

• 研究论文 •

黄嘌呤氧化还原酶不同亚型活性测定方法的建立与应用

陈冬婷^{1,2}, 田金英^{1,2}, 李雪晨^{1,2}, 李江^{1,2}, 叶菲^{1,2*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京新药机制与药理评价研究重点实验室, 北京 100050;

2. 中国医学科学院糖尿病研究中心, 北京 100050)

摘要: 黄嘌呤氧化还原酶 (xanthine oxidoreductase, XOR) 是体内催化嘌呤生成尿酸的关键酶, 以两种可以相互转化的亚型存在, 分别是黄嘌呤脱氢酶 (xanthine dehydrogenase, XDH) 和黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO)。本研究首先通过两亚型酶在催化过程中使用电子受体不同的原理, 在牛奶来源纯酶中建立了 XOR 及亚型 XO、XDH 的活性测定方法, 明确了测定体系中最适底物 xanthine 浓度为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 最适电子受体烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 浓度为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 最适 pH 值为 7.80, XOR、XO、XDH 的可测定范围分别为 $0.97\sim 17.5 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1\sim 9 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $66\sim 1\ 191 \text{ mU}\cdot\text{L}^{-1}$ 。随后在纯酶体系测定方法的基础上, 建立了小鼠肝组织 XOR 及亚型 XO、XDH 的活性测定方法, 明确了组织制样方法、测定体系中最适 xanthine 浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、最适 NAD⁺ 浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, XOR、XO、XDH 的可测定范围分别为 $0.67\sim 3.98$ 、 $0.19\sim 1.08$ 、 $0.52\sim 3.55 \text{ U}\cdot\text{gprot}^{-1}$ 。应用已建立的方法, 测定了经典的 XOR 抑制剂别嘌呤醇 (allopurinol, Allo) 对牛奶及小鼠肝组织来源 XOR、XO 及 XDH 活性的抑制作用。所有动物实验经过中国医学科学院药物研究所实验动物管理与动物福利委员会审核并批准 (00003346), 符合实验动物伦理相关规范。本研究分别建立了牛奶来源纯酶体系中及小鼠肝脏中 XOR 及其亚型 XO、XDH 的活性测定方法, 该方法准确、便捷, 对探究 XOR 在机体中不同的病理生理作用、研发新型 XOR 抑制剂等奠定了实验基础。

关键词: 黄嘌呤氧化还原酶; 黄嘌呤脱氢酶; 黄嘌呤氧化酶; 酶活性测定; 酶动力学; 抑制剂

中图分类号: R965.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)10-3016-08

Establishment and application of activity determining methods for different subtypes of xanthine oxidoreductase

CHEN Dong-ting^{1,2}, TIAN Jin-ying^{1,2}, LI Xue-chen^{1,2}, LI Jiang^{1,2}, YE Fei^{1,2*}

(1. Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Diabetes Research Center of Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Xanthine oxidoreductase (XOR), the key enzyme catalyzing purine to produce uric acid, including two subtypes, xanthine dehydrogenase (XDH) and xanthine oxidase (XO), respectively, *in vivo*. Usually, XDH and XO can transform to each other. In this study, based on the principle that the subtype XO or XDH uses different electron acceptors, the methods for the measuring the activities of bovine milk XOR (pure enzyme) and its subtypes were established. The optimal concentrations of substrate xanthine ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and electron acceptor NAD⁺ ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), pH value (7.80) were investigated. The ranges of the XOR, XO, XDH activity which could be determined were $0.97\sim 17.5 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, $1\sim 9 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, and $66\sim 1\ 191 \text{ mU}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Furthermore, the methods for

收稿日期: 2023-03-30; 修回日期: 2023-05-05.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-029, 2022-I2M-1-020); 中国药学会-以岭生物医药创新基金 (CPA-B04-ZC-2021-005); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (22107121).

*通讯作者 Tel: 86-10-83150495, E-mail: yefei@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0389

determining the activities of XOR and its subtypes in mouse liver were established. The preparation of liver samples, the optimal concentrations of xanthine ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and NAD^+ ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were researched. And the activity ranges of XOR, XO and XDH in mouse liver which could be determined were 0.67–3.98, 0.19–1.08, and $0.52\text{--}3.55 \text{ U}\cdot\text{gprot}^{-1}$, respectively. With the methods above, the effects of classic XOR inhibitor allopurinol (Allo) on XOR, XO and XDH from both milk and mouse liver were determined. All animal experiments have been approved by the Animal Experimental Center, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College (00003346). This study established new methods for the determination of XOR and its subtypes activity in pure enzyme system and in mouse liver, respectively, which were accurate and convenient. It laid the experimental foundation for exploring the different pathophysiological effects of XOR in the body and developing new XOR inhibitors.

Key words: xanthine oxidoreductase; xanthine dehydrogenase; xanthine oxidase; enzyme activity determination; enzyme kinetics; inhibitor

黄嘌呤氧化还原酶 (xanthine oxidoreductase, XOR) 是人体内生成尿酸的限速酶, 在人类高尿酸血症及痛风的发病中发挥重要作用, 也是目前一线降尿酸药物的作用靶点^[1]。XOR 属于黄素蛋白钼辅基脱氢酶家族成员, 在人体中最主要的生物学功能是参与嘌呤分解代谢的最后两步, 即次黄嘌呤 (hypoxanthine) 被氧化为黄嘌呤 (xanthine) 并进一步氧化为终产物尿酸 (uric acid, UA)^[2,3], 这一过程主要在肝脏中进行, 肝脏也是人体中 XOR 活性最高的组织。

在哺乳动物中, XOR 以两种可以相互转换的亚型存在^[2,4], 即黄嘌呤脱氢酶 (xanthine dehydrogenase, XDH) (EC 编号 1.1.7.1.4) 和黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO) (EC 编号 1.1.7.3.2)。除正常生理状态下的转换, 不同病理状态也会加剧 XDH 向 XO 的转换, 如化学制剂、内源性有毒物质、缺血或缺氧导致的组织损伤或细胞坏死^[5,6]。两种亚型均可催化嘌呤生成尿酸, 不同在于 XDH 以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+) 作为电子受体, 催化后生成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH), XO 以 O_2 作为电子受体, 催化后生成两种活性氧 (reactive oxygen species, ROS): 超氧阴离子 (O_2^-) 和过氧化氢 (H_2O_2)。嘌呤代谢紊乱时, XO 在催化过程中会产生过量 ROS 并造成细胞氧化应激损伤^[7,8], 这也被认为是高尿酸水平会增加心血管疾病及代谢综合征患病风险的原因之一^[7,9,10]。分别测定 XOR 亚型 XO、XDH 的活性, 对于机体某些病理状态确定、高尿酸血症与其他疾病间关联机制的探索、XOR 抑制剂对于亚型的选择性研究等都有重要的意义。

