

褪黑激素的瞬态产物及其性质*

朱红平^{①②} 张兆霞^{①②} 赵红卫^① 王文锋^{①**} 姚思德^①

(① 中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800; ② 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 利用纳秒级激光光解瞬态吸收光谱装置, 研究了褪黑激素(melatonin, ML)的光物理和光化学性质. 在 266 nm 激光的作用下, ML 可被激发产生激发三重态($^3\text{ML}^*$), 又可光电离生成水合电子和阳离子自由基($\text{ML}^{\bullet+}$); 并对 $\text{SO}_4^{\bullet-}$, 核黄素(riboflavin, RF)激发三重态与 ML 间的电荷转移反应进行了研究, 测得了反应速率常数分别为 8.0×10^9 和 $1.4 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; 同时还研究了 ML 清除 ABTS 阳离子自由基($\text{ABTS}^{\bullet+}$)的能力, 并与其它抗氧化剂进行了比较.

关键词 褪黑激素 激光光解 光电离 三重态

生物体在其新陈代谢等活动中会产生活性氧自由基(ROS), 生物体内有酶和非酶系统如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、维生素 E 和类胡萝卜素等控制和修复自由基所造成的损伤. 正常机体内自由基的产生与消除处于动态平衡, 但过多的 ROS 能损伤 DNA、蛋白质和脂类等, 从而改变基因表达、影响信号传导, 导致疾病和衰老^[1~3]. 研究结果表明, 阿尔茨海默症、帕金森氏症和动脉粥样硬化等很多退行性疾病都与 ROS 有关, 此外, 白内障的形成和视网膜的损伤也是 ROS 对蛋白质氧化的直接结果. 因此, 对 ROS 的控制和清除研究在生物学和医学界得到了广泛的关注. 大量的研究表明: 抗氧化剂能有效清除 ROS 或修复被氧化损伤的蛋白质和 DNA 等生物分子^[4], 经常摄入富含抗氧化剂的食物可以减少心脑血管等疾病的发生率^[5,6].

褪黑激素即 N-乙酰-5-甲氧基色胺(图 1), 是松果腺分泌的一种吲哚类激素, 同时具有亲水性及亲脂性, 可以透过血脑屏障和胎盘屏障等生物屏障进入细胞^[7]. 实验表明它是一种内源性自由基清除剂, 可通过多种途径减少氧化损伤, 除了直接清除 ROS 外, 它还能激活很多抗氧化物酶以及通过螯合金属离子等保护 DNA 和蛋白质的自由基损伤^[8]. 脑在生物体活动中需要大量的能量, 其代谢过程比其他器官活跃, 因此脑中的 ROS 浓度也较高, ML 则是脑内高效能的抗氧化剂, 对大脑具有保护作用^[9]. 线粒体是产生自由基和发生氧化应激的主要场所, 而线粒体细胞内 ML 浓度很高^[10], 因此 ML 对防止衰老和与衰老有关的疾病有特别重要的作用. 同时褪黑激素有利于治疗阿尔茨海默症和帕金森氏症等多种疾病, 还可减少癌症的发生, 阻止肿瘤的生长, 延长生物体寿

收稿日期: 2005-06-06; 接受日期: 2005-09-21

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 20373086)

** 联系人, E-mail: wfwang@sinap.ac.cn

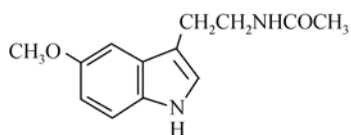


图 1 褪黑激素 (ML) 的结构式

命^[11].

由于ML的抗氧化和抗肿瘤等诸多功能, 其瞬态产物的研究得到了广泛关注. Roberts 和Maharaj等人的研究表明, 激光光解后ML可通过激发能转移产生极少量的单线态氧, 而稳态光解结果显示它可有效清除单线态氧^[11,12]. Mahal小组用脉冲辐解研究了ML和 $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$, $\text{N}_3\cdot$ 等自由基的反应^[13]; Tan等人详细研究了ML与 $\cdot\text{OH}$ 反应的机理^[14], 用ESR或其它稳态方法等对其抗氧化性能也有一些研究^[15]. 为了弄清它的抗氧化机理及过程, 对其光物理和光化学性质及其自由基反应进行深入的研究是十分必要的. 为此, 我们利用激光光解瞬态光谱技术研究了它的光解机理及自由基反应性质.

