

研究生教学用书
教育部研究生工作办公室推荐

氧自由基和天然抗氧化剂

修订版

Oxygen Free Radicals and
Natural Antioxidants

赵保路 编著

科学出版社

北京

内 容 简 介

这本书既是对氧自由基和天然抗氧化剂理论探讨的专著,又是关于氧自由基和天然抗氧化剂研究结果的一个总结。内容包括:氧自由基的物理化学性质,产生、反应和清除的原理和机制;研究和检测氧自由基和天然抗氧化剂的技术和方法;氧自由基和疾病及衰老的关系,天然抗氧化剂对疾病的防治和治疗作用;吸烟中氧自由基对人体的损伤和防护;氧自由基与细胞凋亡;氧自由基和细胞信号等。本书还对天然抗氧化剂的应用和开发提供了理论基础和使用技术,重点介绍了茶多酚、丹参酮、五味子素、黄芩甙、银杏叶、原花青素等提取物抗氧化和防病机理,以及天然抗氧化剂在食品、化妆品、药物等方面的应用。

本书可供广大生物、化学和医学相关领域的专业工作者、大专院校师生、研究和开发天然抗氧化剂的技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

氧自由基和天然抗氧化剂/赵保路编著.—北京:科学出版社,1999.7
ISBN 7-03-007120-4

I. 氧… II. 赵… III. ①氧-游离基②抗氧化剂,天然 IV. R977.9

中国版本图书馆CIP数据核字(98)第34020号

责任编辑:霍春雁 马学海 /责任校对:钟洋
责任印制:刘士平 /封面设计:陈敬

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

http://www.sciencep.com

印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1999年7月第一版 开本:720×1000 1/16

2002年10月第二次印刷 印张:26

印数:2 301—4 300 字数:509 000

定价:46.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

序

氧自由基生物学是一门新兴的学科，特别是因为氧自由基参与许多疾病的发病机理，抗氧化剂又可用于许多与氧自由基损伤有关的疾病的防治，因而自由基生物学与医学紧密相联，成为一门重要的基础学科，又有其重大的实用性。国际上这方面的研究十分活跃，有专门的学术刊物“Free Radical Biology and Medicine”。在我国，氧自由基生物学与医学的研究开始较晚，但发展很快，在许多方面取得了显著的进展，造就了一支具有相当水平的科技队伍。本书的作者赵保路教授多年来在忻文娟教授领导的实验室工作，成绩卓著。他撰写的专著《氧自由基和天然抗氧化剂》，内容丰富新颖，首先概括介绍氧自由基的基本理论及检测技术，继而介绍了氧自由基损伤与有关疾病的关系以及天然抗氧化剂的生物活性，其中许多内容是作者所在实验室多年科研工作积累的总结，属前沿性研究，蕴含着许多切身的经验体会，是一部很好的专著，对有关的研究人员、研究生及临床医生均是一本很好的参考书。愿作序致贺。

刘耕陶

1998.1.22

修订版前言

本书自 1999 年出版以来，受到广大读者的关注和喜爱，2001 年又在教育部组织的全国研究生教材评议中被评为研究生教学用书，并要求再版。在此，作者深表感谢！根据自由基和天然抗氧化剂研究的最新进展，在修订版中，增加了“氧自由基和细胞信号”及“原花青素抗氧化活性和对心脑血管疾病的预防作用”两章，并在“茶多酚”一章增加了“茶多酚对 DNA 损伤的保护作用”和“茶多酚不同异构体对自由基清除作用”两节。同时，作者又对全书进行了校对，纠正了原书中的一些不当和错误。希望修订版能为广大读者和研究生以裨益。

作者

2001 年金秋 10 月

前 言

在正常情况下，体内氧自由基的产生和清除是平衡的。一旦氧自由基产生过多或抗氧化体系出现故障，体内氧自由基代谢就会出现失衡，或称氧应激，这就会导致细胞损伤，引起心脏病、癌症和衰老等严重疾病。这时外加一些抗氧化剂协助体内维持氧代谢的平衡对防止疾病的发生和保持机体的健康是十分有益的。氧自由基和抗氧化剂的研究是近年来生物和医学界非常引人关注的一个研究领域。中草药是我国的宝贵财富，研究其中的天然抗氧化剂我们有得天独厚的优越条件。我国的科技工作者做了大量杰出的工作，受到国际同行的关注和好评，每两年召开的全国自由基生物学和自由基医学学术会议和 1995 年在北京召开的天然抗氧化剂国际学术研讨会就是一个很好的证明。不少自由基领域的同行鼓励我写一本关于氧自由基和天然抗氧化剂的专著，我也很想通过写作把从事这方面研究的一些体会加以总结、归纳和提高，因此促成本书的诞生。

中国科学院出版基金的资助使本书得以出版。在本书的写作过程中，忻文娟教授、刘耕陶院士给予了鼓励和支持，提出了重要建议。忻文娟教授审阅了全书并提出宝贵修改意见。黄可泰教授对其中的几章进行了修改。张春爱副教授参与其中几章的修改和为本书整理资料和图表。在编写基本理论部分时，Halliwell 和 Gutteridge 教授的 *Free Radical in Biology and Medicine* 和 Afanasév 教授的 *Superoxide Ion: Chemistry and Biological Implications* 是主要参考文献。我们实验室的侯京武和曾经在我们实验室工作过的其他同志及我们的研究生晏良军、张建朝、杨法军、石红联、倪玉成、江文、郭琼、沈剑刚、李海涛、卫涛涛、周广印、高军涛、聂广军等做的大量实验和发表的文章为本书提供了可靠和丰富的素材。在编写天然抗氧化剂应用部分时参考和引用了国内外从事自由基和天然抗氧化剂研究的一些同行的工作和发表的文章。科学出版社王爱琳和马学海编辑及其他同志为本书的编辑出版付出了巨大心血。在此一并表示衷心感谢！

由于本人水平有限和写作时间仓促及篇幅所限，本书肯定存在不当之处，敬请广大读者提出宝贵意见。

目 录

序

修订版前言

前言

第一章 氧自由基的物理化学性质和反应原理	(1)
§ 1-1 氧气和自由基	(1)
§ 1-2 超氧阴离子自由基	(8)
§ 1-3 羟基自由基	(13)
§ 1-4 NO 自由基	(16)
§ 1-5 过氧化氢和单线态氧	(20)
第二章 氧自由基的检测和天然抗氧化剂的筛选技术	(24)
§ 2-1 电子自旋共振 (ESR) 波谱解析技术	(24)
§ 2-2 ESR 测量自由基的实验技术	(35)
§ 2-3 自旋捕集技术	(39)
§ 2-4 NO 自由基的检测	(45)
§ 2-5 检测氧自由基的其他方法	(50)
§ 2-6 天然抗氧化剂的筛选和研究	(53)
第三章 氧自由基的代谢	(61)
§ 3-1 氧毒性的超氧阴离子自由基理论	(61)
§ 3-2 超氧化物歧化酶 (SOD) 对氧自由基的清除作用	(64)
§ 3-3 其他酶对氧自由基的防护和清除	(68)
§ 3-4 小分子氧自由基清除剂	(70)
§ 3-5 金属离子螯合剂对氧自由基的清除作用	(72)
§ 3-6 修复体系的保护作用	(73)
§ 3-7 氧自由基和吞噬作用	(74)
第四章 脂质过氧化和氧自由基	(90)
§ 4-1 细胞膜的结构	(90)
§ 4-2 脂质过氧化过程	(92)
§ 4-3 酶促和非酶促脂质过氧化	(96)

