基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.003

氧化型谷胱甘肽对大鼠硫酸基转移酶 1A1 与羟基多氯联苯作用的影响

刘云岗，姜 浩
（南方医科大学公共卫生与热带医学学院毒理学系，广州 510515）

【摘 要】目的：探讨大鼠硫酸基转移酶（Sulfotransferase，SULT）1A1 在巯基部分氧化的状态下对某些羟基多氯联苯（Hydroxylated polychlorinated biphenyls，OH-PCBs）的特异性及酶促动力学的影响。方法：大鼠肝胞液作为大鼠 SULT 的天然来源，大鼠 SULT1A1 则从重组表达的大肠杆菌分离纯化；硫酸基结合速率以辅酶转化产物 3'，5'-二磷酸腺苷的形成来测定；酶蛋白巯基氧化还原状态以氧化型/还原型谷胱甘肽（Oxidized/reduced glutathione，GSSG/GSH）对酶预处理来获得。结果：6'-OH PCB 35、4'-OH PCB 9 及 4'-OH PCB 12 均可在大鼠肝胞液作用下形成硫酸基结合产物；4'-OH PCB 9 和 2-萘酚在用 GSSG 预处理的大鼠 SULT1A1 作用下的硫酸基结合速率降低而底物抑制消除；4'-OH PCB 6 在该酶经 GSSG 预处理后由抑制剂转变为底物，且反应速率随预处理时 GSH/GSSG 中 GSSG 的比例增高而增高；4-OH PCB 14 则仅在该酶经 GSSG 预处理后由抑制剂变为底物。结论：大鼠 SULT1A1 在巯基氧化后可降低 OH-PCBs 等底物的最大反应速度（Maximal velocity，Vmax），同时消除底物抑制；酶的巯基氧化状态使某些作为抑制剂的 OH-PCBs 转变为底物，其反应速率与 GSSG/GSH 相对量有关。

【关键词】大肠杆菌；重组硫酸基转移酶；羟基多氯联苯；氧化型谷胱甘肽
【中国图书分类法分类号】R963 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-04-30

Influence of oxidized glutathione on rat sulfotransferase 1A1 for interactions with hydroxylated polychlorinated biphenyls

LIU Yun-gang, JIANG Hao
(*Department of Toxicology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University*)

【Abstract】*Objective*: The formation of disulfide bond within protein molecules is an outcome of oxidative stress. This study is to investigate the effects of partial oxidation of the sulfhydryl groups in the rat sulfotransferase (SULT) 1A1 protein on its specificity and enzymatic kinetics toward hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs). *Methods*: Rat liver cytosol was used as the native SULTs, and rat SULT1A1 was extracted and purified from recombinant E.coli cells expressing this enzyme; the enzyme activity was assayed by the formation of 3',5'-diphosphoadenosine, the reaction product of the co-factor of SULTs; the redox status of the sulfhydryl groups in the enzyme protein was modeled by pretreatment of the enzyme with oxidized/reduced glutathione (GSSG/GSH). *Results*: 6'-OH PCB 35, 4'-OH PCB 9 and 4'-OH PCB 12 could be conjugated with sulfate group in the presence of rat liver cytosol; the sulfation of 4'-OH PCB 9 and 2-naphthol by GSSG-pretreated rat SULT1A1 demonstrated decreased reaction rates and blockage of substrate inhibition. 4'-OH PCB 6 was converted from an inhibitor to a substrate after pretreatment of rat SULT1A1 with GSSG, and the reaction rate increased along with the increase in the ratio of GSSG/GSH present in the pretreatment; for 4-OH PCB 14, pretreatment of the enzyme with pure GSSG was essential for the conversion of an inhibitor to a substrate. *Conclusion*: After oxidation of the intramolecular sulfhydryl groups, rat SULT1A1-catalyzed sulfation can apparently reduce the maximal velocity (Vmax) of its substrates, such as OH-PCBs, and eliminate substrate inhibition. The oxidation of the enzyme can result in the conversion of some inhibitory OH-PCBs to substrates, and the reaction rate is relevant to the ratio of GSSG/GSH employed for modulating the enzyme.

