

· 实验研究 ·

参附汤上调 HL60 细胞热休克蛋白和糖皮质激素受体 mRNA 表达及其对细胞存活的影响 *

凌昌全¹ 李 敏² 步世忠³ 许金廉³ 王亚云³ 孙继虎³ 商 叔⁴

摘要 目的:探讨中药方剂参附汤对 HL60 细胞热休克反应时热休克蛋白信使核糖核酸(heat shock protein mRNA, HSPmRNA)和糖皮质激素受体信使核糖核酸(glucocorticoid receptor mRNA, GRmRNA)表达及对细胞存活率的影响。**方法:**建立细胞热休克模型,用动物血清学方法制备参附汤(SFT)血清,用 Northern blot 分析 HSPmRNA 和 GRmRNA 的改变,用台盼蓝拒染法观察细胞存活率。**结果:**HL60 细胞热休克反应时 GRmRNA 明显减少,细胞存活率下降,HSPmRNA 则增加;该细胞经 SFT 处理后在热休克反应时,GRmRNA 表达增加,细胞存活率提高,HSPmRNA 进一步增加。**结论:**SFT 可上调 HL60 细胞热休克反应时 HSPmRNA 和 GRmRNA 表达,提高糖皮质激素的生物学效应和抗细胞损伤能力,从而提高 HL60 细胞在热休克时的存活率,这可能是临床上 SFT 用于治疗失血性休克的机制之一。

关键词 参附汤 热休克蛋白 糖皮质激素受体 信使核糖核酸 细胞存活率

Effect of Shenfutang in Up-regulating Expressions of Heat Shock Protein mRNA and Glucocorticoid Receptor mRNA and Its Influence on Cell Survival LING Chang-quan, LI Min, BU Shi-zhong, et al *Department of TCM, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai (200433)*

Objective: To explore the effect of Shenfutang (SFT) in up-regulating expressions of heat shock protein (HSP) mRNA and glucocorticoid receptor (GR)mRNA and its influence on cell survival. **Methods:** HSP cell model was established. SFT containing serum was prepared with animal serologic method. Changes of HSPmRNA and GRmRNA were analyzed by Northern blot and cell survival rate was determined by Trypan blue staining test. **Results:** During HSP reaction, GRmRNA decreased obviously, cell survival rate lowered and HSPmRNA increased in HL60 cell line, while in the cell line being treated with SFT, during HSP reaction, GRmRNA and cell survival rate increased and HSPmRNA increased further. **Conclusion:** SFT could up-regulate the expressions of HSPmRNA and GRmRNA in HL60 cell line, raise the biological activity and injure antagonizing capacity of glucocorticoid, thus to increase the survival rate of HL60 cell line during heat shock reaction. These may be the mechanism of SFT therapy used in clinical practice.

Key words Shenfutang, heat shock protein, glucocorticoid receptor, messenger ribonucleic acid, cell survival rate

热休克反应是机体或细胞受到伤害性刺激时的一种非特异性反应,主要表现为热休克蛋白(heat shock protein, HSP)的诱导和正常蛋白表达的抑制,包括糖

皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)表达的抑制^[1]。糖皮质激素(glucocorticoid, GC)是机体重要的应激激素,其生物学效应由 GR 介导^[2]。由人参、附子组成的参附汤(SFT)是中医临床上治疗失血性休克的有效方剂^[3],前期工作表明 SFT 大鼠血清制剂可上调 HL60 细胞 GR 的表达(已投稿),但这一作用能否增加 GC 的生物学效应,从而增加细胞抵抗伤害性刺激的能力目前尚不清楚。本研究将以人白血病细胞 HL60 为实验对象,以热休克反应作为伤害性刺激,用血清药理学和分子生物学有关方法,在培养细胞上观察 SFT 对热休克反应时 HSP 信使核糖核酸(mRNA)和 GRm-

* 国家杰出青年基金资助课题(No. 30025045);国家自然科学基金资助课题(No. 30271675)

1. 第二军医大学长海医院中医科(上海 200433);2. 第二军医大学军队卫生学教研室;3. 第二军医大学生理学教研室;4. 中国科学院上海生化所分子生物学国家重点实验室

