

染色质体外组装相关蛋白的表达纯化及 组装体系的建立

赵忠亮 赵吉成 代 辉 沈翊珩 张 业

摘 要 **目的** 提取并纯化真核细胞核内组蛋白,表达并纯化重组组蛋白、染色质组装相关因子 NAP-1 (nuclear assembly protein-1) 及 ACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor), 并建立无细胞体外染色质组装体系。**方法** 在大肠杆菌 BL21 中表达并应用离子交换层析纯化组蛋白,从真核细胞 HeLa 细胞核中提取并应用羟基磷灰石纯化组蛋白八聚体,利用杆状病毒表达系统在昆虫细胞 Sf9 中表达并纯化组装相关因子,应用纯化得到的蛋白在适宜条件下进行染色质体外组装,并用微球菌核酸酶酶切检测。**结果** 获得了高纯度的原核表达的组蛋白,真核细胞组蛋白八聚体及组蛋白特异伴侣 NAP-1 和 ACF;建立了由质粒 DNA、纯化的真核细胞核内重组组蛋白、重组 NAP-1、重组 ACF 及 ATP 为核心成分的体外染色质组装的无细胞系统,经微球菌核酸酶检测组装成功。**结论** 利用体外分离纯化的多种重组蛋白,可成功构建基因的染色质模板,为在体外染色质模板上进行基因转录的调控机制研究奠定了基础。

关键词 组蛋白 ACF NAP-1 染色质组装

Purification of Chromatin Assembly Associated Proteins and Reconstitution Chromatin. Zhao Zhongliang, Zhao Jicheng, Dai Hui, Shen Yufei, Zhang Ye. National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

Abstract **Objective** To extract and purify HeLa histones, express and purify recombinant histones, NAP-1 and ACF. To reconstitute chromatin in cell-free systems. **Methods** HeLa core histone octamers were purified from the chromatin pellet of whole cell extracts from HeLa cells using hydroxyapatite chromatography. Individual histone proteins were purified from inclusion bodies of BL21 by ion exchange chromatography, and mixed to renature. NAP-1 and ACF were purified using baculovirus expression system in Drosophila. Then chromatin was assembled using isolated proteins and DNA in proper system, and was identified by micrococcal nuclease digestion. **Results** Purified HeLa histone octamers, recombinant histones, NAP-1 and ACF were shown. The system of chromatin assembly in cell-free systems using these isolated proteins was established. The chromatin was digested to DNA ladder by micrococcal nuclease. **Conclusion** We assembled chromatin templates in vitro. It would be the basis of researches on regulation of gene transcription on chromatin template in vitro.

Key words Histone; ACF; NAP-1; Chromatin assembly

真核细胞基因组 DNA 存在着以核小体为基本单位的染色质结构。DNA 环绕在 4 对核心组蛋白所组成的八聚体核心外形成核小体。对染色质结构的调节是真核基因表达调控的关键。在染色质水平研究 DNA 参与的各种生理过程更能真实的反应体内的状态。为此,我们应用体外体系将 DNA 模板组装成适

当的染色质结构。根据组装因子来源的不同可将体外染色质组装体系分为 4 类:①应用组蛋白转运媒介物提供组蛋白(例如,盐浓度透析、组蛋白结合蛋白、多聚谷氨酸或 RNA)。此体系可产生规范的核小体,但是形成核小体的分布不规则,而且缺乏天然染色质的周期性;②使用细胞(蛙卵、HeLa 细胞或果蝇胚胎)粗提物进行组装,可获得伸展的、呈周期性排列的核小体^[1,2];③应用纯化的重组果蝇染色质组装因子建立的组装体系。该体系产生的染色质中的核小体不仅规范而且呈周期性排列^[3];④使用正在复制的病毒 DNA 中的因子进行组装。在人 293 细胞粗提物中加入 SV40 T 抗原螺旋酶和组蛋白伴侣 CAF-1 (chromatin assembly factor-1) 和 RCAF, 获得了新复

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871382);教育部博士点基金资助项目(20101106110023)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生物化学与分子生物学系、医学分子生物学国家重点实验室

通讯作者:代辉,电子信箱:daihui15@tom.com;沈翊珩,电子信箱:yfshen@pumc.edu.cn;张业,电子信箱:yezhang@pumc.edu.cn

