

第1集

自由基生命科学进展

ADVANCES IN FREE
RADICAL LIFE
SCIENCES

VOL. 1

方允中
郑荣梁 主编
沈文梅

原子能出版社

自由基生命科学进展

第1集

ADVANCES IN FREE RADICAL LIFE SCIENCES

VOL.1

方允中
郑荣梁 主编
沈文梅

原子能出版社

京新登字 077 号

内容简介

自由基的产生、清除、利用与危害是自由基生物学与医学的主要内容,近 20 年来这门新兴学科已渗透或扩展到几乎全部的生命科学中,成为自由基生命科学。本文集刊登了我国科学家撰写的“生命科学中自由基研究的鸟瞰”、“自由基与肝损伤”等 17 篇专论及“甘草中皂甙类成分对超氧自由基作用的研究”、“茶多酚防衰延寿的研究”等 24 篇研究报告。这些文章均有较重要学术价值。

本文集可供从事生物学、生物化学、生物物理、医学、农学,特别是从事有关自由基生命科学的研究及教学人员参考。为了便于国际交流,每篇文章均附有英文摘要。

自由基生命科学进展

第 1 集

方允中

郑荣梁 主编

沈文梅

©原子能出版社, 1993

(北京 2108 信箱)

(邮政编码: 100037)

香河胶印厂 印刷

新华书店总店科技发行所发行·新华书店经售

☆

开本 787×1092 1/16 · 印张 13.75 · 字数 343 千字

1993 年 3 月北京第一版·1993 年 3 月北京第一次印刷

印数 1—1300

ISBN7-5022-0799-6

Q·2 定价 12.00 元

前 言

自从 1968 年 J. M. McCord 与 I. Fridovich 发现超氧化物歧化酶以来, 自由基生命科学, 其中特别是自由基生物学与医学已经取得巨大的进展。15 年来我国科学家做了大量工作, 其学术成就受到国内外重视。1991 年原子能出版社出版了英文版《自由基生物学与医学进展》第一集, 并已在国内外发行。由于国内尚无自由基生命科学的学术刊物, 在许多专家建议下, 自 1992 年起, 拟不定期出版《自由基生命科学进展》。在第一集中有专论 17 篇及研究报告 24 篇。我们希望, 该专集的出版, 不仅有利于学术交流, 促进我国自由基生命科学蓬勃发展, 而且通过展示该学科的研究成果和广泛应用前景将会有助于推动医药及食品工业等应用科学向高、精、尖的技术进军。

方允中 郑荣梁 沈文梅

目 录

我国自由基生命科学发展的回顾	方允中 郑荣梁 沈文梅	(1)
生命科学中自由基研究的鸟瞰	郑荣梁	(5)
自由基与肝损伤	陈仁惇	(14)
应激反应引发过氧化损伤	丛杰 方允中	(28)
自由基损伤与肝脏疾病关系的研究	沈文梅 田亚平 房征宇	(35)
自由基与组织缺氧-复氧损伤	杨正红	(40)
抗氧化酶与衰老关系的研究进展	张爱群 林琳 沈文梅	(46)
氧化修饰的低密度脂蛋白在动脉粥样硬化发生和发展中的作用	陈瑗 周玫	(52)
胆红素自由基及其与胆色素类结石形成的关系	刘湘陶 杨正红 王夔	(58)
辐射损伤、衰老和恶性肿瘤对超氧化物歧化酶的活性与性质的影响	方允中	(64)
自由基与酶研究中某些新的进展及其展望	方允中	(67)
金属硫蛋白的抗羟自由基作用	程时 华珏 王刚 侯琳 谢一琳	(70)
自由基的生成与清除、组织氧化损伤与膜疾病	李芳生	(77)
断链型抗氧化剂的反应速率	王潘奋 郑荣梁	(84)
自由基与植物冻害分子机制	陶大立 靳月华	(89)
高压液相色谱法测定生物体系中的丙二醛	顾继杰 郑荣梁	(92)
抗氧化物质强化膳食与防癌	丛杰 方允中	(96)
青竹梅果铜锌超氧化物歧化酶的纯化和部分性质的研究	张尔贤 俞丽君	(102)
青竹梅清除活性氧作用的研究	张尔贤 俞丽君 肖湘 王国华	(108)
油柑清除活性氧作用研究 I. 化学发光评价	张尔贤 罗伊淳 俞丽君	(118)
44 例体外循环心脏手术患者血浆脂质过氧化物水平及红细胞超氧化物歧化酶活性的检测	阎熙丰 许凤芝 刘际清 汪曾炜 张仁福 孙立志	(126)
妊娠高血压综合征与丙二醛相关性	符玉良 李卫科 梁启峰	(130)
肿瘤患者全血化学发光和抗氧化酶活性的变化	康建 陈晓林 徐敏	(134)
超氧化物歧化酶对缩小家兔急性心肌梗塞范围的研究	许凤芝 阎熙丰	(138)
放射人员血超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性测定	罗时文 杨勇 卢曲琴 邹国林	(141)
变应性皮肤病人血浆脂质过氧化物、中分子物质及 IgE 水平变化的研究	邓建红 祝其锋 陈秋霞 吴志华 刘慧明	(146)
甘草中皂甙类成分对超氧自由基作用的研究	高东英 杨正红 张如意	(149)
脂质过氧化与病毒性肝炎	范学工 谭德明 胡国龄 张铮	(154)
超氧化物歧化酶模拟物对 SR-1 癌细胞 DNA 合成的影响	康鑫 方允中	(160)

茶多酚清除超氧化物自由基的效能及其对肿瘤细胞 DNA 生物合成的影响	康鑫 方允中 刘学英 杨贤强	(163)
模拟超氧化物歧化酶活性配位化合物对活性氧所致红细胞膜损伤的防护作用	田亚平 方允中 沈文梅 罗勤慧 江朝光 沈孟长	(167)
姜和大蒜的水提取物清除活性氧效能研究	田亚平 沈文梅 方允中	(172)
多器官衰竭中氧自由基与微量元素	董伟 李新建 宋旭华 裴晓红 王敏 孟宪钧	(178)
犬心梗前后超氧化物歧化酶和心钠素的研究	陈泮藻 孟竞璧 郝秀华 喻晓春 张安胜 付卫星 宋利明	(181)
维生素 E 和丹参对高速枪弹致多脏器功能损伤的防治作用	付小兵 田惠民 常国友 迟兵 王亚平 盛志勇 王德文 马玉媛	(184)
复方何首乌抗氧化作用的研究	张其兰 孙志福	(189)
应激对老年小鼠心肌营养性血流量、丙二醛含量与超氧化物歧化酶活性的影响	吴伟康 罗汉川 侯灿	(193)
单克隆抗体人铜锌超氧化物歧化酶抗原性及生化特性分析	陈志英 刘士山 朱和平 刘晓力	(197)
血浆总抗氧化活性与脂质过氧化物含量关系及其增龄性变化	祝其锋	(201)
茶多酚防衰延寿的研究	杨贤强 吴炳辉 沈生荣 朱善谨 徐戴本	(205)
一种新型的天然抗氧化剂——茶多酚	杨贤强	(209)

