

文章编号:1671 - 2897(2003)01 - 043 - 04

· 论著 ·

# 转染热休克蛋白 70 对 p38MAPK 信号通路的影响

王莉<sup>1</sup> 李青<sup>1</sup> 张丰<sup>1</sup> 郭斌<sup>2</sup> 郭爱林<sup>1</sup> 叶菁<sup>1</sup> 林圣彩<sup>3</sup> 樊代明<sup>4</sup> (第四军医大学:<sup>1</sup>西京医院病理科,<sup>2</sup>研究生院,<sup>4</sup>西京医院消化内科,陕西 西安 710033;<sup>3</sup>香港科技大学生物化学系,中国香港 05852)

**摘要** 目的 探讨热休克蛋白(HSP70)在人胶质瘤细胞 BT-325 p38MAPK 信号通路中的作用。方法 用脂质体介导法将 hsp70 基因导入人胶质瘤细胞 BT-325 中,倒置显微镜观察转染细胞的形态学及粘附性变化,紫外线照射 30 min 后,采用免疫组化和 Western blot 方法测定转染前后 HSP70 的表达水平及照射前后 p38MAPK 表达情况。结果 免疫组化和 Western blot 证实 hsp70 基因成功转染入 BT-325 中,转染细胞受到紫外线照射后 p38MAPK 表达减弱。结论 体外转染 hsp70 基因可抑制紫外线照射后 BT-325 细胞 p38MAPK 的表达。

**关键词** 胶质瘤; 丝裂素活化蛋白激酶; 热休克蛋白 70

中国图书资料分类号 R 739.41 文献标识码 A

## Effects of transfected HSP70 on p38MAPK signal pathway

WANG Li<sup>1</sup>, LI Qing<sup>1</sup>, ZHANG Feng<sup>1</sup>, GUO Bin<sup>2</sup>, GUO Ailin<sup>1</sup>, YIE Jing<sup>1</sup>, LIN Shengcai<sup>3</sup>, FAN Daiming<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Xijing Hospital, <sup>2</sup>Graduate College, <sup>4</sup>Department of Gastroenterology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China; <sup>3</sup>Department of Biochemistry, Hong Kong University of Science & Technology, Hong Kong 05852, China

**Abstract Objective** To study the role of HSP70 in p38MAPK signal transduction of human glioma cells BT-325. **Methods** pBBS212-hsp70 gene was transfected into BT-325 cells by lipofectin. The morphological and adhesive changes of the cells were observed under an inverted microscope. The level of HSP70 was measured by immunohistochemistry. Then the transfected cells were put into ultraviolet (UV) for 30 minutes, and expression of p38MAPK and HSP70 were examined by immunohistochemistry and Western blot methods both before and after treatment. **Results** It is demonstrated that hsp70 gene was successfully transfected into BT-325 cells by both immunohistochemistry and Western blot methods, and after UV treatment, the induction of p38MAPK in transfected cells was inhibited. **Conclusion** Transfection of pBBS212-hsp70 might inhibit p38MAPK expression in BT-325 cells after UV treatment.

**Key words** Glioma; p38MAPK; HSP70

在炎症、热休克、紫外线、过氧化物、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ )、一氧化氮(NO)等损伤因素作用下,受损细胞中 hsp70 基因的转录活性升高,使热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)70 大量表达<sup>[1-3]</sup>。在诸如热休克等细胞蛋白损伤过程中,HSP70 通过将变性的蛋白质折叠并介导其降解而发

挥保护细胞的作用<sup>[4,5]</sup>。丝裂素活化蛋白激酶(p38MAPK)除在介导炎症、应激等多种细胞反应中起重要作用外,还参与细胞的增殖、分化和对凋亡的调控<sup>[6]</sup>。那么,转染 hsp70 基因是否可以增加细胞对凋亡的抗性,阻抑应激后 p38MAPK 表达,文献报道不一。为进一步探讨 p38MAPK 与 HSP70 在信号转导通路中的关系,我们将外源 hsp70 基因导入人胶质瘤细胞 BT-325 中,观察其对细胞生物学行为的影响,为探明两者之间的关系提供依据。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100218);高等学校骨干教师资助计划(2000-65-66);留学归国人员科研启动基金资助项目(1999-747)

