

氧化型谷胱甘肽对还原型谷胱甘肽清除自由基的协同作用

金春英 崔京兰 崔胜云*

(延边大学, 长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 延吉 133002)

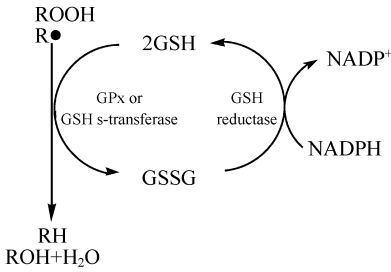
摘 要 利用分光光度法和基质辅助飞行质谱法研究了谷胱甘肽对 1,1-二苯基-2-苦肟基 (DPPH) 自由基的清除作用。通过比较不同浓度和不同配比的还原型谷胱甘肽 (GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 以及 Na_2SeO_3 混合溶液的自由基清除率, 发现 GSH/GSSG 的配比对自由基清除率有明显影响。当 GSH/GSSG 的配比大于 50:1 时, 自由基清除率比同浓度的 GSH 大, 且自由基清除率随 GSH 和 GSSG 的绝对浓度的增加而明显增加, 说明适量的 GSSG 可协同催化 GSH 清除自由基过程。质谱测定结果表明: 此协同作用与 GSSG 参与自由基清除过程中的自由基反应有关。 Na_2SeO_3 对 GSH 的清除自由基的影响主要是通过 GSH 反应生成 GSSG 来调控 GSH/GSSG 配比的结果。通过测定和分析一定配比的 GSH+GSSG 混合溶液与 DPPH 作用前后的质谱图, 提出了少量的 GSSG 共存下, GSH 催化清除 DPPH 自由基的作用机理。

关键词 谷胱甘肽, 自由基, 抗氧化性, 分光光度法, 基质辅助飞行质谱法

1 引 言

谷胱甘肽是生物体内抗氧化防御系统最重要的小分子活性寡肽, 分为氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 和还原型谷胱甘肽 (GSH)^[1]。GSH 作为谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 或谷胱甘肽转移酶 (GSH s-transferase) 的作用底物, 可清除生物体内有害自由基 (主要是氧自由基) 或脂质过氧化物, 使其转换成脂肪酸和水, 而 GSH 被氧化成 GSSG^[2] (见图解 1)。

在酶的调控下, 生物体内 GSH 和 GSSG 通常处于稳恒性动态平衡, 即当机体内由于 GSH 的清除自由基作用导致积累较多的 GSSG 时, GSH 还原酶将作用底物 GSSG 还原成 GSH。这种稳恒性动态平衡的重要标志是 GSH/GSSG 比值约为 100:1^[3]。当机体受到严重的氧化胁迫时, GSSG 还原成 GSH 的过程受阻, 大量的 GSSG 积累在细胞液中, 并破坏氧化还原动态平衡, 给生物体带来不良影响^[4]。图解 1



图解 1 GSH 的抗氧化功能示意图
Scheme 1 Antioxidant function of glutathione (GSH)

所示的抗氧化模式中, GSH 是通过电子和质子的传递作用来清除自由基, 而 GSSG 本身无清除自由基作用, 只参与维持两种形态谷胱甘肽的动态平衡。在该生化反应体系中, GSSG 除了作为 GSH 还原酶底物维持谷胱甘肽的稳恒性动态平衡之外, 还可能参与其它生化反应。文献[5]报道胱氨酸残基中的二硫键在生物体内参与许多氧化还原反应和自由基反应并生成各种硫氧化物。研究非酶条件下的氧化型谷胱甘肽在谷胱甘肽抗氧化系统中的作用和相关的化学反应, 对进一步了解谷胱甘肽的生物学功能具有重要意义。本研究考察了 GSH 和不同配比的 GSSG 和 Na_2SeO_3 混合溶液对 DPPH 自由基的清除能力, 探讨了 GSSG 和 Na_2SeO_3 对 GSH 的协同抗氧化作用。根据自由基清除率和质谱测定结果, 提出了 GSSG 和 Na_2SeO_3 对 GSH 自由基清除过程中的协同机理。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

