

热休克反应与哺乳动物高海拔(缺氧)适应

王晓临^{①②③*} 徐存栓^④ 王修杰^⑤ 王冬杰^⑥ 王青山^⑦ 张宝琛^①

(① 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; ② 中国科学院研究生院, 北京 100045; ③ 青海大学附属医院, 西宁 810001; ④ 河南师范大学科技部重点实验室, 新乡 453000; ⑤ 四川大学华西医院肿瘤研究所教育部重点实验室, 成都 610041; ⑥ 广州美晨药业卫生部重点实验室, 广州 510075; ⑦ 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海口 571737)

摘要 利用免疫学和分子生物学手段研究哺乳动物的高海拔(缺氧)适应, 通过哺乳动物热休克反应, 了解热休克蛋白在生物体高海拔(缺氧)适应中的意义. 用 Western blot 和常规 RT-PCR 及实时荧光定量 PCR(real-time PCR detection)测定不同海拔哺乳动物(牦牛)心肌组织热休克蛋白 70(Hsp70)的表达差异和脑组织中 *Hsp70* 基因的自然表达. 将低海拔哺乳动物(家兔)直接送达不同高海拔地区(海拔 2300, 3300, 5000 m)喂养 3 周后宰杀, 再用 RT-PCR 测定其脑组织中 *Hsp70* 基因的诱导表达. 结果显示: 不同海拔哺乳动物都具有热休克反应基因, 应激时高海拔哺乳动物 Hsp70 表达快速升高; Hsp70 可被高海拔(缺氧)诱导产生. 热休克反应中 Hsp70 的快速合成有利于维持应激时细胞的正常生理功能, Hsp70 的表达存在着阈值, 海拔 5000 m 是热休克反应最佳的条件, 超过海拔 6000 m 时热休克反应减弱; Hsp70 生成量与细胞的耐缺氧能力成正比.

关键词 热休克反应 热休克蛋白 70(Hsp70) Western blot RT-PCR 实时荧光定量 PCR 高海拔(缺氧) 哺乳动物 应激

生物对环境的适应是指生物的形态结构和生物功能与其赖以生存的一定环境条件相适应的现象. 在进化的历史长河中, 有机体具备了诸如行为适应、形态变化、生殖调节和细胞反应等抵抗环境变化的胁迫的能力, 其中最常见的是涉及热休克蛋白(heat shock protein, Hsp)迅速合成的细胞胁迫反应^[1]. 国际上, 对通过分子比较追溯生物进化的轨迹的研究已有极大的突破, 热休克蛋白在分子进化上的研究, 主要就是从这一方面进行的. 热休克反应是生物对逆境适应的一种新的形式. 自 Ritossa^[2]在 1962 年对果蝇唾液腺染色体的研究, Tissières 等人^[3]在 1974 年对果蝇幼虫的研究中发现热休克反应以来, 热休克反应已成为各领域的研究热门. 热休克反应(heat shock

response)是细胞在受到外界应激刺激后发生的反应, 存在于从细菌到人的整个生物界中^[4], 它不仅为热刺激所诱导, 而且可为物理因子如紫外线、射线等, 化学因子如重金属、细胞性毒剂等及机械刺激如缺氧、寒冷及营养缺乏等所诱发^[5]. 由各种应激因子引起的热休克反应被称为应激反应(stress response, Sr), 产生的蛋白质被称为热休克蛋白, 热休克蛋白具有保护有机体(或细胞)不受损害或少受损害的功能^[6], 其中 Hsp70 具有重要的细胞作用, 如抗逆性、分子伴侣. Hsp70 在高海拔(缺氧)应激时, 产生的 Hsp70 可以增强细胞对下一次有害损伤的耐受程度, 维持细胞的正常生理功能代谢, 提高细胞生存率^[7-10]. 热休克蛋白能产生一系列相应的生理反应, 来减缓细胞的

收稿日期: 2005-12-24; 接受日期: 2006-01-20
中国科学院“西部之光”资助项目
* E-mail: wangx163@126.com

损伤^[11~15]。此外,热休克蛋白(Hsp),包括分子伴侣,是其他蛋白质减轻压力的变性细胞。国际上,很多科学家对 Hsp 展开了研究,目前已经在分子和细胞水平了解了 Hsp 的作用。对 Hsp 的研究包括真核细胞的应激生理和组织及器官应激性改变,也包括对生态学的变化和 Hsp 基因演变的研究^[16]。目前的研究多认为热休克蛋白可作为促进因子或“突变容器”在物种进化中发挥作用^[17~19]。Lerman 等人^[20]通过实验证实,环境转变时,Hsp 的遗传物质可产生定量的变化,这种变化会在种群范围内产生区别,自然选择可对其起作用。Rutherford 等人^[17]认为 Hsp 可以缓冲物种的表型变化,即自然选择能增加物种的遗传多样性,在 Hsp 的调节下,机体的表型变化一般不能立刻表现出来,直到当物种的环境受胁迫时,这种变化才显现。相应地,当机体受胁迫时,Hsp 参与某种机制使中性突变转变成选择突变,依靠此来适应选择的需要。换句话说,Hsp 可以在选择压力下影响基因的表达,通过调节突变的蛋白质正确折叠,或是间接地通过调节信号转导缓冲开始变化的表型,使不利于环境的形态基因不能立刻表达,而隐藏的有利基因得以表达。Feder 等人^[18]通过实验进一步支持这种说法。国内对 Hsp 的研究已进展到基因水平,如 Hsp 基因的表达,应激时热休克蛋白的表达,但大多局限于医学、运动医学、畜牧兽医、农业等领域,在生态方面的研究刚开始,但国外早已开始用 Hsp 的表达研究生态适应。如以色列科学家 Choresh 等人^[21]用 Hsp60 研究地中海以色列沿岸盛产的绿海葵对海水温度变化的适应能力;加拿大科学家 Ramaglia 等人^[22]用 Hsp70 研究西方绘画海龟对缺氧的适应能力。本研究用 Hsp70 探讨哺乳动物对高海拔(缺氧)适应能力。它的意义是哺乳动物(人类)突然到达高海拔地区时,因高海拔不适出现呼吸困难等一系列症状,甚至死亡;但在次高海拔地区休息数日后,则能改善呼吸困难等一系列症状,克服了高海拔产生的不适。研究结果提示机体对高海拔(缺氧)应激能发生适应^[23],但不能突然到达高海拔地区,而只能缓冲到达,使机体有时间对应激产生适应。应激适应的机理是热休克反应及热休克蛋白的产生。Hsp70 对生态环境的重要贡献是:(i) 所有组织都有 Hsp70 的表达,不同的组织变化发生在它们的反应时间之中;(ii) 多数 Hsp70 表达

后,均能回归到正常生理状态;(iii) Hsp70 作为一生物标记在环境监测中被应用^[24];(iv) 热休克反应能提高生物的生存和有机体的耐受性^[25];(v) 在适应环境的生物中 Hsp70 mRNA 的表达高,热休克反应在种内调节诱导适应^[26]。

