文章编号: 1001-0580(2009)08-0979-03 中图分类号: R 135.2 文献标志码: A 【论 著】

HSP 70各亚型在染尘体外细胞模型中表达*

张海英[1,2], 杨莉[1], 梁艺怀[3], 黄明立[1], 金泰廙[3]

摘 要: 目的 观察染尘巨噬细胞上清液对人胚肺成纤维细胞热休克蛋白 70(HSP 70)各亚型(HSP 70-1、HSP 70-2、HSP 70-hom)表达的影响。方法 采用大鼠巨噬细胞(AMs)和人胚肺成纤维细胞(HELF)构成体外模型, 采用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术检测二氧化硅粉尘处理 AMs 24 h的培养上清液刺激 HELF细胞的 HSP 70各亚型表达情况。同时用二氧化钛作为阴性对照, 以不用粉尘处理的 AM 培养上清液作为正常对照。结果 HSP 70-1、HSP 70-2、HSP 70-hom基因表达与粉尘浓度的相关系数(R)依次为 0.931($P < 0.01$)、0.923($P < 0.01$)、0.818($P < 0.05$), 呈现明显的剂量-反应关系。结论 受染尘肺泡巨噬细胞上清液刺激的人胚肺成纤维细胞 HSP 70各亚型在转录水平呈表达增加, 且可能参与了矽尘致细胞氧化应激过程。

关键词: 矽尘; 肺泡巨噬细胞; 人胚肺成纤维细胞; 热休克蛋白(HSP 70)

HSP70 subtypes expression in human embryonic lung fibroblasts induced by supernatants of alveolar macrophage exposed to silica ZHANG Hai-ying, YANG Li, LIANG Yi-huai, et al. *Department of Occupational Health, School of Public Health, Guangxi Medical University (Nanning 530021, China)*

Abstract **Objective** To observe the expression of HSP70-1, HSP70-2, HSP70-hom in human embryonic lung fibroblasts (HELF) induced by supernatants of alveolar macrophage (AMs) exposed to silica. **Methods** AMs and HELF of rats were formed in vitro model. The HSP70-1, HSP70-2, HSP70-hom mRNA levels of HELF stimulated by supernatants of AMs exposed to silica were detected by RT-PCR technology. **Results** Expression of HSP70-1, HSP70-2, HSP70-hom could be induced by dust-exposed AMs and there was a clear dose-effect relationship between HSP70-1, HSP70-2, HSP70-hom mRNA levels and silica concentration with the correlation coefficients of 0.931 ($P < 0.01$), 0.923 ($P < 0.01$), 0.818 ($P < 0.05$), respectively. **Conclusion** HSP70-1, HSP70-2, HSP70-hom may play an antioxidant role in the process of oxidative stress induced by silica.

Key words: silica dust; alveolar macrophage; human embryonic pulmonary fibroblasts; heat shock protein

目前认为矽肺发病机制可能涉及矽尘诱导大鼠巨噬细胞(AMs)产生各种细胞调节因子[1], 诱发氧化应激损伤[2-3], 启动信号转导通路等而引起肺成纤维细胞增殖及细胞外基质的沉积, 进而形成以肺间质纤维化为主的矽肺。近年来对炎性细胞因子等与矽肺纤维化关系的研究比较多, 而应激蛋白在影响矽肺发病过程中的作用在国内仅见对大鼠 AMs经石英尘诱导的人胚肺成纤维细胞热休克蛋白(HSP 70)表达的研究[3]。本实验在转录水平上观察染尘肺泡巨噬细胞上清液对人胚肺成纤维细胞 HSP 70各亚型表达的影响。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 RPMI 1640培养基、MEM(Minimum Essential Medium)培养基粉剂、0.25%胰蛋白酶、新生牛血清、台盼蓝、Giemsa, RNA 抽提及扩增试剂盒(上海晶美生物制品有限公司); 标准 SiO_2粉尘(上外广电公司); 标准二氧化钛尘(TiO_2, 中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所); 人胚肺成纤维细胞(HELF)(中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库)。

