

电子自旋共振技术 在生物和医学中的应用

Applications of Electron Spin Resonance in Biology and Medicine



赵保路 编著

中国科学技术大学出版社

当代科学技术基础理论与前沿问题研究丛书

中国科学技术大学
校友文库

电子自旋共振技术 在生物和医学中的应用

Applications of Electron Spin Resonance in Biology and Medicine

赵保路 编著

中国科学技术大学出版社

内 容 简 介

全书共分 15 章,内容包括 ESR 基本原理,实验技术,自旋标记技术,自旋捕集技术,自旋标和自旋捕集剂的合成,ESR 成像技术的基本原理和概念,ESR 技术在细胞膜、蛋白质结构、抗氧化剂的筛选和研究及心脏病、神经退行性疾病、老年痴呆症、帕金森综合征和中风等疾病研究及辐射损伤中的应用。此外,本书还介绍了电子自旋共振在环境污染、植物光合作用以及植物抗病和感病作用研究中的应用。

本书可供从事 ESR、自由基、生物、化学和医学等相关领域的广大科研工作者及大专院校的师生阅读和参考,也可以为从事自由基和抗氧化剂开发的技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

电子自旋共振技术在生物和医学中的应用/赵保路编著. —合肥:中国科学技术大学出版社,2009.5

(当代科学技术基础理论与前沿问题研究丛书:中国科学技术大学校友文库)

“十一五”国家重点图书

ISBN 978-7-312-02232-6

I. 电… II. 赵… III. ① 电子自旋共振—应用—生物学—研究 ② 电子自旋共振—应用—医学—研究 IV. Q68 R312

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 068912 号

出版发行 中国科学技术大学出版社

地址 安徽省合肥市金寨路 96 号,邮编 230026

网址 <http://press.ustc.edu.cn>

印 刷 合肥晓星印刷有限责任公司

经 销 全国新华书店

开 本 710×1000 1/16

印 张 28.75

字 数 563 千

版 次 2009 年 5 月第 1 版

印 次 2009 年 5 月第 1 次印刷

印 数 1—2000 册

定 价 86.00 元

编 委 会

顾 问 吴文俊 王志珍 谷超豪 朱清时

主 编 侯建国

编 委 (按姓氏笔画为序)

王 水	史济怀	叶向东	伍小平
刘 兢	刘有成	何多慧	吴 奇
张家铝	张裕恒	李曙光	杜善义
杨培东	辛厚文	陈 颢	陈 霖
陈初升	陈国良	周又元	林 间
范维澄	侯建国	俞书勤	俞昌旋
姚 新	施蕴渝	胡友秋	骆利群
徐克尊	徐冠水	徐善驾	翁征宇
郭光灿	钱逸泰	龚 昇	龚惠兴
童秉纲	舒其望	韩肇元	窦贤康

总 序

侯建国

(中国科学技术大学校长、中国科学院院士、第三世界科学院院士)

大学最重要的功能是向社会输送人才。大学对于一个国家、民族乃至世界的重要性和贡献度,很大程度上是通过毕业生在社会各领域所取得的成就来体现的。

中国科学技术大学建校只有短短的 50 年,之所以迅速成为享有较高国际声誉的著名大学之一,主要就是因为她培养出了一大批德才兼备的优秀毕业生。他们志向高远、基础扎实、综合素质高、创新能力强,在国内外科技、经济、教育等领域做出了杰出的贡献,为中国科大赢得了“科技英才的摇篮”的美誉。

2008 年 9 月,胡锦涛总书记为中国科大建校五十周年发来贺信,信中称赞说:半个世纪以来,中国科学技术大学依托中国科学院,按照全院办校、所系结合的方针,弘扬红专并进、理实交融的校风,努力推进教学和科研工作的改革创新,为党和国家培养了一大批科技人才,取得了一系列具有世界先进水平的原创性科技成果,为推动我国科教事业发展和社会主义现代化建设做出了重要贡献。

