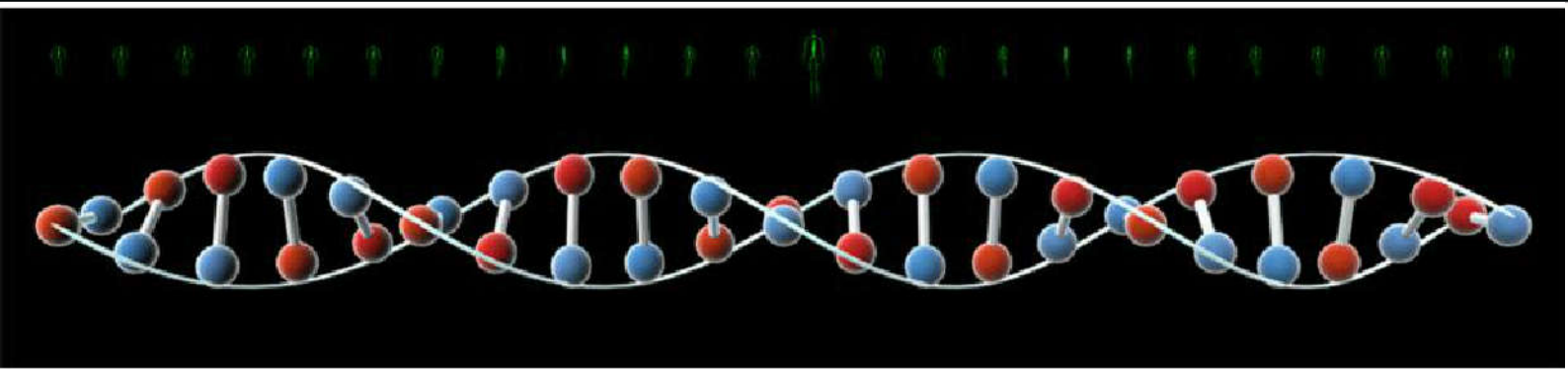


# 第四章 自由基生物学



信息学院 曹学成 颜君 王永刚

4.1 自由基的基本性质

4.2 活性氧

4.3 自由基与癌症

4.4 自由基与衰老

4.5 自由基与植物逆境生理

4.6 一氧化氮自由基

4.7 自由基与人体健康

## 4.1 自由基的基本性质



### ❖ 自由基研究历史

- ❖ 1900年刚伯格 (Gomberg) 发现稳定自由基三苯甲基 (在用氯化三苯甲基制备六苯乙烷时候), 以这一发现为标志, 人类开始了自由基的研究。
- ❖ 1929年, 刚伯格 (Gomberg) 又制备寿命更短的甲基自由基和乙基自由基, 进一步确认自由基的存在。
- ❖ 1931年, 卡拉斯克 (Kharasch) 即 Mago 发现自由基导致的连锁反应, 揭示了其多变性及破坏性。发现了“过氧化物效应”, 即自由基可以作为一类化学实体参加化学反应, 自此创立了化学的一个新的分支—自由基化学。
- ❖ 1969年, 美国科学家弗里多维奇 (I. Fridovich) 和他的研究生麦克德 (J. M. McCord) 发现超氧化物歧化酶的重要的生物学作用, 这是自由基生物学发展的里程碑的事件
- ❖ 1982年国际自由基研究医学会在伦敦成立, 每年召开年会, 为 医学揭开疾病之谜。
- ❖ 1998年, 一氧化氮自由基获得诺贝尔生理学或医学奖。



❖ 20世纪40年代，发现了电子顺（自）磁共振现象，及电子自磁共振检测技术，可直接检测及捕捉自由基，人类对自由基的认识取得长足进展。但偏重其现象研究（特征及含量测定）。

❖ 20世纪70年代，研究手段延伸至各种生化方法和及其它仪器，细胞生物学、生物化学、分子生物学的发展使人类对自由基的生物学意义有了新的认识，并将自由基与医学联系起来，使自由基研究进入理论与应用结合的崭新阶段。形成了一门新兴的交叉学科——自由基生物学与医学，同时发现90%以上的疾病与自由基有关。这包括过敏、冠心病、溃疡、肿瘤、衰老、关节炎等。

