技术与方法 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.019

测定谷胱甘肽-S-转硫酶动力学参数的变化表征其抑制剂

张 灵,杨晓兰,白 婧,廖 娟,刘红博,廖 飞
(重庆医科大学检验医学院,重庆 400016)

【摘 要】目的:测定谷胱甘肽-S-转移酶(Glutathione-S-transferases,GST)动力学参数变化,建立表征其抑制剂的方法。方法:从猪肝经阴离子交换层析和亲和层析制备 GST 酸性同工酶,用还原型谷胱甘肽(Glutathione,GSH)和 1-氯-2,4-二硝基苯(1,-chloro-2,4-dinitrobenzene,CDNB)合成 S-(2,4-二硝基苯基)-谷胱甘肽(GS-DNB)为候选抑制剂,以 GSH 与 CDNB 为底物测定 GST 在 GS-DNB 作用下的米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_m),从而确定 GS-DNB 对 GST 的抑制常数(K_i)。结果:此 GST 被纯化 146 倍以上,活性总收率近 30%。该 GST 对 GSH 和 CDNB 的 K_m 分别为 42 μmol/L 和 0.86 mmol/L,属于随机双底物动力学模型。GS-DNB 对 CDNB 竞争性 K_i 为(21 ± 1) μmol/L (n=2);对 GSH 竞争性 K_i 为 (17 ± 1) μmol/L (n=2)。结论:产物 GS-DNB 是 GST 的高亲和力竞争性抑制剂;测定 GST 动力学参数随抑制剂浓度的变化可筛选其抑制剂。

【关键词】谷胱甘肽-S-转移酶;抑制剂;还原型谷胱甘肽
【中国图书分类法分类号】Q55 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-06-09

Characterization of an inhibitor on glutathione-S-tranferase by analyzing the changes of kinetic parameters

ZHANG Ling, YANG Xiao-lan, BAI Jing, LIAO Juan, LIU Hong-bo, LIAO Fei
(*College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a method based on analysis of the changes of kinetic parameters to characterize an inhibitor of glutathione-S-transferase (glutathione-S-transferases, GST). *Methods*: The acidic GST isozyme was purified from the porcine liver via anion-exchange chromatography and affinity chromatography. The reaction of glutathione(glutathione, GSH) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(1,-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB) gave S-(2,4-dinitrobenzyl)-glutathione (GS-DNB) as a candidate inhibitor. Michaelis-Menten constant(K_m) and maximal reaction rate(V_m) were estimated to determine the inhibition constant (K_i) of GS-DNB. *Results*: Specific activity of GST was increased by more than 146 times with overall activity yield of about 30%. GST followed random bi-substrate kinetics and had K_m of 42 μmol/L for GSH, and K_m of 0.86 mmol/L for CDNB. The competitive K_i of GS-DNB was (21 ± 1) μmol/L (n=2) against CDNB, and (17 ± 1) μmol/L (n=2) against GSH. *Conclusion*: GS-DNB is an effective competitive inhibitor of GST; the estimation of K_i from responses of K_m and V_m to inhibitor concentrations can be a conventional method to screen GST inhibitors.

【Key words】glutathione-S-transferases; inhibitor; glutathione

谷胱甘肽-S-转移酶(Glutathione-S-transferases,GST)催化还原型谷胱甘肽(Glutathione,GSH)的巯基参与生物转化反应，哺乳动物的多数组织细胞液中有多种 GST 同工酶,其含量和活性各异;肝中 GST 含量最高,总量接近可溶性蛋白的 5%[1-3]。GST 在组织中参与包括肿瘤化疗药物代谢灭活等各种疏水物质的生物转化;GST 抑制剂可增强细胞毒性药物抗肿瘤疗效和直接抑制肿瘤生长[4-6]。GST 为同二聚体,每个亚基有一个活性中心,包含谷胱甘肽结合位点(G-site)和相邻疏水底物结合位点(H-site)[7]。GST 的代表性抑制剂包括依他尼酸(EA)系列、GSH 及其类似物、黄酮类化合物、嘌呤类似物等[4-6]。GST 产物同酶接触位点更多而亲和力可能更高,这是 GST 抑制剂的最简单设计方向,但这些产物合成后难纯化。如能用合成后未纯化 GST 抑制剂混合物直接为样品测定其同 GST 亲和力,无疑更有利于筛选 GST 抑制剂。

