

研究论文

咖啡酸对胸腺嘧啶和胸苷阴离子
自由基的快速修复

左志华 姚思德 李虎成 林维真 张加山 林念芸

(中国科学院辐射化学开放研究实验室, 上海原子核所, 上海 201800)

摘要 采用脉冲辐解动态吸收光谱研究了咖啡酸对胸腺嘧啶、胸苷的阴离子自由基的快速修复过程, 其机理是电子自嘧啶碱基及其衍生物的阴离子自由基向咖啡酸的快速转移。咖啡酸作为一种电荷转移保护剂, 它具有比靶分子更高的单电子还原电位或电子亲合势, 以及更低的单电子氧化电位或电离电位。

关键词 脉冲辐解, 咖啡酸, 胸腺嘧啶, 胸苷, 电子转移, 电荷转移保护机理

“辐射保护与敏化‘三转移’机理”是 DNA、蛋白质等的辐射物理与化学研究中的重要研究成果, 它包括氢原子转移、电荷转移以及激发能转移机理^[1]。其中电荷转移保护机理认为, 作为一种电荷转移辐射保护剂, 它应该具有比靶分子更高的电子亲合势以及更低的电离电位。

咖啡酸(3,4-二羟基肉桂酸)属于苯基取代的不饱和羧酸。它不仅可作为一种抗氧化剂来清除超氧阴离子自由基或羟自由基^[2,3], 而且还可作为一种良好的电荷转移保护剂。因为分子轨道计算的结果表明它具有比靶分子高的电子亲合势以及低的电离电位, 所以靶分子的阴离子自由基均能被其修复。其中阴离子自由基的修复已被 ESR 实验结果证实^[1], 当 dTMP 与咖啡酸的摩尔比为 10:1, 或当 DNA 中的核苷酸与咖啡酸的摩尔比为 4:1 时, 两种体系在 77 K 辐照后均显示咖啡酸的羧酸阴离子自由基的特征, 升温至室温及退火后都转换为室温下咖啡酸的自由基, 均不见 dTMP 或 DNA 特有的胸腺嘧啶 5 位自由基的痕迹。

本文采用脉冲辐解动态吸收光谱, 观察电子从胸腺嘧啶、胸苷阴离子自由基向咖啡酸转移的快速过程, 为电荷转移保护机理提供了直观的证据。结合单电子氧化还原电位的测定结果, 进一步研究了“电荷转移保护机理”。

1 实验方法

1.1 实验试剂

胸腺嘧啶、胸苷及咖啡酸均经三次重结晶, 特丁醇(t-BuOH)经蒸馏纯化。所有溶液均用三重蒸馏水配制, 氮气的纯度为 99.99%。

1.2 实验装置

实验装置为纳秒级脉冲辐解动态吸收光谱, 其性能前文已作详细介绍^[3]。

1.3 剂量测定

在每次实验前先进行单脉冲剂量测定, 辐照样品为空气饱和的 $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ KSCN 溶

国家自然科学基金资助课题

收稿日期: 初稿 1994-08-05, 修改稿 1995-01-18

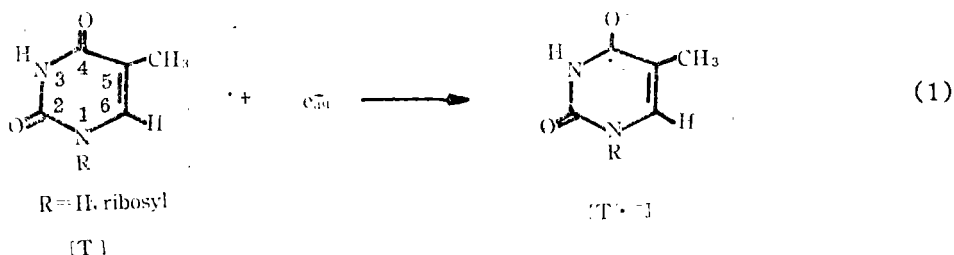
液, 辐照产生的 $(\text{SCN})_2^{\cdot-}$ 之产额为 $G(\text{CNS})_2^{\cdot-} = 2.9$, 它在 480 nm 处有最大吸收, 其摩尔吸光系数为 $7600 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