§ 4-4	引起脂质过氧化的其他因素	(97)
§ 4-5	脂质过氧化的测量	(98)
§ 4-6	脂质过氧化的保护——抗氧化剂	(103)
§ 4-7	红细胞膜脂质过氧化	(107)
第五章	氧自由基和疾病	(113)
§ 5-1	缺血再灌注损伤和氧自由基	(113)
§ 5-2	氧自由基和癌	(127)
§ 5-3	氧自由基和炎症	(137)
§ 5-4	氧自由基和自身免疫疾病	(139)
§ 5-5	氧自由基和糖尿病	(143)
§ 5-6	氧自由基和其他疾病	(147)
第六章	氧自由基和衰老	(156)
§ 6-1	衰老的基本理论	(156)
§ 6-2	衰老的自由基理论	(157)
§ 6-3	体内抗氧化剂和物种的寿限	(159)
§ 6-4	氧自由基清除剂对动物寿命的影响	(163)
§ 6-5	限食与衰老	(166)
§ 6-6	线粒体、氧自由基和衰老	(168)
§ 6-7	氧自由基和衰老退行性疾病	(171)
§ 6-8	皮肤衰老和氧自由基	(173)
第七章	氧自由基和细胞凋亡	(179)
§ 7-1	细胞凋亡和细胞坏死	(179)
§ 7-2	氧自由基和细胞凋亡	(183)
§ 7-3	NO 自由基和细胞凋亡	(186)
§ 7-4	羟基自由基诱导鼠小脑神经凋亡及机理的探讨	(188)
§ 7-5	细胞凋亡和肿瘤的治疗	(191)
第八章	氧自由基和细胞信号	(199)
§ 8-1	氧化刺激细胞信号体系	(200)
§ 8-2	氧化还原调节转录因子	(204)
§ 8-3	信号转导的双氧化还原调节和交叉对话	(206)
§ 8-4	活性氧和细胞凋亡的信号通路	(210)
§ 8-5	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	(213)
第九章	高压氧和氧自由基	(229)
§ 9-1	高压氧概论	(229)

§ 9-2	高压氧的治疗作用	(231)
§ 9-3	氧中毒和氧自由基	(234)
§ 9-4	高压氧引起脂质过氧化和防护	(237)
第十章	吸烟中的自由基致病机理和清除	(243)
§ 10-1	吸烟中的自由基	(243)
§ 10-2	吸烟自由基的危害	(245)
§ 10-3	吸烟产生自由基的检测	(248)
§ 10-4	吸烟气相自由基对细胞膜脂质过氧化和流动性的影响	(251)
§ 10-5	吸烟气相物质对巨噬细胞呼吸爆发产生氧自由基的影响	(253)
§ 10-6	吸烟、营养与健康	(256)
§ 10-7	茶多酚对吸烟引起的脂质过氧化的保护作用	(258)
第十一章	茶多酚抗氧化的分子机理	(263)
§ 11-1	茶多酚对氧自由基的清除作用	(263)
§ 11-2	茶多酚清除氧自由基的协同作用	(266)
§ 11-3	茶多酚清除氧自由基的化学计量	(270)
§ 11-4	茶多酚对心肌缺血再灌注产生氧自由基的清除作用	(271)
§ 11-5	茶多酚对过氧亚硝基氧化活性的抑制作用	(272)
§ 11-6	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	(274)
§ 11-7	茶多酚对 DNA 损伤的保护作用	(276)
§ 11-8	茶多酚不同异构体对活性氧自由基的清除作用	(278)
§ 11-9	茶多酚清除氧自由基的分子机理	(287)
§ 11-10	茶多酚清除氧自由基的量子化学根据	(292)
§ 11-11	饮茶的健康益处	(296)
第十二章	丹参酮的抗氧化途径及其对心脏病的治疗作用机理	(300)
§ 12-1	丹参的药理作用	(300)
§ 12-2	丹参酮对氧自由基的清除作用	(301)
§ 12-3	丹参酮对心肌质网脂质过氧化过程脂类自由基的清除作用	(303)
§ 12-4	丹参及其有效成分对心肌缺血再灌注损伤的保护作用	(304)
§ 12-5	钙过负荷和丹参酮对线粒体脂质过氧化的影响	(308)
§ 12-6	丹参酮 II A 磺酸钠 (STS) 对线粒体电子传递链的旁路作用	(311)
§ 12-7	丹参酮 II A 磺酸钠对阿霉素半醌自由基的作用机制	(315)
第十三章	五味子素的抗氧化作用与结构和构型的关系	(321)

§ 13-1	不同结构五味子素对氧自由基的清除作用·····	(321)
§ 13-2	不同构型五味子素对氧自由基的清除作用·····	(324)
§ 13-3	五味子乙素对多形核白细胞呼吸爆发产生氧自由基引起细胞膜损伤的保护作用·····	(326)
§ 13-4	五味子酚对氧自由基的清除作用和突触体膜脂质过氧化损伤的保护作用·····	(329)
第十四章	黄芩甙及其铜锌络合物的抗氧化作用机理 ·····	(333)
§ 14-1	黄芩甙及黄芩甙金属络合物的药理作用·····	(333)
§ 14-2	黄芩甙及其铜锌络合物对氧自由基的清除作用·····	(336)
§ 14-3	黄芩甙及其铜锌络合物对过氧亚硝基氧化活性的抑制作用·····	(339)
§ 14-4	黄芩甙及其铜锌络合物对红细胞膜的保护作用·····	(343)
第十五章	银杏叶提取物 (EGb) 的抗氧化和防治疾病机理 ·····	(348)
§ 15-1	银杏叶提取物的特性及其药理作用·····	(348)
§ 15-2	EGb 对氧自由基和过氧亚硝基的清除作用 ·····	(353)
§ 15-3	银杏叶提取物对羟自由基所致脑神经细胞损伤的保护作用·····	(355)
§ 15-4	EGb761 对羟自由基诱导小脑神经细胞凋亡的保护作用·····	(358)
§ 15-5	EGb761 对心肌缺血再灌注损伤的保护作用 ·····	(362)
第十六章	原花青素的抗氧化活性和对心脑血管病的预防作用 ·····	(367)
§ 16-1	原花青素的来源——法国松树皮和葡萄籽提取物·····	(367)
§ 16-2	原花青素的化学成分和生物利用率·····	(368)
§ 16-3	原花青素的抗氧化作用·····	(370)
§ 16-4	原花青素对一氧化氮自由基的调节作用·····	(376)
§ 16-5	原花青素对心脑血管疾病的预防作用·····	(378)
§ 16-6	碧萝芷对吸烟气相自由基的清除和对吸烟致癌作用的抑制·····	(381)
§ 16-7	原花青素对其他疾病的预防作用·····	(385)
第十七章	天然抗氧化剂的应用价值和前景 ·····	(390)
§ 17-1	天然抗氧化剂在食物中的应用·····	(390)
§ 17-2	天然抗氧化剂和保健食品·····	(395)
§ 17-3	天然抗氧化剂和化妆品·····	(396)
§ 17-4	天然抗氧化剂和医药·····	(398)
§ 17-5	天然抗氧化剂的应用前景·····	(401)

