鼠肝组蛋白与尼古丁作用后的构象变化

吴小红 ④ 孙红芳 * 刘元方

(北京大学技术物理系, 北京 100871; ④北京大学考古系, 北京 100871. * 联系人)

摘要 采用紫外差谱、荧光光谱和圆二色性光谱法对鼠肝组蛋白 H1 和 H3 与尼古丁作用后的构象变化进行了体外研究. 结果表明, 随尼古丁作用剂量的增加其构象逐渐由有序向无序变化. 造成这种变化的原因, 可能是尼古丁或其代谢产物与组蛋白 H1, H3 发生加合. 因此推测, 尼古丁可以通过改变组蛋白的构象来影响染色体的结构、功能和基因表达.

关键词 尼古丁 组蛋白 分子构象 遗传毒性

尼古丁是烟草中最主要的生物碱, 是使吸烟成瘾的决定因子. 以往的动物诱癌实验证明尼古丁具有协同致癌作用[1], 但未发现其本身具有致癌作用[2]; 而尼古丁的亚硝化衍生物 NNK, NNN 等却是确定的器官专属性致癌物[3]. 另外有细胞实验结果显示[4], 高剂量的尼古丁会诱导 CHO 细胞染色体畸变率和姐妹染色单体交换频率显著提高, 表明尼古丁可能具有一定的遗传毒性. 最近用加速器质谱法研究发现[5,6], 尼古丁在小鼠体内与鼠肝 DNA 和鼠肝组蛋白 H1, H3 均发生加合, 而且所形成的加合物数量与投入剂量间存在着明确的正的剂量响应关系.

组蛋白是一类低分子量的富含精氨酸、赖氨酸和组氨酸的碱性蛋白. 在真核细胞中, 组蛋白 H2a, H2b, H3 和 H4 各两分子组成蛋白核心, 外面缠绕着 DNA 双螺旋构成核小体, 在两个核小体的两端分别有 10 bp DNA 与组蛋白 H1 结合. 许多研究工作已经表明[7], 这五种组蛋白对于维持染色体的结构和功能有重要作用, 而且组蛋白 H1 还是重要的基因调控因子. 因此当化学物质与组蛋白发生作用, 引起组蛋白构象变化时, 将直接影响染色体的结构, 进而影响 DNA 的复制、修复和转录活性.

为了进一步说明尼古丁的遗传毒性, 本工作采用紫外差谱、荧光光谱和圆二色性光谱法对鼠肝组蛋白 H1 和 H3 与尼古丁作用后的构象变化进行了体外研究. 为模拟体内代谢情况, 采用鼠肝微粒体作为混合功能氧化酶供体; 另外, 由于吸烟过程中或尼古丁进入体内后可能发生亚硝化, 我们在反应体系中也加入了亚硝化反应前体 NO_2^- 和 SCN^-.

1 材料与方法

( ) 鼠肝组蛋白 H1 和 H3 的提取. H1 的提取参照文献[8] 进行. H3 的提取在文献[9, 10] 方法的基础上稍作改进. 向提取 H1 后所剩的 $HClO_4$ 不溶物中加入 3 倍体积乙醇-1.25 mol/L HCl (4∶1, 体积比) 溶液, 冰浴下混合振荡 2 h. 8 000 × g, 4 ℃离心 20 min, 弃去沉淀. 所得溶液在无水乙醇中 2 ℃透析 22 h (透析袋截止分子量为 10 000), 更新乙醇 3 次. 透析后溶液于 12 000 × g, 4 ℃离心 20 min, 弃去溶液. 沉淀用乙醇洗 1 次, 丙酮洗 2 次, 溶于 1 mmol/L 2-巯基乙醇溶液, 冷冻干燥, 得到组蛋白 H3, 置– 20 ℃保存. 所得组蛋白 H1 和 H3 经蛋白含量分析, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 分子量测定及氨基酸组成分析, 证明达到了所要求的纯度.

( ) 鼠肝微粒体的提取参照文献[11] 进行.

