

研究报告

大鼠肝及脑组织中微粒体血红素
加氧酶同工酶研究*夏振炜 李云珠 陈舜年 申庆祥¹⁾ 邵洁 王健²⁾ 俞善昌

(上海第二医科大学附属瑞金医院, 上海 200025)

摘要 采用离子交换层析和免疫印迹法分离、纯化和分析血红素和苯胂诱导后大鼠肝脏、脑组织。结果显示: 纯化诱导后的大鼠肝脏, 获得 HO-1 和 HO-2, 前者活性高于后者为 2:1。未诱导的大鼠肝脏仅获得 HO-2, 但诱导剂作用后, HO-1 活性明显增加, 而 HO-2 未见改变。HO-1 和 HO-2 表观分子质量分别为 30 ku 和 36 ku。诱导剂未作用的肝脏及作用的脑层析后仅获得 HO-2 活性的洗脱峰。免疫印迹法检测发现大鼠肝脏 HO-2 抗体与脑 HO-2 间有交叉反应, 与肝脏 HO-1 无反应。实验表明在诱导剂作用的大鼠肝脏内含 HO-1 和 HO-2 同工酶, 其中 HO-1 为诱导型酶。诱导剂作用的脑仅含 HO-2。两种构型在表观分子质量, 诱导性和免疫化学特性方面明显不同。

关键词 血红素加氧酶, 同工酶, 纯化, 免疫印迹

学科分类号 Q55

血红素降解为胆红素需诱导型微粒体血红素加氧酶 (heme oxygenase, HO)、还原型辅酶 II-细胞色素 P-450 还原酶及氧分子共同作用。虽然血红素降解的确切机制还未搞清, 但 HO 在特异部位与底物血红素结合, 并形成胆绿素; 其中还原型辅酶 II-细胞色素 P-450 还原酶激活分子氧并将三价铁还原成二价铁。在哺乳动物, 胆绿素还原酶最终将胆绿素还原为胆红素^[1~6]。本文通过分离、纯化大鼠肝脏和脑组织微粒体成分, 以期获得 HO 的同工酶 HO-1 和 HO-2, 了解同工酶的生化性质。

1 材料和方法

1.1 试剂和动物

血红素购于 Sigma 公司; 胆酸钠和二硫苏糖醇 (DTT) 购于 Serva 公司; Sprague-Dawley (S-D) 大鼠和昆明种小鼠购于中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.2 方法

1.2.1 组织制备: S-D 大鼠常规饲养。吸入 5%~7% 氧浓度和 93%~97% 氮浓度的混合气体 1 h 以提高血脑屏障开放度。随后, 腹腔和尾静脉分别注

射 40 μ mol/kg 血红素 (pH 7.4) 和 100 mg/kg 苯胂。对照组注射等量生理盐水。20 h 后处死大鼠取肝脏和脑组织冰冻保存。

1.2.2 HO 同工酶的分离: 所有实验操作均在 4℃ 进行。取 3 g 组织 (湿重), 加入 2 倍体积含 0.1 mmol/L 二乙胺四乙酸 (EDTA) 和 135 mmol/L KCl 的 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液, pH 7.4, 制成匀浆, 10 000 g 离心 20 min, 留取上清液, 150 000 g 离心 1 h。淋洗、悬浮和溶解微粒体颗粒。加入 1 倍体积 DTT 至终浓度 0.05 mmol/L, 调整 pH 至 8.0。进行 DEAE-Sephacel 柱层析。

1.2.3 HO-1 和 HO-2 纯化: 进行羟基磷灰石柱层析, 具体步骤见表 1 中注解。

1.2.4 胆绿素还原酶的制备: 按 Maines 法^[1]制备供 HO 同工酶活性检测。

1.2.5 HO 的同工酶活性检测: 酶促反应测定法

* 国家自然科学基金资助项目 (39170767)。

¹⁾ 中国科学院上海细胞生物学研究所, 上海 200031。

²⁾ 上海市计划生育科学研究所, 上海 200032。

收稿日期: 1997-11-24, 修回日期: 1998-03-23

按参考文献 [1, 4] 进行. 按 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 消光系数计算胆红素产率, 其中每小时生成 1 nmol/L 胆红素为酶的 1 个活性单位.

