

胎盘型谷胱甘肽 S-转移酶研究新进展

陈建敏 李春海*

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

提 要

主要介绍了近年来关于胎盘型谷胱甘肽 S-转移酶的生化特性、基因结构和调节、在癌及癌前病变中的表达以及与肿瘤细胞耐药性关系研究的新进展。

关键词 胎盘型谷胱甘肽 S-转移酶, 基因家族, 基因结构, 肿瘤标志, 肿瘤细胞耐药性

致癌原等代谢产生的亲电子物质共价结合至生物大分子, 尤其是细胞中的 DNA, 是肿瘤启动的关键因素。谷胱甘肽 S-转移酶 (EC 2.5.1.18 glutathione S-transferase, GST) 能够催化具有亲核位点的谷胱甘肽 (GSH) 竞争性地与上述基因毒性的亲电子物质结合, 从而保护 DNA 分子免受损伤, 在细胞解毒中起着重要作用。迄今的研究表明, 至少存在四个不同的 GST 基因家族, 即 α 、 μ 、 π 和一种微粒体同功酶, 其中前三者均为胞浆蛋白质。同一基因家族的 GST 同功酶表现为 N-末端氨基酸序列的高度同源、高度的免疫学交叉反应性和酶特异底物的一致性^[1]。近年来, 国内学者已相继从人肝、胎盘中纯化了 GST 的各种同功酶, 并发现肝脏中的碱性同功酶可作为肝癌诊断的血清学标志^[2-5]。本文仅就属于 π 基因家族的胎盘型 GST 同功酶研究的新进展综述如下。

1 胎盘型 GST 同功酶的生化特性

胎盘型 GST 同功酶包括大鼠和人胎盘型两种, 分别称为 GST-P 和 GST- π 。它们由大鼠和人胎盘中分离纯化, 并且是胎盘中仅有的一种 GST 同功酶形式。表 1 列出了 GST-P 和 GST- π 的部分分子特性, 两者除等电点有差别外, 生化结构、酶学和免疫学特性均很相似。

Kano 等^[6]从 cDNA 编码序列推出的一级结构表明, GST-P 和 GST- π 氨基酸同源性为

表 1 胎盘型 GST 的分子特性

性 质	GST-P	GST- π
来源	大鼠	人
分子量	48kD	45kD
亚基组成	同二聚体 (YpYp 或 7-7)	同二聚体
亚基分子量	24kD	23kD
等电点	7.0	4.8
底物特异性	1,2-二氯-4-硝基苯 (CDNB)	CDNB
免疫学交叉反应性		
抗 α 类抗体	—	—
抗 μ 类抗体	—	—
抗 π 类抗体	+	+
氨基酸组成	209	209
氨基酸同源性	85.6%	

85.6%。最近 Ahmad 等^[7]用蛋白质序列分析技术测定了 GST- π 的一级结构, 结果见图 1。Ahmad 认为在所研究的个体胎盘中, 至少有两个 GST- π 基因同时表达, 在 GST- π 的基因座可能存在等位基因多态性。另外, 在蛋白质结构分析中未发现 GST- π 翻译后修饰的证据。Ahmad 还对人不同类 GST 同功酶的氨基酸同源性进行了比较, GST- π 与人肝 α 、 μ

* 军事医学科学院基础医学研究所。

收稿日期: 1991-02-04 修回日期: 1991-07-02

	1	20	40
GST- π ¹⁾ :	PPYTVVYFPVRGRCAALRMLLADQGSWKEEVTVETWQE		
GST- π ²⁾ :	-----		
GST-P ²⁾ :	---I-----E-T-----IDV-LQ		
	41	60	80
	GSLKASCLYGQLPKFQDGLTLYQSNTILRHLGRTLGLYG		

