

第四军医大学学报(J Fourth Mil Med Univ) 2002; 23(10)

· 研究快报 · 文章编号: 1000-2790(2002)10-封3-01

p38MAPK 与 HSP70 关系的初步研究

王莉¹, 李青¹, 张丰¹, 郭爱林¹, 叶菁¹, 陈广生¹, 林圣彩², 樊代明³ (第四军医大学: ¹基础部病理学教研室, ³西京医院消化内科, 陕西西安 710033, ²新加坡国立大学分子细胞生物学研究所, 新加坡 117609)关键词: 胶质瘤; p38MAPK; HSP70; 免疫组化; Western-blot
中图分类号: R739.41 文献标识码: B

0 引言 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是细胞内重要信号传递者,其中p38参与细胞的增殖、分化和对凋亡的调控^[1]。热休克蛋白(heat shock protein, HSP)在通常情况下在细胞中低水平表达,应激时高表达,肿瘤细胞中HSP70呈现持续的高诱导表达^[2]。我们对HSP70和p38之间的关系作了初步探索,试图为肿瘤细胞的信号转导研究及肿瘤治疗寻找理论依据和新的治疗途径

1 材料和方法

1.1 材料 人胶质瘤细胞BT-325(第四军医大学生理学教研室周华硕士惠赠),鼠抗人HSP70单抗(购自武汉博士德公司),羊抗鼠p38单抗(新加坡国立大学林圣彩教授惠赠),二抗试剂盒及DAB显色剂(购自武汉博士德公司)。

1.2 细胞培养 BT-325细胞常规培养于加100 mL·L⁻¹灭活小牛血清的DMEM培养液中并置于37℃,50 mL·L⁻¹CO₂培养箱

1.3 细胞的热休克处理 以2×10⁵/孔接种BT-325细胞于置有盖玻片的3块6孔培养板中,分为预休克组、热休克组和未处理组。37℃培养,待细胞铺满70%,将预休克组培养板置于43℃水浴30 min,恢复6 h后,再置于43℃水浴60 min,立即收集细胞爬片,PBS冲洗,以950 mL·L⁻¹冷乙醇固定15 min,室温干燥备用;热休克组直接置于43℃,60 min后收集细胞爬片,同法固定;未处理组细胞爬片固定同上

1.4 免疫组化 SABC 法检测 p38MAPK 和 HSP70 在 BT-325 细胞的表达 细胞爬片用正常山羊血清封闭,滴加兔抗鼠 p38 抗体(1:50),鼠抗人 HSP70 抗体(1:100),4℃冰箱过夜,PBS 振荡,滴加生物素化羊抗兔 IgG(1:100),羊抗鼠 IgG(1:100),37℃孵育1 h,PBS 振荡数次;DAB 显色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,苏木素衬染,中性树脂胶封片。

1.5 Western-blot 检测 p38MAPK 的表达 收集各组细胞,超声裂解,1000 r·min⁻¹离心,取上清,配制12 g·L⁻¹分离胶和4 g·L⁻¹浓缩胶,每孔加入上述样品40 μL,进行SDS-PAGE电泳。然后电转移至硝酸纤维素膜上进行Western-blot

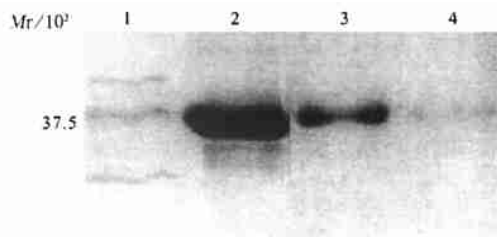
2 结果

2.1 免疫组化染色 热休克前BT-325细胞有HSP70少量表达,以胞质为主,呈淡黄色,p38表达弱阳性;热休克处理后HSP70大量表达,以胞核为主,呈黄褐色;p38MAPK在胞质

中出现明显阳性信号,呈黄褐色;预休克组的HSP70过量表达,以胞质、胞核为主,呈深褐色,而p38MAPK表达强度低于热休克组,以胞质为主,呈淡黄色

2.2 图像分析结果 未处理组、热休克组和预休克组HSP70平均灰度值分别为:213.0±2.6,174.7±0.7,142.9±1.9,p38平均灰度值分别为186.8±2.0,148.4±8.1,181.9±0.6。各实验组细胞灰度值较未处理组低,表明实验组HSP70表达增高(P<0.05);热休克组细胞灰度值较未处理组低,表明p38表达升高(P<0.05)预休克组灰度值又升高,表明p38表达减弱(P<0.05)。

2.3 Western-blot 分析 显示热休克p38表达明显增加,预热休克后p38表达受到一定程度阻滞(图1)。



1: Marker; 2: 热休克组; 3: 对照组; 4: 预热组
图1 热休克后的Western-blot分析

3 讨论 p38MAPK通常由紫外线、砷盐、H₂O₂、细胞因子(L-1, TNF-α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^[3]。本实验观察到通常情况下p38MAPK在体外培养的BT-325细胞弱表达,而在热休克处理后检测到p38MAPK表达增强,说明热休克可激活p38MAPK。当BT-325细胞过量表达HSP70,p38MAPK的激活被抑制,从而阻断了凋亡的发生。Samali等^[4]用反义HSP70处理的肿瘤细胞可阻断HSP70的表达,同样能抑制肿瘤细胞增生及诱导凋亡,这说明HSP70可能通过下调细胞凋亡相关基因、蛋白和蛋白酶活性(如p38MAPK, JNK等)起到拮抗细胞凋亡的作用,过量的HSP70抑制了p38MAPK的激活,是使肿瘤细胞得以持续恶性增殖的机制之一。而且,HSP70似乎在信号转导中扮演了一个相当重要的角色,即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。总之,HSP70是p38MAPK的上游元件,其关系是复杂的,需要我们做更大量的和更为细致的工作,探讨其关系不失为诊断和治疗肿瘤的一条新的途径

参考文献

- [1] Shi YJ, Zhao M, Xu XF, Qiao HH, Huang CZ. Comparative study of expression levels of the major human heat shock proteins in cancer and normal tissues [J]. *Zhonghua Zhongliu Zazhi (J Chin Cancer)*, 1998; 24(4): 277-279.
- [2] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK p38MAPK kinase on apoptosis [J]. *Science*, 1995; 270(5240): 1326-1331.
- [3] Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ, Han J. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta [J]. *Biol Chem*, 1997; 272(48): 30122-30128.
- [4] Samali A, Cotter TG. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 1996; 223(1): 163-170.

编辑 王睿

收稿日期: 2001-12-12; 修回日期: 2002-01-25

基金项目: 高等学校骨干教师资助计划; 留学归国人员科研启动基金 ([1999]747号)

通讯作者: 李青 Tel (029)3374597 Email Liqing@fmmu.edu.cn
作者简介: 王莉(1978-),女(汉族),陕西省西安市人,硕士生(导师李青),Tel (029)3374541 Ext 119