目前, 市售的活性检测试剂盒只能测定样品中 XO 活性, 不能做到对 XDH 亚型活性的测定, 且测定的精确度较低。已有文献^[6,11,12]报道的测定组织 XOR 的方法须将样品经过复杂的前处理后利用高效液相色谱

仪法、同位素法等进行测定, 限制了其方法的使用。本研究则旨在建立一种高效、快捷、准确的 XOR 及其 XO、XDH 亚型的活性测定方法, 为探究 XOR 在机体中不同的病理生理作用、研发新型 XOR 抑制剂等奠定实验基础。

材料与方法

试剂 牛奶来源 XOR (色谱纯化型, 批号: SLBQ1517V)、xanthine (批号: 090M0209V) 购自德国默克 Sigma-Aldrich 公司; UA (批号: A29S11L126459) 购自上海源叶生物科技有限公司; NAD^+ (批号: B179321337769) 购自美国 APEX BIO 公司; NADH (批号: 092722230214) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 别嘌呤醇 (allopurinol, 批号: 10160120) 购自阿法埃沙 (天津) 化学有限公司。BCA 蛋白定量试剂盒 (批号: X1357468) 购自美国 Thermo Fisher 公司; 10 kDa 纯化离心管 (批号: UFC801024D) 购自美国 Millipore 公司。所用化学试剂均为分析纯。

动物 雄性 ICR 小鼠, 体重 $18\sim 22 \text{ g}$, 购自北京维通利华生物科技股份有限公司 [合格证号: SCXK (京) 2016-0006], 脱颈处死, 剖开腹腔取出肝脏组织, 冰生理盐水清洗去除血液及结缔组织备用。动物饲养于中国医学科学院药物研究所实验动物管理中心, 饲养温度为 $22\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 湿度为 $40\%\sim 60\%$, 光照/黑暗时间各 12 h 交替, 并给予小鼠自由进食及饮水。所有动物实验按标准操作规程操作, 经过中国医学科学院药物研究所实验动物管理与动物福利委员会审核并批准 (批准号: 00003346)。

吸收光谱绘制 取 PBS 缓冲液 (含 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液, $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH 7.80), xanthine、UA、 NAD^+ 、 NADH 溶液 (均溶于 pH 7.80 PBS 缓冲液中) 于 96 孔板分别上样 $250 \mu\text{L}$, 应用多功能酶标仪, 在

波长 230~400 nm 范围内连续读取吸光度 (A) 值, 分别绘制吸收光谱。

UA 标准曲线绘制 取不同浓度 UA 溶液于 96 孔板分别上样 250 μL , 在 293 nm 处读取 A 值, 拟合 $A_{293\text{ nm}}-C_{\text{UA}}$ 曲线, 得到 UA 标准曲线方程 (公式 1)。其中, $A_{293\text{ nm}}$ 为波长 293 nm 处的 A 值, C_{UA} 为 UA 浓度, a 为标准曲线斜率, b 为标准曲线截距。

$$A_{293\text{ nm}} = a \cdot C_{\text{UA}} + b \quad (1)$$

NADH 标准曲线绘制 取不同浓度 NADH 溶液于 96 孔板分别上样 250 μL , 在 340 nm 处读取 A 值, 拟合 $A_{340\text{ nm}}-C_{\text{NADH}}$ 曲线, 得到 NADH 标准曲线方程 (公式 2)。其中, $A_{340\text{ nm}}$ 为波长 340 nm 处的 A 值; C_{NADH} 为 NADH 浓度; c 为标准曲线斜率; d 为标准曲线截距

$$A_{340\text{ nm}} = c \cdot C_{\text{NADH}} + d \quad (2)$$

牛奶来源 XOR 活性测定 体系总体积 250 μL , 加入 PBS 缓冲液 (pH 7.80) 220 μL 、XOR 溶液 10 μL 、 NAD^+ 溶液 10 μL , 随后加入 xanthine 溶液 10 μL , 加入 xanthine 后立即在酶标仪中 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 每 1 min 读取一次 293 nm 处 A 值, 绘制 $A_{293\text{ nm}}-t$ 曲线, 选取酶促反应曲线线性反应期内一段拟合直线方程 ($R^2 > 0.99$), 得到直线斜率即 XOR 催化生成 UA 的反应速率 V_{XOR} ($\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$)^[13], 通过公式 3 求得 XOR 活性。 a 为公式 1 中标准曲线斜率。

$$\text{XOR 活性} / \text{U} \cdot \text{L}^{-1} = V_{\text{XOR}} / a \quad (3)$$

牛奶来源 XOR 中 XO 亚型活性测定 根据 XO 催化反应原理, 体系中加入 PBS 缓冲液 (pH 7.80) 230 μL 、XOR 溶液 10 μL , 随后加入 xanthine 溶液 10 μL 开始反应, 反应后绘制 $A_{293\text{ nm}}-t$ 曲线, 拟合得到 V_{XO} , 通过公式 4 求得 XO 活性。考察测定体系最适酶及底物浓度、最适 pH 值。 a 为公式 1 中标准曲线斜率。

$$\text{XO 活性} / \text{U} \cdot \text{L}^{-1} = V_{\text{XO}} / a \quad (4)$$

牛奶来源 XOR 中 XDH 亚型活性测定 根据 XDH 催化反应原理, 加入 PBS 缓冲液 (pH 7.80) 220 μL 、XOR 溶液 10 μL 、 NAD^+ 溶液 10 μL , 随后加入 xanthine 溶液 10 μL 开始反应, 每 1 min 读取一次 340 nm 处 A 值, 绘制 $A_{340\text{ nm}}-t$ 曲线, 拟合得到 XDH 催化生成 NADH 的反应速率 V_{XDH} (等同于 XDH 催化生成 UA 的反应速率), 通过公式 5 求得 XDH 活性。考察测定体系最适 NAD^+ 浓度、最适 pH 值。 c 为公式 2 中标准曲线斜率。

$$\text{XDH 活性} / \text{U} \cdot \text{L}^{-1} = V_{\text{XDH}} / c \quad (5)$$

XOR、XO、XDH 活性单位 (U) 均定义为每分钟转化 1 μmol xanthine 为 UA 所需的酶量。

肝组织 XOR 及其亚型活性测定 参考牛奶来源 XOR 及其亚型活性测定方法。按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定肝组织样本蛋白浓度, 用以校正酶活性,

