

芥子碱对 DNA 及其组份电荷转移 保护机理的 ESR 研究

林念芸 李学鹏 屠铁城 董继荣

(中国科学院上海原子核研究所)

摘要 为了探讨对 DNA 及其组份的电荷转移保护机理, 继咖啡酸之后研究了另一个羟基肉桂酸衍生物——芥子碱的保护效应。芥子碱也属于苯基取代不饱和羧酸而且它的电子亲和势与咖啡酸非常接近, 但其电离电位(ϵ_{HOMO} : -11.27 eV)却明显低于咖啡酸(ϵ_{HOMO} : -11.74 eV), 因此芥子碱应对 DNA 呈现更强的保护效应。例如, 当 DNA-芥子碱二元体系中芥子碱的克分子比明显低于 DNA-咖啡酸中咖啡酸的克分子比时低温辐照并测定的 ESR 波谱以及室温退火后测定的 ESR 波谱均呈现很强的芥子碱信号, 未发现以胸腺嘧啶五位自由基的特征的任何痕迹, 说明芥子碱对 DNA 的保护效应比咖啡酸强。

关键词 羟基肉桂酸衍生物; 芥子碱; 电荷转移保护; 电子自旋共振; 脱氧核糖核酸。

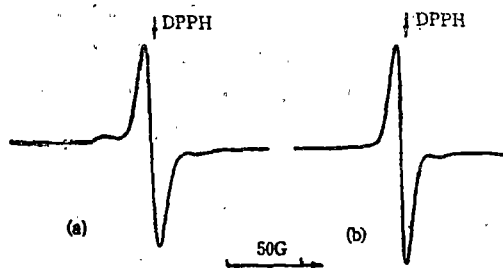


图 1 芥子碱 77 K 辐照后测定的 ESR 波谱
(a) 77 K 测定的 ESR 波谱, $g = 2.0041$, $\Delta H_{\text{pp}} = 11.22 \text{ G}$; (b) 升至室温退火后测定的 ESR 波谱, $g = 2.0043$, $\Delta H_{\text{pp}} = 9.43 \text{ G}$ 。

Fig. 1 ESR Spectra from sinapine irradiated at 77 K

(a) Recorded at 77 K, $g = 2.0041$, $\Delta H_{\text{pp}} = 11.22 \text{ G}$; (b) Recorded after annealing at room temperature $g = 2.0043$, $\Delta H_{\text{pp}} = 9.42 \text{ G}$ 。

前 言

对于羟基肉桂酸衍生物对 DNA 或其组份的辐射保护机理, 本实验室自研究咖啡酸及其甲酯开始已取得了一系列开创性的成果^[1], 揭示其保护效应的本质为电荷转移机理, 在随后对阿魏酸, 芥子酸的研究不但更充分地证实上述机理, 而且强调了辐射保护机理与抗化学致癌的相似性^[2]。由于芥子碱广泛存在于十字花科植物中其抗辐射与抗癌作用的研究显然具有更重要的理论与实际意义^[3]。

实 验 部 分

1. 试剂

小牛胸腺 DNA 为美国 Sigma 公司的生化试剂, 脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dTMP)为国产生物试剂。芥子碱则按顾瑞琦所报道的方法^[3]进行提取的, 经重结晶后熔点为 179°C 。

2. 样品的制备与辐照见文献^[1]。

3. ESR 波谱的测定

所有被辐照的样品均由 VarianE-112 波谱仪在 X 波段进行测定, 所用的微波功率一般为

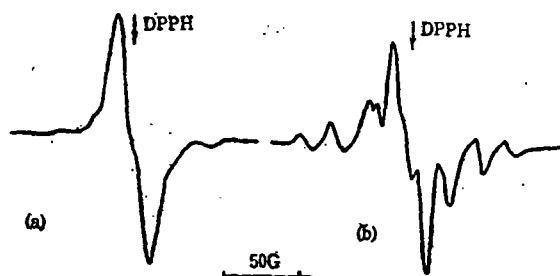


图2 dTMP 77 K 辐照后测定的 ESR 波谱
(a) 77 K 测定的 ESR 波谱, $g = 2.0040$, $\Delta H_{pp} = 24.45$ G; (b) 升至室温退火后测定的 ESR 波谱
Fig. 2 ESR Spectra from dTMP irradiated at 77 K
(a) Recorded at 77 K $g = 2.0040$, $\Delta H_{pp} = 24.45$; (b) Recorded after annealing at room temperature

