

控制其基因突变率,才是发挥真正意义上的保护效应。过去的大量研究已经证实,热休克预处理可以通过抑制细胞凋亡,提高细胞的存活率。我们的研究则证明:热休克预处理对过氧化氢所致成体细胞——V79 细胞 HPRT 基因突变具有显著的保护作用,这对于研究热休克预处理,即热休克蛋白对损伤细胞的保护效应有重要理论意义。热休克预处理降低 HPRT 基因突变的机制目前还不清楚,需要进一步的深入研究。但我们推测,这可能与热休克蛋白能稳定染色体结构、减轻 DNA 损伤有关。

参 考 文 献

- [1] 肖献忠,王燕如,刘梅东,等.热休克预处理抗过氧化氢所致心肌细胞损伤保护作用的细胞分子机理.中国病理生理杂志,1997,13:65-69.
- [2] 张雪岩,孔玮,贾琳琳,等.热休克预处理对晶状体上皮细胞过氧化氢氧化损伤的保护作用.眼科进展,2005,25:325-328.
- [3] 王燕如,黄生宁,罗正曜,等.热休克基因表达对抗过氧化氢所致肺内皮细胞损伤的保护作用.中国病理生理杂志,1996,12:566-568.
- [4] 王燕如,肖献忠,黄生宁,等.热休克基因表达对抗过氧化氢所致肺巨噬细胞损伤的保护作用.湖南医科大学学报,1997,22:1-4.
- [5] Spitz DR, Dewey WC, Li GC. Hydrogen peroxide or heat shock induces resistance to hydrogen peroxide in Chinese hamster fibroblasts. J Cell Physiol, 1987, 131:364-366.
- [6] 刘梅冬,肖卫民,蒋碧梅,等.过氧化氢对 K562 细胞凋亡的影响.湖南医科大学学报,2003,28:499-501.
- [7] Ziegler-Skylakakis K, Andrae U. Mutagenicity of hydrogen peroxide in V79 Chinese hamster cells. Mutat Res, 1987, 192:65-67.
- [8] 徐洪兰,曹毅,吴启庆,等.⁶⁰Co 射线诱发的 V79 细胞 HPRT 基因位点突变频率.中国辐射卫生,1995,4:203-205.
- [9] 李征宇,赵霞.热休克蛋白对细胞凋亡信号转导途径的调节.中国科学 C 辑生命科学,2004,34:6-10.
- [10] Calini V, Urani C, Camatini M. Over expression HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. Toxicol In Vitro, 2003, 17:561-566.

(修回日期:2007-06-30)

(本文编辑:吴倩)

· 研究简报 ·

热休克处理对 NIH3T3 细胞 DNA 双链断裂的影响

李明 张保国 洪承蛟 陆明康

热休克可以导致一系列的生物学效应,包括基因活化、细胞周期阻滞、存活和凋亡等^[1]。很多研究报道证实,热休克预处理可以减少随后高热或其它毒性因子对细胞的损伤,这些报道均假定热休克处理本身所诱发的 DNA 双链断裂(DNA double strand breaks, DSBs)很少^[2]。DNA 双链断裂与细胞的染色体畸变和细胞死亡都有非常密切的关系,是细胞毒理学中一种非常重要的损伤类型。热休克效应诱导的 DNA 双链断裂情况对于选择热休克预处理条件是非常重要的。Iliakis 等^[3]就用中性滤膜洗脱技术检测细胞的 DSBs,认为热休克效应不会产生明显的 DNA 双链断裂。Wong 等^[4]用了较为敏感的脉冲场电泳技术来检测 DNA 的双链断裂,但得到了与 Iliakis 相同的结论。另一方面, Miyakoda 等^[5]观察到热休克处理可以引起 ATM 蛋白激活,导致 P53 磷酸化(在 Ser-15),这一信号传导通路是由 DSB 损伤激活的。Nueda 等^[6]报道,缺乏 DSB 修复能力的细胞,热休克处理诱导的细胞凋亡比正常细胞高。这些研究结果又表明细胞热处理后,细胞 DNA 会产生双链断裂。因此,需要用更灵敏的方法来检测热休克处理诱导的 DNA 双链断裂,证实热休克处理对细胞 DNA 双链断裂的影响。