1 材料和方法

1.1 试剂

Hsp70 标准分子量蛋白购于 Serva 公司,一抗为鼠抗人 Hsc70/Hsp70 单克隆抗体购于北京中山公司,二抗为辣根过氧化物酶(hrp)标记的羊抗小鼠 IgG 购于北京中山公司,DAB 显色(二氨基联苯胺)购于北京中山公司。Trizol 提取 RNA 试剂盒购于北京鼎国公司;M-MLV RT(100 u/μL),Rnasin,5×buffer 购于日本东洋坊生物公司;DTT(100 mmol/L)、随机引物六聚体(20 μmol/L) 购于北京鼎国公司;dNTPs(10 mmol/L, pH 7.5, 购于 Genview 公司;Hsp 基因和β-actin 基因的引物由奥科生物公司合成;仪器:PCR 仪为美国 ABI-2400 型;实时荧光定量 PCR 仪(real-time PCR detection system)为美国 ABI-7700 型。用 Gel-ProAnalyzer 软件对 Western blot 蛋白质条带进行定量测定;用 Excel 2000 软件做统计学处理;用 SPSS(11.0 版)对 RT-PCR 数据进行统计分析。

1.2 材料

海拔 5000 m 牦牛(*Poephagus grunniens*)两头来自青海省玛多县,3300 m 牦牛两头来自青海省海南州,2300 m 牦牛两头来自青海省西宁市周围,平原地区黄牛(*Bos taurus domesticus* Gmelin)两头来自河南师范大学试验动物中心。取材部位为上述动物的心肌和脑组织。不同高海拔地区实验动物的对比均为牦牛,高海拔地区与平原地区对比为牦牛与黄牛^[27~29],低海拔家兔(*Oryctolagus cuniculus domesticus*)购于卫生部兰州生物制品厂(新西兰品系大白兔,合格证书:医动字第 14-004 号。甘肃省兰州市的海拔是 1600 m)。将低海拔地区哺乳动物(家兔)直接用车送达不同高海拔地区(海拔 2300 m 的青海省西宁市喂养 10 只、海拔 3300 m 青海省共和县喂养 10 只、海拔 5000 m 的青海省玛多县喂养 10 只),喂养 3 周(均为摄氏 18℃ 环境温度、12 h 光照时间及相同的饲料)后宰杀。

1.3 Western blot 测定不同海拔哺乳动物的 Hsp70 的热休克反应

海拔 5000, 3300, 2300 m 牦牛和平原地区黄牛, 分别宰杀后, 取其心肌. 立即置 4℃ 缓冲液 (40 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 缓冲液=1:10) 中匀浆, 12000×g 离心 10 min, 取上清液^[30], 用 Neuhoff 等人^[31]方法测定匀浆液的蛋白质浓度, 用 75-2 型分光光度计测量各个样品 630 nm 处的 A 值; 蛋白质分子量为 72 kD. 换算出每个样品的浓度 (即蛋白质浓度), 根据蛋白质浓度和上样的总蛋白量, 计算出上样体积. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 按 Laemmli^[32]的方法进行. Western blot 印迹 (WB) 按 Towbin 等人^[33]方法进行. 一抗为鼠抗人 Hsc70/Hsp70 单克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG, 避光显色后, 用 TE-Buffer (Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA Na 21 mmol/L) 终止固定.

1.4 RT-PCR 测定不同海拔哺乳动物的 Hsp70 基因的表达

海拔 5000, 3300, 2300 m 牦牛和平原地区黄牛, 分别宰杀后, 取其大脑组织. Hsp 扩增引物序列 (根据所需检测的病原体或者待检特定基因). 上游引物: 5'-AAAAACATggCTATCggCATCGA-3', 下游引物: 5'-CAgATCAAAGATgAgCACgTT-3'.

(1) 细胞总 RNA 的提取、RNA 的纯度、含量及完整性的测定和 RT-PCR 操作步骤均依照 Newton 法^[34,35]进行: 称取 0.2 g 冻存的高海拔牦牛脑组织放入 Trizole 里, 液氮快速研磨, 加入 1 mL Trizole 试剂, 振荡, 加入氯仿溶液 200 μL, 振荡, 取上清液, 加入 500 μL 异丙醇, 离心, 沉淀 20 min, 离心 20 min, 弃上清, 10DEPCddH₂O, 取 2 μL RNA 电泳, 另取 2 μL RNA 完成 cDNA, 产物冻存于 -20℃ 备用.

(2) Hsp 与 β-actin 基因的 PCR (51 μL): 以制备的总 RNA 细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应参数为: 94℃, 变性 5 min, 94℃, 30 s, 55℃, 30 s; 72℃, 30 s 共 30 个循环, 再 72℃ 延伸 7 min. 反应结束后, 取 5 μL 产物在 10 g 琼脂糖凝胶中进行电泳鉴定. 用 DNA 胶回收试剂盒回收鉴定正确的 PCR 产物片段, 拍照.

(3) 软件分析: 用 One-Dsan2.03 软件进行分析.

(4) Hsp 的 PCR 产物为 600 bp, β-actin 的 PCR 产

物为 420 bp.

1.5 荧光实时 RT-PCR 测定不同海拔哺乳动物的 Hsp70 基因表达差异

(1) 取海拔 5000, 3300 m 牦牛和平原地区黄牛脑组织: 通过资料查询并设计 Hsp 扩增引物序列: 上游引物: 5'-aggagatctcgtcgtggtg-3', 下游引物: 5'-gatgatcctcagcagcttca-3' 扩增产物大小为 170 bp; β-actin 基因引物序列为: 上游引物: 5'-cacagagcctcgcctttgcc-3', 下游引物: 5'-gacccatgccaccatcacg-3', 扩增产物大小为 200 bp.

(2) 细胞总 RNA 的提取, RNA 的纯度, 含量及完整性的测定和 RT-PCR 操作步骤与第 1.4 小节相同 (均依照 Newton 法^[34,35]).

(3) 将两种 cDNA 部分等体积混合然后 10 倍梯度稀释作为相对标准样, 并自定义其浓度为 1.0×10^{-1} , 1.0×10^{-2} , 1.0×10^{-3} 和 1.0×10^{-4} .

(4) 定量 PCR 实验 (25 μL 体系): cDNA: 2 μL, 引物 (上游+下游): 0.5+0.5, SYBRGreen Real-time PCR master mix: 12.5 μL, 双氧水为 9.5 μL. 每个样品做两个平行, 并设有两个空白对照.

(5) Hsp 与 β-actin 基因的 PCR (25 μL): 以制备的 β-actin 基因和 Hsp 基因的细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应参数为: 94℃, 变性 2 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s; 72℃ 40 s 共 38 个循环, 结束反应.

(6) 实验结果统计分析: 应用分析软件进行结果分析, 即用荧光定量 PCR 检测系统 V4.0 软件进行分析.

1.6 RT-PCR 测定高海拔 (缺氧) 诱导低海拔家兔 Hsp70 基因表达的差异

用 RT-PCR 测定其大脑 Hsp70 的基因表达. 上游引物: 5'-tgttgcaacctgaaggtg-3', 下游引物: 5'-aatcatcgcgagaatac-3'.

