

谷胱甘肽 S- 转移酶 Pi 在 MAPK 途径中的调节作用

朱 键, 谈 莹, 何 兰, 司马健, 殷志敏*

(南京师范大学生命科学学院生物化学与生物制品研究所, 南京 210097)

摘 要: 谷胱甘肽 S- 转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)是细胞内降解生物异源物质(xenobiotics)的一类酶, GST π /GSTpi/GSTp 是人体内的一种重要活性亚型; 有丝分裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径能够调节真核细胞凋亡、增殖、分化和应激。1999 年国际上首次报道 GSTpi 能够在 MAPK 信号途径中起调节作用, 其作用机制如下: 在正常生长条件下, GSTpi 以单体形式与 JNK(c-Jun N-terminal kinase) 形成复合物, 抑制 JNK 活性; UV 照射或 H₂O₂ 处理细胞后, GSTpi 自身形成二聚体/多聚体, 导致 GSTpi-JNK 复合物解离, JNK 的抑制被解除, JNK 被磷酸化激活后激活转录因子 c-Jun, c-Jun 的激活能进一步促进 GSTpi 基因的转录, 进而合成新的 GSTpi 蛋白单体, 该单体又能反馈抑制 JNK。后续研究发现 GSTpi 也能够抑制 JNK 激酶的上游激酶 ASK1 的活性。上述研究揭示 GSTpi 酶在细胞内除能通过降低异源物质而改变细胞的 ROS 平衡外, 其蛋白本身还具有特异性地抑制 MAPK 信号转导途径中 JNK 激酶和 JNK 上游激酶的新功能。

关键词: MAPK; GSTpi; 活性氧; 信号转导

中图分类号: Q2, Q7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)03-252-05

1 GSTs 与 MAPKs

GSTs(EC2.5.1.18)是一组同功酶超家族, 含有两个结合结构域: GSH 结合结构域(G-site)和底物结合结构域(H-site), 能够催化还原型谷胱甘肽上的硫原子亲核攻击底物上的亲电子基团, 降低细胞内的有毒物质水平。此外 GSTs 还可以结合一些亲脂性化合物, 甚至还作为过氧化酶(oxidases)和异构酶(isomerases)发挥作用^[1]。依据一级结构, 哺乳动物 GSTs 可分为八个亚类: ① α 亚型(GST α)、② κ 亚型(GST κ)、③ μ 亚型(GST μ)、④ π 亚型(GST π /GSTpi/GSTp)、⑤ σ 亚型(GST σ)、⑥ θ 亚型(GST θ)、⑦ ω 亚型(GST ω)、⑧ ζ 亚型(GST ζ)。GSTpi 是广泛存在的主要亚型^[2]。

MAPKs 可以被各种生物和理化因素激活^[3-6], 活化的 MAPKs 可以激活各种转录因子, 调节基因表达, 导致细胞凋亡、增殖、分化、应激^[3]。目前, 在哺乳动物细胞内已鉴定出至少 3 种 MAPK 亚族: 胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK), c-Jun 氨基末端激酶/应激激活蛋白激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK/stress activated protein kinase, SAPK)和 p38^[7,8]。ERK 的激活主要受表

皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)等生长因子的调节, JNK 和 p38 的活性与 UV 或 X 射线照射、热激、渗透压改变及某些化学物质处理等环境压力^[4,5]和肿瘤坏死因子家族(tumor necrosis factor family, TNF family)成员等细胞因子结合有关^[6]。MAPKs 激活的蛋白有 ELK-1、c-Jun、c-Myc、p53 等转录因子和 MAPK 激活的蛋白激酶(MAPK-activated protein kinases, MAPKAPKs)等非转录因子蛋白^[3]。

MAPKs 由上游的激酶 MAPK kinases(MAPKKs/MEKs)激活, MAPKKs 本身还被 MAPKK kinases(MAPKKKs/MEKKs)所调节。不同的 MAPKK 具有相应的底物: MKK1 和 MKK2 激活 ERK1 和 ERK2, MKK3 和 MKK6 激活 p38, MKK4 既能激活 p38 也能激活 JNK^[9], MKK7 只激活 JNK。MAPKK 上游有 MEKKs, MLKs(mixed lineage kinases), ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), GCK(germinal center kinase), NIK(NF- κ B inducing kinase), Rac 和 Cdc42 等^[3](详见图 1)。

