

NMDAR1 mRNA Expression Increased After Seizure in Genetically Epilepsy-Prone Rat.

SHAN Weisong, ZHANG Guorong, ZHANG Yuehua, LIANG Yingwu, LI Chunying, WU Xiru (The First Teaching Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100034, China).

Abstract N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) are implicated in several neuropathological conditions including epilepsy. As a model of epilepsy, genetically epilepsy-prone rat was chosen to investigate the changes in expres-

sion of NMDAR1 mRNA after seizure in different brain regions. The results showed that cerebral cortex, hippocampus, subcortex and inferior colliculus had a time-dependent modulation of the NMDAR1 mRNA expression and increased about 111%, 113%, 165%, 202% above control values, respectively in 24h after seizure. This phenomenon demonstrates that NMDAR1 mRNA was regulated by seizure and may contribute to epileptic susceptibility.

Key words N-methyl-D-aspartate receptor, genetically epilepsy-prone rat, gene, expression

亚硒酸钠对大鼠晶体蛋白基因转录的影响*

王 波¹⁾ 何海鹰 贾维红 张家萍 梁 康 张昌颖

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 对不同浓度的亚硒酸钠在体外对 αA 及 $\beta 23$ 晶体蛋白基因转录的影响作了初步的研究. 结果发现, 随着亚硒酸钠浓度的升高, αA 基因的转录下降; 而当亚硒酸钠浓度升至 5×10^{-5} mol/L 时, αA 基因的转录又呈反跳性回升; 提示 αA 晶体蛋白在晶体细胞内, 至少应答于高浓度的硒, 可能作为一种应激蛋白表达. 而随着硒浓度的增加, $\beta 23$ 基因的转录则呈现出先升后降的双相变化; 提示一定浓度的硒可能借某种机制影响或改变晶体上皮细胞的分化状态.

关键词 亚硒酸钠, 晶体上皮细胞, 晶体蛋白基因, 转录, 分化, 应激

晶体发育过程中存在着各类晶体蛋白的分化表达. 晶体蛋白基因表达时间上的调控, 导致晶体蛋白多肽链精确的空间分布, 后者规定了透明晶体折射率梯度的光学特性^[1]; 同时, 晶体的光学特性还要求其纤维内的晶体蛋白具有很高的浓度, 约占晶体蛋白质总量的 90% 以上. 脊椎动物的晶体蛋白主要是 α 、 β 、 γ 晶体蛋白. 近年来, 对 αB 晶体蛋白研究的一个主要突破是发现它不仅限于晶体. 在非晶体组织中, αB 晶体蛋白实际上是一种小热休克蛋白 (SHSP)^[2], 具有分子伴侣功能^[3], 其表达可由热、渗透应激及亚硝酸盐应激所诱导^[4], 并赋予细胞耐热性; 最近有人报道 αA 晶体蛋白也具有分子伴侣活性, 也能赋予细胞

耐热性, 但尚未证实其热诱导性^[5]. 作为晶体上皮细胞分化标志的 β 晶体蛋白, 易于氧化, 在白内障发病时较早发生改变.

我们以前的工作表明, 一定量的亚硒酸钠 (Na_2SeO_3) 在体内、外均能造成晶体上皮细胞 DNA 损伤^[6], 并且可能关闭 (block) 增殖区晶体上皮细胞的细胞周期, 使细胞停滞于 S 和/或 G_2 期^[7]. 晶体中晶体蛋白的数量与质量及分子排列都同其透明性直接相关. 因此, 我们觉得有必要对 Na_2SeO_3 处理后, 晶体上皮细胞晶体蛋白基因转录会出现怎样的反应,

* 国家自然科学基金资助项目.

¹⁾ 齐齐哈尔医学院生化教研室, 齐齐哈尔 161041.

收稿日期: 1996-03-01, 修回日期: 1996-08-02

作一初步探讨.

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar 大鼠由北京医科大学科学动物部提供.

