

四、结 语

β 地贫的分子缺陷多种多样,不同种族甚至同一种族不同个体,情况都可能有异。因此研究这些分子缺陷有助于在分子水平上阐明 β 地贫异质性的发生机制。当然,在研究 β 地贫的分子缺陷时要注意与多态性酶切位点和多态性核苷酸位点相区别,并应对含有分子缺陷的基因进行功能测定。

β 地贫(除 Ferrara β^0 外)的分子缺陷实质上是基因缺陷,它们造成 β 链合成减少或完全缺乏,而使 α 链相对过剩。值得一提的是 HPFH 患者虽然全部缺失 β 基因,但 γ 珠蛋白基因却持续表达,使 γ 链与过剩的 α 链结合成血红蛋白,补偿了 β 链的缺乏,所以此类地贫并无临床症状。在这一临床现象的启发下,最近一、二年来人们试图通过基因操纵的办法,使 β 地贫的 γ 珠蛋白基因开放表达而达到治疗目的。如所周知,基因序列一旦被甲基化就会处于不表达状态,反之亦然。人们发现 5-氮杂胞嘧啶核苷(5-a3-acytidine)能使 β 地贫患者不表达的 γ 基因去甲基化,从而表达出 γ 珠蛋白,它们能与过剩的 α 链结合并使病情减轻。这一研究成果已在 1982 年底发表,并且被认为是人的基因工程的一个重要进展。

现在虽然已经知道 β 地贫的许多分子缺陷,但随着研究工作的不断深入,必将还会发现

新的分子缺陷,特别是旁侧序列的缺陷与 β 基因的表达调控的关系更有待积累更多的资料,它对于了解基因表达的调控机理无疑是很有意义的。

参 考 文 献

- [1] Lawn, R. M. et al.: *Cell*, **21**, 647, 1980.
- [2] Nieuhuis, A. W. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 3960, 1977.
- [3] Maquat, L. E. et al.: *ibid*, **77**, 4287, 1980.
- [4] Kantor, J. A. et al.: *Cell*, **21**, 149, 1980.
- [5] Westaway, D. and Williamson, R.: *Nucleic Acid Res.*, **9**, 1777, 1981.
- [6] Spritz, R. A. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **78**, 2455, 1981.
- [7] Busslinger, M. et al.: *Cell*, **27**, 289, 1981.
- [8] Poncz, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 5994, 1982.
- [9] Orkin, S. H. et al.: *Nature*, **296**, 627, 1982.
- [10] Comi, P. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **79**, 617, 1977.
- [11] Conconi, F. et al.: *Nature New Biol.*, **238**, 83, 1972.
- [12] Old, J. M. et al.: *Cell*, **14**, 289, 1978.
- [13] Temple, G. F. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **74**, 3047, 1977.
- [14] Trecartin, R. F. et al.: *J. Clin. Invest.*, **68**, 1012, 1981.
- [15] Orkin, S. H. and Goff, S. L.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 9782, 1981.
- [16] Moschonas, N. et al.: *Nucleic Acid Res.*, **9**, 4391, 1981.
- [17] Gorski, J. et al.: *J. Mol. Biol.*, **154**, 537, 1982.
- [18] Baird, M. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 4218, 1981.
- [19] Orkin, S. H. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 2400, 1979.

[本文于1983年7月20日收到]

自由基在抗癌中的作用

莫 筒

(第四军医大学化学教研室,西安)

关于自由基与肿瘤的关系,早期的研究,注意力集中于自由基在致癌方面的作用。近年来,有些研究发现,自由基也有抗癌作用。这方面的资料虽然不多,但值得注意。本文将近几年这方面的研究发展向读者做一介绍。

