

铜锌超氧化物歧化酶对几种羟自由基产生系统的影响

傅爱根 王爱国 罗广华

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 应用脱氧核糖降解法研究了CuZn-SOD对几种·OH产生系统的作用机理。结果证明: SOD对 $\text{Fe}^{3+} \cdot \text{O}_2^- \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ 系统中·OH的产生有明显的抑制作用, 而失活SOD或BSA对它的抑制作用不大; 在 $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\text{Cu}^{2+} \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ 系统中, SOD、失活SOD和BAS均能抑制·OH的产生; 在 $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{O}_2^-$ 系统中, SOD对·OH产生作用不大, 而失活SOD或BSA对它有明显的抑制作用。由此推测SOD对·OH形成可能有三方面的影响: 1. 对 O_2^- 的清除作用, 阻断Haber-Weiss反应; 2. 对金属离子的络合作用, 降低·OH的产额; 3. 促进 H_2O_2 的积累, 加快Fenton反应。

关键词 超氧化物歧化酶; Haber-Weiss反应; Fenton反应; 羟自由基; 金属离子

EFFECTS OF CuZn-SUPEROXIDE DISMUTASE ON SEVERAL HYDROXYL RADICAL GENERATING SYSTEMS

Fu Aigen Wang Aiguo Luo Guanghua

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract The effects of CuZn-superoxide dismutase (SOD) on several hydroxyl radical generating systems were studied by using deoxyribose which reacted with hydroxyl radical to release thiobarbituric acid-reactivity compounds. When hydroxyl radical was formed in the $\text{Fe}^{3+} \cdot \text{O}_2^- \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ system, its formation was effectively inhibited by SOD, and just slightly inhibited by inactive SOD or bovine serum albumin (BSA). In $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ or $\text{Cu}^{2+} \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ system, the hydroxyl radical production was significantly inhibited by BSA, inactive SOD, or SOD which had similar effect to that of inactive SOD. The hydroxyl radical generation from $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{O}_2^-$ system could be effectively suppressed by inactive SOD or BSA, but not by the "active" SOD which had little effect on hydroxyl radical generation from this system. It is suggested that SOD could affect the hydroxyl radical formation through the following pathways: 1. scavenging superoxide to inhibit Haber-Weiss reaction; 2. chelating metal ions to decrease hydroxyl radical formation; 3. accelerating H_2O_2 accumulation to enhance hydroxyl radical formation from Fenton reaction.

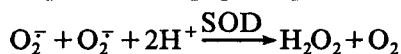
本文为国家自然科学基金项目

缩写: CuZn-SOD 铜锌超氧化物歧化酶; ·OH 羟自由基; O_2^- 超氧阴离子自由基; TBA 硫代巴比妥酸; NBT 氮蓝四唑; HX 次黄嘌呤; XO 黄嘌呤氧化酶; BSA 牛血清蛋白; dRib 脱氧核糖; PBS 磷酸缓冲溶液

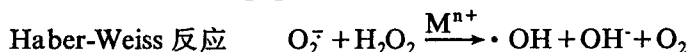
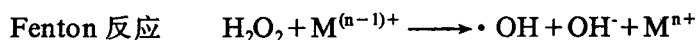
1996-01-23 收稿; 1996-05-21 修回

Key words Superoxide dismutase; Haber-Weiss reaction; Fenton reaction; Hydroxyl radical; Metal ions

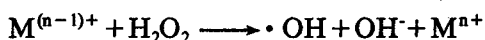
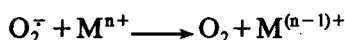
超氧化物歧化酶(SOD; E.C 1.15.1.1)是活性氧清除系统中最重要的酶。它催化超氧阴离子自由基(O_2^-)歧化成 H_2O_2 和 O_2 :



羟自由基($\cdot OH$)是化学性质最活泼的活性氧,它几乎能和生物体内所有的分子发生反应^[1]。在生物体内, $\cdot OH$ 主要由 Haber-Weiss 反应和 Fenton 反应产生^[2,3]:



Haber-Weiss 反应可分为两步:



因此决定 $\cdot OH$ 形成的主要因子有三个^[4,5]: O_2^- 、 H_2O_2 以及金属离子 M^{n+} 。 O_2^- 和 H_2O_2 分别是SOD的底物和产物,且SOD又是一金属蛋白,可见,SOD与 $\cdot OH$ 的形成有密切关系。

