

过氧亚硝酸根离子诱导 DNA 断裂机理的研究

胡 燕 黄开勋*

(华中科技大学化学系, 武汉 430074)

在体内 NO 和超氧阴离子生成的过氧亚硝酸根离子(ONOO⁻, peroxynitrite)是一种强氧化性物质, 它可以诱导 DNA 单链断裂使 DNA 发生损伤。为了探讨 ONOO⁻断裂 DNA 的作用机理, 以质粒 DNA pBR322 为研究对象, 采用琼脂糖凝胶和硫代巴比妥酸(TBA)显色反应等方法对 ONOO⁻与 DNA 的反应进行研究。结果表明 ONOO⁻能明显使 DNA 发生断裂, 而且随着 ONOO⁻浓度的增加, DNA 断裂的程度增加, 在酸性和中性条件下 ONOO⁻断裂 DNA 的能力明显高于碱性介质, 而 CO₂ 对该反应有显著的抑制作用, TBA 显色反应进一步证实该反应为自由基机理, 其机理为 ONOO⁻与 H⁺形成 ONOOH, 然后裂解为二氧化氮自由基(·NO₂)和羟基自由基(·OH), 继而对 DNA 造成损伤。

关键词: 过氧亚硝酸根 DNA 硫代巴比妥酸 NO 自由基
分类号: O611.62 O611.65 O613.61

在体内 NO 和超氧阴离子(O₂⁻)能够以接近被动扩散的速度(6×10⁹ L·mol⁻¹·s⁻¹)极快地反应生成一种新的氧化性和细胞毒性都要比其自身大得多的离子——过氧亚硝酸根离子(ONOO⁻)^[1]。这个反应速率常数是 SOD 酶催化 O₂⁻分解反应的速率常数的将近 3.5 倍, 由此而知, 机体内的 ONOO⁻浓度是相当高的。ONOO⁻的 pK_a=7.49(25 °C), 它在正常的生理条件下可以稳定的存在, 加上它的半衰期相对较长(约为 1.9 s), 使得 ONOO⁻成为体内一种寿命相对较长的强氧化性物质。据报道, ONOO⁻主要与苯环类物质发生硝化反应, 尤其容易与蛋白质的酪氨酸残基发生硝化反应产生 3-NO₂ 酪氨酸; 除此之外, ONOO⁻可引起脂质过氧化, 在动脉粥样硬化中起重要作用^[2]; 与巯基发生单电子或双电子的氧化反应, 破坏体内正常的巯基水平。此外, 它还可以在细胞水平上起作用^[3], 它可以使甘油醛-三磷酸脱氢酶失活, 抑制细胞膜上 Na⁺/K⁺ATP 酶的活性, 使细胞膜上 Na⁺通道失活。

有研究表明 ONOO⁻与蛋白质的反应为自由基机理^[4], 即 ONOO⁻与氢离子生成共轭酸 ONOOH, 进一步分解为·NO₂ 和·OH, ·NO₂ 与蛋白质上的酪氨酸残基发生硝化反应, 而·OH 引起脂质过氧化反

应。ONOO⁻也可以与 DNA 反应, 使 DNA 链断裂, 对碱基进行化学修饰。

有关 ONOO⁻与 DNA 反应的研究虽然已经有一些报道, 但其反应机理还不是十分清楚。本文通过在体外对 ONOO⁻与质粒 DNA pBR322 的反应能力、反应条件、影响因素的研究, 试图对 ONOO⁻与 DNA 反应的机理作进一步的了解。

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

主要试剂: pBR322 DNA 购自大连宝生物工程有限公司, 琼脂糖购自西班牙 Biowest 公司, 溴化乙锭(EB)、二乙撑三胺五醋酸(DTPA)、溴酚蓝均购自 sigma, 二甲苯青 FF 购自 AMRESCO, 脱氧核糖核酸购自上海长阳制药厂, 硫代巴比妥酸(TBA)购自上海生化试剂厂, 其它均为国产分析纯试剂。

主要仪器: 北京六一厂的 DYY-III 8B 型稳压稳压电泳仪和 DYCP-31C 型电泳槽, 上海顾村光电仪器厂 ZF-90 型暗箱式紫外透射仪, PE 公司 Lambda Bio-40 型紫外-可见分光光度计。