我国自由基生命科学发展的回顾

方允中 郑荣梁 沈文梅

《自由基生命科学进展》编辑部

摘要:根据本文作者所知及亲身经历,回顾了我国自由基生命科学的萌芽阶段、建立阶段与发展阶段,并衷心祝愿我国自由基生命科学不断发展,争取尽快赶上国际先进水平。

关键词:自由基生命科学 萌芽阶段 建立阶段 发展阶段 中国

电离辐射作用于生物体所产生的自由基对生物分子的影响及其引发的一系列原发效应,在广义上应属于自由基生命科学的范畴,但从40年代直到现在仍为辐射生物学与辐射有关的其它生命学科内容。我国的自由基生命科学初建于十年动乱后的1978年,较国外约晚了十年。当时从事自由基生命科学初建事业的人员,包括本文作者在内,均为辐射生物学等研究工作者。由于在科学发展史上,辐射生物学等学科的发展曾为自由基生命科学的诞生提供了条件或基础,而且至今自由基辐射生物学及有关生命学科仍为自由基生命科学中不可缺少的内容,再结合我国科研实况,应该把五六十年代我国原子能生命科学的发展期当作自由基生命科学的萌芽时期。在自由基生命科学的诞生上,1968年McCord与Fridovich发现的超氧化物歧化酶及其重大生物学作用是划时代的里程碑。1978年后我国对超氧化物歧化酶及内源性自由基的生物学与医学的研究逐年增多,其发展虽很迅速、蓬勃,然颇分散,而且缺乏有组织的学术交流,因此尚属初建时期。从中国生物物理学会自由基生物专业委员会成立之日起直到现在,我国自由基生命科学发展更为迅速、蓬勃,正处于欣欣向荣的大好形势,因此可称之为发展时期。展望未来,我国自由基生命科学事业一定会紧跟各项科学事业的前进步伐,会有多项的辉煌成就。为了使读者了解我国自由基生命科学事业的发展情况,按理应广为收集资料,撰写专文,但由于自由基生命科学进展第1集出版在即,现仅根据本文作者所知及亲身经历,对我国自由基生命科学事业的发展概况作以下的回顾。

一、萌芽时期

从50年代开始,为了对辐射损伤的预防、诊断和治疗提出有效措施,我国成立了辐射生物学及防原医学等原子能生命科学的研究机构,并组织了大专院校及医院科技人员从事理论与应用研究。在此期间多批科技人员到苏联学习,同时苏联亦派高级科技人员来我国指导研究、讲学与进行学术交流,对我国辐射生物学及有关原子能生命科学的发展起到了推动与促进作用。在我国以往科学事业基础上,广大科技人员吸取国外先进知识与经验,配置科研设备及培养科技队伍,充分发挥才智,做出了具有我国特色的、创造性的科研成果,但是在辐射损伤的机制上,仍受到国外传统学术思想的影响。在1978年以前一直认为辐射作用于生物体所产生的自由基对生物分子的影响及其生物效应一般来自自由基的瞬时效应,而对照射后生物效应及发展成辐射损伤仅认为是瞬时效应所引起的继发反应及由此而产生的疾病。军事医学科学院放射医学研究所及全国有关研究机构和院校曾针对自由基的瞬时效应,合成了大量药物并进行了筛选,从中找到有效药物,而且有的药物具有预防和

治疗效果。这表明有效的辐射损伤预防药物的机理不仅关系到自由基的瞬时效应,而且按照近代自由基生物学观点推测,其治疗效果或许与清除照射后机体的内源性活性氧有关,例如在综合防治措施中维生素效果已得到了肯定,其机理可能为清除活性氧。我国学者在辐射对生物大分子如 DNA 的影响以及 ESR 等方面曾做了不少理论研究。这些工作虽属于辐射生物物理学领域,但在广义上也属于自由基生物物理范畴。中草药的有效成分预防辐射损伤是具有我国特色的研究工作,军事医学科学院放射医学研究所进行了这方面的研究,并做出了突出的成绩,如发现某些中草药确有抗辐射损伤效果,从中提取有效成分并人工合成更有效物质。近几年已有研究报告指出,在离体实验与动物实验中它们可减轻辐射引起的脂质过氧化,其机理可能是它们可清除引发脂质过氧化的活性氧。据此还证明照射动物体内脂质过氧化尚与内源性活性氧产生增加与清除能力减弱有关。兰州大学生物系郑荣梁等首先发现北五味子素的辐射防护作用及抗脂质过氧化效能,而且还发现脂质过氧化与辐射敏感性的相关性。辐射与营养是我国五六十年代的重要研究项目,方允中等参加了此项研究,其研究结果已在 80 年代陆续发表,成为辐射营养的理论与应用参考资料,而且还在在此基础上开展了营养与活性氧的研究。该项工作人员结合了工作经验,又参考了国内外资料,撰写成《辐射与营养》专著,已由原子能出版社出版。根据国内辐射生物学与医学研究结果以及作者亲身经历和实际体会,自由基辐射生物学与医学中很多资料可作为自由基生命科学的内容。因此,我国辐射生物学与医学以及有关原子能生命科学的发展确为自由基生命科学的萌芽。作者深信,这两门生命科学将会相互促进,互相渗透,共同得到蓬勃的发展。

