

## 铜锌超氧化物歧化酶与过氧化氢反应中羟自由基的形成

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离体条件下 Cu,Zn-SOD 与  $H_2O_2$  反应产生  $\cdot OH$ , 并对其机理进行了探讨。  $H_2O_2$  可使 Cu,Zn-SOD 失活, 在失活过程中有  $\cdot OH$  产生, 甲酸钠和苯甲酸钠均能不同程度地保护 Cu,Zn-SOD 和降低  $H_2O_2$  与 Cu,Zn-SOD 反应中  $\cdot OH$  的产额; 热失活 SOD 也可和  $H_2O_2$  反应生成  $\cdot OH$ , 且效能高于活性 Cu,Zn-SOD; 用螯合剂脱去 Cu,Zn-SOD 的金属辅基后, 脱辅基的 SOD 蛋白不能和  $H_2O_2$  反应产生  $\cdot OH$ ;  $Cu^{2+}$  和  $H_2O_2$  反应产生  $\cdot OH$  的效率很高, 而  $Zn^{2+}$  产生  $\cdot OH$  的效率很低。 实验结果提示 Cu,Zn-SOD 与  $H_2O_2$  反应产生的  $\cdot OH$  可能是 SOD 活性中心的  $Cu^{2+}$  与  $H_2O_2$  发生 Fenton 反应的结果。

**关键词** 铜锌超氧化物歧化酶; 过氧化氢; 羟自由基; 铜离子; 脱氧核糖降解法

**分类号** Q55

## THE GENERATION OF HYDROXYL RADICALS FROM COPPER, ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE REACTING WITH $H_2O_2$

Fu Aigen Wang Aiguo Lou Guanghua

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

**Abstract** The generation of  $\cdot OH$  from Cu,Zn-containing superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) reacting with  $H_2O_2$  was studied by using deoxyribose degradation method in which deoxyribose reacts with  $\cdot OH$  to release TBA-reactive compounds. Cu,Zn-SOD could be inactivated by  $H_2O_2$ , during which  $\cdot OH$  was produced. Formate and benzoate, scavengers of  $\cdot OH$ , could partially protect Cu,Zn-SOD against inactivation by  $H_2O_2$ , and could inhibit the generation of  $\cdot OH$  from Cu, Zn-SOD reacting with  $H_2O_2$ . Heat inactivated Cu,Zn-SOD could also react with  $H_2O_2$  to generate  $\cdot OH$ , and it was more effective in generating  $\cdot OH$  than the active Cu,Zn-SOD. Apoprotein of Cu,Zn-SOD did not catalyze  $\cdot OH$  generation from  $H_2O_2$ .  $Zn^{2+}$  could hardly react with  $H_2O_2$  to form  $\cdot OH$ , whereas  $Cu^{2+}$  was highly effective in generating  $\cdot OH$  through Fenton

国家自然科学基金、广东省自然科学基金资助项目

缩写 Abbreviations: Cu,Zn-SOD: 铜锌超氧化物歧化酶 Copper-zinc superoxide dismutase;  $\cdot OH$ : 羟自由基 Hydroxyl radical; D-O-R: 脱氧核糖 Deoxyribose; PBS: 磷酸缓冲液 Phosphate buffer solution; TBA: 硫代巴比妥酸 Thiobarbituric acid; CAT: 过氧化氢酶 Catalase; NBT: 氮蓝四唑 Nitroblue tetrazolium.

1996-10-11 收稿; 1998-03-10 修回

reaction. These observations suggest that the generation of  $\cdot\text{OH}$  from Cu,Zn-SOD reacting with  $\text{H}_2\text{O}_2$  is due to the Fenton reaction between  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{Cu}^{2+}$  in the active center of Cu,Zn-SOD.

