

ADVANCES IN FREE RADICAL LIFE SCIENCES VOL.5

自由基生命科学进展 第5集

郑荣梁 主编

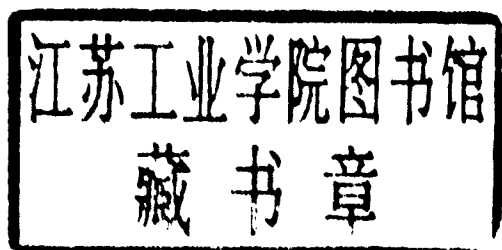
原子能出版社

自由基生命科学进展

第 5 集

ADVANCES IN FREE RADICAL LIFE SCIENCES
VOL. 5

郑荣梁 主编



原 子 能 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

自由基生命科学进展 第5集/郑荣梁主编. —北京:
原子能出版社, 1997. 11
ISBN 7-5022-1789-4

I. 自… II. 郑… III. 游离基-生命科学-研究-进展 IV.
Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 24959 号

内 容 简 介

本书继《自由基生命科学进展》第1~4集之后,由新成立的《自由基生命科学进展》编辑委员会编辑而成。本书的宗旨和学科范围与前4集相同。特点是:增加了自由基与职业病关系的论文和测试方法的介绍。

本书可供从事生物学、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。

©原子能出版社,1997

原子能出版社出版 发行

责任编辑:张 梅

社址:北京市海淀区阜成路43号 邮政编码:100037

中国文联印刷厂印刷 新华书店经销

开本:787×1092mm 1/16 印张8.75 字数218千字

1997年11月北京第一版 1997年11月北京第一次印刷

印数:1—1000

定价:14.50元

《自由基生命科学进展》编辑委员会名单

荣誉主编：方允中(北京)

主 编：郑荣梁(兰州)

副主编：沈文梅(北京) 刘凯勋(兰州) 黄中洋(台北)

编委(以姓氏笔划为序)

丁克祥(广州)	王爱国(广州)	冯国培(香港)
刘耕陶(北京)	刘灿荣(桃园)	田亚平(北京)
孙存普(北京)	李芳生(沈阳)	李文彬(北京)
陈 修(长沙)	陈仁惇(北京)	陈宗荣(重庆)
陈锦泽(台北)	陈 瑗(广州)	吴元德(北京)
罗勤慧(南京)	杨贤强(杭州)	张志义(北京)
张尔贤(汕头)	赵金垣(北京)	赵崇义(桃园)
赵保路(北京)	袁勤生(上海)	胡天喜(上海)
高锦明(香港)	莫 简(西安)	程 时(北京)
彭 安(北京)	谢炳市(天津)	魏耀挥(台北)

出版前言

从1993年到1996年,原子能出版社陆续出版了由方允中、郑荣梁、沈文梅三位教授主编的《自由基生命科学进展》1~4集,之后新成立的《自由基生命科学进展》编辑委员会接替了三位主编的工作继续出版了本书(第5集)。本集主编郑荣梁教授为该书做了大量的工作,但由于收来的稿件四面八方,且风格各异,因此要求全书在体例和格式上完全和谐一致是难以做到的。加之出版时间仓促,书中不足之处还望读者谅解。

目 录

对保健中应用自由基生物学与医学的初步建议	方允中	(1)
生物体系的 NO 自由基及其检测	赵保路	(4)
氧化胁迫是细胞凋亡的一种信号机制	李忌 陈富裕 郑荣梁	(14)
健康长寿与自由基	郭开智	(20)
Novel Antioxidant Action of Dibenzo[a,c]cyclooctadiene Derivatives from Fructus Schisandrae(Wuweizi)		
Kam Ming Ko and Siu Po Ip		(25)
海洋生物抗氧化剂的研究现状与前景	张尔贤	(34)
脉冲辐解法——研究自由基反应的快速动力学方法	罗勤慧 沈孟长	(43)
抗癌金属配合物的研究现状及发展趋势	张岐 李树本 王流芳	(51)
4-甲基-7-羟基-8-乙酰基香豆素及其铜(Ⅰ)配合物的抗氧、抗癌活性及对 T、B 细胞 增殖影响的研究	张岐 李忌 王流芳 李树本 杨浩	(60)
测量活性氧、自由基及脂质过氧化物的化学发光技术	胡天喜	(65)
黄芪总黄酮对自由基清除作用的 ESR 研究	沈文梅 汪德清 田亚平 王成彬 英明中 李小鹰 丛建波 孙存普	(74)
培植牛黄的自由基研究	叶凤阁 王芬 袁春莲	(78)
活性氧调节细胞增殖与分化	康九红 陈富裕 郑荣梁	(84)
检测精子活性氧和脂质过氧化反应的常用方法	张红 郑荣梁	(88)
细胞凋亡、转录因子 NF- κ B 与氧化胁迫	石益民 陈富裕 郑荣梁	(91)
人宫颈病变中电子顺磁共振信号及巯基蛋白的检测	李建峰 李忌 郑荣梁	(97)
几种黄酮类化合物对羟自由基引起的 DNA 损伤的保护作用	吴文林 胡天喜	(101)
靛戊菊酯的氧化毒性及其影响因素的研究	任春兰 高坚瑞 陆荣柱 殷若元	(105)
二硫化碳作业工人血清铜锌超氧化物歧化酶水平初探	简乐 胡迪生 谢晓敏	(109)
亚砷酸钠预处理对大鼠脑和肝匀浆脂质过氧化的影响	周永刚 祝其锋 杨于嘉 陈翔 陶永光	(113)
自由基与矽肺、肺癌、心血管疾病之关系研究——测定发中微量元素早期预测高危人群	龚建新 符移才 石南宁 吴法章 赵捷 汪八贤 俞海燕 方志军 赵富强 王洪伟 李冰	(117)
温石棉对作业女工和大鼠肺巨噬细胞脂质过氧化的影响	王仁元 肖国兵 马藻骅 邱华士 项张华	(120)
三硝基甲苯(TNT)中毒患者抗氧化水平研究	左鸿忍 胡德富 严川信 孟小平 薛秀英 王淑芳 杨福玲 张卫亚	(125)
高频作业工人抗氧化水平的研究	左鸿忍 祝惠筠	(127)
葡萄子——抗衰老食疗的新宠	郭开智	(130)