1.2 试剂

胰蛋白胨 (trytone)、酵母提取物 (yeast extract) 为 OXIOD 公司产品; 核酸内切酶 EcoR I、Pst I、RNA 酶、琼脂糖均为 Promega 公司产品; 199 培养基、胎牛血清、HEPES、牛血清白蛋白 (BSA)、3-(N-玛琳代) 丙磺酸 (MOPS)、DEPC 为 Sigma 公司产品; λ DNA + Hind III 分子质量标准、鲑精 DNA, 购自华美生物工程公司; α -³²P-dCTP 为福瑞公司产品; 小鼠晶体蛋白 cDNA 片段 (附载体及宿主菌) 由美国 NEI (National Eye Institute) 分子及发育生物学实验室 Piatigosky 教授惠赠; 人的 β -actin cDNA 探针 (附载体) 由北京医科大学第三附属医院心内科叶正博士惠赠. 其余试剂均为国产分析纯试剂.

1.3 仪器及其他材料

电泳仪为 LKB 公司产品; 水平电泳槽为国营北京六一厂出品; 硝酸纤维素膜 (NC 膜) 为 Amersham 公司产品; X 光胶片为 Kodak 产品.

1.4 晶体蛋白 cDNA 探针的制备

质粒的快提及大提均参照 Rasheed 等^[8]方法稍加修改进行. 酶切鉴定及目的片段回收: 酶解反应参照《分子克隆》第二版有关方法进行^[9]; 目的片段回收用“V”字形内槽电洗脱法, 电泳条件为 120 V, 30 min. 探针标记用 Promega 公司随机引物试剂盒, 按其操作手册进行.

1.5 晶体上皮细胞培养及 Na₂SeO₃ 处理

细胞培养按本室方法进行, 硒处理前先换含 5% 胎牛血清的 199 培养基, 培养 12 h, 以同步化细胞. 然后, 分别以浓度为 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 5×10^{-6} 、 5×10^{-5} mol/L 的亚硒酸钠处理细胞; 处理时间为 10 h, 条件为 37℃, 5% CO₂.

1.6 细胞总 RNA 提取

按 Huang 等^[10]的方法, 稍加修改进行.

1.7 RNA 印迹

有关操作均参照《分子克隆》第二版有关章节方法进行^[9].

2 结 果

2.1 质粒 DNA 的提取及酶切鉴定

小鼠 β 23 晶体蛋白 cDNA (pMB 23Cr2)、

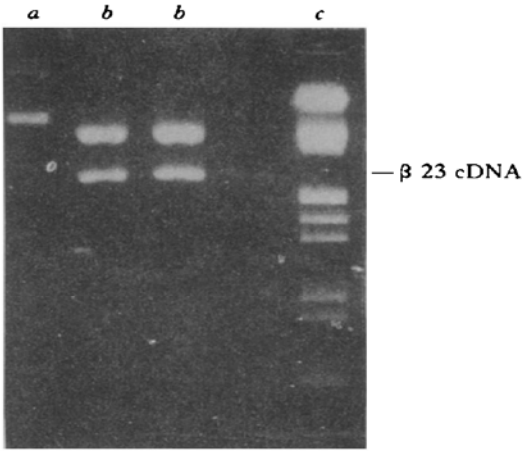


图 1 pMB 23Cr2 质粒酶切鉴定
a: pMB 23Cr2 质粒; b: pMB 23Cr2+ EcoR I ;
c: λ DNA+ Hind III.

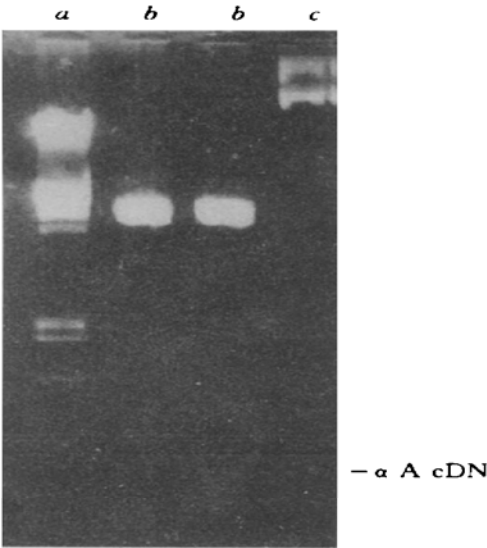


图 2 pMa ACr2 质粒酶切鉴定
a: λ DNA+ Hind III; b: pMa ACr2+ Pst I ;
c: pMa ACr2 质粒.