中国自由基生物学与自由基医学专业委员会为中国生物物理学会下设的学会。

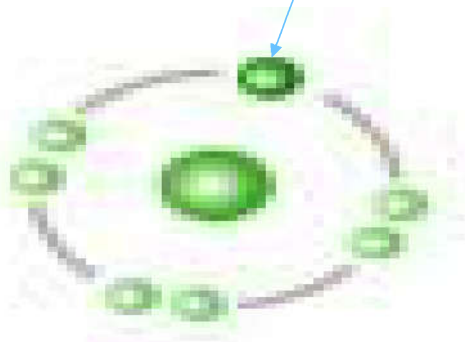
台湾于2001年元月成立自由基学会。该学会每一年举办几次活动，内容包括学术研讨会，内容为自由基在基础医学、临床医学以及应用上最新的发展。学会为提升自由基的学术水平、增进自由基在医疗及养生的功效作出了努力。

# 自由基 (free radical)



化学上也称为“游离基”，是指带有不成对（奇数）电子的原子、原子基团或分子。

未成对电子



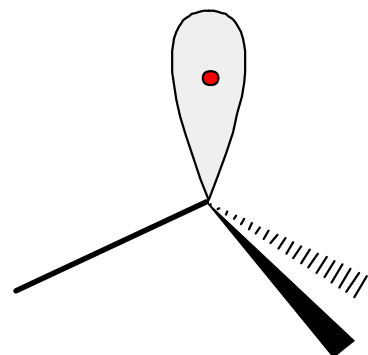
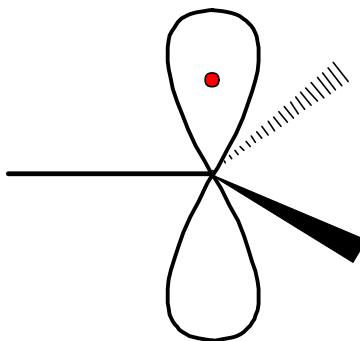
自由基示意图

自由基 (**free radical**) 概念：  
外层轨道上具有单个不配对电子的原子、原子团和分子的总称。

甲基自由基结构：

平面型：

角锥型：



# 自由基和碳正离子区别



❖ 比如 $\text{CH}_4$

$\text{CH}_3\text{--H}$  从中间断  $\text{CH}_3\cdot$  是自由基 不带电 有一个孤电子

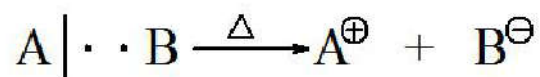
从最左边断  $\text{CH}_3^+$  带一个单位正电荷 甲基正离子

从最右边断 甲基负离子...

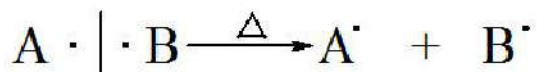
# 自由基的生成



共价键化合物A-B，共价键断裂方式有两种：



共价键异裂，形成阴阳离子



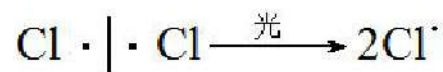
共价键均裂，形成自由基

自由基：化学键发生均裂时产生的未成对电子的中间体。

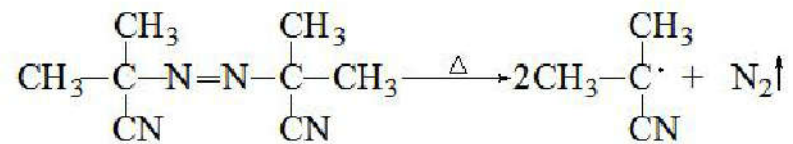
# 自由基的种类



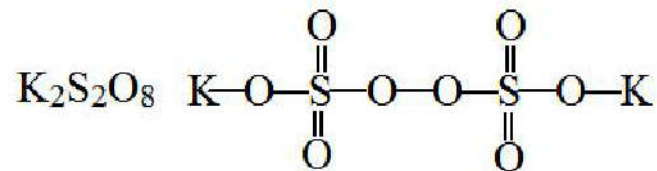
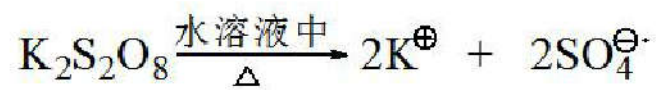
原子自由基



