

Cu²⁺ 和 Cu EDTA 对鲫鱼脑组织应激蛋白 HSP70 诱导的影响

沈骅¹, 王晓蓉^{1*}, 张景飞¹, 刘慧¹, 赵永娟²

(1. 南京大学环境学院污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093; 2. 南京大学生物化学系医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

摘要:以鲫鱼 (*Carassius auratus*) 作为实验对象, 经过 40d 不同浓度铜 (Cu²⁺) 及其配合物 (Cu EDTA) 的暴露后, 运用 SDS-PAGE 和 Western Blotting 方法检测鱼脑组织内应激蛋白 HSP70 的诱导表达情况. 结果表明: 在实验浓度下, 与对照组相比, Cu²⁺ 和 Cu EDTA 对鱼脑内 HSP70 有显著的诱导 ($p < 0.05$), 而将 Cu²⁺ 和 Cu EDTA 实验组相对比, 络合剂 EDTA 一定程度上改变了 Cu 的生物可利用性, 从而降低了其毒性. 实验还发现, Cu²⁺ 浓度在国家渔业水质标准 0.01 mg/L 下时, 鱼脑组织内 HSP70 已经有明显的表达, 说明运用分子生物学指标要比传统的环境监测指标更敏感, 具有对污染物早期预警的作用.

关键词: 应激蛋白; 铜及其配合物; 生物标志物; HSP70; Western Blotting

中图分类号: X18, R994.6 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)03-0094-04

Effects of Copper (Cu²⁺) and Cu EDTA Complex on the Induction of HSP70 in the Fish Brain

SHEN Hua¹, WANG Xiaorong^{1*}, ZHANG Jingfei¹, LIU Hui¹, ZHAO Yongjuan²

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of Environment Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. State Key Laboratory of Pharmaceutical and Biotechnology, Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: The effects of copper (Cu²⁺) and Cu EDTA complex on the induction of HSP70 in the fish brain were studied. After the fish (*Carassius auratus*) were exposed to the experimental concentrations for forty days, the SDS-PAGE and Western Blotting techniques were used to detect the expression level of HSP70 in the fish brain. The results showed that Cu²⁺ and Cu EDTA complex can induce the expression of HSP70 significantly. Comparing with the test groups exposed to Cu²⁺, the Cu EDTA complex had changed the bioavailability and decreased the toxicity of the heavy metal. It was found that the fish exposed to the concentration of Cu²⁺ which below the national fishery water quality standard of 0.01 mg/L, also had a significant increase in the expression level of HSP70. Therefore, HSP70 as an environmental biomarker can be a more sensitive and rapid indicator than conventional end points in the aquatic ecosystem.

Key words: heat shock proteins; copper and its complex compound; biomarker; HSP70; Western Blotting

应激蛋白 (Heat Shock Proteins, HSPs) 是所有生物细胞在受到如热源、病原体、物理化学因素如重金属、有机污染物、紫外线辐射等应激原刺激后, 发生应激反应使生物体原有的一些蛋白质的合成受到抑制, 并产生的一类特殊的蛋白质. 它们的产生可以提高细胞的耐受性, 对生物细胞具有保护修复的作用^[1,2]. 由于 HSP70 在生物体内含量最多, 在细胞应激后表达量最大, 因此对其研究最为广泛深入. 近年来研究发现, 应激蛋白可以作为一种生物标志物 (biomarker) 应用于分子生态毒理研究中, 而且要比传统的生长和繁殖等生物学指标要敏感^[3].

