

甘糖酯对大鼠肝脏 CuZn SOD mRNA 表达和酶活的诱导作用

胡晓珂, 于文功*, 路新枝, 韩 峰, 宫倩红, 高 焱, 管华诗

(青岛海洋大学药物与食品研究所, 山东 青岛 266003)

摘要: 目的 探讨甘糖酯对大鼠肝脏 CuZn SOD 的诱导作用。方法 RT-PCR 法检测甘糖酯 *po* 后的 Wistar 大鼠肝脏中 CuZn SOD mRNA 的表达情况;亚硝酸盐法测定肝组织中 CuZn SOD 酶活。结果 *po* 甘糖酯后,高剂量组大鼠肝组织的 SOD mRNA 水平与对照组相比有显著的差异($P < 0.01$);高剂量组大鼠肝组织 CuZn SOD 活力与对照组相比有非常显著的差异($P < 0.001$),而中剂量组和低剂量组 CuZn SOD 活力与对照组相比有显著的差异($P < 0.01$)。结论 甘糖酯能够诱导大鼠肝组织中 CuZn SOD mRNA 的表达,并提高其酶活,而且其作用随剂量的增加而提高。

关键词: 甘糖酯;超氧化物歧化酶;反转录聚合酶链式反应

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2002)01 - 0023 - 04

甘糖酯(propylene glycol mannate sulfate, PGMS)是由青岛海洋大学海洋药物与食品研究所在藻酸双酯钠(PSS)的基础上研制而成的一种新型低分子量酸性多糖类药物,属线性阴离子多糖。药理实验表明,PGMS 有调血脂^[1]、抗凝血、抗血栓^[2]和保护血管内皮细胞免受多种化学物质损伤的作用^[3]。而且,PGMS 对急性脑梗死有较好的疗效^[4]。外周血管内皮细胞培养的资料表明,甘糖酯能保护多聚阳离子和氧自由基致人脐静脉内皮细胞(HUVECS)的损伤^[5]。另外,动物实验表明,PGMS 还对家兔全脑缺血再灌注损伤有保护作用以及能够抑制培养的牛脑微血管平滑肌细胞的增殖^[6,7]。PGMS 可增强小鼠特异性和非特异性免疫功能^[8]。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是一种含铜、锌、锰等金属的酶。现在人们根据所含金属的不同将 SOD 分为 3 种:即 CuZn SOD, Fe-SOD 和 Mn-SOD。但哺乳动物体内,仅含有 CuZn SOD 和 Mn-SOD。由于 SOD 是超氧阴离子自由基的专一清除剂,故其在维持生物体内阴离子自由基产生与消除的动态平衡中起重要作用。由于在哺乳动物中 CuZn SOD 的稳定性远高于 Mn-SOD,因此众多学者重视 CuZn SOD 在临床应用上的可能性。SOD 可以清除体内的氧自由基,减少血管内皮损伤,因此推测,SOD 可减少氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)的形

成,从而可减少动脉粥样斑块的形成。本文通过研究甘糖酯对正常大鼠肝脏 SOD 酶的诱导作用,为进一步探讨甘糖酯抗动脉粥样硬化的分子机制提供理论依据。

材 料 与 方 法

实验动物 体重(200±20)g, ♂ Wistar 大鼠,购自青岛药品检验所。

药物 甘糖酯,白色粉末,由青岛海洋大学海洋药物与食品研究所提供。

主要试剂 异硫氰酸胍(Amresco 分装)、 β -巯基乙醇(2-ME, SIGMA)、N-十二烷基肌氨酸钠(SIGMA)、焦碳酸二乙酯(SERVA)、PCR 反应试剂盒(大连宝生物技术公司)、SOD 酶测试剂盒(南京建成公司)及各种常用无机盐试剂。

主要仪器 9600PCR 扩增仪(PE 公司)、DY89-1 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝科器研究所)、JOUAN 冷冻高速离心机(法国 Jouan 公司)、Beckman DU-640 核酸和蛋白分析仪(美国 Beckman 公司)、751 分光光度计(上海分析仪器总厂)。

引物设计与合成 本实验根据大鼠 CuZn SOD 的 mRNA 全序列^[9]设计引物如下:上游引物:5'-ATGAAGCCGTGTGCGTG 3' (18 bp),下游引物:5'-ATGATCTGAGACTCAGACC 3' (20 bp); β 肌动蛋白(β -actin)用作 RT-PCR 的内参照物,根据 GeneBank 中的 cDNA 序列设计了大鼠 β -actin 上下游引物^[10]:上游引物:5'-AATTCACACCCACCGAGACCG 3' (21 bp),下游引物:5'-AACAAAGCAGAAGTAGCCATGAGGG 3' (25 bp)。

收稿日期: 2001-04-16.

