

的 BL21 (DE3) 菌液样品中出现特异的免疫带, 与对照的牛脑笼状囊泡颗粒质子泵样品中免疫带位置完全一致. 在不加 IPTG 诱导的含重组质粒的 BL21 (DE3) 菌液样品以及对照质粒 PET-3a 转化的 BL21 (DE3) 中添加 IPTG 后的样品中均没有相应的免疫带. 在蛋白质印迹分析中, 我们对结合样品的硝酸纤维素滤膜进行了两次封闭, 使大部分非特异性带难以出现, 背景变得很浅, 特异的免疫带更加明显了. 蛋白质印迹分析说明, 在大肠杆菌中表达的 70kD 亚基具有与纯化的质子泵中相应亚基相同的免疫性能.

液泡型质子泵的 70kD 亚基和 58kD 亚基是直接结合的^[4]. 在分离纯化中, 可以得到 70kD 和 58kD 两个亚基的复合纯化物. 这表明, 70kD 和 58kD 亚基在质子泵中的作用是紧密相关的. 已相继完成了液泡型质子泵的 70kD, 58kD 和 33kD 亚基在大肠杆菌中的高效表达. 进而得到了单一的高纯度的几个表达亚基. 这对于进一步研究单个亚基以及液泡型质子泵的结构与功能将是重要的一步.

致谢 在本工作中, 高波宁博士给予指导及协

助, 蔡秀锦女士在技术上进行帮助. 在此一并致谢.

参 考 文 献

- 1 Bowman E J, Mandala S, Taiz L *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1986; **83**: 48
- 2 Mandala S, Taiz L. J Biol Chem, 1986; **261**: 12850
- 3 Stone D K, Xie X S. Kidney Int, 1988; **33**: 767
- 4 Xie X S, Stone D K. J Biol Chem, 1988; **263**: 9859
- 5 Frederick M A, Roger B, Robert E K *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, John Wiley & Sons, 1989; 1.13
- 6 Hirsch S, Strauss A, Masood K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1988; **85**: 3004
- 7 张 瑛, 彭生斌, Stone D K 等. 生物化学与生物物理进展, 1994; **21** (4): 334
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 1.85
- 9 Studier F W, Rosenberg A H, Dunn J J *et al.* Methods in Enzymology, 1990; **185**: 60
- 10 Laemmli U K. Nature (London), 1970; **227**: 680
- 11 Xie X S, Stone D K, Racker E. Methods in Enzymology, 1988; **157**: 634
- 12 Burnette W N. Anal Biochem, 1981; **112**: 195

大鼠心肌缺血/再灌及高脂血症的心肌膜损伤*

董传仁 喻学刚 汪学军

(湖北医科大学病理生理学教研室, 武汉 430071)

摘要 通过大鼠心肌缺血/再灌及高脂血症的模型证实, 两者均有明显的生物膜损伤, 主要表现为膜磷脂的降低、胆固醇及胆固醇/磷脂比增高、膜脂流动性及膜酶 (Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase) 活性降低, 这些异常变化与氧自由基引发的脂质过氧化增强或脂质交换有关.

关键词 磷脂类/药效学, 脂质体/药效学, 心肌, 血液灌注, 细胞膜/病理学

生物膜具有多种重要的生理功能, 最近认为, 生物膜损伤是心肌细胞由可逆性损伤转化为非可逆性损伤的早期特征和重要标志^[1], 但因导致生物膜损伤的原因、实验对象及方法的不同, 人们对生物膜损伤的特征性表现的认识

尚不充分^[2]. 本文通过大鼠心肌缺血/再灌及高脂血症模型, 探讨不同原因导致的心肌损伤其生物膜改变的共同表现形式及机制, 旨在为

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1993-05-31, 修回日期: 1993-11-29

