

· 实验研究 ·

体外染尘细胞模型中不同时段 HSP70各亚型的诱导表达

Time effect on induction expression of HSP70 isoforms of silica
exposed human embryonic lung fibroblasts in vitro张海英¹, 金泰虞^{2*}, 李慧祺², 韦艳³, 邓敬桓¹ZHANG Haiying¹, JIN Taiyu^{2*}, LI Huiqi², WEI Yan³, DENG Jinghuan¹

(1. 广西医科大学公共卫生学院, 广西 南宁 530021; 2. 复旦大学公共卫生学院, 上海 200032 3. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021)

摘要: 本实验拟观察染尘巨噬细胞上清液对人胚肺成纤维细胞热休克蛋白 70 (HSP70) 各亚型 (HSP70-1、HSP70-2、HSP70-hm) 诱导表达的时间效应关系。采用大鼠巨噬细胞 (AMs) 和人胚肺成纤维细胞 (HEL F) 组成体外模型, 以逆转录多聚酶链反应 (RT-PCR) 技术, 检测二氧化硅粉尘处理 AMs 培养上清液刺激 HEL F 细胞分别在 0、2、8、12、16、24 h 等多个时段 HSP70 各亚型表达的情况。同时用二氧化钛作为阴性对照, 以不用粉尘处理的 AM 培养上清液作为正常对照。结果 HSP70-1、HSP70-2、HSP70-hm 基因表达与培养时间呈现明显的时间-效应关系。HSP70 可能参与了矽肺发生的氧化应激机制, 且具有不同的诱导动力学特征。

关键词: 矽尘; 肺泡巨噬细胞; 人胚肺成纤维细胞; 热休克蛋白 70 时效

中图分类号: R135.2 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2010)02-0116-03

目前认为矽肺发病机制可能涉及矽尘诱导 AMs 产生各种细胞调节因子, 诱发氧化应激损伤, 启动信号转导通路, 细胞凋亡等, 从而引起肺成纤维细胞增殖及细胞外基质的沉积, 进而形成以肺间质纤维化为主的矽肺。热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 被认为是保护细胞、对抗损伤的主要蛋白质^[1]。前期实验发现, 受染尘肺泡巨噬细胞上清液刺激的人胚肺成纤维细胞 HSP70 各亚型 (HSP70-1、HSP70-2、HSP70-hm) mRNA 在转录水平呈表达增加, 本文拟进一步报道 HSP70 各亚型被诱导的时间-效应观察情况。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI1640 培养基, MEM (minimum essential medium) 培养基粉剂, 0.25% 胰蛋白酶, 新生牛血清, 台盼蓝, Gimsa RNA 抽提及扩增试剂盒 (上海晶美生物制品有限公司), 标准 SiO_2 粉尘 (上外广电公司惠赠), 标准二氧化钛尘 (TiO_2 ,

由中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所提供), HEL F 株 (MRC-5 购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库)。

1.2 实验粉尘的制备

标准二氧化钛尘 (TiO_2), 其分散度为粒径 $< 2 \mu\text{m}$ 的占 91.5%, $2 \sim 5 \mu\text{m}$ 的占 8.5%, 游离二氧化硅 (SiO_2) 为 0%。 SiO_2 粉尘悬液制备: 采用标准 SiO_2 粉尘, 其中游离 $\text{SiO}_2 > 99.8\%$, Al_2O_3 占 0.05%, Fe_2O_3 占 0.01%, TiO_2 、CaO、MgO 痕量, 经光衍射法检测粉尘粒径均 $< 5 \mu\text{m}$, 约为 $4 \mu\text{m}$ 。以上粉尘 (TiO_2 、 SiO_2) 经 180°C 2 h 高温消毒后用无菌 RPMI1640 培养液配成 2 g/L 的粉尘悬液母液, 冷藏备用, 临用前将母液用无菌 RPMI1640 培养液稀释为所需浓度。

