

谷胱甘肽和 Ebselen 对胰岛素硝化的抑制及其相互作用机理的研究

汪铁林 池 泉 黄开勋*
(华中科技大学化学系, 武汉 430074)

摘要: 生物体内 NO 和超氧阴离子快速反应生成的过氧亚硝酸根离子(ONOO⁻, peroxynitrite)是一种强细胞毒性物质, 它诱导蛋白质酪氨酸残基硝化是其损伤生物系统的重要途径之一。为了探讨谷胱甘肽和 ebselen 对胰岛素硝化的抑制及其相互作用机理, 采用 UV-Vis、HPLC 和 ESI-MS 等方法, 研究了 ONOO⁻对胰岛素的硝化作用、小分子抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)和 ebselen 对 ONOO⁻硝化胰岛素的影响以及它们之间的相互作用。结果表明单独的 GSH 和 ebselen 对 ONOO⁻引发的胰岛素硝化均有明显的抑制, 而作为谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)的底物 GSH 与 GPx 的模型化合物 ebselen 之间存在相互拮抗作用, 经过对其产物分析, 确定其机理是 GSH 和 ebselen 能够直接反应生成一种加合物, 从而抑制了 GSH 和 ebselen 各自的抗硝化能力。

关键词: 过氧亚硝酸根; ebselen; 谷胱甘肽; 胰岛素; 硝化

中图分类号: O611.3; O613.61

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2005)04-0500-05

Studies on Inhibition of Glutathione and Ebselen on Nitration of Insulin and Their Reaction Mechanism

WANG Tie-Lin CHI Quan HUANG Kai-Xun*

(Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

Abstract: Peroxynitrite (ONOO⁻) is a potent cytotoxic agent produced by rapid combination of NO and O₂⁻. The nitration of tyrosine residues is one of major pathways that peroxynitrite damages biological system. To investigate the inhibition of glutathione (GSH) and ebselen on the nitration of insulin and their reaction mechanism, the nitration of insulin by peroxynitrite, inhibition of GSH and ebselen to the nitration and their reaction were studied by UV-Vis, HPLC and ESI-MS. Present results showed that GSH or ebselen could inhibit the nitration of insulin by peroxynitrite significantly, but there was an antagonism between GSH, a substrate of glutathione peroxidase (GPx), and ebselen, a mimic of GPx. The antagonism mechanism is proposed from the characterization of reaction product, an adduct formed from ebselen and GSH, thus causing a decrease in the inhibition ability of GSH and ebselen to nitration of insulin.

Key words: peroxynitrite; ebselen; glutathione; insulin nitration

一氧化氮(·NO)是生物体内一个具有重要功能的小分子,由一氧化氮合酶(NOS)催化 L-精氨酸胍基氮产生。但在某些病理条件下,诱导型一氧化氮合酶(iNOS)大量表达,导致·NO大量生成而造成对机体的损伤^[1]。·NO在生物体内与超氧阴离子(O₂⁻)以接近弥散速率(6.7×10⁹ L·mol⁻¹·s⁻¹)迅速结合,生成过

氧亚硝酸根离子(ONOO⁻)^[2]。已有的研究表明 ONOO⁻是一种强氧化剂和硝化剂,是过量·NO产生病理损伤的主要环节。ONOO⁻可以引发脂质过氧化^[3]、DNA裂解^[4]、蛋白质损伤^[5]、小分子抗氧化剂损耗^[6],从而以多种方式对机体产生细胞毒性作用。其中,ONOO⁻硝化蛋白质酪氨酸残基生成 3-硝基酪氨酸(3-NT)是

收稿日期:2004-11-23。收修改稿日期:2004-12-21。

国家自然科学基金资助项目(No.20371018)。

*通讯联系人。E-mail: hxxzrf@mail.hust.edu.cn

第一作者: 汪铁林, 男, 32岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物无机化学。

其损伤蛋白质的主要途径之一。 ONOO^- 与生物大分子的反应为自由基机理^[7],即 ONOO^- 质子化生成共轭酸 ONOOH ,再分解为 $\cdot\text{NO}_2$ 和 $\cdot\text{OH}$,酪氨酸残基在其作用下生成3-硝基酪氨酸。