1.2.6 SDS-PAGE: 采用 Laemmli 的不连续缓冲系统, 分离胶浓度为 10%.

1.2.7 抗血清制备: 取纯化大鼠肝脏 HO-2 ($69 \mu\text{g}$) 加入 0.9% NaCl 100 μl , 腹腔注射入昆明种小鼠 (10~15 g), 每隔 7 d 注射 1 次, 共 3 次. 于末次注射后第 10 天采血样, 收集抗血清, 贮存于 -20°C 备用.

1.2.8 免疫印迹法: 大鼠肝脏 HO-1 和脑 HO-2 按 Laemmli 法进行电转移, 转移完毕后, 丽春红 S (Ponceau S) 染色硝酸纤维素薄膜以鉴定蛋白质转移率. 双蒸水脱色. 加入小牛血清含 20 mmol/L Tris-HCl/0.5 mol/L 胆酸钠, pH 7.5, 37°C 保温 1 h, 封闭非特异抗体位点. 洗涤后加入制备的抗血清, 37°C 保温 1 h, 洗涤数次后加入用 PBS 稀释的辣根过氧化物酶-抗鼠 IgG, 37°C 再保温 1 h, 洗涤后加入基质液二氨基联苯胺显色, 双蒸水洗涤, 终止反应.

2 结 果

2.1 不同组织 HO 同工酶的纯化和鉴定

DEAE-Sephacel 层析血红素和苯肼诱导的大鼠肝脏微粒体成分, 收集 3~4 ml. 通过 HO 活性检测获得含 HO 的两个峰型, 按洗脱先后顺序获得峰 I (主要含 HO-1) 和峰 II (主要含 HO-2), 将峰 I 和峰 II 成分分别用羟基磷灰石柱层析, 最终纯化得到 HO-1 和 HO-2, 其特异活性分别为 4300 U/mg 和 2150 U/mg (表 1).

同方法对血红素和苯肼诱导的大鼠脑和未诱导的大鼠肝脏微粒体成分进行层析, 仅获得一个含 HO 活性峰型, 该峰位于层析诱导剂作用的大鼠肝脏微粒体成分后获得的峰 II 部位 (图 1). 表 2 和表 3 显示, 虽然被诱导的大鼠脑微粒体 HO 和未诱导的肝脏微粒体 HO 层析行为相同, 但二者的活性有很大差异.

2.2 HO-1 和 HO-2 特性

SDS-PAGE 发现血红素和苯肼诱导的大鼠肝脏微粒体 HO-1 和 HO-2 电泳行为不同, 表观分子质量分别为 30 ku 和 36 ku. 诱导的大鼠脑微粒体 HO

表观分子质量与肝脏微粒体 HO-2 相同. 诱导剂作用后肝脏 HO-1 活性明显增高, 而 HO-2 活性无明显变化. 免疫印迹法显示: 抗大鼠肝脏 HO-2 血清与大鼠脑 HO-2 作用, 出现生色反应带, 而与纯化的肝脏 HO-1 无反应 (图 2).

