

与 β -谷甾醇的(24s)差向异构体数据比较接近,由此断定化合物 I 为(24s)-豆甾-5-烯-3 β -醇。化合物 III 的数据则与胆甾醇的数据完全一致。

3 物理常数与波谱数据

化合物 I : mp 142~148 °C; IR $_{\max}^{\text{KBr}}$ cm $^{-1}$: 3397, 2255, 1467, 1379, 1077, 1044, 1027, 935, 887, 859, 778, 723; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl $_3$) δ : 6.48(1H, d, J=8.4Hz), 6.22(1H, d, J=8.5 Hz), 3.95(1H, m), 0.87(d, J=6.5Hz), 0.86 (S), 0.83 (d, J=6.6 Hz), 0.82 (d, J=6.6 Hz), 0.78 (S); $^{13}\text{C-NMR}$ 见表 1; MS m/z: 416 (M $^+$), 398 (M-H $_2$ O), 384 (M-O $_2$, 100), 366 (M-O $_2$ -H $_2$ O), 351 (M-O $_2$ -H $_2$ O-CH $_3$), 325 (M-O $_2$ -C $_3$ H $_7$ O), 303 (M-side chain), 301, 271, 253, 211, 197, 171, 152, 133, 107, 95, 81, 69, 55, 43.

化合物 II : mp 132~136 °C; IR $_{\max}^{\text{KBr}}$ cm $^{-1}$: 3420, 2980, 2960, 1560; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl $_3$) δ : 5.33(1H, t, J=2.5Hz), 3.47(1H, m), 0.98 (S, H-19), 0.91~0.78(12H, m), 0.66(S, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ 见表 1; MS m/z: 414 (M $^+$), 381, 329, 303, 273 (M-side chain), 255, 231, 213,

173, 161, 145, 133, 119, 95, 81, 69, 55, 43.

化合物 III : mp 142~148 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl $_3$) δ : $^1\text{H-NMR}$ (CDCl $_3$) δ : 5.33(1H, t, J=2.5Hz), 3.50(1H, m), 0.98(S, H-19), 0.90~0.78(9H, m), 0.66(S, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ 见表 1; MS m/z: 386 (M $^+$), 368 (M-H $_2$ O), 353, 301, 275, 273 (M-side chain), 255, 247, 231, 213, 178, 159, 145, 133, 119, 107, 95, 81, 69, 55, 43.

参考文献

- [1] Faulkner DJ. Marine Natural Products [J]. *Nat. Prod. Rep.* 2001, 18: 1 and the preceding papers in the series.
- [2] 肖定军, 邓松之, 吴厚铭. 南海海绵 *Gellius cymifor mis* 化学成分的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 1999, 11(1): 6.
- [3] Gauvin A, Smadja J. Isolation of bioactive 5 α , 8 α -epidioxy sterols from the marine sponge *Luffariella cf. Variabilis* [J]. *Can J Chem*, 2000, 78: 986.
- [4] Seo YW, Rho J-R, Shin J. Isolation of two steroids from the marine polychaete worm *Perinereis aibuhitensis* [J]. *Ocean Res*, 1996, 18: 83.
- [5] 奚若明, 张明国. 中国化工医药产品大全[M]. 北京: 科学出版社, 1991, 924.
- [6] Wright JLC, McInnes AG, Shimizu S, et al. Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopy [J]. *Can J Chem*, 1978, 56: 1898.

(收稿日期: 2001-07-30)

转胸腺素 $\alpha 1$ 基因聚球藻抗氧化作用的研究 Δ

刘仁海 章军 周克夫 徐虹 徐惠娟 楼士林

(厦门大学 生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 本实验室已在蓝藻聚球藻中高效表达了人源胸腺素 $\alpha 1$ (thymosin $\alpha 1$, Ta1) 基因, 为研究转 Ta1 基因聚球藻口服后的生物活性, 本研究给小鼠灌服转 Ta1 基因聚球藻 14d, 研究其对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) 含量的影响, 结果表明: 转胸腺素 $\alpha 1$ 基因聚球藻可显著提高小鼠心、肝与肾中 GSH-Px 活力 ($P < 0.01$); 明显提高心脏 Cat 活性 ($P < 0.01$); 显著降低肝脏中 MDA 的含量 ($P < 0.01$); 但对 SOD 活力无明显作用。提示转胸腺素 $\alpha 1$ 基因聚球藻较强的抗氧化作用。

关键词: 转胸腺素 $\alpha 1$ 基因聚球藻; 抗氧化作用; 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 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-3461-(2002)02-0004-04

