

5'-鸟苷酸(5'-GMP) γ 辐解机理研究

朱幼南 翁晨亮 张加山

(中国科学院上海原子核研究所)

摘要 本文研究了 γ 引发 5'-鸟苷酸释放无机磷的反应机理, 证明在中性水溶液中水辐解产生的 OH 自由基是引起 5'-鸟苷酸释放无机磷的主要活性粒种, H 原子对 5'-鸟苷酸释放无机磷也有一定的贡献。

用竞争动力学方法测出了 OH 自由基与 5'-鸟苷酸 C4' 的反应速率常数为 $(1.2 \pm 0.1) \times 10^8 (\text{mol/L})^{-1} \text{s}^{-1}$ 以及与 5'-鸟苷酸的反应速率常数为 $(5.1 \pm 0.4) \times 10^9 (\text{mol/L})^{-1} \text{s}^{-1}$ 。

关键词 5'-GMP; 释放无机磷; 自由基清除剂; 反应速率常数。

引言

5'-鸟苷酸是核酸的重要组份之一, 它的辐射化学行为引起人们的极大兴趣。ESR 研究指出固态 DNA 的四种碱基辐解时, 负离子集中于胸腺嘧啶, 而正离子集中在鸟嘌呤^[1~2]。脱氧鸟嘌呤核苷酸(dGMP)的研究指出, 水辐解产生的 OH 自由基攻击 dGMP 的 C4' 形成氧化性的 dGMP 的 OH 自由基加合物(dGMP[•]OH)_{ox}, 而攻击 C5 或 C8 形成还原性自由基加合物(dGMP)_{red}^[3]。Raleigh 等^[4~5]测出了在氮气饱和与氧化亚氮饱和的中性水溶液体系中, γ 引发 5'-GMP 释放无机磷的 G_{pi} 值, 指出后者的 G_{pi} 值比前者大, 表明从 5'-GMP 释放无机磷是由 OH 自由基引起的。但是关于 γ 引发 5'-GMP 释放无机磷的机理迄今尚不清楚, 至于水辐解的活性粒种与 5'-GMP 戊糖部分的反应速率常数亦未见报道。本文用磷钼蓝比色法测定 5'-GMP γ 辐解时释出的无机磷, 研究了水辐解的活性粒种与 5'-GMP 反应释放无机磷的机理, 并着重研究 OH 自由基引发 5'-GMP 释放无机磷的反应动力学历程, 测出了 OH 自由基与 5'-GMP 的反应速率常数和它在 5'-GMP 的 C4' 抽氢的反应速率常数。

实验部分

5'-GMP 是 Sigma 公司生产的生化试剂, 含量 99%, 辐照溶液是用三羟甲基氨基甲烷缓冲试剂及三次重蒸馏水配制成 $1 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 的中性 5'-GMP 水溶液。特丁醇是上海试剂一厂出品, 经蒸馏纯化。甲酸钠为 A.R 级试剂, 干燥至恒重后备用。

辐照溶液用纯 N₂ 或 N₂O 鼓泡 20 min 后封管, 用 ⁶⁰Co γ 射线室温辐照, 剂量率为 $0.9 \times 10^2 \text{Gy/min}$ 。

辐解释出的无机磷用磷钼蓝比色法^[6]在 751 分光光度计上 710 nm 处测定。实验结果误差不超过 5%。

结果和讨论

1. 5'-GMP 释放无机磷的反应机理

在稀水溶液中, γ 辐解引发 5'-GMP 释放无机磷, 这已是众所周知的事实, 并被公认为是水辐解产生的活性粒种间接作用的结果。但是在以往的研究中, 除了指出 OH 自由基起着相当重要的作用外, 对于水辐解粒种中 OH 自由基, H 原子和水合电子, 它们各自在 5'-GMP 释放无机磷过程中的作用如何, 尚无明确结论, 为此我们做了研究。

