

大鼠肝谷胱甘肽转硫酶的制备及其部分性质的研究

党进军 孙志贤 夏寿萱

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

提 要

本文通过 CM-52 纤维素柱层析分离得到六种大鼠肝谷胱甘肽转硫酶同工酶; 经 GSH-亲和层析柱进一步纯化, 得到纯酶。讨论了该酶的部分理化性质。抑制实验结果表明, 胆酸类化合物对谷胱甘肽转硫酶的抑制作用类型为非竞争性。

谷胱甘肽转硫酶 (Glutathione S-transferase, Ec2、5、1、18; 简称 GST) 是机体内一种具有重要解毒作用同工酶家族。它能催化大量带有亲电中心的疏水化合物 (包括许多致癌剂和诱变剂) 与还原型谷胱甘肽结合, 而且还能共价或非共价地与非底物配基 (如胆红素、胆酸等) 以及多种疏水化合物结合, 具有结合蛋白解毒功能^[1-3]。

GST 广泛存在于动物和人体的多种组织中, 以肝脏中含量最高, 约占肝可溶性蛋白的 10%^[4]。本文对大鼠肝脏 GST 同工酶进行了分离, 并对其部分性质进行了鉴定。

材 料 与 方 法

1. 试剂 DEAE-52 和 CM-52 纤维素为 Whatman 产品; 环氧活化 Sepharose 6B 为 Pharmacia 产品; 还原型谷胱甘肽 (GSH) 为上海酵母厂产品; 1-氯-2, 4-二硝基苯 (CDNB) 为 Baker 产品; 鹅脱氧胆酸和胆酸钠为 Serva

试剂, 脱氧胆酸钠为 Carl Roth 试剂; 牛血清白蛋白为北京红星生化制品厂生产 (电泳纯)。

2. GSH-亲和层析柱制备 见 Simons 等人方法^[5]。

3. GST 同工酶制备 将大鼠 (本院动物场饲养; 雄性, 体重约 180 克) 断头活杀取出肝脏。4℃ 下生理盐水清洗后加入二倍体积缓冲液 A (10mmole/L Tris-HCl, pH8.0) 匀浆, 经 106,000g 离心 60 分钟去除沉淀及漂浮脂肪。然后按 Habig 等人^[6]方法将匀浆上清液过 DEAE-52 和 CM-52 柱。层析中用 Pharmacia UV-2 紫外监测系统检测 OD₂₈₀ 蛋白吸收变化。最后用 GSH-亲和层析柱对 GST 同工酶进一步纯化, 在用缓冲液 B (10mmole/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.7) 洗至流出液无蛋白吸收后, 用 20ml 50mmole/L 磷酸盐缓冲液 (含 10mmole/L GSH, pH9.6) 将 GST 洗脱下来。

4. GST 酶活性测定 采用 Habig 等的紫外吸收测定法^[6]。以 CDBN 和 GSH 为底

Analysis, Edited by Marshall Elzinda, 1982, p27—68.

[2] Chang J. Y.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 578, 188.

[3] Wittmann-Liedolb, B. et al.: *Methods in peptide and Protein Sequence Analysis*, Editor by Chr Birr, Elsevier/North-Holland, 1980, p49—72.

[4] 徐秀璋等: 《生物化学与生物物理进展》, 1982, 1, 32。

[5] Chang J. Y. et al.: *Biochem. J.* 1976, 153. 607.

[6] Chang J. Y. et al., *J. Chromatog.* 1977, 132. 303.

[7] Chang J. Y.: *Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis*, Editor by Chr Birr, Elsevier/North-Holland, 1980, p115—122.

[8] Machleidt, W. et al.: *Methods in Protein Sequence Analysis*, Edited by Marshall Elzinga 1982, p 173—180.