近几年国内外科研工作者已经进行了相关的研究. 胡炜等人在用 Cu²⁺、Zn²⁺ 诱导稀有鮟鲫应激蛋白的研究中发现, 经 5d 亚慢性暴露后, 以生长为测

试指标 Cu²⁺、Zn²⁺ 的最低可观察效应浓度 (LOEC) 分别是 0.04 mg/L 和 0.2 mg/L, 无可观察效应浓度 (NOEC) 分别为 0.02 mg/L 和 0.1 mg/L, 但是经 0.02 mg/L 和 0.01 mg/L 的 Cu²⁺ 胁迫暴露后受试鱼体被诱导出 54 Kda 的特异应激蛋白, 同样经过 0.1 mg/L 的 Zn²⁺ 的 5d 慢性胁迫后分别诱导出 94 Kda, 67 Kda, 40 Kda 的特异性应激蛋白^[4]. 最近国外科学家已经建立了一种方法, 利用土壤线虫的 HSP70 作为生物标志物, 运用转基因技术和分子生物学手段来实现对土壤生态系统污染的监测^[5]. 实

收稿日期: 2003-07-23; 修订日期: 2003-10-08

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (No: 20237010)

作者简介: 沈骅 (1978-) 男, 硕士研究生, 主要从事分子生态毒理的研究.

* 通讯联系人

验证在镉的土壤溶液浓度为 1~10 mg/L 时就诱导土壤线虫体内 HSP70 的表达,而同样条件下 LC₅₀ 指标却为 20 mg/L。因此,土壤生态系统中的无脊椎动物如线虫等正广泛地被应用于检测受污染的土壤样品。以上数据表明应激蛋白能够反映生物体所受环境的胁迫效应,而且比传统的生长指标更为敏感。本文研究了在长期和低浓度条件下,鲫鱼受 Cu²⁺ 和 Cu-EDTA 的慢性胁迫后,脑内应激蛋白 HSP70 的反应性,并探讨了 HSP70 作为重金属 Cu 污染的生物标志物的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

主要仪器:POWER PAC-300 蛋白电泳系统(美国 BIO-RAD 公司),SIGMA 2K15 高速冷冻离心机(德国 SIGMA 公司),Biophotometer RS-232 分光光度仪(德国 EPPENDORF 公司),半干式电转印仪(瑞典 Amersham Pharmacia 公司)。运用 MINTEQ2 程序计算有机配体 EDTA 存在时,使 Cu-EDTA 浓度为 99% 以上,根据计算结果,用 CuCl₂(美国 SIGMA 公司提供)配制实验用储备液。

1.2 实验试剂

主要试剂:一抗为小鼠抗人 HSP70 单克隆抗体 IgG₁(加拿大 STRESSGEN 公司提供),二抗为辣根过氧化物标记的羊抗鼠 IgG(美国 Stabizyme 公司提供),PVDF 膜(瑞典 Amersham Pharmacia 公司提供)。实验所用生化试剂(分析纯)均由美国 AMRESCO 公司和德国 SIGMA 公司提供。

1.3 实验生物

采用健康的幼龄鲫鱼作为实验生物(由南京市水产研究所禄口养殖基地提供),平均体长为 7 cm,体重为 5.2 g,养鱼用水为经过空气泵曝气 3 d 的自来水,实验前将鱼驯养 10 d,控制死亡率小于 2%。

1.4 实验方法

选取健康的无体表损伤的幼龄鲫鱼作为实验用鱼,实验分为 3 组,Ⅰ组为对照组,Ⅱ组为 Cu²⁺ 实验组,Ⅲ为 Cu-EDTA 实验组,实验采用 30 L 的玻璃缸,Ⅱ,Ⅲ两实验组每组 5 缸,盛水 20 L,浓度分别为 0.25 mg/L,0.05 mg/L,0.01 mg/L,0.005 mg/L,0.0025 mg/L。每缸放鱼 4 尾,每天更换原溶液 1 次,喂饵 1 次。实验期间连续进行空气泵充气。暴露 40 d 后取样,每浓度组取样 3 尾,冲洗后擦干,称重,解剖,取出鲫鱼脑组织,迅速放入预冷的玻璃匀浆器,加入事先配制的预冷的蛋白抽提液(66 mM Tris/