UV-8500 紫外/可见分光光度计 (天美公司); MAIDMA-CFR (日本岛津公司); 激光解吸电离飞行时

2009-01-14 收稿; 2009-04-15 接受
* E-mail: huaxuex@ybu.edu.cn

间质谱仪 (N_2 激光器, 激光波长为 337 nm)。1, 1-二苯基-2-苦肟 (DPH)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、氧化型谷胱甘肽 (GSSG)、 Na_2SeO_3 、 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 及三氟乙酸购自 Sigma 公司。DPH 用无水乙醇配制, 谷胱甘肽用三次蒸馏水配制。

2.2 实验方法

体外检测清除自由基的方法以清除 DPH 自由基为最常见。参照文献 [6-7], 采用分光光度法, 通过测定 DPH 自由基与 GSH 作用前后最大吸收波长 (517 nm) 处吸收光谱, 用多项式回归拟合的方法 [8] 得到作用前后的吸光度变化值 (ΔA_{517}) 与 GSH 浓度的多项式拟合回归方程, 并根据回归方程计算出不同浓度的 GSH 和 DPH 混合溶液的自由基半数清除率 (IC_{50})。

3 结果与讨论

3.1 GSH 清除自由基实验

图 1 为 DPH 乙醇溶液和在该溶液中加入适量 GSH、GSSG 和 Na_2SeO_3 混合溶液后的吸收光谱图。DPH 在 517 nm 处有最大吸收。当加入与 DPH 等量的 GSH 时, 此波长处的吸光度 (A_{517}) 从 1.33 降低到 0.55 (图 1A 曲线 2), 说明 GSH 具有明显的清除 DPH 自由基的能力。图 1B 中曲线 2 和 3 分别为 GSH 和 GSSG 量比 (GSH:GSSG) 为 10:1 和 100:1 时的吸收光谱图, 其吸光度分别为 0.79 和 0.48, 说明 GSH/GSSG 比率为 100:1 时具有更高的自由基清除率。与图 1A 的结果比较, 当 GSH/GSSG 比率为 100:1 时, 比等量的纯还原型谷胱甘肽 (GSH) 的吸光度降低更明显, 说明尽管认为氧化型 GSSG 无清除

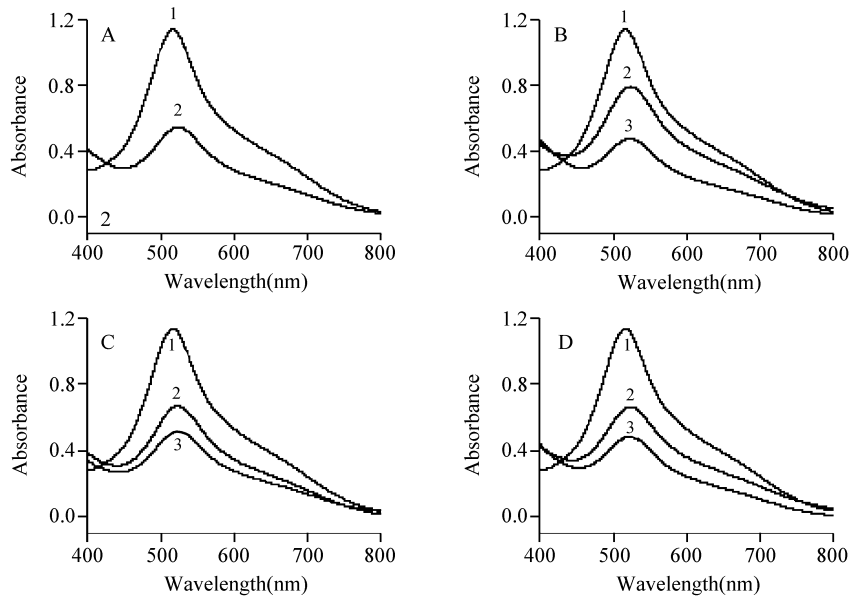


图 1 DPH、DPH 和谷胱甘肽及 Na_2SeO_3 混合溶液的吸收光谱图

Fig. 1 Absorption spectra for 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPH) and mixed solutions of DPH with glutathione and sodium selenite

A (1): 0.1 mmol/L DPH; (2): (1) + 0.1 mmol/L GSH; B (1): 0.1 mmol/L DPH; (2): A(2) + 0.01 mmol/L GSSG; (3): A(2) + 0.001 mmol/L GSSG; C (1): 0.1 mmol/L DPH; (2): A(2) + 0.005 mmol/L Na_2SeO_3 ; (3): A(2) + 0.0002 mmol/L Na_2SeO_3 ; D (1): 0.1 mmol/L DPH; (2): B(3) + 0.005 mmol/L Na_2SeO_3 ; (3): B(3) + 0.0002 mmol/L Na_2SeO_3 .

