

超氧化物歧化酶药用研究的进展

张 翊¹, 王军志^{1*}, 吴勇杰²

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 兰州医学院, 甘肃 兰州 730000)

关键词: 超氧化物歧化酶; 生物化学; 抗炎作用; 基因

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)01 - 0071 - 04

Progress of pharmaceutical studies on superoxide dismutase

ZHANG Yi¹, WANG Jun-zhi¹, WU Yong-jie²

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;

2. Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, China)

Key words: superoxide dismutase; biochemistry; antiinflammatory activity; gene

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是一种重要的氧自由基清除剂^[1],能催化超氧阴离子发生歧化反应。从动物血、脏器及某些植物中提取的SOD已广泛应用于保健品、食品添加剂及化妆品等领域,用重组技术生产的人源性SOD对某些适应症已进入临床研究,现将有关SOD药用研究进展综述如下。

1 SOD的生化及生物学特性

SOD是一种酸性金属蛋白质,存在于真核细胞胞液(Cu, Zn-SOD)、线粒体(Mn-SOD)和原核细胞(Fe-SOD)中。由于Cu, Zn-SOD中酪氨酸和色氨酸的含量很低,所以紫外吸收最大值在258 nm处。由于不同类型的SOD在一级结构上无同源性,它们之间的理化特性及稳定性差别很大。不同种属不同组织来源的同种SOD也略有差别,分子量从3万到8万多。SOD体外活性测定方法有直接法和间接法,其原理是根据SOD与氧自由基清除指示剂竞争氧自由基,从而抑制清除指示剂与氧自由基的反应来测定SOD的活性。

早先的SOD大多是从猪血、猪肝和牛血中提取的,但由于动物源性SOD有潜在的免疫反应,临床研究受到很大限制,为解决这个问题,美、日、英、德等国相继开发了人SOD基因工程产品,并进行了临

床试验,中国医学科学院基础医学研究所和中国药品生物制品检定所在大肠杆菌中表达了人Cu, Zn-SOD^[2,3],山东医科大学用酵母体系表达了SOD^[4],但有几个主要问题:(1)重组SOD要恢复有活性的天然构象比较困难,因此其活性比天然SOD低;(2)临床使用剂量偏大。

2 SOD的分子修饰和脂质体的研究

SOD作为药品在应用方面有以下缺陷:半衰期短,易受蛋白酶水解而失活,分子量偏大,不易透过细胞膜等。为解决以上问题,学者们尝试对SOD进行分子修饰,国内外多用一些水溶性高分子物质如聚乙二醇(PEG)、polyacryloylmorpholin、右旋糖酐、淀粉等作为修饰材料。PEG与SOD中的 ϵ -NH₂缩合,无毒,无免疫原性,活化简单但回收率低。动物实验结果显示PEG修饰的SOD较其他修饰的SOD对小鼠肌肉缺血再灌注损伤具有更好的保护作用^[5]。杨保珍等^[6]用溴化氰低抗凝活性肝素(LAAH)修饰SOD,延长了半衰期,明显提高了稳定性,并且增强了抗炎活性。最近,日本学者Noda^[7]将Cu, Zn-SOD与琥珀酸角蛋白片段连接,小鼠iv后,半衰期由4.7 min延长到20.5 min,并且能够迅速被肝脏吸收,失活速度也低于未修饰对照。Hori等^[8]将Cu, Zn-SOD和卵磷脂合成为卵磷脂化的SOD(PC-SOD),结果显示PC-SOD在血液中半衰期延长了,并且对结肠溃疡具有显著的疗效。Podulslo等^[9-11]用多胺及腐胺修饰的SOD进行了大量对神经元保护作用的研究,

收稿日期: 2002-01-04.

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 67017755 转 380,

E-mail: wangjunzhi@nicpbp.org.cn

测量了血脑屏障 (BBB) 和血神经屏障 (BNB) 的通透系数 (PS), 发现经修饰的 SOD 通过 BBB 的 PS 值比天然的高 17.6 倍, 通过 BNB 的 PS 值高 21.1 倍, 同时保持了大部分酶的活性; 在 pH 值为 4.7 时, 尽管 PS 值最高, 但酶的活性只保留了 6.6%, 当 pH 值为 5.7 时, 可以保留 50% 的酶活性, 而 PS 值只是略有降低。