进一步防治膜损伤和进行膜修饰提供实验资料。

1 材料和方法

1.1 对象和分组

1.1.1 大鼠心肌缺血/再灌模型 取心电图正常的 Wistar 大鼠28只,雌雄兼有,体重250—350g,随机分为:a.假手术组($n=14$),按常规法麻醉、开胸,于冠脉前降支下穿线但不结扎。b.缺血/再灌组($n=14$),方法同上,结扎45min后,解除结扎再灌1h。两组动物处死后取心脏标本待测。

1.1.2 大鼠高脂血症模型 取心电图正常的雌性 Wistar 大鼠16只,体重200—250g,随机分为:a.常规饲养组($n=8$),喂养常规饲料。b.高脂组($n=8$),在常规饲料中加10%猪油、1%胆固醇及0.3%胆盐。喂饲二个月后处死动物,取血及心脏标本待测。

1.2 指标及方法

以邻苯二甲醛显色法^[3]测定血清胆固醇(CH);以磷钨酸-镁法沉淀,按邻苯二甲醛显色法测定血清高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-CH);通过 Abbott 双波长自动生化分析仪测定血清甘油三酯(TG);选取一长约3—5cm 主动脉管,按常规法制备电镜样品,观察主动脉内皮细胞的变化。

取心脏用0.25 mol/L 蔗糖溶液(含5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L 组氨酸, 0.01 mmol/L 二硫苏糖醇)制成10%的心肌匀浆,取部分匀浆进行超速离心,按文献[4]方

法分离线粒体。制备的心肌匀浆及线粒体悬液,分别按不同方法测定下列指标:取心肌线粒体悬液按抗坏血酸法^[5]测定总磷脂(PL);按邻苯二甲醛显色法测定总胆固醇(CH);以 DPH 作荧光探针,按文献[6]法测定膜脂流动性;按文献[7]法测定和计算 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATPase 活性;取心肌匀浆分别按化学发光法^[5]、Ohkawa 法^[8]、铜皂形成二次抽提法^[9]测定超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)及游离脂肪酸(FFA)含量。

2 结 果

高脂饲料喂养大鼠两个月后,与常规饲料组相比,血清 TG 显著增高(由 $0.998 \pm 0.285 \text{ mmol/L}$ 增至 $1.475 \pm 0.483 \text{ mmol/L}$, $P < 0.05$);血清胆固醇显著增高(由 $1.910 \pm 0.293 \text{ mmol/L}$ 增至 $2.453 \pm 0.238 \text{ mmol/L}$, $P < 0.05$);血清 HDL-CH 有降低趋势,但两者间差别无显著意义(由 $1.547 \pm 0.798 \text{ mmol/L}$ 降至 $1.430 \pm 0.261 \text{ mmol/L}$, $P > 0.05$),而 HDL-CH/CH 比值显著降低(由 0.835 ± 0.239 降至 0.587 ± 0.124 , $P < 0.05$);血浆纤维蛋白原和血浆粘度显著增高(分别由 $2.086 \pm 0.175 \text{ g/L}$ 增至 $2.352 \pm 0.189 \text{ g/L}$, $P < 0.05$;由 $1.386 \pm 0.137 \text{ mPa/s}$ 增至 $1.710 \pm 0.129 \text{ mPa/s}$, $P < 0.05$)。主动脉内皮细胞扫描电镜观察表明,常规饲养组的大鼠,其内皮细胞呈梭形排列,大小较一致,排列平整,细胞表面显均一的纵形波纹,核所在部位稍隆起,未见内皮细胞损伤性改变;高脂饲料喂养组主动脉内皮细胞呈片

表1 大鼠心肌缺血/再灌及高脂血症线粒体膜脂质组分的变化

($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	PL/nmol·mg ⁻¹	CH/nmol·mg ⁻¹	CH/PL
假手术组	14	382.372 ± 24.763	78.677 ± 7.851	0.203 ± 0.033
缺血/再灌组	14	267.553 ± 20.801 ¹⁾	119.810 ± 11.377 ¹⁾	0.451 ± 0.055 ¹⁾
常规饲料组	8	380.053 ± 22.602	76.703 ± 5.676	0.189 ± 0.023
高脂饲料组	8	351.097 ± 36.110 ²⁾	87.780 ± 13.366 ²⁾	0.250 ± 0.027 ¹⁾