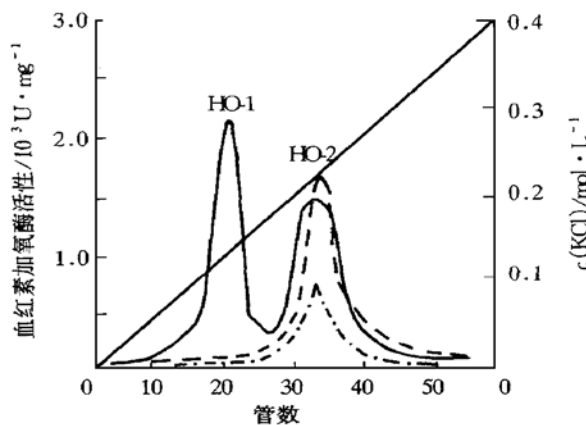


图 1 大鼠肝脏和脑微粒体成分的 DEAE-Sephacel 层析图谱
大鼠肝脏和脑微粒体成分经 DEAE-Sephacel 层析, 分别得到峰 I (含 HO-1 成分) 和峰 II (含 HO-2 成分). 预装 DEAE-Sephacel 柱 ($2.5 \text{ cm} \times 13.6 \text{ cm}$), 用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (含 0.05 mmol/L EDTA 0.5% Triton X-100, 0.1% 胆酸钠和 0.05 mmol/L DTT, pH 7.5) 平衡柱体. 当一定量可溶性微粒体成分上柱后, 以上述缓冲液 75 ml 和含 0.4 mol/L KCl 和 0.9% Triton X-100 的相同缓冲液 75 ml 进行梯度洗脱, 每管收集 3~4 ml. 测定 HO 活性, 得到含 HO-1 和 HO-2 活性的两个峰. —: 诱导的大鼠肝脏 HO-1 和 HO-2; - - -: 未诱导的大鼠肝脏 HO-2; - · - · -: 诱导的大鼠脑 HO-2.

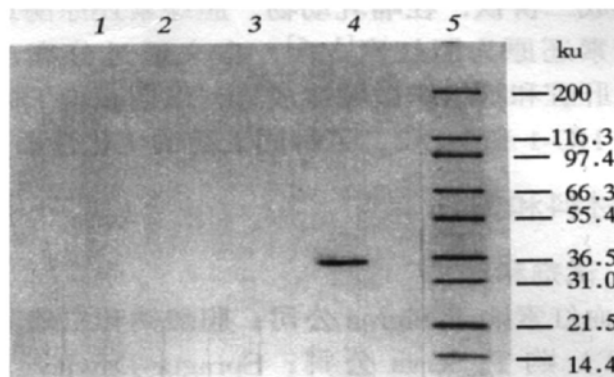


图 2 免疫印迹法检测大白鼠肝脏 HO-1 和脑 HO-2
方法见实验步骤. 1 和 3: 对照; 2: 抗血清与肝脏 HO-1 无反应; 4: 抗血清与脑 HO-2 出现生色反应; 5: 标准分子质量.

表 1 诱导的大鼠肝脏微粒体 HO-1 和 HO-2 的纯化

纯化步骤	总蛋白量/mg	总活性/ 10^3 U	比活性/ $U \cdot mg^{-1}$	回收率/%	纯化倍数
可溶性微粒体成分	82.0	68.6(64.0~ 73.2)	837.5(781.4~ 893.6)	100.0	1
HO-1 DEAE-Sephacel	8.7	18.3(16.6~ 20.0)	2097.3(1902.9~ 2291.7)	10.7	2.5
羟基磷灰石	1.2	5.1(5.0~ 5.2)	4301.1(3692.8~ 4909.3)	1.5	5.1
可溶性微粒体成分	82.0	68.6(64.0~ 73.2)	837.5(781.4~ 893.6)	100.0	1
HO-2 DEAE-Sephacel	4.9	7.7(7.3~ 8.0)	1574.0(1504.5~ 1643.6)	6.0	1.9
羟基磷灰石	3.1	6.7(5.3~ 8.0)	2146.3(1708.5~ 2584.0)	3.8	2.6

注: 将含酶活性的峰 I 和峰 II 样品对双蒸水 4℃ 透析过夜, PEG 浓缩后分光光度法定量蛋白质. 预装羟基磷灰石柱(2.5cm × 20 cm), 用 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液(含 0.05 mmol/L EDTA, 0.4% Triton X-100, 0.1% 胆酸钠, pH 7.2) 平衡柱体, 随后用含 20% 甘油的同一缓冲液平衡, 最后样品分别以 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液 75 ml 及 260 mmol/L 磷酸钾缓冲液 75 ml 进行梯度洗脱, 每管收集 3~ 4 ml, 分别测定纯化后的 HO-1 和 HO-2 活性.