Δ 基金项目: 国家海洋 863 课题(项目编号: 819-04-03)和福建省自然科学基金项目(项目编号: c0010002)

A study on antioxidation of *synechococcus* sp. PCC 7942 with Trans-thymosin α 1-gene in Mice

LIU Ren-hai, ZHANG Jun, ZHOU Ke-fu, *et al.*

(School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Human thymosin α 1 gene was expressed effectively in *Synechococcus* sp. PCC 7942 and antioxidant effect of *Synechococcus* sp. PCC 7942 with trans-thymosin α 1-gene in mice were investigated. *Synechococcus* sp. PCC 7942 with trans-thymosin α 1-gene were administered orally 14d, Later the results showed that the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) in heart, liver and kidney were increased significantly ($P < 0.01$); the activity of catalase (Cat) in heart was increased markedly; the content of malondialdehyde (MDA) in liver was decreased obviously ($P < 0.01$). But no significant change in the activity of superoxide dismutase (SOD) was observed. It indicated that *Synechococcus* sp. PCC 7942 with trans-thymosin α 1-gene had obvious antioxidation in vivo.

Key words: *synechococcus* sp. PCC 7942 with trans-thymosin α 1-gene; antioxidation; glutathione peroxidase (GSH-Px); catalase (Cat); superoxide dismutase (SOD); malondialdehyde (MDA)

蓝藻属于光合放氧型的原核生物,兼具植物和细菌的一些特性^[1]。多数蓝藻富含蛋白质,无毒,是表达外源目的的基因的独特受体系统。本实验室从鲍氏织线藻 *Plectonema boryanum* 中分离得到一种约 1.5Kb 的内源小质粒 pPbS, 构建了蓝藻穿梭质粒 pPRS-1 和穿梭质粒表达载体 pPKE2; 同时根据 DNA 片段同源重组的性质, 构建聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 的基因整合平台系统。

胸腺素 α 1 为一种由 28 个氨基酸组成的多肽^[2], 其主要作用是促使 T 细胞的分化与成熟^[3], 临床上胸腺素 α 1 已被应用于治疗慢性乙型肝炎^[4]和丙型肝炎^[5], 取得了良好的疗效。目前所用的胸腺素 α 1 制剂或来自化学合成, 或从猪和小牛胸腺中提取, 价格昂贵; 近年来国内外已开始用基因工程方法生产胸腺素 α 1, 但未实现高效表达(如在 *E. coli* 中表达)。为获得价廉, 质优, 疗效好的胸腺素 α 1 制剂, 本实验室利用穿梭质粒和基因整合平台系统, 将人源胸腺素 α 1 (thymosin α 1, T α 1) 基因转入聚球藻 *Synechococcus* sp.

PCC 7942 细胞中, 使其得到高效表达(表达效率为 8%)。动物实验表明, 转 T α 1 基因聚球藻具有免疫生物活性^[6]。本文通过测定在臭氧环境下灌服转 T α 1 基因聚球藻与野生聚球藻的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, 研究转胸腺素 α 1 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 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 4~5 周龄昆明种小白鼠, 体重 25-30g, 雌雄兼有, 由厦门大学抗癌研究中心实验动物室提供。

1.1.2 试剂 5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) [5, 5'-dithion-bis(2-nitrobenzoic acid), DTNB], Roche 公司产品; 硫代巴比妥酸 (TBA)、黄嘌呤氧化酶、SOD、Sigma 公司产品。其余试剂均为分析纯。

1.1.3 菌株 转 T α 1 基因聚球藻 PCC 7942 菌株 1(T1)和转 T α 1 基因聚球藻 PCC

7942 菌株 2(T2),由本实验室提供聚球藻 PCC 7942 野生菌株,由青岛海洋大学惠赠。以上菌株均加生理盐水制备为 10%混悬液。

1.1.4 主要仪器 DU-600 分光光度计, BECKMAN 公司出品。

1.2 方法

1.2.1 将小鼠随机分为 4 组:空白对照组、野生藻组、转化藻 T1 组、转化藻 T2 组,其中野生藻组、转化藻 T1 组、转化藻 T2 组分别灌服 $400\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重的野生聚球藻、转 T α 1 基因聚球藻菌株 1、2,空白对照组则灌服同量的生理盐水。每天 1 次,连续 14d,自给药日起小鼠置于臭氧环境中。