【Key words】*E.coli*; recombinant sulfotransferase; polychlorinated biphenyls; oxidized glutathione

氧化应激（Oxidative stress）是普遍存在的内源性及外源性刺激因素，它可造成生物大分子的化学修饰及功能改变。例如，过氧化氢可通过使人血管细胞钾通道蛋白的巯基与谷胱甘肽（Glutathione，GSH）形成二硫键从而使该蛋白活性降低[1]；血管内皮细胞一氧化氮合成酶的 S-谷胱甘肽化水平增高妨碍内皮依赖的血管舒张，且这一作用可用硫醇还原剂逆转[2]；大鼠硫酸基转移酶（Sulfotransferase，SULT）1A1 在氧化型谷胱甘肽（Oxidized glutathione，GSSG）作用下分子内半胱

作者介绍：刘云岗（1964-），男，教授，博士，
研究方向：遗传毒理与代谢活化。

基金项目：广东省高等学校人才引进专项基金资助项目（编号：粤财教[2010]343 号）。

氨酸残基间及与 GSSG 间都可形成二硫键，造成该酶的催化动力学和最适 pH 发生改变[3,4]，而 SULT 是生物转化的重要酶。大鼠 SULT1A1 是肝脏表达最优势的 SULT 亚型，其催化机制研究较多。多氯联苯（Polychlorinated biphenyls，PCBs）是一大组具有潜在健康危害的持久性环境污染物，PCBs 的羟化代谢物（Hydroxylated PCBs，OH-PCBs）是其在生物体内氧化产物。此前发现 OH-PCBs 是大鼠 SULT1A1 的底物或抑制物，且 SULT1A1 分子内部分巯基氧化可影响其对OH-PCBs的特异性[5]。本文研究大鼠肝脏细胞液中 SULT 对某些 OH-PCBs 的硫酸基结合作用，以及重组表达的大鼠SULT1A1 的巯基氧化（二硫键形成）对其代谢 OH-PCBs 活性的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

腺苷 3'-磷酸 5'-磷酰硫酸（Adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate，PAPS）、腺苷 3',5'-二磷酸（Adenosine 3',5'-diphosphate，PAP）、PAP-琼脂糖、GSH、GSSG 及 2-萘酚购自 Sigma-Aldrich 公司（St.Louis，MO，USA）。二硫苏糖醇（Dithiolthreitol，DTT）购自 Research Products International 公司（Mt. Prospect，IL，USA）。PAPS 以二乙氨基乙基纤维素（DEAE cellulose，DE52）柱层析法进一步纯化[6]达到 99%以上纯度（用高效液相色谱法鉴定）后才用于本试验。4'-OH PCB 6、4'-OH PCB 9、4'-OH PCB 12、4-OH PCB 14、6'-OH PCB 35（化学结构见图 1）由美国爱荷华大学公共卫生学院环境与职业卫生系 Larry W.Robertson 教授赠送。

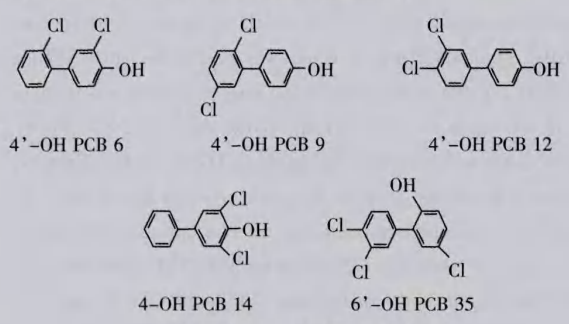


图 1 受试 OH-PCBs 的化学结构

1.2 大鼠肝脏细胞液组分的制备

用差速离心法制备[7]。取 3 只 Wistar 大鼠（雄性，体重 250~300 g）新鲜的肝右叶组织 3 g，剪碎并放入 4 倍容积的预冷含 1.15% KCl 的 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液（pH7.4），用玻璃-聚四氟乙烯匀浆器制备肝匀浆。后者以 13 300 g 在 4℃离心 20 min，所得上清液再以 155 000 g 离心 45 min；最终的上清液即为细胞液组分，存于-70℃备用。细胞液组分的蛋白含量以改良 Lowry 法测定（牛血清白蛋白为标准）。

