

猕猴神经系统器官蛋白水解酶 种类和性质研究*

李彦章 吉爱玲 夏 民 姬生栋 伍 雁 杨春玲 封青川 徐存拴

(河南师范大学生物系 新乡 453002)

摘 要 实验以太行山猕猴为材料,用活性电泳(G-PAGE)方法分析研究了神经系统中蛋白水解酶的种类、活性及pH依赖性,结果表明:(1)神经系统各部分均具有31、30、29ku三种酸性蛋白水解酶;(2)94ku的中性蛋白水解酶普遍存在于神经系统各器官中;(3)在中性和碱性条件下,坐骨神经中蛋白水解酶活性较强,其余部分活性微弱。

关键词 猕猴 神经系统 蛋白水解酶 活性电泳(G-PAGE)

蛋白质水解是细胞的重要代谢过程,这一代谢过程对生命是必不可少的,蛋白水解酶在蛋白质水解过程中起重要作用。生物的很多生理、病理过程均涉及到蛋白质降解。目前人们已认识到,细胞内蛋白降解在调节结构蛋白、功能蛋白和酶的水平,清除细胞内损伤的、衰老的蛋白质等方面具有重要意义。近几年研究发现,在生物应激反应中,蛋白水解酶活性有很大的变化,这表明它们可能与生物的应激反应、生物抗性的建立有密切关系^[1]。

生物体内蛋白水解酶,特别是溶酶体蛋白酶的研究已有很多报道^[2]。在神经系统中,蛋白水解酶与轴突的延伸、运动和再生有密切的关系^[3], Ca^{2+} 激活的中性蛋白酶在病理状态

下,如断离神经纤维脂肪变性(Wallerian degeneration),与神经元纤维的退化有关^[4]。太行山猕猴(*Macaca mulatta tcheliensis*)在进化上与人类有很近的亲缘关系,是研究人类生理、病理很好的实验材料,迄今为止,对太行山猕猴神经系统中蛋白水解酶的研究还很少。因此,阐明猕猴神经系统中蛋白水解酶的种类、性质和分布,对临床诊断、治疗人类的某些疾病,研究猕猴的分类以及其与人类的亲缘关系等有重要的参考价值。

* 国家自然科学基金资助课题(No. 39670372);

第一作者介绍:李彦章,男,33岁,讲师;

收稿日期:1998-05-12,修回日期:1998-12-10

本文采用活性电泳方法^[5]对太行山猕猴神经系统中蛋白水解酶的种类、分布和 pH 依赖性进行了系统的研究,现将结果报道如下:

1 材料与方方法

1.1 材料与药品

(1)材 料 由河南师范大学生物系猕猴饲养场提供的正常雄性成年太行山猕猴,实验用猕猴共 3 只。

(2)主要化学药品 丙烯酰胺 (Acrylamide, 日本进口分装), 对丙烯酰胺 (Bisacrylamide, Fluka 进口分装), N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (TEMED, Bio-Rad), 明胶 (Gelatin, Sigma), 曲拉通 (Triton X-100, Farco), 十二烷基硫酸钠 (SDS, Serva), 牛血清白蛋白 (BSA, Sigma), 三羟甲基氨基甲烷 (Tris-base, 上海巴斯氏生物公司), 标准分子量蛋白 (Serva), 考马斯亮蓝 R250 (Coomassie Brilliant blue R250, Fluka 进口分装)。

1.2 组织匀浆制备、蛋白浓度测定与活性电泳

(1)组织匀浆液制备 取猕猴神经系统大脑、小脑、中脑、脑桥、延髓、脊髓、坐骨神经、视神经各部分。匀浆, 4℃ 离心 (20 000 r/min, 5 min), 分装上清液, 保存于液氮中备用。

(2)蛋白质浓度测定 采用 Neuhoff 方法^[6]。

(3)活性电泳 (G-PAGE) 按徐存拴改良

的方法^[5]进行。电泳时电流不超过 10mA/板, 待前沿指示剂到达离胶板下缘 2cm 处时停止电泳, 切除前沿指示剂以下部分后, 将凝胶板放入洗涤液 (Triton X-100 12ml, Tris-base 3.03g, 加水至 500ml, pH6.5, 20℃) 洗涤 30 分钟, 每 5 分钟振荡一次, 洗涤后, 将胶板放入重蒸水中洗涤三次 (5 分钟/次), 然后将胶板置 37℃ 孵育液 (0.1mol/L Glycin, 5mmol/L CaCl₂, pH 值分别是: 3.5、5.9、7.0、10.5) 中, 24 小时后, 按 Laemmli 方法^[8]固定、染色、脱色至酶活性区域清晰透亮 (使用用过多次的旧脱色液脱色, 效果更佳)。使用不同 pH 值的孵育液处理胶板可以进行蛋白水解酶的 pH 依赖性检测。

