

第2集

自由基生命科学进展

ADVANCES IN FREE
RADICAL LIFE
SCIENCES
VOL.2

方允中
郑荣梁 主编
沈文梅

原子能出版社

Q1-53
FYS

自由基生命科学进展

第2集

ADVANCES IN FREE RADICAL LIFE SCIENCES

VOL. 2

方允中
郑荣梁 主编
沈文梅



原子能出版社



A0278019

(京)新登字 007 号

图书在版编目(CIP)数据

自由基生命科学进展 第二集/方允中等主编. —北京:

原子能出版社, 1994. 7

ISBN 7-5022-1176-4

I. 自… I. 方… II. 自由基-生命科学-文集 IV. Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(94)第 03627 号

内 容 简 介

自由基的产生、消除、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。1993 年 3 月,原子能出版社出版了《自由基生命科学进展》第 1 集。本书为第 2 集,发表了国内 40 多位专家撰写的 30 多篇学术专论和研究论文,介绍了自由基科学的最新研究成果(文章的内容提要、图题、图注、图表均用英文撰写),对国内外学者有较重要的参考价值。

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。



原子能出版社出版 发行

责任编辑: 赵守林

社址:北京市海淀区阜成路 43 号 邮政编码:100037

原子能出版社印刷厂印刷 新华书店经销

开本:787×1092mm 1/16 印张 10.5 字数 298 千字

1994 年 9 月北京第一版 1994 年 9 月北京第一次印刷

印数:1—1000

定价: 15.60 元

目 录

综合报道

膜脂过氧化及脱酯化在干旱引起植物膜损伤中的作用	吕庆 郑荣梁	(1)
自由基与抗衰老研究	李培峰 李文彬	(7)
脂褐素与衰老	李培峰 李文彬	(12)
γ -亚麻酸的抗癌和抗促癌效果	马润娣 于立坚	(18)
创伤后多器官衰竭发病机制中的氧自由基作用	杨红明 盛志勇 郭振荣	(27)
自由基对生物大分子损伤及防护的研究进展	汪德清 沈文梅 田亚平	(31)
胆红素的自由基化学与胆红素的光化学及胆红素生物活性的关系	杨正红	(36)
模拟 SOD 在生命科学中的研究进展	田亚平 沈文梅 方允中 罗勤慧 沈孟长	(49)

研究报告

病变肝组织铜锌超氧化物歧化酶的免疫组织化学定位及意义	陈志英 李秀霞 刘士山 郭美香 陶靖环 范毅军 王玉芳	(54)
超氧阴离子自由基对人肝癌细胞核 6S DNA 聚合酶活性的激活作用	曲淑艳	(59)
从自由基角度讨论南澳岛环境与食管癌高发的相关性	张尔贤 俞丽君 肖湘 姚兴东	(62)
SOD-复合液的实验研究	王洛夫 赵明敏 郭孜良 魏国金	(67)
银杏叶黄酮的抗自由基作用	周君富	(73)
海洛因滥用者尿液脂质过氧化物含量的研究	周君富 刘前进 丁德云	(78)
鼻咽癌患者红细胞 SOD 活性、血浆 LPO 和红细胞 LPO 含量检测及其临床意义	周君富 陈建新 邱明月 林志宏	(83)
党参、黄芪清除超氧阴离子自由基的 EPR 研究	胡永欣 郑颖 陈士明	(86)
模拟 SOD 在培养细胞中的生物学效能	田亚平 刘国康 罗勤慧 沈文梅 沈孟长 方允中	(89)
宁夏枸杞对红细胞脂质过氧化保护作用的研究	沈泳 任彬彬 冯金	(92)
宁夏枸杞及其多糖对鼠肝线粒体脂质过氧化损伤的保护作用	黄元庆 沈泳 吕岩 陈启众 樊海涛	(101)
宁夏枸杞及其多糖和芦丁对大鼠肝脏微粒体脂质过氧化的影响	黄元庆 沈泳 任彬彬 陈启众 吕岩	(105)
宁夏枸杞不同组分的抗氧化效能研究	李国莉 沈泳 任彬彬 黄元庆	(107)
几种抗氧化剂对心肌缺血再灌注致线粒体损伤的预防作用	刘岐山 叶 铭 张运生	

吴再彬	(108)
急性低压低氧再给氧对大鼠组织自由基防护酶的影响	马翥 姜桂荣 王振国 欧阳军 ...
.....	(112)
低压低氧再给氧对大鼠脂质过氧化作用的影响	姜桂荣 马翥 王振国 欧阳军 ...
上海市区大气灰尘中稳定自由基浓度探讨	金为翘 莫素珍 丛树巍 金一尊 王成莲
俞云珍 周澄明 郭惠菊	(116)
应用 TL PAG-IEF 方法测定人红细胞超氧化物歧化酶(SOD)同工酶	聂崇兴 赵双星 ...
.....	(121)
不同年龄人红细胞超氧化物歧化酶活性的比较研究	张爱群 沈文梅
对 AA 神奇乐(SOD-L 型)营养液(AASQL)的自由基生物学评价	张尔贤 俞丽君
王国华 肖湘	(128)
克山病病区粮饲养大鼠血栓素、前列环素水平及其与硒、维生素 E 的关系	刘为民
李广生 张秀云 王凡 朱德志 马力 肖淑芬 刘雅言	(135)
用 ESR 技术研究黄芪对氧自由基的清除作用	汪德清 沈文梅 田亚平 孙存普
丛建波 吴可	(140)
黄芪对自由基所致红细胞溶血的防护效能研究	房征宇 汪德清 田亚平 沈文梅
柏珊 贾万钧	(143)
人红细胞铜锌超氧化物歧化酶的纯化	周潮 李培峰 隋建丽 方允中
抗坏血酸-Fe(Ⅲ)和过氧化氢对人血清白蛋白和人 IgG 抗原抗体反应的影响	李培峰
方允中	(150)
$\cdot\text{OH}$ 自由基产生的化学发光体系及若干天然产物清除作用的评价	张尔贤 俞丽君
李辉 肖湘	(153)
肾移植术前超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化物水平的动态观察	曾强 肖序仁
张晓英 敖建华 金道山 李炎唐	(160)
血清超氧化物歧化酶活性变化与临床疾病	赵云涛 石湘芸 杨晔 李仲孝 李庆棣
丁殿勋 川玲 刘文军	(163)
CONTENTS	(166)

