

苯丁酸氮芥及环磷酰胺对大鼠肝微粒体谷胱甘肽 S-转移酶的激活

郑英^{1*}, 李杨², 张捷³, 楼宜嘉³

(1. 解放军第117医院药剂科, 浙江 杭州 310013; 2. 江干区人民医院内科, 浙江 杭州 310004;
3. 浙江大学药学院药理学与毒理学研究室, 浙江 杭州 310031)

摘要:目的 探索苯丁酸氮芥(CHB)和环磷酰胺(CP)在体外是否通过烷化激活大鼠肝微粒体谷胱甘肽 S-转移酶(mGST)。方法 微粒体粗提物与CHB或CP体外共孵育,测定mGST催化动力学改变,结合N-乙基马来酰亚胺(NEM)再激活实验和结合二硫苏糖醇(DTT)逆转实验,研究酶激活机制。结果 CHB或CP浓度(0~5 mmol·L⁻¹)与时间(0~5 min)依赖性地激活mGSTs。增强的mGST活性能被NEM进一步增强,不被二硫键断裂剂DTT逆转,NEM对CHB或CP活化后的mGST活性的增强效应与NEM单独的增强效应无差异。结论 CHB或CP体外可激活大鼠肝mGST,激活机制可能与mGST的Cys⁴⁹的巯基被CHB或CP修饰激活有关。

关键词:酶激活;微粒体;谷胱甘肽转移酶;苯丁酸氮芥;环磷酰胺;谷胱甘肽

中图分类号: R963, R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2007)01-0039-05

谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST)广泛存在于生物体内,在药物、毒物及其他药理活性物质生物转化和解毒中起到重要的作用。微粒体 GST(microsomal GST, mGST)是其中一组膜结合型同工酶,其第 49 位半胱氨酸 (cysteine 49, Cys⁴⁹)的巯基 (sulfhydryl, -SH)可以与过氧化氢、巯基烷化剂 N-乙基马来酰亚胺 (N-ethyl maleimide, NEM)等特异结合而使酶本身得以修饰激活^[1-3]的

特性及其相关的生命现象具有诱人的研究前景。然而,目前国内外有关氮芥类药物能否修饰激活 mGST 的研究鲜见报道。鉴于近年来采用氮芥类药物作为 GST 的底物,研究其对 mGST 活性的影响及促自身代谢灭活,从而使其在靶细胞中达不到有效浓度,这是否与其耐药性直接相关受到关注。本研究选用氮芥类药物苯丁酸氮芥 (chlorambucil, CHB)和环磷酰胺 (cyclophosphamide, CP),体外观察其能否激活 mGST,探索激活机制是否烷化激活方式,为研究氮芥类药物激活 mGST 模式提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物,试剂与药品

SD 大鼠,♂,体重 180~220 g,由浙江医学科学院实验动物中心提供(二级,动物许可证号 No. 2001001)。

CHB,Fluka Chemika 产品;CP,上海华联制药有限公司产品;L-谷胱甘肽(还原型)[L-glutathione (reduced), GSH],上海伯奥生物科技有限公司产品(批号 200104),进口分装;2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene, CDNB),上海试剂一厂产品(批号 99-04-01);二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT), NEM, Merck 产品;牛血清白蛋白(bovine serum albumin), Sigma 产品;5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)[5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), DTNB], Fluka chemie 产品。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 大鼠肝 mGST 粗提物制备

参照文献方法制备微粒体^[4],用 0.15 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 次,以减少胞浆污染。用含 0.5% Triton X-100 的磷酸缓冲液增溶,使微粒体蛋白成为胶体溶液,然后 13 000 × g 离心 40 min,使不溶性的及容易沉降的杂蛋白沉淀除去,经检测,沉淀的蛋白质用 NEM 激活没有 mGST 活性,确保

收稿日期: 2006-03-14 接受日期: 2006-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070904)

作者简介: 郑英(1972-),女,浙江开化人,主管药师,药理学硕士,主要从事药理学研究与临床药学工作。

* 联系作者 E-mail: zhengying72@163.com Tel: (0571)86452922

mGST 没有形成沉淀丢失。上清液用可透过相对分子质量 8000 ~ 1400 的透析袋对含 0.5% Triton X-100 的 0.01 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液透析 48 ~ 56 h, 即得到 mGST 粗提物^[5], 其中一部分 -86℃ 冰箱保存, 剩余部分稀释至蛋白浓度为 1 g·L⁻¹, 用于以下的实验, 上述操作均在 0℃ 冰浴中进行。