自由基能力, 但适量 GSSG 的存在会提高 GSH 的自由基清除能力。当固定 GSH 浓度为 0.10 mmol/L, 加入不同浓度的 Na_2SeO_3 (见图 1C 中曲线 2 和 3) 时, DPH 在 517 nm 处的吸光度随 GSH 和 Na_2SeO_3 的相对量比的增加而增加, 说明在恒定的 GSH 浓度下, 其自由基清除率随 Na_2SeO_3 加入浓度的减小而增加。当固定 GSH/GSSG 比率为 100:1, 加入不同浓度的 Na_2SeO_3 的浓度 (见图 1D 中曲线 2 和 3) 时, DPH 在 517 nm 处的吸光度随 Na_2SeO_3 加入浓度的增加而减小, 说明自由基清除率随 Na_2SeO_3 的浓度增大而减小。

为考察 GSH 浓度、GSSG 和 Na_2SeO_3 对 GSH 的清除, DPH 自由基能力的影响, 在固定 DPH 浓度

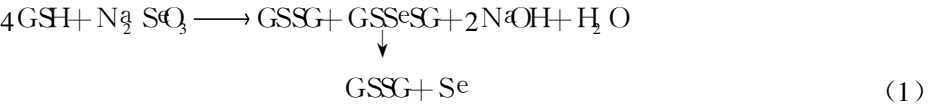
(0.10 mmol/L)情况下, 分别测定了一系列不同浓度的 GSH 和不同配比的 GSH/GSSG 和 Na_2SeO_3 混合溶液在 517 nm 处的吸光度变化值 $\Delta A_{517} = A_{\text{DPH}} - A_{\text{GSH混合液}}$ 。结果发现, ΔA_{517} 值随 GSH 浓度的增加而增加。采用多项式回归拟合方法^[7]对 ΔA_{517} 和混合溶液的 GSH 浓度 (C_{GSH}) 进行回归, 根据回归方程确定 $\Delta A/A = 0.5$ 时的 C_{GSH} 为 IC_{50} 值 (式中 A_0 为纯 DPPH 溶液的吸光度, ΔA 为加入抗氧化剂后的吸光度变化值)。表 1 为不同混合溶液的吸光度变化值 (ΔA) 对 C_{GSH} 的拟合方程和 IC_{50} 值。

表 1 拟合回归方程和不同浓度、摩尔配比的 GSH/GSSG 和 Na_2SeO_3 混合溶液的 DPPH 自由基清除率 (IC_{50})
Table 1 Polynomial regression equation and DPPH radical scavenging activities (IC_{50}) of GSH and mixed solutions with different molar ratio