据统计,中国科大迄今已毕业的 5 万人中,已有 42 人当选中国科学院和中国工程院院士,是同期(自 1963 年以来)毕业生中当选院士数最多的高校之一。其中,本科毕业生中平均每 1000 人就产生 1 名院士和 700 多名硕士、博士,比例位居全国高校之首。还有众多的中青年才俊成为我国科技、企业、教育等领域的领军人物和骨干。在历年评选的“中国青年五四奖章”获得者中,作为科技界、科技创新型企业界青年才俊代表,科大毕业生已连续多年榜上有名,获奖总人数位居全国高校前列。鲜为人知的是,有数千名优秀毕业生踏上国防战线,为科技强军做出了重要贡献,涌现出 20 多名科技将军和一大批国防科技中坚。

为反映中国科大五十年来人才培养成果,展示毕业生在科学研究中的最

新进展,学校决定在建校五十周年之际,编辑出版《中国科学技术大学校友文库》,于2008年9月起陆续出书,校庆年内集中出版50种。该《文库》选题经过多轮严格的评审和论证,入选书稿学术水平高,已列为国家“十一五”重点图书出版规划。

入选作者中,有北京初创时期的毕业生,也有意气风发的少年班毕业生;有“两院”院士,也有 IEEE Fellow;有海内外科研院所、大专院校的教授,也有金融、IT 行业的英才;有默默奉献、矢志报国的科技将军,也有在国际前沿奋力拼搏的科研将才;有“文革”后留美学者中第一位担任美国大学系主任的青年教授,也有首批获得新中国博士学位的中年学者;……在母校五十周年华诞之际,他们通过著书立说的独特方式,向母校献礼,其深情厚意,令人感佩!

近年来,学校组织了一系列关于中国科大办学成就、经验、理念和优良传统的总结与讨论。通过总结与讨论,使我们更清醒地认识到,中国科大这所新中国亲手创办的新型理工科大学所肩负的历史使命和责任。我想,中国科大的创办与发展,首要的目标就是围绕国家战略需求,培养造就世界一流科学家和科技领军人才。五十年来,我们一直遵循这一目标定位,有效地探索了科教紧密结合、培养创新人才的成功之路,取得了令人瞩目的成就,也受到社会各界的广泛赞誉。

成绩属于过去,辉煌须待开创。在未来的发展中,我们依然要牢牢把握“育人是大学第一要务”的宗旨,在坚守优良传统的基础上,不断改革创新,提高教育教学质量,早日实现胡锦涛总书记对中国科大的期待:瞄准世界科技前沿,服务国家发展战略,创造性地做好教学和科研工作,努力办成世界一流的研究型大学,培养造就更多更好的创新人才,为夺取全面建设小康社会新胜利、开创中国特色社会主义事业新局面贡献更大力量。

是为序。

2008年9月

序

电子自旋共振(ESR)理论和技术近年来发展迅速,在多个方面的应用都取得了重要成果,在生物方面的应用尤其引人注目。ESR 是检测自由基最直接和最有效的方法。ESR 技术,特别是自旋捕集技术的发展在自由基的检测和研究中发挥了重要作用,运用该技术进行生物自由基的作用机制及应用研究取得了令人瞩目的成果,为自由基生物学的发展作出了重要贡献。由于生物体系中大部分分子都不含自由基,ESR 技术在生物领域的研究受到一定限制,然而自旋标记技术的发展使 ESR 技术在生物领域的应用得到了扩展,取得了一系列可喜成就。另外,ESR 成像技术在生物和医学中的应用正在成为国际上广泛关注的研究领域。

赵保路教授是我国自由基生物学研究的著名专家,几十年来的科研工作取得了丰硕成果。他主持建立和发展了多种 ESR 检测生物体系自由基的新技术,研制成功我国首台 L 波段和 X 波段 ESR 成像仪,系统地研究了一氧化氮和氧自由基的性质和生物功能及其在医学中的应用。他在百忙之中,为中国科学技术大学(以下简称科大)校庆 50 周年撰写了本书。本书介绍了电子自旋共振基本原理,实验技术,自旋标记技术,自旋捕集技术和 ESR 成像技术的基本原理和概念,以及 ESR 技术在生物学和一些重大疾病如心脏病、神经退行性疾病、老年痴呆症、帕金森综合征和中风等疾病研究中的应用。本书是赵保路研究员根据多年研究工作及国内外该领域研究进展总结而得,深入浅出,是一本难得的关于 ESR 技术在生物学和医学中的应用的专著,为相关领域的教学和科研人员提供了一本优秀的参考书。

