

# 超氧化物歧化酶的研究进展和应用前景

张博润 谭华荣

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, 简称 SOD) 广泛存在于生物界, 从低等微生物到高等动植物都含有 SOD。SOD 是生物体防御氧化损伤的一种十分重要的酶, 它的作用底物是超氧阴离子 ( $O_2^-$ )。而超氧阴离子自由基与人类及动植物的许多疾病的发生和形成有关。人们对它进行了广泛的研究, 它是二千多种酶中研究报道最多的一种。

本文对 SOD 的研究进展和开发应用前景作一简要的综述。

## (一) SOD 的研究进展

自从 Mann 和 Keilin<sup>[1]</sup> 1938 年首次从牛红血球中分离出一种蓝色铜蛋白 (最初定名为血铜蛋白 (Hemocuprein)), 后来由 McCord

和 Fridovich<sup>[2]</sup> 根据其酶活特性定名为超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, 简称 SOD, EC1. 15.1.1.) 以来, 人们对 SOD 进行了一系列研究, 概括起来主要有下述几个方面。

1. SOD 的分布及分类: SOD 的分布相当广泛, 现将从不同来源分离到的不同类型的 SOD 列于表 1。凡是需氧的原核生物和真核生物体内都含有 SOD。以前认为厌氧微生物细胞不含 SOD, 现在已发现多种厌氧细菌也含有 SOD。如已从脱硫弧菌及色素菌属中分离到 SOD。至今所分离到的 SOD 都是金属酶, 依照其含金属离子不同可把它们分为三类: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD 和 Fe-SOD。Cu/Zn-SOD 主要局限于真核生物细胞质中, 但也有人报道在

表 1 从不同材料分离的不同类型的 SOD

SOD 类型	材 料 来 源	参 考 文 献
Hemocuprein	Ox blood	Mann T et al. (1938)
Hepatocuprein	Horse liver	Mohamed M S et al. (1953)
Cerebrocuprein	Ox brain	Porter H et al. (1957)
Cerebrocuprein	Human brain	Porter H et al. (1959)
Erythrocuprein	Human erythrocytes	Kimmel J R et al. (1959)
Hepatocuprein	Human kidney	Shields G S et al. (1961)
Hepatocuprein	Human liver	Porter H et al. (1964)
Cu/Zn-SOD	Ox blood	McCord J M et al. (1969)
Cu/Zn-SOD	Bovine tissue	Beauchamp C et. al (1971)
Cu/Zn-SOD	Garden peas	Sawada Y et al. (1972)
Cu/Zn-SOD	Spinch leaves	Asada K et al. (1972)
Cu/Zn-SOD	Chicken liver	Weisiger R A et al. (1973)
Cu/Zn-SOD	Wheat germ	Beauchamp C O et al. (1973)
Cu/Zn-SOD	<i>Fusarium oxysporum</i>	Rapp U et al. (1973)
Cu/Zn-SOD	<i>Neurospora crassa</i>	Rapp U et al. (1973)
Cu/Zn-SOD	Yeast	Goscin S A et al. (1973)
Cu/Zn-SOD	Smoked plum fruit	张尔贤 (1991)
Cu/Zn-SOD	Dog liver	吕星等 (1991)
Cu/Zn-SOD	Sheep blood	张大志等 (1991)
Cu/Zn-SOD	Human embryo liver	袁海平等 (1991)
Mn-SOD	<i>Escherichia coli</i>	Keele B B et al. (1970)
Mn-SOD	<i>Streptococcus mutans</i>	Vance P G et al. (1972)
Mn-SOD	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Brock C J et al. (1980)
Mn-SOD	Yeast	Joan C D et al. (1982)
Mn/SOD	<i>Halobacterium halobium</i>	Fukumori Y et al. (1985)
Mn-SOD	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	Sato S et al. (1987)
Mn-SOD	<i>Halobacterium cutirubrum</i>	May B P et al. (1987)
Mn-SOD	<i>Bacillus caldosenax</i>	Chambers S P et al. (1992)
Mn-SOD	Chinese cabbage	邹国林等 (1992)
Fe-SOD	Bacteria	Gregory F M et al. (1973)
Fe-SOD	Blue-green algae	Lumsden J et al. (1974)
Fe-SOD	<i>Methanobacterium bryantii</i>	Kirby T W et al. (1981)
Fe-SOD	<i>Photobacterium leiognathi</i>	Barra D et al. (1987)