1 实验部分

1.1 试剂

褪黑激素(ML), 核黄素(RF), 2,2-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS), 过硫酸钾($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 等均为 Sigma 公司产品, 都未经进一步处理直接使用.

1.2 仪器和方法

实验所用溶液均采用 Millipore 装置制得的纯水新鲜配制, 实验前溶液用 N_2 , N_2O 或 O_2 鼓泡 20 min, N_2 , N_2O 和 O_2 均为 99.99% 的高纯气体. 所有实验均在室温下(约 20°C)进行.

激光光解实验装置采用 Nd:YAG 激光器作为激励光源, 激光波长分别为 266 或 355 nm, 脉冲宽度 5 ns, 单脉冲能量约为 80 mJ, 分析光源采用 300 W 氙灯并在检测瞬间进行加亮, 分析光与激光垂直透过 1 cm 的石英样品池, 经单色仪分光后使用 R955 光电倍增管(Hamamatsu) 检测, 信号由 HP 54510B 数字示波器转换成数字信号, 并以自编软件进行动力学数据

分析处理, 实验装置及实验方法详见文献^[16]. 紫外吸收测定在 Zeiss Specord S10 型分光光度计上进行.

2 结果与讨论

2.1 ML 的激光光解研究

$1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 褪黑激素中性水溶液分别通 N_2 , N_2O 和 O_2 20 min, 经 266 nm 激光激发 0.1 μs 后得到的瞬态吸收光谱如图 2 所示. 图中可以观察到氮气体系中分别出现 330, 440 nm 的瞬态吸收峰和 500 nm 后的宽吸收带, 而在 N_2O 或 O_2 气氛中波长吸收带完全消失, 结合文献报道可以把 600 nm 后的宽吸收带归于水合电子(e_{aq}^-)的特征吸收, 而水合电子的产生是光电离的直接证据, 这说明在 266 nm 激光作用下, ML 发生了光电离.

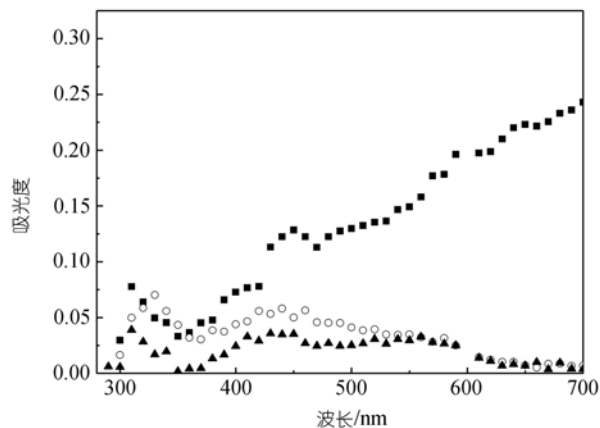


图 2 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 褪黑激素的中性水溶液经 266 nm 光解后在 0.1 μs N_2 饱和(■)、 N_2O 饱和(○)、 O_2 饱和(▲)时测得的瞬态吸收谱

动力学分析表明, 光电离产生的 e_{aq}^- 以一级动力学规律衰变, 主要是 e_{aq}^- 与 ML 的反应, 改变 ML 的浓度, 求得水合电子 e_{aq}^- 与基态褪黑激素反应的速率常数为 $1.6 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 这与 Mahal 等人用脉冲辐解方法得到的结果基本一致^[13].

