

# 黄嘌呤氧化还原酶的结构、功能和作用

李丽书 陈献华 邵叶波<sup>1</sup> 刘璇 徐平\*

(复旦大学生命科学学院基因生理学实验室, 脑研究中心, 上海 200433; <sup>1</sup>复旦大学上海医学院, 上海 200032)

**摘要** 黄嘌呤氧化还原酶(XOR)参与人体内的嘌呤代谢, 并且是这一代谢过程的限速酶。其终产物是活性氧(包括OH·、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和O<sub>2</sub><sup>-</sup>)和尿酸。这两种产物参与体内多种生理活动。从XOR基因的结构、XOR蛋白的分子结构和基本功能、控制XOR活性的多个环节以及XOR的两种催化产物活性氧和尿酸在生理和病理情况下的功能及机制进行了总结, 以期对XOR的发现、研究历史及现状和有待解决的问题有一个系统的了解。

**关键词** 黄嘌呤氧化还原酶; 病理生理; 尿酸; ROS; XOR

1902年, Sharding等发现新鲜牛奶中含有一种物质, 可使加入醛类的美兰或靛蓝溶液退色, 而加热过的牛奶则无此特性; 这种区分鲜奶和加热牛奶的反应被称为沙尔丁格(Sharding)反应, 这种物质后来被命名为沙尔丁格酶(Sharding enzyme)。大约20年后, Morgan等又发现这种物质也同样存在于大鼠的肝、肾、脾、肺等组织内, 并且在有氧以及无氧条件下均可催化次黄嘌呤和黄嘌呤生成尿酸, 而加热则可以破坏这种活性。直到1926年, Dixon等用部分纯化的黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)进行了化学动力学的分析之后, 发现XO除了可以氧化美兰、次黄嘌呤和黄嘌呤外, 还可以和醛类物质发生氧化反应, 这才第一次提供了Sharding酶就是XO的证据。黄嘌呤氧化还原酶(xanthine oxidoreductase, XOR)属于含钼脱氢酶黄素蛋白家族成员<sup>[1]</sup>, 它是黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO; EC 1.1.3.22)和黄嘌呤脱氢酶(xanthine dehydrogenase, XDH; EC1.1.1.204)两种不同存在形式的统称。

## 1 XOR酶分子结构和基本生理功能

不同来源的XOR均为分子量为300 kDa的蛋白质, 由两个相同的亚基组成, 每一个亚基全长1333~1358个氨基酸, 具体数目依不同物种而定, 还包含一个钼蝶呤、两个不相同的Fe/2S中心和黄素腺嘌呤核苷酸(FAD)<sup>[2]</sup>。XOR的三维结构显示这4个氧化还原中心几乎呈线性排列<sup>[3]</sup>。其中的钼原子是以喋呤钼复合物的形式存在, 可以是VI价、V价或IV价<sup>[4]</sup>。试验证明XOR中铁原子、不稳定硫

原子、钼原子和FAD中心的摩尔含量之比为4:4:1:1<sup>[5]</sup>。XOR能够催化多种底物的氧化反应, 其中包括嘌呤、蝶啶、杂环分子和醛类。同时, 它也有很多类型的电子受体, 如分子氧、NAD<sup>+</sup>、亚甲基蓝、苯醌、高铁氰化物和硝酸盐<sup>[6]</sup>。当分子氧作为电子受体时, 催化产生过氧化氢和超氧化物自由基<sup>[7]</sup>。XOR以两种可转换的形式存在: XDH和XO。二者都是人体2号染色体p22位点同一基因转录表达产物, 其中XDH是基因转录产物, XO是XDH转换而来<sup>[8]</sup>, XDH催化黄嘌呤/NAD<sup>+</sup>的活性较高, 催化黄嘌呤/分子氧的活性较低。而XO催化黄嘌呤/分子氧的活性很高, 催化黄嘌呤/NAD<sup>+</sup>的活性很低, 可被忽略。由XDH到XO或由巯基氧化造成可逆的转变, 或由蛋白质水解酶作用造成不可逆的转变。XDH向XO可逆转变可以由半胱氨酸的巯基氧化成为二硫键而形成。XO和XDH都能被胰蛋白酶所裂解。胰蛋白酶对两者都是只在赖氨酸184处进行裂解, 说明这个区域在XOR的天然构象中很易接近, 并且此区域内局部片断比其他区域更易产生构象变动。而糜蛋白酶裂解XDH在甲硫氨酸181处, 裂解XO则是在甲硫氨酸181和苯丙氨酸560处。赖氨酸184和甲硫氨酸185处于一个高度保守的疏水区, 这个区域位于铁-硫中心和黄素区的边缘之间。根据XOR家族蛋白质序列的排列比较以及对于牛XDH晶体学研究表明苯丙氨酸560处于一个不稳定的区域, 位于黄素区边缘和钼蝶呤区边缘之间。这个区域相对疏水, 但在生理条件下也可

