厚强^{1)**}

¹⁾ 高原山地动物遗传育种与繁殖省部共建教育部重点实验室, 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025;

²⁾ 贵州大学贵州省山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025;

³⁾ 贵州大学教育部绿色农药与农业生物工程重点实验室, 贵阳 550025)

摘要 Bloom 综合征解旋酶(BLM)是 RecQ 家族 DNA 解旋酶中的一个重要成员, 参与了 DNA 复制、修复、转录、重组以及端粒的维持等细胞代谢过程, 在维持染色体的稳定性中具有重要作用. BLM 解旋酶的突变可导致 Bloom 综合征. Bloom 综合征是一种罕见隐性常染色体遗传疾病, 患者遗传不稳定, 并易患多种类型癌症. 洛美沙星(LMX)可以抑制细胞内多种酶, 并通过结合 DNA 干扰 DNA 代谢, 从而治疗多种疾病, 但是其具体的作用机理还未完全清楚. 运用荧光偏振技术和自由磷检测技术, 研究了 LMX 对 BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰ 解旋酶 DNA 结合活性、解链活性和 ATP 酶活性的影响. 运用荧光及紫外吸收光谱法研究了 LMX 与解旋酶结合的结合常数、结合位点数、作用力类型、结合距离等参数. 结果表明, LMX 与解旋酶之间能自发进行反应, 两种分子有一个结合位点, 通过静电引力和疏水作用力形成稳定的 BLM-LMX 复合物, 且解旋酶的内源荧光被 LMX 静态猝灭, 主要原因是非辐射能量转移. 在这一过程中, LMX 能抑制解旋酶的解链活性和 ATP 酶活性, 而促进解旋酶的 DNA 结合活性. LMX 对 BLM 解旋酶生物学活性影响的机理可能是 LMX 使解旋酶通过别构机制影响其 ATP 酶活性, 并使酶的构象维持在较低解链活性的状态, 通过抑制 ATP 催化水解与解链过程的偶联和阻止解旋酶的易位, 从而抑制其解链. LMX 能够促进解旋酶的 DNA 结合活性, 可能是由于其 C-6 和 C-7 上的取代功能基团可以增加酶活力, 以及增强药物、酶和 DNA 的结合, 从而形成药物-酶-DNA 复合物. 这些结果为研究以 DNA 解旋酶为药物靶标的分子机理和理解喹诺酮类药物的作用机理奠定相关理论基础.

关键词 洛美沙星, BLM 解旋酶, 生物学特性, 机理

学科分类号 R733.7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00178

DNA 解旋酶在 DNA 的复制、修复、重组、转录、维持染色体稳定性等细胞代谢过程中都具有非常重要的作用^[1-3]. DNA 解旋酶利用催化核苷三磷酸水解所释放的化学能来解开双链 DNA 两条链之间的氢键, 从而使双链 DNA 解链成单链 DNA^[4]. RecQ 解旋酶家族是 DNA 解旋酶中的一个重要家族, 在人类 RecQ 解旋酶家族成员中的 RecQ 解旋酶基因发生突变会导致遗传不稳定性并引起相关疾病, 如癌症^[5-6]. 在生物进化过程中, RecQ 解螺旋酶从细菌到人具有很高的保守性, 在维持各种生物体的遗传稳定性中具有重要作用, 也在许多细胞代谢过程中起着关键作用^[7]. 自从发现了与 RecQ 解旋酶家族成员相关的人类疾病后, RecQ 解旋酶家

族成员的研究便引起了广泛关注. 在人类中已经确定的 RECQ1、BLM、WRN、RECQ4 和 RECQ5 5 种解旋酶属于 RecQ 解旋酶家族^[8]. BLM、WRN 和 RECQ4 缺陷会相应地引起 Bloom、Werner 和 Rothmund-thomson 综合征(RTS)^[9]. 由于 RecQ 解旋酶参与了复制、重组和修复等 DNA 代谢过程,

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2010CB534912), 教育部博士点基金(200806570003), 贵州省优秀人才省长基金(200822)和贵州省创新科研基金(SYN 2009005)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0851-8292183, E-mail: houqiang0524@yahoo.com

收稿日期: 2011-04-23, 接受日期: 2011-06-16

而人 RecQ 解旋酶的缺陷会导致早衰及癌症等人类遗传性疾病, 因此, 人类 RecQ 解旋酶已经成为抗癌的一个潜在靶点^[10-11]. 目前治疗癌症主要是放射性治疗或化学药物治疗, 其主要机理是通过阻碍 DNA 复制或细胞分裂, 使癌细胞不能增殖, 而诱导癌症细胞死亡^[12]. 近年, 改善癌症治疗的重点是开发具有更多选择性的生物学方法以克服肿瘤细胞的抗药性, 尽量减少药物毒副作用^[13]. 以 DNA 解旋酶为靶标来设计和开发抗癌药物可以为治疗癌症提供新的思路^[12].

Bloom 综合征(BS)是一种常染色体隐性遗传疾病, 是由于 BLM 解旋酶基因(*BLM*)突变引起的^[14]. BLM 解旋酶由 1 417 个氨基酸组成^[15]. BS 病人的临床特征表现为身躯小、出生前或出生后引起的生长阻滞、面部有对光敏感的斑、女性的生育能力较低、男性不育、免疫缺陷及易患多种癌症^[16-17]. BLM 解旋酶在 DNA 解链过程中表现为 3'~5' 极性, 而且可以解开多种 DNA, 包括 3'端有缺口的双链 DNA、泡状 DNA、带有复制叉的双链 DNA、G- 四链体 DNA、D 型环状 DNA 及霍利迪结构 DNA^[18-20]. 先前的研究已经证明, BLM 解旋酶的 RecQ 核心区域(642~1290 氨基酸序列)具有与全酶的相似活性^[21].

洛美沙星(lomefloxacin, LMX)是第三代喹诺酮类抗菌药物, 具有抗菌谱广、活性强、毒副作用低及临床疗效高的特点^[22-23]. 其化学式见图 1. 研究证明, LMX 是通过抑制细菌的 DNA 旋转酶(拓扑异构酶 II)起杀菌作用, 临床上洛美沙星常用于呼吸道和胃肠道感染的治疗^[24]. 另外还有研究证明, LMX 在体外对咖啡因 3- 脱甲基酶有轻度抑制作用^[25]. 体内和体外实验结果都表明, LMX 对多种肝混合功能氧化酶有轻度抑制作用, 且有底物选择性^[26]. 研究报道, LMX 能够损坏纤维肿瘤细胞、角质肿瘤细胞和白种人特有的生黑色素肿瘤细胞的基因组 DNA, 从而干扰其代谢以治疗多种人类皮肤肿瘤细胞^[27].

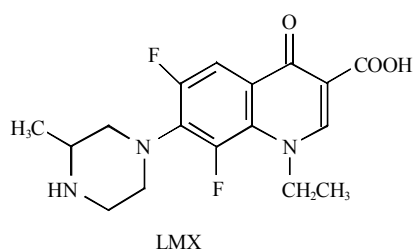


Fig. 1 The chemical structure of LMX

目前研究较多的是喹诺酮类药物与白蛋白的相互作用, 但真正研究其对细菌和人 DNA 解旋酶结构和功能的影响, 特别是直接作用于人 DNA 解旋酶对其结构功能影响的研究还未见报道. 本文应用荧光偏振技术、自由磷检测技术研究了 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶生物学活性的影响. 运用紫外吸收和荧光光谱法研究了 LMX 与 BLM^{642~1290} 解旋酶的相互作用, 并分析了 LMX 与解旋酶的结合常数、结合位点数、能量转移效率和相互结合距离等参数, 以探讨 LMX 对解旋酶生物学特性的影响机理, 为研究以 DNA 解旋酶为药物靶标的作用机理提供相关资料, 同时也为全面了解喹诺酮类药物的作用机理奠定理论基础.

