

# 云芝多糖对小鼠腹腔巨噬细胞锰超氧化物歧化酶基因表达的调控

庞战军 陈 媛 周 玫

第一军医大学生物化学与分子生物学研究所自由基医学研究室, 广州 510515)

主题词 云芝多糖; 超氧化物歧化酶; 基因表达; 巨噬细胞, 腹腔; Actinomycin D; Cycloheximide; Acetovanilone; 小鼠

摘 要 为揭示云芝多糖抗动脉粥样硬化的作用与细胞抗氧化酶的关系, 采用酶活性测定、斑点杂交等方法, 探讨了云芝多糖对小鼠腹腔巨噬细胞锰超氧化物歧化酶基因表达的影响。结果发现, 腹腔注射云芝多糖可以提高小鼠腹腔巨噬细胞的总超氧化物歧化酶活性, 从  $223.7 \pm 29.1$  提高至  $356.1 \pm 9.3$  ku/g, 并使其锰超氧化物歧化酶 mRNA 含量增加; 应用 Actinomycin D、Cycloheximide 和 Acetovanilone 等阻断剂的研究发现, 云芝多糖对巨噬细胞锰超氧化物歧化酶表达的影响发生在转录水平, 而且某种新蛋白的合成可能参与了诱导过程。此结果提示, 云芝多糖提高抗氧化酶活性, 增强细胞抗氧化损伤的能力, 可能是云芝多糖抗动脉粥样硬化作用机制之一。

## The Regulation of Manganese Superoxide Dismutase Gene Expression in Mouse Peritoneal Macrophages by Polysaccharide Krestin

PANG Zhan - Jun, CHEN Yuan and ZHOU Mei

Research Laboratory of Free Radical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

MeSH Polysaccharide Krestin; Superoxide Dismutase; Gene Expression; Macrophage, Peritoneal; Actinomycin D; Cycloheximide; Acetovanilone; Mice

**ABSTRACT** **Aim** In order to find out if the effect of polysaccharide Krestin (PSK) in preventing atherosclerosis is somewhat associated with antioxidant enzymes. **Methods** Applied pyrogallol auto-oxidation method to determine activity of superoxide dismutase (SOD).

The content of manganese superoxide dismutase (MnSOD) mRNA in mouse peritoneal macrophages was detected through dot hybridization.

**Results** It showed that, PSK could improve SOD activity from  $223.7 \pm 29.1$  to  $356.1 \pm 9.3$  ku/g ( $P < 0.05$ ) and increase the content of MnSOD mRNA in mouse peritoneal macrophages. And actinomycin D or cycloheximide could block the induction of MnSOD by PSK.

**Conclusion** PSK could enhance SOD activity and MnSOD mRNA expression in mouse peritoneal macrophages. PSK might induce MnSOD mRNA transcription through a new protein synthesis pathway.

巨噬细胞是存在于机体内多种组织的一类细胞, 对调节机体或局部微环境的免疫状态起着主要作用, 并因此与肿瘤、动脉硬化等疾病的发生、发展及转归有关。云芝多糖 (polysaccharide Krestin, PSK) 是从云芝子实体提取的一种蛋白结合多糖, 可以影响巨噬细胞的功能。用云芝多糖处理的小鼠腹腔巨噬细胞, 其抗过氧化损伤的能力大大提高<sup>[1,2]</sup>。抗氧化酶的活性与细胞的抗氧化能力直接相关, 我室曾报道云芝多糖可以引起小鼠腹腔巨噬细胞硒谷胱甘肽过氧化物酶 (selenium-dependent glutathione peroxidase, SeGPx) 活性及基因表达的增加<sup>[3]</sup>。为进一步研究云芝多糖生物学作用与抗氧化酶表达的关系, 现将云芝多糖对小鼠腹腔巨噬细胞锰超氧化物歧化

酶 (manganese superoxide dismutase, MnSOD) 的调控进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