在此之前,也有一些作者探讨过SOD与 $\cdot OH$ 形成的关系^[6,7],但由于作者们所采用的 $\cdot OH$ 产生系统检测手段及观测的时间不同而导致他们得出的结论互不一致,因此目前对SOD与 $\cdot OH$ 形成关系的认识较为模糊。本文以Fenton反应和Haber-Weiss反应等几个经典 $\cdot OH$ 产生系统作为 $\cdot OH$ 源,用Sigma公司的SOD作为标准品,用脱氧核糖降解法为 $\cdot OH$ 的检测手段对SOD与 $\cdot OH$ 形成的关系进行了较为系统的研究,以期获得一个较为确切的结论。

1 材料与方法

牛血CuZn-SOD、TBA、NBT、HX、XO均来自Sigma公司,dRib来自Serva公司,BSA购于上海生化试剂厂;其余试剂都为国产分析纯。所有溶液皆用双蒸水配制。

失活SOD的制备:CuZn-SOD经沸水浴15min后,完全失活成失活SOD。

$\cdot OH$ 的测定:依王爱国的方法^[8], $\cdot OH$ 产生系统与1ml反应液(含25mmol/L pH7.8 PBS及2.5mmol/L dRib)于35℃保温1h,加TBA(1% w/v,在0.05mol/L NaOH中)1ml和冰乙酸1ml,充分混和,沸水浴30min,冷却后测 A_{532} ,以 A_{532} 的大小来表示 $\cdot OH$ 的产额。

2 实验结果

2.1 SOD对HX·XO系统中 $\cdot OH$ 产生的影响

HX·XO系统是一个最常采用的 O_2^- 产生系统,1993年Mao等^[4]报道HX·XO系统也能产生 $\cdot OH$ 。为了证实此结论,我们用dRib对此系统进行了研究,并探讨了SOD对此系统的影响。表1说明单纯的HX·XO系统也可产生 $\cdot OH$,但 $\cdot OH$ 产额比较低;SOD在250u/ml

表1 CuZn-SOD对HX·XO系统中羟自由基产生的影响
Table 1 Effect of CuZn-SOD on the hydroxyl radical formation from the HX·XO system

处理 Treatment		$\cdot OH$ yield (A_{532})
(1) blank (dRib+PBS)		0.061 ± 0.001
(2) HX+XO		0.071 ± 0.002
(3) HX+XO+SOD (u/ml)	10	0.065 ± 0.002
	50	0.064 ± 0.001
	100	0.064 ± 0.002
	250	0.066 ± 0.002
	500	0.074 ± 0.003
	750	0.085 ± 0.002

以下时,对HX·XO系统的·OH产生有轻微抑制作用;当SOD浓度大于500u/ml时,SOD对HX·XO系统中·OH产生有一定的促进作用,但·OH产额上升的幅度很小;总的来说,SOD对其影响不太大。

2.2 SOD对Fenton反应中·OH产生的影响

Fenton反应是最常采用的一种·OH产生系统,很多金属离子可和H₂O₂发生Fenton反应,人们常采用Fe²⁺、Cu²⁺或Fe³⁺和H₂O₂一起构成Fenton反应。图1表明Fe²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺三种离子在Fenton反应中产生·OH的效率。可以看出,Fe³⁺在Fenton反应中产生·OH的效率很低,Fe²⁺和Cu²⁺有较高的效率,其中尤以Cu²⁺为甚。

SOD对Fe²⁺·H₂O₂系统中·OH的产生有明显的抑制作用(图2),SOD浓度越大,抑制作用越强;而BSA和失活SOD对Fe²⁺·H₂O₂反应系统产生的·OH也有明显的抑制作用,在等同摩尔浓度时,BSA的作用大于SOD,SOD的作用与失活SOD的作用相仿。三种蛋白的抑制作用大小依次为:BSA>SOD≈失活SOD。