二、初建时期

自由基生物学与医学萌芽于五六十年代原子能生命科学的发展时期,然由于十年动乱,我国学者对 1978 年前自由基生命科学的进展几乎完全停顿。约在 1976~1977 年作者之一偶然查阅到苏联生物物理与放射生物学杂志,发现了超弱化学发光的研究资料,引起了很大的兴趣。超弱化学发光来自于生物体内单线态氧 ($^1\text{O}_2$) 转变为基态氧 ($^3\text{O}_2$) 的反应。一般认为脂质过氧化过程中产生 $^1\text{O}_2$, 因此生物体内超弱化学发光强度的变化在一定程度上反映自由基引发脂质过氧化程度,测定人体血清中自发的和诱导的超弱化学发光当有利于判断体内生理与病理变化。方允中与闻慧芬改装液体闪烁计数仪成为高度灵敏的、超弱发光测定仪,测定不同照射剂量下油酸、血清与肝匀浆的自发的与诱导的超弱化学发光,发现发光强度与照射剂量成直线相关,并且还证实国外报道的嗜中性粒细胞吞噬细菌过程中产生活性氧中存在 $^1\text{O}_2$, 其证据是超弱化学发光动态曲线有特征性高峰,接着又观察到照射大鼠血液中嘌呤核苷磷酸化酶理化性质的变化,怀疑与内源性自由基损伤作用有关。由于清除超氧自由基 O_2^- 的超氧化物歧化酶 (SOD) 是 1968 发现的很重要的酶,方允中等遂转向于 SOD 的放射生化研究:在研究中建立了高灵敏度、强专一性、手续简便测酶活力的化学发光法。从牛红细胞提纯 SOD 获得成功,其技术转让给甘肃夏河制剂厂,其质量符合 Sigma 公司纯酶标准,因此 1991 年获得全国“七五”星火计划科技成果博览会金奖。上海李文杰、袁勤生等从猪血提取 SOD 也获得成功,而且还开展临床应用实验。国内不少单位相继开展自由基生物学与医学研究,如郑荣梁、忻文娟、张志义、陈瑗、周玫、徐辉碧、陈文等为做了大量工作,其学术论文在学术杂志或学术会议上发表,引起全国学术界的很大反响。为了推动全国自由基生物学与医学研究,1986 年方允中、沈文梅与吴国利于 6 月 11~25 日在

北京师范大学举办“自由基生物学与医学系统学术讲座”由方允中、吴国利、郑荣梁、忻文娟、沈文梅、张志义、李文杰、陈文为、陈瑗等讲授共讲课 18 次, 约 54 小时。内容包括基础理论与技术、自由基生物学和自由基医学。学员遍及全国 40 个研究单位和院校, 正式学员及旁听生 100 人。据反映及随后调查了解, 该班对推动我国初建时期自由基生物学与医学研究起到较好作用。

郑荣梁、忻文娟等曾在英美进行客座研究, 回国后将国外先进技术与研究经验在国内广为传播, 并积极开展研究, 而且与较多单位协作, 促进了我国自由基生命科学事业的发展。值得提出的是郑荣梁响应组织号召提前从国外返国, 于 1985 年夏在敦煌主持召开中国生物物理学会环境生物物理学术会议。在那次历史性学术会议上郑荣梁与方允中应邀在大会上作了有关自由基生物学与医学方面的学术报告, 引起了大会代表的重视。在他们的倡议下, 许多代表建议 1986 年 10 月第五届全国生物物理学术会议期间, 同时举办第一届全国自由基生物学与医学的学术会议。当时得到中国生物物理学会秘书长的赞同。该建议经中国生物物理学会理事会通过, 并接受郑荣梁建议, 由方允中在第五届全国生物物理学会学术会议的大会上作了自由基生物学的近况和展望的学术报告。在第一届自由基生物学与医学学术会议中共宣读论文 73 篇, 出席代表约 100 人。该次会议展示出初建时期学术成就。

三、发展时期

第一届全国自由基生物学与医学学术会议后中国生物物理学会理事会经讨论通过成立自由基生物学专业委员会, 由方允中担任主任, 郑荣梁、忻文娟为副主任。为了积极推动学术活动、经他们联系, 中华医学杂志编辑部主办, 广州第一军医大学承办, 于 1987 年 6 月 17~20 日在广州召开了脂质过氧化与疾病专题座谈会, 来自全国 14 个省、自治区、直辖市的 62 名代表参加了会议。华裔美国学者赵崇义应邀专程从旧金山赶来参加, 并在会上作了学术报告。会议涉及基础医学和临床医学的多个领域, 主要讨论脂质过氧化与膜疾病、肿瘤、衰老、心血管疾病、创伤、辐射损伤、高氧中毒及其它疾病的关系以及脂质过氧化研究的方法等。

1988 年 4 月经忻文娟和郑荣梁同国外著名学者联系, 由中国生物物理学会主持, 在北京召开了自由基生物学与医学的国际学术讨论会 (International Workshop-Symposium on Biological and Medical Aspects of Free Radicals)。在自由基生命科学领域中自由基与植物的关系是农业方面前沿课题, 我国有关单位进行了不少工作, 其中以中国科学院华南植物研究所为国内最早开展植物 SOD 和氧自由基的单位。自由基生命的科学应用研究, 尤其是药物, 受到了我国药学界重视。在中国药学会赞助与支持下, 华东化工学院袁勤生于 1988 年 1 月在宁波主持召开了第一届全国 SOD 学术会议。他与李文杰、方允中发起组织全国性 SOD 学术研究联络组。近年来还召开了第二届全国 SOD 学术会议及有关的学术活动, 并亲自指导与领导 SOD 的应用研究。

方允中、忻文娟等考虑到自由基与营养、微量元素的关系是自由基生命科学的重要前沿学术课题, 在我国已有较多研究, 而且具有我国特色, 经联系, 以中华医学杂志编辑部为主办单位, 由河北医学院承办 1989 年 5 月 5~7 日在石家庄召开的营养、微量元素与自由基专题座谈会, 来自全国 41 个学术单位的 88 名代表参加了会议。宣读论文共 58 篇, 显示了我国自由基与营养、微量元素的较高学术水平。

1989 年 11 月在中国生物物理学会主办下, 自由基生物学专业委员会委托第三军医大

学承办第二届全国自由基生物学与自由基医学学术会议。代表约 300 名, 共宣读论文 388 篇, 其中纳入专题中心发言汇编 25 篇, 论文摘要汇编 363 篇。这些论文在质量上与数量上均较第一届学术会议有了很大的提高。根据某些代表建议, 选用专论与学术论文, 以英文版在国内外发行。在原子能出版社的支持下, 以方允中为主编, 张书贤为责任编辑, 于 1991 年 9 月出版了“Advances in Free Radical Biology and Medicine”第 1 集。第二届全国自由基生物学与自由基医学学术会的召开以及“Advances in Free Radical Biology and Medicine”第 1 集的出版标志着我国自由基生命科学已发展到可与国外进行学术交流的新阶段。