( ) 鼠肝组蛋白 H1 和 H3 与尼古丁的体外反应及分离. 将 5 mL 尼古丁贮液 A(4 mmol/L 尼古丁, 8 mmo/L $NaNO_2$, 8 mmol/L NaSCN) 置 70 ℃恒温 6 h, 冷却后待用. 取 6 支反应器, 加入 10 mg 微粒体蛋白和 200 μg 组蛋白 H1 或 H3, 在 1.9 mL 反应液中 37 ℃恒温反应 60 min. 反应液中各组分的终浓度分别为: 100 mmol/L pH= 7.4 的磷酸缓冲液; 3.0 mmol/L $MgCl_2$; 1.0 mmol/L EDTA; 1.0 mmol/L NADPH; 5.0 mmol/L 葡萄糖-6-磷酸; 3.8 units/mL 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 尼古丁 0, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.60 mmol/L (由贮液 A 配制). 反应终了时向反应液中加入 0.1 mL 饱和硫酸铵的 2.5 mol/L H_2SO_4 溶液, 终止反应. 然后将上述反应液于 3 000 r/min 离心 10 min, 过 0.45 μm 滤膜除去微粒体蛋白. 滤液加入透析袋中, 4 ℃循环水透析 8 h, 除去小分子化合物.

( ) 组蛋白 H1, H3 构象变化的光谱分析. Folin-酚法测定透析后溶液中的蛋白含量, 用 pH= 7.0 的磷酸缓冲液调节至适当浓度, 分别进行紫外差谱、荧光光谱及圆二色性光谱研究. 所用仪器分别为: 岛津 UV-240 紫外分光光度计, 岛津 RF540 荧光光度计, JASCO J-700C CD 光谱仪.

2 结果与讨论

2.1 组蛋白 H1 与尼古丁作用后的构象变化

一般来讲, 190~ 220 nm 波长范围的紫外光谱显示的是蛋白质中肽基团的光吸收变化, 当蛋白质的构象发生变化时, 在这个吸收区就会有所反映. 例如, 蛋白质的 α-螺旋向无规卷曲变化时, 190~ 220 nm 内的吸收强度就会增加. 而由图 1 可见, 随尼古丁作用剂量的增加, 组蛋白 H1 在 190~ 220 nm 范围内的吸收强度逐渐增加. 表明尼古丁与组蛋白 H1 作用的结果, 可能使组蛋白 H1 分子构象逐渐由有序向无序变化. 这一构象变化也引起了组蛋白 H1 荧光发射光谱的变化. 图 2 中, 随尼古丁作用剂量的增加, 组蛋白 H1 的荧光发射光谱强度逐渐增强. 在组成蛋白质的多种氨基酸中, 只有含芳环的色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸具有荧光特性, 而组蛋白 H1 中不含色氨酸残基, 苯丙氨酸对荧光光谱的贡献又较小, 所以 H1 的荧光发射光谱主要来自酪氨酸. 当组蛋白 H1 的构象发生变化时, 可能导致酪氨酸的微环境发生变化, 极性降低, 从而荧光量子产率增加, 荧光光谱强度增大.

圆二色性(CD) 光谱也是研究蛋白质等生物大分子构象的有力手段. 一般来讲, 具有稳定的α-螺旋结构的蛋白质会在 200~ 230 nm 波段呈现出明显的双负峰. 由于组蛋白 H1 反应活性较强, α-螺旋结构相对不稳定, 因而当尼古丁作用浓度为 0 时(图 3 曲线 1), 组蛋白 H1 在 200 nm 左右有非常明显的负峰, 在 222 nm 附近的负峰相对较小, 表现出一种 α-螺旋结构与无规卷曲混合体的构象状态. 而随着尼古丁作用剂量的增加, α-螺旋特征负峰逐渐减弱, 至尼古丁浓度为 1.60 mmol/L 时几乎完全丧失. 这表明随着尼古丁与组蛋白 H1 作用剂量的增加, 组蛋白 H1 的二级结构已发生了彻底的破坏, 形成了一种完全无序的状态.

综合上述 3 种光谱方法的实验结果可知, 尼古丁与组蛋白 H1 在体外条件下作用后, 确实造成了组蛋白 H1 分子构象的变化, 使其由原来有序的结构向无序状态变化, 这种变化程度的大小与尼古丁的作用剂量有关. 另外, Wu 等人[6] 用加速器质谱法进行动物体内研究发现, 尼古丁经体内代谢活化后与鼠肝组蛋白H1发生加合, 其加合量随尼古丁摄取剂量的增加

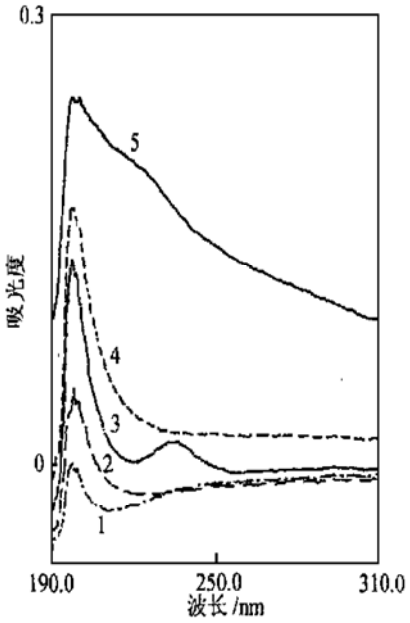


图 1 组蛋白 H1 与尼古丁作用后的紫外差谱

曲线 1~ 5 尼古丁反应浓度分别为 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.60 mmol/L; 组蛋白 H1 的测定浓度为 0.275 mmol/L平均氨基酸残基浓度, 尼古丁浓度为 0 的组蛋白 H1 溶液做参比