Maharaj 和 Roberts 等人证明 ML 经光解后会产生极少量的单线态氧^[11,12], 但是没有深入进行研究. 为了验证是否有 ML 三重态产生, 分析了三重态猝灭剂 O_2 和 Mn^{2+} 对吸收在 330, 440 和 550 nm 瞬态产物衰变

的影响. 猝灭剂加入后, 330 和 550 nm 处瞬态吸收的衰变基本不受影响, 这表明吸收在 330 和 550 nm 处的瞬态产物是自由基, 而 440 nm 处的衰变随猝灭剂的加入明显加快(图 3), 表明 440 nm 处的瞬态产物为激发三重态, 研究得到了在此浓度下, 三重态半衰期约为 2.1 μs , 氧气和 Mn^{2+} 猝灭 $^3\text{ML}^*$ 的反应速率常数分别为 7.3×10^8 和 $4.9 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

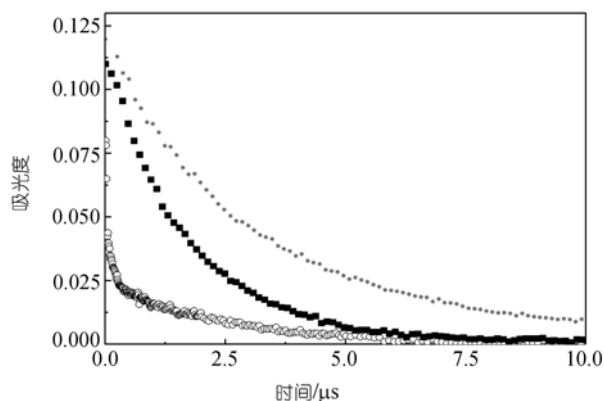
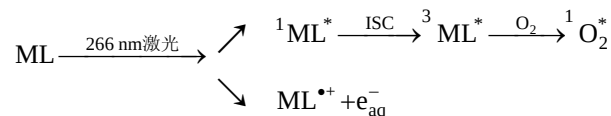


图3 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 褪黑激素的中性水溶液经 266 nm 激光光解后在 440 nm 处观察到的瞬态衰变曲线
*, N_2 ; O, O_2 ; ■, 含有 $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mn}^{2+}$

以上的结果表明, 在 266 nm 激光下, ML 除了光电离, 也产生激发三重态, 在有氧条件下, ML 三重态将能量转移给 O_2 而产生单线态氧, 其机理如下:



少量单线态氧的存在可保护眼睛的氧化损伤^[11], 这可能是 ML 可以阻止白内障发生的原因. 由于褪黑激素自由基 $\text{pK}_a (^1\text{ML}^{\bullet+} / \text{ML}^{\bullet}) = 4.7$ ^[13], 在本实验条件下, $\text{ML}^{\bullet+}$ 阳离子自由基脱质子变成中性自由基, 图 2 中 330 和 550 nm 处是 $\text{ML}^{\bullet}$ 的瞬态吸收峰.

2.2 与 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 的反应

为了进一步讨论 ML 光电离后所生成的自由基归属, 用 266 nm 激光激发 N_2 饱和下含有 ML 的 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 水溶液, 研究了 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 与 ML 的反应. 在该实验条件下, 激光主要被 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 吸收并产生氧化性很强的单电子氧化剂 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ (3.1 V/NHE), 它在 320 和 460

nm 左右有 2 个吸收带. 图 4 是 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 和 $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 褪黑激素的水溶液经 266 nm 激光脉冲后在 0.1 和 2 μs 的瞬态吸收谱, 可以很明显地观察到, 330 nm 处的吸收随时间有明显的增长, 表明有新的瞬态产物生成, 图 4 中的插图是 330 nm 处瞬态产物的生成和衰变曲线, 这说明 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 夺取 ML 分子上的一个电子, 生成 ML 阳离子自由基, 在本实验条件下, 该阳离子自由基脱质子变成中性自由基, 这进一步验证了我们上一部分的结果.

