论著

文章编号:1000-5404(2007)07-0568-04

热休克蛋白70在人胶质瘤耐药过程中的作用

郭春宝[1],王 珊[1],金先庆[1],张佃良[2] ([1]重庆医科大学附属儿童医院外一科,重庆 400014;[2]青岛大学医学院附属医院普通外科,青岛 266003)

提 要:目的 应用热休克人胶质瘤细胞的方法,观察热休克蛋白70(HSP 70)在人胶质瘤细胞耐药过程中的作用。**方法** 经43 ℃热处理2 h的人胶质瘤细胞,应用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫组化技术检测HSP 70 mRNA及蛋白的表达情况;应用hoechst 33258荧光染色的方法观察化疗药物阿霉素(adriamycin, ADM)作用后,不同处理组人胶质瘤细胞的凋亡情况。**结果** HSP 70免疫组化,HS+ADM组阳性率为(61.5±18.3)%,与HS组(61.0±14.1)%比较没有统计学意义,但显著高于对照组(8.50±4.09)%($P<0.05$),RT-PCR结果与免疫组织化学一致;ADM组凋亡细胞比率为(52.7±19.1)%,显著高于对照组(6.5±3.6)%($P<0.05$),HS+ADM组(25.0±10.7)%高于对照组但显著低于ADM组($P<0.05$),HS组(7.2±3.6)%与对照组没有明显差异($P>0.05$)。**结论** 热休克的方法可以诱导人胶质瘤细胞HSP 70的表达;HSP 70可能是引起人胶质瘤细胞耐受ADM的机制之一。

关键词: 人胶质瘤细胞; 热休克蛋白70; 凋亡

中图法分类号: R341; R73-36; R730.264 **文献标识码:** A

Role of heat shock protein 70 in human glioma drug resistance *in vitro*

GUO Chun-bao[1], WANG Shan[1], JIN Xian-qing[1], ZHANG Dian-liang[2] ([1]The First Department of Surgery, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, [2] Department of General Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of HSP 70 in human glioma cells by heat shocking human glioma cells SHG-44. Methods After SHG-44 cells were cultured in the condition of 43 ℃ for 2 h and then 37 ℃ for 10 h, they were cultured with adriamycin (HS+ADM, 25 ng/ml) or without (HS). SHG-44 cells getting no heat shocking and with or without adriamycin treatment served as ADM group and control. HSP 70 was examined by means of immunohistochemistry and its mRNA level was measured by RT-PCR. Results The HSP 70 positive rate was (61.5±18.3)% in HS+ADM group, with no significance to (61.0±14.1)% of HS group, but was significantly higher than control [(8.50±4.09)%, $P<0.05$]. RT-PCR analysis indicated similar outcomes. The apoptotic ratio was (52.7±19.1)% in ADM group and (25.0±10.7)% in HS+ADM group, both significanty differences were observed between these 2 groups ($P<0.05$) and in them with control [(6.5±3.6)%, $P<0.05$]. There was no significant difference in comparison of HS group [(7.2±3.6)%] and control. Conclusion Heat shock can induce the expression of HSP 70, indicating it may be involved in the drug resistance to ADM of human glioma.

Key words: human glioma cells; heat shock protein 70; apoptosis

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)广泛存在于原核、真核细胞,具有多种生物活性[1]。HSP在多种肿瘤细胞中有异常表达,与肿瘤细胞的分化和凋亡有关[2]。真核细胞中的HSP 70分布相当广泛,在应激中最为显著,是主要的HSP[3]。HSP 70蛋白在肿瘤中的作用日益受到重视。以往的研究表明,以热休克、丝裂霉素、β-榄香烯等因素处理肿瘤细胞,均能使其高表达HSP 70蛋白,但高表达HSP 70在人胶质瘤细胞的作用值得进一步探讨。本研究用人脑胶质瘤细胞株作为靶细胞,热休克后观察HSP 70蛋白的表达,以研究其在肿瘤耐药中的作用机制。

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30330590)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China(30330590)

