

热休克诱导表达的 HSP70 对 X 射线诱发 淋巴细胞凋亡的影响

李义杰 洪承皎 张保国

(苏州大学放射医学与公共卫生学院 江苏省放射医学与防护重点实验室 苏州 215123)

摘要 Ficoll 法分离大鼠外周血淋巴细胞, 于 42 °C、5 % CO₂ 培养箱中热休克处理 90 min, 采用流式细胞仪检测热休克预处理后恢复不同时间的淋巴细胞中 HSP70 的表达情况; 采用流式细胞术 Annexin V/PI 双标法检测经过热休克预处理的淋巴细胞经 0.5 Gy、1.0 Gy、1.5 Gy、2.0 Gy、2.5 Gy、3.0 Gy X 射线辐照后细胞凋亡率的变化。以探讨热休克预处理后淋巴细胞中 HSP70 的表达情况和 HSP70 对 X 射线辐照后淋巴细胞凋亡率的影响。结果显示: 1. 淋巴细胞经热休克预处理后恢复 1 h, HSP70 表达即有明显增加, 4 h 达到高峰, 可持续表达 24 h。2. 热休克预处理诱导表达的 HSP70 可以抵抗 X 射线 (1.0~3.0 Gy) 诱导的淋巴细胞凋亡。由此本工作可以得出结论, 热休克预处理表达的 HSP70 可抵抗 X 射线诱发的淋巴细胞凋亡。

关键词 热休克蛋白 70, 辐照, 流式细胞术, 细胞凋亡

中图分类号 R811, R 811.5

热休克蛋白 (Heat shock proteins, HSPs) 是一类保守的细胞内源性保护蛋白, 可以在许多不利的情况下被刺激表达, 它的生理作用就是保护细胞, 参与细胞损伤的修复。根据分子量大小, 主要分为四个家族: HSP90 家族 (83~90 KD)、HSP70 (66~78 KD) 家族、HSP60 家族及小分子 HSP 家族 (15~30KD), 此外还有分子量在 100~110 KD 的大分子 HSPs。其中, HSP70 是最保守的一类, 在应激条件下表达量增加最为显著, 也是目前研究最为深入的热休克蛋白。平时 HSP70 表达量很低, 但在细胞遇到环境因素刺激时, 它的变化主要表现在两个方面, 第一是表达量快速增加, 第二是从细胞质进入细胞核和线粒体, 并与其中的蛋白质结合, 防止刺激因素引起蛋白质的构象发生变化, 并帮助已发生变化的蛋白质恢复到正常状态, 从而发挥保护细胞的作用。已有的研究表明, HSP70 可以减少细胞凋亡, 但诱导凋亡的刺激因素大多使用缺血, 缺氧, 氧化损伤等, 以电离辐射作为引起细胞凋亡的刺激因素的报道并不多见, 且已有的报道使用的细胞多为肿瘤细胞系。本实验以正常的淋巴细胞为研究对象, 利用热休克预处理诱导 HSP70 高表达, 研究 HSP70 对 X 射线引起的细胞凋亡的影响, 探讨

HSP70 对细胞的保护效应。

1 材料与方法

1.1 实验材料及照射条件

1.1.1 细胞来源及细胞培养 雄性 Wistar 大鼠 (苏州大学动物实验中心提供), 体重 (130±5)g。无菌环境下, 由大鼠腹主动脉采血, Ficoll 法^[1]分离大鼠外周血中的淋巴细胞。在含 20 % 小牛血清、100 μg/mL PHA、100U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基中, 于 38 °C、5 % CO₂ 培养箱中培养^[2]。

1.1.2 主要试剂和仪器 淋巴细胞分离液购自上海精华生物高科技公司; PHA 购自广州市医药工业研究所; 第一抗体: 小鼠单克隆 HSP70 抗体 (Santa Cruz, sc-24), 购自北京中杉金桥; 第二抗体: 羊抗小鼠 IgG-FITC 购自武汉博士德; 凋亡试剂盒 (Molecular Probes) 购自联科生物; 流式细胞仪 (BECKMAN COULTER FC500)。

