

最新药物临床试验与非临床研究质量管理规范实施手册

主编 伊剑华

ZUIXIN YAOWULINCHUANGSHIYAN YU FEILINCHUANG
YANJIUZHILIANG GUANLIGUIFAN SHISHISHOUCE

宁夏大地音像出版社

第三节 药物毒性作用机制

一、基本概念

毒物可以是固体、液体和气体。它们与机体接触或进入机体后，可与机体相互作用，产生损害作用。理论上，毒性的强度主要取决于终毒物（ultimate toxicant）在其作用部位的浓度和持续时间。终毒物指一种特别化学性质的物质，它可与内源性靶分子如受体、酶、DNA、微纤维蛋白及脂质等相互作用，使整体性结构和/或功能改变，而导致毒性作用。终毒物常常是母体化合物，即机体接触的化合物，也可能是母体化合物的代谢物或者是在毒物生物转化期间产生的活性氧。偶尔，终毒物也可能是内源性分子。终毒物类型及其来源见表 2-2-6。

表 2-2-6 终毒物类型及其来源

I. 母体化合物为终毒物		
铅离子，河豚毒，四氯二苯二噁英（TCDD），异氰酸甲酯，氢氰酸，一氧化碳		
II. 代谢物为终毒物		
苦杏仁酸	→	氢氰酸
砷	→	砷酸盐
氟乙酸	→	氟化柠檬酸盐（fluorocitrate）
乙二醇	→	草酸
己烷	→	2, 5-己二酮（2, 5-hexane dione）
乙酰氨基苯	→	N-乙酰-P-苯醌亚胺（N-acetyl-p-benzoquinoneimine）
CCl ₄	→	CCl ₃ OO·
苯并（a）芘	→	7, 8-二氯二醇-9, 10-环氧苯并（a）芘 [B（a）P-7, 8diol-9, 10epoxide]
苯并（a）芘	→	B（a）P-阳离子自由基
III. 活性氧为终毒物过氧化氢		
杀草快	→	羟基自由基（·OH）
Cr（V），Fe（II），Mn（II），Ni（II）	→	羟基自由基（·OH）
IV. 内源性物质为终毒物		
氮磺酰	→	白蛋白结合胆红素（albumin-bound bilirubin）→ 胆红素（bilirubin）

续表

$\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$	→ 不饱和脂肪酸	→ 脂质过氧化自由基
$\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$	→ 不饱和脂肪酸	→ 脂质烷氧自由基
$\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$	→ 不饱和脂肪酸	→ 4-羟基壬烯醛
$\text{HO}\cdot$	→ 蛋白	→ 蛋白质羰基

二、化学毒物产生毒性的可能途径

由于潜在毒物的数目巨大和生物机体结构的复杂性，目前只有极少数可能的毒作用已阐明。据现有知识，将毒物进入机体后产生毒性可能的途径如图 2-2-18 所示。

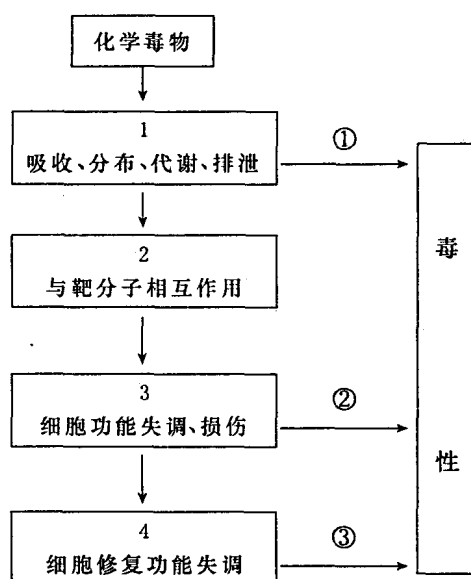


图 2-2-18 产生毒性可能的途径示意图

图中所示，毒物进入机体，与机体发生多种相互作用，并最终引起毒作用的过程。图中介绍三种途径导致毒作用：①最直接的途径，即化学毒物在机体重要部位出现，而不与靶分子作用。例如，过量的糖进入肾小管。②较为复杂途径，毒物进入机体后，抵达靶部位，与靶分子相互作用，导致毒作用。例如，河豚毒素（tetrodotoxin）进入机体，抵达运动神经元，与 Na^+ 通道相互作用，使 Na^+ 通道阻塞，抑制运动神经元的功能。③最为复杂的途径，需要许多步骤。首先，毒物分布到靶部位