膜脂过氧化及脱酯化在干旱引起植物膜损伤中的作用

吕 庆 郑荣梁

兰州大学生物系生物物理研究室 兰州 730000

提要:本文介绍了植物膜损伤的自由基学说,综述了近年来有关水分胁迫下自由基介导的膜脂过氧化尤其是膜脂脱酯化对植物膜损伤机理方面的研究进展。

关键词:干旱 自由基 脂类过氧化 脂类脱酯化 膜损伤 植物

水是植物体内含量最丰富、作用最广泛的成分,植物的正常生命活动只有在一定的细胞水分状态下才能进行,可以说水参加和影响几乎所有的生命过程,因此水分不足必将成为限制农作物的分布和产量的重要因素。目前,全世界已开垦的206.18亿亩耕地中就有43.7%处于缺水状态;在全世界范围内干旱引起的作物减产,相当于其他各种不良因素的总和。在我国约有2/5的耕地分布在干旱、半干旱地区,农田供水不足是我国北方粮食低产的主要原因^[1]。因此研究水分胁迫下作物伤害机理,对研究作物抗逆性、提高作物的抗旱性、培育抗旱品种等,均具有重要意义。当前,在逆境胁迫下膜损伤诸多机理的研究中自由基机理是个较新的观点。国内外研究者已做了大量研究,并有过一些综述^[2~7];本文着重介绍新的研究成果。

一、植物膜损伤的自由基学说的提出

干旱引起植物最直接的原初伤害是细胞膜损伤,表现为膜的渗透性增加和细胞内溶质分子的大量外渗^[8]。用电子显微镜也可观察到失水时细胞膜系统的破坏,如细胞质膜、叶绿体膜、线粒体膜、内质网膜的破坏^[9~11]。

长期以来人们试图弄清干旱引起膜损伤的机理,虽提出了一些假说,均缺乏有力的证据^[12]。60年代末,McCord和Fridovich首次在牛血红细胞中发现了超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)并研究其生物学作用后,Fridovich提出了超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的毒性学说^[13~16]。认为:所有需氧生物体内均可产生 $O_2^{\cdot-}$, $O_2^{\cdot-}$ 可损伤重要的生物大分子,造成机体的损伤。需氧生物体内的SOD可清除 $O_2^{\cdot-}$,而不需氧或厌氧生物体内缺乏SOD,故不需氧或厌氧生物在有氧的环境中不能抵御 $O_2^{\cdot-}$ 的毒害,以致不能生存。该学说提出后,许多实验结果均支持这一观点,并且在植物细胞内也发现了可清除 $O_2^{\cdot-}$ 的SOD^[17~19]。后来Dhindsa^[20]在用耐旱地衣(*Tortula ruralis*)和不耐旱地衣(*Cratoneuron filicinum*)进行的实验中发现SOD和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性与膜脂过氧化水平呈负相关,即耐旱地衣在缓慢失水时SOD和CAT活性都上升,膜脂过氧化水平下降,而不耐旱地衣SOD和CAT活性则略有下降,不能控制膜脂过氧化,据此他首次提出膜脂过氧化是干旱引起植物膜伤害的原因。以后的许多实验均证实了干旱引起的植物膜损伤的自由基学说^[21]:植物通过呼吸和光合作用在体内产生活性氧($O_2^{\cdot-}$ 、羟自由基 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 和单线态氧 1O_2),它们具有很强的氧化能力,对许多生物功能分子有

破坏作用;另一方面,植物体内还具有自由基清除系统。在正常情况下细胞内活性氧的产生与清除处于一种动态平衡状态,不会引起伤害。但当受到逆境胁迫时,平衡遭到破坏,自由基的产生和积累超过一定的阈值,就会发生膜伤害,甚至导致植物死亡。

二、膜脂过氧化对植物膜的损伤

膜脂过氧化(membrane lipid peroxidation)是指生物膜中不饱和脂肪酸受自由基引发产生过氧化反应,最终形成包括丙二醛(malondialdehyde, MDA)在内的多种过氧化物的降解产物^[22]。MDA与硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)在酸性条件下加热可发生显色反应,产物是粉红色的3,5,5-三甲基吡唑2,4-二酮(trimethine)在534 nm处有专一吸收峰。通常用测光吸收的方法确定MDA的量,此量可作为膜脂过氧化的指标,表示膜脂过氧化程度。而膜中不饱和脂肪酸的过氧化及其产物都直接影响膜的组成、结构、流动性和通透性等,使膜遭到损伤。

许多实验都证实水分胁迫下植物膜损伤与膜脂过氧化有关。如武宝珩等^[23]用小麦做的实验证明,小麦幼苗中茎的SOD活性高于根部,SOD活性高低与组织耐脱水力之间存在正相关。王宝山^[24]也证明,轻度胁迫下,不同抗旱性小麦叶片中SOD、CAT和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性与膜透性及膜脂过氧化水平间呈负相关;重度胁迫下,三种酶的活性都下降。蒋明义等^[25]和Mali等^[26]在对不同抗旱性水稻的水分胁迫中发现SOD、CAT和POD活性跟膜脂过氧化水平及膜透性间存在一定的负相关,但抗旱性较强的水稻POD活性上升,抗旱性较弱的水稻活性下降。王振镒^[27]在玉米的研究中表明,重度胁迫下,抗旱与不抗旱的玉米SOD活性均下降,但抗旱的比不抗旱的活性下降得慢。在黄麻中^[28],不同抗旱性的品种在水分胁迫下SOD和CAT活性均下降,但抗旱性强的品种酶活性下降幅度低于抗旱性弱的。而宋英淑等^[29]在研究大豆对干旱胁迫的抗性效应时发现,当大豆植株遭受水分胁迫,水势大幅度下降时,细胞质膜相对透性越大,植株对干旱越敏感,POD活性也相应越高。

另外,Price等^[21]发现干旱可使小麦的 O_2^- 含量增加。Mukherjee等^[30]发现干旱使眉豆(*vigna catjang*)CAT活性下降的同时, H_2O_2 含量增加。此情况说明,干旱能增加植物体内活性氧的量。

Price等^[31]还发现水分胁迫下植物体内Fe和Cu含量的变化与膜脂过氧化有关。干旱7天的小麦叶片中Fe和Cu的含量明显升高,分别由原来的 $0.367\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.393\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上升到干旱后的 $2.717\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.758\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,推测Fe和Cu的积累可使 O_2^- 通过Fenton反应产生 $\cdot\text{OH}$ 而引起膜伤害。

陈少裕等^[32]用甘蔗线粒体做水分胁迫和 O_2^- 自由基处理试验时发现,线粒体膜流动性下降与MDA含量增加有密切关系。认为:膜脂过氧化引起的膜脂不饱和度的下降可能是膜流动性降低的原因。

