

- induced apoptosis of glioma tumors in vivo. *Oncogene*, 2003, 22(44): 6865-6872.
- [12] Dickson PV, Hamner JB, Burger RA, et al. Intravascular administration of tumor tropic neural progenitor cells permits targeted delivery of interferon-beta and restricts tumor growth in a murine model of disseminated neuroblastoma. *J Pediatr Surg*, 2007, 42(1): 48-53.
- [13] Tang Y, ShaháK, Messerli SM, et al. In vivo tracking of neural progenitor cell migration to glioblastomas. *Hum Gene Ther*, 2003, 14(13): 1247-1254.
- [14] Cao F, Lin S, Xie X, et al. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation*, 2006, 113(7): 1005-1014.
- [15] Baumjohann D, Lutz MB. Non-invasive imaging of dendritic cell migration in vivo. *Immunobiology*, 2006, 211(6-8): 587-597.
- [16] Beilhack A, Schulz S, Baker J, et al. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood*, 2005, 106(3): 1113-1122.
- [17] Laxman B, Hall DE, Bhojani MS, et al. Noninvasive real-time imaging of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(26): 16551-16555.
- [18] Paulmurugan R, Umezawa Y, Gambhir SS. Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living subjects by using reporter protein complementation and reconstitution strategies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(24): 15608-15613.
- [19] McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, et al. RNA interference in adult mice. *Nature*, 2002, 418(6893): 38-39.
- [20] Huang M, Chan DA, Jia F, et al. Short hairpin RNA interference therapy for ischemic heart disease. *Circulation*, 2008, 118(14 suppl): S226-S233.

(收稿日期: 2009-04-22)

生物学系统内检测自由基方法的研究进展及其意义

池翠萍

【摘要】 活性氧等自由基与神经变性疾病、糖尿病、辐射损伤等多种病理过程的发展相关。检测自由基技术在辐射防护和辐射生物效应方面具有重要的实际意义。该文综述了建立在电子自旋共振(ESR)基础上的各种自由基检测技术,同时介绍了新近建立的利用免疫电子自旋捕捉技术检测DNA和蛋白质大分子自由基的方法。

【关键词】 自由基; 活性氧; 辐射损伤; 电子自旋共振谱学

Progress in measurement of free radicals in biological systems

CHI Cui-ping

(Department of Radiation Medicine and Environmental Medicine, China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China)

【Abstract】 Free radicals generation and oxidative stress are involved in many pathological processes including neuro-degenerated diseases, diabetes, tumorigenesis and radiation damage. Measurement of free radicals is of importance in the field of radiation protection and radiation damage. The electron spinning resonance(ESR) techniques for measurement of free radicals in biological systems are summarized according to the literature and the author's research work in this review. The recent emerging immuno-spin trapping method for analysis of protein radicals and DNA radicals is also introduced.

【Key words】 Free radicals; Reactive oxygen species; Radiation damage; Electron spin resonance spectroscopy

1 检测自由基的意义

自由基生物学研究已经渗透到与生命科学相关

的多种领域,目前与自由基研究相关的一些主要领域包括以下几个方面:

(1) 与疾病的发病机制和预后有关^[1-3]。研究表明,神经变性疾病如帕金森病、老年性痴呆、肌萎缩侧索硬化症等的发病原因与长期过量的自由基对神经组织的作用,使得大脑中枢系统相应功能部

位长期背负氧化应激负荷有关。

(2) 与生理过程和衰老有关。自由基浓度在正常水平下, 在体内承担信使分子的作用, 例如一氧化氮 (nitric oxide, NO) 自由基在正常水平下与细胞的生长分化、凋亡、血管舒张和神经信号的传递等有关, 当过高浓度时与炎症、细胞坏死及细胞因子的过量释放有关。自由基和机体内氧化还原过程是细胞老化和衰老的机制之一。

