

人谷胱甘肽 S-转移酶 pi(GSTp)中半胱氨酸对其在细胞氧化应激下功能的影响*

司马健 何 兰 朱 键 薛 彬 邵一琳 张双全 殷志敏**

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要 利用 PCR 定点突变技术构建人 GSTp 三种半胱氨酸突变体 C⁴⁷⁻¹⁰¹、C^{14/47-101} 和 C^{14/47-101-169}。将 GSTp 野生型和突变体表达质粒转染 293 细胞,以 CDNB 为底物测定胞内 GST 的转移酶活性,结果显示各类突变体均明显抑制了细胞内源性 GST 的催化活性,具有显著的负显性 (dominant negative) 突变体的功能;将 GSTp 野生型和突变体与 c-Jun、NF- κ B 和 p53 的报告基因载体共转染,通过萤光素酶活性测定发现突变体 C^{14/47-101} 和 C^{14/47-101-169} 能明显激活 c-Jun 和 p21 的转录活性;Western 印迹分析显示突变体均能上调细胞内 p21 蛋白的水平,细胞存活率的测定表明 GSTp 突变体能增强 293 细胞对 H₂O₂ 刺激的敏感性;实验结果表明半胱氨酸残基对于维持 GSTp 在对抗细胞氧化应激过程中的保护作用至关重要。

关键词: 谷胱甘肽 S-转移酶 pi 半胱氨酸 定点突变 氧化应激 负显性

细胞内氧化还原的平衡对于维持细胞正常生理状态具有非常重要的作用。细胞在生长代谢过程中,多种外界刺激(包括理化因素、致癌物和各种细胞因子等)能够通过不同的途径直接或间接的造成胞内的强氧化环境,这种作用主要是通过诱导活性氧类物质(Reactive Oxygen Species, ROS)造成的,ROS 的亲核代谢产物通过对多种转录因子(如 AP-1、NF- κ B 等)作用迅速引起细胞对应激的反应,从而导致细胞增殖、分化、凋亡和衰老。因此,控制胞内 ROS 的稳定与平衡是细胞对抗外界刺激免于损伤的主要保护机制^[1-4]。

细胞内有多种抗氧化物质能自发的对抗氧化应激(Oxidative Stress),其中谷胱甘肽起着重要作用。一方面可直接清除 ROS,同时对 ROS 引起的信号转导具有调节作用^[5,6]。胞内谷胱甘肽的“稳态”(Homeostasis)水平主要由谷胱甘肽 S-转移酶(GST)调控且与多种应激酶的激活密切相关^[7]。

谷胱甘肽 S-转移酶 (Glutathion S-transferase GST EC2.5.1.18) 是胞内降解生物异源物质的一组超家族同工酶,广泛存在于线虫、果蝇、酵母和高等脊椎动物细胞质中。哺乳动物 GST 基因编码的胞质酶根据结构和底物特异性分为八个亚型: α 、 κ 、 μ 、 π 、 σ 、 θ 、 ω 和 ζ 每个亚型都具有两个结构域:GSH 结合结构域(G-site)和底物结合结构域(H-site)^[8-10]。

GSTp(GST π)是人体内 GST 的一种重要的活性亚型,因其首先在人体胎盘中被克隆而得名。GSTp 在多种肿瘤组织(包括结肠癌、乳腺癌、肺癌和胰腺癌等)细胞和转化的细胞株中丰度极高,且与肿瘤细胞的耐药性密切相关。GSTp 在维持细胞的正常机能中发挥着重要作用,敲除 GSTp 的细胞系和小鼠对外界刺激十分敏感,容易引起癌变^[8]。近年来发现 GSTp 蛋白本身在与 ROS 相关的细胞信号转导通路过程中具有重要地位:在正常生长的细胞中,GSTp 通过与 JNK 的结合维持细胞中的 JNK 低活性,当细胞受到外界刺激如 UV、热刺激、H₂O₂ 等作用后,胞内 GSTp 发生多聚化,与 JNK 解离而使后者被激活^[11,12]。GSTp 分子中有四个半胱氨酸位点与 GSTp 多聚化密切相关。关于 GSTp 47 位和 101 位半胱氨酸突变后引起酶活性下降的研究已经有报道^[13,14]。为了进一步研究 GSTp 中半胱氨酸在细胞氧化应激过程以及细胞信号传导中的功能,我们将人 GSTp 14、47、101 及 169 位的半胱氨酸突变为丙氨酸,构建了 3