收稿日期: 2003-11-21 接受日期: 2004-01-09

\* 通讯作者。Tel/Fax: 021-65642903, E-mail: matibuck@yahoo.com

被暴露出来而具有可溶性。此区域仅在 XDH 转变为 XO 之后才能被糜蛋白酶作用说明可能是二硫键使这个区域内的构象发生重大变化, 进而使苯丙氨酸 560 周围的区域暴露出来<sup>[9,10]</sup>。

XOR 参与人体内嘌呤碱的分解代谢。腺嘌呤和鸟嘌呤水解脱氨分别生成次黄嘌呤和鸟嘌呤。次黄嘌呤在 XOR 作用下氧化生成黄嘌呤。黄嘌呤又在 XOR 作用下生成尿酸。此外, XOR 还在小肠吸收铁离子和肝脏转运铁的过程中发挥重要作用。研究表明食物中的铁几乎都是以亚铁形式被小肠吸收, 然后在粘膜细胞中被 XOR 氧化成三价, 可见 XOR 介导了粘膜细胞间铁离子转运, 如果在小鼠食物中加入钨可以导致 XOR 的快速抑制, 从而引起铁离子转运入血过程被持续抑制<sup>[11]</sup>。

## 2 人 XOR 的基因结构

人的 XOR 基因全长 600 kb 以上, 由 36 个外显子和 36 个内含子组成, 外显子的长度从 53 bp 到 279 bp, 内含子的长度从 0.2 bp 到 8 kb, 在 ATG 起始密码子上游 59 和 82 个核苷酸处有两个转录起始位点。在第 2 个转录起始位点上游 24 bp 处有与 Goldberg-Hogness 盒(ATTAT)相似的序列, 在其上游 9 bp 和 24 bp 处有两个倒置的 CCAAT 序列<sup>[12]</sup>。

## 3 人 XOR 表达及翻译后的调节

与其他物种(例如鼠类)相比, XOR 在人体中的活性都很低。这是因为它的基因转录过程和蛋白质的修饰较为独特的缘故。

### 3.1 人 XOR 基因的转录过程

有假说认为, 人 XOR 基因在转录过程中受到抑制。其原因可能和以下机制有关。

**3.1.1 E-BOX 调节人 XOR 基因启动子的活性** 人 XOR 基因启动子活性的核心区域位于起始密码子上游 -138~-1 之间。而 -258~-228 的序列担负着负调控的基本功能。其中序列 acacaggtgtgg(-242~-230) 对于限制人 XOR 基因启动子活性有重要的功能。在这个核心序列内包含 E-BOX 元件, 即 ACAGGTGT(-240~-233)。E-BOX 元件部位的定点突变, 能够消除对启动子的抑制。一些含有螺旋-环-螺旋结构的转录因子能够和 E-BOX 元件结合, 以促进或抑制基因的转录。这些转录因子包括 AREB6、USF 和 TFII-I。AREB6 是一个锌指同源蛋白, 能够在 HepG2 细胞和 HUVECs 细胞中表达。在神经成纤维细胞中, AREB6 对人 70 kDa 热休克蛋白基因启动子的抑制作用需要序列 GTTTC 连同序列 ACAGGTGT 的存在。

AREB6 是所知唯一需要连同序列 GTTTC 的存在才能对启动子起调节作用的蛋白质因子。对人 XOR 基因, GTTTC 存在于 E-BOX 元件上游 21 bp 处(-260), 初步研究表明, 核蛋白和 E-BOX 位点的结合需要 GTTTC 的存在。AREB6 是否确实抑制人 XOR 启动子的活性还需要做进一步的研究。

**3.1.2 TATA-like 元件对人 XOR 基因抑制启动子的活性起调节作用** 与缺少 TATA-like 元件的鼠 XOR 基因相比, 人 XOR 基因在 -138~-1 之间包含一个 TATA-like 元件。定点诱变显示, 当 TATA 变成无 TATA 的位点时, 对启动子的抑制作用得到缓解。这表示 TATA-like 元件可能也参与对人 XOR 基因负调节的功能。

研究还证明, 一些转录因子和核心区域(-125~-89)相互作用形成 DNA-核蛋白复合物, 从而对 TATA-like 元件的活性产生抑制作用。在这个复合物当中, TFIID 通过与 TATA-like 元件相结合而起到重要作用<sup>[13]</sup>。

