

牛磺酸对次氯酸诱导的大鼠肝细胞核核糖三磷酸酶损伤的保护作用

李菊香^{1*}, 李载权², 庞永正², 唐朝枢^{1,2}, 杜军保²

(1. 北京大学 医学部 生理学和病理生理学系, 北京 100083; 2. 北京大学 第一医院 心血管研究所, 北京 100034)

摘要: 目的 探讨牛磺酸对次氯酸(hypochlorous acid, HOCl)诱导的大鼠肝细胞核核糖三磷酸酶(NTPase)损伤的保护作用。方法 体外分离大鼠肝细胞核,用HOCl单独或与牛磺酸共同孵育,分别以ATP和GTP作底物检测核NTPase的活性。结果 ATP和GTP作底物时,HOCl($1 \times 10^{-9} \sim 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)以浓度依赖的方式抑制NTPase活性。牛磺酸($1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)可显著拮抗HOCl($1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)导致的NTPase活性降低。另外,牛磺酸($1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)单独孵育肝细胞核,对NTPase有轻度刺激作用。结论 牛磺酸可浓度依赖地拮抗HOCl诱导的肝细胞核NTPase活性下降,此作用可能是其保护机制之一。

关键词: 牛磺酸; 次氯酸; 核糖三磷酸酶; 肝细胞核

中图分类号: R963; R975.5 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)01-0015-04

Taurine protects rat hepatic nuclear nucleoside triphosphatase from hypochlorous-induced suppression

LI Ju-xiang¹, LI Zai-quan², PANG Yong-zheng², TANG Chao-shu^{1,2}, DU Jun-bao²

(1. Department of Physiology and Pathophysiology, Health-Science Center, Peking University, Beijing 100083, China; 2. Institute of Cardiovascular Research, First Hospital, Peking University, Beijing 100034, China)

Abstract: **Aim** Export of mRNA from nucleoplasmic space via the nuclear pore complex requires nuclear nucleoside triphosphatase (NTPase) activation. It is widely believed that taurine plays important role in protecting cells from toxic injury by functioning as an antioxidant. To investigate whether taurine can directly protect nuclei NTPase from HOCl induced damage, the effects of taurine on NTPase due to incubation with HOCl were studied. **Methods** Isolated hepatic nuclei from rat liver were exposed to HOCl with or without taurine. The NTPase activities on nuclei were assayed using ATP and GTP as substrates. **Results** Incubation of rat hepatic nuclei with HOCl ($1 \times 10^{-9} - 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) resulted in a concentration dependent decrease in nuclear NTPase activity ($P < 0.01$). The reduction of NTPase activities induced by HOCl ($1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was antagonized by taurine from the very low concentration of $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (for ATP and GTP as substrates) ($P < 0.01$). In incubating the nuclei with HOCl ($1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and taurine ($5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), the nuclear NTPase activities reached $(102 \pm 14) \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} (\text{protein}) \cdot 10 \text{ min}^{-1}$ (for ATP as substrate) and $(133 \pm 12) \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} (\text{protein}) \cdot 10 \text{ min}^{-1}$ (for GTP as substrate), which showed significant differences from that of incubating the nuclei with HOCl alone [(44 ± 5) and $(36 \pm 4) \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} (\text{protein}) \cdot 10 \text{ min}^{-1}$] ($P < 0.01$). In addition, incubation of hepatic nuclei with taurine ($1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) slightly increased the nuclear NTPase activity, as compared with that of the control group ($P < 0.01$), indicating that taurine itself showed NTPase-stimulating effect. **Conclusion** These data demonstrate that taurine antagonistically attenuated the toxicity of HOCl to the NTPase, indicating that nuclear NTPase would be one of the favorable targets of OCl^- and taurine protects nuclear NTPase.

Key words: taurine; hypochlorous acid; nuclear nucleoside triphosphatase; hepatic nuclei

收稿日期: 2002-01-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070308).

