

## 对乙酰氨基酚致小鼠肝微粒体谷胱甘肽 S-转移酶的激活机制

郑英, 楼宜嘉\*

(浙江大学药学院药理学与毒理学研究室, 浙江 杭州 310031)

**摘要:** 目的 探索大剂量对乙酰氨基酚(Par)在体内对小鼠肝微粒体谷胱甘肽 S-转移酶(mGST)活性的影响及其可能的机制。方法 小鼠饮用 10% 乙醇 7 d 以诱导肝药酶, Par 90, 150, 210 mg·kg<sup>-1</sup> ip, 在 6 h 内测定肝 mGST 活性及谷胱甘肽(GSH)含量, 结合二硫苏糖醇(DTT)逆转与 N-乙基马来酰亚胺(NEM)激活效应来探讨 mGST 活性变化机制, 并用 SDS-PAGE 和负染凝胶法评价 Par 对 mGST 蛋白分子量及含量的影响。结果 ip Par 90~210 mg·kg<sup>-1</sup>, 在短时间内引起小鼠 mGST 活性增加, GSH 含量减少。mGST 活性的改变与 Par 处理之间存在时效及量效关系。Par 引起的 mGST 的激活效应不被二硫键断裂剂 DTT 逆转, NEM 在 Par 激活的 mGST 半胱氨酸-49 巯基(Cys-49-SH)上总激活效应降低; 激活的 mGST 未见蛋白分子量变迁及蛋白表达增加。结论 大剂量 Par 引起小鼠体内 mGST 活性增加, 其激活机制主要与 Cys-49-SH 上单个巯基的修饰激活有关。

**关键词** 酶激活; 微粒体; 谷胱甘肽 S-转移酶; 对乙酰氨基酚; 谷胱甘肽

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)03-0211-05

膜结合型微粒体谷胱甘肽 S-转移酶(microsomal glutathion S-transferase, mGST), 易被烷化剂、亲电子基等通过烷化作用或氧化应激途径等修饰激活<sup>[1~3]</sup>, 在加速药物或毒物本身灭活代谢的同时对机体起保护作用。对乙酰氨基酚(paracetamol, Par),

在体内经由 CYP2E1 代谢为正-乙酰-对苯醌亚胺(N-acetyl-p-benzoquinone imine, NAPQI) 毒性代谢产物, 具有苯醌结构的亲电子基。在体外, NAPQI 与离体肝细胞孵育, 能修饰蛋白巯基, 使 mGST 活性增加<sup>[4]</sup>, 在体内, Par 对 mGST 活性有一定的影响<sup>[5,6]</sup>, 但 NAPQI 对 mGST 是否具有激活作用及其可能的机制在毒理学上迄今未见报道。本研究探索 mGST 在体内是否能被大剂量 Par 修饰激活并探讨其可能的途径, 为阐明体内 mGST 被 Par 苯醌类毒性代谢物激活模式的生物学意义提供实验依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 药品与动物

Par, 为温州制药有限公司产品, 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT), N-乙基马来酰亚胺(N-ethylmaleimide, NEM)为美国 Merck 产品, 2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene, CDNB)为上海试剂一厂产品。

ICR 小鼠, ♂, 体重(20~24)g, 由浙江医学科学院实验动物中心提供, 二级, 动物许可证号 2001001。200 只小鼠随机分成 10 组, 每组 20 只, 将乙醇加入到每组小鼠饮用水中, 浓度为 10%, 给动物自由饮用, 连饮 7 d。在 d 8, 小鼠禁食不禁水 3 h 后, ip Par 90, 150, 210 mg·kg<sup>-1</sup>, 对照组 ip 同容量生理盐水, 于给药后 0, 1, 2, 3, 6 h, 断头处死, 分离血清, 差速离心法制备肝匀浆和肝胞浆, 改良的钙沉淀法制备肝微粒体<sup>[7]</sup>。