	---ST-----E-----A-----S-----		
	81	100	120
	KDQQEAALVDMVNDGVEDLRCKYISLIYTNYEAGKDDYVK		

	---K-----GT-----N-----		
	121	140	160
	ALPGQLKPFETLLSQNGGKTFIVGDIQSFADYNLLDLLL		

	---H-----A-----N-----		
	161	180	200
	IHEVLAPGCLDAFPLLSAYVGRLSARPKLKAFLASPEYVN		

	V-Q-----N-----A-----I-----S-----DHL-		
	201	209	
	LPINGNGKQ		

	R-----		

图1 GST-P 和 GST- π 氨基酸顺序的同源性比较

- 1) 为 Ahmad 等^[7]用蛋白质序列分析技术测定的一级结构
2) 为 Kano 等^[8]从 cDNA 编码序列推出的一级结构

类同功酶的同源性均为 26%，而与人肝微粒体同功酶的同源性仅为 10%。

最初曾认为从人肺、红细胞提取的 π 类同功酶可能与从胎盘提取的 GST- π 为同一蛋白质，但相继研究发现这些酶在物理和动力学性质上存在明显的差异。如人肺的 π 类同功酶能被胆红素非竞争性地抑制，而人红细胞的则被胆红素竞争性地抑制。还观察到植物酚 (plant phenol) 对三者的抑制作用各不相同。进一步的结构分析表明，三种 π 类同功酶的高效液相层析肽谱图呈现明显的差异，经 SV-8 蛋白酶消化后，GST- π 比人肺、红细胞的 π 类同功酶多一条分子量 103000 的多肽^[9]。至于这些同功酶是不同基因表达的产物还是翻译后修饰的产物有待进一步的探讨。

对于 GST- π 活性中心的结构尚未确定。一般认为，GST 活性部位具有一个 GSH 的结合位点和一个亲电子物质的结合位点。有证据表明，第 47 位的半胱氨酸^[9]和第 162 位的组氨酸^[9]可能参与 GST- π 的活性部位，其中后者

可能是 GSH 结合位点上的一个关键残基。最近，GST- π 已经结晶成功，这为进一步研究它的结构和功能奠定了基础^[10]。

2 胎盘型 GST 同功酶的基因结构和调节

对 GST-P 和 GST- π 的基因序列分析证实，两者的基因结构与排列极为相似 (见图 2)。

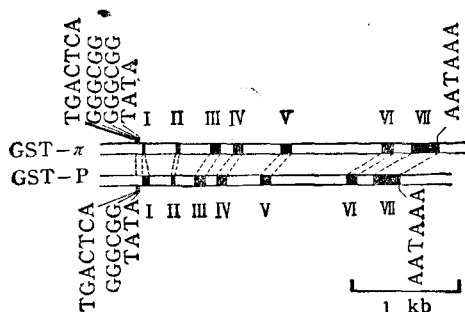


图2 GST-P 和 GST- π 的基因结构

两基因均由 7 个外显子间隔 6 个内含子组成，其中外显子 II-VII 高度保守，仅位于 5' 端非

翻译区的 GST-P 外显子 I 较 GST- π 长一倍;各相应外显子编码的氨基酸数目相同;在 3' 端均含有一个多腺苷酸化信号“AATAAA”;在启动子区域均存在一个“TATA”盒,一个 Spl 识别序列“GGGCGG”(GST- π 有两个)和一个 AP-1 识别序列“TGACTCA”;在转录起始位点 5' 端均有一 200 个核苷酸的富含“G + C”区域。此外,在 GST- π 基因-505 至-413 位核苷酸之间有一富含“A + T”序列,其间共出现 17 个“AAAAT”串联重复序列(tandem repeat)^[11]。

最近 Morrow 等^[12]对 GST- π 基因转录的调节进行了研究。他们将 GST- π 基因的启动子,包括 5' 端 2203 个碱基对、外显子 I 及第 1 个内含子的绝大部分与氯霉素乙酰基转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)的编码基因(cat)融合后,转入人宫颈癌 HeLa 和人乳腺癌 HS5787 细胞中。此基因融合产物(GST-cat)能维持 cat 基因的高水平表达。删除分析(deletion analysis)证明 GST- π 基因启动子区域中-80 到-8 位核苷酸对 cat 基因的表达是必需的。Morrow^[12]还观察了反式调节子对 GST- π 基因转录的作用。多种基因包括 GST-P 和 GST- π 的启动子区域含有 AP-1 识别序列。AP-1 转录因子家族包括 *c-jun*, *v-jun*, *jun-B*, *jun-D*, *c-fos*, *fos-B* 基因产物以及酵母蛋白 GCN4, 通常能够以同二聚体或异二聚体蛋白形式结合至 AP-1 识别序列,从而促进靶细胞转录。含有 AP-1 识别序列的启动子也能被佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, TPA)激活,所以七核苷酸序列“TGACTCA”又称佛波酯反应区(TPA-responsive element, TRE)。Sakai^[13]已证明 TPA 能诱导 GST-P 基因的表达,而 Morrow 的实验表明 TPA 和 *fos*, *jun* 的产物都不能促使 GST- π 基因的转录。Sakai 在 GST-P 基因转录起始位点 5' 发现两个上游增强子,一个含有 TRE 样序列,另一个含有 SV40 和多瘤病毒增强子核心样序列,而在 GST- π 3' 端尚未发现同样序列。因此,尽管 GST-P 和 GST-