* 通讯作者 Tel: 86-10-62092183, Fax: 86-10-66176255, E-mail: lijxl965@hotmail.com

蛋白质表达的过程涉及基因转录、mRNA 出核转运及以 mRNA 为模板的蛋白质翻译等环节。其中 mRNA 出核转运是蛋白质合成的重要步骤之一^[1]。位于核被膜的核苷三磷酸酶 (nucleoside triphosphatase, NTPase) 通过水解 ATP、GTP 和 CTP 等分子中的高能磷酸键, 释放能量来促进核内成熟 mRNA 穿过核孔复合体进入胞浆, 是细胞核 mRNA 出核转运的主要限速酶^[2,3]。次氯酸 (hypochlorous acid, HOCl) 是由中性粒细胞等产生的强氧化剂^[4], 有杀菌作用, 也可损坏宿主组织, 在肝脏缺血、中毒及炎症反应中都起着重要作用。牛磺酸 (2-氨基乙磺酸) 是许多组织细胞内游离氨基酸的主要成分, 有抗脂质过氧化、维持细胞渗透压和调节细胞钙稳态等广泛的作用, 是重要的细胞保护物质^[5], 但其作用机理尚未完全阐明。本实验用 HOCl 和/或牛磺酸孵育离体肝细胞核的方法, 观察 HOCl 对核 NTPase 的作用, 及牛磺酸对 HOCl 作用的影响, 以探讨牛磺酸细胞保护的分子机理。

材料和方法

动物和试剂 Sprague-Dawley 大鼠 (220 ~ 250 g), ♂, 购于北京大学医学部实验动物中心。三磷酸核苷钠盐 (ATP 和 GTP)、牛磺酸和 HOCl 均为 Sigma (Sigma Chemical Co) 产品。DS/PMSF 液 (mmol·L⁻¹): 蔗糖 250, Tris/HCl 50 (pH 7.4), MgCl₂ 5, PMSF 1。STM/PMSF 液 (mmol·L⁻¹): 蔗糖 250, Tris/HCl 50, pH 7.4, MgCl₂ 5, PMSF 1, 乙二醇双胺醚 (EDTA) 1, 二硫苏糖醇 (DTT) 1, leupeptin 0.001, 临用时新鲜配制。以上试剂均为分析纯。

大鼠肝细胞的分离和肝细胞核的制备 肝细胞分离参考 Tomassoni 等^[2]和 Agutter^[3]的方法, 分离的肝细胞用台盼蓝染料排斥法检测细胞活度在 90% 以上。细胞核的制备参考文献^[3]: 细胞悬液匀浆, 离心 (800 × g, 10 min), DS/PMSF 液悬浮沉淀, 差速离心 (70 000 × g, 60 min), 沉淀的细胞核用 STM/PMSF 液重悬, 再于 DS/PMSF 液中差速离心 (70 000 × g, 30 min), 最后沉淀用 STM/PMSF 液悬浮后, 调整细胞核悬液的密度为 5 × 10⁸ · mL⁻¹, 于 -70 °C 保存。按文献^[6,7]报道的方法分别测定肝细胞匀浆和分离的细胞核中 NAD 焦磷酸化酶、甘露糖-6-磷酸酶和 NADPH 细胞色素 C 还原酶的活性以鉴定分离细胞核的纯度。

实验分组 用下列不同试剂孵育离体的肝细胞核 (4 × 10⁸ · mL⁻¹): 单纯的孵育液作为对照; 不同浓

度的 HOCl (1 × 10⁻⁹ ~ 5 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹) 孵育; 不同浓度的牛磺酸 (1 × 10⁻⁶, 1 × 10⁻⁵ 和 1 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹) 孵育; 不同浓度的牛磺酸 (1 × 10⁻⁷ ~ 1 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹) 分别与 HOCl (1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹) 共孵育。30 °C 震荡孵育 10 min。孵育结束后, 放置于冰浴中终止反应, 离心后洗涤细胞核沉淀, 再用 STM/PMSF 液重悬, 将溶液进行蛋白定量, 并调整至 1 g·L⁻¹ 蛋白。