注:缺血/再灌组与假手术组相比,高脂饲料组与常规饲料组相比。¹⁾ $P < 0.01$; ²⁾ $P < 0.05$ 。

状隆起, 内皮细胞排列紊乱, 细胞表面细波纹消失, 部分内皮细胞出现破损并有脂质的沉积和斑块形成。

大鼠心肌缺血/再灌及高脂血症线粒体膜脂质组分变化如表1所示, 结果提示, 两者的 PL 均明显降低, CH, CH/PL 均明显增高。

大鼠心肌缺血/再灌及高脂血症线粒体膜脂流动性及 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性的变化如表2所示, 结果表明, 两者的荧光偏振度

(P) 值、膜脂微粘度 ($\bar{\eta}$) 值明显高于对照组, 由于 $\bar{\eta}$ 和膜脂流动性呈反比关系, 即膜脂流动性明显低于对照组; 两者的 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性也明显低于对照组。

大鼠心肌缺血/再灌的心肌匀浆中 FFA, MDA 含量及 SOD 活性变化如表3所示, 结果表明, 心肌缺血/再灌组心肌匀浆中 FFA, MDA 含量明显高于对照组; SOD 活性明显低于对照组。

表2 大鼠心肌缺血/再灌及高脂血症线粒体膜脂流动性及 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性的变化

($\bar{x} \pm s$)

	n	P	$\bar{\eta}$	Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase / $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
假手术组	10	0.196 ± 0.006	1.483 ± 0.078	138.135 ± 11.030
缺血/再灌组	10	$0.258 \pm 0.017^{1)}$	$2.573 \pm 0.325^{1)}$	$96.894 \pm 10.400^{1)}$
常规饲料组	8	0.198 ± 0.004	1.511 ± 0.053	99.494 ± 8.750
高脂饲料组	8	$0.221 \pm 0.008^{1)}$	$1.859 \pm 0.131^{1)}$	$87.346 \pm 9.185^{1)}$

$^{1)} P < 0.05$.

表3 大鼠心肌缺血/再灌组心肌匀浆中 FFA, MDA 含量及 SOD 活性变化

($\bar{x} \pm s$)

	n	FFA/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
假手术组	12	40.473 ± 7.592	1.211 ± 0.249	13.679 ± 2.913
缺血/再灌组	15	$64.068 \pm 9.698^{1)}$	$2.160 \pm 0.279^{1)}$	$7.520 \pm 1.782^{1)}$

注: 缺血/再灌组与假手术组相比, $^{1)} P < 0.01$.

3 讨 论

膳食中的脂质, 特别是胆固醇和饱和脂肪酸与心血管疾病明显相关^[10]. 本实验结果表明, 给大鼠喂含高脂的猪油和胆固醇的食物二个月后, 可显著改变血脂成分并导致血管壁病变, 主要表现为血清胆固醇、甘油三酯水平明显增高, 血清高密度脂蛋白-胆固醇含量降低, 血浆粘度及纤维蛋白原增加及主动脉壁出现类似于动脉粥样硬化的脂质沉积和损伤性改变。

本实验结果表明, 无论是高脂血症所导致的心肌损伤, 或是通过结扎及解除结扎冠脉所引起的心肌缺血/再灌损伤, 其生物膜具有共同

的膜脂代谢的异常变化, 即膜磷脂降低, 胆固醇及胆固醇/磷脂比增高, 反映膜功能的膜脂流动性降低以及与膜结合的 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性降低, 这些有内在联系的系列变化有利于客观评价生物膜损伤, 同时也表明生物膜损伤是心肌缺血性损伤及心肌缺血/再灌性损伤的共同表现及心肌细胞损伤的重要环节。

