

低浓度 Zn 对幼龄鲫鱼肝脏组织 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. 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 江苏 南京 210093;
2. 医药生物技术国家重点实验室, 南京大学生物化学系, 江苏 南京 210093)

摘 要:选择鲫鱼 (*Carassius auratus*) 作为受试生物, 经过 40 d Zn^{2+} 不同浓度的暴露后, 运用 SDS – PAGE 和 Western Blotting 方法检测了鱼肝脏组织内应激蛋白 HSP70 的诱导表达情况。结果表明, 在各试验浓度下, 与对照组相比, Zn^{2+} 对鱼肝脏内 HSP70 有显著的诱导 ($P < 0.05$)。试验中还发现, 在试验浓度低于国家渔业用水标准时, HSP70 相对于对照组仍然表现为明显诱导 ($P < 0.05$), 充分说明分子生物学指标要比传统的环境检测指标敏感, 对污染物早期具有预警的作用。

关键词: 应激蛋白; 锌; 生物标志物; 鲫鱼

中图分类号: X171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 – 2043(2004)03 – 0441 – 03

Western Blotting Responses of Heat Shock Protein (HSP70) in the Liver of Young Fish, *Carassius Auratus* to Lower Concentration of Zinc (Zn^{2+})

SHEN Hua¹, WANG Xiao-rong¹, ZHANG Jing-fei¹, LIU Hui¹, ZHAO Yong-juan²

- (1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College 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 Zinc (Zn^{2+}) on the induction of HSP70 in the fish liver were studied. After the fish (*Carassius auratus*) were exposed at different Zinc (Zn^{2+}) concentrations for forty days, the HSP70 in the fish liver was measured using the SDS – PAGE and Western Blotting technique. Compared with those under the control, the groups exposed to the Zinc (Zn^{2+}) all showed a significant increase in HSP70 as a function of exposure ($P < 0.05$). The fish exposed to the concentration of Zn^{2+} below the national fishery water quality standard also had a significant increase in HSP70, which implied that the low concentration of the heavy metal also could harm the fish body. HSP70 as a environmental biomarker could be a more sensitive and rapid indicator than conventional end points such as the growth death.

Keywords: heat shock proteins; zinc; biomarker; western blotting

Zn 是生物体的必需元素之一, 也是优先控制环境的污染物, 它对人 and 大多数温血动物的毒性很小, 但是对于绝大多数鱼类及其他水生生物具有较大的毒性作用。有科学家研究发现锌对鱼类的致死浓度开始于 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 这就说明低浓度 Zn 的长期作用具有潜在的的危险^[1]。

应用生物鉴定的方法来评价重金属对所污染水体的危害程度是可行的, 但是大多数生态毒理和生理化学的方法, 如生物死亡 (LC_{50}/LD_{50})、生长受阻 (EC_{50} 、 IC_{50} 、 $NOEC$ 等)、繁殖受影响等传统的监测指标在慢性和低浓度胁迫中表现得并非敏感。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^[2], 而且要比传统的以生长和繁殖等生物学指标更为敏感。应激蛋白目前已发现 10 余种, 根据分子量的大小可分为, HSP90, HSP70, HSP60 和小分子量应激蛋白 4 个主要的家族, 而 HSP70 家族是最保守和最主要的一类应激蛋白, 也是生物体发生应激反应后生成最为显著的一类蛋白质。因此本文研究了在慢性条件下, 鲫鱼受 Zn^{2+} 的慢性胁迫后, 肝内应激蛋白 HSP70 的敏感性, 并探讨了 HSP70 作为重金属 Zn 生物标志物的可行性。

1 材料与方法

1.1 试验仪器

POWER PAC – 300 蛋白电泳系统 (美国 BIO –

收稿日期: 2003 – 09 – 12

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (20237010)

作者简介: 沈 骅 (1978—), 男, 南京大学硕士研究生, 主要从事分子生态毒理的研究。E – mail: takarahua@hotmail.com

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), 各种量程的微量移液器(法国 GILSON 公司)。

1.2 试验试剂

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)。用 ZnCl₂(美国 SIGMA 公司提供)配制试验用储备液。试验所用生化试剂均使用美国 AMRESCO 公司和德国 SIGMA 公司提供的分子生物学级分析纯。

1.3 试验生物

试验采用健康的幼龄鲫鱼作为试验生物(由南京市水产研究所禄口养殖基地提供), 平均体长为 15.2 cm, 体重为 55.7 g, 养鱼用水为经过空气泵曝气 3 d 的自来水, 试验前将鱼饲养 10 d, 控制死亡率小于 2%。