收稿日期: 2003-11-10; 修回日期: 2004-01-07

国家自然科学基金资助项目(No.30270527)

* 通讯作者, E-mail: Zhiminy_2000@yahoo.com

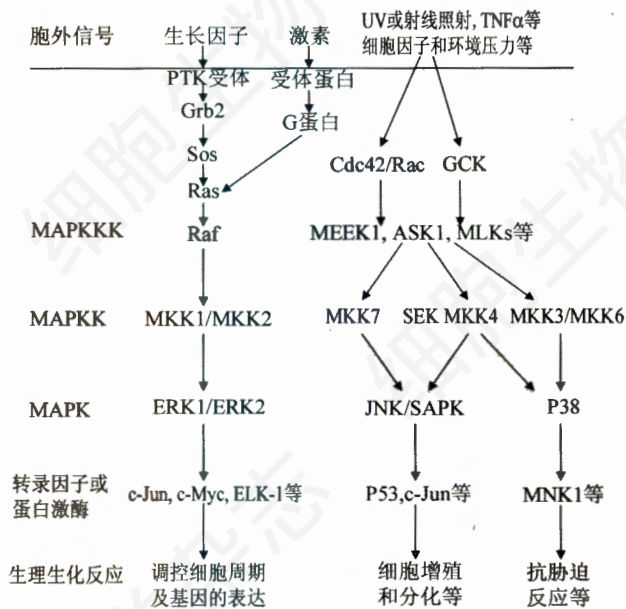


图1 MAPKs 级联反应

2 GSTpi 对 JNK 激酶活性的调节

2.1 GSTpi 调节 JNK 活性功能的发现

JNK 与其他激酶类似, 其主要的活性调节方式是磷酸化/去磷酸化。一些实验表明在正常生长条件下的细胞, 生长因子刺激能够导致 JNK 被磷酸化, 但 JNK 仍保持较低的本底活性; 另外在一些细胞类型中有较高的 JNK 本底活性。磷酸化/去磷酸化调节并不能很好地解释上述现象, 提示细胞内还存在着其他可以调节 JNK 活性的机制。

1999 年作者所在的研究小组首次发现在正常生长条件下的细胞内含有一种 JNK 的天然抑制蛋白, 这种抑制蛋白能够阻断活化的 JNK 磷酸化 c-Jun。经分离、纯化、鉴定这种蛋白是 GSTpi, 且 GSTpi 的抑制作用与通常的催化活性无关。通过免疫沉淀, 在胞内可以检测到 GSTpi-JNK 复合物的存在。细胞受 UV 或 H_2O_2 刺激后, GSTpi-JNK 复合物减少, 但 JNK 总体表达量并不发生显著变化, 而 GSTpi 单体形式减少, 相应的是二聚体/多聚体形式的增加, 最终表现为 c-Jun 磷酸化水平的增加^[10], 这说明 GSTpi 可能作为 JNK 的结合蛋白而抑制 JNK 活性。最近又有报道, Wang 等通过荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer FRET) 的方法证实 JNK 的 C 端能形成负电区域与 GSTpi 结合^[11]。上述实验说明, 细胞在正常生长条件下, 不管 JNK 是否被磷酸化, GSTpi 单体形式与 JNK 形成复合物, 维持了 JNK 较低的本底活性; 一旦细胞受到

UV 或 H_2O_2 等外界刺激, GSTpi 形成二聚体/多聚体, 从而可能造成空间位阻, 与 JNK 解离, 使 JNK 激酶活性的抑制被解除^[10]。

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 包括过氧化物 (superoxide)、单体氧 (singlet O_2)、 H_2O_2 、羟自由基 (highly hydroxyl radical)、NO 等。UV 和 H_2O_2 刺激细胞激活 JNK 活性与 ROS 的产生有关, 因为自由基清除剂 [如还原型谷胱甘肽 (GSH)、GSH 前体物质 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetyl cysteine, NAC) 等] 可以减少 GSTpi 二聚体/多聚体的形成, 抑制 GSTpi-JNK 复合物的解离, 维持 GSTpi 的抑制作用^[10]。GSTpi 本身具有 4 个半胱氨酸位点, 分别是 15 位、47 位、101 位和 170 位。ROS 能够使这些位点的半胱氨酸残基上的 -SH 交联形成分子内二硫键, 改变蛋白分子构象; 或形成分子间二硫键, 使单体 GSTpi 转变成二聚体/多聚体, 进而使 GSTpi 与结合蛋白解离。

