

亚硝基谷胱甘肽对大鼠肝微粒体谷胱甘肽转移酶的激活及机制

史 强, 楼宜嘉*

(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 探索一氧化氮供体亚硝基谷胱甘肽(GSNO)能否在体外通过S-亚硝酰化机制激活大鼠肝微粒体谷胱甘肽转移酶(mGST)。方法 微粒体粗提物与GSNO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)再激活实验和二巯基苏醇(DTT)逆转实验,以及酶蛋白游离巯基和酶S-亚硝酰化蛋白的改变,研究酶的激活机制。结果 GSNO在 $0.125 \sim 2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内呈浓度和时间(3~15 min)依赖性激活mGST,NEM对酶的再激活效应消失,DTT可以逆转上述激活作用,同时酶蛋白游离巯基浓度依赖性减少,而S-亚硝酰化蛋白浓度依赖性增多。结论 GSNO体外可激活大鼠肝mGST,激活机制可能与mGST第49位半胱氨酸(Cys⁴⁹)的巯基被亚硝酰化形成S-亚硝基硫醇结构有关。

关键词:微粒体;谷胱甘肽转移酶类;酶激活;亚硝基谷胱甘肽

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)06-0438-05

谷胱甘肽转移酶类(glutathione transferases, GST)是参与许多致癌物、致突变物、毒物及其他药理活性物质生物转化和解毒过程的一系列同工酶。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、烷化剂等特异结合而使酶本身得以修饰激活^[1],这些方面的研究已经进行得相对深入。然而目前国内外有关一

氧化氮供体能否修饰激活mGST的研究鲜见报道。鉴于近年来关于一氧化氮供体修饰含巯基酶的研究日益受到关注,有学者认为一氧化氮供体的S-亚硝酰化修饰可以与经典的磷酸化修饰在蛋白酶的翻译后修饰中占有同等地位^[2],本研究选用一氧化氮供体亚硝基谷胱甘肽(nitrosoglutathione, GSNO),观察其能否激活mGST,探索激活机制是否为S-亚硝酰化的方式,以阐明这一生命现象的药理学与毒理学意义。

1 材料与方 法

1.1 动物、试剂与药品

SD大鼠,♂,体重(220±15)g,由浙江大学实验动物中心提供(二级,动物许可证号:医动字第20010014号)。

还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH),Amresco产品;2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochloro benzene, CDNB),上海试剂一厂(批号99-04-01);二巯基苏醇(dithiothreitol, DTT),N-乙基马来酰亚胺(N-ethylmaleimide, NEM),Merck产品;牛血清白蛋白, Sigma产品;5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)[5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB],Fluka Chemie产品;GSNO参照文献方法合成^[3]。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 大鼠肝微粒体谷胱甘肽转移酶粗提物制备

参照文献方法制备微粒体^[4],用 $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl缓冲液洗涤2遍,以减少胞浆污染。用含0.5% Triton X-100的磷酸盐缓冲液增溶,使微粒体蛋白成为胶体溶液,然后 $13\ 000 \times g$ 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mGST没有形成沉淀丢失。上清液用可透过 M_r 8 000~14 000的透析袋对含0.5% Triton X-100的 $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液透析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 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,用于以下的实验,

收稿日期: 2003-01-22 接受日期: 2003-04-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070904)

作者简介: 史 强(1976-),男,陕西渭南人,浙江大学药学院药理学博士研究生。

* 联系作者 E-mail: yijialou@zju.edu.cn Tel: (0571) 87217206 Fax: (0571)87217206

上述操作均在 0℃ 冰浴中进行。

1.3 大鼠肝微粒体谷胱甘肽转移酶活性测定

GSNO 激活实验用 mGST 粗提物与不同浓度的 GSNO 体外共孵育, 在不同的时间点按照 Habig 等^[6]方法测定 mGST 活性, NEM 再激活实验利用经过 GSNO 预处理的酶与等体积 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 GSNO 预处理的酶与等体积 1 mmol·L⁻¹ DTT 体外共孵育 10 min 后测活性。上述实验均在 37℃ 进行。

1.4 S-亚硝酰化蛋白的测定

参照文献^[7], GSNO 孵育后的 mGST 粗提物用 10% 三氯醋酸变性沉淀, 反复用 10 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液洗涤, 离心沉淀, 除去上清中的 GSNO, 沉淀加入等体积 10 mmol·L⁻¹ 氯化高汞, 室温放置 20 min, 破坏酶蛋白中的 S-NO 键, 释放一氧化氮, 然后用 Griess 试剂法检测亚硝酸根量, 求得 S-亚硝酰化蛋白的含量。

