

## 胞嘧啶水溶液体系辐解的瞬态产物研究\*

马先勇

(湖南医科大学肿瘤研究所肿瘤分子生物学研究室, 长沙 410078)

姚思德 王文锋 左志华 林念芸

(中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室, 上海 201800)

关键词: 胞嘧啶, 脉冲辐解, 自由基, 特征吸收

DNA 是生物体辐射损伤的主要靶分子, 而 DNA 分子的损伤又主要表现为碱基的损伤. 研究表明: 电离辐射对水溶液中或者天然细胞内的 DNA 分子碱基的损伤, 主要是通过间接作用, 即水在受辐照后产生三种主要的初级活性粒子  $\text{OH}\cdot$ 、 $\text{H}\cdot$ 、 $e_{\text{aq}}^-$ , 这些活性粒子与 DNA 及其组分发生反应生成次级活性产物, 次级活性产物的形成导致 DNA 分子内部的电荷转移而产生正负电荷的两极分化, 即正电荷集中在鸟嘌呤 (Gua) 分子上, 而负电荷则集中于嘧啶 (Thy, Cyt) 的分子上<sup>[1]</sup>, 这种电荷两极分化的结果会导致一系列生化反应的发生, 如链断裂和链交联, 如果细胞本身的以修复酶为主导的修复系统不能修复这种损伤的 DNA, 其结果将导致: ①正常细胞生理生化功能的改变; ②细胞的死亡; ③细胞 DNA 的突变, 畸变—正常细胞转化为癌细胞.

胞嘧啶 Cyt 是组成 DNA 的两种嘧啶碱基之一, 由于胸腺嘧啶二聚体的发现, 因而人们的注意力主要集中于 Thy 的辐解机理及其产物的研究上, 但近年来的研究表明: 胞嘧啶不仅可形成类似的二聚体, 而且在 DNA 的辐解损伤中占有重要地位. 虽然已有关于 Cyt 辐解的研究报导<sup>[2,3]</sup>, 但不同的作者报导的结果相差甚远. 为了确定其辐解的瞬态产物及其衰减机理, 我们采用脉冲辐解方法研究了在  $\text{N}_2$  饱和的不同 pH 值水溶液中 Cyt 及其质子化产物的特征吸收谱.

### 1 实验部分

采用经三次重结晶纯化的 Cyt(日本化成贱卖株式会社), 实验用水为三次蒸馏水, Cyt 溶液浓度为  $5 \times 10^{-4} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $i\text{-PrOH}$  浓度为  $0.2 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 以 HCl 和 NaOH 调溶液 pH 值, 所用化学试剂均为分析纯或色谱纯级. 十兆伏电子直线加速器(国产), 束流 3-4 A, 单脉冲剂量 40 Gy, 脉宽 10 ns, 脉冲电子能量 4-8 MeV. 100 兆数据采集及转换系统, 分析光源为 500 W 氙灯, 分析光由单色仪分成单色光, 经  $\text{IP}_{28}$  型光电倍增管转换成电信号, 再经 A/D 转换成数字信号存入计算机, 用计算机处理数据. 实验前溶液经通  $\text{N}_2$  除氧, 经 HCN 法校正后, 吸收剂量以  $D=9.65 \times 10^8 \times \text{O.D.}/G \cdot \epsilon l$  计算, 相应的一级动力学方程为  $\ln(\text{O.D.}_\infty - \text{O.D.}_0) - \ln(\text{O.D.}_\infty - \text{O.D.}_t) = kt/\epsilon l$ , 二级动力学方程为  $1/(\text{O.D.}_t - \text{O.D.}_\infty) - 1/(\text{O.D.}_0 - \text{O.D.}_\infty) = kt/\epsilon l$ , 分析瞬态产物的特征吸收峰及衰减规律.