CONTENTS

Preliminary Suggestion for the Application of Free Radical Biology and Medicine on Health Care	
<i>Fang Yunzhong</i>	(3)
Nitric Oxide in Biological System and Its Estimation	
<i>Zhao Baolu</i>	(13)
Oxidative Stress is One Kind of Signal Mechanisms for Apoptosis	
<i>Li Ji Chen Fuyu Zheng Rongliang</i>	(19)
Novel Antioxidant Action of Dibenzo[a,c] cyclooctadiene Derivatives from Fructus Schisandrae (Wuweizi)	
<i>Kam Ming Ko Siu Po Ip</i>	(25)
Current Situation and Perspective of Antioxidants from Ocean Living Things	
<i>Zhang Erxian</i>	(42)
Pulse Radiolysis-A Fast Kinetics Method for Studying Free Radical Reactions	
<i>Luo Qinhui Shen Mengchang</i>	(50)
The Current Status and Developing Tendency of Antitumor Metal Complexes	
<i>Zhang Qi Li Shuben Wang Liufang</i>	(59)
Studies on Antioxidative, Antitumor Activity and Effect on T, B cells Proliferation of Copper(I) Complex with 8-Acetyl-4-Methyl Umbelliferone	
<i>Zhang Qi Li Ji Wang Liufang Li Shuben Yang Hao</i>	(64)
The Chemiluminescent Technology for Determination Active Oxygen Species, Free Radicals and Lipid Peroxidation	
<i>Hu Tianxi</i>	(73)
ESR Spectral Studies on Scavenging Effects of Total Flavonoids of Astragalus on Free Radicals	
<i>Shen Wenmei Wang Deqing Tian Yaping Wang Chengbin Ying Mingzhong</i> <i>Li Xiaoying Cong Jianbo Sun Cunpu</i>	(77)
Studies on the Free Radicals of Cultured Bezoar	
<i>Ye Fengge Wang Fen Yuan Chunlian</i>	(83)
The Regulation on Cell Proliferation and Differentiation by Reactive Oxygen Species	
<i>Kang Jiuhong Chen Fuyu Zheng Rongliang</i>	(87)
Practical Techniques to Measure Reactive Oxygen Species and Lipid Peroxidation in Spermatozoa	
<i>Zhang Hong Zheng Rongliang</i>	(90)
Apoptosis, Transcription Factor NF-κB and Oxidative Stress	
<i>Shi Yimin Chen Fuyu Zheng Rongliang</i>	(96)
Measurements of EPR Signal and Protein Thiols in Lesions of Human Uterine Cervix	
<i>Li Jianfeng Li Ji Zheng Rongliang</i>	(100)

