

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

氨基酸限制與解毒酵素--pi 型 glutathione S-transferase 活性與表現(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-040-045-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中山醫學大學營養學系

計畫主持人：李宗貴

計畫參與人員：蔡佳文

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

(計畫名稱)

氨基酸限制與解毒酵素--Pi 型 glutathione S-transferase 活性與表現

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 93-2320-B-040-045-

執行期間：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：李宗貴

共同主持人：

計畫參與人員：蔡佳文

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學營養科學系

中華民國 94 年 5 月 31 日

緣由與目的

許多證據顯示營養因子在哺乳動物中控制基因的表現可能扮演著相當重要的角色 (Foufelle et al., 1998; Pegorier, 1998; Towle, 1995; Vaulont and Kahn, 1994), 因此營養因子對哺乳動物基因表現的探討已成為目前重要的研究課題, 但目前為止氨基酸依賴型基因的表現, 了解仍相當有限, 氨基酸濃度在體內必須維持一個穩定的狀態, 此恆定現在具有多樣性的重要功能, 例如做為生合成各種蛋白質的原料、修補體組織、調控多種基因表現, 以及對於哺乳類的生理功能做調節等 (Bruhat et al., 1997; Gong et al., 1991)。本實驗室過去以大鼠初代肝細胞培養之實驗模式發現, 肝細胞在低濃度含硫氨基酸下 (0.1mM Met + 0.1mM Cys) 明顯較在高濃度含硫氨基酸 (1.0 mM Met + 1.0 mM Cys) 下誘發較多 PGST 蛋白質表現, 由上述結果可知, 在低濃度含硫氨基酸 (0.1mM Met + 0.1mM Cys) 下有助於增加大鼠初代肝細胞的 GSTP 蛋白質表現。雖然氨基酸對於 GSTP 這個解毒酵素的確有影響, GSTP 蛋白質可以受到誘發, 但如何增加這些解毒酵素表現則是未知的, 因此為了進一步證實可能的機制, 預計將以細胞培養模式, 利用分子生物技術探討氨基酸 (Cysteine、Isoleucine、Leucine、Lysine、Methionine 和 Phenylalanine) 對解毒酵素活性作用的位置及相關的調控因子, 以進一步瞭解真正機制。因此本研究針對必需氨基酸在不同模式中誘發 GSTP 機轉及相關調控因子的探討。

材料與方法

1. 初代肝細胞分離與細胞處理

6-7 週齡 Sprague-Dawley 雄性大白鼠, 由國家科學委員會實驗動物繁殖暨研究中心購進, 待 3 天適應後利用兩階段灌注法取出肝細胞, 培養在 L-15 培養液中並進行實驗。當細胞貼盤至第 4 小時, 更換培養液, 之後每天更換培養液, 於第 1、3、4、6 天收取細胞, 細胞液將以超高速離心 (105,000 g) 分離製備細胞質, 利用 Western blotting 分析 GSTP 蛋白質, 並且以對 pi 型有較高敏感性的 ethacrynic acid 為受質, 分析 GST 酵素活性表現。

2. 初代肝細胞的培養與處理

肝細胞培養至含有 0.5 mmol/L L-methionine / 0.2 mmol/L L-cysteine (高含硫氨基酸 [HSAA]) 或 0.1 mmol/L L-methionine / 0.1 mmol/L L-cysteine (低含硫氨基酸 [LSAA]) 的 L-15 培養液中, 分別於第 1、3、4、6 天收取細胞; 並添加 insulin (5 mg/L) 和 dexamethasone (1 μ mol/L) 觀察對於 GSTP 表現的影響。

結果與討論

西方墨點法分析:

結果如圖一所示, 無論在 HSAA 或 LSAA 培養液, GSTP 蛋白質皆隨培養時間而增加, 然而在 LSAA 比 HSAA 有較高的 GSTP 蛋白質; 在第六天, LSAA 處理下, 相較 HSAA 的 GSTP 蛋白質約增加 94%。