(1) 关于 OH 自由基对 5'-GMP 释放无机磷的贡献 图 1 给出了在含和不含特丁醇的氮气饱和和 $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 5'-GMP 中性(pH 7)水溶液体系中, γ 引发 5'-GMP 释放无机磷的浓度与剂量的关系。从中可以看出在剂量为 $5 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3 \text{ Gy}$ 的范围内, 不含特丁醇体系 G_{Pi} 值(每吸收 100 eV 能量时由 5'-GMP 释放出无机磷的分子数)远大于含 1 mol/L 特丁醇时的 G_{Pi} 值。这表明跟 H 原子与水合电子比较, OH 自由基是引起 5'-GMP 释放无机磷的主要活性粒种。 $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 5'-GMP 的氧化亚氮饱和的中性水溶液体系的实验结果也证明了这一点。因为氧化亚氮把水合电子转化为 OH 自由基, 使 G_{Pi} 值从氮气饱和体系中的 7.7×10^{-2} 分子/100 eV 增至 0.133 分子/100 eV。这与 Raleigh 等人^[4-5]的结果是一致的, 但他们测得的 G_{Pi} 值在这两个体系中分别为 0.15 和 0.22 分子/100 eV, 比我们测出的值高。这可归结为所采用的剂量范围不同所致。我们发现当体系的吸收剂量达到一定范围之后, 核苷酸释放无机磷的 G_{Pi} 随剂量的增大而增大。这是因为在核苷酸中其碱基部分及戊糖部分与水辐解活性粒种的反应相竞争, 而前者和水辐解活性粒种的反应性要比后者大, 因此其反应机率比后者大, 但当达到一定剂量后, 由于大部份碱基已先被损伤, 核苷酸中碱基部份的浓度小于戊糖部份的浓度, 从而引起戊糖部份与水辐解活性粒种的反应机率增加。

(2) 关于 H 原子在 5'-GMP 释放无机磷中的作用 从图 1 的曲线(b), 我们得到在剂量为 $4 \times 10^3 \text{ Gy}$ 以下时, 氮气饱和的含 1 mol/L 特丁醇的 $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 5'-GMP 中性水溶液体系中, 从 5'-GMP 释放无机磷的 G_{Pi} 值为 1.1×10^{-2} 分子/100 eV。在氮气饱和的中性水溶液体系中, 能够引起 5'-GMP 释放无机磷的水辐解活性产物除 OH 自由基外, 还有 H 原子, 因为在含 1 mol/L 特丁醇的体系中, OH 自由基已有 99% 以上被清除掉, 剩下的 OH 自由基对 G_{Pi} 值的贡献已可忽略不计, 因此这一 $G_{\text{Pi}} = 1.1 \times 10^{-2}$, 应该归之于 H

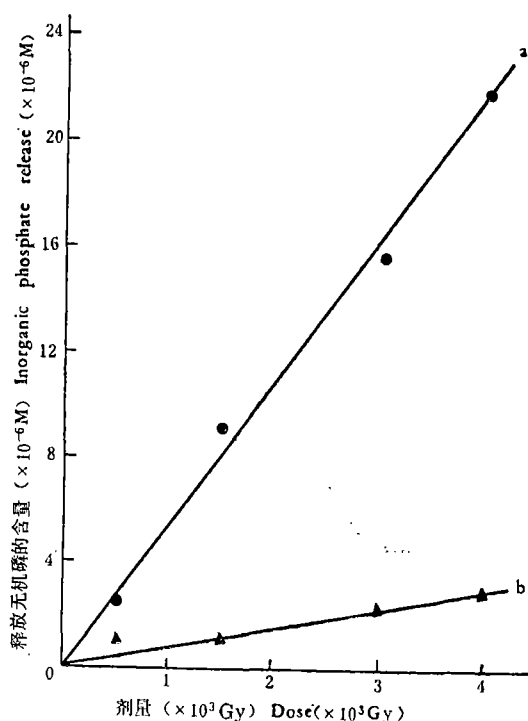


图 1 氮气饱和溶液中 5'-GMP 释磷量与剂量的关系

(a) 5'-GMP, (b) 5'-GMP—1 mol/L 特丁醇
Fig 1 The relation between the concentration of the released phosphate (Pi) and the dose absorbed in nitrogen-saturated sample system.

