

# 用凝胶电泳法研究羟基肉桂酸 衍生物对 DNA 的辐射保护效应

骆 坚 林念芸 张加山

(中国科学院上海原子核研究所, 上海)

**摘要** 用凝胶电泳法研究了 DNA 在  $\gamma$  射线作用下链断裂和链交联及保护剂对它的保护效应。DNA 样品经电泳、荧光染色、紫外灯下照相后对底片进行光密度分析, 最后经计算机数据处理, 可以得到其辐照前后的分子量分布变化, 并由此得出 DNA 的链断裂和链交联的定量数据。以此研究了冰冻干燥二元体系中羟基肉桂酸衍生物, 在室温下对小牛胸腺 DNA 的辐射保护效应。测量了 DNA 与咖啡酸及芥子碱在不同摩尔比下时 DNA 的链交联和链断裂 G 值, 发现两者对 DNA 均有明显的辐射保护效应, 但咖啡酸的辐射保护效应强于芥子碱。对照对它们的 ESR 研究, 并分析它们的结构异同, 初步探讨了两者辐射保护效应强弱的原因。

**关键词** DNA, 肉桂酸, 凝胶电泳, 辐射保护效应

## 前 言

过去曾用 ESR 法详细地研究了羟基肉桂酸衍生物保护剂对 DNA 及其组分的辐射保护机理<sup>[1,2]</sup>。在 77 K 辐照和测试的条件下, 表明无论是咖啡酸及其甲酯, 阿魏酸还是芥子酸和芥子碱等对 DNA 及其组分均呈很强的保护效应, 并进一步论证了其保护效应主要是基于电荷转移机理, 而且协同分子轨道理论计算提出了判别电荷转移保护或敏化作用的统一模式。本文通过对 DNA 链断裂和交联的定量分析, 研究了咖啡酸和芥子碱对 DNA 终极损伤的辐射保护效应。

众所周知, DNA 的主要辐射损伤有单链断裂、双链断裂、碱基损伤及分子间和分子内的交联, 其中双链断裂因其表现出与 DNA 钝化而导致细胞死亡等方应的直接相关, 被认为是细胞的致死损伤<sup>[3]</sup>。所以研究保护剂对这些损伤的作用, 对评价其保护效应将有重要意义。而 DNA 辐照前后分子量分布的变化正是其链断裂和交联的直接体现, 为此, 本工作建立了 DNA 琼脂糖凝胶电泳法来测量 DNA 的分子量分布, 并由此得到其链断裂和链交联的定量数据。据此, 比较研究了咖啡酸和芥子碱对小牛胸腺 DNA 的辐射保护效应。

## 原理与方法

利用不同分子量 DNA 的电泳速度不同的性质, 可以用电泳法研究 DNA 的分子量分布。DNA 样品与一系列已知分子量的标准 DNA 一起经凝胶电泳, 再用溴化乙锭荧光染色, 凝胶置于紫外分析仪下可拍得荧光照片, 用测微光度计自电泳起始点起, 逐点测量底片上的光学密度, 便得到 DNA 电泳距离  $m$  与所对应光学密度  $D(m)$  的分布关系。

电泳距离  $m$  可由关系式  $(m-m_0)(L-L_0)=C$  换算成 DNA 的分子量  $L^{[4]}$ , 其中  $m_0$ 、 $L_0$  和  $C$  三参数可通过标准 DNA 的已知分子量与其对应的电泳距离经拟合计算求得。而某电泳距离  $m$  上 DNA 碱基对的浓度  $\rho(m)$  则与底片上相应的光学密度  $D(m)$  存在关系  $\rho(m) \propto 10^{D(m)/\gamma^{[5]}}$ , 其中  $\gamma$

是胶片的反差系数。因此,可以由  $D(m)-m$  分布换算为  $p(h)-h$  的分子量分布,并由此求得 DNA 的数均分子量  $\bar{L}_n$  和重均分子量  $\bar{L}_1$  [8]。为方便起见,本文用 DNA 分子链的碱基对数目(bp)来表示它的分子量。

