

活性氧及其生物学作用

莫 简

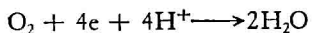
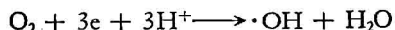
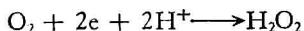
(第四军医大学化学教研室)

许多报道说明,在酶反应、细胞分裂、机体衰老、吞噬杀菌、肿瘤、化学物质中毒、辐射损伤以及环境污染等方面,都可能涉及到活性氧的作用。同时,活性氧在体内的生成与清除,对机体的损害与机体对活性氧的利用,往往又涉及到自由基反应。因此,近年来对于活性氧的研究,已成为自由基化学、分子生物学及其它许多学科颇感兴趣的共同课题。

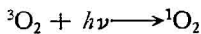
一、活性氧

1. 活性氧的概念

在生物体系中,电子转移是一个最基本的变化,而氧就是一个最重要的电子受体。由于得到的电子个数不同,氧可以形成多种产物,如:



基态的氧分子(通常以 O_2 表示,为了说明其电子自旋多重性为三,写作 $^3\text{O}_2$)可吸收能量而变为激发态的氧分子(因其电子自旋多重性为一,故以 $^1\text{O}_2$ 表示):



另外,氧还能与脂类形成脂质过氧化物。

活性氧就是由氧形成、含氧而且性质活泼的几种物质的总称。其中有两种为自由基,即超氧化物阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)与羟基自由基($\cdot\text{OH}$);有两种为过氧化物,即过氧化氢(H_2O_2)与脂质过氧化物(ROOH);一种为激发态的分子,即单线态分子氧($^1\text{O}_2$)。

本文只对超氧化物阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)和单线态分子氧($^1\text{O}_2$)的结构特点加以说明。

超氧化物阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$),是氧分子进行单电子还原的产物,它既是一个阴离子,又是一个自由基。单线态分子氧($^1\text{O}_2$),是氧分子的一种激发态,它的分子也是由两个氧原子组成,但分子中的电子排布不同于基态的氧分子。

分子轨道	$\cdot\text{O}_2^- \xleftarrow{e} ^3\text{O}_2 \xrightarrow{h\nu} ^1\text{O}_2$		
π^*	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow$
π	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$
σ^*	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$
σ_n	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$
σ	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$

图1 超氧化物阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)、单线态分子氧($^1\text{O}_2$)与基态分子氧($^3\text{O}_2$)的电子排布

“ $\uparrow$ ”表示一个电子,“—”表示一个分子轨道

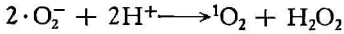
根据洪得原理,电子在同一个亚层中排布时,将尽可能分占各个轨道,而且自旋平行。在由 $^3\text{O}_2$ 变为 $^1\text{O}_2$ 时,使分占两个轨道的两个电子集中到了一个轨道,而且自旋方向相反。因此, $^1\text{O}_2$ 的能量较高,很不稳定。

2. 活性氧的化学性质^[1,2]

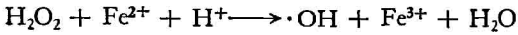
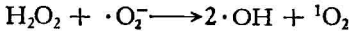
活性氧的性质都很活泼,具有很强的氧化能力;有的还具有还原能力。

$\cdot\text{O}_2^-$ 既可以作氧化剂,又可以作还原剂;同时,还可以发生歧化反应。例如,还原型细胞色素 C、还原型氧还蛋白、还原型谷胱甘肽、半胱氨酸、同型半胱氨酸、抗坏血酸、肾上腺素、儿茶酚、3,4-二羟基苯甲酸、焦性没食子酸、亚硫酸、硫化钠、NADH 及乳酸脱氢酶-NADH 等均可被 $\cdot\text{O}_2^-$ 氧化;氧化型细胞色素 C、对苯醌、过氧化氢复合物 I ($\rightarrow$ 复合物 II)、氮蓝四唑(NBT)、

四硝基甲烷等均可被 $\cdot\text{O}_2^-$ 还原。在发生歧化反应时, 一个 $\cdot\text{O}_2^-$ 失电子, 一个 $\cdot\text{O}_2^-$ 得电子, 结果生成 $^1\text{O}_2$ 与 H_2O_2 :

