

醛糖还原酶类似蛋白 1 在 293T 细胞的表达 降低由丙烯醛引起的氧化应激

祖旭宇^{1,2}, 严瑞兰², 廖端芳¹, 曹德良²

(1. 南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001;

2. 美国南伊利诺州大学医学院肿瘤研究所 美国 伊利诺州 斯普林菲尔德 62702)

[关键词] 病理学与病理生理学; 人类醛糖还原酶样蛋白 1; 丙烯醛; 活性氧; 氧化应激; EGFP/ARL-1 融合蛋白

[摘要] 目的 研究 ARL-1 在 293T 细胞内的表达由丙烯醛引起氧化应激的影响。方法 通过构建 EGFP/ARL-1 融合蛋白表达载体, 将表达载体转染 293T 细胞, 获得具有 EGFP/ARL-1 表达的 293T 细胞; 使用分子探针 CM-H₂D-CFDA 检测 293T 细胞内活性氧水平, 并用流式细胞仪对荧光进行定量。结果 在 10 μmol/L 丙烯醛作用下, 293T 对照细胞内荧光密度比值为 530% ± 36%, 是无药物处理 293T 对照细胞组的 4 倍; 而在有 EGFP/ARL-1 表达的 293T 细胞中荧光密度比值为 220% ± 20%, 是无药物处理有 EGFP/ARL-1 表达的 293T 细胞的 2 倍。结论 ARL-1 在 293T 细胞内的表达能非常有效的减少由丙烯醛所引起的氧化应激。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

ARL-1 Expression Reduces Acrolein Induced Oxidative Stress in 293T Cells

ZU Xu Yu^{1,2}, YAN Rui Lan², LIAO Du an Fang¹, and CAO De Liang²

(1. Molecular Biology Research Center, Nanhua University, Hengyang 421001, China; 2. Department of Medical Microbiology, Immunology, & Cell Biology, and SimmonsCooper Cancer Institute, Southern Illinois University School of Medicine, 913 N. Rutledge Street, Springfield, IL, USA 62702)

[KEY WORDS] Human Aldose Reductase Like-1 Protein; Acrolein; Reactive Oxygen Species; Oxidative Stress; EGFP/ARL-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of ARL-1 expression on acrolein induced oxidative stress in 293T cells.

Methods EGFP/ARL-1 fusion protein was expressed in 293T cells by introducing EGFP/ARL-1 plasmid; the reactive oxygen species (ROS) were probed by CM-H₂DCFDA and determined by FACS.

Results The 293T show a fluorescence density of 530% ± 36% when treated with 10 μmol/l of acrolein, whereas a fluorescence density of 220% ± 20% was detected in 293T cells with the expression of EGFP/ARL-1 under the same concentration of acrolein.

Conclusion ARL-1 expression can decrease cellular ROS level and reduce acrolein induced oxidative stress.

人类醛糖还原酶类似蛋白 1 (aldose reductase like protein 1, ARL-1, AKR1B10) 是由曹德良博士等^[1]于 1998 年发现的一个蛋白, 它属于醛酮还原酶超家族, 与醛糖还原酶 AR 在氨基酸序列上有 71% 的同源性。ARL-1 和 AR 一样对许多醛酮化合物具有很高的酶活性, 并且二者有许多共同底物。但近年来对 ARL-1 在生物体内功能的研究鲜有报道。现有的资料表明, ARL-1 在消化道组织中具有广泛的分布,

它在原发性肝癌和肺癌中有很高表达, 这提示它可能参与肿瘤的发生、发展或影响肿瘤细胞的药物敏感性。

丙烯醛是最具活性的 α, β 不饱和醛, 它可迅速与细胞内亲核内化合物如谷胱甘肽反应, 而使其功能丧失。它可与蛋白质的赖氨酸残基, 组氨酸残基反应, 还可与 DNA 的亲核部位发生反应。这种反应构成了高浓度丙烯醛对细胞所产生的细胞毒性的基础^[2]。而在低浓度下, 丙烯醛能降低人肺癌细胞的增殖^[3-5], 但其机制并不清楚, 可能与丙烯醛能使细胞内许多亲核类化合物功能丧失, 并直接或间接的抑制如核因子 KB, AP-1 以及 c-myc 等转录调控因子活性^[3], 从而影响与生长或氧化应激相关基因的表达。本研究探讨了 ARL-1 在减少由丙烯醛所引起细胞氧化应激中所起的作用。