当 DNA 产生双链断裂时, H2AX 可以迅速地磷酸化,磷酸

化出现在 H2AX 保守的羧基端的尾部 Ser139 残基上。磷酸化的 H2AX,称为 γ -H2AX。由于 H2AX 的磷酸化可以快速诱导和放大,所以每个双链断裂诱发 γ -磷酸化的 H2AX 可以发生在 DSB 附近一个“很大”的区域,估计大约有染色质的两个巨碱基或数个核小体那么大^[7],用荧光标记的抗 γ -H2AX 抗体与 γ -H2AX 结合,就可以在激光共聚焦显微镜(或荧光显微镜)下观察到一个代表 H2AX 磷酸化的荧光斑点。而且由于 γ -H2AX 斑点数量与 DSBs 的数量是 1:1 对应的,因而检测 γ -H2AX 数量成为探测 DNA DSBs 数量的重要方法^[8]。

本研究拟通过用 γ -H2AX 免疫荧光染色的方法检测 DNA 双链断裂,研究热休克处理对 DNA 双链断裂的影响。

材料和方法

一、主要试剂和仪器

1. 试剂:DMEM 培养基购自 Gibco 公司,胰酶购自 Amresco 公司,小牛血清为杭州四季青产品,抗 γ -H2AX 小鼠单克隆抗体购自美国 Upstate 公司,二抗(羊-抗-鼠-FITC)购自华美生物工程公司,BSA 购自 Roche 公司,Triton X100 购自 Amersham 公司,乙醇、Tris 碱和氯化钠均购自国药集团。6 孔板购自 Corning 公司。

2. 仪器:培养箱为 THERMO FORMA 3111 CO₂ 培养箱,激光共聚焦显微镜(LSCM)和软件皆为 Leica 公司产品,倒置显微镜为日本 OLYMPUS 公司 CK41,恒温水箱为上海精宏实验

基金项目:国家自然科学基金(10275083)

作者单位:215123 苏州,苏州大学放射医学与公共卫生学院,江苏省放射医学与防护重点实验室

通讯作者:张保国, Email: bgzhang@suda.edu.cn

设备公司产品。

3. 培养细胞: NIH3T3 细胞购自中科院上海细胞研究所。NIH3T3 细胞采用 DMEM 培养基加 10% 的小牛血清在 37℃、5% CO₂ 条件下培养。选对数生长期的细胞, 消化稀释接种到六孔板中的盖玻片上, 待细胞长满盖玻片的 50% ~ 70% 左右时, 对细胞进行热休克处理。

二、热处理和检测方法

1. 分组及热处理: 细胞分为对照组 (37℃)、39℃ 热处理组、42℃ 热处理组、43℃ 热处理组、45℃ 热处理组。按分组将细胞分别在 CO₂ 培养箱中用不同温度热处理 0.5 h, 然后立即按以下方法处理细胞。

2. 免疫荧光染色: 取热处理好的细胞, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 0.5 h 后, 立即弃培养液, 用温盐 TBS 洗 1 次; 加入 4% 多聚甲醛 4℃ 固定 20 min; 再用 TBS 洗涤 5 min, 洗 3 次; 然后, 加入含 2% BSA、0.3% Triton-X100 的 TBS 封闭 1 h; 再用含 2% BSA、0.3% Triton-X100 的 TBS 稀释的抗 γ -H2AX 小鼠单克隆抗体 (1:500) 4℃ 过夜, TBS 洗涤 5 min, 洗 3 次; 加入羊-抗-鼠-FITC 二抗孵育 1 h, TBS 洗涤 5 min, 洗 3 次; 20% 的甘油封片避光待检。激光共聚焦显微镜下观测有荧光斑点的细胞数量及每个细胞核内 DNA 双链断裂所产生的荧光斑点数量。每个试验组至少观测 100 个细胞。

结 果

首先观察在正常条件下培养、没有经过热处理的细胞, 当经过抗体标记后, 大多数细胞在共聚焦显微镜下观察不到细胞核中有 DNA 双链断裂形成的亮斑。只有少数细胞有微弱的亮斑。有亮斑的细胞数小于细胞总数的 5% (图 1A ~ B, A 为无一抗对照)。

当细胞在 45℃ 条件下热处理后, 用抗体标记, 在激光共聚焦显微镜下则可以观察到所有细胞核中都有因 DNA 双链断裂而形成的斑点, 有的细胞整个核都染成绿色, 有的则只有少量 DNA 断裂而形成的斑点, 但多数细胞核有大量 DNA 断裂而形成的斑点 (图 2)。

尽管都是 45℃ 条件下处理, 但细胞核中的斑点数量和形状却不同, 有的细胞中是斑点多但斑点较小 (图 3A), 有的细胞中的斑点少, 但是大而清晰 (图 3B)。

经过观察, 39℃ 处理的细胞, 核内双链断裂的斑点无明显增多, 细胞数有少量增多。42℃ 处理的细胞有双链断裂斑点的细胞数和核内斑点增多不明显, 但经过 43℃ 处理的细胞细胞核中有双链断裂的斑点的细胞和细胞核中的斑点数量都有显著的增多。经过 45℃ 处理的细胞几乎所有细胞核中都有大量的双链断裂所形成的斑点 (图 1C ~ F)。