一、自由基在肿瘤放射治疗中的作用

放射线对机体的作用,通常是通过两种方式:(1)直接作用,即射线直接作用于生物分子的损伤效应;(2)间接作用,即射线作用于体内

的水分子,使之分解而产生自由基,然后,这些自由基对生物分子产生损伤效应。

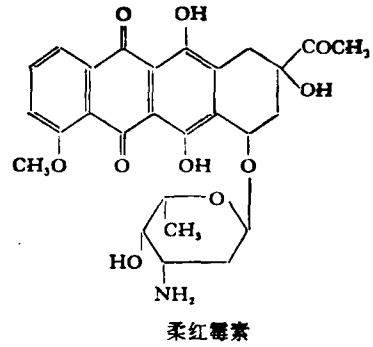
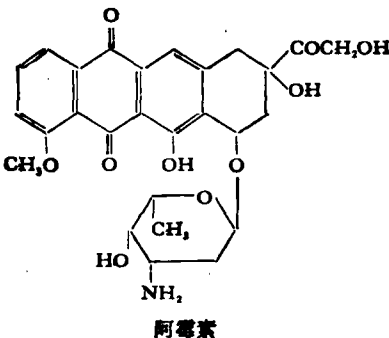
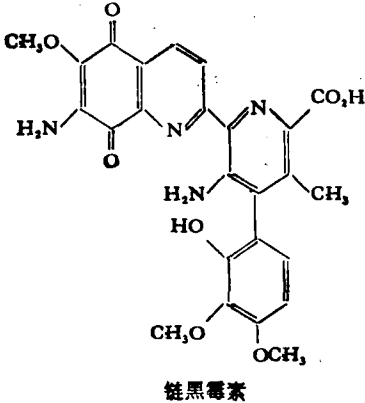
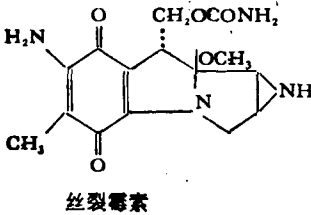
一般说,间接作用更为重要。因为水在体内的含量很多,而且其辐射分解产生的 $\cdot\text{OH}$ 等自由基又非常活泼,很易与生物分子发生反应。体外实验表明,电离辐射引起的DNA的损伤,90%是由于 $\cdot\text{OH}$ 的作用^[2]。

肿瘤的放射治疗也是利用电离辐射,破坏癌细胞中的生物分子。因此,放射治疗也涉及 $\cdot\text{OH}$ 等自由基的作用。

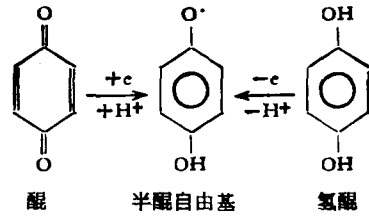
二、自由基在肿瘤化疗中的作用

在常用的抗癌药中,有人从自由基反应探讨其作用机制。例如,丝裂霉素、链黑霉素、阿霉素、柔红霉素等等。

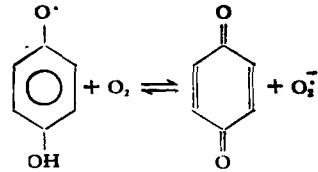
这些抗癌药的共同特点是,都含有醌式结



构。在酶的作用下,醌可被还原为半醌自由基;氢醌被氧化,亦可生成半醌自由基。



另外,半醌自由基与氧反应,又可生成超氧化物阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)。



含醌式结构抗癌药的作用,可能与其在体内生成半醌型自由基及促进超氧化物阴离子自由基的生成有关。

例如,将链黑霉素加入到含大肠杆菌(*E. coli*)的代谢混悬液中,可检出其半醌型自由基。在有氧的条件下,链黑霉素对大肠杆菌的作用较强,当大肠杆菌中的超氧化物歧化酶的活性较高时,链黑霉素就不太起作用。这就表明,链黑霉素的作用可能与其形成半醌型自由基,促进超氧化物阴离子自由基的生成有关系^[7]。

体外实验表明,阿霉素、柔红霉素、链黑霉素等抗癌药均可使电子从NADPH转移至 O_2 的反应增强,而这个反应又可被微粒体的蛋白质促进;在这个反应过程中,这些药物可以形成自由基。另外,从大鼠的肝、心、肺、脾及小鼠

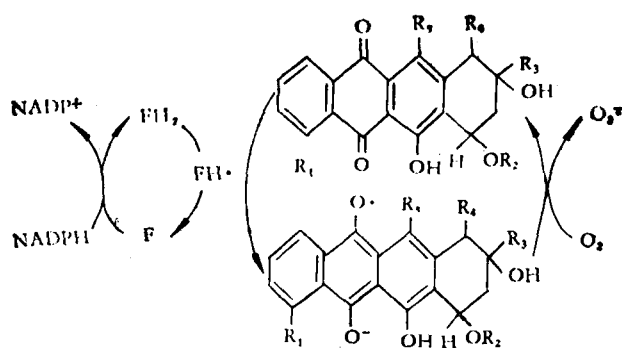


图 1 由蕈蕈系催化而产生超氧化物阴离子自由基的机制

L₁₂₁₀、P₃₈₈ 肿瘤得到的线粒体,均可促进被这些抗癌药增强的氧消耗。因此,研究者认为,这些药物的抗癌作用可能与其在细胞内被激活而产生自由基有关^[4]。进一步的研究表明,在有阿霉素、柔红霉素、丝裂霉素、链黑霉素和 NADPH 的条件下,从大鼠的肝、心、肾得到的细胞核亦可使其氧消耗增加,而且在药物的代谢过程中,亦可检出阿霉素和柔红霉素的自由基。因此,在可以导致细胞核 DNA 损伤的位置,这些药物可被激活成为自由基,因而起到抗癌作用^[3]。