Protective Effects of Several Kinds of Flavonoids to DNA Damage Produced by Hydroxyl Free Radical	
<i>Wu Wenlin Hu Tianxi</i>	(104)
Study on the Effect of Fenvalerate on Oxidative Toxicity and Modifying Effect by Toluene	
<i>Ren Chunlan Gao Jianrui Lu Rongzhu Yin Ruoyuan</i>	(108)
The Preliminary Study on Serum Cupperzinc-Superoxide Dismutase Levels in Workers Exposed to Carbon Disulfide	
<i>Jian Le Hu Disheng Xie Xiaomin</i>	(112)
Effects of Pretreatment with Sodium Arsenite on Lipid Peroxidation of Brain or Liver Homogenate in Rats	
<i>Zhou Yonggang Zhu Qifeng Yang Yujia Chen Xiang Tao Yongguang</i>	(116)
Studies on the Relationship Between Free Radical and Silicosis,Lung Disease, Cardiovascular Disease——A Method to Predict High Risk Group of Patients by Trace Elements in Human Hair	
<i>Gong Jianxing Fu Yicai Shi Nanning et al.</i>	(119)
Lipid Peroxides Produced by Chrysotile Fibres among Exposed Female Workers and in Rat Lung Macrophages	
<i>Wang Renyuan Xiao Guobing Ma Zaohua Qiu Huashi Xiang Zhanghua</i>	(124)
Antioxidant Enzymes in Patients with Occupational Chronic Trinitrotoluene Poisoning	
<i>Zuo Hongren Hu Defu Yan Chuanxin et al.</i>	(126)
Antioxidant Enzymes in Workers Exposed to Radiofrequency Electromagnetic Field	
<i>Zuo Hongren Zhu Huijun</i>	(129)

对保健中应用自由基生物学与医学的初步建议

方允中

放射医学研究所 北京 100850

自由基是带有未成对电子的分子。由于未成对电子趋向于成对,自由基的化学性质极为活泼,其存在时间很短暂^[1]。1968年 McCord 与 Fridovich 发现超氧化物歧化酶(SOD)以前,生物学与医学中尚无自由基的内容。随着自由基生物学的蓬勃发展,近二三十年来自由基医学已成为一门新兴学科。在保健中应用自由基生物学与医学很为普遍,但难免出现一些盲目性或片面性的缺点或问题。现对保健中应用自由基生物学与医学,提出以下的初步建议。

一、要使人体内自由基产生与清除达到正常平衡

在恒定的生理情况下,人体中自由基不断地产生,但也不断地及时被清除,因此可维持在有利无害的极低的平衡水平。自由基尚有生理作用,如参与某些生化反应及前列腺素等生物合成;一氧化氮(NO)也是自由基,有着多种生理作用并且受到了医学界的重视,因此在保健中不能把自由基全当作“垃圾”而彻底清除。另外要认识到人体自身保健能力。在漫长的进化过程中,人体能控制氧自由基产生量为氧消耗量的1%~2%,同时随着氧自由基产量增加,体内合成抗氧化酶如SOD及抗氧化剂如谷胱甘肽(GSH)的清除氧自由基的能力相应增强,只要在生活中讲究卫生,在饮食上符合营养,就可使健康人体内自由基产生与清除达到正常平衡。在衰老、应激与患病时,人体内自由基产生增多或被清除能力减弱,甚至兼而有之,遂会导致自由基对核酸、蛋白质(包括酶)、生物膜等重要生物分子的损伤。如果不能修复或更新,则会影响健康,甚至危及生命。正确的保健措施中,首要的仍应考虑如何降低人体内自由基的产生量及提高抗氧化酶与抗氧化剂的合成能力,其次才是以外源方式提供适当的、适量的、以天然抗氧化剂为主的保健食品或特效保健品。

二、防治营养缺乏或不良应有自由基生物学与医学意义

防治营养缺乏或不良不是仅为单纯的营养措施,而且尚要有自由基生物学与医学意义,因为该措施对体内自由基产生量增高及清除能力减弱而造成自由基对机体损伤也起到间接防治效果。许多报告指出,营养缺乏或不良可引起或加重自由基对机体的损伤。作者认为,衰老、应激与患病时更不可患营养缺乏或不良。在50年代我们曾观察到蛋白质、热能与某些维生素缺乏可加重辐射损伤^[2],就是依据之一。缺乏蛋白质可使人体内组织蛋白质(如抗氧化酶)与抗氧化剂(如GSH)的生物合成受到抑制,并且使氨基酸库中含硫氨基酸和组氨酸以及GSH水平降低,从而使机体抗氧化能力大为减弱。在饥饿时自由基产量增高,某些组织中SOD活性下降,GSH/GSSH比值降低。矿物质缺乏,特别是缺乏硒、铜、锌与锰可影响抗氧化酶的生物合成,如缺乏硒可使组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性降低;缺乏铜、锌和锰可使组织中Cu,Zn-SOD与Mn-SOD的活性减少。维生素缺乏常影响体内自由基的清除,如缺乏抗坏血酸或维生素E可使体内清除自由基的能力减弱,导致自由基对机体的损伤^[2]。

