科学通报
第41卷 第19期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1996年10月

·OH自由基诱导氧化磷酰化甲硫氨酸的pH效应*

储高升 姚思德① 张志成 张曼维 王文锋①
(中国科学技术大学应用化学系,合肥 230026;①中国科学院上海原子核研究所,上海 201800)

关键词 脉冲辐解 NDM 含硫三电子键 α-氨基自由基 pH效应

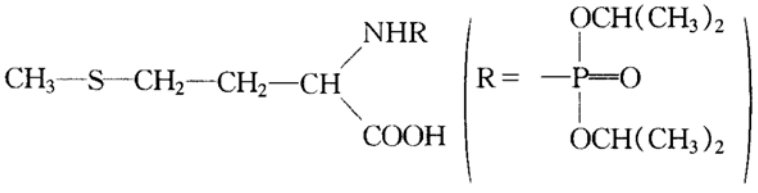
近年来,甲硫氨酸的辐射化学研究十分活跃[1~4],这是因为甲硫氨酸能快速清除·OH自由基而具有对生物的辐射保护作用. 生物大分子的磷酰化作用亦越来越受重视,众所周知,在DNA和RNA中,磷酸酯是储存和传输能量的"生物能源库";近年来基因调控研究的重大进展在于发现了蛋白质的可逆磷酰化作用,不仅是酶活性调节、基因表达调控、细胞生长调节等的关键环节,而且在解决肿瘤的发生与治疗、抗辐射损伤及抗衰老方面具有特殊作用[5~7]. 另外,磷酰化氨基酸及小肽已被证明具有药物性能[8]. 氨基酸是蛋白质的基本结构单位,因此研究磷酰化氨基酸的辐解机理对了解生物大分子磷酰化作用具有重要意义.

·OH自由基诱导氧化N-二异丙基磷酰化甲硫氨酸[(N-Diisopropyloxy phosphoryl) Methionine,简写为NDM]水溶液的机理前文已作报道[9],1),本文将详细叙述pH值对NDM水溶液辐解过程的影响,讨论磷酰化基团的引入对甲硫氨酸辐射保护作用的协同效应,并从分子结构上解释NDM的辐解机理,用化学方法证明高pH条件下的辐解产物.

1 实验部分

1.1 实验试剂

N-二异丙基磷酰化甲硫氨酸(NDM)按文献[10]合成,详细合成、纯化步骤和结构成分分析见前文1). 其结构式为



甲硫氨酸(Methionine,以下简写为Met):中国科学院微生物所层析纯产品;高氯酸、氢氧化钾和磷酸盐均为市售分析纯试剂,异丙醇使用前经蒸馏纯化,甲基紫精(methyl viologen,简写为MV^{2+})由英国MRC实验室馈赠,所有溶液在脉冲辐解前用新鲜三重蒸馏水配制,N_2O的纯度

1995-11-20收稿,1996-04-09收修改稿
* 国家自然科学基金资助项目
1)储高升,姚思德,张曼维等. ·OH自由基诱导氧化磷酰化甲硫氨酸机理的脉冲辐解研究,化学学报,待发表

为 99.99%.

1.2　实验装置

脉冲辐解使用 8 MeV 的直线电子加速器，电子束脉冲宽度为 8 ns，脉冲束流为 2～3 A. 使用光程为 20 mm 的高纯石英样品池，束流与分析光垂直相置，分析光进入 44 W 的单色仪，经 IP 光电倍增管检测后送入 HP54510B 数字示波器记录并经 SUN-486 计算机存储和处理，详见文献[11].

1.3　实验

样品辐照前用 N_2O 鼓泡 20 min，除去溶解氧，并通过反应

$$e_{aq}^- + N_2O + H_2O \rightarrow N_2 + \cdot OH + OH^- \quad (1)$$

清除水合电子，溶液中的·OH 自由基产额为 G(·OH) = 5.4. 溶液的 pH 值用 $HClO_4$，KOH 和磷酸缓冲液来调节. 单脉冲剂量用 KCNS 剂量计进行标定. 实验检测到的瞬态产物的浓度 c 和吸光度 O.D. 是时间的函数，且满足 Beer 律：

$$O.D. = c\varepsilon L, \quad (2)$$

其中 ε 为瞬态产物的摩尔消光系数，L 为样品池的有效光程. 所有实验均在室温下进行.

