

HSP 70 系统分析与 ER 的起源

王秋雨* 宋今丹

(中国医科大学细胞生物学卫生部重点实验室 沈阳 110001)

实验证明,在突然升温或其它不利条件下,几乎所有真核生物和原核生物的细胞,都增加合成了一系列蛋白质,这些蛋白质被命名为热休克蛋白(heat shock protein)。其中一类蛋白质的分子量为 70 KD,称为 HSP 70。进一步研究表明,细胞在正常生命活动中也合成 HSP 70,它在蛋白质的跨膜转运、折叠、解离、降解及特定构象维持等方面起着重要的分子伴侣功能^[1,2]。至今已克隆测序了真核生物、真菌、原核生物、真细菌和古代原细菌等数十种生物的 HSP 70 基因和蛋白,结果表明,HSP 70 不仅广布于各种生物的细胞内,而且还是至今所研究过的进化上最保守的蛋白质之一。另外,在真核细胞内的不同区室(细胞器)内,相应的 HSP 70 具有一定的顺序特征,它们是多基因编码的家族蛋白,具有共同的起源,由于功能和分布位置的不同,导致了它们的进化。因此,对 HSP 70 进行系统分析,对研究内质网(ER)等细胞器的起源与进化有重要意义,HSP 70 可以起着分子水平上的活化

石作用。

一、HSP 70 的顺序特征及比较

Gupta^[3]克隆并测序了 *Halobacterium marismotui* 的 HSP 70 基因,并把其编码的氨基酸顺序与另外 11 种处于不同分类地位物种的 HSP 70 顺序进行了比较,除羧基端的少量延长外,整个蛋白的全长具有极度的相似性,可证实这些蛋白均由 HSP 70 多基因家族所编码,有着共同的起源。使用 GCG 最适软件程序,对 HSP 70 进行配对对位分析,显示出 *H. marismotui* 的 HSP 70 与古代原细菌和真细菌的对应物具有 51%—58% 的相同氨基酸,与真核生物的有 44%—47%,另外,各种生物的 HSP 70 的 15%—20% 氨基酸被保守地替换(表 1)。这一切均说明在囊括三大类群的生物中(真核,真细菌和古代原细菌),HSP 70 是已知的最保守的蛋白质。

序列对位分析结果显示出 HSP 70 家族具

表 1 HSP 70 顺序间相似或相同氨基酸百分数*

| 氨基酸顺序来源 | 相似或相同氨基酸% | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L |
| (A) 死海盐细菌 | | 58.0 | 57.7 | 54.1 | 55.9 | 52.3 | 56.9 | 51.5 | 50.5 | 47.6 | 44.3 | 46.3 |
| (B) 马氏甲烷球菌 | 73.0 | | 65.6 | 59.3 | 65.4 | 58.3 | 61.5 | 60.4 | 55.2 | 48.5 | 49.3 | 49.0 |
| (C) 枯草芽孢杆菌 | 74.9 | 79.8 | | 58.3 | 67.1 | 58.1 | 63.3 | 60.0 | 56.2 | 48.6 | 48.2 | 48.7 |
| (D) 麻疯分枝杆菌 | 72.3 | 76.5 | 75.2 | | 58.4 | 56.6 | 57.6 | 56.8 | 52.5 | 47.7 | 48.3 | 49.3 |
| (E) 产气荚膜梭菌 | 73.0 | 78.0 | 79.6 | 74.4 | | 59.7 | 64.5 | 59.4 | 56.4 | 46.0 | 46.3 | 47.2 |
| (F) 大肠埃希氏菌 | 71.7 | 74.0 | 74.5 | 72.1 | 76.0 | | 66.5 | 59.8 | 59.6 | 48.0 | 50.7 | 50.8 |
| (G) 新月柄杆菌 | 72.9 | 77.2 | 77.7 | 73.7 | 76.7 | 79.7 | | 59.7 | 60.5 | 48.7 | 50.7 | 50.8 |
| (H) 沙眼衣原体 | 68.2 | 75.9 | 75.0 | 74.9 | 74.1 | 74.6 | 74.9 | | 57.1 | 47.0 | 47.6 | 48.8 |
| (I) 南阳酒精酵母(线粒体) | 66.6 | 72.3 | 74.0 | 69.7 | 72.2 | 75.0 | 76.4 | 72.1 | | 49.2 | 48.3 | 46.9 |
| (J) 南阳酒精酵母 | 65.9 | 66.1 | 67.3 | 66.1 | 66.0 | 65.9 | 65.9 | 66.1 | 67.1 | | 57.9 | 59.8 |
| (K) 玉米 | 64.7 | 68.1 | 68.5 | 67.6 | 66.3 | 66.1 | 68.9 | 66.0 | 67.2 | 72.0 | | 75.2 |
| (L) 人 | 66.8 | 67.3 | 68.8 | 69.2 | 67.9 | 66.6 | 68.9 | 66.9 | 65.7 | 74.9 | 85.0 | |