1.2 过氧亚硝酸根离子的制备

采用淬灭流动反应方法合成^[5], 4 °C 时 0.6 mol·

收稿日期: 2003-08-20。收修稿日期: 2003-11-14。

国家自然科学基金资助项目(No.20371018)。

* 通讯联系人。E-mail: hxxzrf@mail.hust.edu.cn

第一作者: 胡 燕, 女, 24 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物无机化学。

$\text{L}^{-1} \text{HCl} + 0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 与 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_2$ 溶液各 10 mL 经 Y 型玻璃管上口流入, 0°C 的 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$ 20 mL 由底部流入, 以淬灭前两种溶液的反应, 保持三者流量与流速的一致。反应完毕迅速在反应液中加入少量的 MnO_2 振荡 10 min 以清除残存的微量 H_2O_2 , 真空抽滤, 黄色液体即是 ONOO^- , 置于 -20°C 过夜并保存。其浓度的测定采用 UV 分光光度计, 以 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$ 为参比, $\epsilon_{302} = 1670 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

1.3 ONOO^- 引起的 DNA 链的断裂

实验 pBR322 由紧密闭环螺旋态 (close circular form, CC) 转变成开环螺旋态 (open circular form, OC) 的多少来检测 ONOO^- 断裂 DNA 的能力^[6,7]。室温下 ONOO^- 加入到含有 250 ng DNA 以及 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTPA 的 $\text{pH}=7.4$ 的 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液中, 使其终浓度分别为 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 总体积为 $10 \mu\text{L}$ 。反应液在 37°C 下反应 10 min。随后, 每份反应液中加入 $2 \mu\text{L}$ 电泳上样缓冲液 (0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青 FF, 40% (m/V) 蔗糖水溶液)。反应液和上样缓冲液共 $12 \mu\text{L}$ 点入制备好的 1% 的琼脂糖凝胶中 (含 $0.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ EB), 在 $0.5\times\text{TBE}$ (Tris-硼酸-EDTA) 的缓冲液中以 90 V 电压电泳 50 min, 电泳完毕, 把胶置于紫外透射仪上观察并照相。

1.4 pH 值对 ONOO^- 诱导 pBR322 链断裂的影响^[8]

(1) 中性、酸性条件下 (磷酸盐缓冲体系)

室温下 ONOO^- 振荡加入到含有 250 ng DNA 以及 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTPA 的磷酸盐缓冲液中, 使其终浓度分别为 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 分别为 7.4 和 5.8。由于制备的 ONOO^- 碱性较大, 在反应过程中加入等物质的量的盐酸以保持溶液 pH 值不变, 总体积为 $10 \mu\text{L}$ 。反应液在 37°C 下反应 10 min 后, 加入 $2 \mu\text{L}$ 上样缓冲液, 混合物共 $12 \mu\text{L}$ 点入制备好的 1% 的琼脂糖凝胶中 (含 $0.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ EB), 在 $0.5\times\text{TBE}$ 的缓冲液中以 90 V 电压电泳 50 min, 电泳完毕, 把胶置于紫外透射仪上观察并照相。

(2) 碱性条件下 (Tris 缓冲体系)

室温下 ONOO^- 振荡加入到含有 250 ng DNA 以及 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTPA 的 Tris 盐缓冲液中, 使其终

浓度分别为 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 总体积为 $10 \mu\text{L}$, pH 分别为 8.0 和 8.8。其余同 1.4(1)。

1.5 ONOO^- 与脱氧核糖核酸的 TBA 显色反应^[9]

在含有 10.65 mg 脱氧核糖核酸的 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液中分别振荡加入 $0 \mu\text{L}$ 、 $200 \mu\text{L}$ 、 $300 \mu\text{L}$ 、 $400 \mu\text{L}$ 、 $500 \mu\text{L}$ 的 ONOO^- 溶液, 使 ONOO^- 的浓度分别达到 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 它们的总体积均为 5 mL , pH 分别为 7.4 和 5.8, 在 37°C 下反应 20 min 后, 每份样品均加入 1 mL 0.6% 的硫代巴比妥酸和 1 mL 的冰醋酸, 再在沸水浴中加热 30 min, 样品冷却后测其在 532 nm 处的吸收。

1.6 CO_2 对 ONOO^- 诱导 pBR322 单链断裂的影响^[10]

室温下, 在含有 250 ng DNA、 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTPA 和 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ONOO^- 的磷酸盐 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 缓冲液中 ($\text{pH}=5.8$), 分别加入不同浓度的 NaHCO_3 , 使其在溶液中的终浓度分别为 0 、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 总体积为 $10 \mu\text{L}$, 反应液在 37°C 下反应 10 min 后, 每份样品加入 $2 \mu\text{L}$ 上样缓冲液, 点入制备好的 1% 的琼脂糖凝胶中 (含 $0.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ EB), 在 $0.5\times\text{TBE}$ 的缓冲液中以 90 V 电压电泳 50 min, 电泳完毕, 把胶置于紫外透射仪上观察并照相。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度的 ONOO^- 对 DNA pBR322 的损伤

