

水生生物超氧化物歧化酶的研究进展

张立颖, 赵 萌, 王跃智

(北京市水产科学研究所, 北京 100068)

摘要: 超氧化物歧化酶是生物体内一种重要的抗氧化酶, 具有清除生物体内超氧阴离子自由基的作用, 可有效地抗御氧自由基对有机体的伤害。概述水生生物(如鱼、虾、贝、藻) SOD 的种类、分布、结构特征、理化性质及基因克隆表达的研究进展, 并对其应用前景进行展望。

关键词: 水生生物; 超氧化物歧化酶; 超氧阴离子自由基

中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)04-0800-05

A Review on Superoxide Dismutases of Hydrobios

ZHANG Li-ying, ZHAO Meng, WANG Yue-zhi

(Beijing Fisheries Research Institute, Beijing 100068, China)

Abstract: Superoxide dismutase (SOD) is an important antioxidase in living creature, existing widely in cytoplasm, mitochondria and chloroplast of eukaryotic and prokaryotic cells, and it can efficiently eliminate superoxide free anion radicals in organism, and prevent organism damage from superoxide free anion radicals. This paper summarizes the research advances on hydrobios (eg. fishes, shrimps, shellfishes and algae) superoxide dismutase in terms of types, distribution, structural characteristics, physicochemical properties and gene cloning and expression. Meanwhile, the prospect of its application is also forecasted.

Key words: hydrobios; superoxide dismutase; superoxide anion radical

广泛存在于细胞和组织中的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 是清除体内超氧阴离子自由基一种重要的酶, 它由美国学者 McCord 和 Fridovich 于 20 世纪 60 年代末发现^[1]。大量的基础和临床研究证实, 当受到病毒、细菌入侵时, 机体的免疫细胞会产生自由基物质 (主要是氧自由基和一氧化氮自由基等) 来杀灭细菌病毒, 这是免疫反应中重要的一环, 但是, 当免疫反应过度, 自由基产生过量时, 它们的非特异反应特性会不加分辨地对受感染机体的生命基本结构分子如蛋白质、核苷酸、脂肪等产生极强的氧化硝化反应, 导致对细胞、组织的攻击。

SOD 作为生物体内超氧阴离子自由基的清洁剂, 在防辐射、抗衰老、消炎、抑制肿瘤和癌症、自身免疫治疗等方面显示出独特的功能, 在医学、食品、化妆品等领域得到越来越多的应用。目前, 世界各地学者对 SOD 的研究方兴未艾, 深入研究 SOD 不仅有着重大的理论意义, 也有着重大的实际应用价值。不同动物, 其 SOD 的含量不同, 即使同一种动物, 其不同组织的 SOD 含量也各不相同。通常以肝脏中的 SOD 的含量最为丰富。陆生动植物 SOD 的研究报道较多, 水生生物方面仅有十几个品种的 SOD 被研究^[2-12]。本文概述了水生生物(如鱼、虾、贝、藻) SOD 的种类分布及研究进展, 并对其应用前景进行展望。

收稿日期: 2012-03-12 修回日期: 2012-05-18

基金项目: 北京市重大项目 (D101105046210004)

作者简介: 张立颖 (1984—), 女, 助理工程师, 主要从事水生生物生理学研究, E-mail: zhangliyong999@yahoo.com.cn。

1 SOD 的种类及分布

SOD 按其结合的金属离子不同,主要分为 Cu/Zn-SOD、Fe-SOD 和 Mn-SOD。Cu/Zn-SOD 主要存在于真核细胞的胞液和叶绿体中,呈现蓝绿色,相对分子量约为 32 000。它由 2 个亚基组成,每个亚基各有 1 个 Cu^{2+} 和 1 个 Zn^{2+} 。Fe-SOD 和 Mn-SOD 很相似^[13],但是它们有明显的差异氨基酸以及对 H_2O_2 的敏感性^[14-15]。Fe-SOD 多见于原核细胞及少数植物细胞中,为黄褐色,相对分子量约为 38 700。它是由 2 个亚基组成的,每个亚基中各含 1 个 Fe^{3+} 。紫红色的 Mn-SOD 在原核生物细胞及线粒体中也比较常见,相对分子量约为 40 000。原核细胞中的 Mn-SOD 是由 2 个亚基组成,而来自真核细胞线粒体中的 Mn-SOD 是由 4 个亚基组成,且每个亚基各含有 1 个 Mn^{2+} 。20 世纪 90 年代,人们又陆续从链霉菌属中发现 Ni-SOD 和 Fe/Zn-SOD,在牛肝中发现了一种 Co/Zn-SOD 等不同的 SOD,这些都是少见的 SOD。

