

谷氨酰胺体外对大鼠晶状体上皮细胞 HSP70 和 NF- κ B 表达的影响

刘 瑜, 鲁建华, 张文芳, 李姗姗, 曲来强

作者单位:(730030)中国甘肃省兰州市,兰州大学第二医院眼科
作者简介:刘瑜,男,主治医师,在读硕士研究生,研究方向:白内障、青光眼。

通讯作者:鲁建华,男,博士,硕士研究生导师. lujianhua266@sina.com

收稿日期:2010-06-17 修回日期:2010-07-19

Influence of glutamine on the expression of HSP70 and NF- κ B

Yu Liu, Jian-Hua Lu, Wen-Fang Zhang, Shan-Shan Li, Lai-Qiang Qu

Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Correspondence to: Jian-Hua Lu. Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. lujianhua266@sina.com

Received:2010-06-17 Accepted:2010-07-19

Abstract

• **AIM:** To study the effect of glutamine (Gln) on the expression of heat shock protein 70 (HSP70) and NF- κ B *in vitro*.

• **METHODS:** HSP70 and NF- κ B expression was detected by ELISA in different times (3, 12, 24 hours) after the lenses of rats were cultivated in MEM cultural medium.

• **RESULTS:** The expression of HSP70 in the Gln group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$); On the contrary, the expression of NF- κ B in the Gln group was significantly lower than that of control group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Gln can induce the expression of HSP70 in the lens epithelial cells of rat and inhibit the expression of NF- κ B.

• **KEYWORDS:** glutamine; heat shock protein 70; NF- κ B; lens epithelial cells; ultraviolet

Liu Y, Lu JH, Zhang WF, *et al.* Influence of glutamine on the expression of HSP70 and NF- κ B. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(9):1662-1664

摘要

目的:探讨谷氨酰胺(Gln)体外对晶状体上皮细胞 HSP70

和 NF- κ B 的作用。

方法:采用 ELISA 法检测在 MEM 培养液里培养 3, 12 和 24h 晶状体上皮细胞 HSP70 和 NF- κ B 的表达水平。

结果:谷氨酰胺注射各组 HSP70 蛋白的表达量均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 谷氨酰胺注射各组 NF- κ B 的表达较对照组显著降低 ($P < 0.05$)。

结论:谷氨酰胺能诱导晶状体上皮 HSP70 蛋白的表达, 抑制 NF- κ B 的表达。

关键词:谷氨酰胺; 热休克蛋白 70; 核转录因子; 晶状体上皮细胞; 紫外线

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.09.007

刘瑜, 鲁建华, 张文芳, 等. 谷氨酰胺体外对大鼠晶状体上皮细胞 HSP70 和 NF- κ B 表达的影响. 国际眼科杂志 2010;10(9):1662-1664

0 引言

白内障是当今国内外的第一致盲的眼病,同时也是眼科的常见病,估计目前全世界有 2500 万人因此而失明。我国目前盲人中约有半数是由白内障引起的,并且每年新增白内障患者约 40 万。随着人口增加和老龄化,这一数字还会增加。现今对白内障的治疗主要还是以手术治疗为主,因此研究白内障的非手术疗法来预防和治疗白内障势在必行,白内障的发病原因很多,有老化、遗传、代谢异常、外伤、辐射、中毒、局部营养障碍等,其中紫外线引起白内障的现象已经在许多流行病学和实验研究中得到证实^[1]。大量的实验研究已经证明 HSP70 在紫外线和氧化损伤所致白内障的晶状体上皮细胞中处于高表达的水平,在晶状体上皮细胞的凋亡和晶状体蛋白变性等方面具有积极的保护作用,热休克蛋白 70 的研究已经成了白内障基础研究的热点;细胞核转录因子核因子- κ B (NF- κ B) 是一种作用广泛的转录因子,在高等生物受外界免疫、应激和炎症等刺激后发生的细胞早期反应以及相关基因表达方面起着重要的调节作用,参与炎症反应、生长调控和细胞凋亡。谷氨酰胺(Gln)是一种条件性必需氨基酸,当人体处于应激条件下时,Gln 不能满足人体需要,而添加 Gln 有助于增强人体的抗应激能力。近年研究发现,Gln 能诱导小鼠肝脏、子宫、卵巢组织和囊胚 HSP70 的表达,并且 HSP70 的表达随着 Gln 剂量的加大而增加^[2],耿桂启等^[3]研究显示谷氨酰胺预处理可抑制大鼠肠缺血/再灌注后肺组织 NF- κ B 的表达,其机制可能与诱导 HSP270 表达有关。但是国内外关于 Gln 对大鼠晶状体上皮细胞 HSP70 和 NF- κ B 表达的影响还尚未见报道,我们通过 ELISA 法研究紫外线所致白内障晶状体上皮 HSP70 和 NF- κ B 的表达及谷氨酰胺对