2　结果与讨论

2.1　不同 pH 值时，NDM 水溶液脉冲辐解后瞬态产物吸收峰的变化

图 1 为 pH 值分别为 1.2，6.6 和 10.0 时，用 N_2O 饱和的 5×10^{-3}mol·dm^{-3}NDM 水溶液在电子脉冲辐照后 1 μs 观察到的瞬态吸收光谱. 如图 1 所示，pH1.2 时，在 480 nm 附近观察到有一宽而强的吸收峰，被判为含硫三电子键阳离子自由基 $NDM_2^{+}\cdot$[S]的特征吸收. 这是·OH自由基进攻 NDM 中的 S 原子，形成阳离子自由基 $NDM^{+}\cdot$[S]，然后结合一个未受进攻的 NDM 分子，形成二聚阳离子自由基 $NDM_2^{+}\cdot$[S]. 随着 pH 值增大，480 nm 吸收峰逐渐减弱，并向短波方向移动. 在 440 nm 周围出现一个宽的吸收峰，这个吸收峰的寿命长达 20 μs，在 pH4.8－8 范围内，该峰都存在，认为它来源于 $NDM^{+}\cdot$[S]在 420 nm 吸收峰[1)]和 $NDM_2^{+}\cdot$[S]在 480 nm 吸收的叠加；当 pH 达到 10.0 时，440 nm 和 480 nm 的吸收峰都已完全消失.

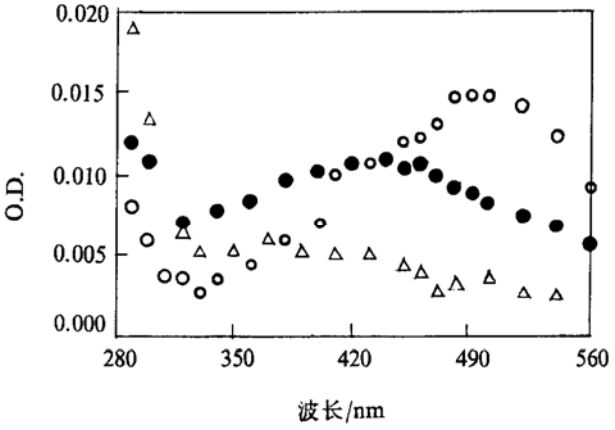


图 1　用 N_2O 饱和的 5×10^{-3}mol·dm^{-3}NDM 水溶液在电子脉冲辐照后 1 μs 观察到的瞬态吸收光谱

○ pH1.2，● pH6.6，△ pH10.0

在 290 nm 处观察到的较弱吸收，来自于 H·和·OH 自由基在 NDM 中硫原子周围的甲基或亚甲基上抽氢形成的共振稳定自由基 $CH_3—S—\dot{C}H—$和 $\dot{C}H_2—S—CH_2—$[记作 NDM(-H)·]的贡献；随 pH 增加，该吸收峰缓慢增大.

1)见 1 756 页脚注

2.2 pH值对NDM水溶液辐解机理的影响

低pH时，·OH自由基诱导氧化NDM水溶液的反应机理可描述为[1],1)

$$H\cdot + NDM \rightarrow NDM(-H)\cdot + H_2 \quad (3)$$

$$\cdot OH + NDM \rightarrow NDM(-H)\cdot + H_2O \quad (4)$$

$$NDM + \cdot OH + H^+ \rightarrow NDM^{+}\cdot[S] + H_2O \quad (5)$$

$$NDM_2^{+}\cdot[S] \rightleftharpoons NDM^{+}\cdot[S] + NDM \quad (6)$$

随着pH值的增加，480 nm吸收峰逐渐下降，图2为用N_2O饱和的5×10^{-3} mol·dm^{-1} NDM水溶液经电子脉冲辐照后1 μs生成的$NDM_2^{+}\cdot[S]$的产额随pH值的变化关系(pH滴定曲线)，由图2可见，$NDM_2^{+}\cdot[S]$的产额从pH<2时的平台值下降到pH10时几乎接近于零，其半值pKa为4.7. 这与Hiller等人[1]报道$Met_2^{+}\cdot[S]$的pKa 1.7有很大的区别，且$NDM_2^{+}\cdot[S]$在480 nm吸收随pH值变化较慢，前者在pH>3时就已完全消失，而后者在pH10左右才完全消失. 这表明$NDM_2^{+}\cdot[S]$的羧基和氨基的质子化状态和氨基上引入的磷酰化基团对NDM的诱导氧化机理起着重要作用.