以 $\text{U} \cdot \text{gprot}^{-1}$ 作为比活性单位。

统计学分析 实验数据采用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, Excel 软件 t test 方法用于组间差异分析, 若 $P < 0.05$ 则表示组间有显著性差异。GraphPad Prism 8 软件 $\log(\text{inhibitor})$ vs $\text{normalized response-variable slop}$ 方法用于拟合酶活性半数抑制浓度 (IC_{50})。

结果

1 牛奶来源 XOR 及其亚型活性测定方法的建立

体内 XOR 存在 XDH 和 XO 两种亚型, 其中, XDH 以 NAD^+ 作为辅酶, 催化 xanthine 生成 UA 和 NADH; XO 以 O_2 作为电子受体, 催化 xanthine 生成 UA 和 ROS。因此, 在生成 UA 的同时, XDH、XO 发挥着不同的生理和病理作用。

1.1 黄嘌呤氧化还原酶 XOR 活性测定 参照文献^[6,14]方法, 体系内加入 XO 3 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ (按 XO 的标示活性计算的理论活性)、xanthine 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 NAD^+ 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行反应, 测定 XOR 活性。同时扫描体系内各物质光谱, 以确定 UA 的特征吸收峰 (最大吸收波长) 及各物质光谱相互间的干扰情况。绘制 UA 标准曲线, 拟合曲线方程。

吸收光谱结果显示 (图 1A), UA 的特征吸收峰在波长 293 nm 处, NAD^+ 不干扰 293 nm 处对 UA 生成的检测, xanthine 对 UA 检测有一定影响, 但随着反应进行 xanthine 逐渐消耗, UA 生成量逐渐增加, 这一干扰也会减弱。在 0~125 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内 UA 标准曲线 (图 1B) 方程为 $A_{293\text{ nm}} = 0.0097 \cdot C_{\text{UA}} + 0.0002$ 。

牛奶来源 XOR 活性测定结果显示, XOR 催化 xanthine 生成 UA 的反应曲线在 0~8 min 内处于线性反应区 (图 1C), 可用于拟合 V_{XOR} , 测得 XOR 活性为 $3.33 \pm 0.15 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2 黄嘌呤氧化酶 XO 活性测定 XO 以 O_2 作为电子受体催化 xanthine 生成 UA, 根据催化反应原理, 体系内加入酶与底物进行反应, 可在波长 293 nm 处测定 XO 活性。为确定适合 XO 活性测定的底物浓度及可测酶活性范围, 选择体系温度 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.80, 反应时间 0~15 min, 当 XO 分别为 1、3、9、27 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 (按 XO 的标示活性计算的理论活性), 分别测定 xanthine 为 25、50、75、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 XO 的活性。

系列酶促反应曲线中, 当 XO 理论活性为 3 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, 催化各浓度 xanthine 反应时, 起始时均具有 1~2 min 延滞期, 随后有不同长度的线性反应区, 可用于拟合线性反应速率, xanthine 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 XO 测定活性与理论活性最接近 (表 1)。当 xanthine 浓度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, XO 理论活性为 1、3、9 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 线性反应区分别为 2~

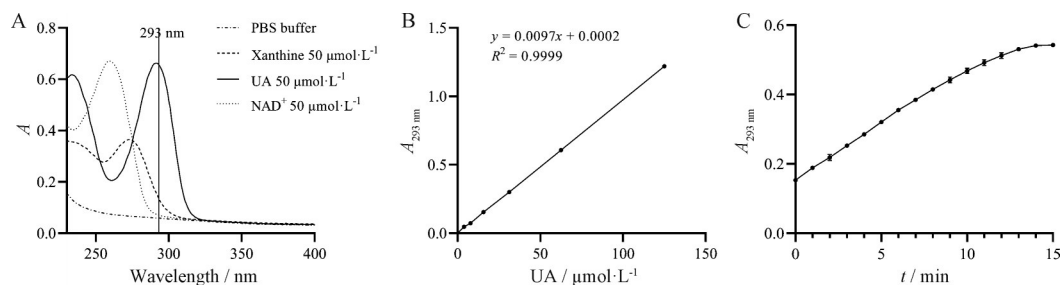


Figure 1 Determination of bovine milk xanthine oxidoreductase (XOR) activity. A: Absorption spectra of substances in the reaction system, absorption peak of uric acid (UA) at 293 nm; B: UA standard curve; C: XOR catalytic reaction curve. $n = 3, \bar{x} \pm s$

15.2~9.0~4 min (图2A~C), XO测定活性与理论活性接近(表1); XO理论活性为27 U·L⁻¹时,反应曲线线性区域过短,测得XO活性较理论值误差大(图2D、表1)。所以,当体系温度37 °C, pH 7.80, XO活性测定底物 xanthine 最适浓度为50 μmol·L⁻¹,拟合2~4 min段反应速率计算XO活性,可测酶活性范围为1~9 U·L⁻¹。

为确定XO催化反应最适pH值,选择体系温度37 °C, XO 3 U·L⁻¹, xanthine 50 μmol·L⁻¹,反应时间0~15 min,在pH为6.50、7.00、7.80、8.50时分别测定XO活性。结果显示,在pH为6.50、7.00、7.80、8.50时,线性反应区分别为1~15、1~12、1~10、1~10 min(图2E),均拟合2~4 min段反应速率计算XO活性,当pH值为

