

核定位信号在热休克蛋白 70 抑制氧化应激所致细胞核仁分离中的作用*

王慷慨 鄂顺梅 蒋磊 张华莉 刘可 张玲莉 肖献忠**

(中南大学湘雅医学院病理生理学教研室, 长沙 410078)

摘要 为探讨核定位信号在热休克蛋白 70 (HSP70) 抑制 H_2O_2 所致核仁损伤中的作用, 采用分子克隆技术分别构建了 4 个真核表达载体, pcDNA3.1(-)-HSP70^{WT} (HSP70 野生型), pcDNA3.1(-)-HSP70^{ΔNLS} (核定位信号缺失突变体), pEGFP-N1-HSP70^{WT}, pEGFP-N1-HSP70^{ΔNLS}. 向传代培养的 C₂C₁₂ 肌源细胞培养液中加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 H_2O_2 模拟体外氧化应激. 甲苯胺蓝染色细胞核仁发现, 正常细胞仅有一个位于中央的、浓染致密的核仁颗粒. 过氧化氢处理后 3 h, 可见明显的核仁分离. 热休克反应处理的细胞及转 pcDNA3.1(-)-HSP70^{WT} 细胞则能明显抑制氧化应激所致的核仁分离. 荧光蛋白示踪及核仁蛋白质免疫印迹分析显示, H_2O_2 处理后 1 h, HSP70^{WT} 由正常时的细胞浆定位转为细胞核及核仁定位, 而 HSP70^{ΔNLS} 在 H_2O_2 处理后仍定位于细胞浆, 同时丧失了抑制核仁分离的作用. 上述结果提示, 野生型 HSP70 能显著抑制氧化应激所致细胞核仁分离, 核定位信号通过介导 HSP70 向细胞核及核仁移位而决定 HSP70 对核仁损伤的保护作用.

关键词 热休克蛋白 70, 核定位信号, 氧化应激, 核仁, 核仁分离

学科分类号 R361

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是广泛存在于整个生物界、进化上十分保守的一类蛋白质. 热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 是 HSPs 家族中最重要的一员^[1-3]. HSP70 第 246~273 位共 28 个氨基酸残基是两个部分重叠的双向核定位信号(nuclear localization signal, NLS)^[4]. 大量研究表明, HSP70 具有显著的抗细胞损伤作用. 我室以往的研究表明, HSP70 能抑制过氧化氢所致细胞凋亡^[5-7].

核仁是位于细胞核中的一个非膜性细胞器, 是核糖体生物合成的场所, 在细胞蛋白质的合成以及细胞的增殖、分化与衰老等生命活动中发挥重要作用^[8, 9]. 有研究表明, 多种应激原 (热应激、TNF- α 以及顺铂等) 可诱导多种细胞核仁分离^[10, 11]. 我室也证实过氧化氢 (H_2O_2) 可导致原代培养的新生大鼠心肌细胞核仁分离, 并发现 HSP70 能显著抑制核仁分离^[12]. 但对胞浆蛋白 HSP70 如何减轻细胞核仁损伤仍不清楚.

本研究采用分子克隆技术构建了 NLS 缺失突变体, 观察其对 HSP70 抑制核仁分离作用的影响, 以初步探讨 HSP70 减轻核仁损伤的机制.

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基, 胎牛血清购自 Gibco 公司; 各种核酸内切酶, Pyrobest 高保真 DNA 聚合酶购自 Takara 公司; T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; 鼠抗 HSP70 及 β -actin 单克隆抗体购自 Stressgen 公司; 羊抗小鼠 IgG 购自 Boster 公司; C₂C₁₂ 肌源细胞株购自 ATCC; pcDNA3.1(-)-myc-His 载体、pEGFP-N1 载体、G418 及 Lipofectamin 2000 购自 Invitrogen 公司; pH2.3-HSP70 质粒由美国德克萨斯西南医学中心 Ivor Benjamin 教授赠送; DH5 α 菌株由本室保存; 蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司; PCR 产物纯化试剂盒、凝胶 DNA 回收试剂盒、小量质粒 DNA 提取试剂盒均购自 Qiagen 公司; 乳酸脱氢酶试剂盒购自北京中生生物工程公司; 引物合成由上海博亚生物技术公司完成.