三、重视食物、保健食品与保健品的抗氧化效能

50年代我们曾根据营养原则调配成合成膳食,以饲养大鼠。在实验中观察到实验动物的辐射损伤程度大于饲以天然食物添加的合成膳食,遂推测这些天然食物如肝粉、卷心菜与酵母可能含有抗辐射损伤的成分^[3]。现在认识到它们也许会直接或间接增强机体的抗氧化效能。近二三十年来已有大量文献指出,天然食物(包括药食两用的中草药)确存在除已知营养素以外的、对防治某些疾病与保健有效的成分,特别是天然抗氧化剂,因此要特别重视食物、保健食品与保健品的抗氧化效能。这些年来,抗坏血酸、维生素E、 β -胡萝卜素、多酚类等抗氧化剂受到了很大重视^[4]。据此而生产的加工食品与保健品受到了人们的欢迎。不过,也不能把抗氧化效能绝对化,正和营养素一样,要适当、适量,多则无用,甚至有害,如抗氧化剂在特定的条件下也会显示促氧化剂的作用。在应用中复方的保健效果常高于单方。如杭州东亚茶多酚厂生产的绿多维胶囊清除 $\cdot\text{OH}$ 与 O_2^- 的效能远高于茶多酚,因此保健食品与保健品配方很为重要。

四、营养需要量的自由基生物学与医学意义

充足的营养应不仅为提供人体的营养素需要量,而且还应使人体可维持自由基的产生与被清除的正常平衡。对老年人、应激或患病者更应有适宜的特殊营养。近年来,已有一些学者注意到这方面问题,甚至提出营养需要量应作适当的修改,如 β -胡萝卜素原被认为进入人体后仅起到维生素A前体的作用,而现已确定它尚有淬灭单线态氧($^1\text{O}_2$)等重要作用,应该单独列出需要量,或修改为其需要量占总维生素A供给量的1/2,而且要强调不能以维生素A代替。抗坏血酸供给量可照原定标准增加1~4倍。维生素E的需要量应由以往不特别列出改为正式确定。现建议为20IU/1800 kcal(1IU相当于1.1 mg α -生育醇)。鉴于多酚类的强抗氧化效能,有的学者提出,日常饮食中多酚类供给量值得考虑。直到现在,国内外对于营养需要量的自由基生物学与医学意义的认识还不相同,其意见也不一致。作者建议,老年人、与特殊环境和特殊作业有关的工作人员及疾病患者的特殊营养需要量宜重新修定,而且一定要有自由基生物学与医学意义。

参考文献

- [1]方允中,李文杰. 自由基与酶——基础理论及其在生物学和医学中的应用(第一版). 北京:科学出版社. 1989
- [2]方允中. 营养与活性氧. 生理科学, 1989, 9(4): 197
- [3]方允中, 魏业毅. 辐射与营养(第一版). 北京:原子能出版社. 1989
- [4] NiKi, E., Noguchi N., Tsuchihashi, H., Gotoh, N.: Interaction among vitamin C, Vitamin E, and β -carotene Am. J. Clin. Nutr. 62(Suppl.), 1: 3225, 1995

Preliminary Suggestion for the Application of Free Radical Biology and Medicine on Health Care

Fang Yunzhong

(Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

Abstract: Preliminary suggestions were given for the application of free radical biology and medicine on health care involving the balance between the production of free radicals and their elimination in human body, the relation of the free radicals with nutrient deficiency or malnutrition, the antioxidant activities of foods and food products for health care and the significance of nutritional requirement in free radical biology and medicine.

Key words: free radical; health care; food; nutrition; antioxidant

生物体系的 NO 自由基及其检测

赵保路

中国科学院生物物理研究所北京,100101

提要: 本文综述生物体系的 NO 自由基及其检测

关键词: 一氧化氮 生理功能 检测

NO 自由基被美国自然杂志选为 1992 年的明星分子。NO 是内皮细胞松弛因子,能够松弛血管平滑肌,防止血小板凝聚,是神经传导的逆信使,在学习和记忆过程中发挥着重要作用;巨噬细胞等在吞噬和刺激时活化释放 NO 自由基作为杀伤外来入侵微生物和肿瘤细胞的毒性分子;NO 作为自由基可以损伤正常细胞,在心肌和脑组织缺血再灌注损伤过程中起着重要作用。我们自 1990 年以来就开展了对 NO 自由基的研究工作,取得一些进展。这里就生物体系 NO 自由基的生理功能及其检测方法作一个概括介绍。

一、NO 自由基的性质

NO 是最小的几个分子之一。在 NO 分子中,N 原子外层有 5 个电子,O 原子外层有 6 个电子,形成共价键后,在分子轨道上含有一个未成对电子,因此它是自由基。用 ESR 可以检测 NO 气体自由基的信号,但是在液体中很难检测它的信号。它不稳定,半衰期短,与氧气极易反应,生成 NO₂ 自由基。NO 还可以与超氧阴离子自由基以极快的速率反应生成过氧亚硝基,质子化后生成 NO₂ 和类羟基自由基。这些化合物相互反应在生物体内生成一系列具有重要生物功能的自由基和硝基化合物。NO 很容易同氧自由基反应,且反应是非常迅速的(表 1)。

Table 1 Reaction rates of NO with oxygen radicals

NO+O ₂ ⁻	————→	ONOO ⁻	$K=5\times 10^9\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$
NO+NO ₂	————→	N ₂ O ₃	$K=2\times 10^9\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$
NO+ [•] OH	————→	HNO ₂	$K=1\times 10^{10}\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$
NO+ROO [•]	————→	ROONO	$K=1\times 10^9\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$

