

羟基自由基引起的脱氧核糖核酸损伤研究

王晓星¹ 方艳芬¹ 杨 静¹ 陈登霞¹ 黄应平^{* 1} 张爱清²

¹(三峡库区生态环境教育部工程研究中心(三峡大学), 宜昌 443002)

²(中南民族大学催化材料科学湖北省重点实验室, 武汉 430074)

摘 要 以鲱鱼精脱氧核糖核酸(Herring sperm DNA) 为研究对象,利用紫外光(UV, 200 ~ 275 nm, 66.4 Lx) 激发纳米 TiO₂ 发生光催化作用介导产生羟基自由基(Hydroxyl radical, ·OH),探讨 ·OH 引发 DNA 氧化损伤特性。采用凝胶电泳和高效液相色谱(HPLC) 分析法跟踪 DNA 损伤历程;应用电子自旋共振(Electron spin resonance, ESR) 及分光光度法跟踪损伤过程氧化物种及 H₂O₂ 相对浓度的变化;运用生物标准样 8-羟基脱氧鸟苷(8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG) 为内标物,通过 HPLC 分析 DNA 损伤产物,研究 DNA 损伤机理。结果表明,较单纯 UV 辐照或暗光(Dark) 催化条件, DNA 浓度 10 mg/L, TiO₂ 浓度 1.5 g/L、pH 7 ~ 8,紫外光激发纳米 TiO₂ 介导产生 ·OH 引发 DNA 损伤程度最大; DNA 损伤为 ·OH 氧化历程,并伴随有深度氧化过程; DNA 结构中鸟嘌呤最易氧化损伤,8-OHdG 为 DNA 氧化损伤中间产物及鸟嘌呤氧化损伤的特异产物。

关键词 脱氧核糖核酸损伤; 羟基自由基; 光催化; 8-羟基脱氧鸟苷

1 引 言

脱氧核糖核酸(DNA) 是所有生物的遗传物质基础,能调控生物的发育和生命机能的运作^[1]。环境中多种因素如辐射、温度、重金属诱导 DNA 损伤^[2]。生物体中自由基参与许多重要的生命过程,自由基过多会使有机体发生损伤,主要表现在 ·OH 导致 DNA 的碱基和脱氧核糖发生化学变化,引起碱基改变、破坏或脱落及脱氧核糖分解等^[3]。目前对自由基导致 DNA 损伤的研究主要从延伸辐射产生介导自由基、自由基的种类引发 DNA 损伤^[4,5] 及 DNA 损伤过程其结构变化几个方面展开探讨^[6],而从光照激发光催化作用介导产生 ·OH 导致 DNA 损伤机理的研究尚未见报道。

本研究以鲱鱼精 DNA(Herring sperm DNA) 为研究对象,利用紫外光(UV, 200 ~ 275 nm, 66.4 Lx) 激发 TiO₂ 发生光催化反应介导产生 ·OH,研究 ·OH 与 DNA 相互作用机理,重点通过凝胶电泳和 HPLC 检测 DNA 损伤程度,采用电子自旋共振(Electron spin resonance, ESR) 及分光光度法跟踪损伤过程氧化物种及 H₂O₂ 相对浓度的变化,同时以生物标准样 8-羟基脱氧鸟苷(8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG) 为内标物,探究 ·OH 攻击 DNA 结构损伤位点,进一步明确 ·OH 引起 DNA 氧化损伤机理。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

600E-SOLVENT 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); ESP300E 波谱仪(德国 Bruker 公司); GE-100 凝胶电泳仪(北京市六一仪器厂)。

10.0 mg/L 鲱鱼精 DNA 水溶液; 10.0 mg/L 8-OHdG 溶液; 0.4 mol/L 5,5-二甲基-4-吡咯啉-N-氧化物(5,5-Dimethyl-4-pyrroline-N-oxide, DMPO) 溶液; 1.0 g/L 辣根过氧化物酶(Peroxidase horseradish, POD) 溶液; 10.0 g/L N,N-二乙基对苯二胺(N,N-Diethyl-p-phenylenediamine, DPD) 溶液; 甲醇为色谱级。

2.2 实验方法

在圆柱型硬质石英瓶中加入 10 mg/L 鲱鱼精 DNA 及 1.0 g/L TiO₂,放置暗处搅拌 4 h,使 DNA 在催

2010-11-13 收稿; 2011-01-07 接受

本文系国家自然科学基金(Nos. 20877048, 50979049)、湖北省自然科学基金青年杰出人才基金(No. 5ABB030) 及中南民族大学催化材料重点实验室开放课题(No. cdxh110007) 资助项目

