

高能质子辐射作用的分子机理*

——DNA 空间结构微观损伤的 Raman 光谱特征

许以明 张志义 赵克俭 张仲纶 刘成祥
王大辉 徐国瑞 郑雁珍

(中国科学院生物物理研究所, 北京100080)

摘 要

高能质子是空间辐射的重要类型。本文用激光 Raman 光谱技术, 研究了高能质子(27.9 MeV)对水溶液中 DNA 辐射作用的分子机理。通过解析其特征 Raman 谱线, 获得 DNA 空间结构微观损伤的以下信息:(1)维系双螺旋结构的碱基间氢键部分断裂; (2)4 种碱基均被损伤, 其中腺嘌呤环的破坏最重; (3)脱氧核糖发生了明显的变化; (4)骨架磷酸离子(PO_2^-)和磷酸二酯(PO_2)的损伤严重, 并出现单、双链的断裂; (5)B 型构象的数量显著减少。

关键词: 高能质子, 空间辐射, DNA, 空间结构, Raman 光谱

空间辐射是人类探索空间所面临的一个危险因素, 并被视为长期载人航天飞行的一大障碍^[1]。因此, 在航天飞行时, 已实施了空间辐射对人体损伤的生物学实验, 并获得某些有价值的结果。但是, 如何对付空间辐射的问题, 至今尚远未解决^[2]。

高能重粒子表征于空间辐射的特征, 并具有主要的潜在危险性^[2, 3], 但是, 高能质子辐射亦应受到重视: 其一, 它占空间辐射通量的 85% 左右^[1], 是空间辐射的主要成分; 其二, 经常发生的太阳耀斑, 又称质子事件, 一旦爆发会释放大量高能质子, 其辐射剂量可高达 10 Gy^[1]。据估算, 在空间, 高能质子和高能重粒子的相对生物效应值各占 40% 左右。因而, 研究高能质子生物效应, 对揭示空间辐射对人体损伤的生物学特征, 显然也具有重要的意义。

辐射对多细胞体的杀伤, 是通过伤害机体细胞实现的, 迄今所知道的各种电离辐射引起的对细胞的主要伤害、致死、突变(包括癌变)以及永久功能缺陷, 都是通过对细胞的遗传物质 DNA 分子的结构损伤引起的。DNA 分子上的“微小”损伤, 如果得不到及时正确的修复, 有可能导致各种严重的后果^[4, 5]。因此, DNA 被公认为辐射作用的要害靶分子, 对 DNA 结构的损伤的研究, 一直是辐射生物效应研究的核心内容^[4, 5]。

鉴于空间辐射等因素的复杂性, 在国际上关于空间辐射生物效应的研究, 已将重点转向地

本文1991年4月22日收到, 1991年8月22日收到修改稿。

* 国家高技术(863)资助项目。

面实验,而后再到空间验证^[2,3]. 目前,限于只有少数几个国家有高能质子加速器,有关高能质子对DNA结构损伤的研究,迄今尚未见报道.

文章论述了以高能质子加速器为辐照源,采用可同时获取DNA空间结构(磷酸骨架,脱氧核糖,碱基、碱基之间氢键和B型构象等)信息变化的激光Raman光谱技术,研究高能质子(27.9 MeV)对水溶液中DNA空间结构的微观损伤特征.

一、材料和方法

1. 材料

(1) 样品制备 小牛胸腺DNA为美国Sigma公司产品. 将该DNA溶于优级纯的二钾砷酸钠(Sodium caoldylate)(0.01 mol/L)和EDTA(0.01 mol/L)的缓冲液,pH为7.0. 浓度为4%. 样品置于内径为10 mm的聚乙烯塑料管中并经高能质子照射后,转移至3 mm内径的石英管中测试其Raman光谱.

(2) 照射条件 高能质子照射源为中国科学院高能物理所的高能质子加速器. 该加速器能产生35 MeV的质子流. 为获得合适的照射剂量,降低束流强度,在出束靶的正前方加了厚度为2.25 mm的铝吸收板,使质子能量减少至27.9 MeV. 照射剂量用丙氨酸/ESR计量计测定,对DNA样品的辐射剂量分别为14.6 Gy, 2.98 和4.83 kGy.