原核生物,如光合细菌中也含有 Cu/Zn-SOD。Mn-SOD 主要存在于原核生物和真核生物的线粒体中。Fe-SOD 主要存在于原核生物中,不过也有人报道证明 Fe-SOD 存在于真核藻类及高等植物的叶绿体基质中。现已发现有的生物含有不同类型的 SOD,如酵母菌既含有 Cu/Zn-SOD、又含有 Mn-SOD。

2. SOD 检测方法:由于 SOD 作用的底物超氧自由基  $O_2^-$  极不稳定,这给研究 SOD 工作带来了极大的困难和不便,至今还未找到直接检测 SOD 的方法。目前已建立的一系列

测定 SOD 的方法均属间接方法,主要有化学测定法<sup>[3]</sup>、免疫测定法<sup>[4]</sup>、等电点聚胶法和聚丙烯酰胺凝胶电泳法<sup>[5]</sup>等。其中以化学测定法和凝胶电泳法应用最普遍。其主要原理是利用一些化合物,如肾上腺素、6-羟基多巴胺、细胞色素 C、四氮唑蓝和邻苯三酚等在自氧化过程中会产生有色中间物和超氧游离基  $O_2^-$ ,而 SOD 能分解  $O_2^-$ ,阻止中间物的积累,据此反应可以测定 SOD 酶活。

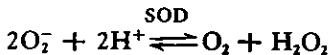
3. SOD 的物化特性及结构:近年来不少学者对 SOD 的物化特性、金属离子含量、氨

表2 SOD 的主要物化特性

SOD 类型 物化特性	Cu/Zn-SOD	Mn-SOD	Fe-SOD
分子结构	二或四聚体	二或四聚体	二或四聚体
分子量	32,000 65,000	42,000 85,000	42,000 85,000
金属含量	1 Cu: 1 Zn	0.5—1 Mn	0.5—1 Fe
颜色	蓝绿色	紫红色	黄褐色
特征吸收峰	260nm 680nm	280nm 475nm	280nm
分子构象	主要为 $\beta$ - 折叠	主要为 $\alpha$ - 螺旋	主要为 $\alpha$ -螺旋
抑制剂	氰化物 $H_2O_2$ + EDTA	叠氮化合物	叠氮化合物 $H_2O_2$ + EDTA

基酸序列、分子结构及稳定性等进行了系统研究<sup>[6-10]</sup>。这些研究结果证明 SOD 属于酸性蛋白,对 pH、热和蛋白酶水解比一般酶稳定。Parker 等人<sup>[8]</sup>根据对多种 SOD 的初级结构以及 X-射线研究提出了区别 Mn-SOD 和 Fe-SOD 的氨基酸残基。Joan 等人<sup>[9]</sup>指出不同来源的 Cu/Zn-SOD 具有较高的同源性,它们的物化性质也很相似,据推测它们可能由同一原始酶进化而来。不同来源的 Mn-SOD 或 Fe-SOD 也具有相似的物化性质和较高的同源性,它们可能由另一原始酶进化而成<sup>[10]</sup>。这些研究表明不同来源的同一类 SOD 显示出进化上的保守性以及物化特性的相同性。现将三类 SOD 的主要物化特性列于表 2。SOD 所含的金属离子对 SOD 的酶活、分子的初级结构和三级结构具有重要作用<sup>[6]</sup>。根据 SOD 对氰化物或  $H_2O_2$  等的敏感程度很容易区别三类 SOD。

4. SOD 的催化机理和活性中心: 鉴于 SOD 作用的底物  $O_2^-$  的寿命相当短,这给研究其催化机理带来了很大的困难,目前一般公认的 SOD 的催化机理如下:



在生物体内, SOD 将过量的  $O_2^-$  歧化为  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2$  再在过氧化氢酶和过氧化物酶的催化下转变成  $H_2O$ , 从而解除  $O_2^-$  对生物体细胞的损伤,起到保护作用。所以人们一般把 SOD 称为生物体内一种重要的  $O_2^-$  清除剂。

三种类型 SOD 的活性中心都含有金属离

子。如采用物、化方法除去金属离子,则丧失酶活,如重新加上金属离子,则又恢复酶活<sup>[9]</sup>。Cu/Zn-SOD 的活性中心形态象一个椭圆形口袋,口袋底部的 Cu 离子与 4 个 His 和 1 个  $H_2O$  配位, Zn 离子与 3 个 His 和 1 个 Asp 配位。Cu 和 Zn 离子之间通过共同连接 1 个 His 而构成咪唑桥结构。Mn-SOD 和 Fe-SOD 的活性中心的金属离子与 3 个 His、1 个 Asp 和 1 个  $H_2O$  配位。三类 SOD 的活性中心均含有金属离子、His、Asp 和  $H_2O$ , 由此可见它们均与催化功能密切相关。