心肌缺血/再灌可导致心肌缺血/再灌性膜损伤; 高脂血症引起的血管异常变化亦可引起心肌缺血性膜损伤. 心肌缺血/再灌性膜损伤的机制已为大量实验研究所探讨, 一般认为与氧自由基引发的脂质过氧化反应的加强、胞内钙超载所导致的磷脂酶 A_2 的激活以及膜磷脂降

解引起的游离脂肪酸聚积和溶血磷脂的去垢样作用有关^[11]。本实验结果表明, 缺血心肌再灌后心肌匀浆中 SOD 活性明显降低, 脂质过氧化产物 MDA 含量及膜磷脂降解产物 FFA 含量明显增加, 提示氧自由基引发的脂质过氧化反应的增强及膜磷脂降解的加速是心肌缺血/再灌性膜损伤的重要环节。高脂血症所导致的心肌缺血性膜损伤, 除因缺血、缺氧引起能量代谢障碍、细胞酸中毒以及细胞色素氧化酶的功能失调和黄嘌呤氧化酶形成增多而导致氧自由基形成增加外, 似与高脂血症时血脂和生物膜的脂质交换有关。有资料报导, 高脂血症在改变血液脂质成分构成的同时, 还可通过体内的转运机制, 改变心肌膜脂的构成^[12]。本实验结果表明, 高脂饲料喂养的大鼠, 心肌线粒体膜脂含量显著降低, 膜胆固醇含量增高以及由于 CH/PL 比的升高使膜脂流动性降低而导致的膜结合酶 (Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase) 活性降低, 提示高脂饲料中的猪油所含的大量饱和脂肪酸, 有可能在与细胞膜的脂质交换中, 提高了

膜脂中饱和脂肪酸含量, 降低不饱和脂肪酸含量, 从而改变膜脂质组分, 而膜脂质组分的改变, 又直接影响膜的结构和功能。

参 考 文 献

- 1 Corr P B, Cross R W, Sobel B E *et al.* *Circ Res*, 1984; **55** (2): 135
- 2 Chien K R, Reeves J P, Buja L M *et al.* *Circ Res*, 1981; **48**: 711
- 3 崔 珏 主编. 医学生化检验手册. 天津: 天津科技出版社, 1982: 9202—9206
- 4 徐叔云. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 218—221
- 5 Chien K R, Abrams J, Serroni A *et al.* *J Biol Chem*, 1978; **253**: 4809
- 6 Esko J D, Gilmore J R, Glaser M *et al.* *Biochemistry*, 1977; **18**: 1881
- 7 Reeves J P, Sutko J L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; **76**: 590
- 8 Ohkawa H, Ohishi J, Yagi K *et al.* *Arch Biochem*, 1979; **95**: 351
- 9 叶应妩. 临床实验诊断学 (上). 北京: 人民卫生出版社, 1989: 499—502
- 10 Grundy S M. *J Nutr*, 1989; **119**: 529
- 11 Jolly S R, Kana W J, Bailie M B *et al.* *Circ Res*, 1984; **54**: 277
- 12 Kaplan M R. *J Cell Biol*, 1985; **101**: 446

血管紧张素 II 和阿片肽对 Fos 蛋白表达的影响*

陈素珍** 韩济生

(北京医科大学神经科学研究中心, 北京 100083)

摘要 利用抗体免疫沉淀技术研究了血管紧张素 II (A II), δ 受体激动剂 (DPDPE) 和 κ 受体激动剂 (NDAP) 对大鼠脑组织 c-fos 原癌基因表达的影响。结果表明, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ A II 可显著刺激脑组织中 Fos 蛋白的表达, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ DPDPE 和 0.1 $\mu\text{mol/L}$ NDAP 对 Fos 蛋白的表达亦有一定的诱导作用。A II 与 DPDPE 或 NDAP 共同处理组织, Fos 蛋白表达水平低于 A II 单独诱导的水平。结果表明阿片肽可抑制 A II 对 Fos 蛋白表达的作用。

