

硒蛋白 TrxR1 介导甲萘醌还原：催化特性和抑制作用

张楠^{1,2*}, 孙世博^{1*}, 张岳¹, 杨宜佳¹, 张意慈¹, 陈继红¹, 徐卫平³, 马强², 许建强¹

1 大连理工大学 生命科学与药学学院 盘锦产业技术研究院, 辽宁 盘锦 124221

2 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176

3 大连理工大学 海洋科学与技术学院, 辽宁 盘锦 124221

张楠, 孙世博, 张岳, 等. 硒蛋白 TrxR1 介导甲萘醌还原: 催化特性和抑制作用. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2139–2150.
Zhang N, Sun SB, Zhang Y, et al. Selenoprotein thioredoxin reductase mediated menadione reduction: catalytic properties & inhibition effects. Chin J Biotech, 2020, 36(10): 2139–2150.

摘要: 硫氧还蛋白还原酶 (Thioredoxin reductase, TrxR) 是一类重要的抗氧化硒蛋白, 参与调控肿瘤发生发展。研究表明, 萘醌类分子可以靶向抑制 TrxR1 活性并经由 TrxR1 介导产生活性氧, 导致细胞氧化还原失衡, 使其成为潜在的肿瘤化疗药物。本文旨在通过生物化学及质谱分析, 探究硒蛋白 TrxR1 与萘醌化合物甲萘醌的相互作用, 进一步揭示 TrxR1 催化萘醌分子还原的机理和萘醌分子抑制 TrxR1 活性的机制。通过对 TrxR1 催化残基的定点突变和突变体的重组表达, 我们测定 TrxR1 突变体介导甲萘醌还原稳态动力学参数, 并分析甲萘醌对 TrxR1 活性抑制, 最后通过质谱分析鉴定甲萘醌与 TrxR1 相互作用。结果表明, 硒蛋白 TrxR1 的 Sec498 催化甲萘醌还原, 但是 U498C 突变使甲萘醌还原更加高效, 表明了甲萘醌还原主要呈现非硒依赖性。突变实验发现 C 端 Cys498 发挥主要催化还原作用, 而 N 端 Cys64 对甲萘醌还原的影响稍强于 Cys59。LC-MS 结果发现 TrxR1 存在 1 分子甲萘醌加合物, 推测其不可逆修饰硒蛋白 C 末端高反应活性的硒代半胱氨酸。本研究揭示了 TrxR1 可以非硒依赖方式催化甲萘醌还原, 同时其活性会受到甲萘醌的不可逆抑制, 为靶向 TrxR1 的萘醌类抗癌药物研发提供有益参考。

关键词: 硫氧还蛋白还原酶, 甲萘醌, 活性氧, 抑制作用, 残基修饰, 液相色谱-质谱联用

Received: February 17, 2020; **Accepted:** May 12, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31670767), Fundamental Research Funds for the Central Universities (Nos. DUT17JC36, DUT20LK36), Research and Development Program of Panjin Institute of Industrial Technology (DUT) (No. PJYJY-002-862011).

*Those authors contributed equally in this work.

Corresponding author: Jianqiang Xu. Tel/Fax: +86-427-2631910; E-mail: Jianqiang.Xu@dlut.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31670767), 中央高校基本科研业务费 (Nos. DUT17JC36, DUT20LK36), 大连理工大学盘锦产业技术研究院研发项目 (No. PJYJY-002-862011) 资助。

Selenoprotein thioredoxin reductase mediated menadione reduction: catalytic properties & inhibition effects

Nan Zhang^{1,2*}, Shibo Sun^{1*}, Yue Zhang¹, Yijia Yang¹, Yici Zhang¹, Jihong Chen¹, Weiping Xu³, Qiang Ma², and Jianqiang Xu¹

¹ School of Life and Pharmaceutical Sciences (LPS) and Panjin Institute of Industrial Technology, Dalian University of Technology, Panjin 124221, Liaoning, China

² Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China

³ School of Ocean Science and Technology (OST), Dalian University of Technology, Panjin 124221, Liaoning, China

Abstract: Thioredoxin reductase (TrxR) is one class of the most important antioxidant selenoproteins and is involved in regulating tumor genesis and progression. It has been reported that naphthoquinones can target and inhibit TrxR1 activity therefore produce reactive oxygen species (ROS) mediated by TrxR1, resulting into cellular redox imbalance and making the naphthoquinone compounds to become potential anticancer chemotherapy drugs. The purpose of this work is to explore the interaction between TrxR1 and menadione using biochemical and mass-spectrometric (MS) analyses, to further reveal the detailed mechanisms of TrxR1-mediated naphthoquinone reduction and inhibition of TrxR1 by naphthoquinone compounds. Using the site-directed mutagenesis and recombinantly expressed TrxR1 variants, we measured the steady-state kinetic parameters of menadione reduction mediated by TrxR1 and its variants, performed the inhibition analysis of menadione on TrxR1 activity, and eventually identified the interaction between menadione and TrxR1 through MS analysis. We found that Sec-to-Cys mutation at residue of 498 significantly enhanced the efficiency of TrxR1-mediated menadione reduction, though the Sec⁴⁹⁸ is capable to catalyze the menadione reduction, indicating that TrxR1-mediated menadione reduction is dominantly in a Se-independent manner. Mutation experiments showed that Cys⁴⁹⁸ is mainly responsible for menadione catalysis in comparison to Cys⁴⁹⁷, while the N-terminal Cys⁶⁴ is slightly stronger than Cys⁵⁹ regarding the menadione reduction. LC-MS results detected that TrxR1 was arylated with one molecule of menadione, suggesting that menadione irreversibly modified the hyper-reactive Sec residue at the C-terminus of selenoprotein TrxR1. This study revealed that TrxR1 catalyzes the reduction of menadione in a Se-independent manner meanwhile its activity is irreversibly inhibited by menadione. Hereby it will be useful for the research and development of naphthoquinone anticancer drugs targeting TrxR1.