* E-mail: chem_ctgu@126.com

化剂表面吸附平衡,计时引入紫外光,间时取样分析,以 Dark/ TiO_2 和单纯 UV 为对照。在相同实验条件下,调节不同底物 pH 及 TiO_2 浓度,分析光催化损伤 DNA 的影响因素。电泳分析: 1% 正常熔点的琼脂糖凝胶,电压 101 V,电流 80 mA,电泳时间 30 min^[7]。琼脂糖凝胶在 302 nm 利用凝胶成像系统进行分析。HPLC 分析: Kromasil C_{18} 色谱柱(200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.05% 醋酸钠(10: 90, V/V) 溶液,流速 0.5 mL/min,检测波长 260 nm^[8-11]。以 DMPO 为自旋捕获剂,捕获自由基生成 DMPO $\cdot\text{OH}$ 加合物^[12],利用 ESR 分析 DNA 损伤过程 $\cdot\text{OH}$ 相对浓度变化。利用 DPD 法分析 DNA 损伤过程 H_2O_2 相对浓度变化。间时取样 1 mL 加入到已装好 H_2O_2 测定液(30 μL POD, 1 mL pH 6.8 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$, 150 mL DPD) 的比色管中,定容,静置 10 min,离心,取上清液在 510 nm 处进行检测。参照 HJ/T 399-2007,测定 DNA 损伤过程化学需氧量(Chemical oxygen demand, COD) 的变化。

3 结果与讨论

3.1 DNA 损伤的电泳分析

电泳图谱中 DNA 超螺旋(SC)、线性(L)和开环(OC) 3 种形态分布可衡量 DNA 损伤程度。采用凝胶电泳检测 DNA 损伤程度,结果见图 1。随着光催化辐照时间的延长,DNA 片段减少,DNA 氧化损伤程度增加,尤其 UV/ TiO_2 辐照 DNA 时长 180 min 时(泳道 1),SC DNA 已不存在,且未见 L DNA 及 OC DNA 形态,DNA 完全损伤。

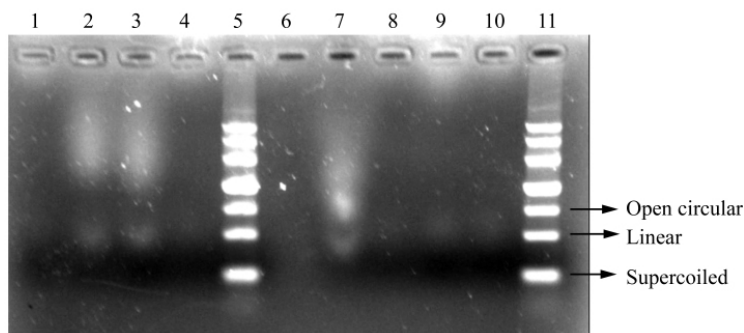


图1 脱氧核糖核酸损伤的凝胶电泳图像

Fig.1 Gel electrophoresis image of deoxyribonucleic acid (DNA) damage

泳道(Lane) 1, 2, 3, 7: UV/ TiO_2 180, 120, 100, 60 min; 泳道(Lane) 5: 11. DNA-Marker III; 泳道(Lane) 4, 8: UV 100, 60 min; 泳道(Lane) 9, 10: Dark/ TiO_2 60, 100 min; 泳道(Lane) 6: None。