1.3 大鼠 SULT1A1 的表达分离和纯化

重组表达大鼠 SULT1A1 采用大鼠 SULT1A1 cDNA-pET-3c 载体转染大肠杆菌 BL21（DE3）细胞，在氨苄青霉素选择性培养基上生长[7]。细胞经过超声破碎后所得匀浆在 24 000 g离心 30 min，上清液即为细胞提取液；后者经 PAP-琼脂糖亲和柱层析，并继之以凝胶过滤（PD-10 层析柱，GE Healthcare 公司，Piscataway，NJ，USA）层析制备重组表达的大鼠SULT1A1[8]，用PM-10 滤膜（Millipore 公司，Billerica，MA，USA）正压过滤浓缩洗脱液。所获得的蛋白质产物催化 2-萘酚硫酸酯形成的比活性为（924 ± 23）nmol/（mg·min）（2-萘酚浓度为 50 μmol，反应液 pH5.5，以亚甲兰离子对抽提法[9]测定），与既往报道相符。图 2 为纯化蛋白产物 SDS-PAGE 分析结果，可见所得蛋白有较高纯度。



图 2 大鼠 SULT1A1 蛋白纯化产物（1.5 μg）经 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色的图像

1.4 大鼠肝脏细胞液和大鼠 SULT1A1 催化 OH-PCBs 形成硫酸酯的活性测定

测定 SULT1A1 催化 OH-PCBs 形成硫酸酯的活性采用 2 种方法：亚甲兰离子对抽提产物硫酸酯的方法[9]和依据 PAPS 消耗后产物 PAP 生成的方法[10]。这 2 种方法的反应液均含有 0.25 mol/L 磷酸缓冲液（pH7.0）、0.2 mmol/L PAPS、7.5 mmol/L 二巯基乙醇、不同浓度的 OH-PCBs（OH-PCBs 溶于丙酮且丙酮终浓度小于 3%）及 0.8 mg/ml 细胞液蛋白质，反应在 37℃水浴中进行 10 min。前一方法反应容积为 1.5 ml，亚甲蓝离子对以丙酮抽提后测定 651 nm 波长的吸光度，结合其摩尔吸光系数计算硫酸酯形成的反应率。后一方法反应液容积为 30 μl，反应中辅酶 PAPS 的分解产物 PAP 的形成量用高效液相色谱（High performance liquid chromatography，HPLC）法测定。

对大鼠肝细胞提取液采用上述 2 种方法测定 OH-PCBs 存在下的 SULT1A1 催化活性。对重组表达的纯化大鼠SULT1A1催化的硫酸基结合反应采用上述 PAP 测定法但每个反应（30 μl）加入 0.75 μg 纯化的大鼠 SULT1A1 蛋白，在 37℃水浴中反应 6 min 后测定所生成的 PAP。反应速度以底物依赖的 PAP 形成量计算。底物浓度与反应速度的动力学研究是将二者资料按米氏方程（无底物抑制时）或反竞争性底物抑制模型（存在底物抑制现象）进行拟合：$v=Vmax/[1+(Km/[S])+([S]/Kis)]$（v 为反应速度，Vmax 为最大反应速度，Km 为米氏常数，[S]为底物浓度，Kis 为底物抑制常数）。采用 Sigma