(步骤1),在此,终毒物与内源性靶分子相互作用(步骤2),引起细胞功能和/或结构的紊乱(步骤3),启动分子水平、细胞或组织水平的修复机制,当毒物所致紊乱超过修复能力,使修复功能失调或丧失,毒作用就发生(步骤4)。组织坏死,癌的形成皆为经4个步骤产生。

按照导致毒作用的途径和较为公认的中毒机制,本章重点介绍毒物对生物膜的损害作用,包括对细胞内钙稳态,酶或受体的影响,毒物所致氧化损伤及毒物对生物大分子的作用。当然,关于中毒机制还有许多假设和理论,如对免疫功能的影响,对机体物质代谢及能量代谢的影响等,将在本书其他章节述及。此外,在《生物化学》、《病理生理学》等基础医学课程中已有述及。

第四节 化学毒物对生物膜的损害作用

细胞表面及各种细胞器的表面都覆盖着特殊的膜状结构,称为生物膜。如质膜、细胞膜、核膜、内质网膜及线粒体膜等。前已述及,化学毒物在机体内的生物转运和生物转化过程均与生物膜有关,而生物膜的正常结构对维持细胞正常生理功能和信息传递又至关重要。近年来,在毒理学已发展一新的分支——膜毒理学。它主要研究化学毒物对生物膜组成成分,生物膜的生物物理功能,膜上的酶或受体,信息物质的转运与代谢和信息传递过程的影响和损伤。

一、化学毒物对生物膜的组成成分的影响

(一) 对膜蛋白质的影响

膜蛋白依其在膜结构的位置可分为两类:一是大部分在膜外侧,其

功能是作为特别的受体位点或作为细胞的标志。例如，人类白细胞上组织相容性抗原（HLA），B 淋巴细胞表面的免疫球蛋白受体。二是大部分在胞内，它又可分为细胞色素 b_5 和跨膜大分子，如 Na^+ ， K^+ - ATPase。膜蛋白按其功能又可分为：受体蛋白、载体蛋白和酶蛋白。目前已测出质膜上有 30 多种酶。

在膜蛋白中，膜结合酶较易研究，可通过酶活性改变，或专一底物和酶催化的反应中的产物含量变化来观察。当然，酶活性的变化仅仅是一表现形式，影响酶活性的因素很多，需结合其他膜毒理学方法一起研究。各种化学毒物作用的膜结合酶并不相同，且作用机制也不尽相同。

①农药 DDT 作用细胞膜上的 Na^+ ， K^+ - ATPase，是通过与膜脂结合，使膜流动性增高，故影响 Na^+ ， K^+ - ATPase，表现为神经细胞膜 Na^+ 、 K^+ 离子通透性改变。

②有机磷化合物对红细胞膜乙酰胆碱酯酶（AchE）的抑制作用，是直接作用于酶，通过有机磷分子中活化的磷原子与乙酰胆碱催化活性中丝氨酸分子的 - OH 发生不可逆的结合，从而抑制 AchE 的催化活性。

③对膜结构破坏，使膜结合酶改变，如 Cd^{2+} 对肾脏损伤，表现为丙氨酸氨肽酶（alanine aminopeptidase）活力下降，而碱性磷酸酶和 γ - 谷酰转移酶（ γ - glutamyltransferase）活性明显上升，Hg 也有类似的作用，但膜结合酶改变不一样。化学毒物对膜结合酶作用，有的表现为活力下降；有的表现为活力增强；不能单独以活力改变来判断其作用。应结合观察其功能变化，因为膜结合酶均具有重要的生理功能，活力的改变必然影响细胞其他生理功能。

（二）对膜脂质的影响

膜脂质由磷脂与胆固醇及其他脂类组成。磷脂等组成双层的脂质，其极性一端位于膜的内外两个表面，非极性的一端位于膜的内部，构成与外界隔离及特定的内环境。胆固醇与磷脂相结合，调节磷脂分子脂肪链的流动性。膜磷脂有许多种类，如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇及鞘磷脂、由于不同的细胞及细胞器的功能不同，

其所含磷脂种类与比例也不尽相同。

化学毒物对膜脂质影响的可能机制有：①膜脂质组成改变，主要因为影响脂质代谢合成的过程。例如，四氯化碳可对肝细胞膜作用，使磷脂总量减少 60%，但胆固醇含量没有变化。农药对硫磷，可影响大肠杆菌，主要使磷脂总含量增加，即菌膜的磷脂和膜蛋白的比值发生变化。总之，对脂质代谢合成影响，是一严重的损伤。②膜脂质与化学毒物结合，改变膜结构的性质。例如，二氧化硅（ SiO_2 ）与巨噬细胞一起培养，可见巨噬细胞负电性增加，经清洗变化不大。说明二氧化硅与膜固有结构的某基团发生结合。③膜脂质过氧化，指由自由基作用于膜脂质，引起膜脂质中多不饱和脂肪酸的过氧化反应，即多不饱和脂肪酸的氧化破坏。它是中毒机制研究中较为成熟的理论之一，将在后面章节详述。

