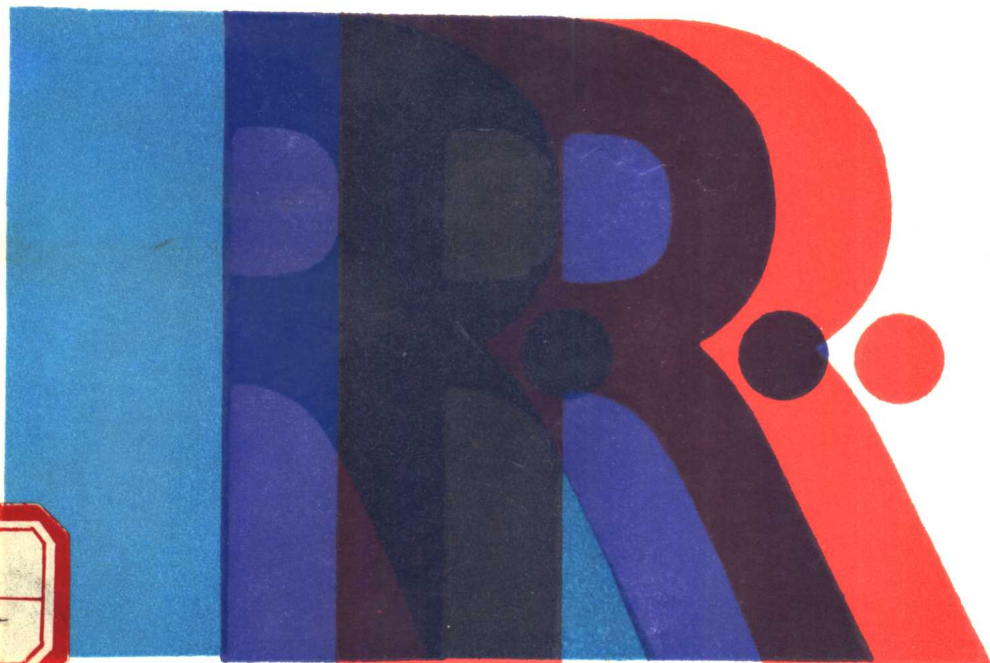


高等学校教材

Free Radical Biology

自由基生物学

郑荣梁 主编



高等教育出版社

自由基生物学

郑荣梁 主编

高等教育出版社

内 容 简 介

自由基生物学是一门新兴的边缘学科,受到国内外学者广泛关注,发展迅速。它与机体正常生理生化功能、组织损伤、肿瘤、衰老、环境污染、辐射效应、光敏作用、植物胁迫、药效机理等都有关系。全书共13章,首先介绍自由基的物理和化学的特性,生物体内的产生及防御,以及研究方法,然后介绍自由基与生命科学各分支间的联系及作用。兼顾基础知识及最新成果,为方便教学和科研,书中还列出了到1989年止的较多文献,便于深入追溯。可供生物学、医学、药学、农学、环境科学等方面的教学、科研和临床工作人员参考。

