

高温、CO及其联合作用对大鼠 HSP70mRNA, HSP70合成影响研究*

郭堂春¹ 张建民² 尤颖健² 屈 伸² 贺涵贞¹ 张国高¹

提 要 当组织细胞对热或其它刺激反应时, 均被诱导增加HSPs合成。本研究将8只雄性大鼠随机分为四组, 分别为对照组、高温组、CO组、高温+CO组。在送氧式高温与毒物联合作用装置中染毒1h, 在室温下恢复1h后, 测定其肛温、HbCO。断头处死, 取其肝脏分析HSP70mRNA和HSP70。结果如下: (1) 与对照组相比, 高温组、高温+CO组大鼠肛温均升高3.0℃以上, CO组及高温+CO组大鼠HbCO含量均达30%以上, 这说明受热及染毒后动物的体温及HbCO含量均符合本实验要求。

(2) 结果显示, 对照组仅有少量HSP70mRNA, 与之相比, CO组有所增加, 高温组增加明显, 而高温+CO组增加更为明显, 表现为协同作用。HSP70合成也与HSP70mRNA结果一致。

关键词 高温 CO 联合作用 HSP70 HSP70mRNA

高温或某些化学物质作用于机体, 导致机体发生一系列普遍而保守的反应, 这个反应被称为热应激或热休克反应(heat stress or heat shock response)。其反应的特征是, 热应激或热休克基因的激活及表达, 从而合成一组被称为热应激或热休克蛋白(heat stress or heat shock proteins, HSPs)的蛋白质, 而正常的蛋白质合成则受到抑制^[1, 2]。HSP70具有许多生物学作用, 如参与热耐受的形成和机体的生长、发育、调节等生理过程, 并与体内某些重要生物活性物质, 如某些激素、白细胞介素、肿瘤坏死因子、癌基因等有着密切的关系^[3]。在工业生产中劳动者经常同时或相继接触多种职业有害因素, 因此开展职业有害因素联合作用的研究不仅具有理论意义, 而且具有实际意义。在高温作业环境中, 高温与CO的联合作用极为常见。关于两者联合作用对热应激反应的影响在国外未见报道。本课题从转录、翻译水平探讨高温、CO及其联合作用对大鼠HSP70, HSP70mRNA合成的影响。

1 材料和方法

1.1 动物分组及染毒

根据热诱导、HSP70合成动力学^[4]、急性高温与CO联合作用致低氧损害的研究结果^[5, 6], 8只雄性SD大鼠(体重200~250g)随机分为四组: 对照组: 25±0.5℃; CO组: 25±1.0℃, 600±50ppm; 高温组: 40±2.0℃; 高温+CO

组: 40±2.0℃; 600±50ppm。在送氧式高温与毒物联合作用装置内分别染毒1h, 然后在室温下恢复1h, 用数字点温计测定大鼠肛温, 取尾部血10μl用分光光度法测定血中HbCO的百分含量, 最后将大鼠断头处死, 取同一叶肝脏分别测定HSP70mRNA和HSP70。

1.2 HSP70mRNA的检测

总RNA用酚/氯仿方法提取, 用Oligo纤维素分离mRNA, 将mRNA与 α -³²P-dATP(北京福瑞公司产品)标记的人HSP70基因杂交, 然后放射自显影显示结果^[4]。

1.3 HSP70的检测

取肝组织1g, 按吕裕强的热应激蛋白分析方法处理, 取等量蛋白用western blot方法检测HSP70。第一抗体为兔抗人HSP70(加拿大Prof. Tanguay所赠), 第二抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG。然后根据颜色深浅判断HSP70的多少。

2 结果

2.1 动物的肛温和HbCO含量

表中所示是受试大鼠的肛温和HbCO的测定结果。表中可见, 高温组、高温+CO组大鼠的肛温均较对照组、CO组明显上升, 达

* 卫生部基金资助课题

1. 同济医科大学职业医学研究所(430030)

2. 同济医科大学生化教研室

3.0°C以上($P<0.05$)。CO组及联合作用组的HbCO含量均达30%以上,以联合作用组为最高。这些结果说明了受热及染毒后动物的体温及HbCO含量均符合本实验要求,另外也证实了高温对大鼠血中HbCO的增加有一定的促进作用。

高温、CO及两者联合作用下大鼠的肛温、HbCO变化($\bar{X} \pm SD$)

组别	n	肛温(°C)	HbCO(%)
对照组	2	37.8±0.5	ND
高温组	2	41.9±0.8	ND
CO组	2	38.0±0.1	32.8±2.5
高温+CO组	2	41.3±0.7	36.7±2.2

注:ND为未检出

2.2 HSP70mRNA检测结果

8只大鼠的HSP70mRNA与HSP70基因探针杂交后,放射自显影的结果见图1。从图1中的斑点大小及密度观察可见,对照组有少量HSP70mRNA,说明在正常条件下也有少量HSP70基因转录;与之相比,CO组有所增加,高温组增加明显,而高温+CO组增加更为明显,这些说明CO刺激了HSP70基因的转录,而高温对此的诱导更为明显。表现了高温与CO的联合作用对HSP70基因的诱导为协同作用。