2. 激光Raman光谱测定

测试在法国JY-T800型Raman光谱仪上进行. 美国NIC-1180计算机进行控制和数据处理. 激光器为美国光谱物理公司所生产的164型氩离子激光器. 激发线波长514.5 nm, 激光功率160 mW. 3个单色器的4个狭缝宽度分别为600, 700, 700, 600 μm. 扫描范围400—1750 cm⁻¹. 扫描速度1.2 cm⁻¹/s. 光子计数,时间常数1s(3K, 1.3). 信号平均3次扫描. 室温19±2 °C.

二、结果和讨论

天然小牛胸腺DNA及不同剂量的高能质子对小牛胸腺DNA损伤的Raman光谱分别示于图1, 2, 3, 4. 有关的喇曼特征频率和指定列于表1. 小牛胸腺DNA的指定来自文献[6—8]. A, G, C, T分别表明碱基腺嘌呤、鸟嘌呤,胞嘧啶和胸腺嘧啶的振动特征. 在表中按照它们对该谱线的贡献大小排列. A1, A2, A3分别为被剂量14.6 Gy, 2.98 kGy和4.83 kGy的高能质子照射的DNA. 缓冲液的Raman光谱表明除水峰以外仅有一根谱线,它在604 cm⁻¹, 指定为二钾砷酸钠. 它的强度和位置不因辐射作用而变化. 因此,可作为内标,据此相对确定DNA的谱线强度^[8].

为了研究受不同剂量的高能质子辐射的DNA损伤的程度,我们计算了DNA各基团的谱线强度的变化率. 高能质子对小牛胸腺DNA的骨架磷酸基团PO₂⁻, PO₂和B型构象损伤的Raman谱线强度的变化率列于表2. 计算Raman谱线强度的变化率的公式如下:

$$\Delta I_n = \frac{I_n - I_0}{I_0} \% .$$

式中I₀: 谱线在天然DNA图谱中的强度.

I_n: 谱线在辐射后的DNA图谱中的强度.

由于喇曼谱线的强度与散射中心的数目成正比^[9]. 因此,当谱线强度降低时则意味着其散射中心(包括基团和化学键)数目的减少. 本工作的结果表明当高能质子的剂量从14.6 Gy

表1 高能质子对小牛胸腺DNA损伤的激光 Raman 光谱 ($400\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$)

频 率 (cm^{-1})				指 定 **	频 率 (cm^{-1})				指 定 **
DNA	A1*	A2*	A3*		1218	1216	1215	1211	T
676	676	678	668	T	1227	1227	1225		A
682	684	685	686	G	1242	1240	1240	1236	T
728	727	727	726	A	1256	1253	1253	1253	C, A
749	746	746	746	T	1304	1305	1301	1299	A
785	786	788	790	O—P—O 对称伸张	1338	1341	1341	1336	A
831	834	830	832	B型构象	1373	1373	1373	1370	T, A, G
934	933	933	928	脱氧核糖	1420	1420	1420	1422	A, G
956	968	964	964	脱氧核糖	1445	1448	1439	1440	脱氧核糖
1001	1001	1002	1000	脱氧核糖	1463	1462	1455	1458	脱氧核糖
1017	1014	1015	1016	C—O 伸张	1487	1489	1489	1484	G, A
1050	1049	1050	1050	C—O 伸张	1505	1505	1505	1513	A
1094	1094	1089	1088	O=P=O 对称伸张	1522	1522	1526	1530	A
1119	1119	1119	1126		1540	1540	1540	1536	G, C
1146	1155	1153	1151	脱氧核糖—磷酸	1576	1577	1577	1575	G, A
1184	1183	1183	1180	碱基外 C—N 伸张	1660	1662	1652	1650	C=O 伸张

* A1, A2, A3 分别为被剂量 14.6 Gy , 2.98 kGy 和 4.83 kGy 的高能质子照射的 DNA.