已知  $\bar{L}_n$  和  $\bar{L}_1$  后,根据 Charlesby 建立的方法 [7],当分子量初始分布为随机分布 ( $\bar{L}_1/\bar{L}_n = 2$ ) 时,经辐照随机引发链断裂和交联后,若断链率和交联率均很小,且与剂量成正比,则存在下列关系式:

$$\left(\frac{2}{\bar{L}_n} - \frac{1}{\bar{L}_1}\right) = \left(\frac{2}{\bar{L}_{n0}} - \frac{1}{\bar{L}_{10}}\right) + \frac{3}{2} p_0 R$$

$$\left(\frac{1}{\bar{L}_n} - \frac{2}{\bar{L}_1}\right) = \left(\frac{1}{\bar{L}_{n0}} - \frac{2}{\bar{L}_{10}}\right) + \frac{3}{2} q_0 R$$

其中  $\bar{L}_{n0}$ 、 $\bar{L}_{10}$  为初始分子量,  $\bar{L}_n$  和  $\bar{L}_1$  则是经剂量  $R$  辐照后的分子量;  $p_0$ 、 $q_0$  分别为单位剂量、单位分子长度的双链断裂和分子间交联频率。

通过  $\left(\frac{2}{\bar{L}_n} - \frac{1}{\bar{L}_1}\right)$ 、 $\left(\frac{1}{\bar{L}_n} - \frac{2}{\bar{L}_1}\right)$  对  $R$  的线性拟合,即可得到  $p_0$  和  $q_0$  的定量数据。

本实验所用 DNA 为 Sigma 公司出品的小牛胸腺 DNA,未经进一步提纯。由于该 DNA 分子量不宜于本电泳实验,故先用超声波 200 W 处理 20 min,使分子量下降至所需值。琼脂糖为电泳用生化试剂,上海东海制药厂生产。咖啡酸是上海试剂一厂产品,化学纯,经三蒸水重结晶两次。芥子碱为实验室自制。电泳所选标准 DNA,为  $\lambda$ -DNA 用 Hind III 及同时用 Hind III 和 EcoR I 限制性内切酶所切得的两个系列标准 DNA 的混合物 [8]。本实验所用的其他化学试剂均为分析纯,所用溶液均用三蒸水配制。

DNA 溶液浓度配成  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$  (碱基对数),咖啡酸、芥子碱溶液均配成  $2 \text{ mmol dm}^{-3}$ 。按所需摩尔比将不同体积的 DNA 溶液与咖啡酸或芥子碱溶液混合均匀,取其  $20 \mu\text{l}$  置于试样管中,液空中速冻,真空抽干,所得干燥样品通高纯氮 ( $99.99\% \text{ N}_2$ ) 除氧 10 min 后封管,在室温下按所需剂量辐照,剂量率由 Frick 剂量计测定。辐照后开管,加  $50 \mu\text{l}$   $0.2 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl 溶液溶解之,然后进入电泳。

本实验电泳缓冲液选用 TBE,其组成为:  $0.089 \text{ mol dm}^{-3}$  tris-borate,  $0.089 \text{ mol dm}^{-3}$  硼酸,  $0.002 \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA。将 1 g 琼脂糖溶解于 100 ml 沸腾缓冲液中,并直接浇注于电泳槽的模子里,冷却后便得  $111 \times 115 \times 4 \text{ mm}^3$  的 1% 琼脂糖凝胶板;加入 TBE 浸没凝胶板。取适量 DNA 溶液与缓冲液 (其六倍浓缩液的组成是: 0.25% 溴酚兰, 40% (w/v) 蔗糖的水溶液) 混合均匀后点入点样槽,每次电泳均在两个不同电泳位点入标准 DNA 作内标。

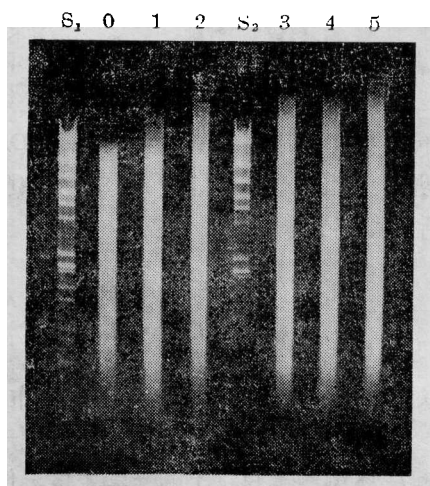


Fig 1. The photograph of the gel electrophoresis of dry DNA after  $\gamma$ -irradiation ( $\times 10^4 \text{ Gy}$ ): (0) 0 (1) 1.0 (2) 2.0 (3) 2.9 (4) 3.6 (5) 4.3  $S_1$  and  $S_2$  is the electrophoresis band of standard DNA