胰岛素(insulin)是体内一种重要的多功能蛋白质激素^[8],除了人们所熟知的代谢调节作用外,还可能是一种生长调节因子。胰岛素含有4个酪氨酸残基,其中有3个位于胰岛素与其受体结合部位。酪氨酸残基被硝化可能会影响胰岛素与其受体结合,进而影响其生物活性,然而有关胰岛素与 ONOO^- 能否发生硝化反应未见报道。Ebselen(2-苯基-1,2-苯并异硒唑-3(2H)酮)是一种人工合成的具有谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性的含硒有机化合物^[9]。它有多种治疗作用,尤其在抗炎和抗氧化方面。有关 ebselen 和 GSH 与 ONOO^- 作用的研究虽然已有一些报道^[10,11],但它们对 ONOO^- 硝化胰岛素的作用亦未见报道,它们之间相互作用的机理也有待进一步的研究。本文在体外研究 ONOO^- 硝化胰岛素的基础上,研究了 ebselen 和 GSH 对 ONOO^- 硝化胰岛素的作用,并对其反应机理作了进一步的探讨。

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

主要试剂:(猪)胰岛素购自江苏万邦生化医药股份有限公司,还原型谷胱甘肽为 Sigma 产品,乙腈购自 Fisher 公司,其它试剂均为国产分析纯试剂,实验用水由二次水经 Milli-Q 超纯水纯化系统纯化。Ebselen、 ONOO^- 为本实验室合成。Ebselen 用乙腈配成 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液备用。 ONOO^- 的合成采用淬灭流动反应法^[12],纯化后的产物置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冷冻保存。每次实验前,根据 ONOO^- 在波长 302 nm 处的吸光度值确定其浓度($\varepsilon_{302\text{ nm}}=1670\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。

主要仪器:Lambda Bio-40 型紫外-可见分光光度计(PE 公司),1100 型高效液相色谱仪(Agilent 公司),LCQ Advantage 质谱仪(Finnigan 公司)。

1.2 胰岛素硝化实验

将一定量的猪胰岛素溶于 $\text{pH}=7.4$ 的 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液中,加入一定量事先配制好的 ebselen 或(和)GSH 溶液,再加入一定量的 ONOO^- 溶液,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下温育 5 min 。反应前后 pH 值变化不超过 0.1 个 pH 单位。反应后用 $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调节 pH 值至 $10\sim 11$ 。以未加 ONOO^- 的空白试液为参比,测 428 nm 处吸光度,根据吸光度值计算

硝化产物 3-硝基酪氨酸的量 ($\varepsilon_{428\text{ nm}}=4400\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)^[13]。

1.3 HPLC 分离 ebselen 与 GSH 和 ONOO^- 反应混合物

$500\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ebselen 溶液与 $500\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH 或 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ONOO^- 反应后通过 250×4.6 (mm)的 Jupiter C18 反相柱分离。流动相为 0.1% 三氟乙酸溶液(A)和乙腈(B),进行梯度洗脱,初始状态为 25% B,保持 8 min , 20 min 时流动相 B 增至 55% ,流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $40\text{ }^\circ\text{C}$,检测波长为 270 nm ,进样量为 $25\text{ }\mu\text{L}$ 。

1.4 反应产物的电喷雾质谱测定

$500\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ebselen 溶液与 $500\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH 的反应产物经脱盐后进入 LCQ Advantage 质谱仪测定。采用电喷雾离子源,正离子检测方式,喷雾电压 4.5 kV ,金属毛细管温度为 $200\text{ }^\circ\text{C}$,以高纯氮气为包层气。

2 结果与讨论

2.1 ONOO^- 引发胰岛素酪氨酸残基的硝化

ONOO^- 在碱性 pH 值下能够稳定存在几个星期,当 $\text{pH}>10$ 时在 302 nm 处有其特征的吸收峰,但它在酸性环境中很不稳定,如在中性磷酸盐缓冲液中温育 5 min 后其特征吸收峰就已消失(图 1)。从图 2 可以看出,在生理 pH 值下 ONOO^- 会引发胰岛素酪氨酸残基的硝化反应,而且呈量效关系。随着 ONOO^- 加入量的增加, 428 nm 处的吸收增强,说明硝化产物 3-硝基酪氨酸生成量逐渐升高。与图 1 比较,即使 ONOO^- 在该条件下有一定量的存在,对 3-硝基酪氨酸的特征吸收也没有任何干扰。这是我们

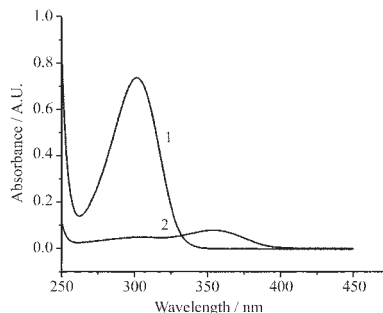


图 1 ONOO^- 紫外-可见光谱

Fig.1 UV-Vis spectra of ONOO^-

- (1) $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ONOO^- in $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH;
(2) $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ONOO^- incubated for 5 min in $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ potassium phosphate buffer, $\text{pH}=7.4$ at $37\text{ }^\circ\text{C}$.

