

研究论文与科研成果报告

咖啡酸类保护剂辐射保护机理的 电子自旋共振研究

林念芸 李学鹏 屠铁城 谢继东

(中国科学院上海原子核研究所)

摘要 为了探讨电荷转移机理,详细研究了咖啡酸(DHPAA)及其甲酯(MDHPA)类保护剂的保护效应。DHPAA和MDHPA属于苯基取代的不饱和羧酸,和马来酸相似,它们具有较强的亲电子性能,因而其最低空轨道能量(1.79eV, 1.75eV)都比胸腺嘧啶(2.60eV),半胱氨酸(2.02eV)低,此外,咖啡酸与碱基还会形成长链分子堆积,有利于电子从嘧啶碱阴离子向DHPAA或MDHPA的长程转移。ESR研究有力地证实了上述的预测;即使dTMP与DHPAA或MDHPA的克分子比为10:1时,dTMP-DHPAA或dTMP-MDHPA 77K的ESR谱显示与DHPAA或MDHPA十分相似的特征而与dTMP不同,室温退火后便转化为DHPAA、MDHPA室温下的单峰,均不见胸腺嘧啶5位自由基的痕迹,而DNA-DHPAA、DNA-MDHPA当核苷酸与保护剂的克分子比为4:1时,DNA-DHPAA、DNA-MDHPA的ESR谱也显示与DHPAA或MDHPA相似的特征,室温下也不见胸腺嘧啶5位自由基的痕迹。

关键词 电荷转移保护;电子自旋共振;脱氧核糖核酸;啡咖酸;啡咖酸甲酯。

实 验 部 分

1. 试剂

脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dTMP)为生化试剂。

小牛胸腺DNA,粗制品为上海市牛奶公司综合厂产品,按盛沛根^[1]改进的方法进行提纯,提纯的DNA具有如下的特性: E_{260}/E_{230} 为2.40; E_{260}/E_{280} 为1.87;增色效应为37%;无蛋白含量;RNA含量为0.49%;磷含量为9.16%; $\epsilon_{(p),260}$ 为6712。

咖啡酸及其甲酯按中国科学院药物研究所提供的方法合成,DHPAA与MDHPA的熔点分别为224—225°C与158—159°C。

2. 样品的制备和辐照

将DNA、dTMP与DHPAA、MDHPA分别称量后溶于三次重蒸水中,然后按不同克分子比配成各种二元体系的水溶液,并分别进行冷冻干燥,氘化的DHPAA(DDPAA)是将DHPAA溶于99.93% D₂O中进行羟基的氢氘交换后再冷冻干燥,将冷冻干燥的样品置入内径约3mm的GG-17玻璃管中用超纯氮除氧封管,样品用⁶⁰Co源在77K避光条件下进行辐照至7Mrad。

3. ESR波谱的测定

所有被辐照的样品都用VarianE-112波谱仪的X波段进行测定,所用微波功率一般为

1mW, 用E-500-2NMR Gauss计进行磁场的跟踪测定, 用E-231/232双样品腔和DPPH标准样品协同标定 g 值。所有前述辐照样品均首先在77K进行ESR测定, 然后在室温退火并在室温测定。

