

果蝇的热休克反应*

陈小芬 杨玉荣* (厦门大学生命科学学院 福建厦门 361005)

摘要 热休克反应最早在果蝇中发现,其过程伴随着一系列特殊蛋白——热休克蛋白(HSPs)的增量表达。热休克蛋白包括多个家族,它们在热休克反应中表现出复杂的表达调控机制,并具有组织和发育阶段特异性。研究热休克反应具有重要的生物学意义,在医学、工业等的应用前景十分广阔。

关键词 果蝇 热休克反应 热休克蛋白

热休克反应或热激反应(heat shock or heat stress response)指短暂、迅速向高温转换诱导出的一种应激反应。所有生物在温度提高到正常生理体温之上时都会引起热应激反应。最明显特征是:正常蛋白质合成受抑制,诱导一系列称为热休克蛋白(heat shock proteins,HSPs)的增量表达。

研究表明,许多刺激可诱导 HSPs 的表达增加。包括:冷、干燥、近亲交配、过高种群密度、有机毒物、重金属(砷、镉)、乙醇、 H_2O_2 等环境因素;基因损伤、组织创伤、微生物感染等生理病理变化。这些蛋白能快速、短暂地调整应激过程中细胞的存活机能,保护细胞抗损伤,有助于恢复期细胞正常结构和机能的重建。在正常生长和发育中,HSPs 也有水平不等的表达,并在发育中起重要的作用。由于 HSPs 特殊的生物学特性,已引起众多国家研究者的兴趣和重视,成为当今热门研究课题之一。

1 果蝇热休克反应的研究简史

1962年,Ritossa 发现短暂热休克可诱导果蝇多线染色体产生特殊膨松,2,4-二硝基酚或水杨酸钠也会导致3个新膨松出现,推测可能是一些化学修饰与解偶联的氧化磷酸化关联的结果。后 Ashurner 对此反应进行了更详尽描述。他发现应激反应时染色体具有以下几个新特点:新膨松的诱导非常迅速,存在很短暂;膨松的诱导不依赖于热休克蛋白的合成,但抑制却依赖于 HSPs 的合成;热休克反应在分离器官中也能产生,说明该反应不需要整个有机体,且不为某一组织或发育阶段所特有。

20世纪70年代,Tissieres 和 Mitchell 利用 SDS-PAGE 分析热激果蝇唾液腺中放射性标记的蛋白质,发现热激诱导少数几个多肽的合成而抑制其他大多数的合成。热激的膨松区和新诱导合成的多肽数目大约一致,Beermann 提出了膨松假说。1975年 O Farrell 改进了双向电泳,分辨率的提高极大地促进了热休克反应研究的深入。20世纪80年代,热休克反应的研究进入了基因水平,即分离和分析热休克基因,比较不同生物中热休克基因的同源性。20世纪90年代的研究主要集中在热休克蛋白的结构和功能上,认为 HSPs 的基本作用是分子伴侣,对其生物学特性及分

子伴侣作用的探索成为焦点。

目前研究主要集中在应用整体原位杂交技术,分析、比较应激下不同热休克基因表达模式的差异及其在组织和发育阶段中的特异性表达。热休克基因的信号通路也是现在研究的热点。

2 热休克蛋白的分类

果蝇的热休克蛋白有:hsp22, hsp23, hsp26, hsp27, hsp68,hsp70,hsp83, hsp104。根据其作用和调控方式,可以把 HSPs 分为两大类:一类为构成性热休克蛋白(constitutive heat shock proteins,HSCs)在细胞正常代谢生理条件下表达和发挥作用;另一类为诱导性热休克蛋白(induced heat shock proteins,HSPs)在机体和细胞受到刺激时表达,并使细胞产生抗逆性。虽然 HSPs 和 HSCs 的调控存在一定差异,但同一家族 HSPs 和 HSCs 的结构和功能及结构基因并无很大差别,因此往往将 HSPs 和 HSCs 统称为热休克蛋白(heat shock proteins,HSPs)。

