

基因自由
生物学导论



医用自由基生物学导论

莫 筒 主编

莫 筒 吕 问 孙淑芬
李爱群 郭正仁 编写

人 民 卫 生 出 版 社

内 容 简 介

本书主要介绍自由基在生物体系中的作用。全书分五部分：第一部分为自由基的基本知识，包括自由基和活性氧的生成、结构、性质、测定；第二部分为活细胞内的自由基，包括自由基在细胞内的产生、清除、危害、用途；第三部分为自由基与疾病，包括自由基与炎症、局部缺血、循环休克、衰老、肿瘤以及消化、呼吸、循环、神经等系统一些疾病的关系；第四部分为自由基和自由基清除剂在医学中的应用，包括自由基和自由基清除剂用于诊断、治疗的一些初步研究；第五部分为研究自由基在生物体系中作用的方法，包括电子自旋共振法、自旋捕捉法、超氧化物歧化酶和活性氧的检测、谷胱甘肽过氧化物酶和脂质过氧化反应产物的检测。

本书可作为自由基生物学的入门读物，供化学、生物学、医学等方面的科学工作者参考。

医用自由基生物学导论

莫 简 主编

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

北京市卫顺排版厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米 32开本 7.5印张 164千字

1989年2月第1版 1989年2月第1版第1次印刷

印数：00,001—3,730

ISBN 7-117-00918-7/R·919 定价：5.05元

〔科技新书目186—152〕

前 言

近年来，自由基在生物体系中的作用已成为许多学科感兴趣的研究课题，并已发展成为一门新学科——自由基生物学。1985年，我们在第四军医大学为研究生和高年级学生首次开设了一门新课——医用自由基生物学导论。现将该讲义经补充修改出版，奉献于广大读者。

自由基生物学的内容很丰富，资料很多，但可以概括为四个要点：①在生物体内既有产生自由基的体系，又有清除自由基的体系；②自由基既可给机体造成损害，机体也可利用自由基；③自由基在体内的生成与清除必须保持平衡，许多疾病都与其失调有关；④自由基在体内生成过多可以引起疾病，但在适当的条件下自由基也可用于疾病的防治。根据这些要点，从医学工作者的需要出发，并考虑到需要有一本入门的读物，我们就以下四个方面对这门学科作一介绍：①自由基化学的基本知识，其中包括自由基的化学和活性氧的化学，即第一、二章；②活细胞内的自由基，其中包括自由基在细胞内的生成、清除、危害与用途，即第三、四章；③自由基与一些疾病的关系，其中包括炎症、局部缺血、休克、衰老、肿瘤、高血压、糖尿病、脑血管痉挛以及一些化学物质和物理因子对机体的损害，即第五～八章；④自由基和自由基清除剂在医学中的应用，其中包括自旋标记法在检测和诊断方面的应用、自由基在抗癌中的作用等，即第九章。这样的安排，可以由浅入深，前后连贯，容易理解。另外，还介绍了一些研究自由基在生物体系中作用的实验方法。对常

用的方法，还附有实验举例，详细地介绍其基本原理、仪器设备、操作步骤，如电子自旋共振法和自旋捕捉法检测自由基，超氧化物阴离子自由基的检测和超氧化物歧化酶活力的测定，脂质过氧化反应产物的检测和谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定等，即第十~十二章。我们认为，只要掌握这些理论和实验方法，就可为深入学习自由基生物学和开展有关科研打下必要的基础。

本书编写主要由莫简执笔，吕问、孙淑芬、李爱群、郭正仁参加编写了第七、八、十一、十二等章的部分内容。第一与十章、三与四章、五与七章及第六章，承蒙徐广智、万芷芳、温光楠、周元凯等教授分别审阅，并提出宝贵修改意见。在此，一并致以衷心的感谢。

由于这是一门边缘学科，涉及面较广，许多内容亦属于化学、生物学、生物化学、生物物理、病理学、免疫学、药理学、放射医学等学科，作者在这些方面的知识有限，因此书中的错误和缺点可能不少，恳乞读者多给予批评指正。