1.5 蛋白游离巯基的测定

参照文献^[8], 用 DTNB 试剂法测定蛋白游离巯基, 摩尔消光系数为 13 600 mol·L⁻¹·cm⁻¹。

1.6 其他

蛋白质含量采用考马斯亮蓝-G250 染色法测定^[9]; mGST 动力学参数用 Lineweaver-Burk 作图法求得^[10]。

1.7 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 软件包, 以 One-way ANOVA, Dunnett' t test, Student-Newman-Keuls 方法进行统计学检验, n 表示 mGST 粗提物的制备次数。

2 结果

2.1 亚硝基谷胱甘肽对大鼠肝微粒体谷胱甘肽转移酶催化活性的影响

GSNO 体外激活实验量效关系研究表明, GSNO 浓度从 0.25 mmol·L⁻¹ 开始, mGST 活性比对照组明显升高 ($P < 0.01$), 在 1.0 mmol·L⁻¹ 时, 活性增大至坪值, 约为原来的 2 倍 (表 1)。时效关系研究表明, 2 mmol·L⁻¹ GSNO 与 mGST 粗提物共孵育后第 6 min 开始, 酶活性较对照组明显升高 ($P < 0.01$), 12 min 时可达最大激活程度 (表 2), 其余各浓度组对 mGST 的激活时效关系与此基本相同 (数据未显示)。

Tab 1. Effect of nitrosoglutathione (GSNO) on rat liver microsomal glutathione transferases activity (mGST) *in vitro*

GSNO/mmole·L ⁻¹	mGST activity/mmole·min ⁻¹ ·g ⁻¹ protein
0	0.052 ± 0.002
0.125	0.058 ± 0.002
0.25	0.064 ± 0.003 **
0.5	0.093 ± 0.003 **
1	0.106 ± 0.005 **
2	0.110 ± 0.003 **

Partially purified mGST 1 g·L⁻¹ was incubated with various concentrations of GSNO for 12 min at 37℃, then activity was assayed. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ** $P < 0.01$, compared with 0 mmole·L⁻¹.

Tab 2. Time course of activation of rat liver microsomal glutathione transferases pretreated with nitrosoglutathione *in vitro*

Time/min	mGST activity/mmole·min ⁻¹ ·g ⁻¹ protein
0	0.054 ± 0.003
3	0.072 ± 0.007
6	0.096 ± 0.003 **
9	0.105 ± 0.004 **
12	0.116 ± 0.004 **
15	0.114 ± 0.003 **

Partially purified mGST 1 g·L⁻¹ was incubated with 2 mmole·L⁻¹ GSNO for various time at 37℃, then activity was assayed at the time indicated. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ** $P < 0.01$, compared with 0 min group.

2.2 亚硝基谷胱甘肽对大鼠肝微粒体谷胱甘肽转移酶催化动力学的影响

2 mmol·L⁻¹ GSNO 处理 mGST 12 min 后, mGST 的酶动力学发生明显改变, 底物 GSH 和 CDNB 的 K_m 较对照组减小, V_{max} 较对照组增大 (表 3)。

2.3 亚硝基谷胱甘肽预处理对 N-乙酰马来酰亚胺再激活实验和二巯基苏醇逆转实验的影响

经 GSNO 预处理后, mGST 不能被 NEM 再激活, 而 DTT 可以逆转 GSNO 的激活效应, 同时逆转后的酶可以被 NEM 再激活 (表 4)。

2.4 亚硝基谷胱甘肽对大鼠肝微粒体谷胱甘肽转移酶粗提物游离巯基及 S-亚硝酰化蛋白的影响

不同浓度的 GSNO 与 mGST 粗提物共孵育 12 min 后, 可以引起粗提物中游离巯基含量减少, 0.125

Tab 3. Kinetic parameters for the activation of rat liver microsomal glutathione transferases treated with nitrosogluthathione *in vitro*

Enzyme	$K_m/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$		$V_{\text{max}}/\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{ protein}$	
	GSH	CDNB	GSH	CDNB(substrate)
Control mGST	0.807 ± 0.069	0.628 ± 0.179	0.101 ± 0.010	0.087 ± 0.009
GSNO-treated mGST	0.493 ± 0.077* *	0.198 ± 0.020* *	0.157 ± 0.007*	0.134 ± 0.004*

Partially purified rat mGST 1 g·L⁻¹ was incubated with 2 mmol·L⁻¹ GSNO for 12 min, then the K_m and V_{max} of mGST with 1 mmol·L⁻¹ GSH and 0.25 - 2.5 mmol·L⁻¹ 2,4-dinitrochloro benzene(CDNB), or 1 mmol·L⁻¹ CDNB and 0.5 - 5 mmol·L⁻¹ GSH were 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 group.