**Key words** Copper-zinc superoxide dismutase; Hydrogen peroxide; Hydroxyl radical; Copper ion; Deoxyribose degradation method

在生物体内, 羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 主要是通过 Haber-Weiss 反应和 Fenton 反应产生<sup>[1,2]</sup>, 这两个反应中, 金属离子的作用十分重要。生物体内的金属离子大都以络合形式存在于细胞中。细胞中的很多蛋白质都含有金属离子, 可以将蛋白质视为机体内的一个重要的离子库, 因此探讨金属蛋白在生物体内发生 Fenton 反应的可能性成为目前国内外很多学者关注的问题。1984 年 Sadrzadeh<sup>[3]</sup> 首先发现人的血红蛋白可以促进和参与  $\cdot\text{OH}$  的形成。Puppo<sup>[4]</sup> 于 1988 年在植物中发现豆血红蛋白也可以和  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应产生  $\cdot\text{OH}$ 。

铜锌超氧化物歧化酶 (Cu,Zn-SOD) 是生物体内普遍存在的一种金属蛋白, 其主要功能是催化  $\text{O}_2$  歧化反应成  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2$ , 它是活性氧清除酶系中最重要的酶。Cu,Zn-SOD 催化反应的产物之一是  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 这使得 Cu,Zn-SOD 周围的  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度高于细胞中其它部位<sup>[5]</sup>, 因此 Cu,Zn-SOD 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  发生 Fenton 反应而产生  $\cdot\text{OH}$  的可能性很大。本文出于这种考虑, 应用脱氧核糖 (D-O-R) 降解法对 Cu,Zn-SOD 参与  $\cdot\text{OH}$  的产生进行了研究。

## 1 材料与方法

**材料** 牛血 Cu,Zn-SOD、TBA、NBT、CAT 均来自于美国 Sigma 公司, D-O-R 来自德国 Serva 公司, 甲硫氨酸、核黄素来自于上海生化试剂厂, 其余试剂皆为国产分析纯; 所有溶液都用双蒸水配制。

**SOD 活性测定** 按照王爱国的 NBT 还原法<sup>[6]</sup>。在反应液中加入  $30 \text{ U ml}^{-1}$  CAT 以消除系统中产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。

**$\cdot\text{OH}$  测定** 依照王爱国的脱氧核糖降解法<sup>[7]</sup>, 以  $A_{532}$  的大小表示  $\cdot\text{OH}$  的产额。

**Cu,Zn-SOD 中  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  的去除** 用李益新等改进的 Fee 法进行<sup>[8]</sup>。

## 2 实验结果

### 2.1 $\text{H}_2\text{O}_2$ · Cu,Zn-SOD 反应系统中的 $\cdot\text{OH}$ 产生

单独的  $\text{H}_2\text{O}_2$  或 Cu,Zn-SOD 所引发的 D-O-R 降解程度很低,  $A_{532}$  几乎和空白值一样, 可见单独的  $\text{H}_2\text{O}_2$  或 Cu,Zn-SOD 不会产生  $\cdot\text{OH}$ 。将  $\text{H}_2\text{O}_2$  加入 Cu,Zn-SOD 组成  $\text{H}_2\text{O}_2$  · Cu,Zn-SOD 反应系统后, 则 D-O-R 降解程度加大,  $A_{532}$  明显上升 (表 1), 这说明 Cu,Zn-SOD 能与  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应产生  $\cdot\text{OH}$ , 且  $\cdot\text{OH}$  的产额随 Cu,Zn-SOD 浓度及  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度上升而增加。

$\text{H}_2\text{O}_2$  对 Cu,Zn-SOD 的活性有明显的抑制作用。5 mmol/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 1 h 可使 Cu,Zn-SOD 的活性只有原来的 7.1% (图 1)。相对而言,  $\text{H}_2\text{O}_2$  是个活性较弱、毒性较小的活性氧, 学者们普遍认为  $\text{H}_2\text{O}_2$  不是损伤 Cu,Zn-SOD 的直接因子<sup>[9,10]</sup>。甲酸钠和苯甲酸钠都是  $\cdot\text{OH}$  的清除剂, 在  $\text{H}_2\text{O}_2$  · Cu,Zn-SOD 系统中加入甲酸钠和苯甲酸, 它们都能不同程度地保护