(a) 5'-GMP, (b) 5'-GMP—1 mol/L t-butyl alcohol

原子的贡献。我们在以甲酸钠作为 OH 自由基清除剂的实验中,发现当甲酸钠的浓度大于 $5 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 时,在本实验的剂量范围内,用磷钼蓝比色法已无法测出体系所释出无机磷(其光密度已在实验的误差范围之内)。在甲酸钠的浓度大于 $5 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 时,绝大部分的 OH 自由基和 H 原子均已被清除,它们攻击 5'-GMP 戊糖的机率完全可以忽略,体系中剩下的只是水合电子,但此时却测不出无机磷,这表明水合电子对 5'-GMP 释放无机磷没有贡献。

(3) OH 自由基和 5'-GMP 反应时释放无机磷的位置 OH 自由基只有攻击 5'-GMP 的戊糖部分才能释放无机磷,但戊糖有五个可被抽氢反应的位置,由于 OH 自由基与有机化合物反应的选择性比较小,因此可以假设它从戊糖的各个位置抽氢是无规的。曾经认为 OH 自由基攻击 5'-GMP 的 C_1' 和 C_2' 位置能够释放无机磷^[7],且从脱氧-核糖-5'-磷酸脂的研究知道,OH 自由基攻击戊糖的 C_1' 而形成的 C_1' 自由基,只有在氧化剂的存在下才能释放出无机磷^[8],我们从硝基杂环化合物对 5'-GMP 的辐射敏化作用的研究中也证明了这一点^[9],而在 β 位置含有磷酸根基团的 α -烷氧基自由基却能迅速地水解释放出无机磷^[10]。因此,可以认为在 5'-GMP 水溶液的辐解中所释放的无机磷主要是来自于 OH 自由基攻击 5'-GMP 的戊糖部分中的 C_1' 位置^[11]。

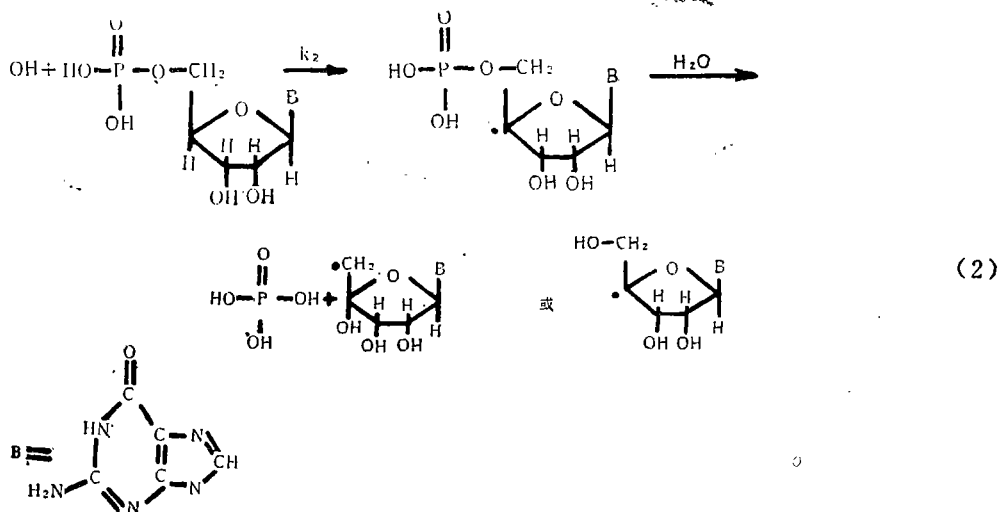
2. 5'-GMP 释放无机磷的反应动力学

前面已经指出,5'-GMP 中性水溶液辐解时,对释放无机磷而言,水合电子是没有贡献的,H 原子由于其产额较少而对无机磷释放的贡献也较少,主要是 OH 自由基的贡献。现在我们着重研究 OH 自由基引发 5'-GMP 释放无机磷的反应动力学。

因为在 5'-GMP 的分子中有两部分是 OH 自由基攻击的对象:碱基部分和戊糖部分。假定碱基与 OH 自由基的反应为(1):



但与戊糖部分的反应却比较复杂,因为 OH 自由基在戊糖部分有五个可抽氢的位置,而要释放无机磷,只有在 C_1' 位置抽氢,形成 5'-GMP 的 C_1' 自由基而后水解,其反应为(2)



OH 自由基在戊糖部分其他位置也要发生抽氢反应,但不释放无机磷,其总的反应为(3)