Tab 4. N-ethylmaleimide (NEM) reactivation and dithiothreitol (DTT) reversibility of rat liver microsomal glutathione transferases pretreated with nitrosogluthathione

Treatment	mGST activity/ $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{ protein}$
Control	0.054 ± 0.002* *
GSNO	0.114 ± 0.004
GSNO + NEM	0.117 ± 0.001
GSNO + DTT	0.055 ± 0.005* *
GSNO + DTT + NEM	0.343 ± 0.008* *
DTT	0.059 ± 0.003* *
NEM	0.353 ± 0.004* *

Samples, treated with GSNO as described in Tab 2, were incubated with 0.2 mmol·L⁻¹ NEM for 1 min, or 1 mmol·L⁻¹ DTT for 10 min, then mGST activity was assayed. In the GSNO + DTT + NEM group, GSNO treated samples were incubated with DTT then exposed to NEM for 1 min. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ** $P < 0.01$, compared with GSNO pretreated alone group.

Tab 5. Effect of nitrosogluthathione on free sulfhydryl group content in partially purified rat liver microsomal glutathione transferases *in vitro*

GSNO/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	-SH/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ protein}$
0	11.8 ± 1.0
0.125	11.6 ± 0.6
0.25	10.9 ± 0.3
0.5	9.0 ± 1.2*
1	4.4 ± 0.6*
2	3.9 ± 0.6*

Partially purified rat mGST was incubated with GSNO as described in Tab 1, then 10% trichloroacetic acid was added to precipitate the protein. After extensive washing with phosphate buffer, the free sulfhydryl group content was assayed using DTNB reagent. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, compared with control.

和 0.25 mmol·L⁻¹组与对照组无显著差异 ($P > 0.05$),其余各浓度组均与对照组有统计学差异(表 5)。对照组 mGST 粗提物中未检测到 S-亚硝酰化蛋白,但与 GSNO 共孵育后,可检测到其存在,并与 GSNO 呈浓度相关性(表 6)。

Tab 6. S-nitrosylated protein content in partially purified rat liver microsomal glutathione transferases treated with nitrosogluthathione *in vitro*

GSNO/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Pro-S-NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ protein}$
0	0.0 ± 0.0
0.125	0.6 ± 0.4
0.25	1.4 ± 0.4* *
0.5	4.3 ± 0.5* *
1	7.8 ± 0.5* *
2	8.0 ± 0.6*

Pro-S-NO: protein S-nitrosobond. Partially purified rat mGST was treated as described in Tab 1. After extensive washing with phosphate buffer, 10 mmol·L⁻¹ mercuric chloride was added and incubated for 20 min at room temperature to hydrolyze the Pro-S-NO, then nitrite was assayed using the Griess reagent. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with 0 mmol·L⁻¹ group.

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、水解激活^[11]等领域,但关于 mGST 能否被亚硝酰化激活目前知之甚少。而亚硝酰化修饰的方式在酶蛋白翻译后修饰中正受到越来越多的关注。本研究利用 GSNO 与 mGST 粗提物体外共孵育,发现 mGST 可以被 GSNO 呈量效和时效关系激活,最大激活倍数为 2 倍左右,12 min 时可达最大激活程度,酶催化动力学特性发生改变,

K_m 减小、 V_{max} 增大。同时巯基特异结合试剂 NEM 不能将 GSNO 预处理的 mGST 再激活,而还原剂 DTT 可以完全逆转 GSNO 对酶的激活作用,由于 NEM 和 DTT 均特异作用于 mGST 的 Cys⁴⁹[1],所以推测 GSNO 的作用位点是酶本身的 Cys⁴⁹。

为了进一步论证 GSNO 的激活作用是否与 mGST 的 Cys⁴⁹ 的巯基修饰有关,实验测定了 mGST 粗提物中游离巯基的变化情况。对照组 mGST 粗提物中游离巯基的测定值为 $(11.8 \pm 1.0) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 蛋白,由于 mGST 占微粒体蛋白质总量的 3%,且每个 mGST 亚基中只含有一个半胱氨酸,单个亚基的分子量是 17 000,故通过测定微粒体蛋白含量可以估算出粗提物中 mGST 的含量,从而得出其中 mGST 粗提物中的游离巯基含量[12],其值是 $(10.9 \pm 0.9) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 蛋白,这一估算值与实际测出的 mGST 粗提物中游离巯基的值较为接近,故可以认为粗提物中的游离巯基主要是 mGST 本身的 Cys⁴⁹ 上含有的巯基。GSNO 处理使 mGST 粗提物中游离巯基含量浓度依赖性下降,表明 GSNO 修饰了 mGST 的 Cys⁴⁹ 上的巯基。

