

过氧化物还原酶 2 及其潜在的临床应用价值研究进展

王丽敏, 杜诗琦, 王佳凤, 李博*, 狄斌(中国药科大学药物分析系, 蛋白质化学与结构生物学重点实验室, 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

摘要: 过氧化物还原酶 2(peroxiredoxins, Prx2)是过氧化物还原酶家族的重要一员, 在人体多种组织器官中都有表达, 红细胞内含量极其丰富。Prx2 在清除过氧化物、信号转导、分子伴侣等方面发挥着重要作用。Prx2 结构和表达量的改变与多种疾病直接相关, 是临床诊断及药物开发领域的新关注点。本文从 Prx2 的生理功能及其与不同疾病的相关性、不同存在形式、Prx2 的检测手段 3 个方面进行综述, 为进一步探究 Prx2 与疾病调控机制及其在疾病诊断和潜在临床应用的研究方面提供参考。

关键词: 过氧化物还原酶 2; 生理功能; 检测方法; 临床应用

中图分类号: R969.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)10-1573-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.10.032

引用本文: 王丽敏, 杜诗琦, 王佳凤, 等. 过氧化物还原酶 2 及其潜在的临床应用价值研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(10): 1573-1579.

Research Progress of Peroxiredoxin 2 and Its Potential in Clinical Applications

WANG Limin, DU Shiqi, WANG Jiafeng, LI Bo*, DI Bin(Department of Pharmaceutical Analysis, Key Laboratory on Protein Chemistry and Structural Biology, MOE Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: Peroxiredoxin 2(Prx2) is an important member of peroxiredoxin family. It is widely distributed in various tissues and organs of human body, especially abundant in erythrocytes. Prx2 can function as a scavenger of peroxide, sensor and transducer of cell signals, molecular chaperone and so on. Changes in the structure and expression of Prx2 are related to many human diseases, consequently making Prx2 a new focus in clinical diagnosis and drug development. This review generally introduced the physiological functions of Prx2 and its relation with different human diseases, as well as detecting techniques of Prx2 in different forms. It aims to study the regulation mechanism of Prx2 and its potential in disease diagnosis and other clinical applications.

KEY WORDS: peroxiredoxin 2; physiological functions; detecting techniques; clinical applications

过氧化物还原酶(peroxiredoxins, Prxs)是一个结构高度保守的过氧化酶超级家族, 含有 1 或 2 个半胱氨酸残基 C_P(“peroxidatic” Cys)和 C_R(“resolving” Cys)。在哺乳动物细胞中共有 6 个不同亚型的过氧化物还原酶(Prx1 到 Prx6), 根据 C_R 的存在与否以及它的位置又可分为典型 2-Cys(Prx1 到 Prx4), 非典型 2-Cys(Prx5)和 1-Cys(Prx6) 3 个亚族^[1]。典型 2-Cys Prxs 在细胞内的含量相当高, 约占细胞内可溶性蛋白的 0.1%~1%^[2]。因为具有 2 个半胱氨酸残基, 1 个蛋白单体上的 C_P-SH 可被过氧化物氧化形成半胱次磺酸(C_P-SOH), 继而与另一单体的 C_R 形成二硫键, 遇

到合适的电子供体可被还原从而完成 1 个催化周期。C_P-SOH 还可以与另一分子的过氧化物反应形成过氧化的 C_P-SO₂H, 见图 1, 这种过氧化会导致 Prxs 的过氧化物还原酶活性丧失, 并形成更高分子量的聚合物, 使蛋白具有分子伴侣的活性。过氧化物还原酶 2(Prx2)分子量约 22 kDa, 定位于细胞质中, 在人体多种组织中表达^[3]。Prx2 在红细胞内含量尤其丰富, 胞内浓度可达到 240 μmol·L⁻¹。它的最小功能单元是蛋白单体, 但有研究报道其在细胞内的主要存在形式是由 5 个二聚体环化形成的十聚体, 见图 2, 以及更高分子量的 Prx2 寡聚物^[4]。随着对 Prx2 的功能研究和疾病研究的深

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2632017ZD07)

作者简介: 王丽敏, 女, 硕士 Tel: (025)83271179 E-mail: lizzie26@163.com *通信作者: 李博, 男, 博士, 副教授 Tel: (025)83271269 E-mail: libocpu@hotmail.com

入, 其重要性日益凸显。本文围绕 Prx2 的生理功能、疾病研究和检测方法展开论述, 重点探讨 Prx2 在不同疾病中的表征行为, 考察其在疾病诊断和监测方面的应用前景。