作者简介:王莉,助教,电话:(029) 3374541-119, E-mail: mailxiaoyuan@163.com

## 材料与amp;方法

## 一、实验材料

人胶质瘤细胞 BT-325 (本校生理教研室周华硕士惠赠), 鼠抗人 HSP70 单抗、二抗试剂盒及 DAB 显色剂(购自武汉博士德公司), 羊抗鼠 p38MAPK 单抗(香港科技大学林圣彩教授惠赠), pBBS212-hsp70 真核表达载体(由叶苓博士构建), 质粒提取及纯化试剂盒(购自上海华舜生物工程公司), DMEM 培养液、胰酶、脂质体 Lipofectamine2000 (购自 Gibco 公司), 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)材料(购自华美生物工程公司), 硝酸纤维素膜(购自美国 Hybond 公司), 电泳仪及真空转印系统(购自美国 Bio-Rad 公司, Power PAC-300 型)。

## 二、方法

1. 质粒的扩增和提取: 挑取少量冻存菌种至 5 ml 含 100 mg  $L^{-1}$  氨苄青霉素的 LB 培养液中, 摇床内 37  $^{\circ}C$  孵育 12 ~ 19 h。JM109 大肠杆菌 4 000  $r \cdot min^{-1}$  离心 5 min; pBBS212-hsp70 中加入氯霉素至终浓度为 170 mg  $L^{-1}$ , 摇 12 ~ 16 h 后再行 4 000  $r \cdot min^{-1}$  离心 5 min。收获的细菌沉淀参照质粒抽提纯化试剂盒说明书进行质粒的抽提及纯化。

2. 细胞培养: BT-325 细胞常规培养于加 100  $g \cdot L^{-1}$  灭活小牛血清的 DMEM 培养液中并置于 37  $^{\circ}C$ 、50 ml  $L^{-1}$   $CO_2$  培养箱。实验用指数生长期细胞。

3. 转染细胞的准备: 转染前 1 d, 用 2.5  $g \cdot L^{-1}$  胰蛋白酶消化 BT-325, 以每孔  $1 \times 10^5$  接种于 6 孔板, 培养 24 h。转染前 4 h 换 10 ml 含 100  $g \cdot L^{-1}$  胎牛血清的 DMEM 培养液, 置 37  $^{\circ}C$ 、50 ml  $L^{-1}$   $CO_2$  孵箱培养。

4. 脂质体转染: 按照转染试剂盒所附操作说明进行, 制备 A 液: 100  $\mu l$  无血清培养液混匀 5  $\mu g$  质粒 DNA; 制备 B 液: 90  $\mu l$  无血清培养液混匀 10  $\mu l$  脂质

体; 混合 A 液与 B 液, 室温孵育 30 min; 以无血清培养液洗涤预转染细胞两次, 加入 0.8 ml 无血清培养液稀释的脂质体-DNA 复合物, 置 37  $^{\circ}C$ 、50 ml  $L^{-1}$   $CO_2$  孵箱培养 6 h, 换完全 DMEM 培养液继续培养。同样方法加入 pBBS212 空质粒作为对照, 只加脂质体每孔 10  $\mu l$  和未处理组各 3 孔作为阴性对照。

5. 转染细胞的观察: 转染后 24, 48, 72 h 于倒置显微镜下观察 pBBS212-hsp70 转染 BT-325 后细胞的形态学改变。

6. 细胞爬片的制备: 在各 6 孔板中, 分别加入消毒的盖玻片, 接种转染后 6 h 的转染细胞。培养 72 h 后, 细胞进入对数生长期。取出全部各种细胞培养皿中的盖玻片, 用 0.01 mol  $L^{-1}$  pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗, 950 ml  $L^{-1}$  酒精固定后, 自然晾干备用。