（三）对膜糖的影响

膜糖不是单独存在，往往与脂质和蛋白质组成糖脂和糖蛋白，分布于质膜的外表面。外来刺激如激素、生物因子或其他细胞等，通过跨膜蛋白传入细胞，引起细胞的应答反应，即细胞的识别过程。膜糖参与受精、细胞分化、器官发生及宿主与寄生物间的相互作用等许多生理和病理过程。由于上述过程极为复杂，可用于研究的方法远不如对膜脂质和膜蛋白的研究方法常见，在毒理学中，化学毒物对膜糖影响的研究尚少。

二、化学毒物对膜生物物理性质的影响

生物膜的生物物理性质主要表现在生物膜的通透性、流动性、膜电荷和膜电位等几个方面。其生物物理性质稳定与正常生理功能发挥有密切关系。再者，生物物理性质可用现代仪器设备方便检测，如膜流动性等，也为毒理学家观察化学毒物对生物膜作用机制打下了基础。

1. 对膜通透性的影响 生物膜的通透性指生物膜与周围环境极性物质交换能力。膜通透性有选择性，不同物质在膜上有不同的通透率。生

物膜是有高度选择性的通透屏障，并造成某些物质的细胞内外浓度差。它可保持细胞内 pH 和离子组成的相对稳定，并可以进行摄取和浓缩营养物，排除废物，产生神经、肌肉兴奋所必需的离子强度等重要生理功能。在毒理学中，可利用生物膜的选择通透性，研究化学毒物对生物膜的影响，以通透性作为细胞毒性作用的观察指标。例如，细胞内重要离子，如 K^+ 浓度可作为评价通透性及膜完整性的指标。用胞内某些酶如乳酸脱氢酶、酸性磷酸酶的漏出，作为膜通透性损伤的指标。

膜的选择通透性与细胞的功能有密切的联系。许多可以改变细胞膜或细胞器膜通透性的物质往往具有一定的毒性。比如，缬氨霉素 (valinomycin) 可使膜对 K^+ 的通透性增大，以致线粒体发生解偶联，从而造成细胞损伤。农药 DDT，可作用于神经轴索膜，改变 Na^+ 、 K^+ 通透性；在离体的神经纤维上，可观察到 DDT 使其动作电位持续时间延长和重复；在整体动物，则可观察到动物兴奋性增高、震颤和痉挛。因此，DDT 中毒的症状与神经细胞膜离子通透性改变有关。

但是通透性的改变与细胞毒性大小并非绝对相关，因为通透性的改变不是细胞损伤的唯一原因。关于膜通透性改变的机制已有不少实验研究。①基于膜的骨架是脂质双分子层，多数人认为物质的脂溶性，尤其是脂/水分配系数，是膜通透性的决定因素。例如，卤代烃农药的生物蓄积作用与其穿越膜的扩散速率及其在水相和脂相的分配有关。②通过调节膜上原有通透途径而改变通透性。如汞、铅等重金属可抑制肾脏有机酸转运系统，主要是通过膜上的与有机酸转运有关的载体或膜上功能基团的相互作用所致。③通过在原来膜上建造新的通透途径而改变通透性。例如，重水 (D_2O) 引起细胞膜通透性的改变主要由于 D_2O 使膜成分的结构发生变化。

2. 对膜流动性的影响 “流动性”是生物膜的基本特征之一。其定义为膜成分的许多不同类型的运动，包括：脂质分子的旋转，沿长轴的伸缩和振荡，侧向扩散运动及翻转运动；蛋白质分子侧向扩散和旋转运动。还应包括膜整体结构的流动性。膜流动性不是绝对的，它可随环境

条件和生理功能变化不断受到控制和调节。不仅表现在膜流动性量的变化,即程度变化,而且表现为质的变化,如相变和分相现象。膜流动性具有重要的生理意义,例如,物质运输、细胞融合、细胞识别,细胞表面受体功能调节等均与膜流动性有关。细胞可以通过代谢等方式调节控制膜流动性,使其保持相对稳定的水平。正是由于膜流动性具有重要的生理意义,毒理学家试图探讨膜流动性与毒性作用的关系,以丰富中毒机制和寻找早期损伤的指标。如今有许多生物物理实验技术可用于研究膜流动性。如荧光偏振、核磁共振、激光拉曼光谱、激光漂白荧光恢复法和电镜冷冻蚀刻技术均可研究不同条件下膜结构的变化。