体外实验证明,链黑霉素可使 DNA 降解,而这个作用既可被超氧化物歧化酶抑制,又可被过氧化氢酶抑制。因 O₂⁻ 与 H₂O₂ 反应产

生 ·OH, ·OH 又易破坏 DNA; 所以链黑霉素引起 DNA 降解,可通过产生 ·OH 而起作用^[5]。

Bachur^[3] 根据已有的事实,对醌型抗癌药在细胞中的代谢,曾提出如下的假设:药物通过细胞膜,进入细胞内,然后,一条途径是直接进入细胞核,被细胞核内的基质中黄素蛋白还原,生成半醌型自由基中间物,此自由基中间物可与 DNA 直接反应;另一途径是药物的自由基与氧反应,使形成超氧化物阴离子自由基,再由此生成氢氧自由基,这些自由基亦可损伤 DNA 或其它的细胞核结构。

最近,Low 等对 Safaromycin 引起 DNA 单链断裂的机制,提出了如下假设:

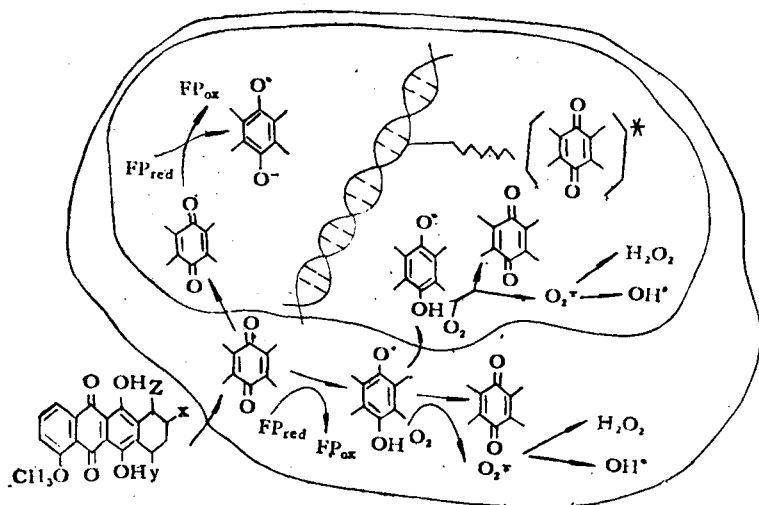
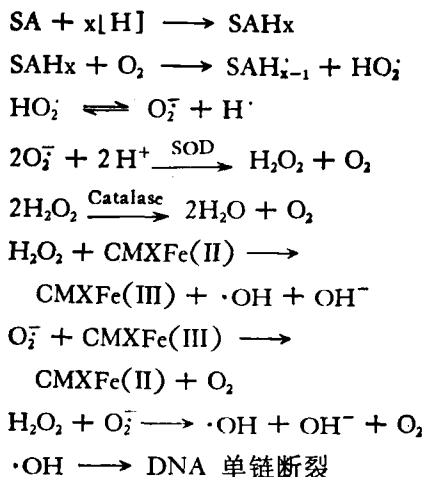


图 2 含醌式结构药物在细胞内反应的可能途径^[3] FP_{red}: 还原型黄素蛋白; FP_{ox}: 氧化型黄素蛋白



式中 SA: Safaramycin, SAH_x: 醌环还原型 Safaramycin, SAH_{x-1}: Safaramycin 半醌型自由基, CMXFe(II): 铁与蛋白质或 ATP 形成的络合物。按照这个机制, Safaramycin 可通过一系列反应使 O₂ 变为 ·OH; 然后, 通过 ·OH 的作用, 使 DNA 发生单链断裂。

博来霉素的抗癌作用与其能使 DNA 断链有关, 也涉及自由基的作用。实验表明, 加入超氧化物歧化酶 (SOD), 可以抑制由博来霉素引起的 DNA 断链。因此, 有人认为 SOD 的作用是清除了 O₂^{·-}, 因而 DNA 断链被抑制。但是, 最近有研究表明, 由于 SOD 与 DNA 形成了稳定的复合物, 从而阻止了博来霉素与 DNA 的相互作用^[6]。