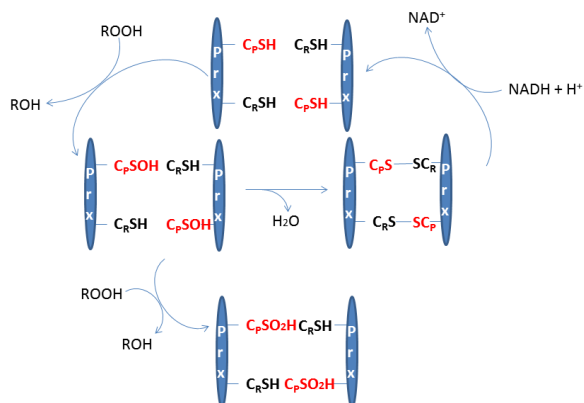


图1 典型 2-Cys Prxs 的催化周期和过氧化机制

Fig. 1 Catalytic cycle and overoxidation mechanism of typical 2-Cys Prxs

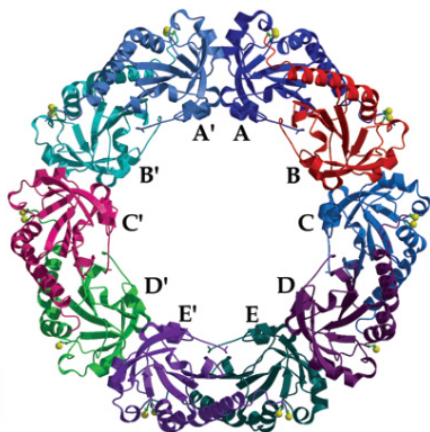


图2 Prx2 十聚体的晶体结构

Fig. 2 Crystal structure of the decameric Prx2

Reprinted with permission from (WOOD Z A, POOLE L B, HANTGAN R R, et al. Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins [J]. Biochemistry, 2002, 41(17): 5493-504.). Copyright 2002 American Chemical Society.

1 Prx2 的生理功能

1.1 抗氧化功能

Lee 等^[5]研究发现 Prx2 基因敲除的小鼠红细胞比野生型的红细胞寿命显著缩短, 检测到血红蛋白被氧化且形成海因茨体, 提示了 Prx2 的抗氧化功能。Prx2 是一种同型二聚体, 每个单体含有 2 个半胱氨酸残基 C_P 和 C_R , 当其与过氧化物反应时, 1 个单体上的 C_P 先被氧化成次磺酸, 另一单体上的 C_R 与次磺酸形成二硫键。硫氧还蛋白可还原二硫键重新生成还原态的 Prx2, 继续发挥其抗氧化功能。

Low 等^[6]发现人红细胞中的 Prx2 对低浓度范

围内的过氧化氢(H_2O_2)极其敏感, $5 \times 10^6 \cdot mL^{-1}$ 的红细胞暴露于 $0.5 \mu mol \cdot L^{-1}$ 的 H_2O_2 中就可观察到二硫键的形成。Peskin 等^[7]测量了 Prx2 与 H_2O_2 的反应速率, 在 pH 7.4 的条件下, Prx2 清除 H_2O_2 的速率与过氧化氢酶(专职清除 H_2O_2)相当。

除了清除 H_2O_2 , Prx2 还可以分解脂质过氧化物和过氧化亚硝酸盐。Prx2 与过氧化亚硝酸盐的反应速率常数也很高, 有研究者提出胞内大量 Prx2 的存在使得红细胞可以作为血浆中过氧化亚硝酸盐的反应池^[7]。

Prx2 还可以与次氯酸和氯胺反应^[8], 但反应速率相比 H_2O_2 就明显慢很多, 这说明 Prx2 对过氧化物具有一定的反应选择性。

1.2 参与细胞信号转导

哺乳动物细胞内的 H_2O_2 可作为 1 种信号分子, 而 2-Cys Prxs 可以对这些 H_2O_2 进行局部范围高选择性和高专属性的控制^[9-10]。Kang 等^[11]研究发现 Prx2 的过表达抑制了血小板衍生生长因子(PDGF)和表皮生长因子(EGF)介导的 H_2O_2 生成, 以及 TNF- α 诱导的细胞核因子 NF- κ B 翻译活性。说明 Prx2 不仅对细胞表面受体刺激下产生的 H_2O_2 水平有直接调控作用, 还会影响与之相关的下游信号。Choi 等^[12]进一步阐述了 Prx2 对 PDGF 信号通路的调节机制。PDGF 通过胞内的 H_2O_2 来调节多种信号蛋白上酪氨酸的磷酸化, 他们发现 Prx2 控制的内源性 H_2O_2 只作用于 PDGF 受体的 579, 581 和 857 酪氨酸磷酸化位点, 而外源性加入的 H_2O_2 则会诱导所有可能的磷酸化位点磷酸化。这也再次证明了位点选择性的响应只能由 Prx2 来实现而非其他过氧化物酶。此外, Prx2 活性位点中半胱氨酸的氧化状态可以转移至其他与 H_2O_2 结合更差的蛋白, 这也使得 Prx2 具备了 H_2O_2 传感器的功能^[13]。

1.3 分子伴侣

Jang 等^[14]发现缺乏细胞内典型 2-Cys Prxs 的酵母细胞对热休克处理极度敏感, 这与缺乏重要的蛋白分子伴侣有关。他们的研究表明, 酿酒酵母经过氧化物的氧化或热休克处理会诱导 Prxs 聚合成高分子形式的氧化物, 此时 Prxs 不再具有过氧化物酶的活力, 但却能防止热变性模板底物的聚合, 这种 Prxs 作为分子伴侣可帮助其他蛋白恢复正确的折叠方式和功能。