作者简介: 郭春宝(1972-),男,山东省淄博市人,博士,主治医师,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。电话:(023)63870729, E-mail: gchunbao@yahoo.com.cn

通讯作者: 金先庆,电话:(023)63876994

收稿日期: 2006-08-26; **修回日期:** 2006-09-26

1　材料与方法

1.1　人脑胶质瘤细胞的培养

人脑胶质瘤细胞株 SHG-44 作为靶细胞，由重庆医科大学超声研究所提供。人脑胶质瘤细胞在 DMEM + 10% 小牛血清培养液中，置于 37 ℃ CO_2 培养箱中生长良好，24 ~ 48 h 传代 1 次。将 SHG-44 单细胞悬液接种于培养瓶中，同步化处理后换培养液，分成下列 4 组：①热休克后化疗组（HS + ADM）：43 ℃ 热休克 2 h，37 ℃ 10 h，阿霉素（终浓度 25 ng/ml），48 h；②单纯热休克组（HP）：43 ℃ 2 h，37 ℃ 58 h；③单纯化疗组（ADM）：37 ℃，阿霉素（终浓度 25 ng/ml），48 h；④对照组（C）：37 ℃ 培养，无阿霉素。不同时间点台盼蓝染色法做活细胞记数，绘制细胞生长曲线，细胞生长抑制率（%）=（1 - 给药组细胞数）/对照组细胞数，收集细胞再进行以下实验。

1.2　HSP 70 免疫组织化学染色

石蜡切片，二甲苯脱蜡，梯度酒精水化；3% 甲醇-过氧化氢浸泡 20 min，微波炉中抗原修复 12 min；非免疫性动物血清封闭液 37 ℃ 15 min；第一抗体抗人 HSP 70 单抗（Stressgen，Canada），室温 1 h；生物素标记的二抗，室温 10 ~ 15 min；链亲和素 · 过氧化物酶溶液，10 ~ 15 min；DAB 显色，显微镜下观察［DAB 配法：在 0.9 ml 蒸馏水中加 DAB solution A 和 DAB solution B 各 50 μl（1 ~ 2 滴）］；苏木精复染，脱水，透明，中性树胶封片。以 PBS 代替一抗体作阴性对照，已知阳性片作对照。结果判定：阳性反应为细胞膜或细胞质染成棕色。每张切片计数 200 个细胞，计算阳性细胞所占百分率。

1.3　RT-PCR 检测

收集培养细胞，加 Trizol，匀浆，加氯仿，离心取上层液相，加异丙醇沉淀 RNA，75%（DEPC 水配制）乙醇清洗，溶于 DEPC 水中。cDNA 合成：模板，Oligo（dT），DEPC 水，70 ℃ 5 ~ 10 min，然后加入 MMLV Buffer，dNTPs，Rnasin，DEPC 水，MMLV，37 ℃ 60 min，90 ℃ 5 min。PCR 扩增：dNTPs，DEPC Water，逆转录 cDNA，10 × Buffer，$MgCl_2$，引物 A，B，*Taq* 酶，混合在扩增仪上扩增；β-actin 引物序列为：S 5′-ACA CTG TGC CCA TCT ACG AGG-3′，AS 5′-AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3′，产物 621 bp；HSP 70 引物序列为：5′-CCA TGG TGC TGA CCA AGA TGA AG -3′，AS 5′-TCG TCG ATC GTC AGG ATG GAC AC-3′，产物 284 bp。反应条件为 94 ℃ 预变性 10 min，94 ℃ 45 s，60 ℃ 45 s，72 ℃ 1 min，35 循环，72 ℃ 充分延伸 10 min，1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析：琼脂糖溶于 0.5 × TBE 制成电泳胶块，加 10 μl PCR 产物（Marker）；4 V/cm，15 ~ 20 min；溴化乙淀染色，紫外光观察及照相。使用 BandLeader 3.0 分析软件，HSP 70 目的片段同内参 β-actin 的光密度比值比较。