Keywords: thioredoxin reductase, menadione, reactive oxygen species (ROS), inhibition, residue modification, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

哺乳动物硒蛋白硫氧还蛋白还原酶 (Thioredoxin reductase 1, TrxR1) 属于吡啶核苷酸二硫化物氧化还原酶家族, 通过催化调节硫氧还蛋白 (Thioredoxin, Trx) 的氧化还原状态参与多种细胞进程, 如拮抗氧化应激、支持 DNA 合成、抵抗凋亡信号^[1]。TrxR1 通常为为首尾相对的同型二聚体, 每个亚基包括 N 端-CVNVGC-催化结构域、C 端-GCUG 催化结构域、黄素腺嘌呤二核苷酸 (Flavin adenine dinucleotide, FAD) 结构域和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 结构

域^[2]。在 TrxR1 电子传递过程中, FAD 首先接收 NADPH 的电子, 随后打开 N 端活性位点 Cys⁵⁹-Cys⁶⁴ 之间的二硫键, 其中 Cys⁶⁴ 与 FAD 形成电子转移复合物, Cys⁵⁹ 则与另一亚基 C 末端 Sec⁴⁹⁸ 形成硒硫键中间体, 最终还原 C 端活性中心, 进而催化多种底物^[3]。据报道, TrxR 在乳腺癌^[4]、肺癌^[5]、肝癌^[6]等癌细胞中高表达, 这与氧化还原信号在肿瘤发生发展中的重要作用紧密相关, 高水平的 TrxR1 有利于肿瘤细胞应对无限增殖、高代谢水平而产生的过量活性氧 (Reactive oxygen species, ROS), 这表明 TrxR1 与癌症发生

发展、表型维持密切相关, 因此 TrxR1 被认为是癌症治疗中的潜在靶点^[7]。

醌类化合物具有六元环状共轭不饱和二酮的结构, 可以诱发氧化应激, 加速氧化还原循环并导致细胞毒性。多种醌类化合物具有高度反应活性, 受 TrxR1 催化还原^[8]。研究表明, 在 TrxR1 介导的胡桃醌 (Juglone) 还原中, 无论是删减化的 TrxR1 还是 U498C 突变体, 均可增强 TrxR1 对 Juglone 的氧化还原速率, 同时 TrxR1 N 端突变会使反应速率大幅降低, 这表明在 TrxR1 介导醌类还原中, 多个活性中心, 包括 FADH₂、FAD-Cys⁶⁴ 的电子转移复合物以及潜在的 Cys⁶⁴-Sec⁴⁹⁸ (对于 -GC 突变体则可能是 Cys⁶⁴-Cys⁴⁹⁷), 均直接参与电子传递^[9]。有研究报道详尽地揭示了 TrxR1 介导胡桃醌还原的分子机制, 证明 TrxR1 中除活性位点 Sec⁴⁹⁸ 外, 还原态 FAD 半醌自由基、N 端 Cys⁵⁹ 和 C 端 Cys⁴⁹⁷ 共同参与催化, 其中 Cys⁴⁹⁷ 是高效还原胡桃醌、大量生成超氧自由基的关键残基^[10]。此外, 9,10-PQ 和 PQQ 等醌类化合物可以接受来自 TrxR1 的电子, 并呈现高度硒依赖性^[11]。

甲萘醌 (图 1) 是一种两性萘醌类化合物, 可被机体吸收并诱导产生大量活性氧, 被广泛应用于氧化应激相关研究^[12]。研究表明, 甲萘醌可以增强 TrxR1 介导的活性氧产生, 进而影响细胞氧化还原稳态, 促进癌细胞死亡^[13], 这表明甲萘醌可能参与 TrxR1 氧化还原循环反应, 然而 TrxR1 还原甲萘醌的催化细节尚不清晰, 亟需深入研究。同时, 紫草素^[14]、兰雪醌^[15]等萘醌分子对 TrxR1

的活性产生不可逆抑制, 而甲萘醌对 TrxR1 的修饰位点和作用机制尚未见报道, 需要系统论证。

本研究深入分析硒蛋白 TrxR1 和甲萘醌的相互作用, 通过测定 TrxR1 介导甲萘醌还原的动力学反应, 分析 TrxR1 N 端和 C 端活性中心在甲萘醌还原中的作用, 并利用 LC-MS 鉴定甲萘醌对 TrxR1 的修饰, 系统论证了 TrxR1 介导甲萘醌的还原机制和甲萘醌靶向 TrxR1 的抑制作用, 有助于进一步理解 TrxR1 与萘醌类分子的相互作用, 并为以 TrxR1 为靶点抗肿瘤药物开发提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌 BL21(DE3) *gor*⁻菌株、大鼠 TrxR1 的表达质粒 pET-TRS_{TER} (6.8 kb)、辅助质粒 pSUABC (9.0 kb) 由瑞典卡罗林斯卡医学院 Arne Holmgren 教授和 Elias S.J. Arnér 教授共同馈赠。甲萘醌 (Menadione)、胡桃醌 (Juglone)、9,10-PQ、NADPH、5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (缩写 DTNB)、二甲基亚砜、LC-MS 级甲酸购自 Sigma-Aldrich 公司。MAbPac RP LC 分析柱和 HPLC 级乙腈购自 Thermo Scientific 公司。ÄKTA StartTM 蛋白纯化工作站、2',5'-ADP SepharoseTM 亲和基质、预装柱 16/60 SephacrylTM S-300 HR、NAPTM-5 脱盐柱均购自 GE Healthcare Life Sciences 公司。多功能酶标仪 SYNERGY H1 购自美国 Bio-Tek 公司。精确微量紫外分光光度计 UV5 BIO 购自瑞士 Mettler Toledo 公司。

1.2 重组大鼠 TrxR1 定点突变体的质粒构建

为研究 TrxR1 催化甲萘醌还原的作用及可能机制, 我们以野生型大鼠 TrxR1 为模板, 对其关键氨基酸进行突变, 相关引物见表 1。使用 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase 进行 Inverse PCR, 向 20 μ L PCR 反应体系中加入 1 ng DNA 模板和 0.5 μ mol/L 上下游引物, PCR 条件如下: 98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 69 $^{\circ}$ C 退

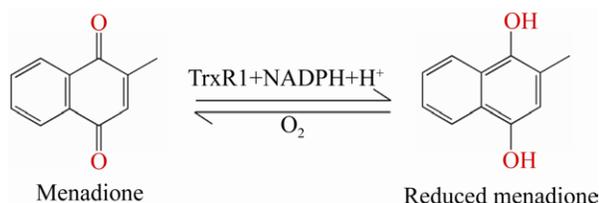


图 1 甲萘醌的化学结构及其还原产物

Fig. 1 Structure of menadione and its reduced form.