*国家重点基础研究发展规划项目(973)(G2000056908)和国家自然科学基金资助项目(30300177, 30270533).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-2355019, E-mail: xianzhongxiao@xysm.net

收稿日期: 2004-12-06, 接受日期: 2005-01-31

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理. C₂C₁₂ 肌源细胞按常规方法培养, 简述如下: 细胞用含 10%新生小牛血清的 DMEM 培养基于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞生长至约 85%的融合状态进行传代. 热休克反应 (heat shock response, HSR) 采用 43℃ 处理 30 min, 37℃ 恢复 12 h. 氧化应激采用终浓度为 1.0 mmol/L H₂O₂ 的无血清 DMEM 培养基 37℃ 孵育 1 h, 3 h.

1.2.2 PCR 扩增 HSP70^{WT} 及 HSP70^{ΔNLS} 基因片段. HSP70^{WT} 基因片段的扩增, 以含 HSP70 全长 cDNA 序列的 pH2.3 质粒为模板, 采用 Pyrobest DNA 聚合酶, 分别用 *Bam*H I (或 *Eco*R I)-FP-70, *Kpn* I

-RP-70 引物对模板进行扩增. HSP70^{ΔNLS} 基因片段的扩增, 先以含 HSP70 全长 cDNA 序列的 pH 2.3 质粒为模板, 采用 Pyrobest DNA 聚合酶, 分别用 *Bam*H I (或 *Eco*R I) FP-70 与 RP-ΔNLS- I、FP-ΔNLS- II 与 *Kpn* I -RP-70 两组引物扩增模板, 在分别获得 ΔNLS 的 2 个基因片段后用引物 *Bam*H I (或 *Eco*R I)-FP-70, *Kpn* I -RP-70 分别扩增 2 个片段的混合模板, 扩增产物即为 HSP70^{ΔNLS} 基因, 用 PCR 产物纯化试剂盒纯化后, -80℃ 保存备用. PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 68.5℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 冷却 15 min. 所用引物见表 1.

Table 1 Sequences and digested sites of primers

Primers	Abbreviation	Sequence	Restrictive enzymes
Forward primer for HSP70 ^{WT}	<i>Bam</i> H I -FP-70	5' AAAAGGATCCAAATGGCCAAAGCCGCGGCG 3'	<i>Bam</i> H I
Forward primer for HSP70 ^{WT}	<i>Eco</i> R I -FP-70	5' CGGAATTCATGGCCAAAGCCGCGGCG 3'	<i>Eco</i> R I
Reverse primer for HSP70 ^{WT}	RP-70	5' TCGGGTACCGGATCTACCTCTCAATGGTG 3'	<i>Kpn</i> I
Reverse primer for HSP70 ^{ΔNLS} - I	RP-ΔNLS- I	5' GCTGGACGACAGGAAGTCTCCACGAAGTGGTTCAC 3'	none
Forward primer for HSP70 ^{ΔNLS} - II	FP-ΔNLS- II	5' GTGGAGGAGTTCCTGTCGTCCAGACCCAGGCCAGC 3'	none

