

中国胎儿肝脏亚细胞谷胱甘肽 S-转移酶活性分布¹

雷少波、彭仁琇 (湖北医学院药理教研室, 武昌 430071, 中国)

Subcellular distribution of glutathione S-transferase in Chinese fetal liver¹

LEI Sao-Bo, PENG Ren-Xiu

(Department of Pharmacology, Hubei Medical College, Wuchang 430071, China)

ABSTRACT Subcellular fractions were isolated from Chinese fetal liver at 4-8 months of age for the determination of glutathione S-transferase (GST). Using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate, GST activity was found to be 66 ± 34 nmol/(min · mg protein), mainly in the cytosol. The GST activities were detected principally in microsomes and their values were 66 ± 31 and 144 ± 83 nmol/(min · mg protein), respectively, when assayed with *p*-nitrobenzyl chloride (PNB) and ethacrynic acid (EA) as substrates. There were no age and sex-related differences in GST activities for any of the substrates studied during fetal development. The K_m values of GST for CDNB, PNB and EA were 1112, 1039 and 205 μ mol/L, respectively. The conjugation of GST may play an important role in fetal hepatic metabolism of toxic electrophiles.

KEY WORDS glutathione transferases; fetus; liver; microsomes; dinitrochlorobenzene; nitrobenzenes; ethacrynic acid

提要 以 1-氯-2,4-二硝基苯 (CDNB) 为底物, 人胎儿肝谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 活性主要分布在细胞浆中, 活性为 66 ± 34 nmol/(min · mg protein); 以对硝基氯苯 (PNB) 及利尿酸为底物, GST 活性主要分布在微粒体中, 活性分别为 66 ± 31 及 144 ± 83 nmol/(min · mg protein)。胎龄及性别对 GST 活性无影响。以 CDNB、PNB 及利尿酸测得 GST K_m 值分别为 1112, 1039 及 205 μ mol/L。

关键词 谷胱甘肽转移酶; 胎; 肝; 微粒体; 二硝基氯苯; 硝基苯; 利尿酸

谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 是一组能催化还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 与一系列不同化合物结合的酶^(1,2), 它对药物或毒物的生物转化或解毒起十分重要的作用, 属于肝生物转化酶系统中 II 相酶。我们已报道了我国人胎肝中 P-450 酶系统的存在及 I 相酶的水平^(3,4)。本文采用 3 种不同底物进一步对我国胎儿肝脏中 GST 水平及其亚细胞组分中的分布进行了探讨, 并观察胎龄及胎儿性别对 GST 活性是否有影响。

MATERIALS AND METHODS

1-氯-2,4-二硝基苯 (1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB) 及 GSH 为 Sigma 产品, 对硝基氯苯 (*p*-nitrobenzyl chloride, PNB) 及利尿酸 (ethacrynic acid) 为上海试剂二厂产品。CDNB (50 mmol/L) 及 PNB (50 mmol/L) 用无水乙醇配制, 利尿酸 (20 mmol/L) 用双蒸水配制。主要仪器有 Shimadzu (uv-3000) 双波长双光束分光光度计及 Beckman (model L7-55) 超速离心机。胎儿 (4-8 个月) 均以水囊引产方式获得, 母亲健康, 无吸烟及饮酒史, 孕期无特殊用药史⁽⁵⁾。

亚细胞组分的分离 用差速离心法⁽⁵⁾分离亚细胞组分。分离肝脏, 称重并剪碎, 用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 的匀浆缓冲液将肝脏制成 25% 的匀浆 (wt/vol)。200 × g 离心 10 min, 保留沉淀部分 (0.2 P), 此部分为细胞核、细胞碎片及未破碎的细胞。上清液经 9000 × g 离心 20 min, 保留少量上清液 (S₉) 及沉淀 (9 P), 此二组分分别为细胞浆及线粒体。余下 9000 × g 上清液再经 105 000 × g 离

Received 1989 Sep 30 Accepted 1990 Jul 2

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China No J-85-289

心 60 min, 沉淀部分即为微粒体. 所得微粒体经 EDTA (10 mmol/L), 1.15% KCl pH 7.4 缓冲液洗涤, 再以 105 000 × g 离心 40 min, 所得微粒体供本实验用. 所有上述过程均在 < 4℃ 下进行. 各离心组分用蔗糖 (0.25 mmol/L) 制成悬液, -80℃ 保存.

