

大鼠部分肝切除前后热激处理对过氧化物酶基因表达的影响

徐存拴¹, 张为民¹, 王莹², 赵绪永¹

(1. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453002; 2. 暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632)

摘要:用过氧化物酶原位复性电泳(SDS-POD-PAGE)技术分析了部分肝切除(partial hepatectomy, PH)、部分肝切除后再热激(partial hepatectomy following heat shock, PH-HS)和先热激再部分肝切除(heat shock following partial hepatectomy, HS-PH)后肝再生期间过氧化物酶(POD)基因表达差异,结果表明,PH中表达的POD基因种类(7个)>PH-HS(5个)>HS-PH(3个);三个模型的POD总活性为:HS-PH>PH>PH-HS。根据实验结果推测,POD在肝再生和肝损伤恢复中起一定作用。

关键词:部分肝切除(PH);热激(HS);过氧化物酶(POD);等位酶;诱导酶;肝再生

中图分类号:Q174

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2001)06-0535-04

Expression Difference of the Peroxidase Genes in Partial Hepatectomy and Heat Shock

XU Cun-shuan¹, ZHANG Wei-min¹, WANG Ying², ZHAO Xu-yong¹

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453002, China;

2. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Expression difference of the peroxidase (POD) genes during liver regeneration after partial hepatectomy (PH), partial hepatectomy following heat shock (PH-HS) and heat shock following partial hepatectomy (HS-PH) was analyzed by POD renatured electrophoresis (SDS-POD-PAGE). The results showed that the expressed POD gene kinds in PH, PH-HS and HS-PH were 7, 5 and 3 respectively, and that the total activities of POD in the three models were HS-PH > PH > PH-HS. The results suggested that POD play some roles during liver regeneration and in recovery after liver damage.

Key words: partial hepatectomy (PH); heat shock (HS); peroxidase (POD); allelic enzyme; induced enzyme; liver regeneration

肝再生涉及细胞去分化、增殖、再分化和组织结构重建等过程,在此过程中,组织和细胞形态、结构、生理、生化、代谢、调控等均发生复杂变化^[1,2]。肝再生不仅受体内各种因素调控^[3],而且也易受外界因素(包括热激)影响^[4,5]。部分肝切除的生物学效应是双重的,一方面部分肝切除作为一种损伤刺

激,可诱导生物发生应激反应,另一方面,部分肝切除作为刺激肝再生的手段,诱导肝细胞增殖^[4]。因此,部分肝切除模型是研究细胞应激反应和细胞增殖调控的良好材料。POD是体内有重要生理功能的酶,它与氧代谢、有害物质清除、生物修饰等有密切关系^[6]。POD有多种同工酶,是研究基因表达调

收稿日期:2000-12-08;修回日期:2000-04-14

基金项目:河南省生物工程重点实验室资助项目(编号:PKL99002)

作者简介:徐存拴(1958-),男,汉族,河南林州市人,教授,博士,专业方向:哺乳动物细胞分化和去分化。

Tel:0373-3326341, E-mail:cunshuanxu@yahoo.com

控、基因和性状、基因和功能关系的良好指标。近几年发现,POD 与生物的应激反应有关^[7]。用 POD 种类和活性变化为指标,分析部分肝切除前后热激处理大鼠对肝生理、生化和再生的影响,以了解生物应激反应和不同应激条件条件相互作用的分子机理。为此,本文分析了大鼠部分肝切除前后热激处理对 POD 等位酶及诱导酶基因表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

成年健康 SD 纯系大鼠,由河南师范大学实验动物房提供,雌雄各半,体重 200~250g。

1.2 化学试剂

丙烯酰胺(USB)、甲叉双丙烯酰胺(Fluka)、四甲基乙二胺(Bio-Rad)、过硫酸铵(Bio-Rad)、Tris-base(Gibco)、SDS(Gibco)、Triton X-100(Sigma)、标准分子量蛋白(上海东风生物技术有限公司)、考马斯亮蓝 R250(Fluka 进口分装)、联苯胺和双氧水(上海化学试剂二厂)。实验所用化学试剂至少为分析纯。