质粒 pBR322 是一种闭环 (CC) DNA, ONOO^- 对 DNA pBR322 的损伤主要是使得闭环 DNA 变为开环 (OC) DNA。这种转变的程度反映了 DNA 受损伤的程度。 ONOO^- 对 DNA 作用的结果如图 1 所示。

从图 1 我们可以很明显地看出, 随着 ONOO^- 浓度由 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增至 $3.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pBR322 中超螺旋闭环的组分逐渐减小, 而超螺旋开环的组分随之增大。pBR322 由超螺旋闭环断裂为超螺旋开环说明在它和 ONOO^- 反应的过程中, ONOO^- 可以导致 DNA 单链断裂, 这与 Sumiko 等人^[10] 及 Epe 等人^[11] 的研究结果基本一致, 而且这种损伤随着 ONOO^- 浓度的增大而加剧。实验中, 没有见到三条及其以上的条带, 说明 ONOO^- 对 pBR322 只有单个切割位点, 但是否是唯一的位点有待进一步的研究。



图1 ONOO^- 的浓度对其诱导的 pBR322 损伤的影响

Fig.1 Nicking of pBR322 by peroxynitrite in the incubation mixture

Lane 1 shows pBR322 in phosphate buffer alone. Lane 2 to Lane 6 show pBR322 incubated with the following peroxynitrite concentration: $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $3.75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.2 pH 值对 ONOO^- 诱导 pBR322 链断裂的影响

从图2中可以看出:同样浓度的 ONOO^- 的条件下, Lane 2 中 pBR322 OC 态的量少于 Lane 3 中 OC 态的量, Lane 4 中 OC 态的量少于 Lane 5 中 OC 态的量, Lane 6 中 OC 态的量少于 Lane 7 中 OC 态的量。而 Lane 2、Lane 4、Lane 6 均为在中性条件下 (pH 7.4) ONOO^- 与 pBR322 反应的结果, Lane 3、Lane 5、Lane 7 均为在酸性条件下 (pH 5.8) ONOO^- 与 pBR322 反应的结果。由此我们可以得出在酸性条件下 ONOO^- 断裂 DNA 的能力远大于其在中性条件下的能力。

图3显示的是在 pH=8.0 和 pH=8.8 条件下 ONOO^- 与 pBR322 反应的情况。在这个实验中,



图2 在酸性和中性条件下 ONOO^- 诱导 pBR322 损伤的比较

Fig.2 Nicking of pBR322 by peroxynitrite in acid and neutral buffer

Lane 1 and lane 8 show pBR322 in pH=7.4 and pH=5.8 phosphate buffer alone respectively. Lane 2 and Lane 3 show pBR322 incubated with $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ peroxynitrite in pH=7.4 and pH=5.8 buffer respectively. Lane 4 and Lane 5 shows pBR322 incubated with $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ peroxynitrite in pH=7.4 and pH=5.8 buffer respectively. Lane 6 and Lane 7 show pBR322 incubated with $3.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ peroxynitrite in pH=7.4 and pH=5.8 buffer respectively.

ONOO^- 的反应浓度分别为 $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $3.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 比在中性和酸性条件下的相应的反应浓度要大。但是可以看出:在碱性条件下 ONOO^- 对 pBR322 的损伤能力较之于酸性和中性条件下明显减弱。当 ONOO^- 浓度为 $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $3.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,可以分别观察到 pH=8.8 时的 OC 带窄于 pH=8.0 时的 OC 带,即在 pH=8.8 时 ONOO^- 对 DNA 的损伤比在 pH=8.0 时 ONOO^- 对 DNA 的损伤要小。比较图2和图3,可以清楚地观察到,在碱性条件下,同样浓度的 ONOO^- 产生的损伤要比在中性和酸性条件下小得多。因此我们可以得出 ONOO^- 在酸性条件下的对 DNA 的损伤能力大于在中性和碱性条件下的,而在碱性条件下 ONOO^- 损伤 DNA 的能力尤其弱。

