

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.04.037

# 琥珀酸半醛还原酶 AKR7A5 的稳态动力学机理分析

燕宝华, 杨文娴, 朱晓峰

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

**摘要:** 琥珀酸半醛还原酶的抑制剂可作为缓解琥珀酸半醛脱氢酶缺陷症状的潜在药物。酶抑制剂的研发要以酶的动力学性质为基础,但琥珀酸半醛还原酶的稳态动力学性质还不清楚。本文通过对琥珀酸半醛还原酶 AKR7A5 稳态动力学性质的分析,判断 AKR7A5 是按照有序的三元复合物反应机理催化反应;在此基础上,推导出琥珀酸半醛发生底物抑制是由于错误地与 AKR7A5:NADP<sup>+</sup> 二元复合物结合;底物的结构类似物琥珀酸体现出反竞争抑制剂的特点,只能与 AKR7A5:NADP<sup>+</sup> 二元复合物相互作用,暗示只有通过抑制剂、酶、NADP<sup>+</sup> 复合物的方向入手,才能获得反竞争抑制剂与 AKR7A5 的复合物晶体结构。

**关键词:** 琥珀酸半醛还原酶;琥珀酸半醛脱氢酶缺陷病;酶稳态动力学机理;抑制剂

**中图分类号:** Q55      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2017)04-0888-07

## The steady state kinetic mechanism of succinic semialdehyde reductase AKR7A5

YAN Bao-Hua, YANG Wen-Xian, ZHU Xiao-Feng

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064)

**Abstract:** The inhibitor of succinic semialdehyde reductase AKR7A5 would be the potential drug for succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. The steady state kinetic mechanism of AKR7A5 remains unclear but are critical in the development of drug candidates. Here the study of steady state kinetic mechanism of AKR7A5 was studied, which indicated the enzyme reacts in the ordered ternary complex mechanism. Based on the mechanism, it is concluded that the substrate inhibition of succinic semialdehyde is caused by the wrong binding to the binary complex AKR7A5 and NADP<sup>+</sup>. The substrate analogue succinate is uncompetitive inhibitor by binding to the binary complex of AKR7A5 and NADP<sup>+</sup>. This information suggests that the ternary complex structure of AKR7A5 and succinate or other uncompetitive inhibitors can only be obtained as the complex of AKR7A5, NADP<sup>+</sup>, and the uncompetitive inhibitors.

**Keywords:** Succinic semialdehyde reductase; Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency; Enzyme kinetic mechanism; Inhibitor

## 1 引言

生物自身产生的醛酮类代谢产物或带有羰基的外源物质进入生物体后,首先被还原酶还原为相

应的醇类,再进入其他途径进行代谢。这步还原反应由短链脱氢还原酶(short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs))或醛酮还原酶(aldo-keto reductases (AKRs))催化<sup>[1,2]</sup>,目前对醛酮还原酶的

收稿日期: 2016-04-26

基金项目: 国家自然科学基金(21534008)

作者简介: 燕宝华(1991-),女,河南开封人,硕士,研究方向为生化与分子生物学. E-mail: 953078426@qq.com

通讯作者: 朱晓峰. E-mail: zhuxiaofeng@scu.edu.cn

研究更为广泛和深入。

醛酮还原酶已发现超过 190 个成员,根据氨基酸序列的差异分为 16 个酶家族<sup>[3,4]</sup>。醛酮还原酶通常以单体形式存在,依靠 NAD(P)(H)的氧化还原电势进行反应<sup>[3]</sup>。醛酮还原酶所有成员具有相同的蛋白骨架,即含有丙糖磷酸异构酶(triose-phosphate isomerase TIM)的( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>桶状结构,在桶状结构的一端存在三个主要的环状结构,正是这三个环状结构决定了醛酮还原酶的底物特异性和不同酶家族成员催化底物的多样性<sup>[3]</sup>。醛酮还原酶可催化的底物包括糖、脂醛类<sup>[5,6]</sup>,类固醇、前列腺素酮类<sup>[7,8]</sup>,以及外源的化学致癌物如亚硝胺类<sup>[9]</sup>,多环芳烃<sup>[10]</sup>和黄曲霉毒素<sup>[11]</sup>等。