核 NTPase 活性的测定^[8] 取上述肝细胞核悬液 200 μL, 于 30 °C 温育 10 min 后分别加入 1 mmol·L⁻¹ 的三磷酸腺苷 (ATP) 或三磷酸鸟苷 (GTP) 以启动 NTPase 酶促反应, 10 min 后加入 10% 的十二烷基磺酸钠 (SDS) 并置冰浴终止反应, 按测定产生的无机磷 (Pi) 含量, 计算相应的 NTPase 活性, 单位为 nmol·mg⁻¹ (protein)。预实验的结果表明, 在 30 min 内, NTPase 活性与孵育时间呈直线关系, 本试验选用孵育时间为 10 min。

统计分析 6 次独立实验, 每次实验设平行管。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析后, 用 Student-Newman-Keuls 检验作统计学处理, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

结果

1 大鼠肝细胞核纯度的鉴定

本实验制备的大鼠肝细胞核悬液中核标志酶 NAD 焦磷酸化酶的活性为细胞匀浆的 7 倍, 分别为 25.8 ± 1.3 和 3.68 ± 0.27 nmol·mg⁻¹·min⁻¹, $P < 0.01$; 而微粒体膜标志酶 NADPH 细胞色素 C 还原酶活性仅为肝细胞匀浆的 28%, 分别为 2.88 ± 0.22 和 10.3 ± 0.9 nmol·mg⁻¹·min⁻¹, $P < 0.01$; 同时存在于微粒体和细胞核的标志酶甘露糖-6-磷酸酶活性约为肝细胞匀浆的 4.5 倍 91 ± 6 和 412 ± 22 nmol·mg⁻¹·min⁻¹, $P < 0.01$, 表明所得肝细胞核纯度较高, 其他亚细胞器污染较少。

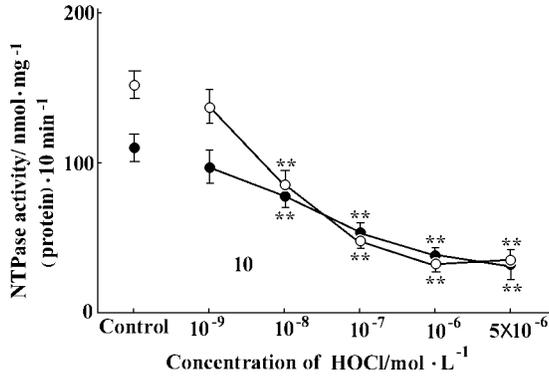
2 次氯酸对肝细胞核 NTPase 的抑制作用

ATP 或 GTP 作底物时, HOCl (1 × 10⁻⁹ ~ 5 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹) 浓度依赖地抑制肝细胞核 NTPase 活性 (图 1)。5 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ HOCl 孵育肝细胞核后, 与对照组相比, NTPase 活性分别下降了 70.0% 和 76.3% ($P < 0.01$)。

3 牛磺酸对肝细胞核 NTPase 活性的影响

用不同浓度牛磺酸 (1 × 10⁻⁶, 1 × 10⁻⁵ 和 1 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹) 孵育肝细胞核, 无论是 ATP 或 GTP 作底物, 呈浓度依赖地增强核 NTPase 活性。较高浓度的牛磺酸可使 NTPase 的活性显著增强, 当牛磺酸浓

度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, NTPase 活性分别较对照组增加 18.1% (ATP 作底物) 和 27.3% (GTP 作底物) ($P < 0.01$)。见表 1。



●—● ATP; ○—○ GTP

Figure 1 Inhibitory action on hepatic nuclear NTPase activity of hypochlorous acid. Rat isolated hepatic nuclei were incubated with different concentrations of HOCl *in vitro*. NTPase activities ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$) were assayed using ATP and GTP as reaction substrates. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

