

代海艳,江 翱,李 伟.黄鳍醛酮还原酶的羰基解毒作用初探[J].江苏农业科学,2017,45(1):150-152.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.042

黄鳍醛酮还原酶的羰基解毒作用初探

代海艳,江 翱,李 伟

(长江大学湿地生态与农业利用教育部工程研究中心,湖北荆州 434025)

摘要:醛酮还原酶(aldo-keto reductase,AKR)是机体依赖 NAD(P)H 的一类重要的氧化还原酶,在细胞有毒羰基化合物代谢中具有重要作用。迄今为止,国内外尚无鱼类醛酮还原酶基因及其功能的报道。为了解鱼类醛酮还原酶在细胞抗有毒羰基化合物胁迫过程中的作用,笔者比较了含重组黄鳍 AKR 基因的阳性菌株和不含该重组基因的阴性对照在丙酮醛及 2,3-丁二酮 2 种羰基化合物处理后的存活率。结果表明,随着毒性物质处理时间的延长和处理浓度的升高,阳性菌株和对照菌株存活率均呈逐渐下降趋势;阳性菌株的存活率始终极显著高于对照菌株($P < 0.01$)。结果显示,黄鳍的醛酮还原酶具有一定的羰基解毒作用。该研究为进一步深入了解鱼类 AKR 基因的功能提供了基础资料。

关键词:黄鳍;醛酮还原酶;羰基胁迫;存活率;解毒作用

中图分类号:S941.91 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)01-0150-03

醛酮还原酶(aldo-keto reductase,AKRs)超家族是一类广泛存在依赖于 NAD(P)H 的氧化还原酶^[1]。生物体内氧化应激^[2]、致癌化合物降解^[3]、糖尿病并发症及肿瘤发生^[4]等过程都有 AKRs 的参与。细胞内存在低浓度的羰基化合物如不能被及时降解,就会通过羰基化修饰使细胞内的蛋白质、核酸等生物大分子发生构象变化和功能丧失,并最终导致细胞代谢紊乱,引起癌变或坏死,这就是所谓的“羰基胁迫”^[5]。醛酮还原酶可以将对细胞毒害较强的羰基化合物还原成相应的对细胞毒害作用较小或无毒性的醇类物质,承担机体防护酶的作用^[6]。研究表明,大肠杆菌^[7]及蓝藻^[8]的 AKR 基因产物可有效降解丙酮醛、甘油醛等羰基化合物对细胞的毒害作用。植物的 AKRs 分子参与植物各种各样的逆境胁迫反应,是植物防御系统中不可或缺的部分^[9]。人类的 AKR1B10 基因转化到 293T 细胞中后,可有效降低不饱和羰基对细胞的毒害作用^[10]。老鼠的 AKR7A1 基因在中国仓鼠 V79-4 细胞中的表达也可提高细胞对丙烯醛和 HNE 的抵抗力^[11]。这些试验结果表明,生理状态下的醛酮还原酶对细胞毒性羰基物质具有解毒功能。

尽管有关于高等脊椎动物、细菌和植物的醛酮还原酶分子的研究众多,但人们对于鱼类的醛酮还原酶基因及其功能却知之甚少。苯并芘(BaP)处理罗非鱼可显著提高其肝组织醛酮还原酶 AKR1A1 基因的大量表达,该研究结果提示罗非鱼的 AKR1A1 分子可能在 BaP 解毒过程中具有重要的作用^[12]。在前期的研究中,笔者所在实验室克隆了黄鳍肝脏醛酮还原酶基因并构建了其原核表达载体。为进一步分析黄鳍

醛酮还原酶在细胞抗羰基胁迫中的作用,笔者对比了含有重组黄鳍醛酮还原酶基因和不含该基因的大肠杆菌在受到丙酮醛和 2,3-丁二酮等有毒羰基化合物胁迫后的存活率,分析了羰基化合物处理时间和浓度差异对细胞毒性的影响。这为深入了解鱼类的醛酮还原酶的羰基解毒作用和功能提供了重要参考资料。