表 1 用于重组大鼠 TrxR1 定点突变的引物

Table 1 Primers for site-directed mutations of rat TrxR1

No.	Name	Mutation site	Sequence (5'-3')
1	F_N01	C59S	gcggtctcggaaactcagtgacgtgggctgc
2	F_N02	C64S	gcggtctcggaaactgtgtgaactgggctccatacctaaaaaac
3	F_C01	U498C	gcggtctccagtcggatgctgcgggtaagccccagaatc
4	F_C02	-GC	gcggtctccagtcggatgctgaagtaagccccagaatc
5	R_N01	N-term mutation	gcggtctccgttccccgagaccccatc
6	R_C01	C-term mutation	gcggtctcgactggaggatgtctcc

火 15 s, 72 °C 延伸 3 min, 30 个循环; 之后 72 °C 延伸 10 min。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物并切胶回收目的条带。随后使用 *Eco31 I* 和 *Dpn I* 在 37 °C 条件下对回收产物双酶切消化 30 min 并精制纯化, 在 22 °C 条件下使用 T4 DNA 连接酶连接 2 h, 热击转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 提取质粒 DNA 并测序, 引物合成和 DNA 序列测定委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

1.3 TrxR1 及突变体蛋白的表达

重组大鼠 TrxR1 及其突变体的制备参照文献方法进行^[16], 步骤如下: 1) 共表达菌株的制备: 取 100 μ L 含有 pET-TRS_{TER} 质粒的 BL21(DE3) *gor*⁻ 感受态细胞, 向其中加入 1 μ L 50 ng/ μ L pSUABC 质粒, 轻微混匀并在冰中静置 20 min, 之后在 42 °C 水浴条件下热击 90 s, 随后立即置于冰中 3 min, 然后加入 900 μ L 无抗性 LB 培养基, 在 37 °C、200 r/min 条件下培养 1 h, 取 100 μ L 菌液用无菌涂布棒在抗性平板均匀涂布, 倒置于 37 °C 恒温培养箱过夜培养。次日挑取单克隆并接种于 3 mL LB 并振荡培养, 即获得含有 pSUABC 质粒和 pET-TRS_{TER} 质粒的共表达菌株。2) 重组大鼠 TrxR1 的表达: 按照 2% 接种量, 将过夜培养的共表达菌液接种至 1 L 新鲜 LB 培养基, 37 °C、220 r/min 条件培养至对数生长末期, 即 $OD_{600}=2.4$, 依次添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG、5 nmol/L 的 Selenite、100 μ g/mL 的 L-Cysteine。然后在 24 °C、220 r/min 条件下振荡培养 24 h, 以

诱导表达 TrxR1 及其突变体。

1.4 TrxR1 及突变体蛋白的纯化

诱导培养结束后, 收集菌液, 在 4 000 r/min 条件下离心 10 min, 弃去上清, 使用少量 TE 缓冲液 (含 2 mmol/L EDTA, pH 7.5) 重悬菌体, 加入终浓度 1 mg/mL 溶菌酶以破碎细胞壁, 经过反复冻融 3 次, 以充分释放胞内蛋白, 随后使用超声破碎仪打碎核酸, 最后以 13 000 r/min 低温离心 20 min, 小心收集上清液, 即为 TrxR 粗酶液。用 0.45 μ m 无菌滤膜对上清样品进行过滤除杂后, 依次使用 2',5'-ADP SepharoseTM 亲和层析、30 kDa cut-off Centrifugal Filters 超滤离心管、16/60 SephacrylTM S-300 HR 凝胶过滤分离纯化目的蛋白 TrxR1。

1.5 TrxR1 突变体蛋白浓度测定

Bradford 法测定蛋白浓度: 使用 96 孔酶标板, 标准浓度测定反应体系为 200 μ L。步骤如下: 取 5 μ L 不同浓度的 BSA 标准蛋白溶液 (0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL) 加入 96 孔板中, 用于绘制标准曲线 ($n=3$), 将 5 μ L 待测浓度的 TrxR1 溶液, 加入 96 孔板中, 每个样品 3 组平行。向上述孔中加入 195 μ L 1 \times Bradford Solution 试剂, 混合均匀 3 min 后, 使用酶标仪在 595 nm 下测定吸光度值, 根据标准曲线, 计算未知样品浓度。

FAD 浓度测定法标定 TrxR1 浓度: TrxR1 浓度通过测定 463 nm 处酶溶液的吸光度值, 以二聚体非共价结合的 FAD 浓度进行标定。1 个 FAD 对应 1 个 TrxR1 亚基, 2 个 FAD 分子对应 1 个 TrxR1

二聚体蛋白。测定步骤如下: 使用 1 cm 光程石英比色杯, 使用 TE 缓冲液作为空白对照, 标准测试体系为 500 μL , 使用紫外分光光度计, 在 463 nm 下测试 3 次, 数据取平均值。采用 FAD 的摩尔吸光系数 11 300 L/(mol·cm) 进行浓度计算。

1.6 TrxR1 及突变体蛋白的电泳分析

取 30 μL 适当浓度蛋白样品, 加入 10 μL 4 \times SDS 上样缓冲液并混匀, 6 000 r/min 离心 30 s, 将样品于 100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴加热 5 min, 13 000 r/min 离心 1 min, 随后混合均匀。接着取下新鲜配制聚丙烯酰胺凝胶的梳子, 向电泳槽加入 1 \times Gly-Tris 电泳缓冲液至没过胶孔, 在胶孔中点样后, 设置 90 V 电压电泳 30 min, 120 V 电泳 90 min。电泳结束后, 使用 R-250 考马斯亮蓝染液对凝胶振荡染色 2 h, 使用脱色液对凝胶振荡脱色直至胶背景脱色干净, 使用 Champ plus 500 紫外凝胶成像系统拍照记录。

1.7 以甲萘醌为底物的稳态反应动力学分析

使用 96 孔酶标板, 标准反应体系为 200 μL 。反应液包括 0–200 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度甲萘醌、30 nmol/L 大鼠 TrxR1 或 50 nmol/L 酵母 GR 和 200 $\mu\text{mol/L}$ NADPH, 50 mmol/L TE 缓冲液 (pH 7.5)。通过向反应体系加入 5 μL 纯酶引发甲萘醌还原反应, 反应程度通过产物 NADPH 的消耗来评估。在 340 nm 监测 30 min。活力检测及酶促反应动力学常数的计算均使用 NADPH 的摩尔吸光系数 6 200 L/(mol·cm)。所有酶促反应均在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行测试, 间隔 10 s 读数, 使用未加酶的反应液作为空白对照。

1.8 甲萘醌抑制 TrxR1 活力测定

0.2 $\mu\text{mol/L}$ 大鼠 TrxR1 与 100 $\mu\text{mol/L}$ NADPH 孵育 10 min, 以还原 TrxR1 的 N 端二硫键及 C 端硒硫键。0.2 $\mu\text{mol/L}$ 还原态酶或氧化态酶与不同浓度的甲萘醌 (0、1、2、3、4、5 $\mu\text{mol/L}$) 共孵育 60 min。孵育结束后, 通过 DTNB 还原法检测 TrxR1 活力。使用 0–2.5 mmol/L 不同浓度的 DTNB,

在 412 nm 跟踪反应产物 TNB $^{-}$ 的吸光度值增加, TNB $^{-}$ 的摩尔吸光系数为 13 600 L/(mol·cm)。所有酶促反应均在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行测试, 按照 10 s 间隔读数, 使用未加酶的反应液作为空白对照。

