

FITC 标记的 GSTP1 蛋白在鼠巨噬细胞中的定位

王 宇¹, 沈佳胤¹, 罗 兰², 殷志敏¹

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

(2 南京大学生命科学院, 江苏 南京 210093)

[摘要] GSTP1 (GST π) 是人体内含胱甘肽-S-转移酶 (GST) 的一种重要的活性亚型, 属于机体内源性蛋白, 不会引起免疫原反应, 在维持细胞的正常机能中发挥着重要作用, 也是一种具有临床应用价值的抗氧化剂. 本实验室在研究中首先发现 GSTP1 具有明显的抗炎作用, 由此我们设想可以通过增加外源性的 GSTP1 蛋白来提高其在机体内的水平, 以此增强机体的抗炎能力. 本实验将薄层色谱扫描和 SDS-PAGE 相结合用于 FITC 标记蛋白质的检测, 使用激光共聚焦显微镜和流式分析相结合的方法研究了外源 GSTP1 蛋白在 RAW 264.7 巨噬样细胞和鼠腹腔巨噬细胞中的跨膜转位, 结果显示外源 GSTP1 蛋白能够进入上述细胞. 该研究为 GSTP1 蛋白作为直接使用的药物在抗肿瘤、抗炎、抗氧化等领域的应用提供了实验基础.

[关键词] GSTP1 FITC, 薄层色谱扫描, 激光共聚焦, 流式分析

[中图分类号] Q78 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)02-0105-06

The Location of FITC-GSTP1 in the Murine Macrophages

Wang Yu¹, Shen Jiayin¹, Luo Lan², Yin Zhimin¹

(1 School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(2 School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract Human glutathione S-transferase P1 is a ubiquitous expressed protein which plays an important role in the detoxification and xenobiotics metabolism, and it is an endogenous protein. Our previous studies showed that GSTP1 prevented LPS-induced excessive production of pro-inflammatory factors and played an anti-inflammatory role in RAW 264.7 macrophage-like cells. In the present study we investigated whether exogenous GSTP1 protein can enter into RAW 264.7 macrophage-like cells and mouse peritoneal macrophages by confocal laser scanning microscopy and Flow Cytometry. The results demonstrated that GSTP1 protein can be transported across plasma membrane into RAW 264.7 cells and mouse peritoneal macrophages.

Key words GSTP1, FITC, Thin Layer Chromatography, confocal laser scanning microscopy, Flow Cytometry

感染性休克是临床上常见的危急病症, 其病理基础是全身性炎症反应综合征 (Systemic inflammatory response syndrome, SIRS). 近年来, 随着研究的深入, 多数学者认为 SIRS 发生可能与几组细胞的激活和多种炎症介质的失控性释放有关^[1-3]. 最近的临床资料表明, G⁻菌所致的全身炎症反应综合征的病死率高达 45% 左右, 其主要死亡原因是内毒素的作用. 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 又称内毒素 (endotoxin) 是革兰氏阴性菌 (G⁻) 外膜的一种糖脂复合物. 单核/巨噬细胞被 LPS 激活后, 释放大量促炎细胞因子, 这些炎症因子进一步作用于其它组织细胞, 加剧了炎症反应^[4,5].

谷胱甘肽-S-转移酶 (Glutathione S-Transferases, GSTs) 是一组同工酶超家族, 参与降解胞内异源物质. 根据亚细胞定位不同, GST 超家族主要分为 2 大类: 胞浆 GST、微粒体 GST^[6]. 根据氨基酸序列不同, 哺乳动物 GST 分为 7 类: A α (A), Mu (M), Omega (ω), Pi (π), Sigma (σ), Theta (θ) 和 Zeta (ζ)^[7,8]. GSTP1

收稿日期: 2007-09-06

基金项目: 国家自然科学基金 (30672473 和 30670825), 国家 973 (2002CB513004) 资助项目.