利用 HPLC-紫外检测器间时取样分析 DNA 色谱谱图(图 2a)。随着光催化辐照时间的延长,保留时间为 10.4 min 的 DNA 物质峰面积不断减小;辐照时长 40 min 样品的色谱图中出现损伤产物峰(保留时间分别为 12.0 和 20.4 min),随着辐照时间的延长,DNA 损伤产物峰面积呈先增加后减小的过程。以 8-OHdG 为内标物,证明 DNA 损伤中间产物(保留时间为 20.4 min)为 8-OHdG。以 DNA 峰面积及其损伤产物 8-OHdG 峰面积对辐照时长作图,其动力学变化曲线如图 2b 所示。DNA 氧化损伤程度为 UV/ TiO_2 > UV > Dark/ TiO_2 。UV/ TiO_2 体系 DNA 氧化损伤程度最大,辐照 120 min DNA 损伤 99%,生成损伤产物 8-OHdG 浓度最高,其动力学反应常数为 $K = 0.0165 \text{ min}^{-1}$; 8-OHdG 是先生成后消失的物质,是 DNA 氧化损伤的中间产物之一。pH 值对 TiO_2 表面态、界面电位和表面电荷及聚集性均有明显影响^[13],同时 TiO_2 浓度也影响光催化效率(图 3)。从图 3a 可见,pH 值近中性时,光催化导致 DNA 损伤程度最大。由图 3b 可见, TiO_2 浓度为 1.5 g/L 时,辐照时长 30 min DNA 损伤 30%,光催化对 DNA 损伤程度最大。实验表明,DNA 浓度 10 mg/L, TiO_2 浓度 1.5 g/L、pH 7~8 时,光催化反应效率最高,DNA 损伤严重。

3.2 DNA 损伤过程氧化物种及 H_2O_2 相对浓度的分析

跟踪 DNA 氧化损伤过程 H_2O_2 相对浓度的变化(图 4a)。检测紫外光催化体系产生的 $\cdot\text{OH}$ 波谱信号,并比较不同体系产生 $\cdot\text{OH}$ 相对强度变化的曲线(图 4b 和图 4c)。

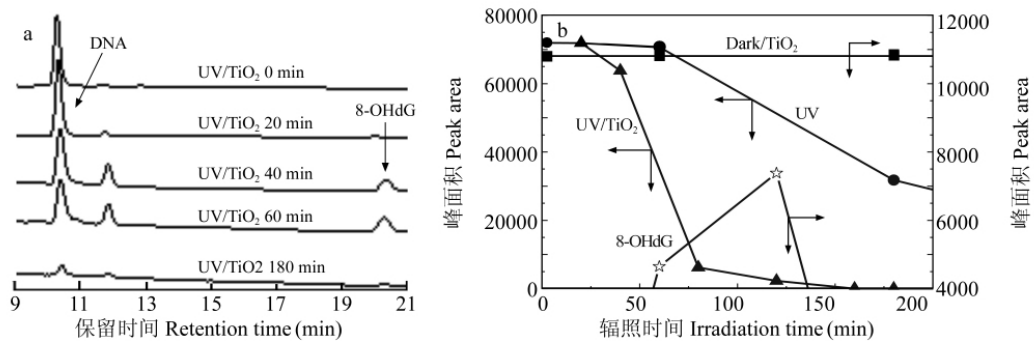


图 2 DNA 损伤过程色谱谱图 (a) 及 DNA 损伤及其损伤产物的动力学曲线 (b)

Fig. 2 HPLC chromatogram of DNA damage (a) and kinetic curves of DNA damage and product (b)

1. 暗光激发 TiO₂ 催化体系 DNA 损伤动力学曲线 (Kinetic curves of DNA damage under Dark/TiO₂) ; 2. 单纯紫外光辐照体系 (Kinetic curves of DNA damage under UV) ; 3. 紫外光激发 TiO₂ 催化体系 (Kinetic curves of DNA damage under UV/TiO₂) ; 4. DNA 损伤产物动力学曲线 (Kinetic curves of DNA damage product) 。

