

二硫化碳氧化性自由基对生物靶分子损伤机理研究

简乐¹ 钱素平² 姚思德² 姜槐¹

¹(浙江大学医学院劳动卫生与环境卫生研究所 杭州 310006)

²(中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室 上海 201800)

摘要 利用脉冲辐解技术研究了二硫化碳(CS₂)被氧化生成的阳离子自由基,以时间分辨瞬态吸收光谱方法获取CS₂阳离子自由基的特征吸收谱。同时,研究了CS₂阳离子自由基损伤生物靶分子的机理,测定了相关的反应动力学常数。结果发现,CS₂阳离子自由基能与DNA、dGMP、酪氨酸和色氨酸反应产生新的产物,在CS₂对生物靶分子的氧化损伤中可能起着重要的作用。

关键词 二硫化碳,阳离子自由基,脱氧鸟苷酸,脱氧核糖核酸,酪氨酸,色氨酸

中图分类号 O644.2, Q523

作为常用的有机溶剂和工业原料,二硫化碳(CS₂)广泛地用于轻纺工业、化工和制药工业,也是实验室常用的溶剂。有关其血管和神经毒性已有大量研究报告^[1,2],但其体内代谢过程的复杂性使得CS₂的毒性机理迄今尚未阐明。近10年来,CS₂对生物体的氧化损伤引起了学者们的关注,动物实验发现^[2,3],CS₂可引起大鼠血清、主动脉中过氧化脂质(LPO)含量增高,血清一氧化氮(nitric oxide, NO)水平降低,红细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性增高;CS₂染毒同时如使用抗氧化剂能拮抗NO、SOD和LPO的改变,阻止CS₂诱导的脂质过氧化损伤;体外实验发现^[4,5],CS₂在一定条件下有诱导产生超氧阴离子自由基(O₂^{•-})和羟自由基(OH[•])作用,可引起红细胞SOD、LPO和CAT改变;对职业接触者的流行病学调查也发现^[6,7]CS₂能较早影响作业工人血清SOD水平,工人血浆NO水平降低和LPO水平明显增高。这些研究结果强烈提示其为一性质活泼的化合物,很有可能通过直接或间接作用产生活性代谢中间产物,并与生物大分子作用诱导机体氧化应激反应,最终导致机体的氧化损伤,但目前对CS₂环境生物化学本质及其演变过程所知甚少。

作为有机溶剂,CS₂在无任何外界诱因(光、热、强氧化/还原剂)条件下反应性不强,但进入机体后,由于机体代谢过程产生大量活性自由基,这些自由基一旦与之反应,必然会产生各种氧化性和还原性CS₂自由基中间体,这些自由基中间体对生物体的氧化或还原反应可能是导致生物体损伤的重要途径。本工作主要采用脉冲电子辐解瞬态吸收光谱技术产生OH[•],

研究了CS₂被OH[•]氧化产生的氧化性中间体的过程和机理,获取了CS₂阳离子自由基的特征瞬态吸收光谱,研究了CS₂阳离子自由基对DNA碱基(主要研究dGMP)和蛋白质氨基酸(主要研究酪氨酸、色氨酸)的氧化性损伤的机理,测定了相关动力学常数,试图探索与CS₂相关的生物化学反应特性,从分子结构上解释CS₂的氧化反应特性,为进一步研究和预防CS₂对生物大分子的氧化损伤提供重要的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验装置

1.1.1 脉冲辐解装置 脉冲辐射源为中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室的10MeV电子直线加速器,电子脉冲宽度为10ns,单脉冲剂量为10—40Gy可调。检测系统由纳秒级时间分辨吸收光谱及数据终端组成(中国科学院上海原子核研究所研制),分析光源为500W氙灯,有效光程为20mm,分析光与束流垂直相置,经电动快门后进入单色仪分光,由R955光电倍增管检测后送入HP54510B数字示波器记录,数据转换至计算机存储,并以专用自编软件进行数据处理获取瞬态吸收谱和动力学常数^[8]。以N₂O饱和的10⁻²mol·dm⁻³KSCN(硫氰酸钾)溶剂作剂量计,校正电子束剂量。

