

DOI: 10.13376/j.cbls/2015082

文章编号: 1004-0374(2015)05-0609-09

## 动物细胞中活性氧的生成及代谢

耿军伟<sup>1,2</sup>, 于涵<sup>1,2</sup>, 林枝<sup>1,2</sup>, 薛凌<sup>1,2</sup>, 管敏鑫<sup>1,2,3\*</sup>

(1 温州医科大学Attardi线粒体生物医学研究院, 温州 325035; 2 温州医科大学浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035; 3 浙江大学生命科学学院, 杭州 310058)

**摘要:** 我们生活在一个氧气充足的环境中, 氧自由基参与的化学反应是需氧生物代谢的一部分。生理低水平的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 作为信使分子介导许多生理过程。同时, 活性氧积累和氧化损伤参与许多疾病的病理过程。因此, 活性氧分子在生理和病理过程中发挥的作用越来越受到人们的关注。现对细胞内可能产生活性氧的部位及其产生机制进行综述, 总结概括了细胞内存在的抗氧化系统, 列举了目前检测活性氧的方法及其局限性, 提出了目前活性氧研究领域亟待解决的问题, 最后对临床药理学的靶向抗氧化剂治疗进行展望。

**关键词:** ROS; 生理学; 病理学

中图分类号: Q255; Q955 文献标志码: A

## Formation and metabolism of reactive oxygen species in cell

GENG Jun-Wei<sup>1,2</sup>, YU Han<sup>1,2</sup>, LIN Zhi<sup>1,2</sup>, XUE Ling<sup>1,2</sup>, GUAN Min-Xin<sup>1,2,3\*</sup>

(1 Attardi Institute of Mitochondrial Biomedicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 2 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; 3 College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** We live in an environment full of oxygen. Oxygen radical species-associated chemical reactions are a part of metabolism in aerobic organisms. Low level of reactive oxygen species acts as signal molecule involving many bioreactions. However, the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and oxidative damage are associated with many pathologic processes. The role of ROS in physiological and pathologic process causes more and more attention. This review describes the possible cellular locations and mechanisms of generating ROS in animal cells, summarizes the intracellular antioxidant systems, lists the current detection methods of ROS and its limitation, enumerates some urgent problems in ROS research, and finally, prospects the targeting treatment with antioxidants in clinical pharmacology.

**Key word:** reactive oxygen species (ROS); physiology; pathology

### 1 活性氧

#### 1.1 活性氧的组成

活性氧通常用来描述超氧化物 ( $O_2^-$ ) 衍生的自由基分子, 如超氧阴离子 ( $O_2^{\bullet-}$ )、羟自由基 ( $\bullet OH$ )、过氧自由基 ( $RO_2\bullet$ ) 和烷氧基 ( $RO\bullet$ ), 以及  $O_2^-$  衍生的非自由基分子, 如过氧化氢 ( $H_2O_2$ )<sup>[1]</sup>。每个氧原子在最外电子层含有两个未配对的电子, 分子氧得到一个电子形成  $O_2^{\bullet-}$  ( $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$ ), 得到两个电子然后质子化后形成过氧化氢 ( $O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow HO_2^{\bullet-}$ ;  $2HO_2^{\bullet-}$

$\rightarrow H_2O_2 + O_2$ )。过氧化氢通过 Fenton 反应得到三个电子, 产生高活性的羟自由基 ( $\bullet OH$ )——( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$ )<sup>[2]</sup>。

#### 1.2 活性氧研究的发展

1954 年, Gershman 等<sup>[3]</sup> 提出了氧毒性的自由

收稿日期: 2014-12-20; 修回日期: 2015-01-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401070); 温州医学院科研发展基金项目(QTJ13017)

\*通信作者: E-mail: gminxin88@gmail.com; Tel: 0571-88206497

基理论。同一年, Commoner 等<sup>[4]</sup>在许多冻干材料中发现了自由基, 从而开启了自由基研究的时代。1956年, Harman<sup>[5-6]</sup>提出体内氧自由基来源于酶反应的副产物, 在生物衰老过程中发挥着重要的作用, 从而引发了生命系统的自由基理论的深入研究。1969年, McCord 和 Fridovich<sup>[7]</sup>研究发现, 超氧化物歧化酶在哺乳动物组织中分布广泛, 具有高活性, 该酶清除生命系统中超氧阴离子产生的氧化损伤效应, 在生命系统中发挥着重要的作用。这一研究成果让许多研究者对生物系统的自由基研究产生了极大的兴趣<sup>[8]</sup>。1977年, Mittal 和 Murard<sup>[9]</sup>提出羟自由基刺激激活鸟苷酸环化酶, 从而形成二级信使分子环鸟苷酸(cGMP), 参与信号转导过程。自由基有利的生物学效应的报道开启了自由基研究的第三时代。21世纪初, 大量实验数据显示, 生命系统不仅实现了与自由基的共存, 同时已经进化出了一套完整的有效利用自由基的机制, 在许多生理过程中发挥作用, 包括作为信号分子参与信号转导, 对低氧的适应, 参与自噬、免疫、分化的调控等<sup>[10-12]</sup>。与此同时, 活性氧积累和氧化损伤参与神经退行性疾病、糖尿病、癌症和早衰等疾病的病理过程<sup>[11,13]</sup>。自由基及其衍生物在生物体中发挥有利或者有害作用的精确的调控机制是生命体的重要组成部分<sup>[14]</sup>。越来越多的科研团队开始关注细胞内的活性氧的研究。