(1) 细胞总 RNA 的提取、RNA 的纯度、含量及完整性的测定和 RT-PCR 操作步骤与第 1.4 小节相同 (均依照 Newton 法^[34,35]).

(2) 提取 RNA 步骤参考说明书 (Trizol 方法提取).

(3) 反转录: Hsp 与 β-actin 基因的 PCR (25 μL): 以制备的 β-actin 基因和 Hsp 基因的细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应参数为: 94℃, 变性 2 min,

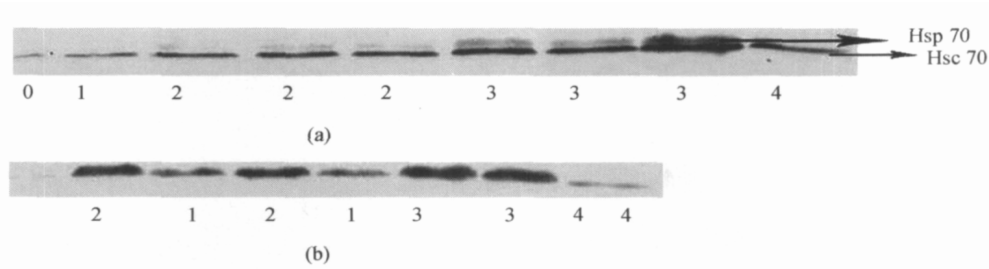


图 1 海拔 5000, 3300 m 牦牛和平原地区黄牛 Hsp70 的表达

(a) Hsp70 示诱导型热休克蛋白(cinduced heat shock proteins 70), Hsc 70 示组成型热休克蛋白(continuous heat shock proteins 70); (b) 海拔 5000, 3300, 2300 m 牦牛 Hsp70 的表达. 0 示平原地区黄牛, 1 示海拔 2300 m 牦牛, 2 示海拔 3300 m 牦牛, 3 示海拔 5000 m 牦牛, 4 示海拔 6000 m 牦牛

94℃, 30 s, 55℃, 30 s; 72℃, 40 s, 72℃, 5 min, 共 35 个循环, 结束反应.

(4) 电泳拍照.

(5) 实验结果统计分析: 应用分析软件进行结果分析(One-Disan2.03 软件), Hsp 的 PCR 产物为 800 bp, β -actin 的 PCR 产物为 200 bp.

2 结果

2.1 Western blot 测定不同海拔哺乳动物的 Hsp70 的热休克反应

经 Western blot 检测牦牛 Hsp70 表达结果见图 1 和 2.

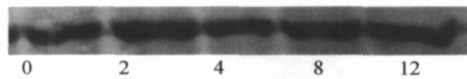


图 2 β -actin(进样量 80 μ g)

由图 1 可见: 不同海拔牦牛心肌中的蛋白质条带密度不同, 带宽也不同, 着色浓度也不同, 因此它们的相对值存在差异, 该差异反映了 Hsp 表达的不同, 即高海拔地区牦牛 Hsp70 应激反应对比中, 海拔 3300 m 牦牛应激反应中等(Hsp70 的表达居中), 海拔 5000 m 牦牛的应激反应激剧(Hsp70 的表达最高), 海拔 6000 米牦牛应激反应减弱(Hsp70 的表达消失); 平原地区黄牛无 Hsp70 应激反应.

由图 2 可见: 经过进样量筛选后, 样品的进样量为 80 μ g 时效果较好, 确定了检测牦牛心肌中 Hsp 的表达时进样量为 80 μ g.

2.2 RT-PCR 测定不同海拔哺乳动物的 Hsp70 基因的表达

(1) 提取的细胞总 RNA 质量: 培养的高海拔牦牛脑组织 Hsp70 细胞总 RNA 经 1%琼脂糖凝胶中电

泳(图 3), 可见 28S, 18S 两条清晰的带, 证明所提取 RNA 质量完整, 无降解.

(2) RT-PCR 测定不同海拔哺乳动物的 Hsp70 基因的表达: 普通 PCR 方法: 以 DNA 为模板扩增出基因. 由 mRNA 反转录产生的 cDNA 进行克隆而得以解决.

以高海拔牦牛脑组织总 RNA 为模板, 通过 pdN6 随机引物在 AMV 反转录酶的作用下合成 cDNA, 采用 pfu-DNA 聚合酶进行 RT-PCR 反应, PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, cDNA 分子量是 540 bp, 获得高海拔牦牛脑组织 Hsp70 基因, 见图 4.

以平原黄牛脑组织总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 反应, PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, cDNA 分子量是 600 bp, 获得平原黄牛脑组织 Hsp70 基因, 见图 5.

2.3 荧光实时 RT-PCR 测定不同海拔哺乳动物的 Hsp70 基因表达的差异

由于 C_t 值与模板初始拷贝数的对数值呈线性关系, C_t 值越小, 说明模板的目标拷贝数量越多, 即该基因的表达量越大.

(1) β -actin 原始数据: β -actin 定量标准模板荧光实时定量 PCR 的动力学曲线见图 6, β -actin 表达结果见表 1.

将不同梯度定量模板数与其 C_t 值关系经对数拟合作图, 得到了定量标准曲线, 其相关系数为 0.9843, 见图 7.

(2) Hsp 基因原始数据: Hsp 基因荧光实时定量 PCR 的动力学曲线见图 8, Hsp 表达结果见表 2.

将不同梯度定量模板数与其 C_t 值关系经对数拟合作图, 得到了定量标准曲线, 其相关系数为 0.9833, 图 9.

(3) 结果校正: 结果校正见表 3.

