

# · 综 述 ·

文章编号: 1008-9926(2005)05-0369-03 中图分类号: R963 文献标识码: A

## 自由基与谷胱甘肽过氧化物酶

王咏梅<sup>①</sup>

(吉林北方肝胆医院药剂科 吉林 长春 130062)

**摘 要:** 生物体内的氧化代谢会产生少量的自由基, 体内的抗氧化系统能及时清除以维持自由基的代谢平衡。但是在一些损伤因素的作用下可诱导体内大量自由基的堆积, 细胞中抗氧化保护机制不足时, 使活性氧产生堆积并对细胞产生毒性, 从而产生氧化和抗氧化的不平衡状态, 这种状态称为氧化应激。谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)是生物体内重要的抗氧化酶之一, 它可以消除机体内的过氧化氢及脂质过氧化物, 阻断活性氧自由基对机体的进一步损伤, 是生物体内重要的活性氧自由基清除剂, 本文对谷胱甘肽过氧化物酶的研究进行了综述。

**关键词:** 自由基; 谷胱甘肽过氧化物酶

通常生物体内的氧化代谢会产生少量的自由基, 体内的抗氧化系统(抗氧化剂和自由基清除酶类)能及时清除以维持自由基的代谢平衡。但是在一些损伤因素的作用下, 如: 缺血<sup>[1]</sup>、缺氧<sup>[2]</sup>、离子辐射<sup>[3]</sup>、紫外线照射<sup>[4]</sup>、化疗药物<sup>[5]</sup>、化学试剂<sup>[6]</sup>等可诱导体内大量自由基的堆积, 细胞中抗氧化保护机制不足时, 使活性氧产生堆积并对细胞产生毒性, 从而产生氧化和抗氧化的不平衡状态, 这种状态称为氧化应激。

现代医学认为, 活性氧在体内堆积与白内障<sup>[7]</sup>、克山病<sup>[8]</sup>、心脑血管疾病<sup>[9]</sup>和炎症<sup>[10,11]</sup>等发病机制密切相关。所谓活性氧就是主要由氧组成的、性质活泼、氧化性强的物质的总称。主要包括羟基自由基、超氧阴离子自由基、过氧化氢、脂质过氧化物和单线态氧等。活性氧自由基对机体造成的最大损害是使脂质过氧化。生物膜上的许多不饱和脂肪酸对活性氧自由基的进攻非常敏感, 而且一旦反应启动, 就会以连锁反应方式进行下去, 造成大量脂质过氧化物的产生。这些过氧化物被断裂成不同大小的醛类分子, 对细胞产生很强的毒性, 使生物膜的结构发生改变, 进而影响其功能, 如使膜的流动性下降、通透性改变、膜运输过程紊乱等<sup>[12]</sup>。羟基自由基、超氧阴离子自由基、过氧化氢和脂质过氧化的不稳定中间产物统称为活性氧自由基(ROS)。

高等动物对 ROS 的清除拥有完整的防御体系见图 1。整个防御体系包括酶学机制和非酶学机制。在酶学防御体系中包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)等。SOD 歧化  $O_2^-$  为  $H_2O_2$ 。CAT 催化分解  $H_2O_2$  为  $H_2O$  和  $O_2$ 。GPX 利用 GSH 还原氢过氧化物为  $H_2O$  或醇类化合物。非酶学机制主要是一些低分子量的抗氧化分子, 如  $\alpha$ -生育酚、Vc 和 GSH。GSH 通过 2 种方式发挥抗氧化作用, 一是直接与自由基反应, 自身则氧化成氧化型谷胱甘肽(GSSG), 还可使  $\alpha$ -生育酚再生而间接发挥作用; 二是 GSH 作为 GPX 底物发挥抗氧化作用。

谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)是生物体内重要的抗氧化酶之一, 它可以消除机体内的过氧化氢及脂质过氧化物, 阻