在此基础上, 经过近两年的准备, 1991 年 12 月在厦门大学召开了第三届全国自由基生物学与自由基医学学术会议。开会前, 经中国生物物理学会理事会讨论, 改选自由基生物学与自由基医学专业委员会, 以忻文娟为主任, 郑荣梁、刘耕陶为副主任, 方允中为顾问。在新专业委员会主持下, 第三届学术会议开得很好。出席代表 406 人, 发表论文数量与质量超过了第二届学术会议, 标志着我国自由基生命科学蓬勃发展。值得一提的是这次大会来自台湾长庚医学院的两位教授参加, 开创了海峡两岸这门学科学术交流的先例, 希望以此作为开端, 今后加强两岸同行间学术交流。

近几年来, 有关自由基生命科学的专著相继出版。为了及时出版这方面的学术专论与学术论文, 成立了自由基生命科学进展编辑部, 拟陆续出版中文专集。第 1 集由方允中、郑荣梁、沈文梅主编, 由原子能出版社出版, 并争取定期出版其它集。“Advances in Free Radical Biology and Medicine”的第 2 集以及其它集也拟争取陆续编辑出版, 向国内外发行。我们希望, 我国自由基生命科学不断发展, 争取尽快赶上国际先进水平。

Retrospects on the Progress of Free Radical Life Sciences in China

Fang Yunzhong Zheng Rongliang Shen Wenmei

(Editorial Board of Advances in Free Radical Life Sciences)

Abstract: The Progress of free radical life sciences in China might be marked by three stages entitled as germination, establishment and development, on which three editors gave some retrospects based on their recognition and experience. They also expressed sincere expectations that the new sciences would make advances year after year so as to keep pace, as quickly as possible, with the international achievements.

Key words: free radical life sciences; germination stage; establishment stage; development stage

生命科学中自由基研究的鸟瞰

郑荣梁

厦门大学抗癌研究中心 厦门 361005

提要:近年来自由基生物学的进展极快,研究领域也有明显拓宽。本文对基础研究、医学及农业中的近来重要成果作一简介,涉及基础研究、组织损伤、癌、衰老、辐射生物效应中的自由基、光敏作用,以及农业中的自由基研究。

关键词:组织损伤 癌 衰老 辐射效应 光敏作用 农业

自由基对维持机体的正常生理功能和病理状态都十分重要。近 20 年来发展极其迅速,形成了一门独立的新兴学科——自由基生物学 (free radical biology)。从构成自由基生物学的两个分支 (脂类过氧化及超氧阴离子自由基) 的论文数量来看,它们都呈指数增长,可见其发展之迅速。

国际自由基学会包括生物、医学及化学三个方面,已举行了四届国际会议及多次专题会议。1976 年以来不定期出版的“Free Radical in Biology”已有七卷问世,国外出版的“Free Radical Research Communications”和“Free Radical Biology and Medicine”两种期刊分别创建于 1982 和 1983 年,有关自由基生物学的专题不下 30 多种。在中国生物物理学会领导下,1986 年成立了自由基生物学与医学专业委员会,至今举行了三届全国性学术会议,两次专题会议和一次国际性讨论会。1991 年底举行的第三届学术会议的论文数比第一届多 6 倍,约 540 篇;参加人数增加了 3 倍,达 400 多人,反映了我国自由基生物学的迅猛发展。已出版了《自由基与酶》、《医用自由基生物学导论》和《自旋标记 ESR 光谱的基本理论和应用》三本书。作为教材的《自由基生物学》一书也由高教出版社于 1992 年出版。在研究内容方面正像国际上一样偏重于生物学及医学。在农学方面的研究国际上只是近十年的事,而我国在自由基农业方面的研究早在 80 年代初就有相当的单位在进行,但参加研究的人数及广度不及在自由基生物学与医学方面的研究。自由基生物学涉及领域之广泛,发展速度之迅速,使得本文难免挂一漏万,但求突出重点,勾划出一个轮廓,对重要的观点和有争议的观点则力求有所反映。

一、基础研究

正常生命过程中产生的自由基为维持生命所必需,但当其浓度过高对机体有害。体内有多种清除途径,自由基的产生与清除处于动态平衡中,一旦破坏平衡就危害机体。不论国内或国外,对于自由基在维持正常生命过程中的作用的研究较少,而对于自由基危害的研究较多。环境中多种物理及化学因素能产生自由基,例如电离辐射、紫外线、臭氧、废气、工业生产过程、杀虫剂、除草剂、抗生素、光敏剂及金属离子等等。体外尚有自由基清除剂,例如食物和药品中的抗氧化剂,种类繁多的天然产物和人工合成物质。1968 年 McCord^[1]在 Fridovich 指导下发现需氧生物体内的超氧化物歧化酶 (SOD) 以后,自由基生物学的发展进入到一个新的阶段,即把注意力转移到氧化过程中产生的超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 和羟自由基 ($\cdot OH$), 以及由此而衍生的有机过氧化物自由基 ($RO^{\cdot}$ 和

ROO[·]) 和氢过氧化物 (ROOH) 等, 它们统称为活性氧或氧自由基, 其中[·]OH 的氧化能力最强, 毒性最大, 但是至今尚未找到相应的清除酶。因此, 前几年有人怀疑[·]OH 在机体中的存在, 近年来人们改变了看法。有许多证据说明[·]OH 的确存在于正常的生命过程中。SOD、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 能分别清除 O₂⁻, H₂O₂ 和 ROO[·]。方允中等^[2,3]用免疫法在人血中测到三种不同形式的 Cu, Zn-SOD: 有活性的, 无活性的, 虽有活性但免疫学性质已改变的。王惠媛等^[4]发现肿瘤、高血压、冠心病、类风湿性关节炎、胆囊炎、肺气肿和 CO 中毒等 7 种患者, 以及 60~80 岁健康老人血中存在无活性或功能有缺陷的 Cu, Zn-SOD。丁克祥和姚树人等^[5]在全国近 30 个单位协作下测定了 6419 健康汉人红细胞 SOD 活性, 发现 SOD 活性随年龄下降, 介于 950~2450 U/g Hb 间, SOD 活性与性别及职业无关; 乙肝、肝癌、糖尿病、肾病、重症肌无力患者红细胞 SOD 活性明显低于健康人。调查人数之多, 分布地区之广, 以及参考值的确定都为国际首次报道。