本文 2003 年 8 月 21 日收到。2004 年 2 月 20 日接受
国家自然科学基金(30270527)和国家教委留学回国人员
启动基金(2002SWXSBJBC22)资助

* 通讯作者: Tel: 025-86214554, Fax: 025-86214554,
E-mail: Zhiminy_2000@yahoo.com

个半胱氨酸突变体 GSTp, 分别为 C⁴⁷⁻¹⁰¹、C^{14-47/101} 和 C^{14-47/101/169}, 转染至 293 细胞中, 研究突变体的转移酶活性负显性效应及其对相关转录因子的调控作用, 进一步探讨 GSTp 蛋白结构与功能的关系及在细胞氧化应激过程中保护细胞免受损伤的分子机制。

1 材料与方法

1.1 质粒与细胞

人胚胎肾细胞 HEK293 细胞、pcDNA3.1 为本室冻存。pcDNA3.1/GSTp-HA 由本室自行构建、萤光素酶报告基因表达载体 pGL2/5×Jun2-luc、pGL2/p21^{wf}-luc、pGL2/NF-κB-luc 由美国 Mount Sinai 医学中心 Dr Ze'ev Ronai 惠赠。

1.2 主要试剂

T₄ DNA Ligase、dNTPs、XbaI、HindIII 均购自 MBI 公司, PfuTurbo DNA Polymerase 购自 Stratagene 公司, Anti-HA mAb 购自 Cell Signaling Technology 公司, Anti-p21 mAb 购自 Labvision 公司, 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase HRP)偶联的羊抗鼠 IgG 二抗购自 Calbiochem 公司, TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl Benzidine) 及 CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) 购自 Sigma 公司, 其它试剂均为上海生物工程公司进口分装。

1.3 GSTp 中半胱氨酸的定点突变和表达载体的构建

根据 GSTp cDNA 序列, 我们设计了 10 条引物, 其中 P1-P8 分别用于 GSTp 14、47、101 和 169 位半胱氨酸的点突变, P9 为 pcDNA3.1 的 T7 primer, P10 为 pcDNA3.1 中的 BGH reverse priming site, 下划线代表突变后的丙氨酸密码子。引物均由上海生物工程公司合成。

P1 5'-ACTCAAAGCCTCCGCCCTATACGGGCAG-3'
P2 5'-CTGCCCCGTATAGGGCGGAGGCTTTGAGT-3'
P3 5'-GACCTCCGCGCCAAATACATCTCCCTC-3'
P4 5'-GACGGAGATGTATTTGGCGCGCTAGGTC-3'
P5 5'-AGTTCGAGGCCGCGCGCGGCCCTGCGCAT-3'
P6 5'-ATCGCGAGGGCGCGGGCGGCCCTCGAACT-3'
P7 5'-TCCTAGCCCCCTGGCGCCCTGGATGCCTTTC-3'
P8 5'-GAACGCATCCAGGGCGCCAGGGGCTAGGA-3'
P9 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
P10 5'-TAGAAGGCACAGTCCGAGG-3'

利用重叠延伸 PCR 法, 以 pcDNA3.1/GSTp-HA 载体为模板扩增出 GSTp 47 及 101 位半胱氨酸突

变体 cDNA, 经双酶切定向克隆至 pCDNA3.1 中, 构建成突变体 C⁴⁷⁻¹⁰¹ (C2), 再以 C2 为模版, 用同样方法突变 14 位及 169 位半胱氨酸并构建成突变体 C^{14-47/101} (C3) 与 C^{14-47/101/169} (C4)。野生型与突变体 GSTp 在 C 末端均带有 HA-Tag。突变体 DNA 序列均由上海基康公司测定。

1.4 细胞培养和转染

293 细胞在 37℃、5%CO₂ 条件下, 用含 10%FBS (Fetal Bovine Serum) 和青/链霉素的 DMEM 培养液培养。转染前 12h 将细胞重新铺到 100mm 培养皿中, 待约 50% 细胞汇片时, 用磷酸钙沉淀法转染 293 细胞, 具体方法按《分子克隆实验指南》第三版进行。转染所用 DNA 的量见结果中的实验说明, 用 pcDNA3.1 调节平衡每次转染总 DNA 量。