目 录

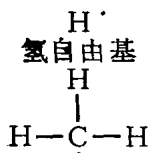
前言	[1]
第一章 自由基的基本知识	1
第一节 自由基的概念	1
第二节 自由基的产生	2
第三节 自由基的反应	4
第四节 自由基的检测	8
第二章 活性氧的化学	13
第一节 超氧化物阴离子自由基	13
第二节 过氧化氢	20
第三节 羟自由基	21
第四节 单线态分子氧	25
第五节 脂质过氧化物	30
第三章 自由基在细胞内的生成和细胞内自由基的清除	38
第一节 自由基在细胞内的生成	38
第二节 细胞内自由基的清除	47
第四章 自由基对细胞的损害和细胞对自由基的利用	59
第一节 自由基对细胞的损害	59
第二节 细胞对自由基的利用	72
第五章 自由基与炎症、局部缺血及休克	93
第一节 自由基与炎症	93
第二节 自由基与局部缺血	101
第三节 自由基与休克	108
第六章 自由基与衰老、肿瘤	113

第一节	自由基与衰老·····	113
第二节	自由基与肿瘤·····	123
第七章	自由基与消化系统、呼吸系统疾病·····	138
第一节	自由基与消化系统疾病·····	138
第二节	自由基与呼吸系统疾病·····	143
第八章	自由基与循环系统、神经系统疾病·····	154
第一节	自由基与循环系统疾病·····	154
第二节	自由基与神经系统疾病·····	160
第九章	自由基和自由基清除剂在医学中的应用·····	165
第一节	自由基在检测和诊断中的应用·····	165
第二节	自由基清除剂在检测和诊断中的应用·····	169
第三节	自由基在预防和治疗中的应用·····	170
第四节	自由基清除剂在预防和治疗中的应用·····	173
第十章	电子自旋共振法及自旋捕捉法·····	178
第一节	电子自旋共振法·····	178
第二节	自旋捕捉法·····	191
第十一章	研究活性氧在生物体系中作用的常用方法·····	196
第一节	探测活性氧在生物体系中作用的初步实验·····	196
第二节	生物体系中活性氧的测定·····	199
第三节	超氧化物歧化酶活力的测定·····	204
第十二章	体内脂质过氧化反应的检测·····	214
第一节	脂质过氧化反应产物的检测·····	214
第二节	谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定·····	228

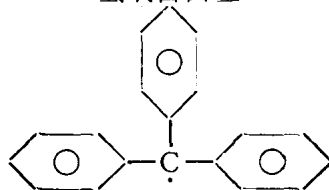
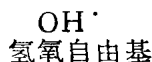
第一章 自由基的基本知识

第一节 自由基的概念

自由基(free radical) 又称游离基, 就是具有未配对电子的原子或原子团。如:



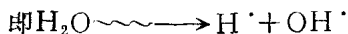
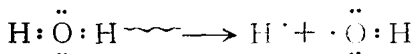
甲基自由基



三苯甲基自由基

结构式中的“·”表示一个电子, “—”表示一个共价键, 即一对共用电子。

在化学反应中, 反应物的分子往往要发生共价键的断裂。共价键的断裂, 可以分为两种方式: 均裂与异裂。在发生均裂时, 原来的共用电子对变为分属于两个原子或原子团, 即形成自由基。如水分子在放射线作用下发生辐射分解时, 即通过均裂而产生氢自由基 (H·) 和氢氧自由基 (OH·)。



发生异裂时, 原来的共用电子对由共价键一侧的原子或原子团独占, 形成带正负电荷的离子。如水分子在通常条件

下的电离，即通过异裂，形成氢离子 (H^+) 和氢氧根离子 (OH^-)。

自由基最基本的特征是具有未配对的电子，所以，具有未配对电子的离子、分子也是自由基。氧分子($:\ddot{O}-\ddot{O}:$)具有两个未配对的电子为双自由基 (biradical)。氧分子得到一个电子后，既带一个负电荷，又带一个未配对的电子，既是阴离子，又是自由基，称为超氧化物阴离子自由基 (O_2^- , superoxide anion radical)。

许多化学反应都发生共价键的均裂，产生自由基，因此，自由基并非罕见。在日常生活中，经常遇到自由基。例如，汽油燃烧、油漆变干、油脂变酸的过程中，就有自由基生成。

自由基的性质活泼，很易进一步反应变为稳定的分子，大多数寿命都非常短，因此，多数只能作为反应中间物存在，检测和分离都较困难。

早在十八世纪末，化学家就提出了“基”的概念，并企图分离它们。但是，直到1900年，才由Gomberg获得第一个令人可信的自由基——三苯甲基。又经过三十多年，在Kharash、Flory、Hey和Water发表一系列论文和重要综述后，自由基在化学反应中的重要作用才受到较普遍的重视。然后，在这方面展开了广泛的研究，并很快地形成了一门新的学科——自由基化学。近年来，自由基在生物体系中的作用，又成了人们很感兴趣的研究课题，并正在形成一门新学科——自由基生物学。

