

- [10] Anil Kumar, Ernst, R. R. and Wüthrich, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1—6, 1980.
- [11] Braun, W., Bösch, C., Brown, L. R., Gō, N. and Wüthrich, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 667, 377—396, 1981.

- [12] Levitt, M.: *J. Mol. Biol.*, 82, 393, 1974.
- [13] 王家槐: 《生物化学与生物物理进展》, 1984年, 1期, 1页。
- [14] Matthews, B. W. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 1428, 1982.

〔本文于1982年8月7日收到〕

自 由 基 和 癌

赵保路

张建中

(中国科学院生物物理研究所)

(中国科技大学研究生院)

自由基和癌的关系是很复杂的,并且一直是一个有争论的问题。但综观对这个问题研究的历史和现状,可以肯定地说,自由基和癌的关系是非常密切的。要研究癌就不能忽视自由基在致癌和癌的发展乃至治疗中的作用。研究自由基最有效的方法是电子自旋共振(ESR)波谱技术。

一、癌发展过程中自由基的变化

人们早就观察到在肿瘤生长过程中,组织里自由基的含量发生变化。有的认为癌组织中自由基含量比正常组织的大,而另一部分作者则发现组织癌变后自由基含量减少。如 Kolomijiseva 等人观察到^[1]鼠肝肿瘤中自由基的

含量比正常组织减少大约三分之二,在肉瘤-45中亦观察到类似的结果^[1]。但 Petyaev 的结果^[2]则表明,在一些鼠白血病和肉瘤 m-1 中自由基含量明显增加。为了解决这一矛盾,很多人研究了肿瘤发展过程中自由基含量变化的动力学规律。

Saprin 等人首先对鼠白血病-La 发展过程中自由基含量的变化进行了动力学研究^[3](见图1)。

由图可知,开始自由基含量逐渐增加,大约第四天达到最大值。这个现象出现在白血病其它症状如脾增大、血象改变等之前。自由基变化动力学曲线的最高点和脾重量开始迅速增大的时间是一致的。在第五到六天,自由基浓度开始下降。在动物死亡时,即第七、八天,自由基含量低于正常值。

Emanuel 等人亦得到类似的结果。例如,对 160 个患骨髓性白血病和 170 个患慢性淋巴性白血病病人的自由基含量测定发现,它们比正常的高 2 到 4 倍^[4]。对人胃癌的研究指出,在第一期自由基含量为正常胃粘膜的 3 倍,从第二期开始,胃癌中自由基含量下降,在第四期明显低于正常值^[5]。

在研究了肿瘤生长的动力学规律之后,他们提出,移植肿瘤生长的早期阶段可以用一指数关系近似表示^[6]:

$$\phi = \phi_0 e^{\phi t}$$

式中 ϕ 是肿瘤在时间 t 时的体积, ϕ_0 为肿

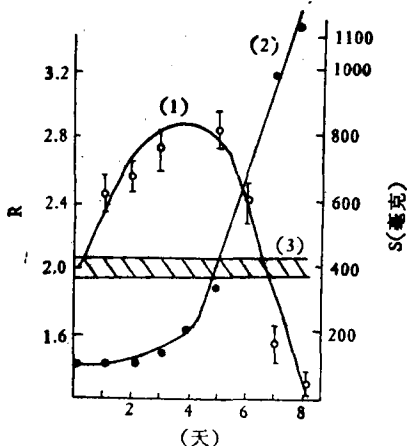


图 1

(1) 白血鼠脾中自由基含量的变化; (2) 脾重量的变化; (3) 对照

R: ESR 信号相对大小 S: 脾重量

瘤的初始体积。图 2 表示了一个以自由基的相对含量和肿瘤的相对增长对肿瘤体积的“加倍数” n (即增加 2^n 倍) 作图的动力学曲线。由图可以看出, 实验值沿着理论值曲线 $\eta = 2^n$ 增加一直到 $n = 5$, 此处 $\eta = \phi/\phi_0$, $n = t/T$, T 为加倍一次所需要的时间, $T = \ln 2/\phi$ 。在肿瘤生长后期, 变成了直线关系。