制的 SV40 DNA 染色质^[4]。

应用纯化的重组果蝇因子的组装体系因其产生核小体的均一性这一优点而被广泛应用。用细胞粗提取物进行染色质组装是一种依赖 ATP 的过程。Kadonaga 等实验室从果蝇提取物中纯化出两种组装基本因子^[5]: 组蛋白特异伴侣 NAP-1 (nuclear assembly protein-1) 及 SWI (switching defective)/SNF (sucrose nonfermenting) 样染色质调整因子 ACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor), 并建立了由质粒 DNA、纯化的天然或重组组蛋白、重组 NAP-1、重组 ACF 及 ATP 为核心成分的体外染色质组装的无细胞系统^[6]。

NAP-1 作为分子伴侣与带正电荷的组蛋白分子结合后, 一方面, 防止组蛋白与 DNA 迅速发生非特异性聚集, 因此, 在组装体系中 NAP-1 与核心组蛋白多肽的分子比例必须是 1:1 甚至更高。另一方面, 将组蛋白提呈给 ACF。因为虽然 NAP-1 能与 H2A/H2B 二聚体和 H3/H4 四聚体结合, 并使它们容易组装成核小体, 但是, 仅用 NAP-1 组装成的并不是规范的核小体, 而是大的组蛋白-DNA 颗粒。

ACF 是由 Acf-1 和与 SWI2/SNF2 相关的 ATP 酶 ISWI (imitation switch, p140) 亚单位组成的复合因子。在染色质组装中具有多种功能: 使组蛋白沉积在 DNA 上、在核小体中使组蛋白与 DNA 能合适地接触、以及使核小体呈一定的间隔排列。所有这些过程都是酶促反应, 而且都需要 ISWI 水解 ATP。为组装反应提供能量。因此, 将由细胞粗提物或重组组蛋白简历染色质组装体系称为“酶组装 (enzymatic assembly)”体系。应用依赖 ATP 的染色质组装体系获得的染色质中核小体呈高周期性排列, 可用于研究染色质结构、转录及 DNA 代谢。

材料与方法

1. 材料: (1) 菌株、质粒及细胞: 大肠杆菌 DH5 (BL21 菌种由本课题组提供)。HeLa S3 细胞株 (北京协和医学院基础学院梅品超教授赠)。组蛋白原核表达质粒为本组保存。pG5ML 质粒 (洛克菲勒大学 Robert Roeder 教授惠赠)。(2) 试剂及材料: 胎牛血清 (Gibco), DMEM 培养基 (Gibco), TC100 培养基 (US Biological) 阳离子交换树脂 (GE), ANTI-FLAG® M2 - Affinity Gel (Sigma), Ni-sepharose High performance (GE), 微球菌核酸酶 (micrococcal nuclease) (Sigma)

2. 方法

(1) 原核表达纯化组蛋白八聚体: 1) 诱导表达组蛋白: 准备 LB 加入抗生素, 37℃ 摇菌, 至 OD₆₀₀ 约为 0.6 时, 加入 IPTG, 终浓度为 0.2 mmol/L, 诱导表达 2h。离心收集细菌, 重悬于