3 SOD 基因治疗的研究

近年来, 基因治疗的研究是 SOD 今后应用的另一热点领域。(1) 抗炎作用研究: 将编码分泌型的 SOD 基因的 cDNA 的质粒导入小鼠皮肤成纤维细胞, 转化细胞能够向胞外分泌 SOD, 并且能减轻由黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶引起的细胞毒作用, 对损伤细胞的脂质过氧化起到很好的抑制作用。将转化细胞移植到小鼠后爪, 通过建立小鼠的重度炎症模型——角叉菜胶引起的足肿来研究体内活性, 对炎症反应抑制作用至少持续 7 d, 并且移植的细胞数越多, 抗炎效果越好, 持续时间也越长。这些研究表明移植含有 SOD 基因的成纤维细胞是今后 SOD 局部治疗可能的给药途径^[12]。(2) 抗细胞毒性研究: Komada 等^[13,14] 将人 SOD 基因克隆到一个真核表达质粒中, 再通过脂质体转染小鼠肺细胞 L2, 用 Southern Blot 技术检测是否整合到基因组 DNA 上, 挑选出已整合上 SOD 基因的阳性细胞, 用过氧化氢酶及黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶处理后, 90% 的阳性细胞存活, 而只有 60% 的阴性细胞存活, 显示对超氧阴离子引起的细胞毒性有明显的保护作用。Barkats 等^[15] 构建了含人 SOD 基因的重组腺病毒载体, 转染纹状体神经元细胞后表达出人 Cu, Zn-SOD, 对谷氨酸引起的细胞死亡有很好的保护作用。(3) 融合蛋白基因治疗: 为使非分泌蛋白 SOD 能进入靶细胞, Komada 等^[16] 用重组 DNA 技术将 SOD 基因和 IL-2 的信号肽基因连接起来, 构建了分泌型的真核表达载体, 用 lipofection 转染小鼠肺表皮样细胞 (L2), 胞外的 SOD 活性提高了 3 倍, 转染细胞能够抑制由脂质过氧化而产生的黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶。

4 SOD 临床应用研究

4.1 早产儿氧中毒 SOD 作为药物在美国、日本等国已批准进入 II 期临床试验阶段, 应用于早产儿氧中毒引起的呼吸系统疾病。对用药的安全性和药物动力学进行了研究^[17], 33 个早产儿通过气管表面吸附给药, 剂量为 2.5 和 5 mg·kg⁻¹, 每 48 h 给药 1 次, 连续给药 14 d, 对各项指标分别进行了检测。结果显示, 血清中的 SOD 浓度在 d 3 时达到最大, 并且在

给药期没有显著变化, 在尿液中也能检测到 SOD 的活性, 肺和气管的炎症反应较对照组有明显的缓解, 所有参试儿童均表现了很好的耐受性, 目前正对 SOD 在临床上预防由呼吸困难引发的支气管肺发育异常的有效性进行研究。

4.2 神经系统疾病 目前发现 SOD 突变体与家族性肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (ALS) 存在相关性^[18], 推测异常的 SOD 活性引发了 ALS 发生过程, 不能有效的去除氧自由基^[19], 突变的 SOD 可以和过硝酸反应形成硝酸蛋白, 最终导致 ALS 中运动神经元的选择性变性。对 ALS 的治疗可采用免疫抑制剂、神经营养因子等, 但抗氧化剂 SOD 应该是一种最有潜力的药物^[20]。另一个研究热点是帕金森病 (PD), 对帕金森病早期和晚期患者的血液中 SOD 活性进行了检测^[21], 发现 PD 晚期 SOD 活性显著下降, 并且与病史长短呈负相关, 抗氧化机制的损伤可能是 PD 的形成原因。Jenner 等^[22] 对氧中毒造成的脑损伤做了进一步的研究, PD 患者表现在大脑中铁含量改变, 线粒体功能受损, 抗氧化保护系统的改变 (主要是 SOD 和谷胱甘肽的减少)。

4.3 SOD 对呼吸融合细胞病毒 (RSV) 抑制作用^[23]

通过对体外 (组织培养物) 和体内 (棉鼠) 试验发现, SOD 对组织培养 RSV 没有明显的毒性和抑制作用, 而用气雾剂将 SOD 喷入大鼠体内后, 对 RSV 产生了显著的抑制作用, 并且未发现任何毒副作用。阿霉素 (ADR) 是一种有效的抗癌药, 却易引起心脏毒性, Mr-SOD 有很好的保护作用^[24]。