** A, G, C, T 分别表明碱基腺嘌呤, 鸟嘌呤, 胞嘧啶和胸腺嘧啶的振动特征. 在表中按照它们对该谱线的贡献大小排列.

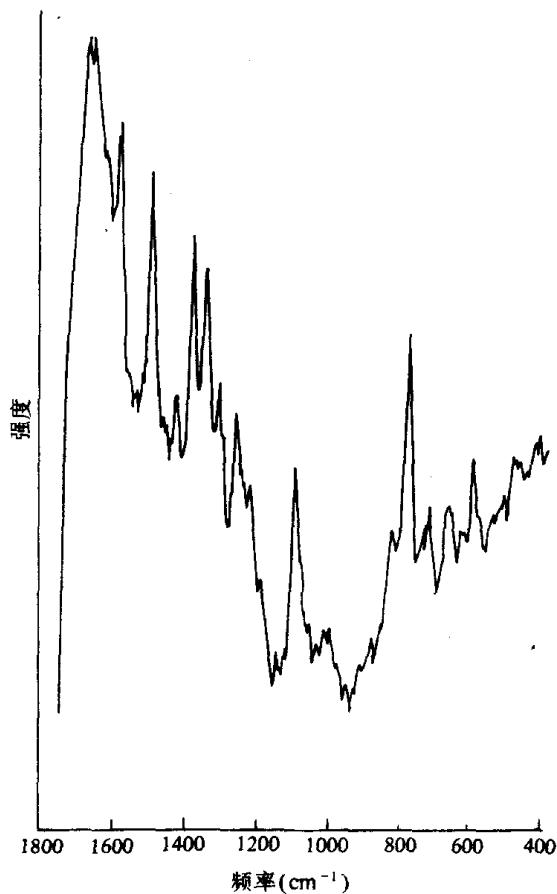


图1 天然小牛胸腺DNA(4%)的Raman光谱($400\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$)

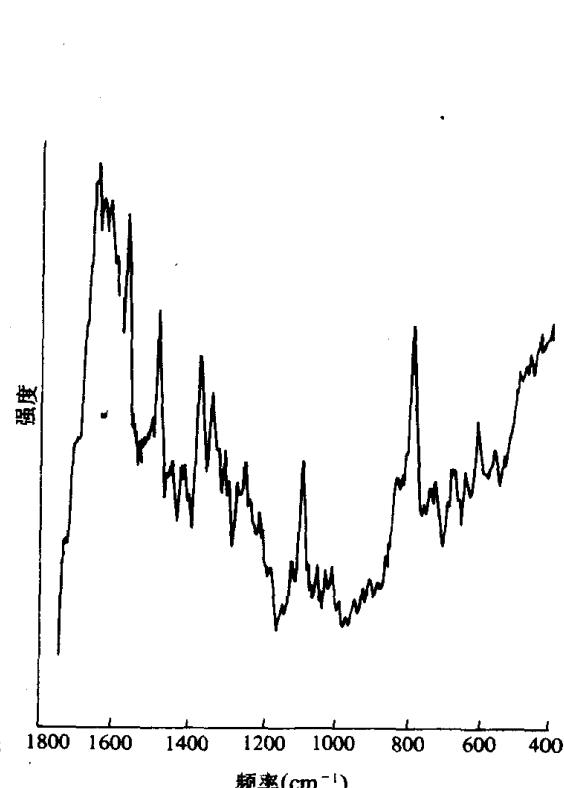


图2 14.6 Gy 的高能质子损伤小牛胸腺 DNA(4%) 的 Raman 光谱 ($400\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$)

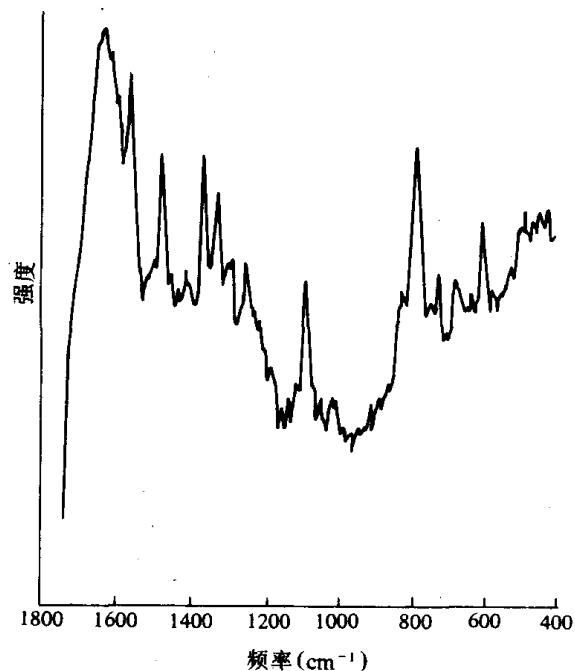


图 3 2.98 kGy 的高能质子损伤的小牛胸腺 DNA(4%) 的 Raman 光谱($400\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$)