2.1 胸腺嘧啶、胸苷和咖啡酸的阴离子自由基

图 1 为含有氮气饱和的 $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 胸腺嘧啶, 0.2 mol dm^{-3} 特丁醇及 $2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 的 pH 7 磷酸缓冲溶液经脉冲辐解后产生的胸腺嘧啶阴离子自由基($\text{T}^{\cdot-}$)的吸收光谱, 它在 340 nm 处有最大吸收, 摩尔吸光系数为 $1.8 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 与 Hayon 报道的结果相近^[4]。

胸腺嘧啶阴离子自由基的产生可用反应(1)表示



$$\begin{aligned} k_1 &= 1.7 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1} [7,8], \quad E_{\text{AT}} = -2.60 \text{ eV} [1] \\ E_{\text{s.e}}^1 &= -1100 \text{ mV/NHE, at pH } 8.6 [10] \end{aligned}$$

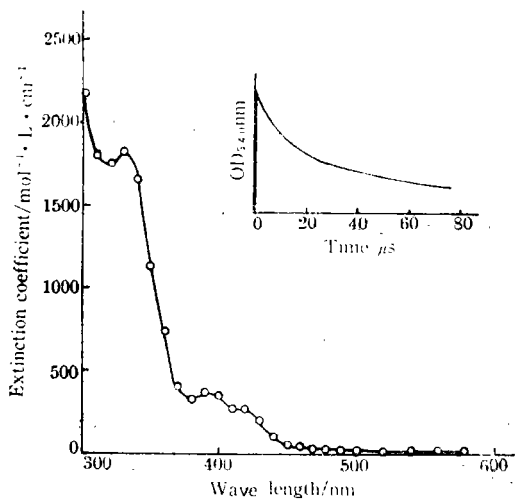


Fig 1. Transient absorption spectrum observed upon one-electron reduction of thymine. Solution containing 1 mmol dm^{-3} of the substance, 0.2 mol dm^{-3} tert-butyl alcohol, 2 mmol dm^{-3} phosphate buffer at pH 7 and saturated with N_2 . Insert, trace of thymine anion radicals at 340 nm. The average dose absorbed was 3.5 Gy, determined by thiocyanate dosimetry and the extinction coefficients were obtained assuming $G = 2.9$ at air condition and $\epsilon = 7600 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 480 nm for $(\text{SCN})_2^{\cdot-}$.

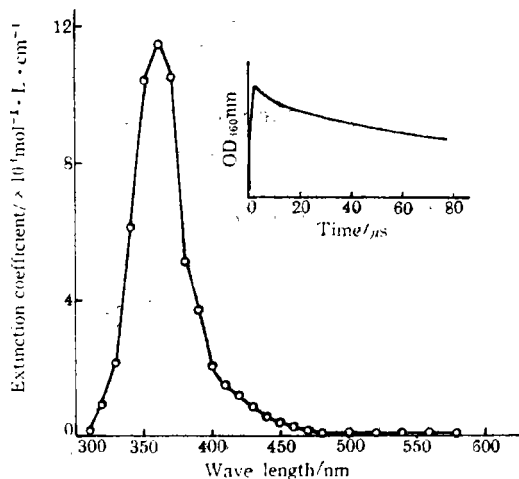
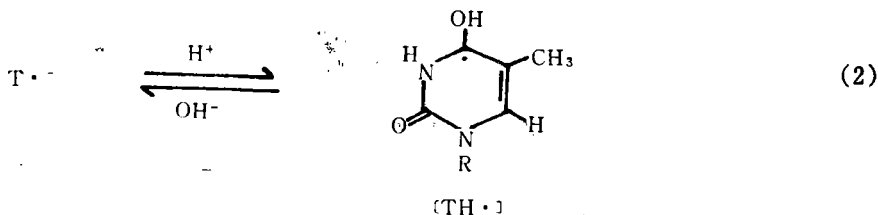
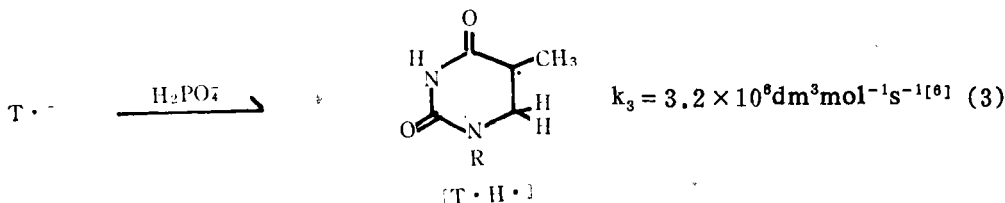