#### 1.2 酶活性测定方法

mGST 活性参考 Habig 等<sup>[8]</sup>方法测定。谷胱甘肽过氧化物酶(glutathion peroxidase, GSH-Px)活性按改良的 Hafemen 等<sup>[9]</sup>法测定。谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量按 Beutler 等<sup>[10]</sup>改良法测定。在 DTT 和 NEM 效应实验中, 微粒体在室温(22~26)℃下, 分别与终浓度 10 mmol·L<sup>-1</sup> DTT 共孵育 10 min<sup>[11]</sup>, 与终浓度 5 mmol·L<sup>-1</sup> NEM 共孵育 2 min<sup>[12]</sup>。蛋白含量按考

收稿日期: 2002-06-18 接受日期: 2002-12-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070904)

作者简介: 郑英(1972-), 女, 浙江省开化县人, 主管药师, 浙江大学药理学硕士研究生, 现在中国人民解放军 117 医院从事药理学研究和教学工作。

\* 联系作者 E-mail: yijialou@cps.zju.edu.cn Tel: (0571)87217206 Fax: (0571)87217086

马斯亮蓝法测定<sup>[13]</sup>。用 UV-9100 型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司)测定吸光度。

### 1.3 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)和负染凝胶法分析肝微粒体蛋白表达

SDS-PAGE 参照 Laemmli<sup>[14]</sup>法配制 3% 浓缩胶和 15% 分离胶,取样品与等量的不含 DTT 的上样缓冲液均匀混合处理。负染凝胶法<sup>[15]</sup>配制 10% 聚丙烯酰胺,样品用缓冲液 37℃ 孵育 30 min,每泳道取等量蛋白上样,电泳分离,切割凝胶:一块放入 4 mL 底物液中,显色后保存;另一块用考马斯亮蓝染液染色后脱色。电泳分离谱经 Bio-Rad 全自动凝胶成像分析系统(意大利伯乐公司)分析。

1.4 SPSS8.0 软件包,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,分别进行 LSD 和 Dunnett T3 检验;秩和检验比较率的差异。

## 2 结果

### 2.1 对乙酰氨基酚对小鼠微粒体谷胱甘肽 S-转移酶、微粒体谷胱甘肽过氧化物酶活性和谷胱甘肽含量的影响

Par 90 ~ 210 mg·kg<sup>-1</sup>, 给药 2 h 时引起 mGST、微粒体 GSH-Px(mGSH-Px)活性增加,GSH 含量降低,且均呈剂量依赖趋势(表 1)。给 Par 150 mg·kg<sup>-1</sup>后不同时间,mGST 及 mGSH-Px 活性增加,分别在 2 h 时达峰值,肝匀浆 GSH 含量在 1 h 显著减少,在 3~6 h 急剧增加,6 h 最显著(表 2,  $P < 0.01$ )。Par 不同剂量给药后 2 h,mGST 与 mGSH-Px 活性呈正相关( $r = 0.9875, P < 0.01$ ),与 GSH 含量呈负相关( $r = -0.9453, P < 0.01$ )。提示大剂量 Par 在短时间内引起肝 mGST 活性增高。

**Tab 1. Effects of paracetamol (Par) on mGST, mGSH-Px activities and GSH content in liver of mice drank 10% ethanol**

Par /mg·kg <sup>-1</sup>	mGST /μmol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup>	mGSH-Px /μmol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup>	GSH /μmol·g <sup>-1</sup>
0	26.1 ± 5.2	0.12 ± 0.04	55.2 ± 5.1
90	30.9 ± 4.7**	0.14 ± 0.04	51.2 ± 2.0*
150	40.8 ± 4.8**	0.16 ± 0.03*	45.8 ± 2.7**
210	41.1 ± 6.7**	0.17 ± 0.04**	40.4 ± 2.3**

mGST: microsomal glutathion S-transferase. mGSH-Px: microsomal glutathion peroxidase. GSH: glutathion. Par 90, 150, 210 mg·kg<sup>-1</sup> ip 24 h after 10% ethanol drinking freely for a week, 2 h after ip Par mice were sacrificed.  $\bar{x} \pm s, n = 10$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with control.

