

张均田 杜冠华 李锡明 主编

自由基氧化损伤 与抗氧化剂

Oxidative Stress and Antioxidants



化学工业出版社

张均田 杜冠华 李锡明 主编

自由基氧化损伤 与抗氧化剂

Oxidative Stress and Antioxidants

 化学工业出版社

· 北 京 ·

本书由我国著名药理学家张均田教授等主编,作者团队汇聚国内一线药理研究人员,对氧化应激的理论基础、研究进展,相关抗氧化剂的研究及应用进行了较为全面的阐述,帮助读者理性认知衰老和有关疾病及延缓衰老的方法。

本书内容前沿,深入浅出,适用于从事抗衰老及相关研究的人员。

图书在版编目(CIP)数据

自由基氧化损伤与抗氧化剂/张均田, 杜冠华, 李锡明主编.
北京: 化学工业出版社, 2015. 10

ISBN 978-7-122-24993-7

I. ①自… II. ①张…②杜…③李… III. ①自由基反应-
医用化学-研究②抗氧化剂-研究 IV. ①R313②TQ047.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 196078 号

责任编辑: 杨燕玲 郎红旗

责任校对: 王素芹

文字编辑: 李 瑾

装帧设计: 关 飞

出版发行: 化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市胜利装订厂

710mm×1000mm 1/16 印张 16½ 字数 236 千字

2016 年 1 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 69.00 元

版权所有 违者必究

作者名单

张均田 教授 中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所
zhangjt@imm. ac. cn

杜冠华 教授 中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所
dugh@imm. ac. cn

李锡明 博士 山东绿叶制药集团
simonli@wpu. com. cn

张庆柱 教授 山东大学药学院
zhangqzh@sdu. edu. cn

楚世峰 博士 中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所
chushifeng@imm. ac. cn

陈 霁 副研究员 中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所
chenj@imm. ac. cn

宋俊科 博士 中国医学科学院 中国协和医科大学 药物研究所
Smilejunke@imm. ac. cn

谢 涛 博士 中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所
xietao8908@imm. ac. cn

前言

《自由基氧化损伤与抗氧化剂》一书共分 8 章，综合了国内外大量文献和编者自己的研究成果、技术和方法。第 1~3 章扼要介绍了什么是自由基，自由基有几种类型，各有哪些特点，自由基在哪些组织细胞、哪些条件下产生，外源性自由基又有哪些来源。

线粒体是细胞中唯一有半自主性作用的细胞器，它是体内产生自由基的主要场所，也是受自由基损害最严重的器官。线粒体产生自由基的过程和机制以及自由基如何破坏线粒体膜导致能量供应障碍等在本书中会给读者一个清晰的回答。人体内从中枢神经系统到各个脏器、组织和细胞，自由基比比皆是。自由基引起的氧化损伤可威胁到成千上万的人，确切地说，会威胁到每一个人，老人、小孩、青年，无一可幸免。

第 4 章介绍了机体为抵抗自由基的攻击发展了怎样的抗氧化防御系统。该系统包括抗氧酶，如超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、谷胱甘肽还原酶和过氧化氢酶（CAT）等，以及非酶性抗氧化物，如维生素类、微量元素、谷胱甘肽等。这些抗氧化成分各尽所能，相互协同，整合效果尤佳。例如，SOD 是最关键的酶，它对自由基中 90% 以上的氧自由基有清除作用；维生素 C 是水溶性维生素，能在血液和体液内循环流动，因而处在抗氧化、清除自由基的最前线；维生素 E 是脂溶性维生素，能插入到不饱和脂肪酸存在的生物膜（如细胞膜、内质网、线粒体、肾

上腺和血液脂蛋白)内起作用;还原性谷胱甘肽(GSH)可保护蛋白质和酶免遭氧化损伤,因而保持蛋白质和酶这两个生命中最重要物质的功能活性。体内性质不同的几种抗氧化物协同作用效果更佳。维生素E、维生素C、GSH和还原性NADPH构成一个有效的氧化还原链往复循环,对维持氧化还原的稳态平衡起重要作用。正常情况下,体内自由基总是处于不断产生不断清除的动态平衡之中,然而,一旦自由基在体内积累过多或体内抗氧化能力大大削弱,悲剧将不可避免地接踵而来。

