

DOI: 10.13376/j.cblls/2021041

文章编号: 1004-0374(2021)03-0374-09

# OXR1基因的抗氧化作用及分子机制研究进展

徐浩, 苗晓敏, 李升, 李云\*

(西南大学水产学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715)

**摘要:** 抗氧化基因1 (oxidation resistance gene 1, OXR1)是一种仅存在于真核生物中, 具有清除活性氧、防止细胞氧化损伤的抗氧化调节基因, 近年来相关研究甚多。在哺乳动物中, *OXR1*高表达于中枢神经系统, 对神经细胞的抗氧化保护起到至关重要的作用, 并发现其功能在人类神经退行性疾病的靶向基因治疗中具有潜在应用价值。该文就*OXR1*的结构、亚细胞定位、抗氧化功能及表达调控等进行综述, 以助于深入理解*OXR1*对细胞抗氧化保护的分子调控机制。

**关键词:** 抗氧化基因1; 真核生物; 中枢神经系统; 抗氧化保护; 表达调控

**中图分类号:** Q319; Q953; R742      **文献标志码:** A

## New research advances on the functions and molecular mechanisms of oxidation resistance gene 1

XU Hao, MIAO Xiao-Min, LI Sheng, LI Yun\*

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development (Ministry of Education),  
College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** Oxidation resistance gene 1 (OXR1) is one of the antioxidant regulatory factor that only occurs in eukaryotes and can scavenge reactive oxygen species (ROS) and prevent cell oxidative damage. In recent years, studies have shown that in mammals, *OXR1* is highly expressed in central nervous system, which plays a crucial role in the antioxidant defenses of neuron, and it has potential application values in targeted gene therapy for human neurodegenerative diseases. In this review, the structure, subcellular localization, antioxidant functions and expression regulation of *OXR1* were summarized for further understanding the molecular regulatory mechanisms of *OXR1* in responding oxidative stress.

**Key words:** oxidation resistance gene 1; eukaryotes; central nervous system; antioxidant defenses; expression regulation

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是有氧代谢中产生的具有较高氧化活性且化学性质活泼的分子及离子的总称, 其主要包括超氧阴离子( $O_2^-$ )、羟基自由基( $\cdot OH$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )以及单线态氧( $^1O_2$ )。研究表明, 细胞内90%的ROS是由线粒体电子传递链产生<sup>[1]</sup>, 其作为胞内信使参与了众多信号途径转导<sup>[2-4]</sup>。然而, ROS具有很强的氧化性, 当在某些外在压力或病理条件下, ROS水平会明显升高, 导致细胞内氧化与抗氧化作用失衡, 从而引起氧化应激。在这种情况下, ROS可造成细胞内DNA、蛋白质、脂质等分子结构的破坏<sup>[5-6]</sup>, 同时

一系列细胞凋亡或坏死途径也将被激活<sup>[7-9]</sup>, 从而导致细胞死亡。

在人体中, 脑的耗氧率极高, 通常占整个机体组织的20%左右, 因此是ROS产生最多的地方<sup>[10]</sup>。神经元, 即神经细胞, 是神经系统最基本的结构和功能单位, 在脑部起到联络和整合输入信息并传递

收稿日期: 2020-11-17; 修回日期: 2020-12-29

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(博士后基金)  
(cstc2020jcyj-bsh0053)

\*通信作者: E-mail: aquatics@swu.edu.cn

信息的作用。然而,神经元对ROS极为敏感。研究发现,人类多种神经退行性疾病的发生,包括肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)<sup>[11-13]</sup>、帕金森综合征(Parkinson's disease, PD)<sup>[14]</sup>、阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)<sup>[15]</sup>及亨廷顿病(Huntington's disease, HD)<sup>[16]</sup>等都与神经元遭遇的ROS氧化性损伤有密切关联。

对于神经退行性疾病,目前尚没有根治的办法。长期以来,人们一直尝试通过外源性的抗氧化小分子物质来进行干预治疗,并在一些啮齿类和灵长类动物的神经退行性疾病模型中取得了一定的研究成果<sup>[17-19]</sup>。但在临床研究中却发现,这种方式并不能达到预期的治疗效果,其中缺乏组织细胞特异性是导致治疗效率低下的重要原因之一<sup>[20-22]</sup>。2015年,Chan等<sup>[23]</sup>提出了一种更具生物学靶向性的治疗手段——基因疗法(gene therapy),即通过激活内源性的抗氧化作用位点以达到根治疾病的效果。为此,识别和鉴定更多能够清除大脑中有害ROS的抗氧化基因就尤为重要。

研究发现,在哺乳动物中存在一种高表达于中枢神经系统,具有清除ROS、防止神经细胞氧化损伤的抗氧化调节基因,名为抗氧化基因1(oxidation resistance gene 1, OXR1)<sup>[24]</sup>,并发现其抗氧化特性在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[25]</sup>、果蝇(*Drosophila melanogaster*)<sup>[26]</sup>、冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)<sup>[27]</sup>、秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)<sup>[28]</sup>以及家蚕(*Bombyx mori*)<sup>[29]</sup>等多种生物中也均保守,其功能的揭示预示其有望成为治疗神经退行性疾病的新靶点。但迄今为止,有关OXR1抗氧化防御的作用机制仍不清楚。因此,本文将对OXR1目前的抗氧化功能研究进展进行简要概述,旨在阐明其对细胞抗氧化保护的分子机理。