1.2 实验粉尘制备 标准二氧化钛尘(TiO_2), 其分散度为粒径 < 2 μm的为 91.5%, 2~5 μm的为 8.5%, 游离二氧化硅(SiO_2)为 0%。SiO_2粉尘悬液制备: 采用标准 SiO_2粉尘, 其中游离 $SiO_2 > 99.8\%$, Al_2O_3(三氧化二铝)占 0.05%, Fe_2O_3(氧化铁)占 0.01%, TiO_2、CaO(氧化钙)、MgO(氧化镁)痕量, 经光衍射法检测粉尘粒径均 < 5 μm, 均约为 4 μm, 占 100%。以上粉尘(TiO_2、SiO_2)经 180℃ 2 h高温消毒后用无菌 RPMI 1640培养液配成 2 g/L的粉尘悬液母液, 冷藏备用。临用前将母液用无菌 RPMI 1640培养液稀释为所需浓度。

1.3 大鼠 AMs的收集、纯化与培养及染尘肺泡 AMs上清液制备 30只健康 SD大鼠, 体重(200±10) g(合格证号: 02-22-4)。采用支气管肺泡灌洗方法收集 AMs, Giemsa染色, 测定 AMs纯度达 95%, 台盼蓝排除法计数存活细胞数达 99%。用含 10%新生小牛血清和青链霉素双抗的 RPMI 1640培养液调成细胞密度为 1×10^9 AMs/L的细胞悬液, 接种到 6孔板中(每孔各 2 mL), 37℃、5% CO_2孵育 2 h, 弃去上清, 即得到较纯的 AMs。将接种好的 6孔板中分别加入一定量的粉尘溶液(TiO_2、SiO_2粉尘悬液), 用无血清的 RPMI 1640培养液调节为 0, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 mg/L(每个剂量组作 3个复孔)并补足体积至 2.5 mL/孔, 37℃、5% CO_2孵育 24 h后终止培养, 上清液以 0.22 μm滤膜的抽滤器抽滤后, 用封口膜封口于-70℃储存备用。

1.4 HELF株(MRC-5)的传代培养及染毒 用含 10%新生小牛血清及青链霉素双抗的 MEM 培养液进行传代培养, 5% CO_2, 37℃恒温培养。MRC-5细胞常规传代培养至对数生长期, 待细胞达到 70%~80%融合后弃除上清液, 胰酶消化、重悬细胞, 调节细胞浓度为 1×10^9/L, 2 mL/孔接种于 6孔板。实验组加入经不同浓度染尘 24 h AMs上清液; 对照组加入无染尘 AMs上清各 0.5 mL及无血清 MEM 培养基各 2 mL;

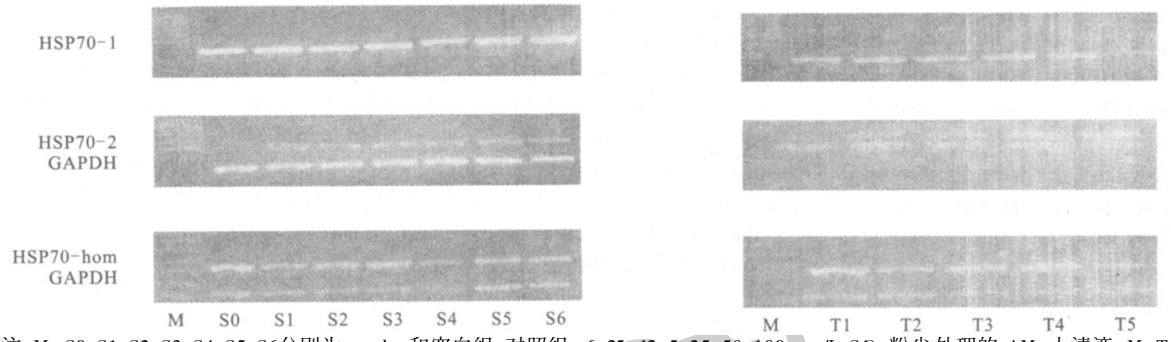
* 基金项目: 广西青年科学基金(桂科青 0832047)
作者单位: 1. 广西医科大学公共卫生学院职业医学与环境卫生学教研室, 南宁 530021; 2. 广西医科大学药学博士后流动站; 3. 复旦大学公共卫生学院
作者简介: 张海英(1973-), 女, 海南琼山人, 副教授, 博士后, 主要从事职业卫生与分子毒理学研究。
通讯作者: 金泰

