

HSP70 高表达保护低氧诱导的大鼠海马 DG 区神经细胞凋亡 *

罗 芳¹ 徐 强² 董大海² 徐 文^{1△} 高 琨¹ 高丽莉¹ 侯顺利¹ 左 晶¹ 刘 红¹
闫 文¹ 杨银书¹ 卢 娟¹

(1 兰州军区疾病预防控制中心 甘肃 兰州 730020 2 兰州市中医医院 甘肃 兰州 730000)

摘要 目的:研究诱导 HSP70 高表达对低氧引起的大鼠海马 DG 区神经细胞凋亡的保护作用。方法:大鼠海马 DG 区神经细胞分别在 41℃ 温浴 2h 和加入砷酸钠诱导 HSP70 高表达。对照低氧而不预热,并用 HSP70 反义寡核苷酸链抑制 HSP70 合成,观察 HSP70 与低氧大鼠海马 DG 区神经细胞凋亡的关系。DNA 碎片法检测细胞凋亡,Western Blotting 检测 HSP70。结果:预热和砷酸钠都可以诱导细胞 HSP70 高表达,HSP70 高表达可以明显减少低氧诱导的细胞凋亡。在预热前导入 HSP70 反义核酸,可以降低 HSP70 抑制细胞凋亡的作用。结论:HSP70 高表达可以保护细胞由于低氧引起的细胞凋亡。

关键词 热休克蛋白 70;低氧;细胞凋亡

中图分类号 Q95-3 R818.74 R14 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2012)01-27-03

HSP70 Over Expression Protected Neurocyte in the Area of Dentate Gyrus (DG) of Rat's Hippocampus From Hypoxia-Induced Apoptosis*

LUO Fang¹, XU Qiang², DONG Da-ha², XU Wen^{1△}, GAO Kun¹, Gao Li-li¹, HOU Shun-li¹, ZUO Jing¹,LIU Hong¹, YAN Wen¹, YANG Yin-shu¹, LU Juan¹

(1 The Centre of Disease Prevention and Control of Lanzhou Military Command of Chinese PLA.Lanzhou 730020, China;

2 Chinese Medicine Hospital of Lanzhou, Lanzhou 730020, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of the over expression of HSP70 on neurocyte in the area of dentate gyrus (DG) of rat's hippocampus in hypoxia-induced apoptosis. **Methods:** Cells were either heated in 41℃ water for 2 hours or affected with 10μmol/L sodium arsenite for 18h to induced the over expression of HSP70. While the control cells are added HSP70 antisense oligomer which reduced the HSP70 expression or not induced before the cells heated. Then the cells were incubated in hypoxia. Fragmentation of DNA was quantities, and HSP70 was analyzed at various times by the Western blot. **Results:** Both heat and sodium arsenite can induce the over expression of HSP70, which can significantly decreased hypoxia-induced apoptosis. Introduction of the HSP70 antisense oligomer prior to heating reserved the protective effect of HSP70. **Conclusions:** The over expression of HSP70 can protect the pre-blood cells from radiation-induced apoptosis.

Key words: HSP70; Radiation; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R818.74, R14 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)01-27-03

前言

人脑正常氧耗量为 3.3-3.8ml/100g 组织 /min,约为全身氧耗量的 1/5^[1]。在急性缺氧时,对神经系统的影响是首要的,可使大脑皮层兴奋和抑制过程功能失调^[2]。平原人初进高原后,当动脉血氧饱和度减少到 85%以下时,部分人可出现抽搐、意识障碍或模糊,甚至昏迷^[3]。

HSP70 作为一种分子伴侣,可以在许多不利的情况下被刺激,它的生理作用就是保护细胞^[4]。正常情况下它的表达量很低,但是当细胞遇到环境因素应激时,它的变化表现在两个方面,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,与那里的蛋白质结合防止应激因素引起蛋白质的构象发

生变化并帮助已发生构象变化的蛋白质恢复到正常状态^[5]。许多研究证明,HSP70 可以保护外界不良刺激引起的细胞损伤^[6]。

低氧,尤其是急性低氧,由于代谢失调,能量供给障碍将对脑、体功能产生显著影响,将出现头痛、头晕、嗜睡、神经精神行为异常外,体力活动能力和作业能力明显降低,记忆、推理能力以及警觉性显著下降^[7]。由于脑组织具有耗氧量大、代谢率高、氧和 ATP 储备少,对低氧耐受性差的特点,是机体对低氧敏感的组织^[8]。低氧引起细胞损伤的主要机理包括染色体断裂、转座、倒置,还有 DNA 单链或双链断裂或修复中碱基错配。低氧还可以通过过氧化间接损伤 DNA^[9]。HSP70 是一种细胞保护蛋白,在许多外来损伤时 HSP70 表达都会增加,例如重金属暴露、失血、外伤、高热、氧化损伤等。研究发现,HSP70 诱导可以