5. SOD 的分子修饰、SOD 脂质体及 SOD 模拟酶: SOD 作为药用酶用于临床受以下因素的影响<sup>[11]</sup>: (1) 半衰期短,通常只有 6—10 分钟; (2) 分子量大,不易透过细胞膜; (3) 抗原性; (4) 如用于口服,易被蛋白酶水解。鉴于上述不利因素,对 SOD 分子进行改造就显得十分必要。近年来不少学者对 SOD 的分子修饰、SOD 脂质体及模拟酶进行了研究<sup>[11-16]</sup>。

对 SOD 进行分子修饰改造的途径有: (1) 对 SOD 氨基酸残基进行化学修饰。对 SOD 来说,由于希望修饰后的 SOD 仍能保留最大活性,主要应对非活性部位进行修饰。(2) 用水溶性大分子(如聚乙二醇、聚蔗糖、右旋糖酐、聚烯属羟基氧化物等)对 SOD 进行共价修饰。(3) 对 SOD 进行酶切修饰。由于 SOD 作用的底物  $O_2^-$  很小, SOD 酶活中心也小,可以设想通过酶切除去 SOD 分子的部分肽段后仍保

留其活性,以达到降低其分子量和抗原性的目的。据文献<sup>[12]</sup>报道,经不同手段修饰后的酶不仅能保留天然酶活,而且在耐热、耐 pH 和抗蛋白酶水解能力等方面优于天然 SOD。

据 Michelson 等人<sup>[11]</sup>报道, SOD 脂质体可明显延长半衰期。此外还证实 SOD 脂质体具有器官特异性,这主要由脂质体带电性质及所含磷脂的组成成分所决定。如带负电荷的 SOD 脂质体主要停留在肝和脾;而带正电荷的 SOD 脂质体主要停留在肺。

随着人们对 SOD 越来越重视,近年来一些生物化学家和有机化学家也加入了 SOD 研究行列,他们开始进行人工有机合成 SOD 模拟酶,并取得了可喜的结果<sup>[16]</sup>。

6. SOD 与逆境生理的关系:近年来有不少学者对 SOD 与逆境生理的关系进行了较广泛的研究<sup>[17,18]</sup>。当植物处于逆境(如干旱、低温、霜冻、高盐碱、有毒物质等)时,植物体内会产生大量的超氧阴离子自由基,从而影响植物的发育和生长,只有当植物体内产生适量的 SOD 时才能清除  $O_2^-$  对其构成的毒害作用。由此可见开展 SOD 与逆境生理的关系的研究不但有助于阐述植物(特别是农作物)在逆境中的生理生化机制,而且可能培育出抗逆能力强、有经济效益的新品种。

7. SOD 基因克隆和表达:随着人们对 SOD 的广泛深入研究,近年来一些分子遗传学家开始对 SOD 基因分离、核苷酸序列、基因克隆和表达进行研究。下面仅举几个例子评述这方面的研究进展。

Takao 等人<sup>[19]</sup>发现 *H. halobium* 的光裂合酶基因的 3'-侧翼区域含有一个 SOD 基因,描述了该基因的完整核苷酸序列,并证明 SOD 基因和光裂合酶基因在该菌中是共转录的。Hallewell 等人<sup>[20]</sup>报道了人的 Cu/Zn-SOD 的 cDNA 的核苷酸序列、分子克隆和用 Tacl 启动子指导其在大肠杆菌中的高效表达。他们对 500 个克隆样品的分析表示克隆子 Ca.25 能合成 5% 或更多的可溶性蛋白为 SOD。他们还研究了人的 Cu/Zn-SOD 基因在酵母菌中的表