1 材料与方法

1.1 试剂

本研究所用 ATP 酶活性检测试剂盒购自英国 Innova Biosciences 公司, LMX 标准品购于美国 Sigma 公司, 其他化学试剂为分析纯级别. 整个实验采用 Milli-Q 超纯水系统制成的超纯水作为实验用水. 解链活性检测缓冲液和 DNA 结合活性检测缓冲液为同一缓冲液, 其组成为 25 mmol/L Tris-HCl, 3 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl₂ 和 0.1 mmol/L DTT, pH 7.9. ATP 酶活性检测缓冲液为 0.1 mol/L Tris-HCl、5 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L ATP 和 4 nmol/L ssDNA(B1), pH 7.9. DNA 底物杂交缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl, pH 7.9.

1.2 BLM^{642~1290} 解旋酶制备

BLM^{642~1290} 重组大肠杆菌 BL21 菌株由法国巴黎第十一大学居里研究所的奚绪光主任研究员馈赠. 含有 6 个组氨酸串联标签(6×His)的 BLM 重组大肠杆菌在 17℃ 的 LB 培养基中用异丙基-β-D- 硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达 20 h, 收集菌体超声破碎(美国 Sonics 公司), 离心收集上清液在 AKTA purifier100 蛋白纯化仪上用镍亲和层析柱(美国 GE Healthcare 公司)和 Superdex 200(美国 GE Healthcare 公司)进行分离纯化, 获得可用于开展生物学特性研究的 BLM^{642~1290} 解旋酶^[17].

1.3 检测酶活性所用的 DNA 底物准备

PAGE 纯化的带有荧光标记的 DNA 底物合成于上海生物工程技术有限公司, 其序列和长度见

表 1. 两条互补单链 DNA(ssDNA)在缓冲液中等量混合, 85℃ 水浴 5 min, 缓慢冷却至室温. 复性后

的双链 DNA (dsDNA)作为检测解旋酶的 DNA 结合活性和解链活性的底物.

Table 1 Oligonucleotide sequences used in this study

Substrate	Length/bp	Sequence
A1	45	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGTTAGGTTAGGTTAGGTTT TTTT 3'
A2	21	3' F-TTAGGCAGCTCGTCTCAATCC 5'
B1	20	5' TGACCATCAGTTT TTTT 3'

F represents the fluorescein chemical group.

1.4 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶 DNA 结合活性影响的检测

用荧光偏振技术检测 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶 DNA 结合活性的影响^[28]. 用两种方法检测 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶 DNA 结合活性的影响. 一种是用 BLM^{642~1290} 解旋酶与 2 nmol/L DNA 先反应形成复合物, 再用 LMX 作用于复合物, 检测其荧光偏振值的变化; 另一种是先用 LMX 与 BLM^{642~1290} 解旋酶反应 5 min, 然后再加入到含有 2 nmol/L DNA 的反应缓冲液中与 DNA 结合, 检测其荧光偏振值的变化. 用同样方法检测 LMX 作用于 DNA 底物后的荧光偏振值的变化. 总反应体系均为 150 μ l, 样品在 25℃ 条件下进行检测. 为确保每一次反应达到平衡, 检测过的样品在 25℃ 平衡 30 min 后进行第二次检测, 检测的各向异性值不发生变化时表示反应达到平衡.

1.5 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶 DNA 解链活性影响的检测

先让 LMX 与 BLM^{642~1290} 解旋酶反应 5 min, 然后再加入到含有 2 nmol/L DNA 的反应缓冲液中与 DNA 结合, 25℃ 条件下检测其荧光偏振值的变化, 直到其稳定. 待其稳定后迅速加入 10 nmol/L 的 ATP, 检测其荧光偏振值的变化. 解链反应体系总体积为 150 μ l. 为了确保每一次反应达到平衡, 检测过的样品在 25℃ 平衡 30 min 后进行第二次检测, 检测的各向异性值不发生变化时表示反应达到平衡^[28].

1.6 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶 ATP 酶活性影响的检测

用 Janscak 等报道的方法检测 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶 ATP 酶活性的影响^[29]. 取稀释为 10 nmol/L 的 BLM^{642~1290} 解旋酶与不同浓度的 LMX 反应 2 min, 然后将混合液等体积加入到 ATP 酶活性检测缓冲液中, 在不同反应时间(2.5、5、7.5、10、15、20、

25 和 30 min)取出反应混合液 200 μ l, 迅速加入 50 μ l 橙色染料(Gold mix)以终止 ATP 水解反应, 2 min 后, 加入 20 μ l 稳定剂, 30 min 后在 650 nm 处检测其紫外吸收值. 将 BLM^{642~1290} 解旋酶的酶活力 A_{activity} 定义为每分钟催化 1 mol 底物水解所需的酶量(U/ml $\cdot$ min). 其酶活力可由方程式(1)计算得出, 该方程式来源于 ATP 酶活性检测试剂盒的使用说明书.

$$A_{\text{activity}} = \frac{A \times C}{500B} \quad (1)$$

式中, A 是根据标准曲线测出的 Pi 浓度(μ mol/L); B 是反应时间(min); C 是解旋酶的稀释倍数.

然后分别改变底物 ATP 的浓度, 根据米氏方程的双倒数作图法求出稳态下 40 nmol/L 解旋酶在不同的 LMX 浓度(0、4、10 和 100 μ mol/L)下相应的米氏常数(K_m)、底物的转换数(K_{cat})和解旋酶的最大反应速率(V_{max}), 并分析其差异.

1.7 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶的紫外光谱影响的检测

在 pH 7.9 的 Tris 缓冲液中, 加入终浓度为 10 μ mol/L 的 BLM^{642~1290} 解旋酶和不同浓度的 LMX, 混匀, 反应体系为 200 μ l, 室温静置 3 h, 测定紫外吸收光谱. 扫描图谱, 3 min 扫描一次, 直到其稳定. 扫描参数: 扫描步长为 1 nm, 扫描速度为 60 次/min, 扫描范围 200~350 nm. 另外, 用同样的方法扫描不同浓度的 LMX 在缓冲液中的紫外吸收光谱.

1.8 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶的荧光光谱影响的检测

在 pH 7.9 的 Tris 缓冲液中, 加入终浓度为 10 μ mol/L 的 BLM^{642~1290} 解旋酶和不同浓度的 LMX, 混匀, 反应体系为 200 μ l, 分别在 4℃、25℃ 和 40℃ 静置反应 3 h. 激发和发射的狭缝宽度均为

5 nm, 电压为 700 V, 在 280~400 nm 范围内扫描 10 nmol/L BLM^{642~1290} 解旋酶、10 nmol/L LMX、10 nmol/L BLM^{642~1290} 解旋酶在不同浓度的 LMX 作用下的荧光光谱, 获得其相对荧光强度。

小分子药物对生物大分子的作用通常会引起荧光猝灭或荧光增强。而荧光猝灭通常可分为动态猝灭和静态猝灭。动态猝灭是由于碰撞使得猝灭剂与激发态的荧光物质分子间发生能量转移或电子转移而引起的, 静态猝灭则是由于猝灭剂与荧光物质分子间发生配合作用, 从而产生了不发荧光的配合物。荧光猝灭符合 Stern-Volmer 方程^[30]:

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_s[Q] \quad (2)$$

式中, F_0 为无猝灭剂时的荧光强度, F 为加入猝灭剂后的荧光强度, K_q 为双分子猝灭过程速率常数, τ_0 为无猝灭剂时荧光体的荧光寿命, 对于生物大分子, τ_0 一般为 10^{-8} s^[30-31], $[Q]$ 为猝灭剂浓度。各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散控制的碰撞猝灭常数为 2.0×10^{10} L/(mol·s)^[32], 如果根据方程(2)得到 K_q 大于这个值, 则属于静态猝灭, 反之则属于动态猝灭。