**Tab 2. Effects of paracetamol on mGST, mGSH-Px activities and GSH content in liver of mice at different time after a dosage of 150 mg·kg<sup>-1</sup>**

Time /h	mGST /μmol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup>	mGSH-Px /μmol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup>	GSH/ μmol·g <sup>-1</sup>
0	25.1 ± 1.7	0.12 ± 0.03	56.3 ± 2.4
1	30.8 ± 6.7*	0.14 ± 0.02	45.6 ± 1.8**
2	40.8 ± 4.8**	0.16 ± 0.03**	45.8 ± 2.7**
3	39.8 ± 5.4**	0.15 ± 0.02*	57.0 ± 3.1
6	25.7 ± 4.8	0.13 ± 0.02*	72.1 ± 5.1**

Par 150 mg·kg<sup>-1</sup> ip 24 h after 10% ethanol drinking freely for a week.  $\bar{x} \pm s, n = 10$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with control.

### 2.2 对乙酰氨基酚对小鼠谷胱甘肽 S-转移酶动力学参数的影响

用 Lineweaver-Burk 作图法,测得 Par 给药后肝 mGST 的  $K_m, V_{max}$  值增大(表 3,  $P < 0.01$ ),提示其酶催化生物学特性显著改变。

**Tab 3. Alteration of kinetic parameters of mGST activities after paracetamol treatment in mice**

Treatment	$K_m$ /mmol·L <sup>-1</sup>	$V_{max}$ /μmol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup>
Control	4.5 ± 0.5	48 ± 8
Par	11.3 ± 3.4**	135 ± 29**

mGST activities for 2,4-dinitrochlorobenzene (0.5 - 20.0 mmol·L<sup>-1</sup>) in liver microsomes obtained from the control and Par (150 mg·kg<sup>-1</sup>, ip, 2 h)-treated mice were measured in the presence of a fixed concentration of GSH.  $\bar{x} \pm s, n = 8$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with control.

### 2.3 二巯苏糖醇与 N-乙基马来酰亚胺对微粒体谷胱甘肽 S-转移酶的作用效应

Par 150 mg·kg<sup>-1</sup> 给药后 1, 2, 3 h, 在加与未加 DTT 实验体系中, Par 使 mGST 活性分别增加至 124%, 150%, 138% ( $P < 0.01$ ) 及 120%, 144%, 112% ( $P < 0.01$ ); DTT 加入与否, 对 Par 增加 mGST 活性无显著性变化 ( $P > 0.05$ )。用 Cys-49-SH 特异修饰激活剂 NEM 处理 Par 给药后的 mGST, 对照组与给 Par 组 mGST 活性均显著增加 ( $P < 0.01$ ) 且达到相似水平, 分别增加为 433%, 412%, 433% 和 347%, 281%, 294%; 但 NEM 对 mGST 活性的增加率则有显著性下降(表 4,  $P < 0.01$ )。提示被 Par 激活的 mGST 不能被 DTT 逆转, 而 NEM 对其激活的总效应降低。

**Tab 4. Effects of dithiothreitol(DTT) and N-ethylmaleimide (NEM) on mGST activities treated with paracetamol 150 mg·kg<sup>-1</sup> ip in mice**

Treatment	mGST activity/ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$			
	DTT(-)	DTT(+)	NEM(-)	NEM(+)
Control	26 ± 8	23 ± 9	25 ± 8	97 ± 24
Par(0 h)	27 ± 10	24 ± 9	25 ± 10	95 ± 25
Control	25 ± 10	25 ± 9	24 ± 10	104 ± 29
Par(1 h)	31 ± 10**	30 ± 6**	30 ± 8*	104 ± 24
Control	26 ± 12	25 ± 10	25 ± 12	103 ± 33
Par(2 h)	39 ± 7**	36 ± 10**	37 ± 7**	104 ± 31
Control	26 ± 9	25 ± 9	24 ± 9	104 ± 29
Par(3 h)	36 ± 7**	28 ± 8**	34 ± 7**	100 ± 25
Control	26 ± 8	24 ± 11	25 ± 9	100 ± 37
Par(6 h)	27 ± 7	26 ± 7	25 ± 8	98 ± 19

Microsomes from the control or Par (150 mg·kg<sup>-1</sup>, ip)-treated mice were incubated with DTT(10 mmol·L<sup>-1</sup>) at room temperature for 10 min or incubated with NEM(5 mmol·L<sup>-1</sup>) at room temperature for 2 min, and then mGST activities were measured.  $\bar{x} \pm s$ , n = 10. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, compared with control.