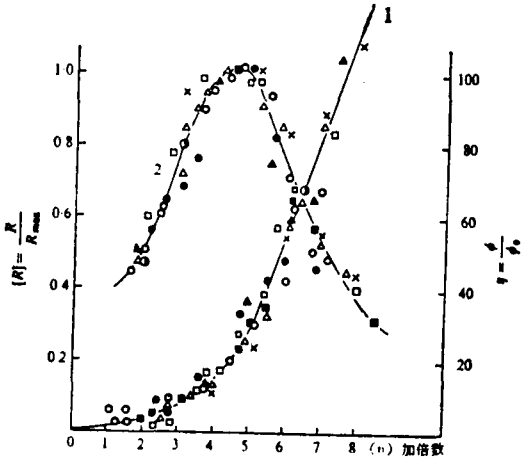


图 2 (1) 移植肿瘤的生长和(2)肿瘤中自由基含量的动力学曲线

×: 鼠白血病; ●: 鼠腹水肉瘤 37; ○: 鼠实体内瘤 37; □: 鼠腿肌瘤; ■鼠 B-16 黑色素瘤; △: 鼠 G-P 黑色素瘤; ▲: 鼠腹水-E 肿瘤; ○: 鼠实体内瘤 180

$$\phi = \phi_1 + bt$$

指数曲线和直线的切点所对应的时间就是肿瘤生长达到最大速度的时间 $t_{\max}$ 。由上述条件可以求出

$$t_{\max} = \frac{1}{\phi} - \frac{\phi_1}{b}$$

这样, 若知道了每个实验肿瘤的 ϕ , 即可估算肿瘤生长达到最大速度的加倍数 n 。

由 8 种肿瘤中自由基相对含量对加倍数作图可以看出, 开始自由基逐步增加, 在大约 n 等于 4 时达到最大, 然后又逐步减小。对这 8 种实验肿瘤测量计算结果表明, 肿瘤体积最大时的加倍数 $n_{w\max} = 5.6 \pm 0.3$, 自由基最大含量的加倍数 $n_{R\max} = 4.3 \pm 0.3$ 。由此可以得到一个简单的关系式

$$n_{R\max} \cong \frac{3}{4} n_{w\max}$$

这就是说, 在接近肿瘤生长最大速度的加倍数

之前就可以观察到自由基的最大含量。

如果这一规律确实成立, 则它对癌症的诊治、治疗的检测都是非常重要的。因此 Swartz 等人对这个问题又进行了重新研究^[7], 发现有些实验不能重复, 即在肿瘤生长过程中自由基含量趋向减少, 而没有观察到任何早期的上升。他们认为这是由于制备样品所采用的方法不同所致。Emanuel 等人采用的是冰冻干燥样品, 而 Swartz 等人用的是直接冷冻样品。他们的实验表明, 冰冻干燥会增加样品中自由基的含量, 并改变 ESR 波谱的线宽。他们还认为, 样品暴露于氧气和水蒸气中也会改变测得的信号。我们在直接冷冻 (-140°C) 和冰冻干燥两种条件下比较了正常鼠肝、心、脾、肾、脑、淋巴结和两种肿瘤鼠 W_{256} 腹水癌和鼠 U_{14} 子宫癌中自由基的含量^[8], 结果指出, 冰冻干燥不仅会使组织中自由基含量比直接冰冻的样品增加许多倍, 而且还会改变自由基浓度大小顺序。在直接冷冻条件下, 自由基含量由大到小的顺序为肝、肾、脾、脑、 W_{256} U_{14} , 心、淋巴结; 经真空干燥的样品为肝、脾、心、 U_{14} 、肾、脑、淋巴结、 W_{256} 。另外我们还发现, 虽然通过大量实验, 经统计计算可以找出肿瘤相对正常组织中自由基含量的改变, 但在测量过程中, 个体差异比较大。我们认为, 直接冷冻样品与冷冻干燥样品相比更接近组织的正常生理状态。因此, 测量组织的自由基最好在直接冷冻条件下进行。但因为冷冻干燥对样品中自由基 ESR 波谱的形状改变不大, 而且可使信号大为增强, 故在某种情况下 (例如, 当自由基浓度特别低时), 使用冷冻干燥样品亦有其显著的优越性。