1996-12-27 收到初稿, 1997-03-25 收到修改稿. 联系人: 马先勇. \* 国家自然科学基金资助项目

## 2 结果与讨论

### 2.1 Cyt 的特征吸收及衰减动力学分析

将配制好的 Cyt/*i*-PrOH 体系以吸管移入石英样品池, 通 N<sub>2</sub> 除氧后, 置于脉冲辐射源的照射程中, 测定一系列 λ 处的 O.D 值即剂量, 在计算机内记录, 贮存和分析. 结果发现, 在 pH 值为 7.0 的水溶液中, 其瞬态产物具有两个特征吸收, 其一在 λ ≤ 300 nm 处, 其二在 λ = 355 nm ± 5 nm 处. 前者的衰减是按二级动力学的方式进行的, 其动力学方程为  $y = 10.52 + 3.2 \times 10^5 x$ ,  $k/\epsilon l = 3.2 \times 10^5$ ; 后者的衰减是按一级动力学的方式进行, 动力学方程为  $y = -3.09 - 2.6 \times 10^6 t$ ,  $k = 2.6 \times 10^6$ ,  $\tau_{1/2} = 0.693/k_1 = 266$  ns.

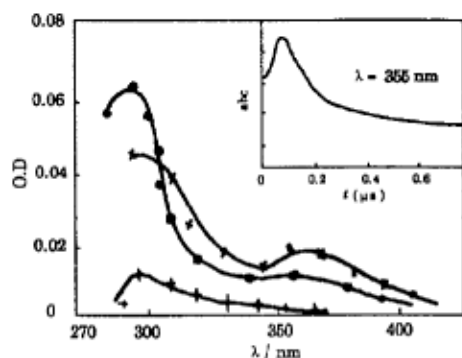


图 1 胞嘧啶水溶液脉冲辐解瞬态产物吸收谱

Fig.1 Transient absorption for radicals induced by pulse radiolysis of cytosine aqueous solution saturated with N<sub>2</sub>.  
[Cyt]=0.5 mmol·L<sup>-1</sup>,  
[*i*-PrOH]=0.2 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.0  
× 0.5 μs; ● 1 μs; + 20 μs

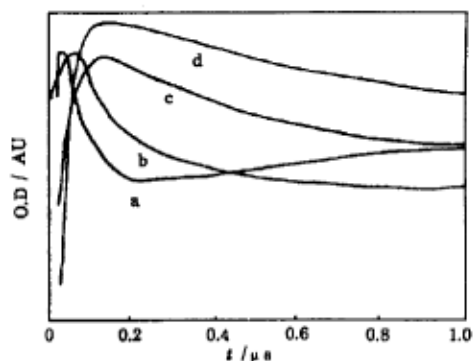
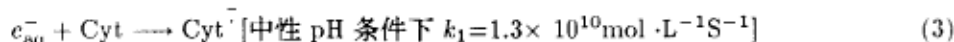
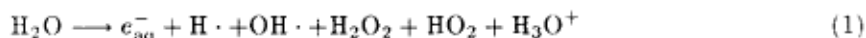


图 2 pH 值的改变对 λ = 355 ± 5 nm 特征吸收峰衰减的影响

Fig.2 pH effects on characteristic absorption peak of λ = 355 ± 5 nm aqueous solution of cytosine for radicals induced by pulse radiolysis saturated with N<sub>2</sub>.  
[Cyt]=0.5 mmol·L<sup>-1</sup>; [*i*-PrOH]=0.2 mol·L<sup>-1</sup>  
a: pH 4.0; b pH 7.0; c: pH 11.0; d: pH 12.6

那么, 位于 λ = 355 ± 5 nm 处的特征吸收是由什么自由基产生的呢? 因为在辐解 Cyt/H<sub>2</sub>O/*i*-PrOH 溶液体系时, 可以发生下列自由基反应:



因而溶液体系反应的结果只产生了两种初级自由基, 即 CH<sub>3</sub>-(OH)·-CH<sub>3</sub> 和 Cyt<sup>-</sup>, 并且它们的产生均为假一级动力学反应的方式, 因此, 要确定 λ = 355 ± 5 nm 处的吸收峰究竟由谁产生, 还必须确定 *i*-PrOH 自由基吸收峰的位置, 我们以 *i*-PrOH 与 H<sub>2</sub>O 组成一个反应体系, 除不含 Cyt 外, 其它反应条件均与前者相同, 结果我们发现在 λ 为 330-360 nm, *t* 为 0.5 ~ 50 μs 范围内均没有明显的吸收, 且它的 ε 值要比观察的 λ = 355 ± 5 nm 处的小得多, 从而排除了 λ = 355 ± 5 nm 处