## 2 细胞内的活性氧

活性氧是由  $O_2^-$  或者过氧化氢衍生的许多活性分子组成。一方面, 生理低水平的活性分子作为信号分子, 介导细胞中许多生理过程; 另一方面, 活性分子的积累会引起 DNA、蛋白质和脂类等生物大分子的氧化损伤, 破坏机体的氧化还原平衡, 是多种疾病的风险因子<sup>[15-16]</sup>。细胞内多个结构可以产生和释放 ROS, 例如线粒体、内质网、溶酶体和质膜等<sup>[17]</sup>。

### 2.1 线粒体与活性氧

线粒体是真核细胞内的一种能量转换细胞器, 通过氧化磷酸化为好氧生物提供生命活动所需要的能量, 被形象地称为细胞的“动力工厂”。实验数据表明, 在线粒体氧化磷酸化电子传递过程中, 2%~4%的氧气没有被还原产生水而是转变为 ROS<sup>[18-19]</sup>。线粒体被认为是细胞内 ROS 来源的主要亚细胞结构。线粒体至少拥有 10 个能够产生 ROS 的位点<sup>[20]</sup>。

线粒体复合体 I 也被称为 NADH-泛醌氧化还原酶, 该酶是线粒体内膜上的多蛋白质复合体, 在可逆反应中以辅酶 Q 作为电子受体, 氧化 NADH

的同时泵出质子产生转膜势。复合体 I 是线粒体电子传递链中最大、最复杂的组成成分。在复合体 I 中电子的运载体有黄素蛋白, 铁硫中心 N1a、N1b、N2、N3、N4 和 N5 以及数量未知的半醌<sup>[21]</sup>。最早的研究表明, 分离的复合体 I 能够在 NADH 存在的情况下, 还原的黄素结合位点 ( $I_F$ ) 能够产生超氧阴离子<sup>[22]</sup>。NAD<sup>+</sup>/NADH 的比率决定着黄素结合位点氧化还原性, 从而影响超氧阴离子的产生<sup>[23]</sup>。在琥珀酸或者三磷酸甘油存在的情况下, 产生还原型泛醌(QH<sub>2</sub>)和质子驱动力, 从而驱动电子通过复合体 I 还原 NAD<sup>+</sup>生成 NADH, 这一过程被称为反向电子传递<sup>[24]</sup>。对亚线粒体小泡和完整的线粒体的研究发现, 在反向电子传递过程中, 高膜电势或者质子驱动力影响超氧阴离子的产生<sup>[25]</sup>。Pryde 和 Hirst<sup>[23]</sup>报道, 线粒体复合体 I 在反向电子传递过程中表现了更大的过氧化氢产生速率。有实验数据显示, 在单独提供琥珀酸为底物的情况, 过氧化氢的产生比率为 2.65 nmol/min/mg 蛋白质<sup>[26]</sup>。通过对分离的线粒体复合体 I 和亚线粒体小泡的研究发现, 大量的超氧阴离子是由复合体 I 的还原泛醌结合位点 ( $I_Q$ ) 产生<sup>[27]</sup>。还有学者认为, ROS 最有可能是由铁硫中心 N1a 产生的<sup>[28]</sup>。外源的醌类能够刺激复合体 I 产生 ROS, 可能该醌类在铁硫中心和氧气之间起到还原桥梁作用。鱼藤酮能够抑制复合体 I 向泛醌的电子转移, 利用这一原理, Gyulkhandanyan 和 Penefather<sup>[29]</sup>研究发现, 复合体 I 在线粒体内膜的基质侧产生大量的超氧阴离子。虽然目前普遍认为, 线粒体电子传递链中的复合体 I 是线粒体 ROS 产生的主要位点, 但是仍然存在许多仍未解决的问题, 如复合体 I 各个位点产生 ROS 精确分子机制、特定位点的抑制剂的非特异性抑制作用以及线粒体复合体 I 的分离和纯化技术<sup>[27,30]</sup>。所以, 复合体 I 产生 ROS 的精确位点的明确还需要对复合体 I 的精确结构、特异位点抑制剂和纯化分离技术等进行深入研究。

线粒体复合体 II (琥珀酸: 醌氧化还原酶或者琥珀酸脱氢酶 SDH) 包含 4 个亚单位, 包括 FAD 共价结合在其活性位点的黄素蛋白亚单位 (SDHA)、包含 3 个铁硫簇 [2Fe-2S]、[4Fe-4S] 和 [3Fe-4S] 的铁硫簇蛋白亚单位 (SDHB), 还有 2 个转膜细胞色素 b 血红素亚单位 SDHC 和 SDHD。线粒体复合体 II 在三羧酸循环中氧化琥珀酸转变为延胡索酸, 在电子传递过程中还原泛醌。线粒体复合体 II 的活性直接影响琥珀酸氧化过程。Ralph 等<sup>[31]</sup>研究表明, 琥珀酸氧化过程通过复合体 II 到复合体 I 的反向电