在 LMX 与 BLM^{642~1290} 解旋酶的作用过程中, 假设 BLM^{642~1290} 解旋酶有 n 个相同且独立的可与 LMX 结合的位点。对于静态猝灭过程, 荧光强度与猝灭剂的关系符合下述方程^[33]:

$$\lg((F_0 - F)/F) = \lg K + n \lg [Q] \quad (3)$$

式中, F_0 和 F 分别是不存在和存在猝灭剂时的荧光强度, K 为蛋白质与猝灭剂的结合常数, n 为结合位点数, $[Q]$ 是猝灭剂 LMX 浓度。

药物等有机小分子和蛋白质之间的作用力主要有疏水作用力、氢键、范德华力和静电引力等。不同药物与蛋白质结合力的类型是不同的, 在温度变化不剧烈时, 反应的焓变 ΔH 可以看作是一个常数, 根据 Van't Hoff 方程可求得反应的焓变 ΔH 和熵变 ΔS 。Van't Hoff 方程为^[33]:

$$\ln K = \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (4)$$

其中, K 为药物与蛋白质结合的结合常数, R 为气体分子常数。以 $\ln K$ 对 $1/T$ 作图, 根据斜率和截距即可求得焓变 ΔH 和熵变 ΔS 。反应的吉布斯自由能 ΔG 可通过如下公式求得:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

在药物与生物大分子的反应中, 其主要作用类型可根据反应前后热力学参数焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的大小来判断: 当 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 时为疏水作用

力; 当 $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 时为氢键和范德华力; 当 $\Delta H \approx 0$, $\Delta S > 0$ 时为静电引力^[31]。

根据 Förster 非辐射能量转移理论^[31, 33], 当供能体荧光发射光谱与受能体的吸收光谱有足够程度的重叠, 且供能体与受能体之间的最大距离不超过 7 nm 时, 将会发生非辐射能量转移, 导致荧光猝灭, 由此可求出小分子化合物和蛋白质分子的结合位置相对于发射荧光的基团之间的距离。据此理论, 非辐射能量转移效率 E , 供能体与受能体之间的结合距离 r 及临界能量转移距离 R_0 之间有下列关系:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (6)$$

$$E = 1 - F/F_0 \quad (7)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^4 \phi_p J \quad (8)$$

式中, F 和 F_0 分别为存在和不存在受能体时供能体的荧光发射强度, K^2 即为偶极空间取向因子, 可取受能体和供能体各项随机分布的平均值 $2/3$, N 为介质折射常数, 一般取水和有机物折射指数的平均值 1.336, ϕ_p 为蛋白质的荧光量子产率, 通常取蛋白质中色氨酸的量子产率 0.15, J 为给体荧光发射光谱与受体吸收光谱的重叠积分, 可表示为

$$J = (\sum I_p(\lambda) \varepsilon_D(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda) / (\sum I_p(\lambda) \Delta\lambda) \quad (9)$$

式中 $I_p(\lambda)$ 是 BLM^{642~1290} 解旋酶在波长 λ 处的荧光强度, $\varepsilon_D(\lambda)$ 是 BLM^{642~1290} 解旋酶在波长 λ 处的摩尔吸光系数。由(8)式可以求出两光谱重叠区域的积分值 J , 并由(7)式求出 R_0 值, 由(6)和(5)式求出 E 和 r 值。

2 结 果

2.1 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶 DNA 结合活性的影响

LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶的 DNA 结合活性的影响见图 2。从结果可知, 无论 ssDNA (图 2a) 还是 dsDNA (图 2b) 作为解旋酶结合活性的底物, LMX 与酶直接反应后再与 DNA 反应和滴定 BLM-DNA 复合物, 其荧光偏振值均升高, 其升高的程度具有显著差异 ($P < 0.05$), 且 2 种 DNA 底物之间也存在极显著的差异 ($P < 0.01$)。LMX 滴定 BLM-ssDNA 复合物和 BLM-dsDNA 复合物增加的荧光偏振值, 均小于 LMX 直接与酶反应后再与相应 DNA 反应增加的荧光偏振值, 其差异显著 ($P < 0.05$)。ssDNA 作为底物时, 荧光偏振值从 ~ 100.2 上升到 ~ 220.4 ,

而 dsDNA 作为底物时, 荧光偏振值从 ~ 120.1 上升到 ~ 190.5 . dsDNA 作为底物其荧光偏振值上升的程度要低于 ssDNA 作为底物时上升的程度, 其差异极显著($P < 0.01$). 另外, 分析了 LMX 与 2 种 DNA 底物的作用(图 2c), 结果表明, LMX 作用于 2 种 DNA 后, 其荧光偏振值均上升, 但是 dsDNA

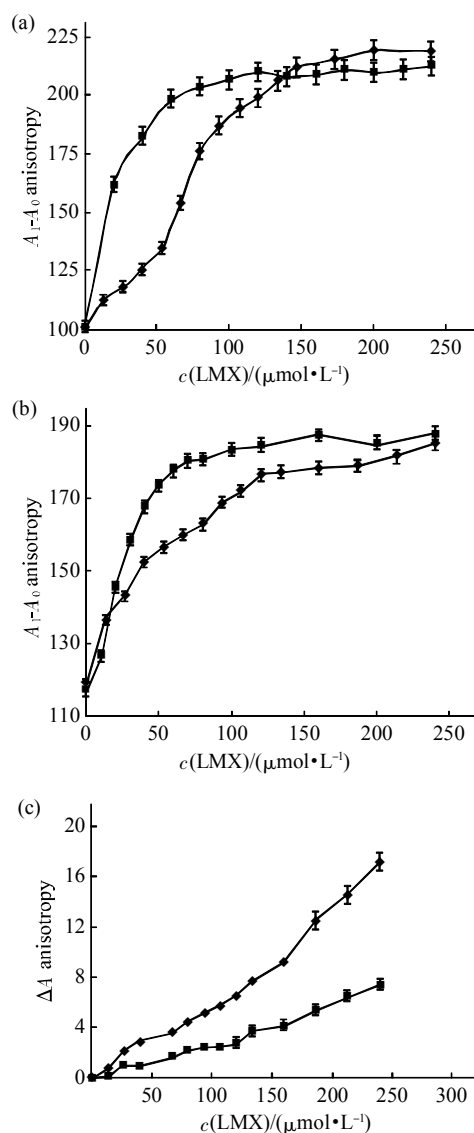


Fig. 2 Effects of LMX on the DNA-binding activity of BLM^{642~1290} helicase

Effects of LMX on BLM^{642~1290} helicase and helicase-DNA complexes when ssDNA (a) and dsDNA (b) as substrates were determined by fluorescence polarized technology. Series1, the helicase-ssDNA or helicase-dsDNA complexes were titrated by different concentrations of LMX. Series2, 2 nmol/L of fluorescein-labelled DNA was reacted with the miscible liquids of BLM^{642~1290} helicase and different concentrations of LMX. $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$: Series 1; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: Series 2. (c) The effects of LMX on ssDNA and dsDNA were assayed by fluorescence polarized technology. Data was $\bar{x} \pm s$ with five replicates and the same below. A_0 is the fluorescence anisotropy of ssDNA or dsDNA; A_1 is the fluorescence anisotropy of the miscible liquid of BLM^{642~1290} helicase and different concentrations of LMX. $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$: dsDNA; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: ssDNA.