第一章 氧自由基的物理化学性质和反应原理

地球上除厌氧生物外，所有动植物和需氧生物都离不开氧气。氧气参与新陈代谢，线粒体的呼吸和氧化磷酸化，产生能量 ATP，它几乎是一切生命活动的基础物质之一。但是，氧气在参与生命活动的同时也产生氧自由基，引起细胞损伤，导致疾病发生，氧气是一切氧自由基的来源和引起氧自由基损伤的物质基础。本章就氧毒性和氧自由基，特别是超氧阴离子自由基和羟基自由基的性质和反应原理作一深入讨论。同时也就 NO 自由基及过氧化氢和单线态氧的一些性质和反应作一介绍。

§ 1-1 氧气和自由基

一、氧 气

氧气的出现，大约在 2×10^9 年之前，它是地壳中最普通的元素 (53.8%)，占大气的 21%。在海平面大气压为 101.3kPa (760 mmHg)，氧分压占 21.2 kPa (159 mmHg)。由于包括氧气在内的一些元素的光化学合成，地球上才出现简单生物。

氧气可以溶于海洋，湖泊和河流的水中，水表面氧气含量和大气保持平衡。氧气在海水中的溶解度，在 10℃ 时为 0.284 mol/L，并随温度的升高而减小 (0.212 mol/L, 25℃)。氧气最易溶于新鲜的水中，在蒸馏水中的溶解度，在 10℃ 时为 0.258 mmol/L，25℃ 时为 0.335 mmol/L。氧气在活细胞中的溶解度主要取决于氧气于细胞接触的程度和细胞对氧气消耗的快慢，它在静脉血中的分压仅为 5.3 kPa (40 mmHg) (相当于 53 mmol/L)，相当大气分压的 25%。在真核细胞中，如心肌和肝细胞，从细胞膜到线粒体，氧含量逐渐减少。氧气在有机溶剂中的溶解度为水的 7~8 倍。在疏水的生物膜中，氧气的浓度也是很高的，这是细胞膜容易引起氧气损伤的重要原因^[1]。

当氧气浓度高于大气正常浓度时，就会对人、动植物和一切需氧生物产生氧损伤，不少原始生物正是因为不能防护氧气损伤而被灭绝。厌氧生物只能在无氧条件下生存，一旦遇氧就会立即死亡。原始动物，昆虫，鱼，兔等在高浓度氧气

中,存活时间大为缩短。在高氧大气中,植物组织受损,叶绿素生长受到抑制,种子和根的生存期变短,叶片枯萎而脱落。将大肠杆菌和其他需氧细菌暴露与一个大气压的纯氧中,生长立即受到抑制^[2]。

在潜水艇和人造卫星上,用高氧浓度的空气供给作业人员,常常会引起急性神经中毒,发生痉挛。当氧气浓度达到 50% 时,即呼吸氧分压为 48.0 kPa (360mmHg) 时,就会慢慢损伤肺。将人暴露于一个大气压的纯氧中 6 小时,便会引起胸痛,咳嗽和喉痛,然后导致肺泡损伤,水肿,肺内皮细胞死亡,这些损伤又是无法修复的。最近临床实验发现,即使认为是安全的氧浓度,对肺也是有损伤的^[3]。

用高浓度氧气培育早产儿,会引起失明。表 1-1 列出了氧气对各种动物的不同组织受高氧浓度损伤各不相同。冷血动物,如龟和鳄鱼等在低温时对氧毒性抵抗力较强,在高温时对氧毒性就较为敏感,幼鼠对氧毒性比成年鼠对氧毒性更有耐受力。氧毒性受食用维生素 A,维生素 E,维生素 C,重金属,抗氧化剂和不饱和脂肪酸的影响很大^[4]。

表 1-1 高氧浓度对动物组织的损伤

动物	氧浓度	暴露时间	组织	损伤情况
成年鼠	5 大气压纯氧	75 分钟	心脏	心脏纤维损伤, 线粒体肿胀
猫	8 大气压纯氧	50 分钟	肾	肾小管肿胀, 肾小球不正常
大鼠	0.3 大气压纯氧	3 天	肝	线粒体损伤
猴子	0.5 大气压纯氧	22 天	肝	光滑内质网增生, 糖原减少
地鼠	79% 氧气	3~4 周	睾丸	曲精上皮细胞解体, 精子产生减少
人	高压氧	治疗	耳	内耳出血, 变聋
豚鼠	70% 氧气	6~36 天	骨髓	红细胞生长受抑制

为什么会产生氧毒性? 而氧毒性又为什么表现出如此复杂的情况? 这一切都与氧自由基有密切的关系。那么, 什么是自由基? 什么又是氧自由基? 它们的性质是什么? 下面先就这些内容进行讨论。

二、什么是自由基

对自由基的研究, 已有较长的历史。不同时期, 自由基的概念和定义也有所不同。自由基的概念, 是 18 世纪末化学家们在研究化学反应时提出来的, 那时猜测一些不稳定集团, 如甲基 (CH_3) 可能存在。到 1900 年, 用银处理氯化三苯甲基制备六苯乙烷时, 偶然发现了三苯甲基自由基。以后又积累了许多这类实验

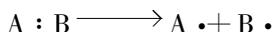
数据,到20世纪初,提出自由基具有奇数个电子,应当是顺磁性的,并且利用瞬时自由基的概念解释了一些化学反应,如聚合反应和链式反应的机理。

20世纪50年代末,发明了电子自旋共振(electron spin resonance, ESR)仪器,为自由基的研究提供了一个非常有力的手段和方法,极大地推进了自由基研究的过程。当时就更明确地提出自由基的定义:一个分子或分子的一部分,它的化学键经过修饰之后,一个未成对电子留在这个体系。按照这一定义,一是自由基一定要对正常化学键进行修饰;二是要具有一个未成对电子。在大量化学反应中出现的有机自由基,如甲基自由基、三苯甲基自由基等是很符合这一定义的。但还有很多具有顺磁性的物质,如氧气,虽具有两个未成对电子,但未经过化学修饰,也就不属于自由基,因而定义为三重态物质。大量过渡金属离子具有一个到多个未成对电子,也不属于自由基,因而定义为顺磁性的过渡金属离子。直到18世纪70年代,对自由基的定义仍保持着这一含义,即“均裂产生的包含一个未成对电子的分子或原子团称为自由基”,其中仍包含化学反应和一个未成对电子两重意思。

80年代,一些研究者对自由基的定义进行了扩展,提出“任何能够独立存在的,包含一个或多个未成对电子的原子或原子团都称为自由基”。这一定义只提未成对电子,不论一个还是多个,也不需要化学反应,因此比前一个定义包含的面大了很多。前面所说的具有两个未成对电子的三重态氧和具有多个未成对电子的过渡金属离子,都属于自由基的范畴。