2 结 果

2.1 pH3.5 时的结果 在 pH3.5 时 (见表 1、图 1), 大脑、小脑、中脑、脑桥、延髓、脊髓、坐骨神经、视神经中均检出 31、30、29 千道尔顿 (ku) 三条蛋白水解酶带, 这三条酶带普遍存在于神经系统各器官中。

表 1 神经系统各器官蛋白水解酶种类

pH 值	分子质量 (ku)	大脑	小脑	中脑	脑桥
pH3.5	31	+	+	+	+
	30	+	+	+	+
	29	+	+	+	+
pH5.9	94	+	+	+	+
	86	+			
pH7.0	94	+	+	+	+
	86	+			

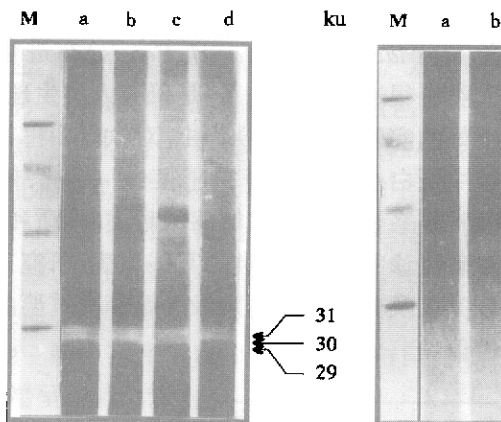


图 1 pH3.5 时, 神经系统的蛋白水解酶

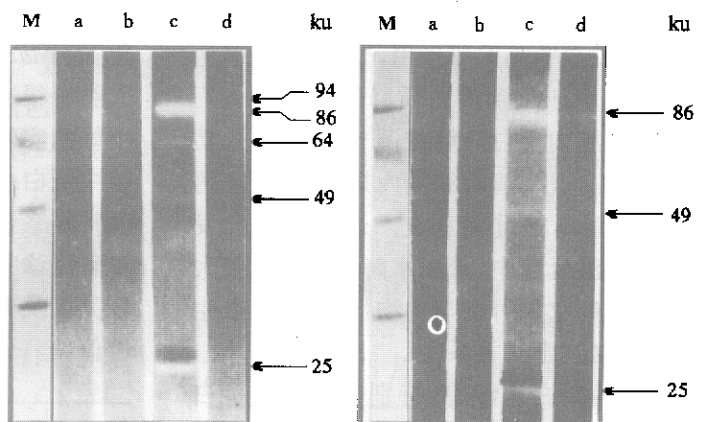


图 2 pH7.0 时, 神经系统的蛋白水解酶

图 3 pH10.5 时, 神经系统的蛋白水解酶

a. 延髓; b. 脊髓; c. 坐骨神经; d. 视神经

2.2 pH5.9 与 7.0 时的结果 在 pH5.9 和 7.0 时(见表 1、图 2), 大脑、小脑、中脑、脑桥、延髓、脊髓、视神经中均检出一条 94ku 酶带, 并在大脑、延髓和视神经中还检出一条 86ku 酶带。在坐骨神经中检出 94、86、64、49 和 25ku 五条酶带。其中, 94ku 的中性蛋白水解酶普遍存在于神经系统各器官中。中枢神经系统中, 蛋白水解酶种类较少, 活性也较弱, 而在周围神经系统中, 尤其是在坐骨神经中, 酶带较多, 活性也较强。

2.3 pH10.5 时的结果 在 pH10.5 时(见图 3), 仅在坐骨神经中检出 86、49 和 25ku 三条酶带。

3 讨论

本文所采用的活性电泳方法是一种专门显示蛋白水解酶的方法, 它的基本原理是: 聚丙烯酰胺凝胶里共聚有易被蛋白水解酶降解的明胶(如果用考马斯亮蓝 R250 染色, 整个胶板被染成蓝色)。在活性电泳过程中, SDS 与蛋白水解酶结合而使酶发生可逆变性, 电泳完毕后, 可用非离子去垢剂(如 Triton X-100)洗去与蛋白水解酶结合的 SDS, 凝胶板里的蛋白水解酶可恢复活性。因此凝胶板在孵育液里保温期间, 蛋白水解酶可把相应位置的明胶消化掉, 从而不能再被考马斯亮蓝 R250 着色而成为无色透亮区域。区域的位置可反映蛋白水解酶的相对分子量, 区域的大小和透光度代表酶活性的强弱。