1.9 LC/MS 分析

色谱条件: 色谱柱 MAbPac $^{\text{TM}}$ RP LC 柱 (规格 2.1 mm \times 50 mm \times 4.0 μm); 流速: 0.25 mL/min; 流动相: A 为纯水, B 为乙腈, A、B 两相均用甲酸调至 pH 为 3.0; 梯度洗脱程序: 0–2.0 min (10% B), 2.0–4.0 min (10%–50% B), 4.0–5.0 min (50%–90% B), 5.0–6.0 min (90% B), 6.0–6.1 min (90%–10% B); 柱温: 75 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL 。

质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 正离子扫描模式, 喷雾电压: 3.5 kV; 透镜电压: 50 V; 鞘气: 氮气; 辅助气: 氮气; 离子传输管温度: 320 $^{\circ}\text{C}$; 辅助气温度 300 $^{\circ}\text{C}$; 扫描模式: 一级全扫描; 分辨率: 17 500; 扫描范围: 600–3 000 (m/z)。

2 结果与分析

2.1 重组大鼠 TrxR1 活性位点突变

大鼠硒蛋白 TrxR1 具有 N 端和 C 端两个反应活性中心, 包含参与氧化还原的 3 个半胱氨酸和 1 个硒代半胱氨酸。我们构建了大鼠 TrxR1 突变体 (表 1), 用于确定位点突变对酶活的影响以及抑制剂对位点的选择。首先, 在 TrxR1 基因 N 端的 Cys 59 、Cys 64 位点处进行单点突变, 得到了“C59S/GCUG 和 C64S/GCUG” 2 个突变体, 然后对 TrxR1 的 C 末端进行 U498C 突变或 Sec 498 删减, 得到了“GCCG、GC” 2 个突变体质粒。接着在 C 末端突变体基础上对 N 端的 Cys59、Cys64 位点处进行质粒的定点突变, 得到了 C59S/GCCG、C64S/GCCG、C59S/GC、C64S/GC 双位点突变的 4 个突变体质粒。最后, 经过 DNA 测序检验正确, 成功获得重组突变体质粒。

2.2 重组大鼠 TrxR1 突变体蛋白的制备

野生型大鼠 TrxR1 及其突变体使用经典方法进行表达, 之后使用 ADP-Sepharose 和 Sephacryl S-300 两步柱层析获得纯化, SDS-PAGE 分析检测, 如图 2 所示, 纯化的目的蛋白 TrxR1, 呈现 55 kDa 单一条带, 且背景中除目标条带外无杂蛋白带出现。经典活力检测使用二硫键小分子底物 DTNB, 检测野生型 TrxR1 比活力为 23.5 U/mg。

2.3 TrxR1 及其突变体的活性检测

我们分别检测和比较了突变体和野生型 TrxR1 的酶活力, 结果如图 3A 所示。在 DTNB 还原反应中, 野生型 TrxR1 呈现较高活力, 其余突变体酶活力几乎丧失殆尽, 表明对于 TrxR1 经典底物, TrxR1 的 C 末端硒代半胱氨酸 Sec⁴⁹⁸ 是必需的。此外, TrxR1 的 N 端突变体结果表明, N 端活性中心参与电子传递过程, 关键半胱氨酸突变同样导致了酶的失活。

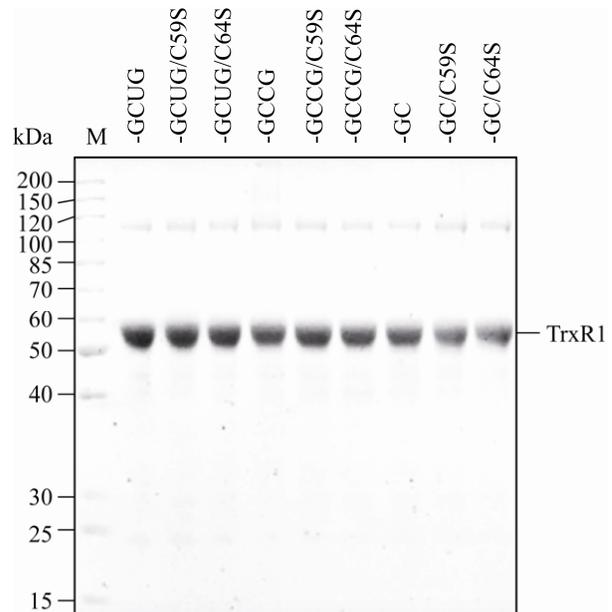


图 2 重组大鼠 TrxR1 的 12%还原型 SDS-PAGE 电泳检测

Fig. 2 12% reducing SDS-PAGE analysis of recombinant rat TrxR1.

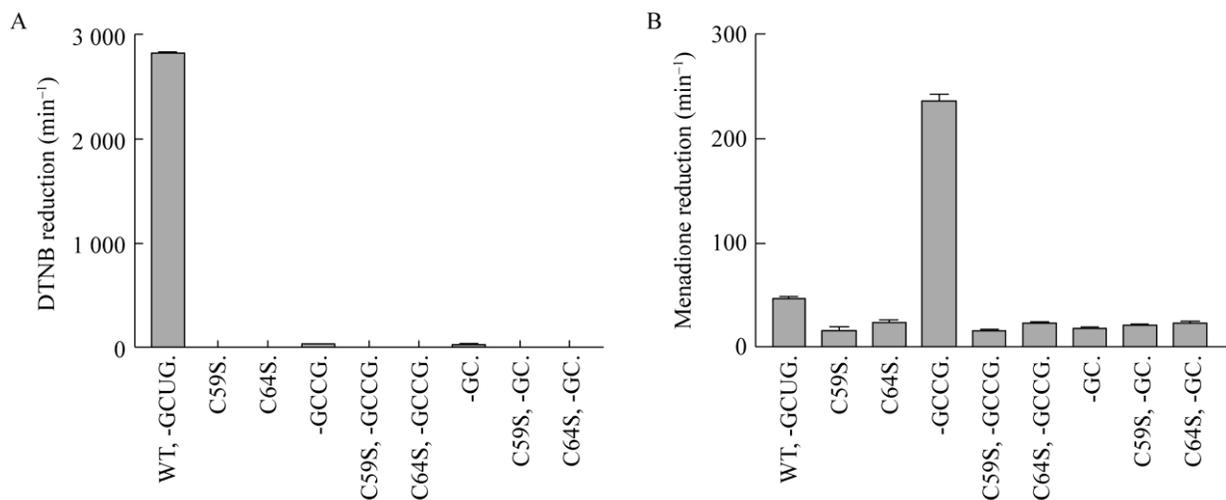


图 3 TrxR 及其突变体分别以 DTNB 和 Menadione 为底物检测酶促底物还原活力

Fig. 3 DTNB reducing activity assay and menadione reducing assay using mutant TrxR1 variants. (A) DTNB reducing activity. Enzyme activities with DTNB were measured with 5 nmol/L TrxR1 variants and 300 μ mol/L NADPH by following TNB⁻ formation at 412 nm for 3 min. (B) Menadione reducing activity. Enzyme activities with menadione were measured with 30 nmol/L TrxR1 variants and 200 μ mol/L NADPH by following NADPH consumption at 340 nm for 30 min.