2.2 GSTpi 调节 JNK 活性的反馈抑制环

c-Jun 是激活蛋白 1 (activator protein 1, AP-1) 的一个组分, 在许多与细胞凋亡、增殖、分化和应激相关基因的启动子内部含有 AP-1 结合位点, AP-1 与之结合可以促进这些基因的转录^[3]。JNK 底物 c-Jun 的 N 端第 30~57 位氨基酸残基能形成一个 δ 结构域, 通过 δ 结构域 c-Jun 可以与 JNK 结合。在非压力条件下生长的细胞内 JNK 本底活性较低, JNK 与 c-Jun 的结合并不导致 c-Jun 的磷酸化, 相反促进 c-Jun 的泛素化降解; 在压力激活后, JNK 活性增加, JNK 与 c-Jun 的结合导致 c-Jun 被磷酸化, 磷酸化的 c-Jun 与 JNK 解离, 不被降解并启动有关基因的转录^[12], 即 JNK 的激活增加了 c-Jun/AP-1 的稳定性和活性。在 GSTpi 基因的启动子中含有 AP-1 结合位点^[5], 因而 JNK 的激活能够促进 GSTpi 基因的转录, 新合成的 GSTpi 可以结合 JNK, 反馈抑制 JNK 的活性。有报道, 在抗肿瘤药物 (抗肿瘤药物可以激活 JNK, 最终导致肿瘤细胞死亡) 处理一些肿瘤细胞后, GSTpi 的 mRNA 量确实增加了; 细胞质中 GSTpi 量上升。有趣的是, GSTpi 会通过核膜上一种特殊的转运系统进入核内, 导致核内 GSTpi 水平也上升, 从而可以参与核内药物降解, 防止 DNA 破坏^[13]。因为研究认为 JNK 磷酸化后会进入核内作用于转录因子^[8], 即新合成的 GSTpi、激活的 JNK 在应激后同时出现在细胞核内, 所以核内 GSTpi 量的增加对反馈抑制环的存在提供了一个更

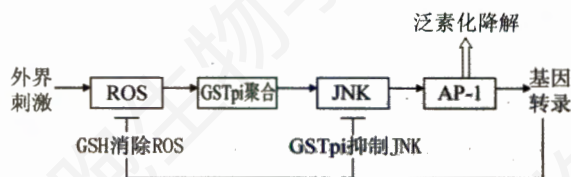


图2 JNK 激活途径的反馈抑制

具体的证据。

GSH 由 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ -glutamylcysteine synthetase, γ -GCS) 和谷胱甘肽合成酶 (glutathione synthetase, GSS) 这两个酶合成, 其中 γ -GCS 是限速酶, 由一个大亚基 (γ -GCS heavy subunit, γ -GCS-HS; 73kDa) 和一个小亚基 (γ -GCS light subunit, γ -GCS-LS; 28kDa) 构成, 大亚基拥有全部的催化活性。在 γ -GCS-HS 基因启动子内部也含有 AP-1 位点^[14]。实验表明, 一些外界刺激正是通过 ROS 介导引起 AP-1 活性增加, 直接导致 GSH 水平上升^[14,15]。GSH 可以消除 ROS, 而自身被氧化成两种形式: 自身交联形成二聚体 GSSG, 和与其他蛋白质上的巯基交联形成 GS-R^[16]。此外, 关于应激后形成的 GSTpi 二聚体/多聚体进一步的代谢, 并没有相关报道, 不知 GSH 能否与 GSTpi 二聚体/多聚体发生反应而直接生成 GSTpi 单体?