1.4　荧光染色、计数凋亡细胞

培养细胞弃培养液，用 4 ℃ PBS（pH 7.20）冲洗 2 次。然后，用 PBS 配制的 4% 甲醛固定 10 ~ 15 min，双蒸水冲洗 2 次，室温下干燥，细胞用荧光染料 Hoechst33258（5 mg/ml Sigma 产品）染色 5 min，双蒸水冲洗，室温下干燥，甘油封片。在荧光显微镜下可观察特异性凋亡核，代表凋亡细胞。在荧光显微镜下进行细胞计数，每张片选 3 个视野记数凋亡细胞占细胞总数的比例，取均值。每次实验分对照组和实验组，各 4 个盖玻片，重复实验 3 次。

1.5　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 10.0 统计软件进行正态检验和方差齐性检验。采用单因素方差分析，多个样本两两比较的 q 检验（SNK 法）。

2　结果

2.1　热休克及化疗对细胞生长的影响

从细胞生长曲线图可以看到，随时间的延长，ADM 有较强的抑制肿瘤细胞增长的作用，并呈明显的量效关系；对照组没有细胞抑制现象；HS 组也没有细胞抑制。HS 后再应用 ADM 虽有细胞抑制但抑制作用没有直接应用 ADM 强。

2.2　HSP 70 蛋白在热休克人脑胶质瘤细胞中的表达

HSP 70 蛋白阳性着色为棕色，主要位于细胞质，分布于肿瘤组织的表层细胞，全部染色切片无非特异性背景染色，阳性与阴性染色对比鲜明。HS + ADM 组阳性率为（61.5 ± 18.3）%，显著高于对照组（8.50 ± 4.09）%（$P < 0.01$）；HS + ADM 组与 HS 组（61.0 ± 14.1）% 比较没有统计学意义（$P > 0.05$），热休克蛋白阳性表达是由热休克引起的，而应用 ADM 化疗后热休克蛋白阳性表达上升不明显（表 1）。

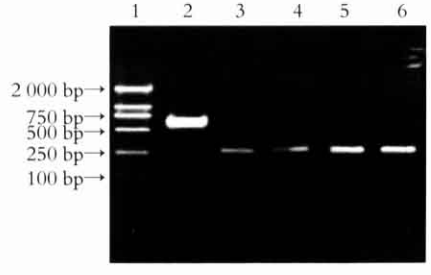
表 1　热休克及化疗对 SHG-44 细胞 HSP 70 蛋白及 mRNA 和凋亡情况的影响（$n = 6$）

组别	免疫组化（$\bar{x} \pm s$，%）	RT-PCR（$\bar{x} \pm s$）	凋亡（$\bar{x} \pm s$，%）
HS + ADM	61.5 ± 18.30[a]	0.22 ± 0.07[a]	25.0 ± 10.7[ab]
HS	61.0 ± 14.10[a]	0.24 ± 0.06[a]	7.2 ± 3.6
ADM	10.50 ± 4.85	0.11 ± 0.04	52.7 ± 19.1[a]
C	8.50 ± 4.09	0.12 ± 0.04	6.5 ± 3.6

a：$P < 0.05$，与 C 组比较；b：$P < 0.05$，与 ADM 组比较

2.3　HSP 70 mRNA 在热休克人脑胶质瘤细胞中的表达

电泳分析显示：在 284 bp 处可见一清晰目标条带（图 1），HSP 70 目的片段同内参 β-actin 的光密度比值见表 1，单因素方差分析多重组间比较检验显示，HS + ADM 组（0.22 ± 0.07），显著高于对照组（0.12 ± 0.04）（$P < 0.05$）；而 HS + ADM 组与 HS 组（0.24 ± 0.06）比较没有统计学意义（$P > 0.05$），与免疫组织化学结果一致，说明热休克可明显诱导 HSP 70 mRNA 的表达，应用 ADM 诱导 HSP 70 mRNA 的作用不明显。