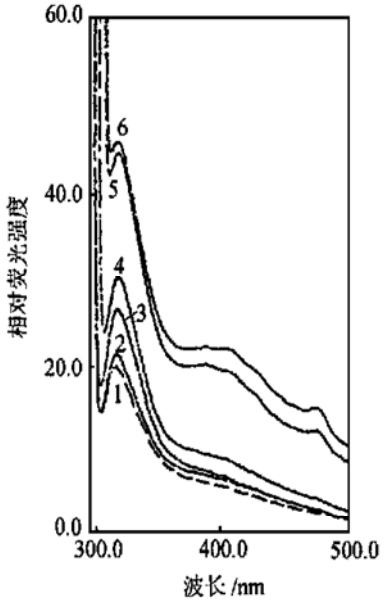


图 2 组蛋白 H1 与尼古丁作用后的荧光发射光谱

曲线 1~ 6 尼古丁浓度分别为: 0, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.60 mmol/L; 组蛋白 H1 的测定浓度为 90 μg/mL, 荧光激发波长为 280 nm

而线性增加. 因此我们认为, 尼古丁或其代谢产物与组蛋白 H1 发生加合是造成组蛋白 H1 构象变化的可能原因. 可以推测, 这种作用和所造成的构象变化将影响到组蛋白 H1 维持染色体超螺旋结构以及基因调控的功能.

2.2 与尼古丁作用后组蛋白 **H3** 的构象变化

从图 4 的紫外差谱结果看, 随尼古丁反应浓度的增加, 组蛋白 H3 的紫外差谱图呈现了两种不同规律的变化. 当尼古丁浓度为 0.10, 0.20 mmol/L 时, 随作用剂量的增加, 200 nm 附近的紫外吸收增加, 而当尼古丁反应浓度大于 0.4 mmol/L 后, 最大吸收峰移到 230 nm 附近, 并随尼古丁反应浓度的增加而增强. 在组蛋白 H3 的中间部分和 C-端区, 由于谷氨酸和丙氨酸等氨基酸的存在, 使得 C-端区易于形成 α-螺旋. 当组蛋白 H3 与尼古丁作用后, 可能首先造成 C-端区 α-螺旋结构的破坏, 从而表现出图 4 中曲线 1 和 2 的变化规律. 随着组蛋白 H3 与尼古丁反应程度的增加, 深藏于其分子内部的其他

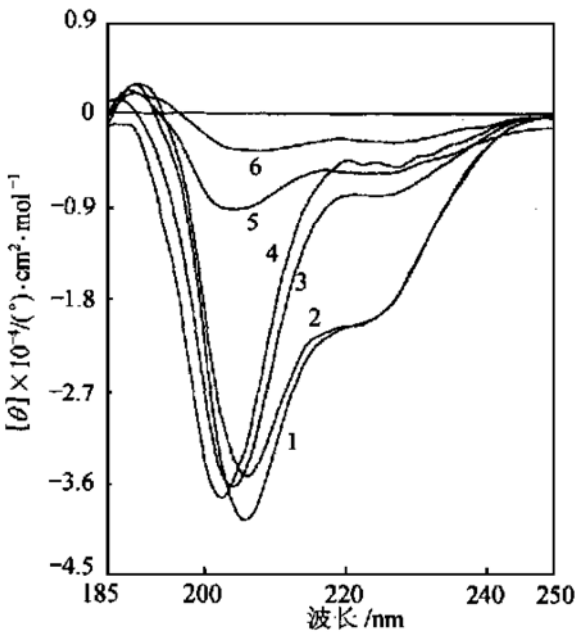


图 3 组蛋白 H1 与尼古丁作用后的 CD 光谱

曲线 1~ 6 尼古丁反应浓度分别为: 0, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.60 mmol/L; 组蛋白 H1 的测定浓度为 0.275 mmol/L 平均氨基酸残基浓度