中草药的许多纯物质具有清除作用, 如: 五味子多种成分^[6~10]、紫堇灵、乙酰紫堇灵、原鸦片碱、菰木素 A 和 F^[10]、去甲乌药^[11]、麦芽醇^[12]、茜甙^[13]、人参皂甙和山茛菪碱^[14]、甘草类黄酮^[15]。我们还研究了汉防己甲素 (从黄耆中提纯) 及黄酮类的清除作用, 计有芦丁、槲皮素和异槲皮素 (从水母雪莲中提纯)^[16]、桑色素、高车前素 (从大苞雪莲中提纯)、合欢素 (从星状雪莲中提纯)、柚甙和橙甙^[17]的清除作用, 还研究了酚类物质清除作用, 例如, 咖啡酸、香草醛、根皮甙、茜黄素和从中药马先蒿中, 提纯的 Verbascoside 等^[18], 对中药粗提物的研究也很多, 例如漏芦^[19]、红人参、生地、当归、酸枣仁和灵芝^[20], 肉桂、丹皮、熟地、山萸肉、五加皮、女贞子、杜仲、肉苁蓉、补骨脂、枸杞和何首乌^[14]、丹参^[13]等。食品含有维生素 C 和 E、β 胡萝卜素, 硫辛酸、氨基酸、核苷酸、蛋白质、酶、黄酮, 没食子酸和柠檬酸等抗氧化剂。张佃志和方允中等^[21]还测定了茄子、豆角、韭菜、油菜、土豆、青椒、黄瓜、蕃茄、葡萄、香蕉、桃、刺梨、大枣、山楂、陈皮、生姜、大蒜和绿茶等水提物或汁液的抗氧化作用。徐辉碧等对硒化物也有较系统的研究^[14,22]。有趣的是, 具有抗疟作用的青蒿酯钠可使红细胞活性氧浓度升高, 并促进脂类过氧化, 对受疟原虫感染过的红细胞影响更大^[23], 这是利用自由基来杀死疟原虫, 正像正常机体中白细胞通过释放自由基杀死入侵微生物一样。这些研究都有中国特色并为药疗和食疗的机理提供了新的线索。

脂类过氧化物引起许多疾病, 人们常用血浆中脂类过氧化物 (LPO) 含量的增高作为疾病的指标, 陈瑗等^[24]指出单纯采用这一指标极不全面, 必须结合测定 Se 谷胱甘肽过氧化物酶 (SeGSH-Px) 的活性, 并采用 SeGSH-Px/LPO 这一比值来表示才合理, 因为有些健康人血浆 LPO 既会大大超过也会大大低于参考值, 但上述比值却在正常范围内。忻文娟等长期采用自旋捕集法在广泛的领域内得到了大量的结果, 胡天喜等用化学荧光法研究了自由基生物学问题, 他们的工作各有其特色。

二、自由基对组织的损伤

外科手术、中风、心血管疾患、血栓、烧伤、冻伤等场合都会发生缺血, 然后再次恢复循环的过程, 称之为缺血-重灌流, 常导致损伤或死亡。Granger^[25]指出, 这一过程产生活性氧, 从而造成组织损伤。赵保路和忻文娟等^[26]用 ESR 仪直接测到了缺血-重灌流时产生的 O₂⁻ 和半醌自由基。复方丹参或茜甙^[27]、人参皂甙、山茛菪碱^[14]以及维生素 E、SOD 和二甲基亚砷等清除剂都能减轻损伤。80 年代初注意到大运动量后的肌肉中自由基含量增多 2~3 倍^[28], 脂类过氧化物含量大增; 缺维生素 E 时情况更严重。肌注 SOD 后立即消除疲劳^[29]。

我们^[36]测得具有抗氧化力的北五味子也有抗疲劳作用。这些研究对强劳动岗位的保健和体育中适量训练提供了依据,我国体育科学界已开始注意这些领域。白内障是致盲的首位原因,发病机理不清,近来报道自由基是重要病因^[31,32]。韩秀娴等^[33]和黄莉莉等^[34]发现多种清除剂有抗白内障作用。彭安等^[22]指出大骨节病三种病因(饮水低硒、高腐殖酸和染菌粮食)都与自由基有关。活性氧导致软骨变性和坏死^[35,36],李芳生等^[37]和杨同书等^[22]指出克山病同样与自由基有关,活性氧能损伤心肌,清除剂亚硒酸钠对大骨节病和克山病都有良好的预防作用^[38]。

三、自由基与癌

50年代人们企图从癌组织中找到ESR特异信号作为早期诊断指标,由于伪迹太多,现在很少再有人进行这种研究。不过Nohammer和Slater等^[39]在妇女宫颈组织中发现一信号,而宫颈癌的信号反而低于正常,这已用于早期诊断。Szent-Györgyi早就指出只有需氧的高级生物才患癌,因此癌与氧之间必有某种关系。现在已发现癌变的两个阶段(诱癌与促癌)都有氧自由基的参与。致癌物质必须经过代谢,经物理化学因素作用使之成为自由基后才致癌^[40~43]。生成自由基的能力与致癌能力间有平行关系。一些药物所以能抗癌也与氧自由基有关。这并不矛盾,因为无论致癌或抗癌,其分子基础都是共同的^[44],即自由基使DNA损伤,如改变了细胞原有的状态,就会产生致癌或抗癌的结果。活性氧对DNA的损伤已有许多研究。郑荣梁等^[45]发现凡能促进活性氧产生的因子,都能加剧损伤;凡能抑制产生的因子,都能缓解损伤。盛沛根与刘本仙等^[46]测得 O_2^- 及 $\cdot OH$ 能使脱氧核糖、胸腺嘧啶和胸苷都变成自由基。几乎任何癌的Cu,Zn-SOD活性常低于正常组织,而Mn-SOD则明显低于正常,因此把Mn-SOD活性低下看作癌的特征之一。Oberley^[47]提出细胞癌变假设,认为正常细胞 O_2^- 的生成与Mn-SOD活性间处于动态平衡中;在致癌因子影响下, O_2^- 生成增多或不变,但Mn-SOD活性却相对变低,细胞处于较多的 O_2^- 中,可引起癌变。根据这一假设,郑荣梁等从两条途径来达到抗癌目的:增加SOD活性,以达新的平衡,或者进一步抑制SOD,使 O_2^- 更多地积累以至于达到杀伤细胞的程度^[48,49]。沈文梅等^[50]发现癌症病人血清Cu,Zn-SOD发生了免疫学性质的改变,这种改变了的Cu,Zn-SOD含量明显高于健康人。当把癌切除后,免疫学性质改变的Cu,Zn-SOD含量明显下降,推测可以根据免疫学性质改变的Cu,Zn-SOD的多少来鉴别肿瘤是良性还是恶性,也可能用之于评价治疗效果。许多致癌物(C)经细胞活化而生成致癌物自由基($C\cdot$), $C\cdot$ 能使DNA转变成 $DNA\cdot$,随后形成 $DNA-C$ 加合物^[51],这种加合物可能是癌变诱发阶段的关键因子。如果非致癌物N与致癌物竞争生成 $DNA-N$ 加合物,保护DNA免遭 $C\cdot$ 的攻击,可能从而阻止癌变。有报道DNA可与氮氧自由基形成加合物^[52],有人建议把这类自由基物质作为抗癌药。郑荣梁等^[53]发现7种氮氧自由基对白血病细胞的生长和DNA合成都有程度不同的抑制作用,有些作用很强。但是当把氮氧自由基还原成分子后就失去抑制作用。氮氧自由基具有自由基的清除作用^[54],由此推测氮氧自由基的确能与 $DNA\cdot$ 或 $C\cdot$ 形成加合物来实现抗癌作用。

