

· 经验交流 · 文章编号: 1000-2790(2000)02-S0015-01

热诱导培养角朊细胞表达 HSP70

廖文俊¹, 刘彦仿², 刘玉峰¹ (第四军医大学: ¹ 西京医院皮肤科, ² 病理学教研室, 陕西 西安 710033)

关键词: 角朊细胞; 热休克蛋白

中图分类号: R 329 文献标识码: B

0 引言 热休克蛋白(HSP)是一类当细胞受到各种有害因素刺激时合成增多的蛋白质,在细胞内蛋白的加工过程中具有重要作用。我们对体外培养的角朊细胞进行热处理,然后观察细胞中HSP70的表达情况,并对其意义进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 角朊细胞无血清培养基(KC-SFM)(Gibco BRL),鼠抗人HSP70单克隆抗体(Santa Cruz公司),生物素化羊抗鼠IgG及SABC试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),HSP70寡核苷酸探针(上海生命技术公司合成)。

1.2 方法 取手术包皮(本校西京医院门诊手术室提供),用 $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 洗必泰液和无菌生理盐水漂洗, $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Dispase 4 消化过夜。次日分离真皮,将表皮部分再用 $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰酶室温消化10 min,反复轻柔吹打,200目筛网过滤除渣,DMEM培养液洗涤细胞2次,用KC-SFM制成角朊细胞悬液,接种于培养瓶中,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $50\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}\text{CO}_2$ 孵箱中培养,待细胞长满瓶底后进行热处理。将培养的原代角朊细胞置 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ CO_2 孵箱中热处理1 h,再置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ CO_2 孵箱中继续培养,分别于热处理后2、4和8 h收集细胞,并提取细胞内总蛋白及RNA。取等量待测样品做SDS-PAGE电泳,电转移至硝酸纤维素膜, $30\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 牛血清白蛋白4 封闭过夜,分别加鼠抗人HSP70单克隆抗体、生物素化羊抗鼠IgG和SABC复合物于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作用1 h,4-氯-1-萘酚显色。行Western印迹分析,RNA斑点杂交用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP5}'\text{-末端标记法}$ 制备探针。异硫氰酸胍一步法提取细胞总RNA,将样本点于尼龙膜上,置真空干燥箱中 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤膜2 h, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预杂交2 h,加入 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -HSP70寡核苷酸探针 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜,放射自显影。

2 结果 Western印迹分析结果显示,正常细胞组在 M_r 70 000处出现一条染色带,此带的位置与HSP70的分子

质量一致;加热处理各组角朊细胞在相同位置也有一条染色带,但着色深度明显强于正常细胞组(图1)。RNA斑点杂交结果也显示,热处理2 h后HSP70mRNA即增高(图2)。提示体外培养的皮肤角朊细胞可以构成性表达HSP70,如经热处理后,细胞内HSP70的表达水平明显增高,而且这种热诱导表达可以持续到热处理后8 h。

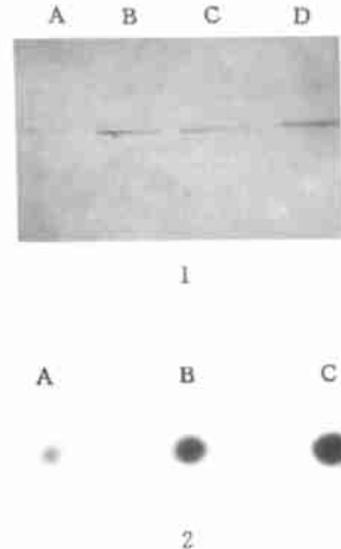


图1 Western印迹分析 A. 正常角朊细胞; B. 热处理后2 h; C. 热处理后4 h; D. 热处理后8 h

图2 RNA斑点杂交 A. 正常角朊细胞; B. 热处理后2 h; C. 热处理后4 h

3 讨论 我们发现,正常人皮肤角朊细胞可构成性表达HSP70,包括角质层、棘细胞层、毛囊外根鞘、汗腺上皮和皮脂腺导管上皮均呈阳性反应^[1]。为研究体外培养的皮肤角朊细胞HSP70的构成性表达及诱导表达情况,我们对普通培养条件下及热处理后的培养角朊细胞中的HSP70进行了RNA斑点杂交和Western印迹分析,结果显示,普通条件培养的角朊细胞即可表达HSP70,经热处理后则可诱导高表达。由于皮肤经常暴露于各种有害环境因素之下,角朊细胞中构成性表达HSP70,并在受热刺激后合成表达增加,这种现象可能是一种适应性细胞保护,有利于保护细胞免受外界有害因素的损伤^[2]。有关热诱导角朊细胞表达HSP70的时间变化特点及其意义,将在进一步的实验中进行探讨。

参考文献

- [1] 廖文俊, 叶 苓, 刘彦仿 *et al*. 热休克蛋白72在皮肤鳞状细胞癌中的表达[J]. 第四军医大学学报, 1998; 19(5): 580
- [2] Feige U, Polla BS. Heat shock proteins: the hsp70 family[J]. *Experientia*, 1994; 50(11-12): 979-986

收稿日期: 1999-04-07; 修回日期: 1999-05-31

作者简介: 廖文俊(1963-),男(汉族),四川省自贡市人,博士,现为广州中山医科大学博士后 Tel: (020) 87755766-8377

编辑 许昌泰