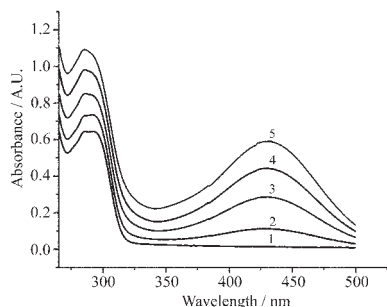


图 2 胰岛素硝化后紫外-可见光谱变化

Fig.2 Comparative UV-Vis spectra of insulin and the products of its interaction with ONOO^- . $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ insulin incubated in $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ potassium phosphate buffer, $\text{pH}=7.4$, at 37°C for 5 min with (1) $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ONOO^- ; (2) $0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ONOO^- ; (3) $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ONOO^- ; (4) $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ONOO^- ; (5) $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ONOO^- .

首次报道 ONOO^- 在体外对胰岛素的硝化作用。

2.2 不同浓度的 ebselen 和 GSH 对 ONOO^- 硝化胰岛素的影响

单独的 ebselen 和 GSH 对 ONOO^- 硝化胰岛素的影响如图 3 所示。从图 3 可以明显看出, 随着 ebselen 或 GSH 浓度的增大, 3-硝基酪氨酸生成量逐渐下降。在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ebselen 或 GSH 存在的条件下, 3-硝基酪氨酸生成量分别下降 25.1% 和 44.2%。说明不论是 ebselen 还是 GSH 对 ONOO^- 引发胰岛素硝化均有较高的抑制作用。文献报道^[14] ebselen 是迄今为止所发现的与 ONOO^- 反应最快的小分子化合物, 仅有一些酶和蛋白质与 ONOO^- 的反应速度快

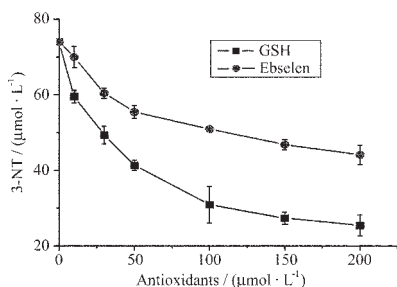


图 3 单独的 ebselen 和 GSH 对胰岛素硝化的影响

Fig.3 Effects of ebselen or GSH on the nitration of insulin

The final concentration of insulin was $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The buffers were $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ potassium phosphate at $\text{pH}=7.4$ and 37°C with $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ONOO^- . Results are expressed as mean $\pm$ STD from at least four determinations.

于小分子。Ebselen 与 ONOO^- 的二级反应速率常数比 GSH 与 ONOO^- 的二级反应速率常数约高 4 个数量级^[15]。但在这个实验中, ebselen 抑制 ONOO^- 引发胰岛素硝化的作用却没有 GSH 强, 这可能与它们反应类型不同有关。 ONOO^- 对蛋白质酪氨酸残基的硝化是通过自由基机理进行, GSH 中巯基可与 ONOO^- 直接反应, 但反应速率常数不大, 直接清除 ONOO^- 的效率可能不是很高, 可是它能将 $\cdot\text{NO}_2$ 和酪氨酸自由基还原成 NO_2^- 和酪氨酸, 所以对 3-硝基酪氨酸生成有更加显著的作用。Ebselen 是与 ONOO^- 直接反应, 属非自由基清除剂, 由于 ONOO^- 分解为自由基以及对酪氨酸残基的硝化较快, 因而 ebselen 抑制 ONOO^- 引发胰岛素硝化的作用没有 GSH 强。

