

而钝化(前者是 Trp108, 后者是 Trp177); 牛胰蛋白酶有 2—3 个色氨酸残基是光易变的, 邻近 Ser198 的 Trp199 是紫外钝化的靶部位, 由酪氨酸和胱氨酸残基吸收光形成的自由基对酶的钝化也有贡献; RNA 酶的光钝化与靠近 Tyr 25 的胱氨酸二硫键的光解有关, 酪氨酸光电离则不十分重要。

从闪光光解瞬态光谱能够得到衡量光解效率的两个参数: 相对光解效率(即酶成份中某种氨基酸光解的量子产额与该种氨基酸在游离状态下光解量子产额之比。以色氨酸为例, 假定某些色氨酸不光解, 而其余的以与游离的色氨酸水溶液相同的效率光解, 就得到表 6 中的  $n_{ox}$  值)。第二个参数是光电离量子效率(根据光强度测量和自由基消光系数得到的)。

表 6 中的  $n_{ox}$  值可以和用普通方法测量的芳香族残基在结构中处于埋藏和暴露的状态相比较。 $n_{ox}$  值近似等于在平均钝化剂量下永久损伤的残基数。Volkert 等用闪光光解方法测量

表 6 酶中色氨酸残基的光解量子产额、暴露数以及与酶钝化量子产额  $\phi_e$  的比值

| 酶       | $n_{ox}^a$ | $\Phi(\text{Trp})^b$ | $\Phi^*(\text{Trp})^c$ | $\Phi'_{\text{trp}}/\Phi_e^d$ | 暴露残基数 |
|---------|------------|----------------------|------------------------|-------------------------------|-------|
| 溶菌酶     | 2.5        | 0.05                 | 0.13                   | 1.7, 2.5                      | ~2    |
| 胰蛋白酶    | 2.4        | 0.04                 | 0.07                   | 1.8, 1.0                      | 2—3   |
| 木瓜蛋白酶   | 3.0        | 0.04                 | 0.07                   | 3.3                           | 2     |
| 核糖核酸酶 A | 2.4        | —                    | —                      | 1.3                           | 2~3   |

a. 酶中色氨酸残基中能够光电离的数目  
b. 酶分子中色氨酸残基的光解量子产额  
c.  $\Phi^*(\text{Trp}) = \Phi(\text{Trp}) \times (Z_{\text{trp}}^0/n_{ox})$ , 若酶分子中所有色氨酸残基都能光电离所应得到的色氨酸中性自由基的量子产额。 $Z_{\text{trp}}^0$  是酶含有的色氨酸残基数。  
d. 钝化一个酶分子要破坏的色氨酸残基数。

核糖核酸酶光解产生 Tyr 的量子产额, 并与游离酪氨酸的产额进行比较, 证明在 pH10 条件下, RNA 酶 6 个酪氨酸残基中有 3 个是暴露的。

在蛋白质光化学研究中, 除强调局部的改变, 即敏感的氨基酸残基的光解外, 还必须考虑蛋白质的构象、聚集状态以及微环境等因素。

综上所述, 闪光光解有可能作为研究蛋白质结构与功能的一种手段。

参 考 文 献

[1] Norrish, R. G. W. et al.: *Nature*, **164**, 658, 1949.  
[2] Grossweiner, L. I. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **29**, 1, 1976.  
[3] Bent, D. V. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2612, 1975.  
[4] Bryant, F. D. et al.: *J. Phys. Chem.*, **79**, 2711, 1975.  
[5] Bent, D. V. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2599, 1975.  
[6] Baugher, J. F. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **22**, 163, 1975.  
[7] Bent, D. V. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2606, 1975.  
[8] Redpath, J. L. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **28**, 243, 1975.  
[9] Fietelson, J. et al.: *J. Phys. Chem.*, **77**, 10, 1073.  
[10] Baugher, J. F. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **28**, 175, 1978.  
[11] 沈恂等:《生物化学与生物物理学报》, 1982 年 14 卷, 437 页。  
[12] Morine, G. H. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **33**, 1, 1981.  
[13] Grossweiner, L. I.: *Current Topics in Radiation Research Quarterly*, **11**, 141, 1976.  
[14] Volkert, W. A. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **17**, 81, 1973.