为探讨 GSNO 对 mGST 的 Cys⁴⁹ 上的巯基的确切修饰方式,实验检测了 GSNO 处理后的 mGST 粗提物中是否有 S-亚硝酰化蛋白(S-nitrosylated protein)的存在。结果表明 GSNO 预处理使 mGST 粗提物中形成了 S-亚硝酰化蛋白结构,而且与 GSNO 呈浓度依赖性。结合上述 GSNO 处理使 mGST 粗提物中游离巯基含量浓度依赖性下降的实验结果,可以推断 GSNO 对 mGST 的激活方式是 S-亚硝酰化的方式,通过形成了 S-亚硝酰化 mGST 而使酶本身得以激活。

GSNO 等小分子亚硝基硫醇类物质近年被认为可能就是内皮舒张因子[13],是 NO 的运输、储存形式,同时是其发挥作用的方式。在硝基化应激中,亚硝基硫醇类物质明显增多。作为一种重要的二相代谢酶,mGST 被过氧化氢、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,本研究的结果提示 mGST 可以被 GSNO 以 S-亚硝酰化的方式激活,推测这一特性与抗亚硝酰化应激有关,因而 mGST 在机体硝基化应激中可能发挥着重要的保护作用。

4 参考文献:

- [1] Svensson R, Rinaldi R, Swedmark S, Morgenstern R. Re-activity 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] Mannick JB, Schonhoff CM. Nitrosylation: the next phosphorylation[J]? *Arch Biochem Biophys*, 2002, **408**(1): 1 - 6.
- [3] 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.
- [4] Zheng Y, Zhang J, Lou YJ. Augmentation of rat liver microsome glutathione S-transferase preparation[J]. *J Zhejiang Univ (Medical sciences)* (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-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation[J]. *J Biol Chem*, 1974, **249**(22): 7130 - 7139.
- [7] Ishii T, Sunami O, Nakajima H, Nishio H, Takeuchi T, Hata F. Critical role of sulfenic acid formation of thiols in the inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by nitric oxide[J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, **58** (1): 133 - 143.
- [8] Tiedge M, Krug U, Lenzen S. Modulation of human glucokinase intrinsic activity by SH reagents mirrors post-translational regulation of enzyme activity[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1337**(2): 175 - 190.
- [9] 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.
- [10] Andersson C, Piemonte F, Mosialou E, Weinander R, Sun TH, Lundqvist G, et al. Kinetic studies on rat liver microsomal glutathione transferase: consequences of activation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1247**(2): 277 - 283.
- [11] 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.
- [12] Ji Y, Akerboom TP, Sies H. Microsomal formation of S-nitrosoglutathione from organic nitrites: possible role of membrane-bound glutathione transferase[J]. *Biochem J*, 1996, **313**(Pt 2): 377 - 380.
- [1] Svensson R, Rinaldi R, Swedmark S, Morgenstern R. Re-activity of cysteine-49 and its influence on the activation of

[13] Myers PR, Minor RL Jr, Guerra R Jr, Bates JN, Harrison DG. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived re-

laxing factor more closely resemble *S*-nitrosocysteine than nitric oxide[J]. *Nature*, 1990, 345(6271):161 - 163.

Mechanism of the activation of rat liver microsomal glutathione transferases by nitrosoglutathione *in vitro*

SHI Qiang, LOU Yi-Jia

(Department of Pharmacology and Toxicology, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract: **AIM** To explore if nitrosoglutathione (GSNO) can activate rat liver microsomal glutathione transferases(mGST) *in vitro* via cysteine *S*-nitrosylation. **METHODS** Partially purified mGST was incubated with GSNO *in vitro*, kinetic parameters of mGST were measured. *N*-ethylmaleimide (NEM) reactivation and dithiothreitol (DTT) reversibility tests were performed, combined with the changes of free sulfhydryl group and *S*-nitrosylated protein, to demonstrate the relevant mechanism. **RESULTS** Rat mGST was activated by GSNO in a concentration- and time-dependent manner, within the concentrations of 0.125 - 2 mmol · L⁻¹. NEM failed to reactivate the GSNO pretreated mGST, while DTT almost

completely reversed the effect of GSNO. After incubated with GSNO, free sulfhydryl group in partially purified mGST significantly reduced, and *S*-nitrosylated protein increased, both in a concentration-dependent manner. **CONCLUSION** Rat liver microsomal glutathione transferases could be activated by GSNO, possibly *via S*-nitrosylation of the single cysteine(Cys⁴⁹) in mGST.

Key words: microsomes; glutathione transferases; enzyme activation; nitrosoglutathione

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

(本文编辑 乔虹)