7. 链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (streptomycin-avidin-biotin-peroxidase complex SABC) 法检测 p38MAPK 和 HSP70 在 BT-325 细胞中的表达: 细胞爬片用 30  $g \cdot L^{-1}$   $H_2O_2$  室温封闭, 再用 20  $g \cdot L^{-1}$  正常山羊血清封闭, 滴加兔抗鼠 p38MAPK 抗体 (1:50), 鼠抗人 HSP70 抗体 (1:100), 4  $^{\circ}C$  过夜, PBS 振洗 3 次, 滴加生物素化羊抗兔 IgG (1:100), 羊抗鼠 IgG (1:100), 37  $^{\circ}C$  孵育, PBS 振洗 4 次; DAB 显色, 苏木素衬染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 封片, 光镜下观察并照相。同时设阳性对照、空白对照、替代对照。

8. 紫外线 (UV) 照射转染 hsp70 基因前后的细胞: 将生长细胞的六孔板置于超净台中, 应用紫外线 UV-C 波段光源垂直照射距离其 30 cm 处的 BT-325 细胞 30 min。

9. 免疫印记法 (Western blot) 检测 p38MAPK 的表达: 收集照射前后的细胞, 裂解后取上清。样品处理后进行 SDS-PAGE 及 Western blot。

统计学处理: 采用 *t* 检验进行统计学分析。

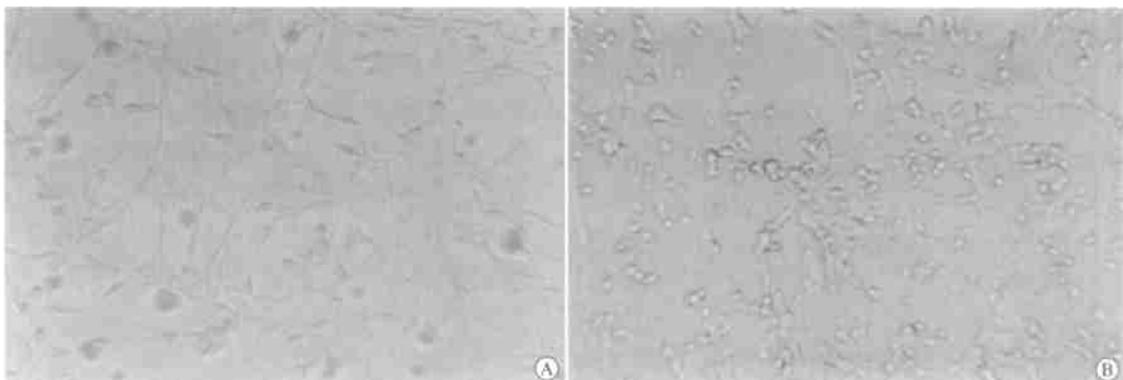


图1 转染 pBBS212-hsp70 前后 BT-325 细胞形态变化 ( $\times 400$ )

Fig 1 Morphological change of the BT-325 cells before and after transfection of pBBS211-hsp70 ( $\times 400$ )

A. Before transfection of pBBS211-hsp70; B. After transfection of pBBS211-hsp70

## 结 果

### 一、质粒的扩增和提取

最终得到的 pBBS212 质粒和 pBBS212-hsp70 质粒浓度分别为  $4 \text{ g L}^{-1}$ 。并经 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切鉴定证实。



图2 转染 pBBS212 组 36 h 后 BT-325 细胞 HSP70 蛋白表达阳性 (SABC,  $\times 400$ )

Fig 2 Positive expression of HSP70 in BT-325 cells 36 h after transfection of pBBS212 (SABC,  $\times 400$ )

### 二、形态学检测

转染 pBBS212-hsp70 质粒后,细胞由原来的多突起形逐渐变为双极或圆形,部分细胞固缩变圆,深染,细胞内空泡增多,核分裂相明显减少,细胞密度减低(图1),生长速度明显缓慢,贴壁性降低,36 h 后可见部分细胞漂浮于培养液中。空白对照组和 pBBS212 组未见明显变化。

