

techniques. After these two recombinant plasmids were transfected the retrovirus packaging cell line PA317, G418 resistant clones could produce defective EPO cDNA recombinant retrovirus successfully which could infect NIH 3T3 target cells and make them form typical resistant

clones in G418 selective medium. Moreover, in the genome of these infected target cells, hEPO cDNA was successfully integrated and expressed.

Key words hEPO, recombinant retrovirus, gene transfer

热休克对家蚕幼虫抗氧化酶活性的影响*

杨唐斌¹⁾ 梅尚筠²⁾

(华中师范大学生物系, 武汉 430070)

摘要 热休克诱导各龄蚕组织中的 SOD、CAT 活性显著升高, 如 40℃ 诱导活性最高, CuZn-SOD 和 MnSOD 活性也都增加. 40℃ 诱导 GSH-Px 活性显著升高, 而 36℃ 热休克诱导 GSH-Px 活性降低. 幼蚕各部位的抗氧化酶活性存在很大的差异, 以胸腹部最高, 头部次之, 后丝腺最低. 热休克对抗氧化酶活性的影响, 与幼蚕的生理状态相适应. 通过 SOD、CAT、GSH-Px 协同作用, 有助于维持机体正常生理机能.

关键词 抗氧化酶, 热休克应答, 家蚕

热休克应答 (heat shock response) 是有机体所具有的许多内源保护体系的一种, 能保护体内自身的平衡, 保护细胞免受应激环境变化造成的损伤. 热休克诱导 SOD 活性增加, 可能是受细胞中自由基水平升高的影响^[1]. 抗氧化酶包括超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px), 它们在体内共同发挥作用能有效地消除超氧自由基 (O_2^-)、过氧化氢 (H_2O_2) 和脂质过氧化物. 我们曾观察到热休克诱导小白鼠各组织中抗氧化酶活性增加, 其特点是协同调节^[2], 家蚕也呈现明显的热休克应答^[3]. 本实验进一步研究了热休克对不同龄期家蚕幼虫抗氧化酶的影响.

1 材料和方法

1.1 实验动物

杂交种家蚕 (朝霞蚕 × 黄鹤蚕) 第一龄、第二龄、第三龄、第四龄和第五龄幼虫 (湖北省农业科学院蚕种场提供).

1.2 家蚕幼虫的热休克

将蜕皮后 3 d 的不同龄蚕在不同温度下进行热休克, 36℃、40℃ 处理 1 h 作为实验组, 对照组保持温度 25℃.

1.3 组织酶液的提取

除去幼蚕的消化道, 用 4℃ 预冷的生理盐水 (含 1 mmol/L 葡萄糖) 清洗, 滤纸吸干水分, 称量, 于 10 倍体积制样液 (pH 6.5, 0.05 mol/L 磷酸钾缓冲液含 10 mol/L EDTA 和 0.04% 苯基硫脲) 匀浆, 4℃ 14 000 g 离心 45 min, 取上清液作酶活性分析.

1.4 酶活性测定

用 NBT 光化学还原法测定总 SOD 活性^[4]; 50 μ mol/L、2 mmol/L KCN 能部分或完全抑制 CuZn-SOD 的活性, 而对 MnSOD 活性无影响, 按 Geller 等^[5]的方法测 CuZn-SOD 和 MnSOD 的活性, 直接光谱法测 GSH-Px

* 国家自然科学基金资助项目.

¹⁾ 北京航天医学工程研究所.

²⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1995-04-07, 修回日期: 1995-09-04

活性^[6], 其活性以酶活性单位每克组织计算 (U/g); 用 KMnO_4 滴定法^[7] 测定 CAT 活性, 并以反应速度常数每克组织计算。

2 结果与讨论

2.1 热休克对不同部位 SOD、CAT 活性影响

家蚕属昆虫类变温动物, 外界环境尤其是温度对其生理周期影响很大。一般幼蚕正常发育的适宜温度范围为 $20 \sim 28^\circ\text{C}$ 。家蚕幼虫不同部位 SOD、CAT 活性不同, 胸腹部最大, 头部次之, 后丝腺作为一个特化细胞, 含大量丝蛋白, 因此 SOD、CAT 活性较低。表 1 是