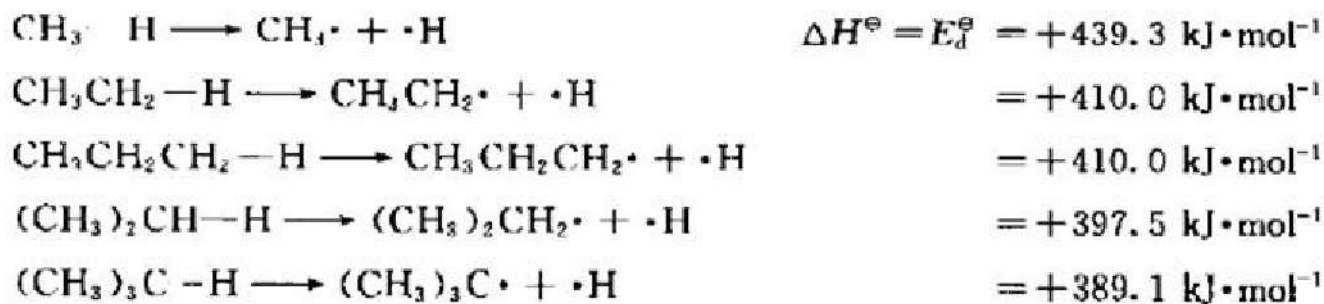
基团自由基



离子自由基

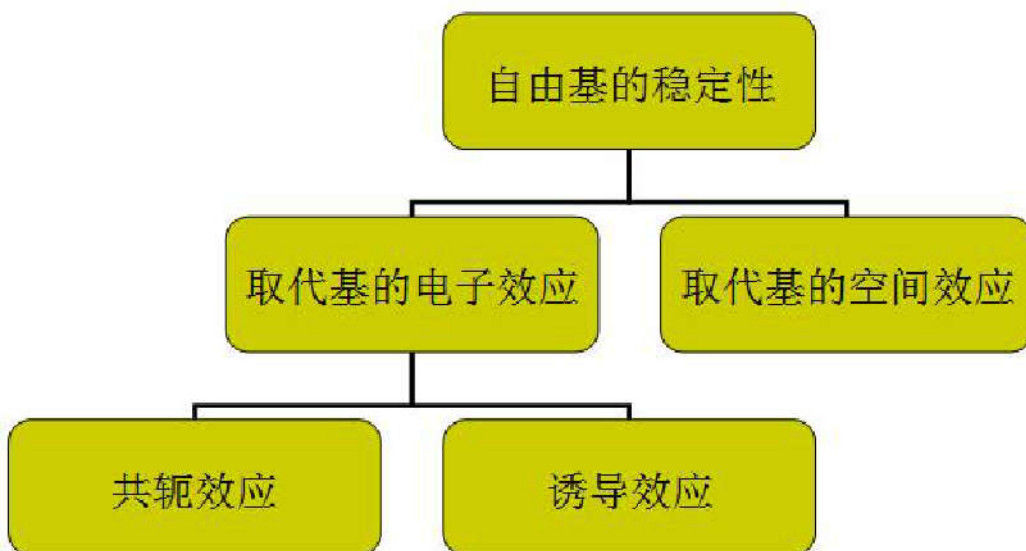




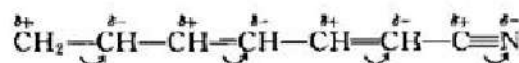


键能越大，断裂此键需要提供的能量越高，自由基的内能越高，稳定性越差

碳自由基的稳定性为： $3^\circ > 2^\circ > 1^\circ > \cdot\text{CH}_3$



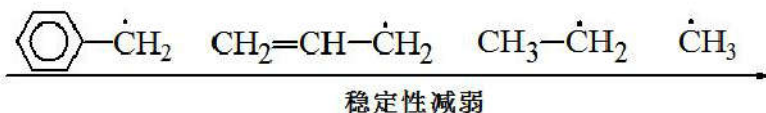
因分子中原子或基团的极性不同，而引起成键电子云沿原子链向某一方向移动的效应。



单双键交替出现的共轭体系中，由于原子间的相互影响而使体系内的  $\pi$  电子分布发生变化的一种电子效应。

# 电子效应对自由基稳定性的影响

## 共轭效应



共轭  $\longrightarrow$  电子云密度降低  $\longrightarrow$  自由基稳定

共轭取代基愈多,共轭效应愈强烈,自由基的稳定性愈强

## 诱导效应

自由基与推电子取代基连接时, 自由基的稳定性降低。

当自由基与吸电子取代基相连时, 自由基的稳定性增强。

共轭效应和诱导效应总是同时起作用,当二者对自由基的稳定性影响发生矛盾,共轭效应起主导作用

登高必自卑, 行远必自迩



当自由基所连接的取代基较大较多时, 由于取代基的位阻和排斥作用, 给自由基的反应增加了困难, 所以使自由基的稳定性增强。取代基的空间效应愈强烈, 自由基的稳定性愈强。

