

谷胱甘肽过氧化物酶

周 玫 陈 媛

(第一军医大学,广州)

谷胱甘肽过氧化物酶(即硒谷胱甘肽过氧化物酶 Se-GSH-PX)是 1957 年由 Mills^[1]在牛红细胞(RBC)中发现的。在有谷胱甘肽(GSH)存在时它可防止血红蛋白被过氧化氢氧化。同年 Schwarz 等^[2]发现硒有抗氧化作用。为了搞清硒与 GSH-PX 的关系,许多学者给动物摄入不同量和不同类型的硒,然后对不同组织 GSH-PX 活性的变化进行研究。1973 年 Rotruck 等^[3]用 ⁷⁵Se, Flohe' 等^[4]用中子活化实验确定硒是 Se-GSH-PX 的组成成分。1976 年 Lawrence 等^[5]发现组织中还存在一种不含硒的 GSH-PX。

GSH-PX 是细胞内抗脂质过氧化作用的酶性保护系统的主要成分之一,它与维生素 E 协同地保护细胞免受脂质过氧化损伤^[6]。Se-GSH-PX 和超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)一起,通过去除 O₂⁻ 和 H₂O₂以减轻和阻断脂质过氧化作用的一级引发作用,Se-GSH-PX 和 non-Se-GSH-PX 通过还原氢过氧化物来减轻和阻止二级引发作用。随着人们对脂质过氧化作用及其在某些疾病发生中的意义不断地被认识^[7],作为抗氧化酶的 GSH-PX 也日益引起医学和生物学工作者的注意。本文主要就 GSH-PX 的生化特性加以讨论。

一、Se-GSH-PX 的分子结构

从大鼠肝、肺组织以及牛、绵羊和人的 RBC 中分离纯化的 Se-GSH-PX,其催化性质都是相同的,但它们的分子量和在 DEAE 柱上的洗脱谱却不完全相同,说明 Se-GSH-PX 有同工酶^[8-10]。如大鼠肺的 Se-GSH-PX 的分子量为 84,000±5,000,肝的则为 76,000±1,000。它们都是由四个相同的亚基所组成。大鼠肝 Se-GSH-PX 的亚基含 153 个氨基酸;牛 RBC 的含 178

个氨基酸,并已初步测定了它们的排列顺序^[11]。

虽然 Se-GSH-PX 没有核苷酸和可透析的辅酶,但紫外吸收谱显示它有一个较其它没有核苷酸和辅酶的蛋白质更为宽的吸收峰,研究说明这是由于硒发色团所致,可能的结构是 RSSe SR' 或 RSSeR'^[8,10]。Se-GSH-PX 的辅基是硒代半胱氨酸。

对大鼠肝组织及人和牛 RBC 的 Se-GSH-PX 研究证实,每个酶含有 4 个原子 Se^[4],以硒醇(-SeH)型残基存在,此外还含有 8 个巯基^[12]。对结晶的牛 RBC 的 Se-GSH-PX 进行圆二色性测定说明,其大约 2.5% 是螺旋状^[13];用 X 光衍射观察三维结构发现其亚基近球形,半径为 18.7 Å^[11]。

Se-GSH-PX 四聚体是由两个二聚体组成,呈扁平形,体积为 90.4 × 109.5 × 58.6 Å,Se 位于酶的表面。二聚体的 Se 间距离最近是 21 Å,因此即使是在氧化型也不会形成二硒键^[11,14]。活性中心可能是在两个亚基的交界处,包含一个 Se 原子,四聚体的活性中心的数目尚未确定,估计不是四个硒都有催化活性。还原型 Se-GSH-PX 的催化部位是 Se-Cys 的硒醇^[10,11]。

二、Se-GSH-PX 的生物合成 —— Se 掺入 Se-GSH-PX 的途径

研究^[11]发现,食用高浓度硒时,例如亚硒酸盐,硒代甲硫氨酸(Se-Met)和硒代胱氨酸(Se-Cys-Cys),它们在体内合成 Se-GSH-PX 的生物效能相似。如缺硒大鼠一次口服大剂量硒(300 μgSe/90 克),亚硒酸盐或 Se-Met 后 48 小时,可使肝、肾、小肠和胃的 Se-GSH-PX 活性同样地增加,但在防止大鼠肝坏死和鸡渗出性素质时,则发现亚硒酸盐的效果较 Se-Met 和 Se-

Cys-Cys 为好。这可能是 Se-Met 和 Se-Cys-Cys 中的 Se 生物利用效率要受到相应的氨基酸供应量的影响。Sunde 等认为 Se-Met 和甲硫氨酸(Met)的代谢途径是一样的,当 Met 供应不足时,大部分 Se-Met 就掺入到机体合成的一般蛋白质中,在这些蛋白质降解之前,Se 不能用来合成 Se-GSH-PX。