[收稿日期] 2007-06-18

[修回日期] 2008-05-26

[作者简介] 祖旭宇, 博士, 主要研究方向为肿瘤相关基因功能研究, 联系电话为 0755-26032094, E-mail 为 zu.xuyu@sz.tsinghua.edu.cn。严瑞兰, 博士, 研究方向为肿瘤相关基因功能研究。E-mail 为 yanrl@hotmail.com。通讯作者廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理学, 联系电话为 0734-8281308, E-mail 为 dliao66@yahoo.com.cn。曹德良, 博士, 副教授, 博士研究生导师, 研究方向为肿瘤发病机理及治疗研究, E-mail 为 dcao@siumed.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

293T 细胞购自美国 ATCC, 细胞用 DMEM 培养基培养。培养基中均含 10% 小牛血清 (Sigma), 2 mmol/L 谷氨酰胺和 100 U 青霉素。细胞在 37 °C, 5% CO₂ 的条件下进行培养。

1.2 醛糖还原酶类似蛋白 1 重组蛋白的纯化及其酶活性鉴定

ARL-1 重组蛋白的纯化参照文献 [1]。ARL-1 对丙烯醛的酶活性由以下方法确定: 在由 135 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.0), 50 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L NADPH 和 2 μg ARL-1 的混合物中加入 0~20 mmol/L 的丙烯醛, 将混合物在 35 °C 孵育 20 min。在 340 nm 下测的孵育前后吸光度值差即为 ARL-1 对丙烯醛的酶活性。Michaelis-Menten 常数 [K_m 和 V_{max}] 由 Graphpad Prims 4 (Graph Pad Software, CA) 计算。为确定 293T 和 HCT8 细胞内 ARL-1 活性, 细胞裂解液 [20 mmol/L NaH₂PO₄, 2 mmol DTT, 5 μmol/L leupeptin, 20 μmol/L PMFS] 被用作制备细胞提取物。在冰上孵育 30 min 后, 在 10 kr/min, 4 °C, 下离心 10 min。以 20 mmol/L DL-甘油醛作为底物^[1], 用 50 μg 可溶性蛋白做 ARL-1 活性分析。

1.3 EGFP/ARL-1 表达载体的构建及其瞬时表达

用 Pst I 和 Apa I 酶切位点, 将 ARL-1 C_{dn}a^[1] 克隆进 EGFP-C3 [Promega] 重组载体, 重组质粒经测序证明正确后用于细胞转染。在转染前 24 h, 将 2 × 10⁵ 293T 细胞种于 12 孔板中。1.6 μg 质粒与 3 μL Lipfectamine (Invitrogen, CA) 混合于 200 μL Opti-MEM 中, 室温下静置 20 min, 然后将其加入含 1 mL Opti-MEM 的细胞悬液中, 转染 4 h 后, 再加等体积的含 20% FBS 的新鲜培养基于细胞。

1.4 Western blot 分析

Western blot 分析方法按文献 [6] 进行。置 293T 细胞于裂解液 (10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.1% NP-40, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L Na₃VO₄) 中于冰上裂解 30 min, 离心 10 min 收集上清并用 DC 蛋白分析试剂 [Bio-Rad, Hercules, CA] 定量。20 μg 可溶性蛋白于 12% SDS-PAGE 胶分离, 然后在 260 mA 下经 2 h 将蛋白转移至纤维膜。在室温下, 膜在封闭液中 [1 × PBS, 和 5% 脱脂牛奶] 封闭 45 min 后, 孵育 ARL-1 一抗 (1:500) 1 h, 经 3 次 5 min TBST 洗膜后, 在室温下孵育羊抗兔 IgG (1:2000) 1 h。抗体结合由化学荧光系统 (Pierce, IL) 检测。β-actin 作为内参照,

其一抗使用浓度为 1:40000。

1.5 293T 细胞内反应性活性氧的检测

通过分子探针 CM-H₂DCFDA (Invitrogen, CA) 检测了 293T 细胞内活性氧的水平, 该化合物在细胞内经活性氧的作用下可以被氧化成荧光性物质。将 293T 和有 EGFP/ARL-1 表达的 293T 细胞分别种于 12 孔板, 24 h 后用含 10 μmol/L 丙烯醛的培养液培养细胞 12 h。之后用 HBBS (Invitrogen, CA) 洗细胞两遍, 用含 1 μmol/L CM-H₂DCFDA 的 HBBS 孵育细胞 10 min。收集细胞, 用细胞流式仪对细胞内活性氧进行定量检测。