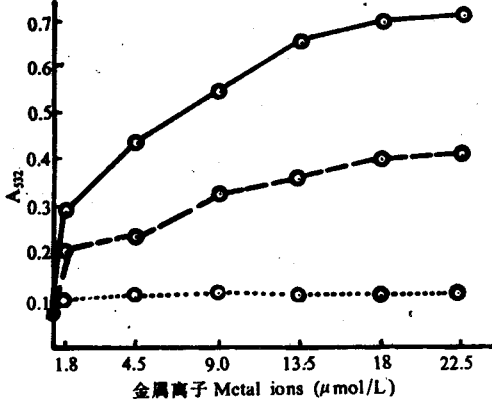


图1 金属离子与H₂O₂反应产生羟自由基的效率
Fig. 1 Hydroxyl radical formation from H₂O₂ plus metal ions (H₂O₂: 5mmol/L, ions: 1.8-22.5μmol/L)
○—○ CuSO₄; ○- -○ FeSO₄;
○- - -○ FeCl₃

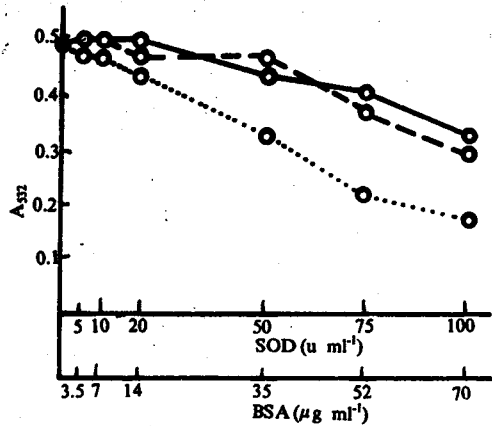


图2 SOD对Fe²⁺·H₂O₂系统中羟自由基产生的影响
Fig. 2 Effect of SOD on hydroxyl radical formation from Fe²⁺·H₂O₂ system (control: 20μmol/L FeSO₄+5mmol/L H₂O₂)
○—○ SOD; ○- -○ 失活SOD; ○- - -○ BSA

SOD对Cu²⁺·H₂O₂系统中·OH的产生也有明显的抑制作用(图3),BSA与失活SOD也能抑制Cu²⁺·H₂O₂系统中·OH的产生,三种物质对此系统的影响与它们对Fe²⁺·H₂O₂系统的作用相似,抑制作用的大小依次为:BSA>SOD≈失活SOD。

2.3 SOD对Fe²⁺·O₂⁻·H₂O₂系统中·OH的影响

在HX·XO中加入Fe³⁺和H₂O₂就构成了典型的Haber-Weiss反应系统,此系统中·OH的产额比HX·XO系统有明显的增加(图4与表1对比),SOD对Fe³⁺·O₂⁻·H₂O₂系统中·OH的产生的抑制作用明显;失活SOD和BSA对此系统中·OH的产生影响不大,当它们浓度较大时才有轻微的抑制作用;摩尔浓度相同时,三种蛋白的抑制作用大小依次为:SOD>BSA≈失活SOD。

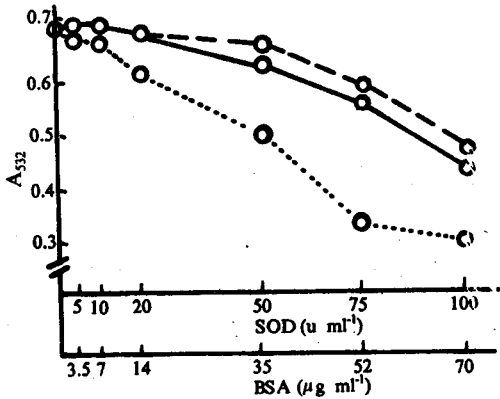


图3 SOD对Cu²⁺·H₂O₂系统中羟自由基产生的影响
Fig. 3 Effect of SOD on hydroxyl radical formation from Cu²⁺·H₂O₂ system (control: 10μmol/L CuSO₄+5mmol/L H₂O₂)
○—○ SOD; ◐--◐失活 SOD; ◑-----◑ BSA