断活性氧自由基对机体的进一步损伤, 是生物体内重要的活性氧自由基清除剂, 它以硒代半胱氨酸(SeC)的形式发挥作用, 以谷胱甘肽(GSH)为还原剂分解体内的脂质过氧化物, 因而可防止细胞膜和其它生物组织免受过氧化损伤。它与体内的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)一起构成了机体的抗氧化防御体系。

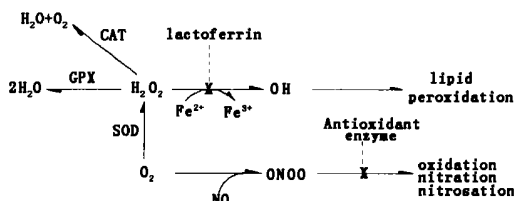


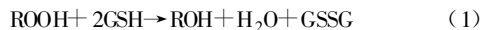
图 1 生物体内的抗氧化体系

Fig 1 Antioxidant system of living organism

### 1 GPX

GPX 是在哺乳动物体内发现的第一个含硒酶, 它于 1957 年就被 Mills 首先发现<sup>[13]</sup>, 但直到 1973 年才由 Flohe 和 Rotruck 2 个研究小组确立了 GPX 与硒之间的联系<sup>[14,15]</sup>。

GPX 可以催化下述反应:



GPX 的催化基团是 Sec, 它由终止密码子 UGA 编码, 对它的研究拓展了人们对遗传密码的认识, Sec 也因此被人们称作第 21 种氨基酸<sup>[16]</sup>, Sec 在原核和真核生物中的表达略有不同, 但是它们的表达都依赖于 mRNA 中特殊的二级结构<sup>[17]</sup>。

它具有清除脂质过氧化物(ROOH)的作用, 在体内同超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)一起构成了抗氧化防御系统, 有预防畸变、防止细胞膜和其它生物组织免受过氧化损伤的重要生物学功能, 因此对 GPX 的结构与功能、催化机制及 GPX 的实际开发应用研究具有重大意义。

### 2 GPX 的结构

GPX 是一个酶超家族, 在这个家族里有 2 个酶的晶体结

① 作者简介: 王咏梅(1969-), 女, 吉林柳河人, 药理学学士, 主管药师。研究方向: 药物分析及临床药理学。Tel: (0431) 7609103

构已解。它们是牛  $\alpha$ GPX 和人的 phGPX。尽管 2 个酶属于不同的种类, 但它们的亚基结构非常相似。牛  $\alpha$ GPX 是由 2 条同样的链构成。图 2 为牛  $\alpha$ GPX 的二级结构<sup>[18]</sup>:



图 2 谷胱甘肽过氧化物酶亚基的二级结构

Fig 2 The secondary structure of GPX subunit

根据 X-射线晶体衍射结构分析结果, GPX 一个亚基的 30~40, 140~150, 63~70 与另一亚基的 63~69 位氨基酸残基在表面形成一个扁平的凹槽, 硒代半胱氨酸就位于这个凹槽底部, 是酶的催化中心, 该凹槽区是酶分子的活性部位。硒代半胱氨酸残基附近的一些含芳香侧链的氨基酸 (Phe, Trp) 与 Gln-7-同对硒代半胱氨酸起稳定作用。

在进行晶体结构研究时, Epp 等人对 GPX 与底物 GSH 的相互作用也进行了详尽的研究见图 3。他们发现, 在还原条件下 GSH 与 GPX 形成非共价键; 而在氧化条件下, GPX 中的 Sec 与 GSH 通过 (Se-S) 桥共价连接。在酶的活性部位中, 对底物结合起重要作用的残基包括 Arg167、Arg40、Gln130 和 Trp148。谷氨酰胺残基上的羧基与 Arg167 的胍基产生静电作用, 而 C 端的游离羧基与 Arg40 形成一个盐桥。这一模型与 Flohé 等人的研究成果一致。Flohé 等人认为 GSH 的 2 个羧基对于 GPX 与 GSH 的相互作用十分重要。