最近报道了以混合物为样品基于磁分离和色谱分析测定混合物中特定配体亲和力的新技术[8],预期可用于高通量筛选未纯化的 GST 抑制剂。作为肿瘤化疗药物增敏剂靶点的 GST 应来自人体,但人 GST 难重组表达;人与猪基因相近,猪 GST 同工酶应可为靶蛋白用于初步筛选 GST 抑制剂。哺乳动物 GST 分为 α,μ,π,θ 和 σ 五大类可溶性 GST 及微粒体膜结合同工酶等,它们的等电点常不同。猪肝 GST 主要同工酶

作者介绍:张 灵(1986-),女,硕士,
研究方向:药物筛选生物技术。
通信作者:杨晓兰,女,副教授,Email:xiaolanyang666@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30472139、81071427);
重庆市教委科技资助项目(编号:KJ100313)。

据其氨基酸序列计算，等电点分别为 6.3，8.7，9.6 等（http://www.expasy.org/enzyme/2.5.1.18）。鼠肝中酸性 GST 含量高，纯化容易且收率近 30%[9]。从猪肝纯化其碱性 GST 同工酶的收率低于 10%[10]。GST 的动力学行为很复杂，需测定不同条件下动力学参数的变化才能确定抑制类型和抑制常数。本文制备猪肝酸性 GST 同工酶，以 GSH 与 2,4-二硝基氯苯（CDNB）合成其加合物 S-(2,4-二硝基苯基)-谷胱甘肽（GS-DNB）为 GST 抑制剂，建立测定 GST 动力学参数变化确定抑制剂抑制常数（K_i）的方法，以便作为其它方法快速筛选 GST 抑制剂的参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

还原型谷胱甘肽、DE-52 纤维素均购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司，GSH Sepharose 4B 购自 Sigma-Aldrich 公司，CDNB 购自 ICN 公司，其余试剂均为国产分析纯。荧光硅胶薄层层析（TLC）板购自德国 Merk 公司。

1.2 GS-DNB 的合成

0.50 g GSH（约 1.6 mmol）用 10 ml 蒸馏水溶解，于室温不断搅拌下缓慢滴加用 5.0 ml 无水乙醇溶解的 0.40 g CDNB（约 1.9 mmol），同步用 2.5 mol/L NaOH 维持反应体系 pH7.0~8.0，室温反应 5 h 后减压浓缩去乙醇，用乙醚萃取除去未反应 CDNB，水层用 5.0 mol/L HCl 调 pH 到刚出现浑浊为止，4℃放置析出黄色粉末，减压抽滤，37℃真空干燥至恒重，即得 GS-DNB[11]。

1.3 猪肝酸性 GST 同工酶的制备

1.3.1 猪肝酸性 GST 同工酶的盐析 操作均在 4℃下进行[9]。市售新鲜猪肝 200 g 用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH6.8，含 0.25 mol/L 蔗糖，1.0 mmol/L EDTA，0.50 mmol/L DTT）按 1:2 制备匀浆；10 000 r/min 离心 30 min，上清在搅拌下加入硫酸铵粉末达 45%饱和度；4℃冰箱放置 10 h，10 000 r/min 离心 30 min，上清用 1.0 mol/L NaOH 调 pH8.0，搅拌条件下加入硫酸铵粉末使其达到 85%饱和度；4℃冰箱放置 10 h，10 000 r/min 离心 30 min，弃上清，沉淀用 50 ml Tris-HCl 缓冲液（10 mmol/L，pH8.0）溶解，将溶解液 10 倍蒸馏水透析 12 h，每 6 h 换 1 次透析液以除去样品中的小分子盐。

1.3.2 DE-52 纤维素离子交换层析 将透析液 10 000 r/min 离心30 min，取上清过已用10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH8.0）平衡的 DE-52 纤维素柱，用同样缓冲液洗去疏松结合蛋白，用 0.10~0.40 mol/L NaCl 梯度（10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液，pH8.0）洗脱活性部分，每管收集 3.0 ml 合并其活力高部分[12]；用 1.0 mmol/L GSH 和 CDNB 在 25℃测定酶活性，据 340 nm 吸光度变化按 9.6 L/(mmol·cm) 计算产物生成速度。

