

急性热暴露大白鼠肝脏热休克蛋白形成的研究

陈育庆

(解放军总医院老年医学研究所,北京)

熊琛

(北京军区总医院肝病研究所,北京)

阎国珍

(军事医学科学院五所,北京)

程素琦

(军事医学科学院四所,北京)

提 要

本研究采用人工气候室模拟自然热环境对大白鼠进行急性热暴露实验。用苯酚法提取大白鼠肝脏总 RNA;用 Oligo(dT)-纤维素亲和层析柱分离出 Poly(A)⁺mRNA。将各条件下的大白鼠肝脏 Poly(A)⁺mRNA 在麦胚无细胞体外转译系统中表达。结果证明急性热暴露大白鼠肝脏同样能生成分子量分别为 71kD、90kD、98kD 和 110kD 的一组热休克蛋白。

关键词 热休克蛋白,急性热暴露,大白鼠肝脏

热休克蛋白 (Heat Shock Protein, HSP) 是指由于应激特别是热应激诱导细胞合成的一类蛋白质,它的编码基因的 5' 端含有一段 14 对碱基的保守序列,对 HSPmRNA 的转录起启动作用。HSP 的形成能提高机体的应激能力特别是耐热能力,探讨它的形成条件及其功能有着重要的理论和实际意义^[1]。

目前国外采用细胞培养的方法对 HSP 的形成机理及其功能的研究已较深入。但对整体动物应激是否能诱导组织细胞生成 HSP 一直是人们感兴趣而未作过深入研究的问题。本研究旨在采用人工气候室模拟自然热环境来观察整体热应激是否能诱导大白鼠肝脏细胞生成 HSP。

材 料 与 方 法

一、大白鼠急性热暴露实验

实验所用动物为军事医学科学院动物场饲养的 Wistar 种同批雄性大白鼠,体重 150—180g。随机分成四组,每组两只。一组静置于

23—25℃环境中作常温对照;其余三组置于干球温度 40℃、湿球温度 32℃、黑球温度 46℃、相对湿度为 60% 的人工气候室中作急性热暴露处理。大白鼠能自由活动,其体温通过 TH-1 型多点数字温度计(军事医学科学院四所研制)监测。要求肛温分别达 41℃、42℃、43℃并持续 1h。然后将动物断头处死速取肝脏 0.5g 按以下方法进行实验。

二、大白鼠肝脏总 RNA 的提取和 Poly(A)⁺mRNA 的分离

主要试剂: 1. NP40, BDH 公司产品; 2. 十二烷基硫酸钠 (SDS) 和三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 均为 Serva 公司产品; 3. 苯酚为北京化工厂产品, 使用前重蒸处理; 4. Oligo(dT)-纤维素为 Sigma 公司产品。

用 Miledi^[2]的苯酚/氯仿/异戊醇法提取大白鼠肝脏总 RNA;用 Maniatis^[3]的 Oligo(dT)-纤维素亲和层析法分离 Poly(A)⁺mRNA。

三、大白鼠肝脏 Poly(A)⁺mRNA 的活性检测

主要试剂: 1. 麦胚无细胞体外翻译系统, BRL 公司产品; 2. L-³⁵S-蛋氨酸(1mCi/mmol), 中国医学科学院放射医学研究所产品。

实验参照侯云德方法^[4]进行。

四、大白鼠肝脏 Poly(A)⁺mRNA 的酸性尿素琼脂糖凝胶电泳

采用 1% 的琼脂糖凝胶 (用 6mol/L 尿素-0.025mol/L 柠檬酸-10⁻³g/L 溴化乙锭溶液制胶), 电泳缓冲液为 0.025mol/L 柠檬酸。电泳后, 将凝胶移至紫外灯下观察结果并照相。

五、大白鼠肝脏 Poly(A)⁺mRNA 的体外转译及产物检测

将各条件下提取的大白鼠肝脏 Poly(A)⁺mRNA 3μg 分别加在 66μl 麦胚无细胞体外翻译系统(含有 10μCi³⁵S-蛋氨酸)中, 于 30℃ 保温 60 分钟。翻译产物经 T = 10%, C = 4% 的 SDS-PAGE 分离。固定, 用 PPO 作荧光增强处理, 干胶后用 X 线软片加增感屏在 -70℃ 进行荧光自显影。显影区带的强度用日本岛津 CS-910 双波长 TLC 扫描仪在波长 630nm 测定吸收峰面积。

结 果

一、大白鼠肝脏总 RNA 的提取和 Poly(A)⁺mRNA 的分离

表 1 总结了四次实验结果, 可以看出本实验所采用的 SDS/苯酚/氯仿-异戊醇法提取总

表 1 大白鼠肝脏总 RNA 的提取和 Poly(A)⁺mRNA 的分离结果

Table 1 The isolation of total RNA and fractionation of Poly(A)⁺mRNA from acute exposure rat liver