但唯一例外是防止鸡胰腺退行性病变时,Se-Met 的生物效能是亚硒酸盐的四倍。这可能是由于胰腺组织与其它组织相比,Met 和 Se-Met 的分解代谢速率较快,释放较多的 Se 可供 Se-GSH-PX 合成;也可能硒或 Se-Met 本身对鸡胰腺具有与 Se-GSH-PX 无关的特殊功能。

Se 如何掺入 Se-GSH-PX, Hawkes 等(1978)^[13]曾提出 Se-Cys 经专门的 Se-Cys-tRNA 直接掺入 GSH-PX 骨架。但 Sunde 和 Hoekstra (1980)^[11,16]则认为是由无机硒化物在酶催化下与翻译后的前 GSH-PX(Pre-GSH-PX) 骨架上的氨基酸残基脱氢丙氨酸(dehydroalanine)、丝氨酸或半胱氨酸结合,再经酶修饰转变成 Se-GSH-PX,并由此提出了 Se-GSH-PX 合成时硒可能的转变途径(图 1)。

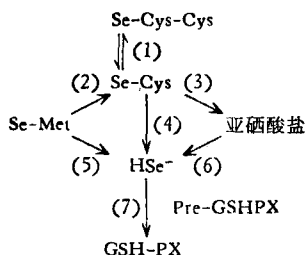


图 1 硒代谢的途径

(1)~(3) 类似于含硫氨基酸的代谢 (4) 硒胱氨酸降解放出 HSe⁻ (5) 硒甲硫氨酸降解放出 HSe⁻ (6) 亚硒酸盐还原成硒化物 (7) 可能由 GSH-PX 硒半胱氨酸合成酶催化

三、non-Se-GSH-PX

除了 Se-GSH-PX 外还有一种不含硒的谷胱甘肽过氧化物酶 non-Se-GSH-PX。Se-GSH-PX 可以 H₂O₂ 和有机过氧化物为基质,而 non-Se-GSH-PX 只能以有机过氧化物为基质,不能利用 H₂O₂,这种酶是 Lawrence 和 Burk^[5] 通过

以下实验证实的。

将缺 Se 三个月的大鼠,取肝制成匀浆,将其上清液经凝胶过滤,测定不同组份的 GSH-PX 活性,并以正常大鼠作为对照。当以 H₂O₂ 和异丙基苯氢过氧化物(cumene OOH)为基质时,对照组可测得峰 I 和峰 II(图 2A);如以 H₂O₂ 为基质,则仅测出峰 I;缺 Se 大鼠不论以 H₂O₂ 或 Cumene OOH 为基质均测不出峰 I,只有峰 II。说明峰 I 是 Se-GSH-PX,峰 II 是 non-Se-GSH-PX(图 2B)。

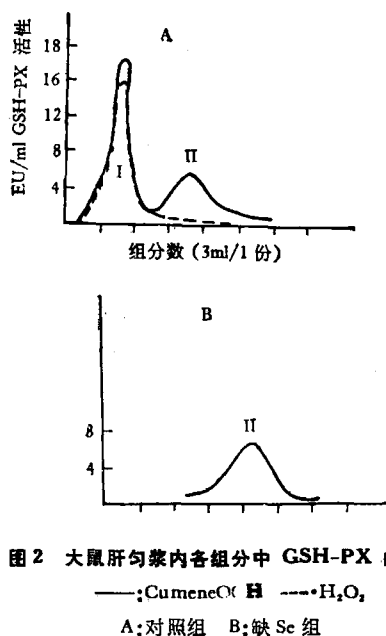


图 2 大鼠肝匀浆内各组份中 GSH-PX 的活性

——: Cumene OOH ---: H₂O₂
A: 对照组 B: 缺 Se 组

non-Se-GSH-PX 和 Se-GSH-PX 在不同种系或同一种系不同组织中的含量是不同的^[17]。两种 GSH-PX 的存在及组织细胞中两种酶活性的差异,部分地说明了不同组织和不同种系对缺硒的敏感性不同。

最近 Prohaska 和 Ganther^[18]以及 Pirce 和 Tappel^[19]证实 non-Se-GSH-PX 就是谷胱甘肽硫转移酶。

四、GSH-PX 的作用机制

Flohe^[10,11]对 Se-GSH-PX 的动力学研究说明,酶的作用是遵循乒乓机制,它包括三个双分子阶段。Ganther 等^[11,20]提出酶在硒醇-次亚