1.3.3 GSH sepharose 4B 亲和色谱层析 将上述样品加入用 pH7.3 缓冲液 A（0.14 mol/L NaCl，2.7 mmol/L KCl，10 mmol/L Na_2HPO_4，1.8 mmol/L KH_2PO_4）平衡的 GSH sepharose 4B 亲和色谱柱，用相同缓冲液洗脱 5~10 个柱体积，改用缓冲液 B（pH8.0，50 mmol/L Tris-HCl 中含 GS-DNB 3.0 mmol/L）洗脱，并按活性高低依次收集，4℃透析 24 h 并多次更换 10 mmol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液以除去 GS-DNB。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

用非变性PAGE检查制剂中其它GST同工酶；用SDS-PAGE判断蛋白质的均一性，并初步估算 GST 亚基的分子量。

1.5 酸性 GST 同工酶动力学参数测定

1.5.1 酸性 GST 同工酶活性测定 用含 0.50 mmol/L DE-TAPA的0.10 mol/L pH6.5磷酸盐缓冲液；反应体系为1.2 ml，CDNB和 GSH 终浓度均为 1.0 mmol/L，加入样品量不超过 0.10 ml[12]。25℃每分钟内催化 1.0 μmol 底物转化成为产物酶量为 1 个单位。

1.5.2 蛋白质含量测定 用 Bradford 的考马斯亮蓝 G-250 法[13]。在试管中加入 1.0 ml 考马斯亮兰 G-250 溶液，加入 20 μl 样品，反应 5.0 min 后，在 595 nm 测吸收，对照为考马斯亮兰 G-250 溶液加对应量缓冲液。

1.5.3 酸性GST对GSH和CDNB表观K_m测定 固定 CDNB 为 1.0 mmol/L，GSH浓度从0.04~0.20 mmol/L；固定GSH为 1.0 mmol/L，CDNB 浓度从 0.40~2.0 mmol/L。双倒数分析确定表观 K_m。测定抑制常数时外加设定量 GS-DNB。每种底物用 3 个浓度测定表观初速度，考察抑制动力学机制[12,14]。

1.6 积分法测定酸性 GST 同工酶底物 GSH 的含量

反应体系含 0.10 mol/L 磷酸缓冲液（pH6.5）共 1.0 ml，25 μl CDNB 乙醇溶液（终浓度为 1.0 mmol/L），稀释样品 0.18 ml，记录 340 nm 初始吸收（A_0），再加入适度稀释的 5.0 μl 酶液启动反应，延迟 30 s 后以 10 s 间隔记录吸收变化，直到吸光度变化小于 0.001 或最大吸光度达到 1.200，同时记录反应 30 min 后吸光度为终点平衡法结果作为参考[10]。用自主设计软件 PCFenzyme 分析 GST 反应过程，确定结果最接近于终点平衡法时所需产物抑制常数[15]（下载地址 http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.11.016）。

1.7 统计学处理

结果为均值±标准差（$\bar{x} \pm s$），用 Excel 内嵌统计函数进行统计分析，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

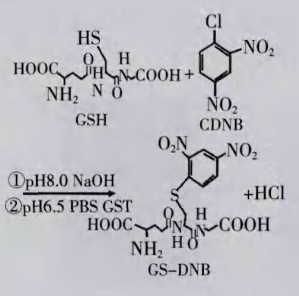


图 1 GS-DNB 合成路线

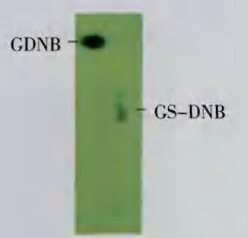


图 2 所得 GS-DNB 的 TLC 分析

2 结果与讨论

2.1 GS-DNB 的合成

参照文献合成并纯化产物[11]，荧光薄层色谱展开，在 254 nm 和 365 nm 两个波长下检测，产物中均无明显杂质；调整展开剂中的乙醇比例，仍没有检测到明显杂质。