早在 20 世纪 70 年代在科大工作期间,我就与赵保路教授一起讲授 ESR

课程,共同从事科学研究。几十年来,我们一直有着很好的合作。在他为科大校庆 50 周年撰写本书之际,我欣然作序,祝贺本书出版,也祝愿科大越来越辉煌。

张建中

2008 年元月 6 日

前 言

早在 20 世纪 70 年代在中国科技大学工作期间,我就开始协助张建中老师管理和使用 ESR 仪器并教授 ESR 课程。1978 年在读研究生期间,我开始从事 ESR 自由基生物学和医学研究,毕业之后留在中国科学院生物物理研究所继续从事这方面的研究。刚开始主要集中在利用 ESR 自旋标记技术研究细胞膜和膜蛋白的构象,接着研究生物体系产生的氧自由基和一氧化氮自由基、自由基和疾病的关系、天然抗氧化剂对自由基的清除作用及其在健康和药物研发中的应用。

我先后分别于 1985 年至 1987 年和 1991 年至 1992 年在美国著名 ESR 生物学专家 Lawrence Berliner 教授的 *in vivo* ESR 实验室工作三年多时间,亲自参与 ESR 生物实验模型的设计和 *in vivo* ESR 研究,合成了多种用于 ESR 的自旋标记物。之后又在英国食品研究所、香港大学和美国伯克利大学从事 ESR 生物学研究。以后主要集中在 ESR 自旋捕集技术在生物和医学中的应用,特别集中于天然抗氧化剂方面的研究,完成了多个基金和项目。为了让 ESR 更好地适用生物研究的需要,近年来又主持研制了 ESR 成像仪,在国内首次研制成功 L 波段和 X 波段 ESR 成像仪器,填补了国内空白。可以说自从工作后三十多年没有离开过 ESR 在生物中的研究。

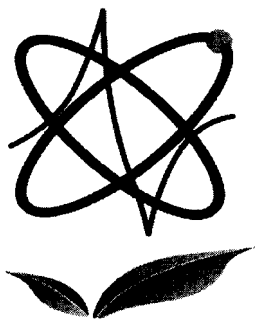
ESR 技术在生物学中的研究也给我们带来巨大的回报,我们在研究工作中取得一系列成果,在国内外发表了两百多篇论文和一本专著。在此期间,我们在自由基生物和医学方面的研究得到国内外的关注,我先后被国内外学术会议邀请做学术报告,担任了中国自由基生物和医学专业委员会主任、亚洲自由基研究学会主席,并在中国首次举办了亚洲自由基研究学术大会和第

十四次国际自由基学术大会。在母校成立 50 周年之际,应彭子成教授、中国科学技术大学校友会和中国科学技术大学出版社的邀请,我总结了二十多年的工作经验以及自 1993 年以来每年给中国科学院研究生院的研究生讲授 ESR 技术在生物和医学研究中的应用及其进展,将这些内容都包括在本书里。本书既是我向母校成立 50 周年的一个小小的献礼,同时也可以供同行在利用 ESR 技术进行生物和医学自由基研究时参考。

感谢彭子成教授、中国科学技术大学校友会和中国科学技术大学出版社的邀请和支持使本书得以出版;感谢国家自然科学基金委对我们多年来的基金支持,使我们的科研工作得以顺利进行,并获得一些有意义的结果;感谢我的研究生和博士后刻苦钻研,辛勤工作,出色完成了各项研究项目,取得可喜成果,为本书提供了主要素材;感谢中国科学院化学研究所刘扬教授为本书撰写了第 4 章(自由基捕捉剂的化学合成)和第 14 章(电子自旋共振在植物光合作用研究中的应用);感谢张春爱副教授为本书提出很多宝贵建议和修改意见。

赵保路

2008 年 11 月



目 次

总序	i
序	iii
前言	v
第 1 章 电子自旋共振(ESR)基本原理	1
1.1 电子自旋共振(ESR)	1
1.2 ESR 波谱仪和测量参数的选择	13
1.3 ESR 测量自由基的实验技术	15
第 2 章 自旋标记技术	29
2.1 自旋标记概念	29
2.2 氮氧自旋标记的波谱解析	31
2.3 自旋标记在生物学中的应用	34
第 3 章 自旋捕集技术	56
3.1 基本原理	56
3.2 氧自由基的捕捉	58
3.3 NO 自由基的检测	66
3.4 乙酸乙酯抽提法 ESR 检测一氧化氮自由基	75
3.5 一氧化氮和氧自由基的同时检测	85
3.6 炎症过程产生自由基的捕捉	88
第 4 章 自由基捕捉剂的化学合成	100
4.1 引言	100
4.2 通用型自由基捕捉剂的合成与基本特性	101
4.3 几种新型特异功能性自由基捕捉剂的合成与应用	111
第 5 章 ESR 成像技术	120
5.1 EPR 成像原理	121
5.2 L 波段 ESRI 成像系统的研制	122