总之, GSTpi 和 GSH 水平的上升会消除 ROS 效应, 抑制 JNK 活性, 降低 c-Jun 磷酸化水平, 增加 c-Jun 泛素化降解, 使细胞内环境获得新的平衡。

上述情况可用图 2 加以描述。

如前所述, JNK 的底物有 ELK-1、c-Jun、c-Myc 和 p53 等, 都是细胞关键的转录因子, 能够决定细胞的命运, 所以要通过反馈抑制环精细调节 JNK 的活性。一般认为, JNK 短时激活导致细胞增殖, 长时激活导致细胞凋亡^[12], 细胞受刺激后的命运是增殖还是凋亡可能取决于 JNK 被反馈抑制的程度。

3 GSTpi 对其他激酶活性的调节作用

GSTpi 对 JNK 活性的调节不仅表现在对 JNK 本身的影响, 而且还能通过 JNK 上游激酶如 ASK1 间接影响 JNK 的活性。

我们发现在 293 培养细胞中撤离血清会激活胞内 ASK1-MKK7-JNK 途径; 将 GSTpi 转染 293 细胞进行瞬时表达, 发现在血清撤离后 ASK1、MKK7 以及 JNK 的磷酸化均被抑制^[17]。我们推测这一现象可能的原因是: 其一, GSTpi 直接或间接阻断了

MKK7 磷酸化 JNK; 其二, GSTpi 抑制了 ASK1 的活性而导致 MKK7、JNK 的磷酸化依次减少。Cho et al 和 Dorion et al 发现, 鼠 GST μ (mGST μ) 能够与 ASK1 在体内与体外条件下结合, 阻止 ASK1 的多聚化, 抑制 ASK1 激酶活性, 从而抑制热刺激诱导的 p38 活性, 这种功能同样与 GST μ 转移酶活性无关。体外激酶活性还表明 GSTpi 不抑制 ASK1^[1,18]。这样看来 GSTpi 在体内也许是通过一个中间分子(比如支架蛋白)抑制 ASK1 的激酶活性。

体外实验表明 GSTpi 并不抑制 MKK4 对 JNK 的磷酸化。在 NIH3T3 细胞中单独转染 GSTpi, MKK4 的磷酸化水平降低; 如果同时共转染 Δ MEKK1 (MEKK1 的持续激活突变体), MKK4 磷酸化水平则不受影响^[10]。可能 GSTpi 抑制了 MKK4 上游某一个/某几个激酶的活性, 但当表达 Δ MEKK1 时, Δ MEKK1 的激活作用掩盖了这种抑制效果, 这里 MKK4 的上游激酶可能包括 ASK1。我们的研究还发现, 将 GSTpi 转染 293 细胞进行瞬时表达, 在血清撤离后 MKK4 的磷酸化不受影响^[17], 这可能与血清撤离后激活 ASK1 的同时激活 MEKK1 有关; 过表达的 GSTpi 虽然抑制 ASK1, 但由于 MEKK1 的激活使得 MKK4 的磷酸化表现得不受影响。GSTpi 特异性地抑制 JNK 激酶以及上游激酶的具体作用机制还不是很清楚, 有待进一步研究。

H₂O₂ 处理 NIH3T3 细胞后会激活 ERK、JNK、p38 和 IKK(I κ B kinase); 如果转染表达 GSTpi 然后再用 H₂O₂ 处理 NIH3T3 细胞, 可以降低 JNK 的磷酸化水平, 但进一步增强了 ERK、p38 和 IKK 活性, 从而降低细胞死亡率。在抑制 JNK 的同时还激活了其他 MAPK 激酶, 这种协调作用的机理还不是很清楚, 也许是 GSTpi 与 JNK 上游激酶或支架蛋白存在相互作用。有趣的是 ERK、p38 和 NF- κ B 途径的抑制反而会衰减 GSTpi 的保护作用, 提示 GSTpi 与 caspases 可能存在一定的联系^[19]。

综上所述, GSTpi 在细胞应激过程中通过调节 MAPK 途径中各种激酶活性发挥了重要作用, 从而揭示了 GSTpi 除谷胱甘肽-S-转移酶活性以外的全新功能。