2.3 HSP70的检测结果

受试后大鼠肝脏中HSP70经western blot方法分析后发现,对照组中有少量HSP70合成,CO组HSP70合成有所增加,高温组HSP70合成增加明显,而高温与CO联合作用组增加更为明显,这些结果与HSP70mRNA的结果相一致,说明HSP70合成的增加(见图2)。

3 讨论

热应激蛋白是指由于环境刺激(如高温、磷酸盐、乙醇等)诱导细胞合成的一类蛋白质,其中HSP70是最主要的热应激蛋白,它的编码基因的5'端含有一段14对碱基的保守序列,对HSP70mRNA的转录起启动作用^[12]。HSP70的形成能提高机体的应激能力如耐热受

的产生等^[9],因此,探讨它的形成条件及职业有害因素对它的影响有着重要的理论和实际意义。

目前国外采用细胞培养的方法对HSP70形成机理及其功能的研究已较深入,旨在阐明基因调控机制等。对整体动物热应激诱导HSP70的研究也有不少学者进行过探讨,如1983年Currie等^[9],采用苯巴比妥麻醉大鼠在恒温电热板上热应激处理,诱导了大鼠的肝、肾、心、脑等组织合成HSP70,但这些研究的缺点是:(1)未能区分出热应激或麻醉应激对HSP70生成的诱导作用。(2)动物整体应激后取其组织块于组织培养中用同位素标记方法检测HSP70,但此时所检测到的为热应激后组织中的HSP70恢复变化。(3)此热应激条件未能很好地模拟自然受热条件。陈育庆等^[10]对HSP70的研究尽管成功地模拟了人体热应激条件,但也只能取其组织块进行培养后,再检测HSP70。由于HSP70基因片段的分离,HSP70抗体的制备成功,使本实验克服了Currie等的不足之处,较完善地探讨了高温、CO及其联合作用对HSP70mRNA、HSP70的影响,从而填补了高温与CO联合作用对HSP70影响研究的实验空白。众所周知,HSP70基因序列和氨基酸序列的高度保守,其同源性在鼠与人之间达80%以上,因此本实验用HSP70基因探针、HSP70抗体检测大鼠HSP70mRNA和HSP70是完全可行和合理的。热应激反应时,其调节主要表现在转录和翻译水平上,而转录水平由热休克转录因子(heat shock transcriptional factors, HSF)调节,它能识别靶序列,称为热休克元素(heat shock element, HSE)。而HSP70翻译水平的调节主要取决于HSP70mRNA的稳定性和翻译效率,而HSP70mRNA的稳定性又取决于细胞状态。因此本实验仅就高温、CO及其联合作用对HSP70mRNA及其HSP70合成进行研究。实验发现,在对照组中有少量HSP70mRNA产生及HSP70合成,说明正常条件下也有少量HSP70基因转录和翻译。与之相比,CO组中

合成略为增加,说明了CO通过HbCO导致组织缺氧所致;高温明显诱导了HSP70合成,其机制是:在高温环境中,环境附加热增加导致了大鼠体内蓄热,体温升高达3.0℃以上,从而诱导了HSP70基因的转录和HSP70mRNA稳定性的增加。Theodorakis等^[4]研究发现,HSP70mRNA在非热休克细胞中,其半衰期约为50min,而在热休克细胞中HSP70mRNA的稳定性增加10倍。且在37℃~42℃范围内其HSP70合成水平达到最高,若温度超过42℃,合成水平则下降。CO与高温相比,其诱导HSP70mRNA,HSP70合成明显偏低,其原因可能是一方面缺氧诱导了HSP70合成,另一方面,缺氧又导致供能方面的不足,进而抑制HSP70的合成。高温与CO联合作用时其HSP70,HSP70mRNA合成均较单纯高温、CO明显增加,提示为协同作用。关于不同浓度的CO与不同温度的联合作用效应是否与本实验结果相符,尚待进一步证实。

4 参考文献

- 1 Lindquist,S.The heat shock response. Annu. Rev.Biochem.1986;55:1151
- 2 Lindquist,S.and E.A.Craig. The heat shock proteins. Annu. Rev. Genet.1988;22:631
- 3 Shinde,U.and Inouye,M.Intramolecular shaperones and protein folding. TIBS 1993;18: 442
- 4 Theodorakis, N. G. and Morimoto, R. I. posttranscriptional regulation of hsp70 expression in human cells,effects of heat shock, inhibition of protein synthesis, and adenovirus infection on translation and mRNA stability. Mol.Cell.Biol. 1987;7(12):4357
- 5 张伟,等. CO急性毒性研究. 中华预防医学杂志1982; 16(1):30
- 6 张伟,等. 环境温度与一氧化碳联合作用的研究. 武汉医学院学报1985;2:122
- 7 Jarjour, W.N.,Jeffries,B.D,Davis,J.S. et al. Autoantibodies to human stress proteins: a survey of various rheumatic and other inflammatory diseases. Arthri. and Rheuma,1991; 34(9):1133
- 8 Laszlo A.Evidence for two states of thermotolerance in mammalian cells.Int J. Hyperthermia(United kingdom).1988;4(5):513
- 9 Currie R.W and White, F.P.Characterization of the synthesis and accumulation of a 71kiloton protein induced in rat tissues after hyperthermia.Can J Biochem Cell Biol. 1983; 61:438
- 10 陈育庆,等. 急性热暴露大白鼠肝脏热休克蛋白形成的研究. 生物化学与生物物理进展1990; 17(1): 50