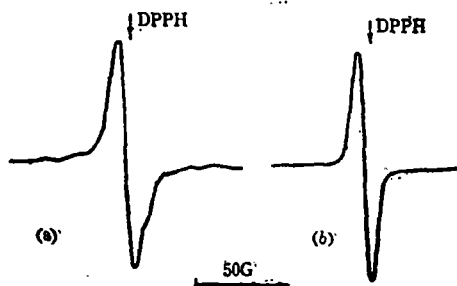


图3 dTMP-芥子碱分子混合物(克分子比 10:1) 77 K 辐照后测定的 ESR 波谱
(a) 77 K 测定的 ESR 波谱, $g = 2.0040$, $\Delta H_{pp} = 12.10$ G; (b) 升至室温退火后测定的 ESR 波谱, $g = 2.0048$, $\Delta H_{pp} = 9.47$ G.
Fig. 3 ESR spectra from dTMP-Sinapine complex with molar ratio of dTMP to sinapine (10:1) irradiated at 77 K
(a) Recorded at 77 K $g = 2.0040$, $\Delta H_{pp} = 12.10$ G; (b) Recorded after annealing at room temperature $g = 2.0048$, $\Delta H_{pp} = 9.47$ G.

别为 2.0048, 9.47 G。而未见胸腺嘧啶五位自由基的痕迹(见图 3(b))。

2. DNA-芥子碱二元体系

如图 4 所示 77 K 辐照, 测定的 DNA ESR 波谱。为一不对称的单峰, 略微显示胸腺嘧啶五位自由基的痕迹, g 值为 2.0032, ΔH_{pp} 为 22.82 G, 升至室温退火后转化为胸腺嘧啶五位自由基的特征波谱。

DNA-芥子碱二种分子混合物 (DNA 中的

1 mw, 用 E-500-2 NMR Gauss 计进行磁场与 ΔH_{pp} 的精确测定, 用 E-231/232 双样品腔和 DPPH 标准样品协同标定各类自由基的 g 值。所有前述辐照样品首先在 77 K 进行 ESR 测定, 然后在室温退火后并在室温进行测定。

结 果

1. dTMP-芥子碱二元体系

如图 1 所示, 77 K 辐照并测定的芥子碱的波谱显示与咖啡酸和芥子酸相似的较对称的单峰, 其 g 值为 2.0041, ΔH_{pp} 为 11.22 G, 主要反映不

饱和羧酸阴离子自由基 ($\phi\text{CH}=\text{CH}\dot{\text{C}}\begin{smallmatrix} \text{O}^- \\ \text{OH} \end{smallmatrix}$) 的超

精细谱。上述 77 K 辐照的样品升至室温退火后测定的 ESR 波谱则主要显示阴离子自由基的分解产物羰基自由基 ($\phi\text{CH}=\text{CH}\dot{\text{C}}=\text{O}$) 的 β 质子的对称单峰, g 值与 ΔH_{pp} 分别为 2.0043, 9.43 G。

77 K 辐照并测定的 dTMP 波谱的 g 值与 ΔH_{pp} 分别为 2.0040, 24.45 G (见图 2), 升至室温退火后明显显示胸腺嘧啶五位自由基八重峰的特征。

dTMP-芥子碱分子混合物 (克分子比为 10:1) 77 K 辐照, 测定的波谱 (见图 3(a)) g 值与 ΔH_{pp} 分别为 2.0040, 12.10 G, 升至室温退火后转化为与芥子碱类同的单峰, g 值与 ΔH_{pp} 分

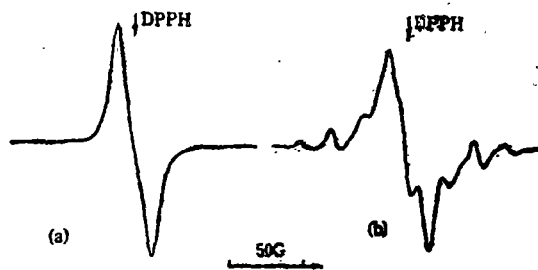


图4 DNA 77 K 辐照后测定的 ESR 波谱
(a) 77 K 测定的 ESR 波谱, $g = 2.0032$, $\Delta H_{pp} = 22.82$ G; (b) 升至室温退火后测定的 ESR 波谱
Fig. 4 ESR spectra from irradiated DNA at 77 K
(a) Recorded at 77 K $g = 2.0032$, $\Delta H_{pp} = 22.82$ G; (b) Recorded after annealing at room temperature.