热休克蛋白另一分类方法是依亚基的分子量(10^3)大小分为4个家族:HSP90/100家族,HSP70家族,HSP60家族以及小分子量 HSP 家族(sHSP)。

3 热休克蛋白的表达调控

目前认为应激下热休克蛋白的表达包括三步:热休克转录因子(heat shock transcription factor, HSTF)的激活、以及与热休克元件(heat shock elements,HSE)的结合和 hsp 基因的转录。目前以果蝇 hsp70 的诱导和表达机制的研究最为清楚。

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) hsp70 有5个拷贝,分别位于3号染色体右臂的87A和87C。这5个拷贝均无内含子,97%蛋白编码序列具有相似性,且转录起点上游约400bp的基因具有高度保守性。在 hsp70 基因启动子 TATA box 上游均有一段特殊的 DNA 序列,以5个碱基(NGAAN)为基本单位重复排列,是转录所必需的特有序列,称为热休克元件(HSE)。每个 HSE 至少含2个“NGAAN”单位,是热休克转录因子(HSTF)的结合域,可顺向连接(NGAAN-NTTCN)或反向连接(NTTCNNGAAN)。

非应激细胞中,HSTF 与泛素(Ubiquitin)结合,无结合

* 教育部留学回国人员启动基金和厦门大学基金 K16094 资助

** 通讯作者

DNA的活性。一旦应激发生, HSTF 磷酸化并组装成三聚体活化形式,多聚体中的每一个亚单位分别与 HSE 的一个“NGAAN”结合,从而激活相应的 hsp 基因的转录。

hsp 基因还受到 Hsp 的负反馈调节。应激时细胞产生大量异常蛋白,泛素-蛋白酶(Ubiquitin-proteasome)系统随之启动,导致细胞对游离态泛素需求剧增。为满足需要,细胞一方面合成泛素,另一方面结合 HSTF 的泛素解离而增加泛素的含量。游离出来的 HSTF 组装成可结合 DNA 的活化形式,从而启动 hsp 基因的表达。在热休克蛋白的参与下,异常蛋白被大量降解。细胞中不断合成的泛素重新结合 HSTF,导致 HSTF 失活而关闭了热休克基因的表达。因此热休克蛋白的表达调控主要发生在转录水平上,且与 HSTF 和 HSE 密切相关。

5 个 hsp70 基因的 5 UTRs 及上游调控序列呈高度保守性,因此以前人们广泛认为 Hsp70 具有大致相同的诱导、表达机制。Hsp70 不仅在转录水平上受到调控(转录水平不同或转录时间不同),也在转录后(从核内输出)及翻译水平上(如翻译延迟或 hsp70 mRNAs 数目不同)受到调控。

由于 3 UTRs 影响了 hsp70 mRNAs 的稳定性及其跨膜转运,推测它与转录后的调控密切相关。对于 hsp70 基因,普遍认为启动子一直处于开放状态,一有应激发生则立刻启动转录。此外, hsp70 基因还能自我反馈调节。果蝇 hsp70 基因在细胞应激反应中发挥着核心的作用,调控机制比其他 hsp 基因更为复杂。

因 5 个 hsp70 基因编码的氨基酸片段间差异很小,并不是所有种类的果蝇都含有多拷贝的 hsp70 基因,因此目前对这 5 个 hsp70 基因分别采用不同调节机制的意义还不清楚。推测可能是在应激下有助于快速产生大量的 Hsp70; 另一方面, 87A 和 87C 两处的 hsp70 基因在发育过程中可能受不同的调控,从而满足不同细胞的需要。5 个 hsp70 编码的氨基酸序列间的微小差异可能引起 Hsp70 分子伴侣活性的不同,从而能有序、高效地参与应激反应。3 UTRs 的差别可能引起 hsp70 mRNAs 定位在不同亚细胞结构中,满足不同细胞的特定需要。hsp70 基因多拷贝现象在不同亚种的黑腹果蝇中广泛存在,一定程度上说明了在进化上的意义。果蝇中一个有趣的现象是,细胞或组织的生理特性似乎会影响应激下 Hsp 产生的代价/效益比例,这可能逼迫其进化产生了一套精细的调控机制来满足特定细胞对 Hsp70 的不同需求。