		Content (μg)	O.D. ₂₆₀	Poly(A) ⁺ mRNA / Total mRNA
			O.D. ₂₈₀	
Control	Total RNA	3672	2.04	1.85%
	Poly(A) ⁺ mRNA	68.20	2.11	
41℃	Total RNA	3525	2.06	2.01%
	Poly(A) ⁺ mRNA	71.04	2.18	
42℃	Total RNA	3631	2.23	2.01%
	Poly(A) ⁺ mRNA	72.96	2.11	
43℃	Total RNA	4039	2.18	2.14%
	Poly(A) ⁺ mRNA	86.40	2.09	

RNA 和 oligo(dT)-纤维素亲和层析分离 Poly(A)⁺mRNA 的方法均具有较好的效果。能从每克肝脏中提取总 RNA 7.43 ± 0.45mg, 其中 Poly(A)⁺mRNA 含量在 2% 左右。表中 O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀ 比值均大于 2.0, 说明蛋白质已基本除尽。

二、大白鼠肝脏 Poly(A)⁺mRNA 活性检测

从图 1 中可见大白鼠肝脏 Poly(A)⁺mRNA 用量从 0.5μg 增至 1μg 时, 转译倍数从 1.57 增至 4.78, 即 Poly(A)⁺mRNA 的加量与 ³⁵S-蛋氨酸掺入计数正相关。由此可见, 所提取分离的大白鼠肝脏 Poly(A)⁺mRNA 具有良好的生物活性。

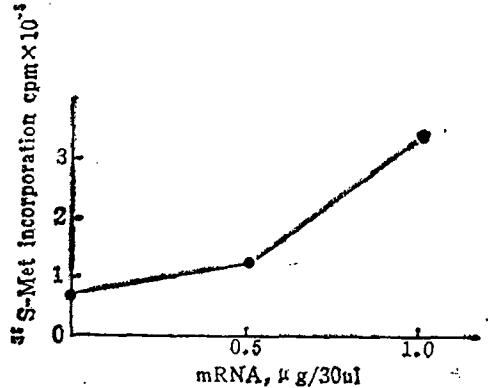


图 1 大白鼠肝脏 Poly(A)⁺mRNA 用量与 ³⁵S-蛋氨酸掺入反应的关系

Fig. 1 The relationship between the quantity of rat liver Poly(A)⁺mRNA and ³⁵S-Met incorporated proteins

三、正常与热应激大白鼠肝脏 Poly(A)⁺mRNA 的酸性尿素琼脂糖凝胶电泳比较

从图 2 可见, 正常大白鼠肝脏中提取的 Poly(A)⁺mRNA 与急性热暴露大白鼠肝脏中提取的 Poly(A)⁺mRNA 之间存在明显差别, 前者呈现一个区带, 后者为二个区带; 且 41℃、42℃、43℃ 相互之间的迁移率存在轻微差异。

四、正常与热应激大白鼠肝脏 Poly(A)⁺mRNA 的体外表达

从图 3 可见肛温达 41℃、42℃、43℃ 并维持 1h 的大白鼠肝脏中所提取的 Poly(A)⁺mRNA

1 2 3 4

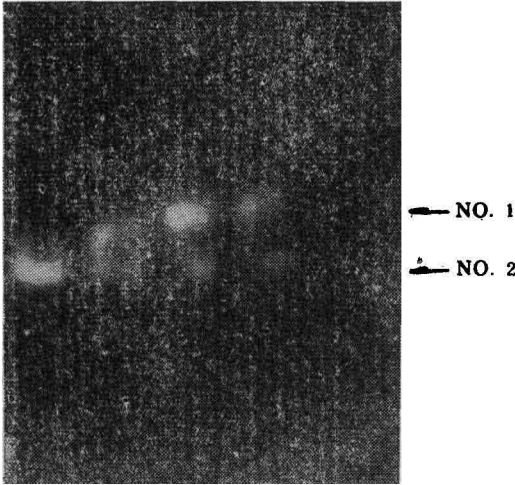


图2 酸性尿素琼脂糖(1%)凝胶电泳检测正常与不同热应激大白鼠肝脏 Poly(A)⁺mRNA

Fig. 2 Comparison of Poly(A)⁺mRNA from livers between normal rats and rats under different temperature treatment by means of 1% urea agarose gel electrophoresis

lane 1, mRNA isolated from rat liver at 37°C
lane 2, mRNA isolated from rat liver at 41°C for 1 hour
lane 3, mRNA isolated from rat liver at 42°C for 1 hour
lane 4, mRNA isolated from rat liver at 43°C for 1 hour