(京)112号

自由基生物学

郑荣梁 主编

*

高等教育出版社出版

新华书店总店北京科技发行所发行

河北省香河县印刷厂印装

*

开本 850×1168 1/32 印张 9.25 字数 240 000

1992年10月第1版 1992年10月第1次印刷

印数0001—940

ISBN 7-04-003386-0/Q·182

定价5.90元

引 言

自由基生物学萌芽于 50 年代初期,当时主要借助于电子顺磁共振仪来研究,由于仪器昂贵,不易为广大实验室采用,因此这一学科的进展较为缓慢,主要工作大多集中在放射生物学领域。1969 年发现超氧化物歧化酶后,新建的多种生物化学研究方法得到推广,尤其发现自由基与许多生物学基本问题、重大疑难病症、农业实践以及环境科学有关后,自由基生物学得到极大发展。自由基生物学是一门新兴的边缘学科,涉及物理学、化学、生物学、医学和农学等学科;即使在生物学内部,也与生物物理学、生物化学、分子生物学、细胞生物学、环境生物学等多个分支密切相关。我国在这个领域的研究起步并不晚,在 60 年代初期就有研究成果报道,近 5 年来更吸引了多种不同学科的工作者参与,许多研究生也对自由基生物学十分感兴趣。因此,出版一本系统阐述自由基基本理论及应用的教材是必要的。作者从 60 年代初就在生物物理课程中介绍自由基生物学的要略,从 1978 年开始为研究生正式开设自由基生物学课程。在中国生物物理学会教育专业委员会及高等教育出版社的委托下,勉为其难,将讲义充实成书。第一部分包括前 4 章,介绍基本理论及研究方法,是初学者必须重点学习的。第二部分介绍自由基在生物学、医学和农学等方面的实际作用,以供读者选择有兴趣的章节重点阅读。考虑到有些人只愿涉猎个别专题而无暇浏览全书,文中特别注出与特定专题有关的前后章节序号,便于找到相关内容。本书注意反映国内外最新成就,并尽量注明文献来源,以方便读者深入钻研。文献查阅到 1989 年,个别文献是 1990 年发表的。本书第 3 章中有关中药的清除自由基作用

和第4章中有关自由基的生物化学研究方法是请中国医学科学院药物所刘耕陶研究员和卢华同志撰写的；第5章请中国科学院生物化学所李文杰研究员撰写；中日友好医院临床医学研究所陈雨亭同志参加了第11章的部分工作；兰州大学景文野同志绘图；许多同道惠赠了原始文献，在此一并致谢。

目 录

引言	1
第1章 自由基的产生及化学性质	1
1.1 什么是自由基	1
1.2 自由基的产生	2
1.2.1 热解	4
1.2.2 光解	7
1.2.3 氧化还原法产生的均裂	8
1.2.4 加氢或夺氢产生的自由基	9
1.3 自由基的化学反应	10
1.3.1 复合反应	10
1.3.2 包括夺氢在内的转换反应	10
1.3.3 芳香族取代反应	11
1.3.4 氧的消耗	12
1.3.5 歧化反应	12
1.3.6 加成反应	12
1.3.7 链锁反应	13
1.3.8 脂类过氧化作用	14
1.3.9 稳定性自由基	17
第2章 活性氧	20
2.1 活性氧及其电子排布	21
2.2 活性氧在生物体中的产生	23
2.2.1 黄嘌呤氧化酶	23
2.2.2 髓过氧化物酶	26
2.2.3 NADPH氧化酶	26
2.2.4 小结	27
2.3 活性氧的毒性	27
2.3.1 羟自由基的毒性	27

2.3.2	超氧阴离子的毒性	30
2.3.3	过氧化氢分子的毒性	34
2.3.4	单线态氧的毒性	35
2.3.5	脂类过氧化产物的毒性	37
2.4	活性氧和金属诱发脂类过氧化	39
2.4.1	单线态氧的诱发作用	39
2.4.2	超氧阴离子和羟自由基的诱发	40
2.4.3	臭氧的诱发	40
2.4.4	金属的诱发	41
2.5	活性氧对DNA的损伤	42
第3章	自由基清除剂	47
3.1	引言	47
3.2	天然自由基清除剂	48
3.2.1	水溶性清除剂	48
3.2.2	脂溶性清除剂	52
3.3	外源性抗氧化剂	54
3.3.1	食品中的抗氧化剂	54
3.3.2	药品中的抗氧化剂	56
3.4	中药的清除自由基作用	刘耕陶 57
3.4.1	抑制 CCl_4 引起的转氨酶升高	57
3.4.2	抑制 CCl_4 引起的丙二醛生成	58
3.5	活性氧的清除	59
3.5.1	清除活性氧的酶	59
3.5.2	活性氧的清除剂	62
3.6	借助清除剂来揭露活性氧的毒性	63
第4章	自由基的研究方法	68
4.1	电子顺磁共振原理	68
4.2	谱线分析	71
4.2.1	等性核引起的分裂	71