空白组细胞仅加入 2.5 mL MEM 培养基(每组设 3孔平行样)。培养 24 h后移除上清液,贴壁细胞每孔加 0.5 mL提取总 RNA的试剂充分吹打混匀收集后保存于 -80 ℃,提取 RNA备用。

1.5 RNA抽提及逆转录多聚酶链反应(RT-PCR) 按说明书提取细胞总 RNA。紫外分光法测定 RNA纯度和含量。将 RNA模板逆转录成 cDNA。取 1 μL上述反应液用 PCR试剂盒对甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、HSP 70-1、HSP 70-2、HSP 70-hom扩增,引物序列采用 primer premier5软件设计,由上海 Sangon合成,GAPDH、HSP 70-1、HSP 70-2、HSP 70-hom引物序列(5′-3′)及长度分别为 CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT, AGTCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC, 307 bp; CACCAAGCAGACGCAGAT, CCAGCCACGAGATGACC, 482 bp; AGCTGGAGCAGGTGTGTAAC, GAAGGTGGCAGTGTTGATTC, 317 bp; TGAAGGGCAAGATTAGTGA, TGAAGGGCAAGATTAGTGA, 515 bp; GAPDH、HSP70-hom扩增条件为:预变性 5 min,循环数分别为 26、28,每个循环包括:94 ℃变性 1 min,55 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,循环结束后 72 ℃终末延伸 10 min。HSP 70-1、HSP 70-2扩增条件为:退火温度为 56 ℃,其余同前,循环数均为 28。反应结束后于 2%琼脂糖凝胶中电泳,图像分析软件分析目的基因吸光度(*A*)值,以 GAPDH为内参照,计算各基因相对表达丰度。

2 结 果

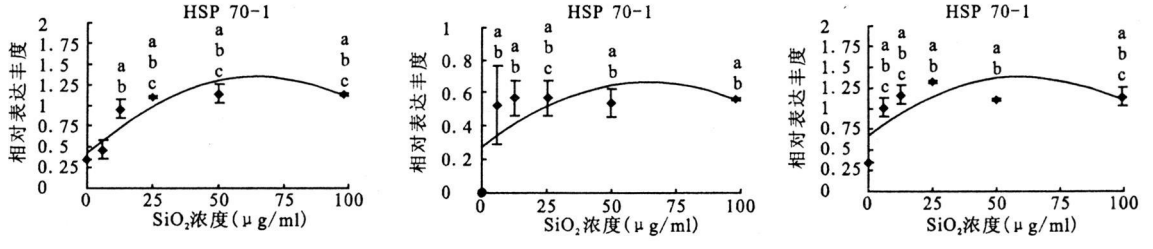
2.1 目的基因 RT-PCR产物凝胶电泳图(图 1) 图 1显示:SiO_2实验组的 AMs上清液刺激 MRC-5细胞 24 h,其 HSP 70-1、HSP 70-2、HSP 70-hom表达情况,其中空白组的 HSP70-2未能检测到表达;TiO_2粉尘组与 SiO_2实验组的比较尚需以 GAPDH mRNA的表达作为内参分析各基因 mRNA的表达丰度。



注:M、S0、S1、S2、S3、S4、S5、S6分别为 marker和空白组,对照组,6.25、12.5、25、50、100 mg/L SiO_2粉尘处理的 AMs上清液;M、T1、T2、T3、T4、T5分别为 marker和 6.25、12.5、25、50、100 mg/L TiO_2粉尘处理的 AMs上清液。