通讯联系人: 殷志敏, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生物化学及细胞生物学. E-mail: yinzhimin@njnu.edu.cn

(GST π)是人体内 GST 的一种重要的活性亚型,因其首先在人体胎盘中被克隆而得名^[9].它是由 2 个相对分子质量为 22 500 的多肽亚基以非共价键结合而成的一种同源二聚体蛋白,为 $55\text{ m}^{-10} \times 52\text{ m}^{-10} \times 45\text{ m}^{-10}$ 的球状分子^[10].

近年来许多研究表明 GST 除了发挥其酶活效应外,还通过其蛋白本身,以“配体结合 (ligand-binding)”的方式广泛参与调节激酶依赖的细胞增值、凋亡、分化信号通路^[11-14].本实验室在对 GSTP1 的研究中首先发现 GSTP1 在 RAW 264.7 巨噬样细胞中抑制细菌脂多糖 (LPS) 诱导的炎症反应, GSTP1 具有明显的抗炎作用^[15].然而,机体内虽然存在 GSTP1 这样的抗炎物质,但在正常生理条件下其含量不足以使其有效地抑制感染性休克等严重炎症反应的发展,补充细胞内的 GSTP1 成为减缓、治疗炎症的一种有效途径.由此我们设想能否通过增加外源性的 GSTP1 蛋白来提高细胞的抗炎能力?要实现这一设想,外源的 GSTP1 蛋白能否进入细胞成为首先要考虑的问题.本实验利用激光共聚焦、流式分析等手段从细胞水平探讨了 GSTP1 蛋白的胞质转位现象,为利用 GSTP1 便捷地治疗炎症性疾病等提供了基础.

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和质粒

含 pET-28a/hGSTP1(WT/Y7F/C4)的 *E. coli* BL21 大肠菌株由本实验室构建并冻存.

1.1.2 试剂

DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司; IPTG 购自 Merck 公司;异硫氰酸荧光素 (FITC) 购自 Pierce 公司; BSA 购自南京生兴生物技术有限公司;预染蛋白 Mark (P7708) 购自 BioLabs 公司;蛋白水解酶 K 购自南京吉泰生物科技有限公司;其余试剂均购自国内其它公司.

1.1.3 动物

清洁级 ICR 小鼠 (雌性, $20 \pm 2\text{ g}$) 购自南京医科大学实验动物中心.

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

鼠巨噬细胞 RAW 264.7 于含 10% 新生牛血清和抗生素 (100 U/mL 青霉素, 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素) 的 DMEM 培养基, 37°C 5% CO_2 中培养.

1.2.2 鼠腹腔巨噬细胞的分离与培养

ICR 小鼠提前 3 d 腹腔注射 8% 淀粉溶液.脱颈处死, Hanks 液灌洗采集腹腔巨噬细胞, 1 000 r/min 离心 10 min 将细胞悬浮于含 20% 新生牛血清的 DMEM 培养基, 接种于 10 cm 培养皿, 37°C 5% CO_2 中培养 2 h 吸去未贴壁细胞, 于 20% 新生牛血清的 DMEM 培养基中继续培养.

1.2.3 蛋白的表达及纯化

含表达载体 pET-28a/hGSTP1(WT/Y7F/C4)的 *E. coli* BL21 菌株的蛋白诱导表达按照本实验室已发表方法进行.最后经 0.05 mol/L 硼酸缓冲液透析, 考马斯亮蓝法测定蛋白浓度.

1.2.4 蛋白的标记

异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记纯化得到的蛋白 GSTP1 (WT) 和作为对照的牛血清白蛋白 (BSA) 依照 Pierce 公司使用说明进行.在充分透析除去游离的 FITC 后, 将 FITC 标注蛋白避光储存于 -20°C .

1.2.5 薄层色谱扫描仪鉴定标记蛋白

分别取 10 μL 的标记蛋白, 未标记蛋白和未结合蛋白的 FITC 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 然后通过薄层色谱扫描仪检测蛋白在 495 nm 处的荧光吸收以判定蛋白是否已被标记上 FITC.