1 材料与方法

1.1 试验菌株和试剂

含 pET-28a-EakR1 重组质粒的 BL21(DE3)菌株和含 pET-28a 空白质粒的 BL21(DE3)菌株,由长江大学生物医药研究所保存;丙酮醛和 2,3-丁二酮,购买于 Aladdin 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 菌株活化及诱导表达检测

将重组阳性菌株和对照菌在含 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 平板上划线,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。挑取于单克隆 LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 恒温摇床上培养 4 h 后,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG,诱导培养 3 h,取适量菌液用 12% 的 SDS-PAGE 电泳检测。

1.3 羰基化合物浓度大小对大肠杆菌存活率的影响

挑取阳性重组菌单克隆于 6 mL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养 3 h 后,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,继续诱导表达 1 h。将诱导培养液分装至 6 只 EP 管中,然后在 EP 管中加入丙酮醛(或 2,3-丁二酮),使其终浓度为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L,进一步在 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h。离心收集菌体,灭菌水洗涤 3 次后用 1 mL 新鲜液体 LB 重悬。取 10 μL 菌液进行 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 ...倍梯度稀释。取稀释后的系列菌液 50 μL 涂布在含 Kana 的 LB 平板上后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中恒温培养 12 h。选择菌落数在 100~500 的平板,用 Shinesso 公司的平板菌落计数仪进行菌落计数,根据相应稀释倍数推算稀释前的总菌落个数。计算出不同浓度丙酮醛(或 2,3-丁二酮)处理后大肠杆菌的存活率(S_c)。对照菌同样处理,重复 3 次。

收稿日期:2015-09-23

基金项目:国家大学生创新训练计划(编号:201510489007);湖北省教育厅基金(编号:Q20131206);湿地生态与农业利用教育部工程研究中心开放课题(编号:2013A011)。

作者简介:代海艳(1994—),女,湖北随州人,主要从事生物制药方面的研究。E-mail:1345410929@qq.com。

通信作者:李 伟,博士,副教授,主要从事鱼类分子生物学研究。E-mail:wetli@yangtzeu.edu.cn。

$$S_c = \frac{\text{各浓度丙酮醛(2,3-丁二酮)处理后的总菌落个数}}{\text{不添加丙酮醛(2,3-丁二酮)处理的总菌落个数}} \times 100\%。$$

1.4 羧基化合物处理时间长短对大肠杆菌存活率的影响

按照“1.3”节进行重组菌株诱导培养。诱导后的菌液中加入终浓度为 2 mmol/L 的丙酮醛(或 2,3-丁二酮),分别在 37 °C 静置培养 0、10、20、30、40、50、60 min。每个时间点取出菌液 0.1 mL,离心收集菌体并进行梯度稀释。稀释后的菌液取 50 μ L 涂布在含 Kana 的 LB 平板上后于 37 °C 培养箱中恒温培养 12 h。选择菌落数在 100~500 的平板,用 Shinesso 公司的平板菌落计数仪进行菌落计数,根据相应稀释倍数推算稀释前的总菌落个数。计算出丙酮醛(或 2,3-丁二酮)处理不同时间大肠杆菌的存活率(S_T)。对照菌同样处理,重复 3 次。

$$S_T = \frac{\text{丙酮醛(2,3-丁二酮)处理不同时间后的总菌落个数}}{\text{不添加丙酮醛(2,3-丁二酮)处理的总菌落个数}} \times 100\%。$$

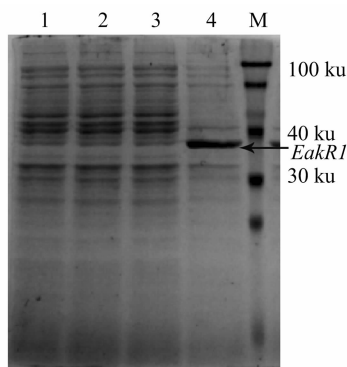
1.5 数据处理和分析

数据处理采用 SPSS 20.0 软件中的单因素方差分析(A-NOVA)进行,存活率结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并进行 Duncan's 多重比较检验。当 $P < 0.05$ 时为差异显著,当 $P < 0.01$ 时差异极显著。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 检测诱导表达结果