Cu,Zn-SOD 的活性(图 1)。甲酸钠在 100 mmol/L 浓度时能使 SOD 活性保持 53.1%，苯甲酸钠的保护作用比甲酸钠差一些，浓度为 100 mmol/L 只能使 SOD 活性保持在 30% 左右。

表 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·Cu,Zn-SOD 系统中·OH 的产生

Table 1 ·OH formation from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·Cu,Zn-SOD system

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mmol/L)	SOD (U ml <sup>-1</sup> )	A <sub>532</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mmol/L)	SOD (U ml <sup>-1</sup> )	A <sub>532</sub>
5	0	0.070 ± 0.001	0	500	0.060 ± 0.001
5	10	0.101 ± 0.001	0.01	500	0.066 ± 0.001
5	50	0.113 ± 0.001	0.1	500	0.074 ± 0.001
5	100	0.123 ± 0.002	0.5	500	0.082 ± 0.001
5	250	0.137 ± 0.001	1.0	500	0.103 ± 0.003
5	500	0.156 ± 0.002	2.5	500	0.131 ± 0.002
5	750	0.173 ± 0.003	5.0	500	0.160 ± 0.002

空白 (D-O-R + PBS) 的 A<sub>532</sub> 为: 0.060 ± 0.001

A<sub>532</sub> of blank (D-O-R + PBS): 0.060 ± 0.001

甲酸钠和苯甲酸钠加入到 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·Cu,Zn-SOD 反应系统中，它们也能不同程度地抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·Cu,Zn-SOD 反应系统对 D-O-R 的降解作用(图 2)，此结果反面地证明了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·Cu,Zn-SOD 反应系统产生了·OH。其中甲酸钠对 Cu,Zn-SOD 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应产生的·OH 的抑制作用高于苯甲酸钠。

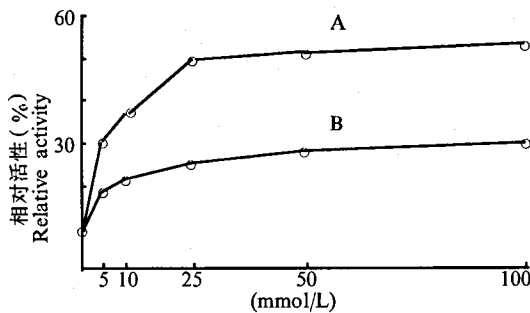


图 1 ·OH 清除剂对 Cu,Zn-SOD 的保护作用

Fig. 1 Protective effects of ·OH scavengers on the activity of Cu,Zn-SOD

溶液含 25 mmol/L PBS、5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、500 U ml<sup>-1</sup> SOD 及甲酸钠 (A)、苯甲酸钠 (B)  
The solution containing 25 mmol/L PBS, 5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 500 U ml<sup>-1</sup> SOD in the presence of formate (A) and benzoate (B)

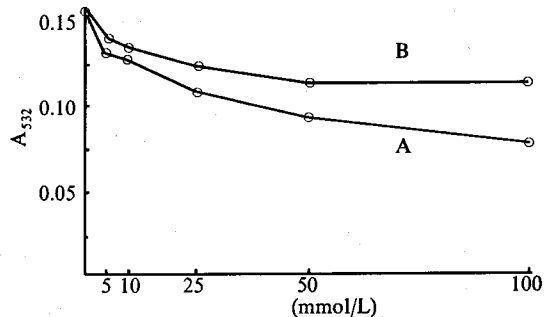


图 2 ·OH 清除剂对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·Cu,Zn-SOD 系统中·OH 产生的影响

Fig. 2 Effects of ·OH scavengers on the ·OH formation from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·Cu,Zn-SOD system