1.2.6 标记蛋白在细胞内的定位

通过激光共聚焦显微镜 (Bio-Rad MRC-1024) 检测直接荧光来进行蛋白在鼠巨噬细胞内的定位. RAW 264.7 细胞/腹腔巨噬细胞培养于 10% 新生牛血清 DMEM 培养基中, 12 孔板, 37°C 5% CO_2 中培养 24 h 第 2 天, 更换无血清的 DMEM 培养基继续培养 1 h 以 1 $\mu\text{mol/L}$ 的终浓度加入 FITC-GSTP1(WT) 37°C 5% CO_2 中孵育 30 min 作为对照分别以 1 $\mu\text{mol/L}$ 的终浓度加入 FITC-BSA 或未结合蛋白的 FITC, 同样条件下进行孵育.孵育结束, DMEM 洗细胞 2 次, PBS (PH 7.4) 洗 1 次.无需固定即用激光共聚焦显微

镜进行观测.

1.2.7 基于流式细胞术的蛋白酶趋近性分析

此法目的是确定细胞所发荧光是由已进入细胞的蛋白所致. RAW 264.7细胞 /腹腔巨噬细胞培养在 10% 新生牛血清 DMEM 培养基中, 37℃ 5% CO₂ 中培养 24 h 第 2 天更换无血清 DMEM 培养 1 h 分别用 1 μmol/L 终浓度的 FITC-GSTP1 或未结合蛋白的 FITC, 37℃ 5% CO₂ 中孵育 30 min 接着再分别加入蛋白水解酶 K (终浓度 1 μmol/L), 37℃ 孵育 10 min 作为对照, 蛋白先用蛋白水解酶 K (终浓度 1 μmol/L), 37℃ 孵育 10 min 再加入细胞. 孵育结束, PBS (pH 7.4) 洗细胞 2 次, 流式细胞仪 (BD Biosciences) 检测.

2 结果

2.1 His-TaghGSTP1 蛋白表达及纯化

pET 蛋白表达系统是蛋白表达和研究的强有力的工具, 本实验室已成功应用 His-tag 重组蛋白纯化技术表达、纯化 hGSTP1 野生型 (WT) 及其突变体 Y7F (第 7 位 Tyr → Ala) 和 C4 (C14A /C47A /C101A /C169A)^[10]. 结果显示, 蛋白条带在 26 000 标准蛋白 Marker 上方, 与 hGSTP1 26 000 的相对分子质量吻合, 说明纯化得到的蛋白确是 His-TaghGSTP1.

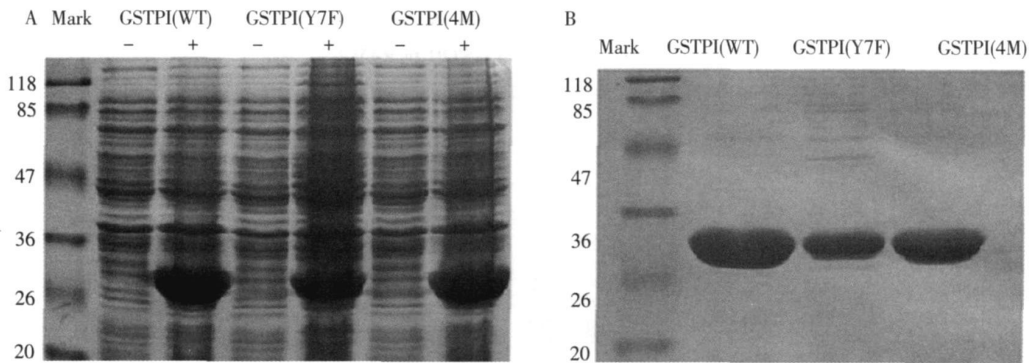


图 1 hGSTP1 诱导表达及纯化结果

Fig.1 Expression, purification of Hexahistidine-Tagged wild type human GSTP1(hGSTP1) and its mutants