4.2.2 不等性核引起的分裂	73
4.3 自旋捕集技术	75
4.3.1 自旋捕集剂	76
4.3.2 自旋加合物的特性	79
4.3.3 加合物 EPR 波谱分析	82
4.3.4 细胞内外自由基的区别	85
4.3.5 注意事项	86
4.4 脉冲射解与停流技术	87
4.4.1 脉冲射解法	87
4.4.2 停流法	89
4.4.3 反应速率	90
4.5 超微弱生物化学发光法	91
4.5.1 化学发光原理	91
4.5.2 化学发光与脂类过氧化	92
4.6 超氧阴离子的测定	卢华 刘耕陶 94
4.6.1 黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶系统	94
4.6.2 微粒体—NADPH—棉酚系统	95
4.7 过氧化氢的测定	卢华 刘耕陶 95
4.7.1 硫氰化铁法	95
4.7.2 荧光法—辣根过氧化物酶(HRP)法	96
4.8 过氧化产物的测定	卢华 刘耕陶 96
4.8.1 丙二醛(MDA)的测定	96
4.8.2 共轭双烯的测定	99
4.9 抗氧化酶的测定	卢华 刘耕陶 101
4.9.1 过氧化氢酶	101
4.9.2 谷胱甘肽过氧化物酶	101
4.9.3 超氧化物歧化酶	102
第5章 自由基的生理功能	李文杰 107
5.1 吞噬作用	107
5.1.1 超氧阴离子自由基的形成	109

5.1.2	髓过氧化物酶中介的杀菌体系	110
5.1.3	过氧化氢的非酶促的杀菌毒性	112
5.1.4	羟自由基的形成及其杀菌毒性	112
5.1.5	单线态氧的形成及其杀菌毒性	113
5.2	前列腺素的合成	113
5.3	脂肪加氧酶的产物	115
5.4	木脂素的形成及毁坏	116
5.5	生殖和胚胎发育	117
5.6	酶促羟化作用对人体的重要性	118
5.6.1	胶原蛋白的合成	118
5.6.2	解毒作用	118
5.7	凝血酶原的合成	119
5.8	果实的成熟和植物组织对创伤的“响应”	121
5.8.1	果实的成熟和老化	121
5.8.2	植物对创伤的“响应”	121
5.9	其他	122
5.9.1	环核苷酸的生物合成	122
5.9.2	植物的光合作用	122
第6章	自由基对组织的损伤	125
6.1	缺血—重灌流损伤机理(小肠)	125
6.1.1	氧自由基在缺血—重灌流损伤中的作用	125
6.1.2	氧自由基产生的机理	127
6.1.3	缺血时间与损伤的关系	130
6.1.4	脂类过氧化与损伤的关系	131
6.2	其它器官	131
6.2.1	胃、胰、肝	132
6.2.2	心	136
6.2.3	肌肉	137
6.2.4	脑	137
6.2.5	皮肤、肺	138

6.2.6 眼	139
6.3 休克的治疗	141
6.4 大骨节病与克山病	142
第7章 自由基与癌(总论)	149
7.1 癌组织的 EPR 信号	149
7.2 致癌物活化生成的自由基	153
7.2.1 多环芳烃	154
7.2.2 芳胺、酰胺、胺、羟胺、亚硝基和硝基化合物	155
7.2.3 亚硝胺类	156
7.3 自由基诱发和促进癌变	156
7.3.1 诱发阶段	157
7.3.2 促癌阶段	158
7.4 癌细胞中的自由基	159
7.5 自由基的抗癌作用	163
7.5.1 增加癌细胞中活性氧以杀伤细胞	163
7.5.2 抑制 SOD 以增加癌对活性氧的敏感性	165
7.5.3 外加 SOD 以弥补癌 SOD 活性的低下	165
7.5.4 保护 DNA 免遭自由基攻击	166
第8章 自由基与癌(各论)	172
8.1 苯并比(a)致癌的自由基机理	172
8.2 香烟的自由基	175
8.2.1 吸烟致癌	175
8.2.2 烟的致癌物	176
8.2.3 烟的自由基	177
8.2.4 香烟的生物学作用	178
8.3 空气中的自由基	180
8.4 脂类过氧化物与癌	183
8.4.1 脂类过氧化物抑制细胞分裂	183
8.4.2 癌细胞不易发生脂类过氧化	185