现倾向于这样的定义:“任何包含一个未成对电子的原子或原子团,均称之为自由基”。这一定义与第一个定义不同的是未加化学反应的限制,因为现在已经发现很多稳定自由基,如自旋标记物。和第二个定义不同的是限制了一个未成对电子,对含有两个以上未成对电子的集团,分别给予“三重态”,“双自由基”和“顺磁性过渡金属离子”等名称。

所谓未成对电子,就是指那些在原子或分子轨道中未与其他电子配对而独占一个轨道的电子。其自旋为 $1/2$ 。如A, B两个原子,各提供一个电子,通过共价键形成一个分子 $A:B$,这两个电子是配对的。在化学反应中发生了均裂, A和B各带一个电子,它们就是未成对电子。



$A \cdot$ 和 $B \cdot$ 就称为自由基。

如水的辐射离解就生成氢原子($H \cdot$)和羟基自由基($\cdot OH$),它们各具有一个未成对电子。为了清楚地表明自由基中的未成对电子,一般文献和著书中都将一个小圆点标在自由基的结构或分子式上,以表示这个未成对电子,如氯原子自由基 $\cdot Cl$,甲基自由基 $\cdot CH_3$,三氯甲烷自由基 $\cdot CCl_3$ 。

三、自由基的性质

从自由基的定义可知，自由基有三个明显的特点，一是反应性强，二是具有顺磁性，三是寿命短。

自由基的基本特征是具有一个未成对电子，在所有分子成键过程中，电子都是倾向配对的，因此自由基中的未成对电子也具有配对的倾向。大多数自由基都很活泼，反应性极强，容易反应生成稳定分子，这是自由基的一个非常重要的性质。如羟基自由基可以进攻细胞成分，膜脂、蛋白质、酶和核酸等，这是自由基生物学和医学的重要内容^[5,6]。

自由基的化学性质可归纳以下几点：

1. 抽氢反应

这是一个非常普遍的自由基反应，自由基从反应物中抽取一个氢，形成新的自由基



典型例子有



2. 自由基化合反应

两个自由基互相结合自我湮灭的反应



3. 歧化反应

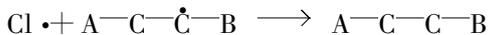
两个自由基反应，一个被氧化，一个被还原。



4. 加和反应



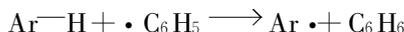
R



R

R Cl

5. 芳环取代

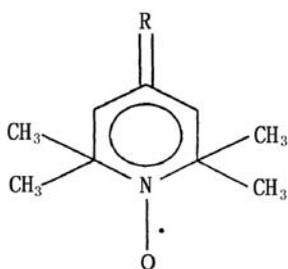


6. 链式反应

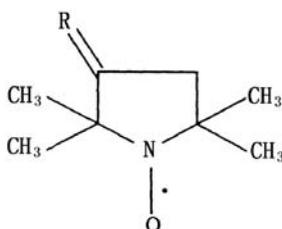


自由基的未成对电子具有自旋磁矩，而且是顺磁性的，这就是研究自由基的电子自旋共振(ESR)技术的理论基础。ESR 是研究自由基最直接最有效的方法。但是多数自由基的寿命极短，如羟基自由基的寿命只有 10^{-6} 秒，这就给 ESR 测量带来了困难。为此，我们将在第二章介绍几种检测和研究短寿命自由基的有效方法，特别是自旋捕集技术。

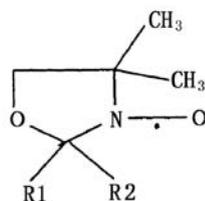
多数自由基反应性很强，寿命很短，但也有少数自由基反应性不强，寿命较长，并相当稳定，这就是近年来在生物学和医学中应用很广的自由基——自旋标记物。关于自旋标记技术的理论和应用，著者曾有一些专题文章发表，并出版了专著“自旋标记 ESR 波谱的基本理论和应用”。在此仅举例加以说明。下面的三个自旋标记物在 N—O 键上都有一个未成对电子，其周围又都有四个甲基保护着，因此相当稳定，它们在 4°C 干燥蔽光的环境中可稳定地保存数年。



吡啶类自旋标记物



吡咯啉类自旋标记物



噻唑烷自旋标记物

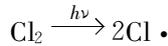
另一类较稳定的自由基是多环芳烃自由基和醌类自由基，如黑色素和吸烟焦油中的自由基就比较稳定。

产生自由基的方法很多，但一般都是通过分子的均裂而得到，加氢和抽氢也

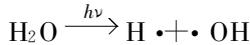
可以产生自由基，常用的方法有

1. 辐射诱导均裂

辐射(可见光、紫外光、X射线、 α 射线)可以提供分子均裂所需的能量, 如用波长为 4875\AA 的光照 Cl_2 , 可以产生 $\text{Cl}\cdot$ 自由基; 金属 Hg 的存在可以加速 Cl_2 的均裂。



α 和 γ 射线辐照水, 可产生 $\cdot\text{H}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 自由基。



2. 共价键的热均裂

通过提高温度, 共价键可以从热能得到能量而裂解, 生成自由基。应用最多的是石油裂解, 生成各种自由基, 这些自由基再相互结合生成各种小分子物质。

3. 同金属离子偶合的氧化还原裂解

凡是能够单电子氧化还原的金属离子都可以同过氧化氢反应, 使其发生分裂, 产生自由基, 这就是很有名的 Fenton 反应。



实验室使用最多的是 Fe^{2+} , Fe^{2+} 和 H_2O_2 反应是一个复杂的过程, 根据所用 Fe^{2+} 和 H_2O_2 的浓度不同, 产生的自由基也不同。

4. 加氢和抽氢产生的自由基

这在生物体内是一个非常重要的过程, 最典型的例子是在线粒体呼吸链中, 黄素辅酶氧化还原时形成黄素半醌自由基



当有金属离子存在时, 半醌自由基与醌和氢醌之间形成一个稳定的平衡体系。



四、氧气和自由基的关系

根据自由基的概念来理解氧气之所以有那么多毒性就比较清楚了。按扩展了的自由基定义, 氧气本身就是一种自由基, 因为在氧分子的轨道上有两个未成对

电子。按本书的定义，氧分子属三重态，具有顺磁性，但它很容易转变为自由基和活性氧（见图1-1）。三重态氧就是我们平常所说的氧气，在其两个 $\pi^* 2P$ 轨道上各有一个电子，自旋互相平行，没有配对。如果氧气要氧化一种物质，它就要求该物质也具有两个平行的电子，这就是所谓的自旋限制。但是多数物质不具备这种条件，不能与氧气反应，因此，氧气表现出一定的惰性。然而，氧气在吸收一定能量之后，可以被激发生成单线态氧，并依吸收能量的多少分别生成 $^1\Delta_g O_2$ 和 $^1\Sigma_g O_2$ 。 $^1\Delta_g O_2$ 和 $^1\Sigma_g O_2$ 的能量分别比基态氧气高28.4千卡^①和37.5千卡。 $^1\Sigma_g O_2$ 极不稳定，在没有和其他物质接触之前就衰减成 $^1\Delta_g O_2$ 或 $^3\Sigma_g O_2$ ，所以生物学意义不大。 $^1\Delta_g O_2$ 虽不是自由基，但它具有较高的能量，而且解除了自旋限制，因此反应性极强。