## 1 OXR1基因简介

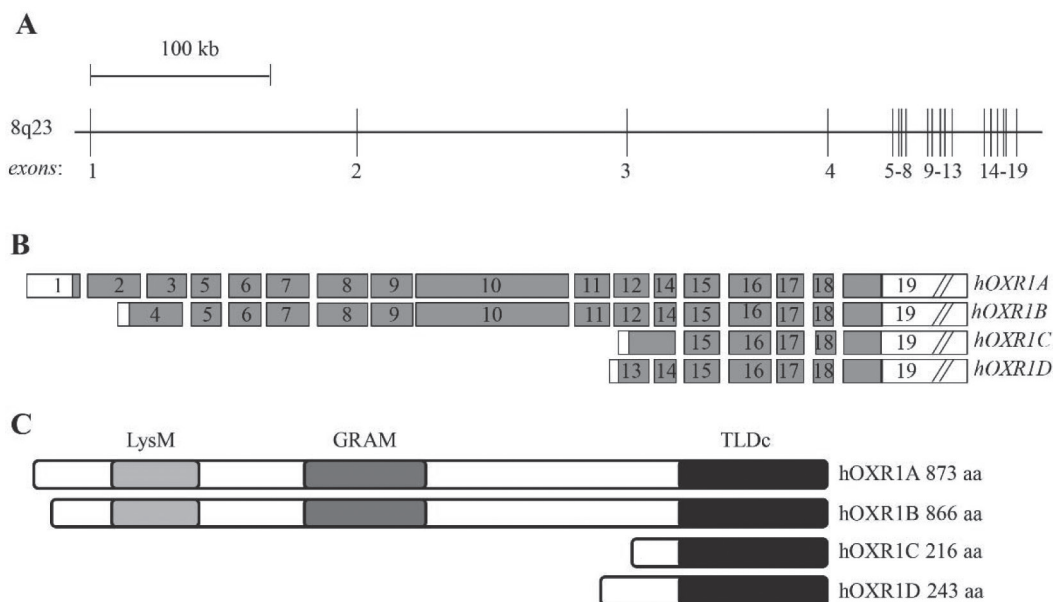
无论在真核生物还是原核生物中,氧化应激都是诱导DNA分子结构损伤,造成基因突变的重要原因<sup>[30-32]</sup>。在氧化应激状态下,机体通过动员细胞内的抗氧化酶或抗氧化小分子物质清除ROS以防止基因突变。基于此原理,Volkert等<sup>[24]</sup>将人源基因导入大肠杆菌易突变菌株*mutH nth*中,目的是筛选出具有抗氧化功能的人类基因。研究发现,位于染色体8q23.1的一个基因可显著降低*mutH nth*由ROS诱导的基因突变,表明该基因可能具有清除ROS、防止DNA氧化损伤的作用。紧接着,他们

又在酿酒酵母<sup>[25]</sup>中鉴定出了该基因的同源性基因,对其敲除后检测到酿酒酵母对ROS成员之一——过氧化氢(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的敏感度会显著提高,而将人类的同源基因转染至酿酒酵母后又可增强其对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的抵抗力,于是进一步确认了该基因的抗氧化特性,故将其命名为抗氧化基因1(OXR1)。

迄今为止,在所有已被测序的真核生物,包括动物、植物以及真菌等中均有发现OXR1基因的存在,但在原核生物中尚未检测到。目前发现,除了在斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[33]</sup>中,OXR1在真核生物中均以单拷贝形式存在。尽管是单拷贝基因,但在转录后的选择性剪接下却可产生多条长度不同的转录亚型,如人源OXR1基因,它位于人类第8号染色体上,基因全长约为54.78 kb,由19个外显子和18个内含子组成(图1A)。Yang等<sup>[34]</sup>通过Northern blot检测发现,人源OXR1具有4种转录亚型,分别为OXR1A、OXR1B、OXR1C以及OXR1D,其中OXR1A和OXR1B较长,包含LysM、Gram及TLDC共3个结构域,而OXR1C和OXR1D较短,仅含有TLDC结构域(图1B)。同样地,在小鼠<sup>[35]</sup>等其他生物中也均发现OXR1基因含有多个转录亚型,而在个别物种,如果蝇中甚至达20个以上<sup>[26]</sup>。

有关OXR1的3个结构域,LysM和GRAM在该基因中的功能研究目前尚未见文献报道,但有研究表明,LysM在植物细胞膜上是作为识别受体,可与真菌细胞壁上的几丁质特异结合,然后将信号传递到胞内,从而启动免疫反应的一个功能结构域。在植物免疫系统中,LysM对病原真菌的识别起到了极为关键的作用<sup>[36-38]</sup>;GRAM结构域则主要存在于一些膜蛋白中,包括葡糖基转移酶、GTP酶激活蛋白、肌管蛋白等,主要参与膜耦合过程以及信号转导<sup>[39]</sup>。研究发现,在肌管蛋白中,GRAM与磷脂酰肌醇具有很高的亲和力,可调节肌肉的生长和发育<sup>[40]</sup>。这些结果提示,OXR1可能是一个集免疫防御、生长调节及抗氧化保护于一体的多功能基因,具体作用有待进一步探究。

在OXR1中,发挥其抗氧化作用的是TLDC,该结构域通常位于蛋白分子的C末端,由167个氨基酸残基组成,是整个蛋白最保守的区域(图1C)。同时,该结构域也广泛存在于其他蛋白中,包括NCOA7、TBC1D24、C20ORF118以及KIAA1609等<sup>[41-44]</sup>,TLDC在这些基因中也均是扮演着抗氧化防御的角色。生物信息学及生物物理学研究显示,TLDC结



(A)人源*OXR1*基因结构。该基因位于染色体8q23, 包含19个外显子, 全长547 883 bp。(B)人源*OXR1*的4个转录亚型。白色方框表示未翻译区域, 灰色方框表示开放阅读框。(C)人源*OXR1*亚型的保守结构域。所有亚型都有TLDC结构域, 而亚型*OXR1A*和*OXR1B*额外包含LysM和GRAM结构域。