第5章讨论了日常生活与机体抗氧化能力的关系,介绍提高机体抗氧化能力的一般方法,将身体保健与抗氧化的关系进行了阐述。

第6章和第7章综述了国内外生物来源的抗氧化剂研究和使用的进展。我们之所以重视生物来源的抗氧化剂,一是因为植物王国蕴含千姿百态、作用广泛、机制独特的抗氧化剂,自然界的各种营养素、存在于动物和人体的各种抗氧化物也会包含在内;二是因为科学证明人们长期使用的人工合成的抗氧化剂副作用大,科学家转而从自然界寻求天然抗氧化剂自然是合情合理的,天然抗氧化剂不仅副作用小,活性也比人工合成的抗氧化剂高出许多。本章把自然抗氧化剂分成十一大类做了详细介绍。重点介绍一种天然抗氧化剂丹酚酸组合,以展示天然抗氧化剂的魅力和前景。这种丹酚酸组合是从中药丹参中分离出的一种水溶性成分,含有丹酚酸B 57%、丹酚酸A 1%、迷迭香酸 35%,其具有很强的抑制心、脑、肝、肾脂质过氧化作用,对氧自由基和羟基自由基的清除率分别达到 48%和 98%。维生素C、维生素E、褪黑素、依达拉奉、银杏提取物EGb-761、石榴子、白藜芦醇均一一与丹酚酸的抗氧化、清除自由基活性做了比较,结果证明丹酚酸比上述已知抗氧化剂强数百倍至数千倍,是目前为止世界上发现的最强抗氧化剂之一,其用于治疗心、脑血管疾病,效果显著,已获得国家食品和药品监督管理局

批准的新药证书与生产证书。

第 8 章介绍了抗氧化清除自由基的体内、体外试验方法，对脂质过氧化代谢产物、脂质、DNA 和蛋白质损伤的标志物的检测技术也一并做了介绍。

关于氧自由基 (ROS) 的第一篇文章于 1945 年发表，至今在 Pubmed 收录的与 ROS 相关的英文文献约 117000 篇，其中 1200 篇为综述性文章，可见，有关自由基研究之广之深。但这一研究方兴未艾，参与进来的学科众多，探索的理论机制更复杂、更深入。中国科研人员应该奋起直追，在更高的起点和更关键的问题上积极参与，以期做出我们自己的贡献。例如，自由基既有损害人体的一面，又有有利于机体的一面，自由基介导的凋亡、自噬、低氧环境下的适应性改变和对干细胞的增殖与转化的影响，对维护健康、防治疾病、重塑细胞、延长寿命都有重要意义。NO 是气体分子，是相对分子质量只有 30 的自由基，但它也是体内一个非常重要的信使物质，在许多生理过程中发挥关键调节作用。寻找 NO 样的物质，阐明自噬，干细胞增殖、分化的关键机制，不正是我们未来的研究目标吗？再如，存在于动物、人体和植物界的抗氧化剂已发现不少，但距离发现高效、低毒、作用机制独特的抗氧化剂还有很长的路要走。

一个完美抗氧化剂需要满足的标准很高：①抗氧化剂产生抗氧化作用所需的有效浓度必须在 10^{-6} mol/L 或以下，只有如此才能使这类物质在体内作用靶点的浓度达到有效浓度；②抗氧化剂不仅要有抑制自由基生成作用，还要有清除自由基作用，并且清除率要能达到约 90%，只有这样才可能清除每一个细胞中细胞膜、细胞质和细胞核里的自由基，对存在于血液、体液和组织内的自由基也能彻底清除而不留下后患；③抗氧化剂与自由基结合后能使自由基毁灭或排出体外，不让自由基从结合部位重新释放出来；④抗氧化剂能有效地清除自由基但不损伤正常细胞。实际上，如果清除一两种

自由基是可能的，但要彻底清除所有类型的自由基是相当困难的，不过，保留一定量自由基对维持氧化还原稳态平衡也是必要的。看来，要找到符合以上标准的抗氧化剂任重而道远，时不我待。