A. hGSTP1 经 IPTG 诱导+在大肠杆菌 *E. coli* BL21 中的表达, SDS-PAGE 变性电泳后考马斯亮蓝染色;
B. hGSTP1 经 IPTG 诱导表达纯化后, SDS-PAGE 变性电泳后考马斯亮蓝染色

2.2 FITC 标记蛋白的检测

薄层色谱扫描仪是一种广泛使用的检测仪器, 本实验巧妙地运用该仪器原理, 结合 SDS-PAGE 电泳对 FITC 标记的蛋白进行检测. FITC 通过形成硫碳氨基键与蛋白结合, 不受 SDS 影响, 经 SDS-PAGE 后仍与蛋白牢固结合, 因此, 只有结合了 FITC 的蛋白才能在 495 nm 处检测到荧光吸收. 由于预染的标准蛋白 Mark 中含有显色基团, 所以在 495 nm 处也可以检测到荧光吸收. 而未被 FITC 标记的蛋白由于不带有显色基团, 故无法被检测到. 再通过与标准蛋白 Mark 吸收峰的位置比对即可得知目的蛋白是否已被 FITC 标记. 如图 2 所示, 在标准蛋白 Mark 85 000 47 000 间出现吸收峰, 而 FITC-BSA 经 SDS-PAGE 相对分子质量约为 66 000 这表明 BSA 已被 FITC 标记. 同理可知 GSTP1(WT) 已被 FITC 标记.

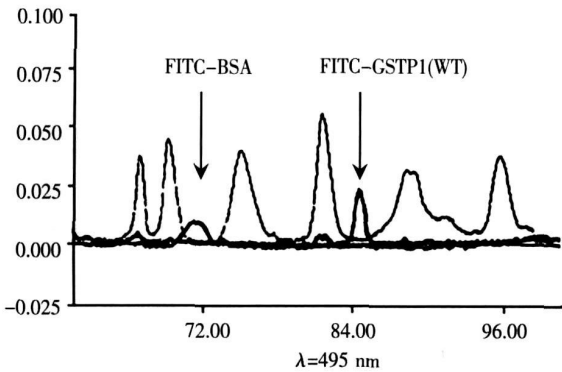


图 2 薄层色谱扫描仪检测 FITC 标记蛋白

Fig.2 Detection of labeled GSTP1 using Thin Layer Chromatography(TLC)

495 nm 处, 蛋白 Mark、FITC-GSTP1、FITC-BSA 吸收峰的重合图像

2.3 FITC-GSTP1 在鼠巨噬细胞中的跨膜转位

使用激光共聚焦显微镜, 我们直观地监测了 FITC-GSTP1 转位至鼠巨噬细胞 RAW 264.7 及鼠腹腔巨

噬细胞的情况^[16 17]. 因为激光共聚焦显微镜工作原理是采用逐层扫描, 而细胞是立体的, 经过“赤道”面的成像平面, 中间就会显示出“黑洞”即为细胞核; 而经过非“赤道”面的图像不会显示出“黑洞”^[18]. 如图所示, 细胞内可见明显的绿色荧光, 并且荧光主要集中于细胞内围. 这说明外源的 GSTP1 蛋白可以通过胞膜进入细胞并主要集中于胞浆. 使用同样的方法我们观察了 FITC 标记的 GSTP1 蛋白在分离的鼠腹腔巨噬细胞的跨膜转运, 结果显示 GSTP1 蛋白同样可以进入鼠腹腔巨噬细胞并集中于胞浆 (图 4).