(3) 与环境污染致人体毒性机制有关^[4-5]。例如, 与镉、汽车尾气等毒理学有关。

(4) 通过检测稳定性自由基可应用于食品、药物及医疗用品辐照加工等的质量检验, 还可以应用于考古学中年代推算等方面。

自由基研究技术在辐射防护领域中的应用有四个方面: ①自由基是电离辐射损伤机制之一^[6]。辐射损伤有三大主要机制包括: 细胞死亡、自由基产生和 DNA 损伤。电离辐射除造成 DNA 链断裂、分子损伤和杀死细胞外, 由于沉积的能量可以电离组织中的水分子, 产生活性氧和自由基, 后者对周围大分子产生作用, 继而改变大分子的结构和性质, 发生功能的改变。所以, 对自由基的研究是揭开辐射损伤机制和特点的不可缺少的内容之一。②用电子自旋共振 (electron spinning resonance, ESR) 或称电子顺磁共振谱仪测量牙釉质中稳定性自由基可作为辐射生物剂量计用于过去照射的剂量评估。此方法已经应用于日本原爆幸存者和切尔诺贝利核事故受照人员的剂量评估^[7-9]。③用丙氨酸-ESR 系统定量照射剂量^[9]。晶体 α -丙氨酸照射后产生的自由基 $(CO(OH))=C(CH_3)NH_2^+$ 可用 ESR 谱仪检测, 从而定量照射剂量, 此法可以探测 X 射线、 γ 射线、电子、质子和高 LET 射线, 可测的剂量范围在 1 Gy 至 100 kGy 之间, 可用于辐照加工或肿瘤放疗吸收剂量的测定。④用于辐射防护药物的筛选。目前使用的筛选辐射防护剂的指标是动物 30 d 的存活率。利用 ESR 方法检测自由基的变化可以作为筛选辐射防护剂的一个辅助指标^[10]。

综上所述, 正因为自由基生物学的多方面渗透, 所以自由基检测手段和评估机体内氧化应激具有重要的实际意义。

2 ESR 检测自由基的方法

根据自由基寿命的长短, 可以分为稳定性自由

基和非稳定性自由基。在很多情况下, 生物体内非稳定性自由基及其代谢物在生理病理过程中起着重要作用, 所以检测非稳定性自由基更加具有实际意义, 但非稳定性自由基的寿命很短, 例如 $\cdot OH$ 为 $1.0 \times 10^{-9} s$, 生成后很快与周围 (3 nm 范围内) 分子发生反应^[6, 11], 因此检测起来比较困难。用 ESR 方法检测自由基有直接法和间接法。直接法用来测定寿命长的自由基, 即稳定性自由基, 间接法用来测定非稳定性自由基。

2.1 直接检测方法

ESR 的基本物理学原理与磁共振类似, 所不同的是后者激发的是原子核的共振。由于一般稳定性物质的电子是成对的, 所以 ESR 的使用没有磁共振广泛。但正因为 ESR 针对具有未配对电子的自由基, 决定了其具有较高的特异性。

直接检测方法就是将样品或处理过的样品, 未使用电子自旋探针或电子自旋捕捉剂直接进行 ESR 谱测量。样品可以是液体 (例如尿液、血液), 也可以是固体组织 (例如皮肤、脑、肝组织等)。在皮肤、肝、胆汁中, 通过 *ex vivo* 可直接测到维生素 C 自由基。这种检测方法是检测稳定性自由基的最好方法。

2.2 间接检测方法

常用的方法有下列几种:

(1) 使用电子自旋捕捉剂的间接检测。用此方法检测的自由基有 NO、 $\cdot OH$ 、 SO_3^- 、血红蛋白硫中心自由基等^[12-15]。电子自旋捕捉剂本身不是自由基, 不能产生 ESR 信号, 但能捕获特定的自由基, 产生的自由基加合物转化为相对稳定的自由基加合物及其代谢产物后则能用 ESR 或高效液相色谱来检测。由于这种目的, 电子捕捉剂与被检测的短寿命自由基必须有高的反应性和选择性。常用的电子自旋捕捉剂用来捕捉 $\cdot OH$, 而 5, 5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物 (5, 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide, DMPO) 来捕捉 NO 自由基。电子自旋捕捉的方法已成为检测自由基最常用的方法。

(2) 测定耗氧量。此法建立在增加氧敏感性电子探针 ESR 谱宽度的基础上, 来定量活性氧和自由基的产生^[16]。

(3) 利用体内 ESR 方法来监测体内氧化还原反应和氧化应激负荷^[17]。使用本身产生自由基信号电子自旋探针, 用 ESR 检测自由基信号衰减速度

的变化,根据自由基的代谢可测定体内自由基的产生情况。当电子自旋探针通过注射给药进入机体后,其 ESR 信号强度随时间而变弱。自由基探针代谢的实质是电子的氧化与还原反应,电子探针得到电子,成为 ESR 谱仪检测不到产物。电子探针在体内 ESR 信号的衰减被认为有两种原因,一种原因是电子探针被代谢为非磁性物质,另一种原因是其从测量范围内扩散到其他器官并排泄到体外。电子探针在体内的还原速度与其化学结构有关。Bacic 等^[18]在膀胱内测量到电子探针信号的增强,说明水溶性的电子探针可以分泌到尿中。最常用的电子探针有氮氧自由基,其在室温下相对稳定和对机体的毒性较小^[16]。自由基探针适用于探测体内生理、病理状态下氧化还原反应及其氧化应激负荷,例如缺血再灌注、辐射损伤、衰老、氧中毒和缺氧、四氯化碳中毒、糖尿病及铁负荷等。