4.4 对爱滋病的辅助治疗 有一种 Clastogenic 因子 (CFs) 在 HIV-1 基因表达调控过程中起了重要作用, 主要表现在感染 HIV 病毒早期, SOD 能抑制 CFs 因子从而减除了病毒诱导因素。在感染早期如果能将 SOD 和其他药物联合使用, 将大大延长潜伏期^[25]。AZT (三叠氮二脱氧胸苷) 是目前治疗爱滋病的首选药物, 但由于其毒性强, 应用上受到限制。AZT 的治疗往往伴随着氧损伤, 进而引起很多组织的细胞功能紊乱, SOD 作为 AZT 的辅助用药将有助于爱滋病的治疗^[26]。

5 SOD 不良反应报道

有文献^[27] 报道 SOD 可能产生毒性反应。Cu, Zn-SOD 和 Mr-SOD 在体内的过分表达会对细胞产生伤害, 两种 SOD 能诱导单链或双链 DNA 发生断裂, 加入特异性抗 SOD 抗体后 DNA 不再发生断裂, 这些发现有助于解释与 SOD 有关的一些遗传性疾病的发生。

6 SOD抗炎作用机理研究

近年来,研究人员对各种类型的 SOD 抗炎作用机理进行了探讨,Dowling 等^[28]证明 Mn-SOD 对角叉菜胶诱导的大鼠足肿有明显的抑制作用,但 Cu-Zn SOD 的抗炎作用结果却是无效;Conforti 等^[29]给药(天然 SOD $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 3 周末显示明确的抗炎活性;Iida 等^[30]认为 SOD 的抗炎作用与内毒素样物质的污染有关,而不是 SOD 本身的活性。但作者的实验结果显示大鼠给 SOD $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 有明显的抗炎效果,说明剂量对其活性的影响至关重要。大多数结果也肯定了其抗炎作用。对各种炎症介质相互关系的研究是目前的热点,一氧化氮(NO)在大鼠关节炎模型中是一种最主要的炎症介质,应用 NOS 抑制剂能抑制足肿并伴随着炎症组织白细胞浸润的减少和 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 及 PG 等炎症介质(细胞因子)的减少^[31]。然而最近报道 SOD 模拟物 M4043 具有抗炎作用和抑制白细胞浸润的作用,但对 PGE_2 和 NO 的释放没有影响^[32]。IL- 1β 和 TNF- α 刺激和诱导过氧化亚硝酸根的生成,SOD 能直接清除氧自由基,从而间接的预防过氧化亚硝酸根的形成^[33]。炎症细胞因子能够调节表皮纤维细胞等多种细胞外的 SOD 的分泌和调节 NO 的产生,在炎症细胞因子存在下,胞外 SOD 和诱导型 NOS 的协同同向调节意味着在炎症发生时,机体具有非常重要的防止过氧化亚硝酸根形成的保护机制^[34]。Frank 等^[35]在研究角质细胞增殖时发现,NO 的供体可明显诱导内源性的 SOD 生成,却不能够被重组生长因子、炎症细胞因子和超氧阴离子所诱导。地塞米松是一常用抗炎药,研究发现它是通过抑制核转录因子 NF- κ B 和 AP-1 的活化与抑制 IL- 1β 基因的表达而发挥作用^[36]。Lim 等^[37]在研究大鼠神经胶质瘤细胞的 NF- κ B 的活化中发现,NF- κ B 的活化总伴随着 SOD 表达的增强,并且是 SOD 的上游调节因子,它们都属于细胞生存信号,体现了一种细胞保护机制。Kim 等^[38]的研究证明 NF- κ B 的活化对 IL-6、IL-8 和 GM-CSF 的诱导活化有密切关系。张翊等^[39]研究发现 SOD 抗炎作用和清除氧自由基、抗脂质过氧化有关,也和减少炎症性细胞因子如 IL- 1β 和 TNF- α 的生成有关,尤其是对 IL- 1β 的抑制率达到 90% 以上。其特殊作用机理有待进一步实验证实。

7 小结及展望

由于 SOD 具有广泛的药理作用,在药物作用机理研究方面已经深入到分子水平,动物试验研究已在基因治疗、与其他药物联合治疗、分子修饰等方面

取得了一定的进展,临床研究也进行了有意义的探索,但是总体来说还有一些问题需要解决:(1) 进一步阐明 SOD 的抗氧化作用及引起的体内抗氧化网络体系的一系列变化;(2) 进行 SOD 的分子修饰和改构,进一步延长体内半衰期,减少使用剂量,从而降低 SOD 反应产物过氧化氢引起的副作用;(3) 进一步提高 SOD 体外表达水平,提高比活性,以适应产业化的需求。在以上问题逐步得到解决的基础上,相信在不远的将来 SOD 必将应用于医疗领域,造福人类。

References:

- [1] Kushleika J, Checkoway H, Woods JS, et al. Selegiline and lymphocyte superoxide dismutase activities in Parkinson's disease [J]. *Ann Neurol*, 1996, **39**(3): 378 - 381.
- [2] Zhao MX, Gao BF, Wang HY, et al. Biotechnological studies on human Cu-Zn superoxide dismutase II: expression of human Cu-Zn superoxide dismutase in *E. coli* [J]. *Basic Med Sci Clin* (基础医学与临床), 1990, **10**(4): 23 - 26.
- [3] Zhang Y, Wang JZ, Wu YJ. Gene cloning, expression and purification of its production of recombinant human superoxide dismutase [J]. *Chin J Biotechnol* (中国生物工程学报), 2000, **16**(5): 557 - 560.
- [4] Qu AQ, Ji SL, Shang XY, et al. Studies on yeast SOD [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 1997, (2): 98 - 101.
- [5] Rocca M, Giavaresi G, Caliceti P, et al. Pathophysiological and histomorphological evaluation of polyacryloyl morpholine vs polyethylene glycol modified superoxide dismutase in a rat model of ischaemia/reperfusion injury [J]. *Int Artif Organs*, 1996, **19**(12): 730 - 734.
- [6] Yang BZ, Zhang TM, Wang SQ. Studies on superoxide dismutase modified with low anticoagulant activity heparin [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 1996, (2): 82 - 86.
- [7] Noda J, Otagiri M, Akaike T, et al. Pharmacological advantages of conjugation of Cu, Zn-superoxide dismutase with succinylated keratin fragment: improvement of biological properties and resistance to oxidative damage [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, **279**(1): 162 - 171.
- [8] Hori Y, Hoshino J, Yamazaki C, et al. Effect of lecithinized superoxide dismutase on the rat colitis model induced by dextran sulfate sodium [J]. *Jpn J Pharm*, 1997, **74**(1): 99 - 103.
- [9] Wengenack TM, Curran GL, Poduslo JF. Postischemic, systemic administration of polyamine-modified superoxide dismutase reduces hippocampal CA1 neurodegeneration in rat global cerebral ischemia [J]. *Brain Res*, 1997, **754**(1-2): 46 - 54.
- [10] Poduslo JF, Curran GL. Increased permeability of superoxide dismutase at the blood-nerve and blood-brain barriers with retained enzymatic activity after covalent modification with the naturally occurring polyamine, putrescine [J]. *J Neurochem*, 1996, **67**(2): 734 - 741.