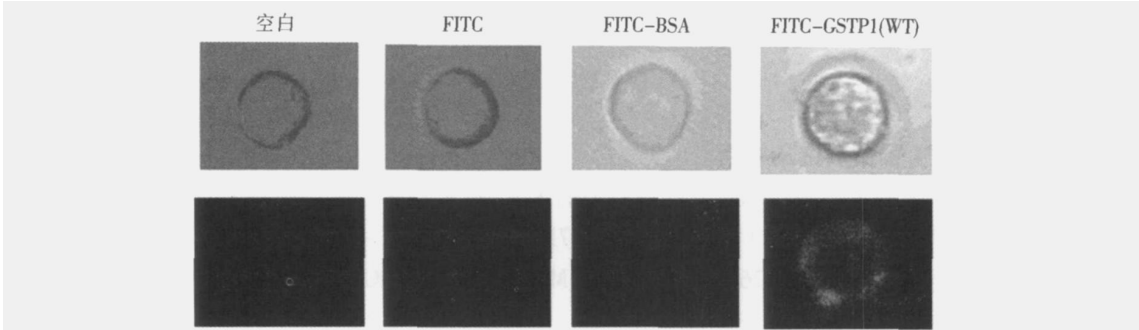


图 3 FITC 标记的蛋白在鼠巨噬细胞 RAW264.7 中的探测
Fig.3 Intracellular detection of GSTP1 in RAW264.7 cell
上排展示了光镜图像,下排是同一细胞的激光共聚焦扫描图

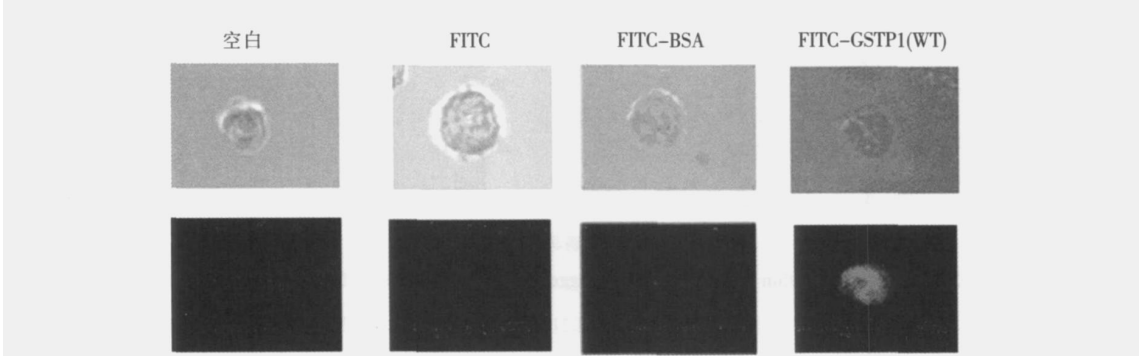
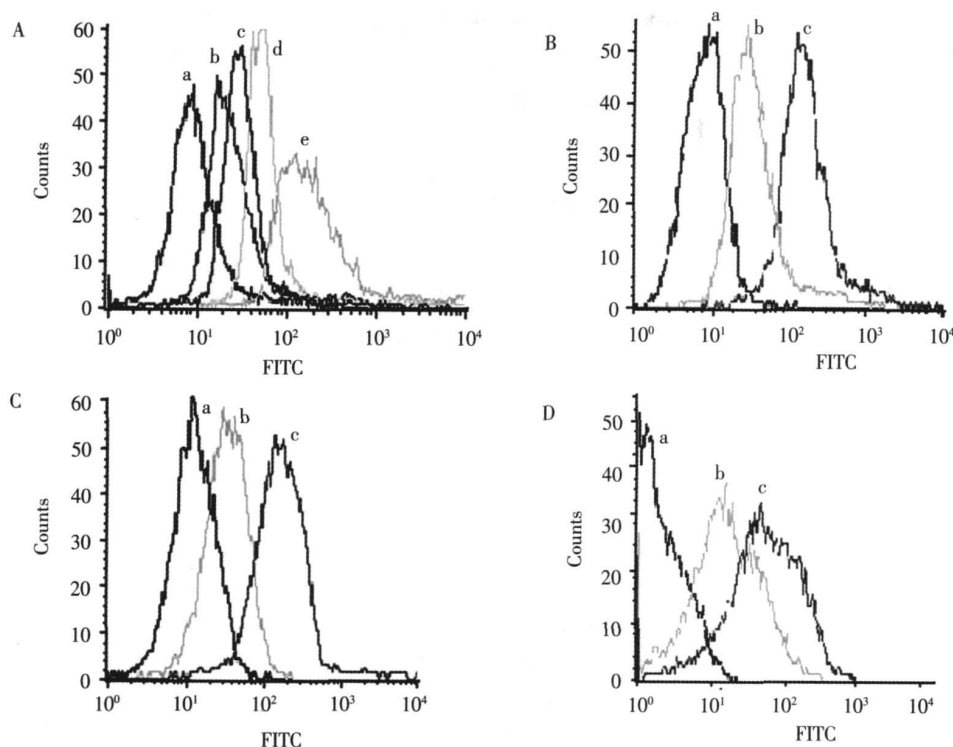