的荧光偏振值上升的程度明显高于 ssDNA($P < 0.01$), 而其荧光偏振值上升的程度远小于 LMX 作用于酶或酶-DNA 复合物后上升的荧光偏振值($P < 0.01$), 说明 LMX 对解旋酶的 DNA 结合活性有促进作用.

2.2 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶解链活性的影响

LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶解链活性的影响结果见图 3. 从实验结果可知, 解旋酶的解链活性被 LMX 抑制, 当 LMX 浓度达到 $(120.0 \pm 2.5) \mu\text{mol/L}$ 时, 其解链活性达到最低, 但 LMX 浓度高于 $(120.0 \pm 2.5) \mu\text{mol/L}$ 时, 解旋酶的解链活性不再下降, 说明 LMX 不能完全抑制 BLM^{642~1290} 解旋酶的解链活性. LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶解链活性的半失活量(C_i)为 $(45.5 \pm 5.1) \mu\text{mol/L}$.

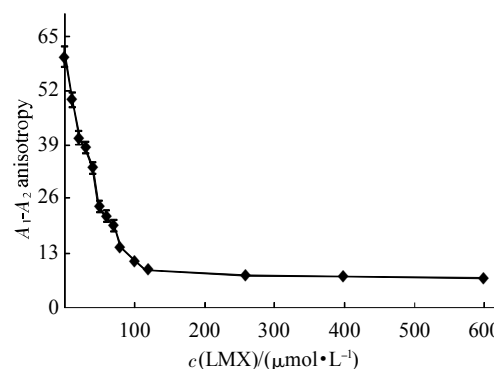


Fig. 3 Effects of LMX on the helicase activity of BLM^{642~1290} helicase

A_2 is the fluorescence anisotropy of the BLM^{642~1290} helicase after the addition of ATP.

2.3 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶 ATP 酶活性的影响

LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶的影响结果见图 4. 由结果可知, LMX 能够抑制解旋酶的 ATP 酶活性(图 4a), LMX 浓度达到 $(50.0 \pm 1.5) \mu\text{mol/L}$, 酶的 ATP 酶活性达到最低, 但随着药物的浓度继续增加, 其活性不再降低, 说明酶的 ATP 酶活性不能完全被 LMX 降低. LMX 对解旋酶的 ATP 酶活性的影响与时间有关($P < 0.01$, 图 4b), 随着时间的增加, 酶活力越来越低. 通过米氏方程的双倒数作图求出了 K_m 、 $V_{\max}$ 等常数, 结果见表 1. K_m 不变($P > 0.05$), 而 $V_{\max}$ 随着 LMX 浓度的增加而逐渐降低($P < 0.01$), 且 K_{cat} 随之下降低($P < 0.05$), 说明 LMX 对于解旋酶的 ATP 酶活性是一种非竞争性抑制剂. LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶 ATP 酶活性的半失活量(C_i)为 $(8.4 \pm 2.9) \mu\text{mol/L}$.

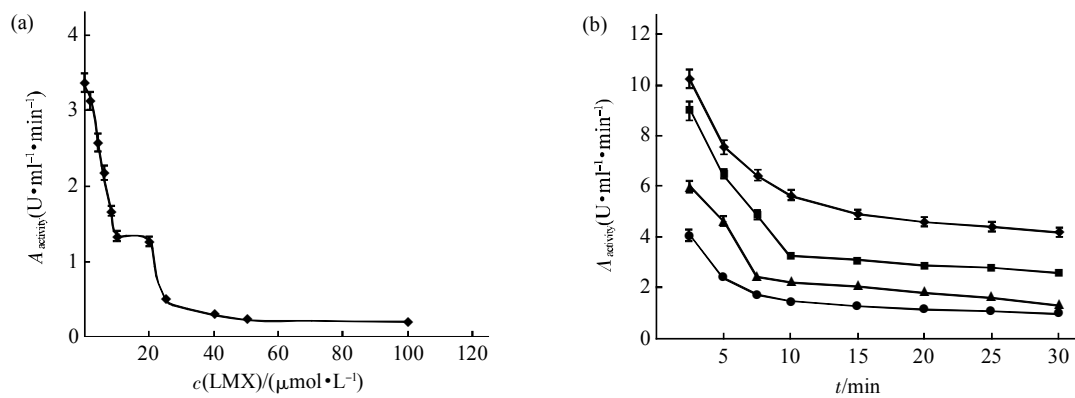


Fig. 4 Effects of LMX on the ATPase activity of BLM^{642~1290} helicase
(a) Time course of ATP hydrolysis [based on the equation (1)] by 40 nmol/L BLM^{642~1290} helicase in the presence of 0 μmol/L, 4 μmol/L, 10 μmol/L, and 100 μmol/L of LMX. (b) Curves of the activity of the miscible liquids of BLM^{642~1290} helicase and different concentrations of LMX. ◆◆ : 0 μmol/L; ■—■ : 4 μmol/L; ▲—▲ : 10 μmol/L; ●—● : 100 μmol/L.

BLM ^{642~1290}	ATPase			
	$V_{max}/(\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1})$	$K_m/\mu\text{mol}$	K_{cat}/s^{-1}	$[K_{cat}/K_m]/(\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1})$
Control	143.2 ± 25.6	184.6 ± 2.1	5.9 ± 1.5	2.4 ± 0.3
4 nmol/L LMX	$118.4 \pm 8.6^{**}$	185.9 ± 2.9	$4.6 \pm 1.3^*$	$1.9 \pm 0.3^{**}$
10 nmol/L LMX	$68.5 \pm 4.9^{**}$	182.9 ± 4.6	$2.5 \pm 1.2^*$	$1.1 \pm 0.4^{**}$
100 nmol/L LMX	$18.8 \pm 1.6^{**}$	183.1 ± 3.8	$1.1 \pm 0.5^*$	$0.8 \pm 0.2^{**}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the control group.

2.4 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶紫外光谱的影响

LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶紫外吸收光谱的影响结果见图 5。由结果可知, 加入 LMX 后, 解旋酶在 237 nm、276 nm 左右的吸收峰均呈现整体增强

(图 5a), 并且峰位发生蓝移。而蛋白质之所以能产生紫外吸收峰, 主要是因为蛋白质分子中某些氨基酸残基尤其是芳香氨基酸残基和肽键中存在生色基团, 一般在 210~240 nm 内的峰是肽键的强吸收

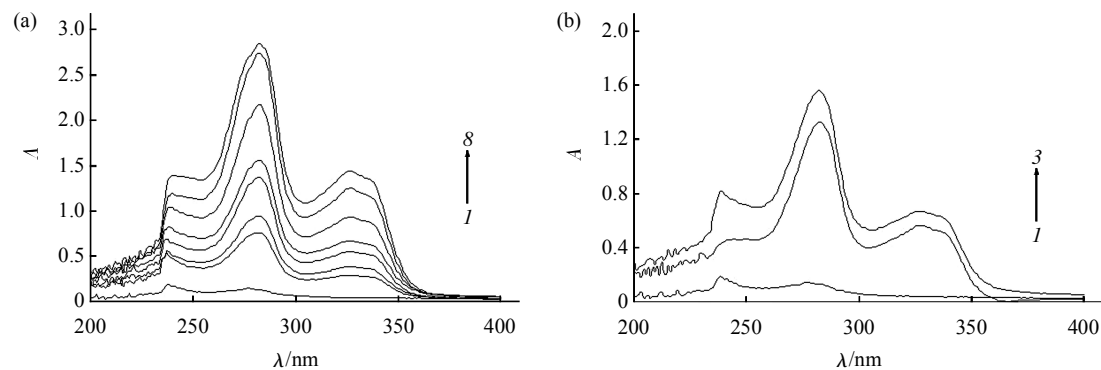


Fig. 5 Effects of LMX on ultraviolet (UV) absorption spectra of BLM^{642~1290} helicase
(a) The changes of UV absorption spectra by different concentrations of LMX treatment. 1~8: 1, 1.5, 2, 2.5, 3.75, 5, and 6.25 μmol/L. (b) Comparison of the UV absorption spectra of BLM^{642~1290} helicase, LMX, and helicase-LMX complex. 1~3: 10 nmol/L BLM^{642~1290} helicase, 2.5 μmol/L LMX and the mixture solution of 10 nmol/L helicase and 2.5 μmol/L LMX.