### 3.2 翻译后修饰对 XOR 活性的影响

XOR 在人体中的低活性首先是因为人 XOR 中钼的含量低<sup>[14]</sup>。XOR 含有 3 个还原位点: 钼原子、FAD 位点和两个铁-硫中心。而大部分的还原性底物都把电子传递给钼原子。典型的牛奶中纯化的酶有 65% 含有钼原子(每一个 150 kDa 的亚基含有一个钼原子为 100%), 而人的 XOR 中这个数据为 2%~5%。XOR 的另外一种没有活性的形式是“去硫”XOR, 即其中最重要的活性部位 Mo=O 被 Mo=S 所代替。这种情况存在于从人乳中纯化的 XOR 蛋白中。牛奶中还原状态的 XOR 通过在体外实验中和硫离子共温育发生“去硫-硫化”的转变, 而使活性得到改变。在体内, 鼠和鸡的食谱中蛋白质含量增加可导致去硫-硫化的转变而使 XOR 被激活。在人上皮细胞株 HB4a 中观察到了 XOR 在翻译后的正向调节。一系列细胞因子, 包括白介素 1、白介素 6、肿瘤坏死因子  $\alpha$  和干扰素  $\gamma$  都能够刺激 HB4a 中 XOR 的活性。干扰素  $\gamma$  能够使 XOR 对蝶呤的活性升高 8~10 倍, 而此时 XOR 的 mRNA 含量只上升了 2~3 倍。有可能是转录后激活使 XOR 的活性又上升了 2~3 倍, 这种活性的增高可以用“去硫-硫化”的转变来解释。

另有事实表明, 翻译后活性的调节除“去硫-硫化”途径外还应有其他方式。测定 14 位分娩几周后妇女的乳汁中 XOR 的活性, 结果是在分娩后 15 天之内, 酶的活性达到最高峰, 之后下降。而在最高峰时期, 并没有观察到相应蛋白质水平的变化。在最高峰和基本水平的 XOR 活性差距是 50 倍。

去硫-硫化的变化并不足以解释活性的显著提高。

近期研究表明<sup>[15]</sup>, XOR 是一种磷蛋白。在哺乳动物细胞内, XOR 可以被磷酸化。缺血刺激条件下, XOR 的磷酸化程度强烈升高, 与此同时 XOR 的活性也增强, 而在此条件下去磷酸化处理使 XOR 的活性降低。添加激酶的抑制剂, 阻止了 XOR 的磷酸化, 也阻止了缺血条件下酶活性的升高。以上现象支持了磷酸化使 XOR 活性升高的假说。有迹象表明, 酪蛋白激酶 II 和 p38 激酶参与了 XOR 的磷酸化过程。

## 4 XOR 在生理及病理过程中的作用机制

### 4.1 在缺血-重灌注损伤中的作用

通常被引用的关于在缺血-重灌注中发生氧化损伤的机制可作如下描述<sup>[14]</sup>: 缺血期间, 细胞中电荷减少, 跨膜离子梯度消失, 引起细胞内钙离子浓度升高。结果使蛋白酶被激活, 还原型 XDH 被不可逆的转变成为 XO。同时, ATP 被消耗, 变为 AMP。AMP 又代谢为腺嘌呤核苷、次黄嘌呤核苷最后变为次黄嘌呤。次黄嘌呤大量积累, 作为新增的还原性底物。而当氧气在组织中重灌注时, 就被催化成为  $H_2O_2$  和  $O_2^-$ 。这个过程表述在图 1A 中。在这一模型里, XDH 向 XO 的转变对 XDH/XO 在病理生理过程中发挥作用是很重要的, 损伤由氧化作用引起, 并因钨或别嘌呤醇(XOR 的一种抑制剂)预处理而遭到阻碍。