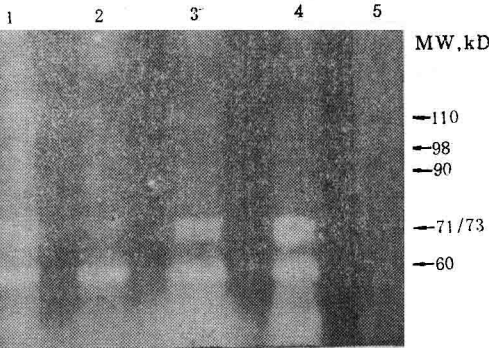


图3 大白鼠肝脏 mRNA 在麦胚无细胞体系中表达,产物经 10% SDS-PAGE 分离后作荧光自显影
Fig. 3 Fluorescence autoradiogram of the in vitro translation products of rat liver mRNA after 10% SDS-PAGE separation
Lanes from left to right: mRNA isolated from rat liver at 41°C for 1 hour; mRNA isolated from rat liver at 37°C; mRNA isolated from rat liver at 42°C for 1 hour; mRNA isolated from rat liver at 43°C for 1 hour; no exogenous mRNA added

均能产生一组正常对照不存在的蛋白质,分子量为 110kD、98kD、90kD 和以双肽形式出现的 71/73kD。未加外源性 mRNA 的微球菌核酸酶处理过的麦胚体系未见蛋白质区带。

图 4 是利用荧光自显影底片经日本岛津 CS-910 双波长 TLC 扫描仪在 630nm 波长处扫描后所得各蛋白质区带的相对密度而绘制的不同体温热应激大白鼠肝脏 HSP 生成量的关系图。从图中可见随应激体温升高主要 HSP 均有生成量稍增加的现象。

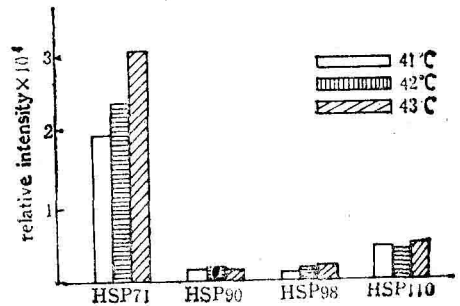


图4 不同温度热应激与大白鼠肝脏 HSP 生成量的关系

Fig. 4 Comparison of the induction of 4 major rat liver HSPs under different temperature treatment

Column heights showed relative intensity of each Mr band on SDS-PAGE autoradiogram

讨 论

目前对 HSP 的工作已有深入研究,但对整体动物应激是否能诱导 HSP 的形成一直是人们感兴趣而未做过深入研究的问题。1983年 Currie^[5]采用苯巴比妥麻醉大白鼠在恒温电热板上热应激,成功地诱导了大白鼠肝、肾、心、脑等组织器官生成 HSP。但此实验未能区分热应激和麻醉应激对 HSP 生成的诱导作用。采用人工气候室模拟自然热环境的整体应激是否能诱导大白鼠肝脏细胞内 HSP 的生成尚未见文献报道。本实验所得的荧光自显影图谱(图 3)证明高温整体热应激也能诱导大白鼠肝脏生成 HSP71、HSP90、HSP98、HSP110。尤以 HSP71 明显,且仍然发现 HSP71 以双肽(71 kD/73kD)形式出现,与文献报道相近似^[5-8]。此外图 3 中出现的分子量为 60kD 的蛋白质,因

37°C对照动物肝脏细胞也可出现,说明它并非热休克所诱导生成。

迄今为止对于 HSP 表达的调控机制尚不清楚。本实验结果(图 2)表明热应激大白鼠肝脏 mRNA 比正常大白鼠肝脏 mRNA 多一个区带与文献报道相似^[9]。提示正常大白鼠肝脏细胞内四种 HSPmRNA 含量很少,但经热应激后明显增加;这与本研究中 ³⁵S-蛋氨酸掺入实验结果相符合。说明 HSP 在大白鼠肝脏细胞中的表达主要是在转录水平上调节。从图 2 中还可可见正常体温与热应激体温的大白鼠肝脏细胞所共有的 mRNA 区带,随热应激体温的升高有递减趋势,表明热休克时细胞表达正常功能蛋白的 mRNA 转录被抑制。

尽管对于整体热应激诱导组织细胞产生 HSP 的研究工作刚刚开始,对其功能的认识也仅限于对耐热性的产生。但这一领域的研究已引起人们的关注。Fleming^[10]证实 HSP 与果蝇的衰老有关;Bond^[11]报道 HSP 参与细胞的许多基础代谢。从本研究的结果可以推论:HSP 这种普遍存在于生物界的保守蛋白会出现在高温作业人员,临床上发热病人和局部温热进行理疗或高温治疗肿瘤的病人体内。由于 HSP 能被许多应激因素诱导生成,因此推测它也会出现在寒冷、高原作业人员和临床上创伤应激