通讯作者:凌昌全, Tel: 021-25070606, Fax: 021-65562275, E-mail: Lingchangquan@hotmail.com

RNA 表达以及对细胞存活的影响,以期阐明 SFT 的作用机制。

材料和方法

1 材料

1.1 SFT 按中医传统方法煎制,终浓度为含生药 1g/ml,由第二军医大学长海医院中药制剂室提供。

1.2 主要试剂 $[^3\text{H}]$ -地塞米松:英国放化中心产品,1.37TBq/mmol,放化纯度 $>97\%$,放化浓度为 37MBq/ml,稀释 100 倍使用。地塞米松和异硫氰酸胍:Sigma 公司产品。 α - ^{32}P dATP:Amersham 公司。HSP70cDNA 质粒由美国 R. Morimoto 博士惠赠,GR-cDNA 质粒由美国张世明博士惠赠。

2 方法

2.1 大鼠血清制备 分别以 SFT 口服液和生理盐水灌喂大鼠,每天 2 次,每次 2ml,连续 10 天,停药次日上午 8:00 断头取血,分离得两种不同的血清,分别为 SFT 血清和生理盐水血清, -20°C 保存备用。

2.2 细胞培养 HL60 细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,在 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养。第 1 批实验完成 HL60 细胞热休克模型的建立,以 GR 含量及细胞存活率作为热休克反应的观察指标。取细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液培养液 150 μl ,置于不同的 96 孔培养板内,于 43°C 条件下分别处理 10、30、60 和 90min,测 GR 含量和细胞存活率。第 2 批实验,在上述最佳热休克反应条件下,观察经 20% SFT 血清和生理盐水血清预处理 48h 的 HL60 细胞 HSPmRNA、GRmRNA 表达的改变以及细胞存活率的变化。

2.3 测定方法

2.3.1 GR 分析 按照 Clark^[4] 单点饱和法测培养细胞的 GR 位点。

2.3.2 细胞存活率测定 采用台盼蓝拒染法。

2.3.3 总 RNA 抽提和 Northern 印迹法^[5] 测定 GRmRNA 细胞总 RNA 抽提按照 Chomczynski^[6] 硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法加以改进^[7],经 DABA 法^[8] 测知其中 DNA 含量小于 1%,经紫外分光光度计 ($A_{260}/A_{280} > 1.8$) 后,通过电泳转移交联于尼龙膜上,与 α - ^{32}P dATP 标记的人 GRcDNA(编码 DNA 结合区)或 β 肌动蛋白(β -Actin)cDNA(比活为 $5 \times 10^8 \text{cpm}/\mu\text{g}$) 于 65°C 杂交过夜。杂交信号于 -70°C 放射自显影。湿润的尼龙膜用 10mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸 (Tris·HCl, pH 8.0), 1mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA), 0.1% (w/v) 十二烷基磺酸钠 (SDS) 于 95°C 洗 20min,可除去杂交信号,用于下 1 次杂交。

3 统计学处理 分别采用 F 检验和 t 检验,所有实验均至少重复 3 次。

结 果

1 不同处理时间热休克反应对 HL60 细胞 GR 的影响 见图 1。处理 10min 即出现 GR 明显下降,由处理前的 1540 ± 386 (位点/细胞) 降至 1235 ± 306 (位点/细胞) ($P < 0.01$), 60min 时再度出现明显下降,由 30min 时的 1123 ± 311 (位点/细胞) 降至 850 ± 214 (位点/细胞) ($P < 0.01$)。

2 不同处理时间热休克反应对 HL60 细胞存活率的影响 见图 2。处理 10min 时细胞存活率下降至 69% ($P < 0.01$), 至 60min 时降为 45% ($P < 0.05$)。