作者简介: 胡晓珂(1977-),女,硕士研究生;

于文功(1962-),男,教授,博士生导师。

* 通讯作者 Tel: (0532)2032067, Fax: (0532)2033054,

E-mail: yuwengong@public.qd.sd.cn

样品的处理 将大鼠随机分为 1 个对照组和 3 个剂量组(每组 6 只),除对照组 *po* 生理盐水外,其余 3 个剂量组均 *po* 甘露糖。药物剂量的换算按照人和动物体表面积折算的等效计量比值表计算,即低剂量组为 $18.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;中剂量组为 $37.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;高剂量组为 $75.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。大鼠每天 *po* 一次,共 10 d。

断头处死大鼠,取肝脏,一部分立即加入变性液^[11]匀浆,终浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 并以 0.5 mL 的体积分装于微量离心管中;另一部分于冰浴中加入 pH 7.8 的磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液匀浆,终浓度为 10%,用于测定 CuZn-SOD 酶活。

总 RNA 的提取及鉴定 参照文献^[12],在已用变性液处理过的组织匀浆液 0.5 mL 中加入 0.05 mL 的 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 4.0 的乙酸钠缓冲液中,混匀;加入水饱和酚 0.5 mL,混匀;再加入 0.1 mL 的氯仿-异戊醇(49:1),混匀后于 4℃ 放置 20 min;4℃ 下 $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,将上层水相移入另一个微量离心管中,加入等体积异丙醇, -20℃ 下放置 60 min;4℃ 下 $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min。将沉淀溶解于 0.3 mL 变性液中,加 0.3 mL 异丙醇, -20℃ 下放置 30 min;4℃ 下 $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。加 75%乙醇 1 mL 于 RNA 沉淀中,在 4℃ 下 $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。真空干燥 RNA 5~10 min,溶解于适量 DEPE 处理过的水中。用 Beckman DU640 核酸和蛋白分析仪检测 RNA 的浓度,调整 RNA 浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,取样 1 μL ,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 mRNA 的质量。

反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法扩增 CuZn-SOD 的 mRNA 按照 cDNA 合成试剂盒推荐的方法合成 CuZn-SOD 的 cDNA,以此 cDNA 为模板进行 PCR 反应,按如下参数进行循环 30 次,94℃ 变性 1 min,60℃ 退火 0.5 min,70℃ 延伸 1.5 min,最后一个循环 72℃ 延伸 7 min。PCR 反应产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检查。用柯达凝胶成像分析系统对照片进行光密度扫描定量。

SOD 酶活性的测定 采用亚硝酸盐法^[13]按照试剂盒中所规定的步骤测定组织中 CuZn-SOD 酶活性。

实验结果

1 总 RNA 纯度的鉴定结果及 RNA 电泳图

4 组样品 A_{260}/A_{280} 值均在 1.9~2.1 之间,说明

RNA 纯度高。图 1 电泳可清晰见到 18S 和 28S 两条核糖体 RNA 条带,说明我们所抽提的肝组织中的总 RNA 无降解,可作为样品使用。

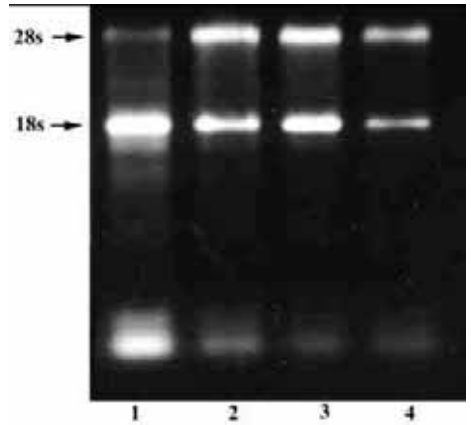


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA in rat liver. Wistar rats were given PGMS by *po* at different doses (0, 18.9, 37.8 and $75.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$) for ten days. The total RNA was extracted from the rat liver. The samples were loaded on a 1% agarose gel. Lane 1: Control group ($0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$); Lane 2: Low dosage group ($18.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$); Lane 3: Middle-dosage group ($37.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$); Lane 4: High dosage group ($75.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$)