表1 HSP70 和 NF-κB 在晶状体上皮细胞的表达含量和 12h 晶状体混浊程度

各组	HSP70(ng/L)			NF-κB(ng/L)			晶状体混浊程度(n=20)				
	3h	12h	24h	3h	12h	24h	-	+	++	+++	++++
A 组	46 ± 3	52 ± 3	63 ± 3	632 ± 12	371 ± 8	289 ± 7	0	0	3	5	12
B 组 ^a	80 ± 5	102 ± 4	168 ± 5	317 ± 9	193 ± 6	136 ± 4	0	2	4	4	10
C 组 ^a	151 ± 4	214 ± 7	335 ± 7	154 ± 4	95 ± 4	72 ± 5	0	5	6	3	6
D 组 ^a	301 ± 8	394 ± 9	692 ± 9	60 ± 2	49 ± 3	42 ± 2	0	8	6	4	2

^aP < 0.05 vsA 组。

其的影响。拟解决的关键问题旨在明确 Gln 是否能够诱导大鼠晶状体上皮细胞中 HSP70 的表达及对 NF-κB 表达的影响,以期通过调控晶状体上皮细胞中 NF-κB 和 HSP70 的表达实现增强晶状体上皮细胞抗氧化应激能力和保护晶状体上皮细胞。

1 材料和方法

1.1 材料 健康 SPF 级 SD 大鼠 60 只(兰州大学实验动物中心提供)雌雄兼备,体质量 180 ~ 240g。实验前双眼前节检测均正常,对动物的处置方法符合动物伦理学要求。谷氨酰胺准品(干粉状,由武汉博士德公司提供),MEM 培养液,胎牛血清,大鼠热休克蛋白 70 (HSP70) ELISA Kit,大鼠核转录因子核因子-κB (NF-κB) ELISA Kit (USCNLIFE™公司),ELISA(酶联免疫仪)和 UV 光源选用 250W 高压汞灯(UV-A,UV-B 混合光源),微型台式离心机,微型移液管等分别由甘肃省中医学院生化实验室和病理教研组提供。