Fig 2. Transient absorption spectrum observed upon one-electron reduction of caffeic acid. Solution containing $0.06 \text{ mmol dm}^{-3}$ of the substance, 0.2 mol dm^{-3} tert-butyl alcohol, 2 mmol dm^{-3} phosphate buffer at pH 7 and saturated with N_2 . Insert, trace of caffeic acid anion radicals at 360 nm. The average dose absorbed was 3.5 Gy, determined by thiocyanate dosimetry and the extinction coefficients were obtained assuming $G = 2.9$ at air condition and $\epsilon = 7600 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 480 nm for $(\text{SCN})_2^{\cdot-}$.



$$k_2(H^+) = 2.6 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1} [6], k_{-2}(OH^-) = 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1} [6]$$



其中 k_1 为反应速率常数, EA_T 为电子亲合势, $E_{s.s}^1$ 为 pH 8.6 时的单电子还原电位。

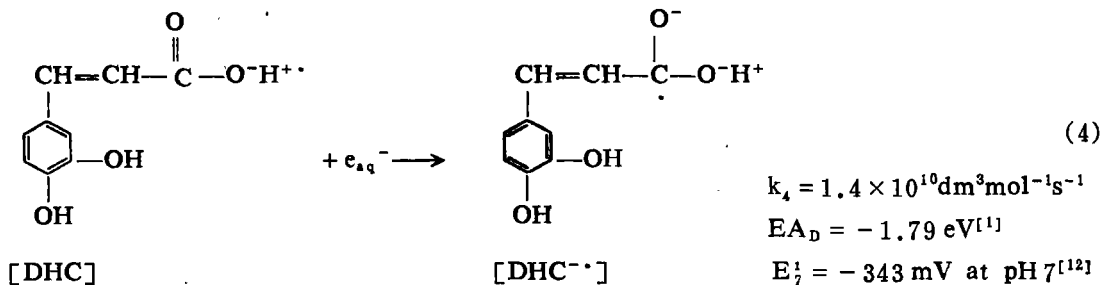
$T^{\cdot-}$ 的质子化过程包括在 O 4 位上的相互可逆的快质子化过程(反应 2), 其质子化产物的 pK_a 值为 7.2^[4], 以及由 C 6 位上的不可逆的慢质子化过程(反应 3)^[5,6]。因此在 pH 7 时胸腺嘧啶的单电子还原电位应考虑到其 O 4 位上的相互可逆的质子化过程(反应 2), 根据下式^[11]

$$E_7^1(T, H^+/TH^{\cdot}) = E_{s.s}^1(T, H^+/TH^{\cdot}) + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{K_a + 10^{-7}}{K_a + 10^{-8.6}} \right)$$

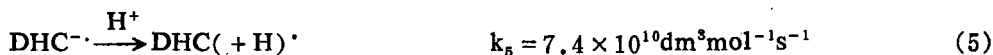
可得 -1077 mV。

胸苷阴离子自由基具有与胸腺嘧啶阴离子相似的瞬态吸收及近似的单电子还原电位。

水合电子加成到咖啡酸的不饱和羧酸上的羰基氧上生成其阴离子自由基(反应 4), 其瞬态吸收光谱见图 2。它在 360 nm 处有最大吸收峰, 其摩尔消光系数为 $11400 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。