1.2 试剂及溶液配制

DNA、dGMP、酪氨酸、色氨酸、NaN₃、由Sigma公司进口,直接用3次蒸馏水配成母液。CS₂、为A.R

浙江省自然科学基金(300470)资助

第一作者:简乐,女,1956年6月出生,1982年毕业于浙江医科大学,临床医学专业,副教授,副主任医师

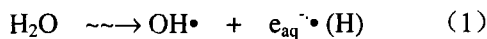
收稿日期:初稿2002-01-23,修回2002-04-16

级试剂, 根据实验要求以 A.R 级乙腈试剂配成母液。所有溶液都由母液用 3 次蒸馏水稀释配制, 根据实验要求分别以高纯氮气 (>99.99%) 或氧化亚氮 (N₂O) 鼓泡 20min 以去除氧气或清除水合电子。所有实验均在室温下进行。

2 结果和讨论

2.1 CS₂ 氧化性中间体自由基的脉冲辐解产生

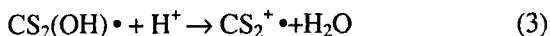
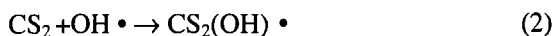
水溶液辐解后会产生大量的氧化性和还原性活性粒子, 在 pH2-11 范围内氧化性粒子主要为羟基自由基、还原性粒子主要是水合电子 (或氢原子)。



实验中 CS₂ 以 CH₃CN 配成母液, 再稀释成水溶液, 其 CH₃CN 终浓度为 200m mol/L, 在 pH7 左右 e_{aq}^{·-} 与 CH₃CN 反应的速率常数为 4.3×10⁷ mol⁻¹·L·s⁻¹[9], 这样水溶液辐解产生的水合电子基本被乙腈所清除, 辐解后溶液中的原初粒子为氧化性的 OH 自由基。

图 1 为 10m mol/L CS₂, 200m mol/L CH₃CN 水溶液脉冲辐解后所得到的瞬态吸收谱, 发现辐射后根据时序不同主要有两处吸收 (1, 290nm 左右; 2, 320nm 左右), 结果见图 1 插图。其中, 290nm 处有一快速生成过程 (1.2 μs 内完成), 对应于 CS₂ 与 OH 自由基的反应产生自由基加成产物过程的吸收, 1.2 μs 后是一衰减过程; 320nm 有两个生成过程, 其中快过程与 290nm 处生成过程同步, 1.2 μs 后对应于 290nm 处的衰减又出现一相对慢的生成过程。此外实验发现, 这些吸收及变化与溶液 pH 值有关, 结果见图 2。经分析认为 320nm 处第二步产物生成过程可能是 CS₂ 与 OH 的加成自由基经脱 OH 反应生成 CS₂ 阳离子自由基的过程。通过对 290nm 处的快速生成过程进行准一级动力学模拟, 得到 OH 自由基与 CS₂ 反应速度在 7.23×10⁹ mol⁻¹·L·s⁻¹ 与文献[10]报道 8.3×10⁹ mol⁻¹·L·s⁻¹ 相似。

CS₂ 与 OH 自由基及其后继脱水反应可用如下反应式表示



本工作曾分别应用邻苯三酚-鲁米诺和邻菲罗啉-硫酸铜-维生素 C-过氧化氢化学发光体系观察到 CS₂ 在该两体系中诱导超氧阴离子和羟自由基的产生^[4,5]。对接触工人的生物监测结果也表明 CS₂ 可引起工人血清 SOD 水平升高^[6,7], CS₂ 在非辐照条件下与不同化学物质反应所产生的短寿命激发态物质向基态跃迁时

产生发射光子并释放激发能, 这与在辐照条件下 CS₂ 的反应特性类似。即 CS₂ 对环境中光的诱导作用敏感, 极易在光和水溶液环境下生成性质活泼的自由基中间产物。

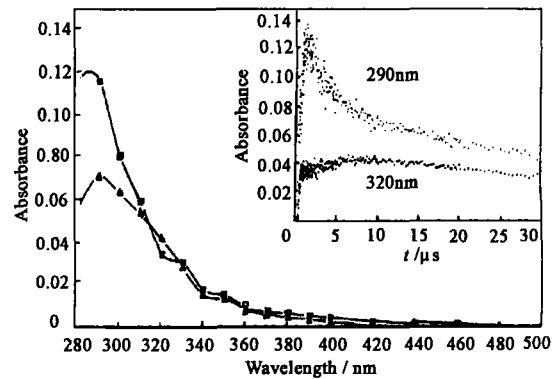


Fig.1 The transient absorption spectra of hydroxyl addition CS₂ radical in acetonitrile CH₃CN water solution in pulse radiolysis.

