

26 ku的蛋白质而且表达量很高(>30%),此时大肠杆菌中由于相应翻译因子的缺乏对其他基因的翻译会有一定的抑制^[6],从而减少了作为第二顺反子目的蛋白的产量.当我们把GST基因从660 bp 缩少到206 bp 时,hBMP2A 和 hBMP3 的表达量分别提高一倍.因此我们认为第一顺反子基因最好要小一些,这样有利于提高目的蛋白的产量,也有利于其后目的蛋白的分离.我们设计的这种双顺反子表达形式是否适用于其他外源基因,还有待于更多的应用来证实,但至少对翻译增强子和TSE序列联合应用于双顺反子载体的构建提供了一个成功的借鉴.

参 考 文 献

- 1 刘新平, 陈南春, 陈苏民. 生物化学杂志, 1991; 7 (1): 8
- 2 Smith D B, Johnson K S. Genl, 1988; 67: 31
- 3 Ito W, Kurosawa Y. Gene, 1992; 118: 87
- 4 Ferrin M, Terranova K D, Schreiber M P *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 1937
- 5 Peter O L, Shaikat H R. J Biol Chem, 1992; 264: 16973
- 6 Liu J, Albers M W, Chen C M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 2304

Construction and Application of A Dicistronic Expression Vector. Liu Xinping, Chen Sumin,

Chen Nanchun, Zhao Zhongliang, Chai Yubo, Cui Youhong, Xue Yongtao (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Fourth Military Medical University, Xian 710032, China*).

Abstract A dicistronic expression vector in *E. coli* has been constructed. The vector contains glutathione S-transferase (GST) gene as the first cistron, followed successively with translational enhancer, SD sequence, stop codon, start codon and multiple restriction enzyme sites for cloning (MCS). 3'-terminal fragments of human bone morphogenetic protein (hBMP) gene 2A and 3 were inserted into the MCS respectively. After induction, unfused hBMP2A and hBMP3 expressed and occupied 10% and 15% of the total cell protein respectively. The GST gene in the plasmids were further shortened from 660 bp to 206 bp. The expression level of hBMP2A and hBMP3 were double by the plasmids containing short GST gene as compared to that of the corresponding plasmids with large GST gene.

Key words dicistron, human bone morphogenetic protein gene, gene expression regulation, expression vector

超氧化物歧化酶模拟化合物的生物活性研究*

廖展如 扶惠华¹⁾ 田廷亮¹⁾ 蔡汉临 刘宛乔

(华中师范大学化学系, 武汉 430070)

摘要 根据天然超氧化物歧化酶(SOD)活性部位结构合成了含苯并咪唑的5种配体及其32种分别含Cu(II)、Fe(III)、Mn(II)、Co(II)的模拟化合物.经光谱、电化学测试证明这些化合物具有拟SOD活性,其50%抑制率浓度(IC₅₀)为10⁻⁶~10⁻⁸ mol·L⁻¹,催化超氧离子自由基(O₂⁻)歧化

*国家自然科学基金、湖北省自然科学基金和南京大学配位化学国家重点实验室基金资助.

¹⁾华中师范大学生物系. 收稿日期: 1995-05-29, 修回日期: 1995-09-11

的反应速率常数 k_q 为 $10^6 \sim 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. 同时观察到几种模拟化合物有抗肿瘤活性或增强水稻抗寒性.

关键词 超氧化物歧化酶, 模拟化合物, 生物活性

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 催化超氧阴离子自由基 (O_2^-) 歧化为 O_2 和 H_2O_2 , 从而可防止 O_2^- 在需氧生物体内聚积和阻遏其通过 Haber-Weiss 反应产生羟自由基 ($\cdot\text{OH}$). O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ 引起生物膜损伤和核酸、蛋白质等大分子降解破坏, 甚至引发各种炎症、肿瘤、白内障等疾病. 在动物模型实验中已证明 SOD 及其模拟化合物有防治氧自由基损伤的作用^[1]. 在植物体内, SOD 可增强植物抗寒、抗旱、抗早衰及抗化学药害的能力^[2,3].