结 果

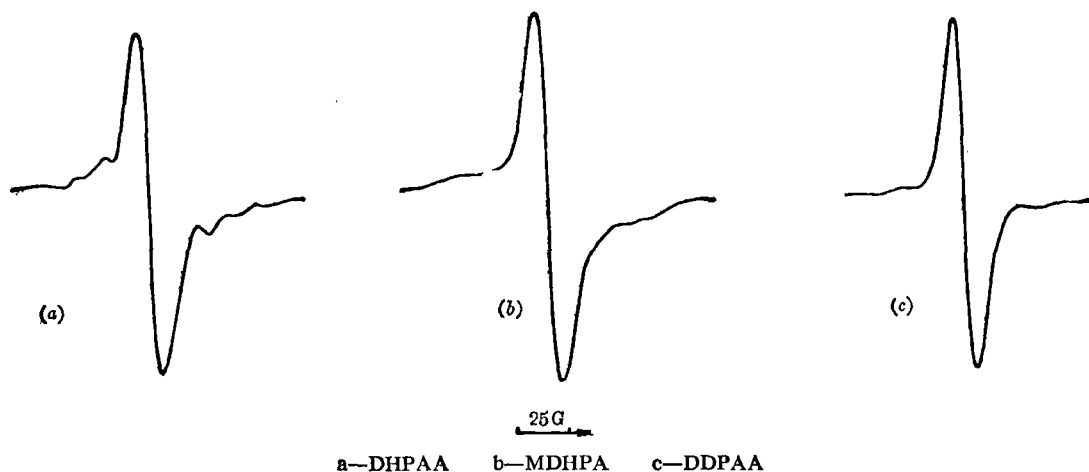


图1 DHPAA、MDHPA、DDPAA 77K辐照, 77K测定的波谱

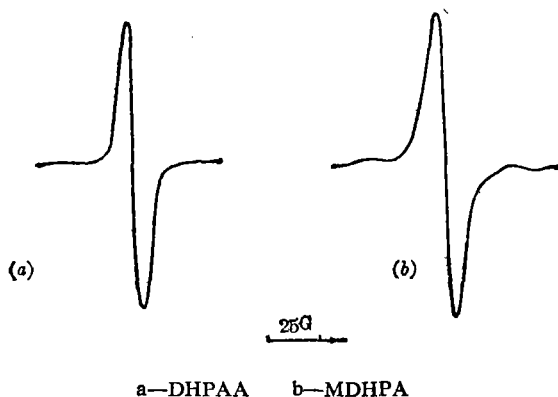


图2 DHPAA与MDHPA 77K辐照升至室温退火后的ESR波谱

1. DHPAA与MDHPA ESR

波谱的特征

Box^[2]和Iwasaki^[3]等人在用ESR研究羧酸单晶的辐解自由基产物时指出, 其主要氧化产物为羧基自由基 ($\text{RC} \begin{smallmatrix} \text{O} \\ \diagup \\ \text{O} \end{smallmatrix}$), 主要还原产物为羧酸阴离子自由基 ($\text{RC} \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{O}^- \end{smallmatrix}$)。Iwasaki^[3]等人

还特别注意研究了丁烯二酸的初级氧化和还原产物, 并发现其羧基自由基和羧酸阴离子自由基的 g 值都靠近

DPPH, 但前者的 g 值稍大些, 以马来酸为例, 二者的各向异性 g 值分别为(2.0261, 2.0061, 2.0035), (2.004, 2.0040, 2.0043)^[2~3]。Box^[2]和Iwasaki^[3]等人还一致指出丁烯二酸具有很强的亲电子性能, 例如, 当丁二酸中含有微量的富马酸时, ESR波谱仪仅显示富马酸阴离子自由基的特征。

DHPAA、MDHPA不仅是含有双键的不饱和羧酸及其甲酯, 而且其双键又与苯环共轭, 亲电子性能也应当很强, 应用半经验分子轨道计算方法(DNDO/2)求得其最低空轨道能量分别为1.79eV, 1.75eV。

如图1所示DHPAA与MDHPA 77K辐照, 77K测定的ESR波谱均有较对称的单峰, g 值分别为2.0042, 2.0043, 峰宽分别为13.72G, 13.44G, 二者不同之处为DHPAA在单峰的