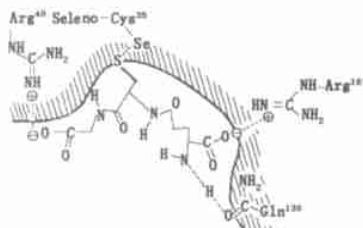
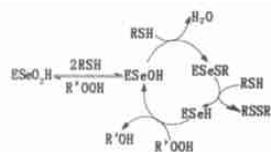


图 3 谷胱甘肽过氧化物酶与谷胱甘肽之间的作用

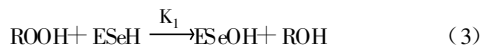
Fig 3 The interaction between glutathione peroxidase and glutathione

### 3 GPX 的催化机制

Flohé 等人对牛血红蛋白 GPX 的催化机制进行了研究<sup>[19]</sup>, 认为 GPX 以 GSH 为底物催化氢过氧化物的反应为乒乓机制。硒是 GPX 中起氧化还原催化作用的唯一元素, 以硒氢基(-SeH)的形式发挥作用, 在催化过程中存在着一个价态循环, 当氢过氧化物过量时, 酶活性中心硒以硒酸形式存在(E-SeOOH)<sup>[20]</sup>。整个价态变化可表示如下:



而在乒乓机制中, 催化循环始于酶的还原态(E-SeH), 经氢过氧化物氧化为亚硒酸形式(E-SeOH), E-SeOH 被 GSH 还原为硒硫化物 E-Se-SG, 再经另一分子 GSH 还原为初态(E-SeH)。其催化机制可表示如下:



在整个催化循环中, 最快的步骤是 E-SeH 被 ROOH 氧化, 而 E-Se-SG 转化为 E-SeH 形式为反应的限速步骤<sup>[21]</sup>。事实上, 活性中心的硒代半胱氨酸位于蛋白质疏水性凹槽较暴露处, 这使得各种类型的氢过氧化物都能接近它而使它被快速氧化, 这也是此酶对各种类型氢过氧化物不表现出底物专一性的原因。天然 GPX 在催化动力学上符合 Dalziel 方程<sup>[19,21]</sup>:

$$\frac{E_0}{V} = \frac{\Phi_1}{[\text{RSH}] + \Phi_2[\text{ROOH}]} \quad (5)$$

( $E_0$  为 GPX 初始浓度,  $V$  为反应速度,  $\Phi_1, \Phi_2$  为 Dalziel 常数)。GPX 的动力学方程还可以用 Segel 形式表示<sup>[22]</sup>。

$$V = \frac{V_{\max}[\text{GSH}][\text{ROOH}]}{K_{m\text{GSH}}[\text{ROOH}] + K_{m\text{H}_2\text{O}_2}[\text{GSH}][\text{ROOH}][\text{GSH}]} \quad (6)$$

$V_{\max}$  为最大反应速度,  $K_m$  为 Michaelis 常数。当将一种底物浓度固定, 而改变另一种底物的浓度时, 其双倒数曲线为一组平行线。

