

电子顺磁共振在生物医学研究中的应用

屈喜梅 王丽琴 张文艺 刘忠超 崔松野 冯鑫 焦玲

【摘要】 电子顺磁共振技术从被发现到现在已有半个多世纪, 由于它可以直接对自由基进行检测, 现已应用到各种研究领域, 推动着生物医学事业的发展。该文主要概述了现阶段电子顺磁共振所研究的生物组织内的各种自由基, 以及自旋标记、电子顺磁共振成像技术在生物医学研究中的应用。

【关键词】 电子自旋共振谱学; 生物医学研究; 自由基

The application of electron paramagnetic resonance in biomedical research QU Xi-mei, WANG Li-qin, ZHANG Wen-yi, LIU Zhong-chao, CUI Song-ye, FENG Xin, JIAO Ling. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Corresponding author: JIAO Ling, Email: ljiao.irm@163.com

【Abstract】 Electron paramagnetic resonance technique has been found more than half a century, for free radicals detection application, it has been applied to various research studies, and promotes the development of the biomedicine. This article summarized the various free radicals measurement by the electron paramagnetic resonance in biology tissue, and the application of the spin labeling and electron paramagnetic resonance imaging technology in biomedicine.

【Key words】 Electron spin resonance spectroscopy; Biomedical research; Free radicals

顺磁共振吸收现象最先由苏联物理学家扎沃伊斯基在 4.76 mT 的外磁场中用频率为 133 MHz 的交变电磁波照射 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 样品时观测到的, 之后磁共振一直属于物理学的研究领域, 直到 1952 年, 首次报道出第一个有机自由基的电子顺磁共振 (electron paramagnetic resonance, EPR) 谱后, 磁共振作为一种崭新的实验技术逐渐地引入到生物学的领域之中。20 世纪 60 年代以后, 由于仪器不断改进和技术不断创新, 如低温技术、自旋捕捉技术等的应用等, 把 EPR 的研究对象拓展到了对逆磁性物质的研究^[1]。EPR 技术至今已在物理学、半导体、有机化学、络合物化学、辐射化学、化工、海洋化学、催化剂、生物学、生物化学、医学、环境科学、地质探矿等领域得到了广泛地应用。

1 EPR 的基本原理

EPR 是在外磁场的作用下, 具有未抵消的电子磁矩 (自旋) 的磁无序系统在一定的恒定磁场和高频磁场同时作用下产生的磁共振。EPR 可从定性和定量两个方面检测物质原子或分子中所含的不配对电子, 并探索其周围环境的结构特性。对自由基而言, 轨道磁矩几乎不起作用, 总磁矩的绝大部分 (99% 以上) 来自电子自旋, 所以 EPR 亦称 “电子自旋共振”。

物质所具有的顺磁性是由分子的永久磁矩引起的。电子除了质量、电荷等基本属性外, 还有自旋, 根据保里原理, 每个分子轨道上不能同时存在两个自旋态相同的电子。因而各个轨道上已成对的电子自旋运动产生的磁矩是相互抵消的, 只有存在未成对电子的物质才具有永久磁矩, 它在外磁场中呈现顺磁性^[2]。

电子自旋角动量 S 与自旋磁矩 μ_e 的关系为:

$$\mu_e = -g_e \beta S$$

其中, g_e 称为 g_e 因子, β 为电子的玻尔磁子。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.02.011

基金项目: 中国医学科学院放射医学研究所探索基金(ST1222)

作者单位: 300192 天津, 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室

通信作者: 焦玲 (Email: ljiao.irm@163.com)

自旋磁矩在外场中与磁场 H 的相互作用能为:

$$E = -\mu_e \cdot H = -g_e \beta S \cdot H$$

电子的自旋为 $S=1/2$, 它在外磁场中有两种不同的取向($2S+1$), 分别对应于两个不同的能级, 其能量为:

$$E = g_e \beta S H m_s$$

其中, $m_s = \pm 1/2$, 所以单个电子磁矩在磁场方向的分量为 $\mu = 1/2 g_e \beta$, 电子在外磁场 H 的作用下, 只能有两个可能的能量状态:

$$E = \pm \frac{1}{2} g_e \beta H$$

能级的能量差为:

$$\Delta E = g_e \beta H$$

如果在垂直于 H 的方向上施加频率为 $h\nu$ 的电磁波, 当 $h\nu = g_e \beta H$ 时, 处于两能级间的电子发生受激跃迁, 导致部分处于低能级中的电子吸收电磁波的能量跃迁到高能级中, 这就是电子自旋共振现象, 或称顺磁共振现象^[1]。