的吸收峰来自于异丙醇自由基的可能, 那么, 此吸收峰是否来自于  $e_{aq}^-$  呢?  $e_{aq}^-$  在  $\lambda=355\pm 5$  nm 处的  $\epsilon$  值极小, 且在 ps 时间范围内就发生反应, 因而不可能在  $\mu s$  范围内检测到其特征吸收。

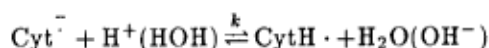
为了进一步确定  $\lambda=355\pm 5$  nm 处的特征吸收来自于  $Cyt^-$ , 我们研究了不同 pH 水溶液的脉冲辐解, 结果发现:  $\lambda=355\pm 5$  nm 处的吸收峰对 pH 值的变化非常敏感, 随 pH 的增大,  $\lambda=355\pm 5$  nm 处的吸收峰半衰期明显增大, 在 pH 为 5.0 时, 这个吸收峰约在 50 ns 出现, 而在 100 ns 就基本上消失了, 而在 pH=12.6 时, 这个吸收峰在 0.5 ns 时即已出现, 但在 20 ns 时依然可以观察到。不同 pH 条件下  $\lambda=355\pm 5$  nm 衰减速率常数及半衰期于表 1。

表 1 pH 值的改变对  $Cyt^-$  半衰期及衰变速率常数的影响

Table 1 pH effects on half-time and decay constant of  $Cyt^-$  ( $\lambda=355\pm 5$  nm)

pH	4.0	5.8	7.0	8.0	11.0	12.6
$k$	$1.5\times 10^7$	$1.1\times 10^7$	$2.6\times 10^6$	$2.54\times 10^6$	$6.0\times 10^5$	$3.2\times 10^5$
$\tau_{1/2}/ns$	46.20	65.74	266.10	293.69	1158.20	2165.31

从上表可看出, 随着 pH 值的升高,  $\lambda=355\pm 5$  nm 处的吸收峰衰减半衰期明显延长, 呈一种带负电荷分子特征, 为了更清楚观察到这点, 我们以  $[OH^-]$  为横坐标, 以  $\log k_1$  为纵坐标作图 2 可看出: 随  $[OH^-]$  的增大,  $\lambda=355\pm 5$  nm 处吸收峰的衰减速率常数  $k$  则呈指数减小。这点有力地支持了  $\lambda=355\pm 5$  nm 处为带负电荷的  $Cyt^-$  特征吸收峰的判断。  $Cyt^-$  的衰减速率常数受溶液 pH 值的影响表明其衰变反应中产生  $OH^-$ , 其衰变可能主要采取下列方式进行, 即:



Hummel<sup>[4]</sup> 等人推测的  $Cyt^-$  的  $\tau_{1/2}$  为 10 ~ 20 ns, 这与我们在 pH=4.0 时的实验结果  $\tau_{1/2}=46$  ns 较接近; 而 Von, Sonta<sup>[5]</sup> 等人推算的  $Cyt^-$  的  $\tau_{1/2}$  为 210 ns, 这与我们在 pH 7.0 时的实验结果  $\tau_{1/2}=266$  ns 基本一致。显然, 本实验更能表明  $Cyt^-$  作为一种带负电荷的自由基衰变速率对 pH 值变化的依赖性。