醛酮还原酶的第 7 个家族(AKR7)仅存在于哺乳动物,是醛酮还原酶中唯一以二聚体形式存在的酶<sup>[12]</sup>,以人的 AKR7A2 和 AKR7A3 为代表,AKR7A3 最基本的功能是还原黄曲霉毒素,减低对肝脏的毒性<sup>[13]</sup>。AKR7A2 则在中枢神经系统中行使琥珀酸半醛(succinic semialdehyde, SSA)还原酶的功能,主导生成  $\gamma$ -羟基丁酸( $\gamma$ -Hydroxybutyric acid, GHB)<sup>[14]</sup>,既可作用在相应的受体又可作为抑制性神经递质  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的激动剂<sup>[15]</sup>,增强  $\gamma$ -氨基丁酸的神经抑制功能。

在遗传代谢性疾病琥珀酸半醛脱氢酶缺陷的患者中,神经系统中的琥珀酸半醛无法被分解代谢,被 AKR7A2 还原为  $\gamma$ -羟基丁酸,引起持久的  $\gamma$ -氨基丁酸抑制效应,造成发育迟缓,智力低下,癫痫等症状<sup>[16,17]</sup>。同时具有琥珀酸半醛脱氢酶缺陷和琥珀酸半醛还原酶 AKR7A2 失活的个体,却不表现出明显的琥珀酸半醛脱氢酶缺陷的症状<sup>[3]</sup>。因此寻找琥珀酸半醛还原酶 AKR7A2 的特异抑制剂,可作为缓解琥珀酸半醛脱氢酶缺陷代谢遗传病的潜在药物<sup>[18]</sup>。

目前琥珀酸半醛还原酶 AKR7A2(人源)和 AKR7A5<sup>[19]</sup>(鼠源)的晶体结构已得到解析,二者的氨基酸序列和晶体结构高度相似,但针对琥珀酸半醛还原酶高效专一抑制剂的研究还未见报道。虽然晶体结构的解析对酶抑制剂的研发有着重要推动作用,但是单纯的晶体结构无法提供酶稳态动力学机理的足够信息,而这些信息是设计抑制剂筛选策略必不可少的基础<sup>[20,21]</sup>。因此,本文对潜在药物靶点琥珀酸半醛还原酶 AKR7A5 的稳态动力学机理进行研究,发现 AKR7A5 通过有序的三元复合物反应机理催化反应,该结果不仅可以解释

AKR7A5 的底物抑制现象,还可通过分析抑制剂的抑制类型,判断抑制剂同酶的哪种状态结合,指导酶和抑制剂复合物晶体的制备,有助于根据结构解析对抑制剂进行优化改造。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

醛酮还原酶 AKR7A5 的表达质粒和菌株由本实验室保存;镍离子亲和层析柱购自 GE 公司;化学试剂 NADPH,琥珀酸半醛(SSA), $\gamma$ -羟基丁酸(GHB)购自 Sigma-Aldrich 公司;其他化学试剂购自 Sigma-Aldrich 公司的 Vetec 分部。

### 2.2 方法

2.2.1 醛酮还原酶 AKR7A5 的表达与纯化 根据已发表的方法<sup>[19]</sup>,表达和纯化琥珀酸半醛还原酶 AKR7A5,简述如下:AKR7A5 的表达质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 得到表达菌株。37℃ 培养 2L 表达菌株,当细胞在 600nm 光吸收值达到 0.6 时,用 0.5 mM IPTG 在 37℃ 诱导 AKR7A5 过表达 3 小时,离心(3000g, 15min)收集表达细胞。2 升的细胞培养物可得到约 15 g 细胞(湿重)。细胞破碎后离心(3500g, 30min),取上清上样到镍离子亲和层析柱,50 mM 咪唑洗脱除去杂蛋白,再用 50~150 mM 咪唑梯度洗脱得到目的蛋白 AKR7A5 纯品。将 AKR7A5 的缓冲液透析置换为与后续酶学分析相同的 100 mM 磷酸缓冲溶液(pH 6.6)。将最后得到的蛋白以 0.5 mL 分装,在液氮速冻后,置于-80℃ 保存。

2.2.2 酶促反应初速度的测定 酶促反应以琥珀酸半醛 SSA 和 NADPH(或 NADH)作为底物进行分析。酶促反应的初速度通过 Shimadzu UV-2401PC 分光光度计在 340nm 处测量酶消耗 NADPH 的吸光度变化。以 NADPH 的吸光系数  $6270 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  计算 NADPH 随时间的消耗速度。测量产物或底物结构类似物抑制类型时,在一系列浓度的抑制剂存在下,分别测定两种底物不同浓度条件下的初速度。非酶催化反应或分光光度计光照对 NADPH 的消耗作为对照得以扣除。酶促反应总体积为 1mL,(不足的体积用 100mM 磷酸缓冲溶液补足),加入实验设计的一定浓度的底物琥珀酸半醛(SSA),如未在图中特定说明,NADPH 的浓度为  $100 \mu\text{M}$ ,最后加入  $0.2 \mu\text{M}$  纯化的 AKR7A5 启动反应,测量 NADPH 的消耗速率。