数出各个温度处理后有双链断裂斑点的细胞和这些细胞中的双链断裂的数量, 分别以核内斑点数 0 ~ 10, 10 ~ 20, 20 ~ 30, 30 ~ 40, 40 ~ 50 为区间作图 (图 4)。可以看出在处理温度低于 42℃ 时, 核内斑点小于 10 个的细胞都占到了 75% 以上; 当温度升到 43℃ 以后, 可见每个核中小于 10 个斑点的细胞的比例突然降到了 30% 左右; 而当温度升高到 45℃ 以后, 核中小于 10 个斑点的细胞已经少于所数细胞比例的 5%。核内斑点大于 20 个的细胞数量在 43℃ 和 45℃ 后都有大量增加, 以 45℃ 增多的更为明显, 可以达到 30% 左右。

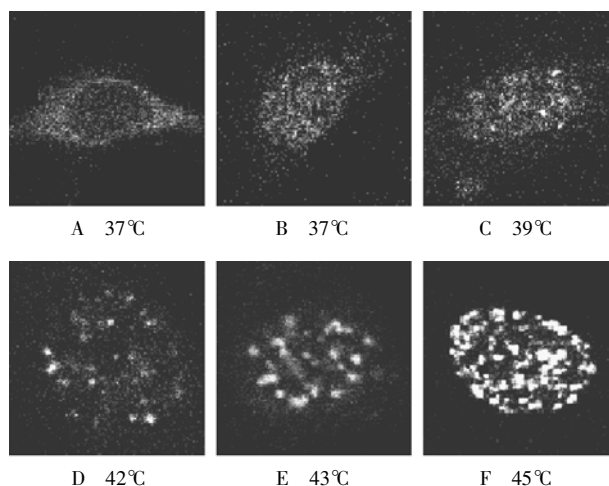


图 1 不同温度处理 30 min 后, 抗 γ -H2AX 抗体标记的细胞的激光共聚焦显微结构 (免疫荧光染色, $\times 400$)

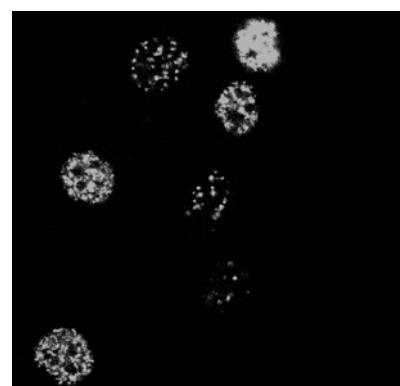


图 2 45℃ 处理后用抗 γ -H2AX 抗体标记的细胞的激光共聚焦显微结构

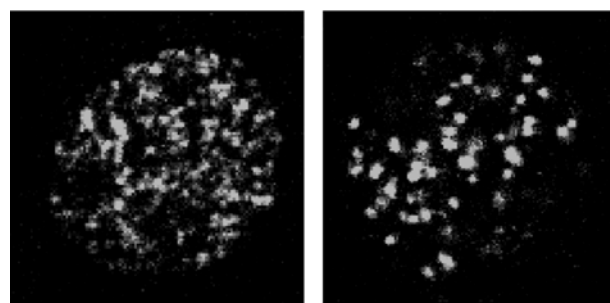


图 3 45℃ 处理后两种不同断裂斑点

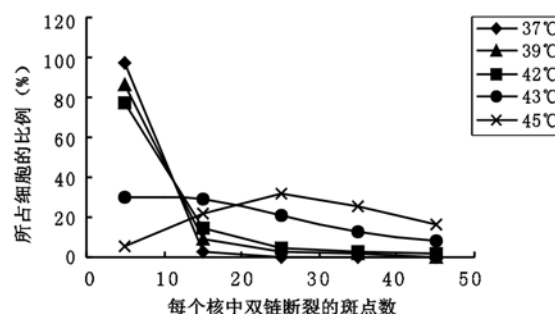


图 4 不同温度下每个细胞核中的断裂点的分布, 每个温度至少数 100 个细胞

讨 论

本实验利用 γ -H2AX 免疫染色的方法来检测小鼠胚胎成纤维细胞 NIH3T3 在各种热休克处理条件下的 DNA 双链断裂情况。从实验结果可以看出, γ -H2AX 免疫染色的方法是一种非常灵敏的检测 DNA 双链断裂的方法, 可以观察到不同的热休克处理条件下, DNA 双链断裂量的明显变化。从以上的实验结果可以发现 39℃ 和 42℃ 只有少数细胞有少量的双链断裂, 而当温度达到 43℃ 时多数细胞有大量双链断裂, 45℃ 时所有细胞皆有大量双链断裂。实验结果表明: 对细胞进行热休克处理可以导致细胞 DNA 的双链断裂, 温度在 42℃ 以上时, 可以产生大量的 DNA 双链断裂, 热处理温度低于 42℃ 时, 产生的 DNA 双链断裂很少。这与 Kaneko 等^[9]的研究结果一致。