目前市售 SOD 多从牛血、牛心或大肠杆菌中提取, 价格昂贵. 酶分子量大, 不易穿过细胞膜, 临床应用易引起机体排异反应而使其应用受到限制, 因此小分子模拟化合物研究受到极大重视. 近 20 多年来生物无机化学家合成了联吡啶、菲啉、氨基酸、多肽、Schiff 碱的含 Cu (II)、Mn (II)、Fe (III) 小分子 SOD 模拟化合物, 并采用脉冲辐解、ESR 自旋追踪、极谱等方法对它们的拟 SOD 活性进行了研究^[4~9], 但对其生物活性研究较少.

天然存在的 SOD 因其活性中心离子不同分为三类: Cu-ZnSOD, Mn-SOD 和 Fe-SOD. Cu-ZnSOD 活性部位是 4 个组氨酸 (His) 咪唑 (Im) 基 3-位氮和 H_2O (轴向) 配位于 Cu (II) 的四方锥结构, 并以其中一个咪唑负离子桥连 Zn (II) 离子^[10]. 而 Mn-SOD 和 Fe-SOD 是由 3 个 His-Im-N 和 1 个天门冬氨酸 (Asp) 羧氧呈扭曲四面体配位^[11,12].

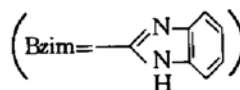
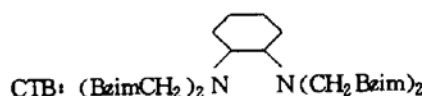
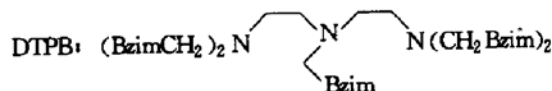
我们根据天然 SOD 活性部位结构设计, 合成了 5 种含苯并咪唑 (benzimidazoly, bzim) 的多齿配体及其一系列含 Cu (II)、Fe (III)、Mn (II)、Co (II) 的模拟化合物^[13,14]. 并用氮蓝四唑 (nitroblue tetrazolium, NBT) 光还原法^[15], 邻苯三酚自氧化法^[16]和采样极谱法^[17]对模拟化合物的 SOD

活性进行了检测, 其结果表明 32 种化合物均有 SOD 活性.

1 实验方法和结果

1.1 配体及配合物合成和表征

含苯并咪唑配体由相应多元羧酸与邻苯二胺按一定摩尔比共热缩合, 活性碳脱色, 重结晶多次得到. 它们的结构式如下:



IDB: N, N-二 (2'-苯并咪唑甲基) 亚胺.
EGTB: N, N, N', N'-四 (2'-苯并咪唑甲基) -1, 4-二乙氨基乙二醚. CTB: N, N, N', N'-四 (2'-苯并咪唑甲基) 反式环己烷邻二胺. DTPB: N, N, N', N'', N'''-五 (2'-苯并咪唑甲基) 二乙基三胺. TTHB: N, N, N', N', N'', N'''-六 (2'-苯并咪唑甲基) 三乙基四胺.

配体与相应金属盐反应得到一系列单核、双核和三核 SOD 模拟化合物. 经元素分析、电导、紫外-可见、红外和电子顺磁共振测试, 表征各模拟化合物.

1.2 循环伏安法测定配合物电势

在二甲甲酰胺 (N, N-dimethyl formamide, DMF) 溶液中, 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高

氯酸四丁基铵 (tetrabutylammonium perchlorate, TBAP) 为支持电解质, 玻碳 (glassy carbon, G. C) 电极为工作电极, 铂丝为对电极, Ag/AgCl 为参比电极的三电极体系中, 用 BAS-100 电化学分析仪以 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的速度在氮气氛中从 $+1.0 \sim -0.5 \text{ V}$ 扫描. 模拟化合物的氧化还原电势均介于 $+0.98 \sim -0.45 \text{ V}$ 之间. 由于 $\text{O}_2 + \text{e} \rightleftharpoons \text{O}_2^-$, $E'_0 = -0.45 \text{ V}$; $\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{e} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}_2$, $E'_0 = +0.98 \text{ V}$, 电势介乎其间的化学物种均具有 SOD 活性^[18]. 在测定模拟化合物电势的相同条件下, 仅以氧气氛代替氮气在 -0.5 V 以负的电势扫描. 增加模拟化合物的量, 会使 O_2/O_2^- 电偶一对对称的还原氧化峰 ($-0.87 \text{ V}/-0.79 \text{ V}$) 的阴极峰增高, 阳极峰降低乃至消

失 (图 1). 这说明由于模拟化合物具有 SOD 活性, 使 O_2^- 歧化, 从而增加了本体溶液中 O_2 浓度, 降低了 O_2^- 浓度, 致使阴极峰电流增大, 阳极峰电流减小. 这给确定配合物有无 SOD 活性提供了一个快速、定性的检测方法.