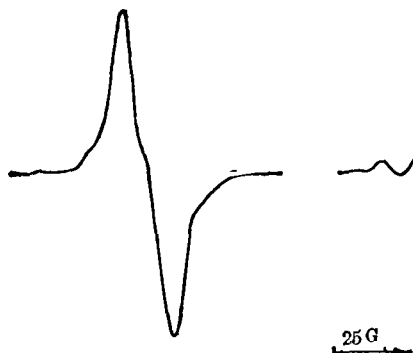


图3 DNA 77K, 辐照 77K测定的ESR波谱

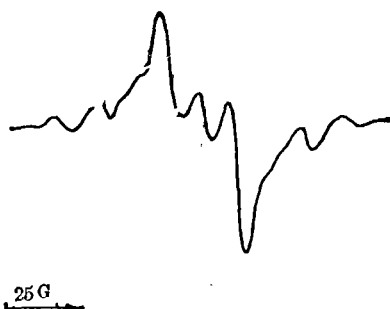
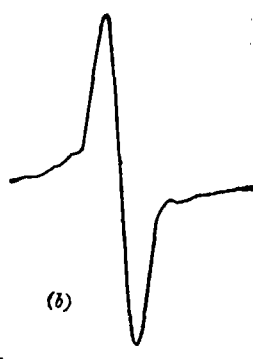
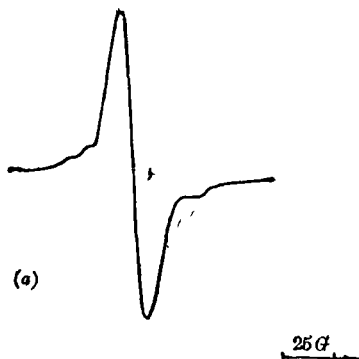
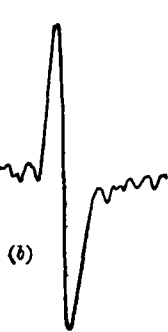
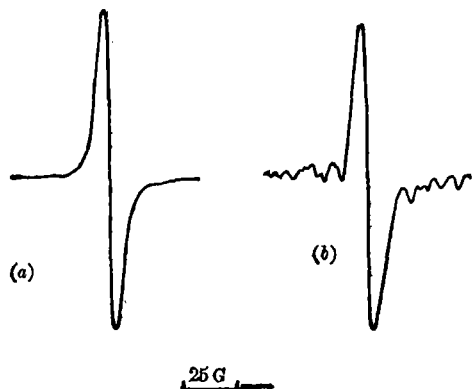


图4 DNA 77K辐照升至室温退火后的ESR波谱



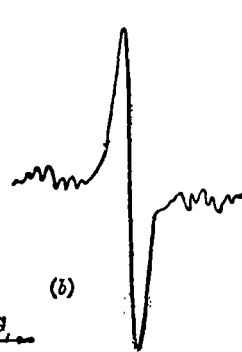
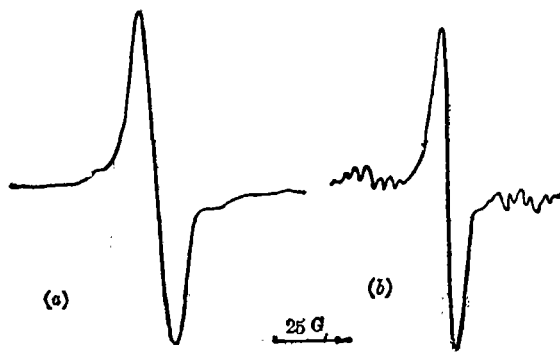
a—克分子比 1:1 b—克分子比 4:1

图5 DNA-MDHPA 二种分子混合物 77K 辐照测定的ESR波谱



a—克分子比 1:1 b—克分子比 4:1(增益 8×10^4)

图6 DNA-MDHPA 二种分子混合物 77K 辐照升至室温退火后测定的ESR波谱



a—77K测定的ESR波谱
b—升至室温退火后测定的ESR波谱(增益 5×10^4)

图7 DNA-DHPAA 分子混合物(克分子比4:1) 77K 辐照测定的ESR波谱

两侧出现四个低峰。可能显示羧酸自由基与羧酸阴离子自由基的超精细谱, 而MDHPA以及DDPAA由于羧基上的活动氢被甲基或氘取代, 难以明确显示阴离子自由基的超精细波谱。上述低温辐照的ESR波谱升至室温退火后均转化为对称的单峰(见图2)

2. DNA-MDHPA, DNA-DHPAA 二元体系

如图3所示, 77K辐照的DNA的ESR波谱主要为一不对称单峰, 略为显示胸腺嘧啶5位自由基的痕迹, g 值2.0028, 峰宽22.78G, 升至室温退火后, 明显地显示胸腺嘧啶5位自由基的特征, 总宽度为160G(见图4)。

