

脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dTMP)辐射 释磷机理和组氨酸的保护效应

王高栋 王在兰 张加山

(中国科学院上海原子核研究所)

摘要 本文研究了脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dTMP)辐射释磷的机理以及组氨酸对 dTMP 释磷的保护作用。dTMP 辐射损伤释放出无机磷主要是由于水辐解产生的 OH 自由基在 C₄' 位置发生抽氢反应所致。实验求得这一反应的速率常数为 $(1.7 \pm 0.1) \times 10^8 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$; 同时求得 OH 自由基与 dTMP 大分子的反应速率常数为 $(5.0 \pm 0.2) \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 。

由于组氨酸能有效地清除 OH 自由基, 因而组氨酸对 dTMP 释磷的保护作用是显著的。从辐照后测得 DNA 溶液粘度变化的结果来看, 组氨酸对 DNA 变性——降解作用也呈现出明显的保护作用。

关键词 脱氧胸腺嘧啶核苷酸, 脱氧核糖核酸, 组氨酸, 辐射保护作用。

引言

脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dTMP)是 DNA 中对射线敏感的组份, 它的辐射化学行为受到了广泛的研究。但是对于辐射引发 dTMP 释放无机磷的机理及其释磷反应动力学研究的报道却不多, 特别是关于在水溶液中水辐解的活性产物与 dTMP 中释磷位置的反应速率常数迄今尚未见报道。研究核苷酸的辐射释磷机理对于探讨辐射引发 DNA 的链断裂是极为重要的。本文研究了稀水溶液中 γ -引发 dTMP 释放无机磷的机理, 用竞争动力学方法测定了 OH 自由基在 dTMP 中 C₄' 位置抽氢的反应速率常数。同时研究了组氨酸对 dTMP 释放无机磷的保护效应, 初步探讨了组氨酸对 DNA 辐射损伤的保护作用。

实验部分

1. 试剂

dTMP, 组氨酸分别为长阳生化制药厂和上海生物化学研究所生产的生化试剂, 粗制品小牛胸腺 DNA 经浓盐溶液抽提法纯化后得到高质量的精制品, 其质量规格如下: 紫外吸收 E_{260}/E_{230} 为 2.40、 E_{260}/E_{280} 为 1.91、蛋白含量无、RNA 含量 0.93%、磷含量 9.16%、 $e_{(P)}$ 为 6564、增色效应 37.7%、溶解温度 T_m 83.7°C。

2. 辐照条件

取一定量的辐照体系置于辐照管中, 通入高纯氮或氧化亚氮 20 min 后封管, 用钴源 γ 射线进行辐照, 对于 dTMP 和 DNA 辐照体系的剂量率分别为 $5.65 \times 10^3 \text{Gy/h}$, $1.27 \times 10^3 \text{Gy/h}$ 。

3. 分析方法

磷钼蓝比色法^[1]测定 dTMP 体系辐射损伤所释放出的无机磷, 粘度法^[2]测定辐照前后 DNA

溶液的粘度以示 DNA 的辐射损伤。

结果和讨论

1. dTMP 的辐射释磷机理

图 1 和图 2 给出了在氧化亚氮和氮饱和体系中 γ 引发 dTMP 释放无机磷的产额 G_{pi} 值 (每吸收 100 eV 能量时所释出的无机磷的分子数) 与剂量的关系。从这两图中可以看出, 在氧化亚氮饱和的体系中, dTMP 释放无机磷的 G_{pi} 值要比氮饱和的体系中高, 它表明 OH 自由基是引发 dTMP 释放无机磷的主要活性产物, 这跟 Edwards 等人^[3]的报道相一致。从图 1 和图 2 还可以看出, 当达一定的剂量后, dTMP 释放无机磷的 G_{pi} 值随剂量的增加而增加, 表明水辐解的活性产物优先攻击 dTMP 中的碱基部份, 这跟 Scholes 等人^[4]的报道是一致的。随着剂量的增加, dTMP 中的碱基部份的浓度逐渐降低, 使水辐解的活性产物攻击 dTMP 中的戊糖部份的机率逐渐增加, 因而释出的无机磷的 G_{pi} 值随剂量的增加而增加。