* 基金项目:全军重点基金课题(G-867)

作者简介:罗芳(1967-),女,主治医师,主要从事特殊作业环境因素对机体的影响与防护研究。

电话:13919760596 E-mail: xuwen1166@sohu.com

△通讯作者:徐文,博士,研究员 E-mail: xuwen1166@sohu.com

(收稿日期:2011-06-10 接受日期:2011-07-05)

抑制内皮细胞坏死^[10]。缺血再灌注后 ,HSP70 被诱导可以使心肌耐受更长时间的缺血。在以前就描述过可诱导的应激蛋白家族例如 HSP70 可以保护细胞并抑制各种应激原引起的细胞凋亡。但是有关低氧引起细胞凋亡的报道并不多见 ,而且许多报道使用的细胞多为肿瘤细胞系^[11]。本研究以正常前体血细胞为研究对象,研究了 HSP70 诱导高表达对低氧引起的细胞凋亡的保护作用。

1 材料和方法

1.1 细胞制备

在显微镜下操作 ,找到海马的 DG 区并取材^[12]。吸管吹打机械分离 ,细胞洗 3 次 ,制作单细胞悬液 ,悬浮密度为每毫升 5×10^6 。

1.2 细胞处理与分组

接种 ,于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 ,常氧培养 24 h 后换无血清培养基 ,低氧(2% O₂)培养 24h。细胞共分为正常对照组、低氧对照组、温浴 + 低氧组、砷酸钠 + 低氧组、反义寡核苷酸 + 温浴 + 低氧对照组共 5 组。细胞按 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 。

1.3 HSP70 的诱导

取培养的细胞在 41℃ 热水中温浴 ,或者在培养液中加入 10umol/L 砷酸钠作用 18 小时。在温浴的不同时间检测 HSP70 表达情况 ,取温浴 2 小时的细胞进行低氧处理。

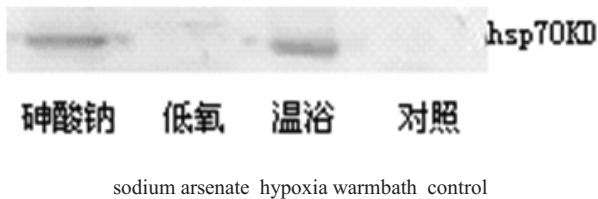


图 1 不同因素对细胞 HSP70 的表达
Fig.1 HSP70 in different factors

2.2 预热对低氧引起的细胞凋亡的影响

由表 1 可见 ,单纯低氧组细胞凋亡率很高 ,达 90.4% ,温浴可以增加细胞凋亡的数量 ,但是温浴后细胞再进行低氧则与不

1.4 DNA 碎片分析

DNA 碎片量可以反映细胞凋亡的程度。根据文献进行^[13]。
 $\text{DNA 碎片量} = \frac{\text{上清中 DNA 含量}}{(\text{上清中 DNA 含量} + \text{沉淀中 DNA 含量})}$

1.5 HSP70 反义寡核苷酸

HSP70 反义寡核苷酸由华美生物工程有限公司合成 ,其序列为 15 个碱基 CGTGTTCTTGGCCAT ,根据大鼠 HSP70mRNA 序列 ,其中含有 HSP70mRNA 配对序列。加入 60 $\mu\text{mol/L}$ HSP70 反义寡核苷酸到培养细胞中。

1.6 WESTERN BLOT 分析

按文献操作^[14] ,HSP70 抗体为 Sigma 公司产品 ,

1.7 统计方法

用 SPSS 统计软件进行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 HSP70 的诱导

结果如图 1 ,温浴和砷酸钠均可以诱导 HSP70 高表达 ,HSP70 在预热 5 分钟后就可以被诱导 ,随时间延长 ,HSP70 的表达量也增加 ,1h 后最高并进入衰减期 ,12h 后还可以检测到 (结果未列出) ,砷酸钠作用 18 小时后 ,细胞 HSP70 也明显表达增高。而低氧则不能诱导细胞 HSP70 高表达。

