

热休克蛋白的产生、分布及功能

邢 成

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所,天津)

提 要

本文综述了热休克蛋白的产生条件,分类及在细胞内的分布,并对其在细胞生物学中的可能作用做了介绍。

二十多年前人们就观察到细胞对环境温度升高所产生的热休克反应 (heat shock response)。近几年来,美、英、加、日的许多实验室先后报道,几乎所有的有机体从 *E. coli* 到人的组织细胞经受热休克之后,都能诱导产生出一组蛋白质,把它们叫做热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs)。随着对 HSPs 研究的广泛展开,对其重要性也越来越受到关注。从 1984 年起,关于 HSPs 的研究已经以单独的栏目“heat shock proteins”被纳入了“INDEX MEDICUS”。从研究的情况来看,虽然对 HSPs 产生的条件,种类、分布、单克隆抗体以及合成中的基因表达,调控等方面都有涉及,也具有一定深度,但对 HSPs 的生理学功能却认识很少。许多作者依据自己的研究结果提出了种种看法,如认为 HSPs 及其基因可能参与许多重要的生命现象:胚胎发生及分化,病毒感染、生长和代谢,防止基因表型模拟 (phenocopy) 的产生和耐热能力等^[1]。因此,深入研究 HSPs 尤其是认识其生物活性是一项有意义的工作。本文就近几年国外研究 HSPs 的情况作一简要综述。

一、热休克蛋白的产生条件

果蝇 (*Drosophila*), 中国苍鼠卵巢细胞 (CHO), 赫拉细胞 (Hela Cell), 酵母 (Yeast), 大肠杆菌 (*E. coli*) 以及鸟类和哺乳动物的细胞,还有一些植物细胞,当受到热应激之后,能

从这些细胞中分离得到一组为正常细胞所没有的,分子量大小不尽相同的蛋白质即热休克蛋白。早先是用这些培养细胞将其置于高出生理温度几度以上的热环境中(45℃左右) 5—15 分钟,然后再回到 37℃ 放置 2 小时左右,让其扩生 (development), 用 SDS-PAGE 的方法可以从这些细胞中分离得到 HSPs。需要强调的是,如果不经过 37℃ 2 小时的孵化过程,则这些细胞中检测不出有 HSPs 的产生^[2]。后来发现,除了热应激之外,其它的一些因素也能使这些细胞产生 HSPs,如葡萄糖缺乏,氨基酸类似物,亚砷酸盐,过渡性金属、钙离子载体,乙醇等,这些因素单独或是与热应激共同作用均可诱导组织细胞产生 HSPs。此外,用化学物质致使机体过热 (hyperthermia) 之后,如用 D-Lysergic acid diethylamide 给家兔耳静脉注射 1 小时之后,直肠温度升为 42.5℃,达到过热状态。从脑和肾等器官组织中可分离得到 74kDa 的蛋白^[3]。缺氧时也能诱发 HSPs 的产生,当把 CHO 细胞暴露于缺氧环境时,或是转移到这种环境中,可观察到主要的 HSPs 明显地合成出来,接着可以持续合成糖调节蛋白 (glucose-regulated proteins, GRPs)^[4],也属于 HSPs。有的作者还观察到,在 *E. coli* 细胞中,存在异常蛋白时,也能引起 HSPs 产生。许多病毒感染,如一些真核细胞 DNA 病毒: adenovirus, herpes virus, simian virus 40, polio virus

等都能在早期感染时激活 HSPs 的合成,还有 newcastle disease virus 一种 RNA 病毒也可以在感染的鸡细胞中引起 HSP70 和 HSP90 的合成^[5]。

从上述可见,引起热休克蛋白产生的因素,不仅是热应激,而且在其它许多因素的作用下,也都能诱发 HSPs 的产生。所以从广义而论,应该将这类蛋白称为应激蛋白(stress proteins)更为合理。