DNA-MDHPA二种分子混合物(DNA中的核苷酸与MDHPA的克分子比为1:1, 4:1), 77K辐照测定都显示类

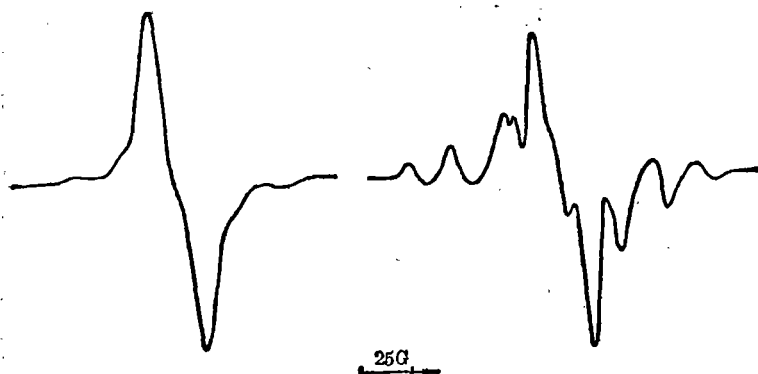
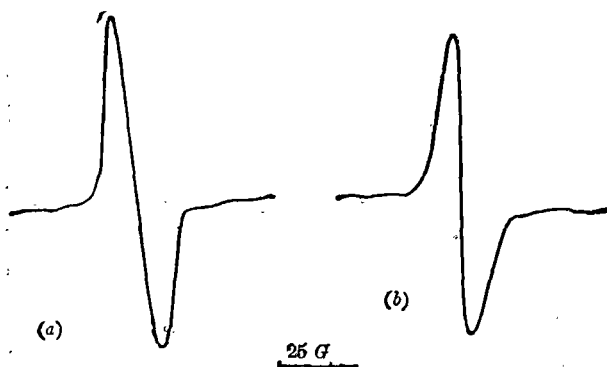


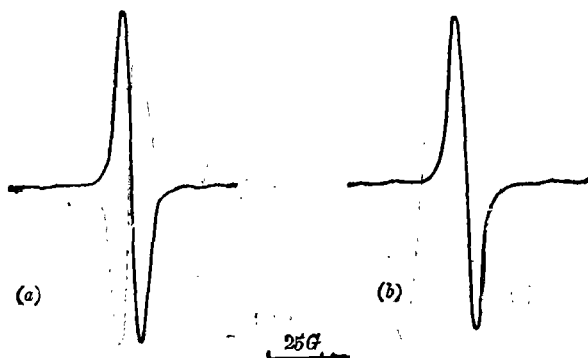
图8 dTMP 77K 辐照, 测定的 ESR 波谱

图9 dTMP 77K 辐照, 升至室温退火后测定的 ESR 波谱



a—克分子比 4:1 b—克分子比 10:1

图10 dTMP-MDHPA 二种分子混合物 77K 辐照、测定的 ESR 波谱



a—克分子比 4:1 b—克分子比 10:1

图11 dTMP-MDHPA 二种分子混合物 77K 辐照, 升至室温退火后测定的 ESR 波谱

同的 ESR 波谱, g 值分别为 2.0034, 2.0034, 峰宽分别为 18.19G, 19.40G (见图 5)。升至室温退火后均转化为 MDHPA 室温下的单峰, 而不见胸腺嘧啶 5 位自由基的痕迹 (见图 6)。

至于 DNA-DHPAA 则着重研究了分子混合物 (4:1) 的二元体系, 77K 辐照, 77K 测定也显示

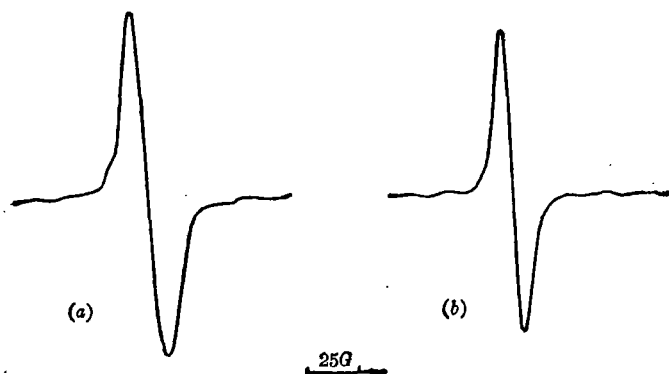
与 DNA-MDHPA 相似的波谱, g 值 2.0034, 峰宽 18.72G。升至室温退火后依然是 DHPAA 室温下的单峰, 也不见胸腺嘧啶 5 位自由基的痕迹 (见图 7)。