达和  $N^2$ -乙酰化作用。他们利用酵母甘油醛磷酸脱氢酶启动子指导人的 SOD 基因在酵母菌中高效表达,产生的人的 Cu/Zn-SOD 是可溶的、具正常的酶比活以及对铜和锌表现低水平抗性。酵母产生的人的 SOD 在其 N-末端乙酰化,它与人红细胞的 Cu/Zn-SOD 在物化等特性上没有区别。相反,细菌中表达产生的人的 SOD 不能乙酰化<sup>[21]</sup>,酵母菌自身的 Cu/Zn-SOD 也不能乙酰化<sup>[22]</sup>。由此可见用酵母表达生产人的 SOD 可能是最有应用前途的。May 等人<sup>[23]</sup>发现 *H. cutirubrum* 有一个尚不知道功能、与 SOD 基因相类似的基因 (slg),它具有与 SOD 基因不同的表达方式,它保存四个与 Mn 离子结合的氨基酸残基。但两个基因的侧翼区域不相关。尽管这两个基因核苷酸序列的同源性高达 87%,而它们编码的蛋白质的氨基酸序列的同源性只有 83%。Brehm 等人<sup>[24]</sup>把 *B. stearotherophilus* 的 Mn-SOD 基因克隆进大肠杆菌,对它的完整氨基酸序列进行了测定。他们证实除翻译后粘连的 N-末端甲硫氨酸残基外,预测的氨基酸序列与先前测定的氨基酸序列完全相同。重组体 Mn-SOD 在大肠杆菌中高效表达,产生 49% 的可溶性蛋白为 SOD。Chambers 等人<sup>[25]</sup>已将 *B. caldotenax* (BC) 的 Mn-SOD 基因克隆到大肠杆菌,并进行了序列分析。他们指出该基因的编码区域内有 21 个核苷酸与以前报道的 *B. stearotherophilus* (BS) 的 SOD 基因同一编码区域内的核苷酸序列不同。BC Mn-SOD 在大肠杆菌中能高效表达,产生 40% 的可溶性蛋白为 SOD。

## (二) SOD 的应用前景

SOD 的应用前景主要有以下几个方面。

1. 药物: SOD 是一种新型的抗炎症药物,尤其对治疗关节炎和类风湿关节炎有明显疗效。根据 SOD 的作用机制和毒性试验,它对治疗因超氧游离基  $O_2^-$  引起的各种疾病都有一定疗效。为此, SOD 可作为抗老化、抗炎症、自身免疫疾病患者广泛应用的医药品。此外, SOD 对治疗贝切特氏病、心肌梗塞等血虚性心脏病、胶原病、新生儿呼吸困难综合症、防御放

表2 国外 SOD 应用开发现状\*

单 位	批量生产技术	用途及备注
日本三井东亚化学公司	重组生产人 Mn-SOD	作为治疗心肌梗塞后血液再灌流时的心肌保护剂。
日本三井东亚化学公司 九州大学	重组生产人 Mn-SOD	正在研究对慢性关节炎风湿病的疗效。
美国 BTN 公司	重组生产 SOD	对风湿性关节炎、支气管肺异形形成症、溃疡性肠炎等进行临床试验。
美国 Hammersmith 医院	“聚合物 SOD”	作为肾脏移植时再循环障碍的治疗药进行第二、三阶段临床试验。
美国 Chiron 公司	从牛血中提取 SOD	治疗关节炎。
德国 Gruenenthal 公司	大肠杆菌基因重组生产 SOD	以血虚性再回流障碍为治疗对象进行临床试验。
美国 DDIP 公司	大肠杆菌基因重组生产 SOD	以与心脏病无关的疾病为治疗对象进行临床试验。
日本化药公司	大肠杆菌基因重组生产 SOD	以心脏病为治疗对象进行临床试验。
日本东洋酿造公司	大肠杆菌基因重组生产 SOD	用 PEG 修饰 SOD。使寿命提高数十倍。具有减轻抗癌剂副作用的效果。
日本宇都兴产—藤译药品公司	基因重组—化学合成	以关节炎患者为对象进行临床试验。
日本味之素公司 熊本大学医学院	酵母菌基因重组生产 SOD	
美国 Chiron 公司 武田药品公司		

\* 参考文献略。

射线作用等也都可望有效。近几年来,美、日、意、德、英等对 SOD 作为药品开发应用进行了一系列研究和临床试验。现将几个典型的例子列于表 3。

2. 添加剂: 据悉国外不少的高级化妆品都添加有 SOD。国内也有数家工厂或公司在开发和生产 SOD 化妆品, 如大宝 SOD、康妮 SOD、SOD 康舒达霜剂等。SOD 作为化妆品添加剂主要有三个优点: 一是有明显的防晒效果, 光照使皮肤变黑的主要原因是氧自由基损害, SOD 可有效防止皮肤受电离辐射(特别是紫外线)的损伤, 从而起到防晒效果; 二是可防皮肤衰老, 阻止紫褐质(老年斑)的形成; 三是有明显的抗炎效果, 对防治皮肤病有一定效果。当然至今仍有人对 SOD 能否透过皮肤及其实际效果持怀疑态度, 对这些问题还有待进一步研究。