1.3 N-乙基马来酰亚胺对大鼠肝 mGST 的激活效应

mGST 粗提物 1 g·L⁻¹ 分别与 0, 0.039, 0.078, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5 及 5 mmol·L⁻¹ NEM 37℃ 孵育 1 min。按照 Habig 等^[6] 方法测定 mGST 活性。取 mGST 活性对 NEM 浓度作图, 作出量-效曲线。

mGST 粗提物 1 g·L⁻¹ 分别与 0.312 mmol·L⁻¹ NEM 37℃ 孵育 0, 10, 20, 30 s, 1, 2, 3 及 5 min。测定 mGST 活性。取 mGST 活性对孵育时间作图, 作出时-效曲线。

1.4 药物处理的大鼠肝 mGST 活性测定

CHB 或 CP 激活实验类同 NEM 处理, 用 mGST 粗提物与不同浓度的 CHB 或 CP 体外共孵育, 在不同的时间点测定 mGST 活性, 作出量-效和时-效曲线。NEM 再激活实验利用经过 CHB 或 CP 预处理的酶(最佳激活)与等体积 0.2 mmol·L⁻¹ NEM 体外共孵育 1 min 后测活性; DTT 逆转实验利用经过 CHB 或 CP 预处理的酶(最佳激活)与等体积 1 mmol·L⁻¹ DTT 体外共孵育 5 min 后测活性; DTT 与 NEM 共同作用实验是 DTT 实验基础上再与等体积 0.2 mmol·L⁻¹ NEM 体外共孵育 1 min 后测活性。上述实验均在 37℃ 进行。

1.5 蛋白质含量测定

考马斯亮蓝-G250 染色法测定蛋白质含量^[7]。

1.6 mGST 动力学参数测定

mGST 粗提物分别与 0.312 mmol·L⁻¹ NEM 或 0.156 mmol·L⁻¹ CHB 体外共孵育 1 min, 与 0.312 mmol·L⁻¹ CP 共孵育 2 min, 以 1.0 mmol·L⁻¹ CDNB 与 0.10 ~ 1.60 mmol·L⁻¹ GSH 为底物测定 mGST 活性。用 Lineweaver-Burk 作图法计算 mGST 动力学参数。

1.7 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 8.0 软件包, 以单因素方差分析 (One-way ANOVA), Dunnett *t* 检验, Student-Newman-Keuls 方法进行统计检验, *n* 表示 mGST 粗提物的制备次数。

2 结果

2.1 N-乙基马来酰亚胺、苯丁酸氮芥和环磷酰胺对大鼠肝 mGST 催化活性的影响

NEM 体外激活实验量-效关系研究表明(图 1), NEM 和 CHB 或 CP 浓度从 0.039 ~ 0.156 mmol·L⁻¹ 开始, mGST 活性比对照组(0 mmol·L⁻¹) 明显升高, 0.156 ~ 0.312 mmol·L⁻¹ 时活性增大至坪值, NEM 激活约为对照的 8 倍, CHB 激活约为对照的 2.5 倍, CP 激活约为对照的 2 倍, 3 个处理组之间激活的倍数有显著差异。时-效关系研究表明(图 2), 0.156 ~ 0.312 mmol·L⁻¹ NEM 和 CHB 或 CP 与

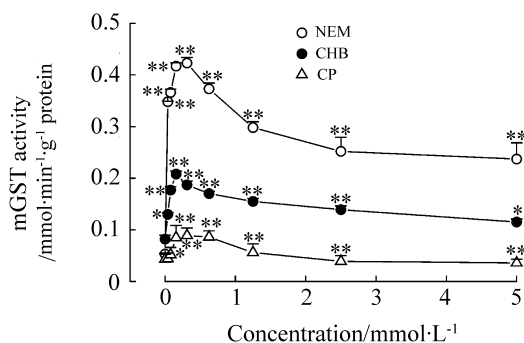


Fig 1. Concentration-dependence of effect of N-ethyl maleimide (NEM), chlorambucil (CHB) and cyclophosphamide (CP) on microsomal glutathione S-transferase (mGST) activity in rat liver microsomes. mGST was incubated with various concentrations of NEM or CHB for 1 min (CP for 2 min) at 37℃, then activity was assayed. $\bar{x} \pm s$, *n* = 3. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, compared with control(0 mmol·L⁻¹.)