由图 1 可知,相对于阳性重组质粒,空白质粒菌株在用 IPTG 诱导前后均没有表达外源蛋白;而含有 *EakR1* 的重组菌株用 IPTG 诱导后与未诱导相比明显表达了 *EakR1*。*EakR1* 分子量大约为 37 ku,与醛酮还原酶理论分子量大小相符。这说明黄鳝 AKR 基因可以实现在大肠杆菌 BL21(DE3)中的融合表达。



1—空质粒菌株;2—空质粒菌株IPTG诱导;3—*EakR1*重组菌株;4—重组菌株诱导

图1 阳性重组菌株和对照的诱导检测

2.3 羧基化合物浓度大小对大肠杆菌存活率的影响结果

由图 2 可知,丙酮醛的处理对大肠杆菌细胞有着极强的毒害作用;随着丙酮醛浓度升高,2 组大肠杆菌的存活率都极显著下降。当培养环境中丙酮醛浓度达到 2.5 mmol/L 时,阴性对照菌株的存活率极低($10^{-3}\% \sim 10^{-4}\%$),而阳性重组菌株的存活率(约 1%)与阴性对照相比有极显著提高,约为阴性对照菌株存活率 1 000~10 000 倍。

由图 3 可知,2,3-丁二酮处理对大肠杆菌细胞也有较强毒害作用,但效果比丙酮醛低得多。随着 2,3-丁二酮浓度升高,2 组大肠杆菌菌株存活率也出现明显降低。当培养基

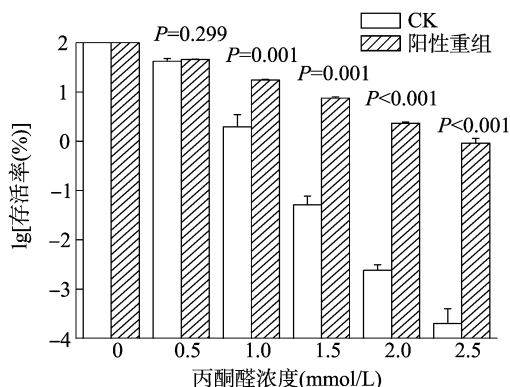


图2 不同浓度丙酮醛处理后大肠杆菌的存活率

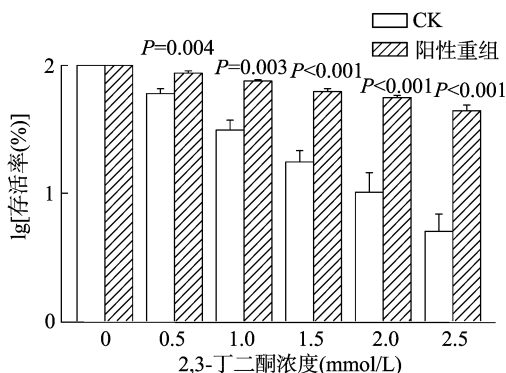


图3 不同浓度 2,3-丁二酮处理后大肠杆菌的存活率

中 2,3-丁二酮的浓度达到 2.5 mmol/L 时,阴性对照菌株的存活率只有约 5%,而阳性重组菌株存活率达到 44%,约为空质粒对照菌株存活率的 9 倍。

2.5 羧基化合物处理时间长短对大肠杆菌存活率的影响结果

由图 4 可知,当与 2 mmol/L 丙酮醛共同培养时,随着时间延伸,阳性重组菌及对照菌株的存活率都呈逐渐下降的趋势;且丙酮醛对阴性对照菌株的毒害作用要明显高于阳性重组菌株。当处理时间达到 60 min 时,阴性对照菌株的存活率约为 $10^{-3}\%$,而重组菌株的存活率约为 1.4%,约为对照菌株的 1 400 倍。