溶液含 25 mmol/L PBS、5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、500 U ml<sup>-1</sup> SOD 及甲酸钠 (A)、苯甲酸钠 (B)，A<sub>532</sub> 空白值 (D-O-R + PBS): 0.070

The solution containing 25 mmol/L PBS, 5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 500 U ml<sup>-1</sup> SOD in the presence of formate (A) and benzoate (B). A<sub>532</sub> of blank (D-O-R + PBS): 0.070

## 2.2 Cu,Zn-SOD 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应产生·OH 的机理

**失活 SOD 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的反应** Cu,Zn-SOD 经沸水浴 15 min 后完全失活成失活 SOD。将失活 SOD 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应也可产生·OH(图3)，经换算，0.9、2.25、4.5、6.75 μmol/L 的失活 SOD 与 100、250、500、750 U ml<sup>-1</sup> 的活性 SOD 浓度相等，失活的 Cu,Zn-SOD 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应

产生·OH的效率高于相同浓度的活性Cu,Zn-SOD(图3与表1)。可见,参与·OH的形成并不是活性Cu,Zn-SOD所固有的特征,酶本身的催化活性对于参与·OH的形成并不是关键性的。

**脱辅基Cu,Zn-SOD与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的反应** 用螯合剂将Cu,Zn-SOD中的Cu<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>脱去,使之成为不含金属离子辅基的SOD蛋白。从图4中可以看出,脱辅基的SOD与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>反应不会造成D-O-R的降解,无金属辅基的SOD蛋白不具备与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生·OH的功能。可以说,Cu,Zn-SOD的蛋白部分与·OH的形成没有明显的直接关系。

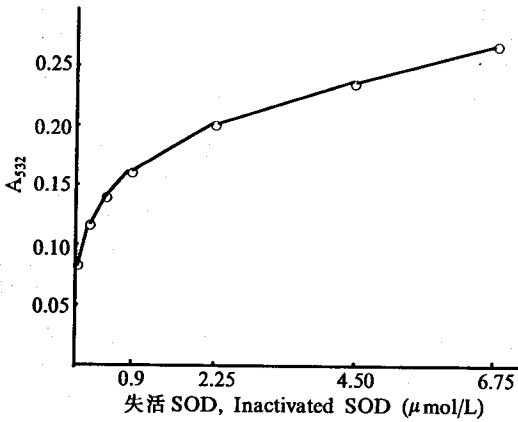


图3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>与失活Cu,Zn-SOD反应过程中·OH的产生

Fig. 3 ·OH formation from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reacting with inactivated Cu,Zn-SOD system

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 5 mmol/L; A<sub>532</sub>空白值(D-O-R+PBS): 0.065, A<sub>532</sub> of blank (D-O-R+PBS): 0.065

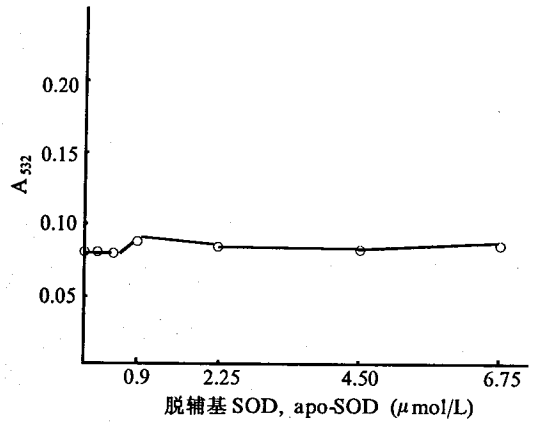


图4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>与脱辅基Cu,Zn-SOD反应过程中·OH的产生

Fig. 4 ·OH formation from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus apo-Cu,Zn-SOD

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 5 mmol/L; A<sub>532</sub>空白值(D-O-R+PBS): 0.070, A<sub>532</sub> of blank (D-O-R+PBS): 0.070

**Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的反应** 金属离子和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>相结合构成产生·OH的经典反应—Fenton反应。Cu,Zn-SOD中含有Cu<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>两种离子,既然Cu,Zn-SOD的蛋白部分与·OH的形成没有直接关系,那么这两种离子可能和Cu,Zn-SOD参与·OH的形成有直接相关性。图5比较了Cu<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>在Fenton反应中产生·OH的效率;可以看出,Cu<sup>2+</sup>在Fenton反应中能很好地分解H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生·OH,而Zn<sup>2+</sup>在Fenton反应中催化产生·OH的效率很低,·OH的产生几乎没有增加。

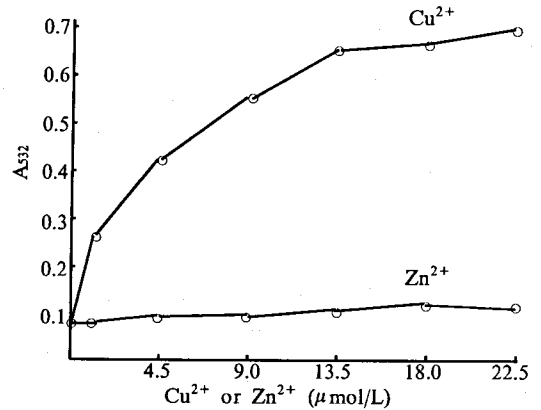


图5 Fenton反应中·OH的产生

Fig. 5 ·OH formation from Fenton reaction by Cu<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup>

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 5 mol/L, Cu<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup>: 1.8—22.5 μmol/L, A<sub>532</sub>空白值(D-O-R+PBS): 0.083, A<sub>532</sub> of blank (D-O-R+PBS): 0.083

### 3 讨论

本文用脱氧核糖降解法作为·OH的检测手

段,证明了Cu,Zn-SOD在 $H_2O_2$ 存在下可参与 $\cdot OH$ 产生,并探讨了Cu,Zn-SOD参与 $\cdot OH$ 产生的机理。

1990年Yim<sup>[11]</sup>用ESR法首次发现在Cu,Zn-SOD被 $H_2O_2$ 失活的过程中有 $\cdot OH$ 信号的产生。他认为只有活性Cu,Zn-SOD才可催化 $H_2O_2$ 产生 $\cdot OH$ ,参与 $\cdot OH$ 的产生是活性SOD的特征之一;并认为Cu,Zn-SOD具有过氧化物酶活性。但我们的实验证明热失活的Cu,Zn-SOD也可和 $H_2O_2$ 反应产生 $\cdot OH$ ,这说明参与 $\cdot OH$ 的形成并不是活性SOD独有的特性, $\cdot OH$ 的产生与SOD是否处于活性状态关系不大。SOD脱去金属辅基后不能有效地参与 $\cdot OH$ 的形成,由此可见Cu,Zn-SOD的蛋白部分与 $H_2O_2$ 反应产生 $\cdot OH$ 的可能性很小,Cu,Zn-SOD参与 $\cdot OH$ 产生的关键因子可能是SOD所含的金属离子。

Cu,Zn-SOD所含的两种金属离子当中, $Zn^{2+}$ 在Fenton反应中与 $H_2O_2$ 产生 $\cdot OH$ 的效率很低,可以认为 $Zn^{2+}$ 对于Cu,Zn-SOD参与 $\cdot OH$ 产生的作用不是主要的。另一个金属辅基 $Cu^{2+}$ 与 $H_2O_2$ 发生Fenton反应产生 $\cdot OH$ 的效率很高。所有的实验结果提示Cu,Zn-SOD在 $H_2O_2$ 存在时参与 $\cdot OH$ 的形成是由于Cu,Zn-SOD活性中心的 $Cu^{2+}$ 与 $H_2O_2$ 发生Fenton反应的结果。但是等摩尔浓度的Cu,Zn-SOD参与产生 $\cdot OH$ 的效率大大低于等摩尔浓度的 $Cu^{2+}$ (图5与表1),这可能是因为SOD活性中心的 $Cu^{2+}$ 与 $H_2O_2$ 产生的 $\cdot OH$ 大部分和SOD本身结合了,而 $\cdot OH$ 的作用时间和作用半径都很小,在SOD外围的探针分子D-O-R捕捉到的 $\cdot OH$ 不多。