2 EPR 在生物医学中的应用

2.1 研究生物组织中稳定的自由基

EPR 技术不但能证明自由基的存在, 而且能得到分子结构、化学反应机理及反应动力学方面的重要信息。对来源于各种动物与植物的黑色素的测量得知均有自由基存在, 黑色素是经过自然的和人工的聚合而形成的独特的基因, 是一种稳定的有机自由基, EPR 谱是研究其自由基的有效方法^[3]。此外, 在冻干的动物和植物组织以及代谢活跃的组织(如绿叶、肝、肾)样品内均检测出自由基^[4]。

2.2 研究生物过程中产生的自由基

在许多生物过程中, 特别是包含氧化还原反应或者氧利用的过程中, 有自由基作为中间产物或者最终产物产生。已证明在叶绿体、活的水藻和能进行光合作用的细菌中有光照所引起的自由基生成, 它们全部参与光合电子传递链, 如 Zhang 等^[5]曾用 EPR 捕捉技术研究了光合体系中的超氧化自由基的光合原初反应。EPR 也可用于研究酶促反应中的自由基, 能获得催化剂表面的性质及反应机理。在某些情况下, 可利用超精细结构来鉴定自由基, 进而提供关于酶催化机理的信息和探测有关酶的活性部位的结构^[6]。

2.3 研究由于药物和辐射影响而产生的自由基

生物物质受高能辐射后, 生物体中有自由基产

生, EPR 技术可以对所产生的自由基作定性与定量的检测, 提供辐射损伤程度及损伤部位的信息, 还可以从进一步的研究中得出涉及辐射效应的原初机理、氧效应、能量转移、自旋转移、生物物质的辐射灵敏度、辐射防护和辐射剂量等许多极为重要的结果^[7]。辐射事故发生后, 用辐射诱发的 EPR 信号来测量人类受到的辐射剂量也已经成为一个非常重要的研究领域, 例如, 牙齿、骨头、指甲等生物组织在受到辐照后都有自由基产生, 可用 EPR 进行检测实现剂量重建^[8-9]。

EPR 不仅可以对某些药物在代谢过程中变异产生的自由基(如氯丙嗪、含细胞毒素药物等)进行检测, 也可用于对药物作用的监控^[10]。现已观察到某些癌组织内的自由基含量低于正常组织, 证明了致癌物可以在组织中形成自由基的现象, 有研究发现, 在用多种致癌物喂大鼠后, 肝内可检出一个特征信号, 这在癌的诊断中可能有重要价值^[11-12]。

2.4 自旋标记法

一般而言, 自由基在化学变化中具有高度反应力, 而在正常生物环境中并不会以高浓度出现, 若采用特别设计的不反应自由基分子, 将之附着在生物细胞的特定位置, 有可能得到自旋标记或自旋探针分子附近的环境。自旋标记法由美国的 Janzen 于 1965 年首次提出, 是指将一种稳定的自由基(通常用氮氧自由基)结合到单个分子或处于较复杂系统内的分子上的特定部位, 从 EPR 波谱取得有关标记物环境的信息^[13-14]。

自旋标记物可通过共价键或通过酶与辅酶、酶与底物、抗体与半抗原以及膜与甾体等的相互作用中所包含的非共价的引力连接到目的物上。自旋标记法现已被广泛地用于研究生物高分子的构象、酶活性部位的结构、脂质体和生物膜的结构, 并应用于免疫分析, 在膜脂和膜蛋白的细胞生物学研究中具有广阔的应用前景^[15-16]。位置定向的自旋标记技术结合 EPR 波谱技术也已成为检测蛋白质结构的有力工具^[17]。徐超等^[18]用定点自旋标记法研究了天青蛋白疏水区的结构及其与 P53 蛋白的相互作用。

EPR 波谱技术在医学中的应用一直是 EPR 很重要的研究内容。自旋标记和饱和转移可以实现对非顺磁性的生物分子的 EPR 研究, 而且自旋捕捉可以捕获短寿命的活性氧自由基, 促进与自由基相关的疾病的病理药理过程的分子机制的研究^[19-21]。

2.5 电子顺磁共振成像(electron paramagnetic resonance imaging, EPRI)技术

EPRI 是基于 EPR 技术和 CT 扫描成像技术的一种影像化显示和测量样品中自由基或顺磁物种的分布及其变化过程的无损检测技术^[22]。可研究活细胞和活体组织产生的自由基及天然抗氧化剂在细胞和心脏或脑中与 NO 和氧自由基作用的空间分布和反应动力学, 给出体内自由基的分布图和与各种疾病之间的关系, 这对从整体概念研究自由基在细胞和活体组织损伤中的作用机理有重要理论意义。