二、热休克蛋白的分类及其在细胞内的分布

(一) HSPs 的种类 随所用的组织细胞以及采用的应激方法上的不同,合成出的 HSPs 在其分子量大小和数量上都表现出差异。目前已发现的 HSPs 按其分子量大小就有十多种,最小的分子量为 20—30kDa,依次还有 34, 46, 56, 68, 70, 76, 89, 97, 110kDa, 最大的分子量为 174kDa。普遍公认的是 68、70、89 和 110 kDa。这些 HSPs 按照它们在细胞内的分布和可能起的作用分为下面四组。(1), 68, 70, 89 和 110kDa 组: 这是在应激情况下,最为普遍产生的,也是为之公认的一组。在大多数器官的细胞中,68, 70kDa 的产生最为显著。而且,在果蝇和哺乳动物的组织细胞之间,以及在果蝇和 *E. coli* 之间,70kDa 表现出高度的稳定性^[6]。89kDa 也是得到普遍承认的,在不同的组织细胞中都能发现。而 110kDa 只在哺乳动物细胞中观察到,常与 70, 89kDa 一起出现。在酵母中发现 100kDa。(2), 34, 76, 97, 174kDa 组: 这些蛋白主要是在葡萄糖缺乏的情况下产生的,当把葡萄糖加入到这些细胞的培养基中,可看到 GRPs 的合成逐渐被抑制。因此这组蛋白质被称为糖调节蛋白。在轻度热应激情况下,也能见到 GRPs 的产生。而在中度热应激情况下产生的主要是 76 和 97kDa。(3)低分子量组: 分子量为 20—30kDa, 它的产生不同于高分子量的 HSPs,它是与脱皮激素——脱皮甾酮一起产生的。果蝇中的 HSP22—23kDa 类

似于哺乳动物的 α -结晶蛋白(α -crystalline)。关于这组蛋白刚开始研究。(4), 46, 56kDa 组: 这两种蛋白质报道很少,这是在 CHO 细胞中因热应激而产生的,葡萄糖缺少或是缺氧时也能诱发生成。

(二) HSPs 在细胞内的分布 上述的第一组蛋白(68, 70, 89, 110kDa)是主要的热休克蛋白,也称为核/核仁或是胞浆蛋白。十多年前 Mitchell 和 Lipps^[7]就已证实,果蝇唾液腺在受热之后,胞浆中有蛋白合成并迅速地被转运到核中,似乎与染色体的膨突部分相结合。随后,许多研究表明,70kDa 是平等地分布在核和胞浆中,热应激期间,这些蛋白主要在核和核骨架中蓄积和浓缩。Pelham 使用抗果蝇 HSP70 的抗体及一个相应的质粒转染小鼠 L 细胞和猴的 COS 细胞,发现果蝇的 HSP70 也是集中在这些细胞的核仁中,在鸟和哺乳动物细胞中,70 kDa 是一种甲基化的蛋白, HSP70kDa 的单克隆抗体是与微丝(microfilaments)相结合,而且表现出对细胞核有亲合性^[8]。对其它哺乳动物细胞的研究表明,70 kDa 存在于核基质(nuclear matrix)中。Hughes 指出,在小鼠的成纤维细胞中,有少量的细胞内 HSP70 与细胞的表面糖蛋白结合。Welch^[9]近来用兔抗血清免疫学方法证实了热应激之后,哺乳动物的核仁中有 HSP68,但与核仁的亲合力是取决于 HSP68 的合成。HSP68 合成完成之后,它并不与核仁结合而是与核相结合。哺乳动物的 HSP68 是与果蝇的 HSP70 很相似的。Welch 近来还找到了迅速纯化 HSP68 和 70 的方法,这将为进一步研究它们的细胞内定位及功能起主要的推动作用。110kDa 也是在哺乳动物细胞中观察到的,也存在于核仁中,免疫电镜的观察表明, HSP 110kDa 看起来好象是与核仁中 rDNA 的纤维状片段相结合。HSP89 主要是动物细胞中的一种可溶性蛋白,主要蓄积在临近细胞膜周围的胞浆中。

糖调节蛋白 GRPs 中, GRP76 似乎是与细胞内的膜结构相结合,如内质网上。而其它主要是结合在高尔基体上,在某些细胞中,也可

见到部份 GRP97 存在于核上。热应激时可以增加在核上的结合^[10]。

对于低分子量的 HSPs(15—32kDa),它们在细胞内的分布似乎是随不同的生物体和不同类型的细胞而有所不同。在网柄菌 (*Dictyostelium*) 中,有八个小分子量的蛋白主要位于核中,由于它们可以从用高浓度盐纯化的核中提取出来,所以认为它们是与染色体结合的。而在果蝇中,发现有四种小分子的 HSPs(22—26 kDa),主要是与核骨架结合,而不是与染色体相结合。在仓鼠 (*Hamster*) 的成纤维细胞和人的 KB 细胞中,这些小分子量的 HSPs 又是以可溶形式存在的^[11]。