相同的作用在人体细胞内典型的 2-Cys Prxs 也得到了验证^[15-16]。人体内的 2-Cys Prxs 分子伴

侣有利于受损细胞的修复, 这些受损细胞存活下来之后, 过氧化的 Prxs 可被硫氧还原蛋白和 sestrin 还原^[17-18]。Ogasawara 等^[4]研究了人红细胞中 Prx2 的分子伴侣活性与其氧化还原状态和聚合状态的关系, 以 Prx2 保护柠檬酸合成酶和乙醇脱氢酶免受热诱导聚合的能力为指标来测量分子伴侣活性。结果发现新鲜血液的红细胞中, 还原态的 Prx2 高分子聚合物也具有分子伴侣活性, 与是否受 H₂O₂ 的过氧化诱导无关。这个新发现可能与红细胞中硫氧还原蛋白活力较低有关。

1.4 其他重要功能

Ishii 等^[19]介绍了 Prxs 在基因表达, 内在免疫以及炎症相关的生理反应如组织修复、寄生虫感染和肿瘤形成等方面都有突出的作用。Park 等^[20-21]报道 Prx2 具有抑制低密度脂蛋白的氧化和降低血浆脂质过氧化物水平的作用。Geiben-Lynn 等^[22-23]发现 Prx2 和 Prx1 可以抑制 HIV 病毒在人 T 细胞中的复制。研究^[24-25]表明 Prx2 的低聚物(分子量在 300~400 kDa)是一种活性的 NK 细胞增强因子(NKEF-B)。Sauri 等^[26]发现 DTT 处理过(抑制了其寡聚过程)的重组 Prx2 几乎没有 NK 细胞增强活性, 而使用 *N*-乙基-马来酰胺封闭了 Prx2 的巯基基团后(抑制了二聚体和寡聚体的形成), 这种活性彻底丧失。最新研究发现人体红细胞中 Prx2 的昼夜氧化循环是人体生物钟运行的重要生理机制^[27]。

2 Prx2 在各类疾病中的潜在临床价值

Poynton 等^[28]认为 Prxs 是一种氧化还原传感器, 在调控基于氧化压力的信号通路方面有重要作用。这种传感器可以检测出氧化还原动态平衡中的微小扰动, 因此是监测氧化压力信号的理想标志物。测定 Prxs 的氧化情况可以了解氧化应激和稳态恢复的时间, 这与只报道累积效应且有不可逆性的氧化还原敏感型探针相比是一种优势。而且监测内源性标志物避免了与递送化学探针^[29]或表达报告蛋白相关的复杂问题。

心血管疾病、糖尿病、神经退行性疾病和癌症等涉及异常的炎症和代谢过程, 常常会引起对活性氧分子(reactive oxygen species, ROS)^[30]的控制异常, 而包括 Prx2 在内的过氧化物还原酶家族具有很强的清除 ROS 能力。除此之外, Prx2 还与肿瘤细胞的再生, 细胞凋亡以及血管再生等密切相关^[31], 国内外众多研究都报道了 Prx2 与各类疾病的关系。

2.1 作为炎症中氧化压力的指示物

Prx2 对多种氧化剂高度敏感, 由中性粒细胞产生的氧化物诸如 H₂O₂ 或氯胺等均会引起红细胞内 Prx2 的氧化^[6-8]。Bayer 等^[32]发现中性粒细胞被活化后, 红细胞中的 Prx2 极易被氧化。使用吡啶醇肉豆蔻酸乙酸酯(phorbolmyristate acetate, PMA)激发中性粒细胞后, 红细胞中氧化型 Prx2, 迅速增加。进一步实验表明 PMA 引起的 Prx2 氧化是 1 种时间和(受激中性粒细胞的)浓度依赖型氧化。

这种氧化型 Prx2 二聚体的形成和消除动态平衡说明了氧化型 Prx2 即其二聚体是对细胞内氧化压力的 1 种实时而非累积性的测量指标。研究者还模拟人体发热(高温)和酸中毒(低 pH)环境下 Prx2 的氧化行为, 发现降低 pH 至代谢性酸中毒条件时, Prx2 的氧化产物显著增加。为了检验在体内炎症环境下, Prx2 的氧化是否增加, Bayer 等设计了脂多糖(LPS)诱导内毒素血症的动物模型, 发现在注射 LPS 的 6~10 h 后 Prx2 的氧化瞬时增加, 随后逐渐减少, 与上述现象一致。

Turner 等^[33]发现类风湿性关节炎患者外周血的淋巴细胞中, Prx2 的平均含量是正常人的 2 倍以上。而且这种胞内 Prx2 的含量与血浆内一种炎症标志物——降解物激活蛋白(catabolite activator protein, CRP)的浓度呈很强的正相关性。

综上实验结果, Prx2, 特别是氧化型 Prx2 二聚体可作为一种在体内中性粒细胞刺激下, 对氧化压力的实时高灵敏指示物, 在炎症有关疾病的诊断和病情监测中有重要作用。

2.2 作为非小细胞肺癌耐药性的监测指标

Prxs 在人类肺癌中高度表达, 不同的 Prx 在肿瘤病理学和癌症进行过程有不同的作用^[34]。Kwon 等^[35]研究耐药性非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中 Prxs 和各种抗氧化酶的表达, 发现在吉非替尼耐药性(gefitinib-resistant, GR)的 A549 肺癌细胞中, Prx2 的表达量显著高于非耐药性 A549 细胞。

