

# 转 hCu, Zn-SOD 突变基因聚球藻 抗氧化作用的研究<sup>△\*</sup>

刘仁海, 高淑彬, 章军, 徐虹, 周克夫  
(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 目的 研究转人铜锌超氧化物歧化酶(hCu, Zn-SOD)突变基因聚球藻口服后的生物活性。方法 给小鼠灌服转 hCu, Zn-SOD 突变基因聚球藻 20d, 然后测定小鼠谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活力以及丙二醛(MDA)含量。结果 转 hCu, Zn-SOD 突变基因聚球藻可明显提高小鼠血清 GSH-Px 活力和全血血红蛋白 CAT 活性, 显著提高小鼠血清和肝脏中 Cu, Zn-SOD 和总 SOD(T-SOD)的活力, 显著降低小鼠血清和肝脏的 MDA 含量。结论 转 hCu, Zn-SOD 突变基因聚球藻有较强的抗氧化作用。

**关键词:** 转 hCu, Zn-SOD 突变基因聚球藻; 抗氧化; 谷胱甘肽过氧化物酶; 过氧化氢酶; 超氧化物歧化酶; 丙二醛  
**中图分类号:** R931.711, R915.3, R965 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-3461(2007)06-0010-03

## Effect of *Synechococcus* sp. PCC7942 with trans-mutated hCu, Zn-SOD-gene on antioxidation activities in mice

LIU Ren-hai<sup>\*</sup>, GAO Shu-bin, ZHANG Jun, XU Hong, ZHOU Ke-fu  
(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract: Objective** To study the biological activities of *Synechococcus* sp. PCC7942 with trans-mutated hCu, Zn-SOD-gene. **Methods** *Synechococcus* sp. PCC7942 with trans-mutated hCu, Zn-SOD were administered orally for 20d to mice, then the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) were determined. **Results** The activities of GSH-Px in serum and the activities of CAT in blood increased obviously; the activity of SOD in serum and liver increased markedly; the content of MDA in serum and liver decreased obviously. **Conclusion** *Synechococcus* sp. PCC7942 with trans-mutated hCu, Zn-SOD-gene had obvious antioxidant effect *in vivo*.

**Key words:** *Synechococcus* sp. PCC7942 with trans-mutated hCu, Zn-SOD-gene; antioxidation GSH-Px; CAT; SOD; MDA

蓝藻富含人体和动物所必需的氨基酸和生理活性物质或前体, Cu, Zn-SOD 因为可以消除超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)而被运用于延缓衰老和控制炎症<sup>[1-4]</sup>。采用人类的 SOD 可消除种属特异性的影响, 但不能直接大规模提取 SOD 基因工程是获得人类 Cu, Zn-SOD 的最佳手段。本实验室对 hCu, Zn-SOD 基因进行了改造, 将 Cys<sup>111</sup> 突变成 Ala<sup>111</sup>, 并将 hCu, Zn-SOD 突变基因转入聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 细胞中, 使其得到高效表达(表达效率为 7.8%)<sup>[5]</sup>。本文通过小鼠灌胃转 hCu, Zn-SOD 突变基因聚球藻与野生聚球藻, 测定小鼠谷胱甘肽过

氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)的活力以及丙二醛(MDA)的含量变化, 研究转 hCu, Zn-SOD 突变基因聚球藻的抗氧化作用, 以进一步探讨其口服后的生物活性。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 动物

4~5 周龄昆明种雌小鼠, 18~22g, 由厦门大学抗癌研究中心实验动物室提供。

##### 1.1.2 试剂

超氧化物歧化酶(SOD)抽提法试剂盒、

\* <sup>△</sup> 基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C0510004)

过氧化氢酶(CAT)测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒和丙二醛(MDA)测试盒购自南京建成生物工程研究所,其余试剂均为分析纯。

1.1.3 菌株

聚球藻 PCC7942 野生菌株和转人 Cu, Zn-SOD 突变基因聚球藻 PCC7942 菌株由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 动物处理与分组

将小鼠随机分为空白对照组、野生藻组、转基因藻小剂量组、转基因藻大剂量组等 4 组,每组 10 只。其中,野生藻组灌服 0.3g · kg<sup>-1</sup>的野生聚球藻 PCC7942,转基因藻小、大剂量组分别灌服 0.3, 0.6g · kg<sup>-1</sup>的转人 Cu, Zn-SOD 突变基因聚球藻,空白对照组灌服同体积的生理盐水,每日 1 次,连续 20d。末次给药 8h 后眼球取血,其中 200 $\mu$ L 加肝素抗凝,另外 1mL 血液分离血清,处死小鼠,快速取出肝脏组织,制成匀浆,测定 GSH-Px, CAT, 总 SOD(T-SOD)和 Cu, Zn-SOD 活力以及 MDA 含量,具体测定方法按试剂盒说明操作。