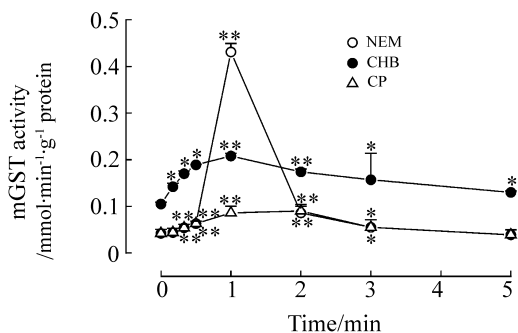


Fig 2. Time-course of effect of NEM, CHB and CP on mGST activity in rat liver microsomes. mGST was incubated with 0.312 mmol·L⁻¹ NEM or CP (0.156 mmol·L⁻¹ CHB) for various time at 37℃, then activity was assayed at the time indicated. $\bar{x} \pm s$, *n* = 3. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, compared with control(0 min).

Tab 1. Kinetic parameters for activation of rat liver mGST treated with NEM, CHB or CP *in vitro*

Group	Microsomes	$K_m/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$V_{\max}/\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ protein
NEM	Control	0.421 ± 0.023	0.087 ± 0.009
	NEM treated	0.105 ± 0.015 **	0.668 ± 0.026 **
CHB	Control	0.390 ± 0.030	0.110 ± 0.004
	CHB treated	0.167 ± 0.011 **	0.146 ± 0.005 **
CP	Control	0.410 ± 0.070	0.084 ± 0.002
	CP treated	0.259 ± 0.004 **	0.125 ± 0.006 *

mGST was incubated with 0.312 mmol·L⁻¹ NEM or 0.156 mmol·L⁻¹ CHB for 1 min (0.312 mmol·L⁻¹ CP for 2 min), then mGST activity toward 1 mmol·L⁻¹ CDNB (with 0.10 - 1.60 mmol·L⁻¹ GSH) was assayed. K_m And V_{\max} were calculated from Lineweaver-Burk plots. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with corresponding control.

mGST 粗提物共孵育后第 20 ~ 40 s 开始, 酶活性较对照组明显升高, 1 ~ 2 min 时达到最大激活程度。

2.2 N-乙基马来酰亚胺、苯丁酸氮芥和环磷酰胺对大鼠肝 mGST 动力学参数的影响

mGST 粗提物分别与 0.312 mmol·L⁻¹ NEM 或 0.156 mmol·L⁻¹ CHB 体外共孵育 1 min, 与 0.312 mmol·L⁻¹ CP 孵育 2 min, mGST 的酶动力发生明显改变, 底物 GSH 的 K_m 较对照组明显降低, V_{\max} 较正常对照组明显增大(表 1)。

2.3 N-乙基马来酰亚胺和二硫苏糖醇对苯丁酸氮芥或环磷酰胺预处理后增强的大鼠肝 mGST 活性的影响

根据量-效和时-效曲线, 选择 CHB 或 CP 单独增强 mGST 活性的最佳浓度与时间进行预处理。结果发现(表 2, 表 3), DTT 对 CHB 或 CP 所增强的 mGST 活性没有影响; 在未加 DTT 的体系中加 NEM 使 CHB 或 CP 处理后的 mGST 活性均进一步增加; 如在已有 DTT 的体系中再加入 NEM, mGST 活性也有明显增加, 增强程度与单用 NEM 没有差别($P > 0.05$)。但 CHB 或 CP 与 NEM 的叠加效应与 NEM 的单独效应相似($P > 0.05$)。提示 DTT 不能逆转 CHB 或 CP 的增强效应; 同时不被 DTT 逆转的酶仍可进一步被 NEM 增强。

3 讨论

mGST 被外来物质修饰激活特性的生物学意义已逐渐被引起关注, 研究进行得较为深入的方向主要集中在烷化激活、氧化激活和水解激活^[8]等领域, 但有关烷化剂活化 mGST, 促进自身灭活代谢加速, 使药物在肿瘤靶细胞中达不到有效浓度的研究

Tab 2. Increase in rat liver mGST activity after CHB pretreatment and enhanced by NEM