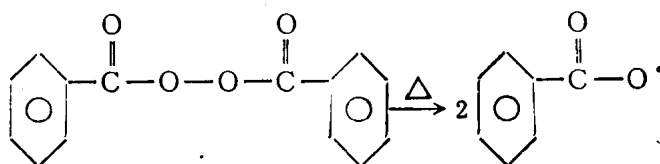
第二节 自由基的产生

自由基的产生，通常可发生于以下几类反应中。

一、共价键的热分解

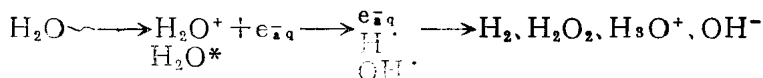
原则上只要有足够高的温度，任何共价键都可以裂解而产生自由基。当然，由于共价键的牢固程度不同，有些较难，有些较易。较易裂解而产生自由基的化合物有过氧化物、偶氮化合物及金属有机化合物等。

例如，在实验室和工业上常作为聚合反应引发剂的过氧化二苯甲酰，就是一种易受热分解而产生自由基的化合物。



二、辐射分解

电离辐射可以使许多物质发生分解，产生自由基。例如，在 α -射线、 γ -射线的作用下，水分子可以分解成水化电子 (e_{aq}^-)、氢自由基 ($H\cdot$)、氢氧自由基 ($OH\cdot$)，然后才变为氢分子 (H_2)、过氧化氢 (H_2O_2)、水化氢离子 (H_3O^+) 及氢氧根离子 (OH^-) 等最终产物。



电离辐射可以使人和动物产生放射病，其原发机制就涉及自由基的作用。

在紫外线作用下，许多物质也可以分解而产生自由基。紫外线引起的损伤，也涉及自由基的作用。

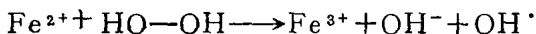
可见光也可以引发一些自由基反应。如将氯气和甲烷混

合，以可见光照射，可以通过自由基反应而生成一氯甲烷、二氯甲烷、三氯甲烷等化合物。

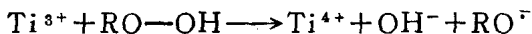
三、单电子氧化还原反应

在氧化还原反应中，如进行单电子转移，则可产生自由基。

过渡金属离子都是氧化还原剂，易发生单电子氧化还原反应，用它们很容易产生自由基。例如，将二价铁离子加入到过氧化氢中，可以产生氢氧自由基（OH·）。



用类似的方法，还可以产生烷氧自由基（RO·）。



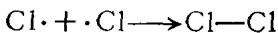
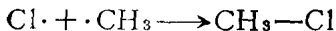
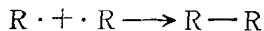
在体内，许多酶反应是进行单电子转移，也可以产生自由基。

第三节 自由基的反应

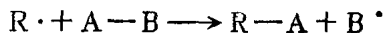
一、自由基反应的类型

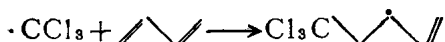
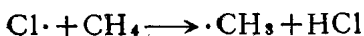
自由基反应的类型，主要有以下几种：

1. 自由基的结合 两个自由基很容易相互结合，形成一个非自由基产物。如：

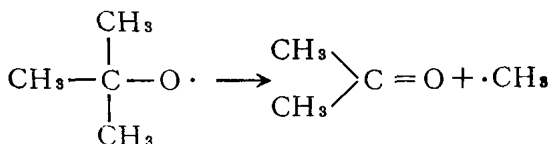


2. 自由基的转移 自由基也很容易与别的分子反应，产生一个新的自由基。如：





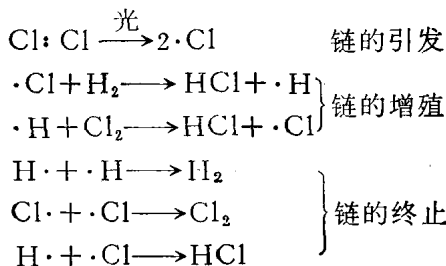
3. 自由基的裂解 自由基可以在其β-位置发生键断裂, 形成一个新的自由基和稳定的分子。如:



此外, 自由基还可以发生一些其它类型的反应, 如自由基的重排、歧化、氧化还原等等。

二、自由基反应的特点

自由基反应往往都是链式反应, 例如氯气与氢气变为氯化氢, 要经过如下的一系列反应:



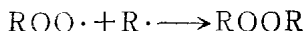
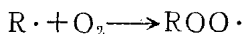
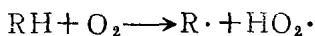
在一个自由基链式反应中, 只要有很少量的自由基产生, 整个反应就可以被启动, 这步反应, 称为链的引发。然后, 就反复进行自由基的消失与生成的反应, 从而导致基质的大量消耗和各种产物的生成, 这步反应称为链的增殖。最后, 当自由基与自由基结合, 则可使此链式反应不再往下进行, 这步反应叫链的终止。由以上可以看出, 在一个自由基链式

反应中，只要加入很少量的引发剂，使之产生引发基，整个反应就可以被启动，并加速反应的进行，同时，只要加入很少量的自由基清除剂或自由基反应抑制剂，整个反应就可以停止或减慢。这是自由基反应的一个重要特点，常常可用来判断一个变化是否涉及自由基反应。

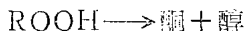
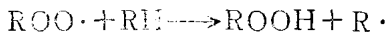
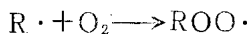
对自由基反应具有引发或抑制作用的物质很多，常用的有以下几种：

1. 氧 少量的氧可以引发自由基反应，而大量的氧则可以抑制自由基反应。

氧对自由基反应的引发，可以通过先与反应物作用，使之产生自由基；再与自由基反应，形成更活泼的自由基，从而使反应加快。



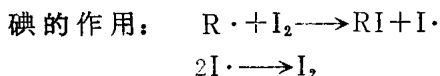
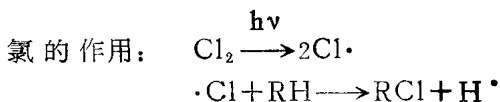
氧对自由基反应的抑制，可以通过先形成氢过氧化物，然后，此氢过氧化物再通过歧化反应变为较稳定的化合物，从而使自由基不再按链式反应的途径继续进行。



在加入氧后，如能改变反应速度或检测出过氧化物，则说明该反应可能为自由基反应。但是，在作出此结论时，必须谨慎，因为有些自由基反应可不受氧的影响，有些分子或离子反应亦可在氧的作用下转变为自由基反应。

2. 卤素 卤素对自由基反应可产生很显著的影响，特别

是在有光线存在时，加入氯，可使自由基反应加快；加入碘，可使自由基反应减慢。

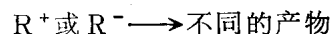
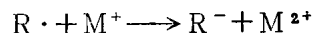
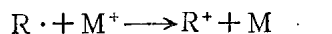


利用卤素的作用判断一个变化是否涉及自由基反应，如同氧一样，也必须谨慎。

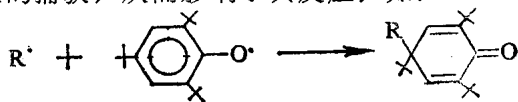
3. 过渡元素的金属离子 有些过渡元素的金属离子及化合物，能显著改变自由基反应的速度。特别是涉及过氧化物或氢过氧化物的反应，可以增快其速度。如：



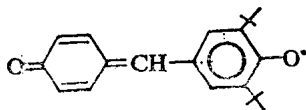
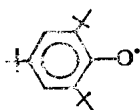
同时，这些过渡元素的金属离子亦可改变反应的产物。如：



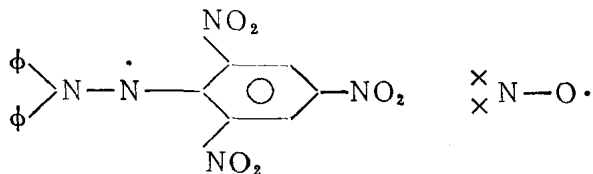
4. 稳定自由基 在一个自由基反应中，加入稳定自由基，可导致自由基反应被抑制或减慢其速度。这是由于发生了自由基的捕获，从而影响了其反应，如：