**2.4 SDS-PAGE 和负染凝胶法分析微粒体谷胱甘肽 S-转移酶蛋白**

分子量在 17 和 34 ku 左右以 SDS-PAGE 及负染

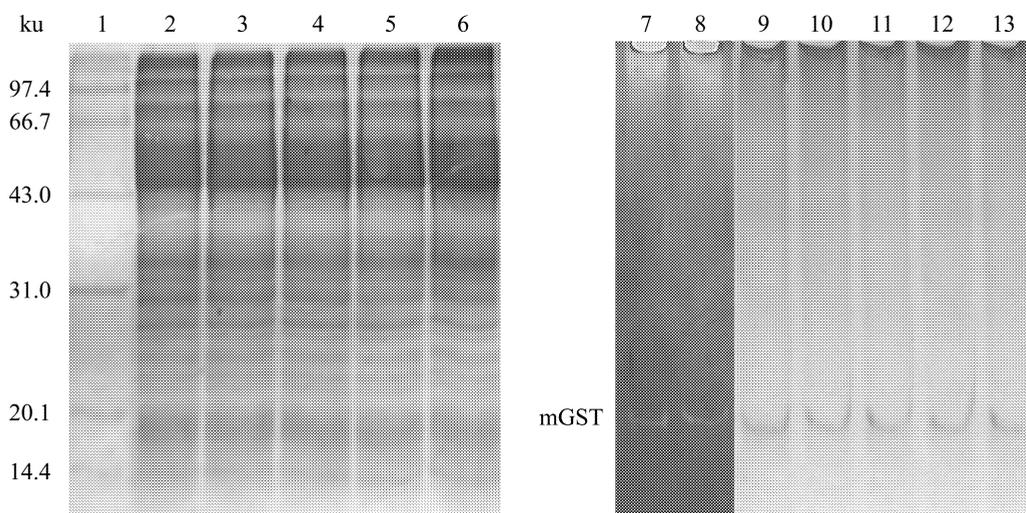
凝胶法定位, mGST 蛋白处有明显的蛋白条带。电泳图谱经全自动凝胶成像分析系统分析表明, 小鼠 Par 给药后, mGST 蛋白分子量未见变迁, 蛋白含量无显著性变化(图 1, P > 0.05)。提示 mGST 激活不是由于蛋白二聚体形成或蛋白表达上调所致。

**3 讨论**

膜结合型 mGST 催化解毒反应, 可快速隔离有害亲脂化合物。mGST 是防止中毒性肝损伤的重要解毒酶, 其巯基易被亲电子代谢物活化的特性, 在保护其他关键的细胞靶位免受损伤中起到重要作用<sup>[16,17]</sup>, 在毒理学上有重要意义。

在体内, 通过烷化作用或氧化应激途径, mGST 分子的 Cys-49 单个巯基可以通过 mGST 与 GSSG 巯基/二硫键交换、与药物活性代谢中间产物共价结合, 以及 mGST 二聚体形成等多种方式激活<sup>[2,3]</sup>。本研究选用大剂量 Par 肝损伤模型, 是基于其可在体内经 CYP2E1 代谢为具有苯醌结构的毒性代谢物 NAPQI。

研究表明, 小鼠经 10% 乙醇诱导 CYP2E1 后的 Par 代谢物, 在给药 2 h 内可引起 mGST 活性显著增加, 说明 mGST 在体内能被大剂量 Par 显著激活。由于大剂量 Par 能引起肝毒性氧化损伤<sup>[5]</sup>, 为



**Fig 1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and negative dye gel diagrams of mouse liver microsomal proteins prepared at 2 h after Par treatment.** Lane 1: marker; lanes 2, 9: control (0.9% NaCl); lanes 3-5, 10-12: Par 90, 150 and 210 mg·kg<sup>-1</sup> ip, respectively; lanes 6, 13: microsomes were incubated with NEM(5 mmol·L<sup>-1</sup>) at room temperature for 2 min; lanes 7, 8: location of mGST.