[本文于 1982 年 7 月 26 日收到]

活性氧在放射生物学中的作用

郑 荣 梁

(兰州大学生物物理教研组, 兰州)

人们早已知道电离辐射作用于水分子产生的自由基能引起一系列放射生物学间接效应。

但是近十多年来才认识到水的射解产物——活性氧类的重要作用。活性氧类不仅引起一系列

生物学效应,而且还参与某些正常及病理过程,所以受到广泛注意<sup>[1-4]</sup>。1980 年召开了氧和氧基团国际会议<sup>[6]</sup>。曾召开过两届防止超氧阴离子自由基毒性的超氧化物歧化酶(SOD)国际会议,第二届是 1979 年召开的,但会议录至今尚未出版。近年来有关这方面的论文已达 500 多

篇。可见活性氧的研究工作正处在十分活跃的阶段。

# 一、活性氧类的产生及生物学作用

活性氧可通过辐射化学、生物化学及化学的不同途径产生(图 1)。

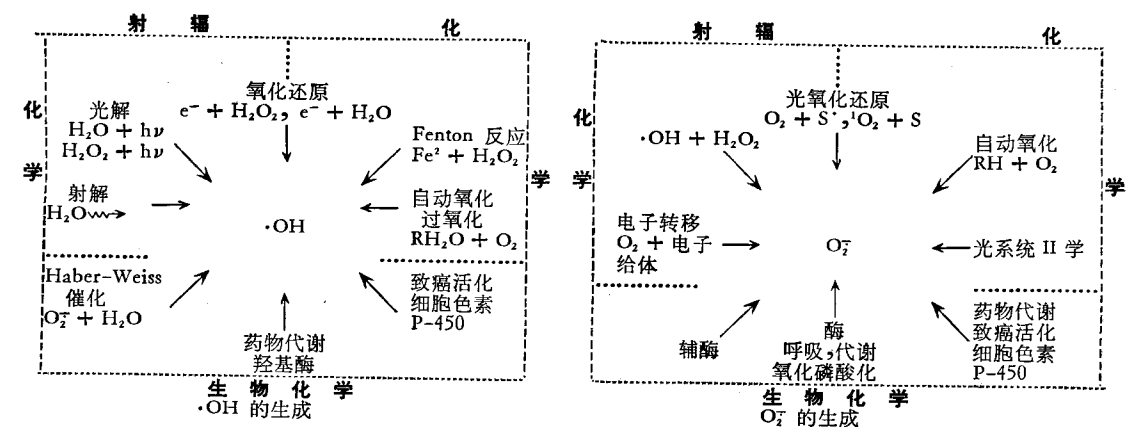
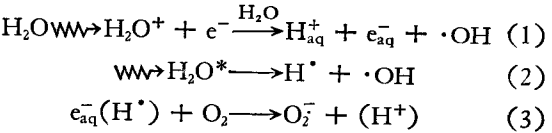
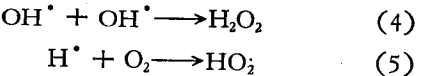


图 1 活性氧 ·OH 和 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 的生成途径

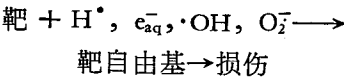
水射解的主要活性产物是水合电子 e<sub>aq</sub><sup>-</sup>、氢原子 H<sup>·</sup> 和羟自由基 ·OH。在有氧时, e<sub>aq</sub><sup>-</sup> 和 H<sup>·</sup> 发生反应,产生超氧阴离子自由基 O<sub>2</sub><sup>·-</sup>。



水射解时产生了等量的还原性(e<sub>aq</sub><sup>-</sup>, H<sup>·</sup>)和氧化性(·OH)产物,而继发产物 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 既能起氧化剂作用,也能起还原剂作用。水射解时还继发性地产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 HO<sub>2</sub><sup>·</sup>, 它们都起氧化作用。