三、热休克蛋白的生物学作用

对 HSPs 的研究虽然进展得很快,但对于它在生物学中的作用了解甚少。近年来,对它在生命活动过程中的意义已逐渐有所重视,最为公认的是它可能与机体从应激状态中恢复有关,也就是可以增加机体从应激中恢复过来的能力。但它是怎样来行使这一作用以及它的其它功能仍然不清楚,这已成为许多研究者倾心关注的问题。

(一) HSPs 与耐热能力 由于 HSPs 广泛地参与到细胞骨架和核骨架中,所以可以想象它们一定与细胞的功能有着密切的关系。HSPs 68,70,110 都参与到核,核仁的结构中,而很早以前就已认识到,核仁对热是特别敏感的^[12],所以推测这些蛋白与细胞的热耐受性可能有某种联系。在早期的一些研究中就已观察到,无论是植物细胞或是低等的一些生物,如 *E. coli*,果蝇培养细胞,酵母,海胆等乃至哺乳动物的细胞,当预先经受过一次中等强度的热暴露处理之后,就能耐受其后的一个强烈的热处理。后来证实了这种热耐受现象是与细胞在接受了预先的中度热处理之后的 HSPs 的合成有关的^[13]。进一步的研究还发现,当 HSPs 合成时并不影响细胞的正常蛋白质的合成,而且认为正是 HSPs 和正常蛋白的相伴合成才使得细胞获得热耐受能力和防止表型模拟的产生。He-

nle 等人证明了热耐受力的产生是与细胞的总蛋白合成的恢复相一致的。如果使用蛋白合成抑制剂,如放线菌酮 (cycloheximide),则就能阻止热耐受力的产生。McAlister 等发现,酵母中 HSP 100kDa 与其抗热能力是相关的。Loomis 等也观察到在网柄菌 (*Dictyostelium*) 中,一些低分子量的 HSPs(26—32kDa) 的合成与其热耐受力是相关联的,如果这些低分子量的 HSPs 的合成丧失,则热耐受力也就受到抑制。这就表明了两者之间是密切关联的^[14]。Berger 等报道,如果对果蝇的培养细胞选择控制使其合成低分子量的 HSPs,则可引起对热的耐受性。Subjeck 及其同事^[15]研究了 CHO 细胞经受不同强度热应激时耐受能力产生的情况,发现在 45℃ 处理 12 分钟条件下,热耐受力和主要的 HSPs(70, 89, 110kDa) 之间存在着对数相关。但也存在着难以解释之处,当耐受力达到极限时,HSPs 的合成应该停止,但实际上观察到 HSPs 的合成仍持续地增加。总之,这些研究表明,热耐受性是与高分子量和/或低分子量的 HSPs 的合成相关的。但不与 GRPs 有关,而 GRPs 可能反而会增加细胞的热敏感性。对于亚砷酸盐引起的 HSPs 能否产生热耐受力尚有争议。Landry 和 Li 得到不同的结果,对这一矛盾如何解释还不清楚,可能与他们所使用的亚砷酸钠的剂量有关。Tanguay 等认为是因为亚砷酸盐诱导生成的 HSPs 不能象热应激引起的 HSPs 一样与细胞的核相结合。

关于 HSPs 产生热耐受性的机制有两种看法,(1) HSPs 直接和间接地使细胞获得热耐受力。他们能直接与细胞结构结合使之得以稳定^[16]。或者它们能激动正常蛋白质合成的恢复^[13]。在这种情况下,因诱发休克的一些处理使得变性的蛋白得到了补充,因此使之获得热耐受性。如过热时可以使酶的活性变化,蛋白结构疏展、变性等^[17],从而影响细胞的抗热能力,一旦这些蛋白得以补充时,它的热耐受性又得以恢复。支持这一理论的证据是:细胞经受热休克之后,正常蛋白的恢复有一延滞时间,如果这一时间增加就反映着细胞死亡的可能性亦

增加。在热耐受的细胞中,可以观察到正常蛋白的合成迅速恢复。(2) HSPs 不参与热耐受能力, HSPs 不起原因上的作用而可能存在着其它调节因子,而由这假想因子的水平来控制 HSPs 的产生。已经证实,当用热或乙醇使 CHO 细胞获得热耐受性后,在这些细胞中谷胱甘肽的含量增加,相反,谷胱甘肽缺乏时可增加细胞的热敏感性。