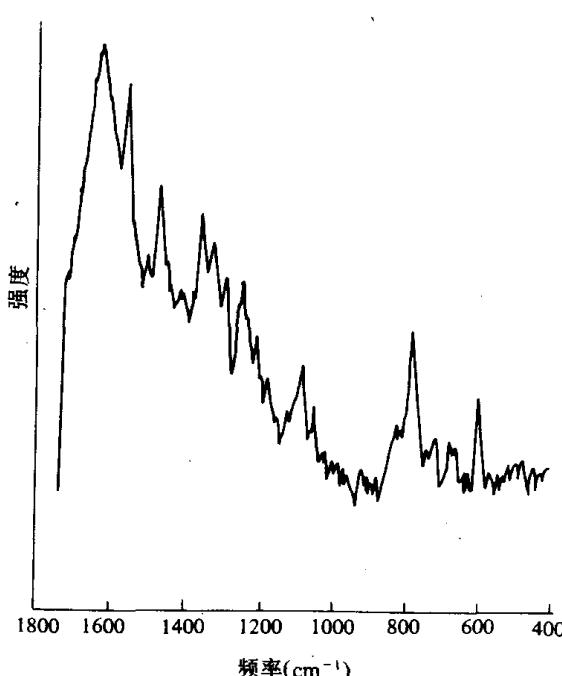


图4 4.83 kGy 的高能质子损伤小牛胸腺 DNA(4%) 的 Raman 光谱($400\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$)

增至 4.83 kGy 时小牛胸腺 DNA 的变化从最初的垂直的碱基堆积相互作用受到破坏, 直至发展到单、双链的断裂。变化十分明显, 现分别叙述如下:

1. 当高能质子的剂量为 14.6 Gy 时被照 DNA 的损伤轻微, 如图 2 所示。

(1) 其属于骨架磷酸离子(PO_2^-)、磷酸二酯(PO_2)、B 型构象和碱基间氢键的 4 个谱线的位置和强度几乎无变化(表 2)。

(2) 部分脱氧核糖的谱线, 例如在 1155 cm^{-1} 指定为磷酸 - 脱氧核糖的谱线和脱氧核糖在 1462 cm^{-1} 的谱线, 强度下降比较明显, 其它则无变化。

(3) 属于碱基各基团的谱线强度的变化比较多样。有的增高, 有的下降, 有的则无变化。例如在 1505 cm^{-1} 和 1522 cm^{-1} 指定为腺嘌呤环, 在 1540 cm^{-1} 指定为鸟嘌呤、胞嘧啶环以及在 1577 cm^{-1} 指定为鸟嘌呤、腺嘌呤环的 $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{N}$ 伸张振动的谱线强度的变化率均为正值, 表明发生了增色效应。这是由于高能质子辐射损坏垂直的碱基 - 碱基堆积相互作用的结果^[10]。指定为胸腺嘧啶环的伸张振动在 676 和 746 cm^{-1} 的谱线以及指定为鸟嘌呤环在 684 cm^{-1} 的谱线强度无变化。其它 11 根谱线强度的变化率为 -7% 至 -29% , 说明与该谱线有关的碱基, 有不同程度的损伤。

2. 当高能质子的剂量达 2.98 kGy 时, 对 DNA 的损伤增强, 如图 3 所示。

(1) 指定为骨架磷酸离子(PO_2^-)对称伸张振动的谱线向低波数位移了 5 cm^{-1} , 它在 1089 cm^{-1} , 其强度的减少率为 29% 。指定为磷酸二酯(PO_2)对称伸张振动的谱线从 785 cm^{-1} 位移到 788 cm^{-1} , 其强度的减少率为 30% 。由此可知, 它有单、双链的断裂^[11]。指定为 B 型构象在 830 cm^{-1} 的谱线^[7]强度的减少率为 28% , B 型构象的减少是明显的。指定为包括碱基间氢键在内的胸腺嘧啶环($\text{C}=\text{O}$)的伸张振动在 1660 cm^{-1} 的谱线位移到 1652 cm^{-1} , 其强度的减少率为 13% , 说明该 DNA 有氢键的断裂^[8, 11]。部分 B 型 DNA 变成无规卷曲的 DNA。因此在