子传递过程产生 ROS。有学者对大鼠骨骼肌中线粒体复合体 II 的研究表明, 线粒体复合体 II 能够高速率地产生超氧阴离子和过氧化氢。该研究表明, 线粒体复合体 II 的 ROS 主要来源于 FAD 结合位点, 而且只有当 FAD 为半还原 FADH• 或者完全还原状态 FADH<sub>2</sub> 时, 该亚基的底物结合位点没有其他分子的情况下, 超氧阴离子才能够产生<sup>[32]</sup>。利用线粒体复合体 II 的抑制剂丙二酸、草酰乙酸或者二氮嗪研究发现, 复合体 I 反向电子传递过程产生的 ROS 量减少; 然而, 刺激复合体 III 的 Q<sub>o</sub> 位点产生更多 ROS, 表明复合体 II 的活性调节电子传递链的复合体 I 和复合体 III 的活性<sup>[33]</sup>。

线粒体复合体 III 也被称为泛醌-细胞色素 *c* 还原酶, 该酶是一个多酶复合体, 以细胞色素 *c* 作为电子受体氧化辅酶 Q(QH<sub>2</sub>)。复合体 III 中电子运载体主要是细胞色素 *b<sub>L</sub>*、*b<sub>H</sub>*、*c<sub>1</sub>* 以及 Rieske 铁硫中心和中心 “*i*” 和 “*o*” 的泛醌<sup>[21]</sup>。线粒体复合体 III 发挥功能主要是一系列辅酶 Q 的氧化过程。在 Q<sub>o</sub> 位点, 铁硫蛋白的铁硫簇氧化辅酶 Q, 转移一个电子从而氧化细胞色素 *c<sub>1</sub>*, 细胞色素 *c<sub>1</sub>* 还原细胞色素 *c*。辅酶 Q 转移另一个电子到细胞色素 *b<sub>L</sub>*, 然后转移到细胞色素 *b<sub>H</sub>*, 穿过磷脂双分子层形成膜电势, 同时在 Q<sub>i</sub> 位点形成稳定的半醌。该反应过程称为 Q-循环<sup>[34-35]</sup>。Grigolava 等<sup>[36]</sup> 利用内膜外翻的亚线粒体小泡氧化琥珀酸证明了超氧阴离子的产生场所。当用抗霉素 A 处理这些小泡时, 它们产生超氧阴离子, 但当用氰化物 (细胞色素 *c* 氧化酶的抑制剂) 处理或者用抗霉素 A 和氰化物一起处理时并没有产生超氧阴离子; 利用 Q<sub>o</sub> 中心的抑制剂——黏么菌素、2,3-二巯基丙醇和黏噻唑菌醇能够抑制超氧阴离子的形成, 揭示超氧阴离子有可能是由 Q<sub>o</sub> 位点处的不稳定的半醌 (Q<sup>-</sup>) 形成的。在 Q<sub>o</sub> 位点形成的不稳定的半醌 (Q<sup>-</sup>) 是超氧阴离子形成过程中重要的反应<sup>[23,30]</sup>。Drose 和 Brandt<sup>[25]</sup> 研究表明, 高膜电势能够增加 Q<sub>o</sub> 位点产生的超氧阴离子。在复合体 III 的中心 “*i*” 抑制剂抗霉素 A 存在的条件下, 复合体 III 产生超氧阴离子, 然而, 复合体 III 中心 “*o*” 的抑制剂 myxothiazol 和 stigmatellin 能够阻止该效应。在泛醌穴处于高度还原状态的情况下, myxothiazol 能够诱导中心 “*o*” 产生超氧阴离子。中心 “*o*” 位于内膜的胞质溶胶侧的疏水结构域, 因此预测中心 “*o*” 释放的超氧阴离子进入细胞溶胶中<sup>[37]</sup>。

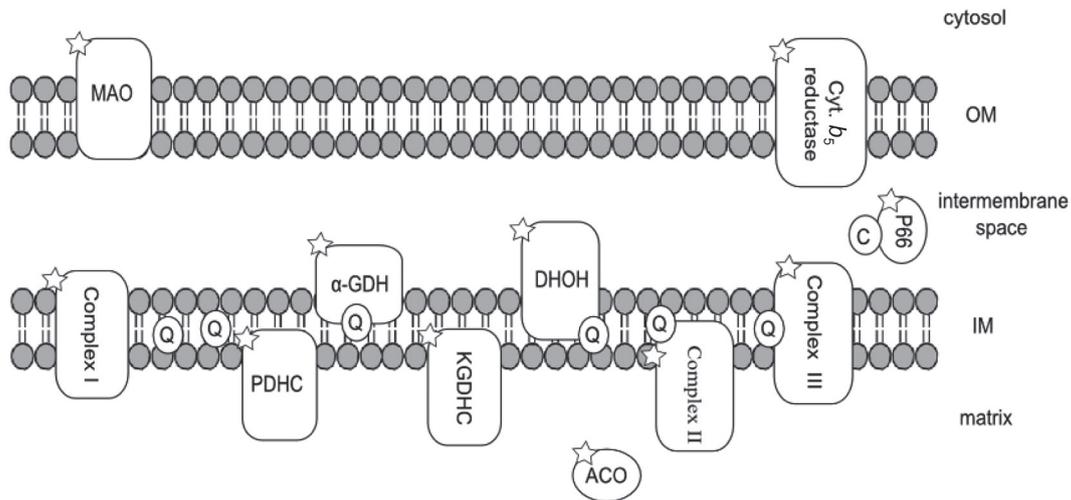
除了上述线粒体多酶复合体能够产生 ROS 外, 线粒体内还存在产生 ROS 的不同的酶。细胞色素