1.5 Western 印迹分析

Western 印迹法证实目的蛋白在细胞内的表达。细胞裂解方法参见《分子克隆实验指南》第三版, BCA assay reagent 测定蛋白浓度, 取 80μg 蛋白进行 13% 的 SDS-PAGE, 将蛋白转移至 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂牛奶的 TBST (10mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 150mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20) 液封闭。加抗 HA 或抗 p21 单抗 4℃ 孵育过夜, HRP 偶联的羊抗鼠 IgG 作为第二抗体, 加底物 TMB 进行显色, 检测蓝黑色条带。

1.6 GST 转移酶活性测定

酶活测定按参考文献[15], 以 CDNB 为底物进行测定。取 20μl 的细胞裂解上清液 (约 50μg 蛋白), 加入到 0.1mol/L 磷酸钾 (0.1mol/L EDTA, 1mmol/L CDNB, 1mmol/L GSH) 缓冲液中, 补水至终体积 1ml, 25℃ 间隔 0、3、5、10 min 于 340nm 处测定吸光值, 以每分钟产生 1μmol CDNB-GSH 复合物所需 GST 的量定义为一个酶活单位(u)。

1.7 萤光素酶活力测定

按 Promega 公司 Luciferase Assay Kit 说明书进行。

1.8 H₂O₂ 刺激细胞及 MTT 法测定细胞存活率

采用 MTT 法测定细胞存活率。293 细胞转染后 24h, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 以含 10%FBS 的 DMEM 培养液吹打成单个细胞悬液, 以每孔 10⁵ 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔体积 200μl, 37℃, 5%CO₂ 培养 12h 后, 用含终浓度 100μmol/L H₂O₂ 或 50μmol/L H₂O₂ 的培养液处理 6h, 每孔加入 5mg/mL MTT 20μl, 37℃ 孵育 4h, 吸去培养液, 每孔

加入 150 μ l DMSO,振荡 10min,于 490nm 处测定,630nm 为参比检测吸光值。

2 结 果

2.1 GSTp 半胱氨酸突变体在 293 细胞中的表达

C2、C3 和 C4 经 DNA 序列测定,相应位点均突变成功(数据未显示)。将 GSTp 野生型与突变体表达质粒转染 293 细胞,24h 后裂解细胞,用抗 HA 单克隆抗体进行 Western 印迹分析目的蛋白表达情况,预染蛋白标记显示目的蛋白分子量约为 25kD,与预期分子量一致。结果见(图 1)。

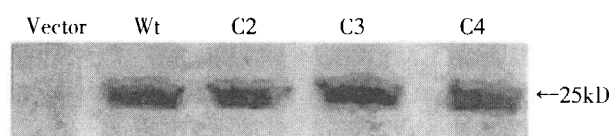


图 1 Western 印迹检测 GSTp 野生型及其三个突变体在 293 细胞中的表达

将 3 μ g 野生型 GSTp 及各个半胱氨酸突变体转染 293 细胞,以空载体作对照。转染 24h 后,收集并裂解细胞,蛋白用 HA 单抗进行免疫印迹分析。

Fig.1 Western blot analysis for expression of wide-type GSTp and its three cysteine mutants in 293 cells

293 cells were transfected with 3 μ g wide-type GSTp or each cysteine mutant, empty vector as control. 24 hours after transfection, cells were harvested and lysated. Proteins were subjected to immunoblot analysis using HA monoclonal antibody.

2.2 GSTp 野生型和突变体对 293 细胞内 GST 转移酶活性的影响

将 GSTp 野生型和突变体表达质粒转染细胞后,以 CDNB 为底物测定胞内 GST 的转移酶活性,结果显示 GSTp 突变体抑制了胞内总 GST 的酶活,且这种抑制作用与半胱氨酸突变位点数目呈正相关(图 2)。表明在 293 细胞中,GSTp 3 个半胱氨酸突变体在转移酶催化活性上呈现了递增的负显性(dominant negative)作用,这种负显性作用可能是由于本身无催化活性的突变体与胞内 GST 竞争结合谷胱甘肽,干扰了内源性 GST 的正常酶活性。