結果如圖二所示, dexamethasone 會抑制 GSTP 蛋白質表現, 然而 dexamethasone 的抑制現象, 並不會改變含硫氨基酸限制下增加 GSTP 蛋白質的表現, 可知氨基酸調節 GSTP 蛋白

質表現與 dexamethasone 無關，而且此調節現象亦與 insulin 無關。

酵素活性分析:

結果如圖三顯示，在 GSTP 酵素活性方面結果與蛋白質表現一致，LSAA 比 HSAA 有較高的 GSTP 酵素活性。由圖四結果可知與正常的 L-15 培養液(0.5mmol/L 甲硫氨酸)相比較，至少得低於 0.1 mmol/L 的甲硫氨酸才具誘發效果。

結論: 在低含硫氨基酸下，可增加 GSTP 的蛋白質和酵素活性，而此結果與生長因子--insulin 和 dexamethasone 並無關係；而除了 GSTP 酵素外，其他酵素是否也受到影響，以及 GSTP 基因是否也受到甲硫氨酸外的其他氨基酸影響目前則在進行確認。

參考文獻

- Bruhat, A., Jousse, C., Wang, X. Z., Ron, D., Ferrara, M., and Fafournoux, P. (1997). Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.* 272, 17588-17593.
- Foufelle, F., Girard, J., and Ferre, P. (1998). Glucose regulation of gene expression. *Curr Opin Clin Nutr. Metab. Care* 1, 323-328.
- Gong, S. S., Guerrini, L., and Basilico, C. (1991). Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. *Mol Cell Biol* 11, 6059-6066.
- Pegorier, J. P. (1998). Regulation of gene expression by fatty acids. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 1, 329-334.
- Towle, H. C. (1995). Metabolic regulation of gene transcription in mammals. *J. Biol. Chem.* 270, 23235-23238.
- Vaulont, S., and Kahn, A. (1994). Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB J.* 8, 28-35.