1.3 模型制作和样品制备

将大鼠随机分组(每组 5 只)用于制作下列三种模型。(1)部分肝切除(PH)模型:乙醚麻醉大鼠,按 Higgins 方法^[8]切除大鼠 2/3 肝,在通常饲养条件下恢复 2、4、8、12、16、24、36、48、96 和 144h;(2)部分肝切除后再热激(PH-HS)模型:PH 后恢复 4h 时,将大鼠置 46℃±0.5℃的电热鼓风恒温箱(加有湿盒)30min,然后,继续在通常饲养条件下恢复与(1)相同的时间(按部分肝切除时间计时);(3)热激后再部分肝切除(HS-PH)模型:46℃热激大鼠 30min,在通常饲养条件下恢复 8h,然后按(1)进行部分肝切除和恢复(按部分肝切除时间计时)。各组大鼠恢复到相应时间后被脊椎脱臼处死,摘除眼球放血,用肝门静脉灌注法将肝叶“洗白”后^[9],取下置于加有冰冷生理盐水的培养皿中剪碎,在 4℃、40mmol/L NaCl、20mmol/L Tris-HCl, pH7.5 的缓冲液(样品湿重,缓冲液=1:15)中匀浆,12000g 离心 10min,取上清液,按 Neuhoff 等方法^[10]测定蛋白质浓度后,分装,于-85℃保存备用。

1.4 POD 种类和活性检测

按酶原位复性电泳方法制备 SDS 聚丙烯酰胺凝胶(分离胶浓度 10%,浓缩胶浓度 4%),电泳分离

匀浆液的蛋白质(每槽 75μg 总蛋白)。电泳在 4℃进行,电流:10mA/板;电压:50V(浓缩胶)和 100V(分离胶)。电泳完毕后,用 250mmol/L Tris-HCl、2.4% Triton X-100, pH6.5 溶液将凝胶板上的 SDS 彻底洗去(酶和蛋白质复性)后,将凝胶板放到含 POD 底物(联苯胺)的溶液中保温、显色和分析^[11]。

1.5 POD 同工酶种类和活性标记方法

用大写英文字母 NN 表示对照组所含的 55kDa POD 酶带(等位酶型)。大鼠为 2 倍体动物,因而用小写英文字母 *nn* 表示该酶带的基因型。按照酶型及其基因构成命名法则,分子量小于 55kDa 的 52、48 和 41kDa 酶带依次记为 *mm*、*ll* 和 *kk*;分子量大于 55kDa 的 60、64 和 68kDa 酶带依次记为 *oo*、*pp* 和 *qq*。用“+”的多少表示 POD 活性强弱。

2 结果与讨论

2.1 对照酶带和诱导酶带的种类及基因表达

2.1.1 部分肝切除(PH)

POD 原位复性电泳分析表明,PH 后恢复 4、24 和 36h,POD 的酶型、基因型和基因表达产物均与对照(NN、*nn*)相同,但不同恢复时期的 POD 活性有区别;PH 后 2h,诱导出一条新的酶带(PP),其基因型为 *pp*,表达产物的分子量为 64kDa;PH 后 8h,诱导出一条新的酶带(MM),其基因型为 *mm*,表达产物的分子量为 52kDa;PH 后 12h,诱导出的新酶带为 OO,其基因型为 *oo*,表达产物的分子量为 60kDa;PH 后 16 和 96h,检出两条酶带(NN 和 PP),其基因型为 *nn* 和 *pp*,表达产物的分子量为 55 和 64kDa;PH 后 48h,出现三条酶带(LL、NN 和 PP),其基因型为 *ll*、*nn* 和 *pp*,表达产物的分子量为 48、55 和 64kDa;PH 后 144h,检出 4 条酶带(NN、OO、PP 和 QQ),其基因型为 *nn*、*oo*、*pp* 和 *qq*,表达产物的分子量为 55、60、64 和 68kDa(图 1、表 1)。

2.1.2 部分肝切除后再热激(PH-HS)

POD 原位复性电泳分析表明,PH-HS 后恢复 16、36、48、96 和 144h 的酶型、基因型和基因表达产物均与对照相同,但不同恢复期的 POD 活性存在差异;PH-HS 后 8h,检出两条酶带(NN 和 PP),其基因型为 *nn* 和 *pp*,表达产物的分子量为 55 和 64kDa;PH-HS 后 12h,检出一条 MM 酶带,其基因型为 *mm*,表达产物的分子量为 52kDa;PH-HS 后 24h,除 NN 酶带的活性最强外,另外还诱导三条

新酶带:KK、LL 和 PP,基因型为 *kk*、*ll*、和 *pp*,表达产物的分子质量为 41、48 和 64kDa;PH-HS 后 72h,检出三条酶带:LL、NN 和 PP,其基因型为 *ll*、*nn* 和 *pp*,表达产物的分子质量为 48、55 和 64kDa (图 2、表 1)。