现已发现不少化学毒物可以影响膜脂流动性。溴氰菊酯对膜流动性影响研究发现:溴氰菊酯可使人工膜的脂质流动性升高。而用突触体膜,其易与脂质双层分子极性头部和膜蛋白分子极性基团相互作用,增加脂质双层极性基团活动程度,可能削弱了膜脂和膜蛋白相互作用,而导致膜脂流动性降低。人工膜与生物膜流动性表现有一定差异,所以体外研究结果的外推应十分慎重。前已述及,DDT可改变神经细胞膜的 Na^+ 、 K^+ 离子的通透性,还可与膜脂相结合,使荧光偏振度降低,即膜的流动性增大。 Na^+ 、 K^+ 通透性的变化,是由于DDT与膜相结合,膜有序结构紊乱增强是DDT与膜的相互作用的结果。重金属二价离子引起膜流动性下降已有不少报道。铅可引起大鼠离体肾脏细胞微粒体膜脂流动性降低,且具有剂量-效应关系。其机制可能是铅致膜脂和膜蛋白运动限制晶格所需的温度提高。 SiO_2 可引起巨噬细胞膜脂流动性升高,对硫磷引起人与大鼠红细胞膜脂流动性下降。总之,有机化合物、无机化合物或重金属对膜流动性均可产生影响,虽然影响剂量各有不同,有些至今尚不清楚,但是均可通过对膜脂流动性的影响分析其对膜的毒性作用。

3. 对膜表面电荷的影响 膜表面糖脂、糖蛋白形成膜表面极性基团,组成表面电荷。细胞膜表面电荷的性质和密度可以反映细胞表面的结构和功能。因此,可通过测定细胞膜表面电荷来了解化学毒物与膜作用的途径和方式。

SiO₂ 在膜表面形成硅醇基, 与膜上含胆碱基的磷脂结合, 正电荷减少。同时, 可明显降低细胞膜水化度。表现为细胞电泳速度明显加快, zeta 电位增加。这就可解释 SiO₂ 致膜脂流动性增加, 以及膜通透性增加的原因。二价金属离子在细胞周围浓度变化可以影响膜表面电荷密度, 且随着二价阳离子如 Mg²⁺、Zn²⁺ 及 Cd²⁺ 等浓度的增加, 中和膜表面负电荷, 即结合或吸附于负电荷基团上, 使 zeta 电位减少, 细胞电泳迁移率逐渐减慢。还可表现为膜脂流动性的变化。

第五节 化学毒物对细胞钙稳态的影响

一、细胞内钙稳态

在细胞静息状态下细胞内游离的 Ca²⁺ 仅为 10⁻⁷ mol/L, 而细胞外液 Ca²⁺ 则达 10⁻³ mol/L。当细胞处于兴奋状态, 第一信使传递信息, 则细胞内液离 Ca²⁺ 迅速增多可达 10⁻⁵ mol/L, 此后再降低至 10⁻⁷ mol/L, 完成信息传递循环。认为 Ca²⁺ 是体内第二信使。上述 Ca²⁺ 浓度的变化过程稳态状, 称为细胞内钙稳态。正常情况下, 细胞内钙稳态是由质膜 Ca²⁺ 转位酶和细胞内钙隔室系统共同调控。现已知控制细胞内钙的浓度的运送系统有多种, 有的是接受外部刺激而允许钙进入胞液中, 从而产生钙信号。而有的是移动钙并将细胞内钙浓度维持在低水平, 从而使信使系统具有效率。比较重要的是钙通道和钙泵。钙通道系统指利用浓度梯度, 使胞外高浓度的钙进入胞内的通道。其本质是膜上的分子微孔, 可允许大量的离子沿浓度梯度进入细胞, 在兴奋性细胞, 钙浓度受动作电位影响, 而在非兴奋性细胞, 则不受动作电位影响。钙泵, 或称钙转位酶, Ca²⁺, Mg²⁺ - ATPase 等, 具有高亲和力, 可通过消耗 ATP, 将胞内钙逆浓度差