Plot 12.0(Enzyme Kinetics Wizard)对所得酶促反应速度和相应底物浓度进行线性拟合，得出相应酶促动力学参数值。

1.5 GSSG 对大鼠 SULT1A1 催化活性的影响

在用谷胱甘肽预处理酶蛋白之前，酶溶液中所含巯基还原剂 DTT 以 PD-10 凝胶过滤层析法除去[3]。含酶蛋白和 1 mmol/L GSSG 或 GSH 的密闭 Eppendorf 管(充有氩气以防止蛋白自发氧化)在25℃水浴中反应1 h，取1小份酶液用DTNB分析巯基含量以监测 GSH 的消耗[11]。质谱分析发现处理导致酶蛋白亚基 66 位的半胱氨酸与 232 位的半胱氨酸或蛋白分子外的 GSSG 形成二硫键，而在蛋白质亚基内的另外 3 个半胱氨酸残基的巯基仍为还原态[12]。此外，酶蛋白还以 GSSG/GSH 混合物预处理，以谷胱甘肽总浓度为 1 mmol/L，其中GSSG摩尔数占 0%、25%、50%、75%、100%；然后观察上述不同巯基氧化条件下大鼠 SULT1A1 催化反应的特异性和反应率的变化。本文前期工作已证明 4'-OH PCB 6 和 4-OH PCB 14 是蛋白分子巯基还原态大鼠 SULT1A1 的抑制剂，二者却在该酶经 GSSG 预处理后成为底物，且最大反应率所对应的浓度分别为 200 μmol/L 和 100 μmol/L(因反应不符合任何已知模型而未得出 Km 值)；因此对 4'-OH PCB 6 和 4-OH PCB 14 就分别以这 2 个浓度来分析不同巯基氧化条件对酶促硫酸基结合反应率的影响。

2 结 果

2.1 大鼠肝细胞液催化 OH-PCBs 形成硫酸酯

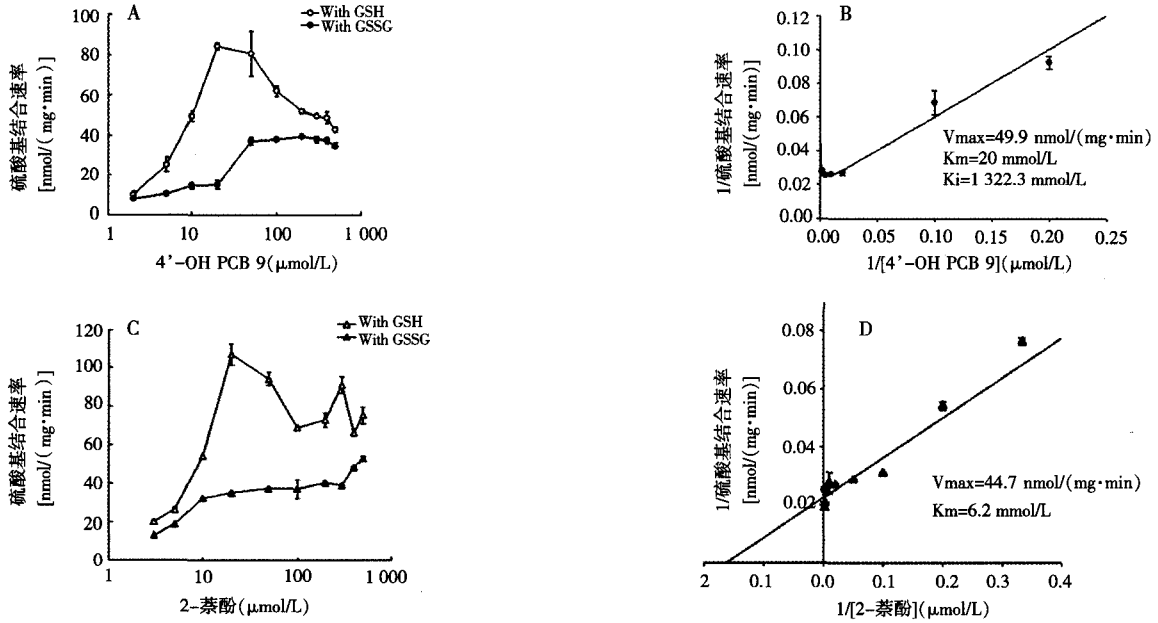
由表 1 可见，2-萘酚和 3 种 OH-PCBs 在大鼠肝脏细胞液作用下形成的硫酸基结合物水平，以亚甲蓝离子对抽提法和 PAP 分析法 2 种方法测定的数值基本一致。其中 2-萘酚是SULT1A1的标志性底物[13]；由于3种OH-PCBs对SULT1A1具有极端强烈的底物抑制效应(反应曲线呈 SULT1A1 催化反应所特有的尖峰状)而无法获得其相应的米氏常数[10]，本试验中所采用的浓度均为已报道的各底物 Vmax 相应的浓度，有利于观察酶活性[10]。