蛋白含量测定 用 Folin 酚试剂法⁽⁶⁾. 以牛血清白蛋白作标准.

GST 活性测定⁽⁷⁾ 反应系统中含 0.1 mmol/L, pH 6.5 的磷酸钾缓冲液及不同浓度底物. 实验条件见 Tab 1. 未加酶源的温育液作参比, 加入酶源蛋白后开始反应过程, 测样室反应温度为 25℃, 总容量 2 ml, 活性以 nmol / (min · mg protein) 表示.

Tab 1. Spectrophotometric assay of glutathione S-transferase (GST) in phosphate buffer (0.1 mol/L, pH 6.5) at 25°C.

substrate (mmol/L)	GSH (mmol/L)	λ_{max} (nm)	$\Delta\epsilon$ 1/(mmol · cm)
CDNB 1.0	1.00	340	9.6
PNB 1.0	5.00	310	1.9
EA 0.2	0.25	270	5.0

CDNB = 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene; PNB = p-nitrobenzyl chloride; EA = ethacrynic acid; GSH = reduced glutathione

本文用方差分析处理实验结果.

RESULTS

随 GSH 及酶蛋白浓度增加, 人胎肝 GST 活性也增加, 在一定范围内呈线性关系, 随后达饱和(Fig 1).

CDNB, PNB 及利尿酸分别为不同 GST 同工酶代谢⁽⁷⁾. 人胎肝以上述 3 种化合物为底物的 GST 活性在亚细胞组分中的分布见 Tab 2. 胎肝微粒体代谢 EA 的 GST 活性最高, 在 0.2 P 及 9 P 中的 GST 分别为微粒体酶活性的 13% 及 38%. 代谢 PNB 的 GST 分布情况与代谢利尿酸的相似, 0.2 P 及 9 P 组分中的活性分别为微粒体酶活性的 38% 及 15%. 而以

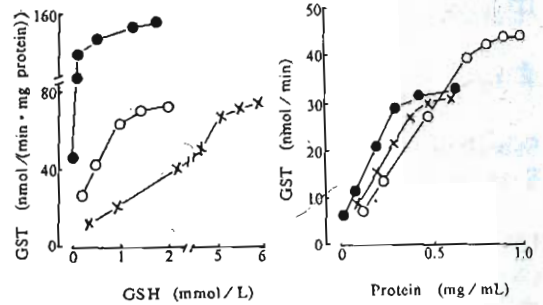


Fig 1. Effects of reduced glutathione (GSH) and protein concentrations on GST activity. (O) 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene, (●) ethacrynic acid, (x) p-nitrobenzyl chloride.

CDNB 为底物, GST 则主要在 S₉ 部分, 微粒体中的活性与 9 P 相似, 约为 S₉ 的 21%. GST 活性有明显个体差异存在.

Tab 2. Distribution of GST activity (nmol / (min · mg protein)) in subcellular fractions. n=25, $\bar{x} \pm SD$. *P>0.05, **P<0.05, *P<0.01 vs microsomes.**

Fraction	CDNB	PNB	EA
microsome	14 ± 8	66 ± 31	144 ± 83
0.2 P	32 ± 22**	25 ± 14***	18 ± 7**
9 P	16 ± 8*	10 ± 11***	54 ± 36***
S ₉	66 ± 34***	19 ± 9***	8 ± 5***

不同胎龄肝脏中 GST 活性无显著性差异. 在男女胎儿的发育期间, 肝 GST 活性也未见显著性差异.

用双倒数作图, 求得以 CDNB, PNB 及利尿酸为底物的 GST K_m 值分别为 1112, 1039 及 205 μmol/L; V_{max} 值分别为 141, 160 及 282 nmol / (min · mg protein) (Fig 2).