▲ 2μs, □ 5μs.

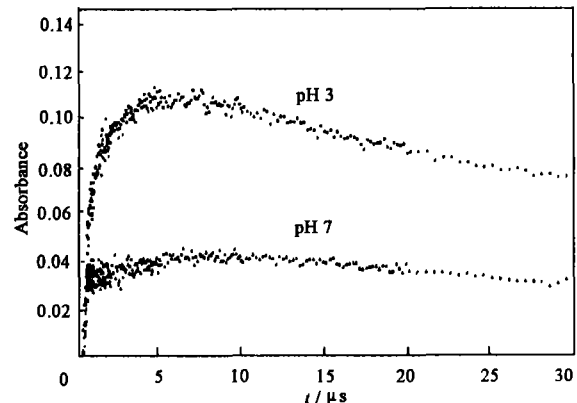
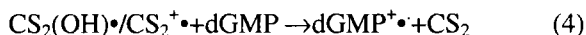


Fig. 2 The transient absorption spectra of CS₂ in various pH CH₃CN water solutions in pulse radiolysis.

2.2 CS₂ 氧化性中间体自由基与 dGMP/DNA 的氧化还原反应

图 3 为 10m mol/LCS₂, 200m mol/L CH₃CN 水溶液加入 0.1m mol/L dGMP, 与不加 dGMP 体系在脉冲辐解后记录到的瞬态吸收谱的叠加, 可见在加入 0.1m mol/L dGMP 后, 390nm 左右有明显的产物生成, 540nm 左右有一个弱吸收峰 (540nm 弱吸收见图 3)。OH 自由基与 dGMP 的反应速率常数为 6.83×10⁹ mol⁻¹·L·s⁻¹[11], 这与 OH 自由基和 CS₂ 反应速率相近。在本研究体系中, 由于溶液中 CS₂ 浓度远大于 dGMP 浓度 (100 倍), 该溶液体系脉冲辐解后所产生的 OH 自由基主要与 CS₂ 反应, 而 dGMP 对 OH 自由基的竞争反应可以忽略。390nm 左右产物吸收是加入 dGMP 以后出现的, 排除体系中 dGMP 与 OH 自由基的反应,

则 390nm 左右出现的瞬态吸收应是 dGMP 与 CS₂ 氧化性自由基反应产物的吸收。另据文献[12]报道, dGMP 阳离子主要有 3 个特征吸收: 310nm 附近有强吸收峰; 390nm 附近有次强吸收; 540nm 附近有弱吸收。从图 3 可以看出体系辐解后在 310nm 附近都有强吸收, 这说明在该处 CS₂ 氧化性自由基和 dGMP 氧化性损伤产物的吸收有叠加; 而 390nm 附近的吸收可以认为是 dGMP 阳离子自由基的特征吸收, 其反应机理推测如下



将上述实验体系中 0.1m mol/L dGMP 换成 0.1m mol/L 小牛胸腺 DNA, 脉冲辐解后得到与加入 dGMP 相似的吸收谱, 可能是因为 DNA 4 个碱基中 G 的单电子还原电位最低^[13], CS₂ 氧化性自由基通过电子转移氧化损伤 DNA 产生的 DNA 阳离子自由基, 其空穴将最终沉积于 G 并产生类似于 dGMP 阳离子自由基的瞬态吸收。由于 DNA 分子内部电荷转移反应太快, 远小于实验检测时段 (μs 级), 所以只能检测到具有 G 阳离子自由基特征瞬态吸收的 DNA 阳离子自由基吸收谱。

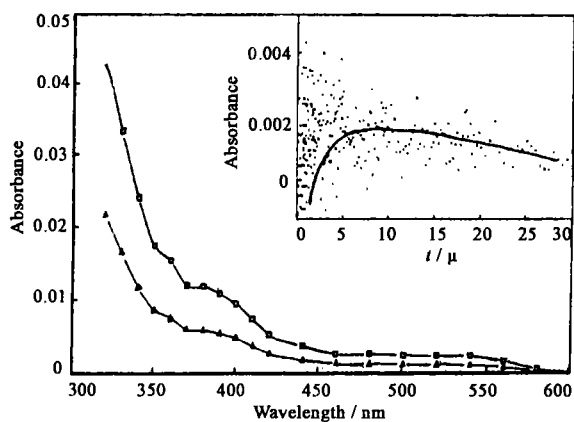


Fig.3 The interaction spectra of CS₂ cation radical with dGMP in pulse radiolysis. □ - 0.1m mol/L dGMP, ▲ no dGMP.