DNA 双链断裂是一种非常重要的细胞损伤类型, 如不能修复将导致细胞基因组的不稳定, 产生基因突变, 导致细胞死亡或癌变。利用热休克预处理减少有害因素对细胞的损伤时, 应尽量减少热休克预处理诱导的 DNA 双链断裂。根据我们的实验结果, 在研究热休克预处理对细胞的保护作用时, 热休克处理的温度应该选择 42℃ 或以下的温度。肖献忠等^[10]研究发现, 39℃ 作为热处理条件并不能明显提高热休克蛋白的基因表达量、细胞的存活率、SOD 值和过氧化氢酶活性等。所以最适宜的热休克处理温度应该处于 39℃ 以上、42℃ 以下。当温度适宜时, 热休克本身所引起的双链断裂并不会对细胞造成明显的损伤, 热休克预处理如何产生对细胞的保护作用, 具体机制有待进一步的实验研究。

参 考 文 献

- [1] Das DK, Maulik N, Moraru II, Gene expression in acute myocardial

- stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. J Mol Cell Cardiol, 1995, 27:181-193.
- [2] 李征宇, 赵霞. 热休克蛋白对细胞凋亡信号转导途径的调节. 中国科学 C 辑生命科学, 2004, 34:6-13.
- [3] Iliakis G, Seaner R, Okayasu R. Effect of hyperthermia on the repair of radiation-induced DNA single and double strand breaks in DNA double strand break repair deficient and repair proficient cell lines. Int J Radiat Biol, 1995, 68:141.
- [4] Wong RSL, Dynlacht JR, Cedervall BW, et al. Analysis by pulsed field gel electrophoresis of DNA double strand breaks induced by heat and/or X-irradiation in Bulk and replicating DNA of CHO cells. Int J Radiat Biol, 1995, 68:141.
- [5] Miyakoda M, Suzuki K, Watanabe M, Activation of ATM and phosphorylation of p53 by heat shock. Oncogene, 2005, 21:1090-1096.
- [6] Nueda A, Hudson F, Mivechi NF, et al. DNA dependent protein kinase protects against heat-induced apoptosis. J Biol Chem, 1999, 274:14988-14996.
- [7] Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J Biol Chem, 1998, 273:5858-5868.
- [8] Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, et al. H2AX: the histone guardian of genome. DNA Repair (Amst), 2004, 3:959-967.
- [9] Kaneko H, Igarashi K, Kataoka K. Heat shock induces phosphorylation of histone H2AX in mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328: 1101-1106.
- [10] 肖献忠, 王燕如, 刘梅冬, 等. 热休克预处理抗过氧化氢所致心肌细胞损伤保护作用的细胞分子机理. 中国病理生理杂志, 1997, 13:65-69.

(修回日期:2007-07-10)

(本文编辑:熊芝兰)

《中华物理医学与康复杂志》2007 年第 9 期 “继续教育园地”测试题

读杂志、获学分, 本刊继续教育园地栏目每期推出, 只要您每期阅读该栏目文章, 正确填写答题卡寄回本刊编辑部, 您就可获得国家 II 类继续教育学分, 每期 1 分, 全年可获得 12 分。

测试题(文章见本期 647 页, 答题卡见本期 646 页):

1、WHO 关于心脏康复的定义是:

- A. 确保心脏病患者获得最佳的体力、精神、社会功能的所有方法的总和
B. 溶栓治疗
C. 减轻症状
D. 介入治疗

2、心脏康复分期中不包括哪一期:

- A. 住院期
B. 出院期
C. 预防维持期
D. 随访期

3、心脏康复的内容是:

- A. 医疗评估
B. 体力活动
C. 改变生活方式、健康教育及心理社会支持

D. 以上均是

4、心脏康复对象是:

- A. 心肌梗死(ST 段抬高心肌梗死, 非 ST 段抬高心肌梗死)、稳定性心绞痛
B. 冠脉血管重建术后患者
C. 起搏器植入术后, 已控制的心衰、其他血管或心脏病患者
D. 以上均是

5、心脏康复治疗时运动处方的制定不包括下列那一项:

- A. 运动强度与运动持续时间
B. 运动频率
C. 运动类型
D. 预热期与放松期