**当取代基的空间效应和电子效应对自由基的稳定性影响发生矛盾时,空间效应起主导作用。**

❖ 1、独特的物理特性——顺磁性：自由基中的未成对电子，因自旋运动产生的磁距未被抵消，具有净的电子自旋磁矩。在无外加磁场时，未成对电子的自旋磁距是随机取向，处于同一个平均能量状态。

❖ 当自由基置于外加恒定磁场中，电子自旋磁距就会与外磁场相互作用，其磁距方向就会沿外磁场方向排列，使含有自由基的物质表现出净的磁化强度，这种现象称之为顺磁性，顺磁性是自由基独特的物理特性。

## ❖ 2、活泼的化学性质

❖ 由于自由基具有未成对电子，所以大部分自由基很不稳定，具有活泼的化学性质，具有极强的攻击作用。

❖ 在所有分子成键过程中，电子都是倾向配对的，自由基中的未成对电子也有配对的倾向，因此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，这一重要性质导致自由基极易进攻细胞、蛋白质、酶和核酸等，这也正是自由基容易造成机体损害的直接原因。

❖ 有少数自由基化学反应性很低，如三苯甲基自由基，这是由于其空间因素和共振效应引起的。



### ❖ 3、绝大多数自由基半衰期短

❖ 在通常条件下很难存在，平均寿命仅有 $10^{-5}\text{s}$ ，所以不易制备，这就给自由基的分离和检测工作带来困难。

❖ 4、有些自由基如FMN或FAD具有特征的吸收光谱，有特殊的颜色，这有助于自由基的鉴别。

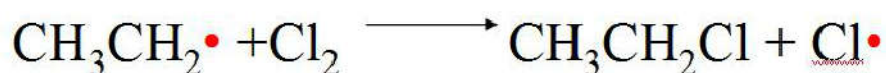
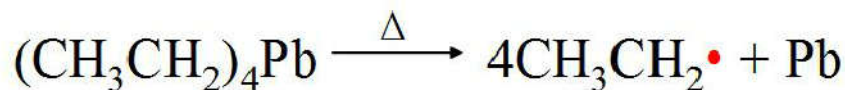
# 自由基产生

电子俘获

共价键均裂

产生自由基的供能方式:

## I. 热解

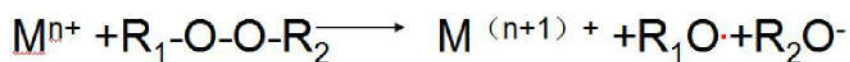


## II、光解



## III、辐射分解（如水的辐射分解）

## IV、氧化还原反应:



## V、加入自由基引发剂

登高必自卑，行远必自迩



## 1. 体外产生自由基

外源性自由基指以物理或化学方法产生的自由基，有通过热解、光解、辐射分解使共价键均裂产生的，也包括使带有成对电子的物质俘获一个电子产生的自由基。

## 2. 体内产生自由基

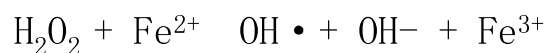
内源性自由基指生物体内产生的自由基，主要是 $O_2^{\cdot -}$ 与 $\cdot OH$ 及其衍生物如 $H_2O_2$ 、 $O_2$ 、 $RO\cdot$ 、 $RO_2\cdot$ 、 $ROOH$ ；

### ① 电磁辐射产生

电磁辐射是指可见光、紫外光、x射线以及其他能产生电离作用的射线的总称。由电磁辐射提供的能量也能使共价键裂解产生自由基。

### ② 氧化还原过程产生自由基

体内许多物质可以发生氧化还原反应，最著名的是Fenton反应，即体内 $H_2O_2$ 与 $Fe^{2+}$ 的作用，可生成 $OH\cdot$ ：





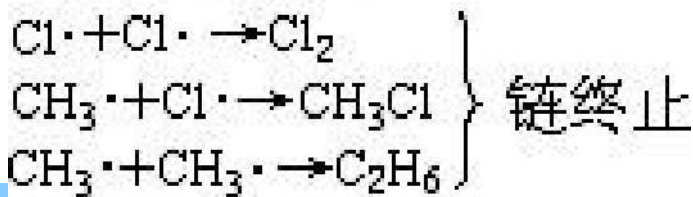
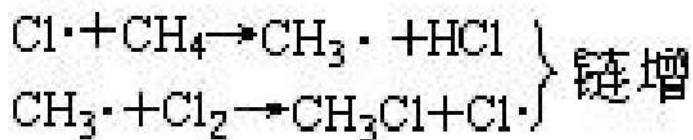
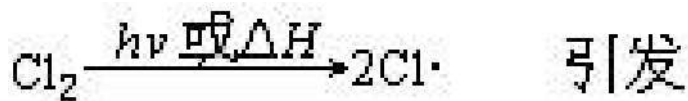