1.4 试验方法

选取健康的无体表损伤的幼龄鲫鱼作为试验用鱼, 试验分为 2 组, 分别为对照组和 Zn²⁺ 试验组。试验采用 40 L 的玻璃缸, 对照组和试验组分别为 1 缸和 4 缸, 每缸盛水 35 L, 浓度分别为 0, 0.02, 0.1, 0.5, 1 mg · L⁻¹, 每缸放鱼 6 尾, 每天更换溶液一次, 控制水温 5℃ ~ 10℃, pH 控制在 6.0 ~ 6.2, 暴露 40 d 后取样。对照组和每浓度组取样 4 尾, 冲洗后擦干, 称重, 解剖, 取出鲫鱼肝脏组织, 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 mmol · L⁻¹ tris/HCl, pH7.2, 3% Nonident-p40, 0.1 mm PMSF)^[3], 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, 以 15 000 r · min⁻¹ 4℃ 下离心 30 min, 将所得上清液冷冻保存在 -80℃ 下待用^[4]。

试验采用 BRADFORD 法(1976)进行蛋白含量的测定, 以便后期的定量分析, 具体操作详见文献[5]。SDS-PAGE 蛋白质电泳和 Western Blotting 具体操作根据分子克隆试验指南(第三版)^[6]进行。以每个加样孔加样量为 70 μg 总蛋白为标准进行 SDS-PAGE 电泳, 按 150 V 衡压电泳 2 h。电泳结束后立即进行蛋白质电转移, 使用半干式电转移系统将凝胶上的蛋白质转移到 PVDF 膜上, 然后进行 Western Blotting。一抗采用 1:750 的稀释比, 二抗采用 1:2 000 稀释比。所得结果用英国 UVP 数码凝胶分析系统进行灰度分析, 计

算试验各组相对灰度值(试验组灰度值/对照组灰度值), 并用 SPSS 10.0 for windows 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 时为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

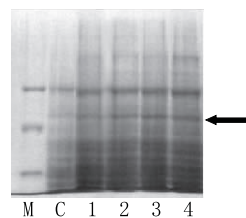
2 结果与讨论

肝脏是动物主要的解毒器官, 研究发现重金属主要富集在动物的肝脏中。生物体在受到任何有害物质胁迫后的第一个反应就是应激蛋白(HSPs)表达水平的提高, HSPs 作为“分子伴侣”参与蛋白质的折叠、转位和生物合成等过程, 从而提高了细胞和机体的耐受性, 对细胞损伤具有保护作用。应激蛋白作为生物标志物的主要优势在于它们可以将所有的胁迫效应综合地表现在诱导蛋白的完整性上, 这一点被国外科学家称为“蛋白毒性”(roteotoxicity)^[7]。

本试验就鲫鱼经 40 d Zn²⁺ 不同浓度的暴露后, 肝脏组织 HSP70 的诱导表达的影响进行探讨。

2.1 鲫鱼肝脏组织 HSP70 的 SDS-PAGE 电泳图谱

图 1 为 Zn²⁺ 暴露下鲫鱼肝脏组织 SDS-PAGE 蛋白电泳图谱, 由图可以清晰的看出, 各浓度试验组在 70 Kd 大小的地方有明显的蛋白质表达(图中箭头处), 而且相对于对照组有较明显的表达, 各浓度组之间 70 Kd 蛋白质的表达量也与浓度有一定的关系。进一步进行肝脏组织 HSP70 的 Western Blotting 免疫检测, 以确定该 70 kD 蛋白是否为 HSP70 蛋白。



M 为标准蛋白, 从上到下依次为 97.4 kD, 66.2 kD, 44 kD; C 为对照组, 1, 2, 3, 4 依次为浓度组 0.02, 0.1, 0.5, 1 mg · L⁻¹

图 1 Zn²⁺ 暴露下鱼肝脏组织 HSP70 SDS-PAGE

Figure 1 SDS-PAGE of HSP70 in the liver of fish exposed to Zn²⁺

2.2 Zn²⁺ 对鲫鱼肝脏组织 HSP70 的诱导表达

经过肝脏组织 HSP70 的 Western Blotting 免疫检测, 确定该 70 kD 蛋白即为 HSP70。根据 UVP 数码凝胶分析系统进行灰度扫描分析可以看出, 相对于对照组, 试验组肝脏组织内应激蛋白 HSP70 均有显著的诱导表达($P < 0.05$), 尤其高浓度组为 1 mg · L⁻¹, 0.5 mg · L⁻¹, 表达尤为明显($P < 0.01$), 表明 Zn²⁺ 对于肝脏组织有明显的胁迫, 并且随着浓度的增加肝脏组织的损伤加重。但在浓度为 0.1 mg · L⁻¹ 时, 表达