在体 EPRI 技术已经成为有力的自由基测量技术, 包括活体组织氧化还原状态、活体组织氧分布和时间演化等。它可以用来研究一系列生理疾病过程, 能获得人体表皮或皮下组织在病理中氧化还原的重要信息^[23]。近年来越来越多的科研人员开始利用 EPRI 来研究生物体某些病理、生理过程以及探索药物在体内的代谢规律。例如, Kuppusamy 等^[24-26]对大鼠心脏缺血再灌注损伤过程中外源自由基的分布、氧浓度等做了较系统的 EPRI 研究。

EPRI 特有的优势也是其他方法无法取代的。它研究的对象是体内的自由基等顺磁性物质, 这类物质往往直接参与生物体的某些生理和病理过程, 甚至在某些疾病的发生与发展中起主要作用, 所以生物体的 EPRI 不仅仅是结构性成像, 还可以直接检测分析某些致病因子的形成过程。

在生物医学领域, 现在已有了比较完整的用 EPR 技术筛选氧化剂的方法, 临床上也证明了某些疾病与氧化应激损伤有关, 开始了对天然或人工合成的抗氧化剂的筛选与评价抗氧化性能等方面的研究, 如追踪氧化反应的动力学过程等^[27-28]。此外, 临床上还用 EPR 研究了许多具有清除自由基功能的中药, 如研究了五味子等中药的药理学及其有效成分对氧自由基的清除作用和对细胞成分的保护作用, 促进了国内中药事业的发展^[29]。

3 总结与展望

EPR 技术已在生物医学中得到广泛的应用, 例如, 利用自旋标记、自旋捕获和 EPRI 等技术, 可以研究活体组织和体液中的自由基、酶的反应、氧自由基以及药物的检测、代谢和毒性等, 推动着生物医学的发展。EPR 的研究对象是体内的自由基等顺磁性物质, 这类物质往往直接参与生物体的

某些生理和病理过程, 甚至在某些疾病的发生与发展中起主要作用, EPRI 可以进行无损成像检测, 其特有的优势也是其他方法无法比拟的, 有着广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 徐元植. 实用电子磁共振波谱学. 北京: 科学出版社, 2008: 1-24.
- [2] 裘祖文. 电子自旋共振波谱. 北京: 科学出版社, 1980: 5-10.
- [3] Sarma T, Pilas B, Land EJ, et al. Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 833 (1): 162-167.
- [4] Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*, 2012, 70(5): 257-265.
- [5] Zhang S, Weng J, Pan JX, et al. Study on the photo-generation of superoxide radicals in Photosystem II with EPR trapping techniques. *Photosynthesis Res*, 2003, 75(1): 41-48.
- [6] 李培峰, 方允中. 用顺磁共振及自旋标记研究活性氧对铜锌超氧化物歧化酶结构的影响. *生物物理学报*, 1994, 10(3): 497-500.
- [7] 潘景喜, 屠铁成, 韩镇辉, 等. 放线菌素 D 光敏产生活性氧的 EPR 研究. *中国科学(B 辑化学)*, 32(4): 342-346.
- [8] Fattibene P, Callens F. EPR dosimetry with tooth enamel: a review. *Appl Radiat Isot*, 2010, 68(11): 2033-2116.
- [9] Symons MCR, Chandra H, Wyatt JL, et al. Electron paramagnetic resonance spectra of irradiated finger-nails: a possible measure of accidental exposure. *Radiat Prot Dosim*, 1995, 58(1): 11-15.
- [10] De Beer EL, Bottone AE, Voest EE. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. *Eur J Pharmacol*, 2001, 415(1): 1-11.
- [11] Commoner B, Ternberg J. Free radicals in surviving tissues. *Proc Natl Acad Sci*, 1961, 47(9): 1374-1384.
- [12] 齐子荣, 吴恩, 孙存普, 等. 顺磁共振(ESR)对高发恶性肿瘤早期诊断研究: I. 能级电子饱和法建立. *波谱学杂志*, 1991, 8(2): 195-202.
- [13] Gornicki A, Gutsze A. Erythrocyte membrane fluidity changes in psoriasis: An EPR study. *J Dermatol Sci*, 2001, 27(1): 27-30.
- [14] Ledoux F, Zhilinskaya EA, Courcot D, et al. EPR investigation of iron in size segregated atmospheric aerosols collected at Dunkerque, Northern France. *Atmos Environ*, 2004, 38(8): 1201-1210.
- [15] 李曦, 葛志强. 电子顺磁共振技术在细胞膜研究中的应用. *细胞生物学杂志*, 2007, 29(3): 365-368.
- [16] 王澍, 孙存普, 丛建波, 等. 自旋标记 ESR 技术研究铁对受照射红细胞膜蛋白的影响. *中华放射医学与防护杂志*, 1995, 15(1): 36-38.
- [17] Kleschyov AL, Wenzel P, Munzel T. Electron paramagnetic resonance(EPR) spin trapping of biological nitric oxide. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 851(1-2): 12-20.

(下转第 115 页)