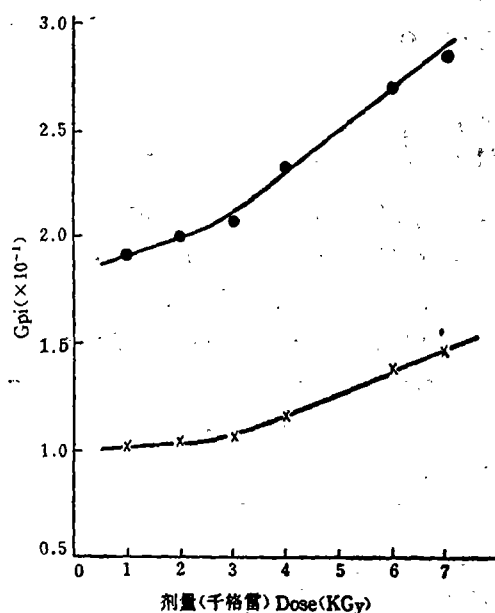


图 1 氧化亚氮饱和体系中组氨酸对 G_{pi} 值的影响

Fig. 1 Effect of Histidine on the G_{pi} in the system saturated with nitrogen monoxide

- $1 \times 10^{-3} \text{M}$ dTMP
- × $1 \times 10^{-3} \text{M}$ dTMP - $1 \times 10^{-3} \text{M}$ His

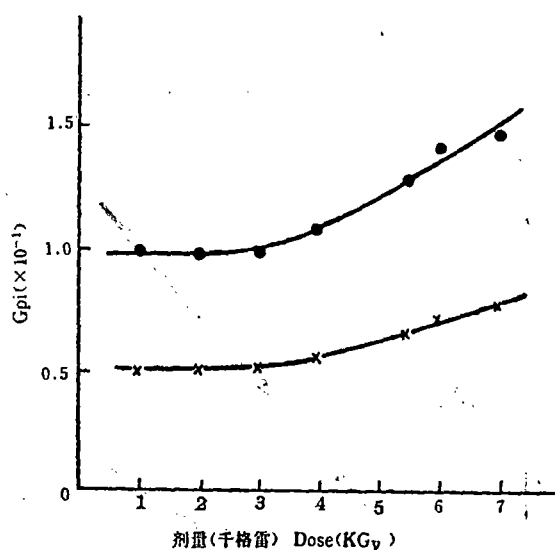


图 2 氮饱和体系中组氨酸对 G_{pi} 值的影响

Fig. 2 Effect of Histidine on the G_{pi} in the system saturated with nitrogen

- $1 \times 10^{-3} \text{M}$ dTMP
- × $1 \times 10^{-3} \text{M}$ dTMP - $1 \times 10^{-3} \text{M}$ His

在剂量为 $5 \times 10^2 \text{Gy}$ 时, 我们测出在氧化亚氮饱和及氮饱和体系中的 G_{pi} 值分别为 1.16×10^{-1} 和 2.16×10^{-1} 。当体系中绝大部分 OH 自由基被特丁醇清除时, 我们测出 dTMP 释出的无机磷的初始产额为 1.33×10^{-2} , 此值可归之于 H 原子的贡献。

根据 Edwards 等人^[3]的研究, 我们提议在 dTMP 水溶液体系中 OH 自由基引发 dTMP 释放无机磷的反应历程为:





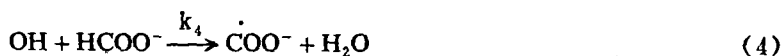
dTMP·OH 为 OH 自由基攻击碱基部分引起的损伤, dTMP-C₄' 为 OH 自由基攻击 C₄' 生成抽氢自由基后水解释放无机磷, dTMP· 表示在戊糖其它位置的抽氢反应。