NO 和一般底物不太容易反应,除了胱氨酸和谷氨酸外,NO 同一般氨基酸及胞嘧啶反应性不大(表 1)。

Table 2 Reaction rates of NO with substrates in aqueous solution

Substrate	Reactionrate (mol ⁻¹ · L · s ⁻¹)
ferrocyanide	5×10 ²
cysteine	5×10 ³
glutathione	10 ⁴
tyrosine	25
aminoacids	<5
cytosine	<0.005

NO 同含铁蛋白的结合是 CO 的 100 倍,NO 和含铁蛋白结合是非常迅速和紧密的(表 3)。

Table 3 Reaction rates of NO with iron proteins

NO+Fe ²⁺	————→	Fe(H ₂ O)5NO ⁺²	K=6.2×10 ⁵ mol ⁻¹ ·L·s ⁻¹
NO+Fe(TPPS)	————→	Fe(TPPS)NO	K=1.8×10 ⁹ mol ⁻¹ ·L·s ⁻¹
NO+Hb ¹	————→	Hb ¹ NO ₂	K=2.5×10 ⁷ mol ⁻¹ ·L·s ⁻¹
NO+Mb ¹	————→	Mb ¹ NO	K=1.7×10 ⁷ mol ⁻¹ ·L·s ⁻¹

二、NO 自由基和内皮细胞松弛因子

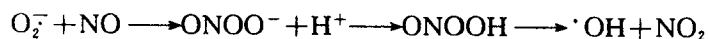
1986 年 Gryglewshiki 等人首次在 Nature 上发表文章,提出内皮细胞松弛因子可能是一种不稳定的自由基,但其化学结构不清楚,推测可能是过氧基或花生四烯酸衍生物自由基。1987 年,Palmer 等人正式提出内皮细胞松弛因子就是 NO。以后经过几个实验室大量实验都证实了这一结论。到目前为止,虽然还有一些问题没有完全搞清楚,但是,NO 作为内皮细胞松弛因子已经被广泛接受。血管扩张剂,如乙酰胆碱,硝酸甘油和舒张肽等通过一系列反应,作用到受体上,活化 G 蛋白,通过磷脂酶 C(PL-C)启动磷脂肌醇通路(PIP₂-IP₃),释放 Ca²⁺,激活钙调蛋白,进而再激活 NO 合成酶,在 NADPH 参与下,以氧气和 L-精氨酸为底物,合成 NO 并释放到细胞外,接着活化可溶性的含血红素的尿苷酸环化酶,使血管平滑肌和血小板中的 cGMP 水平升高,增加的 cGMP 促进血管平滑肌松弛,抑制血小板凝聚和黏附到内皮细胞上。

三、NO 是神经传导的逆信使

脑和内皮细胞的 NO 合成酶具有信息传导功能。神经递质作用于神经元膜表面的受体后,其 NO 合成酶活性迅速增加,反应极快,且受钙离子和钙调蛋白系统的调控和激活。NO 在学习和记忆过程发挥着重要作用。NO 首先在突触后体生成,逆行扩散到突触体前区,在那里激活 cGMP 合成酶,合成大量 cGMP。对海马突触的长时增强效应(LTP)起维持作用。这是继 LTP 和 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体发现之后的又一重要进展。NO 自由基与学习和记忆及突触体调变关系的研究,将为脑信息加工原理展示新的前景。

四、NO 在免疫杀伤中的作用

过去研究表明白细胞在免疫杀伤过程中释放大量活性氧自由基,作为杀伤外来入侵微生物的武器。最近研究发现,白细胞,特别是巨噬细胞,在这一过程不仅释放活性氧自由基,而且还释放大量 NO 自由基。这两种自由基可以很快反应生成过氧亚硝基阴离子(K=3.7×10⁻⁹ mol⁻¹·L·s⁻¹)。在碱性条件下,过氧亚硝基比较稳定,但在稍低于中性 pH 时,立即分解生成氧化性更强的类羟物质和 NO₂× 自由基。



从自由基分子毒理学的角度来看这一反应机理是非常有意义的。O₂⁻ 和 NO 都是自由基,但二者的氧化性都不很强,它们在体内都有一定的生物功能。二者结合生成过氧亚硝基阴离子,在高于生理 pH 条件下,过氧亚硝基相当稳定,允许它由生成位置扩散到较远的距离,一旦周围 pH 稍低于生理条件,立即分解生成羟基和 NO₂ 自由基,这两种自由基具有很强的氧化性和细胞毒性。这对杀伤入侵微生物和肿瘤细胞具有非常重要意义。