脂氧合酶(lipoxygenase)活性可能与膜脂过氧化也有关。周国顺在其硕士学位论文中指出, -0.2 MPa 的水分胁迫下小麦脂氧合酶活性有上升趋势,膜脂过氧化水平也有所升高。

从以上这些实验结果可看出:水分胁迫下植物体内各种保护酶的活性与膜脂过氧化程度有关。轻度胁迫下,抗旱性强的品种各种抗氧化酶的活性往往比抗旱性弱的或不抗旱的高,膜脂过氧化程度也相对较低;重度胁迫下,各种酶活性均下降,而相应的 O_2^- 、 H_2O_2 等活性氧的量增加,金属元素Fe和Cu的积累,膜脂不饱和度下降,以及脂氧合酶活性上升,这些均加速了

膜损伤的程度。

植物除了有清除活性氧的保护酶外,非酶清除体系也发挥着作用。如 Price 等^[33]在对小麦和九种欧洲杂草进行水分胁迫后发现,膜脂过氧化水平上升,SOD、CAT 和 POD 活性变化无规律,而谷胱甘肽(GSH)和维生素 E 含量却明显上升。Leprince 等^[34]的实验表明:萌发后的玉米种子在干旱条件下 SOD 和 POD 活性上升,同时维生素 E 含量也明显上升,GSH 也有升高。赵会贤在其硕士论文中用两种不同抗旱力的小麦进行水分胁迫后发现,质膜透性和 MDA 水平均升高,而 SOD、CAT 和 POD 活性无显著变化,但发现抗旱力较强的品种 GSH 和维生素 C 含量无变化,抗旱力较弱的品种 GSH 和维生素 C 含量明显下降。因此在自由基清除系统中非酶清除体系也起着作用。

除了上述支持膜脂过氧化是引起膜伤害的原因的实验外,也有相反的实验结果。如王邦锡和孙莉^[35]发现黄瓜叶片在水分胁迫下,膜透性增加,膜脂过氧化水平却下降;SOD 和 CAT 活性无变化,POD 活性则明显下降。他们还用二乙基二硫代氨基甲酸钠(DDC)和氨基三唑(AT)分别抑制 SOD 和 CAT 活性,用甘露醇清除 $\cdot\text{OH}$ 等方法来验证膜的损伤是不是由于 O_2^- 、 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ 引发了脂类过氧化所致。结果表明:膜损伤与膜脂过氧化之间并无相关性,因此他们认为把水分胁迫对膜造成的损伤归因于干旱诱发 O_2^- 、 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ 的过量产生从而导致膜脂过氧化的证据尚不充分。Quartacci 等^[36]对向日葵苗进行水分胁迫后也发现,胁迫后的苗与对照相比相对含水量、蛋白质含量、SOD 和 CAT 活性均下降,膜相对渗透率上升,而 MDA 含量却无明显变化,膜脂分析显示脂肪酸的不饱和度无变化。从而也表明水分胁迫引致的膜损伤与膜脂过氧化无关。

目前在测定膜脂过氧化水平时,大多采用 TBA 法,即测定膜脂过氧化反应的终产物之一 MDA 含量。虽然这是一种广泛采用、简便快捷的方法,但在测生物样品时,特别是测植物样品时,这一方法容易受到干扰,专一性不强,往往不能真实反映膜脂过氧化水平,Valenzuela^[22]对此有综述。我们实验室用自然干旱和 PEG 胁迫两种方法分别对小麦、玉米、蚕豆进行处理,发现随干旱天数和 PEG 浓度的增加,三种植物叶片匀浆的 MDA 量均呈下降趋势,与王邦锡等(1992)的结果相同。原因可能是水分胁迫下叶片中可溶性糖类大量积累,干扰了 TBA 与 MDA 的反应。但如果将受旱叶片的微粒体膜分离出来,测膜的脂类过氧化水平时,却会发现随干旱时间延长,MDA 量上升,说明干旱确实促进了膜脂过氧化(待发表)。因此改进测定脂类过氧化的方法,对研究膜脂过氧化与膜损伤的关系会有很大帮助。

三、膜脂脱酯化对植物膜的损伤

活性氧不仅具有使膜脂发生过氧化的作用,而且能使膜脂发生脱酯化(deesterification)。膜脂脱酯化是指膜磷脂中脂肪酸从甘油上脱离而使膜磷脂遭到破坏的过程。磷脂是两性脂,它具有由亲水的极性基团构成的头部和由疏水的脂肪酸碳链构成的尾部,脂肪酸从甘油上脱离后,亲水的头部便进入水相中,游离的脂肪酸则仍留在疏水相中。

1978年 Niehaus^[37]模拟生物膜体系,将含有两个月桂酸($\text{C}_{12:0}$)的磷脂酰胆碱溶于二甲亚砜中,以 KO_2 作为 O_2^- 的产生源,将 KO_2 加入到该体系中后发现,含有两个月桂酸的磷脂酰胆碱在月桂酰处发生了脱酯化反应,因而提出 O_2^- 对生物膜的伤害可能是由膜脂脱酯化所致,而不是膜脂过氧化。在上述反应中 O_2^- 是作为亲核物与磷脂发生反应的,但对其反应机理仍不清楚。