吸烟致癌已有定论。不幸的是1986年我国卫生部调查报告^[55]表明中国男人吸烟者达61%,多数在15~24岁就开始吸烟;妇女占7%,被迫吸入者同样易患癌。劝阻戒烟的最大障碍不是来自吸烟者,而是来自烟草工业的惊人利润,1986年我国烟业收入为432亿元,仅次于石油工业。如果考虑到吸烟致病而投入的医疗费,以及由此丧失的人才,那么发展烟草工业无异于饮鸩止渴。1990年2月21日洛杉矶时报报道美政府每年因吸烟引起疾病

的医疗费和给生产降低造成的损失超过 520 亿美元。出路在于寓禁于征,同时生产低毒烟配合卫生部宣传才是良策。国内外多人曾测得香烟烟雾及气相中的 ESR 信号^[56~59],既有氧自由基也有有机自由基。这些自由基也损伤细胞 DNA^[60,61]。

空气中自由基来自发动机尾气、工业废气、含硫劣质煤的燃烧、以及光化学烟雾等。城市上空多环芳烃自由基占分子污染物的 1%~10%^[62]。兰州为化工中心之一,再加上特殊地理环境,构成了光化学烟雾生成的条件。我们不但在空气飘尘中测到 ESR 信号的规律性变化^[63],而且发现飘尘萃取物使 DNA 损伤,使姊妹染色单体交换增多^[64]。顺便提及,至今对能使空气新鲜并有杀菌能力的空气负离子没有确切定义。Kellogg 等^[65]通过实验认为至少 O_2^- 是其组成物之一。

四、自由基与衰老

有关衰老的学说不下八九种,它们全都与自由基有关联^[66]。Harman^[67]最早提出衰老与自由基有关。Cutler 等^[68]在 12 种灵长类和 2 种啮齿类动物脑、肝和心匀浆中测得 SOD 活性对代谢率 (SMR) 的比值与可期寿命成正比: $SOD/SMR = K$ 。可期寿命, K 是一个系数。这意味着防御 O_2^- 的能力越强,氧耗越少,则物种的寿命越长。寿命还与体内一些抗氧化剂,例如尿酸, β -胡萝卜素和 α -生育酚等呈正相关;而与另一些体内抗氧化剂,例如抗坏血酸,谷胱甘肽、GSH-Px 和 CAT 等无关。表面看来,这些资料似乎并不都符合 Cutler 提出的看法,但是如不拘泥于个别抗氧化剂的变动,而全面考虑组织总抗氧化力,则发现总抗氧化力越强,可期寿命也越长;反之,组织的脂类过氧化物越多,则寿命越短。Sohal 等^[69]发现上述规律同样适用于衰老,很自然地想到口服抗氧化剂例如维生素 E 来防止衰老,Harman 等得到了正结果。当然只有在一生的前 $\frac{1}{3}$ 时期,即发育早期就服用维生素 E 才有效^[70],而 Sohal 等却得到负结果。对此, Cutler 提出一个新概念,认为组织的总抗氧化力处于一种代偿性稳态,不受个别抗氧化剂变动的影响,向食物中添加抗氧化剂不足以改变总抗氧化力。他指出今后应该着重研究总氧化力的调控来达到防衰老的目的。有趣的是,我国多种延年益寿中药具有抗氧化作用,这在前面已提到。有悖于常识的是减少家蝇的运动量^[71,72]和在保证基本营养前提下减少哺乳动物的食量的 $\frac{2}{3}$ ^[73]都能有效地延缓衰老和延长寿命,以上两项措施也与自由基有关,可以降低氧耗和减少活性氧的产生。由此想到“生命在于运动”的格言也许并不全面,中医的动静结合似乎更加合理。雌性动物寿命较长这一现象也与自由基有关,一方面雌性代谢普遍低于雄性,另一方面 X 染色体带有葡萄糖-6-磷酸去氢酶的编码,这酶在 NADPH (还原性烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) 的生成起关键作用,而 NADPH 能使谷胱甘肽维持在还原型,后者是良好的自由基清除剂^[74]。许多衰老学说都提到细胞 DNA 或基因的损伤是导致衰老的原因。这种损伤的起因也在于活性氧, DNA 受到活性氧的攻击后产生 8-羟基去氧鸟嘌呤核苷,它在人、猩猩、猴、松鼠猴及小鼠等哺乳动物肝中的含量反映出寿命越短的动物含量越多,人寿命最高,含量最低^[75]。另外两种 DNA 损伤的产物胸腺嘧啶乙二醇和胸苷乙二醇在大鼠尿中的含量比人多 15 倍^[76,77],必须指出相反的观点,即有的实验表明 DNA 的氧化性损伤对细胞衰老不起作用。