表 2 诱导的大鼠脑微粒体 HO-2 的纯化

纯化步骤	总蛋白量/mg	总活性/ 10^3 U	比活性/ $U \cdot mg^{-1}$	回收率/%	纯化倍数
可溶性微粒体成分	56.0	24.0(16.9~ 31.1)	428.7(302.7~ 554.7)	100.0	1
HO-2 DEAE-Sephacel	20.1	12.2(10.3~ 14.1)	607.7(512.0~ 703.4)	35.9	1.4
羟基磷灰石	1.6	10.6(10.0~ 11.2)	6478.1(6102.4~ 6853.8)	2.9	5.1

表 3 未诱导的大鼠肝脏微粒体 HO-2 的纯化

纯化步骤	总蛋白量/mg	总活性/ 10^3 U	比活性/ $U \cdot mg^{-1}$	回收率/%	纯化倍数
可溶性微粒体成分	662.7	394.7(351.8~ 437.6)	595.6(530.9~ 660.3)	100.0	1
HO-2 DEAE-Sephacel	10.2	16.0(13.8~ 18.2)	1574.4(1358.7~ 1789.5)	1.5	2.6
羟基磷灰石	2.4	8.2(7.3~ 9.0)	3381.6(3020.1~ 3743.2)	0.4	5.7

3 讨 论

对 HO 同工酶的分离和纯化在 80 年代中末期已见报道^[1~ 6]. 本实验通过对大鼠肝脏和脑组织纯化获得了 HO 的同工酶, HO-1 和 HO-2. 经 SDS-PAGE 初步分析两者生化特性, 包括分子量、电泳行为和诱导性, 在此基础上, 应用免疫印迹法进一步检测 HO-1 和 HO-2 的抗原性. 结果显示: 在血红素和苯胍诱导的大鼠肝脏, 含有 HO 的同工酶, 从层析行为和电泳迁移率发现两者的分子组成和结构不同, 即两者在氨基酸构成和序列上存在差异. 而在未诱导的大鼠肝脏仅发现 HO-2, 未能纯化获得 HO-1, 提示 HO-1 的含量相当低以致于未能通过本法纯化获得, 但在诱导剂作用后, HO-1 活性明显增高, 而 HO-2 活性无明显变化, 说明 HO-1 为诱导型酶, 而 HO-2 为组织型酶. 与临床上分离血红素增加后, HO-1 活性提高以加速血红素代谢结果相一致.

采用相同的方法纯化诱导的大鼠脑组织仅获得

HO-2, 未纯化得到 HO-1, 但并不能说明脑组织内无 HO-1, 可能现采用的方法无法分离纯化到极其微量的 HO-1, 亦可能是脑组织因血脑屏障的存在, 阻断了诱导剂对脑组织的刺激, 使 HO-1 表达受到了抑制, 但脑组织 HO-2 显示出高的活性, 该现象反映出有机体高度生物适应性. 免疫印迹法检测提示 HO-1 和 HO-2 的抗原性不同. 本实验进一步提示肝脏和脑组织 HO-2 是相同的酶, 其依据为: a. 分子量相同; b. 脑 HO-2 与抗肝脏 HO-2 血清有交叉反应; c. 层析行为相同.

研究表明 HO-1 和 HO-2 在分子量、诱导性、免疫化学性等方面均不同, 这对了解 HO 同工酶的性质有重要意义.