1.2.3 pcDNA3.1 (-)-HSP70^{WT} 与 HSP70^{ΔNLS} 及 pEGFP-HSP70^{WT} 与 HSP70^{ΔNLS} 表达载体的构建. 用 *Bam*H I (或 *Eco*R I) 和 *Kpn* I 双酶切(32℃/37℃, 20 h) HSP70^{WT}、HSP70^{ΔNLS} 基因片段及 pcDNA3.1(-) 质粒 (*Bam*H I /*Kpn* I) 与 pEGFP-N1 质粒(*Eco*R I /*Kpn* I), 经凝胶 DNA 回收试剂盒纯化后, 建立 10 μl 连接体系用 T4 DNA 连接酶连接 (4℃ 过夜). 随后用该连接体系直接转化 DH5α 感受态细菌, 经含氨苄青霉素(pcDNA 3.1)和卡那霉素(pEGFP-N1)的琼脂平板筛选阳性克隆, 挑取阳性克隆并扩增后, 用小量质粒 DNA 提取试剂盒抽提质粒. 一部分进行双酶切鉴定, 一部分测序鉴定.

1.2.4 基因转染. a. 瞬时转染. 根据生命技术公司提供的转染操作说明书以及本室以往所建立的方法^[12] 进行. 用 0.25 ml 无血清 DMEM 培养基溶解 20 μg 重组质粒, 并将其与 0.25 ml 含 15 μl 脂质体的无血清 DMEM 培养基充分混匀, 室温放置 20 min. C₂C₁₂ 小鼠肌源细胞用无血清 DMEM 培养基洗涤 3 遍后, 加入 1.5 ml 无血清 DMEM 培养基, 然后加入上述重组质粒与脂质体的混合物, 37℃, 5%的 CO₂ 培养箱中培养, 6 h 后再加入 2 ml 含 20%小牛

血清的 DMEM 培养基, 于 24 h 后收集细胞, 进行后续实验. b. 稳定转染. 同前将相应重组质粒导入细胞 24 h 后, 接种于 96 孔板. 第二天加入含 1 000 mg/L G418 和 10%新生小牛血清的 DMEM 培养基筛选 4 周. 挑取克隆后, 改用含 500 mg/L G418 和 10%新生小牛血清的培养基. 同时转染 pcDNA3.1 空载体, 用 G418 进行同样筛选后用于对照.

1.2.5 核仁染色. 培养在载玻片上的细胞用无菌预冷的磷酸盐缓冲液漂洗 2 次, 4%多聚甲醛 / 磷酸盐缓冲液室温固定 30 min, 磷酸盐缓冲液漂洗 2 次; 再用 0.1% Triton X-100/ 磷酸盐缓冲液室温处理细胞 15 min, 磷酸盐缓冲液荡洗 2 次, 1%甲苯胺蓝 /1%四硼酸钠染色液染色 2 min, 磷酸盐缓冲液反复荡洗, 甩干、封片, 观察并拍照. 统计分析

按下列公式进行:
$$\frac{\sum A/(2 \times 50)}{N = 3}$$
, 其中, A 为每一样本中核仁染色颗粒总数, N 为样本数, 2×50 为每一样本选取 2 个视野, 每一视野计数 50 个细胞.

1.2.6 免疫印迹分析. 按实验室常规方法进行. 简言

之, 用 2×SDS 裂解缓冲液裂解细胞或核仁, 收集细胞或核仁蛋白质, 100℃ 煮沸 10 min, 12 000 r/min×5 min 离心, 收集上清. 采用 Bradford 法进行蛋白质定量, 制备好的蛋白质样品置-80℃ 冰箱保存备用. 30 μg 总蛋白经 10% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 6 h 后, 电转膜 (4℃, 过夜) 至硝酸纤维素膜, 2% BSA 室温封闭 3 h, 先后加入鼠抗 HSP70 单克隆抗体及 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 室温分别孵育 1 h 和 0.5 h, DAB 显色试剂盒进行显色.