最近, Scheulen 等^[17]认为, Fe(III)-博来霉素在 NADPH 细胞色素 P₄₅₀ 的作用下, 可发生如下的氧化还原循环 (图 3)。

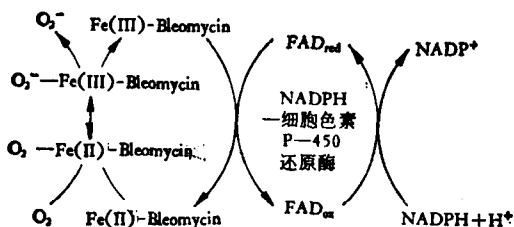


图 3

对于直接利用自由基抗癌, 人们也进行了一些研究。

有人合成了 [4] 位被取代的四甲基哌啶氧化物类的稳定自由基, 并将它注射到移植的白

血病小鼠中。据称有抗白血病的活力, 活性的大小与剂量有关。这些资料直接支持某些自由基有抗肿瘤活力的看法。最近, 有人又将抗癌药噻替派制成具有顺磁性的衍生物, 并研究其抗癌作用与毒性。结果表明, 它的抗癌活性大于母体化合物, 而毒性较小。另外, 替派的含氮氧基的衍生物, 亦具有比替派较强的活性^[10]。

Gelvinoxyl 是一种长效自由基, 也是一种高效的自由基捕获剂。动物实验表明, 经其处理的腹水型肝癌细胞再移植到体内, 其抑瘤率可达 43%; S-180 和肝癌皮下接种后第六天, 向癌内注射其溶液, 隔四天再注射一次, 对 S-180 的抑瘤率为 51.3%, 对肝癌的抑瘤率为 39%。另外, 2,3-二苯基-2,3-二氰基丁二酸二乙酯及其各种异构体的混合物是一类新型的自由基反应引发剂, 可通过使 C—C 键断裂而产生短效自由基。经用它们处理的肝癌细胞再移植到动物体内, 其抑制率分别为 30% 和 6.2%; 在 S-180 和肝癌皮下接种后注射它们的溶液, 对 S-180 的抑制率分别为 46.8% 和 15.6%, 对于肺癌的抑制率分别为 37% 和 13%^[18]。

三、自由基在抗肿瘤的宿主防御体系中的作用

机体对恶性肿瘤也具有防御体系, 其中有些是针对已经癌变的细胞起遏制作用, 有些可防止或抑制癌变的发生, 起监视作用。已知, 体内可通过 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、K 细胞、巨噬细胞、多形核白细胞及天然杀伤细胞等的作用, 把肿瘤细胞杀死。

人的多形核白细胞在体外可杀死哺乳动物的肿瘤细胞; 给肿瘤病人局部静脉注入浓缩的白细胞, 亦可使病情好转。已有一些实验表明, 多形核白细胞对肿瘤细胞的杀伤, 也涉及 O₂^{·-} 的作用。例如, 在抗体和肿瘤细胞共同存在时, 多形核白细胞可被激活, 它释放出的 O₂^{·-} 显著增多, 可以杀死肿瘤细胞^[6]。研究者认为, 这个过程可能是: 特异性的 IgG 结合到肿瘤细胞, 多形核白细胞通过 IgG 的 Fc 区结合到肿瘤细胞; 然后, 通过一系列尚未弄清楚的反应, 激活

浆膜外侧的氧化酶。被激活的氧化酶可通过将电子从细胞内的 NADPH 经过细胞膜向外转移,使细胞外产生 O_2^- ,被产生的 O_2^- 可歧化为 H_2O_2 与 1O_2 , O_2^- 再与 H_2O_2 反应,生成 $\cdot OH$; 由于这些自由基和其它活性氧的作用,引起脂质过氧化和蛋白质变性,从而使生物膜破坏,并引起癌细胞崩解。

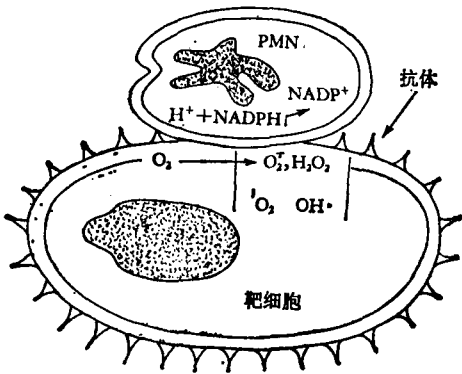


图 4 由多形核白细胞引起的与抗体有关的癌细胞崩解的假设机制^[1]