### 4 GPX 的生物学效应

生物体在正常生理条件下将氧还原为  $\text{H}_2\text{O}$  获取能量, 一般要经过  $\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$  过程, 期间产生的活性氧, 如  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$  和单线态氧, 除满足机体代谢需要外, 不可避免会作用于其它生物分子(如造成脂质过氧化, 引起生物膜损伤, 基因突变等), 从而引起机体病变。GPX 的作用是和超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)一起, 共同清除机体活性氧, 减轻和阻止活性氧的过氧化作用; 机体对活性氧  $\text{O}_2^-$  的第一道防线是超氧化物歧化酶(SOD), 它将  $\text{O}_2^-$  转化为过氧化氢和其它氢过氧化物; 第二道防线是过氧化氢酶(CAT)和 GPX。其中 CAT 可清除过氧体系中的  $\text{H}_2\text{O}_2$  而 GPX 分布在细胞的胞液和线粒体中, 可同时清除  $\text{H}_2\text{O}_2$  和氢过氧化物。最奇妙的是微生物也利用 GPX 来抵御宿主的保护机制。在马铃薯的一种病毒 Globodera rostochiensis 中它能编码二种 GPX, 其中一种能分泌到细胞外, 因为宿主被它感染后会生成一些自由基来清除它, 它通过分泌 GPX 到胞外来抵抗宿主的保护机制<sup>[23]</sup>。

至少有 4 种 GPX 同工酶被发现。这些同工酶在位置分布、亚基结构、一级序列和酶学特点上显著不同。经典的细胞内 GPX( $\alpha$ GPX)主要分布在组织的胞浆和红细胞, 它催化还原  $\text{H}_2\text{O}_2$  和有机氢过氧化物。磷脂氢 GPX(phGPX)主要分布于胞浆内, 部分与膜结合<sup>[24]</sup>。它除了还原  $\text{H}_2\text{O}_2$  外, 并还原磷脂氢过氧化物。第三类是血浆 GPX(pGPX), 它既能还原磷脂氢过氧化物又能还原  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[25]</sup>。第四类 GPX 是胃肠道 GPX

(giGPX), 它高表达于胃肠道粘膜上皮细胞<sup>[26]</sup>。大量的证据表明, cGPX 能有效地新陈代谢细胞内的  $H_2O_2$ 。特别是细胞内或细胞器的 CAT 含量很低或缺乏时。PHGPX 是必不可少的生物膜组成成分, 它阻止生物膜的非专一性的磷脂过氧化。现在又有一种新的 GPXP 被发现, 它存在于植物中被命名为 OsGPX, 它是由环境胁迫诱导产生。不同种类的 GPX 相对分子量和比活性都有所不同见表 1, 现对比如下:

表 1 不同种类的谷胱甘肽过氧化物酶的性质

Tab 1 Properties of GPX from different species

种类	亚基相对 分子量(Kd)	亚基数	活力(底物 $H_2O_2$ ) (U/ $\mu$ mol)
cGPX	21	4	216
pGPX	21.5	4	31.3
giGPX	23	4	2.1
phGPX	22	1	135

## 5 结语

谷胱甘肽过氧化物酶是机体抗氧化防御体系中重要的酶之一, 能清除  $H_2O_2$  防止细胞脂质过氧化, 延缓生命衰老。自由基学说是现代抗衰老学说中的一种。自由基学说认为, 自由基能使细胞受到损害, 导致人体衰老和死亡。同时, 这种学说还认为凡能抑制和消除自由基的物质, 均具有抗衰老作用。因此研究和完善自由基学说, 筛选能防御自由基损害的抗衰老药物, 对防治老年病和提高人类生存质量, 延年益寿有着不可低估的作用。综上所述, 人体产生的自由基能加速人体衰老和死亡, 而抑制和清除自由基能延缓人体衰老过程。因此研究和应用抗氧化剂和抗氧化酶类药物, 防御自由基对人体的健康损害有重要的现实意义。

## 参考文献:

[1] Alexandrova M, Bochev P, Markova V, *et al.* Dynamics of free radical processes in acute ischemic stroke: influence on neurological status and outcome[ J ]. *J Clin Neurosci*, 2004, 11(5): 501

[2] Boldyrev A, Bulygina E, Makhro A. Glutamate receptors modulate oxidative stress in neuronal cells. A mini-review[ J ]. *Neurotox Res*, 2004, 6(7-8):581