1.2.7 细胞浆及核仁蛋白质组分抽提. 依据 <http://www.lamondlab.com> 所提供的核仁提取操作步骤进行. 约 5×10^7 个细胞经胰蛋白酶消化后, 1 000 r/min 离心收集沉淀, 4℃ 预冷的 PBS 洗涤 3 次, 沉淀用低渗裂解缓冲液 (100 mmol/L Hepes, pH 7.9, 15 mmol/L $MgCl_2$, 40 mmol/L KCl, 5 mmol/L DTT) 悬浮, 冰上放置 10 min, 玻璃匀浆器冰上匀浆 15 次, 4℃, 1 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液并用超滤离心管进行浓缩后-80℃ 保存, 此组分即为细胞浆蛋白组分 (cytoplasm). 用 0.25 mol/L 的蔗糖溶液悬浮细胞核沉淀物, 并将其缓慢加入 0.35 mol/L 的蔗糖溶液中, 2 500 r/min、4℃ 离心 5 min, 0.35 mol/L 的蔗糖溶液悬浮沉淀物后, 超声匀浆 6×10 s. 将匀浆液缓慢加入 0.88 mol/L 的蔗糖溶液中, 3 500 r/min、4℃ 离心 10 min, 即得核仁沉淀物, 0.35 mol/L 的蔗糖溶液重悬、洗涤一次, 离心后弃上清, 0.35 mol/L 的蔗糖溶液重悬, -80℃ 保存. 样本解冻后, 离心, 弃上清, 用 2×SDS 裂解缓冲液裂解核仁即可得到核仁蛋白质.

1.2.8 乳酸脱氢酶释放率. 利用北京中生生物工程公司生产的 LDH 测定试剂盒, 依其说明用紫外分光光度计于 340 nm 处检测培养液和细胞粉碎液中 LDH 活性, 按下式计算 LDH 释放率: LDH 释放率 (%) = 培养液 LDH / (培养液 LDH + 细胞 LDH) × 100%.

1.2.9 统计处理. 数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 两组间比较用 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析. 以 $P < 0.05$ 判断为有统计学意义.

2 结 果

2.1 生物信息学分析 HSP70 的核定位信号及 HSP70^{WT} 及 HSP70^{ΔNLS} 真核载体的酶切鉴定

生物信息学分析结果显示, 在 HSP70 氨基端第 246~273 位的共 28 个氨基酸残基为两个双向核定位信号, 一个位于第 246~262 位, 另一个为 257~273 位, 针对这一结构, 本研究采用分子克隆技术将全部 28 个氨基酸残基剔除掉, 并构建真核表达载体.

用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 分别双酶切构建的 pcDNA3.1(-)-HSP70^{WT}, pcDNA3.1(-)-HSP70^{ΔNLS} 后, 可见一长度约为 2.0 kb 的插入片段 (HSP70^{WT} 为 1 921 bp, HSP70^{ΔNLS} 为 1 837 bp) (图 1a4, b4), 大小与 PCR 扩增产物 (图 1b2, c2) 一致. 用 *Eco*R I 和 *Kpn* I 分别双酶切 pEGFP-N1-HSP70^{ΔNLS} 及 pEGFP-N1-HSP70^{WT} 后, 同样可见大小与相应 PCR 产物一致的插入片段 (图 1c4, c7). 基因测序结果也证实插入片段序列与 HSP70 基因序列完全一致, 插入方向正确 (测序结果未显示).