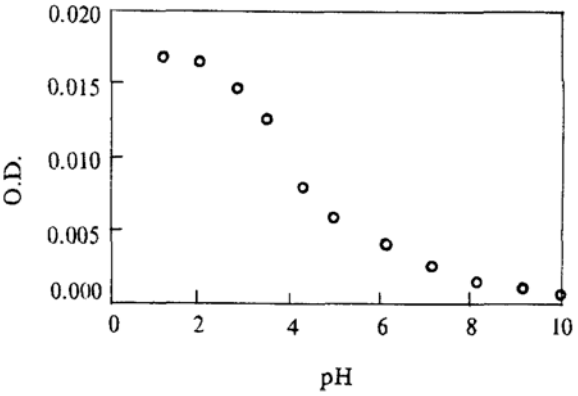
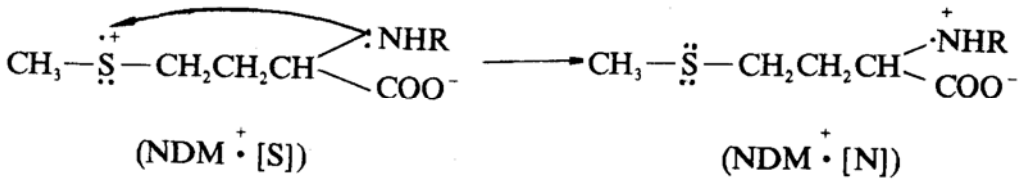


图2 用N_2O饱和的5×10^{-3} mol·dm^{-3} NDM水溶液在电子脉冲辐照后1 μs测得的$NDM_2^{+}\cdot[S]$的产额(480 nm处吸收值)与pH值的变化关系

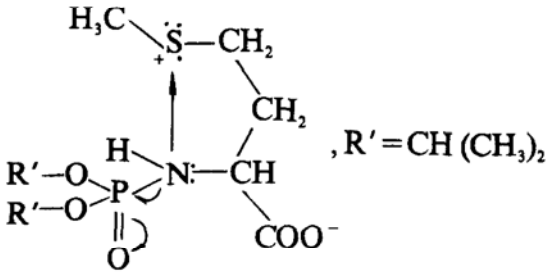
在酸性时，$NDM_2^{+}\cdot[S]$中的氨基是完全质子化的，因此该阳离子自由基比较稳定. 在碱性条件下，一方面如反应式(5)所示，随pH值增大，$NDM^{+}\cdot[S]$自由基的产额减小，从而导致$NDM_2^{+}\cdot[S]$的产额减小；另一方面，$NDM_2^{+}\cdot[S]$中氨基氮原子有一对孤对电子而具有较高的还原电势，同时该自由基中硫原子的P_z空轨道可以接受一个电子，这样就发生了氮原子上孤对电子向硫原子的分子内电子转移反应，并形成立体上有利的五元环结构，经快速脱羧反应产生还原性很强的α-氨基自由基. 在中性条件下，由于$NDM^{+}\cdot[S]$自由基的氨基和羧基之间的快速质子交换，也保证了N→S分子内电子转移反应的发生. 中性和碱性时，$NDM^{+}\cdot[S]$的衰变过程可表示为



