

- chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett*, 1992, **135**: 235~ 238
- 14 Diedrich J F, Minnigan J, Carp R I *et al.* Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J Virol*, 1991, **65**: 4759~ 4768

Strong Induction of Apolipoprotein E Expression in Rat Muscle by Chronic Intoxication with Chloroquine GU Yongjun (*Department of Neurobiology and State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China*); MA Jiabao (*Heze Professional Medical College, Heze 274030, China*); Fumitaka Oyama, Yasuo Ihara (*Department of Neuropathology, Institute for Brain Research, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-Ku, Tokyo 113, Japan*).

Abstract Apolipoprotein E (ApoE) is strongly associated with late-onset familial and sporadic forms of Alzheimer's disease. Some myopathic changes which are similar to those seen in

Alzheimer brain, that is, deposits of β AP and tau protein, could be induced by chronic intoxication with chloroquine. The influence of chloroquine treatment on ApoE expression in rat muscle was examined using reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR). A steadily expressed endogenous mRNA, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PD) was served as an internal standard in PCR quantification. Amplification was found to be linear over a wide range of cycle number, and the efficiency was identical for target and control mRNA in RT-PCR. The expression of ApoE mRNA in rat muscle began to increase after 6 weeks of chloroquine treatment, and became 20-fold more than that in untreated control later on. The results suggest that ApoE may play roles in the pathologic changes in rat muscle caused by chronic intoxication with chloroquine.

Key words apolipoprotein E, chloroquine, Alzheimer's disease, mRNA quantification, RT-PCR

Mn-SOD 对 CHO 细胞电离辐射敏感性的影响

孙 娟 陈 媛 周 玫 葛忠良¹⁾ 黎明涛²⁾
(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

摘要 近年来的研究发现, IL-1 和 TNF 是重要的辐射防护因子, 因 IL-1 和 TNF 都能选择性诱导 Mn-SOD 的高度表达, 因此认为 Mn-SOD 可能有辐射防护作用. 通过转染有义和反义 Mn-SOD cDNA 于 CHO 细胞, 进一步说明了 Mn-SOD 在抗电离辐射损伤中的作用. 研究表明, 转染有义 Mn-SOD cDNA 可降低细胞对电离辐射的敏感性, 而转染反义 Mn-SOD cDNA 的细胞克隆对电离辐射的敏感性升高.

关键词 Mn-SOD, 基因转染, 电离辐射

所有需氧生物总是不断处于活性氧 (ROS) 导致的氧损伤的危险之中, 电离辐射、高氧和化疗药物都能增加细胞 ROS 如 O_2^- 、 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 的产生而损伤生物大分子. 为免

受氧损伤的威胁, 需氧生物在进化过程中产生

¹⁾ 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850.
²⁾ 中山医科大学药理教研室, 广州 510089.
收稿日期: 1996-02-14, 修回日期: 1996-06-06

了适应性的酶和非酶抗氧化系统. 超氧化物歧化酶 (SOD) 是主要的抗氧化酶, 根据其所含金属辅基的不同而分为 MnSOD、CuZnSOD 和 FeSOD^[1,2]. MnSOD 主要位于易产生氧自由基且是氧损伤的重要靶部位的线粒体内. 白细胞介素 1 (IL-1) 和肿瘤坏死因子 (TNF) 能在体内和体外诱导某些肿瘤细胞以及正常细胞 MnSOD 的高度表达, 且能提高受致死剂量射线照射小鼠的存活率^[3,4]. 因 IL-1 和 TNF 都能在转录和翻译水平选择性诱导 MnSOD 的高度表达, 由此设想 IL-1 和 TNF 抗电离辐射损伤的机理之一可能是通过诱导 MnSOD 的高表达来实现的. 为此, 本文通过 MnSOD cDNA 基因转染探讨了 MnSOD 对电离辐射敏感性的影响.

1 材料和方法

1.1 细胞培养

中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 购自中科院上海细胞生物所细胞库. 在含有 10% 小牛血清 (浙江杭州四季青生物材料厂) 的 RPMI 1640 培养基内, 加入青霉素 (100 U/ml) 和链霉素 (100 µg/ml). 细胞培养瓶置于 37℃、5% CO₂ 孵育箱内.