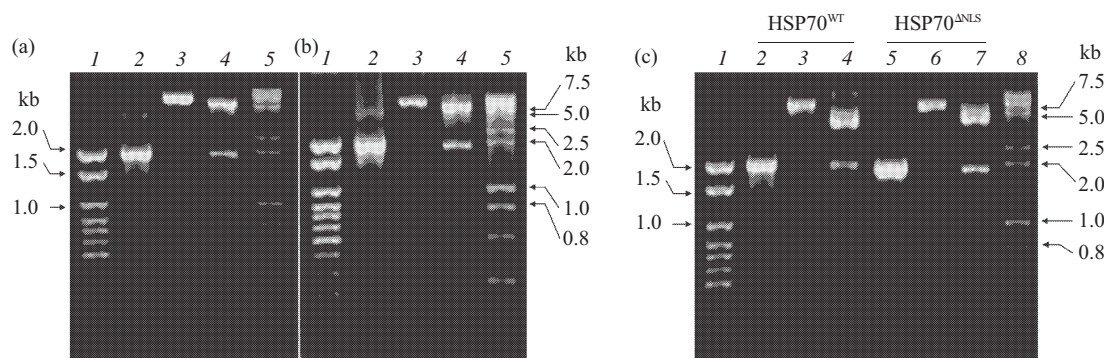


Fig.1 Identification of four recombinant plasmids digested with *Bam*H I (or *Eco*R I) and *Kpn* I in 1.0% agarose gel (a) pcDNA3.1(-)-HSP70^{WT}; (b) pcDNA3.1(-)-HSP70^{ΔNLS}; (c) pEGFP-N1-HSP70^{ΔNLS} and pEGFP-N1-HSP70^{WT}. a1,b1,c1: 100 bp DNA ladder marker; a5, b5, c8: wide range DNA ladder marker; a2, b2, c2 and c5: responsive PCR products; a3, b3, c3 and c6: recombinant plasmid digested with *Kpn* I; a4, b4, c4 and c7: recombinant plasmid digested with *Bam*H I (or *Eco*R I) and *Kpn* I.

2.2 热休克预处理及转基因细胞中 HSP70 的表达及活性检测

免疫印迹结果显示，正常生长的 C₂C₁₂ 细胞 (Ctrl) 及转空载体细胞 (vector) 中几乎不能检测到诱导型 HSP70 的存在. 经 43℃ 30 min 热休克处理并于 37℃ 恢复 12 h 后(HSR)的细胞和瞬时转染 pcDNA3.1 (-)-HSP70^{WT} (HSP70^{WT}) 及 pcDNA3.1 (-)-HSP70^{ΔNLS}(HSP70^{ΔNLS}) 24 h 后的细胞中，均检测到 HSP70 有高表达 (图 2).

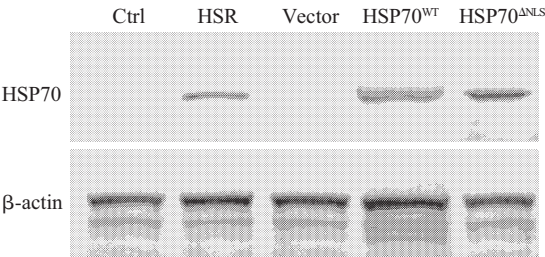


Fig.2 Immunoblotting showing the over-expression of HSP70 in heat shock-pretreated C₂C₁₂ cells and transient transfected cells

1.0 mmol/L 过氧化氢处理 3 h 后，检测 C₂C₁₂ 细胞乳酸脱氢酶释放率来判定 HSP70^{WT} 与 HSP70^{ΔNLS} 的活性(图 3). 结果显示：正常培养时，细胞乳酸脱氢酶释放率均在 10% 以下；过氧化氢处理 3 h 后，转空载体细胞 (pcDNA3.1) 细胞乳酸脱氢酶释放率达(47.83±3.39) %，显著高于正常对照组， $P < 0.05$ ，而转 HSP70^{WT} 及 HSP70^{ΔNLS} 的细胞乳酸脱氢酶释放率分别为(15.32±2.48) %，(23.67±3.72) %，均显著低于过氧化氢处理的转空载体组细胞 ($P < 0.05$).

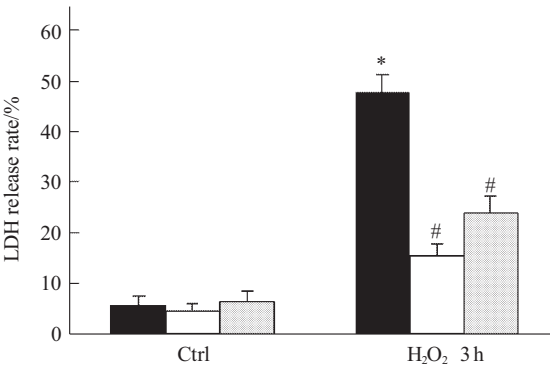


Fig.3 Effects of HSP70^{WT} and HSP70^{ΔNLS} on LDH release rate induced by H₂O₂ in C₂C₁₂ myogenic cells
Compared with Ctrl, * $P < 0.05$; Compared with *, # $P < 0.05$. ■ : pcDNA3.1; □: pcDNA3.1-HSP70^{WT}; ▒: pcDNA3.1-HSP70^{ΔNLS}.