自由基对生物体有强大的破坏作用: 可以使核苷酸主链断裂、碱基修饰和氢键破坏; 使氨基酸修饰、蛋白质聚合和断裂; 使脂质过氧化、破坏细胞的化学结构, 干扰其正常功能, 所以 SOD、CAT 活性的增加, 对保护蛋白质的结构有重要意义。热休克诱导 SOD、CAT 活性增加, 以适应幼蚕不同部位在不同条件下的生理需要。

2.2 热休克对不同龄蚕抗氧化酶活性的影响

热休克诱导不同龄蚕组织中的 SOD 活性显著升高, 见表 2。40℃ 热休克诱导 SOD 活性最高, 各龄期 SOD 活性分别增加了 28.5%、39.6%、11.8%、16.3%、24%, 第二龄蚕受温度的影响最大。热休克对 CuZn-SOD 和 MnSOD 活性的影响 (表 3)。热休克后第二、第三龄蚕 CuZn-SOD 和 MnSOD 活性都增加, 尽管 MnSOD 的量比 CuZn-SOD 的量低, 但 MnSOD 活性增加百分率较 CuZn-SOD 大, 说明热休克主要诱导 MnSOD 的生物合成。 KMnO_4 滴定法测定不同龄蚕 CAT 活性, 见表 2。热休克诱导 CAT 活性升高, 且 36℃ 诱导 CAT 活性最高。第二龄蚕受温度影响较大, 不同温度诱导 CAT 活性的升高均在 40% 以上。用直接光谱法测定不同龄蚕 GSH-Px 活性, 无显著差异 (表 2)。36℃ 热休克诱导 GSH-Px 活性降低, 40℃ 则活性升高, 这种现象随龄期的增加尤为明显。以第二龄蚕为例: 40℃ 热休克诱导 SOD、CAT、GSH-Px 活性分

表 1 热休克对第五龄蚕不同部位 SOD、CAT 的影响

温度	头 部		胸腹部		后丝腺	
	SOD	CAT	SOD	CAT	SOD	CAT
25℃	51.1 ±4.8	51.1 ±9.4	63.6 ±5.3	81.8 ±8.2	4.4 ±1.1	20.9 ±2.2
40℃	92.1* ±8.4	92.7* ±8.4	76.9* ±7.2	140.3* ±2.5	71.1* ±2.5	35.6* ±4.5

注: 与对照组比较, * $P \leq 0.01$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)。

热休克对第五龄蚕不同部位 SOD、CAT 活性的影响。40℃ 热休克 1 h, 后丝腺的 SOD、CAT 活性分别升高了 15、0.7 倍, 头部增加了 0.8、0.81 倍, 胸腹部仅增加 0.21、0.7 倍。热休克蛋白 (HSP) 的合成抑制了丝蛋白的合成^[2], 增加细胞中氧自由基的水平。氧

表 2 热休克对不同龄蚕抗氧化酶活性的影响

温 度	第一龄			第二龄			第三龄			第四龄			第五龄		
	SOD	CAT	GSH-Px	SOD	CAT	GSH-Px	SOD	CAT	GSH-Px	SOD	CAT	GSH-Px	SOD	CAT	GSH-Px
25℃	202.6 ±15.7	155.5 ±6.5	31.26 ±2.1	132.2 ±23.4	89.3 ±7.3	19.84 ±1.9	203.2 ±18.3	195.6 ±6.7	29.80 ±2.7	423.7 ±34.0	483.3 ±18.6	22.06 ±2.1	326.4 ±17.2	381.8 ±15.6	37.99 ±1.9
36℃	243.1* ±17.6	202.0* ±8.3	9.80* ±1.9	210.2* ±28.7	130.7* ±6.9	10.17* ±2.1	209.0 ±22.1	240.3* ±5.7	25.84* ±3.3	347.7* ±47.4	570.4* ±16.2	21.1 ±2.7	435.7* ±31.3	486.5* ±16.9	23.97* ±3.2
40℃	260.3* ±21.2	160.9 ±10.4	28.98 ±4.0	184.6* ±21.1	133.1* ±11.7	27.36* ±3.1	232.8* ±24.5	156.3* ±6.4	53.65* ±4.2	492.9* ±56.2	384.6* ±15.8	40.0* ±2.6	404.8* ±34.4	463.5* ±17.4	76.27* ±3.6