图 4 显示的是在固定 ebselen 的浓度不变, 逐步增加 GSH 浓度时 ebselen 和 GSH 对胰岛素硝化的复合作用。有趣的是, ebselen 是 GPx 的模拟物, 作为 GPx 辅助因子的 GSH 在一定浓度下对 ebselen 抗 ONOO^- 引发胰岛素的硝化作用却有抑制作用, 在二者物质的量之比接近 1:1 时这种抑制作用最为显著。这与 ebselen 对 Cu^{2+} 诱导 LDL 氧化修饰的抑制作用要依赖于 GSH 存在的情况正好相反^[16]。

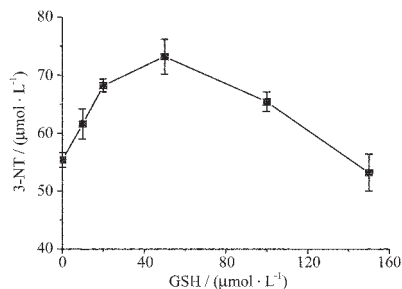


图 4 Ebselen 和 GSH 对胰岛素硝化的复合影响

Fig.4 Effects of GSH on the nitration of insulin in the presence of $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ebselen

The final concentration of insulin was $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The buffers were $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ potassium phosphate at $\text{pH}=7.4$ and 37°C with $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ONOO^- . Results are expressed as mean $\pm$ STD from at least four determinations.

2.3 Ebselen 与 ONOO^- 和 GSH 的反应

为了探讨图 4 所示的 ebselen 和 GSH 对胰岛素硝化的复合影响时所表现出来的抑制作用的机理, 我们对 ebselen、GSH 和 ONOO^- 之间的相互作用进行了研究。从图 5 可以看出, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ebselen 溶液与 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ONOO^- 温育 5 min 后, 其紫外特征吸收曲线发生了显著变化。 ONOO^- 的浓度增至 100

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, ebselen 在波长为 325 nm 处的吸收峰基本消失。由此可知 ebselen 与 ONOO^- 已经发生了反应。Ebselen 与 ONOO^- 的反应产物为 ebselen 中 Se 上结合了一个氧原子, 生成 ebselen Se-oxide^[14]。这也是 ebselen 抑制 ONOO^- 硝化胰岛素的原因。从图 6 可以看出, 在 ebselen 溶液中加入 GSH 后, 紫外吸收曲线也发生了显著变化, 显然这是 ebselen 与 GSH 发生了反应。而当 ebselen 和 GSH 反应完毕再加入 ONOO^- , 紫外吸收曲线有重新向 ebselen 变化的趋势, 但程度不大。可能是 ONOO^- 将 ebselen 和 GSH 反应产物一小部分氧化, GSH 再将其还原成 ebselen 所致。

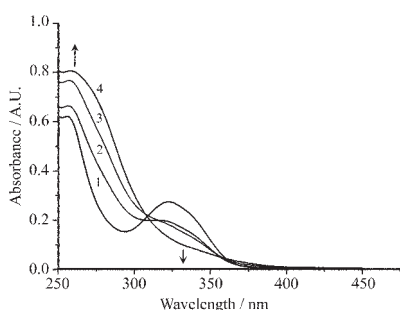


图5 Ebselen 与 ONOO^- 反应后紫外吸收变化

Fig.5 Comparative UV-Vis spectra of ebselen and the products of its interaction with ONOO^-
 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ebselen incubated in $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ potassium phosphate, $\text{pH}=7.4$ at $37\ ^\circ\text{C}$ for 5 min with (1) $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ONOO^- , (2) $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ONOO^- , (3) $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ONOO^- , (4) $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ONOO^- .

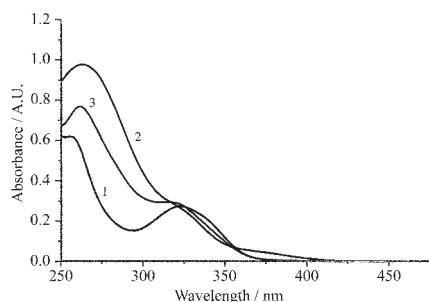


图6 Ebselen 与 GSH 和 ONOO^- 反应后紫外吸收变化

Fig.6 Comparative UV-Vis spectra of ebselen and the products of its interaction with GSH and ONOO^-
 (1) $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ebselen, (2) $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ebselen incubated for 10 min with $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH, (3) $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ebselen incubated for 10 min with $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH and $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ONOO^- . The buffers were $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ potassium phosphate, $\text{pH}=7.4$ at $37\ ^\circ\text{C}$.

