

色氨酸、酪氨酸对胸腺嘧啶辐射损伤的影响及其作用机理的研究

李 敏* 王高栋

(中国科学院上海原子核研究所)

摘要 用紫外分光光度法、CNDO/2 理论计算研究了色氨酸和酪氨酸对胸腺嘧啶的辐射保护与敏化作用,其作用机理是:在常温水溶液体系中是清除水辐解自由基,而在冰冻水溶液体系中,电荷转移和激发能转移则是主要的。

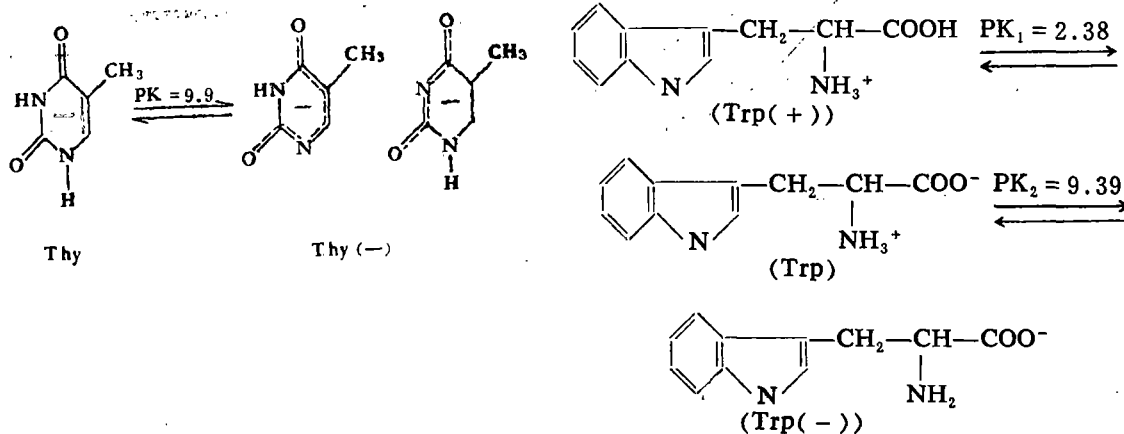
关键词 胸腺嘧啶;色氨酸;酪氨酸;辐射保护作用;辐射敏化作用。

引 言

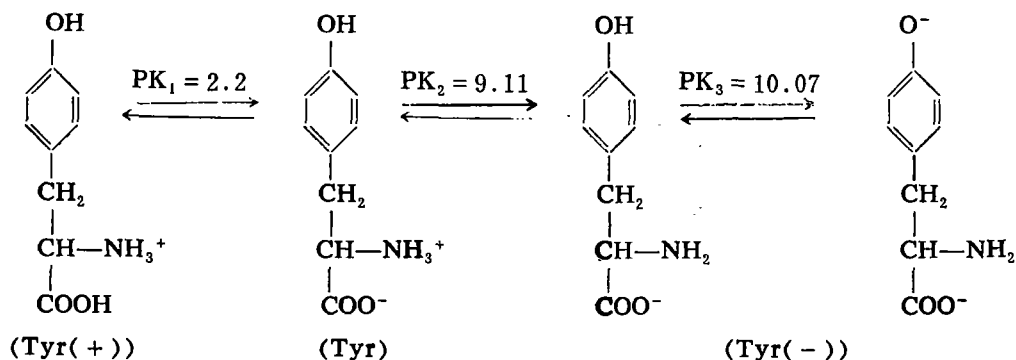
由于 DNA (脱氧核糖核酸)在生命现象中占有重要的地位,因而,电离辐射对 DNA 分子的损伤和修复机理成为目前国际上辐射研究中很活跃的课题。近年来,由于微观瞬态活性粒子的测试分析技术不断发展,各种分析方法的逐步改善,使得这方面的研究工作有了较快的进展, DNA 及其组份的辐射损伤以及有关辐射保护、致敏方面的研究也已取得了显著的成效。但关于 DNA-蛋白质络合物之间的辐化相互影响的模式体系的研究以及氨基酸作为辐射保护、致敏剂的专题报道还为数不多。本文选用了 DNA 中辐射较敏感的胸腺嘧啶,和蛋白质中辐射较敏感的芳香氨基酸(色氨酸和酪氨酸)作为模式体系,着重研究在冰冻水溶液条件下,由于混合堆积聚集态所形成的电子授受(EDA)络合物时,这些芳香氨基酸对胸腺嘧啶辐射损伤的影响及其机理。

实 验 部 份

胸腺嘧啶(Thy)、色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)均为生化试剂。在不同的酸度下所呈现的不同离子状态的结构及电离平衡常数如下^[1~3]:



* 现在中国科学院成都有机化学研究所



将上述试剂按照需要配制一定浓度的辐照体系，置于辐照管中，为减少体系中次级反应的复杂性，故辐照体系处于氮气气氛中。在研究常温水溶液体系时，辐照体系预先通入纯氮(99.99%) 20 min，并在继续用纯氮鼓泡的条件下进行辐照；冰冻水溶液体系是在常温下通纯氮 20 min 后，封管，在液空温度下迅速冷冻，然后置于杜瓦瓶中，在干冰条件下进行辐照，所用 ^{60}Co γ 射线的剂量率，用 Frick 剂量计测得，常温水溶液体系为 $7.5 \times 10^3 \text{ rad/min}$ ；冰冻水溶液体系为 $3.4 \times 10^4 \text{ rad/min}$ 。

用 751 紫外分光光度计测定体系辐照前后吸收值的变化，以表示嘧啶环上 5、6 位双键破坏引起的辐射损伤^[4]，辐照后的冰冻水溶液体系升至室温后进行分析。

实验结果

1. 常温水溶液体系中芳香氨基酸对胸腺嘧啶辐射损伤的影响

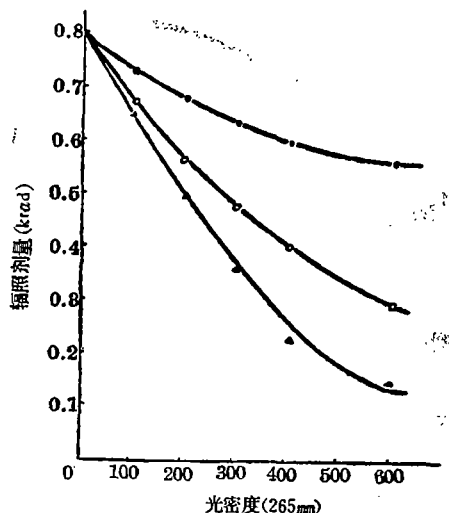


图 1 色氨酸、酪氨酸对胸腺嘧啶辐射损伤的影响

▲—胸腺嘧啶 ○—胸腺嘧啶-酪氨酸
 ●—胸腺嘧啶-色氨酸

1.30，这表明这二个氨基酸的存在，都对胸腺嘧啶的辐射损伤起了保护作用，且色氨酸的保护效果高于酪氨酸。

为了进一步探讨水辐解产生的活性粒子在实验体系中的作用机理，和氨基酸的不同的离子状

胸腺嘧啶和选用的氨基酸分别溶于三次重蒸水中，然后将其混合以配成二者浓度均为 $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ 的胸腺嘧啶-氨基酸二元体系，在 $1 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5 \text{ rad}$ 的剂量范围内充气辐照，测其 265 nm 处的光密度并对吸收剂量作图。图 1 给出了这些辐照体系中胸腺嘧啶 5、6 位双键破坏引起的辐射损伤与吸收剂量的关系。

在室温条件下，当胸腺嘧啶损伤至原来浓度的 37% 时，对应的剂量 (D_{37}) 为 $3.5 \times 10^5 \text{ rad}$ ，求得该条件下胸腺嘧啶的损伤 G 值为 1.74，与文献^[5]基本相符。由图 1 可见，相同的吸收剂量下，加入氨基酸的二元体系使胸腺嘧啶的损伤显著减小。例如在单纯胸腺嘧啶 D_{37} 剂量下，胸腺嘧啶-色氨酸，胸腺嘧啶-酪氨酸的二元体系中，胸腺嘧啶损伤 G 值分别为 0.62 及

态对胸腺嘧啶辐射损伤的影响,改变体系的 pH 值,观察了酸、碱性条件下,经 D_{37} 剂量辐照后胸腺嘧啶损伤 G 值并与中性体系相比较,实验结果列于表 1。

表 1 常温水溶液体系中胸腺嘧啶损伤 G 值

体系 pH	G	Thy	Thy-Trp	Thy-Tyr
1		2.14	0.49	1.10
~6		1.74	0.62	1.30
~12		0.55	0.34	0.29

可见,就胸腺嘧啶本身的损伤来看,在酸性条件下明显加剧,而在碱性条件下却大大减小。氨基酸在所研究的 pH 条件下都呈现不同程度的保护效果,色氨酸的保护效果随 pH 值增大而降低,酪氨酸在中性时的保护效果均低于酸性和碱性时的保护效果。