1.2.2 肝脏组织匀浆中蛋白质浓度测定

用考马斯亮蓝 G-250 染色法。

1.2.3 结果分析

采用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析,均以  $\bar{x} \pm s$  表示。

2 结果

2.1 转 hCu, Zn-SOD 突变基因聚球藻对小鼠 GSH-Px 活力的影响

见表 1。

表 1 转 hCu, Zn-SOD 突变基因聚球藻对小鼠 GSH-Px 活力的影响( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Effect of mutated hCu, Zn-SOD transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 on GSH-Px activity in mice( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	血清 GSH-Px (U · mL <sup>-1</sup> )	肝 GSH-Px (U · mL <sup>-1</sup> )
空白对照组	704.52 ± 17.55	240.12 ± 32.12
野生藻组	787.26 ± 67.88 *	249.51 ± 36.52
转基因藻小剂量组	895.71 ± 43.50 ** $\Delta$	263.87 ± 33.62
转基因藻大剂量组	1035.30 ± 108.80 ** $\Delta\Delta$	267.97 ± 32.09

注: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs 空白对照组,  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$  vs 野生藻组,下同

从表 1 可知,野生藻组和转基因藻小、大剂量组的血清 GSH-Px 活力比空白对照组明显提高,相比而言给予野生藻和转基因藻的小鼠肝脏中 GSH-Px 活力虽有所提高,但差异无统计学意义。

2.2 转 hCu, Zn-SOD 基因聚球藻对小鼠 CAT 活性的影响

见表 2。

表 2 转 hCu, Zn-SOD 基因聚球藻对小鼠 CAT 活性的影响( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Effect of mutated hCu, Zn-SOD transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 on CAT activity in mice( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	血红蛋白 CAT (U · g <sup>-1</sup> )	肝 CAT (U · mg <sup>-1</sup> )
空白对照组	85.39 ± 21.53	139.79 ± 25.15
野生藻组	91.23 ± 19.31 *	144.76 ± 28.36
转基因藻小剂量组	114.47 ± 21.14 * $\Delta$	149.24 ± 22.04
转基因藻大剂量组	119.01 ± 28.47 ** $\Delta\Delta$	155.30 ± 18.95 *

表 2 结果表明,野生藻组和转基因藻小、大剂量组的全血血红蛋白 CAT 活力比空白对照组有明显和显著提高。与空白对照组相比,转基因藻大剂量组的小鼠肝脏 CAT 活力有显著提高,而给予野生藻和转基因藻的小剂量组小鼠肝脏中 CAT 活力有所提高但差异不明显。

2.3 转 hCu, Zn-SOD 基因聚球藻对小鼠 SOD 活性的影响

见表 3, 4。

表 3 转 hCu, Zn-SOD 基因聚球藻对小鼠 Cu, Zn-SOD 活性的影响( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

Tab 3 Effect of mutated hCu, Zn-SOD transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 on CuZn-SOD activity in mice( $\bar{x} \pm s$ )

组别	血清 (U · mL <sup>-1</sup> )	肝 (U · mg <sup>-1</sup> )
空白对照组	58.06 ± 14.59	42.36 ± 2.21
野生藻组	60.75 ± 16.56	43.30 ± 2.77
转基因藻小剂量组	108.57 ± 19.82 ** $\Delta\Delta$	75.47 ± 6.77 ** $\Delta\Delta$
转基因藻大剂量组	135.86 ± 26.16 ** $\Delta\Delta$	87.64 ± 5.14 ** $\Delta\Delta$

由表 3 可看出,与空白对照组相比,给予野生藻的小鼠血清和肝脏中 Cu, Zn-SOD 的活力均无显著性差异。转基因藻小、大剂量组可显著提高小鼠血清和肝脏的 Cu, Zn-SOD 活力。

表 4 转 hCu, Zn-SOD 基因聚球藻对小鼠 T-SOD 活性的影响 ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