五、NO 自由基在组织缺血再灌注中的作用

前面介绍 NO 是内皮细胞松弛因子,可以松弛血管,降低血压。对组织缺血再灌注损伤有保护作用。一些实验也表明了这一点。但是,一些实验结果表明 NO 自由基在组织缺血再灌注损伤过程中起着相反的作用。如大鼠脑和心脏缺血再灌注,NO 可以抑制脑组织中的梗塞面积,增加皮层血液供应,减少心肌坏死范围;另一方面,NO 也可以和缺血再灌注产生的氧自由基协同作用,对神经细胞和心肌造成损伤。

六、NO 自由基的检测

为了深入研究 NO 自由基在细胞和组织中的产生规律和生物功能,就必须用灵敏和特异方法检测它。人们发展了各种方法检测 NO 自由基。NO 是自由基,检测自由基最有效最直接的技术是 ESR。但是由于它在溶液中的寿命短和浓度低,不能直接检测。下面介绍几种检测生物体系 NO 自由基的技术。

1. 自旋捕集技术

自旋捕集技术成功地用于检测活性氧自由基,但目前常用的自旋捕集剂不能捕捉 NO 自由基。现在已经合成几种自旋捕集剂,可以捕捉到溶液中的 NO 自由基。但这几种自旋捕集剂还不能用于捕集细胞体系和生物体系产生的 NO 自由基。我们发展了一种用 DMPO 检测 PMA 刺激 PMN 产生 NO 自由基的方法。

PMN(10^7 个细胞/ml), DETAPAC (diehylenetriaminepentacetic acid) (10 mmol/L) 和 PMA(100 nmol/L),混合,在 37℃ 温育 2 min,加入 0.1 mol/L DMPO,立即测试 ESR 波谱。加不同浓度的 L-精氨酸或 NGMA 以检测它们对 PMN 产生自由基的影响。

用 DMPO 捕集的 PMA 刺激 PMN 产生的 O_2^- 的 ESR 波谱及 L-精氨酸(1 mmol/L)和 NGMA(1 mmol/L)对 PMA 刺激 PMN 产生 O_2^- 的影响如图 1a,b,c 所示。图 1a 是一个由 O_2^- 与 DMPO 的加合物(DMPO-OOH, $g=2.0055$, $a_N=14.3G$, $a_H^\beta=11.3G$, $a_H^\gamma=1.26G$)和羟基与 DMPO 的加合物(DMPO-OH, $g=2.0053$, $a_N=a_H=14.9G$)组成的复合谱。由图可以看出, L-精氨酸可以明显减少在 PMA 刺激 PMN 体系中捕捉到的 O_2^- ,而 NGMA 则可以明显增加在 PMA 刺激 PMN 体系中捕捉到的 O_2^- 。而且对精氨酸的浓度有一定的依赖关系(表 4)。加入 L-精氨酸只是略微增加 PMA 刺激 PMN 体系中捕捉到的羟基自由基,而 NGMA 对 PMA 刺激 PMN 体系中捕捉的羟基自由基的影响不十分明显。在黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系中检测了 L-精氨酸和 NGMA 对 O_2^- 的清除作用。在所用浓度范围内,未检测到有任何清除和增强作用。

为了测量在上述实验中有多少 NO 自由基生成并与 O_2^- 结合形成了 $ONOO^-$ 。用光照核黄素产生的 O_2^- 作为模型,用化学合成的 $NO^\cdot$ 与之反应。发现随着 NO 浓度的增加,检测到的 O_2^- 线性下降,且呈现量效关系。由图 1 可以推算出在以上 PMA 刺激 PMN 实验中,加不同浓度 L-精氨酸产生 NO 自由基的量(表 4)。由表中的数据可以看出,在未加 L-精氨酸时,PMN 就可以产生 NO 自由基,只是分离的细胞中 NO 合成酶的底物 L-精氨酸的浓度有限,所以产率比较低。当加入 L-精氨酸之后,NO 产率急剧增加。

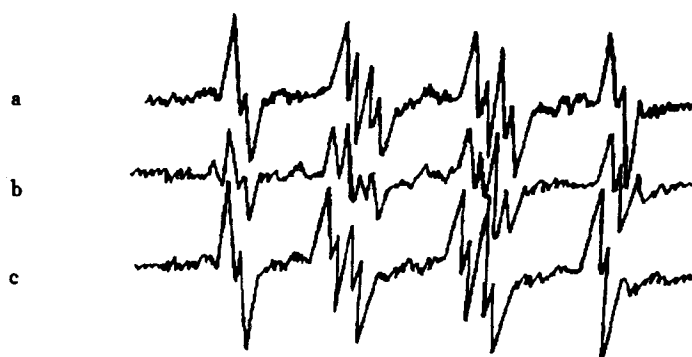


Fig. 1 The ESR spectra of superoxide, trapped with DMPO (0.1 mol/L), released from PMN (10^7 /ml), activated by PMA (200 ng/ml) (a), adding L-arg (1.0 mmol/L) (b), and N^G-methyl-arg (1.0 mmol/L) (c).