## 2.2 $Cyt^-$ 的质子化产物分析

由  $e_{aq}^-$  与 Cyt 反应生成的  $Cyt^-$ , 其寿命很短, 它依靠  $H_2O$  或  $H^+$  的介质而进行快速质子化, 所以在进行脉冲辐解研究时, 我们主要观察到的是其质子化产物。根据 INDO 计算结果<sup>[6]</sup>, Cyt 的自旋密度主要分布在  $C_6(0.443)$ ,  $N_3(0.153)$  和  $C_4$  上, 由于  $C_4$  上有  $-NH_2$  基团的存在, 会对此位置的质子化产生较强的空间障碍。所以质子化作用主要在  $C_6$  和  $N_3$  上发生。而要预测究竟是在  $C_6$  或  $N_3$  上质子化, 则必须考虑质子的来源和质子化后所形成的产物在反应体系中的热力学稳定性。Bernhard<sup>[7]</sup> 认为: 提供  $Cyt^-$  质子化作用的质子可分为两种来源, 即自由质子和通过氢键所供给的质子。前者是在酸性条件下通过酸的解离而产生的, 这种质子主要加在原初阴离子自由基的  $C_6=C_5$  上, 也可以加在  $O_2$  上; 而在中性和碱性条件下, 质子化主要发生在与  $H_2O$  的分子形成氢键的  $N_3$  上。

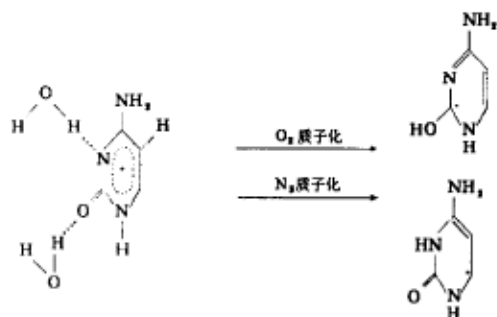
### 2.2.1 $C_6$ 质子化产物分析

对  $\lambda=310\pm 5$  nm 处特征吸收的衰减动力学分析发现: 这个特征峰是按二级动力学的方式衰减的, 其衰减的动力学方程为  $1/D_t=1/D_0+k(t-t_0)/\epsilon l$ , 计算机拟合的方程为  $y=25.3+2.93\times 10^6x$ ,

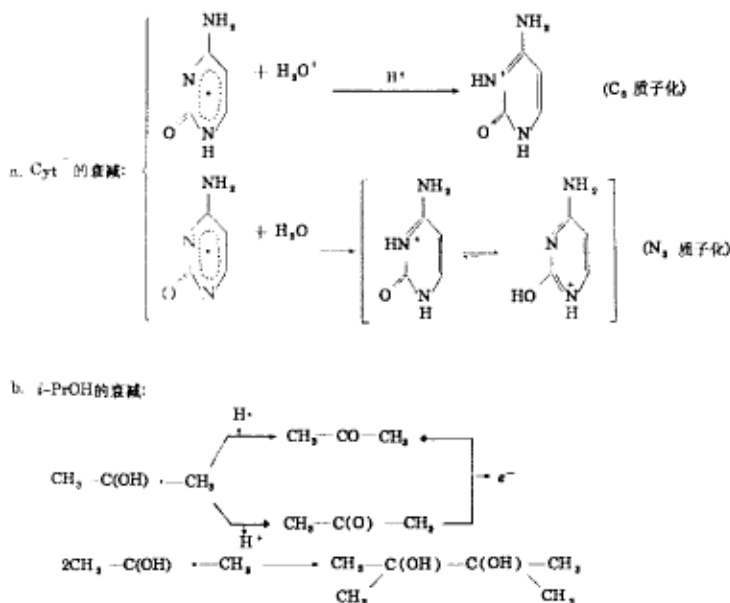
故其  $k/\epsilon l = 2.93 \times 10^6$ , Hayon 错误地认为这个吸收峰来自于  $\text{Cyt}^-$ . 根据前面的论述, 我们有理由推测,  $\lambda = 310 \pm 5 \text{ nm}$  处的吸收来自于  $\text{Cyt}$  的 6 位质子化产物.