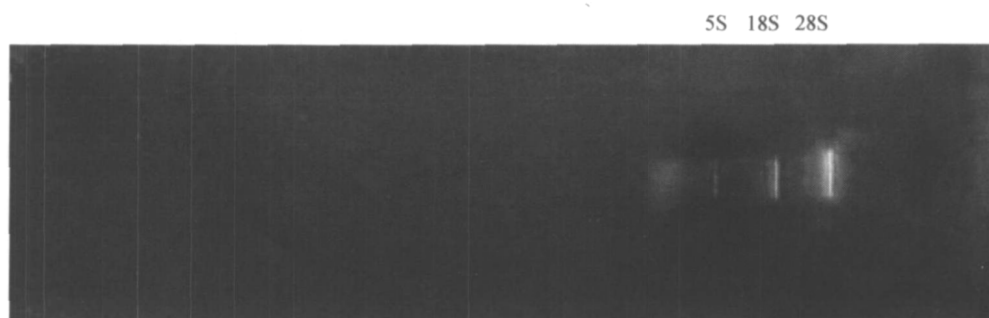


图 3 细胞总 RNA 质量

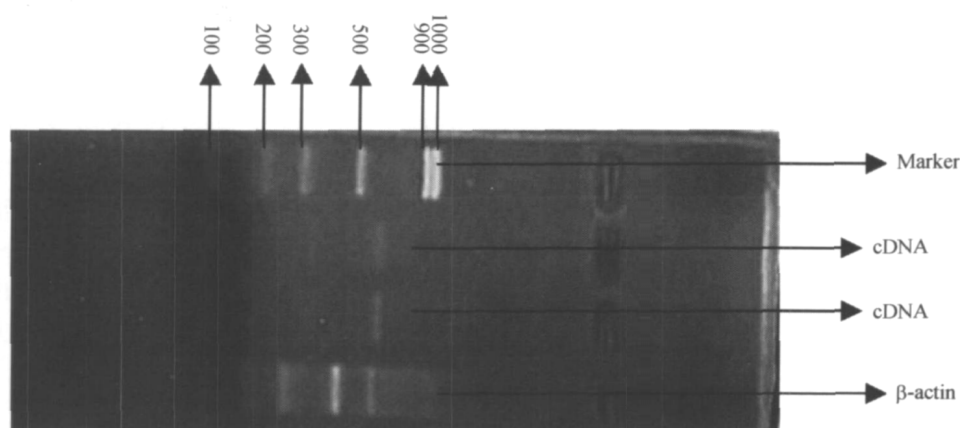


图 4

cDNA 分子量为 540 bp. β -actin 用来证明 cDNA 是正确的, Marker 示分子量标准

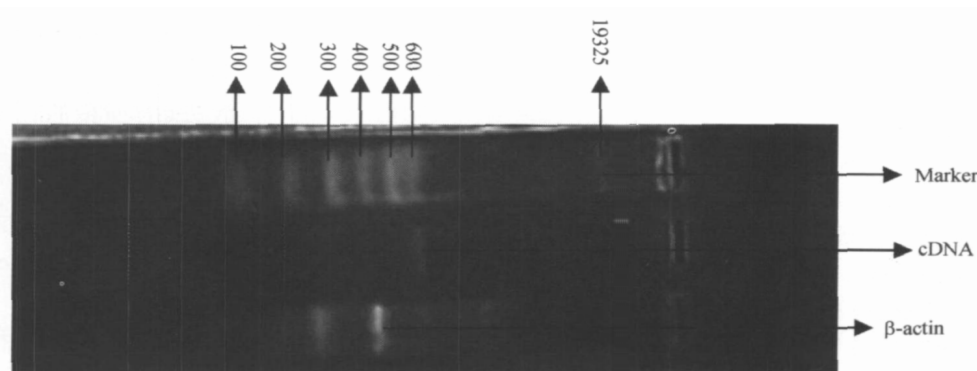


图 5

cDNA 分子量为 600 bp. β -actin 用来证明 cDNA 是正确的, Marker 示分子量标准

2.4 RT-PCR 测定高海拔(缺氧)诱导低海拔家兔 *Hsp70* 基因表达的差异

(1) 提取的细胞总 RNA 质量, 高海拔(缺氧)诱导低海拔家兔脑组织 *Hsp70* 细胞总 RNA 经 1%琼脂糖

凝胶中电泳(图 10), 均可见 28S, 18S 两条清晰的带, 证明所提取 RNA 质量完整, 无降解. β -actin 用来证明 cDNA 是正确的; Marker 是分子量标准.

(2) 两次测定经高海拔(缺氧)诱导的低海拔家兔

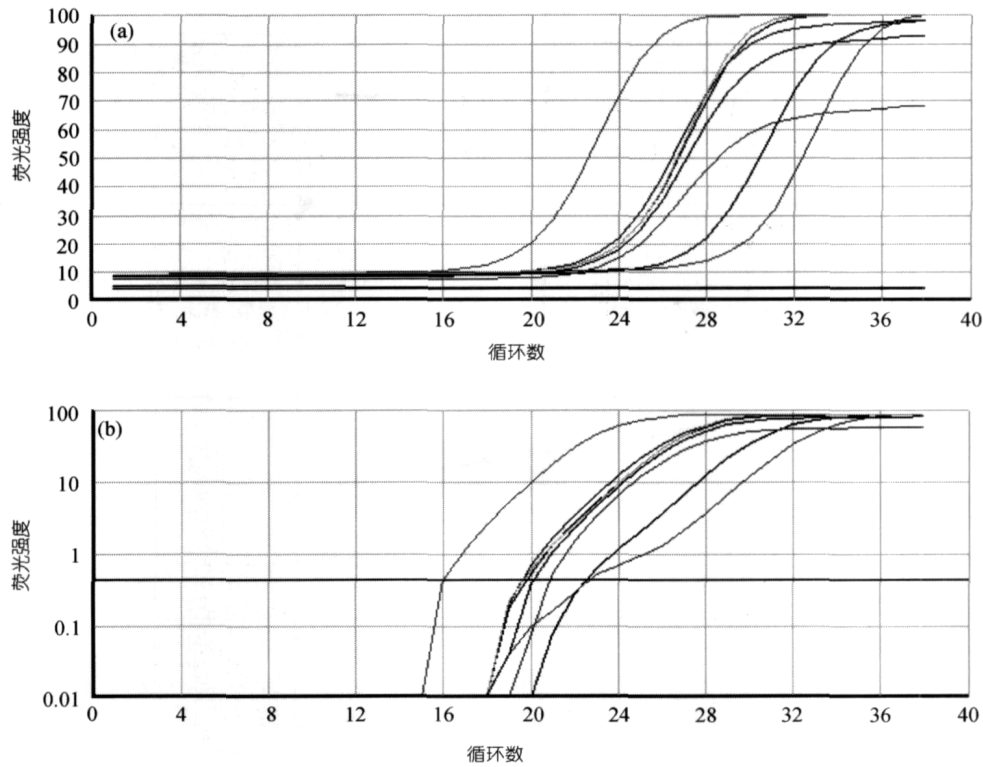


图 6 β -actin 定量标准模板荧光实时定量 PCR 的动力学曲线

表 1 β -actin 表达结果^{a)}

编号	样品号	型号	C_t	拷贝数	平均拷贝数	浓度值/%
1	β -actin 标准 1	标准	16.74	1.00×10^{-1}	1.12×10^{-1}	1.2%
2	β -actin 标准 2	标准	20.24	1.00×10^{-2}	9.63×10^{-3}	3.7%
3	β -actin 标准 3	标准	23.51	1.00×10^{-3}	1.00×10^{-3}	0.0%
4	β -actin 标准 4	标准	25.43	1.00×10^{-4}	1.05×10^{-4}	0.5%
5	样品 1	未知	20.55		6.56×10^{-3}	
6	样品 2	未知	20.72		5.74×10^{-3}	
7	样品 3	未知	20.90		4.99×10^{-3}	
8	样品 4	未知	20.85		5.18×10^{-3}	
9	其他					