### ❖ 3. 自由基引发剂

❖ 处于稳定态的分子加入自由基引发剂，可分解为自由原子或自由基等活性传递物，所需的活化能相当于所断裂键的键能。链引发所产生的活性传递物与另一稳定分子作用，在形成产物的同时又生成新的活性传递物，使反应如同链条一样不断发展下去。

❖ 两个活性传递物相碰形成稳定分子，失去传递活性；或与容器壁相碰，形成稳定分子，放出的能量被容器壁吸收，造成反应停止。

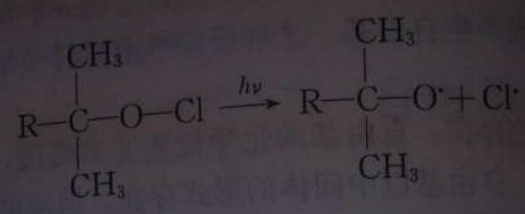
❖ 自由基的链式反应，包括链引发、链传递和链终止三个基本过程。



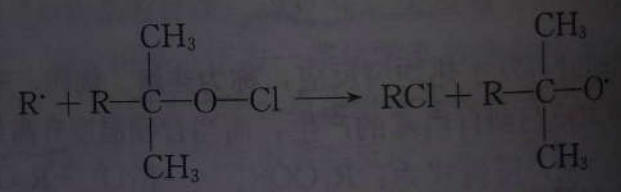
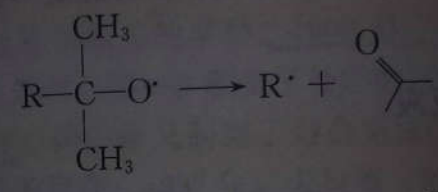


链式反应，包括链引发、链传递、链终止。

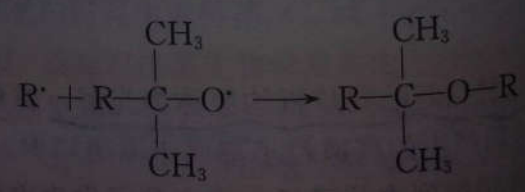
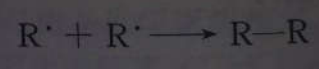
链引发：



链传递：

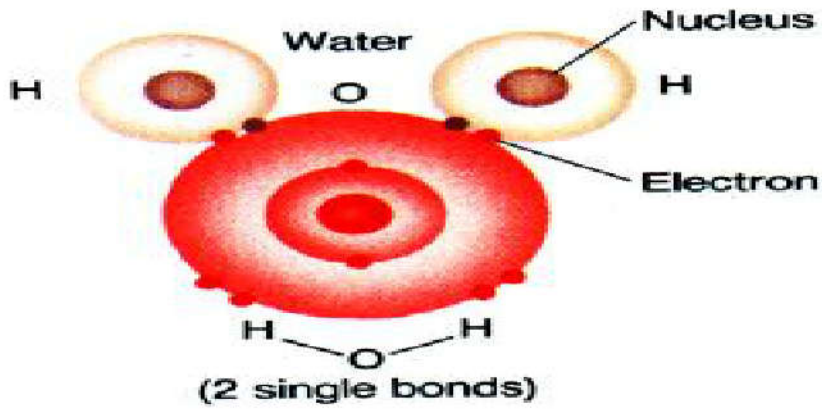
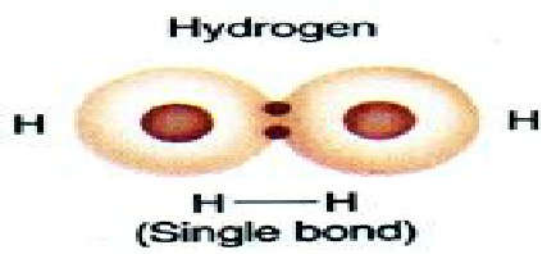