我们推测 $H_2O_2$ 与SOD的反应过程如下: $H_2O_2$ 通过扩散作用到达SOD的活性中心,在活性中心与 $Cu^{2+}$ 发生Fenton反应产生 $\cdot OH$ ;产生的 $\cdot OH$ 攻击SOD,导致SOD的结构发生变化。热失活SOD由于预先受损,它所含的 $Cu^{2+}$ 可能比活性SOD中的 $Cu^{2+}$ 更加暴露或游离于外周环境中,Fenton反应比较容易进行,因而 $\cdot OH$ 产额更高一些。

一般生理条件下,细胞产生 $H_2O_2$ 的速率约为 $0.1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ <sup>[5]</sup>,若生物体处于逆境条件下, $H_2O_2$ 的产生速率则更高一些。SOD催化的歧化反应是细胞中 $H_2O_2$ 的主要来源,SOD周围的 $H_2O_2$ 浓度肯定高于细胞中其它部位。如果SOD周围的 $H_2O_2$ 不能及时被清除掉,则Cu,Zn-SOD与 $H_2O_2$ 反应而产生 $\cdot OH$ 的可能性很大。近年来,有一些学者<sup>[12,13]</sup>发现高水平的SOD可促进活性氧对机体的伤害作用,这可能与Cu,Zn-SOD参与 $\cdot OH$ 的产生有关。

## 参考文献

- 1 Garry R B. The spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. Oberlay L W eds. Superoxide Dismutase. CRC Press, London, 1983, II, 63-87
- 2 Bowler C, Van Montagu M, Inzé D. Superoxide dismutase and stress tolerance. Annu Rev Plant Physiol & Plant Mol Biol, 1992, 43:83-116
- 3 Sadrzadeh S M H, Graf E, Panter S S et al. Hemoglobin: A biological Fenton reagent. J Biol Chem, 1984, 259: 14354-14357
- 4 Puppo A, Halliwell B. Generation of hydroxyl radicals by soybean nodule leghaemoglobin. Planta, 1988, 173: 405-410
- 5 Yim M B, Chock P B, Stadtman E R. Enzyme function of copper,zinc superoxide dismutase as a free radical

- generator. *J Biol Chem*, 1993, 268(6):4099-4105
- 6 王爱国, 罗广华, 邵从本等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. *植物生理学报*, 1983, 9(1):77-83
  - 7 王爱国, 罗广华. 羟自由基启动下的脱氧核糖降解及其产物的TBA反应. *生物化学与生物物理进展*, 1993, 20(2):150-152
  - 8 李益新, 方允中, 刘智峰. 铜锌超氧化物歧化酶的重组研究 I. 铜锌的去除与重组. *生物化学与生物物理学报*, 1984, 16(5):472-479
  - 9 Hodgson E K, Fridovich I. Interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: Inactivation of the enzyme. *Biochemistry*, 1975, 14:5294-5299
  - 10 Blech D M, Borders C L Jr. Hydroperoxide anion,  $\text{HO}_2^-$ , is an affinity reagent for the inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase: Modification of one histidine per subunit. *Arch Biochem Biophys*, 1983, 224:579-586
  - 11 Yim M B, Chock P B, Stadtman E R. Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:5006-5010
  - 12 Elroystein O, Groner Y. Impaired neurotransmitter uptake in PC12 cells overexpressing human Cu/Zn-superoxide dismutase— Implication for gene dosage effects in down syndrome. *Cell*, 1988, 52:259-267
  - 13 Scott M D, Meshnick S R, Eaton J W. Superoxide dismutase amplifies organismal sensitivity to ionizing radiation. *J Biol Chem*, 1989, 264:2498-2503