1.1.3 照射条件 X 射线照射实验使用医用高能直线加速器 (SIEMENS PRIMUS) 照射电子束能量为 6-MV, 剂量率为 200 cGy/min, 源轴距 100 cm。

国家自然科学基金 (10275083) 资助

第一作者: 李义杰, 男, 1979 年 12 月出生, 2002 年毕业于山西医科大学大同学院临床医学专业, 现为苏州大学放射医学专业在读硕士研究生

通讯联系人: 张保国

收稿日期: 初稿 2008-10-17, 修回 2008-12-05

1.2 实验方法

1.2.1 流式细胞仪检测热处理后淋巴细胞中 HSP70 的表达 将细胞分为空白组, 阴性对照组, 热处理组。空白组置于 38 °C、5 % CO₂ 培养箱中不做热休克预处理。阴性对照组, 热休克预处理组于 42 °C、5 % CO₂ 培养箱中热休克预处理 90 min 后, 取出置于 38 °C、5 % CO₂ 培养箱中分别恢复培养 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、24 h。分别收集各组淋巴细胞 PBS 洗 2 次; 加 75 % 的冰乙醇 1 mL, -20 °C 条件下固定破膜 12 h; PBS 洗 2 次; 加 2 % BSA 1 mL, 室温 30 min 封闭非特异性位点; 空白组, 热休克预处理组加第一抗体 1 μL/10⁶ (1:100), 阴性对照组用 PBS 代替第一抗体, 4 °C 条件下处理 12 h; PBS 洗 2 次; 加第二抗体 20 μL/10⁶ (1:32) 室温避光处理 2 h; PBS 洗两次; 调整细胞浓度为 10⁶/mL, 400 μL 样品上机检测。

1.2.2 流式细胞术 Annexin V/PI 双标法检测细胞凋亡 将细胞分为空白组, 热休克预处理组, 照射组, 热休克预处理+照射组。热休克预处理组, 热休克预处理+照射组于 42 °C、5 % CO₂ 培养箱中热休克预处理 90 min 后, 取出置于 38 °C、5 % CO₂ 培养箱中, 恢复培养 3 h、6 h、10 h, 照射组和热休克预处理+照射

组分别给予 0.5 Gy、1.0 Gy、1.5 Gy、2.0 Gy、2.5 Gy、3.0 Gy 剂量的 X 线照射。24 h 后收集细胞, PBS 洗 2 次, 用 1×annexin-binding buffer 悬浮细胞, 计数并调整细胞浓度为 10⁵/mL, 取 100 μL 细胞悬液, 分别加入 5 μL Alexa Fluor 488 annexin V 和 1 μL 浓度为 100 μg/mL 的 PI 染液, 避光 15 min 后加入 400 μL 1×annexin-binding buffer, 流式细胞仪检测凋亡。

1.3 统计方法

所有实验数据采用 SAS 8.0 统计软件处理, 数值以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 组间比较采用 *t* 检验。

2 试验结果

2.1 淋巴细胞热休克预处理后 HSP70 的表达情况

流式细胞术检测热休克预处理后淋巴细胞中 HSP70 的表达时, 每个样本分析 1×10⁴ 细胞, 流式细胞图谱如图 1 所示, 与 A 相比 B,C,D,E,F,G,H 的峰明显右移, 定性的说明热休克预处理后 HSP70 的表达增加。