3 SFT 对热休克反应时 HL60 细胞 HSPmRNA 和 GRmRNA 表达的影响 见图 3。SFT 处理后热休克反应时 HSPmRNA 和 GRmRNA 含量明显增加。

4 SFT 对热休克反应时 HL60 细胞存活率的影响 见图 4。经 SFT 处理的细胞在热休克反应时存活率明显提高,特别是 60min 和 90min 时仍能维持在 75% 左右 ($P < 0.01$)。

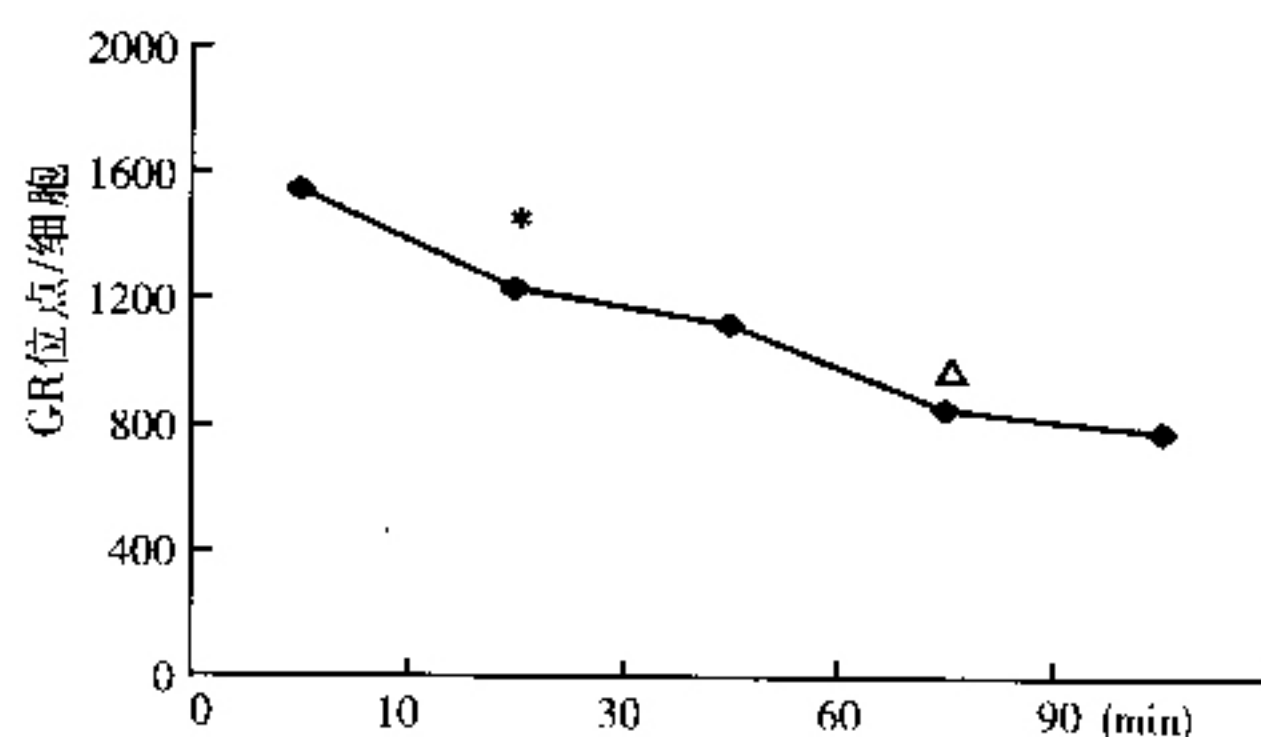


图 1 不同处理时间热休克反应对 HL60 细胞 GR 的影响

注:与处理前比较,* $P < 0.01$;与 30min 时比较,^Δ $P < 0.01$; $n = 6$

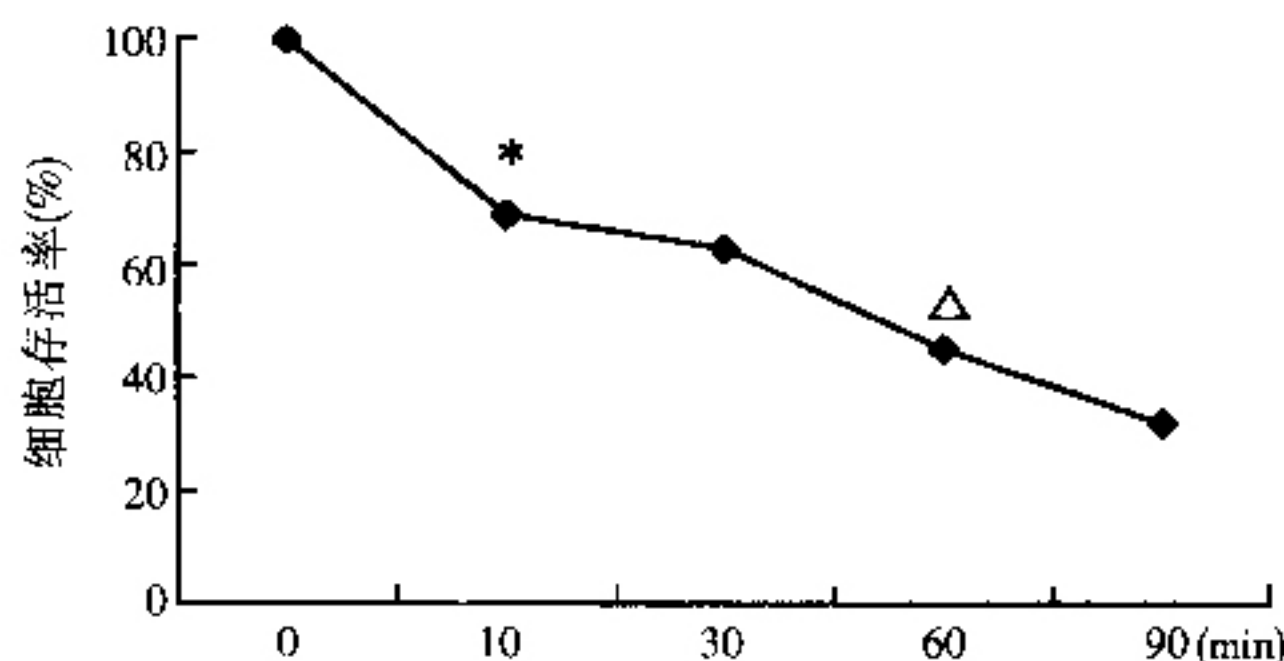


图 2 不同处理时间热休克反应对 HL60 细胞存活率的影响

注:与处理前比较,* $P < 0.01$;与 30min 时比较,^Δ $P < 0.05$; $n = 6$

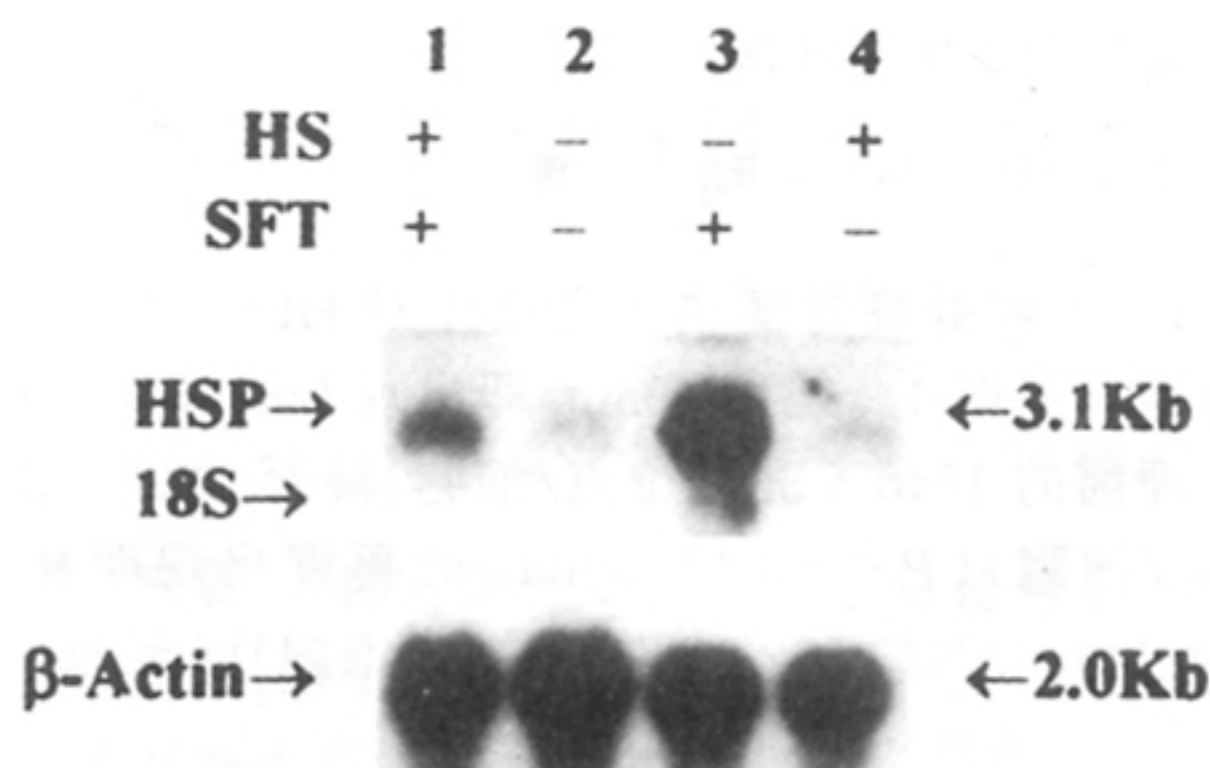


图3 Northern blot 分析热休克反应时 SFT 对 HL60 细胞 GRmRNA 和 HSPmRNA 的影响

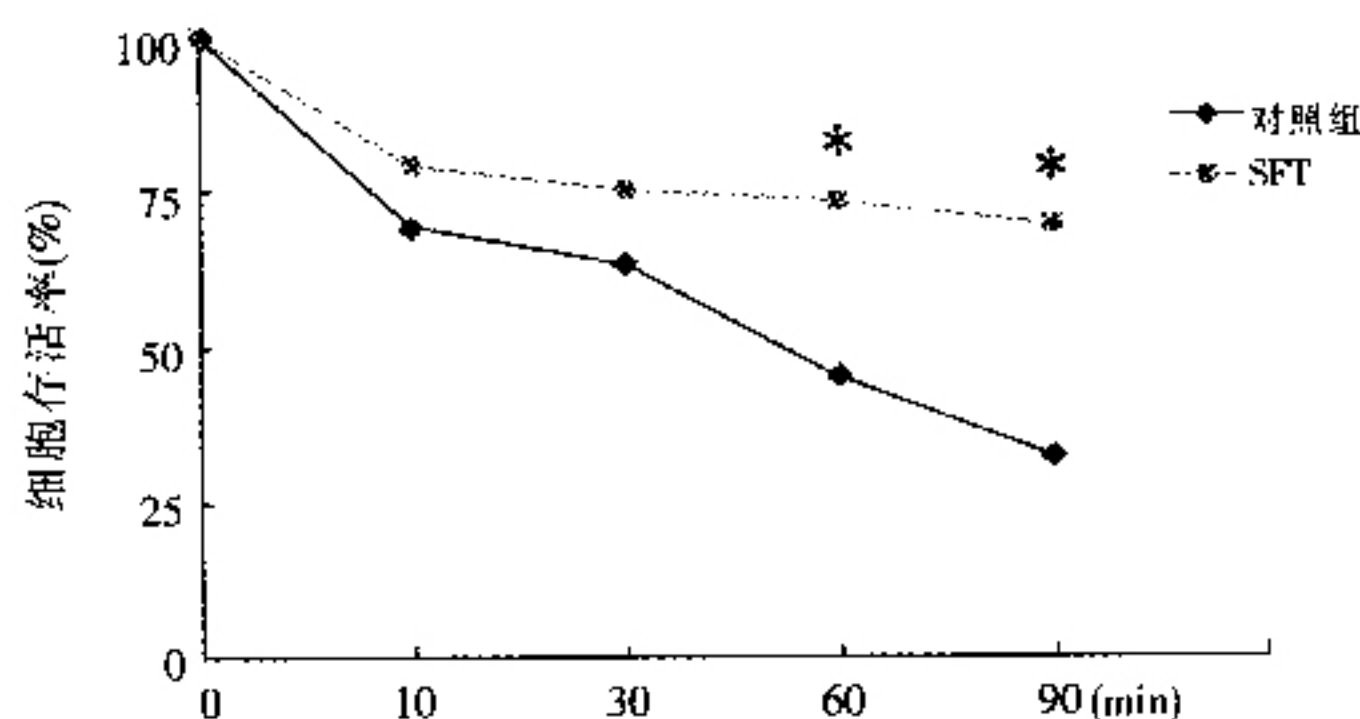


图4 SFT 对热休克反应时细胞存活率的影响

