

# 辐射引发核组蛋白与咖啡酸之间电荷转移保护效应的 ESR 研究

朱幼南 屠铁城 董继荣 张加山 林念芸

(中国科学院辐射化学开放研究实验室 上海原子核研究所 上海 201800)

**摘要** 核组蛋白-咖啡酸二元混合体系在 pH9、77K 辐照并测定的 ESR 谱主要呈现为咖啡酸阴离子自由基的信号; 用计算机模拟 ESR 波谱方法, 对二元体系以其组分核组蛋白和咖啡酸单谱信号线性叠加拟合进行重组, 经处理后得到该体系中咖啡酸自旋转移的百分率。结果显示, 随着体系中核组蛋白含量的增加, 自旋转移百分率也随之增加, 表明体系内发生了电子自旋由核组蛋白向咖啡酸的转移。

**关键词** 核组蛋白, 咖啡酸, 电子转移, ESR 波谱解析

作为 DNA-蛋白质结合体的核蛋白是染色体的基本组成成分, 它的辐射损伤能直接导致染色体畸变乃至细胞的死亡, 因而对其辐射损伤机制的研究长期来一直受到关注。继 Alexander 等<sup>[1]</sup>发现低温辐照核组蛋白的 ESR 波谱类似于 DNA 之后, 相继报道了受照射核蛋白其单链 DNA 断裂的产额较之纯 DNA 辐照后的产额为高<sup>[2]</sup>, 其自由基优先定位于 DNA<sup>[3]</sup>, 支持和证明了辐射引发核蛋白的电子自蛋白质向 DNA 转移并敏化 DNA 的辐射损伤。作者曾在研究全组蛋白与嘧啶碱基的相互作用中发现了辐射引发电子自全组蛋白向胸腺嘧啶和胞嘧啶的转移, 亦有助于阐明核组蛋白的辐射损伤机理<sup>[4]</sup>。正是由于核组蛋白在细胞核中的重要作用, 研究其辐射损伤的保护效应显得十分有意义。中科院辐射化学开放实验室在用羟基肉桂酸衍生物对 DNA 和蛋白质的辐射保护效应及其机理研究方面取得的成果<sup>[5~8]</sup>, 揭示了保护效应的本质为电荷转移机理。据此, 本工作以咖啡酸作为电子受体清除核组蛋白辐照产生的次级电子, 抑制其辐射损伤, 以期进一步证明羟基肉桂酸衍生物对细胞核的保护效应。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

核组蛋白为美国 Sigma 公司生产的产品, 咖啡酸为上海试剂一厂产品, 重结晶后使用。

### 1.2 样品的制备及辐照

按所需核组蛋白-咖啡酸的重量比, 称取核组蛋白, 用 NaOH 稀水溶液溶解, 加入一定量已知浓度的咖啡酸, 两者充分混和配制成 pH9 的溶液后, 骤冷成二元分子堆集物, 经真空冷冻干燥制成核组蛋白-咖啡酸重量比为 1:1 至 60:1 的一系列二元分子混合物。将其与冷冻

国家自然科学基金资助项目

(收稿日期: 1996-10-24; 修回日期: 1996-12-23) Copyright © 1997 Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

干燥的 pH 为 9 的纯核组蛋白和咖啡酸分别装入  $\phi 3$  mmGG17 的辐照管中, 通纯氮后封管, 在液氮温度下置于  $^{60}\text{Co}$  源室中辐照, 吸收剂量为 70 kGy。

### 1.3 ESR 波谱的测定及解析

所有被辐照的样品均由 Varian-112 波谱仪在 X 波段进行测定, 微波功率为 1mW, 用 E-500-2NMR Gauss 计作磁场精确测定, 以 E-231/232 双样品腔和 DPPH 协同标定所测样品自由基的 g 值。上述辐照样品首先在 77K 进行 ESR 测定, 然后升至室温测定。对于在 77K 下辐照及测定的二元体系的 ESR 谱, 其信号以联用的 HP-9835B 微机记录后按单组分线性叠加原理进行模拟重组。分别得到咖啡酸和核组蛋白二个单组分的 ESR 波谱在重组时占二元体系复合谱中的权重  $w_1$  和  $w_2$ , 由  $w_1$  和咖啡酸在二元体系中的重量及单组分的重量求得单组分咖啡酸自旋浓度 ( $S_1$ ) 与二元体系中咖啡酸总自旋浓度 ( $S$ ) 之比  $S_1/S$ , 由于后者是咖啡酸由辐照直接俘获次级电子产生的自旋浓度 ( $S_1$ ) 与咖啡酸接受从核组蛋白转移而来的自旋浓度 ( $S_2$ ) 之和, 即  $S = S_1 + S_2$ 。于是咖啡酸自旋转移的百分率即咖啡酸由核组蛋白转移得到的自旋浓度占二元体系中电子受体咖啡酸总自旋浓度的百分率就可由下式得到:  $P_{ST} = S_2/S = (S - S_1)/S = 1 - S_1/S$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 核组蛋白-咖啡酸二元体系在 77K 辐照并测定的 ESR 波谱