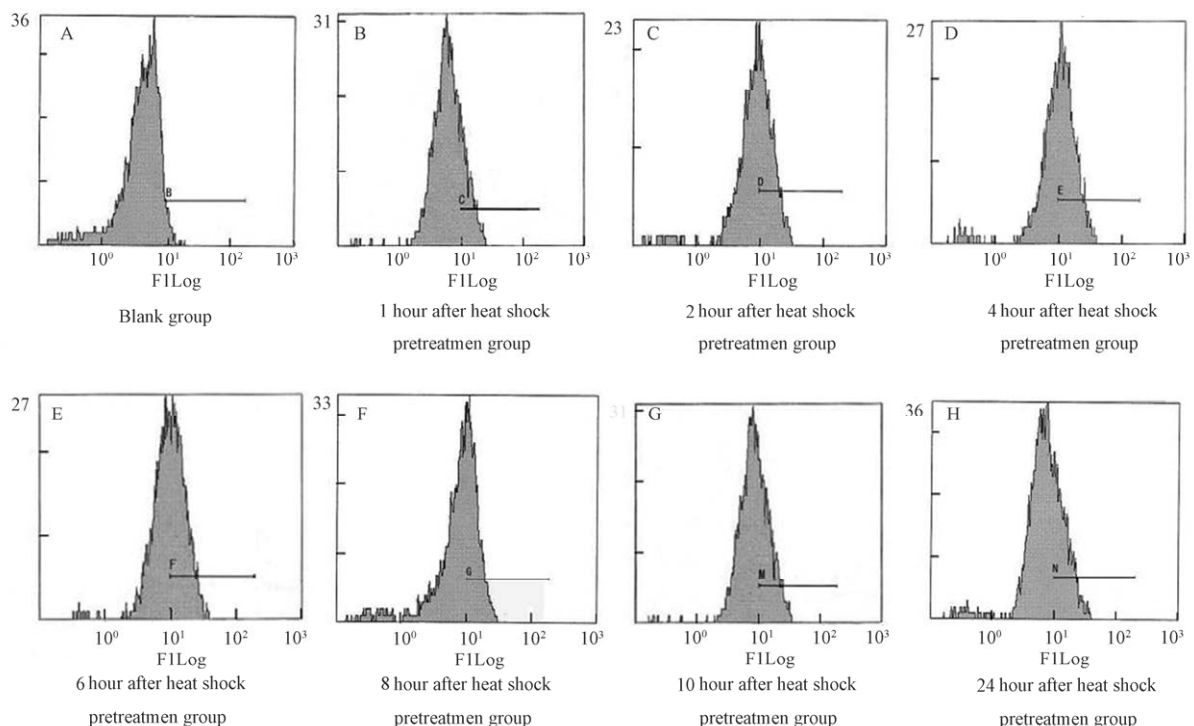


Fig.1 Flow cytometry image of HSP70 expression with different recover time after shock pretreatment

这里以阳性细胞率与平均荧光强度乘积为实验指标, 反应表达 HSP70 的阳性细胞总的荧光含量, 间接提示淋巴细胞热休克预处理后恢复时间与

HSP70 含量的关系。从表 1 可以看出, 热休克预处理后 1 h HSP70 开始表达, 4 h 达到最大值, 可持续表达 24 h。

Table 1 Expression of HSP70 in lymphocyte with different recover time after heat shock pretreatment (n=5)

Recover time after heat shock pretreatment / h	Positive cell rate	Average rate of fluorescence intensity	Positive cell rate×Average rate of fluorescence intensity
Blank group	0.08±0.02	5.19±0.98	1.59±0.48
1	0.48±0.02	15.28±1.73	7.26±0.90 ⁽¹⁾
2	0.47±0.02	31.17±1.36	14.49±1.02 ⁽¹⁾
4	0.55±0.05	33.68±5.22	18.82±4.91 ⁽¹⁾
6	0.52±0.02	31.12±0.57	16.05±0.90 ⁽¹⁾
8	0.49±0.01	33.32±1.32	16.36±0.66 ⁽¹⁾
10	0.50±0.04	32.40±3.20	16.33±2.93 ⁽¹⁾
24	0.43±0.04	28.17±0.95	11.51±1.04 ⁽¹⁾