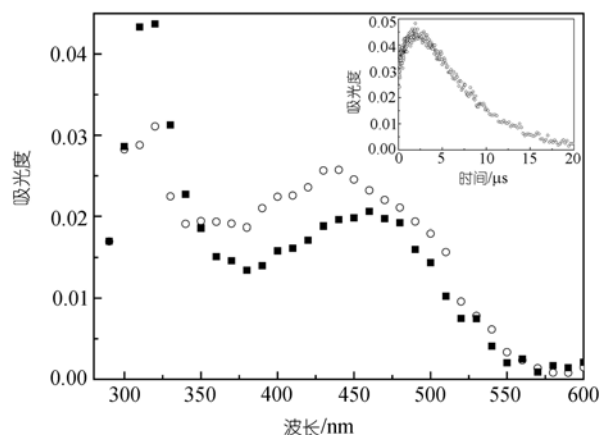


图4 氮气饱和下 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 和 $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 褪黑激素的水溶液经 266 nm 激光脉冲后在 0.1 μs (O) 和 2 μs (■) 分别测得的瞬态吸收谱
插图: 330 nm 处的时间分辨吸收曲线

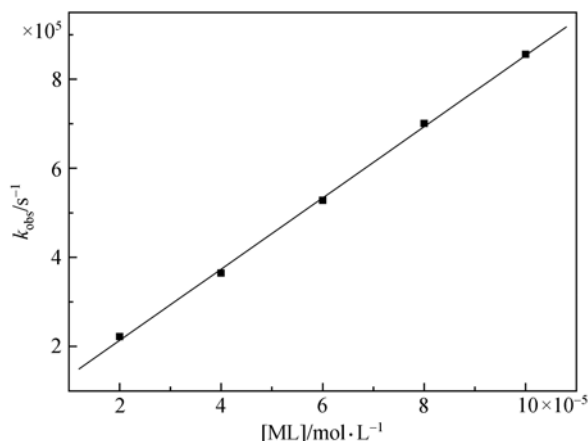
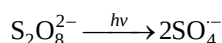
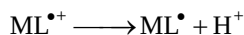
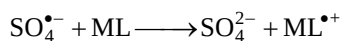


图5 褪黑激素自由基在 330 nm 处的表观生成速率常数 k_{obs} 对褪黑激素的浓度作图





运用差谱技术扣除 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 在此处的吸收, 得到 $\text{ML}^{\bullet}$ 在 330 nm 处的生长曲线, 以 330 nm 处测得的表观生成速率常数对 ML 的浓度作图(图 5)可求出 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 氧化 ML 的反应速率常数为 $8.0 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

2.3 与核黄素三重态 $^3\text{RF}^*$ 的反应

核黄素(Riboflavin, RF)即维生素 B_2 , 是黄素辅酶的主要活性基团, 广泛分布在人体组织器官中, 是一种重要的内源性光敏化剂。它吸收光子后可产生激发三重态, 损伤蛋白质或DNA。本工作研究了ML猝灭核黄素三重态($^3\text{RF}^*$)的能力。 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RF中性水溶液通 N_2 20 min后, 被 355 nm激光激发所得的瞬态吸收光谱与报道的核黄素的激光光解谱图一致^[17]。

图 6 是 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RF 和 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ML 的中性水溶液在 355 nm 激光作用后于 0.1 和 1 μs 观察到的瞬态吸收谱, 在 330 和 550 nm 处的吸收有很明显的增长, 不加 ML 的 RF 溶液在此处的吸收只发生衰减(见图 6 中插图(a)), 此外, 改变 ML 的浓度, 发现 $^3\text{RF}^*$ 的衰减随着 ML 浓度的增大而加快, 由于有吸收重叠, 利用差谱方法得到 $\text{ML}^{\bullet}$ 在 330 nm 处的生长过程, 此生长过程与 RF 激发三重态在 680 nm 处的衰减同步, 这些结果说明 ML 与 $^3\text{RF}^*$ 反应生成了 $\text{ML}^{\bullet}$ 。为避免 $\text{ML}^{\bullet}$ 的影响, 选择 $^3\text{RF}^*$ 在 680 nm 的表观衰减速率常数对 ML 的浓度作图得一直线(见图 6 中插图(b)), 由直线的斜率可求出 ML 猝灭 $^3\text{RF}^*$ 的反应速率常数为 $1.4 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 这说明体内的 ML 能有效地猝灭 $^3\text{RF}^*$, 从而减少其对蛋白质或 DNA 的损伤。