巨噬细胞在抗癌中具有很重要的作用,它可通过吞噬、抑制癌细胞的生长和细胞溶解等方式杀伤癌细胞。已有一些实验表明,在巨噬细胞杀伤癌细胞的过程中,可能涉及自由基的作用。

例如,尽管在肿瘤中有大量巨噬细胞浸润,却往往不能使肿瘤被抑制,但当卡介苗与肿瘤细胞接触后,即使是免疫抑制的动物,其巨噬细胞也能侵入肿瘤组织,并且有效地杀死肿瘤细胞。体外实验表明,给动物注射卡介苗后,其巨噬细胞受到酵母聚糖、PMA 等的刺激时,大量释放 O_2^- ,而且显著高于未注射卡介苗者^[16]。由此推想,卡介苗可能是通过提高巨噬细胞释放 O_2^- 的能力而起作用。但是,直接作用于癌细胞的不一定是 O_2^- ,因为 O_2^- 可以进一步反应而生成 H_2O_2 及 $\cdot OH$ 。已有实验表明,巨噬细胞杀伤癌细胞可涉及 H_2O_2 的作用。如被激活的巨噬细胞受到 PMA 的作用时则可使癌细胞崩解,当以过氧化氢酶清除了 H_2O_2 ,或加入可与 O_2^- 反应的细胞色素 C,其崩解作用消失。另外,被抗肿瘤抗体——肿瘤细胞复合物激活后,

巨噬细胞亦可释放出 H_2O_2 ,并能杀伤肿瘤细胞^[12]。

天然杀伤细胞也是一类很重要的具有抗肿瘤作用的细胞,它不需预先致敏就有迅速破坏肿瘤细胞的作用。有些学者认为,天然杀伤细胞是免疫监视的第一线,是机体在肿瘤临床症状出现以前和肿瘤体积很小时的主要抗肿瘤机制。关于这类细胞的作用是否涉及超氧化物阴离子自由基,最近有人用化学发光法研究表明,天然杀伤细胞结合到肿瘤细胞时可导致化学发光,而且其发光强度,与天然杀伤细胞同靶细胞结合并引起其崩解的敏感性有直接关系,同时,超氧化物歧化酶可使其发光大部分受到抑制。因此,天然杀伤细胞对肿瘤细胞的作用,也可能涉及超氧化物阴离子自由基的生成与反应^[7]。

自由基可以抗癌,可能与自由基的性质有关,亦可能与癌细胞的特点有关。

自由基的化学性质通常都很活泼。例如, O_2^- 既有氧化能力,又有还原能力,亦可通过歧化反应生成 H_2O_2 。 H_2O_2 在可变价金属离子和 O_2^- 存在下,又可变为 $\cdot OH$ 。 $\cdot OH$ 是氧化能力特别强的自由基。在这些自由基的作用下,细胞膜、核酸和蛋白质均可被破坏,甚至可造成细胞的死亡。在正常的情况下,细胞内就存在有产生自由基的反应,如一些酶反应和蛋白质、低分子化合物的自动氧化时,氧分子就可变为超氧化物阴离子自由基,同时,在细胞内亦存在清除自由基和抑制自由基反应的防御体系,如在需氧细胞中均含有超氧化物歧化酶,能使细胞免受 O_2^- 的损害^[19]。

在肿瘤细胞中,亦有抗氧化剂损伤的防御体系。最近发现,肿瘤细胞中谷胱甘肽氧化还原循环就具有抗氧化剂损伤的作用,是其重要的防御机制之一。实验表明,被研究的六种肿瘤细胞对由酶产生的 H_2O_2 的敏感性差异很大;并发现,肿瘤细胞内谷胱甘肽的含量与其对 H_2O_2 的敏感性有关。当以卞氮芥 (BCNU) 抑制谷胱甘肽还原酶 (GR),通过给缺 Se 食物降低谷胱甘肽过氧化物酶 (GPO),用谷氨酰半胱氨酸合成酶抑制剂封闭谷胱甘肽的合成,