大量的实验表明, 应激下不同 hsp 基因的表达呈现了组织和发育阶段的特异性,在果蝇的发育遗传学研究中,人们常常利用 hsp 启动子来驱动报告基因或其他基因的表达,其中以 hsp70 启动子的应用最为广泛。

4 热休克反应的研究意义

由于热休克蛋白有着十分广阔、诱人的应用前景,

对热休克反应的研究有助于认识生物体耐热及抗不良生境、生理、生态的机制,有助于了解物种的种群分布,也有助于了解全球气候变化对自然界和农业的影响。大量研究表明,热休克反应与临床肿瘤治疗密切相关。

近年来治疗肿瘤常用高温和放射联合疗法。一次热疗后,肿瘤细胞内热休克蛋白水平升高,对热产生了短暂抵抗能力。下一次热疗前必须先测定肿瘤细胞内的 Hsps 含量,只有当细胞内的 Hsps 呈低水平表达时,肿瘤细胞才最易被摧毁。基于 Hsps 能增强细胞的抗热能力,研究者们正设法使热疗时正常细胞内 Hsps 水平升高,而使肿瘤细胞失去表达 Hsps 的能力,从而达到最有效的治疗。

当机体受到损伤时(如心血管堵塞),体内大量表达 Hsps 并释放到血液中,可通过测定血液里 Hsps 的含量,诊断受损伤程度。近年研究显示,随着机体的衰老和细胞的老化, Hsps 的表达能力降低。由于生理老化是以机体对环境应激的反映能力下降为标志,所以 Hsps 可能是引起机体衰老或细胞老化的一个重要因素。利用 Hsps 的细胞保护作用来提高器官的保存时间也是当今热休克反应研究的一个热点。

热休克反应还可以应用于发酵工业。发酵生产中的过份拥挤、过热或营养不良等因素都会造成细菌或酵母产生热休克反应,从而大大降低了产量。针对此,加拿大 CB 国际公司已经开始培养能产生较高水平 Hsps 的酵母株和其他菌株,使其能耐受上述不良条件。此外如利用转基因的方法增强 Hsps 的表达,使动、植物抵抗恶劣环境的能力提高,无疑会为农牧业生产带来巨大经济利益。随着热休克反应研究的不断深入,热休克蛋白的应用范围将更为广阔。

参考文献

- 1 Genevieve Morrow, Robert M. Tanguay. Heat shock proteins and aging in *Drosophila melanogaster*. *Seminars in Cell & Development Biology*, 2003, 14: 291—299.
- 2 S.C. Lakhota and K. V. Prasanth. Tissue and development specific induction and turnover of hsp70 transcripts from loci 87A and 87C after heat shock and during recovery in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology*, 2002, 205: 345—358.
- 3 Lakhota, S.C., Rajendra, T.K. and Prasanth K.V.. Developmental regulation and complex organization of the promoter of the non-coding hsr gene of *Drosophila melanogaster*. *J. Biosci*, 2001, 21: 25—38.
- 4 Prasanth K. V., Rajendra T.K., Lal, A.K. et al. Omega speckles a novel class of nuclear speckles containing hnRNPs associated with non-coding hsr-omega RNA in *Drosophila*. *J. Cell Sci*, 2000, 113: 3485—3497.
- 5 Lipshitz H.D. and Smibert C.A.. Mechanisms of RNA localization and translational regulation. *Curr. Opin. Genet*, 2000, 10: 476—488.
- 6 靳远祥, 陈玉银. 热休克蛋白的研究进展及其应用. *科技通报*, 2002, 18(2): 157—163.

(BH)