因此,5'-GMP 辐解时其释放无机磷 G_{pi} 值为

$$G_{pi} = G_{OH} \frac{k_2}{k_1 + k_2 + k_3} \quad (I)$$

当体系中添加 OH 自由基清除剂如 $HCOO^-$ 或特丁醇时, 便与上述反应竞争 OH 自由基:



此时 5'-GMP 释放无机磷的 G_{pi} 值为

$$G_{pi} = \frac{k_2[5'-GMP]}{k_1[5'-GMP] + k_2[5'-GMP] + k_3[5'-GMP] + k_4[HCOO^-]} G_{OH} \quad (II)$$

或

$$\frac{1}{G_{pi}} = \frac{1}{G_{OH}} \left(\frac{k_1 + k_2 + k_3}{k_2} + \frac{k_4}{k_2} \frac{[HCOO^-]}{[5'-GMP]} \right) \quad (III)$$

以 $\frac{1}{G_{pi}}$ 对 $\frac{[HCOO^-]}{[5'-GMP]}$ 作图应为一直线, 其截距 a 等于 $\frac{1}{G_{OH}} \frac{k_1 + k_2 + k_3}{k_2}$, 该直线的斜率为 $b = \frac{1}{G_{OH}} \frac{k_4}{k_2}$ 。令 $k_1 + k_2 + k_3 = k_0$ 为 OH 自由基与 5'-GMP 相互作用的总的反应速度常数。

首先, 我们在氮饱和的 5'-GMP 中性水溶液体系中, 加入不同浓度的甲酸钠, 辐照至吸收剂量为 $5 \times 10^2 Gy$ 时, 把测出的无机磷的产额 G_{pi} 按方程(III)对 $[HCOO^-]/[5'-GMP]$ 作图得一直线为图 2 a, 其截距 $a = 15.9$, 斜率 $b = 9.22$ 。从截距 a 得甲酸钠的浓度为零时 5'-GMP 所释放出的无机磷的产额 G_{pi} 为 6.3×10^{-2} , 加上 H 原子和 5'-GMP 反应释放无机磷的产额 1.1×10^{-2} , 则该体系释放无机磷的产额为 7.4×10^{-2} , 与实验测得的 7.7×10^{-2} 分子/100 eV 相当一致。从图 2 a 直线的斜率 b 并取 $k_4 = 2.8 \times 10^9 (mol/L)^{-1} S^{-1}$ 和 G_{OH} 为 2.72, 得 k_2 为 $1.1 \times 10^8 (mol/L)^{-1} S^{-1}$, 从而可得 $k_0 = 4.8 \times 10^9 (mol/L)^{-1} S^{-1}$ 。

其次, 我们在氧化亚氮饱和的 5'-GMP 中性水溶液中, 测出所释出的无机磷产额随所添加的甲酸钠浓度的变化情况。同样以 $\frac{1}{G_{pi}}$ 对 $[HCOO^-]/[5'-GMP]$ 作图亦为一直线如图 2 b, 从其截距 a 得甲酸钠的浓度为零时, 5'-GMP 释放无机磷的产额为 0.116, 加上 H 原子贡献的 G_{pi} 1.1×10^{-2} , 则体系所释出的无机磷的产额 G_{pi} 为 0.127, 与实验值 0.133 也很一致。从该图的斜率 b 和 G_{OH} 值, 并取 k_4 为 $2.8 \times 10^9 (mol/L)^{-1} S^{-1}$ 得 $k_2 = 1.2 \times 10^8 (mol/L)^{-1} S^{-1}$, 进而得 $k_0 = 5.5 \times 10^9 (mol/L)^{-1} S^{-1}$ 。

再者, 我们以特丁醇为 OH 自由基的清除剂, 测出 5'-GMP 释放无机磷的产额随特丁醇浓度的变化而变化的情况, 用同上述类似的方法处理得 $k_2 = 1.2 \times 10^8 (mol/L)^{-1} S^{-1}$ 和 $k_0 = 5.0 \times 10^9 (mol/L)^{-1} S^{-1}$ 。现把我们在三个体系中所测出的 OH 自由基与 5'-GMP 的反应速率常数列于表 1。