二、病毒致癌过程中的自由基

病毒致癌的假说不断被实验所证实, 学者们对病毒致癌的机理正进行多方面的研究。图 3 表示用腺病毒 12, 6 和 3 感染鼠胚胎成纤维细胞 (REF) 和腺病毒 12 感染的地鼠胚胎成纤维细胞 (HEF) 及腺病毒诱导的田鼠肉瘤中自由基含量变化的动力学曲线^[9]。

腺病毒 12 具有很高的致癌活性, 腺病毒 3

的致癌活性较低,腺病毒 6 只具有病毒活性。腺病毒 12 能在 18—20 天诱导 REF 和 HEF 恶性转化,在 30—40 天诱导地鼠皮下肉瘤出现,由图 3 可以看出,病毒致癌活性和自由基变化过程有一定关系。在腺病毒 12 感染细胞之后第

3、4 天自由基含量达到最大值。在用腺病毒诱导的地鼠皮下肉瘤的恶变增殖病灶中和一些小的肿瘤块内也观察到了最大的自由基含量。随着肿瘤的生长,自由基下降 2.5 倍,并低于正常值。

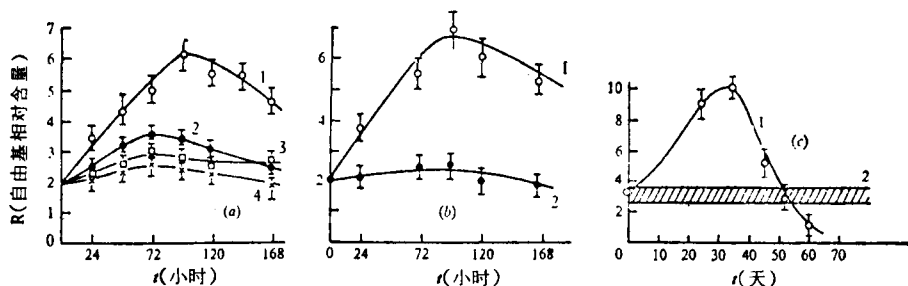


图3 病毒感染鼠肿瘤中自由基含量的变化

(a) 培养鼠成纤维细胞: (1) 腺病毒 12 感染, (2) 腺病毒 6 感染, (3) 腺病毒 3 感染, (4) 对照。
(b) 培养地鼠胚胎成纤维细胞用腺病毒 12 感染。 (c) 腺病毒诱导的地鼠皮下肿瘤 (1), (2) 对照

三、自由基抑制剂对癌的预防和治疗作用

既然自由基在肿瘤的生长和致癌过程中起着重要作用,那么自由基抑制剂是否会对癌的预防和治疗有作用呢?回答是肯定的。这是提出一类新的抗癌药物的思想基础。

一系列的研究表明,一类抗氧化剂也就是自由基的抑制剂确实对癌具有一定的预防和治疗作用。如已知为自由基过程抑制剂的 2,6-二特丁基-4-甲基酚实际上是一种有效的抗癌药物^[10]。二甲基胺偶氮苯 (DAB) 加入到动物食物里,90 天后,90% 鼠肝上出现肿瘤,但是当 0.3% 的 2,6-二特丁基-4-甲基酚掺入 DAB 喂了 150 天之后,在鼠肝中也未观察到肿瘤。