峰, 而 280 nm 附近的峰是酪氨酸、色氨酸以及苯丙氨酸残基中共轭双键的吸收峰, 所以根据峰形和峰位的变化即可判定蛋白质结构发生的变化^[34]. 紫外光谱的变化表明, 加入 LMX 引起了芳香族氨基酸残基和肽键中生色基团的微环境发生了变化, 从而导致蛋白质分子构象发生改变. 另外, 还分别分析了 10 nmol/L BLM^{642~1290} 解旋酶、2.5 μ mol/L LMX、10 nmol/L BLM^{642~1290} 解旋酶和 2.5 μ mol/L LMX 混合后的紫外吸收光谱的变化(图 5b). LMX 和解旋酶混合后在 237、276、326 nm 左右均出现了吸收峰, 而 BLM^{642~1290} 解旋酶的吸收峰是在 237、276 nm 左右出现, LMX 则在 276、326 nm 左右出现. 分析吸收值的大小发现, 二者混合后的紫外吸收值大于解旋酶和 LMX 单独测的紫外吸收值之和, 说明 LMX 与解旋酶形成了复合物, 并且对二者的紫外吸收基团均有一定的影响.

2.5 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶荧光光谱的影响

用荧光分光光度计检测了 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶荧光光谱的影响, 其结果见图 6. 解旋酶的激发波长为 275 nm, 散射波长为 305 nm. 由结果可知, 随着 LMX 浓度增加, 解旋酶的内源荧光强度有规律地降低($P < 0.01$), 且发射峰峰位和峰形不变, 说明解旋酶的荧光强度被 LMX 猝灭, 但是其具体的猝灭类型要进一步深入分析.

根据 Stern-Volmer 方程, 以 BLM^{642~1290} 解旋酶相对荧光强度 F_0/F 对猝灭剂 LMX 浓度 $[Q]$ 作图(图 7), 由直线斜率可得到 4℃、25℃、40℃ 时 LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶的猝灭速率常数 K_q 分别为 1.426×10^{15} 、 1.051×10^{15} 、 7.800×10^{14} L/mol·s, 结果见表 3. 显然, LMX 对解旋酶的猝灭速率常数远大于最大扩散控制的碰撞猝灭常数 2.0×10^{10} L/mol·s.

因此, LMX 对 BLM^{642~1290} 解旋酶的荧光猝灭是由于形成了复合物而引起的静态猝灭.

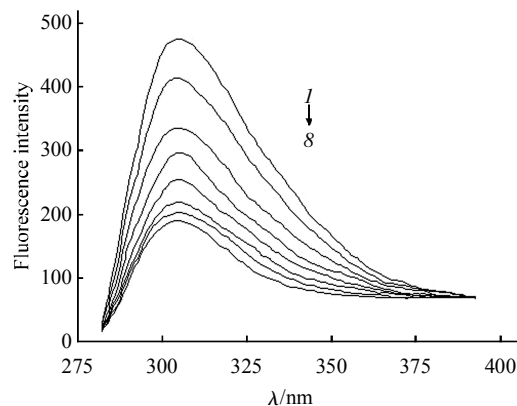


Fig. 6 Effects of LMX on fluorescence spectra of BLM^{642~1290} helicase

$c_{\text{BLM}} = 1.0 \times 10^{-8}$ mol/L; $c_{\text{LMX}} / (10^{-8}$ mol/L), $I \sim 8$: 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, and 11.

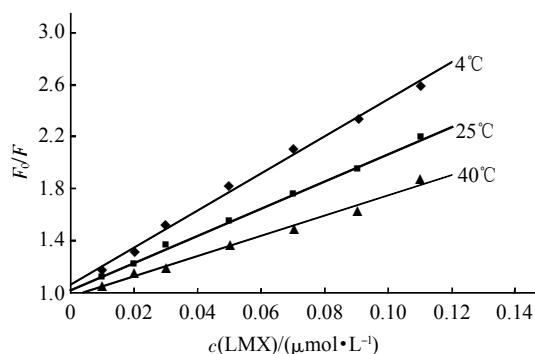


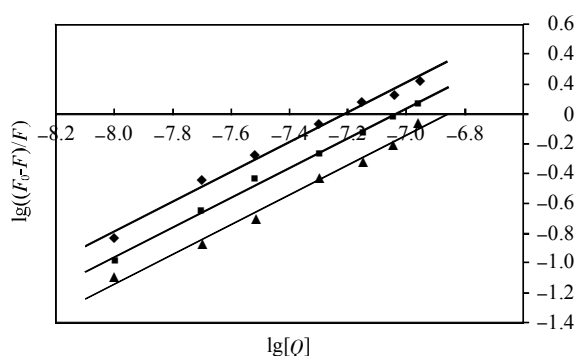
Fig. 7 Stern-Volmer curves of fluorescence quenching of BLM^{642~1290} helicase by LMX at different temperature

Table 3 Stern-Volmer equations and quenching constants for BLM^{642~1290} helicase fluorescence quenching with LMX at different temperatures

Quenching agent	$t/^\circ\text{C}$	$F_0/F-[Q]$ equation	$K_q / (10^{14} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	r^2
LMX	4	$y = 14.26 \times 10^6 x + 1.0635$	14.26	0.9956
	25	$y = 10.51 \times 10^6 x + 1.0247$	10.51	0.9988
	40	$y = 7.800 \times 10^6 x + 0.9698$	7.800	0.9907

根据方程(3), 把所得到的数据以 $\lg[(F_0-F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 作图(图 8 和表 4), 由直线的截距和斜率可求得 LMX 与 BLM^{642~1290} 解旋酶分子的结合常数 K 和结合位点数 n . 由图 8 得出, 4℃、25℃、

40℃ 下 LMX 与 BLM^{642~1290} 解旋酶分子的 K 分别为 1.514×10^7 、 1.053×10^7 、 7.522×10^6 L/mol, n 分别为 0.995 3、0.997 8、1.002 5. 因此, 可以确定两种分子间存在着一个结合位点.

Fig. 8 Plot of $\lg((F_0-F)/F)$ vs $\lg[Q]$ at different temperatures

◆—◆: 4°C; ■—■: 25°C; ▲—▲: 40°C.