π 的基因结构和排列极为相似,两者之间仍存在明显的结构和功能的差异。

3 胎盘型 GST 同功酶在癌及癌前病变中的表达

3.1 GST-P 在大鼠实验性肝癌中的表达

化学致癌剂很容易在大鼠肝脏诱导生成增生性结节(hyperplastic nodule, HN)。在有 HN 的肝脏或肝癌组织中, GST-P 的含量比正常肝脏高 10—100 倍,而且在 GST-P 含量升高以前,免疫组化染色就能在大鼠肝脏检测到 3—5 个 GST-P 染色阳性细胞构成的微小酶变灶,有时甚至可以检测到 GST-P 阳性的单个细胞。这些 GST-P 阳性细胞能在癌变前的相当早期,使用致癌剂 48h 后检测到,并且数目与致癌剂的剂量成正比。GST-P 阳性细胞进一步发展成为癌细胞。GST-P 与其他肿瘤标志酶相比,具有出现时间早、持续时间长、表达稳定等特点,因此被广泛用于大鼠实验性肝癌的研究^[14]。GST-P 在大鼠自发性肝癌中也有过量表达,对其机理正在研究之中^[15]。

3.2 GST- π 在人多种肿瘤组织及患者血清中表达升高,可以作为肿瘤标志

免疫组化染色发现 GST- π 在多种肿瘤组织中均过量表达,其中胃癌的阳性率大于 80%^[16],肺鳞癌的阳性率高达 100%^[17]。Niitsu^[18]采用放免法对消化系统肿瘤患者血清中 GST- π 含量进行了测定,胰腺癌、食道癌、胃癌、胆管癌和结肠癌的阳性率分别为 42, 53, 61, 65 和 77%。而在消化系统非癌疾病中,除被认为属于癌前病变的慢性肝炎、肝硬化 GST- π 表达明显升高外,其余如胃息肉、胃溃疡、结肠息肉等 GST- π 含量均在正常范围。也有学者报道肺腺癌^[19]和原发性肝癌患者^[20]血清中 GST- π 含量显著升高,阳性率为 90% 左右。上述事实说明 GST- π 可作为某些肿瘤的有用标志物。Niitsu^[18]用 GST- π 作为肿瘤标志,即使 I 期胃癌的阳性率也达 47.5%,其他肿瘤标志物的阳性率仅为 10% 左右。还发现 GST- π

含量随肿瘤的进展而升高,如 I,II 期胃癌的阳性率为 50%,III,V 期的阳性率为 80%,胃癌切除后 GST- π 含量降至正常。提示 GST- π 有可能用于监测肿瘤的进展情况和手术治疗效果。