吉非替尼是一种抑制肿瘤细胞生长, 诱导产生 ROS 的抗肿瘤药^[36]。Kwon 等使用 Western blot 分析吉非替尼耐药性的 A549 肺癌细胞(A549/GR)与 A549 细胞中的 Prxs 的含量差异, 发现 Prx2 在 A549/GR 细胞的含量增加最为显著。

在 NSCLC 的肺部肿瘤中, Prx2 几乎不表达或表达量极低, Kwon 等推测 Prx2 的基因表达可能受甲基化作用的调控。他们进一步实验发现在

A549 细胞中, Prx2 的基因上游 5'-CCGG-3'片段是高度甲基化的,但在吉非替尼耐药性的 A549 肺癌细胞中无这一现象,说明了 A549/GR 细胞对吉非替尼的耐药性可能与 Prx2 基因去甲基化有关,从而使 Prx2 的表达量大幅增加。

综合以上研究,Prx2 在 A549 非小细胞肺癌中的表达量与吉非替尼耐药性紧密相关,提示 Prx2 可作为一种有效的监测指标用于评价肺癌细胞对吉非替尼的耐药性。

2.3 在帕金森病(Parkinson's disease, PD)早期检测中的应用

PD 与脑中黑质致密部(substantia nigra pars compacta, SNc)的多巴胺(dopamine, DA)神经元萎缩有关。由于频繁的氧化代谢,DA 神经元极易受氧化压力损伤。而哺乳动物神经元中 Prx2 是含量最多的过氧化物还原酶^[37],Hu 等^[38]发现 Prx2 通过调控硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)和凋亡信号调节激酶(apoptosis signal-regulating kinase, ASK1)的相互作用,抑制依赖 ASK1 的细胞凋亡,从而保护 PD 中 DA 神经元免受损伤。不少研究都报道 PD 患者的脑部 Prx2 表达量异常,且观察到 Prx2 的磷酸化和亚硝基化^[39-41]。这都显示了 Prx2 在 PD 中极大的临床价值

Hu 等^[38]使用多巴胺能毒素 6-羟基多巴胺(6-OHDA)构建了 PD 的疾病模型,在 MN9D 多巴胺神经元中,过氧化形式的 Prx2 增加最为明显(使用免疫细胞化学和 Western blot 分析)。进一步研究揭示,这种保护机制主要是通过氧化型 Prx2 的增加抑制 Trx 的氧化,从而使还原型的 Trx 结合在 ASK1 上,抑制了激酶活化和细胞凋亡进程。

Randall 等^[41]发现 Prx2 的一段非催化片段上,硝基化后的酪氨酸会提高其抗氧化活性。但与之相反,Prx2 的 S-亚硝基化通过在 Prx2 的半胱氨酸残基(Cys51 和 Cys172)上修饰亚硝基基团,形成 SNO-Prx2,则会降低其与过氧化物的反应活性^[37]。而这种 SNO-Prx2 在大鼠和人的帕金森脑部含量显著高于正常值。

上述研究表明,Prx2 的过氧化是一种 PD 中过氧化物酶体系受干扰的病理表现,且还原性 Prx2 与过氧化 Prx2 的比例是评估 DA 神经元功能状态的更优指标。此外,Prx2 的硝基化、亚硝基化均会影响蛋白的功能,在不同病理状态下可检测到这些经基团修饰后的 Prx2 含量变化,说明 Prx2 在对 PD 早期诊断中具有很大的研究和应用前景。

2.4 作为抗阿霉素型乳腺癌的监测指标

McDONALD 等^[42]首次研究了 Prx 家族在 MCF-7 乳腺癌细胞中的作用,发现这些细胞不仅对阿霉素诱导的毒性有很强的抗性,而且包括 Prx2 在内的蛋白水平在阿霉素诱导后也显著提高。经阿霉素处理后,非癌细胞系 MCF-10A 的细胞活性下降了 80%,而乳腺癌细胞系 MCF-7 的活性仅损失 10%~20%;对比分析了两者的过氧化物还原酶表达,显示后者的 Prx2 等显著提高,说明乳腺细胞对阿霉素的抗性与 Prx2 的表达量有很强的相关性。小干扰 RNA(siRNA)转染实验也辅助验证了这一作用,在 Prx2 的表达受抑制后,阿霉素处理的细胞活性大大减弱,大部分细胞凋亡。

为了模拟临床环境,研究者将 MCF-7 细胞系与 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿霉素长期(14 d)共培养,然后分析各 Prxs 的变化。结果发现 Prx2,3,4,5 的表达量都显著增加,尤其是 Prx2,含量增加有 10 倍之多。

以上实验不仅说明了 Prx2 对乳腺细胞突出的保护作用,而且首次发现长期阿霉素治疗引起 Prxs 的过量表达是乳腺癌细胞产生耐药性的重要原因,其中 Prx2 的作用最为显著。Diaz 等^[43]还发现抑制 MCF-7 细胞系中 Prx2 的表达后,细胞对辐射诱导的死亡更加敏感。因为目前对乳腺癌的治疗主要借助化疗和放疗,上述研究则为乳腺癌的治疗情况提供了 1 个新的检测目标,即 Prx2。