HCl, pH 7.2, 3% Nonident-p40, 0.1 mmol/L PMSF)^[6],进行蛋白抽提,整个操作过程必须在冰浴中进行,控制温度在 4℃ 以下。随后将匀浆液移入 1.5 mL 的离心管,在 4℃ 下以 15000 r/min 转速离心 30 min,将所得上清液冷冻保存在 -80℃ 下待用^[7]。

在进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳和 Western Blotting 之前,采用 BRADFORD 法(1976)进行蛋白含量的测定^[8]。根据分子克隆实验指南(第三版)^[9]进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳和 Western Blotting 进行操作。SDS-PAGE 电泳采用浓缩胶为 5%,分离胶采用 8%,电泳缓冲液采用 Tris-甘氨酸(pH=8.3)的电泳体系。Western Blotting 免疫印记实验的一抗采用 1:750 的稀释比,二抗采用 1:2000 的稀释比。SDS-PAGE 电泳过后,立即使用半干式电转移系统将凝胶上的蛋白质转移到 PVDF 膜上,随后进行 Western Blotting 免疫印记,所得结果用英国 UVP 数码凝胶分析系统分析灰度,计算实验各组相对灰度值(实验组灰度值/对照组灰度值),并用 SPSS 10.0 for windows 软件进行单因素方差分析, $p < 0.05$ 时具有显著性差异。

2 结果与讨论

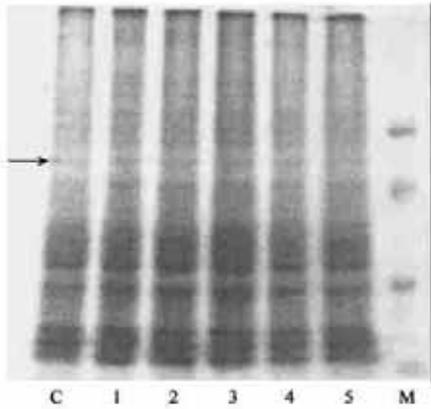
动物脑组织内的神经元,神经胶质细胞和星形胶质细胞在受到外界因素应激时都能诱导产生应激蛋白,而且一旦受到胁迫,诱导表达非常明显。已有研究发现,鲤鱼在浓度为 4 mmol/L 的醋酸铵中暴露 30 d 后,鱼脑组织各部分都出现明显的 HSP70 诱导^[10]。

2.1 Cu²⁺ 对鲫鱼脑组织 HSP70 的诱导表达

由图 1 的 SDS-PAGE 蛋白电泳图可知,在分子量为 70 Kda 处(图 1,箭头所指处),各实验浓度组,相对于对照组有明显的蛋白表达,进一步进行 HSP70 的 Western Blotting 检测(每个泳道总蛋白为 70 μg),结果表明该 70 Kda 蛋白为 HSP70。由图 2 和图 5 可以看出,与对照组相比,实验组鱼脑组织应激蛋白 HSP70 均有显著的诱导表达($p < 0.05$),尤其是 0.25 mg/L,0.05 mg/L 和 0.01 mg/L 的高浓度实验组表达尤为明显,可见金属 Cu²⁺ 对鲫鱼脑组织可能产生了不同程度的损伤,并且随着浓度的增加损伤程度加剧,在浓度小于 0.005 mg/L 时 HSP70 的表达趋于稳定,但仍然高于对照组,说明在低浓度暴露时 Cu²⁺ 已经对鲫鱼脑组织产生影响。

2.2 Cu-EDTA 对鲫鱼脑组织 HSP70 的诱导表达

由图 3 的 SDS-PAGE 蛋白电泳图可知,在分子



图中 M 为标准蛋白,从上到下依次为 97.4Kda, 66.2Kda, 44Kda; C 为对照组,1,2,3,4,5 表示铜浓度依次为 0.25, 0.05,0.01,0.005,0.0025 mg/L