* HSP 70 顺序经过 GCG 6 最适标准数据程序对位处理,上角为两数据间相同氨基酸百分数,下角为两顺序间相似氨基酸百分数^[5]。

* 现工作单位为辽宁大学生物系

有下列特征: 1. 在 N-末端的四分之一处, 真核细胞、革兰氏阴性细菌的 23—27 位含有非常保守的插入顺序, 此顺序在古细菌和革兰氏阳性细菌不存在; 2. 真核细胞的 HSP 70 在近中部丢失 5 个氨基酸; 3. 在真核细胞, 中部特有地插入 3—5 个氨基酸, 羧基端四分之一处插入精氨酸。上述后两个特点可用来区别真核细胞和原核细胞的 HSP 70。值得一提的是, Gray^[4]比较了从胞质中和线粒体中提取的 HSP 70, 后者明显表现出真细菌的特点, 辅证了线粒体的内共生起源论。

二、ER HSP 70

Gupta^[5]在克隆原生动物 *Giardia lamblia* 的 HSP 70 时, 获得了一个含有 1986 bp 的基因, 编码 662 个氨基酸, 它的顺序特征与真核细胞胞质中的 HSP 70 基本一致, 只是在 120、204、268 位含有插入序列。下述两个特征可证明它是 ER 驻留型的 HSP 70, 首先同其它运入 ER 的蛋白一样, 在 N-末端具有疏水的引导序列(信号肽), 位于其保守序列 GIDLG-TTYSVCV 之前, 这段保守序列存在于所有 HSP 70 家族成员之中; 其次在它的 C-末端也含有 ER 驻留蛋白所特有的驻留信号 KDEL。进一步研究表明, ER 内的 HSP 70 就是前人报道的 Grp78 或 Bip 蛋白, 即 ER 的 Grp78 或 Bip 蛋白也由 HSP 70 家族基因编码。

Gupta^[5]把不同物种的 ER HSP70(包括 *G. lamblia*, *Saccharomyces cerevisiae*, Human, Tobacco, *Plasmodium falciparum*) 与胞质型的 HSP 70 进行了对比比较, 发现除上述的 N-末端和 C-末端的特点, 还具有下列保守性的变化: 1. 在第 31 位, ER HSP 70 为 K, 胞质的为 Q; 2. 在第 87 位, ER 的为 L, 胞质的为 W; 3. 在 324—325 位, ER 的为 SE, 胞质的为 FT 或 YT。总之, ER HSP 70 与胞质 HSP 70 虽同来自于 HSP 70 家族, 但还是存在着非常保守的差异。