Group	mGST activity/mmole·min ⁻¹ ·g ⁻¹ protein
Control	0.105 ± 0.004 **
CHB	0.208 ± 0.006
CHB + NEM	0.417 ± 0.006 **
CHB + DTT	0.206 ± 0.005
CHB + DTT + NEM	0.431 ± 0.008 **
DTT	0.109 ± 0.003 **
NEM	0.432 ± 0.009 **

Samples, treated with CHB as described in Fig 2, were incubated with 0.2 mmol·L⁻¹ NEM for 1 min, or 1 mmol·L⁻¹ DTT for 5 min, then mGST activity was assayed. In the CHB + DTT + NEM group, CHB treated samples were firstly incubated with DTT then exposed to NEM at the time course indicated. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ** $P < 0.01$, compared with CHB alone group.

Tab 3. Increase in rat liver mGST activity after CP pretreatment and enhanced by NEM

Group	mGST activity/mmole·min ⁻¹ ·g ⁻¹ protein
Control	0.075 ± 0.003 **
CP	0.112 ± 0.002
CP + NEM	0.286 ± 0.003 **
CP + DTT	0.106 ± 0.002
CP + DTT + NEM	0.249 ± 0.012 **
DTT	0.073 ± 0.003
NEM	0.289 ± 0.010 **

Samples, treated with CP as described in Fig 2, were incubated with 0.2 mmol·L⁻¹ NEM for 1 min, or 1 mmol·L⁻¹ DTT for 5 min, then mGST activity was assayed. In the CP + DTT + NEM group, CP treated samples were firstly incubated with DTT then exposed to NEM at the time course indicated. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ** $P < 0.01$, compared with CP alone group.

却迄今未见报道。目前较被认可的氮芥类抗肿瘤药物耐药机制包括:DNA-烷化交联损伤和肿瘤细胞代谢催化药物灭活。对于后者,结构中含氯乙基类化合物的代谢是通过细胞色素 P450 酶系氧化活化后,经 GST 代谢和直接通过 mGST 灭活代谢两个独立的微粒体酶系统催化完成的。鉴于氮芥类化合物的结构特点,本研究选用 CHB 或 CP 与 mGST 粗提物体外共孵育,发现 mGST 可以被 CHB 或 CP 浓度依赖和时间依赖地激活,1~2 min 时可达最大激活程度,酶催化动力学特性发生改变, K_m 降低, V_{max} 增大。同时巯基特异结合试剂 NEM 能将 CHB 和 CP 预处理的 mGST 再激活,而还原剂 DTT 不逆转 CHB 或 CP 对酶的激活作用,由于 NEM 和 DTT 均特异性地作用于 mGST 的 Cys⁴⁹,所以推测 CHB 或 CP 的作用位点也是酶本身的 Cys⁴⁹。

以 DTT 逆转及 NEM 激活效应实验分别是检测 mGST 酶分子上 Cys⁴⁹-SH 是否被烷化修饰,以论证 CHB 和 CP 激活 mGST 的确切机制。结果显示,被 CHB 和 CP 激活的 mGST 不能被二硫键还原剂 DTT 逆转,提示没有涉及双硫键裂解机制,因此该激活作用并非通过 Cys⁴⁹-SH 与氧化型谷胱甘肽巯基/二硫键交换及二聚体形成途径。在体外,mGST 的 Cys⁴⁹-SH 巯基极易被活性烷化剂 NEM 修饰激活^[9-10]。本研究结果表明,mGST 经 CHB 或 CP 激活后,能被 NEM 再激活,NEM 对 CHB 或 CP 活化后的 mGST 激活效应降低,或者说 CHB 或 CP 与 NEM 叠加效应与单用 NEM 的激活效应一致。因此该酶被 CHB 或 CP 活化的机制可能是通过 Cys⁴⁹-SH 巯基修饰作用,也提示 Cys⁴⁹-SH 被 NEM 激活前,已被 CHB 或 CP 占据结合位点,表明 NEM 和 CHB 或 CP 与 mGST 结合的位点是一致的。