1.2 MnSOD cDNA 基因转染

1.0 kb 的人 MnSOD cDNA 基因表达载体, 有义载体 pHBA-SOD (+) 和反义载体 pHBA-SOD (-) 由日本 Kureha Chemical Industry Co., Ltd., Kouji Matsushima 博士赠送. 采用 Lipofectin (GIBCO BRL) 基因转染方法^[5]将 MnSOD 表达质粒导入 30%~50% 融合状态的 CHO 细胞, 培养 48 h 后按 1:8 传代并用含 1000 mg/L 的 G418 (GIBCO BRL) 培养液进行选择培养, 培养至第 12 天用克隆环挑选出 G418 抗性克隆, 扩大培养于含 200 mg/L 的 G418 维持培养基内.

1.3 RNA 点印迹分析

采用异硫氰酸胍一步法^[6]提取细胞总 RNA, 约 10 µg RNA 用 RNA 稀释缓冲液 (DEPC 处理的 H₂O: 20×SSC: 甲醛=5:3:2)

稀释后点样于尼龙膜 (Boehringer Mannheim Biochemica) 上, 置 80℃烤箱烘烤 2 h, 用 DIG 标记的人 MnSOD cDNA 探针 (Boehringer Mannheim Biochemica, DIG Labeling Kit) 于 50℃在 50% 甲酰胺的杂交液内预杂交 3 h, 杂交 20 h, 用 2×SSC 于室温洗膜两次, 每次 5 min, 0.1×SSC 于 68℃洗膜两次, 每次 15 min, 按试剂盒 (Boehringer Mannheim Biochemica, DIG Labeling and detection Kit) 提供的 NBT 显色方法检测结果.

1.4 酶活性测定

用连苯三酚法^[7]测定总 SOD, 连苯三酚购自 Sigma 公司, 以 5 mmol/L KCN 抑制 CuZnSOD, 从总 SOD 活性减去 MnSOD 活性即得到 CuZnSOD 活性. 谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 活性测定按 DTNB 法, 即 5, 5-二硫对二硝基苯甲酸法测定 GPx 活性^[8]. Lowry 法^[9]测定蛋白含量, 以 2.5 g/L 牛血清白蛋白为标准. 酶活性以 U/mg 表示.

1.5 电离辐射

采用剂量率为 3.2 Gy/min 的 6 MV X 射线 (直线加速器, 2100C Varian USA), 选对数生长期的细胞用 PBS 悬浮于 15 ml 塑料离心管 (Corning, USA) 室温下照射, 照射后的细胞立即接种于培养瓶继续培养.

1.6 克隆形成率测定

对照组和照射组细胞按 1000 个/ml 细胞接种于 35 mm 平皿, 37℃、5% CO₂、100% 湿度培养 9 d, 甲醇: 冰醋酸 (3:1) 固定细胞, 1% Giemsa 染色计数克隆形成数和分散集落比, 绘制剂量存活曲线.

1.7 DNA 分离和凝胶电泳

收集 5×10^6 细胞用 PBS 洗一次, 用含 0.5% SDS、0.1 mol/L EDTA (pH 8.0)、10 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0)、0.5 g/L 蛋白酶 K 细胞裂解液于 50℃裂解细胞 2 h, 酚: 氯仿抽提, 无水乙醇沉淀 DNA, 将 DNA 悬浮于 50 µl TE (10 mmol/L Tris·HCl、1 mmol/L EDTA pH 8.0) 中, 加 RNase A 20 mg/L 于 37℃消化 1 h, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化

乙锭染色, 紫外灯下观察并照片.

2 结 果

2.1 MrSOD 基因重组细胞系的鉴定

经杂交分析得到了两个转染有义载体 pHBA-SOD (+) 和两个转染反义载体 pHBA-SOD (-) 的阳性克隆 (图 1). 酶活性测定结果可看出 (表 1), cSOD (+) -c1 克隆 MrSOD 活性较对照高出约 4 倍, cSOD (+) -c2

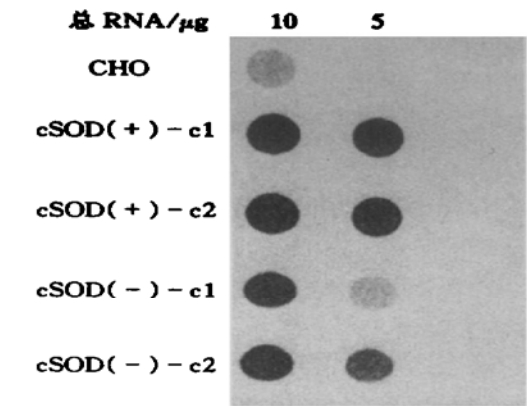


图 1 对照和基因重组细胞总 RNA 点杂交分析
用 500 bp 的有义和反义人 MnSOD cDNA 探针分别杂交点样于尼龙膜上的 RNA. DNA 探针根据地高辛标记试剂盒说明自行制备.