Table 1 Effect of taurine on hepatic nuclear NTPase activity

Taurine/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ATP/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$	GTP/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$
0 (Control)	127 ± 7	150 ± 9
1×10^{-6}	136 ± 9	168 ± 10*
1×10^{-5}	148 ± 7**	179 ± 11**
1×10^{-4}	150 ± 8**	191 ± 12**

Isolated hepatic nuclei from rat were incubated with different concentrations of taurine *in vitro*. NTPase activities ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$) were assayed using ATP and GTP as reaction substrates. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

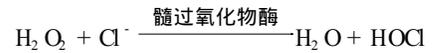
4 牛磺酸对次氯酸诱导的核 NTPase 活性的影响

$1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HOCl 孵育细胞核显著抑制了核 NTPase 的活性。与对照组相比, NTPase 活性下降了 65.4% (ATP 底物) 和 76.0% (GTP 底物) ($P < 0.01$)。牛磺酸($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 浓度依赖地对抗了 HOCl 诱导的 NTPase 活性的抑制。 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HOCl 和 $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛磺酸共同孵育细胞核, 使 NTPase 活性较 HOCl 单独孵育增加了 132% (ATP 底物) 和 269% (GTP 底物) ($P < 0.01$); 接近对照水平(分别为对照组的 80.3% 和 88.7%)。

讨论

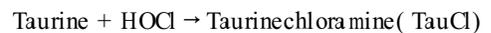
NTPase 活性依赖镁、锰等离子, 对高能磷酸化合物的水解能力依次为 $\text{UTP} > \text{GTP} > \text{ITP} > \text{CTP} >$

ATP, 可受到多种因素的影响, 细胞信号分子, 如胰岛素、表皮生长因子等通过相应的细胞信号转导途径影响 NTPase 的活性^[3,9]。近年发现, 细胞核被膜脂质过氧化抑制核被膜 NTPase 的活性, 提示该酶可受到氧化应激的损伤^[8]。HOCl 在机体氧化还原反应和氧化应激、炎症等病理情况下产生^[10]。活化的中性粒细胞产生超氧离子和过氧化氢 (H_2O_2), 并释放血红素髓过氧化物酶。后者通过下述反应将氯化物转化为 HOCl。



HOCl 能与多种生物活性分子发生反应^[11]。其中与蛋白质中巯基的反应性最强, 该部位也是细胞中氧化反应的关键部位^[12]。本实验中, HOCl 浓度依赖地降低 ATP 和 GTP 底物时核 NTPase 的活性。等分子的底物浓度相比, GTP 作底物时 NTPase 活性高于 ATP。牛磺酸在离体的情况下, 以浓度依赖的方式拮抗 HOCl 对 NTPase 的抑制作用, 表明核 NTPase 是 HOCl 攻击的目标之一, 牛磺酸对 NTPase 有保护作用。

HOCl 作用于 NTPase 分子靶部位和机制, 可能是由于 HOCl 氧化了该酶的巯基, 从而导致 NTPase 的结构、变构能力和与其它分子亲和力发生改变, 并影响其酶活性。有实验表明, 牛磺酸与 HOCl 反应可产生稳定的产物—牛磺酸的氯化物 (TauCl)^[5]。



后者性质比较稳定, 寿命较长, 是牛磺酸发挥细胞保护作用的关键物质^[5]。本实验中牛磺酸对 NTPase 的保护作用是否与 TauCl 的作用有关有待进一步研究。另外本实验还观察到牛磺酸对 NTPase 有轻度的激活作用, 提示其具有胰岛素样作用, 与文献^[13]报道一致。

人体内的牛磺酸可由含硫氨基酸, 如蛋氨酸、半胱氨酸, 在半胱亚磺酸脱羧酶等的作用下, 经半胱亚磺酸脱羧途径合成。人体合成牛磺酸的能力较弱, 合成量满足不了机体的需要, 体内牛磺酸主要从动物膳食摄取。肾脏可依据机体的需要和膳食中牛磺酸的量, 调节牛磺酸的排出量, 以维持体内牛磺酸的平衡。牛磺酸具有清除自由基等广泛生物学效应, 它对维持机体的正常功能具有重要意义。牛磺酸缺乏会对机体的许多器官、系统产生不利影响, 并引起一系列的生理、病理和生物学改变, 而补充外源性的牛磺酸可大大改善牛磺酸缺乏所引起的症状。本实