2.2.2 酶学数据的拟合和分析 所有酶促反应的

初速度和底物浓度,以及抑制剂浓度的关系利用 *Graphpad prism 6* 软件对数据进行非线性的拟合.在数据拟合时,根据双倒数作图,Dixon 作图判断相应的酶稳态动力学模型,再选择相应酶动力学公式进行最小平方根法拟合.通过拟合,可得到相应的酶学常数.数据拟合质量根据拟合值的标准偏差,95%的置信区间以及最小平方根余量和来判断.

### 3 结果与讨论

#### 3.1 AKR7A5 的稳态动力学机理的初步分类

在获得 AKR7A5 的蛋白纯品后(图 1),即开展稳态动力学性质的研究. AKR7A5 催化两个底物的反应,利用 NADPH 的还原力催化带羰基的底物还原琥珀酸半醛(SSA)为  $\gamma$ -羟基丁酸(GHB)作为稳态动力学的研究体系.

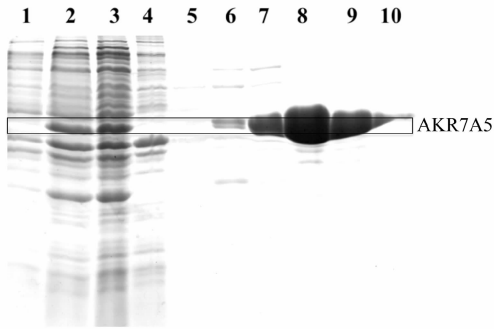


图 1 醛酮还原酶 AKR7A5 的纯化过程的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the procedure of purification of AKR7A5

双底物酶促反应的初步分类可通过分析一种底物浓度和反应初速度的双倒数直线的斜率是否随另一底物浓度变化而变化得以区分.如图 2 所示,在一定浓度的琥珀酸半醛(SSA)条件下,对反应的初速度和底物 NADPH 浓度进行 Lineweaver-Burk 双倒数作图.每个琥珀酸半醛浓度对应一条双倒数直线.随着琥珀酸半醛的浓度升高,可以得到一系列斜率依次减小,截距依次降低的双倒数直线.与之类似,在一定浓度的 NADPH 条件下,对反应的初速度和琥珀酸半醛的浓度进行 Lineweaver-Burk 双倒数作图.随着 NADPH 的浓度升高也得到一系列斜率依次降低,截距依次降低的双倒数直线.

根据三元反应机理,不管一个底物的浓度达到饱和还是很低,只有另一底物加入反应,才会推动

反应的进行,另一底物浓度的升高对反应产生更高的促进作用. AKR7A5 针对两种底物分别进行双倒数作图,都得到一系列截距和斜率都减小的双倒数直线,显示 NADPH 或 SSA 分别在饱和和较低浓度时都受到另一底物的推动作用,符合典型的三元反应机理的特征,因此酶反应时与两个底物同时结合.

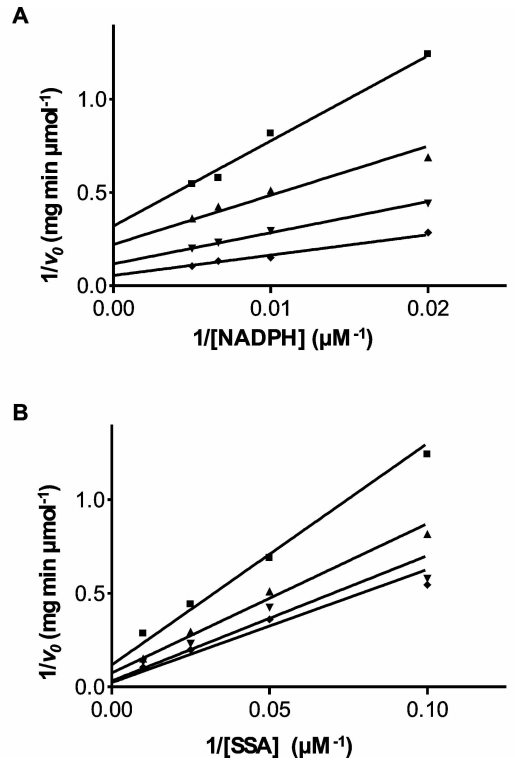


图 2 在固定一种底物浓度条件下,对另一底物的初速度和浓度的双倒数作图

A:当 SSA 浓度为 10(■),20(▲),40(▽),100  $\mu\text{M}$ (◆)时,对 NADPH 的浓度和反应初速度的双倒数作图

B:当 NADPH 浓度为 50(■),100(▲),150(◇),200  $\mu\text{M}$ (◆)时,对 SSA 的浓度和反应初速度双倒数作图

Fig.2 Double reciprocal plots obtained with the two substrate enzyme AKR7A5.