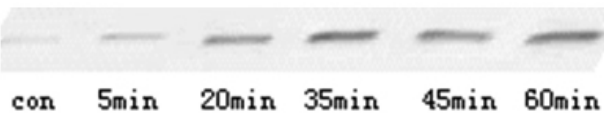


图 2 不同浴热时间细胞 HSP70 的表达
Fig.2 HSP70 at different time of warm bath

温浴细胞比较凋亡率显著降低($P < 0.01$) ,说明 HSP70 诱导高表达可以保护细胞对抗低氧的影响 ,降低细胞凋亡率。

表 1 温浴诱导 HSP70 高表达对低氧诱导细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm \text{SD}$ $n=9$)
Table1 Warm bath induced over-expression of HSP70 on apoptosis of hypoxia($\bar{x} \pm \text{SD}$ $n=9$)

分组 Groups	细胞凋亡率(%) Apoptosis ratio(%)
对照组 Control	20.6± 2.5
低氧组 Hypoxia	88.4± 7.7
温浴组 Warm bath	17.8± 3.9
温浴 + 低氧组 Warm bath+hypoxia	58.6± 5.9**

注 : ** $P < 0.01$ vs 低氧组

Note: ** $P < 0.01$ vs hypoxia

2.3 砷酸钠作用细胞对低氧引起的细胞凋亡的影响

由表 2 可见 ,对照组细胞凋亡率变化不大(与表 1 对照组比较) ,而砷酸钠组细胞凋亡率为 36.8%高于温浴组 (表 1 结果) ,但是砷酸钠作用后再进行低氧处理则凋亡细胞率显著低于单纯低氧处理组($P < 0.01$) ,推测可能是砷酸钠作用细胞后 ,

诱导了细胞 HSP70 高表达所致。

2.4 HSP70 反义寡核苷酸链对射线引起的细胞凋亡的影响

由表 3 可见 ,加入 HSP70 反义寡核苷酸链后再进行温浴 ,细胞凋亡率与低氧组没有显著差异 ,而温浴加低氧组的凋亡细胞率则明显低于低氧组和温浴 + 寡核苷酸 + 低氧组($P < 0.01$) ;

推测是 HSP70 反义寡核苷酸链与 HSP70mRNA 互补结合 ,抑 制了 HSP70mRNA 的翻译。

表 2 砷酸钠诱导 HSP70 高表达对低氧诱导细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm$ SD $n=9$)

Table 2 Sodium arsenate induced over-expression of HSP70 on hypoxia induced apoptosis $\bar{x}\pm$ SD $n=9$)

分组 Groups	细胞凋亡率(%)Apoptosis ratio
对照组 Control	23.4 \pm 4.9
低氧组 Hypoxia	97.4 \pm 7.8
砷酸钠组 Sodium arsenate	32.8 \pm 6.1
砷酸钠 + 低氧组 Sodium arsenate+hypoxia	48.9 \pm 5.4**

注 :** P<0.01 vs 低氧组
Note: ** P<0.01 vs hypoxia

表 3 HSP70 反义寡核苷酸加温浴对低氧诱导细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm$ SD $n=9$)

Tabl e3 Antisensedigonucleotides of HSP70 plus warm bath on hypoxia induced apoptosis

分组 Group	细胞凋亡率(%)Apoptosis ratio
对照组 Control	24.7 \pm 2.7
低氧组 Hypoxia	93.4 \pm 4.8
HSP70 反义寡核苷酸组 Antisensedigonucleotides of HSP70	22.6 \pm 6.5
温浴 + 低氧组 Warmbath+hypoxia	49.2 \pm 5.8**
温浴 + 反义寡核苷酸 + 低氧组 Warm bath+ Antisensedigonucleotides of HSP70+hypoxia	107.1 \pm 8.9 ^{###}

注 :** P<0.01 vs 低氧组 ## P<0.01 vs 温浴 + 低氧组
Note: ** P<0.01 vs hypoxia ## P<0.01 vs warm+hypoxia