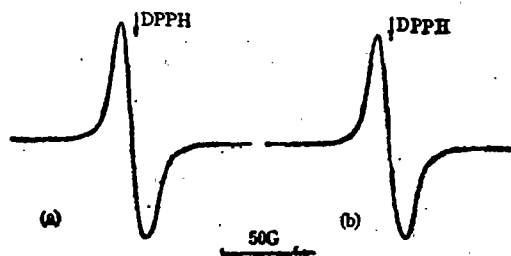


图 5 DNA-芥子碱二种分子混合物 77 K 辐照, 测定的 ESR 波谱

(a) DNA 中核苷酸与芥子碱的克分子比为(4:1), $g = 2.0040$, $\Delta H_{pp} = 15.36$ G; (b) DNA 中核苷酸与芥子碱的克分子比为(8:1), $g = 2.0036$, $\Delta H_{pp} = 20.97$ G。

Fig. 5 ESR spectra from DNA-Sinapine complex with molar ratio of nucleotide in DNA to Sinapine (4:1; 8:1) irradiated and observed at 77 K.

(a) With molar ratio(4:1) $g = 2.0040$, $\Delta H_{pp} = 15.36$ G; (b) With molar ratio(8:1) $g = 2.0036$, $\Delta H_{pp} = 20.97$ G。

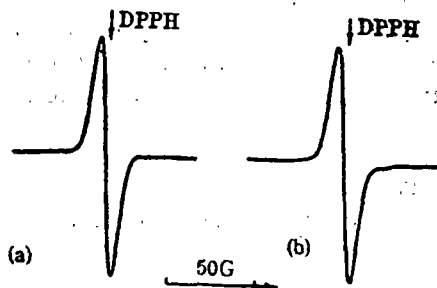


图 6 DNA-芥子碱二种分子混合物 77 K 辐照, 升至室温退火后测定的 ESR 波谱。

(a) DNA 中的核苷酸与芥子碱的克分子比为(4:1), 增益 2×10^3 ; (b) DNA 中的核苷酸与芥子碱的克分子比为(8:1), 增益 2×10^3 。

Fig. 6 ESR Spectra from DNA-Sinapine complex with molar ratio of nucleotide in DNA to sinapine (4:1; 8:1) irradiated at 77 K observed after anneating at room temperature.

(a) With molar ratio (4:1) $g = 2.0046$, $\Delta H_{pp} = 9.70$ G, gain 2×10^3 ; (b) With molar ratio(8:1) $g = 2.0043$, $\Delta H_{pp} = 10.26$ G, gain 2×10^3 。

却突变为与室温下芥子碱十分接近的 ΔH_{pp} (9.43 G)。

应用分子轨道理论方法计算前沿轨道能量的结果表明随着羟基肉桂酸苯环上甲氧基数量的增加电离电位下降即抗氧化性能增强, 但电子亲和势却非常接近^[2]。如咖啡酸与芥子酸的 ϵ_{LEMO} 分别为 1.79 eV 与 1.81 eV。据此可预测含有二个甲氧基的芥子酸(ϵ_{HOMO} : -11.27 eV)或芥子碱显然应比含有一个甲氧基的阿魏酸(ϵ_{HOMO} : -11.35 eV), 和不含甲氧基的咖啡酸(ϵ_{HOMO} : 11.74 eV)具有更强的抗辐射抗氧化性能, 亦即芥子碱同时具有强的亲电子性和较强的抗氧化性能, 有利于同时

核苷酸与芥子碱的克分子比分别为 4:1, 8:1) 77 K 辐照, 测定的波谱十分相似, 其 g 值分别为 2.0040, 2.0036; ΔH_{pp} 分别为 15.36 G, 20.97 G (见图 5)。

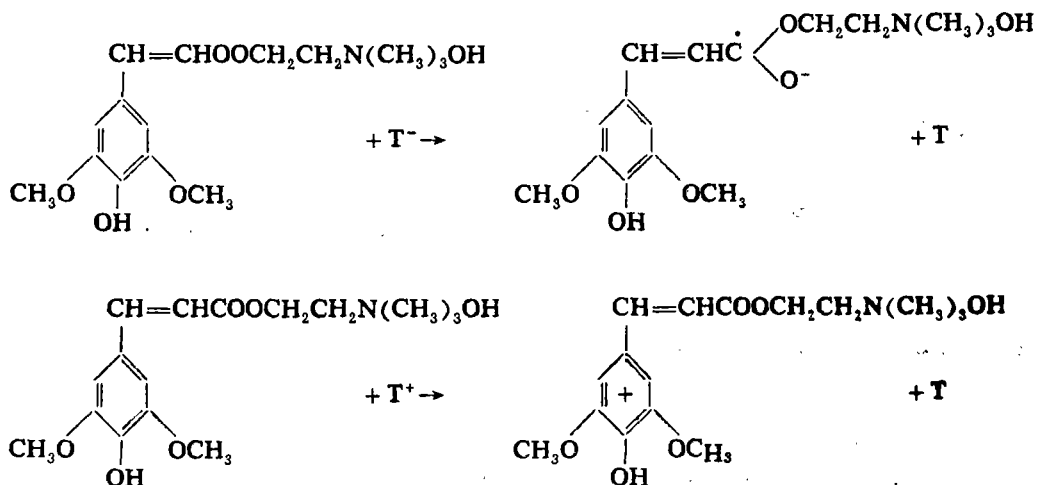
上述二种分子混合物 77 K 辐照升至室温退火后均转化为与芥子碱室温下十分类同的单峰。其 g 值分别为 2.0046, 2.0043; ΔH_{pp} 分别为 9.70 G, 10.26 G。(见图 6)