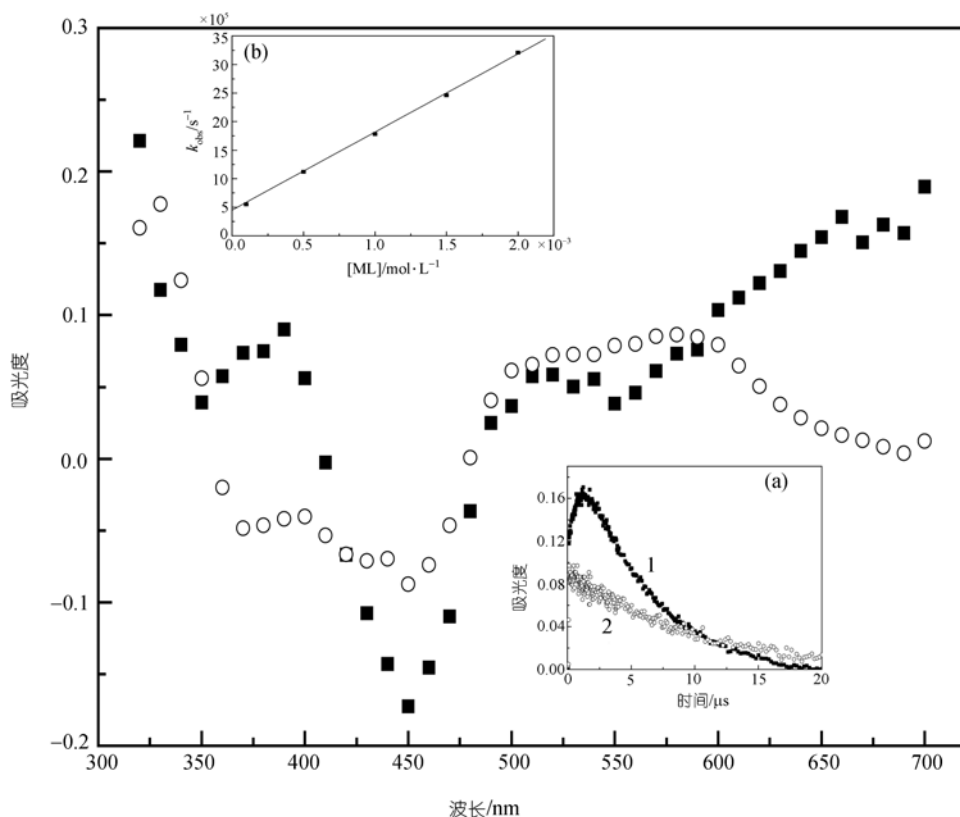


图 6 氮气饱和下 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 核黄素和 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 褪黑激素水溶液经 355 nm 激光光解后在 0.1 μs (■)和 1 μs (○) 分别测得的瞬态吸收谱

插图: (a) 在 330 nm 观察到的时间分辨吸收曲线: 1. 含有 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 褪黑激素; 2. 无褪黑激素; (b) 核黄素激发三重态在 680 nm 处的表观衰减速率常数 k_{obs} 与褪黑激素浓度的关系