但以上机制是依据牛奶、鼠肝和鸡肝中 XOR 的特点而提出的。而人乳中提取的 XOR 对于大多数底物的活性都很低, 如对黄嘌呤的活性只有牛奶中酶的 2%~3%。在大部分人体组织中, XOR 的活性都很低, 与其他组织相比, 肝和肠中的 XOR 活性相对较高。人体组织中 XOR 可催化另一个底物 NADH, 但 NADH 和其他还原性的底物不同的是, 它把电子直接传递给 FAD 位点, 而不是 Mo。人乳中的 XOR 和牛奶中的 XOR 催化 NADH 的活性相似。这两种酶, 尤其是在以脱氢酶(XDH)形式存在的时候, 在有分子氧存在的条件下具有较强的氧化 NADH 形成氧自由基的能力。人和牛的 XDH 在催化氧自由基的产生过程中都有明显的底物抑制现象。两种酶产生氧自由基的最大速率大致都在每毫克  $0.2 \mu\text{mol}/\text{min}$ 。根据图 1A 的机制, 人 XO 在黄嘌呤存在下催化氧分子产生活性氧的速率是每毫克  $0.05 \mu\text{mol}/\text{min}$ , 前者是后者的 4 倍。这些数据说明至少在人体某些组织内的缺血-重灌注过程中还有另一个产生活性氧的机制(图 1B): 缺血导致 NADH 的积累, 还原性底物增加, 使重灌注氧气浓度恢复时产生活性氧。

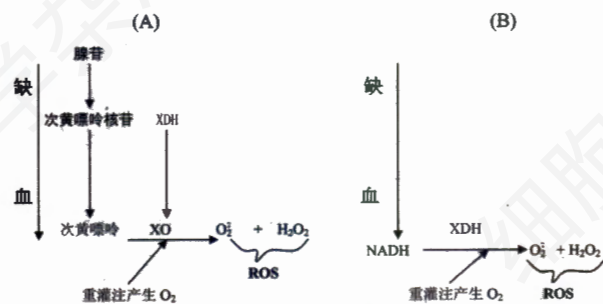


图1 XOR在缺血-重灌注损伤过程中产生ROS的两种可能的过程<sup>[14]</sup>

(A)由次黄嘌呤作为还原底物, XDH转变为XO, 催化产生活性氧。(B)由NADH作为还原性底物, XDH催化产生活性氧。

虽然图 1B 的方案适用于部分人体组织, 但其他哺乳动物和人的肝、肠中情况尚不明了, 在这些组织里 XOR 利用黄嘌呤作为底物的活性更高。牛 XO 在黄嘌呤存在下产生超氧阴离子自由基的最大速率是每毫克  $1.7 \mu\text{mol}/\text{min}$ , 是牛 XO 在 NADH 存在下最大速率的 8 倍。还有很多其他因素影响反应速率, 比如 pH 值等, 以上反应速率都是在 pH 7.4 条件下测得的。并且图 1B 中, 各步骤反应的时间和程度都引起争议。可能的情况是, 图 1A 和图 1B 中的机制与缺血-重灌注中活性氧的产生都有关。

### 4.2 活性氧, 即 XOR 的产物之一, 可能参与某些癌症发生机制

癌症的形成和发展过程中都有自由基参与, 因而自由基和癌关系极为密切。而由 XOR 来源的活性氧也同某些癌症的发生机制有关。

以乳腺癌为例, 乳腺癌的发生是复杂的多步骤过程的结果<sup>[16]</sup>。遗传因素、年龄等都是提高患病风险的因子。近期研究证明: 酒精消耗和乳腺癌之间有非常重要的联系。乙醇能在一个简单的两步反应下变成醋酸盐: 先在乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)作用下生成乙醇, 再经 XOR 或乙醛氧化酶(aldehyde oxidase, AOX)作用下变为醋酸盐。活性氧的产生过程可能是: 乙醇代谢产生乙醛和 NADH, XOR 和 AOX 都能分别催化两者产生包括羟自由基在内的活性氧。乳腺癌侵入的乳腺组织中, DNA 被羟自由基广泛的修饰, 包括羟自由基加到腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶上, 以及造成 DNA 双链的断裂。乳腺癌 DNA 被羟自由基修饰的程度是正常组织的 8~17 倍。此外, 在膀胱癌病人的膀胱洗液<sup>[17]</sup>以及脑肿瘤组织中<sup>[18]</sup>均有 XO 活性上调的报道。这些事实揭示活性氧在病理生理过程中可能的关系。

此外, XOR 还与其他各种疾病相关。如在高血压的病理发生过程中, XOR 催化产生的自由基可

促使血管舒张的一氧化氮湮灭,从而使动脉血管受到的压力升高<sup>[19,20]</sup>。此外在如急性呼吸痛综合症、重复膨胀肺水肿等疾病中都有 XOR 活性上调的报道<sup>[15]</sup>。XOR 在这些疾病发病机制中的作用均在于其催化产生的活性氧。