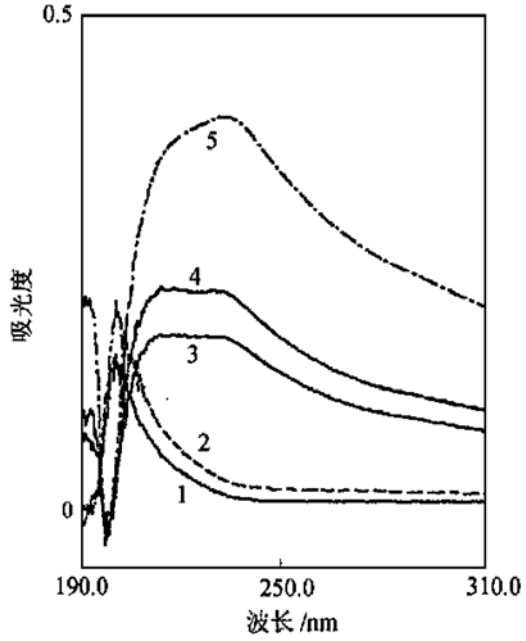


图 4　组蛋白 H3 与尼古丁作用后的紫外差谱
曲线 1～ 5 尼古丁反应浓度分别为: 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.60 mmol/L; 组蛋白 H3 的测定浓度为 0.275 mmol/L 氨基酸残基浓度, 尼古丁浓度为 0 的组蛋白 H3 溶液做参比

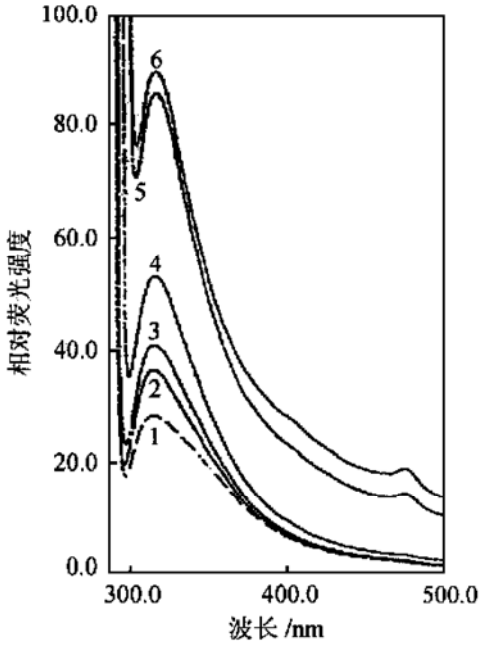


图 5　组蛋白 H3 与尼古丁作用后的荧光发射光谱
曲线 1～ 6 尼古丁的反应浓度分别为 0, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.60 mmol/L; 组蛋白 H3 的测定浓度为 90 μg/mL,
荧光激发波长为 280 nm

活性部位亦逐渐发生了反应, 从而引起 H3 分子构象上更大程度的变化, 表现出图 4 中曲线 3～ 5 的变化规律.

同组蛋白 H1 一样, 组蛋白 H3 分子中亦不含有色氨酸残基, 所以组蛋白 H3 的荧光也主要来自酪氨酸残基的贡献. 由图 5 可知, 随尼古丁反应浓度的增加, 组蛋白 H3 的荧光强度逐渐增强. 当尼古丁浓度达到 0.80 mmol/L 以上时, 组蛋白 H3 的最大荧光发射峰还发生了可观察到的蓝移. 这说明尼古丁与组蛋白 H3 的作用导致 H3 的构象发生了变化, 使酪氨酸的微环境由极性向非极性转变, 并且随作用量的增加而加剧.

对比图 3 和图 6 可看到, 组蛋白 H3 具有与 H1 不同的 CD 光谱特征和变化规律. 前面已提到, 组蛋白 H3 的 C-端区存在许多有利于形成 α-螺旋结构的氨基酸, 因而组蛋白 H3 具有相对稳定的α-螺旋结构. 图 6 中尼古丁浓度为 0 时的曲线 1 在 200～ 230 nm 区间的双负峰即为 α-螺旋结构的特征