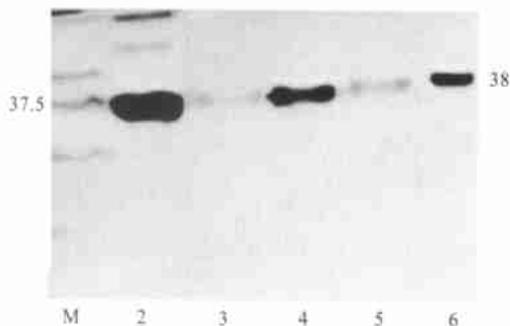


图3 转染质粒后经紫外线照射 BT-325 细胞的 Western-blot 分析

Fig 3 Western blot of UV-treated BT-325 cells before and after pBBS212-hsp70 transduction

M: Protein marker; 2: Control (after UV-treatment); 3: pBBS212-hsp70 (after UV-treatment); 4: pBBS212-hsp70 (before UV-treatment); 5: Control (before UV-treatment); 6: pBBS212 (after UV-treatment)

### 三、SABC 染色

BT-325 细胞经上述处理,分别观察转染 pBBS212-hsp70 组、转染空质粒组和对照组的 HSP70 的表达,镜下观察转染 pBBS212-hsp70 后 BT-325 细胞有 HSP70 表达,以胞质为主,呈淡黄色(图2);对照组和空质粒组未见阳性表达。

图像分析结果显示,转染 hsp70 组细胞平均灰度值为  $142.9 \pm 1.9$ ,低于未处理组  $174.7 \pm 0.7$  ( $P < 0.05$ ),表明 HSP70 表达增高。

### 四、Western-blot 分析

转染 hsp70 基因的细胞经紫外线照射后 p38MAPK 表达减弱,而未转染组与空质粒组细胞经紫外线照射后 p38MAPK 表达增强(图3)。

## 讨 论

HSPs 是细胞在一些应激条件,如热休克、葡萄糖饥饿或受到病原菌感染时高效表达的一族蛋白。HSPs 有高度的保守性,广泛存在于原核、真核生物细胞中,具有涉及细胞能否生存的重要功能。热休克应答可使细胞产生热耐受,避免死亡,还可使细胞逃避机体的免疫监控。HSP70 与各种疾病的关系,特别是肿瘤的研究正在受到重视。我们曾经研究过其在人胶质瘤细胞中的表达<sup>[7]</sup>,发现其表达水平与肿瘤的恶性程度和增殖活性成正相关,推测 HSP70 可能通过抑制肿瘤细胞的凋亡而使肿瘤得以持续增殖。许多研究表明,HSP70 在细胞存活与死亡的平衡间,参与了多个信号途径调节节点的调控<sup>[8-11]</sup>。p38MAPK 是近年来研究较多的蛋白激酶通路,通常由紫外线、高渗环境、砷盐、热休克、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、细胞因子(IL-1、TNF-等)和生理应激等激活之后移位作用于相应的转录因子,启动某些基因转录<sup>[12]</sup>。多数实验证实 p38MAPK 通路与 c-Jun 氨基末端激酶/应激活化蛋白激酶(JNK/SAPK)途径的作用相似,可诱导细胞产生凋亡。Frasch<sup>[13]</sup>等发现在应激刺激如紫外线及 Fas 抗体引起的 HL-60 细胞凋亡过程中,均存在 p38MAPK 的激活。p38MAPK 抑制剂可以阻断应激刺激所致的凋亡。因此,我们推测,在 HSP70 和 p38MAPK 参与调节细胞信号通路的过程中,一定存在某种关系。为此,我们将外源 hsp70 基因导入正常

情况下弱表达 HSP70 的人胶质瘤细胞 BT-325 中,观察其对细胞生物学行为的影响。我们发现,经紫外线照射后,外源性 hsp70 基因高表达的 BT-325 细胞中,p38MAPK 的激活被阻滞。先前的研究也显示,经轻微预处理 BT-325 细胞在经历下一次热休克时