云芝多糖由我室按照文献 [4] 报道的方法从云芝子实体中提取, 平均分子量约为  $1.2 \times 10^6$ , 其中含糖 78%, 用无菌生理盐水配制成 1.5% 的溶液, 脂多糖含量低于 50 ng/L。含 0.737 kb MnSOD cDNA 片段的质粒由黄胜和博士 (USA) 惠赠; 地高辛 DNA 标记试剂盒、DIG Easy Hyb、尼龙膜、地高辛标记的 1.5 kb  $\beta$ -actin RNA 探针购自德国宝灵曼公司; DMEM 细胞培养基、Actinomycin D、Cycloheximide、Acetovanilone、PMSF、Aprotinin、邻苯三酚、Diethyl pyrocar-

bonate (DEPC)、异硫氰酸胍、Sarcosyl 购自美国 Sigma 公司;其它试剂均为分析纯。

## 1.2 动物处理与腹腔巨噬细胞提取

雄性昆明鼠购自本校实验动物中心 4~5 周龄,  $20 \pm 2$  g), 随机分为云芝多糖处理组与对照组。处理组给予云芝多糖处理, 对照组给予等量生理盐水处理。将经处理后的小鼠拉颈处死, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 腹腔灌洗法采集腹腔巨噬细胞,  $1\ 000$  r/min 离心 7 min, 将细胞沉淀, 用不含血清的 DMEM 培养基吹成悬液, 接种于平皿中。经 2 h 贴壁后, 洗去未贴壁细胞。

## 1.3 细胞裂解与超氧化物歧化酶活性测定

用裂解液 (50 mmol/L Tris·HCl, pH 8.0; 150 mmol/L NaCl; 0.02%  $\text{NaNO}_3$ ; 100 mg/L PMSF; 1 mg/L Aprotinin; 1% Triton X-100) 裂解细胞,  $4^\circ\text{C}$  放置 30 min, 将细胞裂解液转移至 Eppendorf 管中,  $4^\circ\text{C}$   $12\ 000$  r/min 离心 30 min, 吸取上清液用作酶活性及蛋白含量测定。SOD 活性测定采用改良的邻苯三酚自氧化法<sup>[5]</sup>。以使邻苯三酚自氧化速率 (吸光度值控制在  $0.070/\text{min}$ ) 抑制 50% 为一个活性单位 (u), 结果以 ku/g 表示。蛋白含量测定采用 Lowry's 法<sup>[6]</sup>, 酪蛋白为标准参照物。

## 1.4 杂交探针的制备与标记

将质粒导入 E. coli: HB101, 经扩增后, 采用碱裂解法抽提质粒, 并用聚乙二醇法纯化。经限制性酶切获得所需 DNA 片段, 并根据文献<sup>[7]</sup>报道的方法进行分离纯化, 所得的 MnSOD 探针长度为 737 bp。DNA 探针的标记采用非放射性的地高辛标记方法, 标记过程与标记效率检测按照试剂盒产品说明书进行操作。

## 1.5 斑点杂交

细胞总 RNA 采用异硫氰酸胍一步法提取<sup>[8]</sup>。RNA 沉淀用 DEPC 处理的 0.5% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 溶解, 紫外分光光度法定量。斑点杂交按照文献<sup>[9]</sup>报道的方法稍加修改, 简述如下: 将变性处理过的 RNA 样品在尼龙杂交膜上点样, 固定。预温 DIG Easy Hyb 至杂交温度 ( $42^\circ\text{C}$ ), 取适当体积与膜在杂交温度共温 30 min, 轻微搅动。DNA 探针经煮沸变性, 按  $5 \sim 25\ \mu\text{g}/\text{L}$  加至杂交液中, 与膜继续杂交 16 h。用  $2 \times \text{SSC}$ , 0.1% 十二烷基硫酸钠室温下洗膜  $2 \times 5$  min。再用  $0.1 \times \text{SSC}$ , 0.1% 十二烷基硫酸钠  $68^\circ\text{C}$  下不断搅动洗膜  $2 \times 15$  min。按照宝灵曼 DNA 探针标记试剂盒产品说明书检测杂交信号。将杂交膜放在热的二甲酰胺中

脱色, 并于  $68^\circ\text{C}$  下在探针剥离液 (50% 甲酰胺; 50 mmol/L Tris·Cl, pH 8; 1% 十二烷基硫酸钠) 中洗  $30\ \text{min} \times 2$  次以剥离探针, 再与下一种探针杂交。

## 1.6 数据处理

杂交膜显色后, 在 UVP's GDS 7500 Gel Documentation System 上进行图像处理, 杂交斑点的灰度值采用 GelBase/GelBlot Pro 软件包进行分析。数据统计学分析均采用两样本均数比较的  $t$  检验。