作为一种重要的二相代谢酶,mGST 被过氧化氢和烷化剂等特异修饰激活的特性被认为与抗氧化应激、抗脂质过氧化及抗癌药物的耐药性等有关,氮芥类抗肿瘤药物其代谢物均为氯乙基类化合物,在 GST 的催化下,与 GSH 反应生成单 GSH 加成物或 GSH 加成物。GSH 的结合部位是在氮芥部分的氯原子基团,加成物的生成,增大了极性,但也降低了原有烷化能力,若加成反应增强,母体化合物浓度迅速下降,则对肿瘤化疗作用有明显影响。因此论证氯乙基类烷化剂对 mGST 活性影响,尤其是在内质网上的短暂激活对肿瘤耐药性产生的阐明是一种新方向。本研究的结果提示,mGST 可以被氮芥类药物

物 CHB 或 CP 以烷化方式激活,这一短暂激活特性可能与氮芥类药物的耐药性相关,在解毒与保护机体自身中可能发挥着重要的作用。

4 参考文献:

- [1] Svensson R, Rinaldi R, Swedmark S, Morgenstern R. Reactivity of cysteine-49 and its influence on the activation of microsomal glutathione transferase 1: evidence for subunit interaction [J]. *Biochemistry*, 2000, **39** (49):15144 - 15149.
- [2] Kelner MJ, Bagnell RD, Montoya MA, Estes LA, Forsberg L, Morgenstern R. Structural organization of the microsomal glutathione S-transferase gene (MGST1) on chromosome 12p13.1 - 13.2. Identification of the correct promoter region and demonstration of transcriptional regulation in response to oxidative stress [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (17):13000 - 13006.
- [3] Lee SH, DeJong J. Microsomal GST-I: genomic organization, expression, and alternative splicing of the human gene [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1446** (3): 389 - 396.
- [4] Zheng Y, Zhang J, Lou YJ. Augmentation of rat liver microsome glutathione S-transferase preparation [J]. *J Zhejiang Univ: Med Sci* (浙江大学学报:医学版), 2002, **31** (6):429 - 432.
- [5] Morgenstern R, DePierre JW. Microsomal glutathione transferase. Purification in unactivated form and further characterization of the activation process, substrate specificity and amino acid composition [J]. *Eur J Biochem*, 1983, **134** (3):591 - 597.
- [6] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation [J]. *J Biol Chem*, 1974, **249** (22):7130 - 7139.
- [7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248 - 254.
- [8] Weinander R, Ekstrom L, Andersson C, Raza H, Bergman T, Morgenstern R. Structural and functional aspects of rat microsomal glutathione transferase. The roles of cysteine 49, arginine 107, lysine 67, histidine, and tyrosine residues [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272** (14):8871 - 8877.
- [9] Sies H, Dafre AL, Ji Y, Akerboom TP. Protein S-thiolation and redox regulation of membrane-bound glutathi-

one transferase [J]. *Chem Biol Interact*, 1998, **111** – **112**:177 – 185.

[10] Ji Y, Toader V, Bennett BM. Regulation of microsomal

and cytosolic glutathione *S*-transferase activities by *S*-nitrosylation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, **63** (8): 1397 – 1404.

Activation of rat liver microsomal glutathione *S*-transferase by chlorambucil and cyclophosphamide *in vitro*

ZHENG Ying^{1*}, LI Yang², ZHANG Jie³, LOU Yi-Jia³

(1. Department of Pharmacy, the 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310013, China; 2. Department of Internal Medicine, People's Hospital of Jianggan, Hangzhou 310004, China; 3. Department of Pharmacology and Toxicology, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract: **AIM** To study whether chlorambucil (CHB) and cyclophosphamide (CP) activate rat liver microsomal glutathione *S*-transferase (mGST) by alkylation. **METHODS** Partially purified mGST was incubated with CHB or CP *in vitro*, kinetic parameters of mGST were measured. *N*-ethyl maleimide (NEM) activation and dithiothreitol (DTT) reversibility tests were performed to demonstrate the relevant mechanism. **RESULTS** The activity of mGST was activated by CHB or CP in a concentration and time-dependent manner. NEM can enhance the increased activity pretreated with CHB or CP, while DTT failed to reversed the effect of CHB or CP on mGST activity. The mGST total

activation on Cys⁴⁹-SH after CHB or CP pretreatment by alkylating agent NEM was similar to that of NEM alone group. **CONCLUSION** Rat liver mGST can be activated by CHB or CP, possibly via alkylating of the single cysteine (Cys⁴⁹) in mGST.

Key words: enzyme activation; microsomes; glutathione transferases; chlorambucil; cyclophosphamide; glutathione

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China (30070904)

* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)