限于水平，本书疏漏之处在所难免，敬请读者批评指正，以利于再版时修订补充。本书即将付梓，在此谨向参加编写的各位作者以及协助本书编写和出版的有关同志表示诚挚感谢。

张均田 杜冠华
2015 年 6 月于北京

目 录

- 第1章 氧化应激与氧自由基和氮自由基 /1
- 第2章 氧化应激对机体的危害 /37
- 第3章 线粒体与氧化应激 /57
- 第4章 体内抗氧化系统 /81
- 第5章 适度运动与限制饮食的抗氧化和延缓衰老作用 /105
- 第6章 植物来源的抗氧化剂 /129
- 第7章 丹参及丹酚酸的抗氧化活性及作用 /185
- 第8章 抗氧化试验研究的技术方法 /217

第 1 章

氧化应激 与氧自由基和氮自由基

中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所 陈 霁 张均田

苹果切开后渐渐变成黄棕色，铁会生锈，人脸上长痘痘，经常掉头发，慢慢变老，窥视细胞里的 DNA，人体细胞每天有 100000 条 DNA 损伤，这都是自由基捣的鬼。自由基有四大类：氧自由基、氮自由基、氯自由基、硫自由基。自由基分为内源性自由基和外源性自由基，前者来自细胞的正常代谢，来自酶促反应，来自炎症、缺血和其他病理过程；后者来自大气污染、水源污染、各种放射线辐射、粮食污染以及应激、感染等，雾霾天气 PM2.5 吸入肺部后再也挥之不去，成为肺炎、肺癌和心脏病的催化剂。

不过，自由基也不是百害而无一利，它在生命起源和进化中起一定作用，在身体内有杀菌、松弛血管以及激发保护机制，如在低氧、凋亡、自噬中发挥有益作用。

人类生活在复杂多变的环境里，每时每刻都受到来自体内体外化学的、物理的、生物的刺激，这对机体来讲就是一种应激。如果机体不能有效地处理和消除它，长期持续的积累，甚至急性的、突发的应激，就可能对身体造成伤害、促进衰老、引发疾病。在各种应激中，氧化应激是最常见、最严重的，它与衰老和疾病高度相关，必须重视它、防御它、消除它，把氧化应激损伤减至最低限度。人体抗氧化防御功能不足时，就要及时补充外源性抗氧化剂。本章旨在了解什么是氧化应激，哪些化合物、毒物乃至食物会引起氧化应激，它们出现在哪里或在哪儿生成等。正如上述，人的一生无时无刻不受到氧化应激，如何预防和治疗呢？了解和掌握本章及本书其他各章的科学知识，以及实验室和临床的大量科学数据，您就可以变成一个善于防御和治疗氧化损伤的人，成为至亲好友的健康护卫者。

1.1 氧化应激

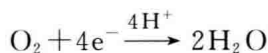
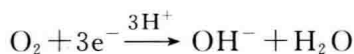
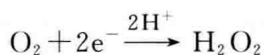
在谈什么叫氧化应激之前，需先了解 redox 一词的含义，redox 是描述氧化还原所产生的信号调节过程，redox 是氧化还原共存的一个级联反应。生理情况下，机体有少量自由基产生，而体内抗氧化防御系统有能力予以清除，redox 便处于稳态平衡（redox homeostasis）。但当氧自由基，又称活性氧（ROS）的生成过多或抗氧化防御系统的能力降低，redox 的稳态便失去平衡，此时的稳态失调或是急性的、短暂的，或是慢性的、长期的，在这种条件下，ROS 就能引起组织或细胞的损伤，这就叫氧化损伤

(oxidative damage) 或称氧化应激 (oxidative stress)。

1.2 ROS 和 RNS

ROS 和 RNS 分别称为氧自由基和氮自由基。什么是自由基呢？自由基 (free radical)，也称游离基，是指含有 1 个或奇数个电子并在一个轨道上具有未配对的电子，它总具有配对的倾向，所以自由基很容易发生失去或得到电子的反应，而显示出较活泼的化学性质。为了区分哪些分子是一般分子或自由基，通常在自由基结构中带有未成对电子的原子符号上角或附近标记一个小圆点以表示自由基。