后来,2,6-二特丁基-4-甲基酚的抗癌作用也被其它研究所证实。例如有人研究了 2,6-二特丁基-4-甲基酚、异丁基噁唑烷和乙氧喹啉在苯并芘和 7.12-二甲基-苯蒽致癌过程中的作用,发现酚的抗氧化性能对鼠胃和乳肿瘤有抑制作用^[11]。

含硒化合物是具有抗氧化性的。它也是一类有效的抗肿瘤药物^[12]。

抗坏血酸 (维生素 C) 是一种抗氧化剂,

实验发现它确实对化学致癌有一定的缓解作用^[13]。

对稠环芳烃,亚硝基胺、硝基喹啉、尿烷、尿嘧啶芥子和芳胺等致癌物的研究表明,抗氧化剂都有减缓它们致癌作用的功能^[14]。

自由基抑制剂能减缓化学致癌并对癌症具有一定的疗效,反过来自由基过程在致癌和对癌的发展确实起着作用。很可能是自由基抑制剂在致癌过程的某个自由基阶段将反应中止或使已产生的自由基还原到原来的状态。这还需要进一步的实验证实。

四、癌细胞中自由基的性质和来源

随着对肿瘤研究的深入和 ESR 波谱仪器的改进,人们不仅能对肿瘤中自由基含量进行测定,而且能够进一步研究这些自由基的性质、来源以及它们在生理代谢中所起的作用。

1. 急性淋巴白血血病中的自由基

Lohman 等人对急性淋巴白血血病中的自由基进行了深入的研究^[15-18]。他们发现在患急性淋巴白血血病的冰冻干燥的血液样品中,有一个 $g = 2.005$ 的自由基信号,它是正常血样所没有的,而且它的自旋浓度增加。图 4 表示了健康献血者和患急性淋巴白血血病人的 ESR 谱。由图

可看出, 在白血病样品的 ESR 波谱中出现了 $g = 2,005$ 的峰, 而在正常血样中此峰却不出现。当用长春新碱等药物处理后, 此峰消失, 自旋浓度也恢复正常。当长春新碱等作用超过一周以后, 在低场部分又出现了一些附加峰, 这与氧化剂 KMnO_4 对样品的作用类似。

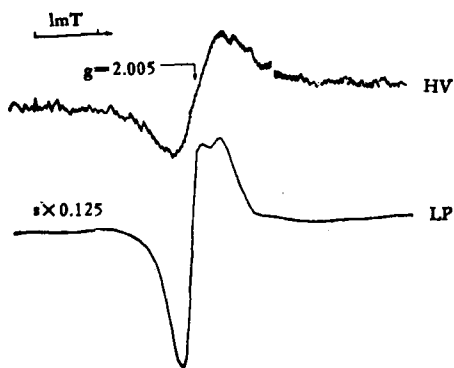


图4 健康献血者 (HV) 和患急性淋巴白血病人 (LP) 的冰干燥血样的 ESR 谱
(S = 实际灵敏度)

当在健康人红细胞中加入抗坏血酸之后, 在 ESR 谱上出现了“白血病峰”(图5)。随着抗坏血酸浓度的增加, 自旋浓度开始增加, 接着

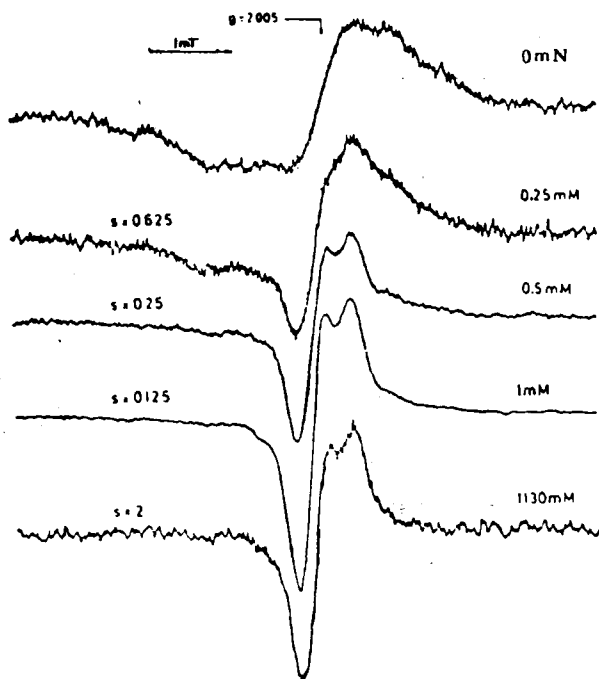


图5 不同浓度的抗坏血酸对红细胞 ESR 波谱的影响
(S = 实际灵敏度)