8.4.3	癌组织的抗氧化力	186
8.4.4	脂类过氧化物浓度制约着癌细胞的分裂	186
第9章	自由基与衰老	192
9.1	生物抗氧化剂与寿命的关系	192
9.1.1	SOD、尿酸、胡萝卜素和维生素E	193
9.1.2	抗坏血酸、GSH、GSH-P _x 和CAT	195
9.1.3	血浆铜蓝蛋白	196
9.2	组织抗氧化力与寿命的关系	196
9.3	组织中过氧化物含量与寿命的关系	197
9.4	组织抗氧化力与衰老的关系	198
9.5	外加抗氧化剂对衰老的影响	200
9.6	代谢率与衰老	201
9.7	脂褐质(老年斑)	202
9.8	限食与性别	203
9.9	结束语	203
第10章	辐射生物学效应与光敏作用	208
10.1	放射生物学效应	208
10.1.1	射线对水的作用	208
10.1.2	射线对DNA的作用	211
10.1.3	放射防护	213
10.1.4	放射致敏	224
10.2	光敏现象	225
10.2.1	动物的光敏现象	226
10.2.2	人的光敏现象	227
10.2.3	视网膜损伤	229
10.2.4	癌的光疗	230
10.2.5	不需氧的光敏现象	232
第11章	SOD的生物学特性及临床应用 ··· 陈雨亭 郑荣梁	238
11.1	SOD的生物学特性	238

11.1.1	SOD 对细胞膜的通透性·····	238
11.1.2	SOD 在体内的分布和半衰期·····	240
11.2	各种疾病的 SOD 变化·····	242
11.3	SOD 的临床应用·····	244
11.3.1	SOD 治疗自身免疫病·····	244
11.3.2	SOD 与放疗联合治疗癌症·····	245
11.3.3	SOD 治疗骨髓损伤·····	246
11.3.4	SOD 治疗炎症·····	248
11.3.5	SOD 治疗阴茎海绵体硬结疼痛(Peyronie 氏病)·····	249
11.3.6	SOD 消除肌肉疲劳·····	250
11.4	SOD 临床应用的安全性·····	250
第 12 章	植物体内的自由基反应·····	256
12.1	植物体内超氧阴离子的产生与清除·····	256
12.2	衰老·····	257
12.3	逆境中的自由基·····	260
12.3.1	高浓度氧、二氧化硫与臭氧的损伤作用·····	260
12.3.2	干旱·····	265
12.3.3	低温·····	266
12.3.4	盐份·····	267
12.3.5	光氧化作用·····	268
第 13 章	糖和蛋白质的自由基反应·····	272
13.1	单糖自动氧化·····	272
13.2	单糖自动氧化的生物学作用·····	275
13.3	超氧阴离子和过氧化氢对血红蛋白的反应·····	276
13.4	血红蛋白的氧化还原反应·····	277
附录	缩写符号·····	280

第1章 自由基的产生及化学性质

1.1 什么是自由基

本章仅极简单地介绍有关自由基化学的一些基本知识, 这些知识对于理解以后章节的内容是必需的。

当 A 与 B 两个分子或原子间形成共价单键时, 可以看作它们共享一对电子, 这两个电子既可以是一个分子所提供的, 也可以是每个分子各贡献出一个电子, 前者称为配位作用, 后者称为共价结合



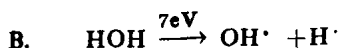
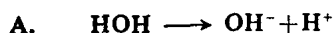
其逆过程, 即当一个共价键离解时, 必须要供给自由能。反应式(1)的逆过程称为异裂(heterolysis)反应式(2)的逆过程称为均裂(homolysis)。