放射生物学效应正是这些射解产物与细胞中靶分子作用的结果,这些反应通常涉及氧化或还原作用,导致产生非常活泼的生物靶分子自由基。



这些靶自由基继续与邻近分子发生反应,造成永久性化学损伤,最终出现放射生物学的有害效应(图 2)。

五十年代,人们误认为 HO<sub>2</sub><sup>·</sup> 在放射生物学

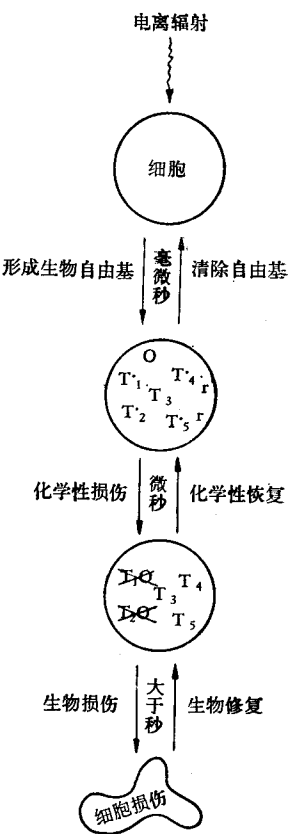


图 2 放射生物学损伤的历程及修  
○ 氧化剂, r 还原剂, T 靶

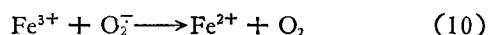
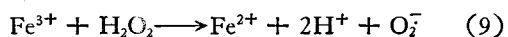
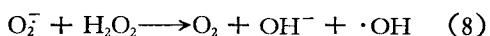
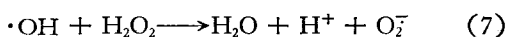
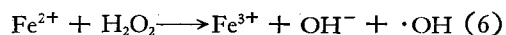
中起最重要的作用。其实在离体实验中,  $\text{HO}_2\cdot$  对饱和有机化合物是相对地不活泼 (Latajet, 1958)。遗憾的是直到不久以前, 这一误解才得到纠正。而  $\text{O}_2^-$  在七十年代初还很少被放射生物学学家注意, 直到近年来才被重视。

### 1. $\text{O}_2^-$ 的作用

它的作用十分广泛, 能使鲑鱼精子或大肠杆菌 DNA 的粘度及分子量下降 (White, 1966), 使  $\phi\text{X174}$  DNA 单链断裂 (White, 1971), 使多糖解聚 (Matsumura, 1966), 使肾上腺素 (McCord, 1969)、6-羟多巴胺 (Heikkila, 1973)、焦性没食子酸 (Marklund, 1974) 自动氧化, 也能使硫醇、抗坏血酸盐<sup>[1]</sup>及氧合血红蛋白 (Sutton, 1976) 氧化, 使不饱和脂肪酸发生过氧化 (Pederson, 1972)。  $\text{O}_2^-$  还能迅速还原高铁细胞色素 c (Simic, 1975), 高铁血红蛋白 (Sutton, 1976) 及氮兰四唑等。

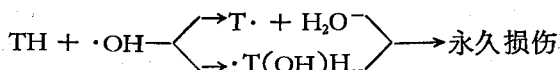
### 2. $\cdot\text{OH}$ 的作用

人们早已知道, 铁盐能大大加强  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化有机化合物的能力。铁盐加  $\text{H}_2\text{O}_2$  称为 Fenton 试剂, 它已被广泛用作羟基化试剂。Haber 和 Weiss 认为二者形成下列链锁反应:



所以除反应式(1)和(2)外, 反应式(6)和(8)也能产生  $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{OH}$  是活性氧中最强的氧化剂, 在放射生物学中被视作最有损伤性的基团<sup>[6]</sup>。在空气中容易进行自动氧化的 5-羟巴比妥酸能使缺维生素 E 的大白鼠红血球溶血, 这一现象可被过氧化氢酶或超氧化物歧化酶部分抑制。若同时加入以上二酶, 则这一现象被彻底抑制, 所以很容易理解成  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2^-$  是造成溶血的重要原因。但是根据反应(8), 也可推测是氧化能力极强的  $\cdot\text{OH}$  引起的。核酸常是辐射损伤中的靶分子, 例如 DNA、核苷酸、核苷及碱基等亚单位, 很容易受到  $\cdot\text{OH}$  的攻击<sup>[7]</sup>。大部分  $\cdot\text{OH}$  是攻击核酸组分, 发生嘧啶碱 5, 6 双键加成作用