*b<sub>5</sub>* 还原酶 (cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase) 位于线粒体外膜, 广泛存在于哺乳动物组织中。Whatley 等<sup>[38]</sup> 报道表明, 细胞色素 *b<sub>5</sub>* 还原酶以大约 300 nmol/min/mg 蛋白质的高速率产生超氧阴离子。单胺氧化酶 (MAO) 位于线粒体外膜, 在许多哺乳动物组织中表达, 催化生物胺氧化的同时释放过氧化氢。Kunduzova 等<sup>[39]</sup> 报道称, 大鼠脑线粒体中单胺氧化酶氧化酪胺产生过氧化氢的速率是用抗霉素 A 抑制线粒体复合体 III 产生过氧化氢的 50 倍。在局部缺血组织、衰老过程和外源胺的氧化过程中, MAO 催化的反应是过氧化氢的主要来源。P66<sup>shc</sup> 是由人类和小鼠的 *shc* 基因座编码的氧化还原酶。实验证明, 线粒体中存在 P66<sup>shc</sup>, 大约 35% 的 P66<sup>shc</sup> 富集在线粒体膜间腔中<sup>[18]</sup>。有报道显示, P66<sup>shc</sup> 在调节 ROS 代谢过程中发挥着重要的作用<sup>[40-42]</sup>。P66<sup>shc</sup> 通过氧化细胞色素 *c*, 从而产生过氧化氢。有研究推测, 通过 P66<sup>shc</sup> 产生的线粒体过氧化氢的速率大约为 10 nmol/min/mg 蛋白质<sup>[18-19]</sup>。二氢乳清酸脱氢酶 (DHOH) 位于线粒体内膜的外侧, 在缺失线粒体内膜的辅酶 Q 的情况下, 还原性的 DHOH 在体外能够产生过氧化氢。 $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶 ( $\alpha$ -GDH) 位于线粒体内膜的外侧, 是线粒体内膜的完整蛋白质, 其活性位点位于线粒体内膜的胞溶胶侧。Miwa 和 Brand<sup>[37]</sup> 报道表明, 小鼠和果蝇的 3-磷酸甘油脱氢酶在线粒体内膜的胞溶胶侧产生过氧化氢。分离的  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合物 (KGDHC) 中的二氢硫辛酰胺脱氢酶与超氧阴离子的产生相关。 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合物 (KGDHC) 存在于线粒体内膜的基质侧。在线粒体基质中 NADH/NAD<sup>+</sup> 比率升高的情况下, 二氢硫辛酰胺脱氢酶最可能是线粒体基质中 ROS 来源<sup>[43]</sup>。NADH/NAD<sup>+</sup> 比率越高, 过氧化氢产生的比率越快, NADH/NAD<sup>+</sup> 比率是调节 KGDHC 产生过氧化氢的重要因子<sup>[44]</sup>。顺乌头酸酶 (ACO) 位于线粒体基质中, 催化三羧酸循环中的柠檬酸转变为异柠檬酸。超氧阴离子能够氧化铁硫簇, 从而使该酶失去活性。分离的顺乌头酸酶最可能通过释放亚铁离子通过 Fenton 反应, 从而诱导产生羟自由基。

目前的研究是鉴于对分离的线粒体以及借助线粒体电子传递链的抑制剂作为前提, 确定了可能的 ROS 产生位点<sup>[30]</sup>(图 1)。随着研究的精细化, 线粒体中可能存在其他产生 ROS 的位点。

## 2.2 内质网与活性氧

内质网是细胞内生物大分子, 如蛋白质、脂质



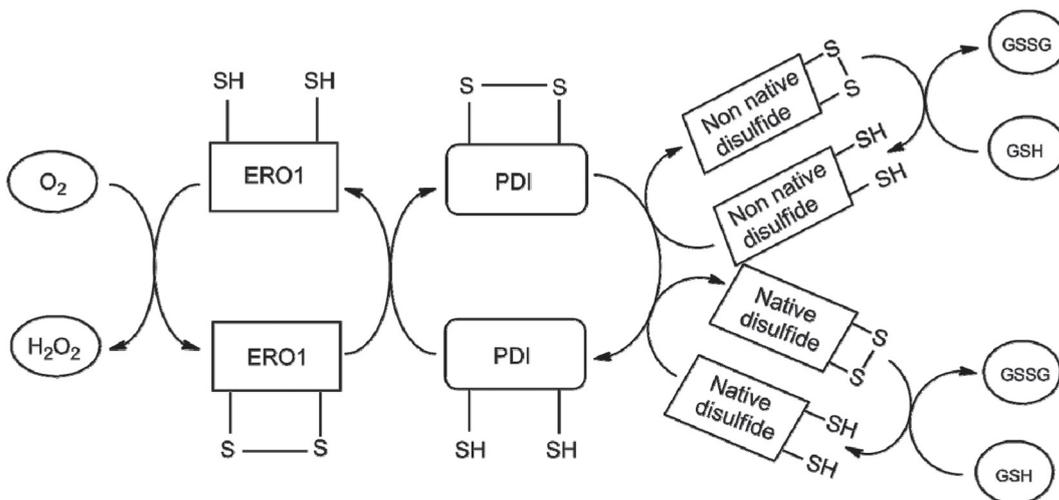
MAO: 单胺氧化酶; Cyt.  $b_5$  reductase: 细胞色素 $b_5$ 还原酶; Complex I: 线粒体复合体I; PDHC: 丙酮酸脱氢酶复合物;  $\alpha$ -GDH:  $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶; KGDHC:  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合物; DHOH: 二氢乳清酸脱氢酶; Complex II: 线粒体复合体II; Complex III: 线粒体复合体III; ACO: 顺乌头酸酶; Q: 辅酶Q; C: 细胞色素c; OM: 线粒体外膜; IM: 线粒体内膜; ☆: 活性氧产生的部位。