3. dTMP-MDHPA, dTMP-DHPAA 二元体系

如图 8 所示, 77K 辐照并测定的 dTMP 的波谱已显示出胸腺嘧啶 5 位自由基的痕迹, g 值 2.0040, 峰宽 24.45G, 升至室温退火后显示出更明显的胸腺嘧啶自由基的特征, 总宽度 160G (见图 9)。

dTMP-MDHPA 二种分子混合物 (4:1, 10:1) 77K 辐照、测定都显示类同的 ESR 波谱 (见图 10), g 值分别为 2.0043, 2.0043, 峰宽分别为 14.01G, 14.33G, 与 MDHPA 相似, 而与 dTMP 不同, 升至室温退火后转化为 MDHPA 室温下的单峰 (见图 11) 都不见胸腺嘧啶自由基的痕迹。

dTMP-DHPAA 主要研究了克分子比为 10:1 的分子混合物, g 值 2.0041, 峰宽 15.38G, 与 DHPAA 相似, 而与 dTMP 不同。升至室温退火后, 显示 DHPAA 室温下的单峰, 也不见胸腺嘧啶自由基的痕迹 (见图 12)。



a—77K 测定的 ESR 波谱 b—升至室温退火后测定的 ESR 波谱

图 12 dTMP-DHPAA 分子混合物 (10:1) 77K 辐照

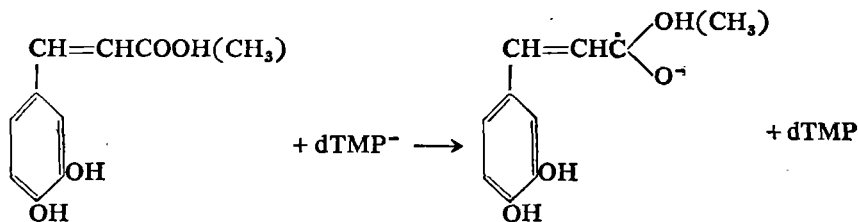
讨 论

如前所述 MDHPA 与 DHPAA 77K 辐照、测定的 ESR 谱, 其波谱中心 g 值与羧酸阴离子自由基的 g 值较接近。同时, 77K 辐照、测定的 DNA-MDHPA, DNA-DHPAA 及 dTMP-MDHPA, dTMP-DHPAA 四种体系, 其 ESR 波谱的 g 值均似羧酸阴离子自由基。上述辐射保护效应

机理可综合分析如下:

如前所述, 首先 MDHPA 和 DHPAA 属于苯基取代的不饱和羧酸, 其最低空轨道能量为 1.75eV 和 1.79eV, 不但低于 DNA 组份中亲电子性能较强的胸腺嘧啶 (2.60eV), 而且比电荷转移保护剂半胱氨酸 (2.02eV) 还要低, 因而上述二化合物有可能是优异电荷转移保护剂的一种模型。

同时, 在电离辐射作用下, 由于 DNA 分子内部的电荷转移过程产生正负电荷的两极分化^{[4][5]}。ESR 证实正电荷主要集中于鸟嘌呤, 电子主要被胸腺嘧啶所俘获。不论 DNA 中的胸腺嘧啶的负离子或胸腺嘧啶游离碱基负离子都会经由质子化反应生成人们熟知的胸腺嘧啶 5 位自由基, 并导致 DNA 的变性^[5]。为了防止 DNA 的脱氧胸腺嘧啶核苷酸在电离辐射作用下由于俘获电子并经由质子化而导致 DNA 的变性, 必需借助亲电子的保护剂经电荷转移过程达到保护 DNA 的目标。MDHPA, DHPAA 恰恰能够满足上述要求并实现下述电荷转移过程。



再者, 由于其具有芳香结构, 使之能与 DNA 的碱基通过 π 电子之间的相互作用形成长链的分子堆集, 有利于实现电子的长程转移。

这和亲电子的含硫氨基酸^[6]、碱性氨基酸^[7]对胸腺嘧啶辐射保护的电荷转移机理是十分相似的, 它们的共同本质都是胸腺嘧啶或其核苷酸的阴离子与这些亲电子保护剂之间的电子转移, 转移过程的产物属于羧酸或氨基酸阴离子自由基。