下降, 当抗坏血酸浓度为 $1M$ 时, 自旋浓度下降到零。加氧化剂 KMnO_4 、 H_2O_2 , 可以逆转由抗坏血酸产生的“白血病峰”。由以上结果可以推断, 在恶性淋巴白血病人细胞中含有较高浓度的抗氧化物。

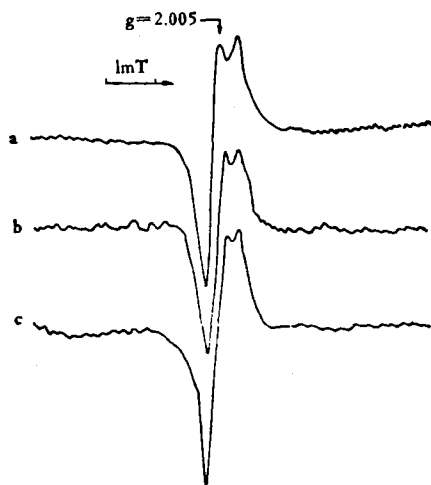


图6 抗坏血酸对不同铜蛋白和红细胞 ESR 波谱的影响
(a) 红细胞加 $1mM$ 抗坏血酸; (b) $0.3mM$ 血浆铜蛋白 + $40mM$ 抗坏血酸, (c) $0.1mM$ 血蓝蛋白 + $5mM$ 抗坏血酸

为了研究抗坏血酸的受体性质, 他们又研究了金属离子 Cu^{+2} 、 Fe^{+2} 、 Fe^{+3} 、 Mn^{+2} 和金属蛋白等与抗坏血酸的相互作用。发现 Cu^{+2} 与抗坏血酸作用最强, 某些含铜蛋白可能是抗坏血酸的受体。图6表示了几种铜蛋白和抗坏血酸冰冻干燥样品的 ESR 谱。可以看出它们与白血病血样的 ESR 谱非常类似。

用红细胞膜也可以得到类似的结果。另外, 用原子吸收光谱研究表明, 红细胞总含量的大约3%在它的膜中。因此可以推断, 这些铜蛋白受体是在红细胞膜上。

他们还研究了抗坏血酸氧化酶对用抗坏血酸处理过的红细胞、患急性淋巴白血病人的血和恶性肺组织的影响。发现它可以逆转抗坏血酸的作用。这表明抗坏血酸氧化酶或类似作用的酶存在于健康的个体中, 而在患急性淋巴白血病的个体中, 其含量很少。抗坏血酸氧化酶在抗坏血酸代谢中可能起着关键性的作用。

在有氧时, 抗坏血酸氧化酶能将抗坏血

酸氧化成脱氢抗坏血酸。用核磁共振 (NMR) 研究表明,首先是抗坏血酸侧链的环闭合,接着是脱氢抗坏血酸的两个环结构的打开和抗坏血酸的分解。用 ESR 测量也证实了这一结果。