### 4.3 XOR 的另一催化产物尿酸具有抗氧化功能

XOR 的作用有双重性,一方面它是内源性超氧阴离子自由基的一个重要来源。但另一方面,XOR 催化次黄嘌呤和黄嘌呤形成的最终代谢产物尿酸却是一个重要的生物抗氧化剂。尤其在人和大多数灵长类中,由于在进化中丧失了尿酸酶,而使血液中尿酸的浓度比其他哺乳类高 10 倍左右。尿酸的抗氧化作用可能有利于延长生命和减少癌症的发生。而近期研究表明,在灵长类以外的哺乳动物中,XOR 来源的尿酸在体内有抗氧化功能<sup>[21]</sup>。在鼠的肝实质细胞里,基质和过氧化物酶体的核心中都有 XDH 和 XO 活性。而在细胞质中则只有 XDH 的活性。在肝星型细胞和窦状隙内皮细胞中,只有 XDH 活性而没有 XO 活性。提示在鼠肝实质细胞和窦状隙细胞中,XOR 的功能除产生氧自由基之外,还有产生尿酸作为有效的抗氧化剂的作用。

但产生过多的尿酸会导致高尿酸症的发生,例如痛风<sup>[22]</sup>。XOR 的抑制剂别嘌呤醇过去一直被用于治疗痛风,但其副作用很大,因此需要寻找其他 XOR 的抑制剂。根据对 122 种治疗相关疾病中草药的研究发现,治疗痛风最有效的中草药对 XOR 的抑制作用也最强。说明 XOR 的活性过高与痛风有直接的关系。

## 5 小结

综上所述,XOR 是人体内嘌呤代谢的限速酶,其产物活性氧和尿酸在生理病理过程中各自具有重要功能。对其作用机制的深入了解将有利于多种疾病的预防和治疗。尽管目前对 XOR 的研究已有初步的认识,但对其基因结构中启动子的活性调节机制、翻译后的调控过程以及在多种疾病中的作用机制等都有待于进一步研究。

### 参考文献 (References)

- [1] Pritsos CA. *Chem Biol Interact*, 2000, **129**: 195
- [2] Hille R *et al.* *FASEB J*, 1995, **9**: 995
- [3] Amaya Y *et al.* *J Biol Chem*, 1990, **265**: 14170
- [4] Palmer G *et al.* *J Biol Chem*, 1964, **239**: 2657
- [5] Massey V *et al.* *J Biol Chem*, 1969, **244**: 1682
- [6] Edmondson D *et al.* *J Biol Chem*, 1973, **248**: 6135
- [7] Fridovich I. *J Biol Chem*, 1970, **245**: 4053
- [8] Minoshima S *et al.* *Cytogenet Cell Genet*, 1995, **68**: 52
- [9] McManaman LJ *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 21261
- [10] Enroth C *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 10723
- [11] Topham RW *et al.* *Biochemistry*, 1982b, **21**: 4529
- [12] Xu P *et al.* *Genomics*, 1996, **34**: 173
- [13] Xu P *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 5918
- [14] Harrison R. *Biochem Soc Trans*, 1997, **25**: 786
- [15] Kayyali US *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 14359
- [16] Wright RM *et al.* *Free Radic Biol Med*, 1999, **26**: 348
- [17] Gulec M *et al.* *Clin Biochem*, 2003, **36**: 193
- [18] Gobbel GT *et al.* *Pharm Exp Ther*, 1997, **282**: 1600
- [19] Kerr S *et al.* *Hypertension*, 1999, **33**: 1353
- [20] McIntyre M *et al.* *Hypertension*, 1999, **34**: 539
- [21] Frederiks WM *et al.* *Acta Histochem*, 2002, **104**: 29
- [22] Kong LD *et al.* *J Ethnopharmacol*, 2000, **73**: 199

## The Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase

Li-Shu Li, Xian-Hua Chen, Ye-Bo Shao<sup>1</sup>, Xuan Liu, Ping Xu\*

(Laboratory of Genomic Physiology, Brain Research Center, Fudan University, Shanghai 200433, China;

<sup>1</sup>School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**Abstract** Xanthine oxidoreductase (XOR) is the rate-limiting enzyme in the catabolism of purines. The two final products of the reaction — uric acid and reactive oxygen species (OH·, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup>) play important roles in variety physiological processes. In this review, we summarized some important results about XOR, including the genomic sequence, the molecular structure and the function of its protein, multiple steps in regulation of its activity, and the function of the two catalytic products — uric acid and reactive oxygen species in physiological and pathological conditions. This will help systematically understanding the research history of the enzyme, the situation of recent studies and the problems remains to be resolved.

**Key words** xanthine oxidoreductase; pathophysiology; uric acid; ROS; XOR

Received: November 21, 2003 Accepted: January 9, 2004

\*Corresponding author. Tel/Fax: 86-21-65642903, E-mail: matibuck@yahoo.com