GSH			GSH:GSSG		
浓度 Concentration (mmol/L)	IC ₅₀ (mmol/L)	回归方程 Regression equation	摩尔比 Molar ratio of GSH:GSSG	IC ₅₀ (mmol/L)	回归方程 Regression equation
0.025	0.0880	$\Delta A = 0.0879 + 6.6706 C_{\text{GSH}} - 15.5493 C_{\text{GSH}}^2$ ($r = 0.9976$)	10:1	0.1140	$\Delta A = 0.0384 + 6.3784 C - 15.8095 C^2$ ($r = 0.9926$)
0.050			20:1	0.0979	$\Delta A = 0.0519 + 6.9866 C - 18.0241 C^2$ ($r = 0.9897$)
0.100			50:1	0.0807	$\Delta A = 0.0879 + 6.6706 C - 15.5493 C^2$ ($r = 0.9976$)
0.200			100:1	0.0745	$\Delta A = 0.1095 + 7.3377 C - 17.4258 C^2$ ($r = 0.9990$)
GSH:Na ₂ SeO ₃			GSH:GSSG:Na ₂ SeO ₃		
摩尔比 Molar ratio of GSH:Na ₂ SeO ₃	IC ₅₀ (mmol/L)	回归方程 Regression equation	摩尔比 Molar ratio of GSH:GSSG: Na ₂ SeO ₃	IC ₅₀	回归方程 Regression equation
2:1	0.1268	$\Delta A = 0.0116 + 6.4268 C - 14.3445 C^2$ ($r = 0.9981$)	100:1:50	0.1348	$\Delta A = 0.0074 + 6.1770 C - 13.9333 C^2$ ($r = 0.9955$)
5:1	0.1107	$\Delta A = 0.0062 + 7.1114 C - 17.3381 C^2$ ($r = 0.9968$)	100:1:20	0.1235	$\Delta A = 0.0043 + 6.4195 C - 15.0060 C^2$ ($r = 0.9962$)
10:1	0.1034	$\Delta A = 0.0395 + 6.4721 C - 14.2056 C^2$ ($r = 0.9974$)	100:1:10	0.0906	$\Delta A = 0.1040 + 6.0860 C - 12.8714 C^2$ ($r = 0.9982$)
20:1	0.0862	$\Delta A = 0.1066 + 6.3440 C - 13.7484 C^2$ ($r = 0.9972$)	100:1:5	0.0818	$\Delta A = 0.1184 + 6.4996 C - 14.6572 C^2$ ($r = 0.9981$)
50:1	0.0822	$\Delta A = 0.1059 + 6.6192 C - 14.4938 C^2$ ($r = 0.9992$)	100:1:2	0.0760	$\Delta A = 0.1207 + 6.9902 C - 16.3845 C^2$ ($r = 0.9980$)

表 1 表明: (1) GSH 具有较高的自由基清除率, 其 IC_{50} 达 0.088 mmol/L, 是良好的抗氧化剂。 (2) 实验中发现氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 本身对 DPPH 自由基无清除能力, 但当其与还原性谷胱甘肽共存时, 对 GSH 的自由基清除率具有较大的影响。当 GSH/GSSG 配比大于 50:1 时, 其自由基清除率大于等量的 GSH 的自由基清除率; 当 GSH/GSSG 配比小于 50:1 时, 清除率小于等量的 GSH 的清除率。 (3) Na_2SeO_3 也对 GSH 的抗氧化性具有协同作用。在一定浓度的 GSH 条件下, 加入 Na_2SeO_3 的量相对较大时 ($\text{GSH}/\text{Na}_2\text{SeO}_3 < 20:1$), 其自由基清除率小于同浓度的 GSH; 当加入量相对较小 ($\text{GSH}/\text{Na}_2\text{SeO}_3 > 20:1$) 时, 自由基清除率大于同浓度的 GSH 的自由基清除率。 (4) 当固定 GSH/GSSG 配比为 100:1 加入不同量的 Na_2SeO_3 时, 尽管 Na_2SeO_3 的相对量减小对 GSH/GSSG 混合溶液的自由基清除率有增强的趋势, 但总的趋势是 Na_2SeO_3 会降低 GSH/GSSG 混合溶液的自由基清除率。

综上所述, GSH 具有较强的 DPPH 自由基清除率, 但适当配比的 GSSG 的存在会提高 GSH 的自由基清除率, 说明 GSSG 对 GSH 自由基清除过程具有协同作用。这种协同作用与 GSH/GSSG 配比有关。当其配比为 100:1 时, 对 DPPH 自由基清除率最高。向含有 GSH 溶液中加入 Na_2SeO_3 会影响 GSH 自由基清除率, 是由于 GSH 和 Na_2SeO_3 发生了氧化还原反应^[9]:



此反应使得部分 GSH 被氧化成 GSSG, 改变了 GSH/GSSG 的相对量和氧化还原电位, 从而影响了 DPPH 自由基清除率。

3.2 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS)检测

光谱测定结果表明, 适量的 GSSG对 GSH清除 DPPH自由基具有协同作用, 说明 GSSG在与 GSH和 DPPH的混合溶液中参与了相关的化学反应。为了辨别相关反应产物, 应用 MALDI-TOF-MS法, 以 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA)为基质, 对 GSH:GSSG配比为 100:1 的含有和未含有 DPPH的混合溶液进行了质谱测定, 结果见图 2。