链终止：

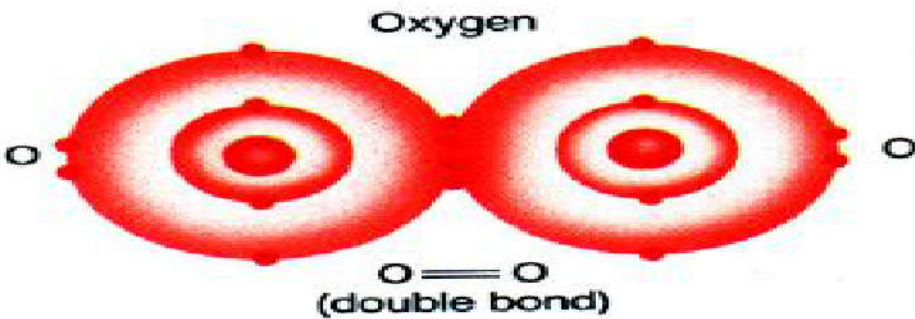


### 2.1.2 自由基的化学反应

$\text{CH}_3^\bullet + \text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2 \longrightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2^\bullet$   
 (2) 发生：  
 1,1,1-三氯丙烯  
 1,2-氯转移，生  
 $\cdot\text{CCl}_3 + \text{CH}_2=\text{CHCl} \longrightarrow \text{CH}_2\text{CHCl}\cdot$   
 2. 自由基-  
 自由基分子  
 (1) 加成反  
 如，三氯甲基自  
 $\cdot\text{CCl}_3 + \text{C}=\text{C} \longrightarrow \text{CCl}_3\text{C}-\text{C}$   
 (2) 取代反  
 $\text{ph}^\bullet + \text{BuSH} \longrightarrow \text{phH} + \text{BuS}^\bullet$   
 (3) 自由基-  
 3. 自由基-自  
 自由基-自由  
 (1) 二聚/偶  
 $\text{phCH}_2^\bullet + \text{phCH}_2^\bullet \longrightarrow \text{phCH}_2\text{CH}_2\text{ph}$   
 (2) 链化反应



带有不成对电子的基团称为自由基



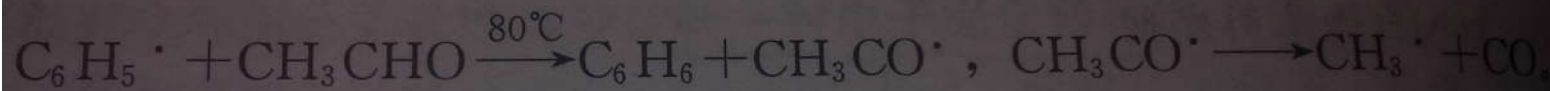
自由基的反应活泼性特别强

❖ 自由基参与的反应主要包括以下三类：1. 单分子与自由基反应，2. 自由基-分子相互作用，3. 自由基-自由基相互作用。

❖ 1. 单分子自由基反应

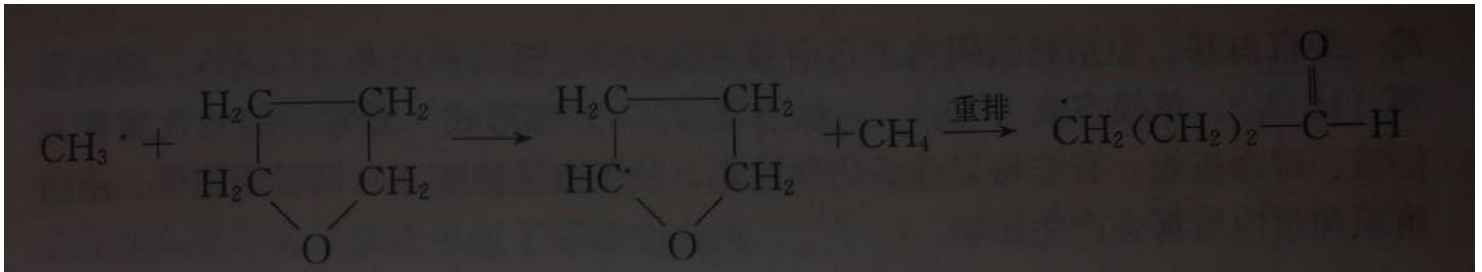
❖ 自由基本身发生的反应，包括碎裂和重排两种主要类型。

❖ 碎裂反应是指自由基碎裂生成一个稳定的分子和一个新的自由基的反应，如苯基自由基和乙醛在80 °C反应生成乙醛自由基，后者继续发生碎裂反应，生成甲基自由基和一氧化氮：