a) 样品 1 和 2 分别代表高海拔(5000 m)的样品, 样品 3 和 4 分别代表低海拔(2300 m)的样品

表 2 Hsp 表达结果^{a)}

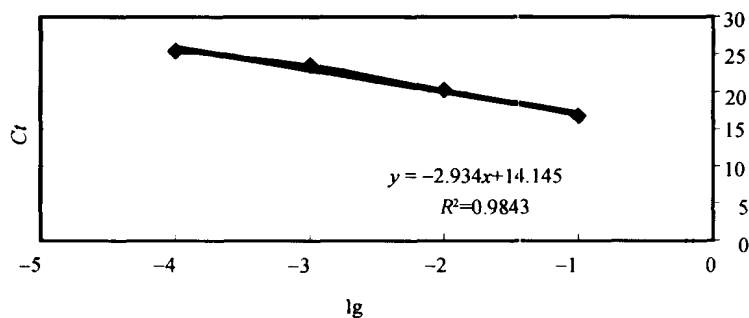
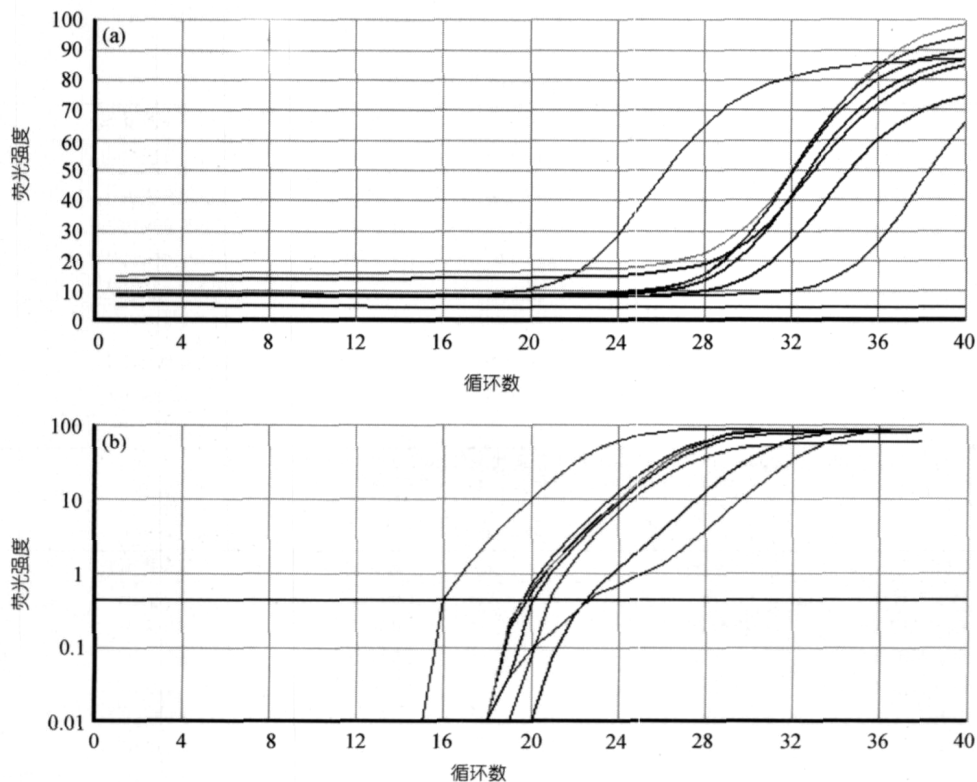
编号	样品号	型号	C_t	拷贝数	平均拷贝数	浓度值/%
1	Hsp 标准 1	标准	19.37	1.00×10^{-1}	1.02×10^{-1}	0.2%
2	Hsp 标准 2	标准 rd	24.87	1.00×10^{-2}	1.01×10^{-2}	0.1%
3	Hsp 标准 3	标准 rd	27.82	1.00×10^{-3}	9.62×10^{-4}	3.8%
4	Hsp 标准 4	标准	31.57	1.00×10^{-4}	1.13×10^{-4}	1.3%
5	样品 1	未知	22.80		1.93×10^{-2}	
6	样品 2	未知	22.65		2.11×10^{-2}	
7	样品 3	未知	25.82		3.33×10^{-3}	
8	样品 4	未知	25.67		3.63×10^{-3}	
9	其他					

a) 样品 1 和 2 分别代表高海拔(5000 m)的样品, 样品 3 和 4 分别代表低海拔(2300 m)的样品

表 3 结果校正表^{a)}

样品名称	高海拔样品		低海拔样品	
	1	2	3	4
β-actin(内参)	6.56×10^{-3}	5.74×10^{-3}	4.99×10^{-3}	5.18×10^{-3}
待测基因(<i>Hsp</i>)	1.93×10^{-2}	2.11×10^{-2}	3.33×10^{-3}	3.63×10^{-3}
校正后值	2.94	3.67	0.67	0.70
Hsp / β-actin				

a) 两种样品待测基因(*Hsp*)实时定量 PCR 后由标准曲线图所得测量值为: 1.93×10^{-2} , 3.33×10^{-3} ; 两种样品内参基因(β -actin)实际时间定量 PCR 后由标准曲线图所得测量值为: 6.56×10^{-3} , 4.99×10^{-3} ; 实时定量 PCR 时两种样品上样量均为 2 μ L, 然而由于受 RNA 浓度定量误差和 RNA 反转录效率误差等的影响, 每个样品的 2 μ L 体积的 cDNA 其含量并不完全相同, 为校正此差异, 使用管家基因 β -actin(不同样品间表达量基本恒定)作为内参, 以样品待测基因得值除以该样品内参得值, 最终得到的比值为样品的待测基因相对含量; 样品 1 和样品 2 的比值比样品 3 和样品 4 的比值高, 说明高海拔地区牦牛 *Hsp* 基因表达量相对高些. 由于海拔高, 缺氧等恶劣环境促使牦牛的 *Hsp* 基因大量表达