表 1 抗氧化酶活性测定

细胞系	MrSOD	CuZnrSOD	GPx
CHO (control)	13.5 ± 1.6	45.7 ± 1.5	0.065 ± 0.004
cSOD(+)-c1	54.0 ± 1.4 ¹⁾	46.6 ± 1.1	0.069 ± 0.003
cSOD(+)-c2	43.1 ± 2.7 ¹⁾	45.3 ± 2.8	0.072 ± 0.008
cSOD(-)-c1	8.1 ± 1.9 ²⁾	40.1 ± 3.6	0.061 ± 0.002
cSOD(-)-c2	6.1 ± 2.3 ²⁾	49.5 ± 2.3	0.068 ± 0.007

注: 每一个数据是三次测定的平均值. ¹⁾ 与对照组相比 $P < 0.01$; ²⁾ 与对照组相比 $0.01 < P < 0.05$.

约高出 3 倍, 这种差别有利于我们研究不同基因表达量与抗电离辐射损伤能力间的关系. 转染反义 MrSOD cDNA 的克隆其 MrSOD 活性低于对照组说明反义 MrSOD RNA 有效地

封闭了 mRNA 对 MrSOD 的翻译. 在所有基因重组的细胞系中, CuZnrSOD、GPx 活性与未转染基因细胞比较无明显差异, 说明 MrSOD 表达的改变不影响其他抗氧化酶的基因表达.

2.2 重组细胞系对电离辐射的反应

转染人 MrSOD 基因的 CHO 细胞克隆接受不同剂量 X 射线照射后显示 (图 2), 两个稳定表达转染有义 MrSOD cDNA 基因的克隆 cSOD(+)-c1 和 cSOD(+)-c2, 与未转染基因的对照组 CHO 细胞相比, 明显提高了细胞受照射后的存活能力. D_0 值分别为 cSOD(+)-c1 (3.61 ± 0.20) Gy、cSOD(+)-c2 (3.06 ± 0.1) Gy 和 CHO (1.80 ± 0.1) Gy. 而转染反义 MrSOD cDNA 的克隆其放射敏感性明显升高, 它们的 D_0 值分别为 cSOD(-)-c1 (1.19 ± 0.2) Gy 和 cSOD(-)-c2 (0.82 ± 0.3) Gy.

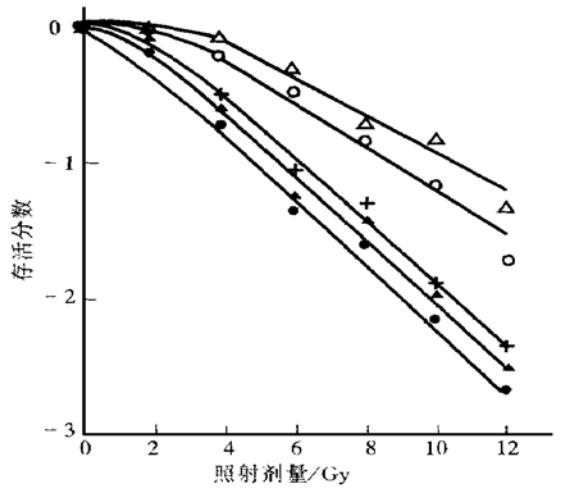


图 2 转染有义和反义 MnSOD cDNA 细胞的克隆形成率分析
根据照射剂量和细胞存活分数绘制剂量存活曲线, 每一个点是三次试验的平均值, 各细胞克隆存活曲线的相关系数分别为: 对照 CHO 0.996, cSOD(+)-c1 0.992, cSOD(+)-c2 0.992, cSOD(-)-c1 0.998 和 cSOD(-)-c2 0.996. + —: CHO; Δ — Δ : cSOD(+)-c1; $\square$ — $\square$: cSOD(+)-c2; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: cSOD(-)-c1; $\bullet$ — $\bullet$: cSOD(-)-c2.