7.80时测得XO活性最接近理论值,为3.02 ± 0.04 U·L⁻¹(图2F),所以XO活性测定的最适pH值为7.80。

综上,XO活性测定的最适条件是:反应体系总体积250 μL,含PBS缓冲液(pH 7.80),底物 xanthine 50 μmol·L⁻¹(终浓度),37 °C反应,连续测定波长293 nm处A值,拟合2~4 min段反应速率计算XO活性,可测活性范围为1~9 U·L⁻¹。

1.3 黄嘌呤脱氢酶XDH活性测定 XDH以NAD⁺作为电子受体催化生成UA的同时生成NADH。其中,UA在波长293 nm处有特征吸收峰;NADH在波长340 nm处有特征吸收峰(图3A)。因此,体系内加入酶、底物、NAD⁺进行反应,可分别在波长293和340 nm

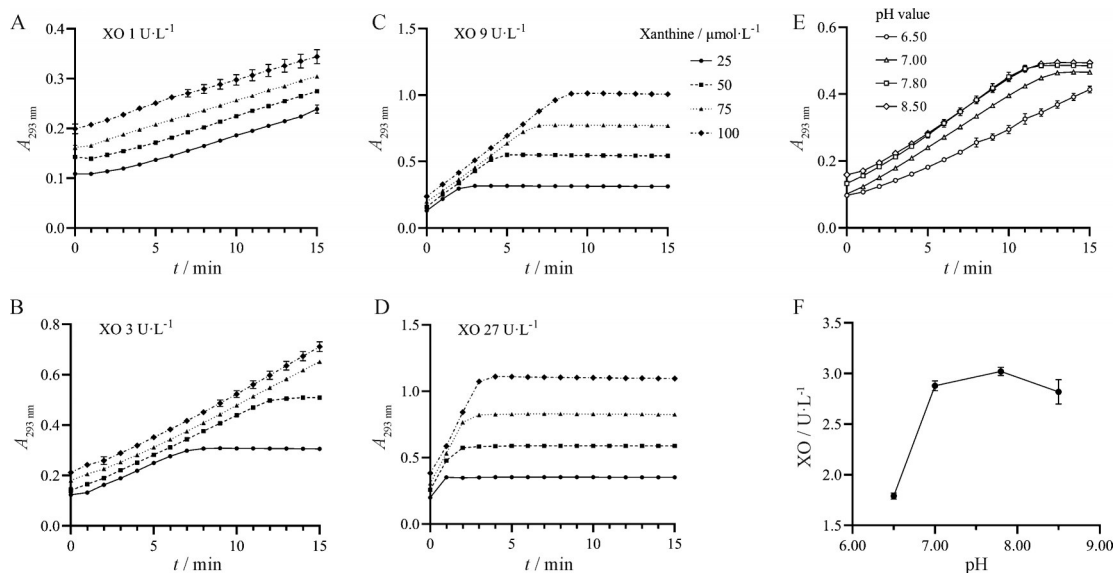


Figure 2 Effect of xanthine and pH value on the bovine milk xanthine oxidase (XO) catalytic reaction and activity determination. The theoretical activity of XO was 1 (A), 3 (B), 9 (C), 27 (D) U·L⁻¹, respectively, catalyze different concentrations of xanthine to formation UA; E: Effect of pH value on the XO catalytic reaction; F: Effect of pH value on the determination of XO activity. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Table 1 Effect of xanthine on the determination of bovine milk XO activity. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Xanthine / μmol·L ⁻¹	[XO measured activity / theoretical activity ratio] / %			
	Theoretical activity 1 U·L ⁻¹	Theoretical activity 3 U·L ⁻¹	Theoretical activity 9 U·L ⁻¹	Theoretical activity 27 U·L ⁻¹
25	106.2 ± 1.5	95.9 ± 1.5	94.4 ± 4.9	58.0 ± 3.7
50	109.3 ± 1.5	101.5 ± 0.2	99.8 ± 0.5	83.2 ± 1.6
75	108.8 ± 0.7	105.3 ± 0.7	101.5 ± 0.6	87.5 ± 0.6
100	118.6 ± 4.4	105.7 ± 0.2	103.6 ± 0.9	88.3 ± 2.4

处测定 XOR 及 XDH 活性。

体系内 NAD^+ 大于 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时会对 293 nm 处 UA 检测造成干扰, NADH 为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对 293 nm 处 UA 检测影响较大; 体系内物质基本不干扰 340 nm 处 NADH 的检测。在 $0\sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内 NADH 标准曲线 (图 3B) 方程为

$$A_{340\text{ nm}} = 0.0047 \cdot C_{\text{NADH}} - 0.0007$$

为确定 XDH 与 XOR 活性测定的最适 NAD^+ 浓度, 选择体系温度 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7.80, XO $3 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, xanthine $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 反应时间 $0\sim 15 \text{ min}$, 分别测定 NAD^+ 为 5、10、50、100、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 XDH 及 XOR 活性。

在测定 XDH 活性时, 当 NAD^+ 为 5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 测定时间范围内 $A_{340\text{ nm}}-t$ 曲线线性不佳, 当 NAD^+ 为 50、100、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $A_{340\text{ nm}}-t$ 曲线线性反应区分别为 $1\sim 10$ 、 $1\sim 12$ 、 $1\sim 15 \text{ min}$ (图 4A), 均拟合 $2\sim 4 \text{ min}$ 段反应速率, 计算得 XDH 活性接近。在测定 XOR 活性时, 当 NAD^+ 为 5、10、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $A_{293\text{ nm}}-t$ 曲线线性反应区均为 $1\sim 10 \text{ min}$ (图 4B), 均拟合 $2\sim 4 \text{ min}$ 段反

应速率, 计算得 XOR 活性接近, 且明显高于 NAD^+ 为 100、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时测得的 XOR 活性 (图 4C), 可能与高浓度 NAD^+ 在 293 nm 的干扰有关 (图 3A)。所以, XDH 及 XOR 活性测定的最适 NAD^+ 浓度为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

为确定 XDH 及 XOR 催化反应的最适 pH 值, 选择体系温度 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, XO $3 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, xanthine $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, NAD^+ $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 反应时间 $0\sim 15 \text{ min}$, 在 pH 为 6.50、7.00、7.80、8.50 时分别测定 XDH 及 XOR 活性。