30ml 组蛋白漂洗缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.1mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L PMSF) 中, 转移至 50ml 离心管。此步可标记清楚置于 -80℃ 保存。2) 提取并洗涤包涵体: 以下均在 4℃ 操作。超声完全裂解细菌, 打断 DNA。离心 17000g × 15min, 弃上清保留沉淀。加入 40ml 组蛋白漂洗缓冲液 + 1% Triton X-100 完全重悬沉淀, 洗涤包涵体。离心 17000g × 15min, 弃上清保留沉淀, 重复洗涤 1 次 (共 2 次)。然后以组蛋白漂洗缓冲液 (不加 Triton X-100) 洗涤沉淀两次。最后一次离心前取出 0.5ml 样品, 单独离心, 准备电泳。3) 从包涵体中提取组蛋白 [使用变性剂如尿素、盐酸胍 (guanidine hydrochloride) 等时, 不必冰上操作]: 包涵体沉淀中加入 1ml DMSO 打碎重悬沉淀, 室温静置 30min。加入 25ml 组蛋白去折叠缓冲液 (7mol/L 盐酸胍, 20mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10mmol/L DTT) 重悬, 室温轻摇 1h。室温离心 17000g × 15min, 弃掉不溶物, 保留上清。4) 离子交换层析纯化组蛋白: 以 SAU-0 (7mol/L 尿素, 20mmol/L 醋酸钠/pH5.2, 1mmol/L DTT, 5mmol/L β-巯基乙醇) 透析包涵体组蛋白过夜。同时以 SAU-0 溶液平衡阳离子交换树脂。透析蛋白离心后上柱子。依次以 3~5 倍柱体积的 SAU-0, SAU-200 (7mol/L 尿素, 20mmol/L 醋酸钠/pH5.2, 200mmol/L NaCl, 1mmol/L DTT, 5mmol/L β-巯基乙醇) 洗脱杂蛋白, 收集样品以备电泳检测。然后以一倍柱体积的 SAU-400 (7mol/L 尿素, 20mmol/L 醋酸钠/pH5.2, 400mmol/L NaCl, 1mmol/L DTT, 5mmol/L β-巯基乙醇), SAU-600 (7mol/L 尿素, 20mmol/L 醋酸钠/pH5.2, 600mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 5mmol/L β-巯基乙醇) 洗脱组蛋白, 收集洗脱峰, 电泳鉴定。合并收集管的样品, 以双蒸水中于 4℃ 透析, 测定浓度, 然后分装液氮速冻, 储存于 -80℃。5) 复性组蛋白八聚体: 重悬 1mg H2A、1mg H2B、1mg H3 和 0.8mg H4 于 0.75ml 组蛋白去折叠缓冲液 (20mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 7mol/L 盐酸胍, 10mmol/L DTT, 5mmol/L β-巯基乙醇) 中。4℃, 透析于组蛋白再折叠缓冲液 (2mol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1mmol/L EDTA, 5% 甘油, 5mmol/L β-巯基乙醇) + 3mol/L urea 中, >4h。继续透析于组蛋白再折叠缓冲液中, 更换 3 次透析液。4℃, 离心 17000g × 20min, 保留上清弃去不溶物。6) 凝胶层析纯化组蛋白八聚体: 以 2 倍柱床体积的组蛋白再折叠缓冲液平衡凝胶层析柱。将透析后的组蛋白过柱, 洗脱。监测洗脱峰, 电泳鉴定。收集合并目的管, 分装保存。

(2) 提取 HeLa 细胞组蛋白八聚体: 1) 收集细胞核: DMEM 培养基 (含 10% 血清) 培养 HeLa S3 细胞。收集约 10⁹ 个细胞, PBS 洗两次。重悬于 20 倍体积的裂解液 (20mmol/L HEPES pH 7.5, 0.25mol/L 蔗糖, 3mmol/L MgCl₂, 0.5% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40), 3mmol/L β-巯基乙醇, 0.4mmol/L PMSF, 1μmol/L 胃酶抑素 A, 1μmol/L leupeptin) 中, 匀浆破碎细胞膜。4℃ 离心, 3000g × 15min。重悬于裂解液中洗涤 2 次, 然后重悬于 buffer B (20mmol/L HEPES pH 7.5, 3mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L EGTA, 3mmol/L β-巯基乙

醇, 0.4mmol/L PMSF, 1 μ mol/L pepstatin A, 1 μ mol/L leupeptin) 中。缓慢震荡, 逐滴加入等体积的 buffer B (0.6mol/L KCl/10% 甘油), 继续温和震荡 10min, 4℃ 离心, 17500g $\times$ 30min。此沉淀即为细胞核。2) 利用羟基磷灰石纯化核心组蛋白八聚体: 重悬细胞核于 HAP buffer (50mmol/L 磷酸钠 pH 6.8, 0.6mol/L NaCl, 1mmol/L β -巯基乙醇, 0.5mmol/L PMSF) 中, 4℃ 温和震荡 10min。震荡过程中加入 10g 羟基磷灰石粉末, 然后灌注。以 10 倍柱体积 HAP 洗涤杂蛋白, 然后以 HAP + 2.5mol/L NaCl 洗脱组蛋白八聚体。电泳检测, 合并收集管, 分装冻存。