2.3 GSTp 半胱氨酸突变体对 c-Jun 以及 NF- κ B 转录活性的影响

已经证实 GSTp 在细胞氧化应激引起的信号通路中具有重要地位,为研究构建的突变体对几条主

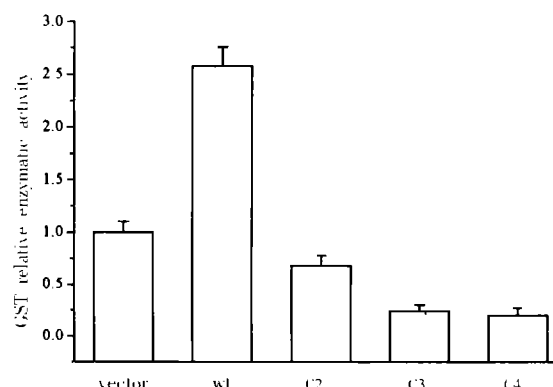


图 2 GSTp 半胱氨酸突变体对于其酶活性的负显性作用

将野生型 3 μ g GSTp 及各半胱氨酸突变体表达载体分别转染 293 细胞,以空载体为对照,24h 后收集并裂解细胞,上清液用作酶活测定,每次实验重复 3 次。

Fig.2 Dominant negative effect of cysteine mutants on GSTp enzymatic activity

293 cells were transfected with an empty vector (column 1) or 3 μ g wide-type GSTp (column 2), each cysteine mutant vector (column 3-5). 24 hours after transfection, 293 cells were harvested and lysated and cell supernatant was used for enzymatic activity analysis. Each analysis was repeated three times.

要的应激信号通路的影响,我们将 GSTp 和各个突变体分别与 c-Jun 及 NF- κ B 萤光素酶报告基因载体共转染至 293 细胞中,通过萤光素酶活力测定来间接显示这两种转录因子的活化程度。结果发现:野生型 GSTp 抑制了 c-Jun 而激活了 NF- κ B,这与先前的报道一致^[16];同样条件下突变体 C2 并不抑制 c-Jun,且仅轻微激活 NF- κ B;C3 和 C4 则能强烈激活 c-Jun,同时对 NF- κ B 无明显作用(图 3)。我们认为在细胞信号通路中,突变体 C2 丧失了部分功能,而 C3 和 C4 则具有显著的负显性功能。

2.4 GSTp 半胱氨酸突变体对于 H₂O₂ 诱导细胞死亡的影响

野生型 GSTp 过表达对 H₂O₂ 及血清撤离引起的细胞死亡有一定的保护作用^[16,17],为探讨 3 种突变体在保护细胞抵抗氧化刺激中的作用,将各个表达载体转染 293 细胞后用 H₂O₂ 刺激 6h,MTT 法测定细胞存活率显示:在没有外界刺激时,野生型和突变体 GSTp 对细胞均没有明显的作用;但当用 H₂O₂ 处理后,突变体均增加了 293 细胞的死亡率,尤其是 C3 及 C4 的作用更为明显(图 4)。