图 4 FITC 标记的蛋白在鼠腹腔巨噬细胞中的探测
Fig.4 Intracellular detection of GSTP1 in peritoneal macrophages
上排展示了光镜图像,下排是同一细胞的激光共聚焦扫描图

2. 4 FACS蛋白酶趋近性分析

因为蛋白在膜表面的非特异性结合, 共聚焦显微镜不足以提供蛋白在细胞内定位的确切证据, 因此, 我们使用了流式分析和蛋白酶趋近性分析相结合的办法来进一步研究 RAW 细胞中外源 GSTP1 蛋白的跨膜转位^[16 17]. 普遍使用的蛋白酶 – 蛋白酶 K (proteinase K), 可以水解掉未进入细胞的蛋白, 被用于区分已转位至胞内和不能入胞的蛋白. 如图 5 所示, 先经孵育再加蛋白酶 K 处理的 GSTP1 组, 其吸收峰较不经蛋白酶 K 处理的 GSTP1 组向左飘移, 说明大部分 GSTP1 蛋白已进入细胞, 而未进入细胞的 GSTP1 蛋白受到蛋白酶 K 的水解作用, 造成了荧光量的减弱; 而作为比较, 先经蛋白酶 K 处理再进行孵育的 GSTP1 组, 其吸收峰又向左飘移与 FITC 组吸收峰位置接近, 说明孵育前蛋白酶 K 已将大部分蛋白水解掉, 造成了荧光量的大幅减弱 (图 5A). 由此, 我们通过激光共聚焦显微镜观察结合 FACS 蛋白酶趋近性分析, 证明了外源的 GSTP1(WT) 蛋白可以进入 RAW 细胞 (图 5B). 随后, 我们检测了 GSTP1(WT) 蛋白在 HEK293 细胞 (图 5C), 分离的鼠腹腔巨噬细胞 (图 5D) 的跨膜转运, 结果显示有明显的荧光吸收峰, 说明 GSTP1(WT) 蛋白同样可以进入这些细胞.



A. 用 $1\ \mu\text{mol/L}$ FITC 标记 GSTP1 蛋白孵育 RAW264.7 细胞, 37°C $5\%\ \text{CO}_2$ 中, 不进行蛋白酶 K 处理(e), 或接着用 $1\ \mu\text{mol/L}$ 蛋白酶 K 37°C 处理 10 min(d), 或者, 先用蛋白水解酶 K ($1\ \mu\text{mol/L}$) 37°C 预处理 FITC 标记蛋白 10 min, 再 37°C $5\%\ \text{CO}_2$ 中孵育细胞 30 min(c). 对照组细胞不加入蛋白(a)或以未结合的 FITC 孵育(b); B. 用 $1\ \mu\text{mol/L}$ FITC 标记 GSTP1 蛋白孵育 RAW264.7 细胞, 37°C $5\%\ \text{CO}_2$ 中, 接着用 $1\ \mu\text{mol/L}$ 蛋白酶 K 37°C 处理 10 min. 空白组:a; FITC 组:b; GSTP1(WT):c; C. 用 $1\ \mu\text{mol/L}$ FITC 标记 GSTP1 蛋白孵育 HEK293 细胞, 37°C $5\%\ \text{CO}_2$ 中, 接着用 $1\ \mu\text{mol/L}$ 蛋白酶 K 37°C 处理 10 min. 空白组:a; FITC 组:b; GSTP1(WT):c; D. 用 $1\ \mu\text{mol/L}$ FITC 标记 GSTP1 蛋白孵育鼠腹腔巨噬细胞, 37°C $5\%\ \text{CO}_2$ 中, 接着用 $1\ \mu\text{mol/L}$ 蛋白酶 K 37°C 处理 10 min. 空白组:a; FITC 组:b; GSTP1(WT):c. 每组数据代表 3 组独立实验.