2 SOD 的结构特征

2.1 Cu/Zn-SOD 的结构特征

不同来源的 Cu/Zn-SOD 的氨基酸序列,无论是来自细菌、真菌高等植物细胞质或叶绿体,还是来自高等动物和人的细胞质,它们的同源性都较高,有些氨基酸很保守。在 Cu/Zn-SOD 的氨基酸组成中,酪氨酸和色氨酸的含量甚微,甚至没有。而甘氨酸含量较高,每 6~8 个氨基酸残基中就有 1 个甘氨酸残基。1975 年 Richardson 得到了 Cu/Zn-SOD 的三维结构^[16],发现它是由 2 个基本相似的亚基组成的二聚体,且每个亚基含有 1 个铜原子和 1 个锌原子。2 个相同亚基之间通过非共价键的疏水相互作用而缔合,类似于圆筒的端面。Cu 与 4 个来自组氨酸残基(His44,46,61,118)的咪唑氮配位,呈现 1 个三角双锥畸变的四方锥构型。Zn 则与 3 个来自组氨酸残基(His61,69,78)的咪唑氮和 1 个天门冬氨酸残基(Asp81)的羧基氧配位,呈畸变的四面体构型。

2.2 Fe-SOD 的结构特征

不同生物来源的 Fe-SOD 一级结构同源性较低。Phalgun 等^[17]比较了 7 种嗜盐古细菌家族的 Fe-SOD,在 199 个氨基酸中有 125 个氨基酸完全一致(62%),而它们与真菌和真核线粒体 Fe-SOD 相比只有 35%~40%的同源性。但 Donatella 等^[18]研究了真核细胞 *Tetrahymena pyriformis* 的四聚体 Fe-SOD 并测序,氨基酸序列分析表明,与其它来源的 Fe-SOD 相比,具有较低的同源性(33%~34%)。Barry 等^[19]认为对 Fe-SOD 结构最有意义的特征之一是高度保守的芳香族氨基酸含量,特别是在活性部位的氨基酸残基。占 17% 的蛋白序列的 33 个保守氨基酸残基分别是 His、Tyr、Phe 和 Trp,活性部位 Fe 的 8Å 范围内发现 5 个保守氨基酸残基,分别为 Tyr34、Tyr77、His30、Trp123 和 Trp158,其中,Trp 和 Tyr34 存在于所有接近金属开放结合位置。另外,在所有的 Fe-SOD 中都存在严格保守的 Gln70 和 Tyr34 之间的相互作用,这对残基之间的相互作用在酶的化学性质、结构及催化动力学方面都起着重要的作用,并与酶的金属特异性相关。

到目前为止,发现 Fe-SOD 具有二聚体和四聚体 2 种形式。每一种形式都由各自相同的亚基组成。高嗜温性菌株 *S. solfataricus* 的 Fe-SOD 晶体结构显示,在每一对称亚基中含 2 个相同单体,形成一个紧凑的四聚体,与来源于结构分支杆菌的嗜温性 SOD 相比,在亚基之间的 Fe 离子对的数量增多。电子数据显示在活性部位保留氨基酸 Tyr 残基上存在特别的共价修饰。这可能与酶特殊高嗜温性相关^[20]。