1.3 大鼠 AMs 的收集、纯化与培养及染尘肺泡 AMs 上清液制备

健康 SD 大鼠 (200 ± 10) g 30 只 (合格证号: 02-22-4), 采用本教研室支气管肺泡灌洗方法收集 AMs, Gimsa 染色测定 AMs 的纯度达 95%, 台盼蓝排除法计数存活细胞数达 99%。用含 10% 新生小牛血清和青链霉素双抗的 RPMI1640 培养液调成细胞密度为 1×10^6 AMs/L 的细胞悬液, 接种到 6 孔板中 (每孔各 2 mL, 37°C 、5% CO_2 孵育 2 h 弃去上清, 即得到较纯的 AMs。向接种好的 6 孔板中分别加入一定量的粉尘溶液 (TiO_2 、 SiO_2 粉尘悬液), 用无血清的 RPMI1640 培养液调节为 50.0 mg/L 并补足体积至 2.5 mL/孔, 37°C 、5% CO_2 孵育 24 h 后终止培养, 上清液以 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜的抽滤器抽滤后, 用封口膜封口于 -70°C 储存备用。

1.4 HEL F 株 (MRC-5) 的传代培养及染毒

细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 2 mL/孔接种于 6 孔板。实验组接种孔分别加入经 50 $\mu\text{g/mL}$ TiO_2 、 SiO_2 粉尘染尘 24 h 的 AMs 上清液各 0.5 mL 及无血清 MEM 培养基各 2 mL。对照组加入无染尘 AMs 上清液各 0.5 mL 及无血清 MEM 培养基各 2 mL。空白组细胞仅加入 2.5 mL 的 MEM 培养基 (每组设 3 孔平行样)。37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱分别培养 0、2、8、12、16、24 h 后, 于相应时段收集细胞, 贴壁细胞每孔分别加 0.5 mL Trizol 充分吹打混匀收集后保存于 -80°C , 提取 RNA 备用。

1.5 RNA 抽提及逆转录多聚酶链反应 (RT-PCR)

按说明书提取细胞总 RNA。紫外分光法测定 RNA 纯度和含量。将 RNA 模板逆转录成 cDNA。取 1 μL 上述反应液用

收稿日期: 2009-08-19 修回日期: 2009-10-09

基金项目: 广西青年科学基金资助 (桂科青 0832047); 广西大型仪器协作共用网资助

作者简介: 张海英 (1973-), 女, 博士, 主要从事职业流行病学与分子毒理学研究。

* 通讯作者, 教授, 博士生导师。

PCR试剂盒对 GAPDH HSP70-1、HSP70-2 HSP70-hom扩增, 引物序列采用 Primer premier5软件设计, 由上海 Sangon 合成, 序列及长度见表 1 GAPDH HSP70-hom扩增条件: 预变性 5 min 各循环数见表 1 每个循环包括: 94℃变性 1 min 55℃退火 1 min 72℃延伸 1 min 循环结束后 72℃终末延伸 10 min HSP70-1 HSP70-2 扩增条件: 退火温度 56℃, 其余同前。反应结束后于 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 图像分析软件分析目的基因光密度 (optical density A) 值, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参照, 计算各基因相对表达丰度: 目的基因相对表达丰度 = 目的基因 A 值 / 内参基因 A 值。