常用的稳定自由基有以下几种：

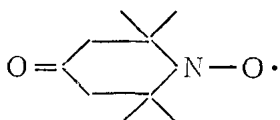


2,4,6-tri-t-butylphenoxy galvinoxyl



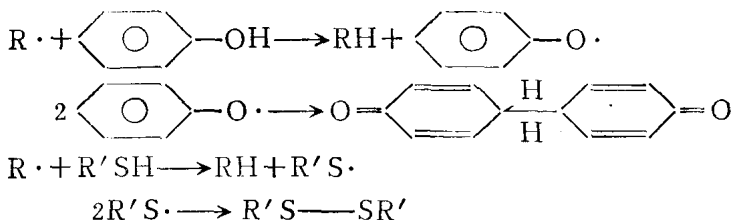
diphenylpicrylhydroazyl
(DPPH)

di-t-butyl nitroxide



2,2,6,6-tetramethyl-4-peridone-N-oxyl

5. 自由基反应抑制剂 自由基反应抑制剂可使其反应速度减慢，或使整个反应受到抑制。作为自由基反应抑制剂的物质，通常都是一些具有活泼氢原子的化合物，如酚或硫醇。它们可以通过给与氢原子使自由基变为稳定的分子，变为较稳定的自由基或稳定的分子，如：



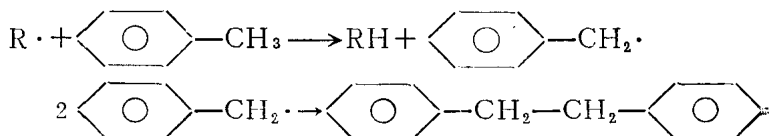
第四节 自由基的检测

自由基的检测，既可以用化学方法，亦可用物理方法。

一、自由基的化学检测

用化学方法检测自由基比较困难，因为自由基很不稳定，

无法分离。但是，可以用间接的方法证明自由基的存在。例如，甲苯的甲基氢比较活泼，容易被自由基夺氢而生成苄基自由基，后者很易通过自由基结合反应而变为二苯乙烷。因此，如果将反应混合物中加入甲苯后能检测出二苯乙烷，就可推知此反应混合物有自由基生成。



分析一个反应的产物，往往可以有助于判断一个变化是否涉及自由基。在烯烃发生加成反应时，如为离子型反应，则氢加到双键的含氢较多的碳原子上，即要符合马尔可夫尼可夫规律，如为自由基反应，则可得到不符合马尔可夫尼可夫规律的产物。

利用苯乙烯与甲基丙烯酸甲酯(50:50)的共聚反应，亦可检测一个变化是否涉及自由基反应。因为如有阳离子存在时，共聚合物全由苯乙烯形成；在有阴离子存在时，共聚合物全由甲基丙烯酸甲酯形成；在有自由基存在时，共聚合物则由等量的苯乙烯和甲基丙烯酸甲酯组成。

加入自由基清除剂并观察一个变化是否受到影响，是判断一个变化是否涉及自由基反应的简便方法。维生素C、维生素E就可以用作自由基清除剂，并常用于研究生物体系中的一些变化是否涉及自由基反应。

二、自由基的物理检测

在自由基的物理检测法中，电子自旋共振法(ESR)是最常用的方法。

这个方法的原理比较复杂。简单地说，电子自旋共振法依赖于样品中存在未配对的电子。其基本概念可用一个未配对的电子来描述。电子带电而且自旋，犹如一个小磁铁，具有一个磁偶极矩。根据量子力学理论，未配对电子在外磁场中，只可能有与外磁场平行和反平行的两种不同取向的磁矩。其相应能量分别为 $-\frac{1}{2}g\beta H$ 和 $+\frac{1}{2}g\beta H$ ，其能量差为 $\Delta E = g\beta H$ (图1-1)。

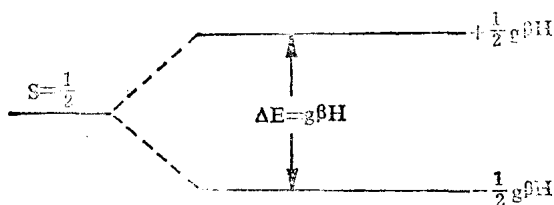


图1-1 电子的能级

S 为电子自旋角动量； g 为无因次常数，一般称为 g 因子； β 是电子的波尔 (Bohr) 磁子， H 为外加磁场。

在垂直于 H 的方向，再加一高频磁场，使其频率为 ν ，并满足

$$h\nu = g\beta H$$

此时，低能级的未配对电子则从高频磁场吸收能量跃迁至高能级，这就产生电子能与辐射场共振。将这种能量吸收变为电信号，进行检测、放大，则得到ESR信号。

有两种可能的方法来检测ESR信号，即固定 H 而改变 ν ，或反之。由于技术上的原因，采用了后一种方法。因而ESR信号对 H 作图而不是对 ν 作图。

对于不受其它电子或核作用的电子，其ESR应是条单一的线。实际上情况总因电子与其它电子和核发生磁相互作用而复杂化。后一类相互作用使得谱线发生超精细分裂。图