2.3 Mn-SOD 的结构特征

任何生物来源的 Mn-SOD 的一级结构的同源性都很高。如人 Mn-SOD 和鼠、大肠杆菌的 Mn-SOD 的同源性分别为 94% 和 43%,不仅如此,参与形成活性中心及与金属连接的氨基酸在所有 Mn-SOD 中都是保守的,而且与金属锰相连的氨基酸在所有 Mn-SOD 中也是保守的,它们是 His26、His87、His181 和 Asp185。Mn-SOD 的 CD 谱表明,其含有较高程度(大于 32%)的 α 螺旋结构,较少 β 折叠。由一级结构预测的二级结构表明,Mn-SOD 中不可能存在象 Cu/Zn-SOD 那种八股反平行的 β 折叠,也不存在长的松散环,整个结构比较紧凑。电子自旋共振(ESR)和核磁共振(NMR)研究揭示 Mn-SOD

中的金属离子是处于高度自旋状态的 3 价锰 Mn^{3+} 。Mn-SOD 的金属辅基上结合有 1 个水分子。金属辅基对蛋白质结构有稳定作用,而且与 Mn-SOD 的活性直接相关。

Mn-SOD 的活性中心都是具有五配位的三角双锥结构,其中一个轴向配体为水分子,来自蛋白质辅基的 4 个配位基为 His28、His83、Asp166 和 His170。后 3 个配位基位于赤道平面,His28 的咪唑基则占据着另一个轴向位置。活性部位处在一个主要由疏水残基构成的疏水壳子里,两个亚基链共同开成一个通道,该通道终止于金属离子附近的 Try36 和 His32 残基,是底物或其他内界配体接近 Mn^{2+} 离子的经由之路。His33、Trp37、His83 和 Tyr36 形成一个疏水口袋,该口袋构成底物结合部位。

3 SOD 的理化性质

SOD 是一种酸性蛋白,在酶分子上共价连结金属辅基,因此它对热、pH 以及某些理化性质表现出异常的稳定性。

3.1 温度对 SOD 的影响

温度是生物生存环境的重要因素之一。因为细胞膜的成分中含有脂类,所以温度过高或过低都会对细胞膜系统造成影响,进一步破坏细胞内的蛋白质和 DNA 等。SOD 作为一种细胞膜保护酶在温度胁迫下发挥作用。SOD 酶活性在适宜温度范围外随时间和温度的变化而下降,仅在适宜温度范围内趋于稳定,表 1 是不同来源 SOD 酶的熔点温度(范围)。

表 1 不同来源 SOD 的熔点温度(温度范围)

Tab.1 The denaturing temperature of SOD from different sources

来源 Source	熔点温度/°C Denaturing temperature
黄鳝(肠) Intestinal of ricefield eel	70
罗非鱼(肝) Liver of hybrid <i>Tilapia</i>	75
鲨鱼(肝) Liver of shark	72
口虾蛄(肝胰脏) Hepatopancreas of <i>Squilla oratoria</i>	30 ~ 60
贻贝(肌肉) Muscle of <i>Perna viridis</i>	55 ~ 60
钝顶螺旋藻 <i>Spirulina platensis</i>	25
盐藻 <i>Dunaliella salina</i>	70

表 2 不同来源 SOD 的等电点

Tab.2 The pI of SOD from different sources

来源 Source	pI
黄鳝(肠) Intestinal of ricefield eel	7.15
泥鳅(肌肉) Muscle of loach	6.10、6.64、6.86、7.40
黄鳝(内脏) Splanchna of ricefield eel	7.1
口虾蛄(肝胰脏) Hepatopancreas of <i>Squilla oratoria</i>	6.7
扇贝(内脏团) Visceral mass of scallop	8.30

3.2 pH 对 SOD 的影响

SOD 在 pH5.3 ~ 10.5 内其催化速度不受影响。如 pH3.6, SOD 中 Zn 要脱落 95%, pH12.2 SOD 的构象会发生不可逆的转变,从而导致酶活性丧失。SOD 对 pH 的稳定性同样归因于金属辅基的存在,一旦去除金属离子,其稳定性就大大下降。实验表明,不同来源的 SOD,其等电点 pI 值也不相同,见表 2。