1.2 方法 SD 大鼠根据尾静脉注射的药物不同随机分成 4 组(n = 15),A 组(生理盐水)为对照组,B 组(Gln 0.15g/kg),C 组(Gln 0.45g/kg),D 组(Gln 0.75g/kg)为实验组即谷氨酰胺处理组,各组大鼠于注射药物 4h 断颈处死。摘取其眼球,无菌条件下洗净血迹,小心剔除肌肉、筋膜等软组织,用含有 320kU/L 庆大霉素的生理盐水冲洗 10min。由后极部剪开巩膜,取出晶状体。将晶状体放入盛有 3mL 的 MEM 培养液(100mL/L 小牛血清,青霉素 100kU/L,链霉素 0.1g/L,pH7.4)的 24 孔培养液内,置 50mL/L CO₂ 的培养箱中恒温 37℃ 培养 8h 后,弃去因操作损伤致混浊的晶状体,留取透明晶状体进行实验。将筛选好的 120 只各组透明晶状体,置于紫外线光源下方 50cm 处,撤去培养液盖板,晶状体表面上液保留约 1mm,其余培养液移走照射 30min,照射完毕后送回培养箱继续培养,分别于照射后继续培养 3,12,24h 后进行检测。制备 SD 大鼠晶状体匀浆^[1]:用圈匙托起晶状体,称后,置于含 8.6g/L 生理盐水匀浆器内,在冰浴下磨研 5min,10000r/min 高速离心 15min,取上清液测定各指标;用纯化的抗体包被微孔板,制成固相载体,往包被抗 HSP70 或 NF-κB 抗体的微孔中依次加入标本或标准品、生物素化的抗 HSP70 抗体、NF-κB 抗体,HRP 标记的亲合素,经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 HSP70 和 NF-κB 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(A 值),计算样品 HSP70 或 NF-κB 浓度。

统计学分析:所有数据采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,若差异有统计学意义,两组间比较用最小显著差 LSD-t 检验,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HSP70 和 NF-κB 的含量 经紫外线诱导的晶状体上皮细胞中 HSP70 的表达在 3,12,24h 用谷氨酰胺干预组均比对照组含量增加,并且随着谷氨酰胺浓度和干预时间的延长 HSP70 表达随之增强(表 1);NF-κB 的表达随着谷氨酰胺剂量的增加而明显减弱,统计学分析具有显著差异(P < 0.05,表 1)。

2.2 晶状体混浊程度分析 大鼠晶状体离体经紫外线照射后培养 3h 开始,大鼠晶状体逐渐开始混浊,每 2h 裂隙灯下观察大鼠晶状体混浊程度进展,依据 Zhang 等^[4]对紫外线白内障进行分级:-晶状体透明;+ 晶状体前囊混浊;++ 前囊膜及周边混浊;+++ 裂隙灯可见前皮质混浊;++++ 皮质混浊明显,肉眼即可见。分析结果见表 1。

3 讨论

白内障是世界范围内主要的致盲原因,流行病学调查表明,紫外线辐射可致晶状体混浊,氧化损伤是白内障形成的重要因素,不同类型白内障共同的细胞学基础是晶状体上皮细胞的凋亡^[5]。晶状体上皮细胞凋亡导致细胞密度降低,影响了晶状体纤维生长及生长质量,上皮细胞缺损使其下的晶状体纤维渗透压平衡失去控制,使这部分晶状体纤维的透明性和完整性受损。氧化损伤导致晶状体上皮细胞凋亡的机制仍不十分清楚,有研究认为,紫外线可以使细胞氧化还原反应位点向着氧化型方面转移,致细胞暴露于氧化损伤的环境下,使其 DNA 分子损害,细胞膜失去转运能力,细胞膜的钙离子泵对过氧化氢极为敏感,其所引起的 Ca²⁺ 内流,导致细胞凋亡。周海燕等^[6]通过实验认为抗氧化剂在体外可以有效防护晶状体氧化损伤,清除活性氧,阻止细胞凋亡。热休克蛋白是一类结构高度保守的蛋白质,具有重要的生物学作用。按其分子量大小可分为 HSP90, HSP70, HSP60, HSP32 及小分子和大分子热休克蛋白等多个家族^[7]。HSP70 是最保守,最主要,含量最丰富的一类,在应激后生成最为显著,它作为分子伴侣参与细胞内蛋白质的折叠,装备,降解和修复过程,以维持蛋白质的自稳系统。最近的一些研究表明 HSP70 的表达对热休克,氧化损伤,射线, TNF, FAS/APO 和酰基鞘氨醇等多种刺激诱导的凋亡有抑制作用: HSP70 通过抑制线粒体细胞色素 C 的释放及 caspase3 的活化而抑制细胞凋亡,张伟英等^[8]研究表明,老年性白内障晶状体中