2.2 猪肝酸性 GST 同工酶的制备

猪肝匀浆后，经硫酸铵分级、阴离子交换层析、GSH 亲和层析（图 3、4），纯化后酸性 GST 同工酶比活性可达 8.7 U/mg 以上；不考虑其它同工酶的贡献，其纯化倍数也达 146 倍以上，且活性收率近 30%（表 1）。故该 GST 作靶蛋白优于其碱性同工酶。

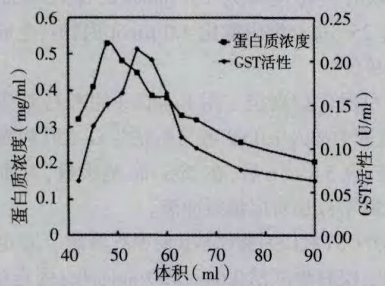


图 3 DE-52 离子交换层析时 GST 洗脱峰图

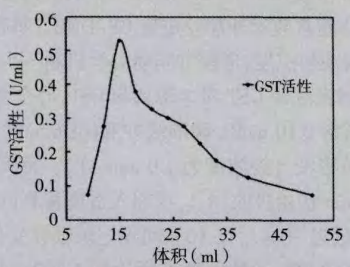
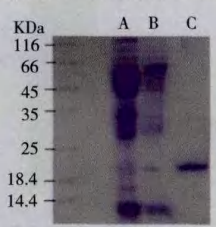
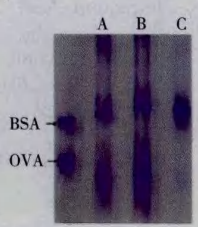


图 4 GSH 亲和层析时 GST 洗脱过程

2.3 GST 同工酶的纯度鉴定

在亲和层析之前，样品中所需 GST 含量均很低而杂蛋白太多；经 GSH sepharose 4B 亲和层析后，样品 SDS-PAGE 电泳仅仅检测到单一多肽，对应所需 GST 亚基分子量约 23 KDa（图 5），与从大鼠肝中所得酸性 GST 同工酶分子量非常接近[9]。非变性 PAGE 电泳中牛血清白蛋白（Bovine serum albumin，BSA）与卵清蛋白（Ovalbumin，OVA）作为参考蛋白，其等电点都接近 5.0，而此酸性 GST 等电点接近 6.3，其分子量虽小于 BSA，但其移动速度慢于 BSA（图 6）；此结果说明样品中其它 GST 同工酶可不计。





A. 硫酸铵沉淀后样品；B. 过 DE-52 纤维素柱后的样品；C. 过 GSH sepharose 4B 柱后的酸性 GST 同工酶

图 5 GST 的 SDS-PAGE 电泳分析　　图 6 GST 的非变性 PAGE 电泳分析

2.4 猪肝酸性 GST 对 GSH 和 CDNB 的 K_m

CDNB为 1.0 mmol/L 时，此 GST 对 GSH 的表观 K_m 为（0.10 ± 0.01）mmol/L（n=3）（图 7）；在 GSH 为 1.0 mmol/L 时，其对 CDNB 的表观 K_m 为（1.2 ± 0.1）mmol/L（n=3）（图 8）。

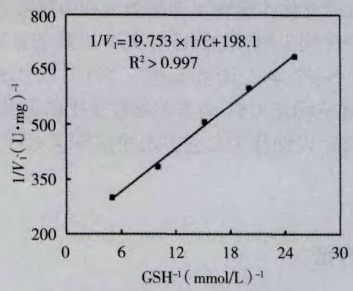


图 7 测定 GST 对 GSH 的 K_m

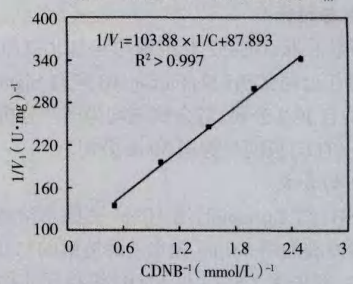


图 7 测定 GST 对 CDNB 的 K_m

此前从猪肝分离碱性 GST 同工酶对 GSH 的表观 K_m 为（0.21 ± 0.02）mmol/L（n=4），对 CDNB 的表观 K_m 为（62 ± 3）μmol/L（n=4）[10]。可见猪肝酸性 GST 同工酶对底物 GSH 与 CDNB 的亲和力与其碱性 GST 同工酶明显不同。