注:与对照组比较, * $P < 0.01$; $n = 6$

讨 论

热休克对细胞是一种伤害性刺激,随着热处理时间的延长,细胞存活率将大大下降,本实验中处理 10min 时 GR 含量和细胞存活率出现明显下降,主要由于热休克时 GR 受体蛋白降解加快,GC 的生物学效应下降所致,60min 时下降幅度进一步加大,这可能是由于细胞热休克反应时 GR 表达受抑制,因为 GR 的表达受基因组机制调节,时间较长。

HL60 细胞为人白血病细胞株,表达 GR,对 GC 具有较好的反应性,是研究 GC 与 GR 作用较为理想的细胞株。

HSP 与 GR 之间关系密切,其作用主要是使 GR 处于一种较稳定的未活化状态,热休克反应时 HSP 被诱导,表达明显增加,与此同时 GR 表达受抑制,HSP 增多后是否对 GR 有某种稳定作用尚不清楚,但可以肯定热休克反应时 HSP 的诱导对受伤害的细胞有明显保护作用。机体处于应激状态时主要的应激激素

GC 将大量分泌,尽管此时 GR 表达受抑制,但 GC 的生物学效应仍大大增加,从而提高机体抵抗伤害刺激的能力,这是机体的一种自我保护作用。培养细胞遇伤害性刺激时不存在 GC 的大量分泌,在热休克时由于 GR 表达被抑制,因此 GC 的生物学效应是降低的。