(Lesko, 1980), 其余的  $\cdot\text{OH}$  从糖上移去 H, 造成 DNA 链的断裂。可以认为, 生物靶分子通过 H 抽提成  $\cdot\text{OH}$  加成反应, 产生活泼的靶自由基  $[\text{T}\cdot, \cdot\text{T}(\text{OH})\text{H}]$ , 然后进一步反应生成稳定的损伤产物。



### 3. $\text{H}_2\text{O}_2$ 的作用

它在活性氧中是最稳定的。  $\text{H}_2\text{O}_2$  对细胞有毒。需氧生物普遍存在过氧化氢酶以对抗  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 而厌氧生物缺少过氧化氢酶, 所以当它暴露在空气中时, 会被  $\text{H}_2\text{O}_2$  杀死。  $\text{H}_2\text{O}_2$  的致毒原因至今仍不明确, 只知道它能使巯基类化合物 (Sanner, 1963) 和蛋白质中蛋氨酸残基 (Stauffer, 1969) 氧化, 也能使不饱和脂肪酸过氧化。目前认为  $\text{H}_2\text{O}_2$  的毒性不是它直接攻击细胞成分, 而是它与  $\text{O}_2^-$  或  $\text{Fe}^{2+}$  发生反应生成极活泼的  $\cdot\text{OH}$  的结果。

由此可见, 射解而形成的活性氧类对细胞的影响是非常广泛的。

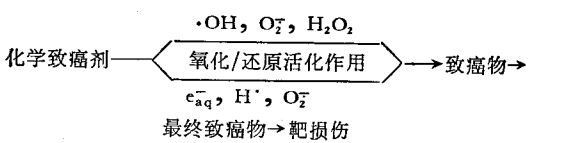
## 二、活性氧与辐射敏感性

细胞不是各种成分混在一起的单纯匀浆, 而是一个动态的、精致的受控系统。为了维持细胞的有序性和动力学, 许多紧密偶联的氧化还原反应综合成为一个复杂的功能整体。氧化还原状态不但影响细胞的活力和适应性, 而且也影响细胞的辐射敏感性。任何改变氧化还原状态的因素, 都必然改变细胞对射线的反应, 因此可以通过两种途径来改变辐射敏感性: (1) 从外部直接加入氧化性或还原性物质, 或改变环境条件, 例如 pH、温度、盐浓度等。(2) 改变细胞内部的代谢状态, 例如饥饿、氧的剥夺、代谢的刺激或抑制作用、恶性转化、紧张等。一般地说, 使环境改变到比较偏于还原性, 就可使辐射敏感性下降, 而改变到偏于氧化性方面, 就可使细胞对射线更敏感<sup>[8-10]</sup>。氧化剂或亲电子物 (氧、氮杂环类) 能加剧靶自由基的损伤, 使损伤固定化, 而还原剂 (巯基类, 维生素 C) 能消除靶自由基的潜在损伤<sup>[7]</sup>。

既然  $O_2^-$  有辐射损伤作用,那么清除  $O_2^-$  的 SOD 理应具有辐射防护作用,曾把 SOD 加入具有射解产物的悬浮液中,  $O_2^-$  被 SOD 所截获,的确使 *E. coli* 的氧效应下降 (Misra, 1976)。从细胞外给予的 SOD 对 DNA (Van Hemmen, 1975)、蛋白质 (Lavelle, 1973)、细胞膜 (Petkau, 1976)、成肌细胞 (Micheison, 1974)、类菌质体 (Petkau, 1974) 和细菌 (Oberly, 1976) 有防护作用。静脉注射 SOD, 能增强小白鼠的辐射抗性<sup>[11]</sup>。杜德林等发现静脉注射 SOD, 不但能提高受照射小鼠的存活率, 还能明显提高骨髓 CFU-S 的形成能力与总量<sup>[12]</sup>。让细菌在不同氧压下,或在缺少 SOD 所需的辅金属的介质中生长,以改变细菌自身的 SOD 含量,发现了内源性 SOD 在抗氧效应中的重要性 (Oberly, 1976)。把人血红细胞和中国仓鼠细胞培养在含有能抑制 CuZn-SOD 的二乙基二硫氨基甲酸酯 (DDC) 的培养液中,使辐射敏感性增高<sup>[13-14]</sup>。这些都说明能清除  $O_2^-$  的 SOD, 在放射防护中起着重要作用。但也有些矛盾的资料,不再例举。我国学者还发现照射能使小白鼠红细胞、肝和脾中 SOD 活力下降<sup>[15]</sup>。