4 GSTpi 新功能发现的意义

从已有研究结果来看, GSTpi 调节 MAPK 活性功能的发现具有以下一些意义。

4.1 对激酶活性调节方式的理解具有新的参考价值

前期报道, 硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)在细胞非应激的生长条件下能与 ASK1 结合; 细胞内 ROS 水平升高可使 TRX 形成分子间二硫键, TRX 与 ASK1 解离, ASK1 多聚化从而激活^[12,16,17,20], 这与 GSTpi 调节 JNK 活性的机理类似。TRX 和 GSTpi 同属抗氧化蛋白, ROS 的改变可以改变 TRX 和 GSTpi 中巯基的交联状况, 从而导致 TRX 与 GSTpi 抑制激酶活性功能的获得或丧失, 进而调节激酶活性。这种巯基的交联也许可作为激酶活性调节的一种新的方式, 与磷酸化/去磷酸化直接修饰激酶相比, 这种方式是间接的: 通过修饰结合蛋白而实现^[16]。

4.2 为一些应激信号通路的阐明提供新的视点

细胞内源性因素和外源性刺激均可引起胞内 ROS 水平改变, UV 照射或 H₂O₂ 处理激活的应激反应包括 ROS 介导的 JNK 激活, 但是具体机制不是很清楚^[4]。研究表明肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)结合到细胞表面受体后也会产生 ROS, 从而进一步激活 JNK^[16]。这里 GSTpi 应该是 ROS 所介导的 JNK 激活途径中的一个调节组分。越来越多的证据表明 ROS 可以作为第二信使介导一些外源刺激所引起的应激反应^[20]。如果这是事实的话, 那么寻找类似 TRX 与 GSTpi 的 ROS 敏感分子对于阐明一些应激信号通路十分有意义。最后, Daxx 所激活的 ASK1 说明 TRX 与 ASK1 的解离还存在其他机制。一些外界刺激似乎并不能产生 ROS, 如细胞因子刺激, 也能够激活 JNK, 这里造成 GSTpi 与 JNK 解离的机制有待进一步研究^[10,20]。

4.3 设计以 GSTpi 为靶点的抗肿瘤药物

早期研究只表明 GSTpi 能够催化降解有关生物异源物质, 上述研究揭示 GSTpi 还能够作为信号转导途径的一个调节蛋白, 并且这种调节作用与 GSTpi 通常的催化活性无关, 人们对于 GSTpi 的功能又有了更多的了解。一些肿瘤细胞能够耐受抗肿瘤药物, 研究发现这些细胞中的 GSTpi 表达量较正常细胞要高, 一般认为 GSTpi 参与了这些药物作为生物异源物质的降解, 但是一些药物并不能作为 GSTpi 的底物, 而高表达量的 GSTpi 也能够起到类似的作用。GSTpi 也许是通过抑制 JNK 活性(直接抑制 JNK 和间接抑制 JNK 上游激酶)来保护细胞免于死亡的。这样 GSTpi 可以作为辅助治疗肿瘤的药物靶标: 人们可以通过设计药物, 削弱 GSTpi 的保护作用, 增强某些肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感性^[10]。