2.2 大鼠 SULT1A1 巯基氧化还原状态对其催化 4'-OH PCB 9 和 2-萘酚硫酸基结合反应的影响

如图 3 所示，GSH 预处理后(还原型)的大鼠 SULT1A1 对 4'-OH PCB 9 和 2-萘酚都催化硫酸基结合反应，且反应率在低浓度上升很快，在约 20 μmol/L 浓度开始转而出现强烈的底物抑制效应，因而呈现尖峰状反应曲线。反之，在GSSG预处理后(氧化型)的大鼠 SULT1A1 作用下 4'-OH PCB 9 和2-萘酚的硫酸基结合反应速率较之 GSH 预处理组下降约 1/2，但底物抑制作用明显减弱(对于 4'-OH PCB 9)或完全消除(对于 2-萘酚)，其 Km 值分别为 20 nmol/(mg·min)和 6.2 nmol/(mg·min)。

表 1 大鼠肝细胞液作用下 2-萘酚和 3 种 OH-PCBs 的硫酸酯形成($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

酶活性测定方法	硫酸基转移反应率[nmol/(mg·min)]			
	2-萘酚(50 μmol/L)	4'-OH PCB 9(20 μmol/L)	4'-OH PCB 12(50 μmol/L)	6'-OH PCB 35(100 μmol/L)
亚甲蓝离子对抽提法	1.6±0.1	1.4±0.1	0.4±0.1	2.3±0.1
PAP分析法	1.6±0.2	1.3±0.1	0.4±0.1	2.4±0.2



A和 C 分别为 4'-OH PCB 9 和 2-萘酚在 GSH 和 GSSG 预处理过的大鼠 SULT1A1 催化下的硫酸基结合剂量-效应关系；B、D 分别为 A、C 中 GSSG 预处理组的数据按照反竞争性底物抑制(Uncompetitive substrate inhibition)模型和普通米氏方程拟合的浓度-反应率双倒数曲线(GSH 预处理组因强烈的底物抑制作用而没有适当的酶促动力学模型进行拟合)，所得动力学参数数值标于图中。数据为 2 个重复观测值的均数±标准误

图 3 4'-OH PCB 9 和 2-萘酚在巯基还原型和氧化型大鼠 SULT1A1 催化下的硫酸基结合反应及其动力学分析

2.3 GSSG/GSH 不同的相对含量对 OH-PCBs 由大鼠 SULT1A1 抑制剂转变为底物的影响

由表 2 可见，4'-OH PCB 6 和 4-OH PCB 14 在用 GSH 预处理（巯基还原型）的大鼠 SULT1A1 的作用下均无硫酸基结合反应。4-OH PCB 14 只对 GSSG（无 GSH）预处理过的酶具有底物活性，而对含 GSSG 25%、50%、75%的混合谷胱甘肽预处理过的酶均不呈现底物活性。不同的是，4'-OH PCB 6 对含 GSSG 25%、50%、75%、100%的混合谷胱甘肽预处理过的酶均呈现底物活性，且活性水平与预处理酶的混合谷胱甘肽中GSSG 所占比例成依赖关系。