A, Double reciprocal plot when NADH concentration was varied between 50-200  $\mu\text{M}$ , while SSA was used at a range of fixed concentration between 10-100  $\mu\text{M}$  as indicated; B, Double reciprocal plot when SSA concentration was varied between 10-100  $\mu\text{M}$ , while NADPH was used at a range of fixed concentration between 50-200  $\mu\text{M}$

#### 3.2 琥珀酸半醛还原酶 AKR7A5 的产物抑制特征推导稳态动力学机理

在知道醛酮还原酶 AKR7A5 是三元复合物反应机理后,通过产物的抑制特征,可以具体得到 AKR7A5 是有序还是随机的三元复合物反应机理,即底物的结合或产物的释放是否遵循特定的顺序<sup>[22]</sup>.

固定 SSA 浓度, 观察不同浓度  $\text{NADP}^+$  对底物 NADPH 的抑制类型. 双倒数作图发现不同浓度的外加  $\text{NADP}^+$  只影响底物 NADPH 双倒数直线的斜率, 而不影响截距, 说明  $\text{NADP}^+$  不影响酶促反应的最大初速度  $V_{max}$ , 但是会升高 AKR7A5 对 NADPH 的米氏常数  $K_m$ , 表现为竞争性的抑制特点(图 3A). 固定 SSA 浓度, 观察不同浓度产物 GHB 对底物 NADPH 的抑制类型, 发现 GHB 会同时影响 NADPH 双倒数直线截距和斜率, 表现

为非竞争性抑制(图 3B). 固定 NADPH 的浓度, 观察  $\text{NADP}^+$  和 GHB 对底物 SSA 的抑制类型, 均表现为非竞争性抑制(图 3C、D). 综合产物抑制的结果, 仅有产物  $\text{NADP}^+$  和底物 NADPH 之间为竞争性抑制, 符合有序三元复合物反应机理的特征, 据此可以推导底物的结合和产物的释放遵循特定的顺序, 即 NADPH 首先结合到 AKR7A5, 产物  $\text{NADP}^+$  最后从 AKR7A5 释放. 整个酶促反应过程可总结为图 3E 所示.