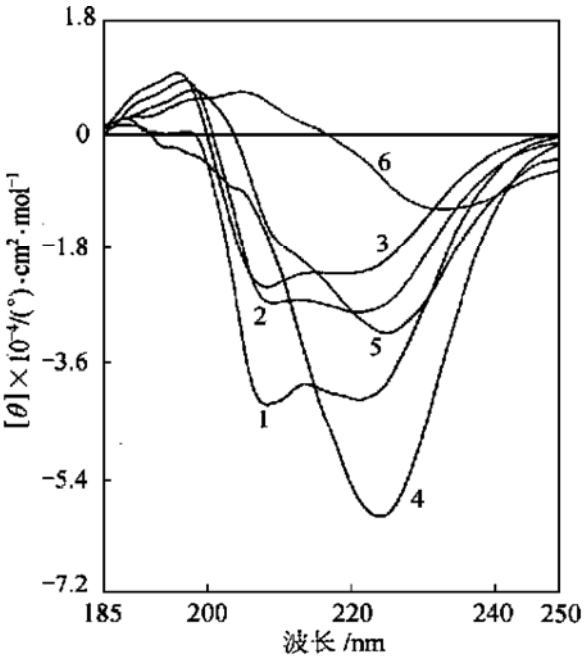


图 6　组蛋白 H3 与尼古丁作用后的 CD 光谱
曲线 1～ 6 尼古丁反应浓度分别为: 0, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.60mmol/L; 组蛋白H3的测定浓度为 0.275 mmol/L 平均氨基酸残基浓度

CD 光谱, 而随着尼古丁作用剂量的增加, α-螺旋的双负槽曲线逐渐减弱, 向无规卷曲演变. 当尼古丁反应浓度为 0.4 mmol/L 时, 组蛋白 H3 的 CD 光谱在 260 nm 处出现了一个很强的不对称吸收负槽, 通过计算可知, 此时组蛋白 H3 分子中无规卷曲结构占了大约 90%. 当尼古丁作用浓度进一步增大后, 组蛋白 H3 的二级结构变得更加无序, 直到最后二级结构彻底被破坏, 成为一种完全无序的状态.

由以上 3 种方法的光谱分析结果可知, 尼古丁与组蛋白 H3 作用后造成组蛋白 H3 分子构象的变化, 这一变化随作用剂量的增加而加剧. 并且以 0.4 mmol/L 尼古丁浓度为转折点, 呈现出两种变化规律. 这一趋势与我们以前报道[6]的用 AMS 法测得的体内加合结果相一致, 因此可以推测, 组蛋白 H3 的这种构象变化可能也是由于尼古丁或其代谢产物与组蛋白 H3 发生加合而引起的.

在序言中已经讲到, 组蛋白 H1 和 H3 是组成染色体的重要蛋白, 它们的二级结构的变化将影响到核小体结构的稳定, 进一步影响到染色体的结构和功能. 已有研究报道[4], 高剂量的尼古丁会造成中华仓鼠卵巢(CHO)细胞染色体畸变率和姐妹染色单体交换率的提高. 本工作即从组蛋白构象变化的角度说明了这一现象的可能本质. 因此从这个意义上讲, 尼古丁确实具有遗传毒性, 它不仅可以与 DNA 形成加合物, 影响遗传基因的表达, 还可以通过与 DNA 结合的组蛋白的作用影响染色体的结构和功能.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 19392100)、高等学校博士点专项科研基金资助项目.

参 考 文 献

1 Bock F G. Cocarcinogenic properities of nicotine. Banbury Report (CSH), 1980, 3: 129~ 139
2 Waldum H L, Nilsen O G, Quigley G J, et al. Long term effects of inhale nicotine. Life Sci, 1996, 58(16): 1339~ 1346
3 Hoffmann D, Brunnemann K D, Prokopczyk B, et al. Tobacco specific N-nitrosamines: chemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. J Toxicol Environ Health, 1994, 41: 1~ 52
4 Trivedi A H, Dave B J, Advaryu S G. Assessment of genotoxicity of nicotine employing in vitro mammalian test system. Cancer Lett, 1990, 54: 89~ 94
5 Li X S, Wang H F, Shi J Y, et al. Genotoxicity study on nicotine and nicotine-derived nitrosamine by accelerator mass spectrometry. Radiocarbon, 1996, 38(2): 347~ 353
6 Wu X H, Wang H F, Liu Y F, et al. Histone adduction with nicotine: a bio-AMS study. Radiocarbon, 1997, 39(2): 293~ 297
7 Grunstein M. Histones as regulators of genes. Sci Am, 1992, 267: 68~ 74B
8 Linder H, Helliger W, Puschendorf B. Separation of rat tissue histone H1 subtypes by reversephase HPLC. Biochem J, 1990, 269: 359~ 363
9 Johns E W. The preparation and characterization of histones. In: Phillips D M P ed. Histones and Nucleohistones. London-New York: Plenum Press, 1971. 10~ 15
10 Linder H, Helliger W. Effects of eluent composition, ion-pair reagent and temperature on the separation of histones by HPLC. Chromatography, 1990, 30: 518~ 522
11 Easom R A, Zammit V A. Diurnal changes in the fraction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in the active form in rat liver microsomal fractions. Biochem J, 1984, 220: 739~ 745

(1999-05-12 收稿, 1999-08-18 收修改稿)