表 2 4'-OH PCB 6 和 4-OH PCB 14 由 GSH/GSSG 以不同比例混合预处理大鼠 SULT1A1 后催化的硫酸基转移速率（$\bar{x}\pm s$，n=3）

预处理大鼠 SULT1A1 (GSSG:GSH，mmol/L：mmol/L)	硫酸基转移反应率 [nmol/(mg·min)]	
	4'-OH PCB 6 (200 μmol/L)	4-OH PCB 14 (100 μmol/L)
0：1	0	0
0.25：0.75	9.4±3.7	0
0.50：0.50	30.7±1.4	0
0.75：0.25	35.1±0.7	0
1：0	58.1±2.9	23.8±1.5

3 讨 论

本研究所观察到的大鼠肝脏细胞液对 3 种 OH-PCBs 形成硫酸基结合物的作用，与前期工作发现的作为重组表达的大鼠 SULT1A1 底物的 OH-PCBs 相吻合[10]。并且根据 PAP 生成测定的 SULT 活性与直接测定硫酸基结合产物（亚甲蓝离子对抽提法）的结果比较一致，说明在本研究实验条件下底物依赖性 PAP 形成与硫酸酯生成是等分子数的关系。SULTs 存在于肝细胞等的细胞液中，其中表达最优势的亚型即为 SULT1A1。实验结果虽无法排除大鼠肝脏细胞液中除 SULT1A1外的其它 SULT 亚型参与催化这 3 种 OH-PCBs 形成硫酸基结合物的可能性，但对大鼠 SULT1A1 与它们之间的底物特异性是一个进一步的支持。

SULT 各亚型催化的硫酸基转移反应的一个主要特征就是几乎无一例外的底物抑制作用[3,10,12,14]；尤其是酚类硫酸基转移酶（SULT1）（如大鼠 SULT1A1）催化的反应，异常强烈的底物抑制使反应曲线呈尖峰形，底物浓度高达一定程度可以使反应率下降至零水平，而且不符合目前已知的酶促动力学模型，因而通常得不到确切的动力学参数值[3,10,14]。本研究观察到的 2-萘酚在巯基氧化状态的大鼠 SULT1A1 催化下硫酸酯生成的动力学变化（最大反应速率降低，底物抑制完全消除）与在该酶与其他酚类化合物（如 4-硝基酚）作用中GSSG 的作用相符[3]。本研究发现大鼠 SULT1A1 的巯基氧化状态对 4'-OH PCB 9 形成硫酸酯的影响与对酚类物质反应的影响大致相同，但底物抑制未完全消除，而是明显缓减，以致其浓度-反应率之间能够符合通常的反竞争性底物抑制模型。这一特征是否因 PCBs 与酚类化合物间显而易见的化学结构差异（前者分子包括 2 个以单键连接的苯环，后者则仅有 1 个苯环）有关则有待进一步探讨。