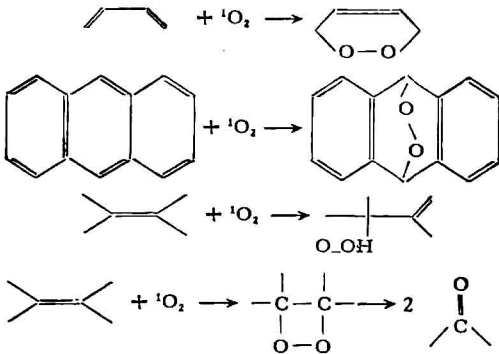


H_2O_2 也是既有氧化能力, 又有还原能力。值得指出的是, H_2O_2 在适当条件下, 还可以生成氢氧自由基 ($\cdot\text{OH}$) 和单线态分子氧 ($^1\text{O}_2$):

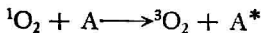


$\cdot\text{OH}$ 是一个氧化能力很强的自由基。例如, KMnO_4 、 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 等强氧化剂都不能使苯氧化, 而 $\cdot\text{OH}$ 则使其氧化为苯酚。 $\cdot\text{OH}$ 还可以破坏体内的碳水化合物、氨基酸、蛋白质、核酸等。

$^1\text{O}_2$ 是一个亲电子性很强的氧化剂。至今已知的反应, 几乎都是对 π 电子的反应。不饱和和键上的电子密度愈大, $^1\text{O}_2$ 就愈易与它发生反应。 $^1\text{O}_2$ 与二烯烃、芳香烃反应, 可以生成内过氧化物; 与烯反应, 可以生成氢过氧化物和二氧烷。例如:



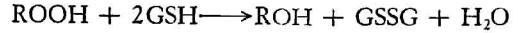
另外, $^1\text{O}_2$ 还可将能量转移给其它物质而变为 $^3\text{O}_2$:



在这个过程中, 作为 $^1\text{O}_2$ 淬灭剂的物质 (A), 接受能量变为激发态 (A^*), 然后, 以热等形式放出其能量而回到基态 (A)。在体内, 能充当 $^1\text{O}_2$ 淬灭剂的物质很多, 水就是其中最重要的一个, 另一个就是类胡萝卜素

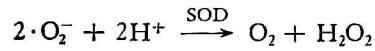
脂质过氧化物 (ROOH 或 ROOR') 的性质也很活泼, 易分解产生自由基 ($\text{RO}\cdot$ 或

$\text{ROO}\cdot$), 并引起自由基反应。它也具有氧化能力。例如脂质过氧化物 (ROOH) 可使还原型谷胱甘肽被氧化, 而本身则变为不易再引起自由基连锁反应的羟基化合物 (ROH):



3. 活性氧的检测

(1) 超氧化物阴离子自由基 ($\cdot\text{O}_2^-$) 的检测 最直接的方法是利用电子自旋共振 (ESR) 法, 但需要较高浓度和低温。如利用超氧化物歧化酶 (即 SOD) 检测 $\cdot\text{O}_2^-$, 既简便, 又有特异性, 因为 SOD 仅能促进 $\cdot\text{O}_2^-$ 的歧化反应^[2]。

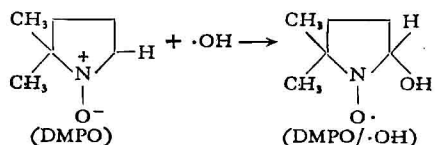


另外, 利用 $\cdot\text{O}_2^-$ 与四硝基甲烷、氮蓝四唑、细胞色素 C、肾上腺素、还原型辅酶 I 等的反应, 也可作 $\cdot\text{O}_2^-$ 的定量测定。如肾上腺素在 $\cdot\text{O}_2^-$ 的作用下, 可变为肾上腺素红, 这可用分光光度计进行测定, 鉴于上述几种物质与其它氧化剂也能发生相类似的反应, 因此, 为确定由 $\cdot\text{O}_2^-$ 的作用引起的反应, 在使用这些试剂的同时, 还应应用 SOD 进行验证。