DISCUSSION

本文实验结果首次表明我国人胎儿发育期间肝脏已有 GST 活性存在. 其含量与胎龄 (4-8 个月) 和性别无明显相关, 但较国外报道^(8,9) 为低, 原因可能与种族或环境因素⁽¹⁰⁾ 有关. 胎肝中 GST 的活性表明有底物选择性, 在

的药物代谢酶系统, 这一系统的存在对胎儿生理学、药理学及毒理学具有重要意义。

REFERENCES

- 1 Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol* 1985; 57 : 357
- 2 Fukami J. Metabolism of several insecticides by glutathione S-transferase. *Pharmacol Ther* 1980; 10 : 473
- 3 Peng RX, Yao XJ, Chen JH, Li QX, Zhao DJ, Gao P. The capacity of drug metabolism in Chinese fetal liver : I. Presence of P-450 enzyme system. *Asia Pacific J Pharmacol* 1989; 4 : 173
- 4 Peng RX, Lei SB, Gao P. The capacity of drug metabolism in Chinese fetal liver : II. Metabolism of ethylmorphine, aminopyrine and aniline. *Ibid* 1990; 5 : 13
- 5 Rane A, Sjoqvist F, Orrenius S. Drug and fetal metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1973; 14 : 666
- 6 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 7 Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. *Ibid* 1974; 249 : 7130
- 8 Summer KH, Greim H. Hepatic glutathione S-transferase : activities and cellular localization in rat, rhesus monkey, chimpanzee and man. *Biochem Pharmacol* 1981; 30 : 1719
- 9 Mukhtar H, Bend JR. Serum glutathione S-transferase : Perinatal development, sex difference and effect of carbon tetrachloride administration on enzyme activity in the rat. *Life Sci* 1977; 21 : 1277
- 10 Kraus P, Gross B, Kloft HD. The elevation of rat liver glutathione S-transferase activity by alpha-hexachlorocyclohexane. *Biochem Pharmacol* 1981; 30 : 355
- 11 Friedberg T, Bentley P, Stasiecki P, Glatt HR, Raphael D, Oesch F. The identification, solubilization and characterization of microsome-associated glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 1979; 254 : 12028
- 12 Spearman ME, Leibman KC. Effects of aging on hepatic and pulmonary glutathione S-transferase activities in male and female fischer-344 rats. *Biochem Pharmacol* 1984; 33 : 1309

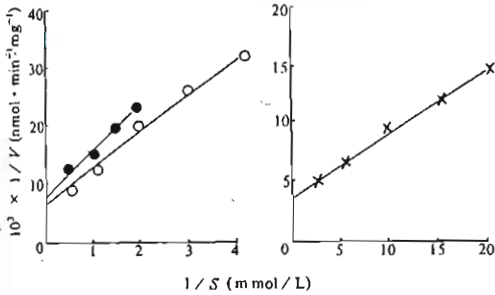


Fig 2. Double-reciprocal plot for human fetal liver GST with different substrates. (O) PNB, $\hat{Y} = 6.267 + 6.510X$, $r = 0.998$, $K_m = 1039 \mu\text{mol/L}$; (●) CDNB, $\hat{Y} = 7.117 + 7.968X$, $r = 0.998$, $K_m = 1112 \mu\text{mol/L}$; (×) EA, $\hat{Y} = 3.543 + 0.726X$, $r = 0.999$, $K_m = 205 \mu\text{mol/L}$

亚细胞组分中呈不均匀分布, 以微粒体和细胞浆为主, 这一结果与文献⁽⁸⁾相符合。由于不同底物为不同的 GST 同工酶所代谢, 且微粒体膜上 GST 同工酶型式与胞浆中的相似⁽¹¹⁾, 因此, 与相应底物结合反应的程度可反映胎肝中 GST 同工酶活性的水平及分布状况⁽¹²⁾。胎肝中以微粒体代谢尿酸的 GST 活性最高, 其 K_m 值小, V_{max} 值大, 表明人胎肝与其它种族的不同之处。

通过肝微粒体 P-450 酶系统作用生成的代谢物可因其仍具有一定亲脂性而停留于微粒体膜上, 不扩散到细胞浆中, 因而不能有效地和胞浆中的 GST 接触, 因此, 微粒体膜上的 GST 对代谢物的进一步失活具有重要意义⁽¹¹⁾。人胎肝细胞浆中, 尤其是微粒体膜上 GST 的存在, 对于由母体经胎盘进入胎儿的外源性化合物的解毒将会有一定作用。

本文与前文^(3,4)实验说明, 人胎肝不仅能通过 P-450 酶系统对药物进行羟化、脱甲基等 I 相反应过程, 还能通过 GST 进行 II 相结合反应。它反映了我国人胎肝中有一套完整