3 讨论

研究显示高原居住人员夜晚难以入睡或睡眠质量差 ,Mc-farland 发现高原探险人员其数学能力、识字能力、注意力和短期记忆能力均受到明显损害 [15]。低氧使海马乙酰胆碱释放减少 ,从而 影响学习和记忆功能 ,其他一些神经递质如多巴胺、5-羟色胺也对低氧比较敏感[16]。本实验结果显示无论是温浴诱导的 HSP70 高表达还是砷酸钠诱导 HSP70 高表达都可以防止低氧引起的细胞凋亡发生 ;如果用 HSP70 反义寡核苷酸链进入细胞 ,则不能降低低氧引起的细胞凋亡 ,主要是因为 HSP70 反义寡核苷酸链与 HSP70mRNA 结合 ,抑制了 HSP70 的表达。

其实不论是高温还是砷酸钠都有诱导细胞凋亡的作用 ,关键是处理的时间和量 ,如果温浴时间超过 10 个小时 ,则凋亡细胞率可以达到 90%以上 ;也有研究结果显示 160mmol/L 就可以明显诱导血管内皮细胞凋亡 ,这也是选择 10mmol/L 砷酸钠的原因。即使在这种条件下 ,还可以看到单纯温浴或 10 μ mol/L 砷酸钠作用 18 小时后 ,凋亡细胞数明显增加。

有关 HSP70 保护作用的研究结果很多 ,然而这些研究的结果并不是完全一致 ,例如 Dressel 用 T 淋巴细胞实验就没有发现类似的结果。不同的细胞对热的敏感性是有区别的 ,温浴温度的选择就非常重要。

低氧是一种对细胞的不良刺激 ,但是在本实验中 ,单纯低氧并没有引起 HSP70 的高表达 ,但是在有些实验中 ,研究者发现低氧也可以诱导细胞 HSP70 高表达 ,有研究发现低氧就可以诱导 HSP70 表达 ,原因可能与低氧的作用时间有关 ,HSP70

对细胞的保护作用也不是无限的 ,推测可能如果低氧时间过长 ,超过了 HSP70 的保护能力 ,就会导致细胞凋亡。虽然有关 HSP70 保护作用的研究很多 ,几乎包括了所有的不良刺激 ,但是由于生命的复杂性和应用不同的实验对象 ,结果还是存在差异。要搞明白这些差异的原因 ,则需要对 HSP70 作用机理更详尽的研究。

参 考 文 献(References)

[1] Lin HJ, Wang CT, Niu KC, et al. Hypobaric hypoxia preconditioning attenuates acute lung injury during high-altitude exposure in rats via up-regulating heat-shock protein 70 [J].Clin Sci (Lond), 2011,121(5): 223-31

[2] Xu K, Sun X, Erokwu BO, et al. A heat-shock protein co-inducer treatment improves behavioral performance in rats exposed to hypoxia [J]. Adv Exp Med Biol, 2011,915:313-318

[3] 王枫,李泊,杨宝平等. 预热诱导 K562 细胞热应激蛋白 70 高表达对高温引起细胞凋亡的影响[J]. 卫生研究, 2001, 30(2): 65-67
Wang Feng, Li Bo, Yang Bao-ping, et al. Pre-warm induced over-expression of HSP70 on Apoptosis by high temperature[J]. Hygiene Research,2001,30(2):65-67

[4] Riezzo I, Neri M, De Stefano F, et al. The timing of perinatal hypoxia/ischemia events in term neonates: a retrospective autopsy study HSPs, ORP-150 and COX2 are reliable markers to classify acute, perinatal events [J].Diagn Pathol, 2010,13:5-49

[5] Yuan ZQ, Zhang Y, Li XL, et al.HSP70 protects intestinal epithelial cells from hypoxia/reoxygenation injury via a mechanism that involves the mitochondrial pathways [J].Eur J Pharmacol,2010,643 (2-3):282-288

(下转第 72 页)

