

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

胞内某些水平的实验中已得到证实^[3]. 有研究表明 A II 可诱导多种细胞的 c-fos 表达^[4]. 为探讨 A II 与阿片肽在分子水平的相互作用, 本工作研究了 A II, δ 阿片受体激动剂 DPDPE 和 κ 阿片受体激动剂 NDAP 对大鼠脑组织中 Fos 蛋白表达的影响以及它们的相互作用.

1 材料和方法

1.1 材料

[³⁵S] 甲硫氨酸 (1128.5Ci/mmol) 购自美国 NEN 公司. c-fos 蛋白抗体是美国 Oncogene Science, Inc. 产品. DMEM 培养基, 无甲硫氨酸的 DMEM 培养基, 小牛血清 (FCS), 免疫沉淀素 (immunoprecipitin) 和蛋白质分子量标准均购自美国 GIBCO 公司. NDAP ([N-methyl-Tyr¹, N-methyl-Arg⁷, D-Leu³] 强啡肽-8) 由日本 Eisai 公司的 Tsukuba 博士馈赠. A II 和 DPDPE (D-pen², D-pen⁵-脑啡肽) 购自美国 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 组织培养 成年 Wistar 大鼠 (雌雄不拘) 断头处死, 无菌条件下迅速取出脑组织, 去皮层和小脑, 剪碎, 用 DMEM 培养液洗数次后接种于培养皿中, 以含 10%FCS 的 DMEM 培养液 (100mg 组织每 ml 培养液) 37℃, 5%CO₂ 培养 2h. 然后换成 1ml 无甲硫氨酸的 DMEM 培养液, 同时加 100 μ Ci/ml 的 [³⁵S] 甲硫氨酸和各种处理药品, 继续培养 2h. 对照组不加药物处理.

1.2.2 免疫沉淀 根据 Gough 等^[5]的方法制备细胞核, 于 RIPA 缓冲液 [10mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 150mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 1% aprotinin, 0.25mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF)] 中制备细胞核悬液^[6]. 1ml 悬液加 10 μ l (1:100) c-fos 多克隆抗体, 4℃ 孵育 24h, 然后加 10 μ l 羊抗兔 IgG 孵育 1h. 加 250 μ l 10% 金黄色葡萄球菌悬液沉淀免疫复合物. 沉淀蛋白质用 10% SDS-PAGE 分离、放射自显影^[7]. 利用德国 Opton 公司的 IBAS 图象扫描系统对自显影条带作定

量扫描, 峰面积和密度以对照组的吸光度 (A) 读数为 1.0, 计算 Fos 蛋白变化的相对值. 扫描定量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并进行 *t* 检验.

2 结 果

2.1 A II 和 DPDPE 对大鼠脑组织 Fos 蛋白形成的影响 由图 1 可知, 对照组有很低的 Fos 蛋白形成. 0.1 μ mol/L A II 处理 2h 后, 脑组织的 Fos 蛋白形成显著增加, 0.1 μ mol/L 的 DPDPE 也可引起大鼠脑组织的 Fos 蛋白表达增加, 但在相同的浓度下, A II 的作用大于 DPDPE. 用 0.1 μ mol/L A II 和 0.1 μ mol/L DPDPE 同时处理组织, 结果表明, Fos 蛋白的表达水平低于 A II 单独诱导的水平, 高于 DPDPE 单独诱导的水平. 提示在体外短期组织培养条件下, DPDPE 可能削弱 A II 对大鼠脑组织 Fos 蛋白表达的显著诱导作用.

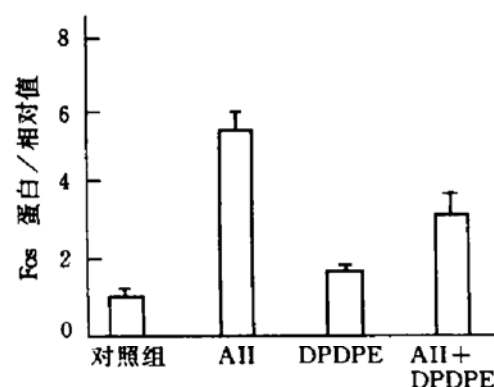


图1 A II 和 DPDPE 对大鼠脑组织 Fos 蛋白的影响

10%SDS-PAGE 和放射自显影图谱的定量扫描结果 (三次实验结果). 处理药物浓度均为 0.1 μ mol/L. 对照组 (不加药物处理) Fos 蛋白的相对水平为 1.03 ± 0.06 . 与对照组比较, A II + DPDPE 处理者, $P < 0.05$; A II 处理者, $P < 0.01$.