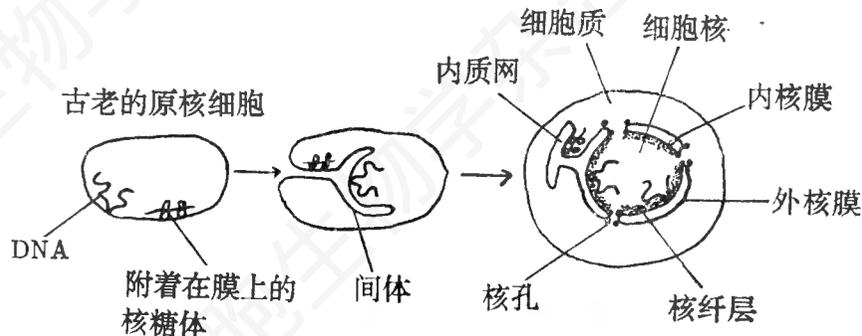
三、HSP 70 的系统分析及进化

为弄清胞质 HSP 70 与 ER HSP 70 的关系, Nicholson^[6]和 Gupta^[5]分别对 HSP 70 的顺序进行了系统分析。Gupta 分析了 25 种 HSP 70 分子, 包括 11 个 ER HSP 70 分子, 12 个胞质 HSP 70 分子(这两组 HSP 70 分子均含有来自植物、动物、真菌和原生动物物种的代表), 1 个真细菌和 1 个古代原细菌的 HSP 70。结果表明, 来自 *Giardia lamblia* ER HSP 70 的氨基酸顺序变异最大, 它形成了 HSP 70 真核细胞系统树的根, 并从它开始, HSP 70 分为两支, 一支存在于胞质, 一支存在于 ER。来自 *G. lamblia* 胞质中的 HSP 70 也在胞质组中显示出了最大的变异。在两大分支内部, 来自动物和植物细胞内的 HSP 70 差异非常显著。Nicholson 的结果表明, 酵母 ER HSP 70 的顺序与鼠, 田鼠和疟原虫的 ER HSP 70 极度相似, 而来自胞质中的 HSP 70 则没有此现象, 这表明两大分支内部存在着独立的进化和发展过程。

Gupta^[8]根据 HSP 70 的顺序特征, 提出了它的进化假说。HSP 70 进化过程分四个阶段, 第一阶段为原始区段的诞生, 指 N-末端约 160 个氨基酸的形成, 在古代原细菌和革兰氏阳性细菌内测到的硫氧还蛋白(thioredoxin)与此段顺序极度相似; 第二阶段为两个原始肽链的融合, 氨基酸数达到 320 个左右, 来自古代原细菌和革兰氏阳性细菌的 HSP 70 的 1—160 和 160—320 氨基酸顺序相似, 为其提供了证据; 第三阶段为 C-末端肽链的获得, 至此古代原细菌和革兰氏阳性细菌的 HSP 70 诞生; 第四阶段为 N-末端 23—27 位获得插入序列, 来自革兰氏阴性细菌和所有真核细胞的 HSP 70 均具有此插入序列。

四、HSP 70 与 ER 起源

Alberts 等^[13]报道, 真核细胞的祖先可能是与细菌相似的生物, 有包裹细胞的质膜存

图1 ER和细胞核可能的进化途径^[13]

在, 但无内膜, 所有依赖于膜的功能均由质膜承担。在进化过程中, 细胞体积不断增大, 功能也越来越多样化和复杂化, 细胞质膜便以内陷的方式增大膜的表面积, 用以承担各种特有的生理功能。内陷的质膜最终与质膜脱离, 形成以内质网为核心的内膜系统, 包括外核膜(图1)。内膜系统及核的进化形成标志着真核细胞的诞生, 由它们所引起的细胞内区室化是真核细胞区别于原核细胞的本质特征。内质网膜囊腔起源于胞外, 并始终独立于胞液而存在。

Sogon^[7]通过对16S样的rRNA顺序系统分析, 得出*G. lamblia*具有众多真核细胞始祖的特征, 这与上述的HSP 70系统分析的结果一致。根据Cavalier^[9]的报道, *G. lamblia*没有线粒体及过氧化酶体等细胞器, 典型的ER结构也未确认^[10,11]。这一切均说明它是极原始的真核细胞生物, 在它体内克隆得到的两种HSP 70分子各具有胞质和ER HSP 70的最原始特征, 根据这些研究结果, 可推测出ER诞生于真核细胞进化的早期阶段, 并与胞质分离, 独立地进化和发展^[6]。

HSP 70承担着非常保守的分子伴侣功能, 即帮助蛋白跨越细胞内膜及维持蛋白的特定构象等。细胞内各区室(ER, 线粒体, 胞室等)都有HSP 70对应物的存在, 表明它对这些细胞器是必需的。现行的观点认为^[12,18]: 细胞内各区室在解剖上或者与胞质对等(如核), 或者与ER对等(如高尔基器, 溶酶体)。从核外膜与ER膜极度相似和相连的特点, 可推测这

些结构在进化中同时出现。古老的真核细胞诞生出ER和核后, 细胞内形成了新的区室, 蛋白必须实现跨越这些区室的运输(如膜蛋白在ER形成后, 往核膜或质膜上的运输), 这就使得分子伴侣的功能量加大, 要完成更多的机能, 有关的基因扩增就成为必需, 基因扩增导致了HSP 70家族的形成, 并出现分歧与进化, 直至演变为既具有共性又具有特性的HSP 70家族^[5]。