2.4 以甲萘醌为底物的稳态反应动力学检测

为了研究 TrxR1 还原甲萘醌的位点特异性, 我们进行了酶促反应动力学检测。在 200 μL 反应体系中, 包含 30 nmol/L 重组大鼠 TrxR1 或其突变体蛋白、0–200 $\mu\text{mol/L}$ 甲萘醌、200 $\mu\text{mol/L}$ NADPH 和 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 以测定 TrxR1 还原甲萘醌 k_{cat} 和 K_{m} (图 4)。C 末端突变为硒代半胱氨酸突变为半胱氨酸, 即 C 末端序列由 -GCUG 突变为 -GCCG, 突变体的 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 为 $(10.0 \pm 0.88) \text{ L}/(\mu\text{mol} \cdot \text{min})$, 是野生型 TrxR1 的 2.7 倍 (野生型酶 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = (3.6 \pm 0.47) \text{ L}/(\mu\text{mol} \cdot \text{min})$)。值得注意的是, 当 N 端活性中心的半胱氨酸 Cys⁵⁹ 或 Cys⁶⁴ 突变为丝氨酸时, 均导致了转换数的大幅下降。删减化 TrxR1(-GC) 在甲萘醌的还原中并没有相对较

高的反应速率, 无论其 N 端活性中心的半胱氨酸是否突变, $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 均小于 $(0.83 \pm 0.19) \text{ L}/(\mu\text{mol} \cdot \text{min})$ 。

2.5 TrxR1 位点突变检测甲萘醌还原反应

为了研究哪些氨基酸残基位点是甲萘醌作为反应底物的关键位点, 我们制备了不同的 TrxR1 突变体并进行了稳态反应动力学分析 (表 2), 突变位置涉及 TrxR1 的 N 端 2 个半胱氨酸催化残基和 C 端 1 个半胱氨酸催化残基, 以及 C 端 498 位的硒代半胱氨酸活性催化残基。对表 2 进行横纵对比, 我们发现 C 端 Cys⁴⁹⁸ 比 Sec⁴⁹⁸ 催化效率高, 但是亲和力降低了, 整体转换数是 WT 的 3 倍。此外, 在同样 C 端条件下, N 端 Cys⁵⁹ 在酶促反应中催化能力比 Cys⁶⁴ 贡献大, 在天然 C 端位点里差距较大, 而 Cys⁶⁴ 比 Cys⁵⁹ 对酶对底物亲和力

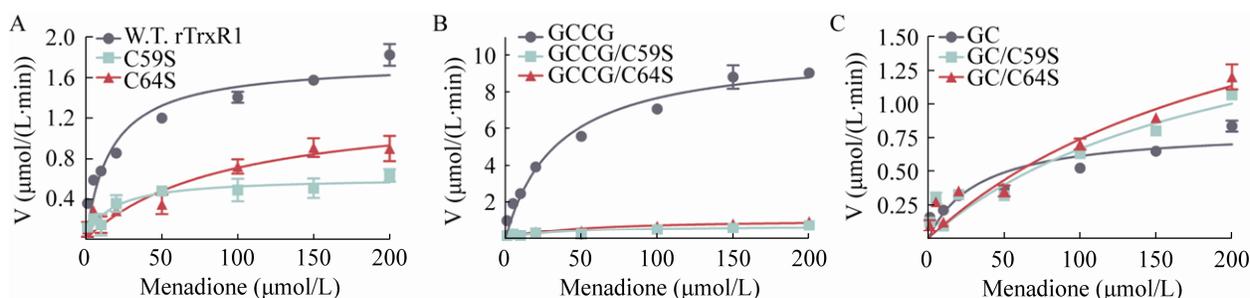


图 4 以甲萘醌做为底物时的 rTrxR1 突变体的酶活动力学曲线

Fig. 4 Kinetics curves for enzymatic activities of rTrxR1 variants with menadione as substrate. (A) W.T. TrxR1, C59S mutant and C64S mutant. (B) -GCCG mutant, -GCCG/C59S mutant and -GCCG/C64S mutant. (C) -GC mutant, -GC/C59S mutant and -GC/C64S mutant.

表 2 以甲萘醌为底物时的酶动力学参数

Table 2 Enzymatic kinetic parameters with menadione as substrate

TrxR1 variants N-term/C-term	k_{cat} (min^{-1})	K_{m} ($\mu\text{mol/L}$)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{L}/(\mu\text{mol} \cdot \text{min})$)
intact/-GCUG	58.6 ± 2.6	16.5 ± 2.9	3.6 ± 0.47
C59S/-GCUG	20.4 ± 1.5	17.0 ± 5.1	1.2 ± 0.27
C64S/-GCUG	45.0 ± 7.0	90.7 ± 32.6	0.5 ± 0.10
intact/-GCCG	342.3 ± 13.1	34.2 ± 4.3	10.0 ± 0.88
C59S/-GCCG	24.0 ± 2.6	35.9 ± 12.5	0.67 ± 0.16
C64S/-GCCG	35.5 ± 3.1	46.3 ± 11.9	0.76 ± 0.13
Intact/-GC	27.2 ± 2.7	32.8 ± 10.7	0.83 ± 0.19
C59S/-GC	67.0 ± 19.2	200.9 ± 97.5	0.33 ± 0.07
C64S/-GC	80.9 ± 22.2	228.4 ± 101.5	0.35 ± 0.06

Note: All analysis was performed in triplicate at 25 °C and values are expressed as $\bar{x} \pm s$.

的贡献大, 在天然 C 端里差距也较大, 这个现象至少在 -GCUG、GCCG 和 -GC 中表现高度一致。不仅如此, 我们还发现 -GC 和 -GCCG 相比, 酶对底物亲和力和转换数均降低了。以上结果表明在甲萘醌被还原的过程中, 催化能力排序是 -GCCG > -GC > -GCUG, 二硫键的作用大于硒硫键, 且大于单一半胱氨酸催化残基。

2.6 GR 还原甲萘醌的稳态反应动力学检测

谷胱甘肽还原酶 (GR) 与 TrxR 同属一个蛋白家族, 除了 GR 不含硒, 两者结构和性质较为相似。但是 C 端不含 Sec 位点, 因此我们试图通过进一步实验来判断甲萘醌是否也同为 GR 的底物 (图 5)。反应体系中包含 50 nmol/L 酵母 GR、0–200 $\mu\text{mol/L}$ 甲萘醌、200 $\mu\text{mol/L}$ NADPH 和 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)。结果表明, 不含 Sec 位点的 GR 可以还原甲萘醌, 甲萘醌是 GR 的底物, k_{cat}/K_m 为 $(0.82 \pm 0.22) \text{ L}/(\mu\text{mol} \cdot \text{min})$, 仅为 TrxR1 的 1/4, 表明 TrxR1 还原甲萘醌的催化效率高于 GR。此外, yGR 的 K_m 是 $(10.0 \pm 3.4) \mu\text{mol/L}$, 野生型大鼠 TrxR 的 K_m 为 $(16.5 \pm 2.9) \mu\text{mol/L}$ (表 3), 这表明甲萘醌相对于 GR 的亲和力高于 TrxR1。