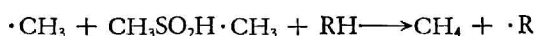
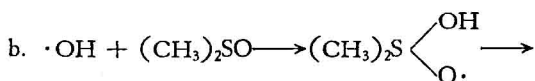
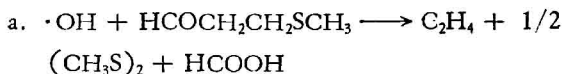
(2) 过氧化氢 (H_2O_2) 的检测 利用过氧化氢酶检出 H_2O_2 , 是一个很简便而又特异的方法, 因为这个酶仅能促进 H_2O_2 的分解。

测定过氧化氢的经典方法为碘滴定并加入过氧化氢酶。最近, 多采用荧光法, 能检出 10^{-9} — 10^{-10}M 的 H_2O_2 。此法均系在过氧化氢酶存在下, 测定钩吻荧光素或同型香草酸的氧化产物。来求 H_2O_2 的含量。

(3) 氢氧自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的检测 $\cdot\text{OH}$ 在水中的寿命很短, 除放射化学领域外, 一般不易用电子自旋共振 (ESR) 法检出。最近有人利用 DMPO (5, 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) 作自旋捕获, 成功地检出了多形核白细胞产生的 $\cdot\text{OH}$ 。DMPO 与 $\cdot\text{OH}$ 能形成一个较稳定的加合物 ($\text{DMPO}/\cdot\text{OH}$)^[3]:



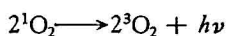
·OH 与甲硫基丙醛反应产生乙烯,与二甲基亚砷反应产生甲烷,因此,将甲硫基丙醛或二甲基亚砷加入一个反应体系,并用气相色谱检测所产生的乙烯或甲烷,也可确定一个反应体系中有无·OH产生^[7,8]



观察一个反应是否受·OH清除剂的抑制,是一个判别有无·OH参与反应的最简便的方法。最常用的·OH清除剂有苯甲酸盐、甘露醇、硫脲、色氨酸及二甲基亚砷等。

(4) 单线态分子氧(¹O₂)的检测 ¹O₂在水中的寿命很短,因此,要检测出它比其它活性氧都难。

最直接的检出方法是观察¹O₂→³O₂+hν的化学发光。¹O₂的单分子发光,波长为1.269nm及760nm,这在观察上有很大困难。¹O₂的两个分子产生一个光子的发光,在可见区域(主要为634nm)。



这在生物体系中进行检测,也比较困难。不过,最近还是有人利用此反应,以光子计数器成功地检出了微粒体中产生的¹O₂。

利用蒽、鲁米拉尔、荧光素等物质受¹O₂激发后的发光现象,也可以检查¹O₂。但这不是¹O₂的特性反应,仅由此还不能肯定有¹O₂生成。

一个反应如能被¹O₂的淬灭剂抑制,则说明该反应中可能有¹O₂参与。¹O₂的重要淬灭剂有:四甲基乙烯(TME)、2,5-二甲基咪唑(DMF)、9,10-二苯基蒽(DPA)。此外,最常用的是类胡萝卜素。

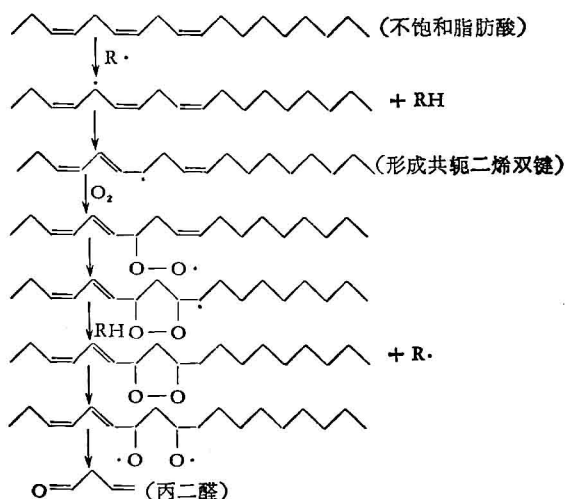
¹O₂的寿命在D₂O中比在H₂O中较长。利用这一特性,结合其它方法,可以确定一个反应中有无¹O₂产生。