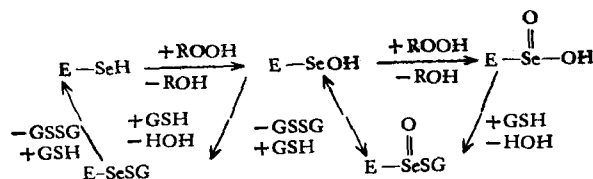


图3 Ganther 等提出的 GSH-PX 反应机制

硒酸-亚硒酸间循环(图3)。当组织中 GSH 浓度较高时酶将循环在硒醇-次亚硒酸之间。

这种反应机制可以解释酶不会被两种基质饱和,对大部分过氧化基质都有相似的最大反应速度(V_{max}),并且对氢过氧化物和 H_2O_2 的作用速度是相似的。

对 Se-GSH-PX 活性研究发现,Se-Cys 残基易和酸性烷化剂如碘乙酸或氯乙酸起反应,形成无活性型。但与中性烷化剂如碘乙酰胺或 N-乙基颀丁酰亚胺(NEM)则不起反应。这可能和邻近基团如组氨酸、精氨酸和芳香氨酸的侧链效应有关^[14]。酶的巯基(-SH)可以和中性烷化剂起反应。-SH 是否参与酶的活性中心仍不清楚,但中性烷化剂 NEM 可抑制血液中 Se-GSH-PX 的活性($4\mu M$ NEM 可使 1ml 全血 Se-GSH-PX 活性抑制 80%)。氰化物的抑制作用是与基质 GSH 相竞争,其竞争抑制常数 K_i 是 $0.95mM$ ^[19]。

non-Se-GSH-PX 与 Se-GSH-PX 不同,其作用是遵循序列机制^[10],每个酶分子约需有四个巯基才能有活性,碘乙酸完全不能使酶失活,而中性烷化剂 NEM 则能抑制其活性。

五、Se-GSH-PX 的生化活性

Little 和 O'Brien 试验发现,Se-GSH-PX 对氢过氧化物具有相对的专一性,能有效地还原亚油酸和亚麻油酸氢过氧化物以及异丙基苯和叔丁基氢过氧化物,产生相应的醇。当氢过氧化物中的氢被另一有机基团取代成 $ROOR'$ 过氧化物时,酶的活性就明显降低。在所有受试的巯基化合物中仅 GSH 是 Se-GSH-PX 的高活性基质。因此 Se-GSH-PX 对 GSH 具有高度的特异性。大鼠肺 Se-GSH-PX 对不同过氧化物和不同巯基化合物的相对活性见表 1^[8]。

表 1 大鼠肺 GSH-PX 对基质的相对活性

基 质	相对活性	基 质	相对活性
氢过氧化物		巯基化合物	
H_2O_2	100	GSH	100
Cumene	97	巯基乙醇	0
t-Butyl	84	Dithiothreitol	10
Lauryl	77	Cysteine	6
过氧化物		N-Acetylcysteine	6
Di-t-Butyl	5	Homocysteine	5
Dicumene	5		

值得提出的是,除了脂氢过氧化物外,其它一些有机过氧化物也都可作为 Se-GSH-PX 的基质,如类固醇氢过氧化物、胸腺嘧啶氢过氧化物、核酸氢过氧化物、前列腺素氢过氧化物和维生素 K 氢过氧化物。

大鼠肺 Se-GSH-PX 的最适 pH 是 8.8—9.0^[8],人 RBC Se-GSH-PX 的最适 pH 是 8.5^[21]。

Se-GSH-PX 和 non-Se-GSH-PX 的亚细胞分布主要是在细胞的胞液和线粒体基质中,过氧体中没有。与 GSH-PX 的分布相互补, CAT 主要存在于过氧体中。SOD 也主要存在于细胞胞液和线粒体基质中^[22]。