α A 晶体蛋白 cDNA (pM α ACr2) 及人 β -肌动蛋白 (β -actin) cDNA 的提取及酶切鉴定见图 1~3.

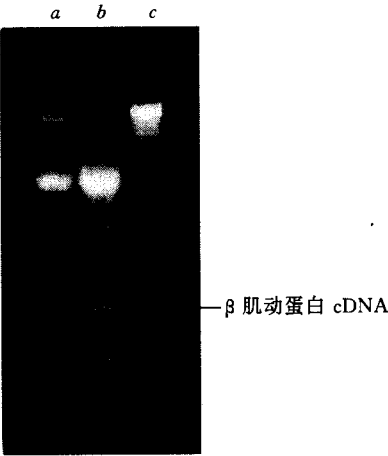


图 3 β -actin 质粒酶切鉴定

a: β -actin 质粒; b: β -actin + Pst I;
c: λ DNA + Hind III.

2.2 RLE 细胞总 RNA 提取及鉴定

由图 4 可见清晰的 28 S, 18 S 及 5 S 条带; 28 S:18 S=2:1. $A_{260}/A_{280}=2.1$, 每孔细胞提取总 RNA 约为 15~25 μ g.

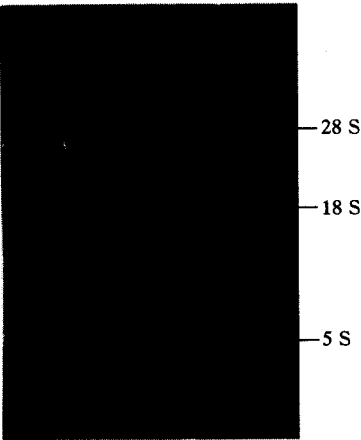


图 4 总 RNA 琼脂糖电泳

2.3 RNA 印迹

从图 5 可见, 不同浓度的 Na_2SeO_3 对 RLE 细胞 α A、 β 23 晶体蛋白转录有不同影响.

随 Na_2SeO_3 浓度的增高, α A 基因的转录有一个降低再升高的过程; 而 β 23 基因的转录在 Na_2SeO_3 浓度为 5×10^{-6} mol/L 时才出现, 在 10^{-6} mol/L 时保持一定水平, 至 10^{-5} mol/L 时又降下来. 辉度扫描后, 经过各条带 (区) 绝对积分光密度 (IOD) 值的计算, 显示出与目测基本一致的结论. 为了更为客观一些, 我们采用各条带的 IOD 与 β -actin 的 IOD 的比值来相比较, 见表 1.

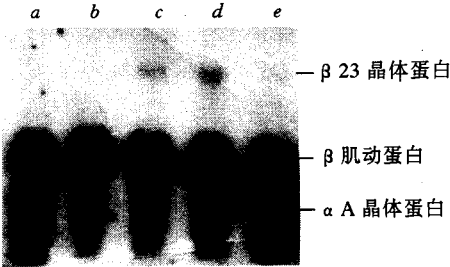


图 5 以 α A-、 β 23-晶体蛋白及 β -肌动蛋白 cDNA 做探针, 同一张硝酸纤维素膜上的 RNA 印迹杂交

a: 正常 RLE 细胞; b: 经 10^{-7} mol/L Na_2SeO_3 处理的 RLE 细胞; c: 经 10^{-6} mol/L Na_2SeO_3 处理的 RLE 细胞; d: 经 5×10^{-6} mol/L Na_2SeO_3 处理的 RLE 细胞; e: 经 5×10^{-5} mol/L Na_2SeO_3 处理的 RLE 细胞.