由以上的这些实验结果,我们可以初步地认为, ONOO^- 在反应过程中很可能是以其共轭酸的形式参与反应的,因此它的反应能力与 pH 值有如此密切的相关性。



图3 在碱性和中性条件下 ONOO^- 诱导 pBR322 损伤的比较

Fig.3 Rupture of pBR322 by peroxynitrite in alkaline buffer Lane 1 and lane 8 show pBR322 in pH=8.0 and pH=8.8 Tris buffer alone respectively. Lane 2 and Lane 3 show pBR322 incubated with $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ peroxynitrite in pH=8.0 and pH=8.8 buffer respectively. Lane 4 and Lane 5 show pBR322 incubated with $1.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ peroxynitrite in pH=8.8 and pH=8.0 buffer respectively. Lane 6 and Lane 7 show pBR322 incubated with $3.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ peroxynitrite in pH=8.8 and pH=8.0 buffer respectively.

2.3 ONOO^- 与脱氧核糖核酸的 TBA 显色反应

为了探讨 ONOO^- 与 DNA 反应的机理,我们进行了 ONOO^- 与脱氧核糖核酸作用的 TBA 显色反应。这个反应的原理是:在 ONOO^- 与脱氧核糖核酸反应的过程中如果有羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 生成,则 $\cdot\text{OH}$ 会进攻糖环而产生丙二醛,丙二醛可与硫代巴比妥酸生成复合物,此物质在 532 nm 下有明显的光吸收。因此,我们检测 ONOO^- 与脱氧核糖核酸的反应产物与 TBA 在 532 nm 是否有明显的光吸收值,就可看出

在 ONOO⁻发生作用的过程中是否有·OH产生,从而可以推测 ONOO⁻是否在体内以自由基机理发生作用。实验结果见图 4。

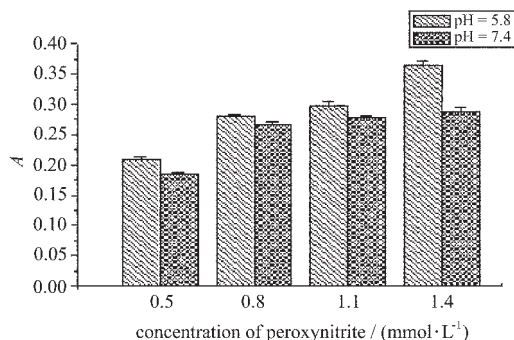


图 4 ONOO⁻和 DNA 的反应物与 TBA 形成复合物后在 532 nm 的光吸收随 ONOO⁻浓度和不同 pH 下变化的比较

Fig.4 Effects of pH and concentration of peroxyntirite on absorption at 532 nm

从图 4 可看出,ONOO⁻与脱氧核糖核酸的反应物与 TBA 的复合物在 532 nm 有明显的光吸收,而且随着 ONOO⁻浓度的增大,在 532nm 的吸光值也随之增大,说明随着 ONOO⁻反应浓度的增大,它产生的·OH 的量越多。同时还可以看出在酸性条件下的吸光度值明显地大于在中性条件下的吸光值,说明在酸性条件下所产生的·OH 的量大于中性条件下产生的·OH 量。可见,ONOO⁻是 以其共轭酸(ONOOH)的形式参与反应,其发生反应是以自由基的机理进行的,而·OH 产生的机理可以用下式表示:



这个实验进一步证实了前人所提出的 ONOO⁻反应的自由基机理^[12,13]。由于 ONOO⁻在发挥作用的过程中产生了·OH 和·NO₂,所以它还可以修饰 DNA 的碱基,生成以 8-NO₂ 鸟嘌呤和 8-OH 鸟嘌呤为主的各种碱基修饰物。因而,ONOO⁻与 DNA 反应导致 DNA 链断裂的原因可以从以下两个方面来解释^[14]:一方面,ONOO⁻与 DNA 反应的过程中产生的·OH 可能进攻 DNA 链中的脱氧戊糖,与脱氧核苷反应,在这个反应过程中,在核糖的 C'4 发生了抽氢反应,继而发生 C'3-C'4 及 C'1-环氧键的裂解而产生碱基-丙烯醛类物质,使 DNA 发生断裂;另一方面,ONOO⁻可以与 DNA 中的碱基发生氧化和硝化反应,对碱基产生各种修饰作用,从而使得碱基突变,易于