1.6 统计学分析

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用方差分析及 *t* 检验。P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 ARL-1 重组蛋白的酶活性测定

为确定 ARL-1 对丙烯醛的酶活性, 其重组蛋白通过原核蛋白表达系统表达并纯化。如图 1 所示, 经酶活性实验表明, ARL-1 对丙烯醛具有较高的酶活性, 其 K_m 和 V_{max} 分别为 31 ± 7 μmol/L 和 3296 ± 245.9 μmol/(g·min)。

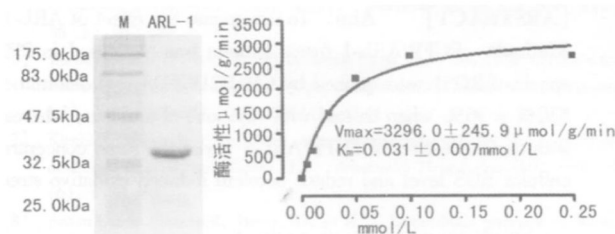


图 1. ARL-1 对丙烯醛的酶活性动力学常数 左为 SDS-PAGE 电泳显示纯化 ARL-1 重组蛋白, 右为 ARL-1 重组蛋白对丙烯醛的酶活性及动力学常数。

2.2 EGFP/ARL-1 融合蛋白在 293T 细胞中的表达及其功能分析

EGFP/ARL-1 融合蛋白表达载体, 经瞬时转染至 293T 细胞, 其转化效率在约 85% 左右 (图 2A), 通过 western blot 分析和酶活性分析以确定融合蛋白表达水平和蛋白的酶活性。分子量约 66 KDa (ARL-1 + EGFP) 的 EGFP/ARL-1 融合蛋白在 293T 细胞内有高水平表达。而有 EGFP-C3 对照质粒转染的 293T 细胞内检测不到该蛋白的存在 (图 2B)。酶活性实验表明 EGFP/ARL-1 融合蛋白在以 NADPH 作为辅酶的条件下能有效的催化 DL-甘油醛 (glyceralde-

hydes) 的还原^[1]。转染有 EGFP/ARL-1 融合蛋白表达载体的 293T 细胞内 ARL-1 酶活性是空载体转染细胞的 5 倍(表 1)。结果表明,在 293T 细胞内成功的表达了有功能的 EGFP/ARL-1 融合蛋白。



图 2. EGFP/ARL-1 融合蛋白在 293T 细胞内的表达 左为 EGFP/ARL-1 融合蛋白在 293T 细胞内的表达, 右为 EGFP/ARL-1 融合蛋白的 Western blot 检测。

表 1. EGFP/ARL-1 融合蛋白的酶活性

细胞	酶活性 ($\mu\text{mol/g}$ 蛋白/h)
空质粒转染 293T 细胞	510 ± 23.00
表达 EGFP/ARL-1 融合蛋白 293T 细胞	2700 ± 34.00

2.3 EGFP/ARL-1 融合蛋白在 293T 细胞内的表达减少由丙烯醛引起的反应性活性氧

为了解 ARL-1 在调节细胞内反应性活性氧 ROS 水平中的作用,作者用 ROS 分子探针 CM-H₂DCFDA 对 293T 细胞内 ROS 水平进行了检测。结果发现,无 ARL-1 表达的 293T 细胞内 ROS 水平明显高于有 EGFP/ARL-1 表达 293T 细胞(图 3),这说明 ARL-1 在 293T 细胞内的表达可以减少内源性 ROS 的产生,降低细胞内源性 ROS 的水平。当用 10 $\mu\text{mol/L}$ 丙烯醛处理细胞后,发现 293T 对照细胞内 ROS 水平较无药物处理 293T 对照组细胞高 1 倍。而在有 EGFP/ARL-1 表达的 293T 细胞中这种 ROS 水平上升并不明显(图 3B、3D 和表 2)。这些结果表明,ARL-1 可以作为一种抗氧化性酶,减少细胞内 ROS 的产生,降低细胞内由丙烯醛引起的氧化应激。

3 讨论

醛酮化合物由于具有很强的亲电性,所以它们容易与许多蛋白质的残基,如组氨酸、赖氨酸和半胱氨酸残基等发生反应形成共价性的螯合物^[6,13]。这种对蛋白质的非特异性修饰,将可能破坏蛋白的功