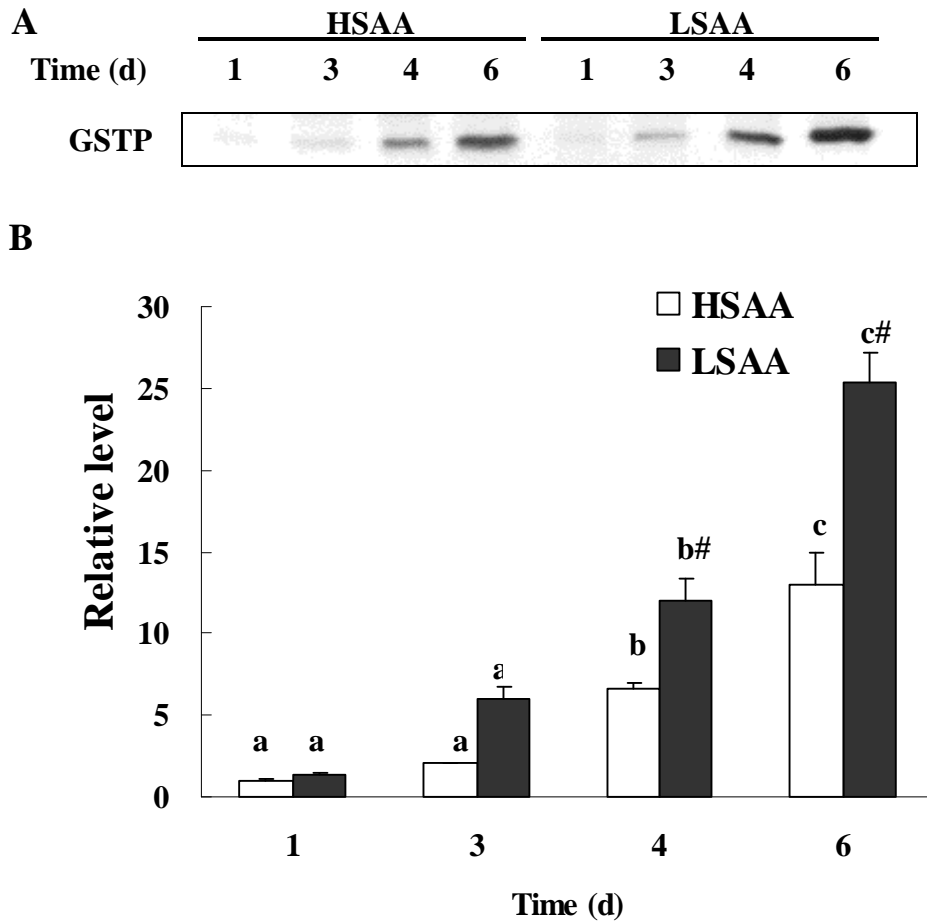


Figure 1 Effect of sulfur amino acid restriction on protein levels of the π form of glutathione *S*-transferase (GST Yp) in primary rat hepatocytes. (A) After the 4-h attachment period, cells were left to incubate in the control medium (high sulfur amino acid [HSAA]: 0.5 mmol/L L-methionine and 0.2 mmol/L L-cysteine) or were switched to the low sulfur amino acid medium (LSAA: 0.1 mmol/L L-methionine and 0.1 mmol/L L-cysteine) for up to 6 d. For each lane, 5 μ g of cytosol protein was separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and an immunoblot assay was performed. (B) Protein was quantitated by densitometry, and the level on d 1 for the HSAA-treated cells was regarded as 1. Each value represented the mean \pm SD of four independent experiments. ^{abc}Groups in the same medium not sharing a common letter differ significantly, $P < 0.05$. #Significant difference between HSAA and LSAA on the same incubation time, $P < 0.05$.