Note: Background (negative control) is subtracted in all above data, Compared with blank, ⁽¹⁾ $p < 0.01$

2.2 热诱导表达的 HSP70 对淋巴细胞凋亡的影响

在确定热休克预处理诱导表达的 HSP70 是否对 X 射线引起的细胞凋亡有保护效应时, 首先要确定 42 °C, 90 min 的热处理是否会增加细胞的凋亡。Gordon 等^[3]对小鼠胸腺细胞和外周 T 淋巴细胞进行 43 °C, 1 h 的热休克处理, 结果显示热休克预处理细胞的凋亡率较未做处理的对照组有所增加说明该

条件的热处理对细胞造成损伤; 王枫等^[4]对大鼠前体血细胞进行 41 °C, 2 h 的预处理, 结果显示热休克预处理不影响细胞凋亡。考虑到热休克处理的条件既要能有效诱导热休克蛋白的表达又不对细胞造成损伤, 因此本实验采用 42 °C, 90 min 热休克预处理诱导 HSP70 高表达。从表 2 可见 42 °C, 90 min 的热休克预处理对细胞凋亡没有影响 ($p < 0.01$)。这与肖献忠等^[5]的研究结果一致。

Table 2 Effect of heat shock pretreatment under 42°C, 90min to lymphocyte apoptosis rate (n=3)

Recover time after heat shock pretreatment / h	Blank group	Heat shock pretreatment group
3	9.51±0.44	10.23±0.15 ⁽¹⁾
6	9.86±0.43	9.99±0.32 ⁽¹⁾
10	9.68±0.26	10.51±0.48 ⁽¹⁾

Note: Compared with irradiation group, ⁽¹⁾ $p > 0.05$

虽然 42 °C, 90 min 的热休克预处理后 1 h HSP70 开始明显表达, 但考虑到 HSP70 对细胞凋亡的抑制需要一定的响应时间, 因此以热休克预处理后 3 h、6 h、10 h 为时间点检测热休克诱导表达的 HSP70 对细胞凋亡是否有保护效应。从表 3 可见: 热休克预处理后 3 h 对淋巴细胞进行 X 线照射, 照射组和热休克预处理+照射组细胞凋亡率无统计学意义 ($p > 0.05$), 在热休克预处理后 6 h 或 10 h 对

淋巴细胞进行 X 线照射照射剂量在 1.0~3.0 Gy 之间热休克预处理+照射组的淋巴细胞凋亡率与照射组细胞凋亡率比较有统计学意义 ($p < 0.05$); 照射剂量为 0.5 Gy 时照射组和热休克预处理+照射组的细胞凋亡率无统计学意义 ($p > 0.05$)。说明热休克预处理 6 h 或 10 h 后诱导表达 HSP70 可以抵抗 X 射线诱导的细胞凋亡。

Table 3 Rate of lymphocyte apoptosis lead by X-ray irradiation 3, 6, 10 h after heat shock pretreatment (n=3)

Irradiation Dose / Gy	Irradiation group			Heat shock pretreatment + Irradiation group		
	3 h	6 h	10 h	3 h	6 h	10 h
0	9.51±0.44	9.86±0.43	9.68±0.26	9.99±0.32 ⁽¹⁾	11.86±0.22 ⁽¹⁾	0.51±0.48 ⁽¹⁾
0.5	13.25±0.40	13.72±0.23	13.10±0.46	12.67±0.27 ⁽¹⁾	13.37±0.33 ⁽¹⁾	12.08±0.57 ⁽¹⁾
1.0	22.90±0.49	21.44±1.64	21.34±0.49	20.65±0.87 ⁽¹⁾	17.91±1.64 ⁽²⁾	16.06±0.31 ⁽²⁾
1.5	24.97±0.52	25.99±0.82	23.73±0.57	23.87±1.80 ⁽¹⁾	20.61±1.88 ⁽²⁾	19.18±0.79 ⁽²⁾
2.0	29.78±0.30	29.26±0.74	27.64±1.21	28.99±1.13 ⁽¹⁾	24.31±0.38 ⁽²⁾	22.68±0.95 ⁽²⁾
2.5	37.46±0.78	36.97±0.66	35.83±0.79	37.49±0.52 ⁽¹⁾	34.41±0.67 ⁽²⁾	31.10±1.26 ⁽²⁾
3.0	51.74±1.43	52.14±0.51	50.98±1.02	51.81±1.25 ⁽²⁾	49.57±0.24 ⁽²⁾	48.24±1.26 ⁽²⁾