4'-OH PCB 6 在本研究中可作为由 GSSG/GSH 混合物预处理后大鼠 SULT1A1 的底物，且硫酸基转移速率与 GSSG 在混合谷胱甘肽中的分子比例有关。后一现象可能与相对含量不同的 GSSG 预处理该酶后其蛋白分子内部发生 Cys66 二硫键形成的比例不同，若有二硫键形成的酶蛋白分子比例越高，有效催化 4'-OH PCB 6 硫酸基结合的酶分子也就越多，从而导致反应速率增加。尤其重要的是，较低的 GSSG 比例（如 25%）在体内氧化负荷增加而不威胁机体生存的情况下是可能存在的，这就提示在体内氧化应激状况下大鼠 SULT1A1 对某些 OH-PCBs 的特异性可能发生转变：由抑制剂变为底物，其生理意义可能是促进某些 OH-PCBs Ⅱ相代谢以及在此基础上的排泄增加。4-OH PCB 14 与 4'-OH PCB 6 虽然都可在大鼠 SULT1A1 经 GSSG 预处理后转变为底物，但不同的是前者在 GSSG 和 GSH 混合物预处理后的该酶作用下没有观察到硫酸基结合反应。既往研究发现大鼠 SULT1A1、酚类底物和 PAP 之间形成三联体—不活泼终端复合体（Dead end complex）是底物抑制形成的机制[3,12]，而极强的底物抑制可导致表观反应率下降为零；我们最近观察到 4-OH PCB 14 与该酶（及与酶-PAP 复合物）结合的亲和力高于 4'-OH PCB 6（解离常数不及后者的 1/2）[15]，因此可以预期 4-OH PCB 14 在本研究的酶促反应体系中形成不活泼终端复合体的水平可能高于 4'-OH PCB 6。这样看来，一方面在酶经过 GSSG/GSH 混合物的预处理后可能只有部分酶分子发生 Cys66 的二硫键形成，另一方面 4-OH PCB 14 形成“不活泼终端复合体”比较占优势，从而可造成硫酸基结合产物的形成速率低于本研究的酶活性检出限。

参 考 文 献

[1] Yang Y，Shi W，Cui N，et al.Oxidative stress inhibits K(ATP) channels by S-glutathionylation[J].J Biol Chem，2010，285(49)：38641-38648.

[2] Chen C A，Wang T Y，Varadharaj S，et al.S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function[J].Nature，2010，468(7327)：1115-1118.

[3] Marshall A D，Darbyshire J F，Hunter A P，et al.Control of activity through oxidative modification at the conserved residue Cys66 of aryl sulfotransferase Ⅳ[J].J Biol Chem，1997，272(14)：9153-9160.

[4] Chang H J，Shi R，Rehse P，et al.Identifying androsterone (ADT) as a cognate substrate for human dehydroepiandrosterone sulfotransferase (DHEA-ST) important for steroid homeostasis：structure of the enzyme-ADT complex[J].J Biol Chem，2004，279(4)：2689-2696.

[5] Kitada H，Miyata M，Nakamura T，et al.Protective role of hydroxylsteroid sulfotransferase in lithocholic acid-induced liver toxicity[J].J Biol Chem，2003，278(20)：17838-17844.

[6] Sekura R D.Adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate[J].Meth-

基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.004

多药耐药基因 MGMT 在脑胶质瘤干细胞中表达的实验研究

徐忠烨[1]，陈　松[1]，程　远[1]，王志刚[2]
（1. 重庆医科大学附属第二医院神经外科；2. 重庆医科大学超声影像学研究所，重庆　400010）

【摘　要】目的：探讨甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶（Methylguanine-dna methyltransferase，MGMT）在脑胶质瘤细胞和胶质瘤干细胞（Brain glioma stem cells，BGSC）中的表达情况。方法：由手术切除的多形性胶质母细胞瘤中分离培养胶质瘤细胞和 BGSC；应用免疫细胞化学染色和流式细胞术（Flow cytometry，FCW）鉴定 BGSC；应用 RT-PCR 法测定 MGMT mRNA 在胶质瘤细胞、BGSC 和正常脑组织中的表达。结果：本研究中获得的 BGSC 具有典型的 BGSCs 细胞生物学特征和免疫学标记；RT-PCR 检测结果表明 MGMT mRNA 在 BGSC 中的相对表达量明显高于胶质瘤细胞（0.562 ± 0.021 vs 0.112 ± 0.023，$P<0.01$），而胶质瘤细胞MGMT mRNA 的相对表达量明显高于正常脑组织（0.112 ± 0.023 vs 0.005 ± 0.001，$P<0.01$）。结论：多药耐药基因 MGMT 主要在 BGSC 而非胶质瘤细胞中表达，其可能是 BGSC 产生多药耐药性的主要分子机制之一。