3.3 SOD 的紫外吸收

SOD 具有特殊的光吸收,Fe-SOD 不含 Cys,而含有较多的 Trp 和 Tyr,不同来源的 Fe-SOD 的吸收峰为 278 ~ 280 nm^[21-22]。且 Cu/Zn-SOD 的紫外吸收峰在 260 nm 附近^[23],Mn-SOD 的吸收峰为 280 ~ 282 nm,不同来源 SOD 的紫外吸收值见表 3。

3.4 酶活性

SOD 是金属酶,在 Cu/Zn-SOD 酶中,Cu 与 Zn 的作用是不同的,Zn 仅与酶分子结构有关,而与催化活性无关,而 Cu 与催化活性有关,透析去除 Cu 则酶活性全部丧失,一旦重新加入,其活性又可恢复。同样,在 Mn-SOD、Fe-SOD 和 Ni-SOD 中,Mn、Fe 和 Ni 与 Cu 一样,对酶活性是必需的。不同来源 SOD 的紫外吸收值见表 4。

3.5 分子量

Cu/Zn-SOD 是一个二聚体,均含有 2 个相同的亚基,每个亚基有一个 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} ,全酶分子量一般为 31 ~ 33 ku,亚基分子量为 15 ~ 17 ku。Mn-SOD 的相对分子量随来源不同而异,来自原核生物的

表3 不同来源 SOD 的最大紫外吸收值

Tab.3 The maximum ultraviolet absorption value of SOD from different sources

来源 Source	金属类型 Metal type	最大吸收值/nm Maximum ultraviolet absorption of the enzyme
黄鳝(肠) Intestinal of ricefield eel	Fe - SOD	280
罗非鱼(肝脏) Liver of hybrid <i>Tilapia</i>	Cu/Zn - SOD	265
泥鳅(肌肉) Muscle of loach	Fe - SOD	278
鲨鱼(肝) Liver of shark	Cu/Zn - SOD	258
黄鳝(内脏) Splanchna of ricefield eel	Fe - SOD	280
口虾蛄(肝胰脏) Hepatopancreas of <i>Squilla oratoria</i>	Cu/Zn - SOD	268
贻贝(肌肉) Muscle of <i>Perna viridis</i>	Cu/Zn - SOD	268
扇贝(内脏团) Visceral mass of scallop	Cu/Zn - SOD	270.5
钝顶螺旋藻 <i>Spirulina platensis</i>	Fe - SOD	279

Mn - SOD 相对分子量约为 40 ku,由 2 个亚基组成,每个亚基各含有 1 个 Mn^{2+} ,其分子量为 19 ~ 21 ku,来自真核生物线粒体的 Mn - SOD,相对分子量为 80 ku,由 4 个亚基组成,每个亚基分子量为 19.5 ~ 21 ku。Fe - SOD 广泛存在于原核生物中,按其结构可分为两类,一类是分子量约为 40 ~ 50 ku 的二聚体,亚基分子量约为 20 ~ 26 ku;另一类是分子量约为 80 ~ 90 ku 的四聚体,其亚基分子量约为 23 ku。不同来源 SOD 酶及其亚基的分子量见表 5。

3.6 金属离子对 SOD 活性的影响

不同浓度的金属离子对 SOD 的活性有着不同的影响,在低浓度下,它可以提高 SOD 的活性,而在高浓度下,SOD 的活性将显著下降。张尔贤等发现 0.02 mol/L KCN 30 μ L 即可使鲨鱼肝脏 SOD 酶活性被抑制 50%。王伟伟发现 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 4 种金属离子对 3 种虾肌肉组织中 SOD 活性则是低浓度起促进作用,高浓度具有明显的抑制作用,但抑制程度不同。此外,郜赵伟等^[24]发现, Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 对南方

表4 不同来源 SOD 酶比活力

Tab.4 The enzyme specific activity of SOD from different sources

来源 Source	酶比活力/(U · mg ⁻¹) Specific activity
黄鳝(肠) Intestinal of ricefield eel	1 500
罗非鱼(肝脏) Liver of hybrid <i>Tilapia</i>	4 895
泥鳅(肌肉) Muscle of loach	2 414
黄鳝(内脏) Splanchna of ricefield eel	1500
口虾蛄(肝胰脏) Hepatopancreas of <i>Squilla oratoria</i>	983.8
贻贝(肌肉) Muscle of <i>Perna viridis</i>	782
扇贝(内脏团) Visceral mass of scallop	2 616
钝顶螺旋藻 <i>Spirulina platensis</i>	4 576