2.7 甲萘醌对 TrxR1 的抑制作用

我们前期研究表明, 胡桃醌及其衍生物会不可逆芳基化修饰 TrxR1 中硒代半胱氨酸和半胱氨酸, 进而抑制 TrxR1 的活力。为了研究甲萘醌是否存在类似作用, 我们检测了甲萘醌 (0–5 $\mu\text{mol/L}$) 对还原态 TrxR1 和氧化态 TrxR1 的抑制。结果如图 6 所示, 在 DTNB 还原中, 不同浓度甲萘醌对氧化态 TrxR1 的酶促反应结果趋于一致, 并没有呈现明显抑制。相反的是, 还原态的 TrxR1 活性会随甲萘醌的浓度升高而下降, 随着甲萘醌浓度的上升, 反应速率下降, 表明还原态的 TrxR1 更易受到甲萘醌的攻击。

表 3 选取 200 $\mu\text{mol/L}$ 甲萘醌作为底物时, rTrxR1 与 yGR 各自参与 NADPH 氧化催化的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of NADPH oxidation catalyzed by either rTrxR1 or yeast GR with 200 $\mu\text{mol/L}$ menadione

	$k_{\text{cat}} (\text{min}^{-1})$	$K_m (\mu\text{mol/L})$	$k_{\text{cat}}/K_m [\text{L}/(\mu\text{mol} \cdot \text{min})]$
Yeast GR	8.2 ± 0.6	10.0 ± 3.4	0.82 ± 0.22
Rat TrxR1	58.6 ± 2.6	16.5 ± 2.9	3.6 ± 0.47

酸, 进而抑制 TrxR1 的活力。为了研究甲萘醌是否存在类似作用, 我们检测了甲萘醌 (0–5 $\mu\text{mol/L}$) 对还原态 TrxR1 和氧化态 TrxR1 的抑制。结果如图 6 所示, 在 DTNB 还原中, 不同浓度甲萘醌对氧化态 TrxR1 的酶促反应结果趋于一致, 并没有呈现明显抑制。相反的是, 还原态的 TrxR1 活性会随甲萘醌的浓度升高而下降, 随着甲萘醌浓度的上升, 反应速率下降, 表明还原态的 TrxR1 更易受到甲萘醌的攻击。

2.8 甲萘醌对 TrxR1 靶向结合的质谱分析

我们通过质谱方法鉴定甲萘醌-TrxR1 加合物。首先, 将 1 $\mu\text{mol/L}$ NADPH 预还原的野生型大鼠 TrxR1 与 200 $\mu\text{mol/L}$ 甲萘醌共孵育 6 h。缓冲体系为 Tris-HCl 含 EDTA, 总体积为 250 μL 。然后, 使用 NAP-5 脱盐柱将缓冲液置换为碳酸氢铵溶液 (pH 7.8), 随后真空干燥, 再用 Millin-Q 超纯水溶解。接下来, 通过 LC-MS 液相质谱联用对野生型 TrxR1 与甲萘醌孵育的产物进行质谱分析。通过 Biofinder 软件选择目标峰进行反卷积。结合已报道的质谱结果和分子量的理论计算可知, TrxR1 单个亚基为 54 665 Da, 甲萘醌分子量为 172 Da, 因此加合物的分子量为 54 837 Da, 结果如图 7 所示, 在 LC-MS 的结果中检测到 TrxR1 单个亚基分子量为 54 666.30 Da, 相对应 TrxR1-Menadione 加合物同样被检测到, 分子量为 54 836.98 Da。

3 讨论

醌类化合物的细胞毒性主要包括诱发氧化应激、加速氧化还原循环, 其作用机理受到广泛

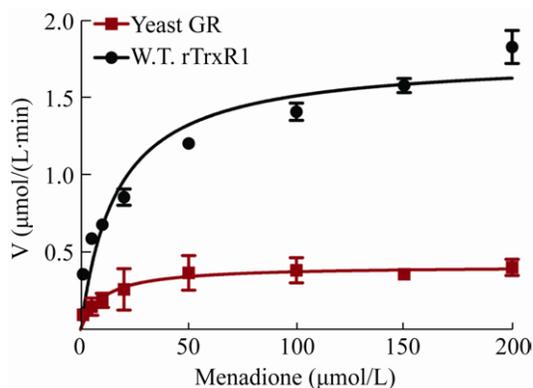


图 5 yGR 和 WT rat TrxR1 还原甲萘醌动力学参数
Fig. 5 Kinetic parameters of yGR and rTrxR1 with menadione.

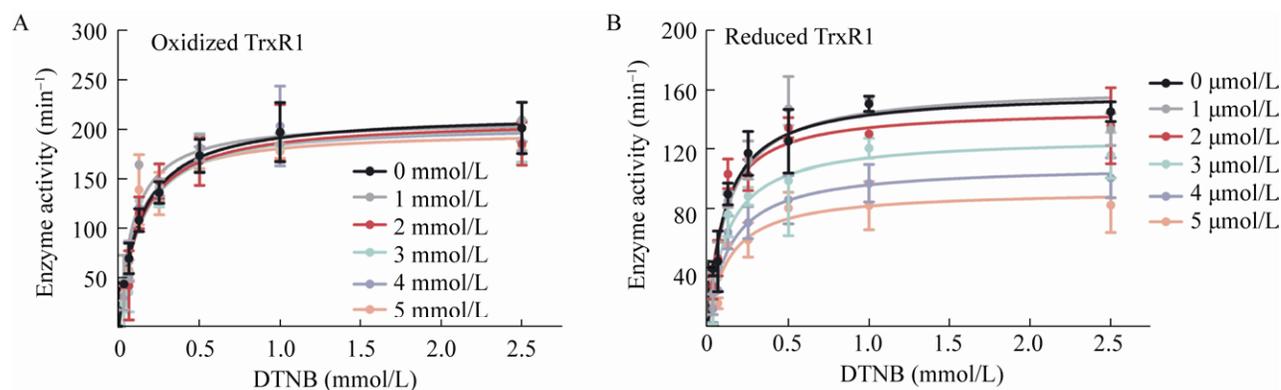


图 6 甲萘醌对 TrxR1 的 DTNB 活力的抑制作用

Fig. 6 Inhibitory effect of menadione on the DTNB reducing activity of TrxR1. (A) Inhibition of oxidized TrxR1 by menadione. TrxR1 was incubated with different concentrations of menadione in the absence of NADPH. (B) Inhibition of reduced TrxR1 by menadione. TrxR1 was pre-incubated with 200 $\mu\text{mol/L}$ NADPH for 10 min before incubated with different concentrations of menadione.