# 2 结果

## 2.1 腹腔注射云芝多糖提高小鼠腹腔巨噬细胞的总超氧化物歧化酶活性

给予小鼠腹腔注射 1.5% 云芝多糖  $0.2\ \text{mL} \times 3$  日, 停注两天后, 收集腹腔巨噬细胞并裂解, 测定细胞裂解液中的总 SOD 活性。结果发现: 注射云芝多糖可以增加小鼠腹腔巨噬细胞的总 SOD 活性 (表 1, Table 1)。

表 1. 云芝多糖对小鼠腹腔巨噬细胞超氧化物歧化酶活性的影响

Table 1. Effect of PSK on SOD activity in mouse peritoneal macrophages ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Groups	Activity of SOD (ku/g)
Control	$223.7 \pm 29.1$
PSK	$356.1 \pm 9.3^a$

a:  $P < 0.05$ , compared with control group

## 2.2 腹腔注射云芝多糖增加小鼠腹腔巨噬细胞锰超氧化物歧化酶基因的表达

云芝多糖处理组小鼠接受 1.5% 云芝多糖腹腔注射  $0.2\ \text{mL}$ , 对照组给予等量的生理盐水, 连续 3 天。停注两天后, 采集腹腔巨噬细胞并提取总 RNA, 斑点杂交检测 MnSOD 基因的表达。结果发现, 云芝多糖可以提高这种抗氧化酶基因的表达 (图 1, Figure 1)。

## 2.3 云芝多糖调节锰超氧化物歧化酶基因表达

给予小鼠腹腔注射 1.5% 云芝多糖  $0.2\ \text{mL}$ , 腹腔灌洗采集腹腔巨噬细胞, 接种于四个平皿中, 经 2 h 贴壁以纯化巨噬细胞。在细胞培养上清中分别加入下列试剂: Actinomycin D  $5\ \text{mg}/\text{L}$ ; Cycloheximide  $30\ \text{mg}/\text{L}$ ; Acetovanilone  $50\ \text{mg}/\text{L}$ ; 另一组作为对照。作用 24 h 后, 提取细胞总 RNA, 斑点杂交检测 MnSOD mRNA 的含量。结果发现, 经 Actinomycin D 或 Cycloheximide 处理的细胞 MnSOD mRNA 的含量减少 (图 2, Figure 2)。

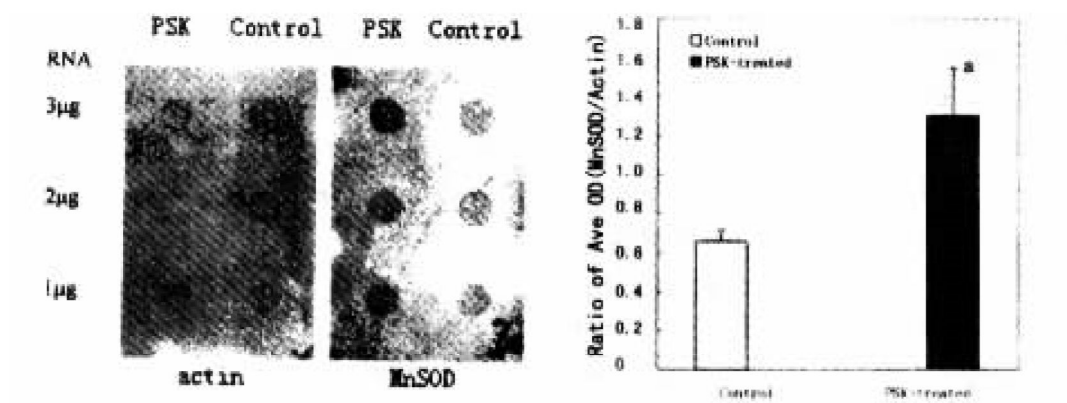


图1. 云芝多糖诱导小鼠腹腔巨噬细胞锰超氧化物歧化酶 mRNA 的表达

**Figure 1. PSK induced MnSOD expression in mouse peritoneal macrophages.** Mice received PSK injection peritoneally (1.5%, 0.2 mL) for 3 days before resident macrophages were collected by peritoneal lavage. And the content of MnSOD mRNA in the cells was detected using dot hybridization analysis. The picture was scanned by a UVP's GDS 7500 Gel Documentation System and the optical density was determined by GelBase/GelBlot Pro analysis. Data were expressed as  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . As compared with the control group, a:  $P < 0.05$