量趋于稳定。试验中还发现,在低于国家渔业用水标准,即 $\text{Zn}^{2+} < 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度组,相对于对照组仍然有较明显的 HSP70 蛋白表达 ($P < 0.05$),这说明低浓度的 Zn^{2+} 仍对鱼肝脏产生了一定程度的影响。在 40 d Zn^{2+} 暴露过程后期鲫鱼开始出现移动缓慢,平衡失调,进食量减少甚至停止,鳃部、尾部和鳍部出现了不同程度的红、烂等病灶,这些外部症状的出现也说明了经过 Zn^{2+} 慢性暴露后对鲫鱼产生了一定程度的影响,见图 2,图 3。

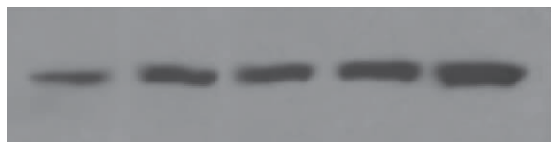
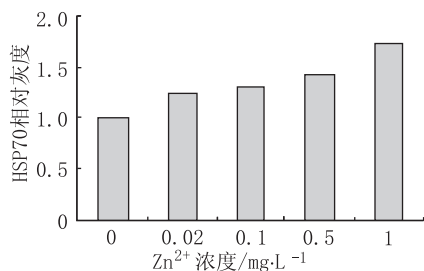


图 2 Zn^{2+} 暴露下鱼肝脏组织 HSP70 Western Blotting

Figure 2 Western Blotting of HSP70 in the liver of fish exposed to Zn^{2+}



注:以上数据为平均值 $\pm$ 标准偏差(SD), $n = 4$

图 3 Zn^{2+} 暴露下鱼脑 HSP70 相对灰度值

Figure 3 Relative gray value of HSP70 in the brain tissue of fish exposed to Zn^{2+}

3 结论

由以上 2 个试验看出,可以把应激蛋白 HSP70 作为重金属 Zn 的生物标志物。国家渔业水质标准规定, Zn 的浓度应小于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 然而经过试验发现,在 Zn^{2+} 浓度为 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,相对于对照组仍然有显著的诱导表达 ($P < 0.05$),说明 Zn^{2+} 低浓度的长期暴露仍然对鱼类产生了一定的损伤,由于在低浓度时对于鱼体内脏并没有立刻产生明显的病理性损伤,不会影响鱼短期内的生长代谢和造成个体死亡,但是 HSP70 的诱导表达确实是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。

目前在环境监测中应用的如生物死亡 ($\text{LC}_{50}/\text{LD}_{50}$)、生长受阻 (EC_{50} 、 IC_{50} 、NOEC 等)、繁殖受影响等传统的监测指标表现得并不敏感,相关的研究已经受到国内外科研工作者的关注。胡炜等人在研究 Cu^{2+} 、

Zn^{2+} 诱导稀有鮎鲫应激蛋白的研究中发现,经 5 d 亚慢性暴露后,以生长为测试指标, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的最低可观察效应浓度(LOEC)分别是 $40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 无可观察效应浓度(NOEC) 分别 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 但是经 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cu^{2+} 胁迫暴露后受试鱼体被诱导出 54 kD 的特异应激蛋白,同样经过 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Zn^{2+} 的 5 d 慢性胁迫后分别诱导出 94 kD, 67 kD, 40 kD 的特异应激蛋白^[8]。最近国外科学家已经建立了一种方法^[9],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检测。试验证明在镉的浓度达到 $1 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 就已经诱导土壤线虫体内 HSP70 的表达,而同样条件下 LC_{50} 指标却为 $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此土壤生态系统中的无脊椎动物如线虫等被广泛应用于检测被污染的土壤样品。以上数据可表明应激蛋白能够反映生物体所受环境的胁迫效应,且比传统的生长指标更为敏感。

由于应激蛋白存在于一切生物体中,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具有一定的优势,它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数的差异而引起的变化,因此可以将试验室的低等生物试验结果应用于高等动物甚至人类。其次,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] 王德庆,刘国顺,等. 锌对离体鲤鱼头呼吸的抑制作用[J]. 动物学报, 1994, 40(1): 39 - 44.
- [2] Sanders B M. Stress proteins: Potential as multitiered biomarker[A]. In L Shugart and J McCarthy (eds). Environmental Biomarkers[C]. Boca Raton, Florida: Lewis Publisher, 1990. 165 - 191.
- [3] Luis A, Cruz - Rodriguez, Fu - 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.
- [4] 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.
- [5] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社, 2000.
- [6] [美]萨姆布鲁克 D, W 拉塞儿. 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.
- [7] Sanders B M. Stress - proteins in aquatic organisms: An environmental perspective[J]. Crit Rev Toxicology, 1993, 23: 49 - 75.
- [8] 胡炜,汪亚平,周永欣, Cu, Zn 诱导稀有鮎鲫应激蛋白的研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(1): 50 - 53.
- [9] Candido E P, Jones D. Transgenic Caenorhabditis elegans strains as biosensors[J]. Trends in Biochemistry, 1996, 14: 25 - 129.