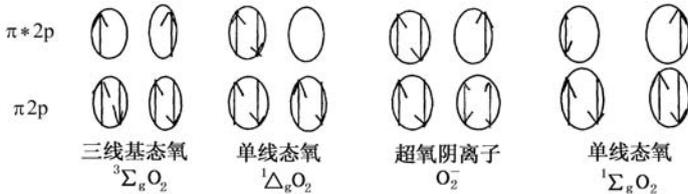
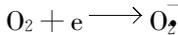


图 1-1 几种氧气的最高占有分子轨道

基态氧接受一个电子生成超氧阴离子自由基，它在 $\pi^* 2P$ 轨道上有一个未成对电子，是典型的自由基，同时多一个负电荷，因此又称负离子，是一个非常重要的氧自由基。基态氧接受两个电子，便生成过氧离子，两个 $\pi^* 2P$ 轨道就全部被电子占满了，电子也全部配对，所以不是自由基。

氧气在有机体内代谢还原，提供了生物能量，最后生成水，共接受 4 个电子。在这一还原过程中，每接受一个电子就生成一个氧自由基或活性氧。



氧气-电子还原生成超氧阴离子自由基，二电子还原生成过氧化氢，三电子还原生成羟基自由基，四电子还原生成水。其中过氧化氢为一种氧化性较强的活性氧，可以参与和生成氧自由基的很多反应。羟基自由基则是已知氧化性最强的氧自由基^[7]。

① 1卡≈4.187 焦耳

§ 1-2 超氧阴离子自由基

超氧阴离子自由基不仅具有重要的生物功能和与多种疾病有密切联系，而且它还是所有氧自由基中的第一个自由基，可以经过一系列反应生成其他氧自由基，因此具有特别重要的意义。本节重点讨论超氧阴离子自由基的物理、化学性质和产生过程。

一、超氧阴离子自由基的物理性质

超氧阴离子自由基是基态氧接受一个电子形成的第一个氧自由基，在水中可视为一个碱。它可以接受一个 H^+ 形成质子化的超氧阴离子自由基 $HOO\cdot$ ，是超氧阴离子自由基的共轭酸；它也可以再分解为超氧阴离子自由基和 H^+ ，并在水溶液中保持平衡， pK 约为 4.8。



改变溶液的 pH 值，便可以改变 O_2^- 和 $HOO\cdot$ 的浓度。在 $pH=3.8$ 时， $O_2^- / (HOO\cdot)$ 约为 1/10， $pH=5.8$ 时，约为 10/1， $pH=6.5$ 时，约为 100/1。人的体液生理 pH 在 6.5~7.5 之间，因此，在生理条件下，体内生成的主要是超氧阴离子自由基，只有少量转化为 $HOO\cdot$ 。就是这少量 $HOO\cdot$ 可能使 O_2^- 跨越细胞膜和引起脂质过氧化。因为 $HOO\cdot$ 和 O_2^- 的性质差别很大， O_2^- 带有负电荷，是亲水性的，不能穿透细胞膜，在很多场合是还原剂；而 $HOO\cdot$ 不带电荷，是疏水性的，可以穿透细胞膜，并在膜的疏水区积聚，而且其氧化性远远大于 O_2^- ，这就为细胞膜的脂质过氧化造就了充分条件。

超氧阴离子自由基在水溶液中的存活时间约为 1 秒，在脂溶性介质中的存活时间约为 1 小时。和其他活性氧相比，超氧阴离子自由基不很活泼，因此曾经有人认为超氧阴离子自由基毒性可能不大。其实，正是由于它寿命较长，可以从其生成位置扩散到较远的距离，达到靶位置，从这种意义讲，超氧阴离子自由基具有更大的危险性。另外，由于它是生物体中第一个生成的氧自由基，又是所有氧自由基的前身，可以转化为其他氧自由基，因此具有非常重要的意义。超氧阴离子自由基存在于气相、液相和固相之中。其物理性质往往取决于存在条件，它的氧化还原电位和光谱性质就随介质的不同而不同。由氧气到超氧阴离子自由基的一电子还原电位反映了超氧阴离子自由基的还原能力，它取决于反应体系和介质（表 1-2，表 1-3）。

表 1-2 在水溶液中超氧阴离子自由基的一电子还原电位^[8]

测定方法	$E_0(\text{O}_2)/(\text{O}_2^-)\text{V}$
$E_0(\text{O}_2)/\text{O}_2^- = G(\text{O}_2^-) - G(\text{O}_2)$	-0.19
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$	-0.16
$\text{O}_2^- + \text{Cu(II)SOO} \leftrightarrow \text{O}_2 + \text{Cu(I)SOO}$	-0.15
$\text{O}_2^- + \text{Cl} \leftrightarrow \text{O}_2 + \text{Cl}\cdot$	-0.15
极谱	-0.14
$\text{CytC}^{2+} + \text{O}_2 \leftrightarrow \text{CytC}^{3+} + \text{O}_2^-$	-0.13

表 1-3 在有机溶液中超氧阴离子自由基的一电子还原电位

溶 剂	$E_0(\text{O}_2/\text{O}_2^-)\text{V}$
二甲基甲酰胺(DMF)	-0.87
二甲基亚砜(DMSO)	-0.77
乙氧	-0.82
丙酮	-0.88
吡啶	-0.89
二氯甲烷	-0.79
二甲基乙酰胺(DMA)	-0.96
六甲基磷酰胺(DMPA)	-0.96
碳酸丙烯	-0.87

吸收光谱是超氧阴离子自由基的重要物理特征。在水溶液中的最大吸收随 pH 变化不大,只是旋光系数有些改变(表 1-4,表 1-5)。

表 1-4 在水溶液中超氧阴离子自由基的光吸收和旋光系数

pH	吸收最大/nm	旋光系数/ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
7.0	245	2020
9.12	245	1930
9.70	245	2000
11.50	245	1720
13.00	245	2150
14.00	260	1850

表 1-5 在不同介质中超氧阴离子自由基的光吸收和旋光系数

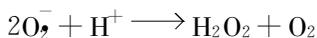
溶剂	吸收最大	旋光系数/ $M^{-1}cm^{-1}$
晶体	243	
水	245	2350
DMF	257.5	2500
乙氧	250	2580
DMSO	250	2686