图1 线粒体中ROS来源

和糖类合成的场所。内质网中催化合成生物大分子的酶分子与 ROS 产生有关。

在蛋白质合成的过程中, 未成熟蛋白质进入内质网后, 蛋白质必须在内质网中形成必要的二硫键, 然后形成成熟的蛋白质进而发挥功能。内质网为蛋白质二硫键的形成提供了独一无二的氧化折叠环境。越来越多的证据表明, 内质网中蛋白质氧化折叠过程与活性氧的产生存在紧密的相关性。蛋白质氧化折叠反应是由二硫键异构酶催化的, 该酶从多

肽底物的硫残基接受电子被还原, oxidoreductin1 (ERO1) 氧化该酶参与反应。ERO1 将电子转移给分子氧, 从而重新参与催化反应, 该过程导致了 ROS 的形成<sup>[45]</sup> (图 2)。在蛋白质氧化折叠中, ERO1 和细菌胞质蛋白质 DsbB 发挥相似的作用。不论在真核生物中, 还是在原核生物中, 分子氧都是作为蛋白质二硫键形成过程中最终的电子受体。ERO1 为 FAD 结合蛋白质, 借助黄素依赖的反应将电子直接转移到分子氧。在有氧环境中, ERO1 还原分子氧



ERO1: 内质网氧化还原酶; PDI: 蛋白质二硫键异构酶; GSH: 谷胱甘肽; GSSG: 谷胱甘肽过氧化物酶。

图2 内质网中氧化蛋白质的折叠途径



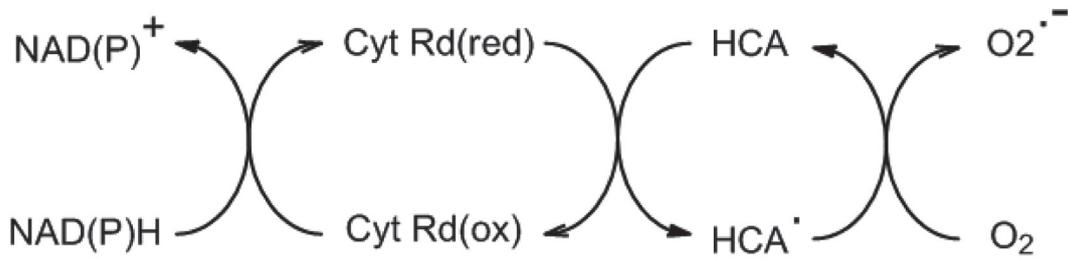


图4 细胞色素还原酶催化杂环胺还原形成超氧阴离子的机制

醌自由基 (UQH•) 快速歧化转变为半还原的阴离子形式 (UQ•<sup>-</sup>), UQ•<sup>-</sup> 可以进行自氧化产生超氧阴离子 (UQ•<sup>-</sup>+O<sub>2</sub>→UQ+O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>)。因此, 推测细胞器内泛醌衍生物 UQ•<sup>-</sup> 可能转移电子到分子氧, 从而产生超氧阴离子<sup>[53]</sup>。在溶酶体酸性环境下, 泛半醌形成的超氧阴离子可能通过 Fenton 反应形成羟自由基 (•HO) 和 OH<sup>-</sup>。Nohl 和 Gille<sup>[54]</sup> 研究表明, NADH 介导的溶酶体的氧化是细胞内 ROS 的来源之一。

#### 2.4 过氧化物酶体与活性氧

过氧化物酶体是含有氧化酶的单层膜细胞器, 参与许多代谢过程, 包括脂肪酸的氧化, 乙醛酸、氨基酸的代谢, 多胺氧化和磷酸戊糖的氧化<sup>[55]</sup>。过氧化物酶体中催化代谢反应的多种氧化酶可能是细胞内 ROS 的来源之一。

哺乳动物过氧化物酶体中, 过氧化氢主要来源于不同氧化酶转移底物的氢原子到分子氧。有证据表明, 在大鼠肝脏中, 过氧化物酶体产生大约 35% 的过氧化氢, 占了整个氧耗量的 20%<sup>[56]</sup>。过氧化物酶体可能是细胞内过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、超氧阴离子 (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>)、羟自由基 (•OH) 的来源之一<sup>[57]</sup>。过氧化物酶体中多种氧化酶催化其底物参与代谢过程的同时产生过氧化氢和超氧阴离子 (表 1)<sup>[56,58]</sup>。