### 2.2.2 $\text{N}_3$ 质子化产物的分析

中性及碱性条件下  $\text{Cyt}$  水溶液脉冲辐解时, 我们观察到了另一类质子化产物的特征吸收峰, 其位置在  $\lambda = 295 \pm 5 \text{ nm}$  处. 其衰减按二级动力学的方式进行, 动力学方程式为  $y = 10.52 + 3.2 \times 10^5 x$ ,  $k/\epsilon l = 3.2 \times 10^5$ . 如前所述, 这个特征吸收峰应归于  $\text{Cyt}^-$  的  $\text{N}_3$  质子化产物. 其质子化方式如下:



实际上, 单晶状态下的质子化大部分也是以这种方式来进行的, David<sup>[9]</sup> 等人在 5' dCMP 的 ESR/ENDOR 实验结果支持了这种质子化方式的推论. 在碱性条件下  $\text{N}_3$  质子化产物还可以异构化为两种不同的烯醇式结构从而增加其稳定性. 根据 INDO 的计算结果,  $\text{O}_2$  上的自旋密度分布基本为 0, 所以质子化难以在它上面产生. 但  $\text{O}_2$  质子化产物与  $\text{N}_3$  质子化产物互为同分异构体, 它们可以相互转化. 基于上述讨论和实验结果,  $\text{Cyt}^-$  及  $i\text{-PrOH}$  的衰减可能采取的机理是:



另外, pH 的改变不仅对  $\text{Cyt}^-$  的质子化过程及质子化位置产生较大的影响, 而且还直接影响到  $\text{Cyt}^-$  的生成, 根据 Shraqge 等人的实验<sup>[10]</sup>, 在  $\text{pH} > 10.0$  后, 与  $\text{Cyt}$  与  $e_{\text{aq}}^-$  的反应速率常

数就开始下降, 到达 pH=12.2 时, 其反应速率常数就急剧下降, 这就是为什么我们在高 pH 下所观察到的  $\text{Cyt}^-$  浓度并不高的原因.

#### 参 考 文 献

- 1 Graslund A, Ehrenberg A, Rupprecht A, et al. *Biochem Biophys Acta*, 1971, 254:172
- 2 Hazra D K, Steenken S. *J Am Chem Soc*, 1983, 105:4380
- 3 Visscher K J, Alexander R W, Dempsey T R, et al. *Int J Radiat Biol.*, 1988, 54:787
- 4 Spoelder H W. Dissertation, Vrije University, Amsterdam: Elsevier, 1979. pp.23-28
- 5 Hissung A, Sonntag C V. *Int J Radiat Biol.*, 1979, 35:449
- 6 Liu Renzhong, Lin Nianyun. *Radiat Phys Chem.*, 1981, 17:293
- 7 Bernhard W A. *Advances in Radiation Biology*, Vol. 9, 1982. p224
- 8 Hayon E, et al. *J. Chem. Phys.*, 1969, 51:4881
- 9 David M C, Willian A B. *Chem Phys.*, 1970, 70:210
- 10 Shrage P C, Michaels H B, Hunt J W. *Radiation Research*, 1971, 36:3055

#### Study on Transient Products Induced by Pulse Radiolysis of Cytosine Aqueous Solution

Ma Xianyong

(Cancer Research Institute, Hunan Medical University, Changsha 410078)

Yao Side Wang Wenfeng Zuo Zhihua Lin Nianyun

(Laboratory of Radiation Chemistry, Shanghai Institute of Nuclear Research, Academia Sinica, Shanghai 201800)

**Abstract:** Using the ns pulse radiolysis, we studied the characteristic absorption spectrum and kinetic decay of cytosine anion radical ( $\text{Cyt}^-$ ). Results showed that the characteristic absorption of  $\text{Cyt}^-$  was located at  $\lambda=355\pm 5$  nm, and decayed following the first order kinetics with  $\tau_{1/2}=265$  ns at pH=7.0. The decay became slower and  $\tau_{1/2}$  rapidly rised with the increment of pH value,  $\text{Cyt}^-$  protonated at C<sub>6</sub> in acidic solution, and the characteristic absorption was located at  $\lambda=310\pm 5$  nm, and decayed following the second order kinetics;  $\text{Cyt}^-$  protonated at N<sub>3</sub> in aqueous solution of pH $\geq 7$ , and the characteristic absorption was located at  $\lambda=295\pm 5$  nm, and decayed following the second order kinetics.

**Keywords:** Cytosine. Pulse radiolysis. Free radical. Characteristic absorption