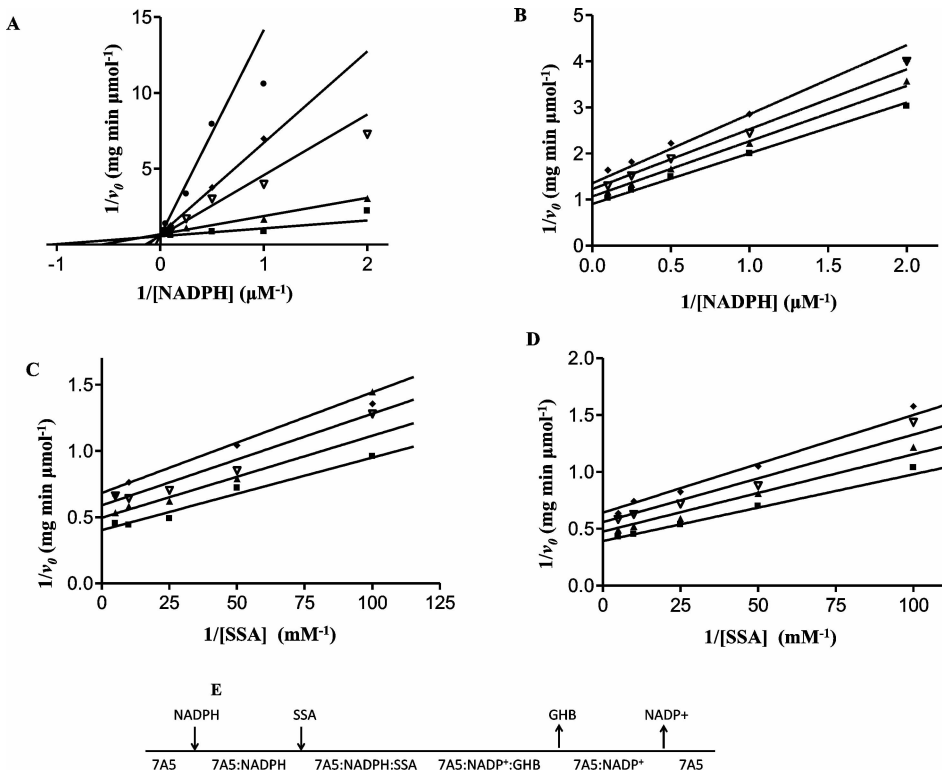


图 3 AKR7A5 的产物抑制特征及稳态动力学机理图

A: 产物  $\text{NADP}^+$  对底物 NADPH 的抑制效应的双倒数作图,  $\text{NADP}^+$  的浓度分别为 0(■), 20(▲), 40(▽), 80(◆), 200(●)  $\mu\text{M}$ ; B: 产物 GHB 对底物 NADPH 的抑制效应的双倒数作图, GHB 的浓度分别为 0(■), 5(▲), 10(▽), 20(◆)  $\text{mM}$ ; C: 产物  $\text{NADP}^+$  对底物 SSA 的抑制效应的双倒数作图,  $\text{NADP}^+$  的浓度分别为 0(■), 100(▲), 200(▽), 300(◆)  $\mu\text{M}$ ; D: 产物 GHB 对底物 SSA 的抑制效应的双倒数作图, GHB 的浓度分别为 0(■), 5(▲), 10(▽), 15(◆)  $\text{mM}$ ; E: 由产物抑制特征推导出的 AKR7A5 稳态动力学机理图

Fig. 3 Product inhibitions of AKR7A5 and the indicated steady state kinetic mechanism. A. Double reciprocal plots of inhibition of AKR7A5 by  $\text{NADP}^+$  when NADPH (A), by GHB when NADPH (B), by  $\text{NADP}^+$  when SSA (C), by GHB when SSA (D), as the variable substrate at different concentrations.

### 3.3 过量底物对 AKR7A5 的抑制机理分析

在 AKR7A5 的研究中发现过量的底物 SSA 对酶促反应有明显的抑制效应(图 4). 我们对 SSA 的底物抑制效应提出两个假设: (1) SSA 进入  $\text{AKR7A5:NADPH}$  二元复合物, 由于结合方向或角度的不合理, 形成非活性的三元复合物, 不能发生反应, 出现底物抑制现象; (2) SSA 在高浓度条

件下, 错误地进入  $\text{AKR7A5:NADP}^+$  二元复合物, 形成  $\text{AKR7A5:NADP}^+:\text{SSA}$  错误三元复合物, 抑制反应的进行. 如果只有第一种情况, 初速度的公式将引入额外的非活性三元复合物平衡解离常数  $K_i$  (解离出非活性结合的 SSA), 经过等式变换, 又可得经典的米氏公式的形式(公式(1)), 这意味着只有非活性的三元复合物发生时, 初速度和底物

浓度的关系不会偏离米氏公式,事实上,实验数据显示随着 SSA 的浓度升高,反应的初速度明显偏离米氏曲线(图 4). 虽然我们不能完排除非活性的三元复合物的存在,但单纯用这一原因无法解释 SSA 的底物抑制效应.

$$v = \frac{V[S]}{K_m(1 + \frac{[S]}{K_i})[S]} = \frac{V[S]}{K_m + (\frac{K_m}{K_i} + 1) * [S]}$$

$$= \frac{V}{1 + K_m/K_i} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

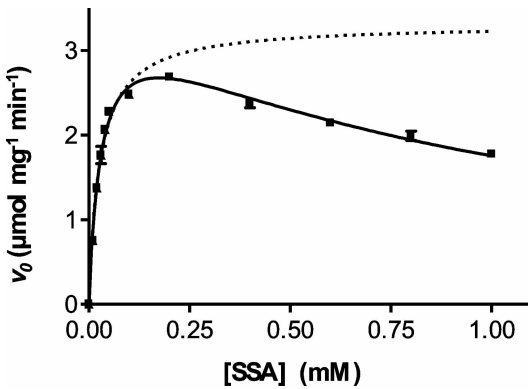


图 4 AKR7A5 的 SSA 底物抑制现象及其反应初速度和底物 SSA 浓度的拟合

Fig. 4 Substrate inhibition of AKR7A5 by SSA and the least-square fit of the initial velocity and SSA concentrations