(5) 脂质过氧化物(ROOH)的检测 检测脂质过氧化物的形成,硫代巴比妥酸(TBA)

法,是最常用的简便方法。因为伴随脂质过氧化物的形成可以产生丙二醛,它与硫代巴比妥酸反应能形成有色化合物,据此可进行比色测定。

此外,另一个比较灵敏的方法,为测定其抽提物在232nm的吸光度的增加。因为形成脂质过氧化物时,在不饱和脂肪酸的碳链上可发生共轭二烯双键的重排。此共轭二烯在232nm呈现最大吸收。

不饱和脂肪酸通过自由基反应,形成共轭二烯双键及产生丙二醛的反应,可表示如下:



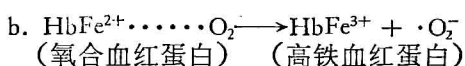
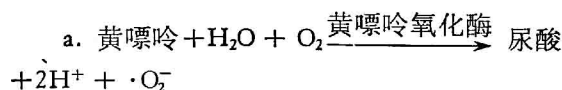
此外,用气相色谱检测动物呼出气中的乙烷,也可以作为判定有无脂质过氧化反应发生的方法。

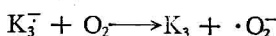
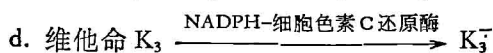
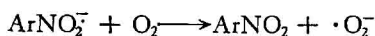
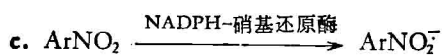
二、生物体内的活性氧

活性氧在体内,不断在生成,同时又不断被清除;既有损伤作用,也有积极作用。

1. 活性氧在体内的生成^[2,6]

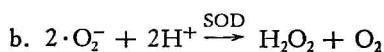
(1) 超氧化物阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$) 在一些氧化酶的反应中,以及一些蛋白质和低分子化合物自动氧化时,可由O₂生成,如:



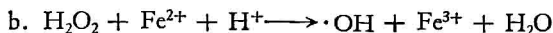
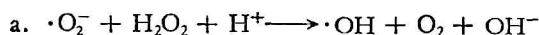


[注: 在 ArNO_2^- 及 K_3^- 中的 $(-)$, 表示该物质既带一个负电荷, 又具有一个未偶合的电子; 即既是阴离子, 又是自由基。如 $\cdot\text{O}_2^-$ 亦可写为 O_2^-]

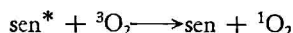
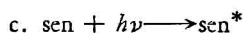
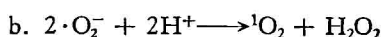
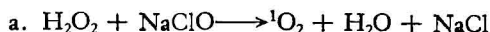
(2) 过氧化氢 (H_2O_2) 既可由 O_2 直接生成, 或由 O_2 先变为 $\cdot\text{O}_2^-$, 再由 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成, 如:



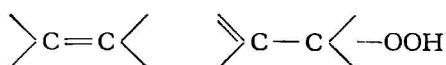
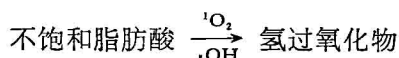
(3) 氢氧自由基 ($\cdot\text{OH}$) 似可看作 O_2 获得三个电子的反应产物。但是, 在体内由 O_2 直接变为 $\cdot\text{OH}$ 的反应尚未见到, 而间接地由 O_2 生成 $\cdot\text{OH}$ 则是可能的:



(4) 单线态分子氧 ($^1\text{O}_2$) 可以由 $\cdot\text{O}_2^-$ 与 H_2O_2 的反应生成; 在光线 ($h\nu$) 和光增敏剂 (sen) 的作用下, 也可由 O_2 直接生成, 如:

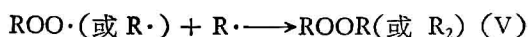
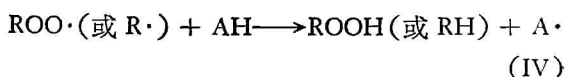
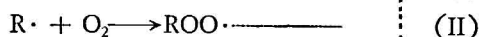
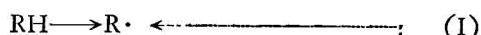