感谢吴一凡博士在学术上给予的指导

参 考 文 献

- [1] CHO S G, LEE Y H, PARK H S, *et al.* Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem*, 2001, **276**(16): 12749 – 12755.
- [2] MARIO L B, MARZIA N, ANNA M C, *et al.* Human Glutathione Transferase P1-1 and Nitric Oxide Carriers. *J Biol Chem*, 2001, **45**: 42138 – 42145.
- [3] TIBBLES L A, WOODGETT J R. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci*, 1999, **55**: 1230 – 1254.
- [4] ADLER V, SCHAFFER A, KIM J, *et al.* UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways. *J Biol Chem*, 1995, **270**(44): 26071 – 26077.
- [5] WILHELM D, BENDER K, KNEBEL A, *et al.* The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinases by alkylating agents. *Mol Cell Biol*, 1997, **17**(8): 4792 – 4800.
- [6] MORIGUCHI T, TOYOSHIMA F, MASUYAMA N, *et al.* A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNF α and cellular stresses. *EMBO J*, 1997, **16**(23): 7045 – 7053.
- [7] YAO Z B, DIENER K, WANG X H S, *et al.* Activation of stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal protein kinases (SAPKs/JNKs) by a novel mitogen-activated protein kinase kinase (MKK7). *J Biol Chem*, 1997, **272**(51): 32378 – 32383.
- [8] TOURNIER C, WHITMARSH A J, CAVANAGH J, *et al.* The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH₂-terminal kinase kinases. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(2): 1569 – 1581.
- [9] TOURNIER C, WHITMARSH A J, CAVANAGH J, *et al.* Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun N-terminal protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 7337 – 7342.
- [10] Adler V, Yin Z M, Fuchs S Y, *et al.* Regulation of JNK signaling by GSTpi. *EMBO J*, 1999, **18**(5): 1321 – 1334.
- [11] WANG T L, ARIFOGLU P, RONAI Z E, *et al.* Glutathione S-transferase P1-1(GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *J Biol Chem*, 2001, **276**(24): 20999 – 21003.
- [12] DAVIS WJ, RONAI Z, TEW K D. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, **296**(1): 1 – 6.
- [13] GOTO S, HARA Y, URATA Y, *et al.* Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase π . *FASEB J*, 2001, **15**: 2702 – 2714.
- [14] RAHAMAN I, MITH C A D, ANTONICELLI F, *et al.* Characterisation of γ -glutamylcysteine synthetase-heavy subunit promoter: a critical role for AP-1. *FEBS Lett*, 1998, **472**: 129 – 133.
- [15] RAHAMAN I, ANTONICELLI F, MACNEE W. Molecular mechanism of the regulation of glutathione synthesis by tumor necrosis factor- α and dexamethasone in human alveolar epithelial cells. *J Biol Chem*, 1999, **274**(8): 5088 – 5096.
- [16] FILOMENI G, ROTILIO G, CIRIOLO M R. Cell signaling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol*, 2002,

- 64: 1057 – 1064.
- [17] 殷志敏, 刘爱华, 姜 勇. 谷胱甘肽 S-转移酶 π 通过抑制 ASK1-MKK7-JNK 通道保护血清撤离诱导的 293 细胞死亡. *生物化学与生物物理学报*, 2001, **33**(2): 185 – 190.
- [18] DORION S, LAMBERT H, LANDRY J. Activation of p38 signaling pathway by heat shock involves the dissociation of glutathione S-transferase mu from ASK1. *J Biol Chem*, 2002, **277**(34): 30792 – 30797.
- [19] YIN Z M, IVANOV V N, HABELHAH H, *et al.* Glutathione S-transferase P elicits protection against H₂O₂ induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res*, 2000, **60**: 4053 – 4057.
- [20] ADLER V, YIN Z M, TEW K D, *et al.* Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*, 1999, **18**: 6104 – 6111.

A Novel Function for Glutathione S-Transferase π in MAPK Pathway

ZHU Jian, TAN Ying, HE Lan, SI Ma Jian, YIN Zhi Min*

(*Institute of Biochemistry and Biological Product, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China*)

Abstract: Glutathione S-Transferases (GSTs) comprise a family of enzymes that contribute to cellular xenobiotic detoxification. In particular, GST π /GST π ii/GST π i is the most ubiquitous isozyme. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway can regulate the apoptosis, proliferation, differentiation and stress responses of eukaryotes. In 1999, a research group first demonstrated that GST π i can modulate MAPK signal pathway, in which under non stressed conditions the monomeric form of GST π i binds JNK and leads to JNK inhibition, while upon UV or H₂O₂ treatment, the dimerization or polymerization of GST π i itself results in GST π i-JNK complex disassociation and eventually the release of JNK inhibition, activated JNK by phosphorylation activates c-Jun, further activates the transcription of GST π i, the newly synthesized monomeric GST π i can inhibit JNK as feedback. GST π i can also regulate the JNK upstream kinase ASK1 to protect cell from serum withdraw. These researches uncovered a novel function for GST π i to regulate MAPK signal transduction pathway other than changing the cellular ROS level by reducing the cellular xenobiotics.

Key words: MAPK; GST π i; reactive oxygen species; signal transduction

This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (No.320270527)

*Corresponding author, E-mail: Zhiminy_2000@yahoo.com