[3] Cantore M., Siano S., Coronello M. *et al.* Pirenoxine prevents oxidative effects of argon fluoride excimer laser irradiation in rabbit corneas: biochemical, histological and cytofluorimetric evaluations [ J ]. *J Photochem Photobiol B*, 2005, 78(1): 35

[4] Wang H., Kochevar I. E. Involvement of UVB-induced reactive oxygen species in TGF- $\beta$  biosynthesis and activation in keratinocytes [ J ]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38(7): 890

[5] Woiniak A, Drewa G, Wozniak B. *et al.* The effect of antitumor drugs on oxidative stress in B16 and S91 melanoma cells in vitro[ J ]. *Med Sci Monit*, 2005, 11(1):22

[6] Meriyani Odyuo M. Differential DNA strand breaking abilities of OH $\cdot$  and ROS generating radiomimetic chemicals and rays: Study of plasmid DNA, pMTa4, in vitro[ J ]. *Free Radic Res*, 2005, 39(5): 499

[7] Balizhayev M. A. Failure to withstand oxidative stress induced by phospholipid hydroperoxides as a possible cause of the lens opacities in systemic diseases and ageing[ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 1315, 1996: 87

[8] Burke MP, Opeskin K. Fulminant heart failure due to selenium deficiency cardiomyopathy (Keshan disease)[ J ]. *Mal Sci Law*, 2002, 42: 10

[9] Forgione MA, Cap A, Liao R. *et al.* Heterozygous cellular glutathione peroxidase deficiency in the mouse: abnormalities in vascular and cardiac function and structure[ J ]. *Circulation*, 2002, 27: 1154

[10] Nakamura Y, Feng Q, Kumagai T. *et al.* Ebselen, glutathione peroxidase mimetic seleno-organic compound, as a multifunctional antioxidant. Implication for inflammation-associated carcinogenesis[ J ]. *J Biol Chem*, 2002, 277:2687

[11] Bosch-Morell F, Roma J. Efficacy of the antioxidant ebselen in experimental uveitis[ J ]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27:388

[12] Richter C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes[ J ]. *Phys. Lipids*, 1987, 44:175

[13] Mills G. C., Hemoglobin Catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown [ J ]. *J. Biol. Chem*, 1957, 229: 189

[14] Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE. *et al.* Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase[ J ]. *Science*, 1973, 179: 588

[15] Flohe L, Gunzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme[ J ]. *FEBS lett*, 1973, 32: 132

[16] Stadtman TG. elenocysteine[ J ]. *Annu. Rev. Biochem*, 1996, 65:83

[17] Atkins JF, Gstelland RF. The twenty first amino acid[ J ]. *Nature*, 2000, 407:463

[18] Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2 nm resolution [ J ]. *Eur. J. Biochem*, 1983, 133:51

[19] Flohe L, Loschen G, Gunzler WA. Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism[ J ]. *Hoppe-Seyler's Z-physiol. Chem*, 1972, 353: 987

[20] Flohe, L. Glutathione peroxidase[ J ]. *Basic Life. Sci*, 1988, 49:663

[21] Dalziel K. The interpretation of kinetic data for enzyme-catalysed reactions involving three substrates[ J ]. *Biochem J*, 1969, 114: 547

[22] Segel JH. Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons[ M ]. New York, 1975. 607

[23] Jones JT, Reavy B, Smart G. Glutathione peroxidases of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*[ J ]. *Gene*, 2004, 324:47

[24] Ursini F, Maiorini M. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides[ J ]. *Biochem. Biophys. Acta*, 1982, 710:192

[25] Maddipati KR, Gasparski C, Matnett LJ. Characterization of the hydroperoxide-reducing activity of human plasma[ J ]. *Arch. Biochem. Biophys*, 1987, 254: 9

[26] Chu FF, Doroshov JH, Esworthy, SJ. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GII [ J ]. *J. Biol. Chem*, 1993, 268: 2571

(收稿日期:2005-06-21; 修回日期:2005-07-27)

(本文编辑 魏 萍)