二、超氧阴离子自由基的化学性质

超氧阴离子自由基既可以接受一个电子氧化其他物质而被还原，又可以提供一个电子还原其他物质而被氧化，这就构成了超氧阴离子自由基的主要化学性质^[9]。

1. 歧化作用

在歧化反应中一个超氧阴离子自由基被氧化生成过氧化氢，另一个超氧阴离子自由基被还原生成氧气。



若无超氧化物歧化酶 SOD 存在，超氧阴离子自由基歧化生成单线态氧，在有 SOD 存在时，不生成单线态氧，反应速率提高 10^4 倍。在这两种情况下，反应速率常数分别为 $10^5 (mol/L)^{-1}s^{-1}$ 和 $10^9 (mol/L)^{-1}s^{-1}$ 。这可能是由于两个 O_2^- 都带有负电荷，互相排斥难于接近，不容易发生电子转移。SOD 的活性中心有一个金属离子 (Cu^{2+} 或 Mn^{2+})，两个超氧阴离子自由基不需要接触，通过金属离子就可以不断交换电子，因而大大加快了反应速度。

表 1-6 超氧阴离子自由基在水溶液中同各种化合物反应的速率常数

化合物	pH	速率常数/ $[(mol/L)^{-1}s^{-1}]$	反应
胆固醇、膜脂	8~10	<1	
丙酮酸、天冬氨酸			
组氨酸、蛋氨酸			基本无反应
色氨酸、络氨酸			
细胞色素 C	8.5	2.6×10^5	将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+}
四硝基甲烷	—	2×10^9	还原

续表

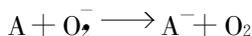
化合物	pH	速率常数/ $[(\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}]$	反应
苯酚和其他酚	7	1×10^9	还原
儿茶酚	7	1×10^9	氧化
抗坏血酸	7.4	2.7×10^7	半脱氢抗坏血酸自由基
NADPH	7.4	< 1	基本无反应
NADH	7.5	1×10^5	链式反应
质体黑素	7.7	1×10^6	将 Cu^{2+} 还原成 Cu^+
胆红素	8.3	2.3×10^4	淬灭
四硝基兰	7~11	6×10^4	

2. 氧化作用（质子化作用）

超氧阴离子自由基可以夺取一个电子把其他物质氧化，本身被还原。还原型细胞色素 C，还原型谷胱甘肽，半胱氨酸，维生素 C，维生素 E，茶多酚，胡萝卜素，黄酮类，肾上腺素，焦没食子酸，NADPH 等都可以被超氧阴离子自由基氧化。

3. 还原作用（亲核取代）

超氧阴离子自由基可以给出一个电子，使其他物质还原，本身被氧化。



细胞色素 C，对苯醌，四硝基甲烷等都可以被超氧阴离子自由基还原。

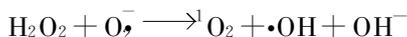
4. 电子转移

超氧阴离子自由基很容易以电子转移方式将电子转移给其他分子。

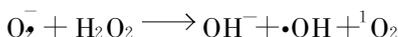
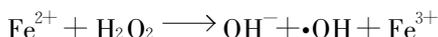


醌，亚铁，亚铜离子复合物和二氧化硫都很容易发生这类反应。

5. Harber-Weiss 反应



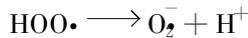
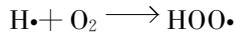
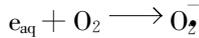
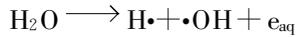
这个反应本身很难进行，常常需要 Fe^{2+} 的参与和催化



三、超氧阴离子自由基的产生

有很多方法可以产生超氧阴离子自由基，常用的方法有^[10]：

1. 辐射分解和光化学方法



2. 电化学方法

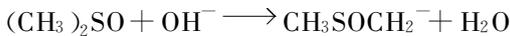
用电化学的方法很容易将一个电子转移给 O_2 生成超氧阴离子自由基。但在水溶液中，超氧阴离子自由基的寿命极短，难于得到高浓度的超氧阴离子自由基。若增加 pH 可以使超氧阴离子自由基寿命延长，在 $\text{pH}=13$ 时，其寿命可达 1 分钟。在有机溶剂中利用电化学方法可以得到寿命更长的超氧阴离子自由基，一般是用汞电极在氧气饱和的有机溶剂中（DMF，DMSO 或乙腈），用 -1V 电压电解，可得到寿命相当长的超氧阴离子自由基。

3. KO_2 在有机溶剂中可以产生超氧阴离子自由基

KO_2 在有机溶剂中溶解度不高，利用冠醚可以增加 KO_2 的溶解度。常用的是二环己烷-18-冠醚，这个化合物中间有一个洞，正好将 K 装入，使氧露在外面，加入有机溶剂就可以得到超氧阴离子自由基。

4. 碱性二甲基亚砷

在碱性条件下，二甲基亚砷产生超氧阴离子自由基，其机理可能是：

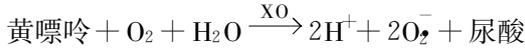


5. 光照核黄素

光照核黄素 EDTA 体系可以产生很高浓度的超氧阴离子自由基，这里 EDTA 是电子供体。

6. 酶促反应

最常用的是黄嘌呤氧化酶 (XO)



另外还有 NADPH 氧化酶, 醛氧化酶, 谷胱甘肽还原酶, 二氧胺氧化酶, 二氢乳酸脱氢酶等, 都可以催化一些反应产生超氧阴离子自由基。

7. 多形核白细胞和巨噬细胞在吞噬过程或受到某些刺激时, 产生呼吸爆发, 释放超氧阴离子自由基

§ 1-3 羟基自由基

羟基自由基是已知的最强的氧化剂, 它比高锰酸钾和重铬酸钾的氧化性还强, 是氧气的三电子还原产物, 反应性极强, 寿命极短, 在水溶液中仅为 10^{-6}s , 在很多缓冲溶液中, 只要一产生, 就会和缓冲溶液反应。它几乎可以和所有细胞成分发生反应, 对机体危害极大。但是由于它的作用半径小, 仅能和它的邻近分子反应。

一、羟基自由基和一些化合物的反应速率常数

表 1-7 羟基自由基与一些化合物的反应速率常数^[11]

化合物	pH	速率常数/ $[(\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}]$	化合物	pH	速率常数/ $[(\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}]$
CO_3^{2-}	10.7	2.0×10^8	甘氨酸甘氨酸	2.0	7.8×10^7
HCO_3^-	6.5	1.0×10^7	甘氨酸络氨酸	2.0	5.6×10^9
Fe^{2+}	2.1	2.5×10^8	鸟氨酸	—	10×10^{10}
H_2O_2	7.0	4.5×10^7	血红蛋白	—	3.6×10^{10}
腺嘌呤	7.4	3.0×10^9	组氨酸	6-7	3.0×10^9
腺苷	7.7	2.5×10^9	羟脯氨酸	2.0	2.1×10^8
AMP	5.4	1.8×10^9	乳酸离子	9.0	4.8×10^9
精氨酸	7.0	2.1×10^9	卵磷脂	—	5.0×10^9
抗坏血酸	1.0	7.2×10^9	甘露醇	7.0	2.7×10^9
苯	7.0	3.2×10^9	甲醇	7.0	4.7×10^8
苯甲酸	3.0	4.3×10^9	蛋氨酸	7.0	5.0×10^9