鲶(*Silurus meridionalis*) 肝超氧化物歧化酶活性有强烈的抑制作用;而张迎梅等^[25]研究重金属胁迫对泥鳅肝胰脏超氧化物歧化酶活性的影响,得出 Zn^{2+} 对超氧化物歧化酶有一定的激活作用。

4 SOD 基因的克隆表达

随着生物技术的快速发展,很多种类的 SOD 基因的克隆和分离已经获得成功,并且具有生物活性。郭建军等^[26]根据 SOD 的蛋白质保守序列,以念珠藻 Fe - SOD 基因序列为基础设计引物,通过 PCR 扩增得到钝顶螺旋藻的 Fe - SOD 基因。通过测序发现此基因长 528 bp,含有 1 个 ORF (open reading frame) 编码 170 个氨基酸残基。IPTG 诱导表达表明,Fe - SOD 融合蛋白实现了高水平表达,在最佳表达条件 37 $^{\circ}$ C、1 mmol/L IPTG 浓度、诱导表达 5 h 后,其外源基因表达量占全菌蛋白的 78%,刷新了原核表达 SOD 高产的新记录。这是我国首次利用基因工程方法获得 Fe - SOD。这也为进行螺旋藻 SOD 的基因的克隆和表达奠定了坚实的基础。

目前,包括鱼类在内的大型水生生物的内脏通常都被丢弃,没有充分利用。从目前的研究中可以看到水生生物具有很高的 SOD 活性,SOD 具有抗衰老、抗炎、抗疾病、抗辐射等多种作用。用鱼类在内的大型水生生物的内脏为原料,开发一种新的 SOD 制剂,既可变废为宝,又可减轻环境污染,将很有发展前景。

表 5 不同来源 SOD 酶及其亚基的分子量

Tab. 5 The molecular weights of SOD and their subunits from different sources

来源 Source	金属类型 Metal type	分子量/ku Molecular weight	亚基个数 Subunit number	亚基分子量/ku Subunit of molecular weight
黄鳝(肠) Intestinal of ricefield eel	Fe - SOD	85	5	16.5
罗非鱼(肝脏) Liver of hybrid <i>Tilapia</i>	Cu/Zn - SOD			36
泥鳅(肌肉) Muscle of loach	Fe - SOD	36.5	2	18.2
鲨鱼(肝) Liver of shark	Cu/Zn - SOD	32	2	16
黄鳝(内脏) Splanchna of ricefield eel	Fe - SOD	87	6	14.5
口虾蛄(肝胰脏) Hepatopancreas of <i>Squilla oratoria</i>	Cu/Zn - SOD	31.5	2	15.6
贻贝(肌肉) Muscle of <i>Perna viridis</i>	Cu/Zn - SOD	32	2	16.4
扇贝(内脏团) Visceral mass of scallop	Cu/Zn - SOD	30	2	15
钝顶螺旋藻 <i>Spirulina platensis</i>	Fe - SOD			21

参考文献:

[1] McCord J M, Fridovich. Superoxide dismutase [J]. Biol Chem, 1969 244(22): 6049-6055.

[2] 沈洪国, 唐云明, 江信红, 等. 黄鳝超氧化物歧化酶的纯化和部分性质研究 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2005 30(1): 136-140.

[3] 吴燕燕, 李来好, 郝志明, 等. 罗非鱼肝脏中超氧化物歧化酶的提取、纯化与分析 [J]. 水产学报 2007 31(4): 518-523.

[4] 唐云明. 泥鳅铁超氧化物歧化酶的纯化和部分性质研究 [J]. 水生生物学报, 1998 22(3): 287-290.

[5] 张尔贤, 李建喜, 俞丽君, 等. 鲨鱼肝脏超氧化物歧化酶的纯化和部分性质研究 [J]. 中国药理学杂志, 1999 34(4): 231-233.