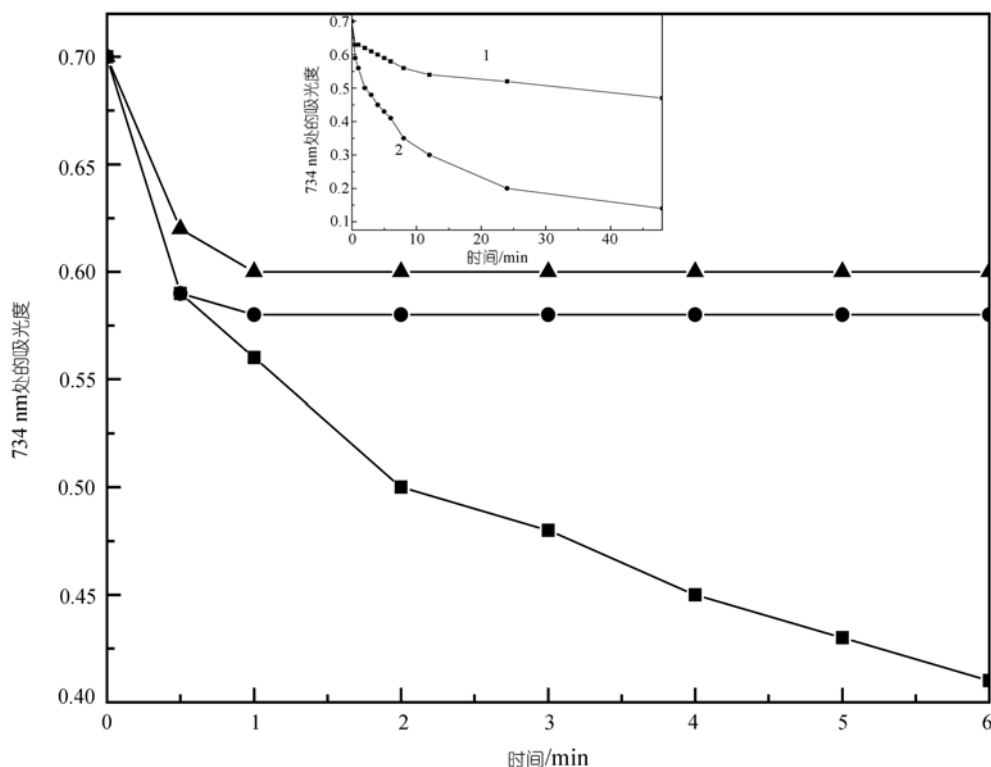


图 7 ABTS^{•+}在 734 nm 处的吸收与时间的关系

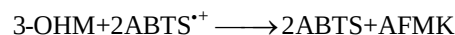
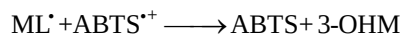
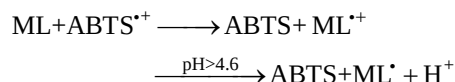
■, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ML; ●, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vc; ▲, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Trolox C. 插图: ML 与 ABTS^{•+}的反应 1, 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ML; 2, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ML

2.4 抗氧化性比较

抗氧化剂的抗氧化能力可以用很多种方法进行测量, 其中 TEAC(trolox equivalent antioxidant capacity)法使用最为广泛, 它是用 2,2-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS) 经反应产生 ABTS^{•+}, 溶液呈现稳定的蓝绿色, 在 734 nm 处有特征吸收. 抗氧化剂加入后能清除 ABTS^{•+}从而使溶液的颜色消褪, 测定 734 nm 处的吸光度变化, 可以判断抗氧化剂的总抗氧化能力(包括抗氧化剂反应后的产物).

本实验采用 Re 等人的方法制备 ABTS^{•+}^[18], 即 ABTS 溶液与过硫酸钾溶液混合至终浓度分别为 7×10^{-3} 和 $2.45 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在暗处室温下反应 16 h. 得到的 ABTS^{•+}溶液用磷酸缓冲溶液(pH 7.4)稀释到在 734 nm 处的吸光度为 $0.70 (\pm 0.02)$. 分别加入维生素 C(Vc), Trolox C 和 ML 至最终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 于加入后半分钟开始每隔一定时间测量

734 nm 处的吸光度. 用 734 nm 处的吸光度对时间作图, 得到图 7. 由实验结果可知, Vc 和 Trolox C 与 ABTS^{•+}的反应在 1 min 便基本结束, 而 ML 清除 ABTS^{•+}可持续到 48 min 以上(见图 7 插图). ML 清除 ABTS^{•+}的速度和量都明显强于 Vc 和 Trolox C. 这是由于 ML 与 ABTS^{•+}逐步反应的结果: 1 个 ML 分子可通过以下机理清除 4 个 ABTS^{•+}^[19].