2.3 氧化应激诱导 HSP70 细胞内定位改变

绿色荧光蛋白示踪显示，正常细胞中 HSP70^{WT} 和 HSP70^{ΔNLS} 主要位于细胞浆(图 4a, b). H₂O₂ 处理 1 h 后，HSP70^{WT} 则大部分进入细胞核中 (图 4c)，而 HSP70^{ΔNLS} 仍停留在细胞浆中 (图 4d).

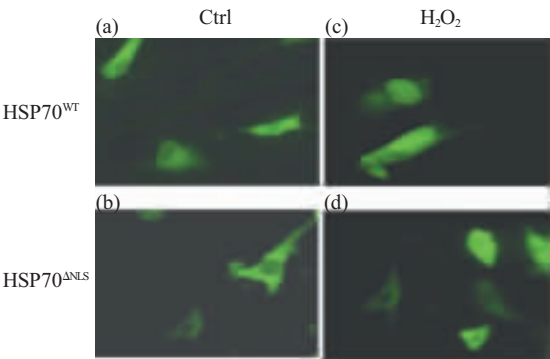


Fig.4 Fluorescent microscopy showing the intracellular distribution of HSP70^{WT} and HSP70^{ΔNLS}
(a),(c) cells transfected with pEGFP-HSP70^{WT}; (b),(d) cells transfected with pEGFP-HSP70^{ΔNLS}; (a),(b) cells cultured under normal conditions; (c),(d) cells treated with 1.0 mmol/L H₂O₂ for 1 h (20×10).

免疫印迹结果显示，未经 H₂O₂ 处理的热休克预处理并恢复 12 h 的细胞、转 HSP70^{WT} 及 HSP70^{ΔNLS} 细胞核仁蛋白质中均不能检测到 HSP70，而在细胞浆组分中则可见 HSP70 均有较高表达. 在 H₂O₂ 处理 1 h 后，热休克反应后的细胞、转 HSP70^{WT} 细胞核仁蛋白质中能检测到 HSP70，同时细胞浆中也含有一定量的 HSP70. 在 H₂O₂ 处理 1 h 后，转 HSP70^{ΔNLS} 细胞核仁蛋白质中仍没有 HSP70，而细胞浆中却有较高的 HSP70^{ΔNLS} 表达 (图 5).

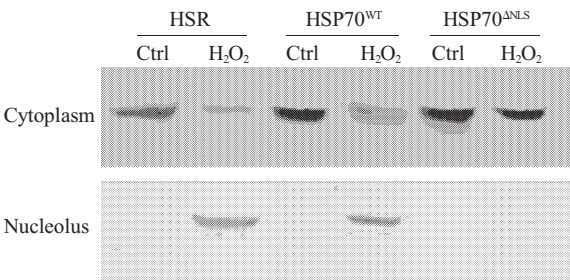


Fig.5 Immunoblotting showing HSP70^{WT} and HSP70^{ΔNLS} within nucleolus and cytoplasm
Ctrl: cells cultured under normal conditions; H₂O₂: cells treated with 1.0 mmol/L H₂O₂ for 1 h; HSR: cells treated with heat shock at 43℃ for 30 min, and recovered at 37℃ for 12 h; HSP70^{WT}: cells transfected with pcDNA3.1 (-)-HSP70^{WT} for 24 h; HSP70^{ΔNLS}: cells transfected with pcDNA3.1(-)-HSP70^{ΔNLS} for 24 h.