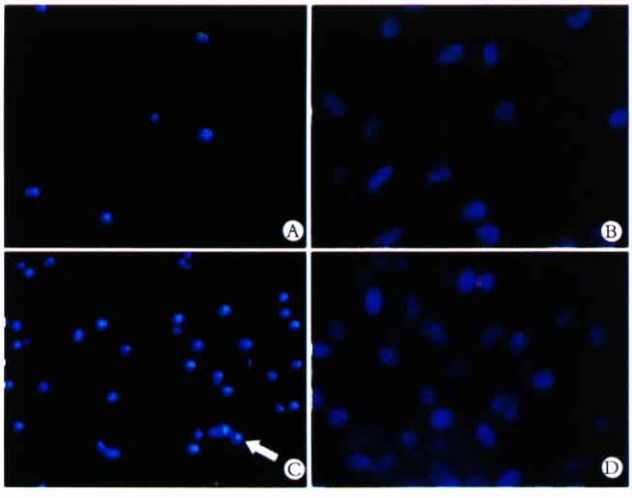


1：DNA 标准；2：β-actin；3：C；4：ADM；5：HS；6：HS + ADM

图 1　人脑胶质瘤细胞 HSP 70 mRNA 的表达

2.4 凋亡细胞形态学观察

荧光染料 hoechst 33258 染色后，正常细胞核荧光染色后表现为均匀一片，色浅且暗；凋亡细胞体积在正常缩小 40% ~ 50%，细胞核变小、固缩、核形不规则、核内块状深染，块状或点状，色深且亮，还可见到不规则的核碎片及凋亡小体。但细胞膜结构仍保持完整，并依然有排出台盼蓝的能力（图 2）。ADM 组凋亡细胞比率为（52.7 ± 19.1）%，显著高于对照组（6.5 ± 3.6）%（$P<0.05$），ADM 有明显的诱导凋亡作用；HS + ADM 组（25.0 ± 10.7）% 高于对照组但显著低于 ADM 组（$P<0.05$），热休克后人脑胶质瘤细胞明显具有耐受 ADM 的诱导凋亡作用。HS 组（7.2 ± 3.6）% 与对照组没有明显差别（$P>0.05$），提示单纯热休克不具有诱导凋亡作用（表 1）。



A：HS + ADM；B：HS；C：ADM；D：C

图 2 人脑胶质瘤细胞凋亡检测 （荧光染色 ×200）

3 讨论

热休克蛋白（HSP）因最先发现于热应激反应中而得名，是生物在不利环境下发生的一种非特异性产物，结构具高度的保守性。HSP 70 基因一般在正常情况下不表达或有微弱表达，且旋即降解，但应激因素比如缺血、缺氧、感染、创伤、低温、多种毒素等均可诱导 HSP 的合成[4]。各种应激因素诱导 HSP 合成后，机体相应适应能力增强。HSP 分类方法很多，但目前主要按其分子量将其分为 4 类：HSP 70 家族、HSP90 家族、HSP60 家族和小分子 HSP 家族，其中 HSP 70 分布最为广泛，是主要的 HSP。HSP 除作为机体的自我保护机制参与应激反应外，还具有极为重要的生理和病理生理意义[5]。小鼠在注射致死量大肠杆菌内毒素之前，用 HSP 诱导剂乙醇或亚砷酸钠预先腹腔注射，可提高小鼠的存活率。转染 HSP 表达基因后，可改善博来霉素引起的肺损伤，并提高小鼠的存活率[6]。

以往的实验研究结果证实，肿瘤组织有较高的 HSP 70 表达，Cardile 等[7]研究发现 HSP 70 在人前列腺癌细胞凋亡过程中其表达变化有重要作用。本研究结果显示，在人脑胶质瘤细胞有 HSP 70 蛋白及 mRNA 的较高表达；热休克后，其表达明显增高，与国内外报道一致，其机制可能为应激因素下出现的特异表达，而应用 ADM 对 HSP 70 的表达影响不明显，可能是高剂量的 ADM 迅速杀死肿瘤细胞且与 ADM 作用时间较短有关。但引起 HSP 70 表达上升的确切机制尚不清楚。