图 1 Cu 暴露下鱼脑 HSP70 SDS PAGE

Fig.1 SDS-PAGE of fish brain exposed to Cu²⁺

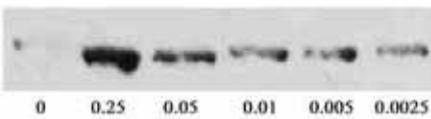


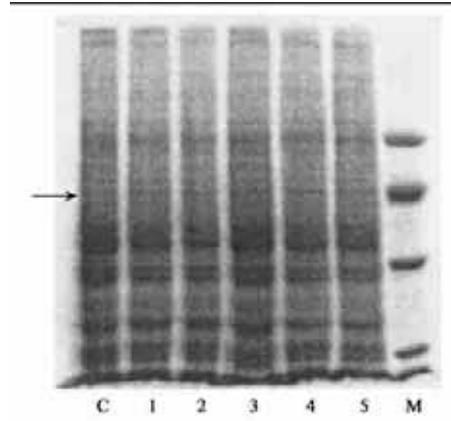
图 2 Cu 暴露下鱼脑 HSP70 Western Blotting

Fig.2 Western Blotting of HSP70 in fish brain exposed to Cu²⁺

量为 70 Kda 处(图 3,箭头所指处),各实验浓度组相对于对照组也有明显的蛋白表达,HSP70 的 Western Blotting 检测(每个泳道总蛋白为 100μg)结果表明该 70Kda 蛋白为 HSP70.由图 4 和图 5 可知,和对照组相比,在实验浓度范围内,Cu-EDTA 配合物对鱼脑组织应激蛋白均有明显的诱导表达,其中实验组暴露浓度为 0.25 mg/L,0.05 mg/L 和 0.01 mg/L 的表达较为显著($p < 0.05$).从图 5 可以清楚看出,添加配体后 HSP70 的相对表达量要比不添加配体的实验组低得多,而且在暴露浓度小于 0.01 mg/L 时表达量开始趋于稳定,和未添加 EDTA 配体时趋势相同,但在浓度为 0.0025 mg/L 时,添加 EDTA 的实验组与对照组相比,表达量没有显著差异($p > 0.05$).由此可见,配体 EDTA 的加入可能改变了金属 Cu²⁺的生物可利用性,从而降低了其对水生生物的毒性.

3 结论

上述研究结果表明,应激蛋白 HSP70 可考虑作为重金属 Cu 污染的一种生物标志物.根据国家渔业水质标准,铜的浓度应小于 0.01 mg/L,然而,本



图中 M,C 和 1,2,3,4,5 的含义同图 1

图 3 Cu-EDTA 暴露下鱼脑 HSP70 SDS PAGE

Fig.3 SDS-PAGE of fish brain exposed to Cu-EDTA

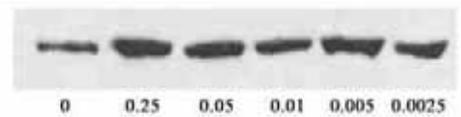


图 4 Cu-EDTA 暴露下鱼脑 HSP70 Western Blotting

Fig.4 Western Blotting of HSP70 in fish brain exposed to Cu-EDTA complex

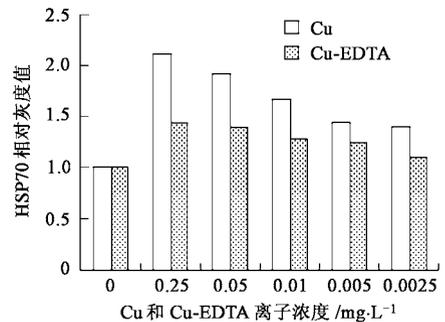


图 5 Cu 和 Cu-EDTA 暴露下鱼脑 HSP70 相对灰度值

Fig.5 Relative Gray value of HSP70 in fish brain exposed to Cu and Cu-EDTA complex

实验发现,在 Cu²⁺ 浓度为 0.005 mg/L 和 0.0025 mg/L 时,和对照组相比 HSP70 仍然有显著的诱导表达,说明水体中低于 0.01 mg/L Cu²⁺ 的长期暴露仍然会对鱼类产生一定的损伤,也就是说,在低浓度时污染物可能不会马上对鱼体内的脏器产生明显的病理性损伤,在短期内不会影响鱼生长代谢和造成个体的死亡,但是 HSP70 的诱导表达明确反映了机体受到外界污染应激因素的胁迫,长时间的这种胁迫必将造成机体脏器组织的病变损伤,影响正常的生长代谢.