Note: Compared with irradiation group, ⁽¹⁾ $p>0.05$, ⁽²⁾ $p<0.05$

3 讨论

HSPs 是一种重要的抗凋亡蛋白,已有的研究结果表明^[6,7]: HSPs 可以抑制线粒体通路介导的细胞凋亡,即可以抑制促凋亡因子(细胞色素 C、凋亡诱导因子 AIF 等)从线粒体释放;同时, HSPs 还可以抑制死亡受体通路介导的细胞凋亡,阻断 Daxx 与 ASK1 的作用而抑制 Fas 受体诱导的凋亡, Hsp70 可以抑制 JNK 活性阻止 JNK/SAPK 途径诱导的凋亡等等。目前关于热休克蛋白对细胞保护作用的研究,基本上以高温,重金属,缺氧,氧化剂等对细胞实施损伤,然后观察其保护作用的,对以电离辐射作为细胞损伤模型来研究保护效应的报道并不多。有研究认为^[8],热休克蛋白能够对电离辐射造成的损伤起到保护效应。Gordon 等^[3]对小鼠胸腺细胞和外周 T 淋巴细胞进行 43 °C, 1h 的热休克预处理诱导 HSP70 的表达,发现其可以显著减少由 γ 射线(1~5 Gy)照射引起的细胞凋亡,而在电离辐射后 4 h 内做同样的热休克预处理或用亚砷酸钠取代热处理也能起到类似的保护作用;进一步研究发现,这种保护效应是通过下调 p53 基因和 bax 基因的表达来实现的。王枫等^[4]在研究诱导 HSP70 高表达对射线引起的前体血细胞凋亡的保护作用时,用前体血细胞分别在 41 °C 温浴 2h 和加入砷酸钠诱导 HSP70,然后用 10Gy 的 γ 射线辐照。对照组前体血细胞则只是射线辐照而不预热,并用 HSP70 反义寡核苷酸链抑制 HSP70 的合成。结果表明预热和砷酸钠都可以诱导前体血细胞 HSP70 高表达,高表达的 HSP70 可以明显减少辐射诱发的细胞凋亡。Park 等^[9]发现,将诱导型的 HSP70 转染到辐射诱发的纤维肉瘤细

胞和小鼠 NIH3T3 细胞中均使其获得了辐射抗性,提示诱导型 HSP70 与细胞辐射适应性反应有关。但也有研究认为,热休克蛋白对电离辐射造成的损伤没有保护效应。Buzzard 等^[10]诱导小鼠胚胎纤维母细胞表达 HSP72,发现 HSP72 对 γ 射线辐射(5~20 Gy)诱导凋亡的抑制作用不明显。说明热休克蛋白对细胞凋亡的保护作用也不是无限的,推测如果照射剂量过大,超过了 HSP70 的保护能力就会导致细胞凋亡;也有可能是热休克蛋白的保护效应存在一定的细胞差异。