2.4 热休克预处理及 HSP70 抑制氧化应激所致核仁分离

甲苯胺蓝染色结果显示, 正常 C₂C₁₂ 细胞一般有 1~2 个浓染且致密, 位于中央的核仁颗粒 (图 6a).

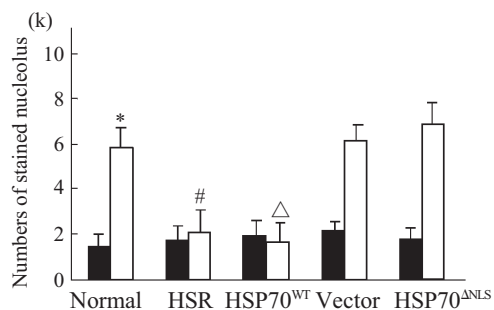
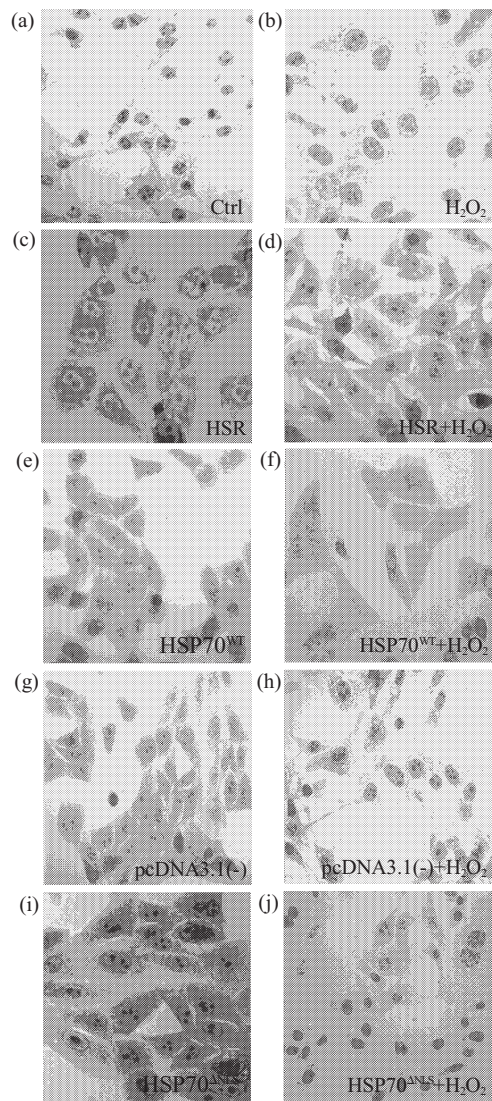


Fig.6 Effects of heat shock pretreatment and HSP70 on nucleolar segregation induced by oxidative stress

(a)~(j): toluidine blue staining; (k) statistic analysis for stained nucleolus in 5×100 cells, Compared with normal cells (Ctrl), * $P<0.05$; compared with *, # $P<0.05$; compared with H₂O₂-treated cells which transfected with pcDNA3.1 (-) (vector) and pcDNA3.1 (-) HSP70^{ANLS} (HSP70^{ANLS}), Δ $P<0.05$. ■: Ctrl; □: H₂O₂.

过氧化氢处理后 3 h, 染色的核仁颗粒显著增多, 达 5~7 个 (图 6b), 统计分析显示过氧化氢处理后 3 h, 核仁数目为 (5.89 ± 0.74) 显著高于正常细胞 (1.46 ± 0.57) ($P<0.05$) (图 6k).

经热休克反应 (43℃ 30 min 热休克处理并于 37℃ 恢复 12 h) 后, 细胞已恢复至正常, 此时染色的核仁颗粒为 (1.73 ± 0.66) (图 6c). 当经热休克反应的细胞再次暴露于过氧化氢中 3 h, 染色的核仁数目仍只有 (2.04 ± 0.98) (图 6d), 与正常对照组相当 ($P>0.05$), 明显少于单纯过氧化氢损伤组 ($P<0.05$) (图 6k).