1.3 NBT 光还原法测定歧化 O_2^- 速率常数 k_q

依据文献 [8], 在 pH 7.8 的磷酸缓冲液中, 恒定光源照射核黄素-四甲基乙二胺-NBT 体系, O_2^- 作为电子传递体把电子传给 NBT, 使 NBT 还原成蓝色甲臍 (formazan), 引起 560 nm 吸光值线性积累. SOD 及其模拟化合物歧化 O_2^- , 与 NBT 竞争 O_2^- , 抑制 NBT 还原成甲臍, 因此降低 560 nm 吸光值的增长速率 ($v = \Delta A / \Delta t$). 在 SOD 及其模拟化合物存在时, O_2^- 的自发歧化可忽略不计. 设 $\rho = v_0 / v_q$ (v_0 和 v_q 分别为无和有 SOD 或其模拟化合物存在时 560 nm 吸光值 A 的增长速率), 则根据稳态近似原理可导出催化 O_2^- 歧化的表观反应速率常数 k_q 为: $k_q = k_N [\text{NBT}] (\rho - 1) / [\text{Q}]$. 文献 [19] 报道 pH 7.8, 23°C $k_N = 5.94 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. $[\text{NBT}]$ 和 $[\text{Q}]$ 分别代表 NBT 和 SOD 活性物质 Q 的浓度. 测得不同浓度模拟化合物存在时 560 nm 吸光值变化速率 v_q 和空白对照速率 v_0 , 则 k_q 可根据上式计算.

NBT 光照还原法测得我们合成的模拟化合物歧化 O_2^- 反应速率常数均为 $10^6 \sim 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. 相同条件下测得 Cu-ZnSOD (中国科学院上海生物化学研究所产品) 的歧化速率常数 $k_q = 1.50 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[15]. 在文献报道脉冲辐解法测得 Cu-ZnSOD $k_q = 1.30 \times 10^9 \sim 2.00 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ 的范围内.

1.4 模拟化合物对作物抗性的影响

以少许 DMF 溶解模拟化合物 MSOD₆ (mimetic SOD), 然后用蒸馏水稀释到 $7.87 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 25°C 用此溶液浸水稻种子 72 h, 秧苗长到 2 cm 高时用同浓度溶液喷雾 (空白对照用蒸馏水浸种、喷雾), 24 h 后置于

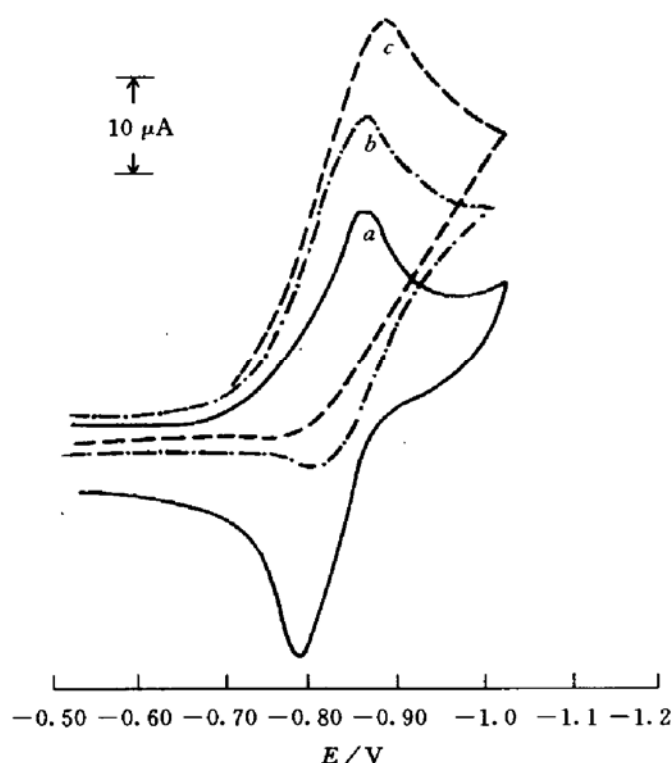


图 1 增加模拟化合物对电偶 O_2/O_2^- 峰电流的影响

模拟化合物 $\text{Cu}(\text{EGTB})\text{Cl}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 在 DMF 中的浓度 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) a: 0; b: 0.48; c: 0.96 (加入化合物前, DMF 溶液被 O_2 饱和). 扫描速度: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; 支持电解质: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TBAP.