在本工作中, 承本所王高栋、王在兰同志提供纯 DNA 试样; 刘仁忠、倪民华同志参加分子轨道理论计算工作; 侯福珍、沈光华同志提供咖啡酸及其甲酯试样; 中国科学院上海生物化学研究所盛沛根、沈枝安、王华黎同志介绍提纯 DNA 的方法; 中国科学院上海药物研究所吴益芝同志介绍合成咖啡酸甲酯的方法, 在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 盛沛根, 王华黎, 沈枝安, 中国科学B辑, 4, 318(1982).
- [2] H. C. Box, Radiation Effects, ESR and ENDOR analysis, pp.118-120, pp.144-150, Academic Press, New York, 1977. E. E. Budzinski and H. C. Box, *J. Chem. Phys.*, 63, 4927 (1975).
- [3] M. Iwasaki, B. Eda and K. Torigama, *J. Am. Chem. soc.*, 92, 3211 (1970). M. Iwasaki, K. Minakata and K. Torigama, *J. Am. Chem. soc.*, 93, 3533 (1971). M. Iwasaki, H. Muto and K. Torigama, *J. Chem. Phys.*, 55, 1894 (1971). B. Eda and M. Iwasaki, *Mol. Phys.*, 24, 589 (1972).
- [4] A. Gräslund, A. Ehrenberg, A. Rupprecht and G. Ström *Biochem. Biophys. Acta*, 254, 172 (1971).
- [5] Lin Nianyun, Liu Renzhong, Li Xuepeng, Zhang Jiashang and Tu Tiecheng- *Radiat. Phys. Chem.*, 16, 445 (1980). A. Gräslund, A. Rupprecht, and A. Ehrenberg, in J. Hüttummann, W. Köhnlein and R. Teouleed., "Effects of Ionizing Radiation on DNA," Sect. I, Chap. 4, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. New York, 1978.
- [6] Li Xuepeng, Tu Tiecheng and Lin Nianyun, *Radiat. Phys. Chem.*, 17, 273 (1981).
- [7] 李学鹏, 林念芸, 屠铁城, 谢继东, 碱性氨基酸辐射保护机理的ESR研究, 辐射研究与辐射工艺学报, (付印中).

(1983年1月7日收到)

ESR Studies of Mechanism of Radiation Protection Effect by Caffeic Acid Protectors

Lin Nianyun Li Xuepeng Tu Tiecheng Xie Jidong

(Institute of Nuclear Research, Academia Sinica)

ABSTRACT

In order to investigate the charge transfer protection mechanism on DNA and its electrophilic nucleotide-dTMP, caffeic acid (DHPAA) and methyl caffeate (MDHPA) protectors have been studied in detail. DHPAA and MDHPA belong to phenylsubstituted unsaturated carboxylic acid, thus, their E A may be as high as maleic or fumaric acid and their energies of lowest empty molecular orbitals are 1.79eV, 1.75eV respectively and lower than that of thymine (2.60eV) and cystine (2.02eV). Besides, caffeic acid and bases of nucleotides form long chain of stacked arrays which is beneficial for long range electron transfer from pyrimidine anion to electrophilic acceptor-DHPAA or MDHPA. These predictions are strongly confirmed by ESR studies. The ESR spectra from dTMP-DHPAA ($g=2.0041$, $H_{pp}=15.38G$) and dTMP-MDHPA ($g=2.0043$, $H_{pp}=14.33G$) with minor molar ratio of DHPAA or MDHPA to dTMP 1:10, irradiated and recorded at 77K, reveal characteristic similar to that from DHPAA ($g=2.0042$, $H_{pp}=13.72G$) or MDHPA ($g=2.0043$, $H_{pp}=13.44G$), which represent carboxylic anion radical $\left[\text{RC} \begin{array}{l} \text{OH}(\text{CH}_3) \\ \text{O}^- \end{array} \right]$ alone, and different from dTMP ($g=2.0040$, $H_{pp}=24.45G$). After annealing at room temperature the ESR patterns changed into that from DHPAA or MDHPA alone at room temperature and no traces of ESR signal from 5-thymyl radical could be found. Regarding

the binary systems of DNA-DHPAA. DNA-MDHPA with minor molar ratio of protector to nucleotide (1:4), ESR spectra from DNA-DHPAA ($g=2.0034$, $H_{pp}=18.72G$), DNA-MDHPA ($g=2.0034$, $H_{pp}=19.40G$) also reveal the characterisitic similar to that from DHPAA or MDHPA alone, irradiated and recorded at 77K. After annealing at room temperature these ESR patterns also changed into that from DHPAA or MDHPA alone at room temperature and no traces of the well known octet pattern from 5-thymyl radical could be found.

KEYWORDS

Charge transfer; ESR; DNA; Caffeic acid; Methyl caffeate,