2. 冰冻水溶液体系中芳香氨基酸对胸腺嘧啶辐射损伤的影响

鉴于生物体中 DNA 往往为蛋白质所包围,这些蛋白质—DNA 络合物的辐射化学行为可能不同于孤立体系,尤其是芳香氨基酸有可能通过 π 电子云的重叠而与核酸碱基形成作用较强的分子堆集物,从而有利于辐射能量的转移。为了模拟这种条件,本文选用与常温下情况相同的胸腺嘧啶与色氨酸、酪氨酸的二元水溶液体系,在液空温度下迅速冷冻,以形成胸腺嘧啶与色氨酸或酪氨酸之间的络合物^[8]。表 2 给出了不同 pH 条件下,实验体系在干冰温度下辐照 3.5×10^7 rad 后求得的胸腺嘧啶损伤 G 值。

表 2 冰冻水溶液体系中胸腺嘧啶的损伤 G 值

体系 pH	G	Thy	Thy-Trp	Thy-Tyr
1		0.017	0.022	0.023
7		0.014	0.008	0.013
~12		0.010	0.005	0.004

可见,在类似生理 pH 条件下,色氨酸、酪氨酸仍呈现保护效果,与常温水溶液体系的结果基本一致。但在 pH 为 1 的酸性条件下,色氨酸、酪氨酸却呈现出明显的致敏效果,显著不同于常温水溶液体系;在碱性条件下,又呈现了高于中性条件时的保护效果,与常温水溶液体系相比较也有所差异。

讨 论

显然,常温水溶液和冰冻水溶液中,色氨酸、酪氨酸对胸腺嘧啶的辐射损伤所呈现的不同实验现象很可能是由于它们各自存在着特有的作用机理。

本文所研究的 $1 \times 10^{-3} M$ 的稀水溶液体系,在室温时色氨酸、酪氨酸对胸腺嘧啶的辐射损伤所呈现的保护作用,主要是通过这两种氨基酸跟胸腺嘧啶争夺水辐解产生的活性产物 OH 、 H 和 e_{aq}^- 的间接作用而引起的。由表 3 可见,它们的主要作用是清除 OH 自由基和 H 原子。其中色氨酸清除自由基的能力高于酪氨酸,因而二者相比得到了较高的保护效果(见图 1);在 OH 和 H 的作用更为显著的酸性条件下,色氨酸和酪氨酸的作用将更为突出,因而呈现更好的保护效果,且色氨酸仍优于酪氨酸;而在 OH 和 H 的作用都大大降低的碱性条件下,这两种氨基酸的保护效果也将随之下降。

本文所研究的 $-78^\circ C$ 的冰冻水溶液体系,水的辐射产生的活性产物虽还能以扩散控制速率与溶质反应,但其产额已大大降低,因此对于该体系,除了考虑水辐解自由基对靶分子的攻击外,还必须着重考虑射线对溶质分子的直接作用,这是由于在迅速冷冻过程中形成了溶质分子的堆集,

表3 胸腺嘧啶、色氨酸、酪氨酸与水辐解自由基反应的速率常数

	$e_{ag}(M^{-1}S^{-1})$	$OH(M^{-1}S^{-1})$	$H(M^{-1}S^{-1})$
Thy	a 1.8×10^{10}	a 5.6×10^9	a 3.8×10^8
Trp	b 3.0×10^8	b 1.2×10^{10}	b 9.0×10^9
Tyr	c 1.6×10^8	c 9.7×10^9	b 1.0×10^9

a-参见文献^[7] b-参见文献^[8] c-参见文献^[9]

产生局部高浓度,提高了射线对溶质分子直接作用的几率。

在射线作用下单纯胸腺嘧啶体系中,体系的电离以及次级电子归宿的途径以下式表示:



即电子可能被体系中的 H^+ 俘获而转化成 H 原子(2),进而再攻击胸腺嘧啶;也可能被中性胸腺嘧啶分子俘获,生成胸腺嘧啶阴离子(3),按 Ormerod^[10] 质子化机理导致损伤即:



这两个过程类似于常温水溶液体系中的自由基的作用,而反应(4)所表示的则是冰冻水溶液体系中的重要过程,即体系中的电子还可能与直接电离产生的胸腺嘧啶阳离子复合生成激发态,它们可以离解为自由基或重新电离或者经过多种途径返回至基态。由此可见,电子经(2)(3)(4)三条不同的途径,对胸腺嘧啶的损伤的贡献是不同的。当介质条件发生变化时,可能会通过阻抑或加剧其中某一过程,而导致胸腺嘧啶损伤的不同情况。例如,在强酸性条件下,体系中大量存在的 H^+ ,将使得反应(2)成为电子作用的主要途径,反应(3)几乎可以忽略,与胸腺嘧啶阳离子的复合也受到了阻抑,相应说来,提高了胸腺嘧啶阳离子的产额,因而该条件下胸腺嘧啶的损伤比较严重,中性条件时,由于 H^+ 浓度降低,反应(2)的比例下降,而使得电子有可能按(3)、(4)途径作用,显然(4)比(3)更有利,因为阳离子比中性分子具有更大的电子亲合性,所以中性条件下胸腺嘧啶损伤会比酸性时小些。碱性情况下, H^+ 浓度更低,反应(2)几乎可以不考虑,加之,胸腺嘧啶本身状态的变化,使电子的作用更利于与胸腺嘧啶阳离子的复合,所观察到的胸腺嘧啶的辐射损伤也将更小些。除此之外,体系中的 OH 自由基在不同 pH 条件下对胸腺嘧啶辐射损伤的影响,与常温水溶液体系中的情况基本相似,这些作用相互加强,便出现了表2所示的胸腺嘧啶在不同 pH 条件下损伤程度不同的实验现象。

至于在含有色氨酸和酪氨酸的胸腺嘧啶冰冻水溶液体系中,氨基酸对胸腺嘧啶的辐射损伤的影响,也不仅仅是通过清除水辐解产生的自由基,而氨基酸的激发和电离,通过影响前述(2)(3)(4)各反应产物的产额从而影响胸腺嘧啶的损伤情况;更重要的是由于两种不同溶质被迅速冰冻过程中形成电子授受络合物(EDA)^[6],有利于溶质分子之间的激发能和电荷的转移。

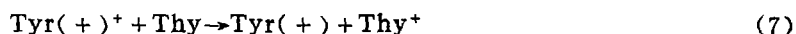
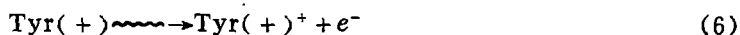
表4给出了我们用半经验分子轨道法(CNDO/2)计算得到的胸腺嘧啶和酪氨酸在不同离子状态时的最高占有轨道能量(ϵ_{HOMO})与最低空轨道能量(ϵ_{LUMO})。由表4可见,当酪氨酸由 pH=1 的正离子状态改变到 pH=12 的负离子状态以及 pH=7 的中性状态时,它的电离电位和电子亲合势发生了较大的变化。Grossweiner^[11] 在研究酶的光化学反应时发现:在碱性条件下,酪

表 4 不同离子状态的 ϵ_{HOMO} 、 ϵ_{LUMO}

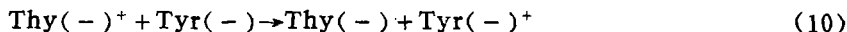
	$\epsilon_{\text{HOMO}}(\text{eV})$	$\epsilon_{\text{LUMO}}(\text{eV})$
Tyr	- 9.12	2.55
Tyr(+)	- 15.57	- 2.29
Tyr(-)	- 4.03	6.25
Thy	- 11.75	2.60
Thy(-)	- 4.08	9.08

氨酸的电离电位较之中性时约低 1 eV. Hayon^[12] 观察了几种氨基酸在不同 pH 条件下与 e_{aq}^- 的反应情况, 发现许多质子化的氨基酸 (pH = 0~2) 都提高了与 e_{aq}^- 的反应速率, 有的甚至提高几个量级。这种电离电位和电子亲合势的较大变化, 必将影响到电荷转移的方向性。由表 4 可见, 酸性条件下, 质子化的酪氨酸的电离电位和电子亲合势都明显地高于胸腺

嘧啶, 因此该体系除了反应(1)~(4)的反应外, 还可发生如下的反应:



这就提高了 Thy^+ 的产额, 导致胸腺嘧啶辐射损伤的敏化效应。而在 pH = 12 时, 如表 4 所示, 虽然 $\text{Tyr}(-)$ 的电子亲合势比相应的胸腺嘧啶高, 但由于电离电位比相应的胸腺嘧啶略低, 因此发生了相反方向的电荷转移:



降低了 $\text{Thy}(-)^+$ 的产额, 从而呈现出对胸腺嘧啶辐射损伤的保护效应。

这是一种极其有趣的现象, 即在电子授受络合物中, 当电子受体和给予体的离子状态发生变化时, 会引起络合物电子受体和给予体的易位, 而改变电荷转移的方向。

此外, 从表 1 和表 2 的结果还可以看出, 在碱性时酪氨酸对胸腺嘧啶的保护效应要比在中性时大得多, 这是在中性时, 除了酪氨酸和胸腺嘧啶争夺水辐解产生的自由基以及它们之间发生的电荷转移外, 它给出了在此条件下还存在着激发能转移的明显启示。Hayon^[13] 指出, 酪氨酸的激发态在中性时为最大, 而在碱性时下降并接近于零。本实验室在研究冰冻水溶液中胸腺嘧啶二聚作用机理时, 曾经证明酪氨酸可把其激发能转移给胸腺嘧啶^[14]:



由于激发能转移导致胸腺嘧啶辐射损伤呈现敏化作用, 从而使该体系最终体现出的保护效应大为减小。显然色氨酸也具有类似的电荷转移和激发能的转移, 只不过其激发能转移的方向与胸腺嘧啶-酪氨酸体系略有不同而已。

结 论

本文用紫外分光光度法结合 CNDO/2 理论计算证实, 在生理 pH 条件下, 色氨酸、酪氨酸在分子水平上均呈现对 DNA 组份胸腺嘧啶的辐射保护作用, 其保护作用机理, 在常温水溶液体系中主要是清除水辐解自由基, 而在冰冻水溶液体系, 还存在着电荷转移和激发能的转移。这一模式体系的结论, 对于模拟研究生物细胞体系中 DNA-蛋白质在射线作用下的相互影响、对于考虑摄入适当的氨基酸作为细胞中无防御蛋白质的 DNA (如线粒体 DNA) 的辐射保护剂、对于研究电荷转移和激发能转移的辐射保护-敏化效应机理都具有一定的现实意义。

本工作是在硕士研究生李敏同志的导师林念芸同志的指导下完成的。作者对张加山同志在整个工作中所给予的热心帮助以及对论文的认真修改;刘仁忠、倪民华两同志帮助进行 CNDO/2 的计算,在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] A. R. Katritzky and A. J. Boulton, "Advances in Heterocyclic Chemistry," Vol. 18, P.259, Academic press, New York, San Francisco London, 1975.
- [2] J. J. Christensen, J. H. Rytting and R. M. Izatt, *J. Phys. Chem.*, 71, 2700(1967).
- [3] A. R. Katritzky and A. J. Boulton, "Advances in Heterocyclic Chemistry," Vol. 18, P. 203, Academic Press, New York San Francisco London, 1975.
- [4] C. L. Greenstock, J. A. Raleigh, W. Kremers and E. McDonald, *Int. J. Radiat. Biol.*, 22, 401 (1972).
- [5] G. A. Infante, E. J. Fendler and J. H. Fendler, *Radiat. Res. Rev.*, 4, 301 (1973).
- [6] T. Montenay-Garestier Michel Charlier and Claude Helene, in Shin Yi wang ed, "Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids," Vol. 1, Chap. 8, pp. 382~413, Academic press, New York San Francisco London, 1976.
- [7] G. Scholes, in J. Huttermann ed., "Effects of Ionizing Radiation on DNA," Section II, Chap 1, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 1978.
- [8] A. J. Swallow, "Radiation Chemistry an Introduction," Chap. 7, pp. 136~164, Halsted Press, London, 1973.
- [9] G. E. Adams, in M. Burton and J. L. Magee ed., "Advances in Radiation Chemistry," Vol. 3, p. 126, Wiley-Interscience, New York, London Sydney Toronto, 1972.
- [10] M. G. Ormerod, *Int. J. Radiat. Biol.*, 9, 291(1965).
- [11] L. I. Grossweiner, in M. Ebert, L. Howard ed., "Current Topics in Radiation Research," p. 141, North-Holl and Publishing Company, Amsterrdam, New York, Oxford, 1979.
- [12] E. Hayon, *Nat Phys. Sci.*, 238, 76(1972).
- [13] D. V. Bent and E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 2599(1975).
- [14] 秦国良, 张文龙, 张加山, 冰冻水溶液中 γ 引发胸腺嘧啶二聚作用机理研究I-影响二聚作用因素的研究, 辐射研究与辐射工艺学报, (付印中)。

(1983年1月17日收到)

EFFECT OF TRYPTOPHAN AND TYROSINE ON RADIATION DAMAGE OF THYMINE AND STUDY OF THE ACTION MECHANISM

Li min Wang Gaodong

(Shanghai Institute of Nuclear Research Academia Sinica)

ABSTRACT The radiation protection and radiation sensitization effects on thymine by tryptophan and tyrosine were investigated by means of U. V. spectrophotometry and CNDO $1/2$ calculation. The mechanisms of action mentioned above are due to scavenging radicals in the irradiated water in the system of aqueous solution at room temperature. However, In the system of frozen aqueous solution, predominately due to the charge transfer and excitation transfer.

KEY WORDS Thymine; Tryptophan; Tyrosine; Radiation protection; Radiation sensitization.