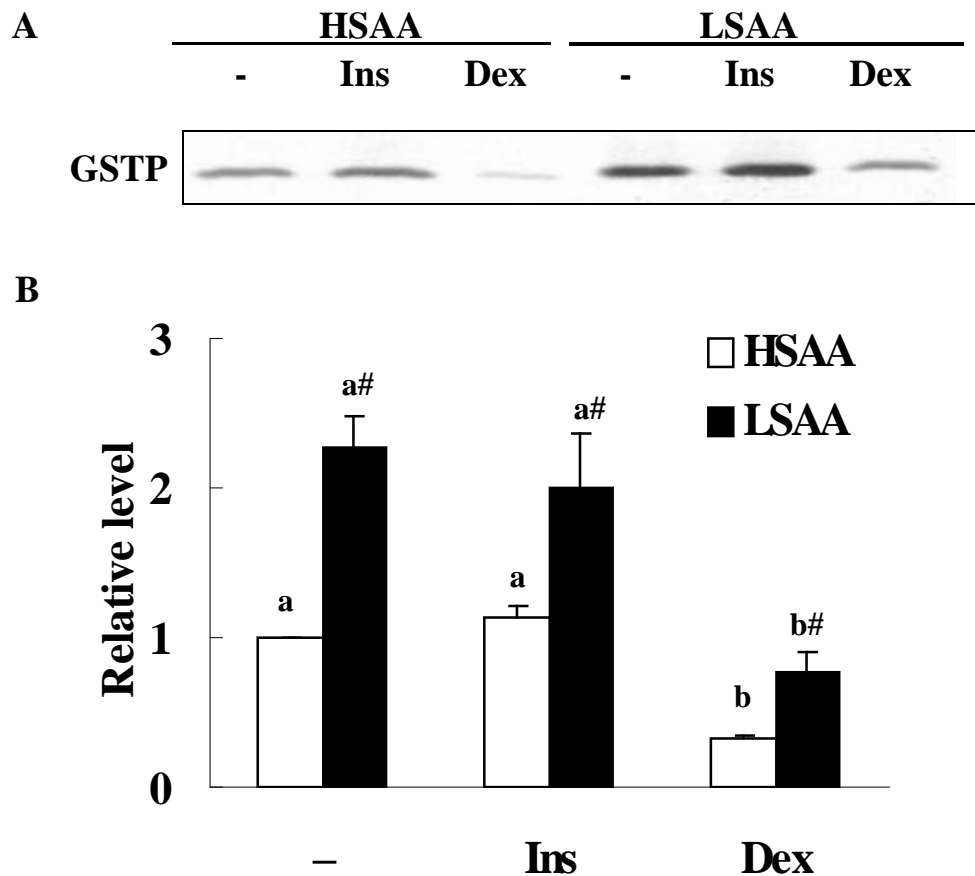


FIGURE 2 Effect of Insulin and dexamethasone on the sulfur amino acids–mediated change in protein levels of the π form of glutathione *S*-transferase (GST Yp). Hepatocytes were cultured with HSAA or LSAA medium in the absence of growth factors (-) or in the presence of insulin (Ins) or dexamethasone (Dex), respectively, for 6 d. (A) Immunoblot assay of GST Yp protein levels. (B) Protein was quantitated by densitometry, and the level on d 6 for the HSAA-treated cells without growth factor was regarded as 1. Values are mean \pm SD, $n=3$. ^{ab}Groups in the same medium not sharing a common letter differ significantly, $P<0.05$. [#]Significant difference between HSAA and LSAA, $P<0.05$.

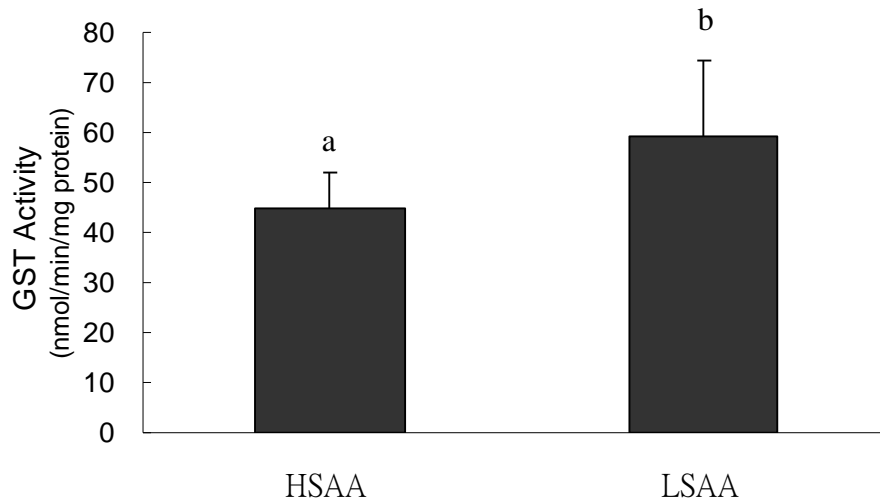


FIGURE 3 The enzyme activity of the π form of glutathione S-transferase (GST Yp) in primary rat hepatocytes cultured in either the HSAA or the LSAA medium for up to 6 d. Values are mean \pm SD, n=3 or 4. ^{ab}Groups not sharing a letter are significantly different, $P < 0.05$.

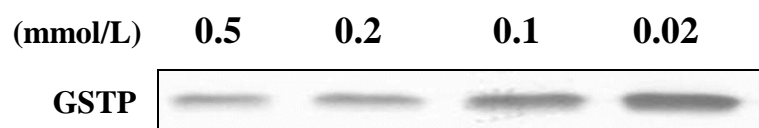


Figure 4 Dose-dependent changes in GST Yp protein level of cells cultured in 0.02-0.5 mmol/L L-methionine for 4 d.