图 5 FACS 蛋白酶趋近性分析

Fig.5 FACS analysis of cells

3 讨论

单核/巨噬细胞在全身组织分布广泛, 它是机体先天免疫的重要执行者, 是所谓的专职性组织吞噬细胞, 具有迁移性, 能以吞噬、吞饮和受体介导的方式将抗原性颗粒或液体摄入胞内^[19]. 受体介导的内吞作用是真核细胞获取多肽类激素, 生长因子, 细胞因子, 血浆糖蛋白, 毒素及病毒等的主要机制. 而受体介导药物靶标进入细胞发挥作用被认为是一种药物转运系统^[20]. 生物体中有很多细胞具备吞噬外源物质的功能, 例如巨噬细胞, 树突状细胞, 肝实质细胞, 内皮细胞等^[19].

Hastings 等人报道, 巨噬细胞内白蛋白的聚集与其胞饮作用和细胞的内吞作用有关^[21]. Ehrenreich 等人发现在体外, 鼠腹腔巨噬细胞可以吸收培养介质中 ^{125}I 或 ^{131}I 标记的人血清白蛋白^[22]. Catherine Lombry 等人研究发现, FITC 标记的人或鼠血清白蛋白(相对分子质量为 65 000 的亲水性分子)在滴灌 30 min 后即可被巨噬细胞吞入^[23]. 而在我们的实验中未看到 BSA 组有明显的绿色荧光, 原因可能是我们采用的是牛血清白蛋白, 种属差异造成了不同的现象. 在我们的研究中分别研究了 GSTP1(WT)蛋白在鼠巨噬细胞 RAW 264.7 及分离的鼠腹腔巨噬细胞的胞质转移情况, 发现在 30 min 时均可观察到明显的绿色荧光(激光共聚焦分析)和吸收峰(流式细胞分析), 这说明 GSTP1(WT)蛋白已经进入胞内. 有报道, GSTP1 不仅作为胞内酶在细胞中发挥作用, 还存在于细胞外^[24-25], 这表明它可以进行跨膜转运. 据已有的研究报道, 目前尚未发现细胞表面存在 GSTP1 蛋白的受体, 可是根据我们实验所观察到的现象, RAW 264.7 细胞及鼠腹腔巨噬细胞均可以吞入外源的 GSTP1(WT)蛋白, GSTP1 蛋白究竟是如何进入巨噬细胞, 这提出了一个值得思考的问题. Daewoong Jo 等人利用来源于纤维原生长因子 4 的亲水信号序列的 12 个氨基酸组成膜转位序列构建了 SOCS3 蛋白, 发现其可进入巨噬细胞及肝、肺、肾等组织器官, 发挥抗炎作用^[17]. 而 GSTP1 蛋白的 N 末端含有与此膜转位序列相似的亲水序列. 我们猜想这可能是 GSTP1 蛋白可进入巨噬细

胞及 HEK293 细胞的原因所在,但 GSTP1 蛋白进入巨噬细胞的确切机理还有待进一步研究.通过添加外源性的蛋白以补偿此种内源蛋白的降低,而达到细胞内的蛋白治疗的目的,较之以基因疗法更为便捷,这为治疗全身及局部的炎症反应提供了一个全新的思路,本文的研究为此奠定了基础.