Table 4 Logarithm equation and its parameters for BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰ helicase fluorescence quenching by LMX at different temperatures

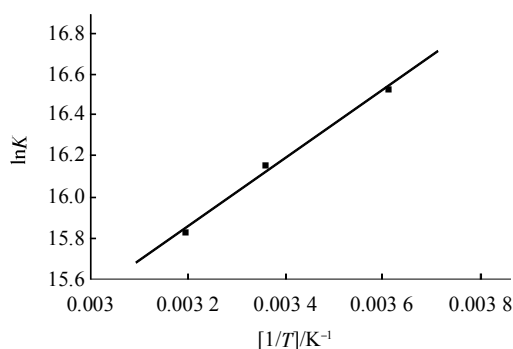
Quenching agent	$t/^\circ\text{C}$	$\lg((F_0-F)/F)-\lg[Q]$	$K/(10^6 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	R^2	R_0/nm	r/nm
LMX	4	$y=0.9953x+7.179$	15.14	0.9953	0.9926	2.01	2.75
	25	$y=0.9978x+7.023$	10.53	0.9978	0.9968	2.10	2.99
	40	$y=1.003x+6.876$	7.522	1.003	0.9930	2.25	3.12

根据方程(4)和(5)计算所得 ΔH 、 ΔS 、 ΔG 见表 5 和图 9。由表 5 中计算结果可知, 反应的吉布斯自由能 ΔG 均小于零, 说明 LMX 与解旋酶之间的反应是自发进行的。从表 5 所示结果可知, $\Delta H =$

-13.885 kJ/mol , $\Delta S = 87.427 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$, 即 $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$, 且 ΔS 对 ΔG 的贡献大于 ΔH 对 ΔG 的贡献。因而, LMX 与 BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰ 解旋酶之间的作用力主要为静电引力和疏水作用力。

Table 5 Thermodynamic parameters of LMX-BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰ helicase binding procedure

Quenching agent	$t/^\circ\text{C}$	$K/(10^6 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$
LMX	4	15.14	-38.10	-13.89	87.43
	25	10.53	-39.94		
	40	7.522	-41.25		

Fig. 9 Van't Hoff plot for the interaction of LMX and BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰ helicase $c_{\text{BLM}} = 1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$.

由 LMX 的紫外可见吸收光谱和 BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰ 解旋酶的荧光光谱的重叠光谱图(图 10), 根据 Förster 非辐射能量转移理论, 得到 4°C 时 LMX 与解旋酶摩尔浓度比为 1:1 时的重叠积分 $J = 1.38 \times 10^{-17} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 将其代入(8)式求得作用距离 $R_0 = 2.10 \text{ nm}$, 再由(7)式求出 BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰ 解旋酶中色氨酸残基与 LMX 分子间的作用距离 $r = 2.99 \text{ nm}$, 最后由方程(6)求出了其能量转移效率(E)为 0.265。其他相应温度下的 r 值见表 4。计算的 r 值均小于 7 nm, 说明 LMX 对 BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰ 解旋酶的荧光猝灭过程符合非辐射能量转移理论, 表明非辐射能量转移是导致解旋酶荧光猝灭的主要原因。

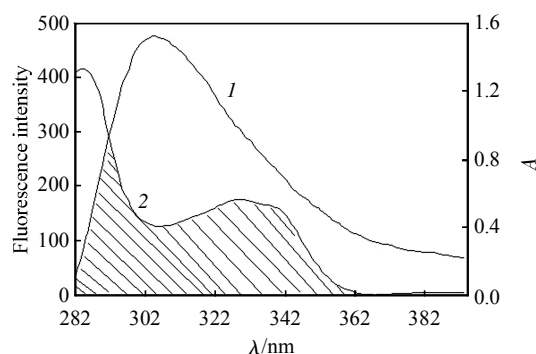


Fig. 10 Overlap spectra of fluorescence spectra of BLM^{642~1290} helicase (1) and ultraviolet absorption spectra (2) of LMX at the same concentration

3 讨 论

为了更好地理解 LMX 与 BLM^{642~1290} 解旋酶的作用机理, 采用荧光偏振技术、光谱技术及自由磷检测技术研究了 LMX 对解旋酶生物学活性和结构的影响。结果表明, LMX 能抑制解旋酶的解链活性和 ATP 酶活性, 但其抑制的效果有显著差异, 而解旋酶的 DNA 结合活性则被 LMX 促进。通过紫外吸收光谱和荧光光谱研究发现, LMX 与解旋酶都能自发进行反应, 且与解旋酶有一个结合位点, 其作用力类型为静电引力和疏水作用力, 二者能够形成稳定的 BLM-LMX 复合物。另外, 解旋酶的内源荧光被 LMX 静态猝灭, 其主要原因是非辐射能量转移。

BLM^{642~1290} 解旋酶的生物学活性对 LMX 敏感。本研究在体外的研究证明解旋酶的解链活性和 ATP 酶活性均被 LMX 抑制(图 3, 4)。然而, 对解旋酶两种活性的抑制作用具有显著差异($P < 0.05$)。LMX 对解旋酶解链活性的半失活量(C_i)为 $(45.5 \pm 5.1) \mu\text{mol/L}$, 而对 ATP 酶活性的 C_i 为 $(8.4 \pm 2.9) \mu\text{mol/L}$, 前者约是后者的 5.6 倍, 说明 LMX 对 ATP 酶活性的抑制作用要强于其解链活性。但是 LMX 对两种活性均不能完全抑制, 其原因还有待进一步研究确定。相反, 通过分别比较 LMX 对解旋酶、解旋酶-DNA 复合物及 DNA 作用后, 其荧光偏振值上升的程度, 发现 LMX 却能促进解旋酶的 DNA 结合活性, 且 LMX 对解旋酶、解旋酶-DNA 复合物的作用具有显著差异($P < 0.05$), 表明 LMX 与解旋酶和解旋酶-DNA 复合物的作用

机制有差异。

BLM^{642~1290} 解旋酶是由解旋酶结构域(helicase)、RecQ 保守的 C 端结构域(RecQ-Ct)和解螺旋酶 RNA 酶 D 的 C 端(HRDC)结构域组成^[29]。解旋酶结构域主要是由 7 个保守的氨基酸基序(motif)组成, 其功能主要是间接或直接地结合 DNA, 并诱导催化水解, 而促使解旋酶的易位和解链^[35~37]。RecQ-Ct 结构域有一个平台型结构, 其中心是由 4 个半胱氨酸和 1 个 Zn^{2+} 离子组成的 α 螺旋结构, 侧翼由螺旋状的基序组成。RecQ-Ct 结构域是 BLM 解旋酶与 DNA 的结合位点, 并介导其和参与 DNA 代谢的相关作用因子相互作用^[36, 38~39]。解旋酶结构域和 RecQ-Ct 结构域结合在一起形成了具有催化作用的“解旋酶核心结构域”, 其包含有 ATP 酶活性和 DNA 结合活性所必需的基序和结合位点^[39]。HRDC 结构域位于解旋酶的 C 端, 通过辅助结合 DNA 来调节解链功能, 且可促进并稳定 BLM 解旋酶与 DNA 的结合, 但不具有催化活性^[40]。根据以上 3 个结构域功能的分析, 可知 LMX 对解旋酶 ATP 酶活性抑制作用最强的原因可能是 LMX 结合在具有催化作用的“解旋酶核心结构域”上。然而, 这种结合为什么会促进解旋酶的 DNA 结合活性仍然不清楚, 需要进一步探讨。

LMX 属于典型的也是较早使用的氟喹诺酮类药物。氟喹诺酮类药物的生物学活性主要是依靠在 C-6 位上的芳香族氟取代基, 可以增强酶与底物的亲和力^[41]。在氟喹诺酮类药物的位置 3 上的羧酸和位置 4 上的酮基是抑制 DNA 旋转酶(拓扑异构酶)所必需的基团, 在位置 1 和位置 7 上的取代基则可以影响药物的生物学活性^[42]。因为羧基可以提供羟基, 而酮基有一个共面的羰基, 均可与酶的氢离子结合形成药物-酶复合物, 所以氟喹诺酮类药物的位置 3 上的羧基和位置 4 上的酮基也是酶的结合位点^[42~43]。在 C-7 位置上的氟、氯、甲基以及甲氧基团的取代也可以加强药物、酶和 DNA 的结合, 从而形成药物-酶-DNA 复合物^[43]。因此, 可以推测 LMX 能够促进解旋酶 DNA 结合活性的原因可能是其 C-6 和 C-7 上的取代功能基团可以增加酶活力, 以及增强药物、酶和 DNA 的结合, 从而形成药物-酶-DNA 复合物。基于解旋酶 3 个结构域的不同功能, LMX 可能是通过位置 3 上的羧基和位置 4 上的酮基结合在解旋酶具有催化作用的“解旋酶核心结构域”上, 从而导致其生物学活性受到影响。