2.3 DNA 断裂分析

细胞受 10 Gy X 射线照射后继续培养 3 h

提取 DNA, 进行凝胶电泳, 由图 3 可看出, cSOD(+)-c1 和 cSOD(+)-c2 克隆 DNA 无降解(3, 4), 而 cSOD(-)-c1 和 cSOD(-)-c2 克隆 DNA 明显降解, 呈现细胞坏死时出现的典型的 DNA 弥散状(5, 6).

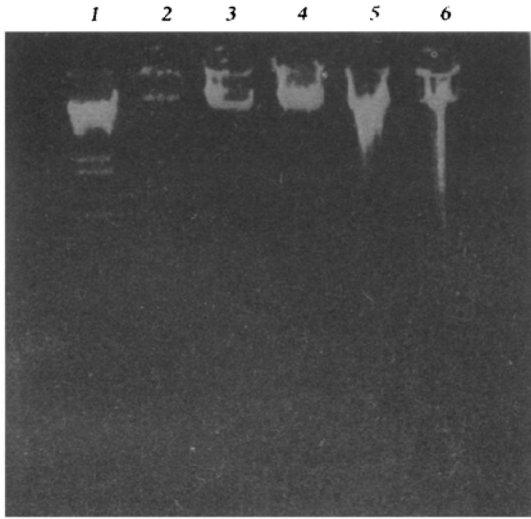


图 3 从对照和 MnSOD 基因重组细胞系分离细胞 DNA 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析

1: DNA marker; 2: 对照 CHO; 3: cSOD(+)-c1; 4: cSOD(+)-c2; 5: cSOD(-)-c1; 6: cSOD(-)-c2.

3 讨 论

研究结果表明转染有义 M_{rr}SOD cDNA 可降低 CHO 细胞的辐射敏感性, 其机理可能是 M_{rr}SOD 清除自由基的作用. 而转染反义 M_{rr}SOD cDNA 的克隆其辐射敏感性升高, 这可能是 M_{rr}SOD mRNA 的翻译受到抑制. 因 M_{rr}SOD 主要位于线粒体, 而线粒体又是电离辐射损伤的主要靶部位, 其中 DNA 极易受损伤^[10], 因此提高细胞 M_{rr}SOD 的表达应能保护线粒体 DNA 和核 DNA. DNA 断裂分析说明, M_{rr}SOD 保护了核和线粒体 DNA 免受电离辐射的损伤, 这可能也是通过 M_{rr}SOD 清除自由基, 使 DNA 不受辐射的损伤. 尽管有不少报道认为有好几种抗氧化酶都参与了能产生 O₂⁻ 的电离辐射的抗性作用^[11], 但 M_{rr}SOD 仍被认为是抵御这种细胞毒作用的最关键保护酶.

目前对抵御电离辐射导致的活性氧损伤机

理仍是众说纷云, 在我们所建立的 M_{rr}SOD 稳定表达的细胞系中, 表达活性最高者约为未转染细胞的 4 倍, 而 CuZnSOD 和 GPx 活性在这些重组系中无明显变化, 细胞受照后 M_{rr}SOD 活性较高者 cSOD(+)-c1 比较低者 cSOD(+)-c2 显示出更高的细胞存活率, 而转染反义 M_{rr}SOD cDNA 的细胞系 cSOD(+)-c2 和 cSOD(-)-c2 显示出对辐射损伤更加敏感, 说明提高 CHO 细胞对电离辐射耐受性的主要抗氧化酶是 M_{rr}SOD 而不是 CuZnSOD 和 GPx, CuZnSOD 和 GPx 可能也参与 M_{rr}SOD 维持细胞内抗氧化作用的整体水平. 也有研究者发现, 转染 M_{rr}SOD cDNA 的个别黑色素瘤细胞克隆尽管表达了较高的 M_{rr}SOD 活性, 但对 γ 射线照射无任何防御作用, 并认为这可能是因该细胞系过氧化氢酶(CAT)和其他抗氧化酶不足影响 M_{rr}SOD 作用的发挥, 也就是说细胞在抵御电离辐射和其他能产生活性氧损伤的因素时不仅需要诱导的主要抗氧化酶水平迅速升高, 而且需要其他抗氧化酶的配合^[12], 如 M_{rr}SOD 对 O₂⁻ 歧化成的 H₂O₂ 若不及时得到 GPx 和 CAT 的催化分解, 就有可能产生毒性更强的 $\cdot$ OH^[13], 这也许正是该重组细胞系中筛选不到 M_{rr}SOD 活性比对照组高 6 倍以上的克隆的缘故.