后来 Senaratna 等^[38~42]用大豆做的一系列实验确证了水分胁迫下植物膜脂脱酯化的存

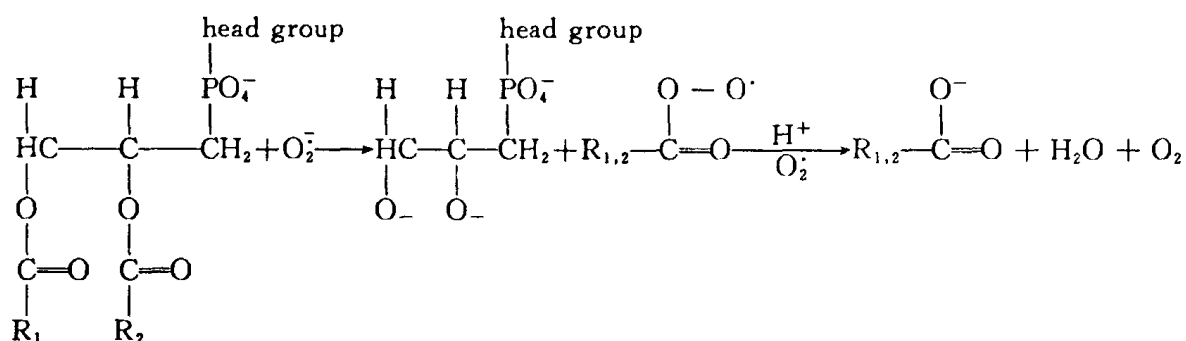
在。他首先证明吸胀6 h的大豆种子为耐旱型,吸胀36 h的为干旱敏感型,然后将从这两种类型种子胚轴分离得到的微粒体膜分别放入以黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶作为 O_2^- 产生源的系统中,一段时间后发现,耐旱型的微粒体膜相变温度由7℃增加到14℃,而在同样自由基浓度和处理时间的情况下,敏感型的微粒体膜相变温度由9℃增加到40℃。分析膜脂组分发现:敏感型相变温度的大幅度上升与磷脂:固醇比值下降,以及游离脂肪酸:磷脂比值增加有关,而总脂肪酸的不饱和度无变化。另外,将上述两种类型的大豆胚轴进行水分胁迫后又复水,发现胁迫前后耐旱型的微粒体膜相变温度为7℃不变,而敏感型微粒体膜相变温度由胁迫前的7℃上升到47℃,膜脂分析同样发现敏感型微粒体膜中,磷脂:固醇比值下降及游离脂肪酸:磷脂比值增加,总脂肪酸的不饱和度无变化。从微粒体膜中磷脂含量下降、游离脂肪酸含量增加以及总脂肪酸不饱和度无变化来看,无论自由基处理或水分胁迫都使膜相变温度升高,说明膜脂由液晶态转变成了凝胶态,即膜的流动性下降了。进一步的实验还发现胁迫前耐旱型的胚轴内源抗氧化剂含量(维生素E的等价量)比敏感型的高98.76%,而水分胁迫后,耐旱型的比敏感型的高99.81%,可见植物体内抗氧化剂含量与抗旱能力有关。为证明由于脱酯化而引起的膜内游离脂肪酸含量的增加,是导致膜流动性下降和膜相变温度升高的原因,他们将微粒体膜中的磷脂提取出来制成脂质体(liposome),用荧光探针DPH进行标记,发现无论水分胁迫或自由基处理都使膜流动性下降。当把饱和脂肪酸($C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$)加入脂质体中时膜相变温度由6℃上升到41℃,而加入不饱和脂肪酸时相变温度为6℃不变,当同时加入饱和及不饱和脂肪酸时,膜相变温度也由6℃上升到37℃。可见胁迫下膜中游离饱和脂肪酸的增加是膜相变温度升高的原因。