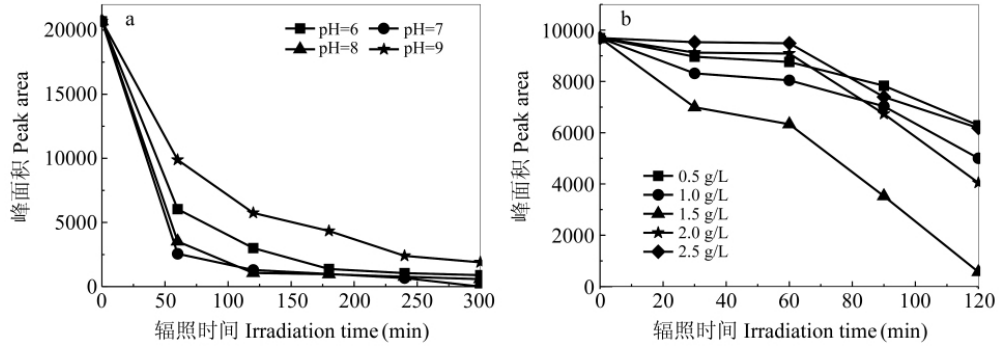


图 3 底物 pH (a) 及 TiO₂ 浓度 (b) 对光催化引发 DNA 氧化损伤的影响

Fig. 3 Effect of pH (a) and TiO₂ concentration (b) on DNA damage

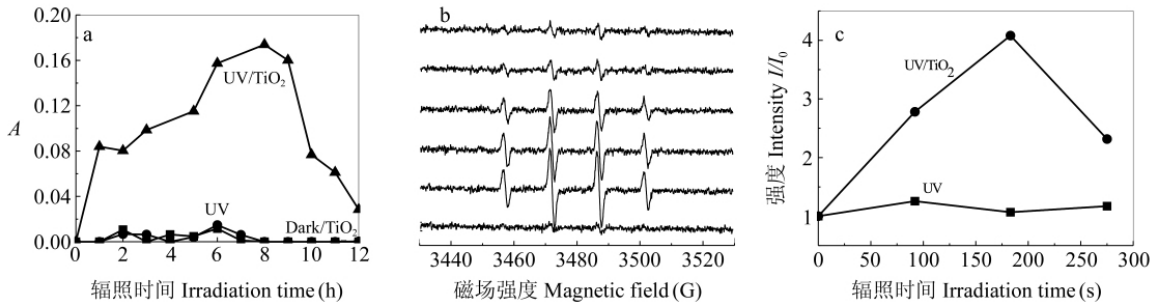


图 4 DNA 氧化损伤过程 H₂O₂ 相对浓度变化 (a) 、UV/TiO₂ 体系 DMPO-·OH 加合物的 ESR 波谱信号 (b) 及不同体系 ·OH 相对强度的比较 (c)

Fig. 4 Change of H₂O₂ concentration (a) , electron spin resonance (ESR) signals of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) -·OH adducts for UV/TiO₂ system (b) and comparison of DMPO-·OH intensity under different systems (c)

由图 4a 可知,UV 和 Dark/TiO₂ 体系不产生 H₂O₂,DNA 无损伤。但体系中引入紫外光并且有催化剂时,紫外光激发 TiO₂ 产生 TiO₂(e⁻), O₂ 捕获光生 e⁻ 产生 ·O₂⁻ 自由基, ·O₂⁻ 自由基与 H⁺ 在光生 e⁻ 作用下生成大量 H₂O₂,反应 8 h 处 H₂O₂ 的浓度最大。伴随辐照时间的延长,H₂O₂ 经紫外光分解或被光生 e⁻ 还原转化为 ·OH^[3]。使用 ESR 检测不同体系产生的 ·OH 波谱信号。UV/TiO₂ 辐照 DNA 的 ESR 谱图有一个四重峰,其强度比为 1: 2: 2: 1,表明有 ·OH 生成(图 4b),同等条件 UV/TiO₂ 催化产生的 DMPO-·OH 加合物的 ESR 信号强度比单纯 UV 体系产生的信号强度强(图 4c),且其特征信号峰强度具有逐渐减弱的趋势。结果表明,UV/TiO₂ 光催化作用介导产生大量的 H₂O₂ 及 ·OH,DNA 氧化

损伤涉及 $\cdot\text{OH}$ 氧化历程。

3.3 跟踪 DNA 深度氧化历程

通过跟踪 DNA 氧化损伤过程化学需氧量(COD)的变化,评价 DNA 氧化损伤(矿化)的程度(图5)。相对于 Dark/ TiO_2 体系而言,UV 和 UV/ TiO_2 体系 DNA 的 COD 值都随着辐照时间的增加而减少。UV/ TiO_2 辐照 12 h DNA 矿化率达 83.37%,DNA 的矿化程度高于单纯 UV 辐照体系。结果表明,DNA 损伤伴随着深度氧化过程,最终氧化为 CO_2 、 H_2O 等小分子无机物。