(5 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 72 h. 低温处理后移至 25°C 下光照. 第 2、4、6、8 天取样分析. 相对于空白

对照, 各生理指标变化率 (%) 如表 1 所示.

表 1 MSOD_e 对水稻抗寒性影响

水稻品种	存活率 增值/%	电解质 渗漏率/%	叶绿素 含量/%	酶活性/%		
				SOD	CAT	POD
华 03	+18.3	-22.0	+52.9	+313.3	+150.1	-21.6
二九青	+21.8	-24.5	+20.8	+27.9	+40.2	-38.3

注: SOD、CAT 和 POD 分别为水稻秧苗含超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和非专一性过氧化物酶的相对量. “+”表示增值, “-”表示降低值. SOD 酶水平用 NBT 光还原法测定. CAT 和 POD 酶水平按文献 [20] 测定.

由上述水稻秧苗抗寒实验各项生理指标证明 MSOD_e 具有膜透性, 在植物体内仍有较高酶活性, SOD 和 CAT 活性高于空白对照. 由于有效而及时地清除了 O_2^- 和 H_2O_2 , 防止它们通过 Haber-Weiss 反应产生 $\cdot\text{OH}$, 抑制了活性氧对膜脂质的过氧化. 因此电解质渗漏率下降, 秧苗存活率和叶绿素含量升高. 含铁卟啉的非专一性过氧化物酶 (peroxidase, POD) 水平却因底物之一 H_2O_2 被清除而下降. 秧苗长势明显优于空白对照.

1.5 模拟化合物的抗肿瘤活性

按文献 [21] 的方法检测模拟化合物对肿瘤细胞增殖动力学的影响. 即取对数生长期细胞, 加入 96 孔培养板, 待贴壁后加入受试模拟化合物, 培养 72 h. 加入四氮唑盐 MTT [(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)], 4 h 后除去培养液, 加入

酸化异丙醇, 振荡后测定 570 nm 吸光值. 发现送测 5 种 MSOD 中有 4 种分别对结肠癌 HCT 瘤株, 白血病 HL-60 瘤株, 鼻咽癌 KB 瘤株有“显效”或“强效”(见表 2).

2 讨 论

对含苯并咪唑模拟化合物的研究发现三条规律.

2.1 SOD 模拟化合物的活性优劣取决于活性中心金属配位结构与天然 SOD 活性部位微环境的相似程度, 与核的多寡无关. 结构愈相似, 活性愈佳. 我们合成的模拟化合物的金属离子大多处于苯并咪唑 3 位 N, 烷胺 N 和酸根离子 (Cl^- 、 NO_3^- 、 ClO_4^- 和 BF_4^- 等), 水和醇配位的畸变四方锥 (有可供 O_2^- 配位的空位) 或八面体 (有结合较弱、易被 O_2^- 取代的配位原子) 的几何环境中. 配合物 UV-Vis 和 ESR 谱分别与含相同金属离子的 SOD 酶图谱、参量相似, 这说明模拟化合物与天然酶活性部位结构的相似性.

2.2 许多 SOD 模拟化合物同时具有过氧化氢酶性质, 使 H_2O_2 分解成 O_2 和 H_2O . 这样就能同时清除 O_2^- 和 H_2O_2 , 防止它们在活体内积累或通过 Haber-Weiss 反应产生 $\cdot\text{OH}$.

2.3 同一配体 (如 CTB、EGTB 和 TTHB) 低氧化态金属 Cu (I)、Fe (II) 配合物能与分子氧结合 (以 O_2^{2-} 桥连双核)^[14], 这就有可能将合成氧载体 (如血蓝蛋白和蚯蚓血红蛋白

表 2 SOD 模型配合物对肿瘤细胞增殖动力学的影响

样品名称	测试体系	$\text{IC}_{50}/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	评价
MSOD _a	人白血病 HL-60 瘤株	6.0×10^{-7}	+++
MSOD _b	人白血病 HL-60 瘤株	2.1×10^{-6}	++
MSOD _b	结肠癌 HCT 瘤株	8.5×10^{-6}	++
MSOD _c	结肠癌 HCT 瘤株	8.6×10^{-6}	++
MSOD _d	鼻咽癌 KB 瘤株	6.8×10^{-6}	++

注: $\text{IC}_{50} \geq 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, “-”无效; $\text{IC}_{50} \leq 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, “+”弱效; $\text{IC}_{50} \leq 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, “++”显效; $\text{IC}_{50} \leq 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, “+++”强效.