据此, OH 自由基引发 dTMP 释放无机磷的初始产额 G_{pio} 应为

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

令 $k_1 + k_2 + k_3 = k_0$ 为 OH 自由基与 dTMP 反应的速率常数。

如果体系中存在 OH 自由基清除剂如 HCOO^- 时, 则它便跟 dTMP 竞争水辐解产生的 OH 自由基, 如反应(4),



此时由 OH 自由基引发 dTMP 释放无机磷的产额 G_{pi} 为:

$$G_{\text{pi}} = G_{\text{OH}} \frac{k_2[\text{dTMP}]}{k_0[\text{dTMP}] + k_4[\text{HCOO}^-]} \quad (II)$$

或改写为

$$\frac{1}{G_{\text{pi}}} = \frac{1}{G_{\text{OH}}} \left(\frac{k_0}{k_2} + \frac{k_4[\text{HCOO}^-]}{k_2[\text{dTMP}]} \right) \quad (III)$$

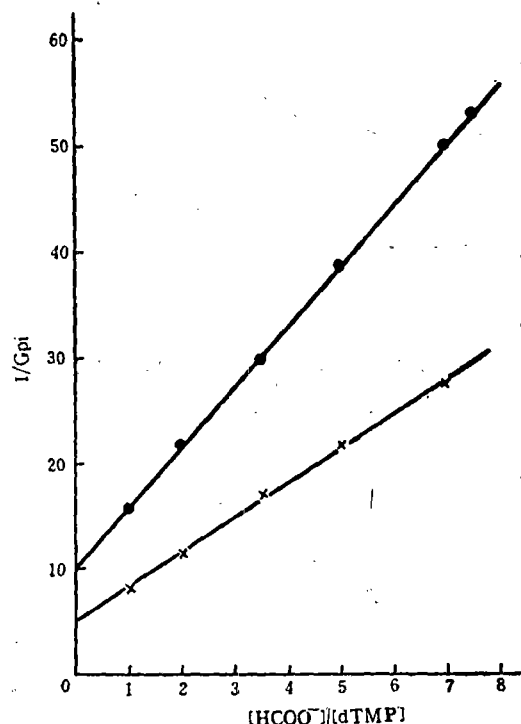


图 3 $1/G_{\text{pi}}$ 与 $[\text{HCOO}^-]/[\text{dTMP}]$ 之间的关系

Fig. 3 The relationship between $1/G_{\text{pi}}$ and $[\text{HCOO}^-]/[\text{dTMP}]$

●—氮饱和体系(N_2)

x—氧化亚氮饱和体系(N_2O)

因此, 在不同的 $[\text{HCOO}^-]/[\text{dTMP}]$ 比例时, 测出的无机磷产额 G_{pi} 应服从方程 II 或 III 的关系。我们在氧化亚氮和氮饱和的体系中, 把 dTMP 的浓度固定在 $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, 改变体系中 HCOO^- 的浓度, 在剂量为 $5 \times 10^2 \text{ Gy}$ 时, 分别测出体系中所释出的无机磷, 然后以 $1/G_{\text{pi}}$ 对 $[\text{HCOO}^-]/[\text{dTMP}]$ 作图均为一直线, 见图 3。

由图 3 求得氧化亚氮和氮饱和体系的截距分别为 5.40 ± 0.56 和 10.40 ± 0.51 , 求得斜率分别为 3.17 ± 0.16 和 5.63 ± 0.14 。从截距可分别求得氧化亚氮和氮饱和体系中的 G_{pi} 为 1.85×10^{-1} 和 9.62×10^{-2} , 加上 H 原子对 dTMP 释放无机磷的贡献 G_{pi} 为 1.33×10^{-2} , 因此得在该两体系中不存在 HCOO^- 时的 G_{pio} 值分别为 1.98×10^{-1} 和 1.10×10^{-1} 。两者之比为 1.80, 跟这两个体系中水辐解所产生的 OH 自由基和 H 原子的产额之和的比率相一致, 也与实验测出的 G_{pio} 值相符合。

从图 3 两直线的斜率和截距, 并取 $k_4 = 2.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ^[5], 以及 G_{OH} 分别取 5.35 和 2.72^[6], 则得到

$$k_2 = (1.7 \pm 0.1) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$$

$$k_0 = (5.0 \pm 0.2) \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$$

其中 k_2 值文献中未曾有过报导, 而 k_0 值与 Scholes^[7] 所报导的值 $5.3 \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 相一致。这说明本文所提出的由 OH 自由基引发 dTMP 释放无机磷的反应历程是合理的。