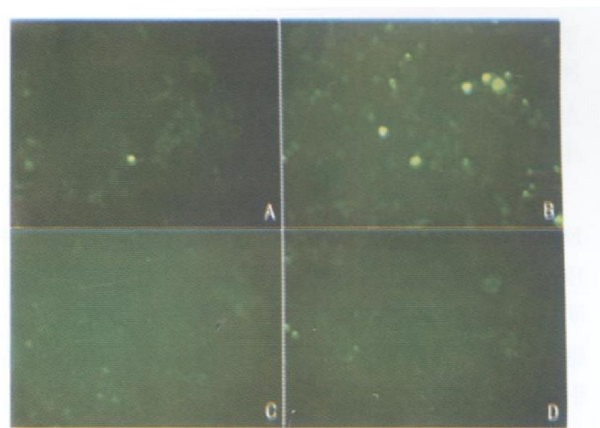


图 3. ARL-1 在 293T 细胞内的表达减少由丙烯醛引起活性氧

A 为 293T 细胞无丙烯醛处理, B 为 293T 细胞 10 $\mu\text{mol/L}$ 丙烯醛处理, C 为有 EGFP/ARL-1 表达 293T 细胞无丙烯醛处理, D 为有 EGFP/ARL-1 表达 293T 细胞 10 $\mu\text{mol/L}$ 丙烯醛处理。

表 2. 293T 细胞内活性氧的定量分析

细胞类型	荧光密度比值
293T	$120\% \pm 10\%$
293T+ 丙烯醛 10 $\mu\text{mol/L}$	$530\% \pm 36\% ^b$
具有 EGFP/ARL-1 表达 293T	100%
具有 EGFP/ARL-1 表达 293T+ 丙烯醛 10 $\mu\text{mol/L}$	$220\% \pm 20\% ^a$

有 EGFP/ARL-1 表达 293T 细胞在无丙烯醛处理下细胞内 ROS 水平被用作对照(100%)。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

能,并且这种蛋白螯合物还可能作为第二信使,影响细胞信号通路,对细胞产生损害。

亲电性醛酮化合物还可与 DNA 发生反应,形成共价的 DNA 螯合物。这种共价 DNA 螯合物的形成能阻止 DNA 的半保留复制,并影响基因的转录从而导致错码翻译,以及 DNA 的损伤和断裂^[14-19]。许多资料显示,由醛酮类化合物所引起的 DNA 修饰能导致体内基因突变,肿瘤发生和一些与年龄相关疾病的产生^[6,14,17,20]。

丙烯醛被认为既是脂质过氧化的产物也是脂质过氧化过程的启动者^[21,22]。由于在一切细胞中都存在脂质过氧化过程,并且这一过程在病理生理条件下更加强化,所以机体细胞很可能长期处于丙烯醛的胁迫之下。如在糖尿病肾病^[23]和 Alzheimer 病^[24]组织中检查到了由丙烯醛引起的蛋白螯合物,而这两种疾病又都与脂质氧化密切相关。由丙烯醛所产生的相关螯合物可以作为一种有用的与机体病程相关生物标记。

在本研究中,为了监测质粒的转染效率,EGFP 蛋白被连接于 ARL-1 蛋白的 N 端,而成 EGFP/ARL-1 融合蛋白。该融合蛋白的 ARL-1 酶活性通过以 DL-

甘油醛做为其底物所做酶活性分析得到了证实。之所以选择 293T 细胞是由于在该细胞中内源性的 ARL-1 表达很低,并且 293T 细胞具有较高的转染效率,这对瞬时转染研究至关重要。

本研究通过检测 293T 细胞内 ROS 水平,发现 EGFP/ARL-1 在 293T 细胞内的表达能降低细胞内 ROS 水平,减少由丙烯醛所引起的氧化应激。这说明 ARL-1 在细胞内可以作为一种抗氧化性酶参与细胞对氧化应激的反应。由于 ARL-1 能降低由丙烯醛引起的氧化应激,而丙烯醛所引起的氧化应激可能与机体的许多疾病,如动脉粥样硬化和老年性痴呆等相关,这暗示 ARL-1 可能参与到心血管疾病的发生发展。目前对于 ARL-1 功能的研究主要集中在它与肿瘤发生发展的关系,它在心血管疾病中的作用尚未有研究报道。本研究结果提示,ARL-1 可能通过减少醛类化合物所引起的氧化应激在人心血管中起着重要的保护作用。这为进一步研究 ARL-1 在心血管疾病中的作用提供了重要的实验依据。