脱落而产生各种坏死位点,而导致 DNA 链的断裂。

2.4 CO₂ 对 ONOO⁻诱导 pBR322 单链断裂的影响

CO₂ 对 ONOO⁻诱导 pBR322 单链断裂影响的实验结果如图 5 所示。从图 5 可以看出,在没有 CO₂ 存在下,0.5 mmol·L⁻¹ 的 ONOO⁻对 pBR322 产生单链断裂而使 pBR322 CC 组分的减少和 OC 组分的增加是明显的,在加入了不同浓度的 NaHCO₃ 后,OC 组分明显减少,CC 组分明显增加,pBR322 被 ONOO⁻损伤的程度明显被抑制。当 NaHCO₃ 的浓度为 50 mmol·L⁻¹,ONOO⁻对 pBR322 的损伤几乎被完全抑制。因此,可以得出 CO₂ 对 ONOO⁻诱导 DNA 的单链损伤有抑制作用。



图 5 不同浓度的 CO₂ 对 ONOO⁻诱导 pBR322 损伤抑制作用的比较

Fig.5 CO₂ influence on nicking of pBR322 by peroxyntirite
Lane 1 shows pBR322 in pH=5.8 phosphate buffer alone. Lane 2 shows pBR322 incubated with 0.5 mmol·L⁻¹ peroxyntirite / 0 μmol·L⁻¹ NaHCO₃ in pH=5.8 buffer. Lane 3 shows pBR322 incubated with 0.5 mmol·L⁻¹ peroxyntirite / 50 μmol·L⁻¹ NaHCO₃ in pH=5.8 buffer. Lane 4 shows pBR322 incubated with 0.5 mmol·L⁻¹ peroxyntirite / 0.5 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ in pH=5.8 buffer. Lane 5 shows pBR322 incubated with 0.5 mmol·L⁻¹ peroxyntirite / 5 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ in pH=5.8 buffer. Lane 6 shows pBR322 incubated with 0.5 mmol·L⁻¹ peroxyntirite / 50 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ in pH=5.8 buffer.

对于 CO₂ 抑制 ONOO⁻损伤 DNA 的机理可能也与我们在前面提到的 ONOO⁻的自由基机理有关。ONOO⁻与 CO₂ 发生作用的机理如下式^[15]:



即在 CO₂ 存在下,它可以与 CO₂ 生成复合物 ONOOCO₂⁻,此物质的最大吸光度值在 650 nm。此复合物可以均裂为·NO₂ 和 CO₃^{·-}。据文献报道,大约 1/3 的 ONOOCO₂⁻可以产生自由基^[16]。

比较 ONOO⁻分别与 H⁺和 CO₂ 的相互作用,我们可以看出,在 CO₂ 的存在下,原本在 ONOO⁻的作用途径中产生的·NO₂ 和·OH 转变成为了·NO₂ 和

CO_3^- , 即羟自由基消失了, 取而代之的是 CO_3^- , 因此, 可以认为 CO_2 可以抑制 ONOO $^-$ 诱导 DNA 单链断裂的原因就在于它的存在抑制了 $\cdot\text{OH}$ 的产生, 而新产生的 CO_3^- 不能够对 DNA 产生损伤。

在上面我们已提出 ONOO $^-$ 诱导 DNA 发生单链断裂可能的原因有两个, 一个是 $\cdot\text{OH}$ 进攻 DNA 的脱氧戊糖, 另一个原因是 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{NO}_2$ 修饰 DNA 的碱基。由于, CO_2 抑制 ONOO $^-$ 诱导 DNA 单链断裂中, $\cdot\text{OH}$ 减少的量和 CO_3^- 增加的量是等等的, 而 $\cdot\text{NO}_2$ 的量不变, 因而可以认为 $\cdot\text{OH}$ 在使 DNA 发生单链损伤的过程中作用大于 $\cdot\text{NO}_2$ 。ONOO $^-$ 和 CO_2 反应的速度极快, 速率常数为 $3 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 而且在体内 CO_2 浓度相当高(约为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 因此, 在体内 CO_2 对 ONOO $^-$ 的反应能力有非常重要的影响。有报道, 当碳酸氢盐的浓度较高时, 细菌和寄生虫受 ONOO $^-$ 的细胞损伤有明显地减少。