Sunde 等(1980)^[11]提出这些水溶性的酶与膜溶性的 α -Tocopherol 在细胞的不同部位

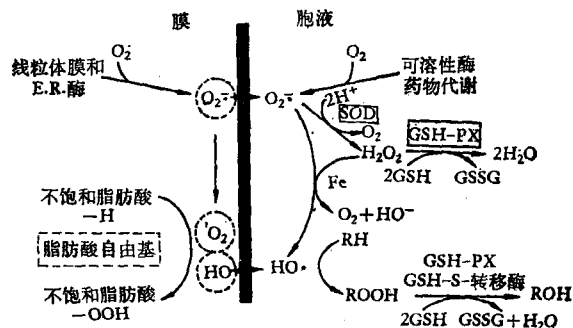


图 4 在肝细胞中 GSH-PX、SOD、GSH-S-转移酶和 α -Tocopherol 的区域化和功能的图解

○=非水介质中 α -Tocopherol 的特殊的清除和淬灭作用

协同地发挥着抗脂质过氧化的作用(图4)。

此图只反映了 VE 作为自由基的清除剂的作用,而对其作为脂质过氧化作用的阻断剂的作用则未予表示。

因对 GSH-PX 的生化活性及它与有机过氧化物作用的研究大都限于简单的系统,而问题是发生在膜类脂疏水区的脂氢过氧化物如何被水溶性的 GSH-PX 系统还原。

Chiu 等 (1976)^[8] 在纯化酶的研究中根据 Se-GSH-PX 能与缬氨酸-琼脂糖相结合(疏水性结合),提出酶有一疏水区,以此解释 Se-GSH-PX 能接近膜的脂氢过氧化物。

最近 Purdy^[10] 研究发现膜中有磷酸脂解酶,它能水解磷脂的脂肪酸氢过氧化物,其水解速度远远大于目前已知的磷酸脂解酶。因此,氢过氧化物磷酸脂解酶可能是过氧化膜的修复系统的一部分。Tappel^[10] 由此提出,这个酶能使脂质过氧化作用形成的脂氢过氧化物,有效地被 GSH-PX 系统还原,它涉及到体内过氧化膜的修复作用,这是未来令人兴奋的一个研究领域。

参 考 文 献

- [1] Mills, G. C.: *J. Biol. Chem.*, **229**, 189, 1957.
- [2] Schwarz, K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3293, 1957.
- [3] Rotruck, J. T. et al.: *Science*, **179**, 588, 1973.
- [4] Flohé, L. et al.: *FEBS Letters*, **32**, 132, 1973.
- [5] Lawrence, R. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res.*

Commun., **71**(4), 952, 1976.

- [6] 陈瓖,周玫:《生命的化学》, **3**(6), 16, 1983.
- [7] 陈瓖,周玫:《第一军医大学学报》, 3 卷增刊, 385, 1983.
- [8] Chiu, D. T. Y. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 558, 1976.
- [9] Stults, F. H. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 490, 1977.
- [10] Tappel, A. L.: *Free Radicals in Biology* (Ed. by Pryor, W. A.), Academic press, Vol. IV, p. 1—47, 1980.
- [11] Sunde, R. A. et al.: *Nutr. Rev.*, **38**(8), 265, 1980.
- [12] Nakamura, W. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **358**, 251, 1974.
- [13] Flohé, L.: *Enzymologie und biologische Aspekte*, Klin. Wschr., **49**, 669, 1971.
- [14] Stadman, T. C.: *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 93, 1980.
- [15] Hawkes, W. C. et al.: *Fed. Proc.*, **58**, 820, 1979.
- [16] Sunde, R. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**(4), 1181, 1980.
- [17] Witting, L. A.: *Free Radicals in Biology*, (Ed. by Pryor, W. A.) Academic Press, Vol. IV, p. 295, 1980.
- [18] Prohaska, J. R. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**(2), 437, 1977.
- [19] Pierce, S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **523**, 27, 1978.
- [20] Granter, H. E. et al.: *Trace Elements in Health and Disease* (Ed. by Prasad, A. S.), Academic Press, p. 165, 1976.
- [21] Awasthi, Y. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **250**(13), 5144, 1975.
- [22] Chance, B. et al.: *Physiol. Rev.*, **59**(3), 527, 1979.

[本文于1984年2月7日收到]

(上接封3)

出来,这样得到的肽图,虽然只能反映一部分肽段情况,但由于斑点清晰,容易分辨,使结果十分明确,有一定的实用价值。此外,本法还具有以下一些优点:

1. 灵敏度高,样品用量少。在我们实验室中,总量 8—10 μg 纯化的流感病毒,经 SDS-PAGE 可同时获得纯化的 HA 和 MP 供标记用,每次标记的样品可供几十次肽图分析用。

2. 样品分离、纯化的步骤简单,易于标准化。待标记样 MP 在经固定、染色、干燥的凝胶中保存一年后,再进行 ^{125}I 标记和肽图分析,结果与新制备样品完全一致。

3. 同位素标记的方法简单、条件易于控制,

重复性好。标记后不必经凝胶柱层析,而只需简单地依次通过含有 10% 甲醇的一排试管洗涤即可除去游离的 ^{125}I , 这样可减少器皿污染,缩短操作时间,便于进行放射防护。

本工作曾得到中国科学院武汉病毒研究所同位素室李荣歧同志帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Watanabe, S. et al.: *Biochem. Genet.*, **5**, 541, 1971.
- [2] 张国娣等:《生物化学与生物物理进展》**6**, 64, 1983.
- [3] Elder, J. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 6510,

(下转第 26 页)