p38MAPK 表达减弱<sup>[14]</sup>。上述研究说明在高表达 HSP70 的细胞中, p38MAPK 的激活受到抑制, 使凋亡和其他激酶依赖的事件受到阻断。在肿瘤细胞中, HSP70 表达比正常细胞高几倍, 且分化越低的肿瘤细胞 HSP70 表达越高, 高表达的 HSP70 可能增强了肿瘤细胞抗凋亡能力。Samali A 等<sup>[15, 16]</sup> 用反义 hsp70 处理肿瘤细胞, 阻断 HSP70 的表达, 发现可抑制肿瘤细胞增生并诱导凋亡。因此, 我们推测 HSP70 很可能通过下调促细胞凋亡相关基因、蛋白和蛋白酶活性(如 p38MAPK, JNK 等)起到拮抗细胞凋亡的作用。本实验证实: 体外转染 hsp70 基因可抑制紫外线照射后 B T-325 细胞 p38MAPK 的表达, 推测 HSP70 可通过调节应激激活的信号通路来增加组织细胞对应激的适应性。

### 参 考 文 献

- 1 Jaattala M, Wissing D, Bauer PA, et al. Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity [J]. EMBO J, 1992, 11(10): 3507 - 3512.
- 2 Li GC, Li LG, Liu YK, et al. Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(5): 1681 - 1685.
- 3 Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, et al. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release [J]. J Clin Invest, 1995, 95(3): 926 - 933.
- 4 Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines [J]. Cell, 1998, 92(3): 351 - 366.
- 5 Bercovich B, Stancovski I, Mayer A, et al. Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70 [J]. J Biol Chem, 1997, 272(14): 9002 - 9010.
- 6 Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, et al. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis [J]. Science, 1995, 270(5240): 1326 - 1331.
- 7 WANG Li, LI Qing, GUO Ailin, et al. Expression of PCNA and HSP70 in human glioma and its clinical implications [J]. Shaanxi Oncology Medicine, 2002, 10(2): 85 - 87.
- 8 Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators [J]. Genes Dev, 1998, 12(13): 3788 - 3796.
- 9 Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, et al. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance [J]. J Bio Chem, 1997, 272(29): 18033 - 18037.
- 10 Mosser DD, Caron AW, bourget L, et al. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis [J]. Mol Cell boil, 1997, 17(9): 5317 - 5327.
- 11 Park KC, Kim DS, Choi HO, et al. Overexpression of HSP70 prevents ultraviolet B-induced apoptosis of a human melanoma cell line [J]. Arch Dermatol Res, 2000, 292(10): 482 - 487.
- 12 Jiang Y, Gram H, Zhao M, et al. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta [J]. J Biol Chem, 1997, 272(48): 30122 - 30128.
- 13 Frasch SC, Nick JA, Fadok VA, et al. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils [J]. J Biol Chem, 1998, 273(14): 8389 - 8397.
- 14 WANG Li, LI Qing, ZHANG Feng, et al. Primary research on relativity of p38MAPK and Hsp70 [J]. J Fourth Mil Medl Univ, 2002, 23(10): 961.
- 15 Samali A, Cotter TG. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis [J]. Exp Cell Res, 1996, 223(1): 163 - 170.
- 16 Jaattelam, Wissing D, Kõkholm K, et al. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases [J]. EMBO J, 1998, 17(21): 6124 - 6134.

(收稿日期: 2002 - 08 - 27; 修回日期: 2002 - 10 - 13)

## 《Science》投稿的基本要求

如果您打算向《Science》投稿, 以下几点可能有助于您准备稿件和说明信。

1. 说明信要简短, 并用科学的语言告诉编辑为什么要他们关注该论文(但并不是该论文解决了当今世界上的所有问题);
2. 欢迎作者建议审稿人及指出与作者存在潜在利益冲突的研究人员;
3. 投稿人在投稿的份数、论文的类型和长度等方面应遵循该杂志的要求, 此点相当重要。这方面的具体要求请参见: <http://intl.sciencemag.org/misc/coninfo.shtml>;
4. 绝对不要邮寄仅有一份的图片;
5. 请随稿附寄相关的、可能有助于编辑或审稿人对稿件进行评审的已发表或待发表的论文;
6. 请使用清晰、合理的语言, 避免修饰词(如最好、第一)和社论性语言(如令人惊异的、令人感兴趣的等);
7. 此外, 应考虑到《Science》广泛的读者群。介绍研究背景和重要性的引言、清晰的图片及定义十分重要。