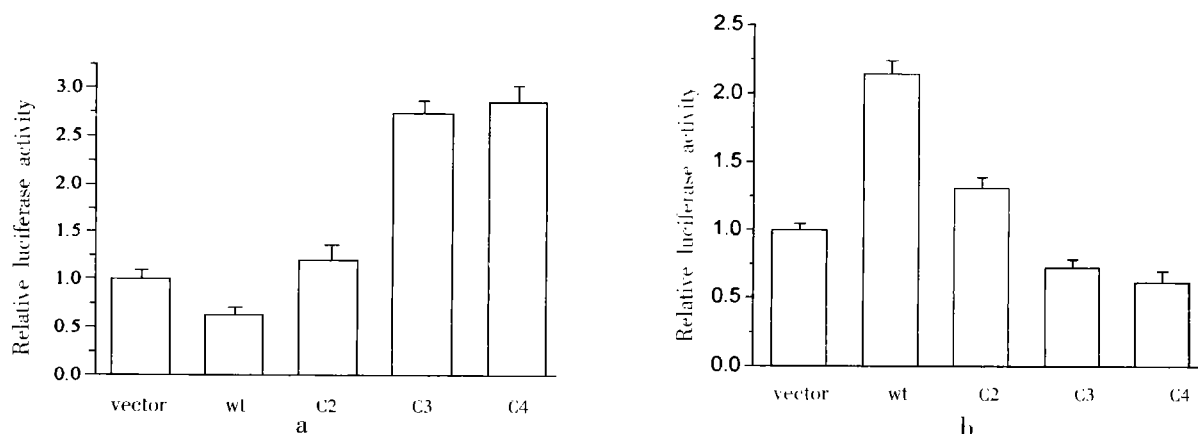


图3 GSTp 半胱氨酸突变体对于 Jun-2 以及 NF-κB 转录活性的影响

293 细胞转染 24h 后测定萤光素酶活,通过共转染 β -半乳糖苷酶表达载体校正转染效率,相对萤光素酶活如图所示,数据显示 3 次实验平均值: a:将 GSTp 及各个半胱氨酸突变体表达载体分别与 Jun-2 luciferase 表达载体共转染 293 细胞,以空载体作对照;b:将 GSTp 及各个半胱氨酸突变体表达载体分别与 NF-κB luciferase 表达载体共转染 293 细胞,以空载体作对照

Fig.3 Effect of cysteine mutants of GSTp on Jun-2 and NF-κB transcriptional activity

The amount of luciferase was quantitated after 24h. Transfection efficiency was monitored by cotransfection with a β -galactosidase expressing vector. The relative luciferase/ β -galactivity detected in cell lysates is presented. Data showed average values of three different experiments. a: 293 cells were co-transfected with Jun-2 luciferase vector(0.5 μ g) together with 3 μ g empty vector(column 1), or 3 μ g expressing vector for GSTp(column 2), each cysteine mutant(column 3-5); b: 293 cells were co-transfected with NF-κB luciferase vector (0.5 μ g) together with an empty vector(column 1),or 3 μ g expressing vector for GSTp (column 2), each cysteine mutant(column 3-5).

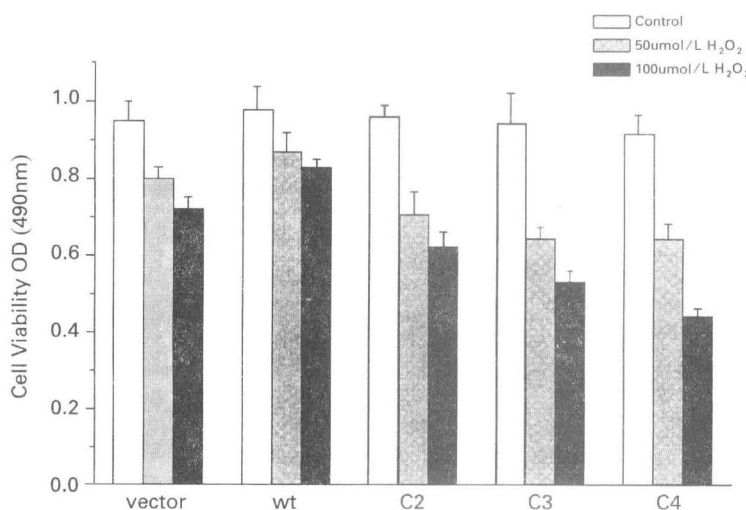


图4 GSTp 半胱氨酸突变体对于 H_2O_2 诱导细胞死亡的影响

将野生型 3 μ g GSTp 及各半胱氨酸突变体表达载体分别转染 293 细胞,以空载体为对照,24h 后细胞被分入 96 孔板,孵育 12h, H_2O_2 处理 6h 后进行 MTT 分析,通过共转染 β -半乳糖苷酶表达载体校正转染效率。数据显示 3 次实验平均值。

Fig.4 Effect of cystein mutants of GSTp on H_2O_2 -induced cell death

293 cells were transfected with an empty vector(3 μ g)(column 1) or 3 μ g plasmid GSTp(column 2), 3 μ g each cysteine mutant (column 3-5). 24 hours after transfection, cells were digested with trypsin and were added into 96 plates for 12h. Then cells were prepared for MTT assay 6h after H_2O_2 treatment. Transfection efficiency was monitored by cotransfection with a β -galactosidase expressing vector. Data showed average values of three different experiments.