通过以上实验 Senaratna 等提出:水分胁迫引起的细胞膜损伤是由自由基介导的,自由基引起的膜脂脱酯化和游离饱和脂肪酸的积累使膜的性质发生了变化。

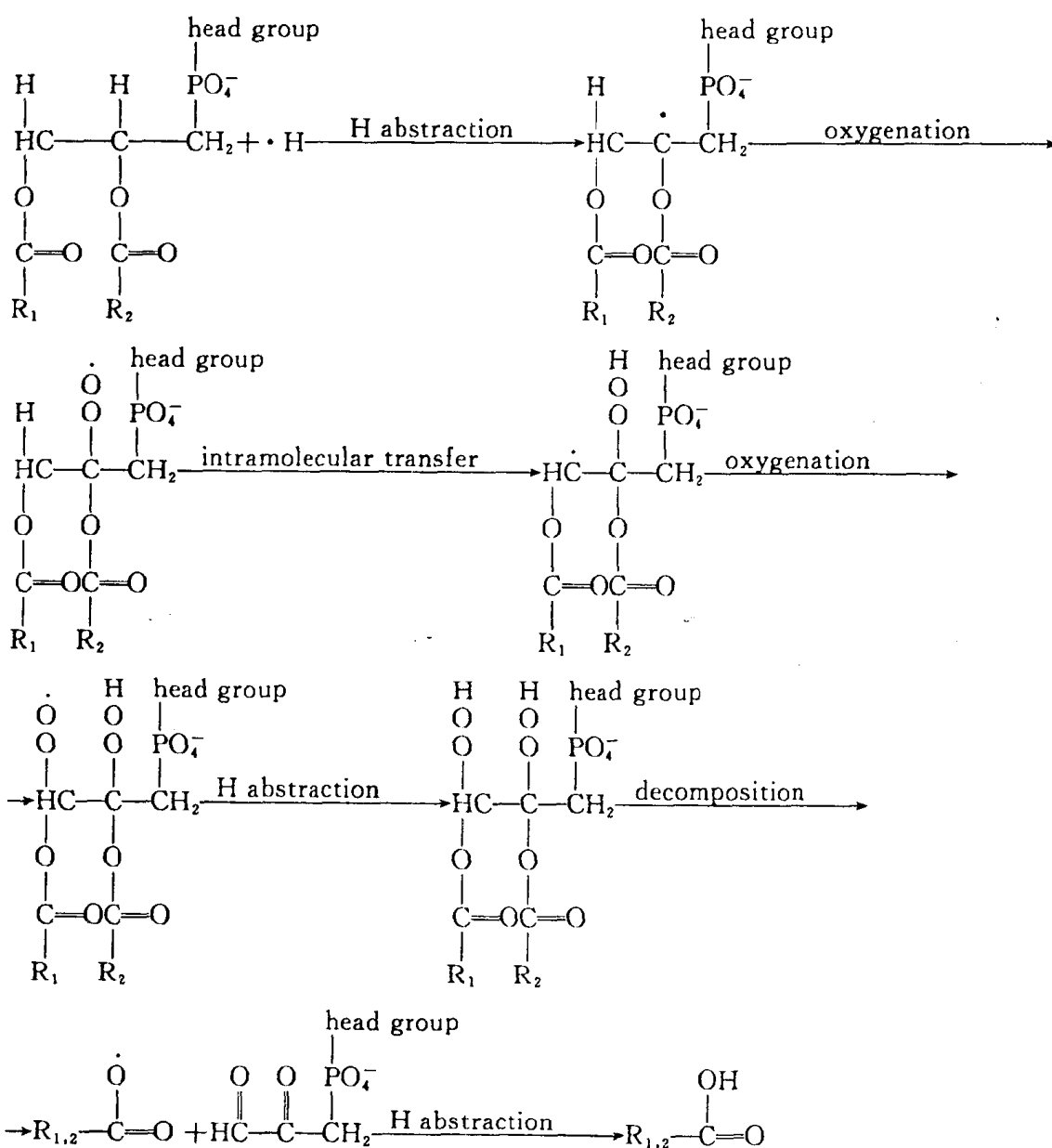
四、膜脂过氧化和脱酯化共同对植物膜的损伤

水分胁迫引起植物体内活性氧的积累,进而使细胞膜受到伤害,已由大量实验结果所证实。而对于水分胁迫下活性氧引起了膜脂过氧化还是膜脂脱酯化,则存在两种不同的看法。为弄清这一问题,我们用小麦叶片微粒体膜进行了实验。首次发现水分胁迫下活性氧引起的膜损伤中既有膜脂过氧化又有脱酯化现象发生。将正常小麦和干旱5天小麦叶片的微粒体膜分离出来测膜的流动性,发现膜的微粘滞度(microviscosity)差异很大,正常的为 1.46 ± 0.08 ,干旱5天的为 1.95 ± 0.09 ,微粘滞度的增加说明膜流动性下降,膜受到了损伤。而用 O_2^- 和 $\cdot OH$ 处理正常小麦微粒体膜时,微粘滞度也升高了,分别为 1.77 ± 0.07 和 2.17 ± 0.13 ,膜也受到了损伤。进一步测膜脂过氧化程度(MDA量)和膜脂不饱和度,对照组分别为 5.8 ± 0.36 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mmol}^{-1}$ 不饱和脂肪酸)和 57.02 ± 1.91 (%); O_2^- 处理后分别为 18.65 ± 0.36 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mmol}^{-1}$ 不饱和脂肪酸)和 48.81 ± 2.39 (%); $\cdot OH$ 处理后分别为 175.95 ± 1.55 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mmol}^{-1}$ 不饱和脂肪酸)和 46.47 ± 0.93 (%),膜脂过氧化程度的升高及不饱和度的降低,表明无论 O_2^- 或 $\cdot OH$ 处理均使微粒体膜发生了明显的膜脂过氧化,且 $\cdot OH$ 引发膜脂过氧化能力远远高于 O_2^- 。测膜脂过氧化的同时也测定了微粒体膜的磷脂和游离脂肪酸的量,发现与对照相比, O_2^- 和 $\cdot OH$ 处理的膜磷脂含量下降,分别为 27.63 ± 2.11 和 37.63 ± 2.11 ,对照为 62.46 ± 3.27 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 微粒体膜);游离脂肪酸含量升高,分别为 160.46 ± 4.45 和 185.77 ± 6.57 ,对照为 71.94 ± 2.37 ($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$ 微粒体膜),磷脂量的下降及游离脂肪酸量的升高,证明 O_2^- 和 $\cdot OH$ 的处理也使膜

A



B


 Fig. (A) The Mechanism of deesterification mediated by O_2^- (Niehaus, 1978)

 (B) The Mechanism of deesterification mediated by $\cdot\text{OH}$ (Senaratna, 1986)

脂发生了脱酯化。 O_2^- 和 $\cdot OH$ 引起脱脂化的机理如图所示^[37,43]。因此,我们认为干旱引起的膜损伤是膜脂过氧化和膜脂脱酯化共同作用的结果(待发表)。

总之,逆境胁迫下的植物膜损伤是个复杂的生理生化过程,有关膜伤害机理问题尤其是原初伤害问题还远没有搞清,而自由基损伤机理的提出以及近年来的有关大量研究结果,为该问题的深入研究开辟了广阔的前景,指出了一个很有希望的方向。

参考文献

- [1] 王韶唐,植物生理生化进展 1983,2:120
- [2] 王宝山,植物生理学通讯 1988,2:12
- [3] 王建华等,植物生理学通讯 1989, 1:1
- [4] 陈少裕,植物学通报 1989,4:211
- [5] 陈少裕,植物生理学通讯 1991,2:84
- [6] 郑荣梁,自由基生物学, p. 256, 高等教育出版社, 北京, 1992
- [7] Halliwell, B. The toxic effects of oxygen on plant tissues, eds. L. W. Oberley, p. 89 CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982
- [8] Hendricks, S. B. et al., Plant Physiol 1976, 58:7
- [9] Crevecœur, M. et al., Planta 1976, 1:31
- [10] Levitt, J. Drought injury, p. 53 Academic Press, New York, 1980
- [11] Nir, I. Aust. J. Biol. Rec. 1969,22:17
- [12] 赵可夫等,作物抗性生理, p. 194, 农业出版社, 北京, 1990
- [13] Fridovich, I. Ann. Rev. Biochem. 1975, 44:147
- [14] Fridovich, I. Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity, ed. W. A. Pryor, p. 239 Academic Press, New York, 1976
- [15] Fridovich, I., Science 1978, 201, 875
- [16] McCord, J. M. et al., J. Biol. Chem. 1969, 244:6049
- [17] Asada, K. et al., Eur. J. Biochem 1973, 36:257
- [18] Beauch. C. O. et al., Anal. Biochem 1971, 44:276
- [19] Foster, J. G. et al., Plant Cell Physiol 1980, 21:895
- [20] Dhindsa, R. S. et al., J. Expt. Botany 1981, 126:79
- [21] Price, A. H. et al., Free Radical Research Communications, 1989, 1:61
- [22] Valenzuela, A. Life Science 1991, 4:301
- [23] 武宝珩等,植物学报 1985,2:152
- [24] 王宝山等,山东师范大学学报(自然科学版) 1987, 1:15
- [25] 蒋明义等,植物生理学报 1991,1:80
- [26] Mali, P. C. et al., Phytochemistry 1977, 16:643
- [27] 王振镒等,西北农业大学学报 1989, 17:45
- [28] Chowdhury, S. R. et al., Physiol. Plant 1985, 4:476
- [29] 宋英淑,大豆科学 1987,4:277
- [30] Mukerjee, S. P. et al., Physiol. Plant 1983, 58:166
- [31] Price, A. H. et al., Superoxide formation and enhanced transition metal uptake in drought damaged wheat leaves, ed. C. Rice-Evans, p. 467, Richelieu Press, London, 1989
- [32] 陈少裕等,植物生理学报 1991,3:285
- [33] Price, A. H. et al., Biochemical Society Transactions, 1989, 17:493
- [34] Leprince, O. et al., New Phytol. 1990, 116:573

(下转第17页)

自由基与抗衰老研究

李培峰* 李文彬

解放军总医院老年医学研究所 北京 100853

提要:探索生物体衰老机理并采取相应措施延缓老化是老年生物学的艰巨任务。本文论及自由基与衰老关系,各种类型自由基特征及其损伤作用,生物体清除自由基机制,最后总结了近年来抗衰老研究所取得的重要进展。

关键词:自由基 衰老 抗衰老

一、自由基与衰老

自由基(free radical)是具有不配对价电子(即具有奇数电子)的原子、原子团、分子或离子。机体内自由基主要来源于细胞生化反应,此外,紫外线照射,电离辐射和环境污染等因素也可诱发机体产生自由基。自由基对正常生命活动的许多重要反应必不可少,它参与生物活性物质的合成(如花生四烯酸合成前列腺素),解毒反应、吞噬细胞杀灭细菌的过程等。但是,过量的自由基也可引起广泛的损伤效应,与炎症、肿瘤、免疫性疾病及衰老等有密切关系。