移至胞外，以保证胞内钙浓度的低水平。

在细胞内的钙有两种类型，游离的钙离子和与蛋结合的钙。与钙结合的蛋白有两种类型，一是结合在细胞膜或细胞器膜内的蛋白质上，二是结合在可溶性蛋白质上。激动剂刺激引起细胞 Ca^{2+} 动员，可调节细胞的多种生物功能，包括肌肉收缩、神经转导、细胞分泌、细胞分化和增殖。 Ca^{2+} 在细胞功能的调节中起了一种信使作用，负责将激动剂的刺激信号传给细胞内种酶反应系统或功能性蛋白。主要通过下列途径：① Ca^{2+} 与钙结合蛋白： Ca^{2+} 对细胞功能的调节作用多数是通过各种钙结合蛋白介导的，如钙调蛋白（calmodulin, CaM）。② Ca^{2+} 与 cAMP： Ca^{2+} 与 cAMP 两种系统在多种水平上以协同或拮抗的方式相互影响，如何影响取决于细胞反应过程与细胞类型。③ Ca^{2+} 与蛋白激酶 C（PKC）、磷脂酶 C（PLC）：它们均是受 Ca^{2+} 调节的酶。这些酶在细胞内信号转导中有重要作用。④ Ca^{2+} 与离子通道：胞内 Ca^{2+} 浓度的增加可调节离子通道，即活化 K^+ 通道、 Cl^- 通道及 Na^+ 通道，也可调节 Ca^{2+} 自身通道。由此可见，钙离子在细胞中有重要的生理意义。在毒理学中，发现细胞损伤与胞内钙浓度增高有关。目前，钙浓度变化研究已成为中毒机制研究热点之一，发展成细胞钙稳态紊乱（disturbtion of calcium homeostasis）学说，指细胞内钙浓度不可控制的增高，从而产生一系列反应，导致细胞损伤或死亡。

二、细胞钙稳态的紊乱与细胞毒性

细胞钙稳态的紊乱是一些化学毒物中毒的机制之一。已发现不少化学毒物对钙稳态有影响：

1. 重金属离子 主要有铅和镉。铅一方面与 Ca^{2+} 及 CaM 结合，激活 Ca - CaM 依赖酶系。另一方面高浓度时与细胞内巯基激活，可抑制 Ca - CaM 依赖酶系，并呈剂量依赖的双相效应。可见铅的中毒机制中 Ca^{2+} 有重要意义。镉可使 caM 含量减少。表现为免疫系统、雄性生殖系统以及心肌等改变，有的可用钙调素拮抗剂来预防或减轻损伤作用。

2. 农药 拟除虫菊酯为神经毒化合物，有研究发现它可使神经细胞内游离钙浓度增高，可能与其抑制 Ca^{2+} ， Mg^{2+} - ATPase、CaM 和磷酸二酯酶（PEE）有关。当然，拟除虫菊酯对钙稳态的影响有复杂的机制，且与其具体化学结构有关。

3. 四氯化碳 它可抑制肝细胞微粒体 Ca^{2+} - ATPase，表现为肝内质网酶活性改变及钙的蓄积。其机制可能是 CCl_4 可在肝脏氧化产生自由基，后者攻击 Ca^{2+} - ATPase 上的巯基，使酶活性下降；另外， Ca^{2+} 浓度增加，可激活某些酶，如磷酸化酶 a。

化学毒物可在不同水平上干扰细胞 Ca^{2+} 信号的转递，引起细胞内 Ca^{2+} 对激素及生长因子的正常反应的丧失，同时介导化学毒物在细胞的毒性作用。

三、钙稳态失调的机制

细胞 Ca^{2+} 信号的改变在各种病理及毒理学过程中起重要的作用。在细胞受损时，可导致 Ca^{2+} 内流增加，或 Ca^{2+} 从细胞内贮存部位释放增加，或抑制细胞膜向外逐出 Ca^{2+} ，表现为细胞内 Ca^{2+} 浓度不可控制的持续增加，即打破细胞内钙稳态，或称为细胞内钙稳态的失调。这种失调或紊乱，将完全破坏正常生命活动所必需的由激素和生长因子刺激而产生的短暂的 Ca^{2+} 瞬变，危及细胞器的功能和细胞骨架结构，最终激活不可逆的细胞成分的分解代谢过程。这就是所谓中毒机制中钙稳态失调学说。

为了研究的 Ca^{2+} 生物学功能，首先要求能够准确地测定生物组织、体液和细胞内的钙浓度，包括总钙、细胞各部分的游离子 Ca^{2+} 和结合 Ca^{2+} 的浓度。其次，了解在各种刺激包括化学毒物作用下，细胞内、外液中总钙及细胞各特定部位结合与游离的 Ca^{2+} 浓度的变化及其机制。大量证据表明，许多化学毒物产生毒性作用时，细胞内游离钙浓度持续增高。钙的浓度变化，可通过下列途径造成细胞损伤：①正常的激素和生长因子刺激的 Ca^{2+} 信号的受损。②钙依赖性降解酶的活化，包括蛋白酶、