有研究证明，热休克蛋白可以抵抗肿瘤细胞的凋亡。HSP 70 高表达一方面介导癌基因及抑癌基因产物的构象成熟、跨膜转运，另一方面介导错配蛋白的降解，协调肿瘤细胞的蛋白质代谢平衡，使肿瘤细胞得以无限制增殖。肿瘤的形成与细胞的增殖和死亡不平衡有关，HSP 通过调控细胞周期所必须的蛋白构象，参与细胞的死亡增殖过程。HSP 可能通过下调凋亡相关的基因、蛋白和蛋白酶活性而增强了肿瘤细胞抗凋亡的能力，使肿瘤细胞的生长抑制和凋亡减弱。HSP 是抗凋亡蛋白之一。Hermisson 等[8]为了评价 HSP 在体内外的抗凋亡作用，筛选了多种人胶质瘤细胞系中 HSP 家族的表达及检测人胶质瘤标本免疫组织化学的检测，发现 HSP27 和 HSP72 的高表达与肿瘤细胞的耐药有关。而短暂的高温可以诱导 HSP72 的表达。临床标本中有较高的 HSP27、alphaBC、HSP72、HSP73 和 HSP90 表达，但是复发肿瘤及调整放化疗方案的病例，HSP 表达没有明显变化。其结论为诱生性的 HSP 在对抗凋亡及耐药中作用不很明显。而本研究表明，热休克后，细胞没有明显凋亡增加，但是可以耐受化疗药物的作用，使 ADM 作用后凋亡数量减少，其机制可能部分是有 HSP 70 表达升高引起的。

本研究仅仅观察到 HSP 70 在人胶质瘤细胞系中抗凋亡的作用，但没有深入其作用机制的揭示。Kuzelova 等[9]在研究肿瘤细胞凋亡机制的研究中观察到在肿瘤细胞系 K562 中 HSP 70 的抗凋亡作用是通过抑制凋亡的上游信号 caspases 而实现的。所以下一步的研究要探讨并筛选表达上升的 HSP 家族，评价其在抗凋亡作用中的地位，并深入探讨其机制。我们认为，在应激因素作用过程中，HSP 70 表达上升将引起肿瘤细胞对化疗药物的抵抗，这是机体对外界刺激反应性的表现，HSP 在肿瘤的治疗中具有重要的意义[10]。探讨 HSP 70 增高的机制及其作用机制将可望为治疗肿瘤提供一个新的治疗靶点，对提高肿瘤的治疗效果有着潜在的临床实用价值。

参考文献：

[1] Tsan M F, Gao B. Cytokine function of heat shock proteins[J]. Am J

Physiol Cell Physiol, 2004, 286(4): C739 - C744.
[2] Udono H, Srivastava P K. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity[J]. J Exp Med, 1993, 178(4): 1391 - 1396.
[3] Nonaka T, Akimoto T, Mitsuhashi N, *et al*. Changes in the localization of heat shock protein 72 correlated with development of thermotolerance in human esophageal cancer cell line[J]. Anticancer Res, 2003, 23 (6C): 4677 - 4687.
[4] 吴伟忠,汤晓雷,刘康达,等. 热休克对H22细胞膜HSP 70蛋白及其mRNA水平的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1998, 5(1): 5 - 8.
[5] Mosser D D, Caron A W, Bourget L, *et al*. Role of the human heat shock protein HSP 70 in protection against stress - induced apoptosis [J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(9): 5317 - 5327.
[6] Weiss Y G, Maloyan A, Tazelaar J, *et al*. Adenoviral transfer of HSP - 70 into pulmonary epithelium ameliorates experimental acute respiratory distress syndrome[J]. J Clin Invest, 2002, 110(6): 801 - 806.
[7] Cardile V, Scifo C, Russo A, *et al*. Involvement of HSP 70 in resveratrol - induced apoptosis of human prostate cancer[J]. Anticancer Res, 2003, 23(6C): 4921 - 4926.
[8] Hermisson M, Strik H, Rieger J, *et al*. Expression and functional activity of heat shock proteins in human glioblastoma multiforme[J]. Neurology, 2000, 54(6): 1357 - 1365.
[9] Kuzelova K, Grebenova D, Pluskalova M, *et al*. Early apoptotic features of K562 cell death induced by 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy[J]. J Photochem Photobiol B, 2004, 73 (1 - 2): 67 - 78.
[10] Nylandsted J, Wiek W, Hirt U A, *et al*. Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by HSP 70 depletion[J]. Cancer Res, 2002, 62(24): 7139 - 7142.