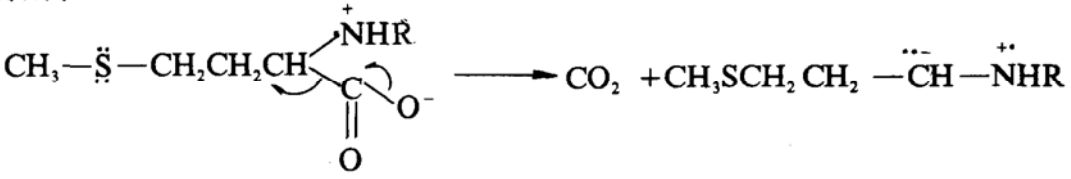
(7)

由此电子转移过程，使$NDM^{+}\cdot[S]$自由基在立体上形成以下五元环结构：

1) 同1 756页脚注

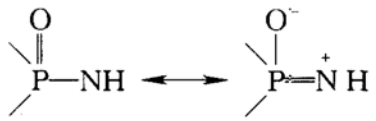


然后经快速脱羧反应，生成 α-氨基自由基；其结果也导致了 $NDM_2^{+}\cdot$[S]的衰减速率加快和量子产额的减小.



$$\rightleftharpoons CH_3SCH_2CH_2\dot{C}HNHR \qquad (8)$$

在生成 α-氨基自由基的过程中，由于在 NDM 分子的氨基上引入了二异丙基磷酰化基团，其 P═O 键是由一个 σ 键和两个 $d\pi$-$p\pi$ 键组成的多重键，这种 $d\pi$-$p\pi$ 多重键是由氧原子的 p 电子对反馈给磷原子的 d 轨道所形成的 π 键，磷原子的 $3d$ 空轨道除了接受氧原子上的反馈电子之外，还具备接纳外来电子的特征. 甲硫氨酸的氮原子上引入磷酰化基团形成 P—N 键后，氮原子上的孤对电子向磷原子的 $3d$ 空轨道反馈电子，通过下列过程形成共轭体系：



(9)

由于这种共轭体系的形成，不仅使得中性和碱性条件下 $NDM^{+}\cdot$[S]自由基氮原子上的孤对电子比相应的 $Met^{+}\cdot$[S]稳定，从而降低了 $NDM^{+}\cdot$[S]氮原子的氧化还原电势，阻碍了 N→S 分子内电子转移和脱羧反应的发生；而且由于引入的磷酰化基团的体积较大，也不利于形成空间上的五元环结构，所以与 Met 辐解产生的 $Met_2^{+}\cdot$[S]相比，$NDM_2^{+}\cdot$[S]在中性和碱性条件下要稳定得多，即在中性和碱性条件下仍能观察到 $NDM_2^{+}\cdot$[S]在 480 nm 处的特征吸收峰.

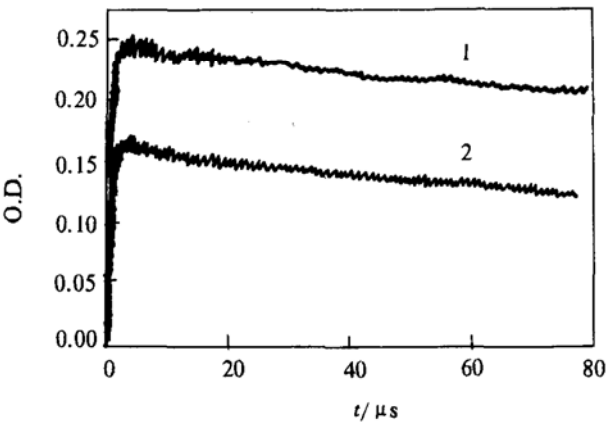


图 3　用 N_2O 饱和的(1) 5×10^{-3} mol·dm^{-3} Met, 5×10^{-4} mol·dm^{-3} MV^{2+} 和 0.2 mol·dm^{-3} 异丙醇，pH7.4；(2) 5×10^{-3} mol·dm^{-3} NDM, 5×10^{-4} mol·dm^{-3} MV^{2+} 和 0.2 mol·dm^{-3} 异丙醇，pH6.8 时在 600 nm 处观察到 $MV^{+}\cdot$ 的动力学衰减曲线