磷脂酶和核酸内切酶。 Ca^{2+} 是参与多种蛋白质、磷脂和核酸分解酶的激活因子， Ca^{2+} 持续增高必然导致维持细胞结构和功能的重要大分子的破坏。③损伤细胞骨架，主要通过改变肌动蛋白与肌动蛋白结合蛋白之间联系；水解 Ca^{2+} 依赖的细胞骨架蛋白；蛋白激酶的活化与蛋白质磷酸化的改变和能量物质 ATP 耗竭。④损害线粒体，最初表现线粒体膜电位的下降，随后出现 ATP 耗竭，推测与氧化应激有关。⑤与细胞凋亡有关。凋亡是一种与遗传机制有关的，细胞主动自发性死亡方式。其明显特征之一是 DNA 断裂为多个片段。这是由 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 依赖的核酸内切酶活性所介导的反应。

第六节 机体内生物大分子氧化损伤

机体内生物大分子氧化损伤指活性氧族 (reactive oxygen species, ROS) 对生物大分子的损伤。其中脂质过氧化和自由基研究已有 100 余年的历史，形成了中毒机制中较为成熟的理论之一。对于其他生物大分子，如核酸和蛋白质的氧化损害也开始涉及。

一、自由基的来源与类型

1. 概念 自由基指能够独立存在的含一个或一个以上不成对电子的任何分子或离子。一个不成对电子是指单独在一个轨道里的电子。自由基的共同特点是：顺磁性，化学反应性极高，作用半径短，半衰期极短。

2. 类型 与生物有关的自由基有以下几类 (表 2-2-7)

在下表所列各类自由基中，最主要的是氧中心自由基，这类自由基持续不断地在机体内产生。活性氧 (ROS) 这个术语实际上是一个集合名词，不仅包括氧中心自由基如 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ ，而且也包括某些氧的非自由

基衍生物，如 H_2O_2 、单线态氧和次氯酸，甚至还包括过氧化物、氢过氧化物和内源性脂质及外来化合物的环氧代谢物，因为它们都含有化学性质活泼的含氧功能基团。

表 2-2-7 与生物体系有关的自由基类型

自由基类型	例子	评价
以氢为中心	H 原子（一个质子，一个电子）	从含碳化合物抽出 H 原子常启动自由基的链式反应。例如， $\text{HO}\cdot$ 能通过从膜脂质的脂肪酸侧链抽出 H 而启动脂质过氧化 $\text{L}-\text{H} + \cdot\text{OH} \longrightarrow \text{L}\cdot + \text{H}_2\text{O}$
以碳为中心	三氯甲基自由基 $\text{CCl}_3\cdot$ （由 H 抽出形成膜脂质中的碳中心自由基 $\text{L}\cdot$ ）	CCl_4 毒性的主要原因
以硫为中心	烷硫自由基 $\text{R}-\text{S}\cdot$	巯基化合物氧化时产生的活性自由基（由过渡金属促进）
以氮为中心	苯基二肼自由基 $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}=\text{N}\cdot$	参与苯肼的红细胞毒性
以氧为中心	无机：超氧阴离子 ($\text{O}_2^- \cdot$) 羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 有机：烷氧自由基 ($\text{LO}\cdot$) 过氧自由基 ($\text{LO}_2\cdot$)	氧化应激的主要动因： $\cdot\text{OH}$ 十分活跃， $\text{O}_2^- \cdot$ 较弱。由 $\text{L}\cdot$ 与 O_2 反应产生 ($\text{LO}\cdot$ 和 $\text{LO}_2\cdot$)；任何碳中心自由基通常迅速与 O_2 反应产生过氧自由基。如 $\text{CCl}_3\cdot + \text{O}_2 \longrightarrow \text{O}_2\text{CCl}_3\cdot$
过渡金属离子	$\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$, $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ $\text{Ti}(\text{III})/\text{Ti}(\text{IV})$	接受和供给电子的能力使它们成为自由基反应的重要催化剂

注： O_2 本身是自由基；双原子氧分子有 2 个不配对电子，所以氧经单电子还原 O_2^- （一个不配对电子），故 H_2O_2 不是合格的自由基，虽然它能形成 $\cdot\text{OH}$ 而成为重要的氧化剂