在测定 XDH 活性时, 当 pH 为 6.50 时, 测定时间范围内 $A_{340\text{ nm}}-t$ 曲线线性不佳, 其余 3 个 pH 时的 $A_{340\text{ nm}}-t$ 曲线线性反应区均为 $1\sim 9 \text{ min}$ (图 4D), 拟合 $2\sim 4 \text{ min}$ 段反应速率, 计算得 pH 7.80 时 XDH 活性最大。在测定 XOR 活性时, 当 pH 为 6.50 时, $A_{293\text{ nm}}-t$ 曲线线性反应区为 $1\sim 15 \text{ min}$, 其余 3 个 pH 时的 $A_{293\text{ nm}}-t$ 曲线线性反应区均为 $1\sim 10 \text{ min}$ (图 4E), 拟合 $2\sim 4 \text{ min}$ 段反应速率, 计算得 pH 为 7.00、7.80、8.50 时 XOR 活性接近, 且明显高于 pH 为 6.50 时的 XOR 活性 (图 4F)。所以, XDH 及 XOR 活性测定的最适 pH 值为 7.80。

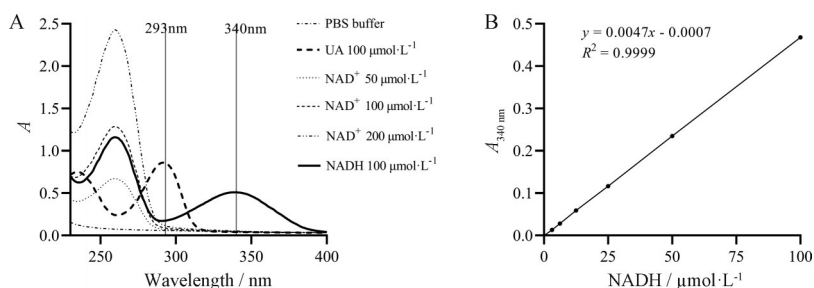


Figure 3 Absorption spectra of substances in the reaction system and nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH) standard curve. A: Absorption peak of NADH at 340 nm; B: NADH standard curve

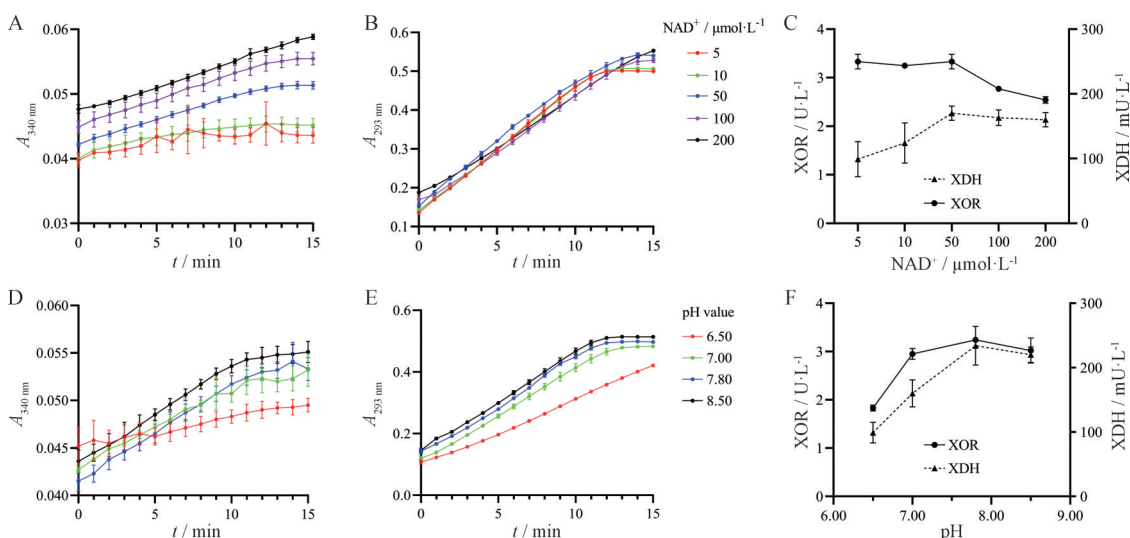


Figure 4 Effect of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) and pH value on bovine milk xanthine dehydrogenase (XDH) and XO catalytic reactions. A: $A_{340\text{ nm}}-t$ curve of NADH catalyzed by XDH with different concentrations of NAD^+ ; B: $A_{293\text{ nm}}-t$ curve of UA catalyzed by XOR with different concentrations of NAD^+ ; C: Activities of XDH and XOR measured with different concentrations of NAD^+ ; D: $A_{340\text{ nm}}-t$ curve of NADH catalyzed by XDH under different pH value; E: $A_{293\text{ nm}}-t$ curve of UA catalyzed by XOR under different pH value; F: Activities of XDH and XOR measured under different pH value. $n = 3, \bar{x} \pm s$

为确定 XDH 及 XOR 活性可测范围, 以体系温度 37 °C, pH 7.80, XO 3 U·L⁻¹, xanthine 50 μmol·L⁻¹, NAD⁺ 50 μmol·L⁻¹ 时测得 XDH 及 XOR 活性为基准, 考察 XDH 及 XOR 理论活性与其催化反应速率的线性关系, 结果如图 5 所示。XOR 活性可测范围为 0.97~17.5 U·L⁻¹, XDH 活性可测范围为 66~1 191 mU·L⁻¹。

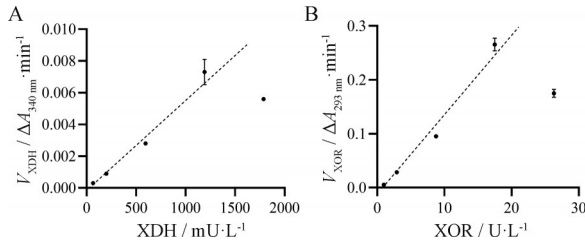


Figure 5 Linear ranges of bovine milk XDH (A) and XOR (B) activity determinations. $n = 3, \bar{x} \pm s$