【关键词】胶质瘤干细胞；胶质瘤细胞；甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶
【中国图书分类法分类号】R739.41　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2010-03-04

Study on the expression of MGMT gene in glioma stem cells derived from GBM

XU Zhong-ye[1], CHEN Song[1], CHENG Yuan[1], WANG Zhi-gang[2]
(1. Department of Neurosurgery; 2. Institute of Ultrasound Imaging, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To explore the expression of MGMT gene in glioma stem cells and glioma cells derived from glioblastoma. *Methods*: BGSC was isolated from glioblastoma and cultured in vitro, and was identified by immunocytochemical stain and flow cytometry. Relative expression of MGMT gene in BGSC and in glioma cells by RT-PCR was analyzed. *Results*: BGSC from glioblastoma could express Nestin and CD133 antigen, self-renew and differentiate into astrocyte and neuron in vitro. RT-PCR results demonstrated the relative expression of MGMT gene in BGSC was markedly higher than in glioma cells (0.562 ± 0.021 vs 0.112 ± 0.023, $P<0.01$), and the relative expression of MGMT gene in glioma cells was markedly higher than in normal brain tissue (0.112 ± 0.023 vs 0.005 ± 0.001, $P<0.01$). *Conclusion*: The expression of MGMT gene in BGSC is markedly higher than in glioma cells. MGMT may be the key molecular biology mechanism that leads to drug resistance in BGSC.

【Key words】brain glioma stem cells; glioma cells; methylguanine-dna methyltransferase

作者介绍：徐忠烨（1977-），讲师，博士，
研究方向：恶性胶质瘤的临床与基础研究。

基金项目：国家重点基础研究发展计划（973 计划）（编号：2011CB707900）。

ods Enzymol, 1981, 77(5): 413-415.

[7] Wang L Q, Falany C N, James M O. Triclosan as a substrate and inhibitor of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate-sulfotransferase and UDP-glucuronosyl transferase in human liver fractions[J]. Drug Metab Dispos, 2004, 32(10): 1162-1169.

[8] Chen X, Yang Y S, Zheng Y, et al. Tyrosine-ester sulfotransferase from rat liver: bacterial expression and identification[J]. Protein Expr Purif, 1992, 3(5): 421-426.

[9] Sheng J, Sharma V, Duffel M W. Current Protocols in Toxicology[M] (Chapter 4, unit 4.5). 1st Edition. New York: John Wiley & Sons, 2001. 1-9.

[10] Liu Y G, Smart J T, Song Y, et al. Structure-activity relationships for hydroxylated polychlorinated biphenyls as substrates and inhibitors of rat sulfotransferases and modification of these relationships by changes in thiol status[J]. Drug Metab Dispos, 2009, 37(5): 1065-1072.

[11] Jocelyn P C. Spectrophotometric assay of thiols[J]. Methods Enzymol, 1987, 143(1): 44-67.

[12] Marshall A D, McPhie P, Jakoby W B. Redox control of aryl sulfotransferase specificity[J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 382(1): 95-104.

[13] Nowell S, Ambrosone C B, Ozawa S, et al. Relationship of phenol sulfotransferase activity (SULT1A1) genotype to sulfotransferase phenotype in platelet cytosol[J]. Pharmacogenetics, 2000, 10(9): 789-797.

[14] Liu Y G, Apak T I, Lehmler H J, et al. Hydroxylated polychlorinated biphenyls are substrates and inhibitors of human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2A1[J]. Chem Res Toxicol, 2006, 19(11): 1420-1425.

[15] Liu Y G, lehmler H J, Robertson L W, et al. Physicochemical properties of hydroxylated chlorinted biphenyls aid in predicting their interactions with rat sulfotransferase 1A1 (rSULT1A1)[J]. Chemico-Biol Interact, 2011, 189(3): 153-160.

（责任编辑：张学颖）