### 三、活性氧与辐射致癌作用

电离辐射作为物理致癌因素,既可直接引发致癌性自由基,又可催化和加剧自由基对于前致癌物的活化作用。在需氧生物中,活性氧通过化学,生化和辐化多种途径产生。它们独特的性质有可能在致癌,或者致癌活化作用中起媒介作用。脉冲射解的研究已用来检验这种假设:



有两个模拟实验分别检查了  $O_2^-$  及  $\cdot OH$  对化学致癌剂的反应能力<sup>[7]</sup>。在氧化亚氮饱和的溶液中,水的射解产物只剩  $\cdot OH$  起作用;在 0.1 M 叔丁醇溶液中,只剩  $O_2^-$  起作用。在上二溶液中的致癌剂与  $O_2^-$  或  $\cdot OH$  分别发生反应的速

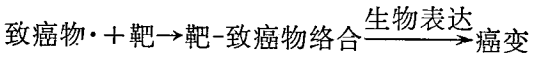
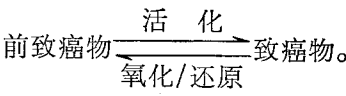
率常数 (表 1) 表明,  $\cdot OH$  与致癌剂的反应速率比  $O_2^-$  快百倍或千倍。

表 1 活性氧与致癌剂反应速率常数  
( $10^7 M^{-1} sec^{-1}$ )

| 致 癌 剂        | $K_{\cdot OH}$ | $K_{O_2^-}$ |
|--------------|----------------|-------------|
| 联苯胺          | 500            | 12          |
| $\beta$ -萘胺  | 900            | $\sim 1$    |
| 5-硝基喹啉-N-氧化物 | 1300           | $\leq 1$    |

但是必须注意,细胞中含有许多高浓度的生物分子,它们可以迅速与  $\cdot OH$  发生反应,所以致癌剂与相对不活泼的  $O_2^-$  发生反应的可能性反而大于迅速被清除掉的  $\cdot OH$ , 现在一般都认为活性氧的致癌性是由于被自由基活化的致癌代谢物与细胞靶分子发生反应的结果<sup>[11]</sup>。已经证实辐射引起活化作用,导致被活化的致癌物与 DNA 亲核中心<sup>[16]</sup> 或 RNA<sup>[17]</sup> 发生共价结合。当致癌物 9, 10- 二甲基 -1, 2- 苯蒽 (DMBA) 的浓度足够时, DMBA-DNA 的结合随着照射剂量的增加而直接增加,当  $\cdot OH$  或  $O_2^-$  的浓度大时,这一结合也增多;当溶液中加入  $\cdot OH$  的清除剂乙醇时, DMBA 与 DNA 的结合几乎不发生;还发现结合程度与活化物对 DMBA 发生反应的氧化势有关 ( $\cdot OH > O_2^-$ )。有人认为  $\cdot OH$  是已知的最简单的致癌物<sup>[18]</sup>。

化学致癌作用的氧化还原模<sup>[8]</sup>式如下:



活化作用包括化学、电化、光化和辐化过程。前致癌物被亲电子自由基中间体所活化,亲电子自由基中间体包括活性氧和其它活泼的氧化还原剂。被活化的致癌物随后与亲核的靶,例如: DNA 的组分,尤其是鸟嘌呤核苷;蛋白质和非蛋白质巯基类,以及磷脂膜的脂肪酸相作用,以形成共价加成和降解产物。关键性细胞成分,尤其是基因物质和调控信息传递的物质的特殊化学变化,可能造成决定性损伤,最终引发了恶性转化。 这些研究阐明了  $O_2^-$  和