图1 人源*OXR1*基因结构及转录亚型示意图<sup>[34]</sup>

构域三维结构呈球形, 表面由4个 $\alpha$ 螺旋环绕, 中心是由两个反向平行的 $\beta$ 折叠组成的 $\beta$ 三明治结构<sup>[45]</sup>。对小鼠*OXR1*酶活性分析表明, 位于 $\beta$ 三明治结构中最后一个半胱氨酸残基为TLDC发挥抗氧化作用所必需<sup>[46]</sup>, 该位点可被 $H_2O_2$ 氧化修饰。*OXR1*酶在与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)共同作用下, 可促进 $H_2O_2$ 的分解, 但自身却不具备过氧化物酶活性。

## 2 *OXR1*基因的表达与调控

在哺乳动物中, *OXR1*几乎表达于所有组织器官中, 但如前面所述, *OXR1*转录后可产生多个长度不同的转录亚型, 因此, 它这样的一种广泛表达方式主要是由各亚型在不同分布所导致。如人源*OXR1*基因, 其转录亚型*OXR1A*和*OXR1C*具有很强的组织特异性, 分别仅在脑和睾丸中表达, 但*OXR1B*和*OXR1D*分布则相对广泛, 可见于脑、眼睛、肝脏、肺、心脏、肌肉、卵巢、睾丸等组织器官中<sup>[34]</sup>, 且两者的分布又不完全重叠。此外, 尽管有些转录亚型在同一器官中均有分布, 但表达水平却存在明显差异, 如*OXR1B*虽然在肠道组织中的表达水平显著高于*OXR1D*, 但在心脏中却是后者高于前者。这些结果说明, *OXR1*的不同转录亚型在不同组织器官中起到的抗氧化作用不尽相同。

从基因表达水平来看, *OXR1*在脑组织的丰度最高, 这一表达特点在人<sup>[34]</sup>、小鼠<sup>[46]</sup>以及斑马鱼<sup>[33]</sup>的组织分布研究中均有发现; 在抗氧化作用方面, 目前的在体研究也证实*OXR1*对脑的抗氧化保护是明显强于其他组织器官的。在人脑组织中, *OXR1*主要表达于大脑皮质、颞叶、小脑以及脊髓等中枢神经系统部位<sup>[34]</sup>。研究发现, 人在健康情况下, 仅有转录亚型*OXR1A*会表达在这些组织, 但在神经退行性疾病患者中, 其他各转录亚型同样会表达于此, 以补偿*OXR1A*的抗氧化作用之不足<sup>[47]</sup>。

有关*OXR1*在细胞内的表达, 不同研究者以不同的细胞材料进行研究, 其结果有所不同(表1)。首先, Fischer等<sup>[35]</sup>以小鼠Rugli细胞进行研究, 通过免疫荧光标记发现, *OXR1*蛋白主要定位于细胞核, 在细胞质中仅能检测到极微弱的信号。Natoli等<sup>[48]</sup>在小鼠肾脏细胞也发现*OXR1*主要表达于细胞核而非细胞质; 但Elliott和Volkert<sup>[25]</sup>对酵母菌和人类HeLa细胞的研究结论则截然相反, 显示*OXR1*是特异表达于细胞质中的线粒体上, 在细胞核并未表达; 而在神经元细胞中, Finelli等<sup>[49]</sup>却又发现, *OXR1*在细胞核和细胞质中是均匀分布的。通常, 基因在细胞内的表达位置与其功能特点是密切相关的, 对于*OXR1*亚细胞定位在各研究中存在的差异, 其原因除了与使用不同细胞模型、细胞状态以及不同检



表1 OXR1在不同物种或细胞来源中的表达部位

基因名称	物种或细胞来源	细胞定位	诱导条件	功能	参考文献
<i>OXR1</i>	小鼠Rugli细胞	细胞核	—	抗氧化	[35]
<i>OXR1</i>	小鼠肾脏细胞	细胞核	高氧	防止视网膜氧化损伤	[48]
<i>OXR1</i>	酵母菌和人类HeLa细胞	线粒体	高温、过氧化物	抗氧化、保护线粒体结构、防止基因突变	[24-25,34]
<i>OXR1</i>	小鼠运动神经元样细胞系(NSC-34)	细胞核和细胞质	过氧化物	抗氧化、保护神经元	[46,49]

测技术有关外,也可能是OXR1在不同细胞类型中的功能存在差异。

在表达调控方面, *OXR1*受多种环境胁迫因子的影响。Elliott和Volkert<sup>[25]</sup>对酿酒酵母分别进行热应激和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫处理,发现其在线粒体上的表达均会显著上调。在冈比亚按蚊中,向腹腔内注射H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>同样可诱导*OXR1*的表达<sup>[27]</sup>。在持续性高氧条件下,小鼠视网膜遭遇严重的氧化损伤,免疫荧光显示该过程中OXR1蛋白水平在视网膜显著升高<sup>[48]</sup>。这些结果表明, *OXR1*表达对外源性的氧化胁迫是极为敏感的。除此之外,机体的病理发生也可诱导*OXR1*的表达,如在神经退行性疾病患者中, *OXR1*在神经元中的表达水平就明显高于健康人体<sup>[47]</sup>。

### 3 OXR1的抗氧化功能在不同层面的生物学效应

研究表明,抑制*OXR1*基因的表达或基因敲除,在个体水平上将明显削弱生物体或细胞对氧化胁迫的耐受力,导致死亡率升高;而在分子水平上则是更容易破坏DNA分子结构的完整性,从而导致细胞代谢紊乱及功能障碍。就目前的研究来看, *OXR1*主要在如下几个层面体现其抗氧化作用。

#### 3.1 亚细胞水平——对线粒体的抗氧化保护

线粒体是一种存在于大多数细胞中的由两层膜包被的细胞器,是为机体提供能量来源的“能量工厂”;但与此同时,线粒体也是ROS产生的主要场所,其过量的产生将会导致线粒体功能出现障碍,进而促进细胞凋亡并诱发相关疾病。因此,有大量的抗氧化基因参与对线粒体的抗氧化防御<sup>[38,50-52]</sup>。研究表明,在某些细胞,如酵母菌或人源HeLa细胞中, *OXR1*蛋白是定位于线粒体上。在酿酒酵母中, *OXR1*突变导致其对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的抵抗力下降,而插入人源*OXR1*基因后发现,只有当蛋白质特异表达于线粒体的情况下才能回救突变菌株在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫下的存活率。反之,当OXR1表达于细胞其他部位时并不能提高突变菌株的抗氧化能力,表明*OXR1*在酿酒酵母中属于线粒体抗氧化保护特异蛋白<sup>[25]</sup>。在