77K 下测定的二元体系的 ESR 波谱见图 1, 六种不同重量比的分子混合物其 ESR 波谱特征  $\Delta H_{pp}$  (0.83-0.95 mT) 与咖啡酸阴离子自由基的波谱特征  $\Delta H_{pp} = 0.94$  mT 相近, 而与核组蛋白阴离子由由基的  $\Delta H_{pp}$  为 2.5 mT 显著不同, 因此它们主要显示了与咖啡酸很相似的单峰。这表明体系中主要的自由基产物为咖啡酸阴离子自由基。随着体系中核组蛋白含量的增加, 其二元体系的 ESR 波谱中核组蛋白阴离子自由基的特征也逐渐增强。众所周知, 核组蛋白辐照时体系内存在着电子由组蛋白向 DNA 的转移, 因此可以认为核组蛋白-咖啡酸二元体系中电子由核组蛋白向咖啡酸转移的机制是电子由 DNA、组蛋白向咖啡酸转移。

### 2.2 核组蛋白-咖啡酸二元体系在 77K 下辐照, 室温下退火后测定的 ESR 波谱

由图 2 可见室温下所有二元体系的 ESR 波谱其主峰均是一个对称的单峰, 而核组蛋白在室温下的 ESR 波谱是类似于 DNA 在 77K 辐照并升至室温退火后所显示的胸腺嘧啶 5 位自由基的特征波谱。表明二元体系在室温下的自由基信号特征主要转化为咖啡酸在室温下的单峰特征, 明显不同于核组蛋白在室温下的多重峰信号特征。与图 1 对照, 可见在退火过程中二元体系内进一步产生由核组蛋白向咖啡酸的自旋转移。

### 2.3 77K 测定的 ESR 波谱解析

按 1.3 方法经计算机对 77K 下二元体系的 ESR 波谱解析所得的咖啡酸自旋转移的百分率  $P_{ST}$  (%) 对二元体系中核组蛋白与咖啡酸的重量比 ( $r$ ) 作图 (图 3), 可见随着体系中核组蛋白含量的增加, 自旋转移百分率也随之增加。在核组蛋白-咖啡酸重量比自 10:1 起, 自旋转移百分率达 90% 以上, 表明体系中发生了电子自核组蛋白向咖啡酸的高效转移。

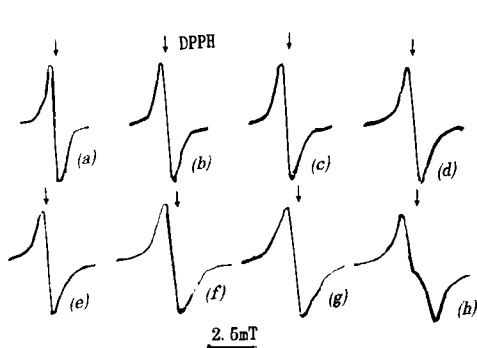


**Fig.1** ESR spectra from binary molecular aggregate composed of nucleohistone and caffeic acid with various weight ratio ( $r$ ) irradiated and recorded at 77 K, pH<sup>9</sup>  $r$  is nucleohistone-caffeic acid with weight ratio (a) caffeic acid,  $g=2.0044$ ,  $\Delta H_{pp}=0.94\text{mT}$  (b)  $r=1:1$ ,  $g=2.0043$ ,  $\Delta H_{pp}=0.83\text{ mT}$  (c)  $r=5:1$ ,  $g=2.0043$ ,  $\Delta H_{pp}=0.83\text{ mT}$  (d)  $r=10:1$ ,  $g=2.0042$ ,  $\Delta H_{pp}=0.83\text{ mT}$  (e)  $r=20:1$ ,  $g=2.0043$ ,  $\Delta H_{pp}=0.83\text{ mT}$  (f)  $r=40:1$ ,  $g=2.0044$ ,  $\Delta H_{pp}=0.95\text{ mT}$  (g)  $r=60:1$ ,  $g=2.0042$ ,  $\Delta H_{pp}=0.95\text{ mT}$  (h) nucleohistone,  $\Delta H_{pp}=2.5\text{mT}$