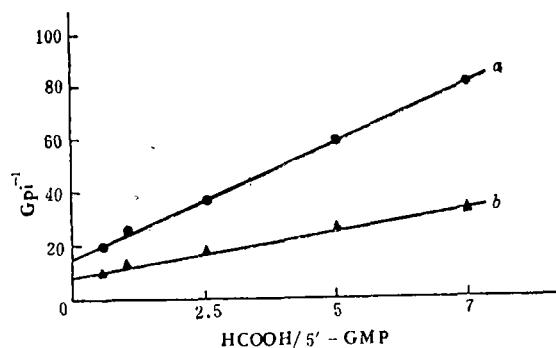


图 2 $[HCOO^-]/[5'-GMP]$ 对 $\frac{1}{G_{pi}}$ 的关系图

(a) N_2 饱和, (b) N_2O 饱和

Fig 2 The relation between the $[HCOO^-]/[5'-GMP]$ and $\frac{1}{G_{pi}}$

(a) N_2 -Saturated (b) N_2O -Saturated

表 1 OH 自由基与 5'-GMP 的反应速率常数
Table 1 The rate constant of the reaction of OH radical with 5'-GMP

体 系 System	$k_0(\text{OH} + 5'\text{-GMP}) \times 10^9$ (mol/L) ⁻¹ S ⁻¹	$k(\text{OH} + 5'\text{-GMP}-(\text{C}_4')) \times$ $10^8(\text{mol/L})^{-1}\text{S}^{-1}$
5'-GMP-t-butanol 5'-GMP——特丁醇	5.0	1.2
N ₂ ——saturated 5'-GMP——HCOO ⁻ 氮气饱和	4.8	1.1
N ₂ O——saturated 5'-GMP——HCOO ⁻ 氧化亚氮饱和	5.5	1.2
average value 平 均 值	5.1±0.4	1.2±0.1

综上所述,我们用竞争动力学方法测出 OH 自由基与 5'-GMP 反应的速率常数 $k_0 = 5.1 \times 10^9 (\text{mol/L})^{-1}\text{S}^{-1}$ (OH 自由基与 dGMP 的反应速率常数 K 为 $5 \times 10^9 (\text{mol/L})^{-1}\text{S}^{-1}$ [13]), 并测出 OH 自由基攻击 5'-GMP 的戊糖而释放无机磷的特定位置的速率常数 k 为 $1.2 \times 10^8 (\text{mol/L})^{-1}\text{S}^{-1}$ 。如果把 OH 自由基攻击 5'-GMP 的戊糖中的各个位置看作是随机的,则在 γ 辐照的 5'-GMP 中性稀水溶液体系中,攻击其戊糖的 OH 自由基约占 OH 自由基的 12%,这跟 Scholes [14] 报导的约有 10~20% 的 OH 自由基攻击戊糖的结果是相当一致。同时我们可以估计出,OH 自由基与 5'-GMP 的碱基部分的反应速率常数约为 $4.5 \times 10^9 (\text{mol/L})^{-1}\text{S}^{-1}$ 。这些结果证明我们所提出的关于 OH 自由基引发 5'-GMP 释放无机磷的反应动力学历程是合理的。

结 论

根据我们对 5'-GMP 稀水溶液体系的辐射化学研究,可以得出如下关于 γ 引发 5'-GMP 释放无机磷反应机理的一些合理的结论。

(1) 在中性水溶液体系中,水辐解产生的 OH 自由基是引发 5'-GMP 释放无机磷的主要活性粒种, H 原子对 5'-GMP 释放无机磷也有一定的作用,但是水合电子对释放无机磷却没有贡献。

(2) OH 自由基与 5'-GMP 反应的速率常数为 $5.1 \times 10^9 (\text{mol/L})^{-1}\text{S}^{-1}$, 它与 5'-GMP C_{4'} 的反应速率常数为 $1.2 \times 10^8 (\text{mol/L})^{-1}\text{S}^{-1}$ 。

参 考 文 献

- [1] S. Gregoli, M. Olast and A. Bertinchamps, *Radiat. Res.*, 89, 238(1982).
- [2] S. Gregoli, M. Olast and A. Bertinchamps, *Radiat. Res.*, 77, 417(1979).
- [3] P. O'Neill, in J. J. Breerse et al. eds., "Radiation Research Chemistry and Physics", Proceedings of the seventh international congress of radiation research, A3-33, Martinus Nijhoff publishers, 1983.
- [4] J. A. Raleigh, C. L. Greenstock, R. Whitehouse and W. Kremers, *J. Radiat. Biol.*, 24, 595 (1973).
- [5] J. A. Raleigh, C. L. Greenstock and W. Kremers, *J. Radiat. Biol.*, 23, 457(1973).
- [6] 郁向荣、沙逸仙, 有机及高分子化合物中磷的快速微量测定, 化学通报, 945.(1965).