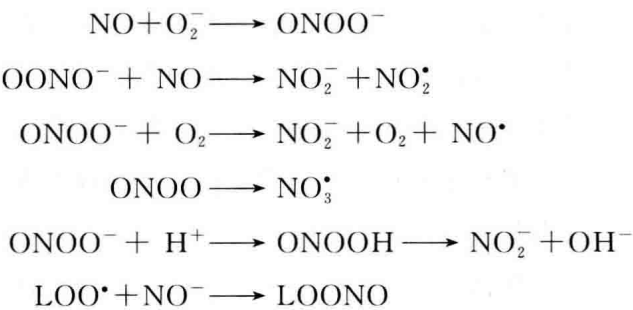
在化学反应中，由共价键结合的化合物在裂解时，由于电子转移及分配的方式不同，有两种不同的裂解方式，裂解时共有的电子对平均分配给两个原子或原子团或每个分子的片段，其产物为自由基，此种反应称均裂。自由基是体内氧分子获得的电子个数不同而生成不同的产物，如下列反应：



ROS 称为氧自由基，包括超氧阴离子 (superoxygen anion, $\text{O}_2^{\bullet -}$)，羟自由基 ($\cdot\text{OH}$)，单线态氧 ($^1\text{O}_2$) 和过氧化氢 (H_2O_2)，后者也具有类似氧自由基的性质和作用，故也归类于氧自由基范畴。

RNS 称为氮自由基 (reactive nitrogen species, RNS)，是一

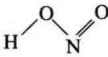
氧化氮 (NO) 及其衍生出的其他自由基的总称。NO 是一小分子的气体信使，有一未配对的电子，因而具有自由基性质。在大气污染中也能发现它的存在，NO 有许多重要的生理功能，如舒张血管、改善记忆、提高突触可塑性等。可是 NO 在机体处于不同环境中能被转化成各种自由基，如亚硝基阳离子 (NO⁺)、亚硝基阴离子 (NO⁻)，与超氧阴离子反应生成过氧亚硝基阴离子 (ONOO⁻)，NO 也可以与体内的脂质过氧化自由基 (LOO⁻) 起反应生成相关的产物，见下列化学方程式：



ROS 与 RNS 之间有何联系？ONOO⁻ 是活性氮与活性氧之间反应的产物，它的自由基活性比 O₂⁻ 和 NO⁻ 更强更稳定，可看做是 ROS 和 RNS 之间的联系吧。

ROS 和 RNS 有哪几类自由基及某些自由基产生的过程见表 1-1、表 1-2 和图 1-1。

■ 表 1-1 细胞和组织生成的活性氧自由基和活性氮自由基

ROS		RNS	
氧(O ₂)	O=O	一氧化氮(NO)	N=O
超氧阴离子(O ₂ ^{•-})	O=O ^{•-}	二氧化氮(NO ₂)	
羟基自由基(•OH)	H-O [•]	亚硝酸(HNO)	
氢过氧自由基,过羟基(ROO [•])		亚硝酸阴离子(NO ⁻)	N=O(-)

续表

ROS		RNS	
烷氧基($\text{RO}^\cdot$)	$\text{R}-\text{O}^\cdot$	亚硝酸酰阳离子(NO^+)	$\text{N}=\text{O}(+)$
过氧羟自由基($\text{HOO}^\cdot$)	$\text{H}-\text{O}-\text{O}^\cdot$	四氧化二氮(N_2O_4)	$\text{O}^--\text{N}^+=\text{O}=\text{N}^+-\text{O}^-$
过氧化氢(H_2O_2)	$\text{H}-\text{O}-\text{O}-\text{H}$	三氧化二氮;亚硝酸酐(N_2O_3)	$\text{O}^--\text{N}^+=\text{N}=\text{O}$
次氯酸(HOCl)	$\text{H}-\text{O}-\text{Cl}$	过(氧化)亚硝酸盐(ONOO^-)	$\text{O}=\text{N}-\text{O}-\text{O}^-$
次亚溴酸(HOBr)	$\text{H}-\text{O}-\text{Br}$	过氧亚硝酸(ONOOH)	$\text{O}=\text{N}-\text{O}-\text{O}-\text{H}$
臭氧(O_3)	$\text{O}=\text{O}^+-\text{O}^-$	烷基过氧(ROONO)	$\text{O}=\text{N}-\text{O}-\text{O}-\text{R}$
单线态氧($^1\text{O}_2$)	$^1\text{O}=\text{O}$	硝酸酰阳离子(NO_2^+)	$\text{O}=\text{N}^+=\text{O}$
		硝酸氯(NO_2Cl)	$\text{O}=\text{N}^+-\text{O}^-$ Cl

