

狼瘡病人血漿及各種血液細胞 Glutathione 氧化  
還原能力及可能影響因子之研究

計劃編號：NSC89-2314-B-002-100

執行期限：1999.8.1—2000.7.31

主持人：余 家 利

執行機構及單位名稱：台大醫學院 分子醫學研究所

中華民國八十九年十月三十一日

## 一、中文摘要

Glutathione (GSH) 的氧化—還原反應 (redox) 是細胞對抗氧自由基毒性的防衛機制之一。本反應主要是包括 Glutathione 及其過氧化酶 (Glutathione peroxidase, GSH-Px) 及還原酶 (Glutathione reductase, GSSG-R), GSH-Px 會催化由 Glutathione 對  $H_2O_2$  及 lipid hydroperoxides 的還原作用。

在本研究中，我們首先測定了正常人的血漿，單核性細胞 (Mononuclear cells, MNC)，多形核中性球 (Polymorphonuclear neutrophils, PMN)，血小板以及紅血球內 GSH-Px 的含量。我們發現正常人血漿中約含  $49.56 \pm 6.67 \text{mU/ml}$ ，而各種血液細胞中以 MNC 的含量最高可達  $52.81 \pm 8.74 \text{mU}/1 \times 10^7 \text{cells/ml}$ ，而 PMN, platelet 及 RBC 的 GSH-Px 含量甚低，均  $\leq 10 \text{mU}/1 \times 10^7 \text{cells/ml}$ 。隨後，我們比較 10 位正常人及 10 位紅斑性狼瘡病人的 MNC 及 PMN 細胞內 GSH-Px 的活性，發現 SLE MNC 的活性 ( $40.32 \pm 7.45 \text{mU}/1 \times 10^7 \text{cells/ml}$ ) 遠比 Normal MNC ( $78.44 \pm 10.14 \text{mU}/1 \times 10^7 \text{cells/ml}$ ) 為低，但是 PMN 的 GSH-Px 活性則在兩組之間無明顯差異 ( $7.50 \pm 0.57$  vs.  $5.84 \pm 1.12 \text{mU}/1 \times 10^7 \text{cells/ml}$ )。以 anti-GSH-Px 抗體作 Western blot 測定時，發現正常 MNC 的 GSH-Px 為以 dimer 的形式 (M.W. = 50-52kDa) 而 PMN 的 GSH-Px 則為 monomer (25-26kDa) 的形式存在。在 SLE 的 MNC 及 PMN 的 GSH-Px 亦呈類似的結果。這些結果提供了吾人更多有關 SLE 病人 MNC 的生化學異常，但是這些異常與免疫反應異常之間的關聯性如何，仍須更進一步的探討。

關鍵詞：谷胱甘肽，谷胱甘肽過氧化酶，谷胱甘肽還原酶，全身性紅斑狼瘡，單核性細胞。

## 二、Abstract

The glutathione redox cycle is part of the defense mechanisms of the body against the toxicity induced by free radicals. The cycle comprises mainly glutathione, glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione reductase (GSSG-R). GSH-Px catalyses the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and lipid hydroperoxides by glutathione.

In this study, we measured the GSH-Px activity of the plasma, mononuclear cells (MNC), polymorphonuclear neutrophils (PMN), platelets and red blood cells of normal individuals in the first. We found normal plasma contain high enzymatic activity of GSH-Px ( $49.56 \pm 6.67$  mU/ml). In the different blood cell type, we noted MNC possessed highest GSH-Px activity ( $52.81 \pm 8.74$  mU/ $1 \times 10^7$  cells/ml) whereas minimal activity ( $\leq 10$  mU/ $1 \times 10^7$  cells/ml) was found in MNC, platelets and RBC. Furthermore, we compared GSH-Px activity of MNC in 10 normal and 10 patients with SLE. We noted GSH-Px activity in SLE MNC ( $40.32 \pm 7.45$  mU/ $1 \times 10^7$  cells/ml) was significantly lower than that of normal MNC ( $78.44 \pm 10.14$  mU/ $1 \times 10^7$  cells/ml). However, there is no difference of PMN GSH-Px activity of normal ( $7.50 \pm 0.57$  mU/ $1 \times 10^7$  cells/ml) and SLE-PMN ( $5.84 \pm 1.12$  mU/ $1 \times 10^7$  cells/ml). Interestingly, Western blot analysis of cell lysates probed by anti-GSH-Px revealed that GSH-Px in MNC was prominently in the form of dimer (50-52kDa) whereas PMN was prominently in monomer (25-26kDa) in normal individuals. Similar finding was also found in SLE cells. These results provided us more information of biochemical abnormalities in SLE MNC. But its correlation with abnormal immune functions needs further investigation.