·OH 活性氧, 作为短寿命氧化还原剂, 在辐射致癌方面, 和在致癌活化方面的机理。

## 参 考 文 献

- [1] Fridovich, I.: *Free Radicals in Biology*, (Pryor, W. A., ed.), Academic Press, N. Y. 1, 239, 1976.
- [2] Fridovich, I.: *Science*, **201**, 875, 1978.
- [3] Osamu Hayaishi et al.: *Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen*. University Park Press, Baltimore, 1977.
- [4] Michelson, A. M. et al.: *Superoxide and Superoxide Dismutases*, Academic Press, London, 1977.
- [5] Radgers, M. A. J. et al.: *Oxygen and Oxy-Radicals in Chemistry and Biology*, Academic Press, 1981.
- [6] Root, R. et al.: *Radiat. Res.*, **64**, 306, 1975.
- [7] Greenstock, C. L.: *Radiat. Res.*, **86**, 196, 1981.

- [8] Biaglow, J. E. et al.: *ibid.*, **39**, 623, 1969.
- [9] Harris, J. W. et al.: *ibid.*, **56**, 291, 1973.
- [10] Chapman, J. D. et al.: *ibid.*, **56**, 291, 1973.
- [11] Petkau, A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 886, 1975.
- [12] 杜德林, 施秉仪, 刘东平, 任建平: 《中华放射医学与防护杂志》1982, **4**, 26.
- [13] Lin, P. S. et al.: *Radiat. Res.*, **77**, 501, 1979.
- [14] Westman, G. et al.: *ibid.*, **83**, 303, 1980.
- [15] 方允中, 刘智峰: 《中国人民解放军军事医学科学院院刊》1982 年, 第 1 期, 29—32 页。
- [16] Tsó, P. O. P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **51**, 272, 1964.
- [17] Cardona, R. A. et al.: *Cancer Res.*, **35**, 2007, 1974.
- [18] Lesko, S. A. et al.: *Biochemistry*, **19**, 3023, 1980.

[本文于 1982 年 8 月 9 日收到]

# 房室模型的系统辨识与药物研究

何 绍 雄

(天津药物研究所)

房室模型 (Compartment Model) 最早是由研究药物动力学发展起来的<sup>[1]</sup>。早在二十年代, 就提出了房室的初步概念, 至三十年代则已建立了多室线性模型。近二十年来, 由于药物研究逐步向定量化发展, 房室模型在药物研究中的应用有了进一步的发展。特别在六十年代中期, 由工业自控系统发展起来的系统辨识法<sup>[2]</sup>被引入房室模型分析, 两者相互渗透结合, 促进了房室模型分析的发展。本文在讨论房室模型与系统辨识法相互结合的某些基本问题的基础上, 重点说明房室模型的辨识应用于药物研究的进展, 并对在实际应用中某些问题提出初步讨论。

## 房室模型的辨识

房室模型分析与系统辨识法的研究对象主要是生物系统, 两者的目的都是要了解系统的结构, 有关参数以及功能特性, 以便运用模型定

量地解决实际问题。由于两者研究对象和目的基本一致, 特别是房室模型现在不仅广泛应用于药物动力学领域, 而且越来越多地应用于代谢、生理以至生态等领域。这就使得系统辨识法与房室模型分析更密切地结合起来, 并通过房室分析, 使系统辨识法的原理和方法在生物医药科学中得到进一步的应用。

系统辨识与参数估计属于现代控制理论的范畴, 后者的特点是以状态空间来描述系统, 结合应用电子计算机技术, 使系统达到某一性能指标下的最优结果。系统辨识就是从系统工作状态下的输入与输出数据的观测, 去建立系统的数学模型, 使模型与实际系统在特定的指标下差别最小。作为数学模型的房室分析显然可以应用系统辨识法的原理和方法来进行辨识, 即房室模型的辨识。因之房室模型的辨识实质上已成为系统辨识在医药科学中应用的重要方面。