会议征文通知

中华预防医学会职业病专业委员会职业健康监护学组拟于1996年10月召开全国学术交流大会,从即日起征集学术论文,稿件内容为:(1)如何保证就业前健康监护工作的全面落实;(2)定期健康监护的管理模式;(3)健康监护工作规范的研制;(4)职业禁忌证的研究;(5)劳动能力鉴定的研究;(6)其它有关职业健康监护工作的调查与研究;(7)健康监护筛选出观察对象的管理;(8)与工作有关疾病的健康监护。

其调查监护的对象,除接触生产性粉尘、毒物、物理因素、生物学因素的工人外,对机动车驾驶员、交警、教师、铺路工、下水疏浚工、清扫工、厨师等职业的调查与监护的论文也受欢迎。

来稿请用原稿纸誊写,不超过4000字,写出500字左右的论文摘要。来稿请寄《中国工业医学杂志》编辑部白汝义收。地址:沈阳市铁西区南十一西路18号,邮编:110024,电话:024—5873841,并在信封上注明:

“健康监护会议征文”字样。通过邮局汇寄稿件处理费,每稿10元。来稿一经采用,部分发表在《中国工业医学杂志》上。来稿一律经专家评审,如被评为优秀论文,除授予优秀论文证书外,尚颁发奖金。

稿件截止日期为1996年6月末,以邮戳为准,会议地址另行通知。

中华预防医学会职业病专业委员会职业健康监护学组

Abstracts of Original Articles

Investigation on the Cytogenetic Effects in Tunnel Bus Drivers and Conductors**Peng Baocheng, et al**

The cytogenetic effects of tunnel bus drivers and conductors were studied in the paper, workers in Shanghai botanical garden were selected as control group. The result showed that the 6-TG-resisting lymphocyte mutation rate, frequency of sister chromatid exchange and the micronucleus of peripheral blood lymphocyte in exposed group were markedly higher than those in control group. The result suggested that high concentration automotive exhaust could induce genetic damages on occupational exposed people.

Key words, automobile exhaust, lymphocytes, 6-TG-resisting mutation, sister chromatid exchange, lymphocyte micronucleus

Studies on DPPC in the BALF of Experimental Silicotic Rats**Yang Qing**

Rat were injected with 50mg of silica intratracheally. The contents of dipalmitoyphosphatidylcholine(DPPC) of the broncho alveolar lavage fluid(BALF) were detected on 15, 45, 90, 180 and 270 days after dosing. The lung tissues of silicotic rats were examined under scanning electromicroscopy. The results show that the DPPC peaks at early stage and declines along with the experimental duration. There is a condation between the DPPC levels and the changes of amount and function of the type 2 areolar epithelium under scamming electromicroscopy.

key words, silica, dipalmitoyphosphatidylcholine(DPPC), scanning, electromicroscopy

Combined Effects of High Temperature and Carbon Monoxide on Rat Liver HSP70mRNA and its Synthesis**Wu Tangchun, et al**

The HSPs(heat stress proteins) could be induced by heat or other stimuli, the normal proteins was inhibited. Present study aimed at the effects of high temperature, carbon monoxide and their combined effects on the major heat stress protein-HSP70 and its mRNA. 8 male rats were randomly divided into four groups, control group($25.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$), high temperature group($40.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$), carbon monoxide group (600 + 50ppm, $25.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$) and the combine effects group(600 + 50ppm, $40 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$). After experiment, the rats recovered in room temperature for 60 min. Then determined the rectal temperature and HbCO in the blood, the liver were taken for HSP70 and its mRNA for analysis. The results were as follows, (1) the rectal temperature in high temperature group and combined effect group, showed a 3.0°C , HbCO level in CO group and combined effect group increased above 30%, respectively compared with control group. (2) only little HSP70 mRNA was transcribed in control group, showed little increase HSP70 mRNA was obviously increased in high temperature group, and the increase of HSP70 mRNA in combined effect group was most obvious, suggesting a synergistic action between high temperature and CO. The synthesis of HSP70 showed a consistent changes with that of its mRNA in all groups.

Key words, high temperature, carbon monoxide, combined effects, heat stress proteins, HSP70mRNA

The Study of Byssinosis in Guangzhou**Jiang Chaoqiang, et al**

1320 workers of two factories processing pure cotton were studied, 1306 subjects without occupational dust exposure were served