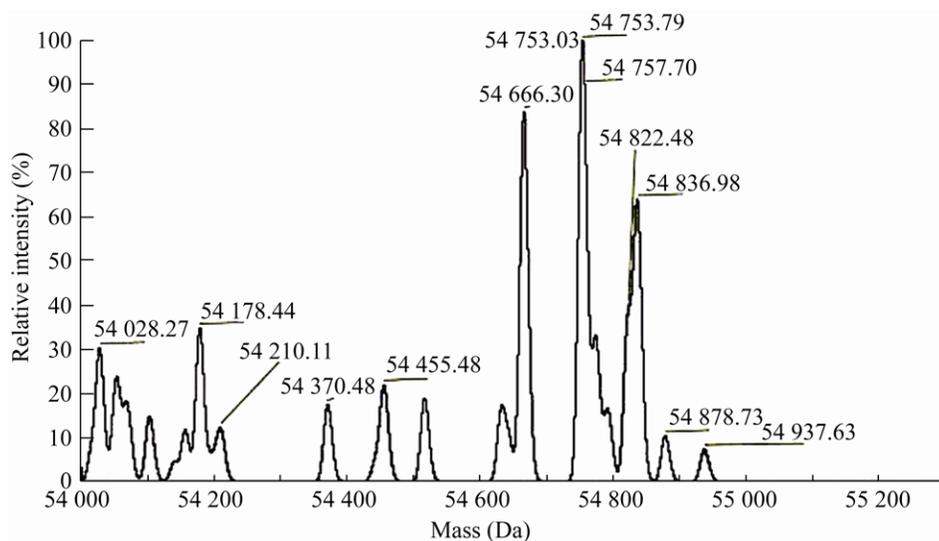


图 7 大鼠 TrxR1 与 1 分子 menadione 加合物的 LC-MS 分析

Fig. 7 LC-MS analysis of rat TrxR1-Menadione adducts. 1 $\mu\text{mol/L}$ reduced recombinant rat TrxR was incubated with 200 $\mu\text{mol/L}$ menadione for 6 h, buffer exchanged using dialysis tube and freeze-dried before subjected to mass analysis.

关注。进一步理解醌类化合物细胞内分子靶标, 对于理解醌类化合物的药理毒性至关重要。研究表明, 醌类分子与 TrxR1 直接反应, 介导活性氧产生是醌类化合物重要的毒性作用机理。同时, 应用醌类小分子及其衍生物抑制 TrxR/Trx 系统活力, 造成细胞内氧化还原失衡, 包括 ROS 产生积

累而无法清除, 破坏细胞微环境, 蛋白质巯基氧化还原态的失衡, 会直接导致细胞氧化应激, 引导癌细胞死亡^[17]。这表明不论是醌类化合物细胞毒性或潜在化疗药物的性质, 都与细胞氧化还原系统及氧化还原酶密切相关。

既往研究显示, TrxR1 可进行硒依赖和非硒

依赖酶促反应, 具有非常广的底物谱, 不仅包括生理底物 Trx、TRP14, 还包括多种小分子如 DTNB、Selenite、Toxoflavin, 这些底物均呈现了硒依赖的反应特性^[18-19]。而多种醌类物质作为 TrxR1 的底物, 可以通过单电子/双电子转移机制, 生成半醌中间体进而大量生成超氧化物, 导致氧化应激, 例如, TrxR1 可以通过单电子转移方式促使甲萘醌生成活跃的半醌中间体。在本实验中, 甲萘醌还原呈非硒依赖性, 有别于上述提及的底物, 推测可能与 TrxR1 多个活性位点直接作用被还原。

谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 系统和 Trx 系统同为哺乳动物体内重要的抗氧化系统, 二者相互协调, 共同行使机体的抗氧化作用^[20]。TrxR1 与谷胱甘肽还原酶 (Glutathione reductase, GR) 相似, N 端活性结构域是 -Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys-, 不同之处在于 TrxR1 的 C 末端有含硒结构域 -Gly-Cys-Sec-Gly。本实验中, TrxR1 对甲萘醌的高效还原活力显著优于 GR, 这提示我们硒蛋白 TrxR1 因其灵活的 C 末端含硒催化结构而具有优于 GR 的甲萘醌催化还原活力。

但是, 在使用 TrxR1 突变体, 尤其是甲萘醌还原过程中, 我们发现 TrxR1 突变体 (-GCCG) 的 C 端活性中心 Cys⁴⁹⁸ 突变使甲萘醌还原反应非常高效, 虽然其对底物亲和力有所降低, 表明具有氧化还原反应活性的半胱氨酸催化残基在甲萘醌还原中发挥主导作用, 而且 498 位优于 497 位。TrxR1 的 N 端活性中心突变无论是 Cys⁵⁹ 还是 Cys⁶⁴, 都促使甲萘醌还原反应中的电子传递变得十分低效。这些结果进一步揭示并佐证 TrxR1 电子传递路径中, N 端活性中心的关键地位, 同时 TrxR1 介导醌类化合物还原过程中独特的非硒依赖和 N 端依赖特性。有趣的是, 删减化的 TrxR1(-GC) 与甲萘醌反应时, 我们并没有观察到较野生型酶更高的反应活性, 还原活力和底物亲

和力反而变得比野生型 TrxR1 都低, 这与胡桃醌还原的情形不同, 说明甲萘醌还原与胡桃醌还原存在反应途径上的差异, 并且在实验中 TrxR1 介导甲萘醌还原的反应速率较低, 同时高浓度的甲萘醌又会抑制酶活性, 包括对半胱氨酸或硒代半胱氨酸的芳基化修饰, 可能是导致删减化酶 (-GC) 的 k_{cat}/K_m 较低的原因之一。

甲萘醌接受 TrxR1 传递的电子, 同时会一定程度上抑制 TrxR1 活性。本研究中, 我们发现氧化态的酶几乎不受甲萘醌的抑制, 这表明处于自由状态巯基或硒巯基很可能是甲萘醌的靶点。由以往的研究可知, 抑制剂进行亲电攻击, 会不可逆修饰 TrxR1 的 C 端 Sec 残基, 经由 SecTRAPs 途径, TrxR1 由抗氧化转变为促氧化, 表现出强烈的 NADPH 氧化酶活力, 类似的亲电试剂还包括顺铂 (Cisplatin, cDDP)、DNCB、美法仑 (Melphalan)、姜黄素 (Curcumin) 等抗癌药物, 以及胡桃醌 (Juglone)、紫草素 (Shikonin)、兰雪醌 (Plumbagin)、甲萘醌等萘醌类化合物^[21]。在本研究中, 我们着重探讨了氧化态或还原态的 TrxR1 酶活是否会受甲萘醌抑制。加入 NADPH 可以预先还原 TrxR1, 使其 N 端二硫键及 C 端硒硫键打开, 变为自由硫醇或硒醇基团。结果显示, (图 6) 只有在 NADPH 存在的情况下, 甲萘醌才会呈现明显的抑制, 这表明这种自由的硒巯基或巯基更容易受到醌类化合物的芳基化修饰。