Tan 小组的研究表明 N¹-乙酰基-N²-甲酰基-5-甲氧基犬尿氨酸(AFMK)也是一种很强的自由基清除剂, AFMK 通过提供电子给氧化剂从而保护 DNA 和脂类^[20]. 因此, ML 是体内一种强有力的抗氧化剂. 在体内 ML 可能与其它内源性抗氧化剂协同作用, ML 能提

高老鼠电离辐射后的存活率可能与它的这种性质有关。

3 结论

利用激光光解时间分辨技术,研究了褪黑激素的光物理和光化学性质。在 266 nm 激光作用下,褪黑激素既可产生激发三重态,又可光电离生成自由基。ML 能与氧化性自由基发生电子转移反应,也能有效猝灭核黄素激发三重态,它的抗氧化能力强于 Vc 和 Trolox C。为了全面弄清 ML 的防治疾病和防辐射机理,我们将对 ML 的抗氧化性进行进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Finkel T, Holbrook N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000, 408: 239~247[DOI]
- 2 Levine R L, Stadtman E R. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol*, 2001, 36(9): 1495~1502[DOI]
- 3 Linetsky M, Ranson N, Ortwerth B J. The aggregation in human lens proteins blocks the scavenging of UVA-generated singlet oxygen by ascorbic acid and glutathione. *Arch of Bioche Biophys*, 1998, 351(2): 180~188[DOI]
- 4 赵晨阳, 石益民, 王文锋, 姚思德, 范波涛, 郑荣梁. 芦丁、槲皮素快速修复嘌呤脱氧核苷酸阳离子自由基. *中国科学, C辑*, 2001, 31(6): 550~556[摘要][PDF]
- 5 Filipe P, Morlière P, Patterson L K, Hug G L, Mazière J C, Mazière C, Freitas J P, Fernandes A, Santus R. Mechanisms of flavonoid repair reactions with amino acid radicals in models of biological systems: a pulse radiolysis study in micelles and human serum albumin. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1572(1): 150~162
- 6 Temple N J. Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutr Res*, 2000, 20(3): 449~459[DOI]
- 7 Pelaez A M, Poeggeler B, Reiter R J, Walden L B, Pablos M I, Tan D X. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem*, 1993, 53(4): 373~382[DOI]
- 8 Rodriguez C, Mayo J C, Sainz R M, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter R J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, 2004, 36(1): 1~9[DOI]
- 9 Reiter R J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Progress in Neurobiology*, 1998, 56(3): 359~384[DOI]
- 10 Castroviejo D A, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter R J. Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *J Pineal Res*, 2001, 30(2): 65~74[DOI]
- 11 Roberts J E, Hu D N, Martinez L, Chignell C F. Photophysical studies on melatonin and its receptor agonists. *J Pineal Res*, 2000, 29(2): 94~99[DOI]
- 12 Maharaj D S, Molell H, Antunes E M, Maharaj H, Maree D M, Nyokong T, Glass B D, Daya S. Melatonin generates singlet oxygen on laser irradiation but acts as a quencher when irradiated by lamp photolysis. *J Pineal Res*, 2005, 38(3): 153~156[DOI]
- 13 Mahal H S, Sharma H S, Mukherjee T. Antioxidant properties of melatonin: a pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(5-6): 557~565[DOI]
- 14 Tan D X, Manchester L C, Reiter R J, Plummer B F. Cyclic 3-hydroxymelatonin: a melatonin metabolite generated as a result of hydroxyl radical scavenging. *Biol Signals Recept*, 1999, 8(1-2): 70~74[DOI]
- 15 Zang L Y, Cosma G, Gardner H, Vallyathan V. Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1425(3): 469~477
- 16 Jian L, Wang W F, Zhang Z D, Yao S D, Zhang J S, Lin N Y. Reactive intermediates in laser photolysis of guanosine. *Res Chem Intermed*, 1991, 15: 293~301
- 17 陆长元, 韩镇辉, 蔡喜臣, 陈雨玲, 姚思德. 核黄素(维生素B₂)的光物理和光化学性质. *中国科学, B辑*, 2000, 30(5): 428~435[摘要][PDF]
- 18 Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(9-10): 1231~1237[DOI]
- 19 Tan D X, Hardeland R, Manchester L C, Poeggeler B, Lopez-Burillo S, Mayo J C, Sainz R M, Reiter R J. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res*, 2003, 34(4): 249~259
- 20 Tan D X, Manchester L C, Burkhardt S, Sainz R M, Mayo J C, Kohen R, Shohami E, Huo Y S, Hardeland R, Reiter R J. N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *The FASEB Journal*, 2001, 15(12): 2294~2296