ER HSP 70的起源与进化是伴随着ER的起源与进化而进行的。因此, 比较研究ER HSP 70的分子特征, 是获取ER有关信息的重要途径之一。

摘 要

HSP 70是迄今研究过的进化上最保守的蛋白质之一, 是分子伴侣的主要成分, 对蛋白的跨膜转运及特定构象的维持等起着重要作用。对其序列进行系统分析表明, 古细菌, 真细菌和真核细胞内的HSP 70虽具有很强的相似性, 但各具特点。真核细胞各区室(细胞器)的HSP 70顺序也既有共性, 又有特性。根据ER HSP 70的特点, 可推测出ER起源于真核细胞诞生的早期阶段, 并由此引起细胞内的区室化, 这是真核细胞区别于原核细胞的本质特征之一。

参 考 文 献

- [1] 王润华, 1993, 细胞生物学杂志, 15: 106—109.
- [2] Lindquist, S. et al., 1988, *Annu. Rev.*

- Genet.*, 22: 631—667.
- [3] Gupta, R. S. et al., 1992, *J. Bacteriology*, Vol., 174: 4594—4605.
- [4] Gray, M. W., 1989, *Trends Genet.*, 5: 294—299.
- [5] Gupta, R. S. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol., 91: 2895—2899.
- [6] Nicholson, R. C. et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol., 86: 1159—1163.
- [7] Sogin, M. L. et al., 1989, *Science*, 243: 75—77.
- [8] Craig, E. A. et al., 1993, *Microbiol. Rev.*, 57: 402—414.
- [9] Cavalier-Smith, T. et al., 1987, *Nature (London)*, 326: 332—333.
- [10] Reiner, D. S. et al., 1990, *Eur. J. Cell Biol.*, 53: 142—153.
- [11] Jacobson, L. M. et al., 1987, *J. Protozool.*, 34: 83—86.
- [12] Dillon, L. S., 1981, *Ultrastructure, Macromolecules and Evolution*, Plenum, N. Y.
- [13] Alberts, B. et al., 1989, *Molecular Biology of the Cell*, Garland, N. Y. 2nd., 408—409.
- [14] Gething, M. et al., 1992, *Nature* 355.

人脐静脉内皮细胞体外培养的影响因素

卞杰勇 周 岱

(苏州医学院附属第一医院脑血管病研究室 215007)

血管内皮细胞是位于循环血液与血管壁内皮下组织之间的单层细胞,是血管壁通透性的重要屏障,具有多种生理功能。脐静脉内皮细胞由于来源充足,取材、操作方便,因而成为血管内皮细胞体外试验的主要材料。自 Jaffe^[1] 首创脐静脉内皮细胞培养方法后,以血管内皮细胞的培养技术为基础的研究工作取得了突飞猛进的发展。1976年 Vane 发现了前列腺素,1980年 Furchgott 发现内皮细胞产生的舒张因子(EDRF),1987年 Moncede 证明一氧化氮就是 EDRF,以及 1988年 Yanagisawa 发现内皮素,这些成果都是在以脐静脉内皮细胞培养为代表的血管内皮细胞培养的基础上取得的,而脐静脉内皮细胞的体外培养受到许多因素的影响。

一、脐带离体时间的影响

脐带取材方便,一般取正常妊娠足月分娩的新生儿无菌脐带,立即浸入 4℃ 的脐带保存液中,保存 6 小时或更多时间会使细胞容易分

离,但最好不超过 48 小时^[2];有研究表明^[3],人脐静脉离体后,随着时间的延长,内皮某些物质的含量会发生变化,脐静脉离体后 6 小时内,因子Ⅷ相关抗原与抗凝血酶功能的变化比较平缓,单位面积内前列环素的生成量的变化亦不十分显著,而离体后 6 小时到 12 小时,内皮抗凝血酶功能,因子Ⅷ相关抗原释放量以及前列环素的生成量均随放置时间的延长而呈下降趋势,变化显著;还有研究表明^[4],脐带离体时间与细胞存活率呈负相关,脐带离体后 3 小时内,内皮细胞存活率达到 90%,离体 24 小时尚有 50% 的存活细胞。

二、不同消化酶的影响

目前,各种消化酶的应用已代替了机械刮取来获取脐静脉内皮细胞,它们各有优缺点。用胶原酶消化的细胞数最多,平均每根脐带可获取 2—5 × 10⁵ 个细胞,但有时混杂少量成纤维细胞;链球菌蛋白酶消化获取的细胞数略少于胶原酶,但很少混杂成纤维细胞;胰蛋白酶