(3) 利用昆虫杆状病毒系统表达纯化 NAP-1; TC100 培养基 (含 10% 血清) 培养 Sf9 细胞。在培养皿中按 80% 的密度接种对数生长期的 Sf9 细胞, 细胞贴壁后 4h, 以 MOI (multiplicity of infection) 值为 10 (扩增病毒约 1ml) 感染细胞。感染 72h 后收集细胞, 用冰冷的 PBS 洗 1 次。离心, 沉淀重悬于 3ml H Lysis Buffer (50mmol/L 磷酸钠 pH7.0, 500mmol/L NaCl, 20mmol/L 咪唑, 10mmol/L β -磷酸甘油, 15% 甘油, 0.01% NP-40, 0.2mmol/L PMSF, 0.5mmol/L 苄脒)。用“A”型匀浆器冰浴中充分的匀浆 (大约在 30min 内匀浆 30~40 次)。于 Sorvall ss-34 转头 4℃ 离心 11000r/min $\times$ 10min。上清与 300 μ l 50% Ni-NTA resin (预先 H Lysis Buffer 平衡) 混合, 4℃ 摇床过夜。次日用 H Lysis Buffer 洗 4 次。然后用 H Wash Buffer (50mmol/L 磷酸钠 pH7.0, 100mmol/L NaCl, 20mmol/L 咪唑, 10mmol/L β -磷酸甘油, 15% 甘油, 0.01% NP-40, 0.2mmol/L PMSF, 0.5mmol/L 苄脒) 洗两次。连续 4 次加入和吸出 200 μ l H Elution Buffer (H Wash Buffer + 480mmol/L 咪唑), 每次洗脱 5min。总蛋白样品 800 μ l 对 400ml 的 Buffer R (10mmol/L HEPES-KOH pH 7.6, 10mmol/L KCl, 100mmol/L NaCl, 0.5mmol/L EGTA, 10% 甘油, 10mmol/L β -磷酸甘油, 1mmol/L DTT, 0.2mmol/L PMSF) 透析。然后于 Sorvall ss-34 转头 4℃ 离心 11000r/min $\times$ 10min, 去除不溶的成分。分装, 冻存。BCA 法测定蛋白浓度, 12% SDS-PAGE 电泳检测蛋白纯化情况。

(4) 利用昆虫杆状病毒系统表达纯化 ACF; 对数生长期的 Sf9 细胞接种于 10 个 150mm 的培养皿中, 大约 2.2×10^7 细胞/板, 细胞贴壁后 2h, 以 MOI (multiplicity of infection) 值为 10 (扩增病毒约 1ml) 感染细胞, 感染 72h 后收集细胞, 用冰冷的 PBS 洗 1 次。离心, 沉淀重悬于 4ml F Lysis Buffer (20mmol/L Tris-HCl pH7.9, 500mmol/L NaCl, 4mmol/L MgCl₂, 0.4mmol/L EDTA, 2mmol/L DTT, 20mmol/L β -磷酸甘油, 20% 甘油, 0.4mmol/L PMSF, 1mmol/L 苄脒, 4 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml aprotinin), 用“A”型匀浆器冰浴中充分的匀浆 (大约在 30min 内匀浆 30~40 次)。于 Sorvall ss-34 转头 4℃ 离心 11000r/min $\times$ 10min, 上清与 100 μ l FLAG-M2 agarose (预先用 F Lysis Buffer 平衡, 并以 1:1 混合) 混合。4℃ 轻摇孵育过夜; 次日用 2ml Wash Buffer F (20mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 150mmol/L NaCl, 15% 甘油, 2mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L EDTA, 0.01% NP

-40, 1mmol/L DTT, 10mmol/L β -磷酸甘油, 0.2mmol/L PMSF, 0.5mmol/L 苄脒, 2 μ g/ml leupeptin; 1 μ g/ml aprotinin) 洗 4 次, 然后用 0.5ml Elution buffer F (Wash buffer F + 0.4mg/ml FLAG peptide + 0.4mg/ml BSA) 4℃ 孵育 1h, 8200g 离心 1min, 迅速将上清转移到预冷的 Ep 管中。重复洗脱 2 次, 合并洗脱液, 液氮速冻, -70℃ 保存。