HeLa细胞中,抑制*OXR1*基因的表达导致线粒体DNA在氧化胁迫下的完整性更容易被破坏,可检测到线粒体DNA多个位点出现断裂,且伴随着线粒体ROS水平显著升高以及凋亡细胞增多;在非氧化胁迫条件下,抑制*OXR1*基因的表达尽管不损害线粒体结构,但线粒体数量却会明显减少,并且在氧化胁迫下这种减少程度还会进一步加剧<sup>[34]</sup>。但另有研究表明,在人体的成纤维细胞中, *OXR1*的突变并不会影响H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫下线粒体DNA的损伤程度<sup>[26]</sup>。相似地,在果蝇中敲除*OXR1*基因, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫也不会造成其线粒体结构的损伤。这些结果说明, *OXR1*并非对所有细胞种类的线粒体都具有抗氧化保护作用,这取决于OXR1蛋白的具体表达部位。

#### 3.2 细胞水平——对神经细胞的抗氧化保护

神经退行性疾病是一种以神经元退行性病变为特征的慢性且不可逆的神经系统疾病,对于这类疾病的发病机制目前尚不完全清楚,但有大量证据表明氧化应激是与之密切相关的诱导因素之一。在脑部,由于中枢神经系统具有极高的有氧代谢率,同时其抗氧化能力却又相对较弱,因此,导致脑组织成为最容易被ROS攻击的主要器官之一,哪怕是如*gpx4*、*thx2*、*sod2*等单个抗氧化基因的突变也会引起中枢神经系统的氧化性损伤,并造成个体死亡<sup>[53-55]</sup>。而在哺乳动物中, *OXR1*正是这样的一个重要基因。Oliver等<sup>[46]</sup>研究发现, *OXR1*基因突变小鼠仅能够在出生后的前18天左右正常生长和发育,随后便可观察到其运动能力减弱、运动共济失调、摄食停止以及生长停滞等症状,最终在出生后24天左右死亡。TUNEL法检测发现,突变小鼠小脑中有大量神经细胞凋亡的现象,同时运动神经元也严重受损,这些表型与人类ALS的表现症状有很大的相似之处。值得注意的是,仅将鼠源OXR1的C末端序列TLDc结构域插入到突变小鼠中即可回救其所有病症,而将缺少该结构域的上游片段(包括LysM和GraM结构域)插入后都不会有以上的效果,证明TLDc结构域是*OXR1*发挥抗氧化作用的关键区域。

鉴于*OXR1*基因在神经系统中的抗氧化保护作用, Oliver等<sup>[47]</sup>进一步将*OXR1*通过转基因手段过表达于因超氧化物歧化酶1(*sod1*)基因突变引起的ALS小鼠模型SOD1<sup>G93A</sup>的神经元中, 结果显示, *OXR1*的过表达显著延长了SOD1<sup>G93A</sup>小鼠的生存时间: 一方面, 小鼠ALS发病时间得到明显延迟, 雌鼠从之前的第106天发病推迟到了第122天; 另一方面, ALS恶化的速度也得到一定程度的缓解, 雌鼠从发病后第43天死亡推迟到了第53天。不仅如此, 过表达*OXR1*后, SOD1<sup>G93A</sup>小鼠运动神经元的存活率也显著提高, 其运动能力得到了很大的改善。

除此以外, Oliver团队还研究了*OXR1*对ALS相关的FUS和TDP-43突变体的靶向基因治疗效果, 通过免疫共沉淀的手段研究发现, 在突变体的神经细胞中, *OXR1*蛋白可直接与FUS和TDP-43突变蛋白分子相互作用, 通过减少这两种蛋白在神经细胞中的错误折叠和堆积, 并激活EIF2、mTOR及NRF2等相关信号途径, 从细胞质的定位和聚集、线粒体基因的拼接变化以及线粒体结构完整性3方面改善了ALS的相关症状<sup>[49]</sup>。因此, *OXR1*作为被发现的第一个神经元特异性的抗氧化调节因子, 有望成为治疗神经退行性疾病的新靶点。

### 3.3 系统水平

#### 3.3.1 抗衰老

衰老是生物体自成熟开始, 随增龄发生的、渐进的、受遗传因素影响的、全身复杂的形态结构与生理功能不可逆的退行性变化。有关衰老的机制从20世纪40年代起至今已出现了大量假说, 其中自由基的衰老假说是一种被广泛接受的理论。假说提出者Harman<sup>[56]</sup>认为, 衰老过程源于自由基对组织及细胞的毒害。在生物代谢过程中, 自由基不断产生, 其性质十分活跃。但随着年龄的增加, 机体抗氧化系统清除氧自由基的能力会逐渐减弱, 过量的自由基可对机体的胶原系统、内分泌系统、心脑血管系统进行攻击, 造成形态以及身体机能上的衰老。鉴于*OXR1*的抗氧化作用, Kobayashi等<sup>[29]</sup>利用家蚕模型探讨了*OXR1*在不同环境条件下对家蚕机体老化的影响。研究发现, 在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和热应激的胁迫下, 过表达*OXR1*均可显著提高家蚕的半数生存期, 相比于对照组分别提高了27.9%和18.9%。更重要的一点是, 即使是在正常环境条件下, 过表达*OXR1*也能延缓家蚕的死亡, 与对照组相比, 其半数生存期从48.6 d提高到了54.1 d。反之, 在秀丽线虫<sup>[28]</sup>中敲除*OXR1*基因, 无论是在氧化应激、热应激抑或是正