综上, XDH 及 XOR 活性测定的最适条件是: 反应体系总体积 250 μL, 含 PBS 缓冲液 (pH 7.80), 底物 xanthine 50 μmol·L⁻¹ (终浓度), NAD⁺ 50 μmol·L⁻¹ (终浓度), 37 °C 反应, 连续测定波长 340 nm 处 A 值, 拟合 2~4 min 段反应速率计算 XDH 活性, 可测定活性范围为 66~1 191 mU·L⁻¹; 连续测定波长 293 nm 处 A 值, 拟合 2~4 min 段反应速率计算 XOR 活性, 可测定活性范围为 0.97~17.5 U·L⁻¹。

1.4 别嘌呤醇对牛奶来源 XOR 及其亚型活性抑制 应用已建立的牛奶来源 XOR 及其亚型 XO、XDH 酶活性测定方法, 观察 XOR 抑制剂别嘌呤醇的抑制作用。结果如图 6 所示, 别嘌呤醇对牛奶来源 XOR、XO、XDH 活性均具有明显抑制作用, 其抑制 XOR、XO、XDH 活性 IC₅₀ 值分别为 4.95×10^{-6} (图 6A)、 3.18×10^{-6} (图 6B)、 4.57×10^{-6} mol·L⁻¹ (图 6C)。

2 小鼠肝组织 XOR 及其亚型活性测定方法的建立

2.1 肝组织样品制备 用预冷 PBS 缓冲液 (pH 7.80) 制备 4% 肝匀浆, 离心 (4 °C, 50 000 ×g, 30 min) 去掉大分子物质; 取 4 mL 上清液转入 10 kDa 纯化离心管, 离心 (4 °C, 4 800 ×g, 20 min), 得到 > 10 kDa 截留液 (LS1) 及 < 10 kDa 滤过液 (LS2)。参考牛奶来源 XOR 活性测定条件, 体系温度 37 °C, pH 7.80, xanthine 浓度 50 μmol·L⁻¹, NAD⁺ 浓度 50 μmol·L⁻¹, 上样 10 μL, 反应时间 0~15 min, 分别测定 LS1 及 LS2 中的 XOR 活性。结果显示 (图 7), LS2 不能催化产生 UA; LS1 可得到与牛奶来源 XOR 催化反应类似的反应曲线, 拟合 2~4 min 段反应速率, 计算得 XOR 活性为 1.67 ± 0.09 U·gprot⁻¹。说明小鼠肝组织 XOR 酶存在于 LS1 中。

2.2 肝组织 XO 活性测定 为确定 XO 活性测定最适 xanthine 浓度, 选择体系温度 37 °C, pH 7.80, LS1 上样

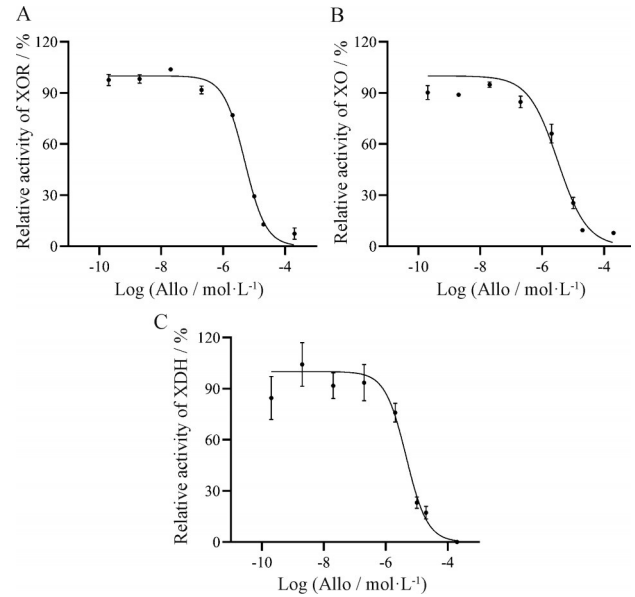


Figure 6 The inhibition of allopurinol (Allo) on the activity of bovine milk XOR (A), XO (B), XDH (C), respectively. $n = 3, \bar{x} \pm s$

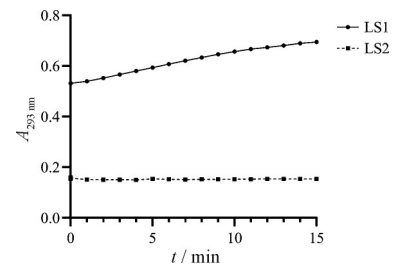


Figure 7 Determination of XOR activity in mouse liver. LS1: > 10 kDa liver sample; LS2: < 10 kDa liver sample

10 μL (含蛋白 0.86 g·L⁻¹), 分别测定 xanthine 为 25、50、75、100 μmol·L⁻¹ 时 XO 活性 (拟合 2~4 min 反应速率后计算所得)。当 xanthine 为 75、100 μmol·L⁻¹ 时测得 XO 活性基本一致, 分别为 0.45 ± 0.05 、 0.44 ± 0.07 U·gprot⁻¹, 明显高于 xanthine 为 25、50 μmol·L⁻¹ 时的测定值, 分别为 0.28 ± 0.19 、 0.30 ± 0.19 U·gprot⁻¹, 且反应更稳定。以上结果说明, xanthine 为 75~100 μmol·L⁻¹ 时均适宜测定, 为保证活性可测范围较大, 选择 xanthine 100 μmol·L⁻¹ (终浓度) 为 XO 活性测定最适浓度。

2.3 肝组织 XDH 活性测定 为确定 XDH 及 XOR 活性测定最适 NAD⁺ 浓度, 选择体系温度 37 °C, pH 7.80, LS1 上样 10 μL, xanthine 100 μmol·L⁻¹, 分别测定 NAD⁺ 为 25、50、75、100 μmol·L⁻¹ 时 XDH 及 XOR 活性 (拟合 2~4 min 反应速率后计算所得), 结果如表 2 所示。NAD⁺ 为 50、75、100 μmol·L⁻¹ 时测得 XDH 及 XOR 活性均显著高于 25 μmol·L⁻¹ 时, 前三者之间测得值无显著性差异。结果说明, NAD⁺ 为 50~100 μmol·L⁻¹ 时均适宜测定, 为保证活性可测范围较大, 选择 NAD⁺ 100 μmol·L⁻¹ 为 XDH 及 XOR 活性测定最适浓度。