注: 与对照组比较, * $P \leq 0.01$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)。

别上升了 39.6%、49%、38%，热休克使幼蚕背血管的搏动次数增多，血液循环速率加快，呼吸作用加强，致使体内 O_2 的大量消耗， O_2 是增加细胞间 O_2^- 的主要原因， O_2^- 作

为诱导剂诱导了 SOD 的生物合成^[8]。SOD 活性的升高，其歧化反应产物 H_2O_2 在细胞内短期积累， H_2O_2 对机体有毒害作用^[9]，需要被还原清除。

表 3 热休克对第二、三龄蚕 CuZn-SOD 和 MnSOD 活性的影响

温度	第二龄					第三龄				
	SOD 总活	CuZn- SOD	占总活 百分数	MnSOD	占总活 百分数	SOD 总活	CuZn- SOD	占总活 百分数	MnSOD	占总活 百分数
25℃	132.2 ± 23.4	126.6 ± 22.3	95.8	5.4 + 1.2	4.2	203.2 ± 18.3	187.0 ± 15.7	92.0	21.2 ± 1.2	8.0
36℃	210.0* ± 28.7	199.8* ± 26.6	95.1	10.2* ± 1.1	4.9	209.0 ± 22.1	198.2* ± 15.7	94.8	10.8* ± 2.1	5.2
40℃	184.6* ± 21.1	172.7* ± 24.8	93.6	11.9* ± 1.3	6.4	232.8* ± 24.5	199.2* ± 14.4	85.6	33.6* ± 3.5	14.4

注：与对照组比较，* $P \leq 0.01$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)。

2.3 作用机理

动物体内各组织细胞清除 H_2O_2 的方式不完全相同，为清除 O_2^- 和 H_2O_2 ，增强自由基代谢，在热休克期间抗氧化酶协同作用，为防止机体损伤起保护作用：a. 不同温度下 SOD、CAT、GSH-Px 的最适配比可能与细胞内 H_2O_2 和 O_2^- 的浓度有关。热休克时 SOD 活性增加，CAT 活性 36℃ 时为最高，40℃ 增加量小于 36℃，而 GSH-Px 则由 36℃ 低于正常值至 40℃ 时转为增高，可能是补偿性分解由于 CAT 活性下降所积累的 H_2O_2 ，虽然 GSH-Px 在催化反应中需要 GSH 作为供氢体，但热休克也促进 GSH 增加，故 GSH-Px 活性增加也是对 CAT 活性的一种协同调节作用，保护蚕体免受热损伤。b. 三种酶在亚细胞中的分布也是互补性的，SOD 和 GSH-Px 主要分布在细胞的胞液和线粒体基质中，CAT 主要存在于过氧化物酶体中，这种定位的互补性具有相互协调、相互保护的生理意义。c. 三种酶在体内构成相互保护的防御系统，热休克后通过清除 O_2^- 和 H_2O_2 ，以减轻和阻断脂质过氧化作用的一级引发作用。GSH-Px 还原脂质过氧化

物来减轻和防止二级引发作用，因而能防止和减轻膜损伤和细胞中毒。

热休克诱导家蚕合成了 HSP，且家蚕的耐热性的获得与 HSP 呈正相关^[3]。热休克诱导 SOD 活性增加与耐热性的获得有关^[10]。Priville 等^[1]认为热休克可能通过膜结构的改变使电子传递链解偶联而影响细胞内自由基的水平，从而诱导了 SOD 的合成。本实验结果表明：热休克诱导家蚕三种抗氧化酶协同作用，共同构成体内自由基防御体系，清除过量的自由基。所以耐热性的获得不仅与 HSP 的合成有关，而且与增强自由基的代谢能力有关。