(5) 染色质体外组装: 1) 染色质体外组装^[7,8]: 在 Ep 管中加入 4 $\times$ Assembly Buffer (40mmol/L HEPES pH7.6, 200mmol/L KCl, 40% 甘油, 4% PEG8000) 5 μ l, 2 μ g NAP-1, 1 μ g histone 加水至 20 μ l, 于冰上孵育 30min。取新 Ep 管中加入 4 $\times$ Assembly Buffer 10 μ l, 100mmol/L ATP 2.4 μ l, 0.2mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l, 2 μ g ACF (ISWI, Acf-1), 1 μ g DNA, 加水至 40 μ l。将上述两者混匀, 于 27℃ 反应 2h。2) 微球菌核酸酶酶切检测: 建立如下酶切体系: 5 $\times$ Buffer 12 μ l, 微球菌核酸酶 0.008U, 组装产物 30 μ l, 加水至 60 μ l, 于 26℃ 消化 150s。以等体积的酚/氯仿 (1:1) 抽提, 氯仿抽提, 无水乙醇沉淀, 乙醇洗涤后溶于 TE (pH8.0), 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

结 果

1. 提取 HeLa 细胞核心组蛋白八聚体: 大量培养 HeLa S3 细胞, 收集细胞, 裂解细胞, 提取细胞核。利用羟基磷灰石结合核小体的 DNA, 以低盐洗去组蛋白 H1, 高盐洗脱核心组蛋白八聚体。收集洗脱液, 进行 SDS-PAGE, 得到核心组蛋白八聚体 (图 1)。

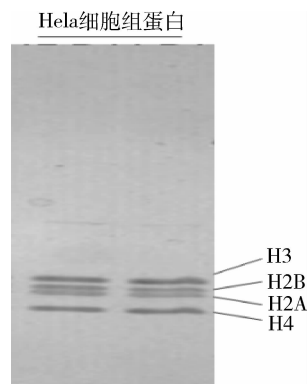


图 1 HeLa 细胞核心组蛋白的提取纯化

2. 原核表达纯化组蛋白: 将 H2A、H2B、H3 和 H4 的原核表达质粒分别转化到 BL21 (DE3) 感受态中, 加入 IPTG 于 37℃ 诱导表达。分离洗涤包涵体, 然后溶解包涵体, 使用阳离子交换层析, 纯化蛋白。收集齐 4 种核心组蛋白后, 等量混匀, 透析使之复性。复性的组蛋白通过凝胶层析过滤, 除去游离组蛋白, 得到纯化的组蛋白八聚体 (图 2)。

3. NAP-1 蛋白表达纯化: 首先, 将表达 6-His-tag 果蝇 NAP-1 的杆状病毒感染 Sf9 昆虫细胞, 培养 72h 后, 裂解细胞, 利用 Ni 柱亲和层析从细胞裂解

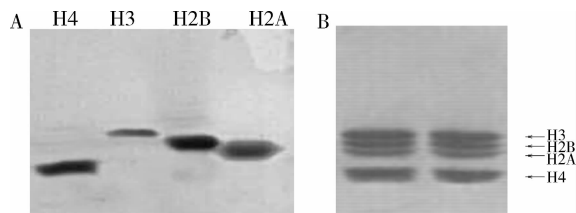


图2 原核表达组蛋白的提取纯化

A. 原核表达的组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4;

B. 复性后的组蛋白八聚体

液中纯化 dNAP-1 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳(图 3A)。

4. ACF 的表达纯化:将带有 Flag 标签的果蝇 Acf-1 和无标签的 ISWI 杆状病毒共感染 Sf9 细胞,然后用 Flag 免疫亲和层析从 Sf9 细胞裂解物中纯化复合物。此方法可以获得含有等分子 Acf-1 和 ISWI 的 ACF(图 3B)。