表 1-2 主要的内源性氧化剂

氧化剂	分子式	反应方程式
超氧阴离子	$\text{O}_2^{\cdot-}$	$\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \longrightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+$
过氧化氢	H_2O_2	$2\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ 次黄嘌呤 + $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \leftrightarrow$ 黄嘌呤 + H_2O_2 黄嘌呤 + $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \leftrightarrow$ 尿酸 + H_2O_2
羟基自由基	$\cdot\text{OH}$	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$
次氯酸	HOCl	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- \longrightarrow \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$
过羟基	$\text{ROO}^\cdot$	$\text{R}^\cdot + \text{O}_2 \longrightarrow \text{ROO}^\cdot$
过氧羟自由基	$\text{HOO}^\cdot$	$\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HOO}^\cdot + \text{OH}^-$

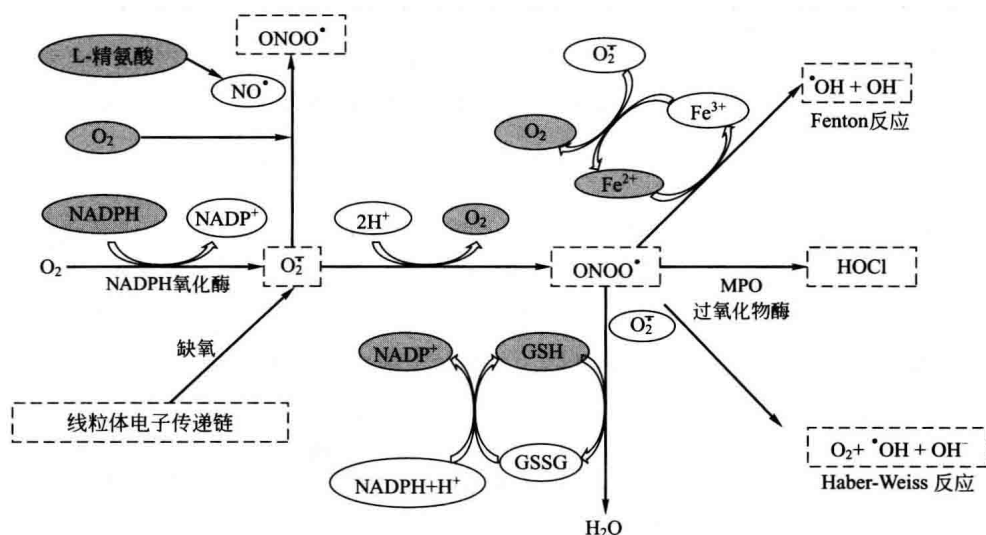


图 1-1 细胞和组织中自由基产生的过程

1.3 ROS 和 RNS 的来源

ROS 和 RNS 有两种来源, 即外源和内源。现分别讲述如下。

1.3.1 外源性 ROS 和 RNS

1.3.1.1 大气污染

大气污染引起的氧化应激原很多，最主要是雾霾，将作为重点进行介绍。雾是一种无毒无害的自然现象，而霾主要是空气中悬浮的大量微粒（particulate matter）和气象条件共同作用的结果，对人体健康危害很大。按空气动力学分为直径小于 $10\mu\text{m}$ 和 $2.5\mu\text{m}$

的细微粒（分别简称为 PM₁₀ 和 PM_{2.5}），它们能渗透到呼吸道并贮存在细支气管和肺泡里，能激活许多基因表达和转录因子，是致炎、致癌、神经退行性变、DNA 断裂和端粒缩短的危险因子，之所以危险还因为它含有具氧化还原性质的金属离子、多环芳香碳基化合物（PHA）和醌类化合物，后者可循环反复地产生自由基，PHA 通过 P450、氢化酶和二氢二醇脱氢酶被转化为醌，产生自由基。

（1）雾霾天气特征

雾是由大量悬浮在近地面空气中的微小水滴或冰晶组成的气溶胶系统，是近地面层空气中水汽凝结（或凝华）的产物。霾是一种稳态大气中大量细微的干尘粒等均匀地悬浮在空中，使水平能见度小于 10km、空气普遍混浊的现象。雾和霾是以相对湿度来定义和区别的，相对湿度达到 95% 以上的低能见度现象叫做雾，低于 80% 的称为霾，但在实际观测和研究中雾与霾却并不容易区分，所以经常统称为“雾霾天气”。雾霾天气是气象因素和空气污染因素共同作用的结果，较高的湿度、静风、逆温、空气污染物（颗粒物等）排放增加均可引起雾霾天气，其中气溶胶粒子作为凝结核，为雾霾的形成提供了必要的物质条件。