鉴于应激蛋白存在于一切生物体中,从微小的细菌到高等动物的人类分布极其普遍,并且具有高度的保守性,将其作为环境生物指标运用于不同类别的生物,可以避免传统的环境监测指标由于不同生物物种和环境因素的差异而引起的变异,因此可以将实验室的低等生物实验结果应用于高等动物甚至人类.另外,将应激蛋白作为环境生态毒理学指标,有助于研究环境中不同污染物的微观作用机理,了解污染物作用的靶器官靶位点.因此,应激蛋白作为一种早期预警生物标志物的研究,必将在生态毒理研究和生态风险评价中发挥巨大作用.

参考文献:

- [1] 凌明圣. 分子伴侣 HSP70 研究进展[J]. 国外医学分子生物学分册, 1997, 15(5): 227 ~ 230.
- [2] Grajg E A. Heat shock protein and molecular chaperones: mediations of proteins, stress 70 and chaperones 60 in diverse species [J]. Cell, 1994, 34: 253 ~ 258.
- [3] Sanders B M. Stress proteins: Potential as multitiered biomarker [A]. In: Shugart L, McCarthy J (eds). Environmental Biomarker[C]. Boca Raton, Florida: Lewis Publisher, 1990, 165 ~ 191.
- [4] 胡炜,汪亚平,周永欣. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 诱导稀有鮟鲫应激蛋白的研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(1): 50 ~ 53.
- [5] Candido E P, Jones D. Transgenic *Caenorhabditis elegans* strains as biosensors[J]. Trends in Biochemistry, 1996, 14: 125 ~ 129.
- [6] Luis A, Cruz-Rodriguez, Fur-Lin E Chu. Heat shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and suspended field contaminated sediments[J]. Aquatic Toxicology, 2001, 60: 157 ~ 168.
- [7] Lewis S, Handy R D, et al. Stress Proteins (HSPs): Method of Detection and Their use as an Environmental Biomarker[J]. Ecotoxicology, 1999, 8: 351 ~ 368.
- [8] 汪家政, 范明主编. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000, 42 ~ 47.
- [9] [美] 萨姆布鲁克·D, W·拉塞尔, 黄培堂等译. 分子克隆操作指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 1713 ~ 1726.
- [10] Hernández C, Martí na M, Bodegaa G, et al. Response of carp central nervous system to hyperammonemic conditions: an immunocytochemical study of glutamine synthetase (GS), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and 70 kDa heat-shock protein (HSP70)[J]. Aquatic Toxicology, 1999, 45: 195 ~ 207.

中日环境化学学术大会通知

China Japan Joint Symposium on Environmental Chemistry

(2004-10-21 ~ 23) 北京

第一轮通知

由中国化学会环境化学专业委员会、中国环境科学学会二噁英专业委员会和日本环境化学会共同主办的“中日环境化学学术大会”定于 2004 年 10 月 21 ~ 23 日在北京举行。会议由中国科学院生态环境研究中心和中日友好环境保护中心承办。

- 会议议题:
1. 化学物质的污染现状及在环境介质中的迁移转化规律;
 2. 化学物质的检测新方法、新技术及食品和日用品中的污染水平分析;
 3. 化学物质的毒理效应及区域风险评价;
 4. 化学物质削减技术及有毒化学品管理战略;
 5. 其他以化学物质为中心的环境化学研究成果。

大会秘书处:中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室(北京市海淀区双清路 18 号, 邮编:100085; TEL:010-62923541; FAX:010-62923543; E-mail:skleac@mail.rcees.ac.cn
联系人:巩玉华女士