续表

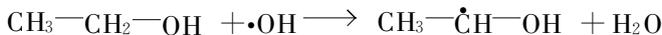
化合物	pH	速率常数/ $[(\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}]$	化合物	pH	速率常数/ $[(\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}]$
丁醇	7.0	2.2×10^9	烟酸	—	6.5×10^8
过氧化氢酶	—	2.6×10^{11}	苯酚	7.0	4.2×10^9
柠檬酸	1.0	3.0×10^7	苯丙氨酸	6.0	3.5×10^9
半胱氨酸	1.0	7.9×10^9	丙醇	7.0	1.5×10^9
胱氨酸	2.0	3.2×10^9	核糖核苷酶	—	1.9×10^{10}
胞苷	2.0	2.0×10^9	吡哆醛	—	1.6×10^9
胞嘧啶	7.0	2.9×10^9	核糖	7.0	1.2×10^9
脱氧鸟苷酸	7.0	4.1×10^9	血清白蛋白	—	2.3×10^{10}
脱氧核苷酸	7.4	3.1×10^9	硫尿	7.0	4.7×10^9
乙醇	7.0	7.2×10^8	胸腺嘧啶	7.0	3.1×10^9
葡萄糖	7.0	10×10^9	色氨酸	6.0	8.5×10^9
谷氨酸	2.0	7.9×10^7	尿嘧啶	7.0	3.1×10^9
谷胱甘肽	1.0	8.8×10^9	尿素	9.0	$< 7.0 \times 10^5$

二、化学反应性质

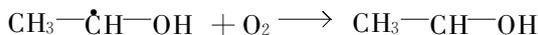
羟基自由基可以参与抽氢、加和及电子转移等三类反应^[12]。

1. 抽氢反应

最典型的反应是羟基自由基从乙醇抽氢生成乙醇自由基和水。



在有氧存在时可以生成过氧自由基



两个乙醇自由基可以连接起来生成非自由基。



羟基自由基还可以参与磷脂抽氢，引起一系列反应，导致细胞膜损伤，从DNA脱氧核糖上抽氢，生成各种产物，引起细胞突变。

2. 加成反应

羟基自由基和芳香环反应，就是采用加成反应的方式进行的。同样也可以和 DNA 和 RNA 的嘌呤和嘧啶的碱基反应，羟基自由基加成到嘌呤和嘧啶的碱基上生成嘌呤和嘧啶自由基。

在氧气存在的情况下，进一步反应生成胸腺嘧啶自由基。羟基自由基就是以这种方式损伤 DNA 碱基和糖的，甚至引起键断裂。若细胞无法修复这些严重的损伤，则会引起细胞的突变和死亡。

3. 电子转移

羟基自由基参与的电子转移反应可发生在无机和有机物上。



也可以从超氧阴离子自由基得到一个电子变为 OH^- ，并使超氧阴离子自由基变为单线态氧。



三、羟基自由基的产生

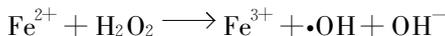
有多种途径可以产生羟基自由基，常用的有以下几种^[13]。

1. 离子辐射

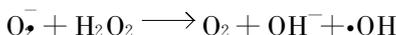
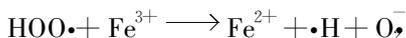
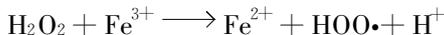
如前所述，辐射水可以产生多种自由基，其中包括羟基自由基。因为水占细胞的比例很大，辐照损伤的主要原因是产生了羟基自由基。

2. 过氧化氢同金属离子的反应

最典型的例子是 Fenton 反应

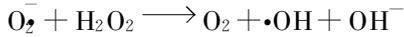


另外， Cu^+ 也可以同过氧化氢发生类似反应生成羟基自由基。这一反应看起来很简单，实际上却很复杂。不同浓度的 Fe^{2+} 和 H_2O_2 ，可得到不同自由基。



另外, 当有络合物存在时, 上述反应又会发生变化, 有的络合物加速 Fenton 反应, 有的则抑制这一反应。在体内, 铁离子的作用就更复杂了。

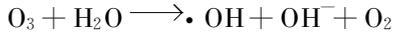
3. Harber-Weiss 反应



上节已叙, 这一反应需要铁离子参与, 才能得到足够的反应速度和得到足够的羟基自由基。

4. 由臭氧产生羟基自由基

臭氧是光化学污染的重要成分, 也是进攻生物分子的强氧化剂, 它可以氧化蛋白质的胱氨酸和组氨酸, 氧化不饱和脂肪酸导致脂质过氧化。这些反应可能都是通过羟基自由基起作用的, 因为臭氧水溶液中, 特别是在碱性条件下, 可以很快生成羟基自由基。



§ 1-4 NO 自由基

NO 自由基被著名的科学杂志 (*Science*) 选为 1992 年的明星分子, 一时名声大震, 关于 NO 的文章像雪崩一样在世界各有名杂志上争相发表出来。归纳起来, 有以下几方面的内容: 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 年以来也开展了对 NO 自由基的研究工作, 取得一些进展。本节就 NO 自由基的物理化学性质和生理功能及其最新研究成果作一个简单讨论。

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。但由于 NO 的自旋和轨道角动量耦合, 用 ESR 检测不到 NO 自由基的信号。NO 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 的键级为2.5，键长为1.14Å^[14]。



NO 很容易同氧自由基反应，且反应非常迅速（表 1-8）。

表 1-8 NO 同氧自由基反应的速率常数

$\text{NO} + \text{O}_2^- \longrightarrow \text{ONOO}^-$	$k = 5 \times 10^9 \text{ (mol/L)}^{-1}\text{s}^{-1}$
$\text{NO} + \text{NO}_2 \longrightarrow \text{N}_2\text{O}_3$	$k = 2 \times 10^9 \text{ (mol/L)}^{-1}\text{s}^{-1}$
$\text{NO} + \cdot\text{OH} \longrightarrow \text{HNO}_2$	$k = 1 \times 10^{10} \text{ (mol/L)}^{-1}\text{s}^{-1}$
$\text{NO} + \text{ROO}\cdot \longrightarrow \text{ROONO}$	$k = 1 \times 10^9 \text{ (mol/L)}^{-1}\text{s}^{-1}$

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 1-9）。

表 1-9 NO 同一些底物在水溶液中的反应速率常数

底物	速率常数/ $[(\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}]$
铁氧化物	5×10^2
胱氨酸	5×10^3
谷胱甘肽	10^4
络氨酸	25
赖氨酸	<5
胞嘧啶	<0.005

NO 同含铁蛋白的结合是 CO 的 100 倍，而且结合得非常紧密（表 1-10）。

表 1-10 NO 和含铁蛋白结合速率常数

反应体系	速率常数/ $[(\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}]$
$\text{NO} + \text{Fe}^{2+} \longrightarrow \text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{NO}^{2+}$	$k = 6.2 \times 10^5$
$\text{NO} + \text{Fe}(\text{TPPS}) \longrightarrow \text{Fe}(\text{TPPS})\text{NO}$	$k = 1.8 \times 10^9$
$\text{NO} + \text{Hb}^{\text{II}} \longrightarrow \text{Hb}^{\text{II}}\text{NO}$	$k = 2.5 \times 10^7$
$\text{NO} + \text{Mb}^{\text{II}} \longrightarrow \text{Mb}^{\text{II}}\text{NO}$	$k = 1.7 \times 10^7$