2.5 在其他疾病中的作用

Karmarker 等^[44]发现在地中海贫血症的血小板蛋白质组中,Prx2 的表达上调与血小板的高凝聚状态有关。Eman 等^[45]首次研究人体循环的 Prxs 水平与糖尿病患者的动脉粥样硬化的关系。通过 ELISA 方法测量有外周动脉疾病(peripheral atherosclerosis disease, PAD)的 2 型糖尿病患者与健康受试者血浆中 Prx1,2,4,6 以及血管内皮功能紊乱标志物,发现患者体内的 Prx1,2,4,6 和这些生物标志物水平均高于对照组。Prx2 和 Prx1 与胰岛素抵抗指数(HOMA/IR)、甘油三酯(TG)有很强的平行性,细胞间黏附分子-1(ICAM-1)更是与 Prx2 的含量直接相关。这都提示了 Prx2 可作为糖尿病患者的动脉粥样硬化合并症和严重程度的标志物。Geiben-Lynn 等^[22]发现在 HIV 血清反应阳性个体的 CD^{8+} T 细胞中,Prx2 的含量显著高于反应阴性个体。Bora 等^[46]研究了与 HIV 感染相关的神经认知障碍(HIV-associated neurocognitive disorders, HAND)病人的脑脊液蛋白组,发现 Prx2 的表达上

调,提示 Prx2 在 HAND 中的指示作用。卵巢癌的发病过程中会诱导产生很多的 Prx2 和 Prx6,在基因敲除的小鼠模型中缺少 Prx2 或 Prx6 均会导致氧化压力的升高,产生不利影响^[47]。Sova 等^[48]研究了子宫内膜异位症相关性卵巢癌(endometriosis-associated ovarian cancer, EAC)和良性子宫内膜异位症(benign endometriosis, BE)中的 Prx2 和 8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG),两者都是指示氧化压力的指标。发现 EAC 肿瘤组织细胞核内的 Prx2 和 8-OHdG 都明显下调,说明 Prx2 对研究 EAC 的发病机制有重要意义。除此之外,在肝癌^[49-50],胰腺癌^[51],膀胱癌^[52],结肠直肠癌^[53]等也检测到 Prx2 的显著表达异常。

3 Prx2 的检测手段

随着对过氧化物还原酶 2 的认识更加深入,近年的研究发现人类的许多疾病与 Prx2 的表达水平或结构改变相关。这其中有些检测的是还原态的 Prx2 总量,有些是氧化型二聚体或过氧化形式的 Prx2,还有研究发现还原性 Prx2 与过氧化 Prx2 的比例对疾病状态有指示作用^[38]。对不同组织或细胞中的 Prx2 有多种检测方法可以进行检测,本文按照 Prx2 的不同存在形式对其检测手段简要论述。

3.1 还原态的 Prx2

最普遍的检测手段是 Western blot,有多种商业化的 Prx2 抗体产品可获取。

质谱法也不失为一种准确的定性定量方法, MALDI-TOF 可以给出蛋白精确的分子质量,从而实现对 Prx2 的鉴定和检测。Manta 等^[54]从新鲜人血红细胞中提取纯化出 Prx2 后,通过 12.5% SDS-PAGE 和 MALDI-TOF MS 2 种方法鉴定了 Prx2 的单体和二聚体。

除了上述 2 种常用的检测手段,近年来,更加简便快速的 HPLC 也越来越多地应用于 Prx2 的检测和定量。Ogasawara 等^[55]以重组 Prx2 在反相 C₁₈ 柱上的保留特征为定性依据,以 280 nm 处的紫外吸收定量,建立了一种反相 HPLC 法对人红细胞中还原态的 Prx2 进行分离和测定,色谱峰经 SDS-PAGE 和质谱法验证为 Prx2。他们将此法应用于健康受试者,测得男性和女性红细胞中 Prx2 的平均相对含量分别为 7.28 ng·mg⁻¹和 8.29 ng·mg⁻¹,无显著差异。

3.2 氧化型 Prx2 二聚体(含二硫键)

氧化型的 Prx2 二聚体(~44 kDa)与还原型的

Prx2 单体(~22 kDa)可以在非还原性的 SDS-PAGE 上区分。想要准确获取胞内原有的氧化型 Prx2 二聚体的含量,关键是在细胞破碎前对所有还原型的 Prx2 进行巯基封端,因为 Prx2 的半胱氨酸 C_p-SH 对过氧化物高度敏感,蛋白变性操作、缓冲液中极微量的过氧化物以及其他步骤都很难使 Prx2 保持其原有的还原状态。最有效的方法是在细胞裂解前对还原态的 Prx2 烷基化,不同的样品如悬浮细胞、贴壁细胞和组织样品还需对烷基化条件进行优化。常用的烷基化试剂有碘代乙酰胺(IAM)和 *N*-乙基-马来酰胺(NEM),Sobotta 等^[56]发现甲基硫代磺酸甲酯也是一种十分高效的巯基修饰剂。