Table 2 The effect of NAD⁺ on the determination of XDH and XOR activity in mouse liver. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$. **P* < 0.05 vs corresponding value when NAD⁺ at 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Enzyme activity / U·gprot ⁻¹	NAD ⁺ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
	25	50	75	100
XDH	0.43 ± 0.12	0.84 ± 0.18*	0.89 ± 0.11*	0.92 ± 0.02*
XOR	0.80 ± 0.14	1.19 ± 0.08*	1.15 ± 0.09*	1.15 ± 0.13*

2.4 小鼠肝组织 XOR 及其亚型活性测定 小鼠肝组织 XO 活性测定的最适条件是: 反应体系总体积 250 μL , 含 PBS 缓冲液 (pH 7.80), 应用 LS1, 底物 xanthine 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (终浓度), 37 °C 反应, 连续测定波长 293 nm 处 *A* 值, 拟合 2~4 min 段反应速率计算 XO 活性, 蛋白浓度在 0.43~3.44 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内测得 XO 活性线性关系良好 (图 8), 可测活性范围为 0.19~1.08 U·gprot⁻¹。应用此方法测得正常 ICR 小鼠肝组织 XO 活性为 0.33 ± 0.13 U·gprot⁻¹ (*n* = 7)。

小鼠肝组织 XDH 及 XOR 活性测定的最适条件是: 反应体系总体积 250 μL , 含 PBS 缓冲液 (pH 7.80), 应用 LS1, 底物 xanthine 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (终浓度), NAD⁺ 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (终浓度), 37 °C 反应, 连续测定波长 340 nm 处 *A* 值, 拟合 2~4 min 段反应速率计算 XDH 活性, 可测定活性范围为 0.52~3.55 U·gprot⁻¹ (图 8); 连续测定波长 293 nm 处 *A* 值, 拟合 2~4 min 段反应速率计算 XOR 活性, 可测定活性范围为 0.67~3.98 U·gprot⁻¹ (图 8)。应用此方法测得小鼠肝组织 XDH 及 XOR 平均活性为 0.91 ± 0.33、1.28 ± 0.32 U·gprot⁻¹ (*n* = 7)。

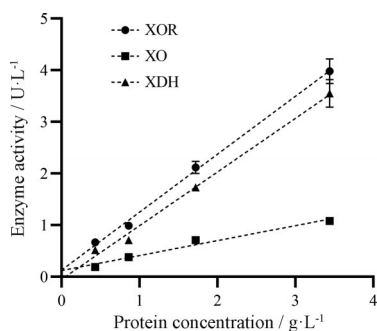


Figure 8 Linear relationship between protein quantity with the measured XOR and its subtypes activity in mouse liver. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$

2.5 别嘌呤醇对小鼠肝组织 XOR 及其亚型活性抑制 应用已建立的小鼠肝组织 XOR 及其亚型 XO、XDH 酶活性测定方法, 观察 XOR 抑制剂别嘌呤醇的抑制作用。结果如图 9 所示, 别嘌呤醇对小鼠肝脏 XOR、XO、XDH 活性均具有明显抑制作用, 其抑制 XOR、XO、XDH 活性 IC₅₀ 值分别为 4.31×10⁻⁷ (图 9A)、3.03×10⁻⁷ (图 9B)、2.18×10⁻⁷ mol·L⁻¹ (图 9C)。

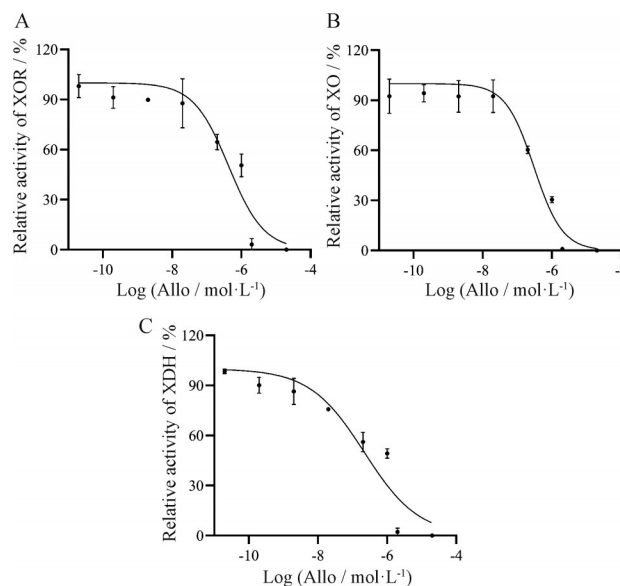


Figure 9 The inhibition of Allo on the activity of mouse liver XOR (A), XO (B), XDH (C), respectively. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$

讨论

酶活性测定方法主要为终点法及动力学法两种。终点法是指通过酶催化反应进行至平台期时生成产物的总量来衡量酶的活性, 这一方法的优势是流程步骤少, 操作及数据处理简单, 但缺点在于该方法耗时长, 易受逆反应的影响, 误差较大, 且通常需要特殊物质来终止反应。动力学法是指连续监测酶催化反应中产物或底物的变化, 以产物的生成速率或底物的消耗速率来衡量酶的活性, 此方法的优势是耗时短, 容易观察到整个反应过程的特征, 不需终止酶反应, 测定灵敏度高、结果准确, 但缺点在于该方法操作及数据处理较复杂, 对操作者熟练程度要求高。本研究应用动力学法分别建立了测定牛奶来源 (纯酶体系) 和小鼠肝组织 XOR 及其亚型 XO、XDH 活性的方法, 并应用上述方法, 分别观察了经典的 XOR 抑制剂别嘌呤醇对牛奶来源和小鼠肝脏来源 XOR 及其亚型 XO、XDH 的抑制活性。

根据 XO、XDH 亚型催化反应原理, 若体系中只有酶及底物, 不含辅酶 NAD⁺, 则只有 XO 亚型可进行催化反应, 通过在 293 nm 处检测 UA 生成, 就可测定 XO 亚型活性。在酶、底物、NAD⁺ 同时存在体系中, XDH 亚型也可参与反应, 通过在 340 nm 处检测 NADH 生成量, 可测定 XDH 亚型活性; 或在 293 nm 处检测 UA 生成量, 可测定 XOR 总活性。这样就实现了对 XDH、XO 两种亚型活性以及 XOR 总活性的检测。