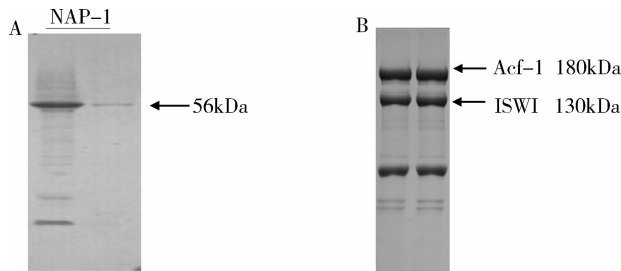


图3 NAP-1 和 ACF 的表达纯化

5. 利用纯化的蛋白进行染色质体外组装:将等摩尔数的 NAP-1 和组蛋白八聚体预先混合,然后加入与组蛋白八聚体等质量的质粒 pG5M1,过量的 ACF,ATP 等在 27℃ 孵育 2h。然后进行微球菌核酸酶不完全酶切。微球菌核酸酶可催化 DNA 和 RNA 中磷酸二酯键的水解,产物为 3'-磷酸的单核苷酸或寡核苷酸。此酶不作用于与蛋白质相接触的 DNA,因此没有组装成染色质的 DNA 会被消化成弥散的条带,组装成功的染色质可在核小体之间的部位将 DNA 切断,导致核小体聚合数目不等而形成 146bp 为倍数的 DNA 梯带。利用酚氯仿抽提 DNA,无水乙醇沉淀,溶解后进行琼脂糖凝胶电泳。结果显示,酶切产生了 5~6 条 DNA 梯带,表明组装成功(图 4)。

讨 论

由重组蛋白建立的组装体系中需要考虑的最关键参数是核心组蛋白与模板 DNA 的比例。如果比例低至 5%~10% 将抑制反应或组装的染色质的质量

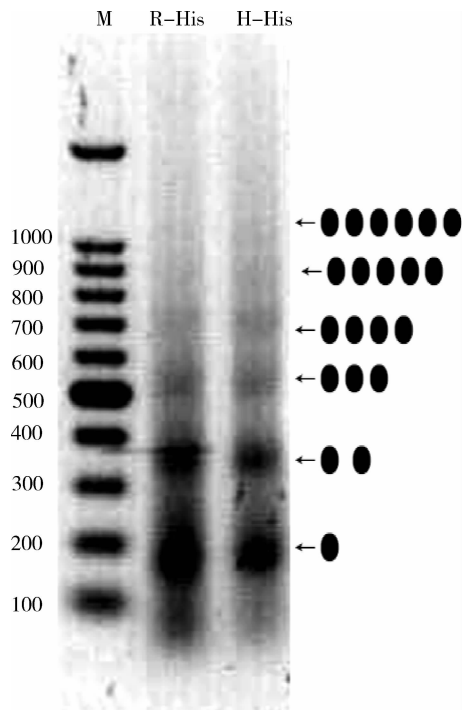


图4 微球菌核酸酶酶切体外组装的染色质

M. 分子质量标准;R-His. 重组组蛋白;H-His. 细胞组蛋白

较低。用分光光度计或比色方法测定获得的 DNA 浓度的准确性不足以用于建立正确的组蛋白/DNA 的比值。因此,为使重组的染色质在微球菌核酸酶处理后产生理想的 DNA 梯带,必须通过预实验确定每一对组蛋白及 DNA 之间的比例。设立一组核心组蛋白与 DNA 的质量比例分别从 0.7~1.4 的组装反应体系,其中组蛋白和 NAP-1 的比例保持恒定。一般,低组蛋白含量所获得的染色质组装不完全及转录抑制不充分。经微球菌核酸酶消化后产生较短的 DNA 梯带(仅在凝胶底部出现由 2~3 个核小体形成的带)及大的核小体重复合体(180bp 或更长)。过量的组蛋白将完全抑制组装反应,并产生不能被微球菌核酸酶有效消化的组蛋白-DNA 聚合体。

组装反应对 NAP-1 的浓度很不敏感。但是必须注意,加过量的组蛋白伴侣对组装反应比较安全。如果 NAP-1 与核心组蛋白的比例降至 3/8~3/4 以下,过多的游离组蛋白则形成不能作为 ACF 底物的组蛋白-DNA 聚合体。ACF 浓度过高并不影响组装反应。

为防止重组体系中的成分对研究染色质的功能产生影响,应通过凝胶过滤或蔗糖梯度离心法纯化组装的染色质。然而,应用未经纯化的组装的染色质作为转录检测的模板,效果同样很好。通过改变组装体

系中 KCl 的浓度及组蛋白的量可以使核小体包装的较松散或较紧密。但是,较紧密的核小体需要较高浓度的微球菌核酸酶消化。由纯化蛋白质构成的组装体系对组蛋白的修饰状态并不敏感。