[参考文献]

- [1] Cao D, Fan ST, Chung SS. Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273** (19): 11 429-435.
- [2] Sierra LM, Barros AR, Garcia M, et al. Acrolein genotoxicity in *Drosophila melanogaster*: Somatic and germinal mutagenesis under proficiency repair conditions [J]. *Mut Res*, 1991, **260** (2): 247-256.
- [3] Horton ND, Mamiya BM, Kehler JP. Relationships between cell density, glutathione, and proliferation of A549 human lung adenocarcinoma cells treated with acrolein [J]. *Toxicology*, 1997, **122** (1): 111-122.
- [4] Ramu K, Perry CS, Ahmed T. Studies on the basis for toxicity of acrolein mercurates [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, **140** (2): 487-498.
- [5] Rudra PK, Krokan HE. Acrolein cytotoxicity and glutathione depletion in r3 fatty acid sensitive and resistant human tumor cell [J]. *Anticancer Res*, 1999, **19** (2): 461-469.
- [6] Davydov VV, Dobaeva NM, Bozhkov AI. Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging [J]. *Exp Gerontol*, 2004, **39** (1): 11-16.
- [7] Vasiliou V, Pappa A, Petersen DR. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism [J]. *Chem Biol Interact*, 2000, **129** (1): 1-19.
- [8] Li H, Wang J, Kaphalia B, et al. Quantitation of acrolein protein adducts: potential biomarker of acrolein exposure [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2004, **67** (3): 513-524.
- [9] Hashimoto M, Sibata T, Wasada H, et al. Structural basis of protein-bound endogenous aldehydes. Chemical and immunochemical characterizations of configurational isomers of a 4-hydroxy-2-nonenal-histidine adduct [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (10): 5 044-051.
- [10] Uchida K, Stadtman ER. Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (4): 4 544-548.
- [11] Okada K, Wangpoengtrakul C, Osawa T. 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. Identification of proteasomes as target molecules [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274** (34): 23 787-793.
- [12] Uchida K, Stadtman ER. Selective cleavage of thioether linkage in proteins modified with 4-hydroxynonenal [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (3): 5 611-615.
- [13] Hauptlorenz S, Esterbauer H, Moll W, et al. Effects of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and related aldehydes on proliferation and viability of cultured Ehrlich ascites tumor cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 1985, **34** (8): 3 803-809.
- [14] Yang IY, Chan G, Miller H, et al. Mutagenesis by acrolein-derived propargyloxymethyl adducts in human cells [J]. *Biochemistry*, 2002, **41** (12): 13 826-832.
- [15] De Bont R, Van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data [J]. *Mutagenesis*, 2004, **19** (2): 169-185.
- [16] Hou SM, Nori P, Fang JL, et al. Methylglyoxal induces hprt mutation and DNA adducts in human T-lymphocytes in vitro [J]. *Environ Mol Mutagen*, 1995, **26** (2): 286-291.
- [17] Nagy E, Zeisig M, Kawamura K, et al. DNA adduct and tumor formations in rats after intratracheal administration of the urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone [J]. *Carcinogenesis*, 2005, **26** (9): 1 821-828.
- [18] Cline SD, Riggins JN, Tornaletti S, et al. Malondialdehyde adducts in DNA arrest transcription by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (6): 7 275-280.
- [19] Eckl PM. Genotoxicity of HNE [J]. *Mol Aspects Med*, 2003, **24** (1): 161-165.
- [20] 武迎, 王绿娅, 张慧信, 等. 葛根总黄酮对载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠动脉粥样硬化斑块形成的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (4): 317-320.
- [21] Adams JD, Jr, and Klaidman LK. Acrolein-induced oxygen radical formation [J]. *Free Radic Biol Med*, 1993, **15** (1): 187-193.
- [22] Uchida K. Current status of acrolein as a lipid peroxidation product [J]. *Trends Cardiovasc*, 1999, **9** (1): 109-113.
- [23] Suzuki D, and Miyata T. Carbonyl stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Inter Med*, 1999, **38** (2): 309-314.
- [24] Calingasan NY, Uchida K, and Gibson GE. Protein-bound acrolein: A novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease [J]. *J Neurochem*, 1999, **72** (3): 751-756.

(此文编辑 李玲玲)