(5) 脂质过氧化物 (ROOH)。不饱和脂肪酸可被 $^1\text{O}_2$ 或 $\cdot\text{OH}$ 氧化。脂类自动氧化的机制大体如下:



氧化自由基
连锁反应
醛、醇
酮等等

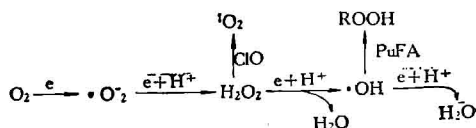
脂质过氧化反应, 也可以表示如下:



在反应 I 中, 不饱和脂肪酸 (RH) 在自由基引发剂存在下, 去氢形成自由基 ($\text{R} \cdot$)。此自由基与 O_2 作用产生脂肪酸过氧自由基 ($\text{ROO} \cdot$) (II)。过氧自由基与另一不饱和脂肪酸 (RH) 反应, 形成半稳定的氢过氧化物 (ROOH), 并同时产生一个新自由基 ($\text{R} \cdot$) (III)。除非自由基被抗氧化剂 (AH) 清除或自身熄灭 (V), 反应 III 与 I 将循环进行。

另外, 机体在受到放射线、紫外线、超声波等物理因素的作用时, 亦可产生活性氧。

在体内, $\cdot\text{O}_2^-$ 是一个非常重要的自由基, 因为 $\cdot\text{O}_2^-$ 是氧进行单电子还原时首先生成的产物, 由它可以再生成 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $^1\text{O}_2$ 、 ROOH 等其他活性氧, 如:

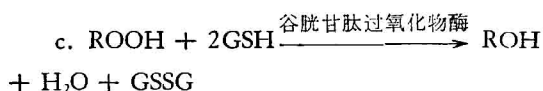
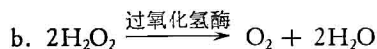
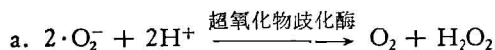


注: 1. PUFA 为多不饱和脂肪酸

2. 已知在髓过氧化物酶作用下由 Cl^- 与 H_2O_2 可生成 ClO_2^-

2. 活性氧在体内的清除^[2,5,6]

(1) 超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等, 可分别使 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 H_2O_2 、 ROOH 转变为活性较低的物质, 而使机体受到保护。

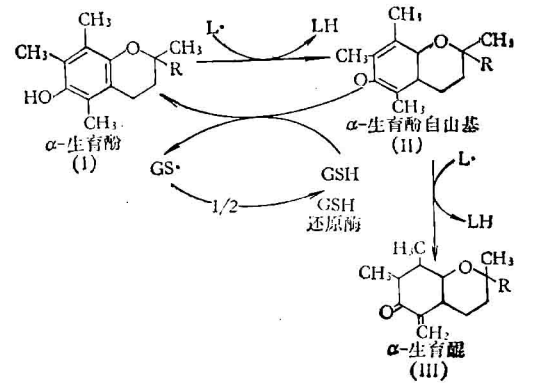


(2) 有些低分子化合物能与活性氧反应, 不仅不给机体带来任何损伤, 还可使机体受到保护。亦可作为活性氧清除剂。这类化合物有: 维生素 E、维生素 C、还原型谷胱甘肽, 类胡萝卜素等。此外, 还有微量元素硒等物质。

细胞膜含有较多不饱和脂肪酸残基, 膜的两侧又含有氧及微量元素, 因此, 质膜比细胞浆

更易受到自由基脂质过氧化的损害；而硒与维生素 E 则可通过清除活性氧而使细胞膜亚细胞器膜受到保护。实验证明，饮食性硒及维生素 E 可抑制组织匀浆中脂质的过氧化作用及一些组织的线粒体和微粒体制品中的过氧化作用。

维生素 E 具有脂溶性，并存在于细胞膜中，因此，对于自由基和脂质过氧化物，是一个很重要的清除剂。已知在阻止红细胞膜的脂质过氧化反应中，生育酚(维生素 E)可变为生育醌。维生素 E 清除自由基的过程大致如下：