2.2 A II 和 NDAP 对大鼠脑组织 Fos 蛋白的影响 图 2 显示, 与图 1 结果相似, 0.1 μ mol/L A II 可明显刺激大鼠脑组织 Fos 蛋白的表达. 0.1 μ mol/L NDAP 亦可刺激大鼠脑组织的 Fos 蛋白表达, 与对照组比较尚未达显著水平. 用

0.1 μ mol/L A II 和0.1 μ mol/L NDAP 同时处理组织, Fos 蛋白表达量处于 A II 和 NDAP 单独作用的中间, 同样提示 NDAP 可能抑制了 A II 对大鼠脑组织 Fos 蛋白表达的刺激作用。

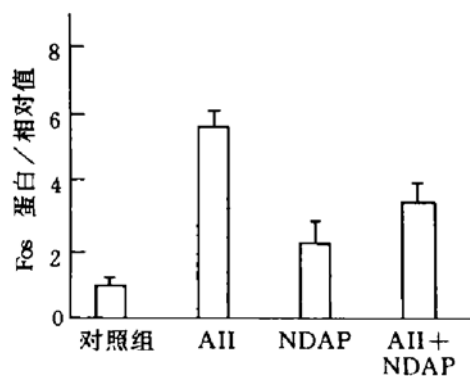


图2 A II 和 NDAP 对大鼠脑组织 Fos 蛋白的影响

10%SDS-PAGE 和放射自显影图谱的定量扫描结果 (三次实验结果)。处理药物浓度均为0.1 μ mol/L。对照组 (不加药物处理) Fos 蛋白的相对水平为 1.09 ± 0.11 。与对照组比较, A II + NDAP 处理者, $P < 0.05$; A II 处理者, $P < 0.01$ 。

3 讨 论

多种刺激因子, 包括神经介质, 神经调质 (neuromodulators) 和某些离子通道的改变等均可引起 c-fos 原癌基因在中枢神经系统的表达。但是, 有关 c-fos 原癌基因在脑内表达的工作多用原位杂交和 Northern 杂交进行 c-fos mRNA 水平的研究, Fos 蛋白的生成研究则常用免疫组化的方法^[8-11]。本工作首次报导了利用免疫沉淀方法研究 A II 和阿片肽对大鼠脑组织 Fos 蛋白表达的影响以及它们的相互作用。结果表明, A II 可刺激大鼠脑组织 Fos 蛋白生成显著增加, δ 阿片受体激动剂 DPDPE 对 Fos 蛋白的生成也有一定的诱导作用, 而 κ 阿片受体激动剂 NDAP 对 Fos 蛋白的生成无显著作用。行为学实验的研究中发现 A II 可以拮抗阿片镇痛^[12]。机理研究表明, A II 可以拮抗吗啡抑制的突触小体 Ca^{2+} 摄取和 cAMP 水平^[3,13]。

本文结果则要复杂些。DPDPE 虽然本身可以诱导 c-fos 表达, 但和 NDAP 一样在与 A II 共同处理组织时, 均显示对 A II 刺激的 c-fos 表达有抑制作用。提示在本实验条件下, 阿片肽削弱了 A II 诱导的大鼠脑组织中 c-fos 的表达, 可见阿片肽可以抑制抗阿片肽 A II 的作用。