末次给药 8h 后眼球取血,分离血清,并处死小鼠,快速采取心脏、肝脏和肾脏等组织,测定 GSH-Px、Cat 和 SOD 活力以及 MDA 含量。

1.2.2 GSH-Px 活力测定采用 DTNB 法^[7],即 GSH-Px 催化以 GSH 为还原剂的过氧化物还原反应,GSH 可与 DTNB 反应生成黄色的 5-硫代,2-硝基苯甲酸阴离子,测得该离子的浓度,计算 GSH 的减少量,并求得

2 结果

2.1 转 T α 1 基因聚球藻对小鼠 GSH-Px 活力的影响(结果见表 1)

表 1 转 T α 1 基因聚球藻对小鼠 SGH-Px 活力的影响 $\bar{x} \pm s$

组别	n	心(U/mg)	肝(U/mg)	肾(U/mg)
空白对照组	10	59.84±17.80	144.9±19.84	162.05±11.78
野生藻组	10	56.02±7.44	142.69±21.78	172.78±14.08
转化藻 T1 组	11	59.56±21.05	165.89±18.13*	190.77±4.11*
转化藻 T2 组	11	76.31±14.05*	162.33±10.69*	191.69±3.02

注: $P < 0.01$ vs 空白对照组

由表 1 可知,两种转 T α 1 基因聚球藻均可显著提高小鼠肝脏与肾脏的 GSH-Px 的活力($P < 0.01$),转 T α 1 基因 PCC 7942 菌株 2 还可显著提高小鼠心脏 GSH-Px 的活力($P < 0.01$),但转 T α 1 基因 PCC 7942 菌株 1 无明显作用;与空白对照组相比,给予野生聚球藻的小鼠各组织中 GSH-Px 的活力则均无显著性差异。

GSH-Px 的活力。活力单位定义:每 mg 组织蛋白质,扣除非酶反应,使 GSH 浓度降低 $1\mu\text{mol}$ 为 1 个活力单位。

1.2.3 Cat 活力测定采用钼酸铵比色法^[8],即 Cat 作用于过氧化氢,使其分解,体系中残留的过氧化氢再与钼铵作用生成稳定的黄色化合物,其在 405nm 处的吸光度取决于 H_2O_2 和钼酸铵的浓度,从而反映 Cat 活性。活力单位定义:每 g 蛋白每分钟分解 $1\mu\text{mol}$ 过氧化氢的酶量为 1 个和单位。

1.2.4 SOD 活力采用黄嘌呤氧化酶法^[9],即藉黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生 O_2 ,后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂作用下呈现紫红色,而 SOD 则抑制该反应,根据抑制率计算 SOD 的活力。活力单位定义:SOD 抑制率达 50%时所需的 SOD 量为一个活力单位。

1.2.5 MDA 含量采用硫代巴比妥酸法^[10]。

1.2.6 用考马斯亮兰 G-250 染色法测定各组织匀浆中蛋白质浓度。

1.2.7 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间比较采用 t 检验进行处理。

2.2 转 T α 1 基因聚球藻对小鼠 Cat 活性的影响(结果见表 2)

表 2 转 T α 1 基因聚球藻对小鼠 Cat 活性的影响 $\bar{x} \pm s$

组别	n	心(U/g)	肾(U/g)
空白对照组	10	1.67±1.10	1.12±0.52
野生藻组	10	1.60±0.99	1.23±0.50
转化藻 T1 组	11	6.84±3.80*	1.19±0.26
转化藻 T2 组	11	7.05±4.05*	1.17±0.74

注: * $P < 0.01$ vs 空白对照组

由表 2 可看出,两种转 T α 1 基因聚球藻均可显著提高小鼠心脏 Cat 的活性($P < 0.01$),但对肾脏 Cat 的作用则无显著性差异与空白对照相比,野生聚球藻对各组织 Cat 的作用亦无显著性差异。

表 3 转 T α 1 基因聚球藻对小鼠 SOD 活性的影响 $\bar{x} \pm s$

组别	n	心(U/mg)	血清(U/mg)	肾(U/mg)
空白对照组	10	125.76 \pm 25.14	65.37 \pm 36.36	150.47 \pm 40.28
野生藻组	10	129.80 \pm 43.26	76.79 \pm 39.83	150.14 \pm 37.65
转化藻 T1 组	11	139.86 \pm 15.85	65.59 \pm 28.36	153.64 \pm 11.76
转化藻 T2 组	11	126.65 \pm 38.21	65.88 \pm 27.81	149.28 \pm 36.00