参考文献

- 1 Glikin GC, Ruberti I, Worcel A. Chromatin assembly in *Xenopus* oocytes; in vitro studies[J]. *Cell*, 1984, 37 (1): 33 - 41
- 2 Nelson T, Hsieh TS, Brutlag D. Extracts of *Drosophila* embryos mediate chromatin assembly in vitro[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76 (11): 5510 - 5514
- 3 An W, Kim J, Roeder RG. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53 [J]. *Cell*, 2004, 117 (6): 735 - 748
- 4 Stillman B. Chromatin assembly during SV40 DNA replication in vitro

[J]. *Cell*, 1986, 45 (4): 555 - 565

- 5 Ito T, Levenstein ME, Fyodorov DV *et al.* ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP - dependent catalysis of chromatin assembly[J]. *Genes & Development*, 1999, 13 (12): 1529 - 1539
- 6 Fyodorov DV, Kadonaga JT. Chromatin assembly in vitro with purified recombinant ACF and NAP - 1 [J]. *Methods in Enzymology*, 2003, 371: 499 - 515
- 7 An W, Roeder RG. Reconstitution and transcriptional analysis of chromatin in vitro[J]. *Methods in Enzymology*, 2004, 377: 460 - 474
- 8 Zhang Y, Griffin K, Mondal N, *et al.* Phosphorylation of histone H2A inhibits transcription on chromatin templates[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (21): 21866 - 21872

(收稿: 2011 - 06 - 21)

(修回: 2011 - 11 - 20)

糖调节蛋白 78 在脓毒症损伤心肌中表达的意义

伏晓琳 刘晓义 鲁彦 郭雅琼 李宏宝 周荣

摘要 目的 研究脓毒症大鼠心脏组织内葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 的表达。方法 24 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组和脓毒症 (0、4、8、12、24h) 组, 脓毒症模型采用盲肠结扎穿孔法 (CLP)。术后测血压、心率及心电图同时测定心肌酶谱, 光镜观察心脏的组织形态学, 实时荧光定量多聚酶链式反应 (实时 PCR) 检测心脏组织中 GRP78 mRNA 的表达。结果 与脓毒症 0h 组及假手术组相比, 脓毒症大鼠的血压、心率、心电图、心肌酶谱及组织学变化均随时间延长而变化明显 ($P < 0.05$); 与脓毒症 0h 组及假手术组相比, 脓毒症组大鼠心脏组织中 GRP78 mRNA 明显升高 ($P < 0.05$), 4h 时达到了峰值, 随后开始下降, 到 12h 与 24h 时下降明显, 但仍然高于脓毒症 0h 组及假手术组 ($P < 0.05$)。结论 脓毒症可能通过诱导过强的内质网应激反应参与了心肌组织损伤。

关键词 脓毒症 葡萄糖调节蛋白 78 心肌损伤 内质网应激

Expression of Glucose - regulated Protein 78 in Myocardial Injury of Sepsis in Rats. Fu Xiaolin, Liu Xiaoyi, Lu Yan, Guo Yaqiong, Li Hongbao, Zhou Rong. Department of Emergency Medicine, First Hospital of Lanzhou University, Gansu 730000, China

Abstract Objective To investigate the expression of glucose regulation protein 78 (GRP78) in heart tissue of the sepsis rats. **Methods** Twenty - four male SD rats were randomized into sham group and sepsis group (0, 4, 8, 12, 24h), in which the sepsis model adopted cecal ligation perforation method (CLP). The changes of blood pressure (BP), heart rate (HR) and electrocardiogram were determined, and the concentration of myocardial enzymes (LDH, α - HBDH, CK - MB and CK) were detected. Morphological changes of hearts tissues were observed by light microscopy. The expression of GRP78 in heart tissue was detected by quantitative fluorescence polymerase chain reaction (real - time PCR). **Results** Compared with sham group, the BP in sepsis rats decreased significantly. Oppositely, the HR in sepsis rats increased significantly. ST depression was observed along with the significantly increase of myocardial enzyme. Importantly, it was shown that the expression of GRP78 in heart tissue of CLP rats was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion**

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30700266); 中央高校基本科研业务费专项资金 (lzujbky - 2010 - 146)

作者单位: 730000 兰州大学第一医院急诊科 (伏晓琳、刘晓义、周荣); 730030 兰州, 解放军第一医院检验科 (鲁彦); 730000 兰州大学基础医学院生理教研室 (郭雅琼、李宏宝)

通讯作者: 周荣、鲁彦, 电子信箱: lu73free@yahoo.com.cn