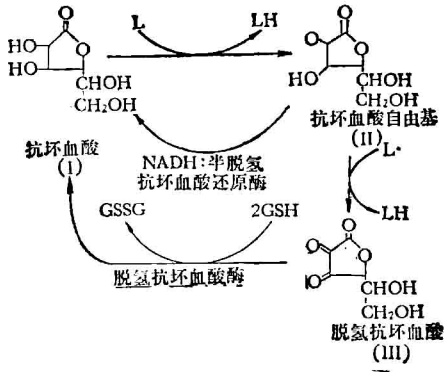


在这个反应中，生育酚(I)先将一个氢原子给与自由基($L\cdot$)使之变为分子(LH)，同时，生育酚变为一个自由基中间物(II)；此自由基(II)再将一个氢原子给与另外一个自由基($L\cdot$)使之又变为分子(LH)，同时，生育酚的自由基(II)则变为生育醌(III)。因此，在这个过程中，一个生育酚分子可以清除两个自由基。另外，生育酚的自由基(II)又可被巯基化合物还原，尤其是能被谷胱甘肽(GSH)再还原为生育酚。这样，则可使生育酚更有效地发挥其作用。

维生素 C 在一些组织中，对于自由基的损伤可起胞细外的初步防御作用。酶的防御作用，如超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶，往往仅限于细胞内，而维生素 C 则可在细胞外发挥其作用。例如，在大鼠的肺组织中，约有 50% 抗坏血酸存在于呼吸上皮的衬里中。在坏血病豚鼠中，仍可保持其肺组织中细胞外的抗坏血酸库，细胞外抗坏血酸的百分比，甚至从 57% 上升至 78%；虽然肺中抗坏血酸总的有所减少，但在呼吸衬里中却存在着相当大部分的肺

抗坏血酸。

维生素 C 清除自由基的机制可能如下：



3. 活性氧对机体的损害^[2-5,10]

活性氧对机体的损害，主要有：(1)与酶的巯基或色氨酸残基反应，导致酶的失活；(2)氧化与构成细胞膜有关的脂肪酸，导致细胞膜被破坏；(3)破坏核酸的结构，攻击其嘌呤碱和嘧啶碱，导致变异的出现和蓄积。由于这些损伤作用，可造成炎症、肿瘤、衰老、血液病、以及心、肝、肺、皮肤等方面的病变。

例如，在吞噬细菌或受到适当刺激时，白细胞可释放出大量的 $\cdot O_2^-$ ，并能由此而生成 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 及 1O_2 。这些活性氧的释放，既可消灭细菌等异物，亦可对细胞和组织造成损害。体外实验表明，将大肠杆菌与多形核白细胞一同温育，可给白细胞本身也造成早死；如果加入 SOD，则可使白细胞受到保护而减少死亡。这就有力地说明，白细胞的早死与 $\cdot O_2^-$ 的作用有关系。给大鼠注入致炎剂角又菜胶造成其足水肿时，给以 SOD 可以完全抑制其前列腺素期的肿胀。这说明，致炎过程中，前列腺素肿胀与 $\cdot O_2^-$ 的作用有关，而且 $\cdot O_2^-$ 的作用可能与前列腺素的合成有关。另外，在炎症的发展中，多形核白细胞可在炎症部位聚集，并释放出许多蛋白酶，如弹性蛋白酶和胶原酶，这些蛋白酶可使完整的组织和基膜发生降解。同时，在循环和组织液中，存在着一个抗蛋白酶系统，可以使炎症细胞释放出的蛋白酶的失活。 α_1 -蛋白酶抑制剂就是这个系统中的一个重要成分。现在认为，被释放的蛋白酶与组织抗蛋白酶的局部平衡，对于

能否由炎症引起完整组织的损伤,具有关键性的作用,最近有实验表明,在炎症中, α_1 -蛋白酶抑制剂的失活,可能涉及到 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 H_2O_2 等活性氧的作用。对于风湿样关节炎,有人认为与 $\cdot\text{OH}$ 攻击关节滑液,使之发生解聚或降解,失去了粘性,从而丧失了其润滑剂的作用有关。

又如,氧、臭氧、二氧化氮对肺的损伤,酒精、四氯化碳对肝的损伤,抗癌药中的阿拉霉素对心脏的损伤,都涉及活性氧的作用和脂质过氧化反应。

3. 机体对活性氧的利用^[8,11,13]