图 7 β -actin 荧光定量 PCR 法定量标准曲线图 8 *Hsp* 基因荧光实时定量 PCR 的动力学曲线

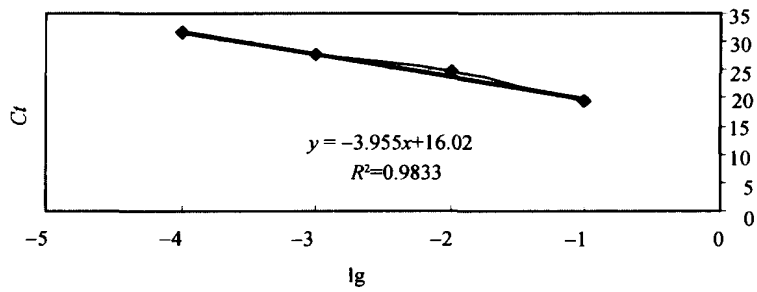


图 9 *Hsp* 标准曲线

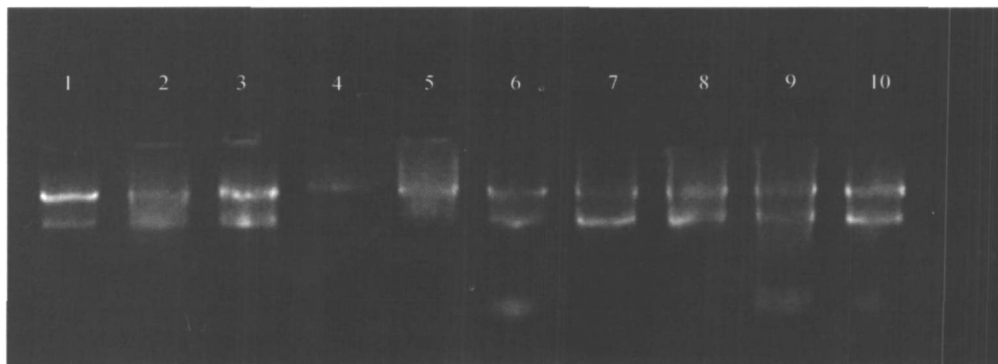


图 10 低海拔家兔高海拔(缺氧)诱导后 *Hsp70* 基因的细胞总 RNA
1~10 示总 RNA

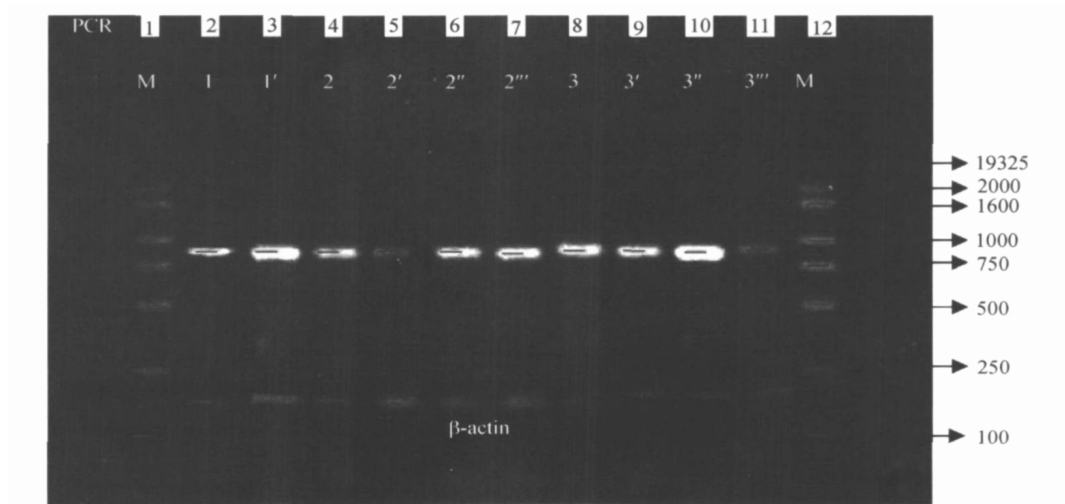


图 11 低海拔家兔高海拔(缺氧)诱导后 *Hsp70* 基因的表达

1 系列为在海拔 2300 m; 2 系列为在海拔 3300 m, 3 系列为在海拔 5000 m; M 示 Marker; 2~11 为 β -actin. *Hsp* 的 PCR 产物为 800 bp, β -actin 的 PCR 产物为 200 bp

均有 *Hsp70* 基因的表达(图 11).

高海拔(缺氧)诱导低海拔家兔 *Hsp70* 基因表达的差异见表 4.

3 讨论

利用免疫学和分子生物学手段对生态学和高原医学的现象进行了研究, 并且利用动物实验对哺乳

动物(人类)突然到达高海拔地区时,因高海拔不适出现呼吸困难等一系列症状,甚至死亡;但在次高海拔地区休息数日后,则能改善呼吸困难等一系列症状,克服了高海拔产生的不适的现象进行了研究. 实验

表 4 高海拔(缺氧)诱导低海拔家兔 *Hsp70* 基因表达的差异($\bar{x} \pm s$)^{a)}

组别	产地	海拔/m	<i>Hsp70</i> 表达
家兔 1 组	西宁市	2300	0.16±0.14
家兔 2 组	共和县	3300	0.14±0.12*
家兔 3 组	玛多县	5000	0.12±0.14*

a) 家兔 3 组和 2 组与 1 组比较: * $P < 0.05$

表明: 热休克蛋白是机体对应激反应产生的物质, 能促进机体对高海拔应激的适应; 高海拔应激对 *Hsp70* 的诱导表达剧烈; 高海拔哺乳动物和低海拔哺乳动物都具有热休克反应的基因, 以及不同的反应程度; 生物从低海拔到高海拔后出现热休克蛋白基因的表达. 实验证明了热休克反应是哺乳动物高海拔(缺氧)适应的一种形式. Western blot 测定发现不同海拔牦牛, 其 *Hsp70* 表达量不同, 以海拔 5000 m 最多, 海拔 3300 m 开始下降, 海拔 3300, 2300 m *Hsp70* 表达差异显著. 实验结果显示: 高海拔(缺氧)可以使牦牛心肌组织中 *Hsp70* 的表达明显升高, 但在平原黄牛心肌组织中未检测到 *Hsp70* 的表达. RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 测定发现不同海拔哺乳动物都具有 *Hsp70* 基因, 且在应激时被激活; 经过 RT-PCR 两次测定的低海拔哺乳动物直接到达不同高海拔地区, 在缺氧诱导下, 该实验组动物出现不同程度的热休克反应, 低海拔家兔的 *Hsp70* 基因出现表达. 实验结果说明: *Hsp70* 的快速表达有利于维持细胞正常生理功能; 热休克反应中 *Hsp70* 的表达可能存在着阈值, 海拔 5000 m 牦牛热休克反应是最佳的热休克条件, 海拔 6000 m 牦牛热休克反应降低. 哺乳动物对高海拔的适应能力是逐步形成的, 在海拔 2300 m 开始产生热休克蛋白, 在海拔 5000 m 达到高峰, 超过海拔 6000 m 时则开始下降, 这个特殊的结果说明了海拔越高, 缺氧越严重, 机体的 *Hsp70* 表达越明显, 如果海拔超过一定的高度, *Hsp70* 的保护作用消失. 对果蝇的研究表明, 用 *Hsp70* 单克隆抗体检测热应激和未热应激果蝇的细胞 *Hsp70* 含量, 发现在果蝇细胞中有时 *Hsp70* 的增加幅度可达未热应激时的 1000 倍^[36]. 随着 *Hsp70* 的表达增强, 机体对热的耐受能力也迅速增