常条件下, 其存活时间相比于野生型均显著缩短。本实验组通过CRISPR/Cas9基因编辑技术在斑马鱼中敲除*OXR1*基因, 发现纯和突变体在8月龄前的存活率与野生型相比并无显著差异, 但在10月龄后, 突变体的死亡率急剧上升, 并在16月龄全部死亡, 而野生型在对应月龄仍有半数以上存活<sup>[57]</sup>。相似地, 在小鼠<sup>[46]</sup>及果蝇<sup>[26]</sup>中敲除*OXR1*基因也均可观察到类似的结果。很显然, *OXR1*的抗氧化特性在生物机体的抗衰老过程中扮演了重要角色。

有关老年疾病的治疗, 通过小分子药物选择性清除机体中的衰老细胞(senescent cells, SCs)一直是很有应用前景的治疗手段。研究发现, 胡椒素(piperlongumine, PL)<sup>[58]</sup>是一种新型的抗衰老小分子药物, 但其作用机制以及在SCs中的分子靶点尚不清楚。Zhang等<sup>[59]</sup>使用PL的化学探针从活细胞中提取PL结合蛋白, 然后通过基于质谱蛋白质组学分析来识别SCs中PL的潜在分子靶点, 发现*OXR1*就是PL其中的一个重要靶点。研究表明, 相比于正常的成纤维细胞, *OXR1*在衰老的WI38成纤维细胞中表达水平更高, 以增强或补偿其抗氧化水平。在PL发挥功效的过程中, PL可直接与*OXR1*蛋白结合, 然后通过SCs特异的泛素-蛋白酶系统降解*OXR1*蛋白, 从而削弱SCs抗氧化能力。在SCs中, 抑制*OXR1*的表达导致ROS水平显著升高, 同时伴随抗氧化酶基因*ho-1*、*gpx2*、*cat*的表达下调, 并促进SCs的凋亡。而在正常细胞中, 抑制*OXR1*的表达并不会出现以上变化。这些结果表明, *OXR1*是一个潜在的抗衰老靶点, 可用于开发具有更高效价和特异性的抗衰老药物。同时, 这些发现也为研究SCs对氧化应激的抵抗机制提供了新的线索。

#### 3.3.2 调节生长发育

*OXR1*虽是在2000年人源抗氧化基因筛选研究中被发现, 但实际上其同源基因于1999年在果蝇中就已经被报道<sup>[60]</sup>, 只是当时并未对其命名, 而是以其所在染色体位置“L82”进行表示。直到2019年, Wang等<sup>[26]</sup>才将其正式命名为*mustard (mtd)*基因。研究发现, 果蝇*mtd*基因转录后可产生26条不同的转录亚型, 其广泛表达于果蝇从卵到成虫的各个发育阶段。*mtd*突变体尽管整体形态上与野生型差异不明显, 但发育进度却变得相对迟缓, 并最终在转换为成虫的羽化阶段出现死亡。进一步研究发现, 通过转基因手段在突变体中插入各转录亚型均可完全回救突变果蝇的表型, 其中包括最短的仅含有TLDc结构域的转录亚型以及*OXR1*的另一个同源基因



*NCOA7*的TLDC结构域。这些结果说明, *mtd*对果蝇的正常发育以及成功蜕变是至关重要的, 而其中发挥关键作用的是具有抗氧化功能的TLDC结构域。

在斑马鱼<sup>[33,57]</sup>中, *OXR1*属于母源基因, 即在卵子向合子的转换过程中高水平表达, 然后在完成转换后被迅速降解。本实验组通过比较转录组学手段证实, *OXR1*在斑马鱼早期发育的细胞周期途径具有调控作用, 敲除*OXR1*基因导致斑马鱼发育出现轻度迟缓<sup>[57]</sup>。在家蚕<sup>[29]</sup>中, 蚕卵可分为滞育卵(diapause eggs)和非滞育卵(nondiapause eggs)两种。通常, 滞育卵在蚕卵发育至2~3 d就会进入滞育期, 即发育处于停滞状态, 而非滞育卵可持续正常的发育。研究发现, *OXR1*在两种卵的早期发育阶段同样呈高水平表达, 但随着滞育卵进入滞育期后, *OXR1*在两者中将呈现出差异表达, 即*OXR1*在滞育卵的表达显著高于非滞育卵, 推测*OXR1*可能在启动滞育卵进入滞育期或维持其滞育状态方面起到重要作用。

有关*OXR1*对生长发育的调节, Yang等<sup>[34]</sup>在细胞水平上的研究可给出一定的解释: 他们通过siRNA干扰技术对HeLa细胞*OXR1*基因表达进行敲低, 发现抑制*OXR1*表达将导致细胞分裂受阻于G<sub>2</sub>/M期, 同时大量细胞周期途径相关基因表达水平发生显著改变, 证明*OXR1*对细胞的分裂具有调节作用。此外, 近期的研究也表明, *OXR1*参与了对细胞周期的调节, 细胞无论是处于正常生理条件还是氧化应激条件下, *OXR1*的低表达均会造成细胞分裂受阻<sup>[61]</sup>。

#### 4 OXR1抗氧化作用机制

目前, 无论是在动物实验还是细胞实验中均已证实*OXR1*是具有清除ROS、增强细胞抗氧化防御的一个基因, 因此, 有大量研究认为*OXR1*可能是一种类似于过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)等抗氧化酶类的具有直接清除ROS能力的功能蛋白。为了验证这一假设, 相关研究者先后分别对小鼠<sup>[46]</sup>、斑马鱼<sup>[45]</sup>及秀丽线虫<sup>[28]</sup>的*OXR1*蛋白进行了分离和纯化, 然后以H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>为底物检测其催化酶活性。然而结果均显示, *OXR1*蛋白并不具备直接催化分解H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的能力, 这就说明*OXR1*可能是通过间接的调控作用来参与对细胞中ROS的清除。