表 2 高能质子对小牛胸腺 DNA 的骨架磷酸基团 PO_2^- , PO_2 和 B 型构象损伤的 Raman 谱线强度的变化率

样 品 *	辐照剂量		谱线的指定		
			PO_2^-	PO_2	B 型构象
A1	14.6 Gy	谱线频率 (cm^{-1})	1094	786	834
		强度变化率 (%)	-3.6	0	-4
A2	2.98 kGy	谱线频率 (cm^{-1})	1089	788	830
		强度变化率 (%)	-29	-30	-28
A3	4.83 kGy	谱线频率 (cm^{-1})	1088	790	832
		强度变化率 (%)	-55	-44	-42

* A1, A2, A3 为小牛胸腺 DNA 分别被剂量为 14.6 Gy, 2.98 kGy, 4.83 kGy 的高能质子照射的样品.

样品 A2 中比天然的小牛胸腺 DNA 短的 B 型 DNA 与单链 DNA 及多核苷酸共存(表 2).

(2) 该 DNA 脱氧核糖的变化也很明显, 指定为 C—O 伸张振动在 1015 和 1050 cm^{-1} 的谱线强度的减少率分别为 29% 和 34%. 指定为磷酸 - 脱氧核糖在 1153 cm^{-1} 的谱线强度的减少率为 42%. 其脱氧核糖在 1439 和 1455 cm^{-1} 的谱线强度下降也很明显.

(3) 样品 A2 碱基的 18 根谱线强度的变化率都是负值, 有的还相当大. 例如指定为腺嘌呤环的伸张振动在 1301 和 1341 cm^{-1} 的谱线强度的减少率分别为 46% 和 41%. 指定为胸腺嘧啶环的伸张振动在 1215 cm^{-1} 和 1240 cm^{-1} 的谱线强度的减少率分别为 42% 和 45%. 指定为鸟嘌呤和腺嘌呤环的伸张振动在 1489 cm^{-1} 的谱线强度的减少率为 43%. 在样品 A2 中属于碱基的各个谱线, 其强度的减少率在 30% 以上的有 11 根. 由此可见 DNA 的损伤比较严重.

3. 当高能质子的剂量高达 4.83 kGy 时, 被照 DNA 的损伤更加严重, 如图 4 所示.

(1) 指定为骨架磷酸离子(PO_2^-)对称伸张振动的谱线已位移到 1088 cm^{-1} , 并且强度的减少率达 55%, 其半高宽度为 27 cm^{-1} 比天然小牛胸腺DNA 增加了 7 cm^{-1} . 指定为磷酸二酯(PO_2)对称伸张振动的谱线位移到了 790 cm^{-1} , 向高波数位移了 5 cm^{-1} 并且强度的减少率为 44%. 指定为 B 型在 832 cm^{-1} 的谱线的减少率为 42%. 同时指定为包括碱基间氢键在内的胸腺嘧啶羰基($\text{C}=\text{O}$)的伸张振动谱线在 1650 cm^{-1} , 其向低波数位移了 10 cm^{-1} , 且其强度的减少率为 27%.

(2) 指定为脱氧核糖 C—O 伸张振动在 1016 cm^{-1} 和 1050 cm^{-1} 的谱线强度的减少率分别为 54% 和 42%. 指定为磷酸 - 脱氧核糖在 1151 cm^{-1} 的谱线及脱氧核糖在 1440 cm^{-1} 及 1458 cm^{-1} 的谱线下降也很明显.