5.3	X 波段 ESRI 成像系统的研制	130
5.4	局部心肌缺血再灌所导致的心肌损伤区域和心肌坏死进行 EPR 成像研究	137
5.5	一氧化氮自由基的 ESRI 图像	140
5.6	植物 X 波段 ESR 波谱成像	145
5.7	EPR 成像的其他应用	147
第 6 章	电子自旋共振在细胞膜结构研究中的应用	152
6.1	细胞膜的结构	152
6.2	细胞膜的相变	154
6.3	细胞膜的通透性	157
6.4	细胞膜的流动性	158
6.5	膜中的脂类-蛋白相互作用	173
第 7 章	利用 ESR 研究膜蛋白的结构和动态特性	182
7.1	自旋标记探测蛋白质巯基结合位置的大小和构象变化	182
7.2	EPR 研究非共价结合自旋标记血清白蛋白和血红蛋白	188
7.3	利用位置特异自旋标记物研究 S-腺苷甲硫氨酸合成酶活性位置的 动力学性质	190
7.4	用自旋标记研究跨膜蛋白细菌视紫素的结构	193
7.5	机械敏感通道蛋白是跨膜机械电子开关	199
7.6	多药转运体 MsbA 运输循环中能量转换的结构基础	205
7.7	用自旋标记 ESR 技术研究线粒体解耦联蛋白 UCP 的结构和功能	210
第 8 章	电子自旋共振用于抗氧化剂的筛选和研究	216
8.1	茶多酚对氧自由基的清除作用	217
8.2	茶多酚对过氧亚硝基氧化活性的抑制作用	219
8.3	茶多酚对脑突触体脂质过氧化的保护作用和对脂类自由基的清除 作用	221
8.4	茶多酚不同异构体对活性氧自由基的清除作用	223
8.5	茶多酚清除氧自由基的分子机理	229
第 9 章	电子自旋共振在药理学研究中的应用	237
9.1	ESR 在研究五味子药理学作用中的应用	237
9.2	ESR 在研究黄芩甙及其铜锌络合物药理作用中的应用	244
9.3	ESR 在研究山楂黄酮的抗氧化和健康作用中的应用	249
9.4	ESR 在研究丹参酮抗氧化途径及其对心脏病的治疗作用机理中的 应用	253

第 10 章	电子自旋共振在神经退行性疾病和衰老研究中的应用	267
10.1	ESR 技术在帕金森综合征研究中的应用	267
10.2	ESR 技术在脑缺血再灌注损伤(中风)中的应用	277
10.3	ESR 技术在老年痴呆症的分子机理及尼古丁预防老年痴呆症研究中的应用	287
第 11 章	电子自旋共振在心脏病研究中的应用	294
11.1	心肌缺血再灌注损伤和氧自由基	294
11.2	一氧化氮自由基和心脏病	299
11.3	银杏黄酮对离体心肌缺血再灌注产生的一氧化氮和氧自由基的清除作用	308
11.4	知母宁抗离体心肌缺血再灌注损伤的 NO 和氧自由基机制	311
11.5	在体大鼠缺血再灌注心脏产生的 NO 自由基	315
11.6	银杏黄酮对在体缺血再灌注心肌产生的一氧化氮自由基的调节作用	321
11.7	知母宁对在体大鼠缺血再灌注心肌产生的 NO 自由基的调节作用	325
11.8	缺血再灌注诱导心肌细胞凋亡的一氧化氮自由基信号通路	328
11.9	天然抗氧化剂银杏黄酮和知母宁对细胞凋亡一氧化氮自由基通路的调节作用	336
第 12 章	电子自旋共振在辐射治疗研究中的应用	342
12.1	辐射治疗和氧自由基	342
12.2	辐射敏化剂和氧自由基	343
12.3	光动力疗法产生的一氧化氮自由基	344
第 13 章	电子自旋共振在环境污染研究中的应用	367
13.1	吸烟过程中产生的自由基	367
13.2	吸烟产生自由基的检测	370
13.3	吸烟气相自由基对细胞膜脂质过氧化和流动性的影响	372
13.4	吸烟气相自由基对巨噬细胞呼吸爆发产生氧自由基的影响	373
13.5	吸烟气相自由基对细胞膜脂质过氧化和流动性的影响	376
13.6	除草剂与自由基	378
13.7	化学污染和自由基	380
第 14 章	光合系统中活性自由基产生分子机制的电子自旋共振研究	387
14.1	引言	387
14.2	PS II 内超氧阴离子自由基生成机制的 ESR 研究	388
14.3	PS II 中由超氧阴离子、羟基自由基诱导的光抑制损伤的 ESR 研究	397