咖啡酸具有比胸腺嘧啶较高的电子亲合势或单电子还原电位(反应 4)。与 T 等一样, $DHC^{\cdot-}$ 以其质子化过程衰减(反应 5), 而后其质子化产物按自由基双分子衰减的方式生成更稳定的产物(反应 6)。



2.2 电子转移反应

图 3 为含有 $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 的胸腺嘧啶(T)、 $6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ 咖啡酸(DHC)、 0.2 mol dm^{-3} 特丁醇及 $2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 磷酸缓冲溶液(pH 7)的氮气饱和水溶液经一个脉冲电子照射后观察到的瞬态吸收谱。辐解产生的 $OH^{\cdot}$ 自由基被特丁醇清除, 而 $H^{\cdot}$ 自由基与底物(如胸腺嘧啶、

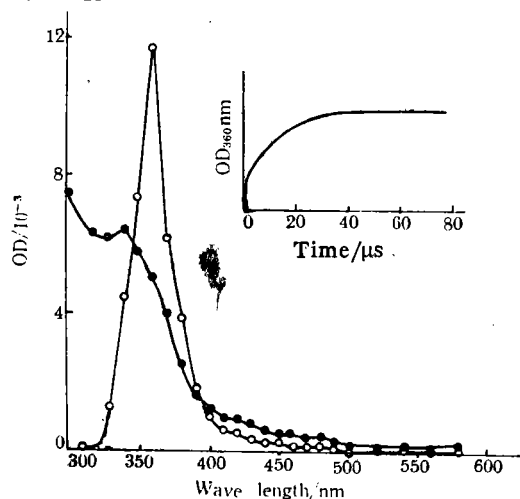


Fig 3. Transient absorption spectra observed upon irradiation to the solution containing 1 mmol dm^{-3} thymine and $0.06 \text{ mmol dm}^{-3}$ caffeic acid, 0.2 mol dm^{-3} tert-butanol, 2 mmol dm^{-3} phosphate buffer at pH 7 and saturated with N_2 , at $1 \mu\text{s}$ (solid square), $40 \mu\text{s}$ (solid triangle). Insert, trace of caffeic acid anion radicals at 360 nm . The average dose absorbed was 3.5 Gy determined by thiocyanate dosimetry

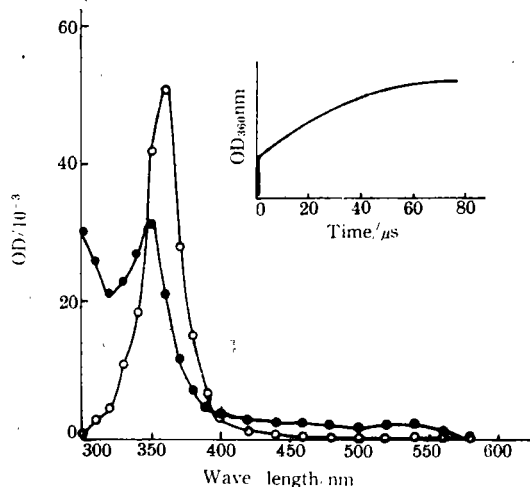


Fig 4. Transient absorption spectra observed upon irradiation to the solution containing 1 mmol dm^{-3} thymidine and $0.06 \text{ mmol dm}^{-3}$ caffeic acid, 0.2 mol dm^{-3} tert-butanol, 2 mmol dm^{-3} phosphate buffer at pH 7 and saturated with N_2 , at $1 \mu\text{s}$ (solid square), $40 \mu\text{s}$ (solid triangle). Insert, trace of caffeic acid anion radicals at 360 nm . The average dose absorbed was 3.5 Gy determined by thiocyanate dosimetry