- [11] Poduslo JF, Curran GL. Polyamine modification increased the permeability of proteins at the blood-nerve and blood-brain barriers [J]. *J Neurochem*, 1996, **66**(4) :1599 - 1609 .
- [12] Okumura K, Nishiguchi K, Tanigawara Y, *et al.* Enhanced anti-inflammatory effects of Cu, Zn-superoxide dismutase delivered by genetically modified skin fibroblasts *in vitro* and *in vivo* [J]. *Pharm Res*, 1997, **14**(9) :1223 - 1227 .
- [13] Komada F, Nishiguchi K, Tanigawara Y, *et al.* Effect of transfection with superoxide dismutase expression plasmid on superoxide anion induced cytotoxicity in cultured rat lung cells [J]. *Biopharm Bull*, 1996, **19**(2) :274 - 279 .
- [14] Komada F, Nishiguchi K, Tanigawara Y, *et al.* Effect of transfection with a superoxide dismutase expression plasmid on xanthine/xanthine oxidase-induced cytotoxicity in cultured rat lung cells [J]. *Biopharm Bull*, 1996, **19**(8) :1100 - 1102 .
- [15] Barkats M, Bemelmans AP, Geoffroy MC. An adenovirus encoding CuZnSOD protects cultured striatal neurones against glutamate toxicity [J]. *Neuroreport*, 1996, **7**(2) :497 - 501 .
- [16] Komada F, Nishiguchi K, Tanigawara Y, *et al.* Protective effect of transfection with secretable superoxide dismutase (SOD) (a signal sequence-SOD fusion protein coding cDNA) expression vector on superoxide anion-induced cytotoxicity *in vitro* [J]. *Biopharm Bull*, 1997, **20**(5) :530 - 536 .
- [17] Davis JM, Rosenfeld WN, Richter SE, *et al.* Safety and pharmacokinetics of multiple doses of recombinant human CuZn superoxide dismutase administered intratracheally to premature neonates with respiratory distress syndrome [J]. *Pediatrics*, 1997, **100**(1) :24 - 30 .
- [18] Crow JP, Ye YZ, Strong M, *et al.* Superoxide dismutase catalyzes nitration of tyrosines by peroxynitrite in the rod and head domains of neurofilament-L [J]. *J Neurochem*, 1997, **69**(5) :1945 - 1953 .
- [19] Liu D. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Mol Neurosci*, 1996, **7**(3) :159 - 167 .
- [20] Louvel E, Hugon J, Doble A. Therapeutic advances in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Trends Pharm Sci*, 1997, **18**(6) :196 - 203 .
- [21] Bostantjopoulou S, Kyriazis G, Katsarou Z, *et al.* Superoxide dismutase activity in early and advanced Parkinson's disease [J]. *Funct Neurol*, 1997, **12**(2) :63 - 68 .
- [22] Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Neurology*, 1996, **47**(6 Suppl 3) :S161 - 170 .
- [23] Wyde PR, Moore DK, Pimentel DM. Recombinant superoxide dismutase (SOD) administered by aerosol inhibits respiratory syncytial virus infection in cotton rats [J]. *Antiviral Res*, 1996, **31**:173 - 184 .
- [24] Yen HC, Oberley TD, Vichbandha S, *et al.* The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice [J]. *J Clin Invest*, 1996, **98**(5) :1253 - 1260 .
- [25] Edeas MA, Emerit I, Khalfoun Y, *et al.* Clastogenic factors in plasma of HIV-1 infected patients activate HIV-1 replication *in vitro*: inhibition by superoxide dismutase [J]. *Free Radic Biol Med*, 1997, **23**(4) :571 - 578 .
- [26] Prakash O, Teng S, Ai M, *et al.* The human immunodeficiency virus type 1 Tat protein potentiates zidovudine-induced cellular toxicity in transgenic mice [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1997, **343**(2) :173 - 180 .
- [27] Dowjat WK, Kharatishvili M, Costa M. DNA and RNA strand scission by copper, zinc and manganese superoxide dismutases [J]. *Biomaterials*, 1996, **9**(4) :327 - 335 .
- [28] Dowling EJ, Chander CL, Claxson AW, *et al.* Assessment of a human recombinant manganese superoxide dismutase in models of inflammation [J]. *Free Radic Res Commun*, 1993, **18**(5) :291 - 298 .
- [29] Conforti A, Caliceti P, Sartore L, *et al.* Anti-inflammatory activity of monomethoxypolyethylene glycol superoxide dismutase on adjuvant arthritis in rats [J]. *Pharm Res*, 1991, **23**(1) :51 - 56 .
- [30] Iida M, Saito K. Failure of endotoxin-free superoxide dismutase to reduce some paw edemas and adjuvant arthritis in rats [J]. *Inflamm Res*, 1999, **48**(2) :63 - 66 .
- [31] Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, *et al.* Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation [J]. *Br J Pharm*, 1996, **118**(4) :829 - 838 .
- [32] Salvemini D, Wang ZQ, Zweier JL, *et al.* A Nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats [J]. *Science*, 1999, **286**(5438) :304 - 306 .
- [33] Hikiji H, Shin WS, Koizumi T, *et al.* Peroxynitrite production by TNF-alpha and IL-1beta: implication for suppression of osteoblastic differentiation [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, **278**(6) :E1031 - 1037 .
- [34] Brady TC, Chang LY, Day BJ, *et al.* Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-Kappa B activation [J]. *Am J Physiol*, 1997, **273**(5 Pt1) :L1002 - 1006 .
- [35] Frank S, Kapfer H, Podda M, *et al.* Identification of copper/zinc as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) Keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation [J]. *Biochem J*, 2000, **346** Pt3 :719 - 728 .
- [36] Jeon YJ, Han SH, Lee YW, *et al.* Dexamethasone inhibits IL-1 beta gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by blocking NF-kappa B/Rel and AP-1 activation [J]. *Immunopharmacology*, 2000, **48**(2) :173 - 183 .
- [37] Lim R, Zaheer A, Yorek MA, *et al.* Activation of nuclear factor kappa B in C6 rat glioma cells after transfection with glia maturation factor [J]. *J Neurochem*, 2000, **74**(2) :596 - 602 .
- [38] Kim J, Sanders SP, Siekierski ES, *et al.* Role of NF-kappa B in cytokine production induced from airway epithelial cells by rhinovirus infection [J]. *J Immunol*, 2000, **165**(6) :3384 - 3392 .
- [39] Zhang Y, Wang JZ, Wu YJ, *et al.* Anti-inflammatory effect of recombinant human superoxide dismutase in rats and mice and its mechanism [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, **23**(5) :439 - 444 .