14.4	PS II 抑制过程中超氧阴离子产生的自调节保护功能	406
14.5	主要结论	412
第 15 章	电子自旋共振在植物抗病和染病作用研究中的应用	417
15.1	利用 ESR 检测植物产生的 ROS 和一氧化氮自由基	417
15.2	用 ESR 波谱技术研究一氧化氮自由基在小麦条锈病抗感过程 中的作用机理	424
15.3	用 ESR 技术研究亚硝酸还原酶是高等植物一氧化氮自由基的 来源	432
15.4	用 ESR 技术研究一氧化氮自由基在植物分化和退分化中的 作用	438

第 1 章 电子自旋共振(ESR)基本原理

自由基有很多生物功能,与健康 and 疾病有非常密切的关系,有什么好办法和技术检测它呢?虽然检测自由基有各种物理方法和化学方法,但是电子自旋共振是检测自由基最直接最有效的方法。因为自由基含有一个未成对电子,这就决定了它具有顺磁性,而 ESR 的检测能级范围正是电子自旋跃迁的能级。本章首先介绍检测自由基的 ESR 技术的基本原理和测试技术,然后结合测试每种自由基的具体方法进行详细介绍和讨论。

1.1 电子自旋共振(ESR)

电子自旋共振(electron spin resonance, ESR)又称电子顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR),是研究电子自旋能级跃迁的一门学科,是检测自由基最直接最有效的方法。其原理的论述需要量子力学的理论,但目前大部分生物学和医学工作者和广大读者难以接受和理解这一与自己专业有一定差距的理论,特别是那些数学符号和方程式。因此,本章尽量少用数学推导,而用一些易于接受的语言来描述 ESR 的基本原理和技术^[1~4]。

1.1.1 共振条件

电子除了具有质量 m , 电荷 e 之外,它还具有另一个特性,就是自旋 S 。所谓自旋,可以想象为电子像地球一样绕一个轴旋转。电子是一个带电体,带电体的旋转就会产生磁场。这样一个旋转着的电子就好像一个小磁偶极子,在力学上可以用 m 描述磁偶极矩,它具有方向性,因此是一个矢量。如果将这一磁偶

极矩放在磁场 H 中,它们之间就会产生一个相互作用能 E :

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{H} = -\mu H \cos \theta$$

这里 H 为磁场 H 的大小, μ 为磁矩 $\boldsymbol{\mu}$ 在磁场方向的投影, θ 为 $\boldsymbol{\mu}$ 和 $\mathbf{H}$ 之间的夹角,负号表示它为吸引能。当 $\theta = 0$ 时, $E = -\mu H$, 即电子的自旋磁矩和外磁场平行时能量最低,体系最稳定;当 $\theta = 180^\circ$ 时, $E = \mu H$, 即电子的自旋磁矩和外磁场反平行时,能量最高,体系最不稳定。如果将电子从自旋磁矩平行外磁场的位置转变到反平行的位置,需要外力做功,反之就会释放能量。

在经典物理学中,磁矩是正比于角动量的。电子的自旋角动量为 S 。

$$\boldsymbol{\mu} = -g\beta S$$

这里 g 是一个没有量纲的因子,称 g 因子。对自由电子, $g = 2.0023$ 。 β 为玻尔磁子。

$$\beta = \frac{e\hbar}{2mc} = 0.9273 \times 10^{-20}$$

这里 $\hbar = h/2\pi$, h 为普朗克常数, m 为电子的质量, c 为光速,负号是因为电子带负电荷。自旋角动量 S 在量子力学中写为 $\hat{S}$, 称自旋算符,它在 z 方向的分量为 S_z , 可以用它的本征值 ms 表示, ms 只能取 $\pm 1/2$ 两个值。这样,电子在磁场中的磁相互作用能量就为