[本文于 1987 年 5 月 27 日收到]

物,在 340nm 波长处记录 GST 酶促生成产物引起的光吸收增值。酶活力单位定义为: 25℃ 时每分钟催化生成 1 μ mole/L 产物所需的酶量。蛋白质含量测定采用 Bradford 考马氏亮蓝染料法^[7],以牛血清白蛋白作为标准。

5. SDS-PAG 电泳 按 Laemmli 方法^[8]。

6. IEF-PAG 电泳 等电点测定方法见参考文献^[9]。

7. 酶活力抑制实验 选用四种胆酸(鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、胆酸钠和胆酸甲酯)作为酶抑制剂。每一种胆酸取三种不同浓度(0.25、0.50 和 1.0mmole/L) 分别对四种底物浓度(0.33、0.67、1.0 和 1.33mmole/L CDNB) 作酶活力抑制测定。每个实验点重复二次。

结 果

1. 大鼠肝 GST 同工酶的分离纯化

分离 GST 时,首先采用 DEAE-52 柱层析可除去大量杂蛋白。由于 GST 在 pH 8.0 时不被柱体吸附而直接流出,所以酶活性基本不丢失。用 0—0.75mole/L KCl 对吸附在 CM-52 柱上的 GST 同工酶进行梯度洗脱,可得到六个酶活性峰(见图 1)。根据各活性峰被洗脱下来的位置,并参照 1984 年国际 GST 专题会议上提出的命名原则^[10],这六个活性组分分别为 GST1-1、2-2、3-3、3-4、4-4 和 5-5。最后,分别经 GSH-亲和层析纯化,得到纯酶。表 1 为 GST 同工酶在各步分离纯化的结果。

2. 大鼠肝 GST 同工酶的鉴定

纯化后的 GST 同工酶经 SDS 电泳鉴定结果表明,六个同工酶组分中有五个显示出单一亚基区带,分子量约为 28,000 道尔顿。只有 GST 1-1 在其主要区带下面出现一微弱区带,分子量约为 25,000 道尔顿(图 2)。文献报道^[10] GST 同工酶均为由二个亚基组成的二聚体,主

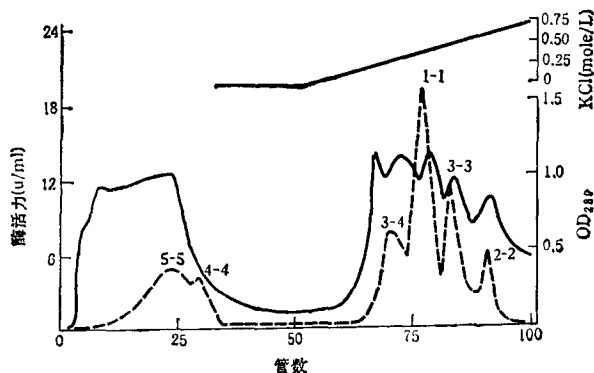


图 1 大鼠肝 GST 同工酶 CM-52 柱层析洗脱图谱

—— OD₂₈₀ 蛋白吸收曲线 - - - - 酶活性测定曲线

要亚基 1、2 和 3 的分子量分别为 25,000、28,000 和 26,500 道尔顿。电泳图谱中呈现出的主要区带为亚基 2,下面的微弱区带为亚基 1。电泳结果中未见其它亚基区带出现。

利用等电聚焦电泳技术测定出 6 种 GST 同工酶的等电点分别约为: GST1-1 = 8.5、2-2 = 8.8、3-3 = 8.6、3-4 = 8.3、4-4 = 8.3、5-5 = 6.5。前五种均为碱性 GST 同工酶。

3. 酶抑制动力学研究

已知胆酸为 GST 的一种抑制剂^[11]。利用

鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、胆酸钠和胆酸甲酯四种化合物分别对各 GST 同工酶进行了酶活力抑制测定。通过不同胆酸浓度对 GST 相对酶活性作图,绘制出四种胆酸的抑制曲线(图 3)。结果表明,每一种胆酸均能使 GST 酶活性受到不同程度的抑制。从图 3 可见,鹅脱氧胆酸的抑制作用最强,脱氧胆酸次之,而胆酸钠和胆酸甲酯的抑制作用较弱。其中胆酸甲酯由于其溶解度所限,未能求出其在高浓度下的抑制效应。表 2 为鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸和胆酸钠对

表 1 大鼠肝 GST 同工酶分离纯化结果

	体积 (ml)	酶活力 (u)	蛋白 (mg)	比活性 (u/mg)
匀浆上清液	135	2,514	2,700	0.93
DEAE-52	160	2,470	752	3.28
Sephadex G-100	150	2,194	645	3.40
CM-52				
GST 1-1	48	577.5	139.2	4.15
2-2	44	191.1	27.3	7.00
3-3	47	401.0	56.4	7.11
3-4	63	271.7	138.6	1.96
4-4	41	152.5	23.8	6.41
5-5	72	380.3	187.2	2.03
GSH-亲和层析				
GST 1-1	12	326.6	31.9	10.25
2-2	10	55.0	4.5	12.22
3-3	25	275.7	19.8	13.92
3-4	12	212.9	17.9	11.89
4-4	12	140.8	8.1	17.38
5-5	12	253.5	14.7	17.24