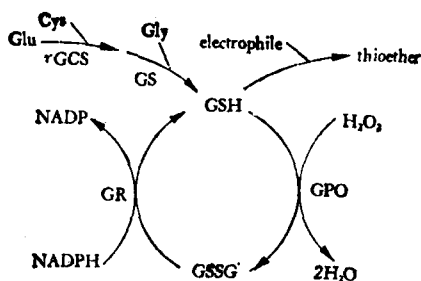


图5 谷胱甘肽氧化还原循环及其有关反应^[13]

通过卤代烃与谷胱甘肽形成硫醚，都可显著提高肿瘤细胞在 PMA 作用下由巨噬细胞所造成的氧化损伤^[13]。还有研究表明，巨噬细胞释放 O_2^- 与 H_2O_2 ，癌细胞也能释放一种因子，使之受到抑制^[1]。

但是，肿瘤细胞的防御体系也有缺陷。如在癌细胞中有超氧化物歧化酶活性降低的倾向。有人发现，在被检查的肿瘤中，含锰的超氧化物歧化酶的含量都较低；在许多肿瘤中，含锌和铜的超氧化物歧化酶的含量也较低^[15]。这样，癌细胞将不能有力清除 O_2^- ，从而也就比正常细胞更易受到 O_2^- 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 、 1O_2 等活性氧的攻击。另外，有资料表明，在一些肿瘤中，过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性也有降低的现象。这样癌细胞也就不能有力地消除过氧化氢和脂质过氧化物，抑制其有关的自由基反应。这也使癌细胞比正常细胞更易受到一些氧自由基的攻击，更易被破坏。

由以上资料可以看出，自由基具有抗癌作用，特别是氧自由基易破坏癌细胞；而癌细胞的防御体系自身又存在缺陷，因此，作者认为，可以将体内产生自由基的体系和可以降低癌细胞防御能力的药物分别包入脂微粒，在脂微粒上再接上单克隆抗体，制成导弹式抗癌药(或用其它使之集中于癌细胞的方法)，通过引发可使

癌细胞致死的自由基反应而抗癌，是一个值得研究的设想。在这方面，我们也开始进行了一些研究。因黄嘌呤氧化酶——黄嘌呤是一个产生 O_2^- 和 H_2O_2 的体系，我们就将以脂微粒包裹的黄嘌呤氧化酶和黄嘌呤给接种了 S-180 癌细胞的小鼠，观察其抗癌作用。实验结果表明，此体系确实可以抑制肿瘤的发展，并能显著延长因癌致死动物的存活时间。当然，关于这个方法用于临床，还需要进行大量的研究工作。

总之，深入研究自由基在抗癌中的作用，利用产生自由基的体系作为抗癌药，并同时设法进一步降低癌细胞的防御能力，或许能找出一些较好的抗癌方法。

参 考 文 献

- [1] Anna, Szuro-Sudol et al.: *J. Exp. Med.*, **156**, 945, 1982.
- [2] Armel, P. R. et al.: *Radiat. Res.*, **69**, 328, 1977.
- [3] Bachur, N. R. et al.: *Cancer Res.*, **42**, 1078, 1982.
- [4] Bachur, N. R. et al.: *Cancer Res.*, **38**, 1745, 1978.
- [5] Cone, R. et al.: *Can. J. Biochem.*, **54**, 219, 1976.
- [6] Galran, L. et al.: *Cancer Res.*, **41**, 5103, 1981.
- [7] Gregory, E. M. et al.: *J. Bacteriol.*, **114**, 1193, 1973.
- [8] Haffman, D. G. et al.: *J. Immunol.*, **123**, 55, 1979.
- [9] Helfand, S. L. et al.: *J. Exp. Med.*, **156**, 492, 1982.
- [10] Konovalava, N. et al.: *C. A.* **97**: 138246, 1982.
- [11] Lown, J. W. et al.: *Biochemistry*, **21**, 419, 1982.
- [12] Nathan, C. F.: *J. Exp. Med.*, **152**, 198, 1980.
- [13] Nathan, C. F.: *Ibid*, **153**, 766, 1981.
- [14] Nathan, C. F.: *Fed. Proc.*, **41**, 2206, 1982.
- [15] Oberisy, L. et al.: *Cancer Res.*, **39**, 1141, 1979.
- [16] Richard, B. et al.: *J. Exp. Med.*, **148**, 115, 1978.
- [17] Scheulen, M. E. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 3385, 1981.
- [18] 于立坚:《国外医学》(肿瘤分册), **3**, 97, 1981.
- [19] 莫简:《生物化学与生物物理进展》, **2**, 23, 1981.

【本文于1983年5月11日收到】