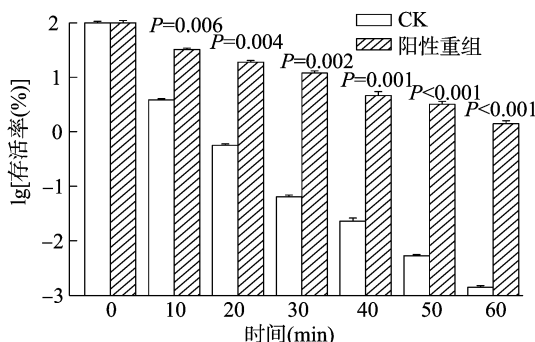


图4 丙酮醛处理时间不同大肠杆菌的存活率

相似地,如图 5 可知,2,3-丁二酮对细胞的毒害作用要低于丙酮醛,随着处理时间延长,2 组菌株的存活率也呈下降趋势;当处理时间达到 60 min 时,阴性对照菌株的存活率约为 6.8%,而阳性重组菌株的存活率约为 55.8%,约为对照菌株的 8 倍。

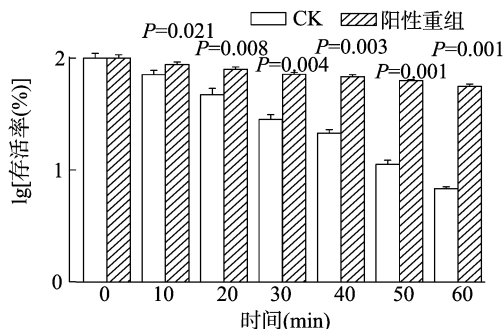


图5 2,3-丁二酮处理不同时间大肠杆菌的存活率

3 讨论

醛酮还原酶在自然界分布广泛且结构相对保守;具有多样化的功能,可能参与了细胞内各种各样羰基化合物的代谢作用^[1]。作为羟化类固醇脱氢酶(HSD),它们参与了高等哺乳动物的类固醇代谢平衡调节和致病过程^[13];作为醛糖还原酶,它们与多种慢性疾病或并发症的发生发展密切相关^[14];作为酮还原酶或醛还原酶,它们是机体细胞外源性或内源性毒性物质代谢的重要分子^[15]。尽管不同来源的醛酮还原酶具有相类似的(α/β)₈桶装二级结构和催化四分体氨基酸,它们在底物识别和催化机理上还是存在非常大的差异^[16]。作为醛酮还原酶超级家族中一个新的成员,黄鳝醛酮还原酶的功能有待深入研究。

甘油醛是细胞甘油代谢途径产生的对细胞有高毒性的化合物,它可修饰或改变细胞内大分子化合物的构象及功能^[17]。现有研究表明,大多数细胞的甘油醛解毒作用是通过Ⅰ型和Ⅱ型乙二醛酶的转化来实现的^[18];越来越多的试验也证实醛酮还原酶可将甘油醛转化为低毒的丙酮醇以实现解毒作用,是细胞抗烷基胁迫的重要分子。细菌的醛酮还原酶分子在体内对甘油醛具有明显的降解作用^[19-20],低等的蓝藻也对醛酮还原酶降解丙酮醛有较强的依赖作用^[8]。

笔者研究表明,丙酮醛和2,3-丁二酮等羰基化合物对大肠杆菌的生长均具有较强的毒害作用;且丙酮醛的毒害作用远大于2,3-丁二酮,其对大肠杆菌致死率约为2,3-丁二酮的6 000倍。重组黄鳝EakR1的菌株能够显著提高细菌抵抗烷基化合物毒害作用的能力。其中,在丙酮醛胁迫试验中能够将大肠杆菌的存活率提高1 000~10 000倍;在2,3-丁二酮胁迫试验中能够将大肠杆菌的存活率提高约9倍。表明,黄鳝EakR1基因在大肠杆菌中的表达产物能够有效降解丙酮醛和2,3-丁二酮等有毒羰基化合物,起到保护酶的作用。当然,目前对于醛酮还原酶在黄鳝羰基化合物胁迫和其他生理过程中的具体作用和机制尚不可知,需要进一步深入研究。该试验结果为人们深入了解鱼类醛酮还原酶的功能并应用于鱼类养殖实践提供了基础资料。