咖啡酸)反应产物产额很少,而且在 300 nm 以上基本没有吸收。所以图 3 的吸收谱来源于水合电子与胸腺嘧啶或咖啡酸反应生成的电子加合物。

图 3 中 $1 \mu\text{s}$ 处的瞬态吸收与图 1 所示的胸腺嘧啶阴离子自由基 $\text{T}^{\cdot-}$ 的吸收谱相似,均在 340 nm 处有一吸收峰,表明水合电子与 T 通过反应 1 生成了 $\text{T}^{\cdot-}$ 。虽然咖啡酸 DHC 可以通过反应 4 与胸腺嘧啶竞争俘获水合电子,但根据两个反应的速率常数以及该体系中 T 和系 DHC 的浓度可知,绝大部分(95%)的水合电子被 T 俘获生成 $\text{T}^{\cdot-}$ 。然而图 3 中 $40 \mu\text{s}$ 处的瞬态吸收与图 2 所示的咖啡酸阴离子自由基 $\text{DHC}^{\cdot-}$ 的吸收相似,其峰值在 360 nm 处,而其中的插图为该体系经脉冲后 $0-80 \mu\text{s}$ 范围内 360 nm 处的瞬态吸收曲线,均表明生成了 $\text{DHC}^{\cdot-}$,而生成机理是通过由胸腺嘧啶阴离子自由基 $\text{T}^{\cdot-}$ 向咖啡酸 DHC 的电子转移:



$$k_7 = 1 \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}, \Delta E_0 = 734 \text{ mV}, \Delta G_0 = -70.8 \text{ kJ/mol}$$

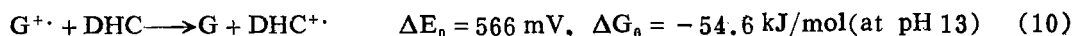
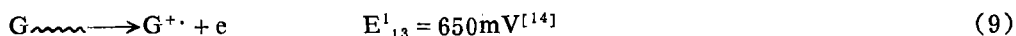
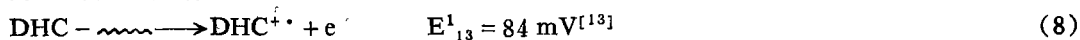
其中反应 7 的 ΔE_0 来自 pH 7 时咖啡酸和胸腺嘧啶的单电子还原电位差, ΔG_0 为相应的自由能变化。胸苷阴离子自由基与咖啡酸之间同样可观察到电子转移,其瞬态吸收如图 4 所示。

经过仔细的动力学分析,求得电子自胸腺嘧啶阴离子自由基转移至咖啡酸产生其阴离子自由基($\text{DHC}^{\cdot-}$)的产额为 $G = 2.2$,而水合电子的产额为 $G = 2.7$,表明大约 80% 的水合电子最终被咖啡酸俘获,因此咖啡酸能够有效地保护胸腺嘧啶。从机理上讲,表明反应 7 在与反应 2 和 3 竞争时占有主导地位,即咖啡酸能够阻止胸腺嘧啶阴离子自由基的质子化产生其 5 位自由基的过程,以及该质子化产物引起的进一步损伤。

3 讨 论

DNA 及其组分经电离辐射产生正负两个电荷中心, 其中正电荷主要被鸟嘌呤 G 俘获, 而负电荷主要被胸腺嘧啶或胞嘧啶俘获。咖啡酸作为一种电荷转移辐射保护剂, 它具有比靶分子较高的电子亲合势或单电子还原电位, 因而能够有效地修复靶分子的阴离子自由基(反应 7)。其机理是电子自靶分子阴离子自由基向啡咖酸的转移阻止了靶分子自由基的质子化产生 5 位自由基的过程以及它引发的进一步损伤。

另一方面啡咖酸具有比靶分子更低的电离电位或单电子氧化电位。以鸟嘌呤和咖啡酸为例:



可以估计即使在 pH 7 时反应 10 也将具有正的 ΔE_0 值或负的 ΔG_0 值, 所以咖啡酸也能够有效地修复 DNA 经电离辐射产生的正电荷中心及其派生的各种自由基。

电荷转移辐射保护剂应该具有比靶分子更高的单电子还原电位或电子亲合势, 以及更低的单电子氧化电位或电离电位, 以便于它修复经电离辐射产生的 DNA 组分的各种阴阳离子自由基。