活性氧在体内的积极作用,至少有以下几个方面:

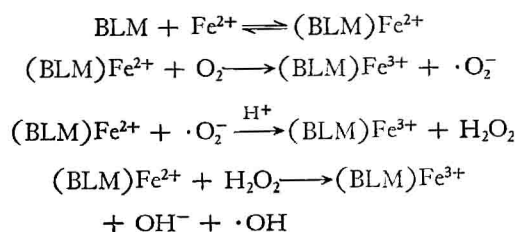
(1) 有些重要物质的生物合成需要活性氧参加。早已有研究表明,在大鼠肝微粒体中, H_2O_2 的产生与能量保存有关,而 H_2O_2 的产生又与 $\cdot\text{O}_2^-$ 有关。因此ATP的产生也可能与 $\cdot\text{O}_2^-$ 有关。关于前列腺素的生物合成,最近已有实验表明,将牛泡状腺或绵羊泡状腺的微粒体与含有甲硫基丙醛和5、8、11、14-花生四烯酸的体系一同温育,并用气相色谱检测,发现有大量的乙烯生成。这有力地说明,在牛和绵羊泡状腺的微粒体中,由花生四烯酸合成前列腺素时,有 $\cdot\text{OH}$ 产生。

(2) 活性氧在机体的防御体系中,具有重要作用。实验表明,嗜中性白细胞可利用 $\cdot\text{O}_2^-$ 等杀死细菌;嗜酸性白细胞也能释放出 $\cdot\text{O}_2^-$,以杀伤不能被吞噬的寄生虫。而且据推想,巨噬细胞可能利用 $\cdot\text{O}_2^-$ 杀死肿瘤细胞。

例如,将人的白细胞与大肠杆菌一同温育,可使大肠杆菌被杀死。如温育时加入超氧化物歧化酶清除 $\cdot\text{O}_2^-$,过氧化氢酶清除 H_2O_2 或甘露醇清除 $\cdot\text{OH}$,均可使细菌受到保护而减少死亡。

(3) 在体内解毒中,也需要有活性氧参加。许多脂溶性药物或毒物,在单加氧酶系统的作用下,可通过羟化等反应,变为极性衍生物,从而易于从胆汁和尿中排泄,消除其毒性。一些研究说明,在加氧酶作用下基质的氧化,有些就要以 $\cdot\text{O}_2^-$ 作为基质或中间物。例如,细胞色素

P450就可能是通过产生 $\cdot\text{O}_2^-$ 而起作用。在吡啶胺-2,3-双加氧酶、2-硝基丙烷加氧酶、m-羟基苯甲酸-4-羟化酶、多巴胺- β -羟化酶等作用下的羟化反应,均可因加入SOD而受到抑制。对于吡啶胺-2,3-双加氧酶,并已证明其有关的活性氧为 $\cdot\text{O}_2^-$,而不是 $^1\text{O}_2$ 和 $\cdot\text{OH}$ 。另方面,有些药物则是通过产生活性氧而起治疗作用。在体外实验中,有 Fe^{2+} 存在时,博来霉素(BLM)可给DNA造成显著的破坏,但这种活性可因加入超氧化物歧化酶和过氧化氢酶或异丙醇而减小。说明,博来霉素(BLM)的抗癌作用可能与产生 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 H_2O_2 及 $\cdot\text{OH}$ 等有关。有人认为其作用机制如下:



看来,活性氧在体内的生成与清除处于平衡状态,对于生物体的正常生活是十分必要的。许多疾病的发生都可能与此平衡被破坏有关,因此,大力开展关于活性氧在生物体系中作用的研究,是很有意义的。例如,关于我国东北等地流行的克山病,就可能是由于活性氧的生成与清除失调而导致心肌损害等病变。有资料表明,克山病可能与缺硒有关;患者血铜含量低。我认为,很可能是由于水土中缺乏硒、铜等微量元素而引起人体内谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶等活性降低,这在通常条件下或许还能清除有关的活性氧,不会出现病变;但是,在较多的可产生活性氧的物质进入人体后,其清除能力就感到不够,使体内的活性氧过多,于是引起心肌损害等病变;应用大剂量维生素C可降低急性克山病人的死亡率,也许也是与其能清除活性氧有关,因为维生素是一个很重要的活性氧清除剂。当然,这还只是一个假设,但它对有关的大量资料都能给以一个较好的解释,对进一步的研究提出一个值得探讨的问题,同时还可使营养学说和中毒学说统一起来。此外,