有关*OXR1*抗氧化作用的分子机制, Jaramillo-Gutierrez等<sup>[27]</sup>首先以冈比亚按蚊为模型进行了初步探讨, 发现抑制*OXR1*的表达导致*cat*和*gpx* mRNA水

平分别下调了92%和82%, 同时冈比亚按蚊对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的抵抗力相比于对照组明显降低, 表明*OXR1*可通过调节抗氧化酶的活性来参与对细胞的抗氧化保护。在氧化应激条件下, c-JNK氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)对于细胞解毒ROS的过程起到关键作用。进一步研究发现, 抑制冈比亚按蚊中*jnk*的表达将导致*OXR1* mRNA下调56%, 同时*cat*和*gpx*分别下调90%和60%, 且冈比亚按蚊对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的抵抗力下降, 说明在冈比亚按蚊中, *OXR1*的表达受到JNK信号通路的调节。类似地, Yang等<sup>[34]</sup>在HeLa细胞中的研究也发现, 抑制*OXR1*表达同样会引起一些抗氧化基因, 如*p21*、*ho-1*、*gpx2*表达水平的下调, 导致细胞以及线粒体在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫下更容易受损。在细胞中, *p21*通过调节抗氧化酶在控制ROS水平中发挥重要作用, Yang等<sup>[34]</sup>的研究结果提示, *OXR1*可能是介导*p21*途径来调控抗氧化基因的表达。

为了更为全面地剖析*OXR1*调节细胞抗氧化防御的信号路径, Yang<sup>[62]</sup>等进一步通过转录组学技术手段对HeLa细胞中*OXR1*敲低组和对照组在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理前后的基因表达分别进行了差异分析, 结果显示, 抑制*OXR1*的表达将导致807个基因表达水平发生显著改变, 其中有554个基因为上调, 253个基因为下调, 这些差异基因主要包括转录因子、抗氧化基因、胁迫应答基因以及p53信号通路中涉及细胞凋亡和细胞周期阻遏的相关因子。比较发现, 相比于对照组, *OXR1*敲低组中有多个涉及细胞抗氧化保护的相关基因, 如*p21*、*cygb*、*ptgs1*、*ho-1*、*gpx2*等表达显著下调, 反之p53信号通路中促凋亡基因*casp9*和*cycs*为显著上调; 与此同时, 细胞分裂受阻, 以及有大量胁迫应答基因在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的胁迫下变化更为显著, 表明*OXR1*在细胞中是作为细胞氧化应激的传感因子, 参与调控解毒ROS所需的转录网络从而进一步调控细胞的分裂以及凋亡。

然而, *OXR1*是如何调控这些基因的表达至今仍不清楚。目前并没有直接证据表明*OXR1*是转录因子或者转录调控蛋白。对于p53信号通路, Yang等<sup>[62]</sup>认为*OXR1*可能是通过在细胞质中与转录因子*p53*结合, 通过改变p53的活性或定位以调节*p53*靶基因的转录, 其亚细胞定位于细胞质是证据之一。但也有研究表明, 在某些组织细胞中, *OXR1*蛋白定位于细胞核中, 提示*OXR1*也可能以转录因子的角色直接调控于靶基因的转录过程<sup>[35,48]</sup>, 但尚缺乏实验数据支撑。总而言之, 有关*OXR1*如何调控细胞抗氧化防御网络的转录过程及机制发生还需要进

一步的研究。

## 5 总结与展望

以上研究表明, *OXR1*是真核生物特有的且功能保守的抗氧化调节基因, 其在组织及细胞中的正常表达对于生物体的生长发育、应对环境压力以及抗衰老等都尤为重要。在抗氧化防御过程中, *OXR1*基因受JNK信号通路的调节, 而本身可介导p21信号通路来调节CAT、Gpx等抗氧化酶相关基因的表达从而发挥其抗氧化作用, 同时*OXR1*还参与了对细胞整个胁迫应答系统、转录因子网络及细胞周期的调控。但总的来说, *OXR1*的抗氧化作用机制还远未阐明, 对于*OXR1*的研究仍处于初级阶段。一方面, *OXR1*基因表达情况较为复杂, 其转录后可产生多条长短不一的转录亚型, 且这些亚型包含的功能结构域不同, 在各组织细胞中的表达也不同, 因此, 发挥的作用也将有所不同, 但目前的研究多以单个*OXR1*转录亚型为主, 缺乏多个亚型之间的功能对比和相互关系; 另一方面, 针对*OXR1*的相关研究, 目前更多是聚焦在功能上, 相比之下, 分子机制的探讨明显滞后。

在哺乳动物中, *OXR1*的突变可直接导致神经退行性疾病的发生, 而将*OXR1*过表达于某些病因引起的神经退行性疾病模型中又能达到一定程度的治疗效果, 表明*OXR1*在神经系统的抗氧化保护中至关重要, 并具有潜在的应用价值。近年来, 随着我国物质生活水平的提高, 国民的平均寿命相比过去有了很大幅度的提升, 但也因此进入了老龄化时代。研究表明, 神经退行性疾病多发生于中老年群体, 世界卫生组织甚至预测, 到2040年, 神经退行性疾病将会取代癌症成为人类第二大致死疾病<sup>[63]</sup>。考虑到*OXR1*在中枢神经系统中的抗氧化作用, 对其功能的深入研究和开发利用, 相信在未来神经退行性疾病的治疗中将会有很好的应用前景。