3 检测方法的前景与需求

3.1 体内 ESR 测量的最新进展

以往的研究大部分是集中在体外 ESR 研究。利用 ESR 技术来探测体内的生物自由基技术开始于 20 世纪 80 年代。正因为活性氧和自由基氧化与多种病理过程有关,所以非侵袭性评价体内氧化还原状态或氧化应激负荷成为研究人员努力的目标。ESR 成像系统的建立就是为了满足这种需求。其功能与其他成像分析仪器例如 CT、MRI 显示的表面解剖结构不同,测定的是自由基的状态,即自由基的分布、扩散或代谢、转移等情况,是病因显像或自由基代谢显像技术。ESR 成像与 MRI 或 CT 联合使用,即自由基成像与解剖成像结合,使得自由基氧化应激的非侵袭性可视化评价成为可能。

ESR 成像与 MRI 或 CT 联合使用,可用于疾病的早期诊断或病因诊断,例如脑缺氧、冠心病、微小肿瘤等;用于疾病模型,可进行发病机制和治疗方法的研究,例如糖尿病模型、汽车尾气肺损伤模型等。以脑为例,脑是容易产生氧化应激负荷的器官,这是因为:①脑的耗氧量很高,约占全身总耗氧量的 1/5;②脑膜结构中含有高的可以被氧化的不饱和脂肪酸成分;③脑内含有低水平的抗氧化酶;④脑脊液中游离的 Fe^{3+} 通过 Haber-Weiss 反应形成高反应性的 $\cdot OH$ ^[19]。而脑内自由基和氧化应激负荷与多种病理状况有关,所以非侵袭性地评价脑

内自由基与氧化应激是人们一直关注的领域,应用氮氧自由基探针的 ESR 成像结合 CT 解剖结构成像,有望探测脑内自由基的代谢、分布和移行等状况,从而对一些病理变化进行早期发现或进行病因显像^[19]。

3.2 在同一器官内同时探测不同的自由基

由于机体内往往是不同自由基同时产生,所以需要检测不同自由基产生场所、量及与抗氧化物的关系。Matsumoto 等^[20]报道,通过使用 $\cdot OH$ 、NO 各自的自由基捕捉剂,应用 ESR-CT 技术,根据生成的稳定性自由基的分布,可以探明 $\cdot OH$ 、NO 的空间分布。利用此法使活体非侵袭性检测自由基和氧化应激的评估在个体水平上成为可能。

3.3 其他检测自由基的方法

蛋白质和 DNA 是活性氧和自由基氧化的对象,产生的大分子自由基在发病机制中占有很重要的地位。利用 ESR 技术可以探测到小分子的自由基,而很难检测到大分子的自由基。美国国立卫生研究院的研究小组建立了用免疫学方法来检测蛋白自由基和 DNA 自由基的技术。检测 DNA 自由基的基本原理是利用电子捕捉剂 DMPO 实时捕捉产生的 DNA 自由基,生成 DMPO-DNA 自由基加合物,后者在体内氧化为较稳定的大分子 DMPO-DNA 氮氧化物加合物;提取 DNA 后用抗捕捉剂抗体来识别 DMPO-DNA 氮氧化物加合物,从而达到检测 DNA 自由基的目的^[21]。电子捕捉剂及其抗体反应可以使用酶联免疫吸附测定法或免疫印迹法来检测。

检测蛋白自由基的基本方法与检测 DNA 自由基类似^[22]。DMPO 通过 C-、N-、S-中心与蛋白自由基生成 DMPO-蛋白自由基,后者被氧化成氮氧化物加合物;为检测样品中的 DMPO-蛋白氮氧化物加合物,将组织或细胞在含有 DNase 和蛋白酶抑制剂的缓冲液中匀浆,用酶联免疫吸附测定法来分析;再用免疫印迹法分离观察 DMPO-蛋白氮氧化物加合物,转到聚偏二氟乙烯膜上,染色后再消化,用液相色谱或质谱法来分析;查阅蛋白数据库比较序列来鉴定蛋白。

总之,检测自由基的产生和评价氧化应激在生物医学研究领域具有实际意义。建立在体内 ESR 基础上的 ESR 成像技术在不久的将来应该会成为重要的诊断技术。同时,相应会有适合各种组织或脏器的电子自旋捕捉剂和电子自旋探针开发出来。