(编辑 薛国文)

文章编号:1000-5404(2007)07-0571-01

个案与短篇

口腔组织补片覆盖下颌阻生牙拔除创面的疗效

赵文峰[1],赵艳华[2],陈增力[1],刘继延[1],张伶军[1],王丽英[1]
([1]北京军区总医院口腔科,北京 100700;[2]中国人民公安大学医院口腔科,北京 100038)

下颌第3磨牙阻生牙拔除术后创伤大,拔牙后遗留的骨腔大,可造成局部感染或干槽症[1]。采用脱细胞异体真皮基质口腔组织补片覆盖拔牙创,可消除其空腔,对预防干槽症的发生起到一定的作用。

现对我科在2005年3月至6月期间的10例下颌第3磨牙阻生牙拔除术后患者,采用口腔组织补片术关闭拔牙创,临床效果满意,现报告如下。

1 临床资料

10例下颌第3磨牙阻生患者,其中,男性4例,女性6例,年龄18~25岁,平均22.6岁。下颌第3磨牙阻生牙拔除术后将片状口腔组织补片(瑞诺口腔组织补片,北京洁源伟业生物组织工程科技有限公司生产)植入拔牙窝,同时将口腔组织补片缝合于拔牙创黏膜边缘关闭拔牙创。术后1个月,取其牙龈黏膜,并以对侧下颌第3磨牙后垫牙龈作为对照(术前签署知情同意书)。标本采用HE染色,使用OLYMPUS OMC-7346光学显微镜观察切片,拍照。光镜下显示:纤维组织排列整齐,规范,无炎性细胞,与对侧下颌第3磨牙后垫牙龈无明显区别。10例患者均未出现干槽症。

2 讨论

下颌第3磨牙拔除术后可能出现出血、疼痛、肿胀和干槽

作者简介:赵文峰(1960-),男,河南省安阳市人,硕士,主任医师,主要从事口腔正畸、口腔修复和口腔颌面外科方面的研究,发表论文30余篇。电话:(010)66721957

收稿日期:2006-11-20;修回日期:2007-01-24

症等并发症,严重地影响患者的生活质量。为了预防和减少下颌第3磨牙拔除术后并发症的出现,国内外学者提出了一些方法[2-4],但效果不能确定。

口腔组织补片是一种新型的组织工程材料,采用脱细胞技术,将异体组织经过脱细胞处理,保留细胞外基质,有效地解决了组织移植的排异反应。其作用机制为植入后诱导宿主细胞有序长入,从而完成组织的修复和重建。

口腔组织补片生物相容性好,周围上皮易于爬行,能够保护创面。应用于下颌第3磨牙阻生牙拔除术后拔牙创,可以隔离外界刺激,缩小拔牙窝,有效保护血凝块。本组中组织学观察下颌第3磨牙阻生牙拔除术采用口腔组织补片封闭拔牙创后的牙龈组织与正常牙龈组织无明显区别,未见干槽症出现,提示口腔组织补片应用于下颌第3磨牙拔除术对干槽症预防有一定作用。

关键词:口腔组织补片;阻生牙;拔牙术
中图法分类号:R782.11 文献标识码:B

参考文献:

[1] Alexander R E. Dental extraction wound management: a case against medicating postextraction sockets[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2000, 58(5): 538 - 551.
[2] Poeschl P W, Eckel D, Poeschl E. Postoperative prophylactic antibiotic treatment in third molar surgery-a necessity? [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2004, 62(1): 3 - 8.
[3] Alkan A, Metin M, Arici S, *et al*. A prospective randomised cross-over study of the effect of local haemostasis after third molar surgery on facial swelling an exploratory trial[J]. Br Dent J, 2004, 197(1): 42 - 44.

(编辑 王 红)