- fuse-type giant cell tumour. In: Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone[M]. Lyon, France: IARC, 2002:110-114
- [4] 江浩,何国祥,陈克敏,等.骨与关节 MRI[M].上海:上海科技技术出版社,1999.505-509
- Jang Hao, He Guo-Xiang, Chen Ke-Min, et al. Bone and Joint MRI. Shang Hai:Shanghai Science and Technology Press,1999:505-509(In Chinese)
- [5] Anazawa U, Hanaoka H, Shiraishi T, et al.Similarities between giant cell tumor of bone, giant cell tumor of tendon sheath, and pigmented villonodular synovitis concerning ultrastructural cytochemical features of multinucleated giant cells and mononuclear stromal cells[J]. Ultrastruct Pathol, 2006,30(3):151-158
- [6] 时惠平,张新合.恶性腱鞘巨细胞瘤 1 例[J].中国医学影像学杂志, 2008,16(1):76
- Shi Hui-Xin, Zhang Xin-He. Malignant giant cell tumor of tendon sheath:one case [J]. Chinese journal of medical imaging technology, 2008, 16(1):76 (In Chinese)
- [7] Wan JM, Magarelli N, Peh WC, et al. Imaging of giant cell tumour of the tendon sheath[J]. Radiol med, 2010,115(1):141-151
- [8] Llauger J, Palmer J, Rosó n N, et al. Pigmented villonodular synovitis and giant cell tumors of the tendon sheath: radiologic and pathologic features[J]. AJR, 1999, 172(4):1087-1091
- [9] Mark DM,John HR, Rachel BL, et al. Pigmented Villonodular Synovitis: Radiologic-Pathologic Correlation [J]. RadioGraphics, 2008, 28 (5):1493-1518
- [10] Kransdorf MJ, Murphey MD. Synovial tumors. In: Imaging of soft tissue tumors [M]. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:381-436
- [11] 方必东,许崇永,章巍,等.腱鞘巨细胞瘤 MRI 表现[J].中国医学影像学杂志,2007,15(6):447-449
- Fang Bi-Dong, Xu Chong-Yong, Zhang Wei, et al. MR Imaging Manifestations of giant cell tumor of tendon sheath [J]. Chinese journal of medical imaging technology, 2007, 15(6):447-449 (In Chinese)
- [12] 艾松涛,孙明华,余强,等.手足局限性腱鞘巨细胞瘤的 MRI 表现[J].放射学实践,2008,23(5):543-546
- Ai Song-Tao,Sun Ming-Hua,Yu Qiang,et al. MR Imaging Manifestations of localized giant cell tumor of tendon sheath in extremities[J]. Radiol Practice, 2008,23(5):543-546 (In Chinese)

(上接第 29 页)

- [6] Taylor L, Midgley AW, Christmas B, et al. Daily hypoxia increases basal monocyte HSP72 expression in healthy human subjects [J]. Amino Acids,2011, 40(2):393-401
- [7] Barut F, Barut A, Dogan Gun B,et al. Expression of heat shock protein 70 and endothelial nitric oxide synthase in placental tissue of preeclampsic and intrauterine growth-restricted pregnancies [J]. Pathol Res Pract, 2010, 206(9):651-656
- [8] Guo W, Yang Z, Xia Q, et al. Arsenite stabilizes HIF-1 α protein through p85 α -mediated up-regulation of inducible Hsp70 protein expression [J].Cell Mol Life Sci,2011,68(3):475-488
- [9] Alekseeva OS, Korzhevskij DE, Vetosh AN, et al. Preadaption to nitrogen anesthesia and impairment of brain cortex structure in rats during hypoxia [J].Evol Biokhim Fiziol,2010,46(4):311-315
- [10] Xu YM, Li JP, Wang RY. Changes of dystrophin and desmin in rat gastrocnemius under micro-damage induced by hypoxia [J].2010,62 (4):339-348
- [11] 司徒镇强,吴军正主编.细胞培养[M].世界图书出版社,北京,1996
- SITu Zheng-qiang, Wu Jun-zheng. Cell Culturing. World Book Publishing, BeiJing, 1996
- [12] Goel G, Guo M, Ding J, et al. Combined effect of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and heat shock protein (HSP)-70 in reducing apoptotic injury in hypoxia: a cell culture study [J].Neurosci Lett,2010,483(3): 162-166
- [13] McCarthy SA, Cacchione MS, Cairns JS. The effects of immunosuppressive drugs on the regulation of activation-induced apoptotic cell death in thymocytes[J]. Transplantation,1999,54:543-547
- [14] Gordon SA, Hoffman RA, Simmons RL, et al. Induction of heat shock protein 70 protects thymocytes against radiation-induced apoptosis[J]. Arch surg, 1997,132:1277-1282
- [15] Fornace AJ. Stress-gene induction by low-dose Gamma irradiation[J]. Military Medicine, 2002, 167: 13-15
- [16] Xu K, Sun X, Erokwo BO, Cernak I. A heat-shock protein co-inducer treatment improves behavioral performance in rats exposed to hypoxia [J]. Adv ExpMed Biol, 2011,915:313-318