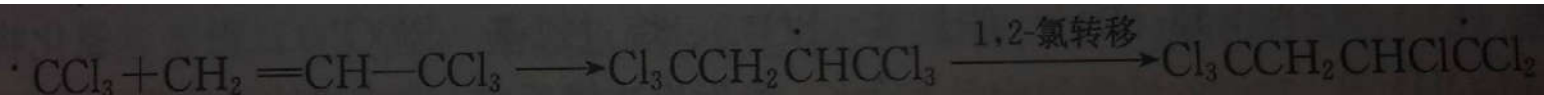


❖ 重排反应通常有以下两种情况

❖ (1) 在环状体系中，通常是邻近氧的碳碳单键断裂生成羰基和一个异构的自由基。例如，甲基自由基和四氢呋喃反应生成  $\alpha$ -四氢呋喃自由基，后者再发生重排反应，生成4-氧丁基自由基。反应式如下：



(2) 发生1,2或者1,5-氢原子或者氯原子的转移反应。例如，三氯甲基自由基和1,1,1-三氯丙烯发生加成反应，生成1,1,1,4,4,4-六氯-2-丁基自由基，再发生1,2-氯转移，生成新的自由基。反应式如下：



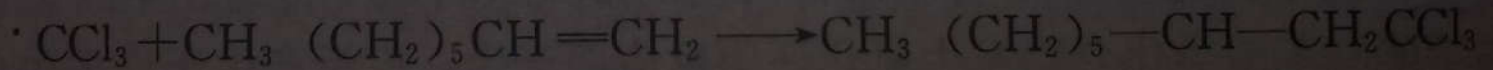


## ❖ 2. 自由基-分子相互作用

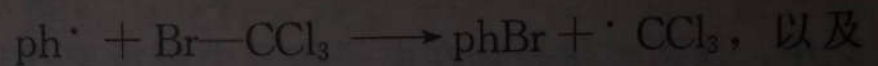
❖ 自由基分子相互作用的类型包括加成、取代或夺取、与氧化剂反应。

❖ (1) 加成反应。对不饱和体系的加成反应，生成一个新的饱和自由基。

❖ 例如，三氯甲基自由基对辛烯的加成，生成1,1,1-三氯-3-壬基自由基。



(2) 取代或夺取反应。例如



(3) 自由基与氧化剂的反应。例如，苯基自由基被亚铜离子氧化生成正离子。

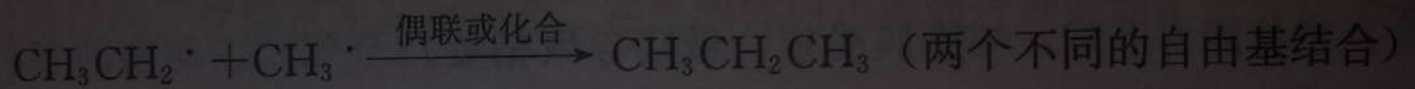
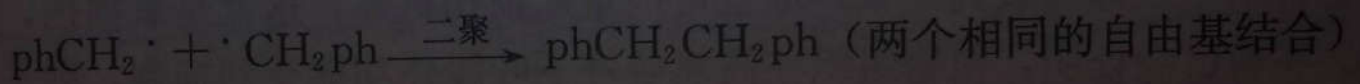




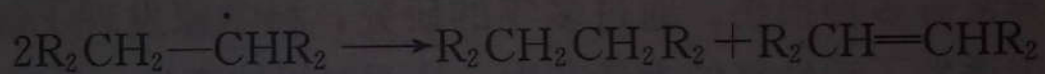
❖ 3. 自由基-自由基相互作用

❖ 包括二聚/偶联和歧化。

(1) 二聚/偶联反应



(2) 歧化反应



❖通过对多种动植物组织、器官做电子顺磁核磁共振波谱分析，发现自由基在生物体内是普遍存在的。生物体内的自由基按照化学结构分类主要分为三类：（1）活性氧，（2）脂类自由基和脂类过氧化物，（3）半醌类自由基

## ❖（1）活性氧

❖活性氧（reactive oxygen species, ROS）是指由氧形成并在分子组成上有氧原子，且化学性质非常活泼的一类物质的总称。氧自由基是由活性氧衍生而来的一类自由基，包括超氧阴离子自由基（ $O_2^- \cdot$ ）、羟基自由基（ $\cdot OH$ ）、过氧化氢（ $H_2O_2$ ）、单线态氧（ $^1O_2$ ）、三线态氧（ $^3O_2$ ）等形式。