纵观诸多衰老学说,大致可归纳为两类,即遗传因素学说和环境因素学说^[1]。衰老的自由基学说是直接从实验得出的理论,属于影响衰老的环境因素。Harman^[2](1956年)在动物实验中发现放射线不仅可引起突变、诱发肿瘤,而且造成动物衰老和寿命缩短,他认为这些都是由于放射线照射机体产生自由基的结果。自由基反应可引起细胞的广泛损伤,它能诱发生物膜中不饱和脂肪酸发生过氧化反应生成过氧化脂质。过氧化脂质能使含有巯基的酶和核糖核酸酶失活,使DNA和RNA交联,触发DNA突变,与肿瘤的发生有关。线粒体发生脂质过氧化可使其形态结构破坏,并影响三羧酸循环和细胞色素的电子传递系统,破坏氧化磷酸化反应。微粒体的脂质过氧化可破坏核糖核蛋白体的结构使之解聚,影响蛋白质及酶的合成。溶酶体内含有多多种与细胞消化和降解有关的水解酶,因此,溶酶体的脂质过氧化可使膜的通透性增高,释放多种蛋白水解酶,破坏组织的正常结构,致使细胞的正常功能紊乱,甚至使组织细胞溶解以至死亡。结缔组织中的胶原发生交联,使胶原蛋白相互交联成大分子物质,胶原蛋白僵硬,失去弹性及膨胀性,使皮肤出现皱纹。脂质过氧化反应的终产物脂褐素可沉积于心、肾、脑等脏器,影响细胞功能^[3~5]。

二、自由基的类型及其损伤作用

生物体内自由基有多种,而且自由基与某些活性氧之间可以相互转化。弄清与细胞损伤有关的自由基有助于揭示衰老机理并为抗衰老提供依据。

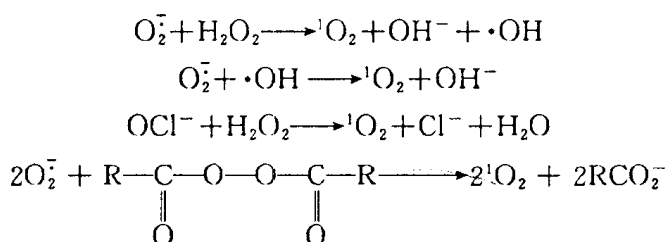
氧是体内重要的自由基,分子中有两个未成对电子,呈平行自旋,因此,氧属于双自由基(diradical)。不过氧分子的化学性质不如带有一个未成对电子的自由基活泼,主要原因是氧分

* 放射医学研究所 北京 100850

子不能同时接受两个成对电子,因为两个成对电子的自旋方向一定相反,虽然其中一个电子可以和氧分子中自旋方向相反的未成对电子共占一条轨道,但另一个电子却不能违反量子力学法则而与氧分子中另一个自旋方向相同的未成对电子共占一条轨道,如果这样的两个电子要共占一条轨道,首先必须在物质分子或原子碰撞氧分子之前,将其电子自旋的相同方向转变为相反,这不仅需要能量,而且需要时间,这样的化学反应受到所谓“自旋阻遏”作用。

有人报道高张力[大于 $17.9 \times 10^3 \text{ Pa}$ (134 mmHg)]氧抑制 WI-38 细胞的生长分裂^[6]。Hela 细胞在 40% 氧浓度中培养,细胞分裂受到抑制^[7]。在 95% 氧浓度中培养,细胞内核酸的合成也受到抑制^[8~10],高浓度的氧可使许多酶失活,尤以活性中心含有巯基的酶受损最为严重。

单线态氧($^1\text{O}_2$)是激发态的氧,它有两种激发状态, $^1\Sigma_g^+\text{O}_2$ 的能量是 $15.5 \times 10^4 \text{ J/mol}$,溶液中寿命为 10^{-11} s ,其特征是氧的两个外层电子占据不同轨道,但自旋相反。 $^1\Delta_g\text{O}_2$ 能量是 $9.21 \times 10^3 \text{ J/mol}$,寿命是 $2 \times 10^{-6} \text{ s}$,氧的两个外层电子占据相同的轨道,自旋相反。目前认为,低能态的 $^1\Delta_g\text{O}_2$ 是起反应的单线态氧^[11],能生成单线态氧的反应有:



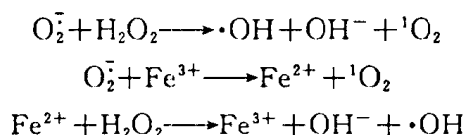
此外,激发态的 NO_2 也可引起 $^1\text{O}_2$ 的产生,是环境污染中 $^1\text{O}_2$ 的主要来源。单线态氧有较强的亲电子作用,故易和电子云密度高的双键及富含电子的基团发生反应,如蛋氨酸、组氨酸、色氨酸、酪氨酸和半胱氨酸。 $^1\text{O}_2$ 与这些氨基酸反应可使一些蛋白质和酶的活性丧失。

超氧阴离子自由基(O_2^-)是细胞内许多酶反应产物,如黄嘌呤氧化酶、醛氧化酶、NADPH-氧化酶、二氢乳清酸脱氢酶、半乳糖氧化酶等。生理条件下, O_2^- 主要来源于肝脏线粒体,产量可达 $24 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (组织)^[12]。

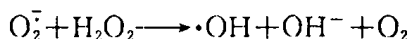
过氧化氢(H_2O_2)是氧还原的产物,D-氨基酸氧化酶,黄嘌呤氧化酶,尿酸酶, α -羟基酸氧化酶等酶反应都可产生 H_2O_2 。线粒体、微粒体和过氧化物体等是 H_2O_2 生成的主要场所。

目前,人们对 O_2^- 和 H_2O_2 的损伤作用尚未形成统一认识。有的作者报道 O_2^- 和 H_2O_2 均参与亚麻酸和花生四烯酸的过氧化反应^[13,14],有的报道 O_2^- 是引起红细胞膜脂质过氧化的必需因素^[15],还有报道 O_2^- 和 H_2O_2 均不直接引发脂质过氧化反应^[16]。

O_2^- 和 H_2O_2 之间反应可生成羟基自由基($\cdot\text{OH}$),反应的途径主要按 Fenton 式:



Haber-Weiss 反应也可生成 $\cdot\text{OH}$,但在体内反应速度极慢,反应式为:



$\cdot\text{OH}$ 是已知的最强氧化剂, O_2^- 和 H_2O_2 的毒性作用有可能是通过 $\cdot\text{OH}$ 表达的。

三、清除自由基的酶性防御系统

在正常生理情况下,自由基不断地产生,同时也不断地被清除,使自由基浓度维持在一定

限度内对机体有利无害。因而对体内自由基消除系统的研究是衰老与抗衰老研究的重要方面。

超氧化物歧化酶(SOD)存在于需氧生物中,催化 O_2^- 歧化生成 H_2O_2 。根据所含金属离子的不同,将 SOD 分为 Cu,Zn-SOD,Mn-SOD 和 Fe-SOD。实验表明,SOD 在有些器官中有明显随龄变化。有人测定8天,1、2、4、6和14月龄鼠的肝、肾、脑、肺、心和红细胞的 SOD,发现 SOD 在出生后至第二月龄呈渐进性增加,以后随月龄增加而趋于稳定,最后逐渐下降^[17]Massion^[18]证实雄性 C₅₇BL/6 J 鼠(5—100 d)脑中的 SOD 活性随龄降低32%—36%。

SOD 可能具有保护脑功能,延缓脑老化的作用。多巴胺是中枢神经系统的重要递质,老年人的运动迟缓,多动等症状与脑内这类递质的丧失和减少有关。 O_2^- 能使多巴胺发生氧化从而丧失活性。观察鼠各脑区在发育过程中 SOD 活性与多巴胺的关系,凡是 SOD 活性高的部位也是多巴胺含量高的区域^[19],因此 SOD 活性降低,就会导致与多巴胺有关的功能障碍。还有实验表明,脑内 SOD 活性低的区域,脂褐素积聚较多^[20]。氯丙嗪能抑制脂褐素形成,给小鼠注射氯丙嗪,其脑内脂褐素沉积明显减少;同时 SOD 活性增高^[21]。

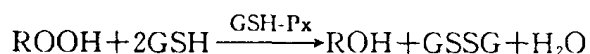
目前,已经开始将 SOD 包于脂质体内用于治疗自身免疫病、关节炎、放射病及放疗引起的副反应,化疗引起的骨髓损伤等。将 SOD 应用于延缓老化的工作有待于开展。

过氧化氢酶(catalase, CAT)是细胞内调节 H_2O_2 的重要酶。主要存在于过氧化物体和微粒体。 H_2O_2 的稳态浓度很低时,该酶起过氧化物酶作用(式1);当 H_2O_2 浓度高时,该酶则催化 H_2O_2 分子之间反应(式2):



H_2O_2 量减少后,与 O_2^- 的反应减弱,结果 $\cdot OH$ 形成减少。

谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)是细胞内抗脂质过氧化的重要成分,可分为含硒和不含硒两类^[22]。该酶作用机理是与 SOD 和 CAT 一起,通过清除 O_2^- 和 H_2O_2 以减轻和阻断脂质过氧化的一级引发作用;该酶还可通过还原氢过氧化物来减轻和阻止二级引发作用:



GSH-Px 对 GSH 有高度特异性,其还原过氧化物的能力依赖于 GSH。该酶对氢过氧化物具有相对专一性,可还原亚油酸,亚麻酸,异丙基苯及叔丁基氢过氧化物,对类固醇、胸腺嘧啶、核酸及前列腺素的氢过氧化物也有还原作用。GSH-Px 的亚细胞分布主要是在胞液和线粒体基质中,过氧化物体中没有。与 GSH-Px 的分布相互补,CAT 主要分布于过氧化物体中,SOD 也主要存在于胞液和线粒体基质中^[12]。

四、自由基与抗衰老研究

自由基反应对衰老的作用为抗衰老研究提供了理论依据。反之,抗衰研究的结果可以进一步证实自由基与衰老的关系。

Harman^[23,24]进行了一系列实验以观察自由基捕获剂对不同品系小鼠寿命的影响。结果发现半胱氨酸,2-巯基乙胺,2,2'-二氨基二乙基二硫化物可使 AKR 鼠的平均寿命提高到10.5个月,对照组为7.5个月,寿命增加35%,2-巯基乙胺可使 C₃H 鼠的平均寿命也延长。有人用乙氧基喹和丁基化羟基甲苯(BHT)实验,发现前者使 C₃H 鼠,后者使 BALB/C 鼠的寿命均有所延

长^[25,26]。

自由基捕获剂对动物平均寿命延长,但并未能延长最大寿命,因此,结果并不十分令人满意。由于捕获剂的吸收、分布和转化等因素均影响其作用,人们正试图克服这些困难继续研究下去。

维生素E是重要抗氧化剂,它为苯骈二氢吡喃的衍生物,是脂溶性物质。主要分布于线粒体膜,内质网和浆膜的特异部位上。天然存在的维生素E共有8种,按其结构可分为生育酚和生育三烯醇两类,每类又各分为 α 、 β 、 γ 和 δ 四种,以 α -生育酚的活性最强。1个分子 α -生育酚氧化成生育醌,可以还原2个分子的自由基。维生素E可抑制脂质过氧化,减少脂褐素的沉积,维生素E缺乏的食物饲养小鼠,其组织内脂褐素积聚增多^[27]。维生素E可以保护细胞内过氧化氢酶的活性,缺乏维生素E的大鼠,细胞中该酶的活性降低^[28]。维生素E还可维持谷胱甘肽过氧化物酶的活性^[29]。在维生素E存在下,培养的人成纤维细胞分裂次数增加,线虫的寿命延长^[30,31]。

维生素C因量的不同而作用也不相同^[32],小量维生素C有可能促进自由基生成而使脂质过氧化反应增强,相反,大剂量维生素C可清除自由基。缺乏维生素C的豚鼠其组织内脂褐素显著增加^[33,34]。

Sohal等^[35]观察了代谢率的降低对家蝇脑内脂褐素沉积和寿命的影响。研究表明,活动量小的家蝇,其平均寿命和最大寿命都显著高于活动量大的家蝇,后者脂褐素增长速度要比前者快3.6倍。这可能与代谢率降低,自由基产生减少有关。

调整饮食结构以减少自由基损伤也是抗衰老研究的重要途径。Harman^[36]观察了不饱和脂肪酸的量及不饱和度对雌性C₃H和雄性Swiss鼠寿命的影响,结果发现,脂肪酸的含量越大,不饱和度越高,C₃H鼠的平均寿命越短,但最大寿命没有改变。不饱和脂肪酸对Swiss鼠的寿命没有影响。