国外一些学者对雾霾天气的形成背景、原因及其类型特征、污染物分布等已做了很多系统性的研究。国内针对雾霾天气的研究主要集中在雾霾过程中气溶胶粒子大小和浓度特征、污染现状、时空分布等方面^[1,2]。

① 空间特征。中国的雾霾天气主要分布在华北的中部和西部、西北的东南部、华中大部、华东大部、华南西部和南部地区，平均雾霾天气年总日数为 10 天及以上（1961 年以来），分布特征呈现东多西少的态势，东部地区集中在长江中下游、华北和华南。其中雾霾天气高发区主要集中在人口比较密集的大城市和煤矿基地，如环北京地区、山西中南部地区、陕西和河南局部地区、长江三角洲、珠江三角洲等地，且在同一区域内，大中城市的雾霾天气较乡

村明显偏多。

② 季节及时间趋势。我国大部分地区雾霾日呈现为冬季多、夏季少、春秋居中的特点。全国平均年雾霾日数呈现明显的增加趋势,增长率为 1.19 天/10 年。经济发达、人口密集的特大城市雾霾天气日趋加剧。其中,1956~1975 年雾霾日较少,仅在四川盆地、辽宁中南部和新疆南部年雾霾日超过 50 天;1975 年以后雾霾日显著增加,到了 21 世纪,大陆东部大部分地区几乎年雾霾日数都超过 100 天,大城市甚至超过 150 天。

③ 气溶胶粒子特征。与欧美城市相比,我国许多城市的大气颗粒物污染相对比较严重,其中 PM_{2.5} 占了很大比例。根据美国国家航空航天局(NASA)发布的 2001~2006 年全球平均 PM_{2.5} 浓度卫星遥感图进行分析,我国的 PM_{2.5} 浓度水平位居世界前列,其中东部沿海地区 PM_{2.5} 污染较为严重,特别是华北平原的 PM_{2.5} 污染为全球最高值,达到 80 μg/m³ (2001~2006 年平均值)。雾霾天气发生时,空气中污染物特别是颗粒物浓度急剧增加,此外颗粒物上的一些成分也发生变化,例如有些地方雾霾期间大气 PM_{2.5} 微粒上比非雾霾期间更容易富集 Cu、Zn、Mn、Pb、Br、S、Cd、As 和 Cl 等元素,雾霾期大气中的 PM₁₀ 微粒上附着的 K、Al、Fe、Mn 等无机元素的质量浓度高于非雾霾期,雾霾期 PM₁₀ 上附着的多环芳烃(PAH)^① 浓度也明显高于非雾霾期,并且雾霾期间相对分子质量较低的组分如菲(Phenanthrene, PHE)、荧蒹(Fluoranthene, FLT)和芘(Pyrene, PYR)等的质量分数显著下降,相对分子质量较高的组分如苯并[b]荧蒹(Benzo[b]

① 多环芳烃(PAH)是分子中含有两个以上苯环的碳氢化合物,包括萘、蒽、菲、芘等 150 余种化合物。英文全称为 polycyclic aromatic hydrocarbon,简称 PAH。有些多环芳烃还含有氮、硫和环戊烷,常见的多环芳烃中具有致癌作用的多为 4~6 环的稠环化合物。国际癌症研究机构(IARC)(1976 年)列出了 94 种对实验动物致癌的化合物,其中 15 种属于多环芳烃,由于苯并[a]芘是第一个被发现的环境化学致癌物,而且致癌性很强,故常以苯并[a]芘作为多环芳烃的代表,它占全部致癌性多环芳烃的 1%~20%。多环芳烃(PAH)主要的 18 种化合物为:萘、苊烯、苊、芴、菲、蒽、荧蒹、芘、苯并[a]蒽、屈、苯并[b]荧蒹、苯并[k]荧蒹、苯并[a]芘、茚并[1,2,3-c,d]芘、二苯并[a,h]蒽和苯并[g,h,i]花、1-甲基萘、2-甲基萘。