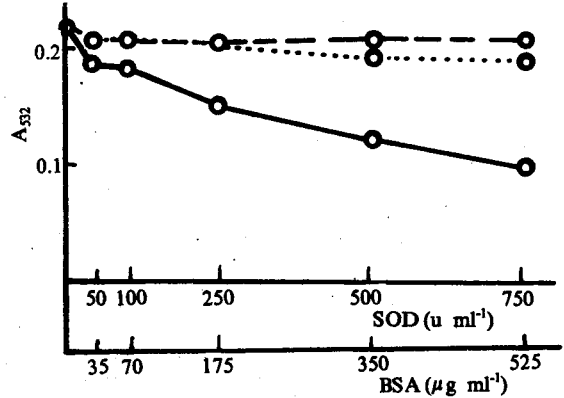


图4 SOD对Fe²⁺·O₂⁻·H₂O₂系统中羟自由基产生的影响
Fig. 4 Effect of SOD on hydroxyl radical formation from Fe²⁺·O₂⁻·H₂O₂ system (control: 0.4mmol/L HX+0.02u/ml XO+60μmol/L FeCl₃+0.1mmol/L H₂O₂)
○—○ SOD; ◐--◐失活 SOD; ◑-----◑ BSA

2.4 SOD对Fe²⁺·O₂⁻系统中·OH的影响

HX·XO系统产生·OH的量很少,加入Fe²⁺后·OH产额上升,此系统也是一个常为人们采用的·OH产生系统^[9,10]。HX·XO系统加入Fe²⁺后,A₅₃₂由原来的0.071(表1)增至0.244(图5),失活SOD和BSA都能降低Fe²⁺·O₂⁻系统中·OH产额,相反,SOD对它却没有明显的影响。三种蛋白对Fe²⁺·O₂⁻中·OH产生的抑制作用依次为:BSA>失活SOD>SOD。

3 讨论

影响·OH产生的几个主要因素为:O₂⁻、H₂O₂和金属离子,SOD可以控制这三个因子的水平以影响·OH的产生。

在Fenton反应中,CuZn-SOD对·OH产生有明显的抑制作用,失活SOD对它也有抑制作用,二者的抑制效果相差无几,这说明SOD的活性对Fenton反应没有什么作用;BSA是一种非金属蛋白,它可以抑制Fenton反应·OH的产生。顺磁共振技术(ESR)说明^[11],在溶液中蛋白质分子对金属离子有一定的络合作用,一般蛋白质与金属离子的络合比为1:1,这主要是因为蛋白分子中的氨基酸残基的作用,特别是组氨酸残基与半胱氨酸残基。由此看来,SOD对Fenton反应的影响可能是SOD作为一种蛋白络合了系统中的金属离子,使自由金属离子量减少,因而系统中·OH产额下降。BSA由于本身不含金属离子,它络合离子的能力可能大于SOD,所以它对Fenton反应的影响更大。

在Haber-Weiss反应中,SOD对·OH的产生有明显的抑制作用,而失活SOD、BSA不具

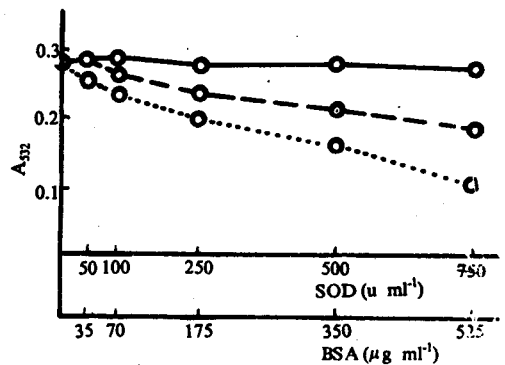
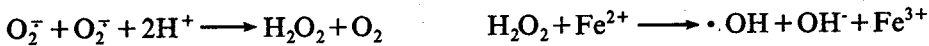


图5 SOD对Fe²⁺·O₂⁻系统中羟自由基产生的影响
Fig. 5 Effect of SOD on hydroxyl radical formation from Fe²⁺·O₂⁻ system (control: 0.4mmol/L HX+0.02u/ml XO+20μmol/L FeSO₄)
○—○ SOD; ◐--◐失活 SOD; ◑-----◑ BSA