[6] 沈洪国, 唐云明, 韩晨霞. 黄鳝内脏铁型超氧化物歧化酶的纯化 [J]. 水产科学 2005 24(2): 15-17.

[7] 王伟伟, 刘存岐, 李道季, 等. 3 种虾超氧化物歧化酶部分理化性质比较 [J]. 水产科学 2009 28(4): 200-204.

[8] 柯佳颖, 陈细香, 陈寅山, 等. 口虾蛄肝胰脏超氧化物歧化酶的纯化和部分性质研究 [J]. 水产科学 2011 30(9): 533-537.

[9] 林少琴, 黄义德, 詹宝玉. 贻贝超氧化物歧化酶的纯化和部分性质研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1998 11(4): 25-29.

[10] 王跃军, 孙谧, 李民, 等. 扇贝超氧化物歧化酶的纯化和部分性质研究 [J]. 海洋水产研究, 1998 19(2): 69-75.

[11] 夏文超, 李素霞, 范立强, 等. 钝顶螺旋藻 Fe - SOD 的纯化及性质 [J]. 华东理工大学学报, 2003 29(2): 20-22.

[12] 郭金耀, 杨晓玲. 盐藻 SOD 纯化条件研究 [J]. 海洋通报 2010 29(4): 417-420.

[13] 自俊青, 杨志毅. 超氧化物歧化酶 SOD 及其研究简介 [J]. 大理师专学报, 1998 8(1): 56-61.

[14] Parker M W, Blake C C. Iron - manganese - containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures [J]. FEBS Lett, 1988 229(2): 377-382.

[15] Tainer J A, Getzoff E D, Beem K M, et al. Determination and analysis of the 2A - structure of copper, zinc superoxide dismutase [J]. J Mol Biol, 1982 15(2): 181-217.

[16] 陈忠宁, 毛宗万, 唐雯霞. 铜锌超氧化物歧化酶的结构机理及其模拟研究进展 [J]. 化学通报, 1993 6(2): 1-7.

[17] Phalgun J, Dennis P P. Structural, function and evolution of the family of superoxide dismutase proteins from *Halophilic archaeobacteria* [J]. J Bacteriol, 1990 175(6): 1572-1580.

[18] Donatella B, Eugenia M S, Franeseo B, et al. Tetrameric iron superoxide dismutase from the eukaryote *Tetrahymena pyriformis* [J]. J Biol Chem, 1990 265(29): 17680-17687.

[19] Barry L S, Dagmar R, Gregory A P. The 2.1 Å resolution structure of iron superoxide dismutase from *Pseudomonas ovalis* [J]. Biochemistry, 1990 29(29): 8885-8893.

[20] Ursby T, Adinolfi B S, Al - Karadaghi S, et al. Iron superoxide dismutase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Analysis of structure and thermostability [J]. J Mol Biol, 1999 286(1): 189-205.

[21] Salin M L, Bridges S M. Isolation and characterization of an ironcontaining superoxide dismutase from an eucaryote *brassica campestris* [J]. Arch: J Biochem Biophys, 1980 201(1): 369-374.

[22] Kwiatowski J, Safianowska A, Kaniuga Z. Isolation and characterization of an ironcontaining superoxide dismutase from tomato leaves [J]. Lycoersicon Scalentun: Eur J Biochem, 1985 146(2): 459-466.

[23] 邹国林, 罗时文. 小白菜线粒体锰超氧化物歧化酶的纯化和性质研究 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1992 24(2): 180-183.

[24] 郝赵伟, 王松, 付伟丽, 等. 南方鲶肝超氧化物歧化酶的分离纯化及部分性质研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2009 31(8): 84-87.

[25] 张迎梅, 王叶菁. 重金属胁迫对泥鳅肝脏 ATPase 和 SOD 活性的影响 [J]. 甘肃科学学报, 2008 20(3): 55-59.

[26] 郭建军, 龚兴国. 钝顶螺旋藻 Fe - SOD 基因的克隆及序列分析 [J]. 浙江大学学报: 理学版, 2004 31(6): 674-678.