根据有序的三元复合物反应机理,正常情况下 SSA 只会同 AKR7A5:NADPH 复合物结合. 但是当 SSA 处于高浓度时,由于 AKR7A5:NADP<sup>+</sup>复合物的底物结合口袋较大, SSA 具有带负电荷的羧酸基团,可能错误进入带正电荷的 AKR7A5:NADP<sup>+</sup>复合物底物结合口袋,而显现出抑制效应. 如果只考虑 SSA 错误结合到 AKR7A5:NADP<sup>+</sup>复合物,形成错误三元复合物,酶促反应初速度的公式(2)<sup>[22]</sup>将会是

$$v = \frac{Vab}{K_{iA}K_{mB} + K_{mB}a + K_{mA}b + ab(1 + b/K_{siB})} \quad (2)$$

公式(2)中  $a$ 、 $b$  分别代表 NADPH 和 SSA 的游离浓度. 同没有底物抑制的初速度公式相比,分母多了一项  $ab^2/K_{siB}$ . 能否显示出明显的底物抑制性,不能单看 SSA 的浓度( $b$ ),只有当 NADPH 的浓度( $a$ )也很高时,SSA 的底物抑制才明显. 在酶活测定,我们为了简化数据处理,往往让 NADPH 的浓度( $a$ )处于饱和,这为 SSA 的底物抑制创造了条

件. 因为 NADPH 的浓度很高,我们可以将公式(2)中不含  $a$  的项略去而得到简化的公式:

$$v = \frac{Vab}{K_{mB}a + ab(1 + b/K_{siB})} = \frac{Vb}{K_{mB} + b + b^2/K_{siB}} \quad (3)$$

利用简化的公式,我们可以很好地拟合 SSA 底物抑制的数据(图 4),因此可以认为 SSA 的底物抑制效应是由于 SSA 错误地结合于 AKR7A5:NADP<sup>+</sup>复合物引起.

### 3.4 底物类似物对 AKR7A5 的抑制机理分析

在寻找酶的抑制剂时,底物的结构类似物往往是最早的考虑对象. 在二元复合物反应机理中,底物的类似物不一定产生竞争性抑制. 通过测量底物的结构类似物的抑制类型,可以判断结构类似物同酶的哪种形式结合,为制备该类抑制剂的晶体提供信息.

作为底物琥珀酸半醛(SSA)的结构类似物(图 5A),我们分析琥珀酸对 AKR7A5 的抑制特点. 在一系列琥珀酸浓度条件下,分别测量 AKR7A5 催化不同浓度 SSA 反应的初速度. 通过双倒数作图,在不同琥珀酸浓度下,可以得到一系列平行的双倒数直线,随着琥珀酸浓度的升高,在  $1/v$  轴上的截距依次升高,表明琥珀酸对琥珀酸半醛产生反竞争抑制(uncompetitive)(图 5B). 为了进一步验证二者的抑制特征,采用  $1/v$  和  $a/v$  与抑制剂琥珀酸浓度  $[I]$  的 Dixon 作图,发现两种 Dixon 的作图形式都与反竞争抑制相符,表明琥珀酸对琥珀酸半醛呈现反竞争抑制效应(图 5C、D). 选用反竞争抑制的模型可以很好地拟合不同浓度琥珀酸对不同底物浓度的反应初速度影响的所有数据,再次证明琥珀酸是 AKR7A5 的反竞争抑制剂(图 5E).

由于结构上的高度相似性,同 SSA 的底物抑制一样,假设琥珀酸可能和 AKR7A5:NADPH 和 AKR7A5:NADP<sup>+</sup>两种二元复合物形式结合. 在琥珀酸存在时,反应的初速度可表示为公式(4)<sup>[22]</sup>,公式中  $K_{ic}$  和  $K_{iu}$  分别表示琥珀酸结合于 7A5:NADPH 和 7A5:NADP<sup>+</sup>的抑制常数.

$$v = \frac{Vab}{K_{iA}K_{mB} + K_{mB}a(1 + b'/K_{ic}) + K_{mA}b + ab(1 + b'/K_{iu})} \quad (4)$$

为了简化分析,实验通常都用饱和浓度的 NADPH 来分析,因此把不含 NADPH 浓度  $a$  的项略去得到简化的公式(5):

$$v = \frac{Vab}{K_{mB}a(1 + b'/K_{iu})} =$$

$$\frac{Vb}{K_{mB}(1+b'/K_{ic})+b(1+b'/K_{iu})} = \frac{Vb/(1+b'/K_{iu})}{K_{mB}(1+b'/K_{ic})/(1+b'/K_{iu})+b} \quad (5)$$