论证 Par 所致 mGST 激活模式是否经由氧化应激途径,本研究同时观察了 mGSH-Px 活性和 GSH 含量,结果显示 mGSH-Px 活性显著增加,GSH 含量减少,提示在功能上可作为 mGSH-Px 的 mGST 激活模式存在氧化应激途径。Par 引起肝损伤模型中,GSH 减少与 GSH-Px 代谢成氧化型谷胱甘肽无关,而是与大量 NAPQI 结合的结果<sup>[6]</sup>,当 GSH 缺乏时,NAPQI 可共价结合到蛋白巯基上,mGST 分子中的 Cys-SH-49 是易被修饰的唯一位点,该位点一旦形成 NAPQI 加合物,可长时间稳定而不被过量 GSH 所逆转<sup>[18]</sup>。本研究 GSH 含量先减后增和短时间内 mGSH-Px 活性、mGST 的  $K_m$  和  $V_{max}$  值增加说明 Par 所致 mGST 活性的增加是由 NAPQI 在 GSH 减少后,共价结合到 mGST 的 Cys 巯基上而被修饰激活的结果。

本研究以 DTT 逆转及 NEM 激活效应实验分别检测 mGST 酶分子上 Cys-49-SH 是否被芳香化修饰<sup>[19]</sup>,来论证 Par 激活 mGST 的确切机制。结果显示被 Par 激活的 mGST 不能被二硫键还原剂 DTT 逆转,提示没有涉及双硫键裂解机制,因此该激活作用并非通过 Cys-49-SH 与 GSSG 巯基/二硫键交换及二聚体形成途径。在体外 mGST 的 Cys-49-SH 极易被活性烷化剂 NEM 修饰激活<sup>[20]</sup>,本研究中,NEM 对已被 Par 活化的 mGST 激活总效应降低,也提示 Cys-49-SH 已被 Par 代谢物 NAPQI 占据,表明 NAPQI 和 NEM 与 mGST 结合的位点是一致的。

SDS-PAGE 及负染凝胶结果显示,被 Par 激活的 mGST 特征性蛋白条带无改变,也说明 mGST 被 Par 活化未涉及二聚体形成或蛋白表达增加。提示大剂量 Par 引起 mGST 激活机制上与 NEM 激活 mGST 模式相同,与 Cys-49-SH 上单个巯基的修饰有关。该机制对机体的保护作用在肝脏解毒作用中具有重大的意义。