#### 2.5 质膜与活性氧

NADPH 氧化酶 (Nox) 是多亚基复合体, 哺乳动物 Nox 家族由 7 个成员组成, 分别是 Nox1、Nox2 (又称 gp91<sup>phox</sup>)、Nox3、Nox4、Nox5、Duox1 (dual oxidase1) 和 Duox2。NADPH 氧化酶最初是在巨噬细胞中发现的, 细胞色素 b<sub>558</sub> 偶联在细胞膜上构成了该酶的骨架, 细胞色素 b<sub>558</sub> 是由 gp91<sup>phox</sup> (Nox2) 和 p22<sup>phox</sup> 两个亚单位组成的异聚体黄素蛋白。在细胞中, 当该酶激活时, 细胞溶胶中的调节亚基 p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup> 和 p40<sup>phox</sup> 以及 G 蛋白 Rac 转移到细胞膜处, 与细胞色素 b<sub>558</sub> 结合成复合体。该复合体利用还原性的 NADPH 作为电子供体, 通过 Nox2 亚单位转移一个电子还原氧气产生超氧阴离子, 即 2O<sub>2</sub>+NADPH→2O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>+NADP<sup>+</sup>+H<sup>+</sup>。随着研究的深入, 发现 NADPH 氧化酶在骨骼肌、血管平滑肌、甲状腺、内皮组织、胎儿组织、肺、肾脏、皮肤和结肠等许多非巨噬细胞和组织中表达<sup>[59-60]</sup>。有研究证明在血管细胞和肌细胞中, 超氧阴离子主要来源于 NADPH 氧化酶<sup>[61]</sup>。

#### 2.6 胞外与活性氧

黄嘌呤氧化还原酶 (XOR) 为同型二聚体, 每个亚单位包含四个氧化还原中心, 即钼辅因子、FAD 和两个 Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 位点<sup>[62]</sup>。在哺乳动物体内, XOR 存在

表1 过氧化物酶体中产生ROS的酶

酶	底物	ROS
脂酰辅酶A氧化酶	脂肪酸	过氧化氢
尿酸氧化酶	尿酸	过氧化氢
黄嘌呤氧化酶	黄嘌呤	过氧化氢和超氧阴离子
D-氨基酸氧化酶	D-脯氨酸	过氧化氢
六氢吡啶羧酸氧化酶	L-六氢吡啶羧酸	过氧化氢
D-天冬氨酸氧化酶	D-天冬氨酸和N-甲基-D-天冬氨酸	过氧化氢
肌氨酸氧化酶	肌氨酸和哌可酸	过氧化氢
L-α-羟酸氧化酶	羟乙酸和乳酸	过氧化氢
多氨基氧化酶	N-乙酰精胺和亚精胺	过氧化氢

两种互变的异构体, 即黄嘌呤脱氢酶(XDH)和黄嘌呤氧化酶(XO)。该酶分布广泛, 在肝脏和肠道中表达水平最高, 其他组织中活性较低。该酶在嘌呤化合物降解代谢通路中能够催化次黄嘌呤氧化为黄嘌呤, 黄嘌呤进一步氧化为尿酸。黄嘌呤脱氢酶还原  $\text{NAD}^+$  为  $\text{NADH}$ , 然而黄嘌呤氧化酶不能还原  $\text{NAD}^+$ , 黄嘌呤氧化酶还原分子氧, XOR 催化还原的分子氧产生超氧阴离子( $\text{O}_2\cdot^-$ )和过氧化氢<sup>[63]</sup>。除了催化次黄嘌呤和黄嘌呤的氧化外, XOR 还能催化许多底物的羟基化作用和发挥  $\text{NADH}$  氧化酶的催化作用。XOR 在催化这些反应的过程中产生超氧阴离子和过氧化氢<sup>[63-65]</sup>。

### 3 展望

细胞内存在许多抗氧化系统, 包括谷胱甘肽过氧化物酶、硫氧还蛋白、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和其他抗氧化酶, 这些酶相互作用清除生物体内的过氧化氢和超氧阴离子<sup>[66]</sup>; 另外, 还存在其他的非酶抗氧化剂, 包括抗坏血酸(维生素C)、 $\alpha$ -生育酚(维生素E)、谷胱甘肽(GSH)、类胡萝卜素、黄酮类似物等<sup>[61,67]</sup>。其中, GSH 是由生物体自主合成, 通过直接与活性氧分子反应或者作为抗氧化酶的辅助因子发挥作用<sup>[68]</sup>。这些抗氧化酶与非酶抗氧化剂共同作用, 维持细胞内的活性氧的稳态。目前存在许多测定细胞内活性氧的方法, 包括自旋捕获、化学发光探针(光泽精、发光氨、MCLA、水母发光蛋白)、荧光探针(二氢乙锭、mitoSOX、DCFH-DA、双氢罗丹明、Amplex Red)、细胞色素 *c* 检测超氧化物、环状羟胺自旋探针、荧光蛋白标记的还原探针、免疫自旋捕获等。但是, 由于生物体内的 ROS 具有低稳定性、多样性、动态性和复杂的空间分布等特点, 这就要求 ROS 检测中探针能够快速、灵敏和精确地与 ROS 反应, 产生稳定的产物, 从而进行定量<sup>[66,69]</sup>; 此外, 由于不同细胞的抗氧化机制不同, 亚细胞结构产生的活性氧被抗氧化系统清除, 从而导致目前没有能够精确测定细胞内各个部位产生活性氧分子的速率的方法; 另外, 在不同的病理状态下、不同的组织细胞中、不同的微环境状态下, 亚细胞结构产生的活性氧的能力有可能不同。这些都是活性氧分子研究亟待解决的问题。目前, 由于临床试验过程中使用的抗氧化剂的非特异性, 不能精确定位到 ROS 产生位点, 导致临床抗氧化剂治疗出现了瓶颈<sup>[70]</sup>。但是随着研究的深入, 在临床药理学的抗氧化剂治疗研究中, 一方面将抗氧化