加. 熊一力等人^[37]通过对大鼠的研究, 发现高温情况下, *Hsp70* mRNA 基因表达及 *Hsp70* 蛋白的合成均明显增加. 可见, 机体在热应激状态下 *Hsp70* 基因被激活, 其 RNA 聚合酶在转录调控因子调节下, 激活 *Hsp70* 基因的启动子, 大量转录 *Hsp70* mRNA 而合成 *Hsp70* 蛋白, 导致 *Hsp70* 的表达水平升高. 但是 *Hsp70* 对细胞的保护作用不是无限的, 不能无限夸大 *Hsp70* 对细胞的保护作用, 它只能在一定范围内起作用, 如果应激超过一定的强度, 或持续时间过长, *Hsp70* 的保护作用也是无能为力的. 如王枫等人^[38]发现当细胞在 45℃ 热暴露达到 6 h 以上时, 不管是 *Hsp70* 表达高的细胞还是 *Hsp70* 表达低的细胞, 其细胞活力均降低. 这主要是因为应激时间过长, 使维持细胞正常生长的蛋白质合成受阻, 威胁细胞的生存; 同时变性蛋白过多的产生超过了 *Hsp70* 的保护能力, 所以影响了细胞的功能, 引起细胞死亡. 生物体受不良环境的因素作用后, 自动关闭或减少正常蛋白基因的表达, 启动热休克基因, 产生 *Hsp*, 所以了解 *Hsp70* 基因的转录是认识 *Hsp70* 产生的基本机制^[39]. *Hsp70* 基因的表达调控包括基础水平表达和诱导表达两个层次, 是研究基因转录调控的一个良好模型^[40]. 在热休克反应中, *Hsp70* 的变化取决于转录和翻译水平^[41], 与热休克转录因子(heat shock transcription factor, Hsf)的活性密切相关, Hsf 有多种, 与体内外环境应激关系最密切的是 Hsf1. Hsf1 的激活是一个多步骤的过程, 其基本途径: 应激 → Hsf1 三聚化 → Hsf1 三聚体由胞质向胞核转移 → Hsf1 与 Hsf 结合 → Hsf1 丝氨酸残基的磷酸化 → 促进 *Hsp70* 基因转录等^[42]. 在实验室不同的温度下, Hsf 能迅速活化, 热休克反应在其中充当一个重要的角色^[43]. 细胞应激时, *Hsp70* 合成增加, 而其他蛋白质合成减少^[44]. 如何有效地诱导 *Hsp70* 的表达已成为近来研究的热点, 特别是在不造成细胞损伤的条件下诱导或者潜在性诱导合成 *Hsp* 更具应用前景. 有文献报道, 处于高海拔的生物对缺氧的耐受性明显增强^[45], 从而使动物对缺氧的耐受时间大为延长^[46]. *Hsp* 为一组高度保守的蛋白质, 有其独特的生物学特性及功能, 在生物体内广泛地参与了多种复杂的功能活动, 人们将其生物活性比喻为“瑞士军刀”^[47], 较为形象地反映出其多作用的生物学效应. 目前已有许多研究证实 *Hsp* 在形态进化中起作用, 例如, Rutherford 等人^[17]认为 *Hsp*

可以缓冲物种的表型变化,即自然选择能增加物种的遗传多样性,在 Hsp 的调节下,机体的表型变化一般不能立刻表现出来,直到当物种的环境受胁迫时,这种变化才表现出来。相应地,当机体受胁迫时 Hsp 参与某种机制使中性突变转变成选择突变,由此适应选择的需要。换句话说, Hsp 可以在选择压力下影响基因的表达,通过调节突变的蛋白质正确折叠,或是间接地通过调节信号转导缓冲开始变化的表型,使不利于环境的形态基因不能立刻表达,而隐藏的有利基因得以表达,但不能产生适应,相反会产生死亡。Lerman 等人^[20]通过实验证实,环境转变时, Hsp 的遗传物质可产生定量的变化,这种变化会在种群范围内产生区别,自然选择可对其起作用。Stenseng 等人^[48]对这方面的研究仍在继续,已成为分子生物学的热点之一。Feder^[49-56]认为:(i) 热休克蛋白能影响野生动物的适应性;(ii) 有机体能整体保留热休克蛋白,如真核细胞;(iii) Hsp70 对果蝇的影响集中在整体幼虫和蛹上的繁殖数量的变化,潜在地影响果蝇的适应;(iv) 热休克蛋白的研究有重大的意义,因为它是研究遗传工程的一个工具,在动物生态学和演变生理的研究中被应用;(v) 热休克蛋白是一种生物化学的压力指示器, Hsp 能被环境压力所诱导^[57]。

本研究的实际意义是哺乳动物(包括人类)都具备 Hsp 基因,只要缓慢、逐渐地从低海拔地区缓冲到达高海拔地区,机体就能产生适应,即机体发生热休克反应,产生热休克蛋白,但这种适应有一定的限度(如实验中的海拔 6000 m),超出这种限度,哺乳动物不能耐受和生存。本研究的生态学意义是:(i) 探索相同的生物对不同环境的生态因子的应激是否启动不同的 Hsp,不同的生物对相同环境的生态因子的应激是否启动不同的 Hsp;(ii) 探索 Hsp 作为对特殊人群适应环境能力的评估指标(如登山运动员对高海拔及缺氧适应,潜水员对深海缺氧适应);(iii) 探索 Hsp 的功能时,应该与所研究的生物群体与环境生态因子的刺激相关联;(iv) 探索一种可以提高生物有机体 Hsp 表达的技术手段,将其应用于不同生态因子作用下的环境中,以增加生物体的抗逆能力;(v) 探索一种无损伤(或损伤较小)的强诱导剂,以便诱导生物体产生 Hsp,从而保护生物体免遭恶劣环境生态因子的伤害;(vi) 人类只有遵循自然,保护自然,才能在

自然中生存,并且在自然中发现有利于人类的规律,达到更好适应自然的目的。本研究为人类适应高原提供了科学理论依据。

参 考 文 献

- 1 McGarry T J, Lindquist S. Inhibition of heat shock protein synthesis by heat-inducible antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(2): 399—403
- 2 Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNA in *Drosophila*. *Experientia*, 1962, 18: 571—573
- 3 Tissières A, Mitchell H K, Tracy U M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*, 1974, 84(3): 389—398
- 4 Ashburner M, Bonner J J. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell*, 1979, 17: 241—254
- 5 Schoeniger L O, Andreoni K A, Ott G R, et al. Induction of heat-shock gene expression in postischemic pig liver depends on superoxide generation. *Gastroenterology*, 1994, 106(1): 177—184
- 6 Chen X M, Luo B D, Zou F. Heat shock protein application prospect. *Foreign Medical Sciences (Section of Pathophysiology and Clinical Medicine)*, 1999, 19(6): 503—504
- 7 Li G C, Li L G, Liu Y K, et al. Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kD heat shock protein-encoding gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(5): 1681—1685.
- 8 Riabowol K T, Mizzen L A, Welch W J. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science*, 1988, 242: 433—436
- 9 Karmazyn M H, Mailer K, Currie R W. Acquisition and decay of heat-shock-enhanced postischemic ventricular recovery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1990, 259: H424—H431
- 10 Huang Z. The bone mucous membrane cell through increases the heat shock protein the synthesis to have the cell protective function. *J Gastroenterology*, 1991, 101—161
- 11 Bukau B, Horwich A L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 1998, 92(3): 351—366
- 12 Mori M, Terada K. Mitochondrial protein import in animals. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1403 (1): 12—27
- 13 Rassow J, Maarse A C, Krainer E, et al. Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J Cell Biol*, 1994, 127 (6 Pt 1): 1547—1556
- 14 Zou Y, Crowley D J, van Houten B, et al. Involvement of molecular chaperones in nucleotide excision repair. *J Biol Chem*, 1998, 273: 12887—12892
- 15 Chu W Z, Cao Q Y. After the big mouse bureau stove brain lacks the blood to pour into the Hsp 70 expressions and the relations which weakly perishes with the cell. *Journal of Binzhou Medical College*, 2000, 23 (6): 525—528
- 16 Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*, 1999, 61: 243—282
- 17 Rutherford S L, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 1998, 396(6709): 336—342
- 18 Feder M E, Block B A. On the future of animal physiological ecology. *Functional Ecology*, 1991, 5(2): 136—144
- 19 Sollars V, Lu X, Xiao L, et al. Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor for morphological evolution. *Nat Genet*, 2003, 33: 70—74