#### 4 参考文献:

- [1] Sies H, Dafre AL, Ji Y, Akerboom TP. Protein S-thiolation and redox regulation of membrane-bound glutathione transferase[J]. *Chem Biol Interact*, 1998, **111** - **112**: 177 - 185.
- [2] Kelner MJ, Bagnell RD, Montoya MA, Estes LA, Forsberg L, Morgenstern R. Structural organization of the microsomal glutathione S-transferase gene (MGST1) on chromosome 12p13.1 - 13.2. Identification of the correct promoter region and demonstration of transcriptional regulation in response to oxidative stress[J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (17):13000 - 13006.
- [3] Lee SH, DeJong J. Microsomal GST-I: genomic organization, expression, and alternative splicing of the human gene[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1999, **1446**(3):389 - 396.
- [4] Lundqvist G, Morgenstern R. Studies on the activation of rat liver microsomal glutathione transferase in isolated hepatocyte[J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, **43**(2):131 - 135.
- [5] Wang H, Peng RX. Sodium ferulate alleviated paracetamol-induced liver toxicity in mice[J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1994, **15**(1):81 - 83.
- [6] Wang H, Peng RX, Li QX, Chen JH, Fu LS, Kong L. Effect of sodium ferulate on liver glutathione and glutathione-related enzymes in mice[J]. *Acta Acad Med Hubei* (湖北医科大学学报), 1996, **17**(1):23 - 26.
- [7] Zheng Y, Zhang J, Lou YJ. Augmentation of rat liver microsome glutathione S-transferase preparation [J]. *Acta Zhejiang Univ (Med Sci)* [浙江大学学报(医学版)], 2002, **31**(6):429 - 432.
- [8] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in merapturic acid formation [J]. *J Biol Chem*, 1974, **249**(22):7130 - 7139.
- [9] Hafeman DG, Sunde RA, Hoekstra WG. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat[J]. *J Nutr*, 1974, **104**(5):580 - 587.
- [10] Beutler E, Cumutte JT, Forman L. Glutathione peroxidase deficiency and childhood seizures[J]. *Lancet*, 1991, **338** (8768):700.
- [11] Svensson R, Rinaldi R, Swedmark S, Morgenstern R. Reactivity of cysteine-49 and its influence on the activation of microsomal glutathione transferase. 1. Evidence for subunit interaction[J]. *Biochemistry*, 2000, **39** (49): 15144 - 15149.
- [12] Horbach ME, Sies H, Akerboom TP. Identification of a hepatic plasma membrane glutathione S-transferase activated by N-ethylmaleimide [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1148**(1):61 - 66.
- [13] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**(5): 248 - 254.
- [14] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature* (Lond), 1970, **227**(259):680 - 685.
- [15] Clark AG. A direct method for the visualization of glutathione S-transferase activity in polyacrylamide gels [J]. *Anal Biochem*, 1982, **123**(1):147 - 150.

- [16] Wang H, Peng RX. Effect of paracetamol on glutathione S-transferase activity in mice[J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1993, **14**(Suppl): S41 - S44.
- [17] Peng RX, Wang H, Wang YS, Fu LS, Ding H. Glutathione-related enzyme activities in human fetal adrenal, liver, and kidney[J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1998, **19**(2):167 - 171.
- [18] Yonamine M, Aniya Y, Yokomakura T, Koyama T, Nagamine T, Nakanishi H. Acetaminophen-derived activation of liver microsomal glutathione S-transferase of rats[J]. *Jpn J Pharmacol*, 1996, **72**(2):175 - 181.
- [19] Daido A, Aniya Y. Alteration of liver glutathione S-transferase and protease activities by cobalt chloride treatment of rats[J]. *Jpn J Pharmacol*, 1994, **66**(3):357 - 362.
- [20] Ji Y, Toader V, Bennett BM. Regulation of microsomal and cytosolic glutathione S-transferase activities by S-nitrosylation[J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, **63**(8):1397 - 1404.

## Mechanism of activation of mouse liver microsomal glutathione S-transferase enhanced by paracetamol treatment *in vivo*

ZHENG Ying, LOU Yi-Jia

(Department of Pharmacology and Toxicology, College of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

**Abstract:** **AIM** To explore the influence of over-dosage paracetamol(Par) on liver microsomal glutathione S-transferase(mGST) activity of mice and the possible mechanism *in vivo*. **METHODS** Mice drank 10% ethanol as CYP inducer for 7 d followed by ip Par 90, 150, 210 mg·kg<sup>-1</sup>. The mGST activity and glutathione(GSH) content were measured at different time within 6 h, the mechanism of mGST activation was confirmed by both reversed effects of dithiothreitol(DTT) and reactivated effects of *N*-ethylmaleimide on mGST. The changes in molecular weight and protein expression were evaluated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and negative dye gel. **RESULTS** mGST activity was increased, and GSH content was decreased compared with those in control by Par(90 - 210 mg·

kg<sup>-1</sup>) in short time ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The mGST activity was dose- and time-dependent on Par treatment. The activity was not converted by DTT, and mGST total activation on Cys-49-SH by alkylating agent *N*-ethylmaleimide was decreased. Both enzyme molecular weight and protein expression of activated mGST by Par had no obvious changes. **CONCLUSION** The mGST activation by over-dosage of Par is mainly due to the unique sulfhydryl modification on Cys-49-SH.

**Key words:** enzyme activation; microsome; glutathione S-transferases; paracetamol; glutathione

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China(30070904)

(本文编辑 石涛)