二、NO 自由基和内皮细胞松弛因子

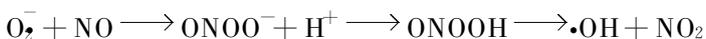
1986 年首次在 *Nature* 上发表文章, 提出内皮细胞松弛因子可能是一种不稳定的自由基, 但其化学结构不清楚, 推测可能是过氧或花生四烯酸衍生物自由基。1987 年, Palmer 等人正式提出内皮细胞松弛因子就是 NO, 以后经过几个实验室大量实验都证实了这一结论。到目前为止, 虽然还有一些问题没有完全搞清楚, 但是, NO 作为内皮细胞松弛因子已经被广泛接受。血管扩张剂, 如乙酰胆碱, 硝酸甘油和舒张肽等通过一系列反应, 作用到受体上, 活化 G 蛋白, 通过磷脂酶 C (PL - C) 启动磷脂肌醇通路 (PIP₂ - IP₃), 释放细胞内 Ca²⁺, 激活钙调蛋白, 钙调蛋白再激活 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鸟苷酸环化酶, 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^[15]。由于这一成果, 美国三名研究者获得 1998 年诺贝尔生理和医学奖。

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 合成酶活性立即迅速增加, 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^[16]。

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 $[k = 3.7 \times 10^{-9} \text{ (mol/L)}^{-1} \text{ s}^{-1}]$ 。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基物质和 NO₂^[17]。



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， O_2^- 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。

NO杀伤感染细胞的另一个途径是NO可以结合到感染细胞的核酸酶和线粒体呼吸酶的金属离子上使其失去活性，引起细胞死亡。但NO在细胞生成后为何不与本身细胞的核酸酶和线粒体的呼吸酶结合，它又是如何穿越细胞膜达到靶细胞的靶位置的，这都是没有解决的问题。

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，按理应当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，也有很多实验结果表明NO自由基在组织缺血再灌注损伤过程中起着相反的作用。近来研究表明，NO在组织缺血再灌注损伤有双重作用，如对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，因此人们称NO为“双刃剑”^[18]。

正常内皮细胞有NO自由基释放，在心肌缺血再灌注时，这种释放被削弱。原因可能是多方面的，一是NO合成酶受缺血再灌注产生的氧自由基进攻活性下降；二是缺血再灌注时白细胞在心肌中积聚活化释放更多的氧自由基对NO合成酶的损伤。但是也有实验证据表明，心肌缺血再灌注损伤NO释放增加，特别是不可逆缺血再灌注损伤。这可能是由于部分心肌细胞在心肌缺血时有坏死发生，坏死的心肌可能释放一种类似肿瘤坏死因子的物质，刺激NO合成酶活化释放更多的NO。

六、过氧亚硝基

NO和超氧阴离子自由基迅速反应生成过氧亚硝基，这在体内具有特别重要的生理意义。因为多形核白细胞在吞噬过程同时释放NO和超氧阴离子自由基，在心肌缺血再灌注损伤时也是同时释放NO和超氧阴离子自由基，这样，在很多生理和病理过程就在体内产生大量过氧亚硝基。过氧亚硝基在碱性条件相当稳定， $pK_a=7.40$ (37℃)，在302 nm有一个明显吸收峰，半衰期为1.9 s。在略高

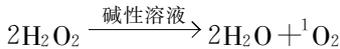
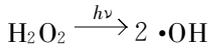
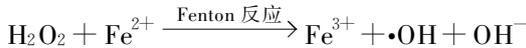
于生理 pH 时，它可以从生成位置扩散到较远的距离。一旦周围的 pH 略低于正常生理值时（病理条件往往如此），立即产生氧化性和细胞毒性非常强的类羟基和 NO_2 自由基，这对于免疫杀伤外来入侵微生物和肿瘤细胞具有重要意义，同时也可能对正常细胞产生损伤^[19]。

§ 1-5 过氧化氢和单线态氧

过氧化氢和单线态氧不是自由基，但它们都是很重要的活性氧，而且都可以反应产生氧自由基。

一、过氧化氢

过氧化氢是氧气二电子还原产物，具有较强的氧化性。但在较强的氧化剂存在时，也具有一定还原性。它可以直接氧化一些酶的巯基，使酶失去活性。甘油醛-3-磷酸脱氢酶就是以这种方式被过氧化氢失活的，菠菜叶绿体的果糖二磷酸酶也是以这种方式失活的。过氧化氢还可以非酶氧化丙酮酸，也可以参与以下反应^[20]：



一些研究表明，Fenton 反应有激发态的铁氧复合物产生^[21]。

过氧化氢可以穿透大部分细胞膜，这是超氧阴离子自由基不能相比的。这就增加了过氧化氢的细胞毒性，当它穿越细胞膜后就可以与细胞内铁反应产生羟基自由基。

过氧化氢在体内的重要来源可能是超氧阴离子自由基的歧化反应。



葡萄糖氧化酶可以氧化葡萄糖生成过氧化氢。另外还有几种使氧气二电子还原生成过氧化氢的酶，它们是氨基酸氧化酶，半乳糖氧化酶，单胺氧化酶和二胺氧化酶等。

水的电离辐射也可以产生过氧化氢。

二、单线态氧

单线态氧是氧气的激发态。有两种激发单线态氧 $^1\Delta_g\text{O}_2$ 和 $^1\Sigma_g\text{O}_2$ 。它们的电子在分子轨道上的排布见图 1-1。在 $^1\Delta_g\text{O}_2$ 的分子轨道上,两个电子方向相反排在 $\pi^* 2\text{P}$ 轨道上,在 $^1\Sigma_g\text{O}_2$ 的分子轨道上,两个电子方向相反排在 $\sigma^* 2\text{P}$ 轨道上,所以它们都没有未成对电子,自旋为零。 $^1\Sigma_g\text{O}_2$ 的能量特别高,极不稳定,一生成就衰减成 $^1\Delta_g\text{O}_2$ 或基态氧,没有太大生物意义。单线态氧虽然不是自由基,但因解除了自旋限制,所以反应性极强^[21]。

单线态氧同其他物质反应主要通过两种形式进行,一是同其他分子的结合反应,二是将它的能量转移给其他分子,自己回到基态,称为淬灭。表 1-11 给出了一些能与单线态氧反应的化合物。它们有一些结构特点,要么容易接受能量变为激发态,要么在侧链上包含共轭双键,容易同单线态氧起结合反应。

表 1-11 与单线态氧反应的一些化合物

化合物	反应类型
二氯二环辛烷	淬灭
叠氮离子	淬灭
维生素 E	淬灭和反应
苯酚	淬灭和反应
DNA	反应
胡萝卜素	淬灭和反应
胆固醇	反应
色氨酸	反应
蛋氨酸	反应
半胱氨酸	反应
组氨酸	反应

在以上反应中,有些生成内过氧化物,有些生成氢过氧化物和二氧烷。在实验室中,产生单线态氧的方法很多,常用的有以下几种:

1. 过氧化氢和次氯酸反应