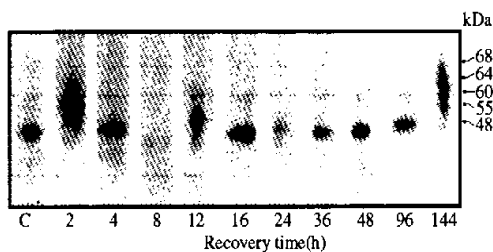


图 1 PH 后的肝再生过程中 POD 种类和活性变化
Fig. 1 changes of peroxidase kinds and activities during liver regeneration after partial hepatectomy

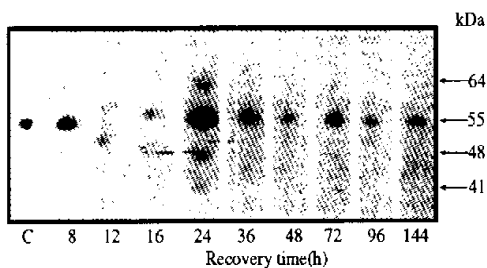


图 2 PH-HS 后的肝再生过程中 POD 种类和活性变化
Fig. 2 changes of peroxidase kinds and activities during liver regeneration after partial hepatectomy following heat shock.

2.1.3 先热激再部分肝切除(HS-PH)

POD 原位复性电泳分析表明,HS-PH 后恢复 2、8、16、48 和 96h 的酶型、基因型及分子量均与对照相同,但各恢复期的 POD 活性存在差异。另外,HS-PH 后恢复 4、12、24、36 和 144h 均产生相同的三条酶带 LL、NN 和 PP,基因型为 *ll*、*nn* 和 *pp*,表达产物的分子量为 48、55 和 64 kDa (图 3、表 1)。

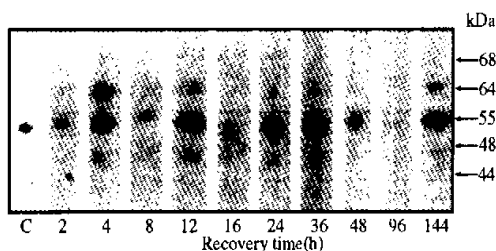


图 3 HS-PH 后的肝再生过程中 POD 种类和活性变化
Fig. 3 changes of peroxidase kinds and activities during liver regeneration after heat shock following partial hepatectomy

2.2 三种模式的酶谱及基因表达比较

比较三个模式的 POD 酶谱及基因表达差异表明,PH 中,*nn*、*oo*、*pp* 和 *qq* 基因的表达频率最高;恢复 144h 时,POD 种类最多。PH-HS 中,*kk*、*ll*、*nn* 和 *pp* 基因的表达频率最高,其 *kk* 和 *ll* 的表达与 PH(*oo* 和 *qq*)不同;恢复 24h 时,POD 种类最多,活性最强。HS-PH 中,*ll*、*nn*、*pp* 和 *qq* 基因的表达频率最高,其 *ll* 基因的表达不同于 PH,*qq* 基因的表达不同于 PH-HS。此外,HS-PH 中的 POD 种类增加和活性提高时间比其他两个模型为早,而且多个 POD 基因同时表达的时期多。如 HS-PH 后恢复 4h,POD 的种类和活性大大超过对照;HS-PH 后的 4、12、24、36 和 144h 5 个恢复时期均有 *ll*、*nn* 和 *pp* 表达。

比较三个模式的基因型变化表明,PH 中诱导表达的基因型共有 7 种:*nn*、*pp*、*mm*、*oo*、*nnpp*、*llnnp* 和 *nnoopppq*;PH-HS 中诱导表达的基因型共有 5 种:*nn*、*nnpp*、*mm*、*kkllnnp* 和 *llnnp*;HS-PH 中诱导表达的基因型仅 3 种:*nn*、*llnnp* 和 *llnnp*。

比较三个模式的 POD 分子量变化表明,PH 中共涉及 6 种(48、52、55、60、64 和 68kDa)不同分子量 POD;PH-HS 中涉及 5 种不同分子量 POD,其中 41kDa POD 仅在该模型检出,而在其他模型中表达的 60 和 68kDa POD 未能在该模型检出;HS-PH 中涉及 4 种不同分子量 POD,其中,在 PH 模型中表达的两种 52 和 60kDa POD 未能在 HS-PH 模型中检出。

表 1 PH、PH-HS、HS-PH 三种模式后过氧化物酶等位酶及诱导酶种类、基因表达和活性变化
Table 1 changes of kinds of peroxidase allelic enzymes, induced enzymes and their gene expression and activities during liver regeneration after PH, PH-HS and HS-PH