表 1 目的基因引物的序列和扩增片段长度

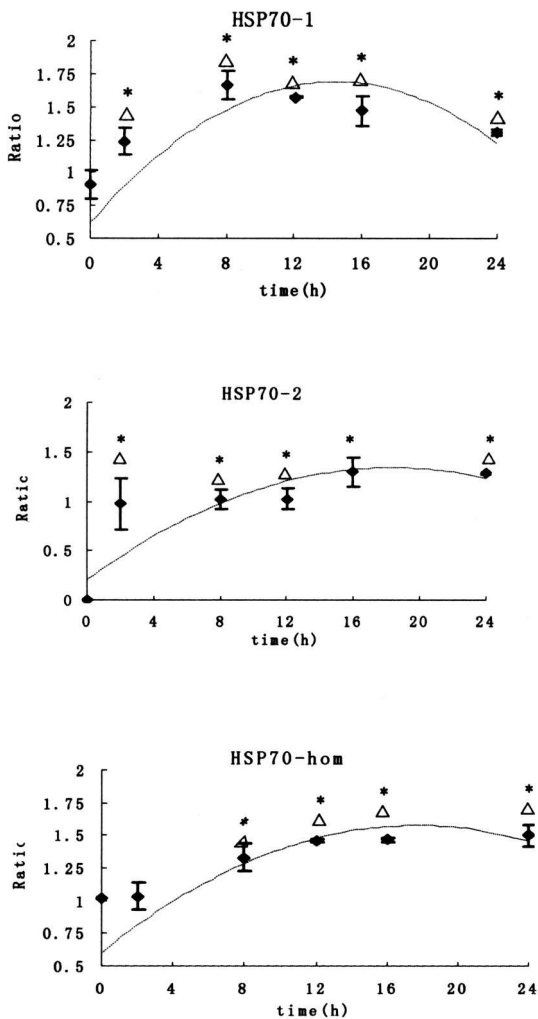
基因	GenBank序列号	引物序列	产物长度 (bp)	循环数
GAPDH	gi 0226183	5'CGGAGTCAACGG- ATTTGGTTCGTAT 3' 5'AGTCTCTCTCCAT- GGTGTGAAGAC 3'	307	26
HSP70-1	gi 26787973	5'CACCAAGCAGA- CGCAGAT 3' 5'CCAGCCACGAG- ATGACC 3'	482	28
HSP70-2	gi 26787974	5'AGCTGGAGCA- GGTGTGTAAC 3' 5'GAAGGTGCA- GTGTTGATTC 3'	317	28
HSP70-hom	gi 26787975	5'TGAAGGGCAA- GATTAGTGA 3' 5'TGAAGGGCAA- GATTAGTGA 3'	515	28

2 结果

经 50 μg/ml SO₂ 诱导后, 染尘 AMs 上清诱导 MRC-5 细胞后热应激蛋白 HSP70-1、HSP70-2 HSP70-hom 在 0 2 8 12 16 24 h 表达的变化见图 1。热应激蛋白 HSP70-1、HSP70-2 HSP70-hom 表达总体呈现良好的时间效应关系, 相关系数分别为 0.738 0.896 0.846 但各亚型表现出不同的特征: HSP70-2 在 0 h 没有表达; HSP70-1 HSP70-2 水平在 2 h 均可见显著升高 (P<0.05); HSP70-2 在 8 h 显著升高 (P<0.05); HSP70-1 在 8 h 达到峰值, 在 12 h 后降低, HSP70-hom 于 12 h 达到峰值且持续到 24 h HSP70-2 在 16 h 达到峰值并持续到 24 h 各时间段 SO₂ 诱导后的热应激蛋白 HSP70-1、HSP70-2 HSP70-hom 表达与空白组和 TiO₂ 组 (50 μg/ml) 的比较详见图 1 标记, 大多数情况呈现较为显著的差异 (P<0.05)。

3 讨论

热休克蛋白按分子量可分为 HSP 60、HSP70、HSP90 及小分子热休克蛋白等, 其中研究最为广泛的是 HSP70 HSP70 与细胞氧化应激密切相关^[2], 而尘肺形成与发展可能涉及氧化应激。HSP70 亚型主要有 HSP70-1、HSP70-2 和 HSP70-hom^[3-4]。本课题组在前期实验发现, 经不同浓度 SO₂ 粉尘处理 AMs 的上清液刺激 MRC-5 细胞 24 h 后, HSP70-1、HSP70-2 HSP70-hom 的表达丰度均有所增加, 且表达水平与粉尘浓度呈现良好的剂量-反应关系。本次实验观察了在不同时间段 HSP70 各亚型表达水平的变化情况, 进一步提示矽尘作用于