剂与亲脂性三苯基阳离子( $\text{TPP}^+$ )偶联<sup>[71-74]</sup>, 另一方面将抗氧化剂与 Szeto-Schiller 肽家族偶联, 使抗氧化剂更容易穿过细胞的膜结构, 在线粒体内膜内积聚, 从而发挥作用<sup>[75-76]</sup>。该研究实现了将抗氧化剂靶向定位到线粒体中的活性氧, 取得了巨大的突破, 推动了临床抗氧化剂的治疗<sup>[77-80]</sup>。本文综述了细胞内可能产生活性氧的部位及其产生机制, 为临床靶向抗氧化治疗提供一定的理论基础。相信随着技术的不断发展以及研究的不断深入, 会发现更多产生活性氧的亚细胞结构, 细胞内活性氧的产生机制会研究得越来越透彻, 从而为靶向抗氧化剂药物的开发和疾病的治疗提供理论指导。

### [参 考 文 献]

- [1] Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*, 1994, 102(Suppl 10): 5-12
- [2] Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*, 2005, 115(3): 500-8
- [3] Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, et al. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 1954, 119(3097): 623-6
- [4] Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature*, 1954, 174(4432): 689-91
- [5] Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(11): 7124-8
- [6] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 1956, 11(3): 298-300
- [7] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969, 244(22): 6049-55
- [8] Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, 1998, 78(2): 547-81
- [9] Mittal CK, Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(10): 4360-4
- [10] D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(10): 813-24
- [11] Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*, 2012, 48(2): 158-67
- [12] Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, et al. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci*, 2011, 16(6): 300-9
- [13] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 2006, 160(1): 1-40
- [14] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002, 82(1): 47-95
- [15] Acharya A, Das I, Chandhok D, et al. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. *Oxid Med Cell Longev*, 2010, 3(1): 23-34

- [16] Dowling DK, Simmons LW. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc Biol Sci*, 2009, 276(1663): 1737-45
- [17] Brown GC, Borutaite V. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion*, 2012, 12(1): 1-4
- [18] Migliaccio E, Giorgio M, Pelicci PG. Apoptosis and aging: role of p66Shc redox protein. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(3-4): 600-8
- [19] Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, et al. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*, 2005, 122(2): 221-33
- [20] Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1147: 37-52
- [21] Lambert AJ, Brand MD. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem*, 2004, 279(38): 39414-20
- [22] Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(20): 7607-12
- [23] Pryde KR, Hirst J. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *J Biol Chem*, 2011, 286(20): 18056-65
- [24] Lambert AJ, Boysen HM, Buckingham JA, et al. Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell*, 2007, 6(5): 607-18
- [25] Drose S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 748: 145-69
- [26] Lambert AJ, Brand MD. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J*, 2004, 382(Pt 2): 511-7
- [27] Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*, 2010, 45(7-8): 466-72
- [28] Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem J*, 2002, 368(Pt 2): 545-53
- [29] Gyulkhandanyan AV, Pennefather PS. Shift in the localization of sites of hydrogen peroxide production in brain mitochondria by mitochondrial stress. *J Neurochem*, 2004, 90(2): 405-21
- [30] Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry: Mosc*, 2005, 70(2): 200-14
- [31] Ralph SJ, Moreno-Sanchez R, Neuzil J, et al. Inhibitors of succinate:quinone reductase/complex II regulate production of mitochondrial reactive oxygen species and protect normal cells from ischemic damage but induce specific cancer cell death. *Pharm Res*, 2011, 28(11): 2695-730
- [32] Quinlan CL, Orr AL, Perevoshchikova IV, et al. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem*, 2012, 287(32): 27255-64
- [33] Drose S, Bleier L, Brandt U. A common mechanism links differently acting complex II inhibitors to cardioprotection: modulation of mitochondrial reactive oxygen species production. *Mol Pharmacol*, 2011, 79(5): 814-22
- [34] Liu SS. Mitochondrial Q cycle-derived superoxide and chemiosmotic bioenergetics. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1201: 84-95
- [35] Lanciano P, Lee DW, Yang H, et al. Intermonomer electron transfer between the low-potential *b* hemes of cytochrome *bc*<sub>1</sub>. *Biochemistry*, 2011, 50(10): 1651-63
- [36] Grigolava IV, Ksenzenko M, Konstantinob AA, et al. Tiron as a spin-trap for superoxide radicals produced by the respiratory chain of submitochondrial particles. *Biokhimiia*, 1980, 45(1): 75-82
- [37] Miwa S, Brand MD. The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1709(3): 214-9
- [38] Whatley SA, Curti D, Das Gupta F, et al. Superoxide, neuroleptics and the ubiquinone and cytochrome *b*<sub>5</sub> reductases in brain and lymphocytes from normals and schizophrenic patients. *Mol Psychiatry*, 1998, 3(3): 227-37
- [39] Kunduzova OR, Bianchi P, Parini A, et al. Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol*, 2002, 448(2-3): 225-30
- [40] Ventura A, Maccarana M, Raker VA, et al. A cryptic targeting signal induces isoform-specific localization of p46<sup>Shc</sup> to mitochondria. *J Biol Chem*, 2004, 279(3): 2299-306
- [41] Trinei M, Giorgio M, Cicalese A, et al. A p53-p66<sup>Shc</sup> signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*, 2002, 21(24): 3872-8
- [42] Orsini F, Migliaccio E, Moroni M, et al. The life span determinant p66<sup>Shc</sup> localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential. *J Biol Chem*, 2004, 279(24): 25689-95
- [43] Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, et al. Mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci*, 2004, 24(36): 7779-88
- [44] Tretter L, Adam-Vizi V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci*, 2004, 24(36): 7771-8
- [45] Ferreira E, Baldeiras I, Ferreira IL, et al. Mitochondrial- and endoplasmic reticulum-associated oxidative stress in Alzheimer's disease: from pathogenesis to biomarkers. *Int J Cell Biol*, 2012, 2012: 735206
- [46] Gross E, Sevier CS, Heldman N, et al. Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(2): 299-304