图 7 是 ebselen 与 GSH 和 ONOO^- 反应混合物高效液相色谱图。在中性磷酸盐缓冲体系中, $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ebselen 和 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ONOO^- 反应 5 min, 约 75% 的 ebselen 转化为氧化产物。 $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ebselen 和 GSH 等物质的量反应 10 min, 约 80% 的 ebselen 与 GSH 反应生成加合物。在该反应体系中再加入 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ONOO^- 反应 5 min, 氧化产物的量比没有 GSH 存在时要少得多, ebselen 与 GSH 加合物比不加入 ONOO^- 时稍有下降, 而 ebselen 残存量比不加入 ONOO^- 时却有所增加。Ebselen 氧化产物显著降低有两个方面的原因, 一方面 ebselen 和 GSH 反应产物与 ONOO^- 的反应速度比 ebselen 与 ONOO^- 的反应速度要慢的多, 另一方面 GSH 与 ONOO^- 直接反应会消耗一部分 ONOO^- , 使得与 ebselen 反应的 ONOO^- 实际浓度降低。

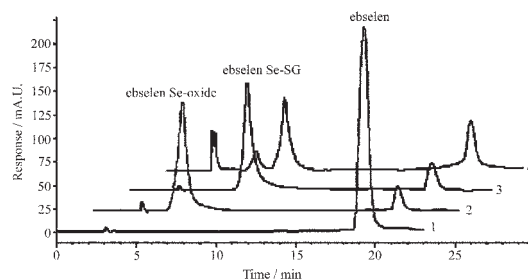


图7 Ebselen 反应混合物高效液相色谱图

Fig.7 Chromatograms (HPLC) of ebselen and the reactions mixtures

(1) $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ebselen; (2) $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ebselen incubated for 5 min with $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ONOO^- ; (3) $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ebselen incubated for 10 min with $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH; (4) $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ebselen incubated for 10 min with $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH and $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ONOO^- for another 5 min. All buffers were $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ potassium phosphate, $\text{pH}=7.4$ at $37\ ^\circ\text{C}$. Retention times: ebselen, $t_R=19.1\ \text{min}$; ebselen Se-oxide, $t_R=5.7\ \text{min}$; and ebselen-GSH adduct, $t_R=7.3\ \text{min}$.

图 8 为 ebselen 与 GSH 反应产物的质谱图。该产物分子离子(MH^+) m/z 为 582.9, 这与 ebselen 和 GSH 直接反应形成加合物(ebselen-Se-SG)的分子量一致, ebselen 分子中的 Se-N 键断裂开环, ebselen-Se 再与 GSH 结合形成 ebselen-Se-SG。对这一产物进行二级质谱分析, 由其产生的两碎片离子分别为 $m/z=275.9$ 和 $m/z=307.8$, 这分别是 ebselen- H^+ 和 GSH $^+$ 的离子峰。这进一步说明 ebselen 与 GSH 反应形成了

eb-selen-Se-SG。从而为 eb-selen 与 GSH 反应形成了 eb-selen-Se-SG 加合物提供了直接的实验证据。

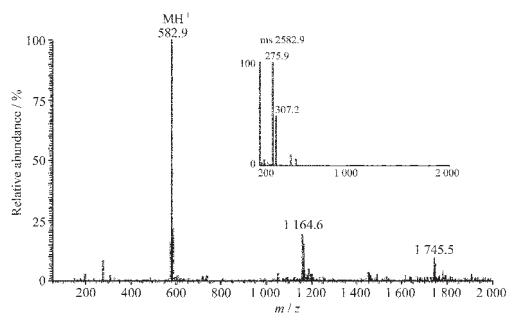
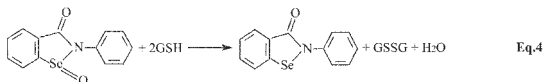
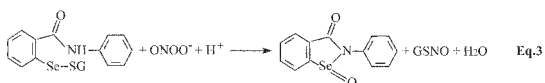
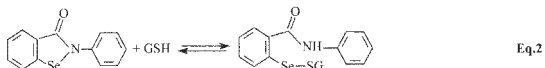
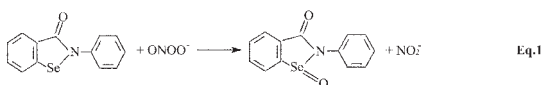