国外把 SOD 作为食品添加剂的例子是加在口香糖和饮料中。我国贵州农学院已开发出刺梨 SOD 饮料。

SOD 及修饰过的 SOD 还可作为外用药膏、眼药及牙膏等的添加剂。

3. 生化试剂: 国外已有数家公司, 如 Sigma 公司等出售 SOD 试剂。国内也有厂家批量生产 SOD 试剂, 如中科院上海生化所东风试剂

厂、天津血液研究所等。

此外, SOD 有可能作为某些疾病的探针, 如郭彦等人<sup>[26]</sup>认为脑瘤组织线粒体 Mn-SOD 的降低是转化细胞的可靠生化指标之一, 并可作为评估脑瘤分化程度的参考。

随着对 SOD 的深入研究和了解, 可望 SOD 在农作物增产方面发挥出难以预料的作用。有人<sup>[17,18]</sup>认为 SOD 在植物抗低温、霜冻、干旱、有毒物质伤害过程中有一定保护作用。

综上所述, 国外对 SOD 进行了一系列的基础、应用开发研究和临床试验。相比之下, 国内对 SOD 的研究起步较晚, 尽管有不少单位在进行 SOD 的研究, 但开展面较窄, 主要是分离纯化方面的研究<sup>[27-31]</sup>。关于 SOD 基因克隆和表达方面的研究, 至今没有正式的报道。我们目前正在用 PCR 技术进行 SOD 基因克隆以及在大肠杆菌和酵母菌中高效表达方面的研究。

可以预言, 随着人们对 SOD 更广泛深入的研究, 不同类型的 SOD、SOD 修饰物、SOD 脂质体以及人工有机合成的 SOD 模拟酶将在医疗保健、食品、农业增产等方面发挥出更大的作用。

## 参 考 文 献

1. Mann T et al.: *Proc. Roy. Soc (London)*, 126: 303, 1938.
2. McCord J M et al.: *J. Biol. Chem.*, 244(22): 6049, 1969.
3. Marklund S et al.: *Eur. J. Biochem.*, 47, 469, 1974.
4. Forman H J et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 159: 396, 1973.
5. Beauchamp C et al.: *Anal. Biochem.*, 44: 276, 1971.
6. Ditlow C et al.: *Carlsberg. Res. Commun.*, 47: 71, 1982.
7. Salin M L et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 260: 806, 1988.
8. Parker M W et al.: *J. Mol. Biol.*, 199: 649, 1988.
9. Joan C D et al.: *Carlsberg. Res. Commun.*, 47: 163, 1982.
10. *Bio. Industry*, 2: 55, 1991.
11. Michelson A M et al.: *Acta. Physiol. Scand (suppl)*, 492: 7, 1980.
12. McCord J M et al.: *Superoxide and Superoxide Dismutase*. New York: Academic Press (London), p129, 1977.
13. 袁勤生等: *中国医学工业杂志*, 20(8): 357, 1989.
14. Pandora L et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181(1): 474, 1991.
15. Luigi I et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 293(1): 153, 1992.
16. 邹国林等人: *生物学通报*, 5: 10, 1992。
17. *Food Chemistry*, 33(4): 243, 1989.
18. 孙凡等人: *生物学杂志*, 1: 13, 1991。
19. Takao M et al.: *J. Bacteriol.*, 171: 6323, 1989.
20. Hallelwell R A et al.: *Bio/ technology*, 5: 363, 1987.
21. Hallelwell R A et al.: *Nucleic Acids Res.*, 13(6): 2017, 1985.
22. Steinman H M.: *J. Biol. Chem.*, 255: 6758, 1980.
23. May B P et al.: *J. Bacteriol.*, 172: 3725, 1990.
24. Brehm J K et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 358, 1991.
25. Chambers S P et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 91: 277, 1992.
26. 郭彦等: *中华医学杂志*, 72(4): 247, 1992。
27. 张尔贤: *中国药学杂志*, 26(7): 404, 1991。
28. 吕星等: *生物化学杂志*, 7(4): 496, 1991。
29. 张大志等: *生物化学杂志*, 7(2): 211, 1991。
30. 袁海平等: *生物化学杂志*, 7(2): 159, 1991。
31. 邹国林等: *生物化学与生物物理学报*, 24(2): 180, 1992。