HSP70 表达高于透明晶状体;Bagchi 等^[9]发现体外培养的小鼠 LECs 在氧化,高渗等刺激下表达 HSP70 增加;在鸡的晶状体中 HSP70 能与晶状体蛋白相互作用,从而保护它们免受应激损害而变性^[10]。NF- κ B 是一种普遍存在的诱导型核转录因子,静息状态下多以 P50 和 P65 二聚体与其抑制蛋白 I κ B 相结合而存在于胞质中,呈无活性状态,当细胞受到脂多糖、细胞因子等外源性刺激后,通过信号传导引起 I κ B 降解,导致 NF- κ B-I κ B 复合物解体,NF- κ B 活化进入细胞核,在核内与靶基因的特异序列结合并启动转录发挥其调控作用。现已证实 NF- κ B 参与了许多细胞因子及炎症介质基因的转录调控,在炎症反应的细胞因子网络调节中起重要作用。NF- κ B 活性与 LPS 诱导的肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 基因表达成正相关,抑制 NF- κ B 活性可降低这些因子的基因和蛋白表达。耿桂启等^[3]研究显示谷氨酰胺预处理可以抑制大鼠肠缺血/再灌注后肺组织 NF- κ B 表达,而槲皮素可以部分阻止这种抑制作用,这表明 Gln 的抗炎作用与其诱导 HSP 表达进而抑制 NF- κ B 的活性、减少炎症介质产生有关。

我们通过谷氨酰胺预处理可诱导晶状体上皮细胞 HSP70 的表达,抑制 NF- κ B 表达,实现对晶状体上皮细胞的保护作用,其作用可能是 Gln 的抗炎作用与其诱导 HSP 表达进而抑制 NF- κ B 的活性、减少炎症介质产生有关,从

而为药物预防和治疗白内障提供了实验依据,但是 HSP70 对 NF- κ B 的抑制作用机制仍需要进一步研究。

参考文献

- 1 崔蓓,付清,柳林,等. 紫外线辐射致大鼠白内障模型的建立. 国际眼科杂志 2009;9(5):836-838
- 2 张志宏,田文儒,李辉辉,等. 谷氨酰胺诱导小鼠热休克蛋白 70 表达的研究. 中国农业科学 2009;42(4):1428-1434
- 3 耿桂启,黄绍强. 谷氨酰胺对大鼠肠缺血/再灌注后肺组织 nf- κ b 表达的影响. 复旦学报医学版 2009;36(5):566-573
- 4 Zhang F, Lofgren S, Soderberg PG. Interaction of anesthetic drugs and UV-B irradiation in the anterior segment of the rat eye. *Acta Ophthalmol Scand* 2007;85(7):745-752
- 5 李春丽,鲁建华,张文芳. 紫外线对大鼠晶状体泛素 mRNA 表达水平的影响. 眼外伤职业眼病杂志(附眼科手术) 2009;31(6):405-407
- 6 周海燕,鲁建华,张文芳,等. 紫外线致兔晶状体上皮细胞损伤的实验研究. 眼科新进展 2006;26(10):733-736
- 7 宫智勇,牛丕业,刘琳,等. Hsp70 过表达对紫外线 C 致 DNA 损伤的影响. 环境与职业医学 2007;24(2):186-189
- 8 张伟英,汪浩,宋蕾,等. HSP27 和 HSP70 在老年性白内障和透明晶状体中的表达. 同济大学学报(医学版) 2008;29(3):33-37
- 9 Bagchi M, Katar M, Maisel H. Effect of exogenous stress on the tissue-cultured mouse lens epithelial cells. *J Cell Biochem* 2002;86(2):302-306
- 10 Bagchi M, Ireland M, Katar M, et al. Heat shock proteins of chicken lens. *J Cell Biochem* 2001;82(3):409-414