五、辐射生物学与光敏作用

电离辐射能使水及有机分子都产生自由基。辐射损伤及防护机理的众多说法几乎都与自由基有关。忻文娟等^[78]照射胃蛋白酶,出现明显的 ESR 双峰信号,加入半胱氨酸后,原

来的信号减弱,出现了新的硫共振信号,同时酶活性受到保护。盛沛根^[79]照射核酸后出现信号,但破坏核酸的有序氢键网后,信号提高了1~2个数量级,破坏愈深自由基增加得愈多,表明非偶电子可能沿着有序的生物聚合物的氢键网不定域,使非偶电子与空穴复合。这些工作支持了电移能量转移机理。Эмануэль等^[80]证实当防护药物的激发能略低于生物大分子的激发能时,可以接受大分子的激发能以防止大分子的损伤。我们^[81]测得具有防护作用的碘杂环化合物能猝灭核黄素受紫外光激发所产生的荧光,猝灭能力与碘杂环共轭系统的宽广程度相关,碘杂环可能通过共轭系统和生物大分子以电动力学方式相联系,夺取大分子的激发能。林念芸等^[82]发现防护剂咖啡酸、咖啡酸甲酯、阿魏酸和芥子酸都能转移生物大分子的电荷。张志义和盛沛根等^[83,84]证实受照射的生物核苷类能变成自由基,受照的DNA出现胸腺嘧啶所特有的八重峰信号,当加入1%没食子酸丙酯后,却只出现没食子酸丙酯所特有的单峰,推测发生了以氢转移为主,以能量转移为辅的防护效应^[85]。我们^[86]照射小白鼠3天后,脂类过氧化物增加得多的组织,辐射敏感性也高,不增加的组织敏感性也低。王崇道等^[87]得到相似结果。这是对Тапысов自身加速链锁反应学说的支持。1961年我们^[82]首次发现北五味子醇溶液有防护作用,1972年国外证实,随后我们又发现五味子乙素具有抗氧化作用。顾瑞琦^[89,90]发现芥子碱的防护作用和自由基清除作用。辐射使SOD活性下降^[91],人白细胞中SOD活性有升有降,大部不变^[92],SOD有防护作用^[93,94]。

光敏素在有氧时受光照产生活性氧,造成损伤和死亡,天然的和人工的光敏素共有400多种。牲畜食用牧草的光敏素后,在无毛覆盖处会产生湿症、黄疸或水肿、卟啉沉着症患者和着色性干皮患者见日光后皮肤溃烂,甚或毁容。我国多人研究血卟啉衍生物的杀癌作用,它能产生活性氧,本身也变成自由基^[95~98]。竹红菌素是我国首先根据民间药发现的光敏素,它的疗效与自由基密切相关^[99~104]。我们^[105]提示了曙红光敏作用的自由基机理。中药白芷根中分离到11种以上香豆素成分,白芷光敏丸对银屑病疗效显著^[106]。

六、植物界中自由基

植物学界关心自由基是近几十年来的事,我国研究工作相对地较多,涉及农业的基础及实践值得重视。植物产生活性氧的途径有二^[107]:①氧化酶在催化反应中伴生 O_2^- ,例如硝基丙烷双氧化酶、半乳糖氧化酶和过氧化酶等,②还原态化合物与 O_2 作用生成 O_2^- ,例如黄素、喋啶、二元酚和铁氧还原蛋白等,光合作用也产生还原态物质,植物体内也含有多种酶与非酶的自由基清除剂。

Dhindsa等^[108,109]发现烟草衰老时脂类过氧化物(LPO)、SOD和CAT活性下降,林植芳等^[110]证实水稻亦有此现象,还发现脱落酸加速衰老时,SOD下降,LPO增多;6-苄氨基嘌呤延缓衰老时,SOD保持高水平,LPO不增多^[111,112],张承烈等^[113]发现萝卜叶片衰老发生在MDA含量增高之前,更早于SOD活性的下降,所以SOD活性的降低可导致膜脂过氧化并非衰老的原初反应,而是叶片衰老到一定程度的生理变化。

当植物处于逆境下,也产生自由基反应。 SO_2 与水分作用后形成酸雨或酸雾,进入植物体内产生多种自由基^[114],发生缺绿病、坏死或过早落叶。 SO_2 还能诱导过氧化物酶活性上升^[115],自由基清除剂可减轻损伤^[116~118]Dhindsa等^[119]指出,干旱导致的膜损伤是由脂类过氧化造成的,干旱时耐旱植物的SOD和CAT活性都增高,不耐旱植物却不变。武宝珩等^[120]得到类似结论。刘鹤先等^[121,122]认为叶绿体SOD活性也可作为植物耐寒指标。Kalia等^[123]指出高浓度盐破坏一般植物CAT合成,使 O_2^- 和 H_2O_2 积累,而嗜盐植物却维持着高活性的

SOD 和过氧化酶以防护逆境的胁迫, 保证生存。

植物含有众多光敏物, 因此也有光敏现象^[124, 125]。朝鲜松是东北主要树种, 越冬苗常见针叶变白而死亡, 过去认为是胞间结冰的伤害, 靳月华等^[126]提出是由光氧化造成的自由基性损伤, 并测到叶的 ESR 信号, 遮光后树苗果然能安全越冬。

自由基为正常生命活动所必需, 动植物胚胎发育都说明这一现象^[127~129], 我们^[130]观察了黄瓜叶长期生长过程中 SOD 和过氧化物酶 POD 和 MDA 的变化, 在生长的第一期很缓慢, MDA 减少, 同时 SOD 和 POD 活性增大; 第二期即指数生长期, MDA 增多, 同时两酶的活性下降。初步揭示正常发育过程与自由基反应密切相关。

总起来说, 近十年来我国工作开展得快, 广和多, 呈欣欣向荣景象。有些工作较深、较系统, 许多论文已在国际权威性刊物上出现, 所以如此重要是自由基与基本生命过程, 重大医学及农业问题以及环境保护等领域有着关系。今后工作有待于深入、提高与集中, 防止不必要的重复。如果加强中草药清除自由基的研究, 或在医学及农业的实际应用上有所突破, 也许可形成我国特色。