本研究我们探究了甲萘醌对 TrxR1 的抑制作用和修饰。经过 LC-MS 质谱检测寻找 TrxR 与抑制剂的加合物, 将是甲萘醌对 TrxR1 活性抑制、残基位点发生修饰的重要的直接证据^[22]。幸运的是, 在质谱检测结果 (图 7) 中发现, TrxR1 受到甲萘醌抑制, 产生一个分子甲萘醌的加合。由于硒代半胱氨酸具有高活性, 半胱氨酸在醌类底物还原中具有更高活力, 我们推测芳基化修饰的位点可能首先是 TrxR1 的 C 末端 Sec⁴⁹⁸。当使用

U498C 实验时, 498 位硒代半胱氨酸残基变为半胱氨酸残基 (Cys⁴⁹⁸), 我们推测甲萘醌在此位点饱和攻击之后, 会沿着 Cys⁴⁹⁷、Cys⁵⁹、Cys⁶⁴, 展开有限的亲电攻击 (残基修饰), 此推论有待进一步实验证实。

胡桃醌被认为可以修饰 4 个以上的 TrxR1 半胱氨酸。有趣的是, 本研究中甲萘醌修饰 TrxR1 的质谱结果, 与胡桃醌不完全一样, 这与两者不同化学结构导致反应速率差异密切相关。接下来, 我们需要进一步精准检测甲萘醌对 TrxR1 的修饰位点和数量关系。

综上, 本研究分析了甲萘醌与 TrxR1 的相互作用, 包括 TrxR1 还原甲萘醌方式、甲萘醌抑制 TrxR1 的机制, 同时我们通过 LC-MS 发现了甲萘醌芳基化修饰 TrxR1 生成 TrxR-Menadione (1 : 1) 加合物。本研究将为理解甲萘醌的细胞功能、揭示硒蛋白 TrxR1 的电子传递机制和靶向 TrxR1 抗癌药物研发提供有益参考。

REFERENCES

- [1] Arnér ESJ. Focus on mammalian thioredoxin reductases—important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2009, 1790: 495–526.
- [2] Zhong LW, Arnér ESJ, Holmgren A. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: The active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 5854–5859.
- [3] Cheng Q, Sandalova T, Lindqvist Y, et al. Crystal structure and catalysis of the selenoprotein thioredoxin reductase 1. *J Biol Chem*, 2009, 284: 3998–4008.
- [4] Lu J, Chew EH, Holmgren A. Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 12288–12293.
- [5] Lu J, Papp LV, Fang JG, et al. Inhibition of Mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: implications for myricetin and quercetin anticancer activity. *Cancer Res*, 2006, 66: 4410–4418.
- [6] Zheng XQ, Ma WW, Sun RX, et al. Butaselen prevents hepatocarcinogenesis and progression through inhibiting thioredoxin reductase activity. *Redox Biol*, 2018, 14: 237–249.
- [7] Smart DK, Ortiz KL, Mattson D, et al. Thioredoxin reductase as a potential molecular target for anticancer agents that induce oxidative stress. *Cancer Res*, 2004, 64: 6716–6724.
- [8] Cenas N, Nivinskas H, Anusevicius Z, et al. Interactions of quinones with thioredoxin reductase: a challenge to the antioxidant role of the mammalian selenoprotein. *J Biol Chem*, 2004, 279: 2583–2592.
- [9] Anestål K, Prast-Nielsen S, Cenas N, et al. Cell death by SecTRAPs: Thioredoxin reductase as a prooxidant killer of cells. *PLoS ONE*, 2008, e1846.
- [10] Xu JQ, Cheng Q, Arnér ESJ. Details in the catalytic mechanism of mammalian thioredoxin reductase 1 revealed using point mutations and juglone-coupled enzyme activities. *Free Radic Bio Med*, 2016, 94: 110–120.
- [11] Xu JQ, Arnér ESJ. Pyrroloquinoline quinone modulates the kinetic parameters of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 and is an inhibitor of glutathione reductase. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83: 815–820.
- [12] Mauzeroll J, Bard AJ, Owhadian O, et al. Menadione metabolism to thiodione in hepatoblastoma by scanning electrochemical microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 17582–17587.
- [13] Li J, Zuo X, Cheng P, et al. The production of reactive oxygen species enhanced with the reduction of menadione by active thioredoxin reductase. *Metallomics*, 2019, 11: 1490–1497.
- [14] Duan DZ, Zhang BX, Yao J, et al. Shikonin targets cytosolic thioredoxin reductase to induce ROS-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Free Radic Bio Med*, 2014, 70: 182–193.

-
- [15] Zhang JM, Peng SJ, Li XM, et al. Targeting thioredoxin reductase by plumbagin contributes to inducing apoptosis of HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys*, 2017, 619: 16–26.
- [16] Rengby O, Johansson L, Carlson LA, et al. Assessment of production conditions for efficient use of *Escherichia coli* in high-yield heterologous recombinant selenoprotein synthesis. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(9): 5159–5167.
- [17] Ren XY, Santhosh SM, Coppo L, et al. The combination of ascorbate and menadione causes cancer cell death by oxidative stress and replicative stress. *Free Radic Bio Med*, 2019, 134: 350–358.
- [18] Xu JQ, Eriksson SE, Cebula M, et al. The conserved Trp114 residue of thioredoxin reductase 1 has a redox sensor-like function triggering oligomerization and crosslinking upon oxidative stress related to cell death. *Cell Death and Dis*, 2015, 6(1): e1616.
- [19] Gencheva R, Cheng Q, Arnér ESJ. Efficient selenocysteine-dependent reduction of toxoflavin by mammalian thioredoxin reductase. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018, S0304-4165(18)30146-6.
- [20] Du YT, Zhang HH, Lu J, et al. Glutathione and glutaredoxin act as a backup of human thioredoxin reductase 1 to reduce thioredoxin 1 preventing cell death by aurothioglucose. *J Biol Chem*, 2012, 287: 38210–38219.
- [21] Zhang BX, Liu YX, Li XM, et al. Small molecules to target the selenoprotein thioredoxin reductase. *Chem Asian J*, 2018, 13: 3593–3600.
- [22] Gaikwad NW, Rogan EG, Cavalieri EL. Evidence from ESI-MS for NQO1-catalyzed reduction of estrogen ortho-quinones. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43: 1289–1298.

(本文责编 郝丽芳)