2 RT-PCR 产物鉴定

由图 2 所示 CuZn-SOD 和 β -actin mRNA 的 RT-PCR 扩增产物电泳结果,各实验组与对照组均在 492 bp 及 543 bp 处出现特异性扩增条带。光密度扫描定量分析,CuZn-SOD 和 β -actin mRNA 的比值结果见表 1。实验结果表明:PGMS 可诱导大鼠肝脏 CuZn-SOD mRNA 表达。

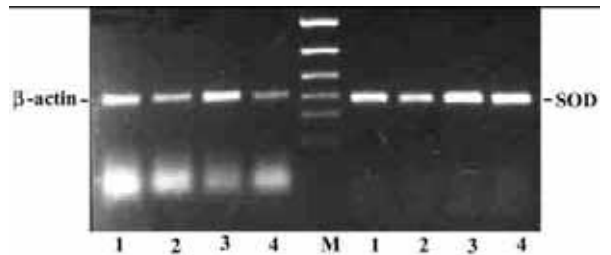


Figure 2 The induction of propylene glycol mannate sulfate (PGMS) on CuZn-SOD mRNA expression in Wistar rat liver. CuZn-SOD and β -actin levels were detected with RT-PCR. The samples were loaded on a 1.5% agarose gel. Lane 1: Control group ($0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$); Lane 2: Low dosage group ($18.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$); Lane 3: Middle-dosage group ($37.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$); Lane 4: High dosage group ($75.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$); Lane M: Molecular weight marker (from top to bottom: 2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp)

Table 1 Effects of PGMS on CuZnSOD mRNA levels of Wistar rat liver

Group	PGMS dose/mg·kg ⁻¹	SOD/actin mRNA level
1	0.0	0.96 ± 0.06
2	18.9	1.10 ± 0.09
3	37.8	1.14 ± 0.06
4	75.6	1.94 ± 0.08 ^{**}

After the agarose gel electrophoresis of the productions of the RT-PCR, the consequential photo was scanned by the Kodak electrophoretic gel image system DC 290. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Δ group 1

3 CuZnSOD酶活力的测定结果

由表2可见高剂量组大鼠肝组织CuZnSOD活力与对照组相比有非常显著的差异($P < 0.001$),而中剂量组和低剂量组CuZnSOD活力与对照组相比有显著的差异($P < 0.01$)。说明甘糖酯确实能够提高大鼠肝组织中CuZnSOD酶活,而且其作用随剂量的增加而提高。

Table 2 Effects of PGMS on the CuZnSOD activities of the liver of Wistar rats

Group	PGMS dose/mg·kg ⁻¹	CuZnSOD activity/U·mL ⁻¹
1	0.0	1115 ± 93
2	18.9	1344 ± 45 ^{**}
3	37.8	1425 ± 41 ^{**}
4	75.6	1549 ± 57 ^{***}

PGMS was given by *po* at the dose of 0, 18.9, 37.8, 75.6 mg·kg⁻¹·d. Ten days later, the rats were killed for the estimation of CuZnSOD activity and the extraction of total RNA in rat liver. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ Δ group 1

讨 论

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是指动脉某些部位的内膜下有脂质沉积,同时有平滑肌细胞和纤维基质成分的增殖,逐步发展形成动脉粥样硬化斑块。斑块部位的动脉壁增厚、变硬,斑块内部组织坏死与沉积的脂质结合,形成粥样物质。80年代末,Steinberg等^[14]提出了氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)引起动脉脂质条纹导致AS的学说,并且此学说已得到广泛的重视和承认。自由基的大量存在一方面可损伤内皮,为动脉粥样硬化的形成提供了基础;另一方面,自由基可使LDL生成Ox-LDL,促进动脉脂质条纹的形成,进一步形成AS。而SOD的作用底物是超氧阴离子(superoxide anion radical, O₂⁻),它能够清除体内的氧自由基,使氧自由基处于

动态平衡,因而可以预防氧自由基过多对机体造成的损害和疾病。

目前,对甘糖酯的药理作用虽已有广泛研究,但甘糖酯对CuZnSOD的诱导作用尚未见文献报道。我们利用RT-PCR法检测大鼠喂药后体内CuZnSOD mRNA的变化情况及对大鼠肝脏中CuZnSOD酶活性的测定,来揭示甘糖酯和大鼠超氧化物歧化酶之间的关系,发现在一定的剂量范围内甘糖酯可诱导CuZnSOD mRNA的表达,并提高CuZnSOD酶活性。根据本实验结果可以推测,甘糖酯通过诱导CuZnSOD酶的活性,清除体内氧自由基,阻滞LDL转变成Ox-LDL,降低Ox-LDL的水平,以防止动脉脂质条纹的出现,但这种推测还有待进一步的实验证实。