### [参 考 文 献]

- [1] Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*, 2013, 62: 90-101
- [2] Sun RX, Sun ZH, Ren Q, et al. Gadd45 $\alpha$  affects retinal ganglion cell injury in chronic ocular hypertension rats by regulating p38MAPK pathway. *Gene*, 2020, 763: 145030
- [3] Lin Y, Jiang M, Chen W, et al. Cancer and ER stress: mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109249
- [4] Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*, 2014, 224: 164-75
- [5] Wang X, Li F, Liu J, et al. Transcriptomic, proteomic and metabolomic profiling unravel the mechanisms of hepatotoxicity pathway induced by triphenyl phosphate (TPP). *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 205: 111126
- [6] Quryshi N, Norwood Toro LE, Ait-Aissa K, et al. Chemotherapeutic-induced cardiovascular dysfunction: physiological effects, early detection -- the role of telomerase to counteract mitochondrial defects and oxidative stress. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 797
- [7] Tang S, Ye S, Ma Y, et al. Clusterin alleviates Cr(VI)-induced mitochondrial apoptosis in L02 hepatocytes via inhibition of Ca<sup>2+</sup>-ROS-Drp1-mitochondrial fission axis. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 205: 111326
- [8] Bae H, You S, Lim W, et al. Flufenoxuron disturbs early pregnancy in pigs via induction of cell death with ER-mitochondrial dysfunction. *J Hazard Mater*, 2021, 401: 122996
- [9] Liu H, Lai W, Liu X, et al. Exposure to copper oxide nanoparticles triggers oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER)-stress induced toxicology and apoptosis in male rat liver and BRL-3A cell. *J Hazard Mater*, 2021, 401: 123349
- [10] Lim C, Kim CH, Lim SH, et al. Salvianolic acid B attenuated ischemia/reperfusion-induced brain injury in mice by inhibiting reactive oxygen species-mediated inflammation. *Rec Nat Prod*, 2020, 15: 25-34
- [11] Paladino S, Conte A, Caggiano R, et al. Nrf2 pathway in age-related neurological disorders: insights into MicroRNAs. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47: 1951-76
- [12] Lewerenz J, Ates G, Methner A, et al. Oxytosis/ferroptosis-(Re-)emerging roles for oxidative stress-dependent non-apoptotic cell death in diseases of the central nervous system. *Front Neurosci*, 2018, 12: 214
- [13] Konovalova J, Gerasymchuk D, Parkkinen I, et al. Interplay between MicroRNAs and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 6055
- [14] Wu T, Fang X, Xu J, et al. Synergistic effects of ginkgolide B and protocatechuic acid on the treatment of Parkinson's disease. *Molecules*, 2020, 25: 3976
- [15] Zhang W, Feng C, Jiang H. Novel target for treating Alzheimer's diseases: crosstalk between the Nrf2 pathway and autophagy. *Ageing Res Rev*, 2020, 65: 101207
- [16] Moretti D, Tambone S, Cerretani M, et al. NRF2 activation by reversible KEAP1 binding induces the antioxidant response in primary neurons and astrocytes of a Huntington's disease mouse model. *Free Radic Biol Med*, 2021, 162: 243-54
- [17] Yhnell E, Heuer A. Automated operant assessments of Huntington's disease mouse models. *Methods Mol Biol*, 2018, 1780: 143-62
- [18] Kuljis D, Kudo T, Tahara Y, et al. Pathophysiology in the suprachiasmatic nucleus in mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci Res*, 2018, 96: 1862-75
- [19] Roitberg BZ, Emborg ME, Sramek JG, et al. Behavioral