总之, 本研究结果提示我们可以通过调节细胞 M_{rr}SOD 的活性来改变细胞对电离辐射的敏感性. 而通过转基因技术单独将 M_{rr}SOD 基因或与其他抗氧化酶基因一起导入造血细胞或淋巴细胞可能会促进骨髓对放疗和化疗后损伤的恢复. 相反, 将反义 M_{rr}SOD 或其他抗氧化酶基因导入肿瘤细胞, 可能会提高肿瘤细胞对放疗和化疗的敏感性.

参 考 文 献

- 1 Freeman B A, Crapo J D. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. Lab Invest, 1982, 47: 412~ 426
- 2 Fridovich I. An adaptation to a prostatic gas. J Biol Chem, 1989, 264: 7761~ 7764
- 3 Masuda A, Longo D L, Kobayashi Y *et al.* Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin

1. FASEB J, 1988, 2: 3087~ 3091

4 Wong G H W, Goeddel D V. Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor. Possible protective mechanism. Science, 1988, 242: 941~ 944

5 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993. 397

6 Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162: 156~ 159

7 邓碧玉, 袁勤生, 敖杰. 改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(2): 163

8 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J Biol Chem, 1951, 193: 265~ 275

9 夏奕明, 朱莲珍. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活性的测定方法. 卫生研究, 1984, 16(4): 29

10 Richter C, Park J W, Ames B N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 6465~ 6467

11 Puchalski R B, Fahl W E. Expression of recombinant glutathione S-transferase π , γ , or γ b1 confer resistance to alkylating agents. Proc Natl Acad Sci USA. 1990, 87: 2443~ 2447

12 Hirose K, Longo D L, Oppenleim J J *et al.* Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1 tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. FASEB J, 1993, 7: 361~ 368

13 陈 媛, 周 玫主编. 自由基医学. 北京: 人民军医出版社, 1991. 55~ 57

Effect of MnSOD on Ionizing Radiation Sensitivity in CHO Cells. SUN Juan, CHEN Yuan,

ZHOU Mei (Laboratory of Free Radical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China); GE Zhongliang (Institute of Radiation Medicine/Beijing, Beijing 100850, China); LI Mingtao (Department of Pharmacology, Sun Yat-Sen University of Medical Science, Guangzhou 510089, China).

Abstract IL-1 and TNF have been found to act as protective agents from lethal doses of ionizing radiation in recent years. It was proposed that the mechanisms of the radioprotective effect of IL-1 and TNF may be resulted from to its selective stimulation of manganese superoxide dismutase (MnSOD) expression on both RNA and protein level. Chinese hamster ovary (CHO) cells transfected with sense MnSOD cDNA showed decreased radiosensitivity after treatment with X-ray irradiation, whereas clones transfected with anti-sense MnSOD cDNA showed increased radiosensitivity. It was demonstrated that overexpression of MnSOD could promotes the survival of CHO cells from ionizing radiation.

Key words manganese superoxide dismutase, gene transfection, ionizing radiation

遗传性癫痫易感大鼠脑内 NMDAR1 基因表达*

单巍松 张国荣 张月华 梁英武 李春英¹⁾ 吴希如
(北京医科大学第一临床医院, 北京 100034)

摘要 N-甲基-D 天门冬氨酸 (NMDA) 受体与癫痫及癫痫易感性的形成密切相关. 以遗传性癫痫易感大鼠 P77PMC 为研究对象, 通过 RNA 印迹杂交检测, NMDA 受体一型亚单位 (NMDAR1) mRNA 在惊厥后不同脑区表达, 结果显示: P77PMC 大鼠惊厥后, 大脑皮层、海马、皮层下、下丘 NMDAR1 mRNA 表达呈时间依赖性增加; 比较惊厥即刻与惊厥后 24 h, 四个脑区 NMDAR1 mRNA 分别增加了 111%、

* 国家自然科学基金资助项目. ¹⁾ 北京医科大学第一临床医院中心实验室.
收稿日期: 1996-02-08, 修回日期: 1996-06-26