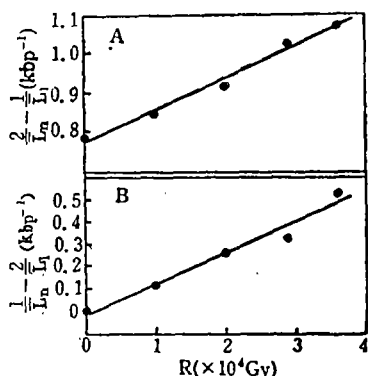


Fig 2. The linear fits between radiation dose ( $\times 10^4 \text{ Gy}$ ) and

$$(A) \frac{2}{L_n} - \frac{1}{L_i} \quad (B) \frac{1}{L_n} - \frac{2}{L_i}$$

的电泳照片, 可见随剂量的增高, DNA 分子量分布逐渐变宽, 大分子量和分子量的分子都逐渐增多, 这正是交联和断链的结果。DNA 的初始分子量分布,  $\overline{L_i}/\overline{L_n} \approx 2$ , 正体现了随机分布的特征。

图 2 即是  $\left(\frac{2}{L_n} - \frac{1}{L_i}\right)$ 、 $\left(\frac{1}{L_n} - \frac{2}{L_i}\right)$  对  $R$  的线性拟合图。得到的结果为  $p_0 = (5.5 \pm 0.3)$

$\times 10^{-6} \text{ kbp}^{-1} \text{ Gy}^{-1}$   $q_0 = (9.3 \pm 0.9) \times 10^{-6} \text{ kbp}^{-1} \text{ Gy}^{-1}$  换算为  $G$  值后, 得到双链断裂  $G$  值  $G_{\text{dab}} = 0.085 \pm 0.005$ , 交联  $G$  值  $G_{\text{CL}} = 0.15 \pm 0.01$ 。

文献报道的数据为  $G_{\text{dab}} = 0.1 - 0.5^{[9]}$ , 与本实验数据基本一致。关于干燥体系 DNA 分子间交联研究相对较少, Hagen 等<sup>[10]</sup>得到的数据是真空中  $G_{\text{CL}} = 0.37$ , 氧气中  $G_{\text{CL}} = 0.16$ , 他们把氧气中  $G_{\text{CL}}$  偏小的原因解释为由于  $\text{O}_2$  对自由基的过氧化而抑制了它们之间的交联。本实验的  $\text{N}_2$  氛围应与真空中类似, 但数据却与氧气中的数据接近, 可能充  $\text{N}_2$  并不能除尽干燥 DNA 纤维中的氧气。

图 3 和图 4 呈现了咖啡酸和芥子碱对  $G_{\text{dab}}$  和  $G_{\text{CL}}$  的影响趋势, 可见两者的辐射保护效应是十分明显的, 而且保护曲线均呈典型的竞争反应曲线特征, 意味着保护机制属竞争动力学机制。

从图 3 和图 4, 也反映出, 在本实验条件下, 咖啡酸的保护能力明显强于芥子碱, 而理论和 ESR 实验都证明, 芥子碱的电荷转移保护能力强于咖啡酸<sup>[2]</sup>, 可见在室温辐照条件下, 保护机制不同于在 77 K 辐照时占主导地位的长程电子转移保护机制。大量的 ESR 研究表明, DNA 在 77 K 辐照时产生的初始自由基为  $\text{G}^+$  和  $\text{T}^-$ , 而戊糖自由基则很难检测到<sup>[11,12]</sup>; 当退火后,  $\text{T}^-$  在 130—208 K 时定量质子化而转成  $\text{TH}^{\cdot}$ <sup>[13]</sup>, 它的 ESR 谱便是著名的胸腺嘧啶 6 位加氢五位自由基八重峰;  $\text{G}^+$  的归宿至今尚未能明确。Gregoli 等观察到, 在碱性条件下,  $\text{G}^+$  在 C 8 位加  $\text{OH}^-$  而生成  $(\text{GOH}\cdot)_8$ , 但在中性时却未能看到任何转变<sup>[13]</sup>; Candeias<sup>[14]</sup>等则用脉冲辐解研究了  $\text{G}^+$  的后续反应, 认为  $\text{G}^+$  在中性时将脱质子而生成  $\text{G}(-\text{H})\cdot$ ; 而无论是  $\text{TH}\cdot$ , 还是  $\text{G}(-\text{H})\cdot$ , 都可能从邻近的戊糖环上抽取氢原子而导致戊糖脱氢自由基  $\text{R}(-\text{H})\cdot$  的生成<sup>[15]</sup>。关于水溶液中辐射诱发 DNA 的链断裂机理一般是接受 D. Schulte-Frohlinde<sup>[16]</sup>提出的 C-4' 机理, 因而  $\text{R}(-\text{H})\cdot$  也可能经类似于 C-4' 机制导致链的断裂。最近 Karam 等<sup>[17]</sup>研究了水溶液中 polydT 的辐射交联, 赵蓉等<sup>[19]</sup>研究了水溶液中 T 的辐射交联, 均证明交联作用是基于 T 自由基间的结合。由于 DNA 在电离辐射作用下构型会发生变化而导致碱基外露, 碱基自由基之间的结合可能是 DNA 交联的