- and morphological comparison of two nonhuman primate models of Huntington's disease. *Neurosurgery*, 2002, 50: 137-45
- [20] Singh A, Kukreti R, Saso L, et al. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 2019, 24: 1583
- [21] Neal M, Richardson JR. Time to get personal: a framework for personalized targeting of oxidative stress in neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Curr Opin Toxicol*, 2018, 7: 127-32
- [22] Monzani E, Nicolis S, Dell'acqua S, et al. Dopamine, oxidative stress and protein-quinone modifications in Parkinson's and other neurodegenerative diseases. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58: 6512-27
- [23] Chan JYH, Chan SHH. Activation of endogenous antioxidants as a common therapeutic strategy against cancer, neurodegeneration and cardiovascular diseases: a lesson learnt from DJ-1. *Pharmacol Ther*, 2015, 156: 69-74
- [24] Volkert MR, Elliott NA, Housman DE. Functional genomics reveals a family of eukaryotic oxidation protection genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 14530-5
- [25] Elliott NA, Volkert MR. Stress induction and mitochondrial localization of Oxr1 proteins in yeast and humans. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 3180-7
- [26] Wang J, Rousseau J, Kim E, et al. Loss of oxidation resistance 1, OXR1, is associated with an autosomal-recessive neurological disease with cerebellar atrophy and lysosomal dysfunction. *Am J Hum Genet*, 2019, 105: 1237-53
- [27] Jaramillo-Gutierrez G, Molina-Cruz A, Kumar S, et al. The *Anopheles gambiae* oxidation resistance 1 (OXR1) gene regulates expression of enzymes that detoxify reactive oxygen species. *PLoS One*, 2010, 5: e11168
- [28] Sanada Y, Asai S, Ikemoto A, et al. Oxidation resistance 1 is essential for protection against oxidative stress and participates in the regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Res*, 2014, 48: 919-28
- [29] Kobayashi N, Takahashi M, Kihara S, et al. Cloning of cDNA encoding a *Bombyx mori* homolog of human oxidation resistance 1 (OXR1) protein from diapause eggs, and analyses of its expression and function. *J Insect Physiol*, 2014, 68: 58-68
- [30] Saini N, Sterling JF, Sakofsky CJ, et al. Mutation signatures specific to DNA alkylating agents in yeast and cancers. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 3692-707
- [31] Torres-Silva CF, Repoles BM, Ornelas HO, et al. Assessment of genetic mutation frequency induced by oxidative stress in *Trypanosoma cruzi*. *Genet Mol Biol*, 2018, 41: 466-74
- [32] Lee YH, Park W, Kim KS, et al. EMS-induced mutation of an endoplasmic reticulum oleate desaturase gene (FAD2-2) results in elevated oleic acid content in rapeseed (*Brassica napus L.*). *Euphytica*, 2018, 214: 28
- [33] Laroche FJ, Tulotta C, Lamers GE, et al. The embryonic expression patterns of zebrafish genes encoding LysM-domains. *Gene Expr Patterns*, 2013, 13: 212-24
- [34] Yang M, Luna L, Sorbo JG, et al. Human OXR1 maintains mitochondrial DNA integrity and counteracts hydrogen peroxide-induced oxidative stress by regulating antioxidant pathways involving p21. *Free Radic Biol Med*, 2014, 77: 41-8
- [35] Fischer H, Zhang XU, O'brien KP, et al. C7, a novel nucleolar protein, is the mouse homologue of the *Drosophila* late puff product L82 and an isoform of human OXR1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281: 795-803
- [36] Takashima T, Sunagawa R, Uechi K, et al. Antifungal activities of LysM-domain multimers and their fusion chitinases. *Int J Biol Macromol*, 2020, 154: 1295-302
- [37] Suzuki M, Numazaki R, Nakagawa T, et al. Cytoplasmic interaction of LysM receptors contributes to the formation of symbiotic receptor complex. *Plant Biotechnol (Tokyo)*, 2020, 37: 359-62
- [38] Gao F, Zhang BS, Zhao JH, et al. Deacetylation of chitin oligomers increases virulence in soil-borne fungal pathogens. *Nat Plants*, 2019, 5: 1167-76
- [39] Doerks T, Strauss M, Brendel M, et al. GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25: 483-5
- [40] Tsujita K, Itoh T, Ijuin T, et al. Myotubularin regulates the function of the late endosome through the GRAM domain-phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate interaction. *J Biol Chem*, 2004, 279: 13817-24
- [41] Yu LJ, Croze E, Yamaguchi KD, et al. Induction of a unique isoform of the NCOA7 oxidation resistance gene by interferon  $\beta$ -1b. *J Interferon Cytokine Res*, 2015, 35: 186-99
- [42] Finelli MJ, Sanchez-Pulido L, Liu KX, et al. The evolutionarily conserved Tre2/Bub2/Cdc16 (TBC), lysin motif (LysM), domain catalytic (TLDC) domain is neuroprotective against oxidative stress. *J Biol Chem*, 2016, 291: 2751-63
- [43] Alam H, Williams TW, Dumas KJ, et al. EAK-7 controls development and life span by regulating nuclear DAF-16/FoxO activity. *Cell Metab*, 2010, 12: 30-41
- [44] Guven A, Tolun A. TBC1D24 truncating mutation resulting in severe neurodegeneration. *J Med Genet*, 2013, 50: 199-202
- [45] Blaise M, Alsarraf HM, Wong JE, et al. Crystal structure of the TLDC domain of oxidation resistance protein 2 from zebrafish. *Proteins*, 2012, 80: 1694-8
- [46] Oliver PL, Finelli MJ, Edwards B, et al. Oxr1 is essential for protection against oxidative stress-induced neurodegeneration. *PLoS Genet*, 2011, 7: e1002338
- [47] Liu KX, Edwards B, Lee S, et al. Neuron-specific antioxidant OXR1 extends survival of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 2015, 138: 1167-81
- [48] Natoli R, Provis J, Valter K, et al. Expression and role of the early-response gene *Oxr1* in the hyperoxia-challenged mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49: 4561-7
- [49] Finelli MJ, Liu KX, Wu YX, et al. Oxr1 improves



- pathogenic cellular features of ALS-associated FUS and TDP-43 mutations. *Hum Mol Genet*, 2015, 24: 3529-44
- [50] Chenet AL, Duarte AR, De Almeida FJS, et al. Carvacrol depends on heme oxygenase-1 (HO-1) to exert antioxidant, anti-inflammatory, and mitochondria-related protection in the human neuroblastoma SH-SY5Y cells line exposed to hydrogen peroxide. *Neurochem Res*, 2019, 44: 884-96
- [51] Ehrenfeld V, Fulda S. Thioredoxin inhibitor PX-12 induces mitochondria-mediated apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *Biol Chem*, 2020, 401: 273-83
- [52] Ganini D, Santos JH, Bonini MG, et al. Switch of mitochondrial superoxide dismutase into a prooxidant peroxidase in manganese-deficient cells and mice. *Cell Chem Biol*, 2018, 25: 413-25
- [53] Yant LJ, Ran QT, Rao L, et al. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34: 496-502
- [54] Nonn L, Williams RR, Erickson RP, et al. The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 916-22
- [55] Lebovitz RM, Zhang HJ, Vogel H, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 9782-7
- [56] Harman D. Aging -- a theory based on free-radical and radiation-chemistry. *J Gerontol*, 1956, 11: 298-300
- [57] Xu H, Jiang Y, Li S, et al. Zebrafish *oxr1a* knockout reveals its role in regulating antioxidant defenses and aging. *Genes*, 2020, 11: 1118
- [58] Zhu Y, Doornebal EJ, Pirtskhalava T, et al. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-X-L inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY)*, 2017, 9: 955-63
- [59] Zhang X, Zhang SP, Liu XG, et al. Oxidation resistance 1 is a novel senolytic target. *Aging Cell*, 2018, 17: e12780
- [60] Stowers RS, Russell S, Garza D. The 82F late puff contains the *L82* gene, an essential member of a novel gene family. *Dev Biol*, 1999, 213: 116-30
- [61] Matsui A, Kobayashi J, Kanno SI, et al. Oxidation resistance 1 prevents genome instability through maintenance of G<sub>2</sub>/M arrest in  $\gamma$ -ray-irradiated cells. *J Radiat Res*, 2020, 61: 1-13
- [62] Yang M, Lin X, Rowe A, et al. Transcriptome analysis of human OXR1 depleted cells reveals its role in regulating the p53 signaling pathway. *Sci Rep*, 2015, 5: 17409
- [63] Gammon K. Neurodegenerative disease: brain windfall. *Nature*, 2014, 515: 299-300