(二) HSPs 与胚胎发育和细胞分化 在胚胎的发生和分化中,在很早期的胚胎阶段,热休克基因的特殊表达在活化其它细胞基因中可能有作用。Morange^[18] 等近来对许多胚胎癌细胞和早期小鼠胚胎细胞在经受短时间热处理之后的 HSPs 的生成作了观察,表明 HSPs 的产生与细胞所处的分化阶段有密切关系。在早期鼠胚中(八个细胞阶段),过热不引起非结构蛋白 HSP68 的合成,而是使得 HSP70 合成。但用视黄酸 (retinoic acid) 促使细胞分化之后, HSP70 的合成水平下降,而可诱导 HSP68 的合成。编码这两个蛋白 (HSP68, 70) 的基因仅在胚层及其后的阶段才能被热应激所激活。如果在孵化之后使胚胎受热则可能引起 HSPs 的产生,而在更早的阶段就不能引起 HSPs 的产生。这些研究者还同时强调,热耐受力增加是伴同着 HSPs 的产生的。

Buzin 及同事的研究指出,能抑制胚胎分化的药物同样可以抑制三种分子量 HSPs 的合成 (HSPs 23, 22a, 22b)。反之,不能抑制分化的药物亦不能引起这几种 HSPs 的产生。他们进一步发现甾类激素中的脱皮激素能抑制早期胚胎培养细胞的肌肉和神经的分化而增加 HSPs 23, 22a, 22b 的合成。这就看出,这几个 HSPs 在调节胚胎分化中可能起重要作用。有趣的是,中度预热诱导产生这三种小分子量的 HSPs 可以防止因致畸胎因素 (teratogens) 或高温所抑制的细胞分化^[19]。

(三) 糖调节蛋白的作用 由于 GRPs 是插入到细胞膜结构中的,所以对它的功能令人思索,它可能与葡萄糖的转运有关。可是 GRP 76 97 它们又与细胞内的膜结构相结合,所以它

们的功能仍是神秘的。

McCormick 等通过对 97kDa 分布的了解指出,GRP97 在控制小鼠胚细胞内外胚层的分化上起调节作用。由于 GRPs 与 HSPs 的表达是交错的,在营养缺乏和缺氧时也能引起 GRPs 的产生,所以 GRPs 在肿瘤生物学中的作用也引起了重视。当葡萄糖缺乏时,转化细胞中 GRPs 的产生比非转化细胞更迅速。而在肿瘤组织中,营养供给跟不上肿瘤组织快速生长的需要,有营养缺乏和慢性缺氧存在,因此在肿瘤组织和正常组织之间 GRPs 的产生就存在着差异。当肿瘤组织重新氧化时(如放疗过程中)或者是葡萄糖的供给恢复时都伴有 GRPs 和 HSPs 合成上的变化。因此,了解这些现象及其与肿瘤发生和治疗中的关系是很有意义的。

(四) 蛋白酶作用 热对细胞的主要后果是使蛋白变性,然后是蛋白的降解。但事实上,触发热休克反应的较小温度的增加并不足以使大多数酶被灭活,或是结构蛋白的构象被破坏。许多实验指出,热休克之后蛋白降解并未增加。有人认为是稳定的。

Ciechanover 认为,在真核细胞中存在着一个降解多肽的非溶酶性质的而依赖于 ATP 的系统。在这个系统中,起作用的是一个由 76 个氨基酸组成的肽,叫做 ubiquitin,它的氨基酸顺序从鸟到人都是稳定不变的,而在酵母中仅有三个氨基酸不同。ubiquitin 的羧基末端的甘氨酸位置被 ATP 激活,接着进行一系列酶反应,最终成为一个 ubiquitin 的复合物结合在蛋白的 ϵ -赖氨酸上。这种结合了 ubiquitin 的蛋白很容易被蛋白酶水解。通过探查热休克后的鸡胚纤维细胞的 cDNA 库和用鉴别克隆杂交的方法筛选,发现 ubiquitin 是一个 HSP^[20]。

Hershko 的实验表明,使用氨基酸类似物(如异常肽, HSPs 的诱导剂)可以使结合 ubiquitin 的蛋白增加 10 倍,而在那些对热休克不敏感的小鼠细胞中,发现它们缺少 ubiquitin 活化酶。在经受热休克的鸡胚成纤维细胞中,

ubiquitin mRNA 的合成增加了几倍,游离的 ubiquitin 也暂时性的增加。在过热的沙土鼠和小鼠的肝脏中也看到 mRNA 的增加。在原核细胞中也发现了热休克和蛋白酶之间的关系。在 *E. coli* 基因中,有一个长基因是受热影响的,它就是编码 ATP 依赖酶的基因。此外,也有人报道, HSP70 本身具有蛋白酶的性质。