电泳后, 凝胶板先于  $0.5 \mu\text{g/ml}$  溴化乙锭水溶液中浸泡 20 min, 后在蒸馏水中泡 20 min 以除去游离的溴化乙锭, 然后置于 KZJ-A 型紫外分析仪下用海鸥 DF-1 型相机摄下荧光照片, 所用紫外激发光波长为 254 nm, 荧光波长为 590 nm, 相机前加近摄镜和红色滤色镜, 胶卷用 21°GB 申光 135 型黑白胶卷。所得底片用  $G_{11}$  型测微光度计逐点测量电泳带光学密度  $D$ 。数据经计算机处理后便得  $p_0$ 、 $q_0$  及其标准偏差。

## 结果与讨论

图 1 为纯干燥 DNA 经不同剂量辐照后的

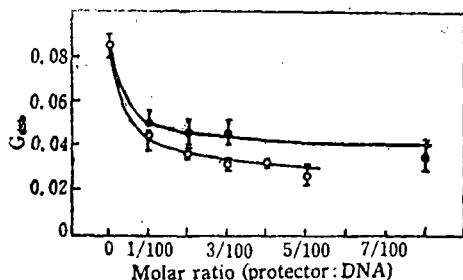


Fig 3. The relation between the G value of double-strand break and the molar ratio of caffeic acid (○) or sinapine (●) to nucleotides in DNA

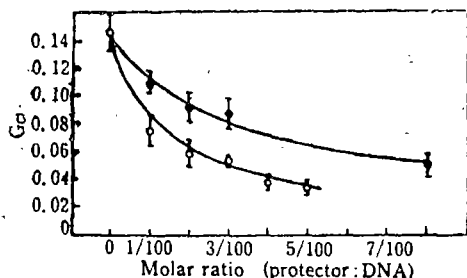
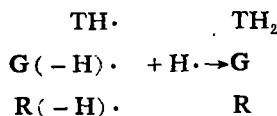


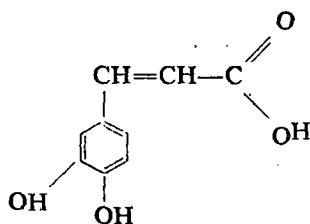
Fig 4. The relation between the G value of intermolecular crosslinking and the molar ratio of caffeic acid (○) or sinapine (●) to nucleotides in DNA

重要途径。另外,碱基-糖基间交联亦在胸腺嘧啶和 2-脱氧核糖模型体系中观察到<sup>[17]</sup>,因此戊糖自由基和碱基自由基间也可能相互结合而导致交联。

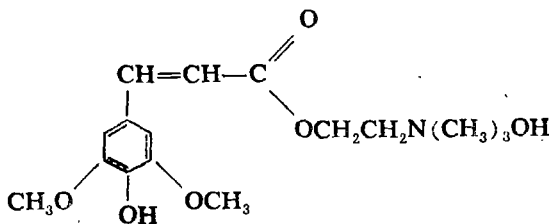
显然,在 77 K 辐照时,咖啡酸和芥子碱可以通过电子转移有效地修复  $G^+$  和  $T^+$ ;但在室温辐照时, $G^+$  和  $T^+$  将很快转变成中性自由基,而对此类自由基的修复或猝灭,则可能不同于电子转移的修复机制。陈懿平等<sup>[18]</sup>的工作发现在芥子酸-DNA 二元体系中,77 K 辐照后在室温退火时出现氢原子转移,认为可能是芥子酸苯环上的羟基氢原子向碱基自由基和戊糖自由基转移的结果。由此推论,在室温辐照时,氢原子转移可能成为主要保护途径:



基于氢原子转移机制,比较咖啡酸与芥子碱的分子结构,可以更合理地解释本工作中所发现的咖啡酸比芥子碱的辐射保护效应更强这一结果。咖啡酸和芥子碱的分子结构如下:



咖啡酸



芥子碱

引人注目的是芥子碱苯环上的羟基夹在两个甲氧基之间,要实现羟基上的氢原子对别的分子的转移,两旁两个取代基明显地构成了空间位阻,虽然甲氧基的存在应有利于该氢原子脱离母体向外转移,然而空间位阻却可能阻碍氢原子进入转移“隧道”。咖啡酸苯环上含有两个可以进行氢原子转移的羟基,而且其空间位阻比芥子碱小得多,所以咖啡酸呈现更强的辐射保护效应。

### 参 考 文 献

- [1] 林念芸,辐射研究与辐射工艺学报,1(1),26 (1983).
- [2] 林念芸,李学鹏,屠铁城,董继荣,辐射研究与辐射工艺学报,4(4),29 (1986).
- [3] D. Schulte-Frohlinde in "Radiation research Proceedings of the 8th ICRR" E. M. Fielden et al. eds, 1987, p. 158-161.
- [4] E. M. Southen, Anal. Biochem., 100, 319(1979).
- [5] A. Prunell, F. Strauss and B. Leblanc, Anal. Biochem., 78, 57(1977).

- [6] O. Yamamoto, M. Ogawa and M. Hoshi, *J. Radiat. Res.*, 23, 385 (1982).
- [7] A. Charlesby, *Atomic radiation and polymer*, Oxford Pergamon Press, 1960, p 172.
- [8] H. E. Schaffre and R. R. Sedreoff, *Anal. Biochem.*, 115, 113 (1981).
- [9] H. Dertinger, H. Jung 著, 中科院生物物理所一室二组译, 分子放射生物学, 科学出版社, 1970, p 172.
- [10] U. Hagen and H. Weiistein, *Strahlentherapie*, 128, 565(1982).
- [11] J. Hüttermann, *Ultramicroscopy*, 10, 25(1982).
- [12] P. M. Cullis and M. C. R. Symons, *Radiat. Phys. Chem.*, 27(2), 93(1986).
- [13] S. Gregoli, M. Olast and A. Bertinchamps, *Radiat. Res.*, 89, 238(1982).
- [14] L. P. Candeias and S. Steenken, *J. Am. Chem. Soc.*, 111(3), 1094(1989).
- [15] D. Schulte-Frohlinde, J. Opitz, H. Görner and E. Bothe, *Int. J. Radiat. Biol.*, 48(3), 397 (1985).
- [16] D. Schulte-Frohlinde, in "Radioprotectors and Anticarcinogens", P. F. Nygaard and M. G. Simic eds. Academic Press, 1983, p 53-71.
- [17] L. R. Karam, M. G. Simic and M. Dizdaroglu, *Int. J. Radiat. Biol.*, 49(1), 67 (1986).
- [18] 陈懿平, 中国科学院上海原子核研究所硕士论文(1986).
- [19] 赵 蓉, 林念芸, 张加山, 辐射研究与辐射工艺学报, 8(1), 43 (1990).

(稿件收到日期: 1990 年 10 月 3 日)

## GEL ELECTROPHORESIS STUDY OF RADIOPROTECTIVE EFFECT OF HYDROXY CINNAMIC ACID DERIVATIVES ON DNA

Luo Jian, Lin Nianyun and Zhang Jiashan

(Shanghai Institute of Nuclear Research, Academia Sinica, Shanghai)

**ABSTRACT** The radioprotective effect exerted by hydroxy cinnamic acid derivatives on the radiation damage of DNA, such as double-strand break (DSB), intermolecular crosslinking (CL), has been studied by gel electrophoresis. The molecular length distribution of DNA can be measured by this method, and by comparing average molecular length of DNA before and after irradiation, the frequency of DSB and CL can be determined quantitatively. The radioprotective effect of caffeic acid and sinapine on calf thymus DNA in binary system at room temperature have been determined. Both caffeic acid and sinapine reveal apparent protective effects and the former is stronger than the latter. The mechanism of radioprotection at room temperature has been discussed. Based on this finding, combined with the previous ESR study and an analysis of the molecular structure about these two protectors, it is suggested that the target is protected as a result of hydrogen atom transferring from protector to target.

**KEYWORDS** DNA, Hydroxy cinnamic acid, Radioprotection, Gel electrophoresis