注: 与空白组比较, * P<0.05 与 TiO₂ 组比较, △ P<0.05

图 1 经诱导的 MRC-5 细胞在不同培养时间 HSP70 各亚型相对表达丰度

AMs 可能产生一定的氧化应激作用, 其产生的上清液不仅能使人胚肺成纤维细胞中的热休克蛋白被诱导表达, 呈良好的剂量-反应关系, 还各自呈现良好的时间-效应关系及诱导动力学特征, 这为进一步阐明应激蛋白 HSP70 在矽肺产生过程中的角色及对进一步的干预研究提供参考依据。另外, 基因表达情况复杂, 通常情况下仅有小部分基因进行表达, 而且存在严格的时间和空间特异性。表达后的 mRNA 仍须经历贮存、转运、降解、翻译调控及产物 (蛋白质) 的翻译后加工 (如糖基化、磷酸化、乙酰化和结构域拼接), 对 mRNA 以及基因与蛋白质线性对应关系的分析也难以反映基因的最终产物蛋白质的质与量的生物学特征。源于基因组学仅涉及生物中心法则 (DNA-RNA-蛋白质) 的一部分, 因此基因组学存在一定的局限性。因此, 其确切作用有待于对其蛋白表达水平进行检测及多方面的验证而确认。

参考文献:

[1] Porter DW, Millicchia LL, Wilkard P, et al. Nitric oxide and reactive oxygen species production causes progressive damage in rats after

- cessation of silica inhalation [J]. Toxicological Sciences March 2006 90 (1): 188-197.
- [2] Aufricht C. Heat shock protein 70 molecular supercoil [J]. Pediatric Nephrol 2005 20 (6): 707-713
- [3] Massa C, Melani C, Colombo MP. Chaperon and adjuvant activity of HSP 70: different natural killer requirement for cross priming of chape-

- roned and bystander antigens [J]. Cancer Res 2005 65 (17): 7942-7949
- [4] Ito H, Sekimura K, Sasaki N, et al. Cytoprotective effects of heat shock protein 70 in bronchial epithelium against neutrophil elastase induced cell injury [J]. Aterugi 2006 55 (7): 820-826

汞对大鼠肾线粒体膜流动性的影响

Effect of mercury exposure on membrane fluidity of renal mitochondria in rats

高健, 徐兆发*, 田智, 刘海军, 田雅文, 徐斌

GAO Jian, XU Zhao-fa*, TIAN Zhi, LIU Hai-jun, TIAN Ya-wen, XU Bin

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 将 24 只大鼠随机分成对照组、染汞组、N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 预处理组。对照组、染汞组大鼠腹腔注射生理盐水, NAC 预处理组腹腔注射 4 mmol/kg NaCl 2 h 后对照组皮下注射生理盐水, 染汞组、NAC 预处理组皮下注射 18.4 μ mol/kg HgCl₂。注射 24 h 后处死大鼠, 测定丙二醛 (MDA) 含量, Ca²⁺-ATP 酶、磷脂酶 A₂ (PLA₂) 活力和线粒体膜流动性。与对照组相比, 染汞组 MDA 含量和 PLA₂ 活力显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Ca²⁺-ATP 酶活力和线粒体膜流动性显著降低 ($P < 0.05$); 与染汞组相比, NAC 预处理组 MDA 含量和 PLA₂ 活力显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 线粒体膜流动性显著升高 ($P < 0.01$)。NAC 预处理在某种程度上能预防汞导致的大鼠肾线粒体膜流动性的降低。

关键词: 汞; N-乙酰半胱氨酸 (NAC); 膜流动性

中图分类号: R135.13 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2010)02-0118-02