2.5 GSTp 半胱氨酸突变体能引起细胞内 p21 转录激活和蛋白水平的上调

当细胞受到氧化刺激时,将引起细胞中的蛋白和 DNA 的损伤,继而会激活肿瘤抑制蛋白 p53^[18,19]。P53 与细胞凋亡以及坏死的关系十分密切。受 p53 的调控,p21 蛋白也是细胞中对氧化刺激极为敏感分子,并且有研究表明,p21 的表达量升高将增强细胞对氧化刺激的敏感性^[20]。为了探讨 p21 与 GSTp 的相互关系以及 GSTp 在 H₂O₂ 诱导细胞死亡过程中的具体分子机制,我们将 GSTp 和各个突变体分别与 P21^{WAF} 荧光素酶报告基因载体共转染至 293 细胞中,通过荧光素酶活力测定,结果显示:突变体

C2、C3 和 C4 均能强烈激活 p21^{WAF} 转录,其激活程度与半胱氨酸突变点的数目正相关(图 5-a)。Western 印迹分析的结果与报告基因实验的结果相一致:转染野生型 GSTp,对细胞内源 p21 的水平没有影响,将突变体 C2、C3、C4 分别转染后,细胞内源 p21 蛋白的水平呈现梯度上升的趋势(图 5-b)。结果显示了突变体 C2、C3、C4 能够引起细胞内 p21 转录激活和蛋白水平的上调,而野生型 GSTp 则没有影响。提示 GSTp 对于维持细胞中 p53 的低活性可能有十分重要的作用。而 GSTp 中半胱氨酸的突变则可能导致细胞中 p53 的激活。

3 讨 论

虽然国外已有关于 GSTp 47 位,101 位半胱氨酸突变后引起酶功能下降的报道^[13,14],但各种突变体在细胞内的功能尚未报道。我们的实验比较了 3 个半胱氨酸突变体与野生型谷胱甘肽 S-转移酶在细胞信号通路中的作用。有许多研究报道表明 GSTp 在细胞中的表达能够抑制 JNK 的活性^[11,21],而敲除 GSTp 的小鼠则上调了内源 JNK 的持续活性^[22],在 H₂O₂ 诱导细胞死亡的研究中,我们之前的研究发现 GSTp 能够通过抑制 JNK,激活 NF- κ B 等信号分子并保护细胞免于死亡^[16],这些研究与我们的目前实验结果相一致。而突变体 GSTp,尤其是 C3、C4 却引起了 JNK 的激活,具有明确的负显性作用。该现象可能与突变体不能很好地利用谷胱甘肽平衡胞内的 ROS 有关。我们的实验结果显示 GSTp 在 293 细胞中的表达显著激活了 NF- κ B,而突变体 C2、C3、C4 均不同程度的削弱了这种作用,C3、C4 则同样呈现了负显性作用。有报道表明,p21 的表达量升高将增强细胞对氧化刺激的敏感性^[20]。我们进一步的实验首次证明,突变体 GSTp 能强烈的激活 p21^{WAF} 的报告基因并且使得细胞内 p21 蛋白水平上调,这一结果与突变体 GSTp 增强了细胞对 H₂O₂ 的敏感性的实验结果相一致,说明了野生型 GSTp 在对维持正常细胞中 p21 的低水平有十分重要的作用,而这种作用也可能是 GSTp 保护细胞抵抗氧化刺激的一种分子机制并且可能是依赖于 p53 的。综合这些实验结果,3 个半胱氨酸突变体不同程度的逆转了 GSTp 在细胞生理状态及氧化应激状态下功能。我们推测,随着 GSTp 基因中半胱氨酸突变数目的增多,一方面导致酶催化活性的大幅下降,破坏了细胞内氧化还原状态的平衡,细胞内 ROS 水平上升导致应