表 1 α A-、 β 23-晶体蛋白 IOD 与 β -肌动蛋白 IOD 的比值

Na_2SeO_3 /mol·L ⁻¹	对照	1×10^{-7}	1×10^{-6}	5×10^{-6}	5×10^{-5}
IOD(α A/ β -actin)	0.4424	0.2020	0.1658	0.1572	0.3876
IOD(β 23/ β -actin)	0.0235	0.0020	0.0465	0.0591	0.0280

3 讨 论

有关 Se 对晶体上皮细胞基因表达的调控、

转录的影响迄今尚未见报道。有人用 Na_2SeO_3 等含 Se 化合物在体外处理不同的肿瘤细胞株^[11], 发现低浓度 ($10^{-8} \sim 10^{-7}$ mol/L) 时, Se 能刺激细胞增殖, 而 Se 浓度升高至高于 10^{-6} mol/L 时, 则抑制细胞增殖, 同时抑制细胞的运动能力, 再升高浓度则表现为毒理作用, 可以造成 DNA 单链断裂。这可以视作硒影响细胞基因表达及转录的一个旁证, 因为细胞增殖分化过程中伴随着多种基因的表达。我们的实验发现, 随着 Na_2SeO_3 浓度的升高, αA 基因的转录受抑, 在达到毒理剂量的硒时 (5×10^{-5} mol/L), αA 的转录显示出反跳性升高, 我们以前的工作表明 5×10^{-5} mol/L Na_2SeO_3 已足以造成严重的 DNA 单链断裂, 那么, 此浓度下 αA 转录的增高是否意味着一种应激反应呢? 由于我们没有 αB 的 cDNA 探针, 所以无从确定这种升高是否与 αB 有关。但 αA 与 αB 有很高的同源性, 其 mRNA 的大小也非常接近, 是否可以考虑不排除 αA 和/或 αB 在晶体内, 于某种应激状态下能发挥 αB 在晶体外组织的应激蛋白的功能 (作为小热休克蛋白应激表达)? 尚待更深入的研究。

在实验中还发现随着 Na_2SeO_3 浓度的升高, $\beta 23$ ($\beta\text{A3/A1}$) 的基因转录呈现出先升高后下降的双相变化, 即在 5×10^{-6} mol/L 与 1×10^{-6} mol/L Na_2SeO_3 时升高, 而到 5×10^{-5} mol/L Na_2SeO_3 时又下降, 但仍高于对照。 $\beta 23$ 的基因在无 Na_2SeO_3 干涉的实验条件下, 不表现出明显的转录, 经 Na_2SeO_3 处理出现上述变化。按照目前的知识, 在体内的情况下, β 晶体蛋白的 mRNA 只在晶体弓形区开始分化伸长的细胞内才出现, 即 β 晶体蛋白 (mRNA) 是晶体细胞开始分化的一个标志^[12,13]。是否某种浓度的 Se 能加快晶体细胞的分化, 还需要进一步的实验证据。

此外, 近年来多种硒蛋白的发现及能识别 UGA 的硒半胱氨酰 tRNA^{Ser} (selenocysteyl-tRNA^{Ser}) 的发现, 使人们得到并重视 Se 对于细胞翻译水平的某些影响及作用^[14]。我们的实验提示, 进一步研究 Se 作用于细胞转录水