2.3　高 pH 值时 NDM 辐解机理的验证

高 pH 值时，·OH 自由基氧化 NDM 水溶液生成的 α-氨基自由基，不能从瞬态吸收光谱中

直接观察到，实验中用异丙醇清除水经辐射电离产生的还原性 H·自由基，并用低浓度(5×10^{-4} mol·dm^{-3})的甲基紫精(MV^{2+}，$E=-0.449$ V)作为氧化剂，氧化 NDM 和 Met 水溶液辐解产生的 α-氨基自由基，都能观察到 $MV^{+}\cdot$ 阳离子自由基在 600 nm($\varepsilon_{600}=11\ 850$ mol^{-1}·dm^3·cm^{-1}[1])处的强吸收(见图 3)，发生的氧化反应如方程(10)所示：

$$CH_3SCH_2CH_2\dot{C}HNHR + MV^{2+} \rightarrow CH_3SCH_2CH_2\overset{+}{C}HNHR + MV^{+}\cdot \qquad (10)$$

反应(10)几乎是定量进行的，它不仅证明了 α-氨基自由基具有还原性，还可以通过 $MV^{+}\cdot$ 在 600 nm 的最大吸收值(O.D. 值)、摩尔消光系数和吸收剂量计算出两种不同情况下 α-氨基自由基的产额. 在 pH 为 6.8 和 7.4 时，NDM 和 Met 水溶液辐解产生 α-氨基自由基的 G 值分别为 2.3×10^{-4}T 和 4.8×10^{-4}T，即分别有 42.5% 和 88% 的含硫三电子键阳离子自由基发生 N→S 分子内电子转移，并经脱羧反应生成 α-氨基自由基，后者与文献[1]报道的结果一致.

3 结论

对·OH 自由基诱导氧化 NDM 水溶液的脉冲辐解研究结果表明：pH 值对其辐解机理有很大影响，低 pH 时，主要形成具有氧化性的 $NDM_2^{+}\cdot$[S]阳离子自由基；随着 pH 的增大，这一自由基逐渐衰变成还原性的 α-氨基自由基；用化学方法证明了 α-氨基自由基的存在，并求出了它的产额. 与甲硫氨酸水溶液的辐解过程相比，$NDM_2^{+}\cdot$[S]的稳定性增加，α-氨基自由基的产额降低，NDM 清除·OH 自由基的效果更为显著，这一事实证明磷酸酯对甲硫氨酸的辐射保护作用具有协同效应，同时也为彻底弄清蛋白质的可逆磷酰化作用提供了一定的理论依据.

参 考 文 献

1 Hiller K O, Masloch B, Gobl M *et al*. Mechanism of the ·OH radical induced oxidation of methionine in aqueous solution. J Am Chem Soc, 1981, 103: 2 734～2 743

2 Bobrowski K, Lubis R. Intermolecular charge transfer involving tryptophan, tyrosine and three electron-bonded intermediates derived from methionine. Int J Radiat Biol, 1986, 50(6): 1 039～1 050

3 Hiller K O, Asmus K D. Formation and reduction reactions of α-amino radicals derived from methionine and its derivatives in aqueous solutions. J Phys Chem, 1983, 87: 3 682～3 688

4 Bobrowski K, Wierzchowski K L, Holcman J *et al*. Pulse radiolysis studies of intramolecular electron transfer in model peptides and proteins. Int J Radiat Biol, 1992, 62(5): 507～516

5 乐志培. 非组蛋白磷酰化与核内信息传递. 生命的化学, 1991, 11(5): 23～25

6 Marx J. Biologists turn on to off-enzymes. Science, 1985, 229: 744

7 Marx J. Proteins for all seasons. Science, 1985, 229: 638

8 Shumpei S, Yasumi Y, Shigebumi H. Eur Pat Appl EP 85 488. 1983-08-10

9 储高升，姚思德，张曼维等. 磷酰化甲硫氨酸水溶液的脉冲辐解研究. 辐射研究与辐射工艺学报, 1995, 13(4): 封四

10 Ji G J, Zeng J N, Zhao Y F *et al*. Synthesis of N-(diisopropyloxyphosphoryl) amino acids and peptides. Synthesis, 1988, 6: 444～448

11 Yao S D, Sheng S G, Cai J H *et al*. Nanosecond pulse radiolysis studies in China. Radiat Phys Chem, 1995, 46: 105～110