我认为,除肿瘤、炎症、衰老、放射病外,还有许多重要生命现象都值得从活性氧的作用方面来进行研究。

参 考 文 献

[1] 诸岡良彦:呼吸と循環, 24(9), 765—770, 1976.
[2] 浅田浩二:生化学, 48(4), 226—237, 1976.
[3] Jeffrey Bland: *J. Chem. Educ.*, 53(5), 274—279, 1976.
[4] Jeffrey Bland: *J. Chem. Educ.*, 55(3), 151—157, 1978.
[5] Турков: М. И. Успехи современной Биологии, 81 (3), 341—354, 1976.
[6] 浅田浩二:蛋白质核酸酵素, 23, (3), 200—213,

1978.
[7] Beauchamp C. and Fridorich I.: *J. Biol. Chem.*, 245(18), 4641—4646, 1970.
[8] Repine, J. E. et al.: *J. Clin. Invest.*, 64(6), 1642—1651, 1979.
[9] Rosen, H. and Klebanoff S. J.: *J. Clin. Invest.*, 64(6), 1725—1727, 1979.
[10] 八木国夫等:最新医学, 33(4), 653—740, 1978.
[11] Pain, A. J.: *Biochem. Pharm.*, 27, 1805—1813, 1978.
[12] Yoshihiko Ōyanaqui: *Biochem. Pharm.*, 27, 771—782, 1978.
[13] Panqanamala, Rao V. et al.: *Prostaglandins*, 17 (2), 155, 1979.

[本文于1980年6月5日收到]

冰冻断裂和冰冻刻蚀技术

鲁崎晤 吴玉薇 傅广礼

(中国科学院生物物理所电镜组)

一、技术特点及发展概况

冰冻断裂和冰冻刻蚀*统称为冰冻复型技术,是电子显微镜常规样品制备技术之一。所谓冰冻断裂就是将生物样品快速冰冻后施一外力,使其发生断裂,再于低温下,在样品的断裂面上制成复型,用透射电镜观察;如果样品断裂后,先使其断裂面上的冰部分升华,再制成复型作电镜观察,这就是冰冻刻蚀。

在冰冻复型技术中,由于无须象超薄切片技术那样对样品作剧烈的化学固定、脱水、渗透,包埋以及染色等处理,因此,它所提供的生物超微结构图象可以更接近于活体时的状态;更重要的是,能够直观地揭示出生物膜平面的内部结构,从而为生物膜的研究提供新信息。

电镜冰冻复型技术早在五十年代初期已经出现;1957年被首次成功地应用于生物材料的研究中,1961年第一台商品冰冻刻蚀仪问世。但是,这项技术在一段较长时期内并未引起生物学家们的足够重视。直到六十年代中期以后,在一场有关冰冻复型结果解释的争论中,搞清

了生物膜结构的冰冻断裂机制,这才使得生物学家们认识到这项技术的独特作用。同时,由于双复型技术^[1]的出现以及电子束投影、旋转投影、放射自显影、立体对电镜术、超高真空等技术在冰冻复型技术中的应用,而使得该项技术更趋完善。

二、原理和方法

冰冻复型技术包括样品的冰冻、断裂、刻蚀、复型制备和清洗几个步骤(图1)。

1. 生物样品的冰冻

冰冻,即将小量生物样品骤然浸入一种液态冷冻介质中使之固定。样品冰冻固定的好坏是整个技术成败的关键。理想的冰冻固定标准应该是样品中的水分不生成冰晶,而达到所谓“玻璃化”状态。但实际上完全的“玻璃化”几乎是不可能的。从形态学角度来讲,只要冰冻时样品中形成的冰晶小到不足以干扰对样品超微结构的观察即可。一些作者认为,要达到上述目的,

* Freeze-etching 亦译作冰冻蚀刻或冷冻蚀刻。