2.4 转 T α 1 基因聚球藻对小鼠 MDA 含量的影响(结果见表 4)

由表 4 可知,两种转 T α 1 基因聚球藻均可显著降低小鼠肝脏中 MDA 的含量($P < 0.01$),但对肾脏中 MDA 的作用则无显著性差异,与空白对照组比较,野生聚球藻组小鼠各组织中 MDA 的含量亦无改变。

表 4 转 T α 1 基因聚球藻对小鼠 MDA 含量的影响 $\bar{x} \pm s$

组别	n	肝(nM/mL)	肾(nM/mL)
空白对照组	10	30.85 \pm 6.13	36.60 \pm 5.36
野生藻组	10	28.07 \pm 7.76	32.78 \pm 5.16
转化藻 T1 组	11	27.50 \pm 6.23*	32.68 \pm 4.98
转化藻 T2 组	11	22.10 \pm 9.71*	36.45 \pm 3.85

注: * $P < 0.01$ vs 空白对照组

3 讨论

本研究的结果表明,转胸腺素 α 1 基因聚球藻可明显提高在臭氧环境下的小鼠心、肝、肾中的 GSH-Px 的活力和心脏中 Cat 的活力,显著降低肝脏中 MDA 的含量,这说明转胸腺素 α 1 基因聚球藻可有效地阻断由臭氧激发的体内自由基连锁反应,具有较强的抗氧化作用,但两种藻株之间的作用有差异。

值得一提的是,灌服转胸腺素 α 1 基因聚球藻的小鼠各个组织中 SOD 的活力均无显著变化,这提示转胸腺素 α 1 基因聚球藻主要是通过提高 GSH-Px 和 Cat 的活力来阻断活性氧自由基的连锁反应的。Cat 的活力仅在心脏中有显著提高,而在其它组织中则无显著性差异,提示心脏可能对转胸腺素 α 1 基因

2.3 转 T α 1 基因聚球藻对小鼠 SOD 活性的影响(结果见表 3)

表 3 中结果表明,相对于空白对照组,给予野生聚球藻和给予转 T α 1 基因聚球藻的小鼠肾脏、心脏与血清中 SOD 的活性均无显著性差异。

聚球藻的作用较敏感;此外,肾脏中 MDA 的含量也无明显改变,说明转胸腺素 α 1 基因聚球藻的抗氧化作用有一定的器官差异性,其机制有待进一步研究。

总之,转胸腺素 α 1 基因聚球藻口服后具有免疫活性^[6]和较强的抗氧化作用,经深入研究,有望成为一种有前途的海洋生物基因工程药物。

参考文献

- [1] 王业勤,徐旭东,黎尚豪. 蓝藻分子遗传学十年研究进展[J]. 水生生物学报. 1991,15(4):356.
- [2] Low T, Thurman G, Mcadoo M, et al. Isolation, characterization and biological activities of thymosin α 1 and polypeptide β 1 from calf thymus[J]. *J Biochem*, 1979, 254(3):981.
- [3] Frasca D, Adorini L, Doria G. Enhanced frequency of mitogen-responsive T cell precursors in old mice injected with thymosin α 1[J]. *Eur j Immunol*, 1987, 17(5):727.
- [4] Mutchnick MG, Appelman HD, Cung HT, et al. Thymosin treatment of chronic hepatitis B: A placebo-controlled pilot trial[J]. *Hematology*, 1991, 14:409.
- [5] 黄自存,张国良,周大桥,等. 胸腺素 α 1 和干扰素 α 1b 联合治疗慢性病毒性乙型、丙型肝炎[J]. 中国新药杂志. 1997, 136(2):90.
- [6] 楼士林,章军,吴巧娟,等. 蓝藻表达载体系统的构建和应用[J]. 厦门大学学报(自然科学版). 2001, 40(2):586.
- [7] 唐雅麟,王红,朱莲珍. 测定人血中谷胱甘肽过氧化物酶方法的比较及条件的探索[J]. 卫生研究. 1987, 16(4):22.
- [8] 陈鲁京,孟泽. 钼酸铵显色法测定血清过氧化氢酶[J]. 临床检验杂志. 1994, 12(1):6.
- [9] Oyagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment kit for superoxide dismutase activity [J]. *Anal Biochem*, 1984, 142:290.
- [10] 钟福孙,胡文尧,冯驰. 硫代巴比妥酸比色法测定血清过氧化脂质[J]. 临床检验杂志. 1986, 4(3):129.

(收稿日期:2001-07-01)