监测氧化型 Prx2 二聚体对了解细胞内的氧化压力有重要意义。Bayer 等^[32]使用非还原性的免疫印迹方法,从暴露于内毒素的小鼠外周循环血的红细胞中检测并分离得到了氧化型 Prx2 二聚体。Prx2 在红细胞中的含量之丰富使得仅从一滴血中检测 Prx2 的氧化还原状态成为可能。

3.3 氧化态的 Prx2

最早测定氧化型 Prx2 的方法是二维凝胶电泳(2D PAGE),通过 Prx2 的半胱氨酸 C_p-SH 上发生的亚磺化和磺酰化造成的蛋白印记酸移来加以区分。这种方法的一大劣势就是每份样品都要做一次二维凝胶电泳,无法实现高通量分析。而且蛋白的磷酸化等其他结构变化也可能引起等电点的位移^[28]。

目前应用最多的是利用氧化型 Prx2 抗体的免疫印迹法,已有多篇文献报道使用了半胱氨酸亚磺酸(SO₂H)和磺酸(SO₃H)化的 Prx2 抗体^[57-58]。这些抗体还可以应用于免疫组织化学诊断^[59-60],更加直观地了解在哪些组织器官处发生了氧化压力的升高。同理,为了避免人为操作带来的 Prx2 氧化,对还原型 Prx2 的半胱氨酸进行烷基化十分必要。还原型的 Prx2 经过 IAM, NEM 或 AMS{4-乙酰氨基-4'-[(碘代乙酰基)氨基]苌-2,2'-二磺酸}的衍生化后在电泳迁移过程中行进更慢,尤其是 AMS,他为每个还原半胱氨酸增加了约 500 Da 的质量^[61],利用这种分子量差异,Prx2 的还原型二聚体和氧化型二聚体,还原型单体和氧化型单体可以很好地在 SDS-PAGE 上得以分离。

除了上述方法,使用标记性的质谱方法也可以对不同氧化状态的 Prx2 进行测定。Prx2 的还原型半胱氨酸经 NEM 修饰会增加 125 Da,而不同氧

化状态的 Prx2 单体或二聚体经衍生化后会加上不同数量的 NEM, Peskin 等^[58]利用这一原理使用 LC-MS 对 Prx2 进行了研究。这种方法有望应用到更复杂的生物样本, 如细胞裂解或组织匀浆后的样品再经蛋白酶解获得含 C_P 半胱氨酸的 Prx2 肽段, 利用液相质谱联用技术对其氧化状态进行分析。

4 小结和展望

作为过氧化物还原酶家族的一员, Prx2 不仅具有强大的清除过氧化物能力——尤其是 ROS, 而且在调节细胞内 H₂O₂ 浓度和氧化压力的感应和信号转导等方面也起着重要作用。高分子量的 Prx2 可发挥分子伴侣的作用, 促进细胞修复^[62]。除此之外, 围绕 Prx2 的功能研究还发现了其在组织修复、寄生虫感染和肿瘤形成等方面的突出作用。近年来越来越多的学者开始关注 Prx2 与人体炎症、肿瘤和癌症的相关性, 如肺癌^[35]、乳腺癌^[42-43]、肝癌^[49-50]、卵巢癌^[47-48]和结肠直肠癌^[53]等。此外还有研究报道了其在动脉粥样硬化^[45]和艾滋病病毒感染^[22,46]中的异常表达。随着对 Prx2 结构和功能的研究更加深入, 结合一些临床症状, Prx2 可作为相关疾病诊断和监测的新型指示物。因此, 进一步挖掘和探索 Prx2 的生理功能, 了解其在疾病发生机制中的作用, 以及开发更加灵敏专属, 简便易行的检测方法将成为 Prx2 未来研究发展的方向。

REFERENCES

- [1] RHEE S G. Overview on peroxiredoxin [J]. *Mol Cells*, 2016, 39(1): 1-5.
- [2] HALL A, KARPLUS P A, POOLE L B. Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions [J]. *FEBS J*, 2009, 276(9): 2469-2477.
- [3] POOLE L B, NELSON K J. Distribution and features of the six classes of peroxiredoxins [J]. *Mol Cells*, 2016, 39(1): 53-59.
- [4] OGASAWARA Y, OHMINATO T, NAKAMURA Y, et al. Structural and functional analysis of native peroxiredoxin 2 in human red blood cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(7): 1072-1077.
- [5] LEE T H, KIM S U, YU S L, et al. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice [J]. *Blood*, 2003, 101(12): 5033-5038.
- [6] LOW F M, HAMPTON M B, PESKIN A V, et al. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte [J]. *Blood*, 2007, 109(6): 2611-2617.
- [7] PESKIN A V, LOW F M, PATON L N, et al. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(16): 11885-11892.
- [8] STACEY M M, PESKIN A V, VISSERS M C, et al. Chloramines and hypochlorous acid oxidize erythrocyte peroxiredoxin 2 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(10): 1468-1476.