总之,在急性淋巴白血病人血中观察到的 ESR 波谱变化似乎反映了抗坏血酸和一些含铜蛋白代谢的混乱。它对急性淋巴白血病的诊断和治疗有一定的参考价值。

2. 人子宫癌中的自由基

Benedetto 等人对子宫癌中自由基的性质进行了研究^[19-20]。结果表明,正常人子宫颈和子宫内膜的冻结粉末样品有很强的 ESR 信号,恶变组织中的相应的 ESR 信号很小或检测不出来。41 个正常子宫颈和子宫内膜粉末样品的 ESR 信号高度为 3.2 ± 0.5 (任意单位),而 15 个侵入癌的样品的 ESR 峰高为 0.4 ± 0.4 ,用完整样品测得的相应值分别为 2.8 ± 0.3 和 1.6 ± 0.6 。完整样品的 ESR 信号的 g 值是 $2.11-2.15$,而粉末样品的 g 值为 $2.002-2.0035$ 。正常和恶变组织的冻结完整样品和粉末样品的 ESR 信号对谐振腔的温度很敏感。当温度增加到 -80°C 时,信号迅速减弱,在 0°C 时几乎消失。ESR 谱由几个信号组成,当改变温度和降低微波功率时 ESR 谱出现超精细结构。随着微波功率的增加,信号有较小的饱和。对完整样品,直到 150mw 还未达到饱和,而粉末样品在 10mw 时就出现饱和。

Benedetto 认为由正常完整子宫颈和子宫内膜给出的在 $g = 2.11$ 和 $g = 2.15$ 之间的 ESR 信号是与金属离子相联系的,而且很可能是 Fe^{+2} 。理由是,在粉末的子宫颈和子宫内膜样品中信号的 g 值和各向异性及其能量的饱和行为是和有机过氧化自由基 RO_2 一致的。研磨过程能把存在于完整样品中的含铁的顺磁样品转变为粉末的有机过氧化自由基(图 7)。完整样品中 $g = 2.11-2.15$ 的信号强度与研成粉末样品的 $g = 2.002$ 的信号强度关系是与转变过程一致的。已知子宫组织的活性是与前列腺素的反应和合成有关的。而在体外培养,脂的过氧化也很容易出现在这些组织中。这两个酶过



图 7 机械研磨对铁-氧复合物和不饱和脂肪酸之间分子联接的影响

程又都是被铁的复合物刺激的。所以,在完整样品中观察到的 ESR 信号,可能表示和不饱和脂肪酸很接近的铁氧复合物是环加氧酶或脂氧化酶反应的底物。样品的机械研磨可能改变分子间的连接,因此产物实际上是脂肪酶过氧化物。

参 考 文 献

- [1] Kolomijiseva, I. K. et al.: *Biophysica*, **5**, 636, 1970.
- [2] Petyaev, M. M. et al.: *Vop. Onkoi*, **13**, 108, 1967.
- [3] Saprin, A. N. et al.: *Dokl. Akad. Nank. SSSR*, **167**, 222, 1966.
- [4] Kassirskii, I. A. et al.: *Problemy Gemutologii Perelivaniya Krori*, No. 8, 11, 1967.
- [5] Kuzin, M. I. et al.: *Symposium: Free radical States and Their Role in Radiation Damage and Malignant Growth*, Moscow, 52, 1971.
- [6] Emanuel, N. M.: *Quarterly Reviews of Biophysics*, **9**, 283, 1976.
- [7] Swartz, H. M. et al.: *Science*, **118**, 936, 1977.
- [8] 赵保路、段绍瑾、张建中、忻文娟:《分子科学和化学研究》(待发表)。
- [9] Sprin, A. N. et al.: *Symposium: Free Radical States and Their Role in Radiation Damage and Malignant Growth*, Moscow, 77, 1971.
- [10] Frankfurt, O. S. et al.: *Bull. Exper. Biol. Medici.*, **64**, 86, 1967.
- [11] Wattenberg, L. W.: *J. National Cancer Inst.*, **48**, 4125, 1972.
- [12] Shamberger, R. I.: *J. National Cancer Inst.*, **44**, 931, 1970.
- [13] R. A. Floya, et al.: *Cancer Res.*, **36**, 1510, 1976.
- [14] T. J. Slaga, et al.: *Cancer Res.*, **37**, 1631, 1977.
- [15] Lohmann, W. et al.: *Blut.*, **39**, 327, 1979.
- [16] Lohmann, W. et al.: *Blut.*, **39**, 317, 1979.
- [17] Lohmann, W. Z.: *Naturforsch. Teil. C*, **36**, 1-8, 1981.
- [18] Lohmann, W. et al.: *Free Radical Lipid Peroxidation and Cancer*. (ed, D. C. H. Mcbrin and T. F. Slater.) 1982.
- [19] Benedetto, C. et al.: *Cancer Res.*, **41**, 2936,

1981.