Table 4 Influences of L-arg on the formation of superoxide released from PMN(10^7 /ml) activated by PMA and formation of NO

L-arg(mmol/L)	1.8	1.0	0.1	0
Inhibition on superoxide(%)	65.7±5.34	51.5±2.68	28.9±3.42	14.7±3.12
Formation of NO(μ mol/L)	10.2±0.05	4.2±0.02	1.1±0.03	0.1±0.02

2. 与血红蛋白结合的 NO 自由基

NO 与血红蛋白的结合速率常数非常高(见表 3)。而且给出特征的 ESR 波谱。结合到血红蛋白上 NO 的测定:2 mmol/L 血红蛋白用抽真空和充氮气的方法进行不同程度的脱氧,然后通入化学制备的 NO,立即放入液氮中待测。将 ESR 谐振腔的温度调到 123K,待温度平衡后,将样品放入谐振腔,记录 ESR 波谱。

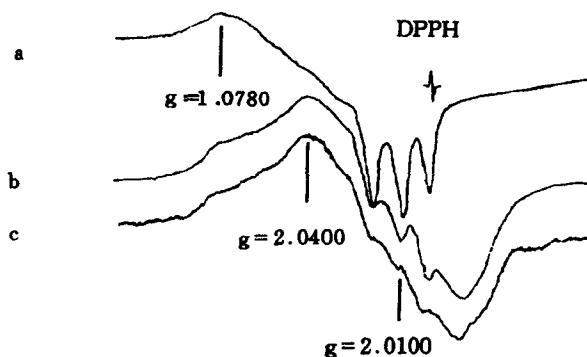


Fig. 2 ESR spectra of NO binding to different subunit of hemoglobin. (a)90% α /10% β , (b)70% α /30% β , (c)10% α /90% β .

结合到血红蛋白 α -亚基的 NO 在低温的 ESR 信号在 1.0780 有一个波峰,在 2.01 有一个波谷,它们又分裂为 3 个超精细结构;结合的血血红蛋白 β -亚基的 NO 在 2.0400 有一个波峰,在

2.0100 有一个波谷,没有超精细分裂。

3. 离体心肌缺血再灌注产生 NO 自由基的测定

利用 NO 这一性质,可以用血红蛋白作为 NO 的捕集剂检测离体缺血再灌注损伤产生的 NO 自由基。

雄性 SD 系大鼠,200~300g,随机分组。以 3%戊巴比妥酸钠 200ml/kg,腹腔注射麻醉,以 5000U/kg 肝素抗凝,开胸,取出心脏。按 Langendorff 法进行离体心肌缺血再灌注实验,以改良的 Krebs-bicarbonate 缓冲液(95%O₂,5%CO₂,pH7.4,37℃)预灌注 10 min,使心脏跳动正常,作为正常组;在预灌注液中加入 L-精氨酸作为正常加 L-精氨酸组;正常停止灌注 120 min 作为缺血组;缺血心脏用灌注液再灌注 10 min 作为缺血再灌注组;在再灌注液中加入(100 mmol/L)L-精氨酸作为缺血再灌注加 L-精氨酸组;在再灌注液中加入(100 mmol/L)NAME 作为缺血再灌注加 NAME 组;在再灌注液中加入(500 U/ml)SOD 和 CAT 作为缺血再灌注加 SOD/CAT 组,实验完成后,立即将心肌组织装入内径为 2mm 塑料管波谱仪上测试。正常心肌,缺血再灌注心肌,缺血再灌注心肌加 100 mmol/L 精氨酸,缺血再灌注心肌加 100 mmol/L N^G 硝基精氨酸甲脂的 ESR 波谱如图 3 所示。由图可以看出,正常心肌在低温的 ESR 波谱只有 g 值等于 2.0050 和 1.937 处分别对应半醌自由基和金属离子两个峰。加入不同浓度 L-精氨酸并没有使所得 ESR 波谱发生什么变化。而在缺血再灌注的心肌的 ESR 波谱上却出现了 g 等于 2.040 和 2.030 两个小峰。g 等于 2.040 的信号与上面检测的 β-NO 复合物完全一致。当加入 L-精氨酸的类似物,NO 合成酶的抑制剂,N^G 硝基精氨酸甲脂时,g 等于 2.040 的信号明显变小,进一步证明了这一信号来自心肌缺血再灌注产生的 NO 自由基。在正常心肌加入 L-精氨酸也没有检测到 NO 自由基产生。在缺血和缺血再灌注的心肌中就有 NO 自由基产生了。在缺血再灌注损伤的心肌中加入 L-精氨酸使心肌中的 NO 自由基产生进一步增加,同时氧自由基的信号也随着增加,而且它们是随加入的 L-精氨酸的浓度增加而同步增加的。在灌注液中加入天然抗氧化剂知母宁效果与 SOD 类似。

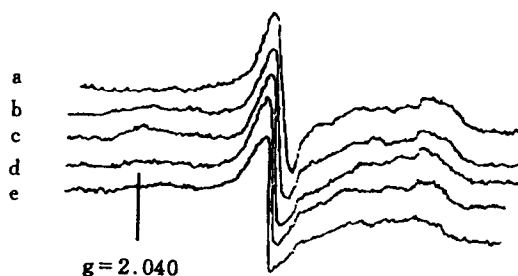


Fig. 3 ESR spectra of cardiomyocyte under 123K.