- [9] KANG S W, RHEE S G, CHANG T S, et al. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications [J]. *Trends Mol Med*, 2005, 11(12): 571-578.
- [10] SOBOTTA M C, LIOU W, STOCKER S, et al. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(1): 64-70.
- [11] KANG S W, CHAE H Z, SEO M S, et al. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(11): 6297-6302.
- [12] CHOI M H, LEE I K, KIM G W, et al. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II [J]. *Nature*, 2005, 435(7040): 347-353.
- [13] RHEE S G, WOO H A, KIL I S, et al. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(7): 4403-4410.
- [14] JANG H H, LEE K O, CHI Y H, et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function [J]. *Cell*, 2004, 117(5): 625-635.
- [15] NYSTROM T, YANG J, MOLIN M. Peroxiredoxins, gerontogenes linking aging to genome instability and cancer [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(18): 2001-2008.
- [16] CHAE H Z, OUBRAHIM H, PARK J W, et al. Protein glutathionylation in the regulation of peroxiredoxins: a family of thiol-specific peroxidases that function as antioxidants, molecular chaperones, and signal modulators [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16(6): 506-523.
- [17] PERKINS A, POOLE L B, KARPLUS P A. Tuning of peroxiredoxin catalysis for various physiological roles [J]. *Biochemistry*, 2014, 53(49): 7693-7705.
- [18] LOWTHER W T, HAYNES A C. Reduction of cysteine sulfinic acid in eukaryotic, typical 2-Cys peroxiredoxins by sulfiredoxin [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(1): 99-109.
- [19] ISHII T, WARABI E, YANAGAWA T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2012, 50(2): 91-105.
- [20] PARK J G, OH G T. The role of peroxidases in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *BMB Rep*, 2011, 44(8): 497-505.
- [21] PARK J G, YOO J Y, JEONG S J, et al. Peroxiredoxin 2 deficiency exacerbates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circ Res*, 2011, 109(7): 739-749.
- [22] GEIBEN-LYNN R, KURSAR M, BROWN N V, et al. HIV-1 antiviral activity of recombinant natural killer cell enhancing factors, NKEF-A and NKEF-B, members of the peroxiredoxin family [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(3): 1569-1574.
- [23] ASMAL M, LETVIN N L, GEIBEN-LYNN R. Natural killer cell-dependent and non-dependent anti-viral activity of 2-Cys peroxiredoxin against HIV [J]. *Int Trends Immun*, 2013, 1(4): 69-77.
- [24] SHAU H, GUPTA R K, GOLUB S H. Identification of a natural killer enhancing factor (NKEF) from human erythroid cells [J]. *Cell Immunol*, 1993, 147(1): 1-11.
- [25] YIN G, LI C, SHAN B, et al. Insufficient peroxiredoxin-2 expression in uterine NK cells obtained from a murine model of abortion [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(3): 773-781.
- [26] SAURI H, ASHJIAN P H, KIM AT, et al. Recombinant natural killer enhancing factor augments natural killer cytotoxicity [J]. *J Leukoc Biol*, 1996, 59(6): 925-931.
- [27] PERKINS A, NELSON K J, PARSONAGE D, et al. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling [J]. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40(8): 435-445.
- [28] POYNTON R A, HAMPTON M B. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(2): 906-912.
- [29] YU Y, LIANG W Y, DENG F. Development of PCR method using TaqMan probe for the detection of human Bocavirus and