Key words : Glutathione, Glutathione peroxidase, Glutathione reductase, Systemic lupus erythematosus, Mononuclear cells.

### 三、計劃緣由與目的

Glutathione (GSH)的氧化-還原反應(redox)是細胞對抗氧自由基(free oxygen radicals)毒性的防衛機構之一。本反應主要包括 glutathione 及其過氧化每(glutathione peroxidase, GSH-Px)和還原每(glutathione reductase, GSSG-R)。GSH-Px 會催化由 glutathione 對  $H_2O_2$  及 lipid hydroperoxides 的還原作用。此外，這個系統也聯結到與 NADPH-NADP 相關的 hexose monophosphate pathway (HMP)。本徑路對 glutathione reductase 的反應是相當重要的。因此，GSH-Px 至整個 glutathione redox cycle 的抗氧化活性實有依賴四個要素：(a) GSH-Px 的含量 (b) 細胞內 glutathione 的濃度(c) GSSG-R 的活性，以及(d)由 hexose monophosphate 徑路產生 NADPH 的量。

文獻報告在支氣管氣喘，類風濕關節炎，Batten's 病，冠狀動脈心臟病以及慢性腎衰竭病人的全血，某些血液細胞(紅血球或血小板)或是血漿中的 GSH-Px 活性降低，因而引發發炎性的病變。全身性紅斑狼瘡(Systemic lupus erythematosus, SLE)是一種全身性發炎性/自體免疫異常疾病的原型。在其各種血液細胞，包括單核性細胞，多形核中性球，紅血球及血小板等可以發現有相當廣泛的異常存在。而且在其血清中有各式各樣的自體免疫抗體，免疫複合物(immune complexes, ICs)及氧自由基的存在，這些異常可以引發發炎反應/自體免疫反應。因此，深入研究狼瘡病人血中的 glutathione redox 能力將是非常重要的。但是這種研究在文獻上仍未有任何報告。

在我們的初步結果中發現活動性 SLE 病人的單核性細胞(mononuclear cells, MNC)的 GSH-Px 活性比健常人低。但是整體血液及各個血液細胞的 glutathione redox capacity 究竟如何？實有繼續探討的必要。因此，本計劃的目標乃針對下面三個方向來進行：(A)全面評估全身性紅斑狼瘡病人全血，單核性細胞，中性白血球，血小板，紅血球以及血漿的抗氧化能力(與對照組比較)。(B)評估活動性狼瘡病人的血清對正常 MNC 及 PMN glutathione redox capacity 之影響。(c)評估各種形式的免疫複合物(precipitating IC, soluble IC, human aggregated IgG 及 antibody-coated sheep RBC 等)對正常人 MNC 及 PMN glutathione redox capacity 之影響。

相信經由這些研究可提供吾人更多有關狼瘡病人血液細胞的病態生理學以及可能的影響因子的知識，以進一步作為治療上的參考。

#### 四、結果與討論：

##### 結果：

- (1)我們測定了 6 位正常人血漿、單核性細胞、中性球、血小板及紅血球中 GSH-Px 的活性。發現血漿中有相當高的活性存在，而各種血液細胞中以 MNC 細胞質內的 GSH-Px 活性最高，但是 PMN, platelet 及 RBC 的活性很低，均低於  $10\text{mU}/1\times 10^7\text{cells/ml}$ ，這些結果詳見 Table 1.
- (2)依 Table 1 的發現，我們進一步比較 10 位正常人及 10 位紅斑狼瘡病人 MNC 及 PMN 的 GSH-Px 活性，發現 SLE MNC 的 GSH-Px 之活性 ( $40.32\pm 7.45\text{mU}/1\times 10^7\text{cells/ml}$ ) 遠比 Normal MNC 的活性 ( $78.44\pm 10.14\text{mU}/1\times 10^7\text{cells/ml}$ ) 為低。但是兩組 PMN 的活性則無差別 (Table 2)
- (3)以 Western blot 來檢測正常 MNC 及 PMN 的 GSH-Px 分子的存在時，發現 MNC 的 GSH-Px 以 dimer (分子量約為 50kDa) 的形式多於 monomer (25kDa)，而 PMN 的 GSH-Px 則與此相同 (Fig.1)
- (4)以 Western blot 來比較正常及 SLE 病人 MNC 及 PMN 的 GSH-Px 的存在，亦得到類似的結果 (Fig.2)。亦即 PMN 主要是以 monomer 而 MNC 主要是以 dimer 的 GSH-Px 存在。而其酵素活性則以 dimer 為最主要。
- (5)以 RT-PCR 法來檢測 Normal MNC 及 PMN 和 SLE MNC 及 PMN 的 GSH-Px mRNA 的存在時，其結果詳見 Fig.3