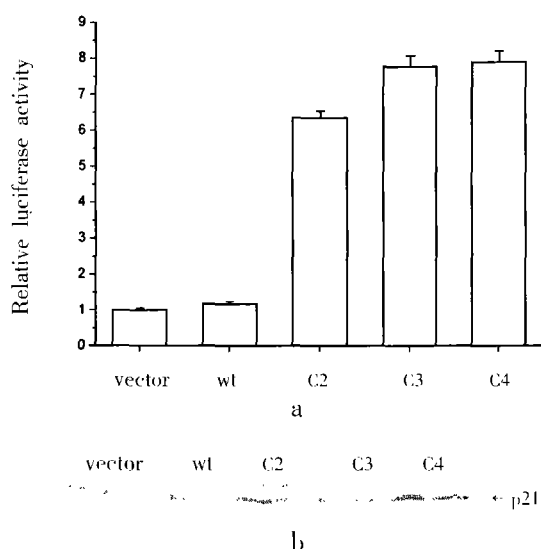


图 5 GSTp 半胱氨酸突变体上调了 293 细胞中的 p21 的水平

将 GSTp 及各个半胱氨酸突变体表达载体分别与 0.5 μ g p21^{WAF} luciferase 表达载体共转染 293 细胞,以空载体作对照,通过共转染 β -半乳糖苷酶表达载体校正转染效率。a: 转染 24h 后测定荧光素酶活,相对荧光素酶活如图所示,数据显示 3 次实验平均值;b: 细胞裂解液采用 p21 单克隆抗体进行免疫印迹分析。

Fig.5 cysteine mutants of GSTp upregulate p21 level in 293 cells

293 cells were co-transfected 0.5 μ g p21^{WAF} luciferase vector together with an empty vector(column 1) or 3 μ g expressing vector for GSTp (column 2), each cysteine mutant (column 3-5). Transfection efficiency was monitored by co-transfection with a β -galactosidase expressing vector. a: The amount of luciferase was quantitated after 24h, and the relative luciferase/ β -galactivity detected in cell lysates is presented. Data showed average values of three different experiments; b: The cell lysates were prepared for immunoblot analysis using p21 monoclonal antibody.

激酶 JNK 以及 p53 的激活, 另一方面, 也有可能 GSTp 蛋白构象的变化阻碍了它与 JNK 的结合, 从而解除了他们在胞内对 JNK 的抑制作用, 并导致细胞内一系列激酶活性的变化。是何种机制导致 GSTp 突变体对细胞产生的这种影响, 以及 GSTp 通过怎样的具体分子机制来保护细胞抵抗氧化刺激, 还需进一步的实验研究。