3.4 羟基自由基引起的 DNA 氧化损伤作用机理

紫外光激发 TiO_2 光催化作用产生具有强氧化能力的 $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OH}$ 诱导 DNA 氧化损伤^[4,13]。鸟嘌呤是 $\cdot\text{OH}$ 攻击 DNA 结构氧化损伤的首要位点^[14], 8-OHdG 是鸟嘌呤氧化损伤的特异产物。DNA 损伤历程: 鸟嘌呤(结构式见图6)自身发生氧化反应,转移一个 H^+ , 转化为鸟嘌呤基团^[17], 该基团不稳定,易与空气中的氧与 H^+ 结合为 $\text{R}-\text{OOH}$, 伴随体系重排反应生成 8-氧脱氧鸟嘌呤(8-OdG)^[18]。紫外光激发 TiO_2 介导产生 $\cdot\text{OH}$ ^[14], 8-OdG 在 $\cdot\text{OH}$ 作用下氧化损伤生成 8-羟基脱氧鸟苷 8-OHdG^[19], 三者的结构式如图6所示。随着光催化反应的进行,中间体 8-OHdG 在强氧化能力的氧化物种 $\cdot\text{OH}$ 作用下深度氧化为 CO_2 、 H_2O 等小分子无机物^[20]。

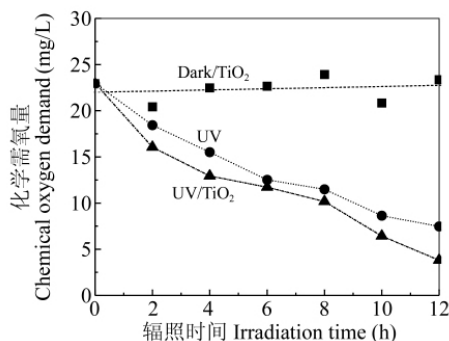


图5 DNA 损伤过程化学需氧量的变化

Fig. 5 Change of chemical oxygen demand in the process of DNA damage

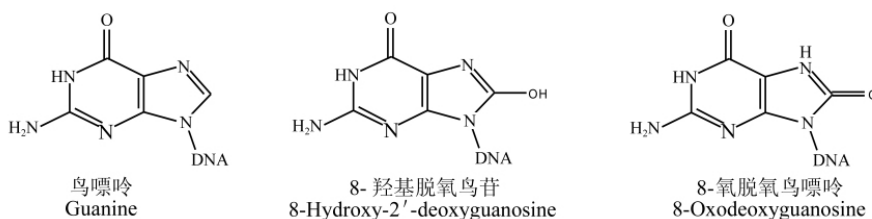


图6 鸟嘌呤及 DNA 损伤产物的结构式

Fig. 6 Structures of guanine and damage products in DNA damage process

References

- Harish Prashanth K V, Dharmesh S M, Jagannatha Rao K S, Tharanathan R N. *Carbohydr. Res.*, **2007**, 342(2): 190 ~ 195
- HONG Fa-Shui, CAI Shu-Ming, LIU Chao, ZHENG Lei, LÜ Shi-Peng(洪法水, 蔡曙明, 刘超, 郑蕾, 吕世鹏). *Spectro. Spectral Anal.* (光谱学与光谱分析), **2005**, 25(3): 424 ~ 427
- LU Yun, AI Shi-Yun, JIANG Lin, LI Jin-Huan, MA Juan(陆云, 艾仕云, 姜林, 李金焕, 马娟). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(9): 1277 ~ 1280
- LIN Jin-Ming, QU Feng, SHAN Xiao-Quan(林金明, 屈锋, 单孝全). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2002**, 30(12): 1507 ~ 1514
- Zhu R R, Wang S L, Chao J, Shi D L, Zhang R, Sun X Y, Yao S D. *Mat. Sci. Eng.: C*, **2009**, 29: 691 ~ 696
- Van Atta R B, Bernadou J, Meunier B, Hecht S M. *Biochem.*, **1990**, 29: 4783 ~ 4789
- Yamaguchi L F, Kato M J, Mascio P D. *Phytochem.*, **2009**, 70: 615 ~ 620
- Parul P R, Bevan R J, Mistry N, Lunec J. *Free Radic. Biol. Med.*, **2007**, 42(4): 552 ~ 558
- Cheng Z, Ke Y, Ding X, Wang F, Wang H, Wang W, Ahmed K, Liu Z, Xu Y, Aikhionbare F, Yan H, Liu J, Xue Y, Yu J, Powell M, Liang S, Wu Q, Reddy S E, Hu R, Huang H, Jin C, Yao X. *Oncogene*, **2008**, 27(7): 931 ~ 941
- Chen L, Zhou M. *J. Mol. Diagnostics*, **2008**, 10(6): 606 ~ 607
- Li X Z, Zhao W, Zhao J C. *Sci. China (Series B)*, **2002**, 45(4): 421 ~ 425
- FANG Yan-Fen, HUANG Ying-Ping, LUO Guang-Fu, LI Rui-ping(方艳芬, 黄应平, 罗光富, 李瑞萍). *Spectroscopy*

Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2008, 28(4): 917 ~ 921

- 13 Yang J, Dai J, Chen C C, Zhao J C. *J. Photochem. Photobiol. A-chem.*, 2009, 208(1): 66 ~ 77
- 14 FANG Yan-Fen, HUANG Ying-Ping, CHEN He-Chun, LUO Guang-Fu, LIU Xiang-Ling, LIU Li-Ming(方艳芬, 黄应平, 陈和春, 罗光富, 刘香玲, 刘立明). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, 2006, 34: S83 ~ S86
- 15 Iwamoto T, Hiraku Y, Okuda M, Kawanishi S. *Pharm. Res.*, 2008, 25(3): 598 ~ 604
- 16 Zheng L F, Dai F, Zhou B, Yang L, Liu Z L. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, 46: 149 ~ 156
- 17 Murakami K, Haneda M, Naruse M, Yoshino M. *Toxicol. Vitro*, 2006, 20(6): 910 ~ 914
- 18 Murakami K, Haneda M, Makino T, Yoshino M. *Food Chem. Toxicol.*, 2007, 45(7): 1258 ~ 1262
- 19 Mourgues S, Trzcionka J, Vasseur J J, Pratviel G, Meunier B. *Biochem.*, 2008, 47(16): 4788 ~ 4799
- 20 Lin X J, Wang Q, Wu J, Liu C B. *J. Theor. Comput. Chem.*, 2008, 7(4): 457 ~ 472

Damage of Deoxyribonucleic Acid Caused by Hydroxyl Radical

WANG Xiao-Xing¹, FANG Yan-Fen¹, YANG Jing¹, CHEN Deng-Xia¹,
HUANG Ying-Ping^{*1}, ZHANG Ai-Qing²

¹(Engineering Research Center of Eco-environment in Three Gorges Reservoir Region,
Ministry of Education, China Three Gorges University, Yichang 443002)

²(Key Laboratory of Catalysis and Materials Science of Hubei Province,
South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074)

Abstract Oxidative damage characteristic of Herring Sperm DNA by hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) which was excited by TiO_2 under UV irradiation (200 – 275 nm, 66.4 Lx) was studied. The process of DNA damage was detected by gel electrophoresis and high performance liquid chromatographic analysis. Electron spin resonance (ESR) and spectrophotometry were used to determine the oxygen species and the relative concentration of H_2O_2 , respectively. The mechanism of DNA damage was studied using 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as an internal standard. The results showed that DNA can be damaged by $\cdot\text{OH}$ generated from photocatalysis. Compared with UV or Dark/ TiO_2 system, the degree of DNA damage reached the maximum in the UV/ TiO_2 system under the condition of DNA concentration 10 mg/L, TiO_2 concentration 1.5 g/L and pH 7 – 8. The damage was caused by the process of $\cdot\text{OH}$ oxidation of TiO_2 under UV irradiation and deep mineralization of DNA took place. Guanine was easy to damage than the other groups in DNA. 8-OHdG was one intermediate product of DNA damage and a special product of guanine damage.

Keywords Deoxyribonucleic acid damage; Hydroxyl radical; Photocatalysis; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine
(Received 13 November 2010; Accepted 7 January 2011)

《红外光谱在微量物证分析中的应用》

微量物证检验是法庭科学的重要组成部分。塑料、纤维、橡胶、涂料、印泥是微量物证检验的重要内容。这些看似平常的物质在成为物证材料(共混/共聚后的物品)后,其红外光谱比均聚物和纯净物的红外光谱复杂得多,谱图解释也复杂、困难得多。本书是作者在20多年物证检验经验的基础上,对分析过的约3万张红外光谱图,经分析、整理、归纳,编写了本书。书中内容由三部分构成:一、常见塑料、纤维、橡胶、涂料、印油等均聚物;二、塑料、纤维、橡胶、涂料、印泥等常用染料、颜料、填料、增塑剂;三、上述两类物质的共聚物、共混物;分别介绍了这些作为微量物证物质的组成、性能和红外光谱,并对红外光谱进行了解释。该书可供从事法庭科学红外光谱检验的同行参考,也可供相关专业从业人员参考,尤其适合熟悉红外光谱仪使用,但不熟悉法庭科学中微量物证红外光谱检验的从业人员参考。