[参考文献]

- [1] Hawiger J. Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm[J]. Immunol Res 2001, 23(2): 99-109
- [2] 陈敏英. 全身炎症反应综合征及治疗进展[J]. 中国实用外科杂志, 2002 22(12): 766-768
- [3] Cunneen j Cartwright M. The puzzle of sepsis: fitting the pieces of the inflammatory response with treatment[J]. AACN Clin Issues 2004, 15(1): 18-44
- [4] 张顺财. 内毒素基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [5] 姜勇等. LPS 介导细胞激活的信号转导: 从 CD14 到 p38MAPK 通路的研究[J]. 生理科学进展, 1999, 30(1): 29-34
- [6] Danyelle M Townsend I, Kenneth D Tew. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance[J]. Oncogene 2003, 22(20): 7369-7375
- [7] Pickett C B, Lu A Y. Glutathione S- transferase gene structure, regulation, and biological function[J]. Annu Rev Biochem, 1989, 58: 743-764
- [8] Oakley A J, Lo Belb M, Nuccetelli M, et al. The lig 2 and in (non2 substrate) binding site of human pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H2 site) [J]. J Mol Biol 1999, 291(4): 913-926
- [9] Reinemer P, Dirr H W, Ladenstein R, et al. Three dimensional structure of class pi glutathione S2 transferase from human placenta in complex with S2 hexyl 2 glutathione at 2.8 Å resolution[J]. J Mol Biol 1992, 227(4): 214-226
- [10] Wu Y, Shen J, Yin Z. Expression, Purification and functional analysis of Hexahistidine-Tagged Human Glutathione S- Transferase P1- 1 and Its Cysteine1 Mutants[J]. The Protein Journal 2007, 26(6): 359-370
- [11] Adler V, Yin Z, Fuchs S, et al. Regulation of JNK signaling by GSTp[J]. EMBO J 1999, 18(5): 1321-1334
- [12] David L Eaton, Theo K Bammler. Concise review of the glutathione S-Transferases and their Significance to Toxicology[J]. Toxicology Sciences 1999, 49(2): 156-164
- [13] Richard C, Strange Monica A, Spiteri, et al. Glutathione-S-transferase family of enzymes[J]. Mutation Research, 2001, 482(1): 21-26
- [14] Wu Y, Fan Y, Xue B, et al. Human Glutathione S-transferase P1- 1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2- ASK1 signals[J]. Oncogene 2006, 25(42): 1-14
- [15] Xue B, Wu Y, Yin Z, et al. Regulation of lipopolysaccharide-induced inflammatory response by glutathione S- transferase P1 in RAW 264.7 cells[J]. FEBS Lett 2005, 579(19): 4081-4087.
- [16] Ruth Ann Veach, Danya Liu, Shan Yao, et al. Receptor/transporter-independent targeting of functional peptides across the plasma membrane[J]. J Biol Chem 2004, 279(12): 11425-11431.
- [17] Daewoong Jo I, Danya Liu I. Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis[J]. Nature medicine 2005, 11(8): 892-898
- [18] Paddock S W. Principle and practices of laser scanning confocal microscopy[J]. Mol Biotechnol 2000, 16(2): 127-149
- [19] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [20] Hitoshi Sate, Yuichi Sugiyama. Importance of receptor-mediated endocytosis in peptide delivery and targeting: kinetic aspects[J]. Advanced Drug Delivery Reviews 1996, 19(3): 445-467.
- [21] Hastings R H, Folkesson H G, Petersen V, et al. Cellular uptake of albumin from lungs of anesthetized rabbits[J]. Am J Physiol 1995, 269(11): 453-462
- [22] Ehrenreich B A, Cohn Z A. The uptake and digestion of iodinated human serum albumin by macrophages in vitro[J]. J Exp Med 1967, 126(23): 941-958
- [23] Catherine Lombry, Cynthia Bosquillon. Confocal imaging of rat lungs following intratracheal delivery of dry powders or solutions of fluorescent probes[J]. Journal of Controlled Release 2002, 83(3): 331-341
- [24] Rajnakers M T, Roelofs H M, Steegers E A, et al. Glutathione and glutathione S-transferases A1- 1 and P1- 1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa[J]. Fertil Steril 2003, 79(1): 169-172
- [25] Nijhoff W A, Mulder T P, et al. Effects of consumption of brussels sprouts on plasma and urinary glutathione S- transferase class- alpha and - pi in humans[J]. Carcinogenesis 1995, 16(4): 955-957.

[责任编辑: 孙德泉]