2.5 猪肝酸性 GST 酶促动力学机制和 GS-DNB 抑制类型分析

GST 催化还原型谷胱甘肽巯基（-SH）与疏水化合物反应，可为随机双底物机制或乒乓机制，对不同 GST 同工酶及不同底物浓度水平，其动力学机制可能不同[12,14]。

固定一个底物在不同浓度时双倒数分析此酸性 GST 的初速度所得直线有交点（图 9、10），故此 GST 为随机双底物动力学机制[12,15]。此 GST 酶促反应的双底物反应动力学方程为[12]：

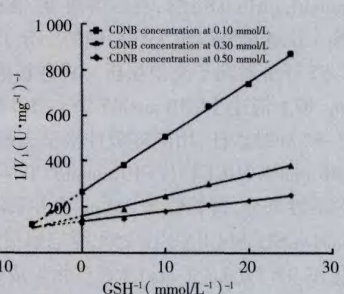


图 9 固定 CDNB 浓度，双倒数法测定对 GSH 的 K_m

表 1 猪肝中 GST 同工酶的提取纯化及特性分析

纯化步骤	总体积（ml）	总蛋白质（mg）	总活性（U）	比活性（U/mg）	纯化倍数	回收率（%）
硫酸铵沉淀	20	216	0.64	0.060	1	100
DE-52离子交换层析	20	21	0.31	0.30	5	49
GSH亲和层	10	0.32	0.18	8.8	146	28

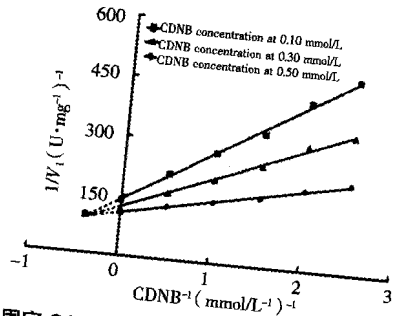


图 10　固定 GSH 浓度，双倒数法测定对 CDNB 的 K_m

$1/V=1/V_{max}\times(K_{ma}+K_{ia}K_{mb}/[B])\times1/[A]+1/V_{max}\times(1+K_{mb}/[B])$（$K_{ma}$：$K_m$ for CDNB；Kmb：K_m for GSH；[A]：CDNB concentration；[B]：GSH concentration；K_{ia}：the dissociation constant of CDNB）。

由此可得此酸性 GST 同工酶不依赖于 CDNB 浓度对 GSH的 K_m 为 42 μmol/L，不依赖于 GSH 浓度对 CDNB 的 K_m 为 0.86 mmol/L，也与猪肝碱性 GST 同工酶不同（图 9、10）。

2.6　初速度法测定 GS-DNB 对酸性 GST 的 K_i

分析此酸性 GST 同工酶在不同 CDNB 浓度下的初速度对 GSH 浓度的响应，及在不同 GSH 浓度下初速度对 CDNB 浓度的响应，所得 GS-DNB 对 GSH 及 CDNB 均为竞争性抑制剂（图 11、12）。GS-DNB 对 GSH 的 K_i 为（17 ± 1）μmol/L（n=2），对 CDNB 的 K_i 为（21 ± 1）μmol/L（n=2）；二者基本一致，支持产物为竞争性抑制剂的结合位点覆盖两个底物的结合位点。