病人体内。从本研究结果中不难预见:从整体应激的组织细胞内提纯主要 HSP 并制备它的单克隆抗体,以其为手段来寻找提高组织细胞产生 HSP 能力的药物和措施,从而增强机体应激能力是可能的。同时这也有助于阐明应激的分子机理。总之,有关整体应激诱导组织细胞生成 HSP 的条件及其功能的研究将会日益引起人们的广泛重视。

参 考 文 献

- 1 陈育庆. 国外医学: 分子生物学分册, 1988; 10(3): 109
- 2 Miledi R *et al.* *Biomedical Research*, 1982; 3(4): 390
- 3 Maniatis T. *et al.* *Molecular cloning-a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor laboratory 1982: 188—209
- 4 侯云德主编. 病毒基因工程的原理及方法. 北京: 人民卫生出版社, 1981: 146—150
- 5 Currie R W *et al.* *Can J Biochem Cell Biol*, 1983; 61: 438
- 6 Dean R L *et al.* *Can J Biochem Cell Biol*, 1983; 61: 472
- 7 Brenda G L *et al.* *Proc Acad Natl Sci USA*, 1986; 83: 90
- 8 沈翊珩等. 生物化学杂志, 1987; 3(2), 131
- 9 Victor C *et al.* *Heat Shock-From Bacteria to Man*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 37—44
- 10 Fleming J E *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 4099.
- 11 Bond U *et al.* *Advance in Genetics*, 1987; 24: 1

[本文于1988年11月19日收到]

INDUCTION OF HEAT SHOCK PROTEIN IN RAT LIVER BY ACUTE HEAT EXPOSURE

Chen Yuqing

(No. 28 Fu xing Road, Beijing 100853)

Chen Xiong

(No. 5 Nan Men Cang, Beijing 100700)

Yan Guozhen

(No. 27 Tai peing Road, Beijing 100850)

Cheng Suqi

(No. 27 Taiping Road, Beijing 100850)

ABSTRACT

Sixteen Wistar rats were randomly divided into four groups. One group was put at an ambient temperature of 23°C—25°C as control. The other groups were exposed in an artificial climatic chamber to DB 40°C, WB 32°C, BG 46°C and Rh 60%. These rats were decapitated after the rectal temperature rose to 41°C, 42°C and 43°C respectively for one hour.

(Continued on page 49)

THE TRANSCRIPTIONAL MODEL OF NUCLEI ISOLATED FROM CEREBRAL CORTEX OF RATS IN VITRO

Qiu Ping Yi Lukang

(Dept. of Biochem., The Third Military Medical College, Chong Qing)

ABSTRACT

This paper deals with establishing a transcriptional model in which the transcriptional activities of RNA Pol I, II, III in intact nucleus could be determined separately in vitro. With modified Giuffrida method, the nuclei isolated from rat cerebral cortex were purified in good yields ranging from 41 to 52% and high purity judging with phase-contrast microscopy. According to the method described by Blatti, RNA synthesis were studied under high or low (240 or 50 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ionic strength condition. The inhibited and residual transcription in high-salt system and presence of α -amanitin represented the activities engaged by RNA Pol II and Pol III independently, the transcription in low-salt system containing α -amanitin was mainly responsible for RNA Pol I activities. In addition, some factors effecting on the nuclei transcription in vitro were also evaluated. It was concluded that the reported model had advantages being easy to operated, saving materials, and approaching cell physiological conditions, it was suitable for studying transcriptional mechanism of cerebral cortex neurons.

Key words RNA polymerase (RNA Pol), transcription, cerebral cortex, nuclei

(Continued from page 53)

Isolation of total RNA from control and heat-shocked rat liver by phenol/chloroform/isomylalcohol method and fractionation of Poly(A)⁺mRNA by Oligo (dT)-cellulose chromatography were performed. The difference of Poly(A)⁺mRNA between control and heat-shocked rat liver was shown by urea agarose gel electrophoresis. In vitro translation of Poly(A)⁺mRNA in wheat germ system, the synthesis of four major heat shock polypeptides with approximate molecular weights of 71000, 90000, 98000 and 110000 Dalton was observed. The relative amount of major heat shock proteins increased as the rectal temperature of the heat-exposed rats rose. These results indicated that HSP was also induced when rats, as a whole, were exposed to a simulated hot environment.

Key words heat shock protein, acute heat exposure rat liver