REFERENCES:

- [1] Chen XM, Yuan W. Prevention of experimental atherosclerosis with propylene glycol mannate sulfate in quails. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志) [J], 1992, 23(8):375.
- [2] Jiang GH, Yuan W, Zhang SL, *et al.* The study of antithrombotic effect and mechanism of propylene glycol mannate sulfate. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志) [J], 1994, 49(1):6-13.
- [3] Zhang AJ, Zhou XB, Zhang LH, *et al.* Protective effects of propylene glycol mannate sulfate on experimental endothelial cell injury. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报) [J], 1995, 11(4):323-325.
- [4] Han ZY, Wang WB, Zhu RH, *et al.* Clinical and laboratory observation of acute cerebral infarction treated with Propylene Glycol Mannate Sulfate. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志) [J], 1994, 52(4):29-33.
- [5] Hu MW, Zhou XB, Zhang LH, *et al.* Protective effect of polysaccharides sulfate on human umbilical vein endothelial cell. *Acta Pharm Sin* (药理学学报) [J], 1995, 30(9):641-645.
- [6] Zhang XM, Wei XB, Sun XH, *et al.* Protective effects of propylene glycol mannate sulfate on the whole cerebral ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志) [J], 1998, 68(4):15-17.
- [7] Zhang XM, Sun XH, Wei XB, *et al.* Effects of propylene glycol mannate sulfate on the proliferation of bovine cerebral microvessel smooth muscle cells in culture. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志) [J], 1998, 66(2):1-5.
- [8] Li YQ, Sheng SH, Hou Q, *et al.* The effects of PGMS on immunological function in mice. *Chin J Mar Drug* (中国海洋药物杂志) [J], 1995, 55(3):14-16.
- [9] Hass MA, Iqbal J, Clerch LB, *et al.* Rat lung Cu, Zn superoxide dismutase: Isolation and sequence of a full-length cDNA and studies of enzyme induction. *J Clin Invest* [J], 1989, 83(5):1241-1246.
- [10] Noonan KE. Quantitative analysis of MDRI (multidrug

- resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* [J], 1990, **343**(1) : 85 - 88 .
- [11] Frederick MA, Brent R, Robert EK, *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology* [M]. New York: John Wiley Sons, Inc, 1995 .714 - 715 .
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 .345 - 349 .
- [13] Oyangui Y. Reevaluation assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem* [J], 1984, **142**(2) :290 - 293 .
- [14] Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, *et al.* Beyond cholesterol, modifications of LDL that increase its atherogenicity. *New Engl J Med* [J], 1989, **302**(4) :915 - 924 .

INDUCTION OF CuZn SOD mRNA EXPRESSION AND ACTIVITY BY PGMS IN RAT LIVER

HU Xiao ke , YU Wen gong , LU Xin zhi , HAN Feng , GONG Qian hong , GAO Yan , GUAN Hua shi

(*Institute of Marine Drug and Food , Ocean University of Qingdao , Qingdao 266003 , China*)

ABSTRACT: **AIM** To study the effect of propylene glycol mannate sulfate (PGMS) on induction of CuZn SOD. **METHODS** Wistar rats were given PGMS *po* at different doses (0 , 18.9 , 37.8 and 75.6 mg•kg⁻¹•d) for ten days . Then the rats were sacrificed and the total RNA was extracted from the livers . The total RNA samples were loaded on a 1 % agarose gel to detect the quality of total RNA. RT-PCR was applied to study the expression of CuZn SOD mRNA in rat livers . The amplified products were detected by the 1.5 % agarose gel electrophoresis . Simultaneously, the CuZn SOD activities in rat liver were determined by nitrite method. **RESULTS** The total RNA extracted from rat livers was integrated without being decomposed by RNase . The level of CuZn SOD mRNA of the high dosage group (75.6 mg•kg⁻¹•d) was higher than that of the control group (0 mg•kg⁻¹•d) (*P* < 0.01) ; the CuZn SOD activities of the high dosage group were significantly higher than those of the control group (*P* < 0.001) and the CuZn SOD activities of the middle- (37.8 mg•kg⁻¹•d) and low dosage groups (18.9 mg•kg⁻¹•d) were higher than those of the control group (*P* < 0.01) . **CONCLUSION** PGMS can increase the CuZn SOD activities as well as CuZn SOD on mRNA level . Therefore , it is possible for PGMS to counteract Atherosclerosis (AS) by inducing the expression of CuZn SOD.

KEY WORDS: propylene glycol mannate sulfate (PGMS) ; CuZn SOD ; RT-PCR