汞是一种以多种形式广泛分布于环境中的有毒重金属, 对人和动物健康有极大的危害^[1]。目前已有研究表明汞可引起肾、肝、脑、睾丸及血液等系统的毒性, 并且具有致癌、致畸、致突变作用。肾脏是氯化汞 (HgCl₂) 排泄、蓄积和毒性作用的主要器官。汞的毒理学机制至今还未完全阐明, 研究表明其很可能与线粒体的结构和功能异常有关。汞具有极强的与巯基分子结合的能力和亲电性, 可抑制线粒体的呼吸功能, 引起细胞凋亡。N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 极易进入细胞内, 为一种巯基供给剂。同时, 它还具有抗氧化作用, 通过与自由基的相互作用清除自由基^[2]。本实验通过大鼠急性汞染毒并用 NAC 预处理, 研究汞对大鼠肾皮质线粒体的影响, 为阐明汞的毒性机制和汞中毒的治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组、染毒及线粒体分离

收稿日期: 2009-07-22 修回日期: 2009-12-28

作者简介: 高健 (1983-) 女, 在读硕士研究生, 主要从事环境毒理学研究。

*: 通讯作者, 教授, 博士生导师。

中国医科大学实验动物中心提供的实验用 Wistar 大鼠 24 只, 体重 (200±10) g, 雌雄各半。正式实验前饲养 1 周, 按体重随机分成 3 组, 对照组、染汞组、NAC 预处理组。对照组、染汞组大鼠腹腔注射生理盐水, NAC 预处理组腹腔注射 4 mmol/kg NaCl 2 h 后对照组皮下注射生理盐水, 染汞组、NAC 预处理组皮下注射 18.4 μ mol/kg HgCl₂ 溶液; 注射容量均为 5 ml/kg。注射 24 h 后, 剪心脏放血处死大鼠, 取肾皮质, 梯度离心得线粒体^[3], 以上操作均在 4℃ 下进行。

1.2 测定指标及方法

丙二醛 (MDA) 含量用硫代巴比妥酸比色法^[4], Ca²⁺-ATP 酶活力、磷脂酶 A₂ (PLA₂) 活力、线粒体膜流动性分别采用文献 [5~7] 介绍的方法进行测定, 蛋白含量用 Lowry 法^[8]测定。

1.3 统计学分析

实验所得数据以平均值±标准差表示, 用 SPSS 软件单因素方差分析方法 (ANOVA) 进行组间差异的显著性检验, 两两间比较用 Q 检验 (Student-Newman-Keuls SNK)。

2 结果

2.1 大鼠肾皮质线粒体 MDA 含量、Ca²⁺-ATP 酶和 PLA₂ 活力

从表 1 可见, 与对照组相比, 染汞组 MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$), Ca²⁺-ATP 酶活力显著降低 ($P < 0.05$), PLA₂ 酶活力显著升高 ($P < 0.01$); 与染汞组相比, NAC 预处理组 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$), Ca²⁺-ATP 酶活力没有明显改变, PLA₂ 活力显著降低 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠肾皮质线粒体 MDA 含量、Ca²⁺-ATP 酶和 PLA₂ 活力 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

分组	MDA 含量 (nmol/mg Pro)	Ca ²⁺ -ATP 酶活力 [μ mol/(mg·h)]	PLA ₂ 活力 (U)
对照组	12.89±1.77	0.60±0.11	35.42±3.86
染汞组	15.18±2.05*	0.46±0.14*	43.75±6.68**
NAC 预处理组	12.95±1.75 Δ	0.47±0.14	35.94±4.95 $\Delta\Delta$

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与染汞组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 。表 2 同。

2.2 大鼠肾皮质线粒体膜偏振度 P 值和膜粘滞系数 (η)

从表 2 可见, 与对照组比, 染汞组偏振度 P 值显著升高