- 20 Lerman D N, Michalak P, Helin A B, et al. Modification of heat-shock gene expression in *D. melanogaster* populations via transposable elements. *Mol Biol Evol*, 2003, 20(1): 135—144
- 21 Choresch O, Ron E, Loya Y. The 60-kDa heat shock protein (HSP60) of the sea anemone *Anemonia viridis*: A potential early warning system for environmental changes. *Marine Biotechnology*, 2001, 3(5): 501—508
- 22 Ramaglia V, Buck L T. Time-dependent expression of heat shock proteins 70 and 90 in tissues of the anoxic western painted turtle. *J Exp Biol*, 2004, 207: 3775—3784
- 23 Zhang Y B. Human and Plateau. Xining: Qinghai People's Publish Agency, 1996, 290—296
- 24 Krebs R A, Feder M E. Tissue specific variation in *hsp70* expression and thermal damage in *Drosophila melanogaster* larvae. *J Exp Biol*, 1997, 200: 2007—2015
- 25 Place S P, Zippay M L, Hofmann G E. Constitutive roles for inducible genes: evidence for the alteration in expression of the inducible *hsp70* gene in *Antarctic notothenioid* fishes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 287: R429—R436
- 26 Tomanek L, Somero G N. Interspecific- and acclimation-induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (*hsp70*) and 90 (*hsp90*) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus *Tegula*): Implications for regulation of *hsp* gene expression. *J Exp Biol*, 2002, 205(5): 677—685
- 27 Cai L. Chinese Yak. Beijing: China Agricultural Publishing House, 1992
- 28 The Chinese Yak Study Compiles Committee. Chinese Yak study. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 1989
- 29 Chen Z H, Zhong J C, Zhao S P. The Tibet yak and the ox inherit the multi-state property research. *Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Sciences Version)*, 1999, 3 (3): 110s—115s
- 30 Xu C S, Xia M, Lu A L, et al. Heat shock protein, protein hydrolytic enzyme and phosphatase in big mouse liver regeneration content and active change. *Acta Physiologica Sinica*, 1999, 5: 548—556
- 31 Neuhoff V, Philipp K, Zimmer H G, et al. A simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1979, 360(11): 1657—1670
- 32 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227 (5259): 680—685
- 33 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic. transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose. sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(9): 4350—4354
- 34 Newton C R, Graham A. PCR. 2nd ed. Oxford: Bios Scientific Publishers Limited, 1997
- 35 Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 36 Bao E D, Sultan K R, Nowak B, et al. Transportation should stir up in the pig skeletal muscle to be hot should stir up protein HSP70 and the HSP90 family's expression. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2001, 24(1): 81—84
- 37 Xiong Y L. The high temperature is hot to the big mouse should stir up the protein the influence. *Chinese Journal of Aerospace Medicine*, 1995, 6(4): 202—204
- 38 Wang F, Zhao F J, Gao J S. HSP70 the high expression to the K562 cell hot endurance influence. *China Journal of Public Health*, 2000, 16(7): 687—688
- 39 Ling M S. The molecular companion HSP70 research progresses. *Journal of Medical Molecular Biology*, 1993, 15 (5): 227—230
- 40 Baler R, Dahl G, Voellmy R. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 2486—2496
- 41 Cheng Y Q. The heat shock protein. *Journal of Medical Molecular Biology*, 1988, 4(3): 29—31
- 42 Storti R V, Scott M P, Rich A, et al. Translational control of protein synthesis in response to heat shock in *D. melanogaster* cells. *Cell*, 1980, 22(3): 825—834
- 43 Lerman D N, Feder M E. Laboratory selection at different temperatures modifies heat-shock transcription factor (HSF) activation in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol*, 2001, 204(2): 315—323
- 44 Lindquist S. Regulation of protein synthesis during heat shock. *Nature*, 1981, 293, 311—314
- 45 Petersen R, Lindquist S. The *Drosophila hsp70* message is rapidly degraded at normal temperatures and stabilized by heat shock. *Gene*, 1988, 72(1-2): 161—168
- 46 McGarry T J, Lindquist S. The preferential translation of *Drosophila hsp70* mRNA requires sequences in the untranslated leader. *Cell*, 1985, 42(3): 903—911
- 47 Srivastava P K, Amato R J. Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents. *Vaccine*, 2001, 19(17-19): 2590—2597
- 48 Stenseng E, Braby C E, Somero G N. Evolutionary and acclimation-induced variation in the thermal limits of heart function in congeneric marine snails (Genus *Tegula*): implications for vertical zonation. *Biol Bull*, 2005, 208: 138—144
- 49 Feder M E. Ecological and evolutionary physiology of stress proteins and the stress response: the *Drosophila melanogaster* model. In: Johnston I A, Bennett A F. Phenotypic and Evolutionary Adaptations to Temperature. Cambridge: SEB Seminar Series, Cambridge University Press, 1996. 79—102
- 50 Feder M E, Bennett A F, Huey R B. Evolutionary physiology. *Ann Rev Ecol Syst*, 2000, 31: 315—341
- 51 Feder M E, Krebs R A. Natural and genetic engineering of thermotolerance in *Drosophila melanogaster*. *Am Zool*, 1998, 38: 503—517
- 52 Garbuz D, Evgenev M B, Feder M E. Evolution of thermotolerance and the heat-shock response: evidence from inter/intraspecific comparison and interspecific hybridization in the virilis species group of *Drosophila*. I. Thermal phenotype. *J Exp Biol*, 2003, 206: 2399—2408
- 53 Lerman D N, Feder M E. Naturally occurring transposable elements disrupt Hsp70 promoter function in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol*, 2005, 22(3): 776—783
- 54 Feder M E, Cartano N V, Milos L, et al. Effect of engineering Hsp70 copy number on Hsp70 expression and tolerance of ecologically relevant heat shock in larvae and pupae of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 1996, 199(8): 1837—1844
- 55 Feder M E. Engineering candidate genes in studies of adaptation: the heat-shock protein Hsp70 in *Drosophila melanogaster*. *Am Nat*, 1999, 154: S55—S66
- 56 Feder M E. Organismal, ecological and evolutionary aspects of heat-shock proteins and the stress response: established conclusions and unresolved issues. *Am Zool*, 1999, 39: 857—864
- 57 Tomanek L, Sanford E. Heat shock protein 70 (Hsp70) as a biochemical stress indicator: an experimental field test in two congeneric intertidal gastropods (Genus: *Tegula*). *Biol Bull*, 2003, 205: 276—284