参 考 文 献

- [1] Biguet, C.N., Wakasugi, Z., Mishal, A., Holmgren, S., Chouaib, T., Tursz & H. Wakasugi, 1994, Thioredoxin increases the proliferation of human B-cell lines through a protein kinase C-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, **269**:28865-28870.
- [2] David, J.M. & O.Sten, 1996, Signal Transduction Pathway in Apoptosis. *Stem Cell*, **14**(6): 619-631.
- [3] Deming, W., Y. Xin & B. Perter, 1998, Nitric oxide and N-Acetylcysteine Inhibit the Activation of Mitogen-activated Protein Kinases by Angiotensin II in Rat Cardiac Fibroblasts. *J.Biol.Chem.*, **273**:33035-33041.
- [4] Powis, G., M. Briehl & J. Oblong, 1995, Redox signaling and the control of cell growth and death. *Pharmacol. Ther.*, **68**:149-173.
- [5] Schafer, F.Q. & G. R.Buettner, 2001, Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free. Radic Biol. Med.*, **30**:191-212.
- [6] Herrlich, P. & F. D. Bohmer, 2000, Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochem. Pharmacol.*, **59**:35-41.
- [7] Benhar, M., I. Dalyot, D. Engelberg & A. Levitzki, 2001, Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.*, **21**(20): 6913-6926.
- [8] Colin, J., G. S. Henderson, U. Austin, Jan, B. E. Ken, B. Jane & C. R. Wolf, 1998, Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **95**:5275-5280.
- [9] Richard, C.S., A. S. Monica, R. Sudarshan & A. Anthony, 2001, Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Res.*, **482**:21-26.
- [10] 刘东远、方福德, 1996, 谷胱甘肽 S-转移酶基因 P1 的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, **23**(1):42-45.
- [11] Victor, A., Y. Zhimin, Y. Serge, Fuchs, B. Miriam, R. Lillian, D.T. Kenneth, R.P. Matthew, S. Mohinder, J. H. Colin, C. R. Wolf, R. J. Davis & Z. Ronai, 1999, Regulation of JNK Signaling by GSTp. *EMBO. J.*, **18**(5): 1321-1334.
- [12] Bernardini, S., F. Bernassola, C. Cortese, S. Ballerini, G. Melino, C. Motti, L. Bellincampi, R. Iori & G. Federici, 2000, Modulation of GSTP1-1 Activity by Polymerization During Apoptosis. *J. Cell. Biochem.*, **77**:645-653.
- [13] Shen, H., S. Tsuchida, K. Tamai, K. Sato, 1993, Identification of cystein residues involved in disulfide formation in the inactivation of glutathione transferase p-form by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**:137-141.
- [14] Giorgio, R. L. B. Mario, M. C. Anna, P. Anna, N. Marzia, W. P. Michael & G. Federici, 1995, Site-directed Mutagenesis of Human Glutathione Transferase p1-1. *J. Biol. Chem.*, **270**:1243-1248.
- [15] Jakoby, W.B., 1985, Glutathione transferases: an overview. *Methods Enzymol.*, **113**:495-499.
- [16] Zhimin, Y., N. I. Vladimirov, H. Hasem, T. Kenneth & Z. Ronai, 2000, Glutathione S-Transferase p Elicits Protection against H₂O₂-induced Cell Death via Coordinated Regulation of Stress Kinases. *Cancer Res.*, **60**:4053-4057.
- [17] 殷志敏、刘爱华、姜勇, 2001, 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*, **33**(2):185-190.
- [18] Milner, J., 1995, DNA damage, p53 and anticancer therapies. *Nat. Med.*, **1**(9):879-80.
- [19] Lee, J. M., A. C. Price, K. B. McClendon, N. A. Al-Abdulla, J. R. Subramaniam, P. C. Wong & Z. Liu, 2003, Early events of target deprivation/axotomy-induced neuronal apoptosis in vivo: oxidative stress, DNA damage, p53 phosphorylation and subcellular redistribution of death proteins. *J. Neurochem.*, **85**(4):234-247.
- [20] Yin, Y., G. Solomon, C. Deng, J. C. Barrett, 1999, Differential regulation of p21 by p53 and Rb in cellular response to oxidative stress. *Mol. Carcin.*, **24**(1):15-24.
- [21] Wang, T., A. P. Davis & Z. Ronai, K.D. Tew, 2001, Glutathione S-transferase P1-1(GSTP1-1) inhibits c-Jun NH2 terminal kinase(JNK1) signaling through interaction with the carboxyl terminal. *J. Biol. Chem.*, **276**(24):20999-21003.
- [22] Robert, E., N.R. Kitteringham & C.E. Goldring, 2003, Increased constitutive c-Jun N-terminal kinase signaling in mice lacking glutathione S-transferase pi. *J. Biol. Chem.*, **278**: 22243-22249.

THE EFFECTS OF CYSTEINES ON THE FUNCTION OF HUMAN GLUTATHION S-TRANSFERASE π (GSTp) UNDER CELL OXIDATIVE STRESS*

SIMA Jian HE Lan ZHU Jian XUE Bin TAI Yi Lin

ZHANG Shuang Quan YIN Zhi Min[^]

(College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

ABSTRACT Site-directed mutagenesis was used to generate three cysteine mutants of GSTp, C^{47/101}, C^{14/47/101} and C^{14/47/101/169}. GSTp, C^{47/101}, C^{14/47/101} and C^{14/47/101/169} were transfected into 293 cells separately and GST activity was determined by using CDNB as substrate. Data showed that each cysteine mutant inhibited endogenous GST catalytic activity and had remarkable dominant negative effect. The expression vectors of wide type GSTp and its cysteine mutants were co-transfected with c-Jun, NF- κ B, or p21 luciferase reporting vector. into 293 cells separately, luciferase activity showed that C^{14/47/101} and C^{14/47/101/169} can dramatically activate c-Jun and p21 transcriptional activity. Each cysteine mutant can increase endogenous p21 level and also increased mortality rate of 293 cells when exposed to H₂O₂. These results suggest that cysteine residues of GSTp play an important role in protecting cells against oxidative stress.

Key words: Glutathion S-transferase π . Cysteine. Site-directed mutagenesis. Oxidative stress. Dominant negative

[^] This work was supported by the National Natural Sciences Foundation(NO.30270527)and by a grant from National Educational Committee(NO.2002SWXSBJBC22).

^{**} Corresponding author, Tel: 025-86214554, Fax: 025-86214554, E-mail: Zhiminy_2000@yahoo.com