白模拟化合物)与合成 SOD、CAT 及单氧合酶(酪氨酸酶和甲烷单氧合酶)的模拟化合物工作结合起来,全面了解和掌握分子氧及其次生产物(O_2^- 、 H_2O_2 、 1O_2 和 $\cdot OH$)之间的转换规律;模拟化合物在相互转换中的作用与其自身结构的关系.这对氧自由基化学、金属蛋白和金属酶模拟化学、基础医学和农学都有十分重要的理论和实际意义.

参 考 文 献

- 1 Crouch R K, Kensler T W, Oberley L W *et al.* In: Karlin K D eds. Biological and inorganic copper chemistry (II). New York: Adenine Press, 1986; 139
- 2 季 成, 王崇效, 余叔文. 植物生理学报, 1989; 15: 318
- 3 李 犁, 余叔文. 植物生理学报, 1989; 15: 57
- 4 Strothkamp K G, Lippard S J. Acc Chem Res, 1982; 15: 318
- 5 Kitajima N, Osawa M, Tamura N *et al.* Inorg Chem, 1993; 32 (10): 1879
- 6 Goldstein S, Czapski G, Meyerstein D. J Am Chem Soc, 1990; 112: 6489
- 7 罗勤慧, 沈孟长, 彭庆芸等. 高等学校化学学报, 1989; 10 (9): 335
- 8 罗勤慧, 沈孟长, 高 伟等. 高等学校化学学报, 1990; 11 (9): 928
- 9 罗勤慧, 沈孟长, 朱守荣等. 高等学校化学学报, 1990; 11 (12): 1322
- 10 Tainer J A, Getzoff E D, Beem K M *et al.* J Mol Biol, 1982; 160: 181
- 11 Stoddard B L, Howell P L, Ringe D *et al.* Biochem, 1990; 29: 8885
- 12 Parker M W, Blake C C F. J Mol Biol, 1988; 199: 649
- 13 廖展如, 胡松洲, 石巨恩. 华中师范大学学报(自然科学版), 1988; 22 (3): 307
- 14 廖展如, 石巨恩, 刘长林. 化学学报, 1995; 53: 147
- 15 Liao Zhanru, Liu Wanqiao, Liu Jianping *et al.* J Inorg Biochem, 1994; 55 (3): 165
- 16 廖展如, 黄 艳, 石巨恩等. 高等学校化学学报, 1992; 13 (5): 697
- 17 蒋亦芹, 刘宛乔, 唐开清等. 高等学校化学学报, 1992; 13 (11): 1444
- 18 Rotilio G, Morpurgo L, Calabrese L *et al.* Biochim Biophys Acta, 1973; 302: 229
- 19 Bielski B H J, Richter H W. J Am Chem Soc, 1977; 99: 3019
- 20 波钦诺克 X H. 荆家海译. 植物生物化学分析方法. 北京: 科学出版社, 1981: 196~205
- 21 Denizot F, Lang R. J Immun Methods, 1986; 89: 271

Study on Biological Activities of Mimic Superoxide Dismutase. Liao Zhanru, Fu Huihua¹⁾, Tian Tingliang¹⁾, Cai Hanlin, Liu Wanqiao (*Department of Chemistry, ¹⁾ Department of Biology, Central China Normal University, Wuhan 430070, China*).

Abstract Five ligands containing benzimidazolyl and 32 compounds of their containing copper (II), iron (III), manganese (II), cobalt (II) have been synthesized based on the active site structures of natural superoxide dismutase (SOD), respectively. It has been shown that these compounds possess mimetic SOD activities by spectroscopic and electrochemical measurements. The concentrations of 50% inhibition (IC_{50}) are within $10^{-6} \sim 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The rate constants (k_q) of catalytic dismutation of superoxide radicals (O_2^-) are in the range of $10^6 \sim 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. Simultaneously it has been observed that a several mimetic compounds of then have antineoplastic activities and increasing antifreezing effect of rices.

Key words superoxide dismutase, mimetic compound, biological activity