有研究表明, A II 通过促进 Ca^{2+} 内流诱导平滑肌细胞的 c-fos 表达^[14]。已知 κ 阿片受体与钙通道偶联, 关闭钙通道, 降低细胞钙浓度^[15], δ 阿片受体激动剂可抑制大鼠脑突触小体 Ca^{2+} 的摄取^[16]。我们推测阿片肽对细胞钙水平的抑制是它们削弱 A II 诱导的 c-fos 表达的机理之一。阿片肽是否在细胞内其他水平抑制 A II 的作用, 是否可以抑制其他抗阿片肽 (CCK) 等的作用以及它们相互作用的机理有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Morgan J I, Curran T. Annu Rev Neurosci, 1991; **14**: 421
- 2 Morgan J I, Cohen D R, Hempstead J L *et al.* Science, 1987; **237**: 192
- 3 王克威, 韩济生. 北京医科大学学报, 1989; **21** (1): 7
- 4 Taubman M B, Berk B C, Izumo S *et al.* J Biol Chem, 1989; **264**: 526
- 5 Gough N M. Anal Biochem, 1988; **173**: 93
- 6 Togni P D, Niman H, Raynond V *et al.* Mol Cell Biol, 1988; **8**: 2251
- 7 Chamberlian J P. Anal Biochem, 1979; **98**: 132
- 8 Cole A J, Saffen D W, Baraban J M *et al.* Nature, 1989; **340**: 474
- 9 Sagar S M, Sharp F R, Curran T. Science, 1988; **240**: 1328
- 10 Herrern D G, Roberston H A. Brain Res, 1990; **510**: 166
- 11 Vendrell M, Pujol M J, Tusel J M *et al.* Mol Brain Res, 1992; **14**: 285
- 12 Kaneko S, Tamura S, Takagi H. Neuropharmacology, 1985; **24**: 1131
- 13 王晓明, 王克威, 韩济生. 生理学报, 1989; **41** (2): 179
- 14 Knwaha Y, Sunako M, Tsuda T *et al.* Biochem Biophys Res Commu, 1988; **150**: 52
- 15 Cherubini E, North R A. Proc Natl Acad Sci USA, 1985; **82**: 1860
- 16 Barr E, Leslie S W. Brain Res, 1985; **329**: 280

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

It has been reported that angiotensin I (A I) has antioioid effect. However, the mechanism of this action is still not understood. To evaluate a possible interaction on c-fos protooncogene expression between A I and DPDPE (δ receptor agonist) or NDAP (κ receptor agonist), the changing patterns of Fos protein in rat brain (less cortex and cerebellum) tissue induced by them were determined by immunoprecipitation. The results indicated that A I at $0.1 \mu\text{mol/L}$ markedly evoked the Fos protein expression in brain tissue. Meanwhile, both DPDPE ($0.1 \mu\text{mol/L}$) and NDAP ($0.1 \mu\text{mol/L}$) could induce Fos protein increase in brain although their effects were less than that induced by A I. The levels of Fos protein expression by A I plus DPDPE or NDAP are lower than that induced by A I individually. It is suggested that the action on c-fos expression between A I and opioids is antagonistic. And opioids may weaken the evoked action of A I on c-fos expression in the brain.

Key words Fos protein, brain, angiotensin I, opioids

Determination and Analysis of Pig Brain Gangliosides. Pan Ying, Huang Rubin, Wang Zesheng, Tong Dashan, Shi Xiaoling. (Department of Biochemistry, Capital Institute of Medicine, Beijing 100054). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 353—355
Gangliosides are one of the glycosylceramides, which are particularly abundant in the central nervous system of vertebrates. The content and components of pig brain Gls were detected. There were 0.0894% (W/W) Gls presented in the pig brain. It was about 0.39% (W/W) of total lipid. The main components were GM1, GD3, GD1a, GD1b and

GT1b. GM1 and GD1a of the pig brain were higher than that of human brain.

Key words gangliosides (Gls), pig brain, determination of content

Subtyping of the Gc System by Immobilized pH Gradients Isoelectrofocusing. Guo Yaojun, Guo Qiang, Huang Lili, Yu Zhongyi. (Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 356—359

The distribution of Gc subtypes of 201 unrelated, healthy donors in the Han population in Beijing were investigated. Gc^{1F} is 0.3698, Gc^{1S} , 0.2812, Gc^2 , 0.3490. There was good agreement between the observed and the expected value. ($\Sigma x^2 = 1.057$, $P > 0.70$).

Key words immobilized pH gradients, isoelectrofocusing, Gc subtypes of human serum, immunofixation

Determination of Globin Gene Expression by RNase Protection Assay. Liu Qinghui, Liu Depei, Liang Zhiquan. (Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 359—362

Quantitative analysis of mRNA is an important technique in the study of gene expression regulation. RNase protection assay shows higher sensitivity and easier operation than Dot blot and Northern blot. The expressions of human β E-globin gene and mouse α -globin gene in transgenic mice were successfully analyzed by RNase protection assay.

Key words RNase protection, globin gene, transgenic mice

Direct Micro Determination of Glutathione Peroxidase Activity in Mice Blood. Rong