关键词 Fos 蛋白, 脑, 血管紧张素 II, 阿片肽

多种外源刺激可引起中枢神经系统 c-fos 原癌基因的快速和一过性表达^[1]。Fos 蛋白与 c-jun 原癌基因的表达产物 Jun 蛋白形成二聚体。Fos/Jun 二聚体通过与特异的 DNA 序列结合调节某些基因的表达。因此 c-fos 被认为是信号传导过程中的“第三信使”, 在神经系统

的信号传导中通过调节某些特殊基因的表达而使短时程信号发挥长时程效应^[2]。血管紧张素 II (A II) 作为一种抗阿片物质, 在行为学和细

* 国家博士后科学基金和国家自然科学基金资助项目。

** 现在工作单位: 上海复旦大学遗传学研究所, 上海 200433。

收稿日期: 1993-06-05, 修回日期: 1993-08-31

Vector. Zhang Tonghai, Song Shiduo, Zhao Weicheng, Chen Kunming, Qi Wei, Hu Wenzhi, Wang Peifu, Fang Peihua. (*Department of Internal Medicine, The Second Teaching Hospital Tianjin Medical College, Tianjin 300211*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 338—341

A cDNA fragment encoding mature salmon growth hormone (sGH) was successfully amplified by polymerase chain reaction and the restriction recognition sequences were respectively introduced into the 5' end and 3' end of the amplified fragment. The recombinant secretion vector pOsGH153 containing genes coding for the *E. coli* ompA signal peptide and mature sGH was constructed and confirmed by restriction enzyme analysis and Southern blot hybridization with the oligonucleotide probe. Upon induction of IPTG, the sGH was expressed in *E. coli* cells and was secreted into the *E. coli* periplasma.

Key words salmon growth hormone, secretion vector, periplasma expression, *E. coli*

Expression of the Genes of the 70kD and 33kD Subunits of the Bovine Brain Vacuolar Proton Pump in *E. coli*. Zhang Ying, Peng Shengbin, Stone D. K., Xie Xiaosong. (*Department of Internal Medicine, Division of Molecular Transport, the University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX 75235, U. S. A.*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 342—347

The genes of the 70kD and 33kD subunits of the bovine brain vacuolar proton pump have been successfully expressed in *E. Coli*. The fragment of the gene of 70kD subunit was obtained by polymerase chain reaction (PCR) from an isolated cDNA encoding the 70kD subunit of the bovine brain vacuolar proton pump.

The fragment of the gene of 33kD subunit was also obtained by PCR from the bovine brain cDNA library. Two clones encoding 70kD and 33kD subunits were individually obtained by directly joining the PCR products into PET vector. Sodium dodecyl sulfate (SDS) -polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Western blot analysis of cultured transformants demonstrated high expression.

Key words vacuolar proton pump, 70kD and 33kD subunits, expression of genes

Myocardial Membrane Injury of Myocardial Ischemia/Reperfusion and Lipidaemia in Rat. Dong Chuanren, Yu Xuegang, Wang Xuejun. (*Department of Pathophysiology, Hubei Medical University, Wuhan 430071*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 347—350

Through the experiment model of the myocardial ischemia/reperfusion and lipidaemia in rat, both of them obviously induce membrane injury: a drop of membrane phospholipids, an increase in content of free fatty acids, cholesterol and cholesterol/phospholipid ratio, a decrease in membrane lipids fluidity and activity of membrane enzymes (Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase). These alterations perhaps related to the increase of lipids hyperoxidation induced by free radical and exchange of lipids.

Key words phospholipids/PD, liposomes/PD, myocardium, hemoperfusion, cell membrane

Effects and Interaction of Angiotensin II and Opioids on Fos Protein Expression. Chen Suzhen, Han Jisheng. (*Neuroscience Research Center, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 350—352