3. 来源 自由基在生物体内来源有二：一是细胞正常生理过程产生；二是化学毒物在体内代谢过程产生。正常情况下，机体会产生自由基，参与某些生物学功能的发挥，对机体没有损害作用。只有当自由基过度产生或机体的抗氧化防御体系的功能减弱或丧失时，自由基才会产生损害作用。细胞产生的自由基主要有以下途径：①酶反应，包括胞浆酶如黄嘌呤氧化酶（xanthine oxidase），膜结合酶如脂肪氧合酶（lipoxygenase）等，可催化生成 ROS。②内源性物质的氧化反应，如抗坏血酸和儿茶酚胺。③内质网膜或线粒体，正常时 ROS 产生较少。当混合功能氧化酶反应过程或线粒体电子传递过程受损，尤其是化学毒物作用，它们可

能是 ROS 的主要来源。

许多外来化合物可通过各种不同途径产生自由基，但其中最主要的途径是通过氧化还原反应。它通过加入一个单电子使化学物还原为不稳定的中间产物，随后这个电子转移给分子氧而形成超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$)，而中间产物则再生为原化学物。能发生氧化还原反应的物质有：①醌类，如丝裂霉素、阿霉素、博莱霉素等。②硝基化合物，主要为苯的硝基化合物如硝基苯和硝基杂环化合物如呋喃妥因。③双吡啶化合物，如百草枯和杀草快。此外，有些化学毒物可干扰线粒体呼吸链功能，如甲基汞、氰化物和 3-硝基丙酸等，使 ROS 生成增加。

二、机体对氧化损伤的防御系统

机体虽有多种途径产生自由基，但并不是自由基产生即对机体有损害作用。自由基产生只有超过抗氧化能力或机体抗氧化能力降低时，才会造成损害作用。这是因为机体有相应的防御系统，包括非酶性和酶性抗氧化系统。

1. 酶性抗氧化系统 在生物进化过程中，需氧生物如人或实验动物中，存在防御过氧化损害的酶系统，即消除自由基的酶系统。包括超氧化物歧化酶 (superoxide dismutases, SOD)、过氧化氢酶 (catalase)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 及谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase) 等。

(1) SOD: 是一类含有不同辅基的金属结合酶家族，如 CuZn-SOD、Fe-SOD 与 Mn-SOD。它们在细胞内定位变化很大，CuZn-SOD 存在多种脏器内如肝脏、红细胞，而 Mn-SOD 主要在线粒体。它的唯一生理功能是歧化超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$)，生成 H_2O_2 和 O_2 。

(2) 过氧化氢酶: 位于肝细胞和红细胞内过氧化小体中，其主要功能是将 H_2O_2 转化为水。

(3) GSH-Px 在机体内广泛存在，能特异地催化谷胱甘肽对过氧化

物的还原反应，使过氧化物转化为水或相应的醇类。可阻断脂质过氧化的链锁反应。

(4) 谷胱甘肽还原酶 其分布同 GSH - Px，主要功能是产生还原型的谷胱甘肽 (GSH)，以保护机体解毒功能的执行。

(5) 其他 心肌黄酶 (DT diaphorase)，葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢酶。

2. 非酶性抗氧化系统 在生物体系中广泛分布着许多小分子，它们能通过非酶促反应而清除氧自由基。例如，维生素 C、维生素 E、GSH、尿酸、牛磺酸和次牛磺酸等。

谷胱甘肽 (GSH) 参与 GSH - Px 的作用，使过氧化物还原为 H_2O 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG)。有些有毒化学物可耗竭肝脏 GSH 而继发脂质过氧化，如丙烯腈、苯乙烯等。

维生素 E，它必须与膜结合才能发挥抗氧化作用。首先与氧自由基反应，生成生育酚自由基，再由抗坏血酸 - GSH 氧化还原偶联反应而还原。它属于“链断裂”抗氧化剂，主要通过提供不稳定的氧给过氧自由基和烷基自由基，从而防止脂质过氧化。

尿酸是一种捕捉自由基很有效的抗氧化剂。维生素 C 也能还原氧自由基。此外，体内的蛋白质通过隔离诱导 ROS 生成的过渡离子如铁、铜等，以达到阻止自由基的产生。例如，白蛋白、转铁蛋白、铁蛋白、铜蓝蛋白等。近年来发现金属硫蛋白 (metallothionin) 具有抗氧化损伤效应。它对于羟自由基有很高的反应活性，使之灭活。而对超氧化物的作用较弱。

抗氧化作用是机体众多解毒机制之一。机体内由酶系统、自由基清除剂、抗氧化剂以及修复系统构成天然防御体系，可以消除 ROS 及其他自由基的损害作用。正常机体内自由基与其防御体系之间处于动态平衡之中，由于种种原因，机体内活性氧积累过多，不能被防御体系消除，或者防御体系功能不足，不能消除过多的自由基时，机体的功能就可能发生紊乱，导致疾病发生或中毒。