四、结 语

近年来许多人研究了 HSPs 的基因及其表达, HSPs 在分子量上表现出来的多样性是由基因的多样性所决定的。这也是符合一个基因决定一个肽的原理的。这些研究者多采用 *E. coli*, 果蝇及酵母进行研究。已经知道编码果蝇 HSP70 kDa 的有多个等同形式的基因,它与哺乳动物的 HSP 68 具有一定程度的同源性。LeBowitz 研究基因突变时发现, *E. coli* HSP70 是 *dank* 基因的产物,而且在噬菌体复制期间与 λ 噬菌体 O 和 P 蛋白相互作用影响 HSP70 的 ATP 酶活性。由于酵母在突变分析中是最为方便的,可用它对一个已知基因在体外进行遗传工程的改变,然后将突变基因整合到酵母基因组上,删去野生型基因。Graig 及其同事已利用酵母产生了 8 个基因并得到不同的表型,其中包括对冷、热敏感的。总之,对 HSPs 的研究已深入到基因水平,这对彻底认识

HSPs 的生物学功能及意义是有益的。并期望能通过遗传工程技术使得 HSPs 有利于机体生命活动的功能得以充分表达。

参 考 文 献

- [1] Subjeck, J. R. et al.: *Am. J. Physiol.*, 1986, **250**, C1.
- [2] Joanna, K. et al.: *Nucleic Acid Research*, 1981, **9**, 5203.
- [3] James, W. C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, **80**, 569.
- [4] Sciandra, J. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81**, 4843.
- [5] Khandjian, E. W. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1983, **3**, 1.
- [6] Bardwell, J. C. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81**, 848.
- [7] Mitchell, H. et al.: *Biochem. Genet.*, 1975, **13**, 585.
- [8] Lathangue, N. B. et al.: *EMBO J.*, 1984, **3**, 1871.
- [9] Welch, W. et al.: *Mol. Cell Biol.*, 1985, **5**, 1229.
- [10] Lai, B. T. et al.: *J. Cell Biol.*, 1984, **4**, 2802.
- [11] Atkinson, B. G. et al.: *Can. J. Biochem.*, 1982, **60**, 316.
- [12] Warocquier, R. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1969, **10**, 362.
- [13] Mitchell, H. K. et al.: *Dev. Genet.*, 1979, **1**, 181.
- [14] Loomis, W. F. et al.: *Dev. Biol.*, 1980, **79**, 399.
- [15] Subjeck, J. R. et al.: *Br. J. Radiol.*, 1982, **55**, 579.
- [16] Minton, K. W. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, **79**, 7107.
- [17] Anderson, R. L. et al.: *Radiat. Res.*, 1985, **102**, 314.
- [18] Morange, M. A. Diu. et al.: *Mol. Cell Biol.*, 1984, **4**, 730.
- [19] Berger, E. M. et al.: *Exp. Cell Res.*, 1983, **147**, 437.
- [20] Bond, V. et al.: *Mol. Cell Biol.*, 1985, **5**, 949.

[本文于 1987 年 9 月 21 日收到]

科技消息

人尿中微量甲苯丙胺*的抽提

介绍一种微量甲苯丙胺(MA)的抽提方法, 100ml 尿中 10ng 的极微量 MA 几乎可 100% 的被抽提出, 具体方法如下:

在 100ml 含 10—150ng MA 的尿试样中, 加入 15% 的碳酸钠水溶液 5ml, 二正己胺饱和水溶液 0.5 ml, 三氯甲烷 10ml, 激烈振荡 1 分钟后, 离心分离 5 分钟。

三氯甲烷相用无水硫酸钠脱水, 取其 5ml 置于 10ml 磨口试管中, 分别加入 1ml 143ng/ml 的二苯

胺的三氯甲烷溶液和 0.4ml 含 95% (V/V) 无水三氟醋酸 (TFAA) 的醋酸乙酯溶液。置于 $50 \pm 3^\circ\text{C}$ 水浴上反应 30 分钟后, 在 $75 \pm 5^\circ\text{C}$ 下加热 10 分钟蒸发除去未反应的 TFAA 及三氯甲烷。得到的 MA 的 TFA 衍生物用 GC/MS 定量。

(河北省石家庄维尼纶厂 封勇编译自《分析化学》(日), 1988, No. 2, T27.)

*甲苯丙胺也称脱氧麻黄碱或苯基异丁-2-胺。