2. 组氨酸对 dTMP 辐射释磷的保护效应

为了探讨组蛋白对 DNA 可能产生的辐射保护效应, 李学鹏^[8]等人用 ESR 法研究指出在固态二元体系中, 组氨酸 (His) 对胸腺嘧啶的辐射保护效应是基于电荷转移和氢原子转移。本文进一步研究在水溶液体系中, 组氨酸对 dTMP 辐射释磷的保护效应, 结果见图 1、图 2 和图 4。从这些结果可以看出, 当体系中存在组氨酸时, dTMP 释出无机磷的产额 G_{pi} 明显下降。如果用保护因子 G_{pio}/G_{pi} 表示 (即体系中不存在组氨酸和存在组氨酸时 dTMP 所释出的无机磷产额之比), 在 dTMP 与组氨酸的克分子比为 1:1 时, 在所研究的剂量范围内 ($5 \times 10^2 \sim 7 \times 10^3 \text{Gy}$), 这两个体系中均为 1.95, 这是体系中组氨酸与 dTMP 竞争水辐解的活性产物的明显启示。当这种二元水溶液体系中存在 0.2 M 特丁醇时, 则保护因子降至 1.14, 这表明组氨酸的保护效应主要是清除 OH 自由基, 从而减小了它与 dTMP 的反应几率。图 4 清楚地指出了组氨酸的保护效果随体系中组氨酸浓度的增加而增加。但是这种保护效应似乎不是简单的竞争作用, 在 dTMP 的浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{M}$, 组氨酸的浓度在 $5 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3} \text{M}$ 的范围内, dTMP 释放无机磷的产额 G_{pi} 与组氨酸的浓度 (mM) 有如下关系:

$$G_{pi} = G_{pio} - 75.3 \times 10^{-3} [\text{His}]$$

因此, 关于组氨酸对 dTMP 辐射释放无机磷的保护作用机理尚需进一步研究。

3. 组氨酸对 DNA 的辐射保护效应

本文初步探索了组氨酸对 DNA 辐射损伤的保护效应。用粘度法研究 DNA 的辐射损伤虽有其缺点, 但对 DNA 结构变化的反应还是灵敏的。图 5 给出了 DNA 的浓度为

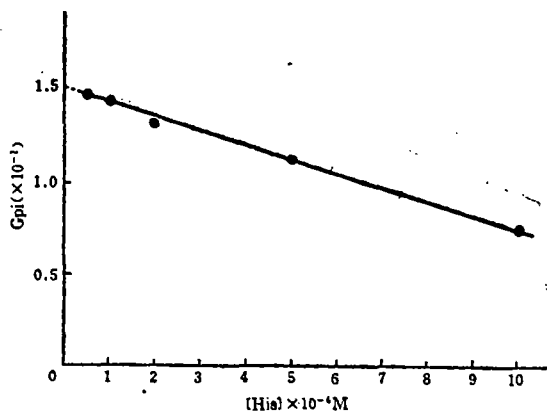


图 4 组氨酸浓度对 G_{pi} 值的影响

Fig. 4 Effect of concentration of Histidine on the G_{pi}
[dTMP]— $1 \times 10^{-3} \text{M}$ 剂量(Dose)— $7 \times 10^3 \text{Gy}$