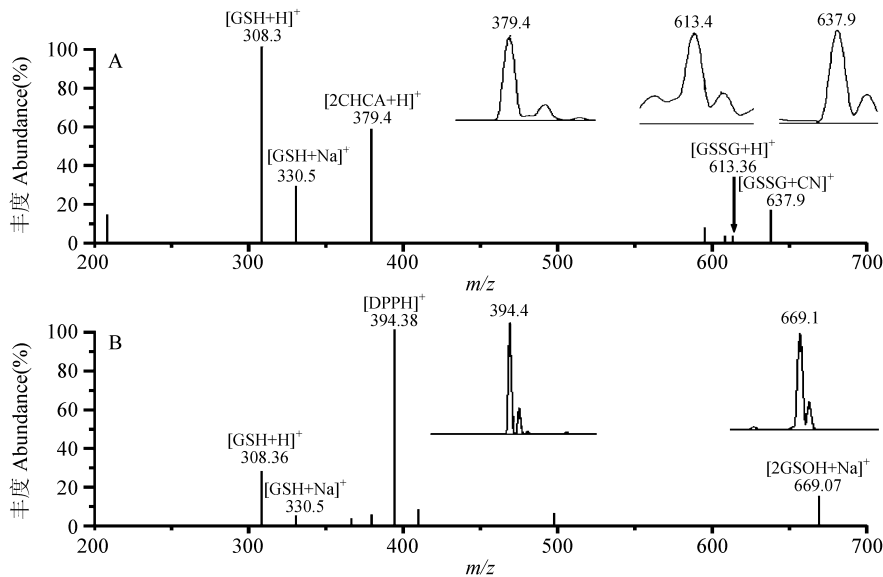
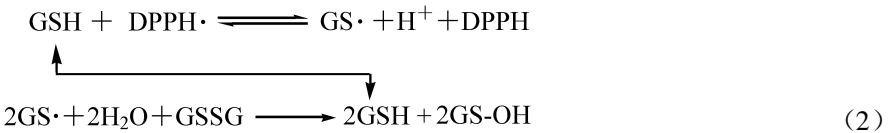


图 2 0.1 mol/L GSH和 1.0 mmol/L GSSG混合溶液 (A) 及该混合溶液中加入 0.1 μmol/L DPPH后测得的 MALDI-TOF-MS图
Fig 2 MALDI-TOF-MS spectra obtained in 0.1 mol/L GSH and 1.0 mmol/L oxidized glutathione (GSSG) mixed solution before (A) and after (B) addition of 0.1 μmol/L DPPH

从图 2可见, 不含有 DPPH的混合溶液 (图 2A)在 m/z 308 和 613 处可观察到质子化的 GSH和 GSSG分子离子峰, m/z 330 和 637 处分别观察到 GSH的钠的加合物和 GSSG在电离过程中与基质中的氰基相互作用产生的氰化物加合物的分子离子峰, 在 m/z 379 处观察到质子化的基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸的二聚体的离子峰。当溶液中含 DPPH (图 2B)时, m/z 613 638 和 379 处的峰消失, 而在 m/z 669 处观察到 GSSG结合 2 个羟基和 Na^+ 的峰, 说明 GSSG可能生成氧化产物来协同 GSH的自由基清除作用。

3.3 GSSG对 GSH清除 DPPH自由基的协同作用机理

(1) GSH对 DPPH自由基清除作用是通过氧化作用将谷胱甘肽的电子传递给 DPPH自由基单电子的过程。这种电子传递过程受 GSH氧化还原电位的影响。根据能斯特方程: $E = E' + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[GSSG]}{[GSH]^2}$, 在 GSH/GSSG混合溶液中, GSH/GSSG比率越高, 谷胱甘肽的还原电位负移, 使得 GSH传递电子与 DPPH的能力越强。这解释了实验中 GSH/GSSG混合溶液中, 自由基清除率随 GSH/GSSG的比率增高而增加的原因。(2) GSH/GSSG混合溶液中, 当其比率 $> 50:1$ 时, 自由基清除率高于等量的纯 GSH的清除率, 说明自由基清除作用不只是 GSH对 DPPH自由基的还原作用所驱动, 少量的 GSSG的存在会协同 GSH的自由基清除作用。GSH和 DPPH的清除作用涉及氧化还原作用的自由基反应。当 GSH与 $DPPH\cdot$ 自由基发生给电子作用后, 本身氧化生成 $GS\cdot$ 自由基。此自由基在水相中仍具有较强的反应活性, 在一定条件下与水相中的 GSSG发生氧化还原作用, 见下式:



上式中第二步反应中 $GS\cdot$ 自由基, 可能首先与水分子发生自由基反应, 生成反应性很强的羟自由基 ($\cdot OH$) 和 GSH生成的 $\cdot OH$ 自由基与 GSSG通过自由基反应生成 $GS-OH$ (glutathione sulfenic acid)。

这种反应的结果使得 GSH 在清除 DPPH 自由基反应中起到催化剂作用。至于 GSSG 氧化后的产物 GS-OH (图 3B 中 m/z 669 所对应的物质), 文献 [5] 已报道在生物体内被检测到。总之, 低配比的 GSSG 通过催化作用协同 GSH 的清除自由基过程, 但当 GSSG 相对于 GSH 配比提高时无协同作用。这可能与 GSSG 阻碍 GS \cdot 自由基与水分子之间的自由基反应有关。

References

- 1 Li ShaoWu (吕绍武), Jin Wei (金伟), Zhang Ying (张莹), Gao Yang (高扬), Zou Xiang-Yu (邹向宇), Li Ming (李明), Mou Ying (牟颖), Yan Gang-Lin (阎岗林), Luo Gui-Min (罗贵民), Jin Qin-Han (金钦汉). Chinese J Anal Chem (分析化学), **2008** 36(2): 211~214
- 2 Deleve L and Kaplowitz N. Pharmacol Ther, **1991** 52: 287~305
- 3 Fang Yun-Zhong (方允中), Yang Sheng (杨胜), Wu Guo-Yao (伍国耀). Progress in Physiological Sciences (生理科学进展), **2004** 35: 199~204
- 4 Fang Yun-Zhong (方允中), Yang Sheng (杨胜), Wu Guo-Yao (伍国耀). Acta Nutrimen Sinica (营养学报), **2003** 25: 337~343
- 5 Jacob C, Giles G J, Giles NM and Sies H. Angew Chem, **2003** 42: 4742~4758
- 6 Peng Chang-Lian (彭长连), Chen Shao-Wei (陈少薇), Lin Zhi-Fang (林植芳), Lin Gui-Zhu (林桂珠). Progress in Biochemistry and Biophysics (生物化学和生物物理进展), **2007** 27(6): 658~661
- 7 Akimoladun A C, Ibukun E O, Dan-Ojoge IA. Sci Res Essay, **2007** 2(6): 191~194
- 8 Zhang Jing-Qiu (张静秋), Han Yu-Wei (韩玉玮), Liu Sha (刘沙). Rare Metals and Cemented Carbides (稀有金属与硬质合金), **2001** 145: 64~67
- 9 Cui S Y, Jin H, Kim S J, Kumar A P, Lee Y I. J Biochem, **2008** 143: 685~693

Synergetic Effect by Oxidized Glutathione for Radical Scavenging Activities of Reduced Glutathione

JIN Chun-Ying, CUI Jing-Lan, CUI Sheng-Yun*

(Key Laboratory for Organic Resources of the Changbai Mountain and Functional Molecules

Yanbian University, Ministry of Education, Yanji 133002)

Abstract 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity have been investigated using UV-Vis spectrometry and MALDI-TOF-Mass spectrometry. In comparison with the radical scavenging activities obtained in the mixture solutions of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) as well as sodium selenite with different molar ratio, it is found that GSH/GSSG ratio significantly influences radical scavenging activities. As the GSH/GSSG molar ratio was larger than 50:1, more active radical scavenging activities were observed than those obtained in the same concentration solutions with pure GSH and increased radical scavenging activities were also observed as the absolute concentration of GSH increased. This indicated that GSSG might synergistically scavenging DPPH radicals. Mass spectrometric determination of the GSH and GSSG mixture solutions before and after the interaction with DPPH radicals indicated that GSSG takes role during the scavenging reaction and converted to a new oxidized product which might be related to the synergetic radical scavenging effect of GSSG. The influence of sodium selenite on the GSH radical scavenging activities might be the formation of GSSG by the interaction between them in the solution which influences the GSH/GSSG ratio in the solution. A catalyst radical scavenging mechanism of GSH has been proposed according to the mass spectrometric determinations.

Keywords Glutathione, radical, antioxidant activity, spectrophotometry, matrix-assisted laser desorption/ionization, time of flight mass spectrometry

(Received 14 January 2009; accepted 15 April 2009)