经 SFT 处理的 HL60 细胞在热休克反应时 HSPmRNA 和 GRmRNA 表达均明显增加,由于 SFT 为大鼠血清制剂,富含 GC,因此当 GR 表达增加时 GC 的生物学效应将大大提高,从而增加了细胞的抗损伤能力;生理盐水组大鼠血清虽也富含 GC,但无此作用,表明 SFT 通过增加 GR 的表达而提高 GC 的生物学效应;HSPmRNA 表达的增加,也有利于对细胞的保护。因此经 SFT 处理的细胞在热休克时存活率大大提高。由此推测, SFT 在临床上治疗失血性休克时,提高机体组织细胞 HSP 和 GR 的表达,由于机体处于应激状态时 GC 大量分泌,而 GR 表达的增加克服了应激时 GR 含量减少,所以机体的抗休克能力大大增强, HSP 表达的增加也增强了对组织细胞的保护作用。由此可见, SFT 可上调 HL60 细胞热休克反应时 HSPmRNA 和 GRmRNA 表达,从而提高 HL60 细胞在热休克时的存活率。这可能是临床上 SFT 用于治疗失血性休克的重要作用机制之一。

参 考 文 献

- Samali A, Cotter TG. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res* 1996;223:163—170.
- Baulieu EE. Steroid hormone antagonists at the receptor level: a role for the heat-shock protein MW 90,000 (HSP 90). *J Cell Biochem* 1987;35:161—174.
- 丁培琳. 参附注射液治疗厥脱证临床疗效观察. *中医杂志* 1988;(4):25—26.
- Clark JH, Kalra SP 主编. 激素作用与分子内分泌的实验方法手册. 北京:科学出版社,1988:1—32.
- Hildebrandt F, Igarashi P 主编. 分子医学技术. 北京:科学出版社,2001:107—108.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem* 1987;162:156—159.
- Bu SZ, Yin DL, Ren XH, et al. Progesterone induces apoptosis and up-regulation of p53 expression in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer* 1997;79:1944—1950.
- Thomas PS, Leranch C, Wirkin JW, et al. Specific measurement of DNA in nuclei and acids using diaminobenzoic acid. *Anal Biol* 1978;89:35—39.

(收稿:2002-06-01 修回:2002-10-24)