参考文献:

- [1] Jez J M, Bennett M J, Schelgel B P, et al. Comparative anatomy of the aldo - keto reductase superfamily [J]. Biochemical Journal, 1997, 326: 625 - 636.
- [2] Endo S, Matsunaga T, Mamiya H, et al. Characterization of a rat NADPH - dependent aldo - keto reductase (AKR1B13) induced by

- oxidative stress [J]. Chemico - Biological Interactions, 2009, 178: 151 - 157.
- [3] Korenaga D, Takesue F, Yasuda M, et al. The relationship between cyclin B1 overexpression and lymph node metastasis in human colorectal cancer [J]. Surgery, 2002, 131 (Suppl 1): S114 - S120.
- [4] Penning T M. The aldo - keto reductases (AKRs) [J]. Chemico - Biological Interactions, 2015, 234: 236 - 246.
- [5] Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, et al. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long - term uremic complications [J]. Kidney International, 1999, 55 (2): 389 - 399.
- [6] Li D, Ferrari M, Ellis E M. Human aldo - keto reductase AKR7A2 protects against the cytotoxicity and mutagenicity of reactive aldehydes and lowers intracellular reactive oxygen species in hamster V79 - 4 cells [J]. Chemico - Biological Interactions, 2012, 195 (1): 25 - 34.
- [7] Laphorn A J, Zhu X F, Ellis E M. The diversity of microbial aldo - keto reductases from *Escherichia coli* K12 [J]. Chemico - Biological Interactions, 2013, 202 (1/2/3): 168 - 177.
- [8] Xu D Y, Liu X W, Guo C, et al. Methylglyoxal detoxification by an aldo - keto reductase in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 [J]. Microbiology - SGM, 2006, 152 (7): 2013 - 2021.
- [9] Sengupta D, Naik D, Reddy A R. Plant aldo - keto reductases (AKRs) as multi - tasking soldiers involved in diverse plant metabolic processes and stress defense; a structure - function update [J]. Journal of Plant Physiology, 2015, 179: 40 - 55.
- [10] 钟琳琳. AKR1B10 蛋白对 α, β - 不饱和羰基的解毒作用 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2009.
- [11] 李丹, 马东初, 张岐山, 等. 醛酮还原酶 AKR7A1 在活性醛引起的 V79 - 4 细胞损伤中的作用 [J]. 中国医科大学学报, 2013, 42 (5): 408 - 411.
- [12] Osorio - Yáñez C, Luis García - Tavera J, Teresa Pérez - Núñez M, et al. Benzo(a)pyrene induces hepatic AKR1A1 mRNA expression in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) [J]. Toxicology Mechanisms and Methods, 2012, 22 (6): 438 - 444.
- [13] Rižner T L, Penning T M. Role of aldo - keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism [J]. Steroids, 2014, 79 (1): 49 - 63.
- [14] 谷娟, 严瑾, 吴卫华, 等. 醛糖还原酶的研究进展 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2010, 35 (4): 395 - 400.
- [15] Barski O A, Tipparaju S M, Bhatnagar A. The aldo - keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification [J]. Drug Metabolism Reviews, 2008, 40 (4): 553 - 624.
- [16] Penning T M. The aldo - keto reductases (AKRs): overview [J]. Chemico - Biological Interactions, 2015, 234 (5): 236 - 246.
- [17] Ferguson G P, Töttemeyer S, Maclean M J, et al. Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival [J]. Archives of Microbiology, 1998, 170 (4): 209 - 218.
- [18] Kalapos M P. Methylglyoxal in living organisms. Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications [J]. Toxicol Lett, 1999, 110: 145 - 175.
- [19] Ko J, Kim I, Yoo S, et al. Conversion of methylglyoxal to acetol by *Escherichia coli* aldo - keto reductases [J]. J Bacteriol, 2005, 187, 5782 - 5789.
- [20] Grant A W, Steel G, Waugh H, et al. A novel aldo - keto reductase from *Escherichia coli* can increase resistance to methylglyoxal toxicity [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 218 (1): 93 - 99.