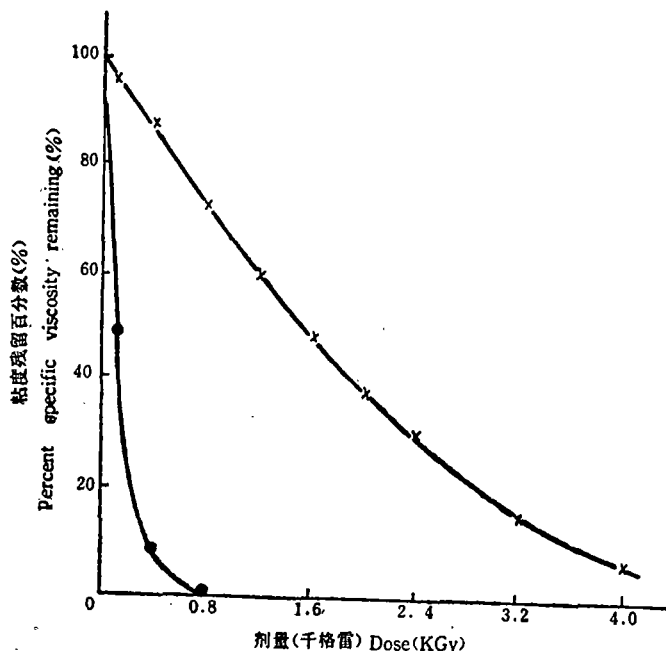


图 5 氮饱和体系中组氨酸对 DNA 粘度的影响

Fig. 5 Effect of Histidine on the viscosity of DNA in the system saturated with nitrogen

• —0.063% DNA × —0.063% DNA + $1 \times 10^{-3} \text{M His}$

0.063%, 组氨酸的浓度为 $1 \times 10^{-3} M$ 的氮饱和中性水溶液体系中, 辐照后测得的 DNA 溶液的粘度残留百分数(辐照后 DNA 溶液的粘度占辐照前的百分数)。结果指出 DNA 溶液辐照后, 其粘度急骤下降, 但当体系中存在组氨酸时, DNA 溶液粘度残留百分数显著增高, 表明组氨酸对于 DNA 的变性——降解有明显的保护作用。

参 考 文 献

- [1] 郁向荣, 沙逸仙, 化学通报, 9, 45(1965).
- [2] G. Kollman, B. Shapiro and D. Martin., *Radiat. Res.* 31, 721 (1967).
- [3] H. E. Edwards, S. Navaratnam, B. J. parsons and G. O. phillips, *Radiation Biology and Chemistry* pp. 94~96, Amsterdam Oxford, New York 1979.
- [4] G. Scholes, J. F. Ward and J. Weiss., *J. Mol. Biol.*, 2, 379 (1960).
- [5] J. W. T. Spinks, R. T. Woods., "An Introduction to Radiation Chemistry" 2nd ed. p. 288 Wiley Interscience, New York, 1976.
- [6] J. W. T. Spinks, R. J. Woods., "An Introduction to Radiation Chemistry" 2nd ed. pp. 258~260. Wiley Interscience. Publication. John and Sons Towto, (1976).
- [7] G. Scholes, in J. Hüttermann ed "Effects of Ionizing Radiation on DNA" section II Chap. 1, p. 156 Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York, (1978).
- [8] 李学鹏, 林念芸, 屠铁城, 谢继东, 辐射研究与辐射工艺学报, 2(2), 17 (1982).

(1984年6月4日收到)

THE MECHANISM OF RELEASING INORGANIC PHOSPHATE FROM dTMP AND RADIATION PROTECTION BY HISTIDINE

Wang Gaodong Wang Zailan Zhang Jiashan
(Institute of Nuclear Research Academia Sinica Shanghai China)

ABSTRACT The mechanism of releasing inorganic phosphate from Deoxythymidine-5'-monophosphate(dTMP) and radiation protection on releasing inorganic phosphate from dTMP by Histidine have been investigated. The release of inorganic phosphate from dTMP results mainly from the acting of OH radical with H atom at position C₄'. It was calculated that rate constant for reaction of OH radical with position C₄' is $(1.7 \pm 0.1) \times 10^8 M^{-1} S^{-1}$ and the rate constant for reaction of OH radical with dTMP is $(5.0 \pm 0.2) \times 10^9 M^{-1} S^{-1}$.

Because the OH radical was scavenged by Histidine effectively, the radiation protection from releasing inorganic phosphate from dTMP by Histidine was obvious. It may be seen from viscosity change of DNA after irradiation that Histidine exhibits marked protection from denaturation and degradation of DNA.

KEY WORDS Deoxythymidine-5'-monophosphate; Deoxyribonucleic acid; Histidine; Radiation protection.