备这种作用,可见SOD减少了Haber-Weiss反应的底物 O_2^- ,从而阻断了反应进行。虽然SOD的歧化作用会带来 H_2O_2 水平上升,但 Fe^{3+} 在Fenton反应中产生 $\cdot OH$ 的效率很低,远远比不上 Fe^{2+} 的效率,因此 H_2O_2 水平上升并不使 $\cdot OH$ 产额增加。在本文所采用的Haber-Weiss系统中,其中 Fe^{3+} 可能是过量的,不是 $\cdot OH$ 产生的直接限制因子,失活SOD与BSA虽然络合了一些 Fe^{3+} ,但剩下的 Fe^{3+} 足以推动反应进行,因此,失活SOD及BSA对其影响较小。

在 $Fe^{2+} \cdot O_2^-$ 系统中的情况比较复杂,首先由 O_2^- 缓慢地自动歧化成 H_2O_2 和 O_2 , H_2O_2 再和 Fe^{2+} 发生Fenton反应^[4]产生 $\cdot OH$:



失活SOD和BSA对此系统中 $\cdot OH$ 的产生均有明显的抑制作用,可能是因为它们络合了系统中的 Fe^{2+} ,减少了自由 Fe^{2+} 的量。SOD对 $Fe^{2+} \cdot O_2^-$ 的 $\cdot OH$ 产生既没有抑制作用,也没有促进效果,这可能是因为SOD对此系统有两方面的作用:(1)SOD络合 Fe^{2+} ,降低了 $\cdot OH$ 的产额;(2)SOD催化 O_2^- 的歧化,造成 H_2O_2 的积累,有利于 $\cdot OH$ 的形成。正是由于这两种正负效应同时存在,且效率相仿,在表观上SOD对 $Fe^{2+} \cdot O_2^-$ 系统中 $\cdot OH$ 产生没有多大影响。

综合看来,SOD对 $\cdot OH$ 产生系统有三方面的影响:(1)作为一种蛋白,SOD可以络合金属离子而降低 $\cdot OH$ 的产额;(2)SOD能快速地减少 O_2^- ,对Haber-Weiss反应中 $\cdot OH$ 的产生有抑制作用;(3)SOD催化 O_2^- 的同时带来了 H_2O_2 的积累,因而促进Fenton反应的进行,提高 $\cdot OH$ 的产额。SOD对 $\cdot OH$ 的影响主要有这三方面的效应,SOD对一个 $\cdot OH$ 产生系统的最终影响,取决于上述三种效应叠加的结果。因此,SOD对 $\cdot OH$ 产生的影响并不总是表现为抑制作用,在某些情况下SOD也能促进 $\cdot OH$ 的产生^[12],这值得引起人们的关注。

参考文献

- 1 Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*, 1989, 58:79-100
- 2 Bowler C et al. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol & Plant Mol Biol*, 1992, 43:83-116
- 3 Garry R B. The spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. In: Oberley L W ed. *Superoxide Dismutase Vol II*, Boca Raton, Florida: CRC press, 1985:63-78
- 4 Mao G D et al. Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. *J Biol Chem*, 1993, 268:416-420
- 5 Gutteridge J M C et al. Superoxide dismutase and Fenton chemistry. *Biochem J*, 1990, 269:169-174
- 6 Gutteridge J M C, Bannister J U. Copper+zinc and manganese superoxide dismutase inhibit deoxyribose degradation by the superoxide-driven Fenton reaction at two different stages. *Biochem J*, 1986, 234:225-228
- 7 Rowley D A, Halliwall B. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: A physiologically significant reaction? *Arch Biochem & Biophys*, 1983, 225:279-284
- 8 王爱国, 罗广华. 羟自由基启动脱氧核糖降解及TBA反应. *生物化学与生物物理进展*, 1993, 20:150-152
- 9 王爱国等. 羟自由基对水杨酸羟基化作用的反应条件. *中国科学院华南植物研究所集刊*, 第八集, 北京:科学出版社, 1992, 73-79
- 10 Richmond R et al. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals: Detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds. *Anal Biochem*, 1981, 118:328-335
- 11 Eilat S et al. The analogous mechanisms of enzymatic inactivation induced by ascorbate and superoxide in the presence of copper. *J Bio Chem*, 1983, 258(24):14778-14783
- 12 Iwashashi H et al. Superoxide dismutase enhances the formation of hydroxyl radicals in the reaction of 3-hydroxyanthranilic acid with molecular oxygen. *Biochem J.*, 1988, 251:893-899