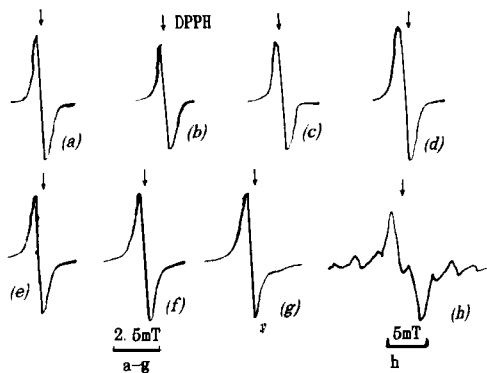


**Fig.2** ESR spectra from binary molecular aggregate composed of nucleohistone and caffeic acid with various weight ratio ( $r$ ) irradiated and recorded at 77 K, pH<sup>9</sup>, and recorded after annealing at room temperature  $r$  is nucleohistone-caffeic acid with weight ratio (a) caffeic acid,  $g=2.0043$ ,  $\Delta H_{pp}=0.63\text{mT}$  (b)  $r=1:1$ ,  $g=2.0045$ ,  $\Delta H_{pp}=0.63\text{ mT}$  (c)  $r=5:1$ ,  $g=2.0044$ ,  $\Delta H_{pp}=0.63\text{ mT}$  (d)  $r=10:1$ ,  $g=2.0044$ ,  $\Delta H_{pp}=0.63\text{ mT}$  (e)  $r=20:1$ ,  $g=2.0044$ ,  $\Delta H_{pp}=0.65\text{ mT}$  (f)  $r=40:1$ ,  $g=2.0044$ ,  $\Delta H_{pp}=0.69\text{ mT}$  (g)  $r=60:1$ ,  $g=2.0044$ ,  $\Delta H_{pp}=0.68\text{ mT}$  (h) nucleohistone overall width 15.0 mT

2.4 咖啡酸对核组蛋白的辐射保护机理

77K 辐照的核组蛋白-咖啡酸二元体系中随着核组蛋白对咖啡酸重量比的增加，体系内核组蛋白的量相应增加，它们应俘获大部分的电子而产生其阴离子自由基。但实验结果表明，尽管二元体系内咖啡酸的含量相对较低，但 ESR 波谱仍主要呈现为咖啡酸阴离子自由基的波谱特征，显然，其中发生了电子自核组蛋白向咖啡酸的转移。由于咖啡酸的亲电子性能优于核组蛋白中其组分的亲电子性能<sup>[5~8]</sup>，且咖啡酸的芳环易与核组蛋白中的 DNA 碱基和组蛋白的芳香侧链堆集叠合，有利于在咖啡酸的酚羟基与 DNA 碱基上的酮基及组蛋白的酰胺羰基之间形成氢键，从而成为电子转移的通途，使受照射核组蛋白-咖啡酸二元分子混合物的自由基主要定位于咖啡酸上，保护了核组蛋白免遭辐射损伤。

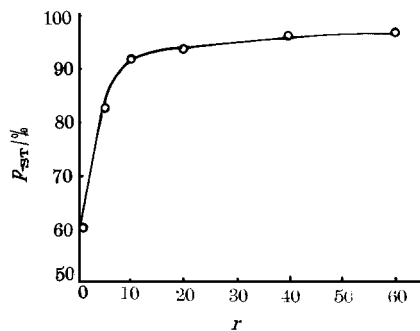


**Fig.3** The relationship between Pst (%) and weight ratios ( $r$ ) of binary molecular aggregates at 77 K, pH=9

## 参 考 文 献

- 1 Alexander P, Lett J T, Ormeder M G. *Biochim Biophys Acta*, 1961, 51: 207
- 2 Kuwabara M, Hayashi M, Yoshii G. *J Radiat Res*, 1973, 14: 198
- 3 Kuwabara M, Hayashi M, Yoshii G. *J Radiat Res*, 1977, 17: 342
- 4 朱幼南等. 中国科学院辐射化学开放研究实验室年报, 1993: 67
- 5 林念芸等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1983, 1 (1): 1
- 6 Lin Nianyun. *Radiat Phys Chem*, 1986, 28: 211
- 7 林维真等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1994, 12 (4): 199
- 8 林维真. 硕士学位论文, 1993年7月

## ESR STUDY ON RADIATION INDUCED ELECTRON TRANSFER BETWEEN NUCLEOHISTONE AND CAFFEIC ACID

Zhu Younan   Tu Tiechen   Dong Jirong   Zhang Jiashan   Lin Nianyun

( *Laboratory of Radiation Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institute of Nuclear  
Research, Shanghai 201800* )

**ABSTRACT**   Radiation induced electron transfer between nucleohistone and caffeic acid and the radiation protection effect by caffeic acid have been studied. A series of binary molecular aggregates of nucleohistone and caffeic acid with weight ratios varied from 1:1 to 60:1 at pH<sup>9</sup> were irradiated and observed at <sup>77</sup>K using ESR spectrometer. The ESR spectra recorded at <sup>77</sup>K indicate that  $\Delta H_{pp}$  (0.83~0.95 mT) of central peak from mixed aggregates with several molecular ratios are close to  $\Delta H_{pp}$  (0.94mT) of caffeic acid alone and quite different from  $\Delta H_{pp}$  (2.5mT) of nucleohistone. It is suggested that caffeic acid anion radical is the main radical product.  $P_{ST}$  (%) defined as the percentage of the spin concentration of caffeic acid arising from transfer of captured electron by nucleohistone in the total spin concentration of caffeic acid could be obtained by resolution of composite ESR spectra. It is obvious that  $P_{ST}$  increased with the increase of nucleohistone content and reaches more than 90% from weight ratios 10:1 to 60:1. The results indicates that electron transfer from nucleohistone to caffeic acid occurred within the mixed aggregates.

**KEYWORDS**   Nucleohistone, Caffeic acid, Electron transfer, Resolution composite ESR spectra