- [47] Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol*, 2004, 164(3): 341-6
- [48] Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(12): 2277-93
- [49] Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 199(3): 316-31
- [50] Davydov DR. Microsomal monooxygenase in apoptosis: another target for cytochrome c signaling? *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(3): 155-60
- [51] Pandey AV, Flück CE. NADPH P450 oxidoreductase: structure, function, and pathology of diseases. *Pharmacol Ther*, 2013, 138(2): 229-54
- [52] Maeda H, Sawa T, Yubisui T, et al. Free radical generation from heterocyclic amines by cytochrome b5 reductase in the presence of NADH. *Cancer Lett*, 1999, 143(2): 117-21
- [53] Kozlov AV, Nohl H, Gille L. Are reduced ubiquinones oxygen radical generators? *Bioorg Chem*, 1998, 26(6): 334-44
- [54] Nohl H, Gille L. Lysosomal ROS formation. *Redox Rep*, 2005, 10(4): 199-205
- [55] Wanders RJ, Waterham HR. Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763(12): 1707-20
- [56] Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763(12): 1755-66
- [57] Franssen M, Nordgren M, Wang B, et al. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822(9): 1363-73
- [58] Antonenkov VD, Grunau S, Ohlmeier S, et al. Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(4): 525-37
- [59] Bokoch GM, Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(9): 502-8
- [60] Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(3): 181-9
- [61] Sedeek M, Hebert RL, Kennedy CR, et al. Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009, 18(2): 122-7
- [62] Hille R. The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem Rev*, 1996, 96(7): 2757-816
- [63] Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med*, 2002, 33(6): 774-97
- [64] Hunt J, Massey V. Studies of the reductive half-reaction of milk xanthine dehydrogenase. *J Biol Chem*, 1994, 269(29): 18904-14
- [65] Hille R, Hall J, Basu P. The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem Rev*, 2014, 114(7): 3963-4038
- [66] Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*, 2014, 224C: 164-75
- [67] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1): 44-84
- [68] Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids*, 2012, 2012: 736837
- [69] Dikalov SI, Harrison DG. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(2): 372-82
- [70] Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, et al. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*, 2000, 342(3): 154-60
- [71] Smith RA, Hartley RC, Cochemé HM, et al. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 2012, 33(6): 341-352
- [72] Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat Med*, 2013, 19(6): 753-9
- [73] Skulachev VP. Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(2): 275-9
- [74] Reily C, Mitchell T, Chacko BK, et al. Mitochondrially targeted compounds and their impact on cellular bioenergetics. *Redox Biol*, 2013, 1(1): 86-93
- [75] Birk AV, Liu S, Soong Y, et al. The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(8): 1250-61
- [76] Szeto HH. First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(8): 2029-50
- [77] Kloner RA, Hale SL, Dai W, et al. Reduction of ischemia/reperfusion injury with bendavia, a mitochondria-targeting cytoprotective Peptide. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1(3): e001644
- [78] Dai DF, Chen T, Szeto H, et al. Mitochondrial targeted antioxidant peptide ameliorates hypertensive cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(1): 73-82
- [79] Chakrabarti AK, Feeney K, Abueg C, et al. Rationale and design of the EMBRACE STEMI study: a phase 2a, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, tolerability and efficacy of intravenous Bendavia on reperfusion injury in patients treated with standard therapy including primary percutaneous coronary intervention and stenting for ST-segment elevation myocardial infarction. *Am Heart J*, 2013, 165(4): 509-14 e7
- [80] Szeto HH, Schiller PW. Novel therapies targeting inner mitochondrial membrane--from discovery to clinical development. *Pharm Res*, 2011, 28(11): 2669-79