❖通常它们的性质非常活泼、寿命极短，有非特异的化学发光，难于检测。它们对细胞膜、脂肪组织、蛋白质都会产生影响。





## ❖ 2. 脂类自由基和脂类过氧化物

❖ 在活性氧的作用下，组织细胞会因脂质过氧化而产生脂类自由基，如脂自由基 ( $L \cdot$ )、烷自由基 ( $R \cdot$ )，脂氧自由基 ( $LO \cdot$ )、烷过氧基 ( $ROO \cdot$ )、脂氢过氧化物 ( $LOOH$ ) 等。它们的性质稳定且寿命长，可发生连锁反应，造成机体更严重的损伤。

## ❖ 3. 半醌类自由基

❖ 半醌类自由基通常是黄素类蛋白、辅酶Q (coenzyme Q, CoQ) 的单电子还原形式或者氧化形式。CoQ是一种广泛分布于生物体内的醌的衍生物，所以也成为泛醌。在呼吸链中，CoQ可以以自由基的形式存在进行电子传递。半醌类自由基一般由苯醌类化合物发生氧化还原反应而产生，广泛产生于许多生命过程中，这两类化合物在电子传导中起重要作用。此类自由基是线粒体呼吸链电子传递功能的主要执行者。

1. 电子顺磁共振
2. 脉冲射解与停流技术
3. 超微弱化学发光法
4.  $O_2 \cdot^-$ 、 $H_2O_2$ 的测定
6. 过氧化产物测定
6. 相关酶的活力测定 (CAT、SOD)



## 1. 电子顺磁共振（EPR）

EPR方法就是利用具有未配对电子的物质在静磁场作用下对电磁波的共振吸收特性来对物质进行检测与分析。

EPR测量通常是固定微波频率，通过线性扫描磁场来获得信号。

## 2. 脉冲射解与停流技术

**脉冲射解法**，即用一个脉冲式电离辐射源照射化合物溶液，自由基可在微秒或更长时间内产生，而许多自由基的吸收光谱与原化合物不同，可用吸收光谱进行检测。

**停流法**，把反应物同时压到石英管中，混合后再进入收集管。控制条件可使混合液体在石英管中停留很短时间而来不及进行明显的反应。进入收集管的液体被迫突然停止后，石英管中的反应才进行直到完成，通过测量吸收光谱的变化可算出反应速率。



### ❖ 3. 超微弱化学发光法

超微弱化学发光法，是对**脂质过氧化**过程中的自由基反应常用研究方法。可分为自发发光和诱发发光，诱发发光可采用物理或化学诱发因子。

### 4. $O_2^{\cdot-}$ 、 $H_2O_2$ 的测定

**$O_2^{\cdot-}$ 的测定：**  $O_2^{\cdot-}$ 可使细胞色素C(CytC,  $\lambda_{max}$ 570nm)变成还原型CytC( $\lambda_{max}$ 550nm)，测定  $\Delta A$ ，根据消光系数，计算CytC还原量间接表示 $O_2^{\cdot-}$ 含量。

**$H_2O_2$ 的测定：**  $H_2O_2$ 的  $\lambda_{max}$ 为240nm，根据其消光系数，无干扰物存在可直接采用紫外法测定。



## ❖ 5. 过氧化产物测定

(1) **丙二醛(MDA)测定**: MDA是不饱和脂肪酸过氧化产物之一, 它的产量多寡可表示过氧化程度高低。

(2) **共轭双烯测定**: MDA易与细胞内其他物质反应, 仅测MDA含量不足以充分反应客观自由基损伤程度。最好还测定不饱和脂肪酸发生过氧化过程中产生的共轭双烯。利用紫外法可直接测定。

## 6. 相关酶活力测定 (CAT和SOD)

(1) 过氧化氢酶(CAT)活力测定: [分光光度法](#)、滴定法、侧压法。

分光光度法最常用, 原理是CAT能催化 $H_2O_2$ 变成 $H_2O$ 和 $O_2$ , 使 $H_2O_2$ 在240nm处吸收值下降, 测定单位时间 $A_{240nm}$ 的差值, 根据 $H_2O_2$ 的消光系数可计算CAT活力。

### ❖ 相关酶活力测定 (CAT和SOD)

(2) SOD(超氧化物歧化酶)活力测定:

**直接法**, 直接测SOD所催化反应底物消耗速率或产生速率。

**间接法**, 原理是有一个产生 $O_2^{\cdot-}$ 的系统, 让 $O_2^{\cdot-}$ 再产生另一个便于检测的反应, 通过检测SOD对这个反应的抑制程度间接计算SOD活力。