恢复时间(h)	对照	2			4			8			12				16		
基因型	nn	nn	pp	ll	nn	pp	qq	mm	nn	pp	ll	mm	oo	pp	nn	pp	
分子质量 (kDa)	55	55	64	48	55	64	68	52	55	64	48	52	55	60	64	55	64
酶活性	PH	+++		+++		+			+							+++	-
	PH-HS	+++							+++	+		+					
	HS-PH	+++	++		+	++++	+++	+		+		-	++++		+	++	

(续表 1)

恢复时间(h)	24				36			48			96		144				
基因型	kk	ll	nn	pp	ll	nn	pp	ll	nn	pp	nn	pp	ll	nn	oo	pp	qq
分子质量 (kDa)	41	48	58	64	48	55	64	48	55	64	55	64	48	55	60	64	68
酶活性	PH			+		++		-	+++	+	++	+		+	++	+++	++
	PH-HS	-	+	++++	++		++		+++		++			++			
	HS-PH		+	++++	+	+	++++	-	+++		-		+	++++		++	

2.3 三个模型的 POD 活性变化比较

PH 中,对照及 PH 后 2 和 4h,POD 活性均较强;恢复到 8h,酶活性最弱;PH 后 12h,酶活性较强,恢复到 16h,NN 酶带活性达到最高峰,而 PP 酶带活性很弱;PH 后 24h,酶活性非常弱;当恢复到 36、48 和 96h 时,酶活性又有所增强;到 144h,酶活性最强的一条带不是 NN,而是 PP。PH-HS 中,对照及 PH-HS 后 8h,NN 带活性均较强,但 PP 酶带活性却很弱;12h 的 MM 带和 16h 的 NN 带活性最弱;恢复到 24h,NN 酶带活性达到最高峰,但 KK、LL 和 QQ 三条酶带较弱;36 和 48h 时酶活性也较弱;恢复 72h 时,NN 酶带活性又变得较强,其余 LL 和 QQ 二条酶带活性仍很弱,到 96 和 144h 时,酶活性也变得很弱。HS-PH 中,NN 酶带在恢复到 2h 时较弱,8、16 和 96h 时活性最弱,而在 4、12、24、36 和 144h 时,NN 酶带活性很强,其余酶带 LL 和 PP 活性均很弱。统计三个模型的 POD 总活性表明,HS-PH > PH > PH-HS,表现出先进行热激处理再进行部分肝切除,诱导的酶带数量多、活性强;而先进行部分肝切除再进行热激处理,POD 活性较弱,酶带数量也较少。

参考文献(References):

[1] 成令忠,钟翠平,顾云娣,等.大鼠肝大部切除后肝细胞超微

结构的变化[J].解剖学杂志,1986,9(1):1~5.

[2] Murray A B, Stre C, Ssilz S. Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy and comparison with biochemical results[J]. J Cell Sci, 1981, 50:433~448.

[3] Michalopoulos G K, Defrances M C. Liver regeneration[J]. Science, 1997, 275: 60~66.

[4] 徐存栓,卢爱灵,夏民,等.大鼠肝大部切除前热休克处理对热休克蛋白和磷酸酶的影响[J].实验生物学报,2000,33(1):1~11.

[5] 夏民,卢爱灵,李效阳,等.大鼠肝大部切除后热休克处理对热休克蛋白和磷酸酶的影响[J].解剖学报,2000,31(3):239~245.

[6] Wang L S, Zhang W L, Wei L Q, et al. A study of peroxidase and amylase isoenzymes in different radish cultivars during winter storage[J]. J Sci Food Agric, 2000, 80: 1767~1771.

[7] Feige U, Morimoto R I, Yahara I, et al. Stress-inducibile cellular responses[M]. 1996, 120~232.

[8] Higgins, G M. Experimental pathology of live restoration of the white rat following partial Surgical removal [J]. Arch Pathol. 1931, 13(3): 186~202.

[9] 周家兴,夏民,金珊.大鼠肝细胞的快速分离和原代培养[J].河南师范大学学报,16(2):46~52.

[10] Neuhoff V, Philipp K, Zimmer H G. A simple versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences [J]. Physiol Chem, 1979, 360: 1657~1670.

[11] 徐存栓,吉爱玲,夏民,等.用复性电泳技术研究溶酶体蛋白水解酶的性质和活性[J].河南科学,1998,16(2):185~192.