验中 HOCl 可强烈抑制 NTPase 的活性从而影响到 mRNA 的出核转运,进一步导致蛋白质合成受阻,因此 HOCl 对 NTPase 的抑制作用可能是肝细胞炎症和损伤时蛋白质合成功能下降的原因之一,是肝脏疾病重要的发病学因素。牛磺酸可以大大减轻氧化毒物所致的肝脏损伤和重量下降,还可以减轻内脏缺血再灌注损伤的程度,对 CCl₄ 所致的肝损伤也有重要的保护作用^[10]。本实验中牛磺酸可有效对抗 HOCl 所引起的 NTPase 活性的下降,以保证 mRNA 的出核转运的顺利进行,从而利于正常和疾病状态下功能蛋白质的合成。因此,牛磺酸对 HOCl 的拮抗作用可能是机体保护肝细胞免受氧化应激损伤的重要机制之一,在肝脏疾病的发病和治疗上可能具有应用价值。

References :

- [1] Izaurralde E, Mattaj JW. RNA export [J]. *Cell*, 1995 ,**81** (2) :153 - 159 .
- [2] Tomassoni ML, Amori D, Magni MV. Changes of nuclear membrane lipid composition affect RNA nucleocytoplasmic transport [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999 ,**258** (2) :476 - 481 .
- [3] Agutter PS. Influence of nucleotides , cations and nucleoside triphosphatase inhibitors on the release of ribonucleic acid from isolated rat liver nuclei [J]. *Biochem J* , 1980 ,**188**(1) : 91 - 97 .
- [4] Winterbourn CC, Vissers MCM, Kettle AJ. Myeloperoxidase [J]. *Curr Opin Hematol* , 2000 ,**7**(1) :53 - 58 .
- [5] Redmond HP, Fecsi M, Phd PPS, *et al.* Immunonutrition : the role of trurine [J]. *Nutrition* , 1998 ,**14**(7 - 8) :599 - 604 .
- [6] Kornberg A. Determination of NADH pyrophosphorylase activity [J]. *Methods Enzymol* , 1955 ,**2**(9) :670 - 690 .
- [7] Crane FL, Low H. NADH oxidation in liver and fat cell plasma membranes [J]. *FEBS Lett* , 1976 ,**68**(2) :153 - 156 .
- [8] Ramjiawan B, Czubryt MP, Massaeli H, *et al.* Oxidation of nuclear membrane cholesterol inhibits nucleoside triphosphatase activity [J]. *Fre Rad Biol Med* , 1997 ,**23** (4) :556 - 562 .
- [9] Schroder HC, Wenger R, Ugarkovic D, *et al.* Differential effect of insulin and epidermal growth factor on the mRNA translocation system and transport of specific poly (A⁺) mRNA and poly (A⁺) mRNA in isolated nuclei [J]. *Biochemistry* , 1990 ,**29**(9) :2368 - 2378 .
- [10] Bomzon A, Ljubuncic P. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell function in liver disease [J]. *Pharmacol Ther* , 2001 ,**89**(3) :295 - 308 .
- [11] Prutz WA, Kissner R, Koppel WH, *et al.* On the irreversible destruction of reduced nicotinamide nucleotides by hypochlorous acids [J]. *Arch Biochem Biophys* , 2000 ,**380** (1) :181 - 191 .
- [12] Peskin AV, Winterbourn CC. Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols , methionine , and ascorbate [J]. *Fre Rad Biol Med* , 2001 ,**30** (6) :572 - 579 .
- [13] Maturio J, Kulakowski EC. Taurine binding to the purified insulin receptor [J]. *Biochem Pharmacol* , 1988 ,**37**(19) : 3755 - 3760 .