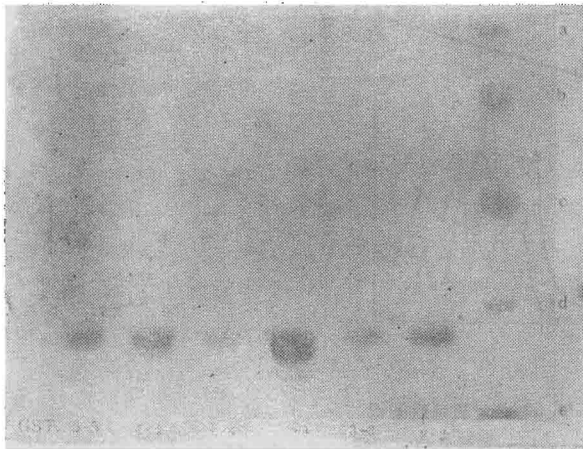


图 2 大鼠肝 GST 同工酶 SDS 电泳图谱

标准分子量蛋白质: a. 磷酸化酶, 94kD; b. 白蛋白, 67kD; c. 卵白蛋白, 43kD; d. 碳酸酐酶, 30kD; e. 胰蛋白酶抑制剂 20.1kD.

GST 同工酶的抑制常数 I_{50} (使酶活性降低 50% 时所需的抑制剂浓度) 的测定值。

关于胆酸类化合物对 GST 酶活性的抑制作用类型, 文献报道不一^[12,13]。我们的抑制实验测定表明, 胆酸类化合物是 GST 的一种非竞争性抑制剂, 四种胆酸对 GST 同工酶的抑制类型基本相同 (图 4)。

讨 论

分离纯化 GST 同工酶的方法较多, 我们在 Habig 等建立的经典制备方法基础上, 增加了 GSH-亲和和层析柱的分离, 较易获得纯酶。

纯化后的大鼠肝 GST 同工酶经 SDS 电泳分析主要为分子量 28,000 的单一亚基区带——亚基 2, 只有 GST 1-1 在其主要区带下有一微弱区带, 其它组分在增大样品量情况下仍未见有其它亚基出现。这一结果表明亚基 2 可能是其它亚基的共同前体, 只是因为制备中未发生降解而未产生其它亚基。1981 年 Scully 等^[14]也曾提出过亚基 1 和 3 是亚基 2 的酶促降解产物的看法。但也有可能由于我们的实验条件不同, 而未能区别并检测出其它 GST 亚基成分, 这有待于进一步的研究来澄清。

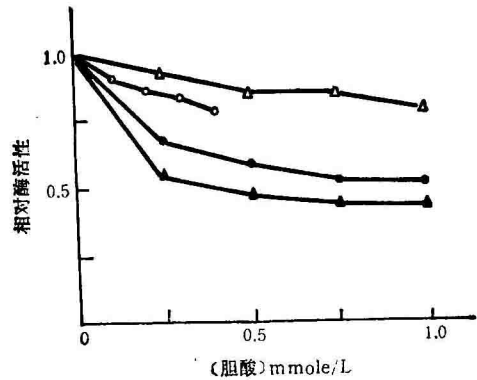


图 3 不同胆酸对大鼠肝 GST 同工酶的抑制作用曲线

(1mmole/L CDNB, 2mmole/L GSH, 0.1mmole/L PB 缓冲液, pH6.7)

△-△-△ 胆酸钠 ●-●-● 脱氧胆酸
○-○-○ 胆酸甲酯 ▲-▲-▲ 鹅脱氧胆酸

表 2 不同胆酸类化合物对 GST 同工酶的抑制常数 (I_{50})

GST	1-1	2-2	3-3	3-4	4-4	5-5
鹅脱氧胆酸 (mmole/L)	0.35	0.20	0.22	0.25	0.24	0.22
脱氧胆酸 (mmole/L)	0.75	0.55	0.56	0.38	0.44	0.40
胆酸钠 (mmole/L)	9.0	4.5	5.5	5.2	4.0	5.0