研究表明,42 °C、90 min 的热休克预处理可以诱导淋巴细胞过表达 HSP70,热休克预处理后 1 h HSP70 明显过表达,4 h 后达到高峰,至少持续 24 h;当照射剂量在 1.0~3 Gy 时,淋巴细胞热休克预处理后恢复 6 h 或 10 h,可以明显提高淋巴细胞的抗辐射凋亡。而恢复 3 h 则没有明显的保护效应。这说明 HSP70 不是直接抗辐射凋亡,而是通过激活其他信号通路起作用,而 HSP70 激活这些通路需要一定时间。因此认为:HSP70 的过表达能够在一定程度上起到降低 X 射线诱发的淋巴细胞凋亡,从而达到保护细胞的目的。热休克蛋白抑制辐射诱发细胞凋亡的具体机理目前还不清楚,还需要进一步的研究和论证。同时诱导 HSP70 表达的最合适的处理条件,恢复时间等也还有待进一步研究。

参考文献

- 1 杨吉成,宋礼华,周建华,等. 医用细胞工程. 上海: 上海交通大学出版社, 2001. 61-62
YANG Jicheng, SONG Lihua, ZHOU Jianhua, et al. Medical cell project. Shanghai: Shanghai Communication University Publishing House, 2001. 61-62

- 2 徐永忠, 劳勤华, 赵经涌. 苏州医学院学报, 1998, **18**(1): 6-8
XU Yngzhong, LAO Qinhu, ZHAO Jingsong. J Suzhou Medical School, 1998, **18**(1): 6-8
- 3 Gordon S A, Hoffman R A, Simmons R, *et al.* Archives of Surgery, 1997, **132**(12): 1277-1282
- 4 王枫, 张文斌, 于芳, 等. 职业与健康, 2004, **20**(12): 17-19
WANG Feng, ZHANG Wenbin, YU Fang, *et al.* Occupation and Health, 2004, **20**(12): 17-19
- 5 肖献忠, 王燕如, 刘冬梅, 等. 中国病理生理学杂志, 1997, **13**(1): 65-69
XIAO Xianzhong, WANG Yanru, LIU Dongmei, *et al.* Chin J Pathophysiol, 1997, **13**(1): 65-69
- 6 Beere H M. Journal of Cell Science, 2004, **11**(7): 2641-2651
- 7 Sreedhar A S, Csermelv P. Pharmacology and Therapeutics, 2004, **10**(1): 227-257
- 8 Carette J, Lehnert S, Chow T Y. Int J Radiat Biol, 2002, **78**(3): 183-190
- 9 Park S H, Lee S J, Chung, H Y, *et al.* Radiation Research, 2000, **153**(3): 318-326
- 10 Buzzard K A, Giaccia A J, Killender M, *et al.* J Biol Chem, 1998, **273**(27): 17147-17153

Effect of HSP70 induced by heat shock on lymphocyte apoptosis lead by X-ray

LI Yijie HONG Chengjiao ZHANG Baoguo

(School of Radiation Medicine and Public Health of Soochow University, The Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection of Jiangsu Province, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT In this paper the Ficoll method was used to isolate peripheral blood lymphocyte of rats, and then the isolated lymphocytes were treated by heat shock for 90 min under 42 °C and 5 % CO₂. Flow cytometer was applied to detect the expression of HSP70 after heat shock treatment at different revival time. Flow cytometry Annexin V/PI was utilized to measure the apoptosis rate of lymphocytes which were already pretreated by heat shock and irradiated under 0.5 Gy, 1.0 Gy, 1.5 Gy, 2.0 Gy, 2.5 Gy, 3.0 Gy X-ray. The expression of HSP70 after heat shock treatment and the influence of HSP70 to the apoptosis rate of lymphocytes irradiated under different doses has been investigated. The results show that the expression of HSP70 in lymphocytes increases obviously at 1h and reaches the maximum at 4 h after heat shock treatment, and can maintains in 24 h. The expression of HSP70 induced by heat shock pretreatment can counteract lymphocyte apoptosis produced in irradiation by X-ray (1.0~3.0 Gy). So the irradiation by X-ray is a useful method to confirm counteraction of lymphocyte apoptosis by HSP70.

KEYWORDS Heat shock protein 70, Irradiation, Flow cytometer, Apoptosis

CLC R811, R 811.5