在体内, ONOO $^-$ 诱导 DNA 单链断裂具有重要的生理意义。例如: PARS[聚(腺苷二磷酸-核糖)聚合酶]是大量存在于细胞核内的一种导致蛋白质修饰和核苷酸聚合的酶, 而 DNA 单链断裂是激活 PARS 的必要开端。一旦 PARS 被激活就会导致 NAD $^+$ (辅酶 II)分解为 ADP-核糖(腺苷二磷酸-核糖)和烟酰胺。接下来, PARS 又把分解产生的 ADP-核糖连接到各种类型的蛋白质上, 包括细胞核内的各种蛋白、组蛋白以及 PARS 自身的自动修饰区域。通过这种方式, PARS 就把 ADP-核糖扩展为类似于核酸聚合物的物质——聚 ADP 核糖。PARS 的显著激活能迅速地消耗储存于细胞间的底物 NAD $^+$, 使 NAD $^+$ 浓度减小; 减慢糖酵解的速度, 并减慢线粒体电子转移的速度和 ATP 生成的速度。这个过程可以引发细胞内的严重的能量危机, 导致急性细胞功能失调和细胞坏死。同时 PARS 通过伴随着各种转录因子和转录辅助激活因子的作用, 也在一系列的免疫调节中起着重要作用。最近证实, 此酶是在过度的氧化应激

情况下, 导致细胞新陈代谢紊乱、免疫损伤和器官受损的一个重要因素。ONOO $^-$ 能够导致 DNA 单链断裂, 因此一旦过氧亚硝酸根离子在体内生成, 它可以穿过细胞膜, 引起细胞核内的 DNA 单链断裂从而激活 PARS, 造成细胞急性损伤和死亡^[17]。

参 考 文 献

- [1] Huie R. E., Padmaja S. *Free. Radic. Res. Commun.*, **1993**, **18**, 195.
- [2] Radi R., Beckman J. S., Bush K. M., Freeman B. A. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1991**, **288**, 481.
- [3] Csaba S. *Toxicol. Lett.*, 2003, 140.
- [4] Althaus J. S., Fici G. J., Plaisted S. M. *Microchemical Journal*, **1997**, **56**(2), 155.
- [5] Masumoto H., Sies H. *Chem. Res. Toxicol.*, **1996**, **9**, 262.
- [6] Maria G., Koni S., Giuseppe L., William A. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, **210**(3), 1 025.
- [7] Ohshima H., Gilibert I. *Free. Radic. Bio. Med.*, **1999**, **26**, 1 305.
- [8] Yermilov V., Yoshie Y., Rubio J., Ohshima H. *FEBS. Lett.*, **1996**, **399**, 67.
- [9] WANG Ai-Guo(王爱国), LUO Guang-Hua(罗广华) *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan (Progress. Biochem. Biophys.)*, **1993**, **20**(2), 150.
- [10] Sumiko I., Shosuke K. *FEBS. Lett.*, **1995**, **371**, 86.
- [11] Epe B., Ballmaier D., Roussyn I., Sies H. *Nucleic. Acids. Res.*, **1996**, **24**(21), 4 105.
- [12] Richeson C. E., Mulder P., Bowry V. W., Ingold K. U. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, **11**, 712.
- [13] Goldstein S., Czapski G., Lind J., Merenyi G. *Chem. Res. Toxicol.*, **1999**, **12**, 132.
- [14] Burney S., Caulfield J. L. *Mutation. Res.*, **1999**, **424**, 37.
- [15] William A. P., Rao M. U. *Free. Radic. Bio. Med.*, **1997**, **23**(2), 331.
- [16] Bonini E. V., Hurst J. K. *Inorg Chem.*, **1998**, **37**, 294.
- [17] Csaba S. *Free. Radic. Bio. Med.*, **1996**, **21**(6), 855.

Studies on the Mechanism of DNA Strand Breakages Induced by Peroxynitrite

HU Yan HUANG Kai-Xun*

(Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

NO reacts with $O_2^{\cdot-}$ to yield peroxynitrite ($ONOO^-$), a powerful oxidant in vivo. Peroxynitrite can induce DNA single-stranded breakages. Plasmid pBR322 is used to study the mechanism of DNA strand breakages induced by peroxynitrite. Agarose gel and TBA revealing colour reaction is also developed. The conclusion shows that $ONOO^-$ can break DNA strands obviously. The degree of DNA strand breakages is augmenting with the concentration of peroxynitrite increasing. The ability of peroxynitrite breaking DNA strands in acid and neutral solution is higher than in alkaline solution. CO_2 can inhibit the reaction. TBA reaction demonstrates the reaction is free radical mechanism: $ONOOH$ is formed when $ONOO^-$ reacts with H^+ and then cleaves into $\cdot NO_2$ and $\cdot OH$ to damage DNA.

Keywords: peroxynitrite DNA TBA NO free radical