[20] Benedetto, C.: *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer*, (ed. D. C. H. Mcbrine and T.

F. Slater.) 1982.

[本文于 1983 年 4 月 12 日收到]

带有不同官能团的聚苯乙烯树脂 在固相多肽合成中的应用概况

汪淑华 朱应麒

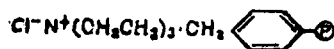
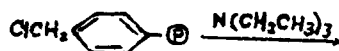
(中国科学院上海药物研究所)

多肽激素不论是在科学研究、医药、农牧业等的应用方面已日趋广泛。固相多肽合成法的问世又给多肽合成带来了方便。近十几年来这个方法已被广泛的研究和应用。通常所谓的 Merrifield 固相合成法就是在 2% 二乙烯基苯和苯乙烯的共聚树脂上引入氯甲基, 而后进行多肽合成, 无疑聚苯乙烯共聚树脂本身的物化性质是起着一定的作用。它必须具有足够的机械强度, 能经受碰撞、胀、缩和酸碱等苛刻条件, 而此种树脂往往不能满足这些要求。几年来有许多工作者探索了一系列其它类型的聚合体, 象大孔网格树脂等, 关于这方面的资料已有综述发表^[1]本文不再介绍。

实际上在固相多肽合成中连接肽链与树脂之间的化学键的作用是很重大的, 它必须满足以下条件: ①容易形成, ②对于合成过程中各步骤重复使用的化学试剂要稳定, ③多肽合成之后能在温和的条件下使它从树脂上脱离下来而不破坏肽键, 多年来许多学者按照不同的目的设计了很多带有不同官能团的树脂, 按照肽与树脂之间化学键的类型可分为以下几类:

1. 苄酯键

卤苄类树脂 (1—6)* 苄酯键的形成最初是将树脂与保护氨基酸一起在三乙胺存在下, 用乙酸乙酯或乙醇做溶剂, 回流 24—65 小时。但反应时间长, 在酯形成的同时部分氯甲基与三乙胺形成季铵盐, 从而使树脂具有阴离子交换树脂的性质, 并降低了所要合成的肽在树脂上的稳定性。



目前肽链与树脂之间的苄酯键的形成多采用碱金属盐法^[2], 它的成酯率高、操作简便, 副反应少。将 Boc-氨基酸与碳酸铯反应生成 Boc-氨基酸的铯盐, 然后再和树脂一起在 DMF 中 50℃ 反应 16 小时, 即可获得很高的酯化率。1975 年中国科学院上海生物化学研究所多肽应用组采用了钾盐法, 也获得了满意的结果。

苄醇构型树脂 (7.8) 的苄酯键的形成最初用 N, N'-羰基二咪唑做为缩合剂, 反应条件温和, 反应时间短, 但对 C-末端是 Asp 和 Glu 的肽不适用, 因为在此情况下它们将自身脱水而成为腈类。DCCI 也曾作为缩合剂而被采用, 但缩合率太低。目前用咪唑催化的活化酯法已广泛应用。

通过苄酯键与树脂相连接的肽, 可根据具体情况选择适当的方法, 使之从树脂上脱离下来。

(1) 酸解: 肽链与树脂之间的苄酯键可用各种无机的或有机的酸, 在适当的条件下断开而得到 C-端是游离羧基的肽酸。比较常用的是 HBr 在 1:1 的 CH_2Cl_2 -TFA 中 25℃ 反应

* 本文树脂结构式均见附录。