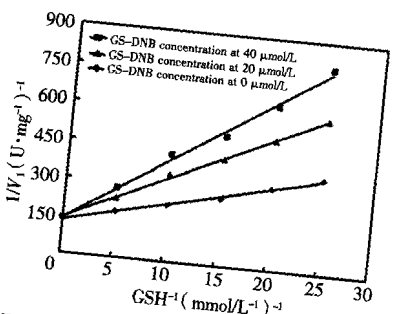


图 11　固定 CDNB 浓度，测定 GS-DNB 对 GSH 的 K_i

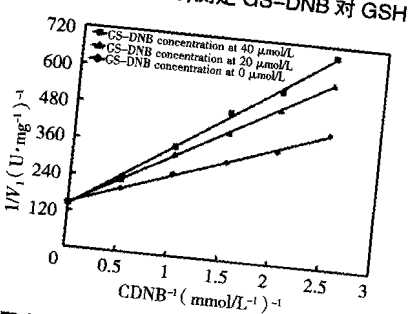


图 12　固定 GSH 浓度，测定 GS-DNB 对 CDNB 的 K_i

GST 反应曲线验证产物的 K_i

GST反应过程可测定GSH含量，其需设定GS-DNB数[10]。调整预设 K_i 分析反应过程，比较最大产物吸终点平衡法的差异，发现预设 K_i 从 12 μmol/L 增加L，所得 A_m 与终点平衡法一致；但当预设 K_i 小于或大于 50 μmol/L 时，所预测 A_m 与终点平衡法测定 A_m 有明显偏差。因此，分析反应过程支持所得 K_i 可靠；该产物对猪肝酸性 GST 抑制效力也不同于其对碱性 GST 的抑制效力。

综上所述，经离子交换和亲和层析获得猪肝酸性 GST 同工酶，活性收率近 30%；GST 产物对其为竞争性抑制剂且亲和力高于任一底物；测定 GST 动力学参数随抑制剂变化可确定抑制常数，并可作为其它方法筛选 GST 抑制剂的参考。

参 考 文 献

[1] 聂立红，王声湧，胡毅玲.谷胱甘肽硫转移酶研究进展[J].中国病理生理杂志，2000，16(11)：1240-1243.

[2] 杨海灵，聂力嘉，朱圣庚，等.谷胱甘肽硫转移酶结构与功能研究进展[J].成都大学学报，2006，25(1)：19-23.

[3] Mannervik B，Danielson U H.Glutathione transferases：structure and catalytic activity[J].CRC Crit Rev Biochem，1998，23(3)：283-337.

[4] Cui H F，Shen J，Lu D N，et al.4-Aryl-1，3，2-oxathiazolylium-5-olate：a novel GST inhibitor to release JNK and activate c-Jun for cancer therapy[J].Cancer Chemother Pharmacol，2008，62(3)：509-515.

[5] Ruzza P，Rosato A，Rossi C R，et al.Glutathione transferases as targets for cancer therapy[J].Anticancer Agents Med Chem，2009，9(7)：763-777.

[6] Sau A，Tregno F P，Valentino F，et al.Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance[J].Arch Biochem Biophys，2010，500(2)：116-122.

[7] Nichole K，Yasien S，Salerwe M，et al.Characterization of the binding of 8-anilinonaphthalene sulfonate to rat class Mu GST M1-1[J].Biophys Chem，2008，137(1)：100-104.

[8] Yang X L，Xie Y L，Pu J，et al.Estimation of affinities of ligands in mixtures via magnetic recovery of target-ligand complexes and chromatographic analyses：chemometrics and an experimental model[J].BMC Biotechnol，2011，11(5)：44.

[9] Thomas F，Ulrike M，Philip B，et al.Purification and characterization of a new cytosolic glutathione S-transferase（glutathione S-transferase X）from rat liver[J].Biolchem J，1983，215(3)：617-625.

[10] 赵利娜，陶　佳，赵运胜，等.分析谷胱甘肽-S-转硫酶的产物抑制反应过程测定还原型谷胱甘肽[J].西安交通大学学报(医学版)，2006，27(3)：300-303.

[11] Saunders B C.Glutathione.its reaction with alkali and some N and S derivatives[J].Biochem J，1934，28(6)：1977-1981.

[12] Pabst M J，Habig W H，Jakoby W B.Glutathione-S-transferase，a novel kinetic mechanism in which the major reaction path way depends on substrate concentration[J].J Biol Chem，1974，249(22)：7140-7147.

[13] Broford M M.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principles of dye binding[J].Anal Biochem，1976，72(1)：248-254.

[14] 郑穗平，郭　勇，潘　力.酶学[M].第二版.北京：科学出版社，2009.124-126.

[15] Liao F，Yang D Y，Tang J Q，et al.The measurement of serum cholinesterase activities by an integration strategy with expanded linear ranges and negligible substrate-activation[J].Clin Biochem，2009，42(6)：926-928.

（责任编辑：关蕴良）