参考文献

- [1] McCord, J. et al. 1968, J. Biol. Chem, 243, 5753
- [2] 方允中等, 科学通报, 1988, 9, 700
- [3] 刘智峰等, 科学通报, 1989, 10, 754
- [4] 王惠媛等, 中华医学杂志, 1988, 1, 44
- [5] 丁克祥等, 健康中国人(汉族) SOD 正常参考值的研究, 个人通讯, 1989
- [6] 郑荣梁等, 辐射研究与辐射工艺学报, 1984, 1, 22
- [7] 包天桐等, 药学报, 1979, 14, 1
- [8] 刘耕陶等, Chem-Biol. Interactions, 1982, 41, 39
- [9] 林童俊等, 中国药理学与毒理学杂志, 1989, 3, 153
- [10] 张铁梅等, 中国药理学报, 1989, 4, 353
- [11] 张家骏等, 药学报, 1985, 20, 423
- [12] Byung 等 Advances in Chinese Medicinal Materials Res., Eds. H. M, Chang et al. (World Scientific Publ. Co. Singapore), 1985, p. 485
- [13] 盛志勇等, 科学通报, 1988, 4, 183
- [14] 中华医学杂志编委, 中华医学杂志, 1987, 12, 641
- [15] 句海松等, 药学报, 1989, 11, 807
- [16] 陈雨亭, 郑荣梁, 生物物理学报, 1989, 3, 235
- [17] 陈雨亭, 郑荣梁, Free Radical Biology and Medicine, 1990, 1, 19
- [18] 周艳春, 郑荣梁, Biochem Pharmacol, 1991, 6, 1177
- [19] 傅乃武等, 中国医学科学院学报, 1988, 2, 95
- [20] 陈文为等, 中西医结合杂志, 1984, 11, 686
- [21] 张佃志, 方允中, 营养学报, 1990, 2, 191
- [22] 中华医学杂志编委, 中华医学杂志, 1989, 12, 663
- [23] 蔺福宝, 潘华珍等, 中国医学科学院学报, 1989, 3, 180
- [24] 陈媛等, 中华医学杂志, 1987, 7, 402
- [25] Granger, D. N. et al, Gastroenterology, 1981, 81, 22
- [26] 赵保路, 科学通报, 1989, 10, 780
- [27] 盛志勇等, 科学通报, 1988, 4, 183
- [28] Davies, K. J. A. et al, Biochem. Biophys. Res. Commun, 1982, 107, 1198
- [29] Lund-Oleson, K. Pathology of Oxygen, eds. A. P. Autor, (Academic Press, New York), 1982 p. 339

- [30] 刘光顺, 郑荣梁等, 中西医结合杂志, 1988, 特1集, 101
- [31] Hull, D. S. et al, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, 1984, 11, 1246
- [32] Zigman, S. et al, Comp, Pharmacol. Toxicol, 1984, 1, 59
- [33] 韩秀娟等, 眼科研究, 1988, 3, 130
- [34] 黄莉莉等, 生物化学杂志, 1989, 4, 365; 375; 369; 5, 385; 390
- [35] Staite, N. D. et al, N. Engl. J. Med, 1984, 311, 538
- [36] 田梦玉等, 生物化学杂志, 1989, 6, 534
- [37] 李芳生等, 中华内科杂志, 1985, 24, 565
- [38] 李崇正, 中华医学杂志, 1979, 59, 169
- [39] Nohammer, G. et al, Br. J. cancer, 1986, 53, 217
- [40] Stier, A. et al, Xenobiotica, 1980, 10, 661
- [41] Nakayama, T. et al, Carcinogenesis, 1983, 2, 229
- [42] Kimura, T. et al, ibid, 1982, 3, 1393
- [43] 郑荣梁等, 生物化学与生物物理学报, 1987, 4, 317
- [44] Ames, B. N. et al, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 1973, 70, 2281
- [45] 郑荣梁等, 中国科学, 1988, B, 4, 378
- [46] 刘本仙等, 生物化学与生物物理学报, 1990, 1, 23
- [47] Oberley, L. W. et al, Medical Hypotheses, 1981, 7, 21
- [48] 郑荣梁等, 生物化学与生物物理学报, 1984, 6, 558
- [49] 郑荣梁等, 生物化学与生物物理学报, 1984, 6, 675
- [50] 沈文梅等, 中华医学杂志, 1989, 5, 286
- [51] Singer, B. et al, Molecular Biology of Mutations and Carcinogens. (Plenum Press, New York) 1983, p. 143
- [52] Willson, R. L., Free Radical. Lipid Peroxidation and Cancer. Eds. D. C. Mc Brien. T. F. Slater, (Academic Press. London) 1982, p. 275
- [53] 郑荣梁等, 中国科学 (B), 1990, 6, 592
- [54] Mason, R. P. Spin Labeling in Pharmacology, (Academic Press, New York) 1984, p. 87
- [55] 全国吸烟情况调查组, 中华医学杂志, 1987, 4, 229
- [56] Forbes, W. F. et al, Nature, 1968, 217, 550
- [57] Pryor, W. A. Environ. Health Perspect, 1985, 47, 345
- [58] 郑荣梁等, 兰州大学学报, 1980, 4, 166
- [59] 吴元德等, 首届全国环境生物物理学术会议论文摘要汇编, 1985, p. 14
- [60] Church, D. F. et al, Environ, Health Perspect, 1985, 64, 111
- [61] 胡虎平、郑荣梁等, 生物物理学报, 1987, 4, 377
- [62] Johnston, H. S. Industr. Eng. Chem. 1956, 48, 377
- [63] 郑荣梁等, 环境科学, 1981, 2, 42
- [64] 胡虎平、郑荣梁等, 环境科学学报, 1988, 2, 110
- [65] Kellogg, E. W. et al, Nature, 1979, Oct, 400
- [66] Johnson, J. E. Jr. Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases. Eds. J. E. Johnson, Jr (Alan R. Liss, Inc, New York), 1988, p. X
- [67] Harman, D. Univ. Cal. Lab. Report, 1955, No. 3078
- [68] Cutler, R. G. Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Diseases, Eds. D. Armstrong et al (Raven Press, New York), 1984, p. 181
- [69] Sohal, R. S. et al, Molecular Basis of Aging. Eds. A. D. Woodhead et al (Plenum Press. New York, 1985, p. 75
- [70] Gershon, D. Free Radicals, Metal Ions and Biopolymers, Eds. P. C. Beaumont et al (Richelieu Press, London) 1989, p. 211
- [71] Ragland, S. S et al, Exp. Geront. 1973, 10, 279
- [72] Eddington, D. et al, J. Geront. 1972, 27, 341