- investigation of pollution of blood products and raw plasma [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2017, 34(10): 1451-1454.
- [30] WANG L L, SHI L, YUAN P, et al. Effect of raloxifene on pulmonary artery remodeling in chronic hypoxic rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2015, 32(6): 681-685.
 - [31] KANG D H, LEE D J, LEE K W, et al. Peroxiredoxin II is an essential antioxidant enzyme that prevents the oxidative inactivation of VEGF receptor-2 in vascular endothelial cells [J]. *Mol Cell*, 2011, 44(4): 545-558.
 - [32] BAYER S B, MAGHZAL G, STOCKER R, et al. Neutrophil-mediated oxidation of erythrocyte peroxiredoxin 2 as a potential marker of oxidative stress in inflammation [J]. *FASEB J*, 2013, 27(8): 3315-3322.
 - [33] SZABO-TAYLOR K E, EGGLETON P, TURNER C A, et al. Lymphocytes from rheumatoid arthritis patients have elevated levels of intracellular peroxiredoxin 2, and a greater frequency of cells with exofacial peroxiredoxin 2, compared with healthy human lymphocytes [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(8): 1223-1231.
 - [34] PARK Y H, KIM S U, LEE B K, et al. Prx I suppresses K-ras-driven lung tumorigenesis by opposing redox-sensitive ERK/cyclin D1 pathway [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(5): 482-496.
 - [35] KWON T, RHO J K, LEE J C, et al. An important role for peroxiredoxin II in survival of A549 lung cancer cells resistant to gefitinib [J]. *Exp Mol Med*, 2015(47): e165.
 - [36] WU J, MIN R, WU M, et al. Gefitinib induces mitochondrial-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mol Med Rep*, 2011, 4(2): 357-362.
 - [37] SUNICO C R, SULTAN A, NAKAMURA T, et al. Role of sulfiredoxin as a peroxiredoxin-2 denitrosylase in human iPSC-derived dopaminergic neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(47): E7564-E7571.
 - [38] HU X, WENG Z, CHU C T, et al. Peroxiredoxin-2 protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neurodegeneration via attenuation of the apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) signaling cascade [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(1): 247-261.
 - [39] FANG J, NAKAMURA T, CHO D H, et al. S-nitrosylation of peroxiredoxin 2 promotes oxidative stress-induced neuronal cell death in Parkinson's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(47): 18742-18747.
 - [40] QU D, RASHIDIAN J, MOUNT M P, et al. Role of Cdk5-mediated phosphorylation of Prx2 in MPTP toxicity and Parkinson's disease [J]. *Neuron*, 2007, 55(1): 37-52.
 - [41] RANDALL L M, MANTA B, HUGO M, et al. Nitration transforms a sensitive peroxiredoxin 2 into a more active and robust peroxidase [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(22): 15536-15543.
 - [42] MCDONALD C, MUHLBAUER J, PERLMUTTER G, et al. Peroxiredoxin proteins protect MCF-7 breast cancer cells from doxorubicin-induced toxicity [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(1): 219-226.
 - [43] DIAZ A J, TAMAE D, YEN Y, et al. Enhanced radiation response in radioresistant MCF-7 cells by targeting peroxiredoxin II [J]. *Breast Cancer*(Dove Med Press), 2013(5): 87-101.
 - [44] KARMAKAR S, BANERJEE D, CHAKRABARTI A. Platelet proteomics in thalassemia: Factors responsible for hypercoagulation [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2016, 10(3): 239-247.
 - [45] EL ETER E, AL MASRI A, HABIB S, et al. Novel links among peroxiredoxins, endothelial dysfunction, and severity of atherosclerosis in type 2 diabetic patients with peripheral atherosclerotic disease [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2014, 19(2): 173-181.
 - [46] BORA A, UBAIDA MOHIEN C, CHAERKADY R, et al. Identification of putative biomarkers for HIV-associated neurocognitive impairment in the CSF of HIV-infected patients under cART therapy determined by mass spectrometry [J]. *J Neurovirol*, 2014, 20(5): 457-465.
 - [47] PYLTVAS M, PUISTOLA U, KAUPPILA S, et al. Oxidative stress-induced antioxidant enzyme expression is an early phenomenon in ovarian carcinogenesis [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(9): 1661-1667.
 - [48] SOVA H, KANGAS J, PUISTOLA U, et al. Down-regulation of 8-hydroxydeoxyguanosine and peroxiredoxin II in the pathogenesis of endometriosis-associated ovarian cancer [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(8): 3037-3044.
 - [49] KWON T, BAK Y, PARK Y H, et al. Peroxiredoxin II is essential for maintaining stemness by redox regulation in liver cancer cells [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(5): 1188-1197.
 - [50] ZHOU S, HAN Q, WANG R, et al. PRDX2 protects hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells from oxidative stress [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(3): 2217-2221.
 - [51] ISOHOOKANA J, HAAPASAARI K M, SOINI Y, et al. Loss of peroxiredoxin expression is associated with an aggressive phenotype in pancreatic adenocarcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(1): 427-433.
 - [52] CHEN Y T, CHEN C L, CHEN H W, et al. Discovery of novel bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics using iTRAQ technology [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(11): 5803-5815.
 - [53] FENG J, FU Z, GUO J, et al. Overexpression of peroxiredoxin 2 inhibits TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and cell migration in colorectal cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(2): 867-873.
 - [54] MANTA B, HUGO M, ORTIZ C, et al. The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2 [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 484(2): 146-154.
 - [55] OGASAWARA Y, ISHIDA Y, TAKIKAWA M, et al. A simple high performance liquid chromatography method for quantitatively determining the reduced form of peroxiredoxin 2 and the mass spectrometric analysis of its oxidative status [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 997(1): 36-41.
 - [56] SOBOTTA M C, BARATA A G, SCHMIDT U, et al. Exposing cells to H₂O₂: a quantitative comparison between continuous low-dose and one-time high-dose treatments [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 60(3): 25-35.
 - [57] POYNTON R A, PESKIN A V, HAYNES A C, et al. Kinetic analysis of structural influences on the susceptibility of peroxiredoxins 2 and 3 to hyperoxidation [J]. *Biochem J*, 2016, 473(4): 411-421.
 - [58] PESKIN A V, DICKERHOF N, POYNTON R A, et al. Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the oxidized cysteine [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(20): 14170-14177.
 - [59] HWANG I K, YOO K Y, KIM D W, et al. Hyperoxidized peroxiredoxins and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase immunoreactivity and protein levels are changed in the gerbil hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(9): 1530-1538.
 - [60] YOO K Y, PARK O K, YU J, et al. Expression and changes of hyperoxidized peroxiredoxins in non-pyramidal and polymorphic cells in the gerbil hippocampus during normal aging [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29(3): 413-421.
 - [61] DAY A M, BROWN J D, TAYLOR S R, et al. Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival [J]. *Mol Cell*, 2012, 45(3): 398-408.
 - [62] TOLEDANO M B, HUANG B. Microbial 2-Cys peroxiredoxins: insights into their complex physiological roles [J]. *Mol Cells*, 2016, 39(1): 31-39.

收稿日期: 2017-11-24

(本文责编: 曹粤锋)