参 考 文 献

- [1] Mosley RL, Benner EJ, Kadiu I, et al. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clin Neurochem Res*, 2006, 6(5): 261-281.
- [2] Block ML. NADPH oxidase as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci*, 2008, 9(Suppl 2): S8.
- [3] Niebrój-Dobosz I, Dziwulska D, Kwieciński H. Oxidative damage to proteins in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis(ALS). *Folia Neuropathol*, 2004, 42(3): 151-156.
- [4] Liu J, Qian SY, Guo Q, et al. Cadmium generates reactive oxygen-and carbon-centered radical species in rats: Insights from in vivo spin-trapping studies. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(14): 475-481.
- [5] Pan CJ, Schmitz DA, Cho AK, et al. Inherent redox properties of diesel exhaust particles: catalysis of the generation of reactive oxygen species by biological reductants. *Toxicol Sci*, 2004, 81(1): 225-232.
- [6] National Research Council Authoring Organizations. Health risks from exposure to low levels of ionizing irradiation: BEIR VII phase 2. National Research Council of the National Academies. Washington: The National Academies Press, 2006: 43-90.
- [7] Chumak V, Sholom S, Pasalskaya L. Application of high precision EPR dosimetry with teeth for reconstruction of doses to chernobyl populations[J/OL]. *Radiat Prot Dosimetry*, 1999, 84(1-4): 515-520 [2009-04-20].<http://rpd.oxfordjournals.org/cgi/content/short/84/1-4/515>.
- [8] Nakamura N, Miyazawa C, Sawada S et al. A close correlation between electron spin resonance (ESR) dosimetry from tooth enamel and cytogenetic dosimetry from lymphocytes of Hiroshima atomic-bomb survivors. *Int J Radiat Biol*, 1998, 73(6): 619-627.
- [9] Paul M, Deluca J. Dosimetry Systems [J/OL]. *Journal of the ICRU*, 2008, 8(2): 29-70[2009-04-20]. <http://jicru.oxfordjournals.org/cgi/reprint/8/2/29>.
- [10] Miura Y, Anzai K, Ueda JI, et al. Novel approach to in vivo screening for radioprotective activity in whole mice: In vivo electron spin resonance study probing the redox reaction of nitroxyl. *J Radiat Res(Tokyo)*, 2000, 41(2): 103-111.
- [11] Ward JF. The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *Int J Radiat Biol*, 1994, 66(5): 427-432.
- [12] Borisenko GG, Martin I, Zhao Q, et al. Nitroxides scavenge myeloperoxidase-catalyzed thiyl radicals in model systems and in cells. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(30): 9221-9232.
- [13] Rangelova K, Mason RP. New insights into the detection of sulfur trioxide anion radical by spin trapping: radical trapping versus nucleophilic addition. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(2): 128-134.
- [14] Kim SR, Jockusch S, Itagaki Y, et al. Mechanisms involved in A2E oxidation. *Exp Eye Res*, 2008, 86(6): 975-982.
- [15] Timoshin AA, Drobotova DY, Lakomkin VL, et al. Estimation of nitric oxide level in vivo by microdialysis with water-soluble iron-N-methyl-D-dithiocarbamate complexes as NO traps: a novel approach to nitric oxide spin trapping in animal tissues. *Nitric Oxide*, 2008, 19(4): 338-344.
- [16] Diepart C, Jordan BF, Gallez B, A New EPR oximetry protocol to estimate the tissue oxygen consumption in vivo. *Radiat Res*, 2009, 172(2): 220-225.
- [17] Takeshita K, Chi C, Hirata H, et al. In vivo generation of free radicals in the skin of live mice under ultraviolet light, measured by L-band EPR spectroscopy. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(5): 876-885.
- [18] Bacic G, Nilges MJ, Magin RL, et al. In vivo localized ESR spectroscopy reflecting metabolism. *Magn Reson Med*, 1989, 10(2): 266-272.
- [19] Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, et al. Nitroxyl radicals for labeling of conventional therapeutics noninvasive magnetic resonance imaging of their permeability for blood-brain barrier relationship between structure, blood clearance, and MRI signal dynamic in the brain. *Mol Pharm*, 2009, 6(2): 504-512.
- [20] Matsumoto K, Utsumi H. Development of separable electron spin resonance-computed tomography imaging for multiple radical species: an application to OH and NO. *Biophys J*, 2000, 79(6): 3341-3349.
- [21] Ramirez DC, Gomez-Mejiba SE, Mason RP. Immuno-spin trapping analyses of DNA radicals. *Nat Protoc*, 2007, 2(3): 512-522.
- [22] Mason RP. Using anti-5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (anti-DMPO) to detect protein radicals in time and space with immuno-spin trapping. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36(10): 1214-1223.

(收稿日期: 2009-02-22)