分析结果表明: 神经系统中蛋白水解酶的种类较少, 活性也较弱, 尤其是中枢神经系统中大脑、中脑、小脑、脑桥、延髓和脊髓等部位。而在坐骨神经中, 检测到了两种活性较强的中性和碱性蛋白水解酶, 它们的分子量分别为 86ku 和 25ku。坐骨神经中蛋白水解酶活性较强, 符合蛋白水解酶与轴突的延伸、运动和再生有关的研究结果^[3]。

在神经系统中, 发现各部分组织器官均具有 31、30 和 29ku 三种酸性蛋白水解酶, 它们在中性和碱性条件下不表现活性, 在猕猴生殖、泌尿、免疫等系统中也有相同发现^[9], 这一结果

与文献报道的酸性溶酶体蛋白酶一致^[2], 故可认为这三种酶是酸性溶酶体蛋白酶, 并在猕猴各器官中普遍存在, 说明它们对器官执行生理功能的重要性。此外还发现, 94ku 的中性蛋白水解酶普遍存在于神经系统各器官中, 它在神经系统中的作用有待于进一步探讨。

通过对太行山猕猴神经系统蛋白水解酶的研究, 得到了一套较完整的蛋白水解酶分布及活性的基础数据, 对诊断治疗某些疾病有重要的临床实践意义, 还为研究神经系统的发育、分化、应激反应等奠定基础。

在蛋白水解酶复性的过程中, 孵育液的 pH 值和所含的化学成分可影响酶的活性, 可通过调节孵育液的化学成分, 如加入酶的特异性底物、活化因子或抑制因子等来进一步研究这些酶的种类、性质和功能。

参考文献

- 1 Neuhaus-Stemmetz, U., C-S. Xu, F. Fracella *et al.* Heat Shock Response and Cytotoxicity in C6 Rat Glioma Cells: Structure-Activity Relationship of Different Alcohols. *Molecular Pharmacology*, 1994, **45**:36~41
- 2 Teichert, U., B. Mechler, H. Muller, *et al.* Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**(27):16037~16045
- 3 Monard, D. Cell-Derived Proteases and Protease Inhibitors as Regulators of Neurite Outgrowth. *TINS*, 1988, **11**(12):541~544
- 4 Badalamente, M. A., L. C. Hurst, A. Stracher. Localization and Inhibition of Calcium-Activated Neutral Protease (CANP) in Primate Skeletal Muscle and Peripheral Nerve. *Experimental neurology*, 1987, **98**:357~369
- 5 Heussen, C., E. B. Dowdle. Electrophoretic Analysis of Plasminogen activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl Sulfate and Copolymerized Substrates. *Analytical Biochem.*, 1980, **102**(1):196~202
- 6 Neuhoff, V., K. Philipp, H. G. Zimmer *et al.* A simple, Versatile, Sensitive and Volume-Independent Method for Quantitative Protein Determination which is Independent of Other External Influences. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1979, **360**:1657~1670
- 7 Mohsenzadeh, S., C-S. Xu, F. Fracella *et al.* Heat Shock Inhibits and Activates Different Protein Degradation Path-

ways and Protomast Activities in *Neurospora crassa*
FEMS, 1994, 124:214 ~ 224

227:680 ~ 685

S. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins During the
Assembly of the Head of Bacteriophage T4 *Nature*, 1970,

9 古爱玲,赵晓进,李彦章等. 猕猴生殖、泌尿、免疫系统各
器官蛋白水解酶种类和性质 *解剖学报*, 1998, 29(2):
195 ~ 199

STUDY ON KINDS AND PROPERTIES OF PROTEOLYTIC ENZYMES IN NERVOUS SYSTEM OF *MACACA MULATTA TCHELIENSIS*

LI Yan-Zhang JI Ai-Ling XIA Min JI Sheng-Dong WU Yan

YANG Chun-Ling FENG Qing-Chuan XU Cun-Shuan

(Department of Biology, Henan Normal University Henan Xinxiang 453002, China)

ABSTRACT Types and pH-dependence of proteolytic enzyme in nervous system of normal monkey (*Macaca mulatta tcheliensis*) were studied with G-PAGE. The data suggest: (1) Three kinds of acidic proteolytic enzymes-31, 30 and 29kD all exist in nervous system. (2) The 94kD neutral proteolytic enzyme exists in all organs of nervous system. (3) On neutral or alkaline condition, only in sciatic nerve the activity of proteolytic enzyme is strong, others are quite weak.

KEY WORDS *Macaca mulatta tcheliensis* Nervous system Proteolytic enzymes G-PAGE