参 考 文 献

1 Maines M D, Trakshel G M, Kutty R K. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. J Biol Chem, 1986, 261 (1): 411~ 419

2 Trakshel G M, Kutty R K, Maines M D. Resolution of the rat brain heme oxygenase activity. Absence of a detectable amount of

- the inducible form (HO-1). Arch Biochem Biophys, 1988, **260** (2): 732~ 739
- 3 Braggins P R, Trakshel G M, Kutty R K. Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. Biochem Biophys Res Commun, 1986, **141** (2): 528~ 533
- 4 Trakshel G M, Kutty R K, Maines M D. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. J Biol Chem, 1986, **261** (24): 11131~ 11137
- 5 Ishikawa K, Sato M, Yoshida T. Expression of rat heme oxygenase in *Escherichia coli* as a catalytically active, full-length form that binds to bacterial membranes. Eur J Biochem, 1991, **202** (1): 161~ 165
- 6 Ishikawa K, Sato M, Yoshida T. Importance of histidin residue 25 of rat heme oxygenase for its catalytic activity. Biochem Biophys Res Commun, 1992, **182** (3): 981~ 986

The Study on Microsomal Heme Oxygenase Isoforms in Liver and Brain Tissues of Rat. XIA Zhen-Wei, LI Yun-Zhu, CHEN Shun-Nian, SHEN Qing-Xiang, SHAO Jie, WANG Jian, YU Shan-Chang (*Rui Jin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China*).

Abstract Heme oxygenase (HO) isoforms in hematin and phenylhydrazine-induced Sprague-Dawley rat liver and brain were purified using DEAE-Sephacel and hydroxylapatite. Rat liver HO-1 and

brain HO-2 were determined by the Western blotting analysis. The results showed that two isoforms were purified and identified from the induced rat liver, and the HO-1 was the predominant form with a ratio of 2:1. In the native state, the activity of HO-2 was detected to be fully refractory to hematin and phenylhydrazine, whereas the activity of HO-1 was increased in response to these agents. The apparent molecular weights of HO-1 and HO-2 were about 30 ku and 36 ku respectively. In the untreated liver and treated brain, only one peak of HO activity (HO-2) was detected. The antiserum against liver HO-2 was employed in Western blotting analysis, cross-reactivity of HO-2 in the brain was observed, and that of HO-1 in the liver was not observed. The study suggests that HO-1 and HO-2 exist in the hematin and phenylhydrazine treated rat liver, HO-1 is an inducible enzyme, and only HO-2 exists in the treated rat brain. Two constitutive forms were different in molecular weight, inducibility and immunochemical properties.

Key words heme oxygenase, isoform, purification, Western blotting

对地贫红细胞的显微激光散射和图象分析*

李平阳 王江成 谭润初 李永龙 贺奇才

黄耀熊¹⁾

(中山医科大学物理教研室, 广州 510089)

(暨南大学生物医学工程研究所, 广州 510632)

摘要 应用显微准弹性激光散射 (MQLS) 技术与显微生物医学图象分析技术对地中海贫血红细胞及胞内血红蛋白动态特性进行了研究. 在实验中, 比较了正常人及地贫患者红细胞胞内血红蛋白聚集体的平均流体力学半径、平均平动扩散系数及红细胞膜的搏动频率等动态特性参数, 以及细胞的截面积、规化形状因子、长径、短径、灰度等图象分析数据, 发现地贫红细胞的血红蛋白聚合物平均流体力学半径远远大于正常人红细胞的, 其大小变异亦较正常人大, 且其膜搏动频率也较为缓慢, 细胞的截面积也变小. 这反映了地贫红细胞内有较大的蛋白质聚合物存在和红细胞变形能力差的特性. 研究还表明, 显微准弹性激光散射技术结合图象分析技术, 可使测量的可比性和准确性大大提高, 预期可广泛适用于各种活细胞动态特性的研究.

关键词 显微准弹性激光散射, 图象分析, 红细胞膜, 血红蛋白动态特性

学科分类号 Q63

* 国家教委博士点基金资助项目 (9503087). ¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-11-21, 修回日期: 1998-05-04