参 考 文 献

- 1 Lin Nianyun. Radiat. Phys. Chem., 1986, 28(2): 211
- 2 Hu Tianxi, Chen Jiwu, Huang Zhendong, Sheng Minli, Lin Nianyun. Symposium of Radiation Research and Processing, Shanghai Medical University Press, Shanghai, China, 1990: 52
- 3 Wang W F, Luo J, Yao S D, Lian Z R, Zhang J S, Lin N Y. Radiat. Phys. Chem., 1993, 42: 985
- 4 Hayon E. J. Chem. Phys., 1969, 51: 4881
- 5 Das S, Deeble D J, Schuchmann M N, Sonntag C V. Int. J. Radiat. Biol., 1979, 35: 449
- 6 Deeble D J, Das S, Sonntag C V. J. Phys. Chem., 1985, 89: 5784
- 7 Hart E J, Gordon S, Thomas J K. J. Phys. Chem., 1964, 68: 1271
- 8 Moorthy P N, Hayon E. J. Phys. Chem., 1974, 78: 2615
- 9 Deeble D J, Sonntag C V. Int. J. Radiat. Biol., 1987, 51: 791
- 10 Steenken S, Telo J P, Novais H M, Candeias L P. J. Am. Chem. Soc., 1992, 114: 4701
- 11 Wardman P. J. Phys. Chem. Ref. Data, 1989, 18(4): 1637
- 12 Lee H C. Determination of one-electron reduction potentials of hydroxycinnamic acid derivatives, Master thesis of Shanghai Institute of Nuclear Research, 1993
- 13 Javanovic S V, Simic M G. J. Phys. Chem., 1986, 90: 974
- 14 Steenken S, Neta P. J. Phys. Chem., 1982, 86: 3661

KINETIC OBSERVATION OF RAPID ELECTRON TRANSFER BETWEEN THYMINE AND THYMIDINE ANION RADICALS AND CAFFEIC ACID:

A PULSE RADIOLYSIS STUDY

Zuo Zhihua Yao Side Li Hucheng Lin Weizhen Zhang Jiashan

Lin Nianyan

(Laboratory of Radiation Chemistry, Academia Sinica, Shanghai 201800)

ABSTRACT Utilizing pulse radiolysis and kinetic spectrophotometric monitoring techniques, rapid electron transfer reaction from thymine and thymidine anion radicals to caffeic acid was observed respectively. Anion radicals of caffeic acid with absorption maximum at 360 nm have been generated via foregoing electron transfer reaction with rate constant of $1 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$. Accordingly the subsequent protonation of thymine anion radicals should be prevented by the electrophilic protector. These kinetic demonstrations have provided direct evidence of charge transfer protection mechanism.

KEYWORDS Caffeic acid, Thymine, Electron transfer, Charge transfer, Radiation protection

(上接第 149 页 Continued from p 149)

References

- 1 Ratner B D, Hoffman A S. J. Appl. Polym. Sci., 1974, 18: 3183
- 2 Stannett V. Radiat. Phys. Chem., 1990, 35(1-3): 82
- 3 Arg Chye H, Granett John L et al. Radiat. Phys. Chem., 1985, 22(3-5): 831
- 4 Sun Y H, Gombotz W R, Hoffman A S. J. Bioactive Biocompat Polys., 1986, 1: 316
- 5 Sun Y H, Hoffman A S, ACS Polymer Prepr., 1987, 28(1): 292

不同分子量的丙烯酸酯对聚乙烯辐射接枝的研究

吴明红 丁中立 马瑞德

(上海科技大学射线应用研究所, 上海 201800)

摘要 利用预辐射方法, 在聚乙烯薄膜上接枝不同分子量的缩乙二醇丙烯酸酯单体。研究单体不同分子量的变化对接枝反应和接枝样品亲水性等的影响。结果表明: 摩尔接枝率随单体分子量增加而非线性地降低; 接枝基材的溶胀程度对分子量较大的单体的接枝反应影响较大; 试片溶胀度越大, 接枝率越高; 单体分子量增加, 接枝反应初速度下降。

关键词 预辐射, 接枝聚合, 生物医用材料, 聚乙烯, 丙烯酸酯