2.3 CS₂ 氧化性自由基与酪氨酸、色氨酸的氧化还原反应

图 4 为 10m mol/L CS₂, 200m mol/L CH₃CN, 0.1m mol/L 酪氨酸 (TyrOH) 水溶液脉冲辐解后所得到的瞬态吸收谱。从图 4 中可以看出, 加入 0.1m mol/L 酪氨酸后, 400nm 以下波长位置都具有较强的混合吸收, 此外在 500nm 左右还产生一个较弱的吸收峰。在含有 10m mol/LCS₂, 0.1m mol/L 酪氨酸水溶液体系中, OH 自由基与酪氨酸的反应速率常数为 1.33×10¹⁰ mol⁻¹·L·s⁻¹^[14], 和 OH 自由基与 CS₂ 反应速率相近, 由于溶液中 CS₂ 浓度远大于酪氨酸浓度 (100 倍), 基于上述相同理由, 该

溶液体系脉冲辐解后所产生的 OH 自由基主要与 CS₂ 反应, 而酪氨酸对 OH 自由基的竞争反应可以忽略。所以加入酪氨酸后所导致的 400nm 以下波长吸收变化 (CS₂ 氧化性自由基的吸收和其与酪氨酸反应产物吸收的叠加), 以及 500nm 左右的吸收均是由于 CS₂ 氧化性自由基与酪氨酸反应的结果。

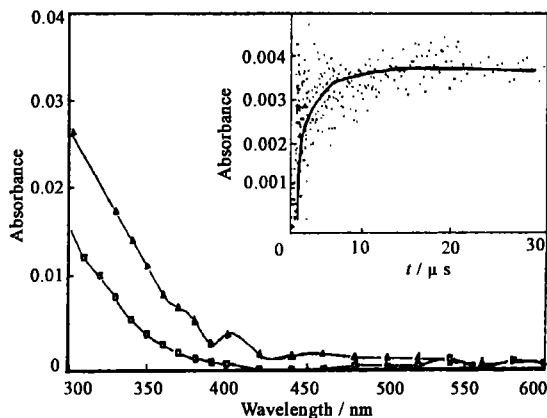


Fig.4 The interaction spectra of CS₂ cation radical with tyrosine in pulse radiolysis. ▲ 0.1m mol/L TyrOH, □ No TyrOH.

图 5 为 10m mol/L CS₂, 200m mol/L CH₃CN, 0.1m mol/L 色氨酸 (Tryptophan) 水溶液脉冲辐解后所得到的瞬态吸收谱。从图 5 中可以看出, 在加入 0.1m mol/L 色氨酸后, 在 400nm 以下波长位置也具有较强的混合吸收, 此外在 540nm 左右还产生一个较弱的吸收峰。在含有 10m mol/LCS₂, 0.1m mol/L 色氨酸水溶液体系中, OH 自由基与色氨酸的反应速率常数为 1.33×10¹⁰ mol⁻¹·L·s⁻¹^[15], 和 0.1m mol/L 酪氨酸体系相同, 该溶液体系脉冲辐解后所产生的 OH 自由基主要与 CS₂ 反应, 而色氨酸对 OH 自由基的竞争反应可忽

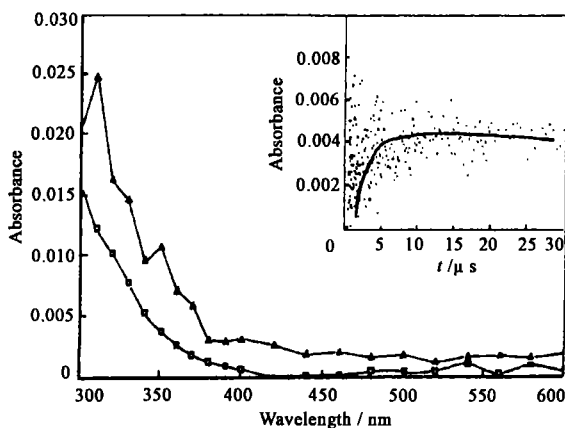


Fig.5 The interaction spectra of CS₂ cation radical with tryptophan in pulse radiolysis. ▲ 0.1m mol/L Tryptophan, □ No Tryptophan.