图 1 MRC-5细胞目的基因和 GAPDH的 RT-PCR产物凝胶电泳图

2.2 目的基因的相对表达丰度(图 2) 图 2显示,经不同浓度 SiO_2粉尘处理 AMs的上清液刺激 MRC-5细胞 24 h后 HSP 70-1、HSP 70-2、HSP 70-hom的表达丰度的变化趋势为在 6.25 μg/mL组,HSP 70-2、HSP 70-hom的表达与空白组及 AMs对照组比较,均呈现明显增高($P<0.05$);在粉尘浓度达到 25 μg/mL时,HSP 70-2表达达到峰值,且随浓度上升呈现平缓上升;粉尘浓度达到 50 μg/mL时,HSP 70-1、HSP 70-hom表达也相应达到峰值,并随着染尘浓度增加的而缓慢升高;HSP 70-1、HSP 70-2、HSP 70-hom基因表达与粉尘浓度的相关系数(R)依次为 0.931($P<0.01$)、0.923($P<0.01$)、0.818($P<0.05$),呈现明显的剂量-反应关系。相同的染尘浓度下(25 μg/mL),SiO_2剂量组的 HSP 70-1的相对表达丰度与 TiO_2组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。



注:与空白组比较,a $P<0.05$;与 AMs对照组比较,b $P<0.05$;与 TiO_2组比较,c $P<0.05$。

图 2 诱导后的 MRC-5细胞 HSP 70-1、HSP 70-2、HSP 70-hom表达变化

3 讨 论

热休克蛋白按分子量可分为 HSP 60、HSP 70、HSP 90等,其中研究最为广泛的是 HSP 70。HSP 70与细胞氧化应激密切相关[4],而尘肺形成与发展可能涉及氧化应激。本次研究结果提示:矽尘作用于 AMs可能产生一定的氧化应激作用,其上清能使人胚肺成纤维细胞中的热休克蛋白被诱导表达,从而发挥一定的抗氧化作用。但是还需观察不同时间其表达水平的变化等情况才能确证应激蛋白的诱导动力学特征。通常情况下,基因组中仅有小部分基因进行表达,而且存在严格的时间和空间特异性。表达后的 mRNA仍须经历贮存、转运、降解、翻译调控及产物(蛋白质)的翻译后加工(如糖基化、磷酸化、乙酰化和结构域拼接),对 mRNA以及基因与蛋白质线性对应关系的分析也难以反映基因的最终产物蛋白质的质与量的生物学特征。即基因组学的局限性源于基因组学仅涉及生物中心法则(DNA-RNA-蛋白质)的一部分,因此,其确切作用有待于对其蛋白表达水平进行检测以及多方面验证后才能加以确认。

参考文献

〔1〕 何燕, 邓国忠, 高天. 肺纤维化细胞因子机制研究进展[J]. 中华创伤杂志, 2006, 22(6): 477-480

〔2〕 刘艺敏,张敬,罗晓阳,等. 硒对染尘肺泡巨噬细胞脂质过氧化和抗氧化酶影响的实验研究[J]. 中国公共卫生, 2001, 17(5): 414-415.
〔3〕 Porter DW, Millecchial L, Willard P, et al. Nitric oxide and reactive oxygen species production causes progressive damage in rats after cessation of silica inhalation[J]. Toxicological Sciences March, 2006, 90(1): 188-197.
〔4〕 张国高,贺涵贞. 热应激蛋白及其在职业医学中应用研究的展望[J]. 中华劳动卫生职业病, 1998, 16(2): 67-69.
〔5〕 Aufricht C. Heat-shock protein 70: molecular supertool? [J]. Pediatr Nephrol, 2005, 20(6): 707-713.

收稿日期: 2008-11-24 (宋艳萍编辑 范会清校对)