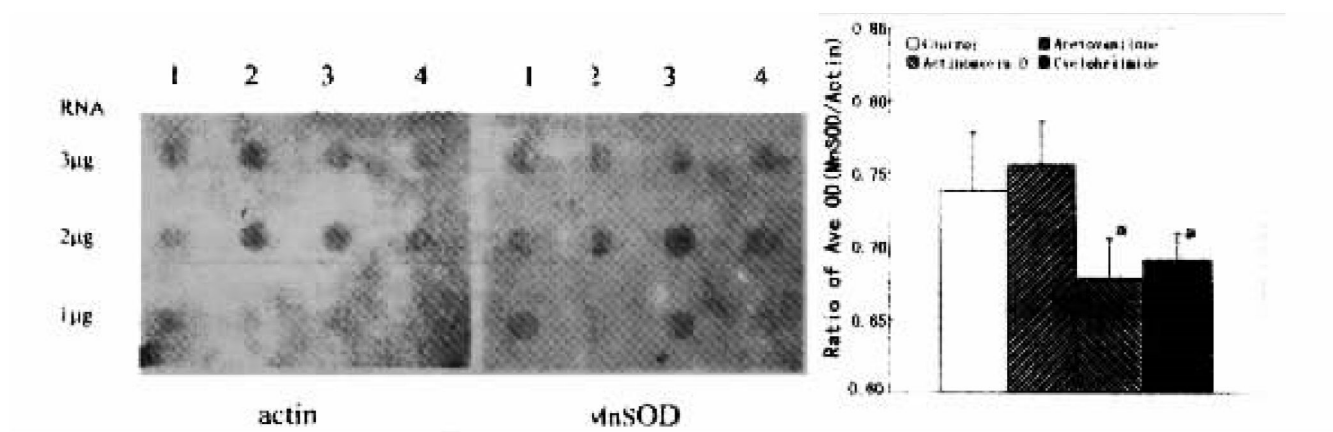


图2. Actinomycin D、Cycloheximide 及 Acetovanilone 这三种因素对云芝多糖诱导小鼠腹腔巨噬细胞锰超氧化物歧化酶 mRNA 表达的影响

**Figure 2. Effect of actinomycin D, cycloheximide and acetovanilone on the induction of MnSOD expression in mouse peritoneal macrophages by PSK.** Mice received PSK injection peritoneally (1.5%, 0.2 mL) for 1 days before resident macrophages were collected by peritoneal lavage. The cells were incubated with Actinomycin D (5 mg/L), Cycloheximide (90 mg/L) and Acetovanilone (50 mg/L) respectively for another 24 hours. And the content of MnSOD mRNA in the cells was detected using dot hybridization analysis. The picture was scanned by a UVP's GDS 7500 Gel Documentation System and the optical density was determined by GelBase/GelBlot Pro analysis. ①: Actinomycin D; ②: Cycloheximide; ③: Acetovanilone; ④: control. Data were expressed as  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . As compared with the control group, a:  $P < 0.05$

### 3 讨论

真核细胞内存在有三种 SOD: 位于胞浆的铜锌超氧化物歧化酶 (CuZnSOD)、线粒体内的锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 和分泌到细胞外的内皮细胞超氧化物歧化酶 (ECsOD), 其中锰超氧化物歧化酶被认为是诱导型的, 在细胞抗氧化损伤中起重要作用<sup>[10]</sup>。许多可以诱导活性氧产生的因素都能诱导锰超氧化物歧化酶的表达, 如电离辐射、肿瘤坏死因子、白细胞介素 1 等<sup>[11]</sup>。本研究发现, 云芝多糖可

以诱导小鼠腹腔巨噬细胞锰超氧化物歧化酶基因的表达。作为良好的非特异性免疫调节剂, 云芝多糖在抗肿瘤细胞生长, 抑制肿瘤病灶转移, 提高机体免疫抗病能力从而防止内源性感染发生等方面的作用已受到广泛重视和研究<sup>[12]</sup>。我室以前的研究表明, 云芝多糖可以防止巨噬细胞受氧化型低密度脂蛋白作用而形成泡沫细胞<sup>[13]</sup>, 有效地预防和减轻动脉硬化家兔模型动脉粥样硬化斑块的形成<sup>[14]</sup>。云芝多糖的这些作用可能与其对细胞 MnSOD 表达的调节