公式(5)为混合型抑制的通用公式效应,反竞争和非竞争是其中的两种极端情况. 如果假设琥珀酸不与 AKR7A5: NADPH 结合, 只与 AKR7A5: NADP<sup>+</sup> 结合, 即假设  $K_{ic}$  非常大, 公式(5)中的  $b'/$

$K_{ic}$  趋近于 0, 公式可进一步简化为:

$$v = \frac{Vb/(1+b'/K_{iu})}{K_{mB}/(1+b'/K_{iu})+b} \quad (6)$$

这是一个反竞争抑制的公式, 可以和我们的实验数据相符. 由此可知, 琥珀酸只和 AKR7A5: NADP<sup>+</sup> 的二元复合物结合, 要获得 AKR7A5 和反竞争抑制剂琥珀酸的复合物晶体结构, 须通过对 AKR7A5, NADP<sup>+</sup> 和琥珀酸共结晶才有可能.

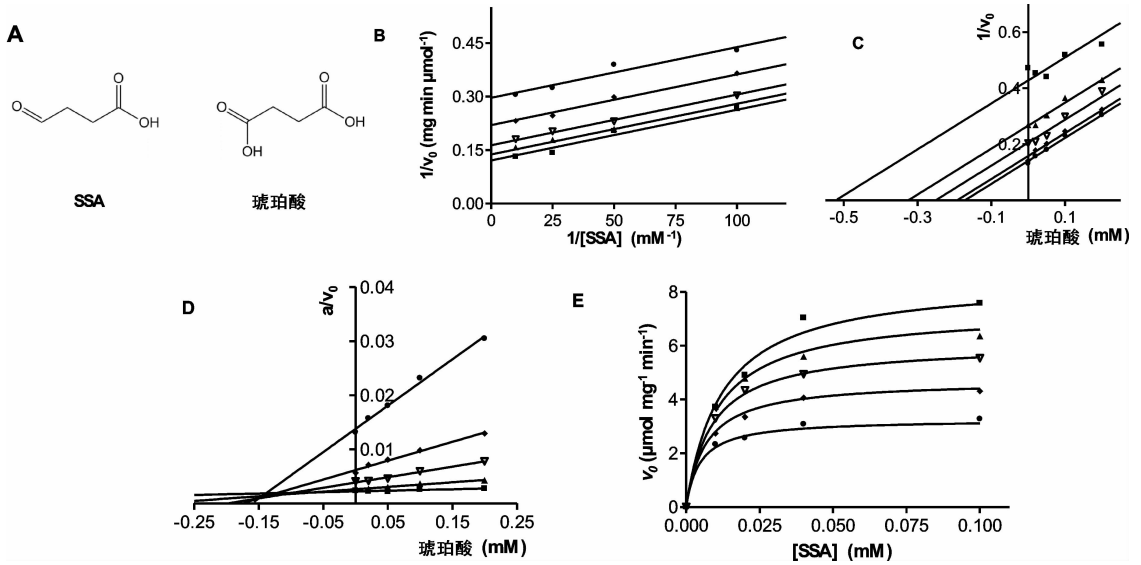


图 5 底物 SSA 结构类似物琥珀酸

(A) 以及通过双倒数(B)、Dixon 作图(C、D)和全局数据拟合的方法(E)分析琥珀酸对 AKR7A5 的抑制类型. 琥珀酸的浓度分别为 0(■), 0.02(▲), 0.05(▽), 0.1(◆), 0.2(●)mM.

Fig. 5 Substrate analogue succinate

(A) and the inhibition type of succinate distinguished by double reciprocal plot (B), Dixon plot (C, D) and Global fitting of the initial velocity data when SSA as the variable substrate.

## 4 结 论

琥珀酸半醛还原酶可作为缓解琥珀酸半醛脱氢酶缺陷代谢遗传病症状的潜在药物靶点, 目前已解析了两个琥珀酸半醛还原酶的晶体结构, 但其特定的抑制剂还未见报道. 酶的稳态动力学机理分析是筛选抑制剂的基础. 我们通过对琥珀酸半醛还原酶 AKR7A5 的稳态动力学性质的分析, 得到了晶体结构无法提供的信息: AKR7A5 的酶促反应是按照有序的三元复合物反应机理进行; 过高浓度的底物琥珀酸半醛 SSA 错误地与 7A5: NADP<sup>+</sup> 二元复合物结合, 产生底物抑制性; 分析底物的结构类似物琥珀酸对 AKR7A5 的抑制特点, 发现琥珀酸是该酶的反竞争抑制剂, 推断它只能与 7A5: NADP<sup>+</sup> 的复合物结合, 据此认为制备包括琥珀酸在内的反竞争抑制剂与 AKR7A5 的复合物晶体要从抑制剂、酶、NADP<sup>+</sup> 复合物的形式入手.