##### 討論：

文獻報告在支氣管氣喘、RA, Batten's 病、冠狀動脈心臟病以及慢性腎衰竭病人的全血及其血液細胞 (紅血球或血小板) 的 GSH-Px 活性會降低，因而引起發炎性的病變。而在本研究中，我們發現 SLE 病人的 MNC GSH-Px 的活性降低，因而易受氧化代謝物的傷害，這個

生化學的異常或許與其免疫反應的異常有關，但仍須作進一步的探討。

Table 1. Comparison of glutathione peroxidase activity (GSH-Px, mU/1x10<sup>7</sup>cells/ml) in normal human plasma, mononuclear cells (MNC), polymorphonuclear neutrophils (PMN), platelets and red blood cells (RBC)

N=6	Plasma	MNC	PMN	Platelets	RBC
GSH-Px activity	49.56±6.67	52.81±8.74	10.14±1.18	10.95±2.30	3.42±0.47

Table 2. Comparison of glutathione peroxidase activity (GSH-Px, mU/1x10<sup>7</sup> cells/ml) in mononuclear cells (MNC) and polymorphonuclear neutrophils (PMN) of normal individuals and patients with systemic lupus erythematosus (SLE)

N=10	Normal MNC	SLE MNC	Normal PMN	SLE PMN
GSH-Px	78.44±10.14	40.32±7.45	7.50±0.57	5.84±1.12
<i>p</i> value		<0.01*		NS*

\*Compared to normal cells, *p* value was calculated by Student's *t* test.



GSH-Px in Normal MNC and PMN

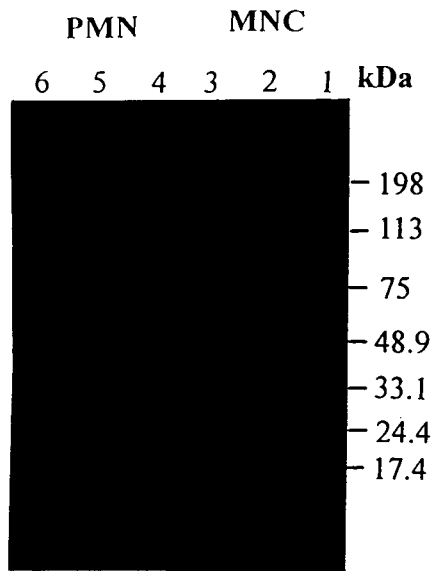


Fig. 1

GSH-Px in SLE MNC and PMN

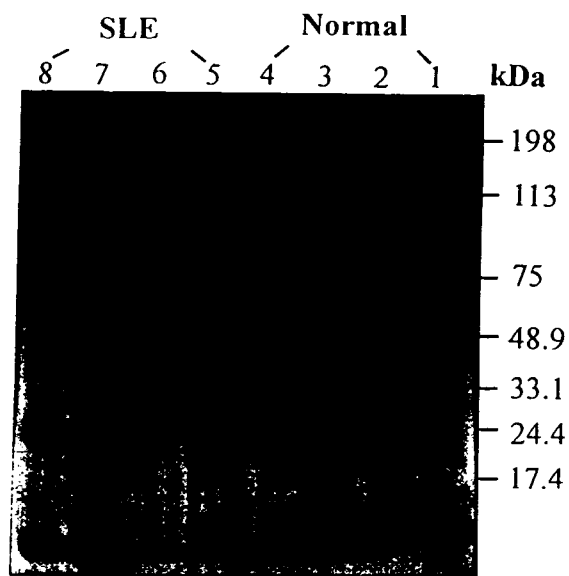


Fig. 2

GSH-Px mRNA in MNC and PMN

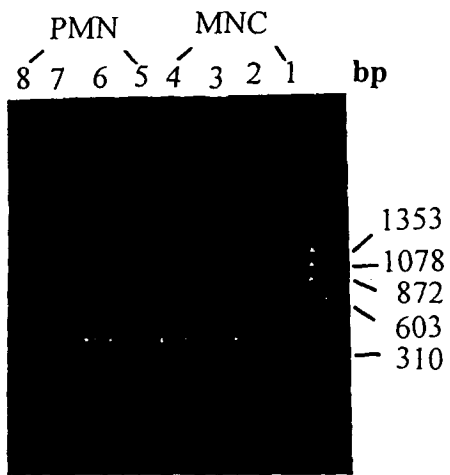


Fig. 3