牛奶来源 XOR 为纯化酶, 应用该酶确定 XOR 及其亚型活性测定方法的最适底物 xanthine 浓度、电子受体 NAD⁺ 浓度、pH 值、反应时间及可测范围。测定结

果显示, 牛奶来源 XOR 中 XO 活性占大多数, 约为 90%, XDH 活性占少数, 约为 10%, 这一结果与文献^[15]报道中 XOR 的生理情况一致, XOR 在哺乳动物的乳汁中基本以 XO 形式存在, 其在催化过程中产生的 ROS 可起到免疫、杀菌的作用。

小鼠肝脏 XOR 及其亚型活性测定会受组织中含量及其他物质的干扰, 所以制样流程较为关键。XOR 蛋白分子是一个分子量约为 300 kDa 的同型二聚体, 首先应用超高速离心将大分子物质去除, 随后利用 10 kDa 超滤离心管去除内源性底物、杂蛋白等影响酶活性的小分子物质, 同时可对样品进行浓缩, 在 LS1 中成功检测到较高的 XOR 活性。该方法在保证测定结果准确的前提下, 充分简化了组织 XOR 活性测定中复杂的制样流程^[11]。最后, 本研究确定了小鼠肝脏 XOR 及其亚型活性测定方法的最适底物 xanthine 浓度、电子受体 NAD⁺ 浓度以及各种酶的可测定范围。应用所建方法测得正常 ICR 小鼠肝脏 XOR 活性与文献^[12]报道接近, XO 与 XDH 活性比例约为 1:3, XDH 占较大比例, 这一情况与文献^[6]报道一致。

应用本方法测得的别嘌呤醇抑制牛奶来源 XOR 的 IC₅₀ 值为 4.95×10⁻⁶ mol·L⁻¹, 抑制小鼠肝脏来源 XOR 的 IC₅₀ 值为 4.31×10⁻⁷ mol·L⁻¹, 两者相差一个数量级, 与文献^[6]报道一致。这可能是不同种属 XOR 的蛋白结构差异导致的^[17], 也可能是牛奶来源 XOR 与小鼠肝脏 XOR 测定体系中酶活性存在差异导致的。此外, 别嘌呤醇对 XO、XDH 两亚型的抑制活性无选择性, 所得结论与文献^[18]报道一致。

综上所述, 本研究分别建立了牛奶来源 (纯酶) 及小鼠肝组织 XOR 及其亚型 XDH、XO 活性的测定方法, 该方法方便快捷、灵敏度高、数据准确可靠, 对探究 XOR 在机体中不同的病理生理作用、探索高尿酸血症与其他疾病间关联的机制以及研发新型 XOR 抑制剂, 奠定了实验基础。以本研究为基础, 后续将进一步探讨这一测定方法在血清 XOR 及其亚型活性检测中的应用, 以拓展该方法的应用范围, 丰富其应用前景。

作者贡献: 陈冬婷设计并完成实验、分析数据、撰写论文; 田金英、李雪晨、李江提供学术指导; 叶菲设计实验并审核论文。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] FitzGerald JD, Dalbeth N, Mikuls T, et al. 2020 American college of rheumatology guideline for the management of gout [J]. *Arthritis Care Res*, 2020, 72: 744-760.
- [2] Battelli MG, Bolognesi A, Polito L. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: new emerging roles for a multi-tasking enzyme [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842: 1502-1517.
- [3] Nishino T, Okamoto K. Mechanistic insights into xanthine oxidoreductase from development studies of candidate drugs to treat hyperuricemia and gout [J]. *J Biol Inorg Chem*, 2015, 20: 195-207.
- [4] Asai R, Nishino T, Matsumura T, et al. Two mutations convert mammalian xanthine oxidoreductase to highly superoxide-productive xanthine oxidase [J]. *J Biochem*, 2007, 141: 525-534.
- [5] Engerson TD, McKelvey TG, Rhyne DB, et al. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues [J]. *J Clin Invest*, 1987, 79: 1564-1570.
- [6] Kusano T, Ehrchiou D, Matsumura T, et al. Targeted knock-in mice expressing the oxidase-fixed form of xanthine oxidoreductase favor tumor growth [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 4904.
- [7] Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications [J]. *J Physiol*, 2004, 555: 589-606.
- [8] Battelli MG, Bortolotti M, Bolognesi A, et al. Pro-aging effects of xanthine oxidoreductase products [J]. *Antioxidants*, 2020, 9: 839.
- [9] Dehlin M, Jacobsson L, Roddy E. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16: 380-390.
- [10] Battelli MG, Bortolotti M, Polito L, et al. The role of xanthine oxidoreductase and uric acid in metabolic syndrome [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864: 2557-2565.
- [11] Murase T, Nampei M, Oka M, et al. Xanthine oxidoreductase activity assay in tissues using stable isotope-labeled substrate and liquid chromatography high-resolution mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 2016, 1008: 189-197.
- [12] Ishii T, Kumagai T, Wakui H, et al. Tissue xanthine oxidoreductase activity in a mouse model of aristolochic acid nephropathy [J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11: 507-518.
- [13] Okamoto K, Eger BT, Nishino T, et al. An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 1848-1855.
- [14] Yan ZX, Yin F, Li XC, et al. Establishment of xanthine oxidase inhibitor screening system [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2019, 35: 1471-1477.
- [15] Bortolotti M, Polito L, Battelli MG, et al. Xanthine oxidoreductase: one enzyme for multiple physiological tasks [J]. *Redox Biol*, 2021, 41: 101882.
- [16] Osada Y, Tsuchimoto M, Fukushima H, et al. Hypouricemic effect of the novel xanthine oxidase inhibitor, TEI-6720, in rodents [J]. *Eur J Pharmacol*, 1993, 241: 183-188.
- [17] Terao M, Romão MJ, Leimkübler S, et al. Structure and function of mammalian aldehyde oxidases [J]. *Arch Toxikol*, 2016, 90: 753-780.
- [18] Vickneson K, George J. Xanthine oxidoreductase inhibitors [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2021, 264: 205-228.