(a)Normal cardiomyocyte, (b)ischemia 120min, reperfusion 10 min, (c)Add 100 mmol/L L-Arg in pour solution of (b), (d)Add 100 mmol/L NAME, (e)Add 100 mg/ml of a natural product.

4. 缺血,移植和再灌注肾脏中产生 NO 的测定

方法:取 250~350g Wistar 大鼠,用戊巴比妥腹腔麻醉,腹正中切口,分离左测肾蒂,用无损伤血管夹阻断左肾动脉,静脉,切除右肾。左肾缺血 1 h,松夹 2 min 后迅速取下腔静脉血

和肾组织,装入 2mm 石英管,放入液氮待测。大鼠肾离体缺血再灌注,同上麻醉,开腹,经腹主动脉插管,用 5ml 0℃乳酸钠-林格液(L-R)或 Sacks 原位灌注肾脏至双肾变为苍白色,立即切除右肾,放入 L-R 或 Sacks 灌注液中 0~4℃保存 24 h,直接装入石英管放入液氮中待测。左肾切除后放入 0~4℃保存液中 24 h,移植于另一只大鼠体内,血液再灌注 2 min 后取下,立即装入石英管放入液氮中待测。

肾在体缺血 1 h 再灌注 2 min 下腔静脉血在 100K 测定的 ESR 波谱如图 4 所示。该谱在 $g=1.0790$ 和 $g=2.023$ 处分别有一个最大值和一个最小值。每个峰又被分裂为三重峰,前者超精细分裂常数为 16.5 G,后者的超精细分裂常数为 17.8 G。这是一个典型的 NO 结合到血红蛋白 α -亚基上的 ESR 信号。正常静脉血没有任何 ESR 信号(图 4a)

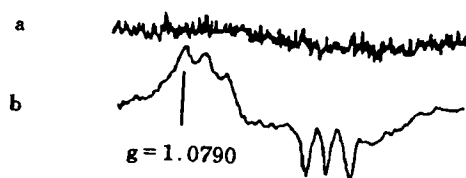


Fig. 4 ESR spectra of renal vein blood. (a) Normal blood, (b) Ischemia 1 hour.

在 L-R 保存液中 4℃离体缺血 24 h 肾组织在 100K 也观察到了类似图 3b 的三重峰,但在 $g=2.0050$ 处又叠加了一个单峰,这是 NO 结合到血红蛋白 α -亚基和半醌自由基叠加的 ESR 波谱。在 Sacks 保存液中缺血 24 h 的肾组织的 ESR 波谱与保存在 L-R 保存液中的肾组织类似,只是信号强度减少了 27%左右。

5. 用铁络合剂 Fe(DETC)(diethyldithiocarbamate)检测在体缺血再灌注产生的 NO 自由基

这一方法可以给出特征的 ESR 波谱,而且稳定。最近多用于体内产生的 NO 的检测,得出很多有意义的结果。方法也简单易行。大鼠在体缺血再灌注以前,将 DETC-Fe 注射在腹腔内即可。

图 5 显示的是在体心脏缺血再灌注产生的 NO 和 DETC-Fe 结合形成复合物的 ESR 波谱。由图 5(a)缺血再灌注心脏的 ESR 波谱可以看出,在 $g=2.035$ 处有一个信号被分裂为三重峰($a=13$ G),这是结合 DETC-Fe 上的 NO 的信号。在缺血再灌注以前给大鼠注射一氧化氮合成酶的底物 L-精氨酸(5 mg/kg, i. p.),缺血再灌注心脏的 ESR 波谱如图 5(b)所示,由图可以看出 $g=2.035$ 的三重峰明显增加。在缺血再灌注以前给大鼠注射一氧化氮合成酶抑制剂 L-NNA(50mg/kg, i. p.),缺血再灌注心脏的 ESR 波谱如图 4c 所示, $g=2.035$ 的三重峰明显减小。这就明确地证明了这一三重峰信号确实来自心肌缺血再灌注产生 NO 自由基。利用这一技术,我们研究了心肌缺血再灌注产生 NO 自由基的机理和天然抗氧化剂对 NO 自由基的清除作用和对心肌的保护作用。

6. 用依赖 luminol 的化学发光法检测巨噬细胞产生的 NO 自由基

NO 自由基本身没有化学发光,即使用 luminol 也检测不到。但是,如 NO 和过氧化氢或超氧阴离子自由基反应,就可以给出非常强的化学发光。这一发光不使用 luminol 也可以检测。