药物对解旋酶的作用机制主要有以下 6 点:

a. 通过干扰解旋酶与 ATP 结合, 而抑制其 ATP 酶活性, 以限制其解链和易位所需要的能量; b. 使解旋酶通过别构机制抑制其 ATP 酶活性, 并使酶的构象维持在较低解链活性的状态; c. 抑制解旋酶与核酸结合; d. 抑制 ATP 催化水解与解链过程的偶联; e. 通过阻止解旋酶的易位, 从而抑制其解链; f. 在细胞中通过抑制其解旋酶工作所必需的相互作用因子的功能, 从而影响解旋酶的功能^[12, 20, 44]. 在以解旋酶或 DNA 为靶标来治疗多种疾病中, 以上的机制通常是有两条或两条以上发挥了重要作用. 根据解旋酶的不同结构域和药物的不同基团的功能差异, 推测解旋酶的解链活性和 ATP 酶活性被 LMX 抑制的原因, 可能是使解旋酶通过别构机制抑制其 ATP 酶活性, 并使酶的构象维持在较低解链活性的状态, 通过抑制 ATP 催化水解与解链过程的偶联, 以及阻止解旋酶的易位, 从而抑制其解链.

另外, LMX 对解旋酶的 ATP 酶活性是一种非竞争性抑制剂. 非竞争性抑制剂与酶和酶 - 底物具有平等的亲和力. 根据非竞争性抑制剂工作的模型可知, 抑制剂和底物在任何时候都可以结合, 从而形成酶 - 底物 - 抑制剂的复合物. 当底物和抑制剂结合时, 如果其酶 - 底物复合物或者是酶 - 抑制剂复合物的结构一旦被改变, 则酶 - 底物 - 抑制剂复合物不能形成^[45]. 非竞争性抑制剂的工作机制是涉及到抑制剂与一个别构部位的可逆性结合, 但也有可能是通过其他直接或间接的方式结合到酶的活性部位. 非竞争性抑制剂不像竞争性抑制剂一样不会阻止酶与底物的结合, 相反是简单地阻止产物的形成^[45]. 因此, LMX 与解旋酶和解旋酶 - DNA 复合物均能够结合, 且这两种结合具有一定的区别.

许多天然的或合成的具有干扰 DNA 代谢能力的化合物已经被开发并用来作为抗癌药物. 这些化合物通过静电结合到 DNA 的磷酸骨架, 从而干扰 DNA 的结构^[20, 46]. DNA 结构的改变可以使参与到复制、修复、和转录等过程与 DNA 有关酶的活性受到抑制或失活. 巧合的是, 有研究报道了 4 种喹诺酮药物能够与小牛胸腺 DNA 的结合作用, 其中就包括 LMX^[47], 这与本研究中 LMX 对 DNA 的影响结果是完全一致的, 证实了喹诺酮药物能够影响 DNA 的结构, 从而干扰 DNA 相关的代谢. 另外, Radi 等^[48]也报道了喹诺酮药物在一定的实验条件下, 通过静电结合并插入到了 DNA 的模型. 这也

间接地说明, LMX 可以通过与底物 DNA 的结合, 阻止解旋酶的易位, 从而抑制其解链. 总之, 这些结果表明, LMX 能影响 BLM^{642~1290} 解旋酶的生物学活性和结构, 这将为理解喹诺酮药物的作用机制和进一步以 DNA 解旋酶作为药物靶标, 特别是抗癌药物靶标的研究提供相关资料.

参 考 文 献

- [1] Bachrati C Z, Hickson I D. RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochem J*, 2003, **374**(Pt 3): 577-606
- [2] Mounira A G. Bloom syndrome, genomic instability and cancer: The SOS-like hypothesis. *Cancer Letters*, 2006, **236**(1): 1-12
- [3] Wong I, Jr Moore K M, Bjornson K P, *et al.* ATPase activity of *Escherichia coli* rep helicase is dramatically dependent on DNA ligation and protein oligomeric states. *Biochemistry*, 1996, **35**(18): 5726-5734
- [4] Pham X H, Tuteja N. Potent inhibition of DNA unwinding and ATPase activities of pea DNA helicase 45 by DNA-binding agents. *Biochem Biophys Res Comm*, 2002, **294**(2): 334-339
- [5] Jr Brosh R M, Karmakar P, Sommers J A, *et al.* p53 modulates the exonuclease activity of Werner syndrome protein. *J Biol Chem*, 2001, **276**(37): 35093-35102
- [6] Brosh R M Jr, Von Kobbe C, Sommers J A, *et al.* Werner syndrome protein interacts with human flap endonuclease 1 and stimulates its cleavage activity. *EMBO J*, 2001, **20**(20): 5791-5801
- [7] Lindor N M, Furuichi Y, Kitao S, *et al.* Rothmund-Thomson syndrome due to RECQ4 helicase mutations: Report and clinical and molecular comparisons with Bloom syndrome and Werner syndrome. *Am J Med Genet*, 2000, **90**(3): 223-228
- [8] Kitao S, Ohsugi I, Ichikawa K, *et al.* Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: Biological significance of multiple species in higher eukaryotes. *Genomics*, 1998, **54**(3): 443-452
- [9] Van Maldergem L, Siitonen H A, Jalkh N, *et al.* Revisiting the craniosynostosis-radial ray hypoplasia association: Baller-Gerold syndrome caused by mutations in the RECQL4 gene. *J Med Genet*, 2006, **43**(2): 148-152
- [10] Hanada K, Iwasaki M, Ihashi S, *et al.* UvrA and UvrB suppress illegitimate recombination: Synergistic action with RecQ helicase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(11): 5989-5994
- [11] Rothenberg M L, Carbone D P, Johnson D H. Improving the evaluation of new cancer treatments: challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer*, 2003, **3**(4): 303-309
- [12] Sharma S, Doherty K M, Brosh R M Jr. DNA helicases as targets for anti-cancer drugs. *J Biol Chem*, 2005, **5**(3): 183-199
- [13] Guo R B, Rigolet P, Zargarian L, *et al.* Structural and functional characterizations reveal the importance of a zinc binding domain in Bloom's syndrome helicase. *Nucl Acid Res*, 2005, **33**(10): 3109-3124
- [14] German J, Roe A M, Leppert M F, *et al.* Bloom syndrome: An