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{H} = -(-g\beta S) \cdot \mathbf{H} = g\beta H ms = \pm 1/2(g\beta H)$$

这就是说,电子的能量在磁场中被分裂成了两个,这两个能量差为

$$E = E_1 - E_2 = (1/2)g\beta H - (-1/2)g\beta H = g\beta H$$

自旋磁矩与外磁场平行的电子具有较低的能量 $-g\beta H$, 自旋磁矩和外磁场反平行的电子具有较高的能量 $g\beta H$ 。若用辐射的方法给处于低能级的电子一个能量 $h\nu$, 正好等于 $g\beta H$, 它们就会吸收这一能量跃迁到高能级,这一过程称为电子在频率 ν 的作用下,在磁场 H 发生了共振。

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

称为电子自旋共振条件。上面的描述可以用图 1.1 表示。

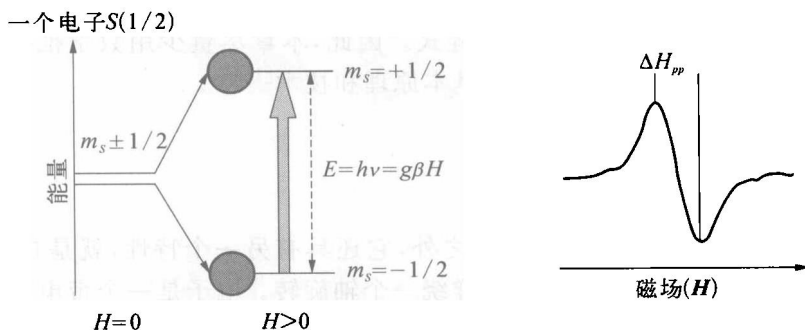


图 1.1 电子自旋共振条件示意图和电子自旋共振产生的 ESR 波谱

由共振条件可以看出,当 $H = 0$ 时, $E = 0$, 所有电子能级相同,称为能级简并。当 $H > 0$ 后,电子自旋能级开始分裂为两个,分裂的大小与磁场的大小成正比,即电子分为两组,高能量组和低能量组。改变磁场 H 或频率 ν 都可以满足共振条件,使处于低能级的电子跃迁到高能级。对于 ESR 波谱仪,通常是固定频率、改变磁场来实现电子自旋共振的。电子从低能级跃迁到高能级,吸收能量,用仪器就可以观察到这一能量吸收,把它记录下来,就得到如图 1.1 的 ESR 信号。信号的高低或积分面积代表信号的强度,峰到峰之间的磁场强度变化为 ESR 信号的线宽 ΔH_{pp} 。

1.1.2 g 因子

前面叙述共振条件时引入了 g 因子,作为一个常数 $g = 2.0023$ 。对自由电子, $g = 2.00$, ± 0.0023 是相对论修正。 g 因子的本质反映了未成对电子自旋角动量和轨道角动量之间的耦合。对没有轨道角动量的自由电子, $g = 2.0023$ 。大部分自由基的 g 值很接近 2.00,但不同自由基具有不同 g 值,所以 g 因子是表征自由基的一个重要参数。由图 1.1 中信号变化斜率最大处的磁场可以计算出一个自由基信号的 g 因子。表 1.1 给出了一些自由基的 g 因子。

表 1.1 部分自由基的 g 因子

自 由 基	g 因 子
苯负离子自由基	2.002 854
萘负离子自由基	2.002 757
蒽负离子自由基	2.002 604
半醌自由基	2.003 0~2.005 0
氮氧自由基	2.005 0~2.006 0
过氧自由基	2.001 0~2.080 0
含硫自由基	2.02~2.06

对大部分顺磁性过渡金属离子,由于轨道角动量的存在,其值偏离 2.00 较远,例如

Cu^{2+} 络合物	$g = 2.0 \sim 2.4$
Fe^{3+} (低自旋)	$g = 1.4 \sim 2.1$
Fe^{3+} (高自旋)	$g = 2.0 \sim 9.7$

在自由原子中,