## 参考文献:

- [1] Jin Y, Penning T M. Aldo-keto reductases and bio-activation/detoxication [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007, 47: 263.
- [2] Oppermann U. Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007, 47: 293.
- [3] Penning T M. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview [J]. Chem Biol Interact, 2015, 234: 236.
- [4] Mochizuki S, Nishiyama R, Inoue A, et al. A Novel Aldo-Keto Reductase, HdRed, from the Pacific Abalone *Haliotis discus hannai*, Which Reduces Alginate-derived 4-Deoxy-L-erythro-5-hexoseulose Uronic Acid to 2-Keto-3-deoxy-D-gluconate [J]. J Biol Chem, 2015, 290: 30962.
- [5] Burczynski M E, Sridhar G R, Palackal N T, et al. The reactive oxygen species and Michael acceptor-

- inducible human aldo-keto reductase AKR1C1 reduces the alpha, beta-unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal to 1,4-dihydroxy-2-nonenone [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 2890.
- [6] Srivastava S, Chandra A, Bhatnagar A, *et al.* Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 217: 741.
- [7] Penning T M, Burczynski M E, Jez J M, *et al.* Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones [J]. *Biochem J*, 2000, 351: 67.
- [8] Komoto J, Yamada T, Watanabe K, *et al.* Crystal structure of human prostaglandin F synthase (AKR1C3) [J]. *Biochemistry*, 2004, 43: 2188.
- [9] Atalla A, Breyer-Pfaff U, and Maser E. Purification and characterization of oxidoreductases-catalyzing carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human liver cytosol [J]. *Xenobiotica*, 2000, 30: 755.
- [10] Palackal N T, Lee S H, Harvey R G, *et al.* Activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiol proximate carcinogens by human aldo-keto reductase (AKR1C) enzymes and their functional overexpression in human lung carcinoma (A549) cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 24799.
- [11] Ellis E M, Slattery C M, and Hayes J D. Characterization of the rat aflatoxin B1 aldehyde reductase gene, AKR7A1. Structure and chromosomal localization of AKR7A1 as well as identification of antioxidant response elements in the gene promoter [J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24: 727.
- [12] Kozma E, Brown E, Ellis E M, *et al.* The crystal structure of rat liver AKR7A1. A dimeric member of the aldo-keto reductase superfamily [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 16285.
- [13] Bodreddigari S, Jones L K, Egner P A, *et al.* Protection against aflatoxin B1-induced cytotoxicity by expression of the cloned aflatoxin B1-aldehyde reductases rat AKR7A1 and human AKR7A3 [J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21: 1134.
- [14] Lyon R C, Johnston S M, Watson D G, *et al.* Synthesis and catabolism of gamma-hydroxybutyrate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: role of the aldo-keto reductase AKR7A2 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 25986.
- [15] Snead O C, 3rd. Evidence for a G protein-coupled gamma-hydroxybutyric acid receptor [J]. *J Neurochem*, 2000, 75: 1986.
- [16] Kim K J, Pearl P L, Jensen K, *et al.* Succinic semialdehyde dehydrogenase: biochemical-molecular-clinical disease mechanisms, redox regulation, and functional significance [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15: 691.
- [17] Pearl P L, Novotny E J, Acosta M T, *et al.* Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency in children and adults [J]. *Ann Neurol*, 2003, 54: S73.
- [18] Kamal R M, van Noorden M S, Franzek E, *et al.* The neurobiological mechanisms of gamma-hydroxybutyrate dependence and withdrawal and their clinical relevance: a Review [J]. *Neuropsychobiology*, 2016, 73: 65.
- [19] Zhu X, Laphorn A J, Ellis E M. Crystal structure of mouse succinic semialdehyde reductase AKR7A5: structural basis for substrate specificity [J]. *Biochemistry*, 2006, 45: 1562.
- [20] Strelow J, Dewe W, Iversen P W, *et al.* Mechanism of action assays for enzymes, assay guidance manual [M]. Bethesda (MD), 2004.
- [21] Nagar S, Argikar U A, and Tweedie D J. Enzyme kinetics in drug metabolism: fundamentals and applications [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1113: 1.
- [22] Cornish-Bowden A. Fundamentals of enzyme kinetics [M]. Wiley-VCH, Weinheim, 2012.