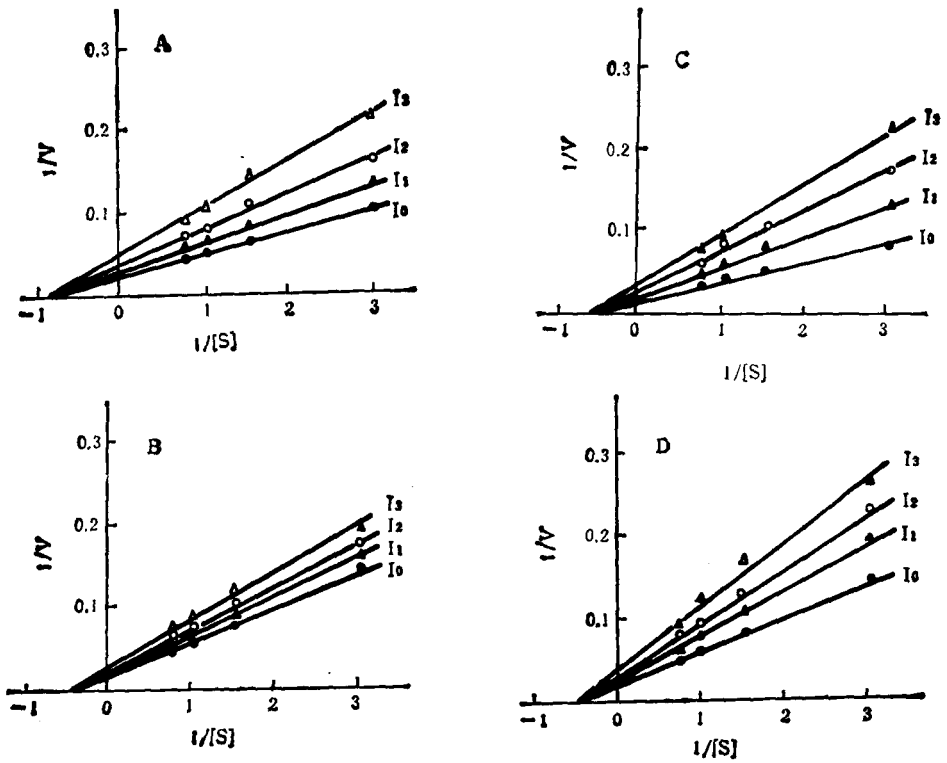


图4 不同胆酸对 GST 5-5 的抑制动力学图谱

A. 胆酸钠 B. 胆酸甲酯
C. 脱氧胆酸 D. 鹅脱氧胆酸

I_0 ——抑制剂浓度为零 I_1 — I_3 ——为不同抑制剂浓度

胆酸类化合物是一种有效的 GST 酶活性抑制剂,抑制实验结果表明, GST 同工酶对不同胆酸抑制作用的敏感性存在着一定的差异,对二羟胆酸(脱氧胆酸和鹅脱氧胆酸)的敏感性明显大于三羟胆酸(胆酸钠)。各种胆酸类化合物的抑制作用类型主要为非竞争性抑制。

参 考 文 献

[1] Booth, J. et al.: *Biochem. J.*, 1961, 79, 516.
[2] Boyer, T. D. et al.: *Biochem. Pharm.*, 1983, 32, 1843.
[3] Harvey, J. W. et al.: *Blood*, 1982, 60, 1227.

[4] Kaplowitz, N.: *Am. J. Physiol.*, 1980, 239, G439.
[5] Simons, P. G. et al.: *Anal. Biochem.*, 1977, 82, 334.
[6] Habig, W. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 7130.
[7] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248.
[8] Laemmli, U. K.: *Nature*, 1970, 227, 680.
[9] 党进军等:《生物化学杂志》,1985, 1, 111.
[10] Jakoby, W. B. et al.: *Biochem. Pharm.*, 1984, 33, 2539.
[11] Vessey, D. A. et al.: *Biochem. J.*, 1981, 197, 321.
[12] Boyer, T. D. et al.: *Biochem. J.*, 1984, 217, 179.
[13] Hayes, J. D. et al.: *Biochem. J.*, 1983, 215, 581.
[14] Scully, N. C. et al.: *Biochem. J.*, 1981, 193, 367.

[本文于 1987 年 4 月 25 日收到]