图 8 Eb-selen 与 GSH 反应产物正离子电喷雾质谱图

Fig.8 Positive ion ESI-MS of products obtained by reaction of eb-selen with GSH

尽管 eb-selen 与 GSH 和 ONOO⁻间作用机理较为复杂,但根据文献报道和目前的实验结果,可以推测如 **Eq.1~Eq.4** 所示的反应机理。无 GSH 存在时,eb-selen 中 Se 会被 ONOO⁻快速氧化,转变成其氧化产物 eb-selen-Se-oxide。在 GSH 存在的条件下,eb-selen 会与 GSH 巯基结合生成加合物 eb-selen-Se-SG,加合物尽管会被 ONOO⁻氧化生成 eb-selen-Se-oxide,但反应速度相对较慢,同时 eb-selen-Se-oxide 还可能被 GSH 再次还原成 eb-selen。因为 eb-selen 与 eb-selen-Se-SG 之间存在一个慢平衡,所以等物质的量的 eb-selen 和 GSH 反应后再加入 ONOO⁻时,并不排除由少量的 eb-selen 直接同 ONOO⁻作用生成 eb-selen-Se-oxide 的可能。即使这一反应途径存在,速度也很慢,否则 HPLC 图中 eb-selen-Se-SG 就会发生显著变化。



ONOO⁻在生物体内选择性与蛋白质分子中的酪氨酸残基发生不可逆反应生成硝基酪氨酸,可影响蛋白质结构与功能。有效清除 ONOO⁻是防止 ONOO⁻介导损伤的最佳方法。Eb-selen 可与 ONOO⁻迅速反

应,从而可抑制 ONOO⁻引起的溶血^[7],但在 GSH 存在的条件下 eb-selen 与 GSH 结合生成 eb-selen-Se-SG 抑制了 eb-selen 的抗 ONOO⁻活性。体内 GSH 浓度高达 mmol·L⁻¹ 级的水平,另外其他一些蛋白质巯基具有更高的亲核性,也可能与 eb-selen 结合生成加合物,因此,在正常情况下生物体内生成一定量的 ONOO⁻不会对机体造成损伤。尽管 eb-selen 有多种治疗作用,也可与 ONOO⁻迅速反应,但在非正常情况下,在生物体内采用 eb-selen 抵抗 ONOO⁻引起的蛋白质损伤是否可行,还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Okamoto T, Masuda Y, Kawasaki T, et al. *Eur. J. Pharmacol.*, **2000**,**396**(2~3):125~130
- [2] Huie R E, Padmaja S. *Free Radic. Res. Commun.*, **1993**,**18**(4):195~199
- [3] Radi R, Beckman JS, Bush KM, et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1991**,**288**(2):481~487
- [4] HU Yan(胡 燕), HUANG Kai-Xun(黄开勋). *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2004**,**20**(3):241~246
- [5] Ischiropoulos H, Al-Mehdi A B. *FEBS Lett.*, **1995**,**364**:279~282
- [6] Vatassery G T. *Biochem. Pharmacol.*, **1996**,**52**(4):579~586
- [7] Radi R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**,**101**:4003~4008
- [8] Hei Y J. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **1998**,**40**(3):123~135
- [9] Sies H. *Free Radic. Biol. Med.*, **1993**,**14**(3):313~323
- [10] Balazy M, Kaminski P M, Mao K Y, et al. *J. Biol. Chem.*, **1998**,**273**(48):32009~32015
- [11] Diaber A, Zou M H, Bachschmid M, et al. *Biochem. Pharmacol.*, **2000**,**59**(2):153~160
- [12] Beckman J S, Beckman T W, Chen J, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**,**87**:1620~1624
- [13] Beckman J S, Ischiropoulos H, Zhu L, et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1992**,**298**(2):438~445
- [14] Masumoto H, Kissner R, Koppenol W H, et al. *FEBS Lett.*, **1996**,**398**:179~182
- [15] Arteel G E, Briviba K, Sies H. *FEBS Lett.*, **1999**,**445**:226~230
- [16] LIU Shang-Xi(刘尚喜), CHEN Yuan(陈 媛), ZHOU Mei(周 玫). *Shengwu Wuli Xuebao(Acta Biophysica. Sinica)*, **1995**,**11**(4):623~628
- [17] Kondo H, Takahashi M, Niki E. *FEBS Lett.*, **1997**,**413**:236~238