有关。另外,云芝多糖还可以使中性粒等细胞超氧阴离子 ( $O_2\cdot$ ) 的产生增加,有利于其杀伤肿瘤细胞<sup>[5]</sup>;而其对锰超氧化物歧化酶表达的诱导则可以保证免疫细胞在用活性氧杀伤肿瘤细胞的同时自身不受到损害。在细胞的抗氧化酶中,超氧化物歧化酶通过清除  $O_2\cdot$  而保护细胞,其生成的产物是  $H_2O_2$  等过氧化物,对细胞仍会造成损害。这些有害产物可被过氧化氢酶及硒谷胱甘肽过氧化物酶等过氧化物酶进一步无毒化。我们已经发现,云芝多糖可以提高小鼠腹腔巨噬细胞硒谷胱甘肽过氧化物酶的活性并增加其基因的表达<sup>[6]</sup>。因此,云芝多糖可以全面提高巨噬细胞的抗氧化能力,清除细胞内有害的氧化产物,从而抵御氧化损伤。

Actinomycin D 常被用来抑制 mRNA 的合成; Cycloheximide 是蛋白合成的抑制剂;而 Acetovanilone 则可以抑制细胞内源性  $O_2\cdot$  的产生。应用三种抑制剂的研究显示,Actinomycin D 和 Cycloheximide 可以减少云芝多糖处理的小鼠腹腔巨噬细胞锰超氧化物歧化酶 mRNA 合成,说明云芝多糖在转录水平对巨噬细胞锰超氧化物歧化酶表达产生影响,而且某种新蛋白质的合成可能参与了云芝多糖对锰超氧化物歧化酶基因的诱导过程;而诱导细胞内源性  $O_2\cdot$  产生可能不是云芝多糖影响巨噬细胞锰超氧化物歧化酶表达的主要途径。

#### 参考文献

- 1 Lou N, Zhou M, Chen Y. Inhibitory effect of polysaccharide Krestin on foam cell formation and necrosis of murine peritoneal macrophage caused by oxidized low density lipoprotein. *Med Sci Res*, 1996, **24** (1): 49 - 51
- 2 Chen Y, Zhou M, Li J, et al. Injurious effect of reactive oxygen species on macrophage and its prevention by PSK. *J Clin Lab Immunol*, 1994, **43**: 99 - 115
- 3 Zhou M, Chen Y, Liu SX, et al. Elevation of macrophage SeGSHPx

- gene expression and prevention of foam cell formation. In: *Eds By Lester Packer, Proceedings of the international Symposium on Natural antioxidants: Molecular Mechanisms and Health Effects*. Maret G Traber. AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 1996; 339 - 351
- 4 Xi LZ, Gu XG. In: Xi LZ (ed.) *Pharmaceutics*. Beijing: Chinese People Hygiene Press, 1993; 20 - 21
- 5 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种 SOD 的测活方法. *生物化学与生物物理进展*, 1986, **4**: 71 - 73
- 6 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr LA, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265 - 275
- 7 贾根深, 温进坤. 从琼脂糖凝胶中快速回收 DNA 片段的新方法. *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3** (3): 257 - 258
- 8 Chomczynski P, Sacchi N. Single - Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate - Phenol - Chloroform Extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156 - 159
- 9 Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77** (9): 5201 - 205
- 10 Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem*, 1989, **264** (14): 7761 - 764
- 11 Wong GH, Goeddel DV. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science*, 1988, **242**: 941 - 944
- 12 Ng TB. A review of research on the protein - bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: omyporaceae). *Gen Pharmacol*, 1998, **30** (1): 1 - 4
- 13 Chen Y, Zhou M, Liu S, et al. PSK protects macrophages from lipoperoxide accumulation and foam cell formation caused by oxidatively modified low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 1996, **124**: 171 - 181
- 14 Chen Y, Zhou M, Lou N, et al. The polysaccharide Krestin prevents plaque formation of experimentally atherosclerotic rabbits. *Med Sci Res*, 1997, **25**: 297 - 300
- 15 Ishihara Y, Fujii T, Iijima H, et al. The role of neutrophils as cytotoxic cells in lung metastasis: suppression of tumor cell metastasis by a biological response modifier (PSK). *In Vivo*, 1998, **12** (2): 175 - 182

此文 1999 - 02 - 10 收到, 1999 - 05 - 17 修回)

此文编辑 胡必利)