- [7] C. V. Sonntag and D. Schulte-Frohlinde in J. Hüttermann et al. eds., "Effects of Ionizing Radiation on DNA", p 204. Springer-verlag Berlin Heidelberg New York, 1978
- [8] E. R. L. Gaughran and A. J. Goudle, "Sterilization by Ionizing Radiation" pp. 360~362 Montréal, Québec, Canada 1974.
- [9] 翁晨亮, 朱幼南, 硝基杂环化合物 N-6, N-8 对 5'-鸟苷酸的辐射敏化作用及其机理研究, 辐射研究与辐射工艺学报, 3(4), 1985.
- [10] C. V. Sonntag, in H. E. Edwards et al., "Radiation Biology and Chemistry" pp. 94~96. Amsterdam-Oxford-New York 1979.
- [11] D. Schulte-Frohlinde, Radiation Research-Proc. 7th Int. Cong. Rad. Res. (J. J. Broerse et al. Eds) A 3-R p 133, Martinus Nijhoff publisher, Amsterdam, 1983.
- [12] J. T. Spinks and R. J. Woods, "An Introduction to Radiation Chemistry", 2nd, p 288 Wiley Interscience, New York, 1976.
- [13] R. L. Willson, P. Wardman and K. D. Asmus, *Nature*(London), 252, 323(1974).
- [14] G. Scholes, G. Stein and J. J. Weiss, *Nature*(London) 164, 709(1960). (1985 年 2 月 4 日收到)

THE STUDY γ -RADIOLYSIS MECHANISM FOR GUANOSINE 5'-MONOPHOSPHATE (5'-GMP)

Zhu Younan Weng Chenlian Zhang Jiashan

(Institute of Nuclear Research, Academia Sinica P. O. Box, 8204, Shanghai, China)

ABSTRACT In this paper, we study the reaction mechanism of 5'-GMP releasing the inorganic phosphate (Pi) induced by γ -ray. It is proved that hydroxyl radical produced by water radiolysis is the main active species which induct 5'-GMP releasing inorganic phosphate and H atom has also some contribution for inorganic phosphate release from 5'-GMP. It is measured by the competition kinetic method that the rate constants of the reaction of OH radical with 5'-GMP C_{1'} and 5'-GMP are $1.2 \times 10^8 (\text{mol/L})^{-1} \text{s}^{-1}$ and $5.1 \times 10^9 (\text{mol/L})^{-1} \text{s}^{-1}$, respectively.

KEY WORDS 5'-GMP; Releasing inorganic phosphate; Scavenger; Rate constant of reaction.

本刊 1985 年第 3 卷第 4 期勘正

因编辑中的疏忽,以致本刊第 3 卷第 4 期出现一些重要差错,是编辑责任心不强的表现,今后应引以为鉴。现更正如下,并向作者和读者致歉。

1. 周漪琴等“ γ 辐照聚脂薄膜的热释电研究”一文,应补上编辑部收稿日期: 1984 年 8 月 6 日收。

2. 周湘艳等“以小鼠精原细胞数的变化检测氚辐射的相对生物效应”一文, P 37 倒数第 11 行第 14 字和倒数第 17 行第 1 字,“雌”字应更正为“雄”字。同时在 P 36 和 P 38 首横线上的标题亦应更正为“以小鼠精原细胞数的变化检测氚辐射的相对生物效应”。

3. 翁晨亮等“硝基杂环化合物 N-6、N-8 对 5'-鸟苷酸的辐射敏化作用及其机理的研究”一文,在 P 49 中前言第一段从“而 5'-鸟苷酸…”起至段末应更正为“脱氧鸟苷酸是 DNA 的组分之一,研究硝基杂环化合物对 5'-GMP 辐射损伤的影响,对研究核酸的辐射敏化机理有一定意义”。同时应补上编辑部收稿日期: 1985 年 2 月 4 日。

本刊编辑部