与 DNA-咖啡酸(4:1)相比不论 DNA 中的核苷酸与芥子碱的克分子比为(4:1)或(8:1), 即使在测定 DNA-芥子碱 ESR 信号时的增益远远低于前者时(二者的增益比约为(50~80:1), 室温退火后的 DNA-芥子碱二元体系依然呈现很强的芥子碱的信号, 即在芥子碱单峰的两侧未发现胸腺嘧啶五位自由基八重峰的任何痕迹。说明芥子碱对 DNA 的保护效应比咖啡酸强得多。

讨 论

正如前文^[1~2]所述咖啡酸, 阿魏酸, 芥子酸 77 K 辐照, 测量的 ESR 波谱的中心 g 值分别为 2.0042, 2.0039, 2.0041 均与羧酸阴离子自由基的各向同性 g 值(2.0036)^[4]相近而与羧酸阳离子自由基的各向同性 g 值(2.020)^[4]差别显著。同时 77 K 辐照, 测定的 DNA 或 dTMP 与芥子碱及其他羟基肉桂酸衍生物组成的多种二元体系的 g 值也与羧酸阴离子自由基接近, 此外, dTMP 与羟基肉桂酸衍生物组成的多种二元体系 77 K 与室温退火后测定的 ΔH_{pp} 都分别接近各保护剂的 ΔH_{pp} , 至于 DNA-芥子碱二元体系 77 K 测定的 ΔH_{pp} 虽然随着芥子碱含量的降低而趋近 DNA 的 ΔH_{pp} , 但在室温退火后

实现对靶分子的电子与空穴转移和氢原子转移保护机理。



参 考 文 献

- [1] 林念芸, 李学鹏, 屠铁城, 谢继东, 辐射研究与辐射工艺学报, 1 (1), 1(1983)。
- [2] Lin Nian-yun, Radioprotection and Radiation sensitization, Mechanisms and Application, Invited Report on the 2nd China Japan Bilateral Symposium on Radiation Chemistry, Osaka, Japan Sept. 29-Oct. 4, 1985, accepted for publication on special issue of Radiat. phys. Chem dedicated to prof. A. Charlesby 70th Birthday.
- [3] 顾瑞琦, 植物生理学报, 9, 307 (1983)。
- [4] 林念芸, 顾瑞琦, 辐射研究与辐射工艺学报, 3 (1), 61 (1985)。
- [5] H. C. Box, Radiation Effect, ESR ENDOR Analysis, pp 118~120, pp 144~150 Academic Press New York, 1977.

(1986年3月18日收到)

ESR STUDIES OF CHARGE TRANSFER PROTECTION MECHANISM ON DNA AND ITS CONSTITUENT BY SINAPINE

Lin Nianyun Li Xuepeng Tu Tiecheng Dong Jirong

(*Institute of Nuclear Research, Academia Sinica*)

ABSTRACT In order to investigate the charge transfer protection mechanism on DNA and dTMP another hydroxy cinnamic acid derivative—sinapine has been studied. Sinapine also belongs to phenyl substituted unsaturated carboxylic acid and its EA (ϵ_{LEMO} : 1.81 eV) is very close to that of caffeic acid (ϵ_{LEMO} : 1.79 eV) but its IP (ϵ_{HOMO} : -11.27 eV) is much lower than that of caffeic acid (ϵ_{HOMO} : -11.74 eV), therefore in comparison with caffeic acid sinapine exert stronger protection effect on DNA, for example, ESR spectrum from DNA—sinapine with more minor molar ratio of protector to nucleotide of DNA (1:8) than that of DNA—caffeic acid (1:4) revealed the characteristic similar to that from sinapine alone irradiated and recorded at 77 K. After annealing at room temperature the ESR pattern changed into that from sinapine alone with clear baseline demonstrating no trace signal from 5-thymyl radical i. e. stronger protective effect by sinapine.

KEY WORDS Hydroxy cinnamic acid derivative; Sinapine; Charge transfer protection; ESR; DNA.