在均裂时所产生的分子或原子含有一个不配对电子(unpaired electron), 这种分子常具有高度化学活性。正因为如此, 它们的寿命也极短暂。这些可以单独存在的具有一个或几个不配对电子的分子或原子就称为自由基(free radical)。经常在分子式上加一个黑点作为自由基的特征标记, 以表示存在着不配对电子, 例如三氯甲基($CCl_3\cdot$), 氯原子($Cl\cdot$), 羟基($OH\cdot$)和黄素半醌($FH_2\cdot$)。

有些自由基即使在室温的溶液中也是稳定的, 例如, 氧(一个稳定的双基)和二苯苦味酰肼。

生物分子在体内也会发生共价键均裂, 从而产生自由基。为

了引发这种解离所需的能量常由辐射(例如紫外辐射)或局部高温(例如激光束冲击固体组织)所提供。有时能源也来自化学反应,例如过氧化氢被铁催化分解(见 2.4)。拿生物中最普通也是最重要的水分子来说,水既可分解成正常见到的离子化合物(A),也可分解成自由基(B)



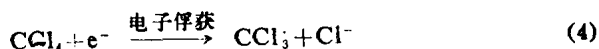
反应 A 可自发地进行,而反应 B 需要外加几个电子伏特的能量。水在受到电离辐射吸收能量后产生这种典型的自由基反应,此时生成两个带不成对电子的自由基 $\cdot\text{OH}$ 及 $\text{H}^\cdot$, 它们的反应性显著大于 OH^- 和 H^+ 。

有些自由基带有负电荷或正电荷,它们既是离子,又是自由基,所以叫做离子自由基或离子基。离子基往往又是氧化还原反应的中间产物。

负离子基可以由中性分子接受一个电子得到。也可以在氧化时失去一个电子生成正离子基。

1.2 自由基的产生

一般而言,自由基是通过共价键的均裂而产生的,也可通过电子俘获而产生。



共价键均裂时需要输入能量,称为键裂解能 D , 表 1.1 列出了一些键的裂解能。

有时,一个新的自由基可以从一个自由基 $\text{A}^\cdot$ 与分子 $\text{B}-\text{C}$ 发

表 1.1 键裂解能 $D(\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1})^*$ (Cottrell, 1954)

键	D	键	D
CH_3-H	101	CCl_3-F	102
$-\text{CH}_2-\text{H}$	92	$\text{OH}-\text{H}$	117
$=\text{CH}-\text{H}$	120	$\text{OH}-\text{OH}$	52
$\equiv\text{C}-\text{H}$	80	$\text{HOO}-\text{H}$	90
$\text{Cl}-\text{Cl}$	53	CH_3-OH	90
CH_3-Cl	81	$\text{CH}\equiv\text{Cl}$	230
CCl_3-Cl	68	CH_3-CH_3	83
CCl_3-Br	49	CH_3-NH_2	80
CCl_3-H	90	NH_2-NH_2	60

*注: $1\text{kcal}=4.18\text{kJ}$

生反应后,生成 $\text{A}-\text{B}$ 和 $\text{C}^\cdot$ 。如果这个反应需要经过一个过渡状态 $\text{A}\cdots\text{B}\cdots\text{C}$, 那么其能量变化可以用图 1.1 表示。

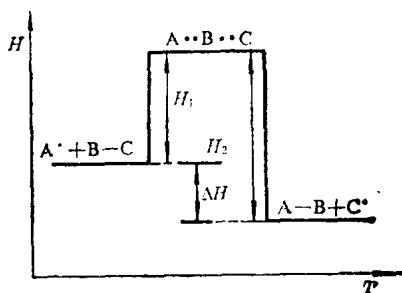


图 1.1 自由基配位反应的热焓变化(Slater, 1972)