(3) 指定为腺嘌呤环在 726 , 1336 和 1299 cm^{-1} 的谱线减少率高达 52%, 57% 和 44%, 而且后者向低波数位移了 5 cm^{-1} . 指定为鸟、腺嘌呤和胸腺嘧啶环的伸张振动在 1370 cm^{-1} 的谱线强度的减少率为 50%, 指定为腺嘌呤、鸟嘌呤环在 1422 cm^{-1} 和鸟、腺嘌呤环在 1484 cm^{-1} 的谱线强度的减少率分别为 52% 和 53%, 还有在 1211 和 1236 cm^{-1} 指定为胸腺嘧啶环和 1253 cm^{-1} 指定为胞嘧啶和腺嘌呤环的伸张振动谱线的强度减少率分别为 42% 和 40%. 在样品 A3 的 Raman 光谱中指定为碱基的各个基团的 18 根谱线强度减少率达 39% 以上的有 9 根. 因此, 样品 A3 空间结构微观损伤的 Raman 光谱特征与样品 A2 相同, 但损伤的程度却明显超过 A2.

综上所述, 随着高能质子辐射剂量的增加, 被照小牛胸腺 DNA 的骨架磷酸基团(PO_2^- 和 PO_2)和 B 型构象减少, 碱基之间部分的氢键断裂并且存在着单、双链的断裂, 构成了生物学

上重要的损伤^[5]。与此同时碱基和脱氧核糖的损伤也很严重,其中损伤最严重的是腺嘌呤环,其次是鸟嘌呤和胸腺嘧啶环。以样品 A3 为例,强度减少率在 40—57% 的 6 条谱线,都起因于腺嘌呤环和鸟嘌呤、腺嘌呤环的伸张振动。这样,均匀的小牛胸腺 DNA 分子已变成混合的、不均匀的分子,其含有比天然小牛胸腺 DNA 短的 B 型 DNA,单链 DNA 和多核苷酸。有的 DNA 还可能缺少某种碱基或脱氧核糖。因此,激光 Raman 光谱,为受高能质子辐射的 DNA 分子的空间结构微观损伤提供了直接的证据。实践证明,用 Raman 谱线的强度变化率,来衡量受照 DNA 分子各个基团损伤的程度是比较准确的。这样我们不仅可以比较受不同剂量的高能质子辐射的 DNA 损伤的程度,还可以比较 DNA 各基团,在同样条件下(包括辐射剂量、温度和 pH 值等)损伤的程度。

上述 DNA 的变化一般是由于它受到了辐射的直接作用——能量从辐射传递到 DNA,和间接作用——受损伤的 DNA 分子邻近的辐射所产生的自由基的化学作用^[12—13]。在这些作用下会引起 DNA 分子一系列的化学变化,诸如脱氨基作用,脱羟基作用,碱基—糖键的断裂,糖的氧化或磷酸酯的释放等。这会导致 DNA 各基团的 Raman 特征频率和强度的改变。

参 考 文 献

- [1] 阿蒂克斯, F. H. & 托契林, E., 辐射剂量学, 原子能出版社, 北京, 1981, 503—512.
- [2] Hagen, U., *Adv. Space. Res.*, 9(1989), 10: 3—8.
- [3] Worgue, B. V. et al., *Adv. Space. Res.*, 9(1989), 10: 315—323.
- [4] 德廷格, H. & 容克, H., 分子放射生物学, 科学出版社, 北京, 1975, 158—172.
- [5] 查德威克, K. H. & 莱恩豪特, H. P., 放射分子生物学理论, 原子能出版社, 北京, 1987, 24—59, 254—262.
- [6] Bram, E. G. et al., *Infrared and Raman Spectroscopy*, 1 part, 1977, 824.
- [7] Goodwin, D. C. & Brahms, J., *Nucleic Acids Research*, 5(1978), 835.
- [8] Erfurth, S. C. & Petricolas, W. L., *Biopolymer*, 14(1975), 247—264.
- [9] Horst Brunner, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 16(1972), 271.
- [10] Cary, P. R., *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*, A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, New York, 1982, 77.
- [11] 许以明、张志义、徐国瑞, 科学通报, 34(1989), 19: 1500—1504.
- [12] Zhang Zhiyi et al., *Scientia Sinica (Series B)*, 29(1986), 1164—1176.
- [13] Shen Peigen et al., *ibid.*, 30(1987), 599—606.
- [14] Zhang Zhiyi et al., *Radiation Research*, 93(1983), 213—231.
- [15] Lkuwabara, M. et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, 41(1982), 241—259.