- analysis of consanguineous families assigns the locus mutated to chromosome band 15q26.1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(14): 6669–6673
- [15] German J. Bloom syndrome: A Mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine(Baltimore)*, 1993, **72**(6): 393–406
- [16] Hickson I D. RecQ helicases: Caretakers of the genome. *Nature Reviews Cancer*, 2003, **3**(3): 169–178
- [17] Cheok C F, Bachrati C Z, Chan K L C, *et al.* Roles of the Bloom's syndrome helicase in the maintenance of genome stability. *Biochem Soc Trans*, 2005, **33**(Pt6): 1456–1459
- [18] Bachrati C Z, Hickson I D. RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork. *Chromosoma*, 2008, **117**(3): 219–233
- [19] Thompson L H, Schild D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res*, 2002, **509**(1–2): 49–78
- [20] Xi X G. Helicases as antiviral and anticancer drug targets. *Current Medicinal Chemistry*, 2007, **14**(8): 503–517
- [21] Janscak P, Garcia P L, Hamburger F, *et al.* Characterization and mutational analysis of the RecQ core of the Bloom syndrome protein. *J Mol Biol*, 2005, **330**(1): 29–42
- [22] Blondeau J M. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clinical Ther*, 1992, **21**(1): 3–40
- [23] Appelbaum P C, Hunter P A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, **16**(1): 5–15
- [24] Albini A, Monti S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. *Chem Soc Rev*, 2003, **32**(4): 238–250
- [25] Fuhr U, Wolff T, Harder S, *et al.* Quinolone inhibition of cytochrome P-450-dependent caffeine metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 1990, **18**(6): 1005–1010
- [26] 黄仁刚, 钱元恕, 兰雁飞. 洛美沙星对大鼠肝脏混合功能氧化酶的作用. *中国抗生素杂志*, 1999, **24**(1): 53–55
Huang R G, Qian Y S, Lan Y F. *Chin J Antibiot*, 1999, **24**(1): 53–55
- [27] Marrot L, Belaidi J P, Jones C, *et al.* Molecular responses to photogenotoxic stress induced by the antibiotic lomefloxacin in human skin cells: From DNA damage to apoptosis. *J Investigative Dermatology*, 2003, **121**(3): 596–606
- [28] Chen X, Luo H, Duan L X, *et al.* Research on prokaryocyte expression and biological activity of the core region of bloom's syndrome protein. *Afr J Biotech*, 2010, **9**(50): 8520–8529
- [29] Chen X, Luo H, Duan L X, *et al.* Effects of mercury on the structure and activity of BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰ helicase. *Biomed Envir Sci*, 2011, **24**(1): 47–55
- [30] Yan Z Y, Shao X F, Jiang X M, *et al.* Studies on the reaction of balofloxacin with bovine serum albumin. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, **26**(8): 1494–1498
- [31] Hu Y J, Liu Y, Xiao X H. Investigation of the interaction between berberine and human serum albumin. *Biomacromolecules*, 2009, **10**(3): 517–521
- [32] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability?. *Biochem J*, 1981, **20**(11): 3096–3102
- [33] Zhang G W, Chen X X, Guo J B, *et al.* Study on the interaction of hesperidin or icariin with lysozyme by fluorescence spectroscopy. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2009, **29**(1): 184–187
- [34] 卢秀敏, 陈得军, 王公轲, 等. 诺氟沙星与卵清蛋白相互作用的研究. *光谱学与光谱分析*, 2009, **29**(1): 236–239
Lu X M, Chen A J, Wang G K, *et al.* *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2009, **29**(1): 236–239
- [35] Dillingham M S, Soultanas P, Wiley P, *et al.* Defining the roles of individual residues in the single-stranded DNA binding site of PcrA helicase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(15): 8381–8387
- [36] Korolev S, Hsieh J, Gauss G H, *et al.* Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of *E. coli* Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP. *Cell*, 1997, **90**(4): 635–647
- [37] Sengoku T, Nureki O, Nakamura A, *et al.* Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein *Drosophila vasa*. *Cell*, 2006, **125**(2): 287–300
- [38] Yankiwski V, Noonan J P, Neff N F. The C-terminal domain of the Bloom syndrome DNA helicase is essential for genomic stability. *BMC Cell Biol*, 2001, **2**(6): 11–26
- [39] Bernstein D A, Zittel M C, Keck J L. High-resolution structure of the *E. coli* RecQ helicase catalytic core. *EMBO J*, 2003, **22**(19): 4910–4921
- [40] Liu Z, Macias M J, Bottomley M J, *et al.* The three-dimensional structure of the HRDC domain and implications for the werner and bloom syndrome proteins. *Structure Fold Des*, 1999, **7**(12): 1557–1566
- [41] Wetzstein H G. Quinolones in the environment: Biological breakdown of gyrase inhibitors. *Pharm Unserer Zeit*, 2001, **30**: 450–457
- [42] Van H N, Wasch K D, Okerman L, *et al.* Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products. *Anal Chim Acta*, 2005, **529**(1–2): 265–272
- [43] Sukul P, Spitteler M. Fluoroquinolone antibiotics in the environment. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2007, **191**: 131–162
- [44] Rigu G, Robert M B Jr. Helicases as prospective targets for anti-cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008, **8**(4): 390–401
- [45] Si D Y, Wang Y, Guo Y, *et al.* Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drug Metab Dispos*, 2008, **37**(3): 629–634
- [46] Madhusudan S, Hickson I D. DNA repair inhibition: A selective tumour targeting strategy. *Trends Mol Med*, 2005, **11**(11): 503–511
- [47] Yuan X Y, Guo D S, Wang L L. Influence of Mg²⁺ and Cd²⁺ on the interaction between sparfloxacin and calf thymus DNA. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2008, **6**(4): 1130–1135
- [48] Radi A, Ries M A E L, Kandil S. Spectroscopic and voltammetric studies of Pefloxacin bound to calf thymus double-stranded DNA. *Anal Bioanal Chem*, 2005, **381**(2): 451–455

Study on The Mechanism of Effects of Lomefloxacin on Biological Properties of Bloom Syndrome Helicase*

LUO Heng^{1,2)}, CHEN Xiang^{1,3)}, DING Mei¹⁾, YANG Qi-Xin¹⁾, XU Hou-Qiang^{1)**}

¹⁾ Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in The Plateau Mountainous Region, Ministry of Education, College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

²⁾ The Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management of Mountainous Region, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

³⁾ Ministry of Education Key Laboratory of Green Pesticide and Agro-Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract Bloom syndrome helicase (BLM), an important member of RecQ family of DNA helicases, participates in cell metabolism including DNA repair, recombination, transcription, telomere maintenance, and plays key roles in maintaining chromosome stability. The mutation of BLM helicase may lead to Bloom syndrome. Bloom syndrome is a rare autosomal recessive genetic disorder characterized by genomic instability and the early development of many types of cancer. Lomefloxacin (LMX) may treat many diseases by inhibiting many enzymes in cells and interfering DNA metabolism through binding DNA, but the specific mechanism of action remains unclear. This study was conducted to determine the effects of LMX on DNA-binding activity, helicase activity, and ATPase activity of BLM^{642~1290} helicase by fluorescence polarized technology and free phosphorus assay technology; and the parameters of binding between LMX and helicase were studied by fluorescence and ultraviolet absorption spectroscopy, included binding constants, number of binding sites, the type of acting force, and binding distance. The results indicated that the reaction between the helicase and LMX was occurred spontaneously, there was one binding site between two molecules, the helicase and LMX might compound BLM-LMX complexes caused by electrostatic force and hydrophobic interaction force; moreover, the intrinsic fluorescence of the helicase was static quenched by LMX as a result of non-radioactive energy transfer. In this process, the helicase and ATPase activities were inhibited and DNA-binding activity of the helicase was promoted by LMX. The mechanism of effects of LMX on biological properties of BLM helicase may be included as below: LMX could inhibit the ATPase activity by allosteric mechanism and stabilize the conformation of the enzyme in low helicase activity state, destroy the coupling of ATP hydrolysis to unwinding, and inhibit the unwinding dsDNA by blocking helicase translocation. The reason that LMX could promote DNA-binding activity of the helicase may be the substitutional functional groups at C-6 and C-7 of LMX which may enhance enzymes activity and strengthen the attachment of drug-enzyme-DNA complex. The results may provide the relative theoretical basis for studying the molecular mechanism of DNA helicase as drug target and understanding the mechanism of action of quinolone drugs.

Key words lomefloxacin, BLM helicase, biological properties, mechanism

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00178

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2010CB534912), The Doctoral Program of the Ministry of Education (200806570003), The Government of Guizhou Province Talents Fund (200822) and Guizhou University Innovation Funds of Graduate Student (SYN 2009005).

**Corresponding author.

Tel: 86-851-8292183, E-mail: houqiang0524@yahoo.com

Received: April 23, 2011 Accepted: June 16, 2011