参 考 文 献

- 1 Priville C T, Fridovich I. Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 84: 2723
- 2 袁均林, 梅尚筠, 梅星元. 生物化学杂志, 1993; 9 (3): 368
- 3 杨唐斌, 梅尚筠. 生物化学杂志, 1993; 9 (6): 736
- 4 杨唐斌, 梅尚筠. 生物化学与生物物理进展, 1991; 18 (6): 468
- 5 Geller B L, Winge D R. Anal Biochem, 1983; 128: 86
- 6 Friedrich B, Isolde R. Chem Abstr, 1984; 101 (25):

225802

- 7 Cohn G, Dembiec D, Marcus J. Anal Biochem, 1970; 34: 30
- 8 Hassan H M, Fridovich I. J Biol Chem, 1978; 253: 8148
- 9 Chance B, Sies H, Boveris A. Physiol Rev, 1979; 59: 527
- 10 Loven D P, Leeper D B, Oberley L W. Can Res, 1985; 45: 3029

The Effect of Heat Shock on the Activities of Antioxidative Enzymes in Silkworm (*Bombyx mori*). Yang Tangbin, Mei Shangyun (Department of Biology, Central China Normal University, Wuhan 430070, China).

Abstract Heat shock induced significant increase of the SOD and CAT activities in silkworm of various ages, such as at 40°C the induced SOD activity was maximal, where both

the activities of CuZn-SOD and MnSOD were also increased. After exposure at 36°C for 1h, GSH-Px activity was decreased, but it was increased at 40°C. Among the different regions of silkworm, the activities of SOD and CAT have great diversities in the order of priorities: thoracicoabdominal region, head region, posterior silk gland. Heat shock also had different influences on the activities of the antioxidative enzymes of different regions to adapt different physiological states of silkworm. The antioxidases work cooperative interaction, so that the normal physiological functions are maintained.

Key words antioxidative enzyme, heat shock response, silkworm

一种双顺反子表达载体的构建及应用的研究*

刘新平 陈苏民 陈南春 赵忠良 柴玉波 崔有宏¹⁾ 薛泳涛

(第四军医大学生物化学及分子生物学教研室, 西安 710032)

摘要 将表达载体 pEC34 中的一段寡核苷酸序列, 其中包括翻译增强子序列、SD 序列、终止码、起始码及两端的限制性内切酶位点, 插入 GST 基因后, 构建成双顺反子的表达载体. 利用此载体表达了非融合的人骨形成蛋白 2A (hBMP2A) 和人骨形成蛋白 3 (hBMP3) C 端肽段. 将第一顺反子基因 (GST 基因) 切小到原来的 1/3 时, 则位于下游的第二顺反子基因编码的蛋白质在大肠杆菌中的表达量增加一倍.

关键词 双顺反子, 人骨形成蛋白基因, 基因表达调控, 表达载体

虽然外源基因在大肠杆菌中的表达已积累了不少知识和经验, 但迄今没有一个表达载体能保证插入的外源基因都能高表达, 以往的实验经验是: 尽管使用了强转录启动子 (如 P_L、P_R、tac 等), 用 RNA 印迹能检出目的 mRNA 的存在, 却常不见目的蛋白的表达^[1]. 目前已知最关键问题是在翻译起始上. 因此人们就构建表达融合蛋白的载体来设法保证目的基因的表达, 如 pGEX-4T 等^[2], 但要去除 N 端的融合肽段常有困难或手续繁杂.

本文利用 GST 基因作第一顺反子, 将目的基因人骨形成蛋白 2A (human bone morphogenetic protein 2A, hBMP2A) 和人骨形成蛋白 (hBMP3) cDNA 的 3' 端片段分别做为第二个顺反子. 在这两个顺反子之间插入了大肠杆菌翻译增强子序列、第二个 SD 序列、第一顺反子终止码 TAA 和第二顺反子起始码 ATG

* 国家“八五”科技攻关资助项目 85-722-07.

¹⁾ 兰州军区军医学校生化教研室.

收稿日期: 1995-05-15, 修回日期: 1995-09-05