Tab 4 Effect of mutated hCu, Zn-SOD transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 on T-SOD activity in mice ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	血清 (U · mL <sup>-1</sup> )	肝 (U · mg <sup>-1</sup> )
空白对照组	88.11 ± 18.00	84.82 ± 2.51
野生藻组	103.62 ± 25.16	90.05 ± 9.05
转基因藻小剂量组	154.17 ± 29.12 ** △△	114.40 ± 17.36 ** △△
转基因藻大剂量组	178.37 ± 38.01 ** △△	132.07 ± 22.77 ** △△

如表 4 所示,与空白对照组相比,给予野生藻的小鼠血清和肝脏中 T-SOD 的活力均有所提高,但无统计学差异。小剂量及大剂量转基因藻均可显著提高小鼠血清和肝脏的 T-SOD 活力。

#### 2.4 转 hCu, Zn-SOD 基因聚球藻对小鼠 MDA 含量的影响

见表 5。

表 5 转 hCu, Zn-SOD 基因聚球藻对小鼠 MDA 含量的影响 ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

Tab 5 Effect of mutated hCu, Zn-SOD transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 on content of MDA in mice ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	血清 (nmol · mL <sup>-1</sup> )	肝 (nmol · mg <sup>-1</sup> )
空白对照组	14.05 ± 3.53	13.47 ± 2.63
野生藻组	10.11 ± 2.16 *	12.50 ± 2.40 *
转基因藻小剂量组	8.54 ± 1.39 ** △△	11.48 ± 2.33 ** △△
转基因藻大剂量组	8.14 ± 1.66 ** △△	10.57 ± 1.91 ** △△

与空白对照组相比,给予野生藻和转基因藻的小鼠血清和肝中的 MDA 含量都有不同程度的降低,差异显著和非常显著。

### 3 讨论

自由基是一类具有高度化学反应活性的含氧基团,在生理情况下,正常机体生命活动不断产生自由基,对组织和细胞产生氧化损伤,机体内有一整套与其相平衡的抗氧化系统,主要包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等,这些酶不但协同作用防止活性氧的损伤效应,而且相互间还起保护作用<sup>[6,7]</sup>。若体内产生的过量自由基无法得到及时清除,则导致脂质过氧化作用加剧,形成大量的脂质过氧化物,造成细胞代谢

和功能形态的改变,机体的免疫系统功能也逐渐衰退,降低机体的防御功能,从而加速衰老过程<sup>[6,8]</sup>。

本实验研究的结果表明,灌服转 hCu, Zn-SOD 突变基因聚球藻可明显提高小鼠血清 GSH-Px 活力和全血血红蛋白 CAT 活性,显著提高小鼠血清和肝脏中 Cu, Zn-SOD 和 T-SOD 的活力,说明了转 hCu, Zn-SOD 突变基因聚球藻具有较强的抗氧化作用。小鼠血清和肝脏的 MAD 含量明显地降低,说明转基因藻口服后可以显著降低对血清及肝细胞的脂质过氧化作用,对肝损伤有一定的防护作用。其作用机制是多方面的,涉及能够提高自由基链锁反应多个环节上抗氧化酶的活力及具有直接清除自由基等作用。

#### 参考文献:

- [1] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocoupein [J]. *Biol Chem*, 1969, 244(22): 6049.
- [2] Ming Y, Wheeler MD, Connor HD, et al. Cu/Zn-superoxide dismutase gene attenuate ischemia-reperfusion injury in the rat kidney [J]. *American Society of Nephrology*, 2001, 12: 2691.
- [3] Zanetti M, Sato J, Zvonimir SK, et al. Gene transfer of superoxide dismutase isoforms reverses endothelial dysfunction in diabetic rabbit aorta [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280: 2516.
- [4] Knudsen L, Meeteren M, Kuiper I, et al. Attenuated mild colonic inflammation and improved survival from severe DSS colitis of transgenic Cu, Zn-SOD mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34(6): 753.
- [5] 高淑彬. 人 Cu, Zn-SOD 突变基因在聚球藻中的高效表达及活性研究[D]. 厦门大学生命科学学院, 2007.
- [6] 陈瑗,周枚. 自由基与衰老[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 10.
- [7] Downs CA, Fauth JE, Woodley CM. Assessing the health of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) exposes to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system [J]. *Mar Biotechnol*, 2001, 3(4): 380.
- [8] Serafini M. Dietary vitamin E and T cell-mediated function in the elderly: effectiveness and mechanism of action [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2000, 18(4-5): 401.

(收稿日期: 2007-04-02)