三、自由基对生物大分子的损害作用

在生物机体内，自由基有两类：一是笼蔽的自由基，它是正常参与线粒体电子转运过程的自由基；另一是自由的非结合状态存在，并能与各种组织成分相互作用的自由基。自由的自由基有较强的反应性，极易与组织细胞成分中的电子结合以达到更稳定的配对电子状态。在毒理学上，主要关注自由的自由基，其中氧自由基，也叫活性氧簇（ROS），即超氧阴离子自由基（ $O_2^{\cdot-}$ ）、羟基自由基（ $\cdot OH$ ）和过氧化氢（ H_2O_2 ）。由氧自由基产生的细胞毒性效应称为氧化应激（oxidative stress）。氧化应激还可定义为促氧化与抗氧化之间的平衡失调，而倾向前者，导致可能的损害。后一定义准确解释自由基在体内引起毒性的条件，即当自由基的产生超过机体防御体系的清除能力，或机体防御体系受损而不能发挥正常功能时，自由基才会对细胞有一定的作用。研究证实，所有的细胞成分，包括核酸、蛋白质及脂类等均可受到自由基反应的损害。

（一）脂质过氧化损害

脂质过氧化（lipid peroxidation）指多不饱和脂脂肪酸的氧化破坏。它主要由自由基引起，不饱和脂脂肪酸的过氧化作用对生物膜具有强烈的破坏作用。人们发现许多中毒过程可用膜脂过氧化的理论来解释。因此，从脂质过氧化的角度来研究化学毒物的毒性作用，在膜毒理学中也具有相当重要的意义。

1. 自由基的形成与脂质过氧化的关系 体内自由基的形成过程可分为启动、发展及终止三个阶段。①启动阶段：脂质过氧化是由一些脂链侧链甲叉碳上除去二个氢的化合物所启动。任何具有足够活性的自由基均可攻击多不饱和脂脂肪酸。从其碳链的亚甲基键（ $-CH_2-$ ）中抽取一个氢原子，形成碳中心的脂质自由基。 $OH\cdot$ 是最重要的脂质过氧化的诱导物。②发展阶段：自由基形成过程是一种连锁反应，已形成的自由基将

作为启动子而产生新的自由基，使反应发展下去。在发展阶段中，形成的自由基总数保持不变，一种自由基团可经多种反应转变成另一种形式的自由基团。去氢后的碳原子形成中心自由基 ($L\cdot$)。它有多种去路：原子转移、加成反应、 β -断裂、电子转移及重排。当在有氧的环境中的细胞内，很快出现分子重排，随之与氧反应生成过氧基 (peroxy radical)，后者可相互结合而终止自由基反应，或就近攻击膜蛋白。与脂质过氧化反应关系最重要的是脂质过氧化自由基和脂质过氧氯化物的形成。③终止阶段：只有一个自由基相互作用，才能使自由基反应链终止，消除自由基。

2. 脂质过氧化的后果 脂质过氧化自由基和脂质过氧化物形成是否具有损害作用或损害范围的大小取决于膜内的脂质/蛋白质比值；脂肪酸的组成；氧的浓度以及膜内抗氧化系统的作用能力等因素。①细胞器和细胞膜结构的改变和功能障碍是脂质过氧化的最明显后果，包括膜流动性降低，脆性增加；膜上的受体和酶类的功能改变；膜通透性变化，如 Ca^{2+} 内流，钙稳态失调和能量代谢改变等。②脂质过氧化物的分解产物具有细胞毒性，其中特别有害的是一些不饱和醛类，如 4-羟基-2-反式-壬烯醛 (4-hydroxy-2-trans-nonenal)。③对 DNA 影响，有两个方面：一是脂质过氧化自由基和烷基自由基可引起 DNA 碱基，特别是鸟嘌呤碱基的氧化；另一是脂质过氧化物的分解产物，丙二醛可以共价结合方式导致 DNA 链断裂和交联。④对低密度脂蛋白 (LDL) 的作用，脂质过氧化产物使 LDL 发生氧化修饰，使 LDL 失去对其受体的高度亲和力，延长 LDL 在循环中存在的时间，提高巨噬细胞对 LDL 的摄取，导致泡沫细胞形成。这可能是动脉粥样硬化的重要机制之一。

(二) 蛋白质的氧化损害

ROS 产生细胞毒效应，除对脂质作用外，对蛋白质也可产生氧化损害。对蛋白质的作用，实质上是对氨基酸的作用。所有氨基酸的残基都可被自由基作用，其中以芳香氨基酸与含硫氨基酸最为敏感。表 2-2-8