总之自由基对生物即有有益的作用,也有不利影响,这取决于自由基的浓度。体内有多种类型自由基,并有相应清除自由基的酶性防御系统。采取措施清除过量的自由基及保护细胞免受自由基损伤是抗衰老的重要方面,取得了一些成果。未来的工作有可能集中在确立与衰老关系最为密切的自由基类型及其作用机理的研究,发现或合成新的更为有效的抗氧化剂。这方面的深入探讨对衰老与抗衰老有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Cristofalo, V. J., *Advances in Gerontological Research*, Vol. 4, p. 45, Academic Press, New York, 1972
- [2] Harman, D. J., *Gerontol.*, 11:298, 1956
- [3] Bjorksten, J., *Theoretical Aspects of Aging*, p. 43, Academic Press, New York, 1974
- [4] Tappel, A. L., *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. exp. Biol.*, 1973, 32:1870
- [5] 徐璠民, *国外医学老年医学分册*, 1987, 8:1
- [6] Balin, A. K. et al., *J. Cell Biol.*, 1978 78:390
- [7] Rueckert, R. R. et al., *Cancer Res.*, 1960, 20:944
- [8] Pace, D. M. et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1962, 28:897
- [9] Drew, R. W. et al., *Exp. Cell Res* 1964, 36:297
- [10] Brosemer, R. W. et al., *Exp. Cell Res.*, 1961, 25:101

- [11] Badwey, J. A. et al., Ann. Rev. Biochem., 1980,49:695
- [12] Chance, B. et al., Physiol. Rev., 1979, 59:527
- [13] Kellogg, E. W. et al., J. Biol. Chem 1975,250:8812
- [14] Fridovich, S. E. et al., J. Biol. Chem., 1981, 256:260
- [15] Miura, T. et al., Chem. Pharm. Bull., 1984, 32:3227
- [16] Gerstenecker, S. H. et al., FEBS Lett., 1972, 27:171
- [17] 朱汉民,国外医学老年医学分册, 1985, 6:49
- [18] Massion, H. et al., Mech. Aging Develop., 1979, 10:93
- [19] Leding, M. et al., Brain Res., 1982, 4:333
- [20] Pisanti, F. A. et al., Arch. Gerontol. Geriat., 1983, 2, 343
- [21] Roy, D., et al., Neuro. Chem., 1983, 42:628
- [22] 陈媛等,《生命的化学》1983, 3:16
- [23] Harman, D. J., Gerontol., 1957, 12:257
- [24] Harman, D. J. Gerontol., 1961, 16:247
- [25] Comfort, A. et al., Nature., 1971, 229:254
- [26] Clapp, N. K. et al., J. Gerontol., 1979, 34:497
- [27] Reddy, K. et al., J. Nutr., 1973, 103:908
- [28] Chow C. K., Int. J. Vit. Nutr. Res. 1980, 50:364
- [29] Jensen, G. E. et al., Ann. Nutr. Metab., 1981, 25:27
- [30] Marx, J. L., Science, 1974, 186:1105
- [31] Epstein, J. et al., Mech. Aging Dev., 1972, 6:257
- [32] Dormandy, T. L. Lancet, 1978, 1:647
- [33] Sulkin, N. M. et al., J. Gerontol., 1960, 15:2
- [34] Sulkin, D. E. et al., Lab. Invest., 1967, 16:142
- [35] Sohal, R. S. et al., J. Gerontol., 1979, 34:489
- [36] Harman., D. J., Gerontol., 1971, 26:451

Free Radical and Anti-Aging Research

Li Peifeng Li Wenbin*

(Institute of Gerontology, General Hospital of PLA, Beijing 100853)

Abstract: A great deal of evidences have showed that free radical play an important role in the processes of aging. The present paper described the properties and the injury action of free radicals as well as the mechanism of scavenging free radicals in living bodies. The major achievements in anti-aging research have also been summerized.

key words: free radical; aging; anti-aging research

* Institute of Radation Medicine, Beijing 100850

脂褐素与衰老

李培峰* 李文彬

解放军总医院老年医学研究所 北京 100853

提要:脂褐素普遍存在于老年动物细胞中,揭示脂褐素的本质、起源及其在细胞老化过程中作用,是老年医学面临的重大挑战。本文论及脂褐素起源理论、组化及理化特性、随龄变化和与衰老关系等有关内容,意在总结十几年来脂褐素研究所取得的成就和进展。

关键词:脂褐素 衰老

一、脂褐素的基本概念

随着年龄的增长,动物体内的多种组织细胞会出现一种典型的形态结构——脂褐素。它是含有脂类、蛋白质、金属离子等多种成分的物质,有黄色或淡绿色的自发荧光。Hannover^[1]于1842年在神经细胞中首先发现的脂褐素,迄今的百余年来,人们对它的研究始终没有中断。

二、脂褐素的起源

目前,脂褐素的起源还是一个有争议的问题,根据色素颗粒的沉积部位与细胞器的关系发展引起许多学说。

脂褐素与多种水解酶有关,故此有人提出起源于溶酶体。Koenig^[2]用组化方法证实了脂褐素和溶酶体的相似性。Chang^[3]等人根据电镜观察结果,提出溶酶体循环理论,溶酶体在内部首先形成片层状结构,经过沉积、转移,脂类降解最后再生成新的溶酶体;这一循环中,任何年龄细胞都有变异的情况存在,但在老年人中,溶酶体降解这一环节如果受阻,它便以脂褐素形式蓄积。

Colocolough^[4]、Hason^[5]及 Glees^[6]等人的研究表明,脂褐素来源于线粒体,因为它的分布靠近线粒体,有的色素颗粒就在线粒体中,二者关系密切。

还有人主张脂褐素来源于高尔基体,内质网的观点,但以上的各种学说都有待于直接的证据来证实。

三、脂褐素的形成

大多数人支持自由基学说。需氧生物在新陈代谢过程中,某些氧化反应伴随着自由基的形成,例如,黄嘌呤氧化酶催化次黄嘌呤或黄嘌呤氧化成尿酸,同时可生成超氧阴离子自由基(O_2^-)^[7,8],醛氧化酶、NADPH-氧化酶、NADPH-细胞色素 C 还原酶、二氢乳清酸脱氢酶等催化底物反应时,都有自由基产生。空气中的氧化性污染物如 O_3 、 NO_2 、 NO 等亦能在体内起自由基反应^[9,10]。光线照射(特别是紫外线)能使水生成 $\cdot OH$ 和 e_{aq}^- 等^[11]。

自由基性质非常活泼,含氧自由基多能互相转换, O_2^- 通过歧化反应转变为 H_2O_2 ,在铁螯合物存在下, O_2^- 与 H_2O_2 可转变成 $\cdot OH$ 。因此,无论是体内或体外因素所致某一种含氧自由基增高

* 放射医学研究所 北京 100850