文章编号: 1001-0580(2009)08-0981-02 中图分类号: R 181.3+7 文献标志码: A

【专题报道之二】

海南省黎族地区老年人生存质量影响因素分析*

刘玉梅,吴玲,王基鸿,方桂红,王小丹

摘 要: 目的 了解海南省黎族地区老年人生存质量现状及其影响因素。方法 采用多阶段抽样的方法,随机抽取海南省黎族地区5个市县城乡60岁~老年人2 208人;采用生存质量(SF-36)量表对其生存质量进行测量,用多变量方差分析、χ^2检验及多重线性回归进行分析。结果 海南省黎族地区老年人慢性病患病率为53.35%,男性47.43%,低于女性的59.33%。城市老年人生理功能(PF)、生理职能(RP)、躯体疼痛(BP)、总体健康(GH)、活力(VT)、精神健康(MH)维度评分均高于农村老年人($P<0.000\ 1$),而社会功能(SF)、情感职能(RE)维度评分差异均无统计学意义($P>0.05$)。多重线性回归结果显示,老年人生理和心理健康的影响因素主要为慢性病、体育锻炼、子女的生活状况、年龄、经济收入。患慢性病老年人生存质量低于无慢性病者。年龄越小、经常参加体育锻炼、子女生活状况越好、月人均收入越高的老年人得分越高。结论 海南省黎族地区城市老年人生存质量优于农村;老年人生存质量的主要影响因素为体育锻炼、慢性病、子女的生活状况等。

关键词: 黎族地区; 老年人; 生存质量; 生存质量(SF-36)量表

Survey on quality of life of elder living in Li ethnic regions of Hainan province LIU Yu-mei, WU Ling, WANG Ji-hong, et al. *Department of Preventive Medicine, Hainan Medical College (Haikou 571101, China)*

Abstract Objective To study the quality of life and its influence factors in the elderly living in Li ethnic regions of Hainan province. **Methods** Overall 2 208 elders aged over 60 were randomly selected with multi-stage sampling in five Li ethnic regions of Hainan. SF-36 quality of life questionnaire was administrated in the elders. Multivariate analysis of variance, Chi-square test and multiple linear regression were used in the analysis. **Results** The prevalence of chronic diseases in the subjects was 53.35% (47.43% in male and 59.33% in female). The scores of PF, RP, BP, GH, VT and MH dimensionality were all significantly higher in urban elders than those of rural elders ($P<0.0001$). But there was no significant diference in scores of SF and RE dimensionalities between the two groups ($P>0.005$). Results of multiple linear regression showed that factors influencing the quality of life of the elders included the history of chronic disease, physical exercise, living status of their children, age, income per capita. The quality of life of the elders with history of chronic disease was significantly lower than those without history of chronic disease. The scores decreased with age in all dimensions. Higher scores were observed in the elders with more physical exercise, with children under better living status and higher income per capita. **Conclusion** The quality of life of the urban elders living in Li ethnic regions of Hainan province is better than that of elders in rural area. The major determinants of quality of life for the elders are physical exercise, history of chronic disease, living status of their children.

Key words: Li ethnic region; elder; quality of life; SF-36 health survey

中国是世界上老龄化人口绝对数最多的国家,也是人口老龄化速度发展最快的国家之一[1],提高老年人健康水平和生存质量已成为亟待解决的问题。我国从20世纪80年代开始,进行了一般人群、老年人群及慢性病人生存质量的研究,而针对少数民族的研究较少[2-3]。本研究于2007年7月-9月对海南省黎族地区老年人生存质量现状及影响因素进行调查,为制订提高老年人生存质量的措施提供科学依据。

1 对象与方法

1.1 对象 采用多阶段抽样方法随机抽取海南省黎族地区5个市县城乡13个社区39个自然村,对所抽中的社区和自然村60岁~汉族、黎族老年人进行入户问卷调查。共调查2 208人。

1.2 方法 生存质量调查采用生存质量(SF-36)量表中文版。进行入户调查。该量表共36个条目,9个维度,包括生理功能(PF)、生理职能(RP)、躯体疼痛(BP)、总体健康(GH)、活力(VT)、社会功能(SF)、情感职能(RE)、精神健康(MH)和健康变化(HT)。其中HT反映健康自觉变化,不参与生存质量评分,其余8个维度又概括为2个综合测量指标:生理健康(PCS)和心理健康(MCS),PCS测量指标包括PF、RP、BP、GH 4个维度,MCS测量指标包括VT、SF、RE、MH 4个维度[4]。

* 基金项目: 海南省自然科学基金项目(80695)
作者单位: 海南医学院预防医学系,海口 571101
作者简介: 刘玉梅(1975-),女,吉林磐石人,讲师,硕士,主要从事环境因素对健康影响研究。
通讯作者: 吴玲