平的机制及与分化的关系, 对硒性白内障发病机制, 以及对有关晶体蛋白的结构和功能认识, 都是很有必要的。

参 考 文 献

- 1 Wistow G J, Piatigorsky J. Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Am Rev Biochem*, 1988, **57**: 479~504
- 2 Klemenz R, Frohli E, Steiger R H *et al.* Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 3652~3656
- 3 Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 10449~10453
- 4 Dasgupta S, Hohman T C, Carper C. Hypertonic stress induces α B-crystallin expression. *Exp Eye Res*, 1992, **54**: 461~470
- 5 van den IJssel P R L A, Overkamp P, Knauf V *et al.* α A-crystallin confers cellular thermoresistance. *FEBS Letter*, 1994, **355**: 54~56
- 6 何海鹰, 王 波, 贾维红等. 亚硒酸钠诱发的晶状体上皮细胞 DNA 损伤及修复. *生物化学杂志*, 1996, **12** (3): 253~257
- 7 Cenedella R J. Cell cycle specific effects of selenium on the lens epithelium studied *in vivo* by the direct chemical approach. *Curr Eye Res*, 1989, **8**: 429
- 8 Lee S Y, Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *Bio/Tech*, 1990, **9** (6): 676
- 9 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁等译. *分子克隆实验指南*. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992, 23~371
- 10 Huang M N, Katherine A H. A simple and fast method to extract RNA from tissue culture cells. *Bio/Tech*, 1990, **9** (6): 693
- 11 Nano J L. Effect of selenite on the growth of three human colon cancer cell lines. *Biol Trace Elem Res*, 1989, **20**: 31
- 12 Mc Avoy J W. Cell division, elongation and distribution of α -, β -, γ -crystallins in the rat lens. *J Embryol Exp Morphol*, 1978, **44**: 149~165
- 13 Mc Avoy J W. β - and γ -crystallin synthesis in rat lens epithelium explanted with neural retina. *Differentiation*, 1980, **17**: 85~91
- 14 Lee B J. Selenocysteyl tRNA^{[ser]sec} Gene is ubiquitous within the animal kingdom. *Mol Cell Biol*, 1990, **10** (5): 1940~

The Effect of Selenite on the Crystallin Genes Transcription of Rat Lens Epithelial Cells.

WANG Bo, HE Haiying, JIA Weihong, ZHANG Jiaping, LIANG Kang, ZHANG Changying (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

Abstract The transcriptional changes of α A-crystallin and β 23-crystallin genes in response to various concentrations of selenite were studied in RLE cells *in vitro*. The results showed that along with the increasing of selenite concentra-

tion, α A-crystallin transcription decreased, then went up sharply at 5×10^{-5} mol/L Na_2SeO_3 . The results suggested that α A-crystallin might at least respond to high concentration of selenite and express as a stress protein. But β 23-crystallin gene transcription showed increasing followed by decreasing with the increase of selenite concentration. It indicated that selenium might play a critical role in lens epithelial cell differentiation.

Key words selenite, lens epithelium, crystallin gene transcription, differentiation, stress

五个氨基酸磷光性质的研究

黄如衡

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 研究了5个氨基酸的磷光特性、光谱、寿命和最小检测量。以色氨酸 (Trp) 的磷光最强, 在 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 290/438$ nm, 最小检测量为 1 ng, 酪氨酸 (Tyr) 其次 (284/390 nm) 为 Trp 的 1/10, 苯丙氨酸 (Phe) 在 276/386 nm, 脯氨酸 (Pro) 在 308/454 nm, 组氨酸 (His) 在 320/466 nm, 其磷光只有 Trp 的 1%。Phe 与 Trp 磷光寿命最长, 在 7 s 左右; His 最短, 只有 0.49 s; Tyr 2.8 s, Pro 1.34 s。另外研究氨基酸在甲醇, 乙醇, 丙醇, 丁醇中及 pH 对氨基酸磷光性质的影响。还计算了 Stokes 位移能量及激化态 $\text{p}K_{\text{a}}^*$ 值。

关键词 磷光, 氨基酸磷光性质, 激化态 $\text{p}K_{\text{a}}^*$

低温磷光 (low temperature phosphorescence, LTP) 灵敏度高, 信息量大, 是分析化学的重要工具之一。但由于磷光读数波动大, 国外至今不能用作常规分析工具, 对化合物的磷光特点研究的也不多^[1,2], 只有少数报道关于色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 和苯丙氨酸 (Phe) 的磷光光谱, 对脯氨酸 (Pro)、组氨酸 (His) 的磷光性质未见报道。本文研究比较这5个氨基酸的磷光性质及 Trp、Tyr 和 Phe 激化态 $\text{p}K_{\text{a}}^*$ 值的测量。

1 材料与方法

1.1 试剂

DL-Trp、DL-Tyr、Phe、His 和 Pro 均进口分装, 均用 0.05 mol/L HCl 液配成 1 g/L, 于冰箱 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 保存, 用前适当稀释。甲醇、无水乙醇、正丙醇和正丁醇均为北京试剂厂 AR 级。25% 乙醇, 由无水乙醇加重蒸水配制。0.1 mol/L 磷酸氢二钠与磷酸二氢钾均用

收稿日期: 1996-03-01, 修回日期: 1996-08-19