4 胎盘型 GST 同功酶与肿瘤细胞耐药性的关系

肿瘤细胞耐药性是化疗成功的主要障碍,深入了解其发生机理是提高肿瘤化疗水平的关键步骤。自从 Wang^[21] 首次报道 GST 同功酶的异常表达与肿瘤细胞的耐药性有关以来,越来越多的研究表明了此现象的普遍性。目前已证实 α 类同功酶的表达能提高细胞对烷化剂类药物的抗性。GST- π 不仅在人多数肿瘤组织中异常表达,而且在多种具有耐药性肿瘤细胞株中过量表达,更是引起了人们的兴趣。Battist 等^[22]发现 GST- π 的活性在 Adr^R MCF-7 (耐阿霉素的人乳腺癌细胞株,具有多重耐药表型)中提高 45 倍,并且在接触阿霉素长达 10 个月的过程中, GST- π 的酶活和细胞的耐药性相当稳定,提示 GST- π 的异常表达与 Adr^R MCF-7 细胞的耐药性有关。但对于酶活性的升高是耐药表型的原因还是结果意见不一。为了弄清 GST- π 与肿瘤细胞耐药性的关系, Nakagawa^[23] 在 c-H-ras 癌基因转化的 NIH-3T3 细胞成功地构建了两个转染有 GST- π cDNA 的转化细胞系——RGN1 和 RGN2。这两个转化细胞系均表达相同水平的 α 类和 μ 类同功酶以及多重耐药基因,从而排除了这些因素对肿瘤细胞耐药性的影响,得以单独观察 GST- π 的作用。研究结果发现两个转化细胞系提高了对 ethacrynic acid 和阿霉素的抗性,将 GST- π 基因导入酿酒酵母中也提高了细胞对苯丁酸氮芥和阿霉素的抗性^[24]。以上结果提示 GST- π 在肿瘤细胞耐药性产生中起着重要

作用。此外还有其他一些证据,如小细胞肺癌与其他类型肺癌相比,对化疗最为敏感。Eimoto^[17] 对不同类型肺癌作免疫组化染色,只有小细胞肺癌不表达 GST- π 。Lafuente^[25] 检测膀胱移行上皮癌组织中 GST- π 含量较正常对照组高 10 倍,并将此发现与临床上膀胱移行上皮癌对化疗不敏感相联系。

GST- π 的异常表达使肿瘤细胞对某些化疗药物的抗性升高,其机理可能与这些抗肿瘤药物具有亲电子特性,为 GST- π 的底物有关。GST- π 催化 GSH 与这些化疗药物的结合,从而保护细胞免受它们的损伤,其实质是机体防御机制的一种体现。因此,对于那些具有较高 GSH 和 GST- π 活性的肿瘤组织,如果采用非 GST- π 底物的化疗药物,有可能提高临床化疗水平。

参 考 文 献

- 1 Boyer T D. *Hepatology*, 1989; 9: 486
- 2 李春海,谭子兴. *生物化学杂志*, 1989; 5: 78
- 3 李春海等. *生物化学杂志*, 1991; 7: 135
- 4 Li C H *et al.* *J Tumor Marker Oncology*, 1990; 5: 211
- 5 李春海等. *上海免疫学杂志*, 1989; 9: 294
- 6 Kano T *et al.* *Cancer Res*, 1987; 47: 5626
- 7 Ahmad H *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1990; 278: 398
- 8 Ahmad H *et al.* *Enzyme*, 1989; 42: 129
- 9 Lo Bello M *et al.* *FEBS Lett*, 1990; 263: 389
- 10 Parker M W *et al.* *J Mol Biol*, 1990; 213: 221
- 11 Morrow C S *et al.* *Gene*, 1989; 75: 3
- 12 Morrow C S *et al.* *Gene*, 1990; 88: 215
- 13 Sakai M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 85: 9456
- 14 Sato K. *Jpn J Cancer Res*, 1988; 79: 556
- 15 Hirotsaki S *et al.* *Hokkaido J Med Sci*, 1990; 65: 201
- 16 尹宗柱等. *中华肿瘤杂志*, 1989; 11: 114
- 17 Eimoto H *et al.* *Carcinogenesis*, 1988; 9: 2325
- 18 Niitsu Y *et al.* *Cancer*, 1989; 63: 317
- 19 Howie A F *et al.* *Clin Chem*, 1990; 36: 453
- 20 林峰,陈惠黎. *生物化学与生物物理进展*, 1990; 17: 371
- 21 Wang A L *et al.* *Cancer Treat Rep*, 1985; 69: 677
- 22 Battist G *et al.* *J Biol Chem*, 1986; 261: 15544
- 23 Nakagawa K *et al.* *J Biol Chem*, 1990; 265: 4296
- 24 Black S M *et al.* *Biochem J*, 1990; 268: 309
- 25 Lafuente A *et al.* *Cancer*, 1990; 65: 2064