T : 时程; H : 热焓

图 1.1 中 $\Delta H (= H_1 - H_2)$ 表示反应的热焓(enthalpy)变化, H_1 表示第一个反应的活化能, H_2 表示第二个反应的活化能, 在这反应中包括(1) $\text{B}-\text{C}$ 键的断裂, (2) $\text{A}-\text{B}$ 键的形成, 所以

$$D(\text{B}-\text{C}) - D(\text{A}-\text{B}) = \Delta H$$

使共价键裂解所需的能量可来自(1)热,(2)电磁辐射,(3)氧化还原偶联反应。下面将分别叙述:

1.2.1 热解(pyrolysis)

很多化合物,特别是含有弱键的化合物可以发生热均裂反应,生成活泼自由基。所需温度依赖于化合物均裂键的浓度。一般说键的裂解能在 $40-50 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 时,需 $200-400^\circ\text{C}$ 。这些键包括 $\text{Br}-\text{Br}$, $\text{O}-\text{N}$, $\text{N}-\text{N}$, $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{N}$, 少数情况下的 $\text{C}-\text{H}$ 和 $\text{C}-\text{C}$ 键;裂解能在 $30-40 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 时,需要温度较低,在 $50-200^\circ\text{C}$ 之间,这是产生自由基的较理想的方法,例如某些含有 $\text{O}-\text{O}$ 弱键的过氧化物及含有 $\text{C}-\text{N}$ 弱键的偶氮化合物分解很容易,可在一般温度下产生活泼的自由基。



$\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{H}$, $\text{C}-\text{O}$ 键的裂解能约为 $90 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 相当于 $450-650^\circ\text{C}$, 这也是石油裂化时所需要的温度范围。

随着温度的增加有机物的均裂也就增加(图 1.2)。

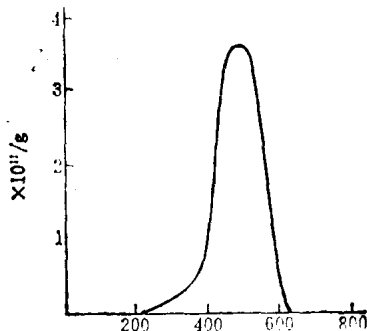


图 1.2 油蒸馏残渣热解时自由基浓度随温度而增加(Ingram, 1969)

一般地说, 键裂解能越高, 产生自由基所需的外加能量就越大, 生成的自由基也越不稳定。

表 1.2 烷烃C—H键裂解能(kcal·mol⁻¹)

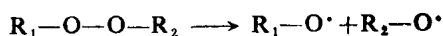
化 合 物	C—H键能	稳定性次序
(CH ₃) ₃ C—H	89	(CH ₃) ₃ C·
(CH ₃) ₂ CH—H	92	(CH ₃) ₂ CH·
CH ₃ CH ₂ —H	96	(CH ₃)CH ₂ ·
CH ₃ —H	101	CH ₃ ·

下面分别叙述与生物学有密切关系的几种化合物的热解:

1. 2. 1. 1 过氧化物的热解

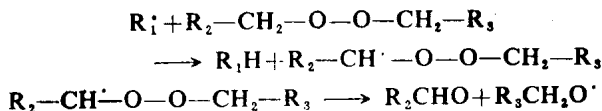
过氧化物中的 O—O 键比许多 C—C 键 或 C—O 键弱, 例如过氧化苯甲酰的键裂解能为 30kcal·mol⁻¹, 而过氧化叔丁基为 37 kcal·mol⁻¹。过氧化物的裂解至少有三种不同机理:

1. 简单的单一分子均裂



对较稳定的过氧化叔丁基的解离常数 $K=10^{-6}e^{-37000/RT}S^{-1}$ 由此可算出在 20°C、60°C、100°C 和 180°C 时的半衰期分别为 9500 年、5 年、4 天和 40 秒。

2. 过氧化物与外源性基团发生反应而产生的裂解[例如夺氢 (hydrogen abstraction)]



3. 爆炸引起的均裂。使用过氧化物时经常发生爆炸, 其机理至今不明。

如果加入烯烃类或胺类, 则氧化物更易发生均裂。当有胺时, 过氧化苯甲酰的均裂大大加速, 叔胺常被用作多聚反应的催化剂。