略。加入色氨酸后所导致的 400nm 以下波长吸收变化 (CS₂ 氧化性自由基的吸收和其与 Tryptophan 反应产物吸收的叠加), 以及 540nm 左右的吸收是 CS₂ 氧化性自由基与色氨酸反应的结果。可用以下反应式表示



3 结论

CS₂ 对环境对人类健康有影响是公认的事实, 其对生命物质的作用机理还不清楚, 本文主要通过研究氧化还原过程中的一些中间反应来分析其可能的影响机理。研究发现, CS₂ 在一定条件下能被氧化, 产生 CS₂ 氧化性自由基, 该氧化性自由基又可进一步与 dGMP、DNA、酪氨酸和色氨酸反应生成新的产物, 因此有可能导致生物染色体或蛋白质氨基酸的氧化性损伤。

参考文献

- 1 Beanchamp R O Jr, Bus James S, Popp James A *et al.* *CRC Crit Rev Toxicol*, 1983, **11**(3):169-278
- 2 张文昌. 中国公共卫生学报, 1992, **11**(4):245-252
ZANG W C. *Chinese J Public Health*, 1992, **11**(4):245-252
- 3 张文昌, 涂荔卿. 卫生毒理学杂志, 1998, **12**(1):13-16
ZHANG W C, TU L Q. *J Health Toxicol*, 1998, **12**(1):13-16
- 4 Jian L. *Luminescence*, 2001, **16**(4):281-283
- 5 Jian L, Chiang H. *Luminescence*, 2001, **16**(4):291-293
- 6 Jian L, Hu D S. *Int Arch Occup Environ Health*, 2000, **73**(7):503-506
- 7 江晓东, 简乐, 胡迪生. 中华预防医学杂志, 2000, **34**(6):348-350
JIANG X D, JING L, HU D S. *J Chine Preven. Med*, 2000, **4**(6):348-350
- 8 Wang W F, Luo J, Yao S D *et al.* *Radiation Phys Chem*, 1993, **42**(6):985-988
- 9 Afanassiev A M, Okazaki K, Freeman G R. *Can J Chem*, 1979, **57**(1):39-45
- 10 Roebhe W, Schoeneshoefler M, henglein A Z. *Naturforsch Teil B*, 1973, **28**(1):12-22
- 11 Scholes G, Shaw P, Willson R L *et al.* *Pulse radiolysis studies of aqueous solution of nucleic acid and related substance.* New York Acadmic Press, 1965, 151-164
- 12 Willson R L. *Biochem Soc Trans*, 1974, **2**(6):1082-1084
- 13 Steenzen S. *Chem Rev*, 1989, **89**(3): 503-520
- 14 Solar S, Solar W, Getoff N. *J Phys Chem*, 1984, **88**(10):2091-2095
- 15 Buxton G V, Greenstock C L, Helman W P *et al.* *J Phys Chem Ref Data* 1988, **17**:513-886

INJURY MECHANISM OF OXIDATIVE FREE RADICALS INDUSED BY CARBON DISULFIDE ON TARGET OF BIO-MOLECULES

JIAN Le¹ QIAN Suping² YAO Side² JIANG Huai¹

¹ (Institute of Occupational and Environmental Health, Zhejiang University, Hangzhou 310006)

² (Laboratory of Radiation Chemistry, Shanghai Institute of Nuclear Research, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

ABSTRACT Pulse radiolysis technique was used to probe the generation of radical cations from carbon disulfide, and characteristic absorbance spectra of the radical cations were obtained by time-resolved transient absorbance spectrum method. The injury mechanism of the bio-molecular targets by the free radicals and relative constants of reaction kinetics were studied. Results showed that the radical cations could react with DNA, dGMP, tyrosine and tryptophan and form new products, which may play an important role in oxidative injury on bio-molecules by carbon disulfide.

KEYWORDS Carbon disulfide, Radical cations, dGMP, DNA, Tyrosine, Tryptophan

CLC O644.2, Q523