进一步采用基因转染技术, 将 pcDNA3.1(-)-HSP70^{WT} (图 6e), pcDNA3.1(-)-HSP70^{ANLS} (图 6i) 及空载体 (图 6g) 导入 C₂C₁₂ 细胞 24 h 后, 各组细胞染色的核仁数目分别为 (1.97 ± 0.65) 、 (2.15 ± 0.41) 和 (1.77 ± 0.53) , 彼此差异无显著性 ($P>0.05$) (图 6k). 当转基因 24 h 后, 用 1.0 mmol/L 过氧化氢处理 3 h 发现, 转 pcDNA3.1(-) 空载体 (图 6h) 及转 pcDNA3.1(-)-HSP70^{ANLS} (图 6j) 组细胞染色的核仁数目分别为 (6.13 ± 0.63) 和 (6.87 ± 0.84) , 显著多于未经过氧化氢处理的转基因细胞 ($P<0.05$) (图 6k); 相反, 转 pcDNA3.1(-)-HSP70^{WT} 细胞 (图 6f) 经过氧化氢处理 3 h 后被染色的核仁数目仍只有 (1.64 ± 0.86) , 显著低于过氧化氢处理的转 pcDNA3.1(-) 空载体及 pcDNA3.1(-)-HSP70^{ANLS} 细胞 ($P<0.05$) (图 6k).

3 讨 论

近年来, 大量研究发现 HSP70 具有明显的抗细胞损伤作用^[5-7]. 我室近年来的系列研究表明, HSP70 通过抑制 Cyt C 与 Smac 从线粒体的释放, 抑制 Caspase 的活化以及抑制核仁蛋白质 C23 的裂解发挥抗细胞凋亡作用^[5,7]. 而且证实 HSP70 能显著抑制过氧化氢诱导的原代乳鼠心肌细胞核仁分离^[12]. 核仁分离主要表现为: 正常状态下位于中央、致密的 1~2 个核仁颗粒变为多个松散的且边集的核仁颗粒^[11,13]. 本研究在以往工作的基础上, 进一步证实了过氧化氢同样能导致 C₂C₁₂ 肌源细胞核仁分离, 而热休克反应通过诱导 HSP70 及其他热休克蛋白的表达能阻止核仁分离的发生.

热休克反应是经典的诱导热休克蛋白表达的应激原, 它激活热休克因子 1 (heat shock transcriptional factor 1, HSF1), 活化的 HSF1 形成三聚体后从细胞浆转位至细胞核, 并与多种下游基

因启动子区的热休克元件(heat shock element, HSE)结合,从而启动这些下游基因的表达^[1,14].这些基因包括多种热休克蛋白如:HSP70, HSP90, HSP25 等等^[1].我室以往的研究已证实,热休克反应除诱导 HSP70 高表达外,也在一定程度上导致 HSP90, HSP68, HSP25 等表达增加^[3,5].为了充分阐明 HSP70 的抗核仁损伤作用,本研究采用分子克隆技术构建了含人 HSP70 全长 cDNA 序列的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-HSP70^{WT}.结果发现,将 pcDNA3.1(-)-HSP70^{WT} 导入细胞使 HSP70 过表达后,具有与热休克反应相一致的抑制氧化应激所致核仁分离的作用,说明尽管热休克反应能诱导多种 HSPs 表达,但其抗核仁损伤的作用与 HSP70 的高表达关系密切.

正常状态下, HSP70 主要分布于细胞浆中,而核仁是位于细胞核中的非膜性细胞器,由细胞核膜将其与细胞浆分隔开来.所以,只有能进入细胞核的热休克蛋白才可能具有抗核仁损伤作用.为进一步探讨 HSP70 在氧化应激状态下的核及核仁移位,本研究同时又构建了全长 HSP70 与 GFP 的融合载体 pEGFP-N1-HSP70^{WT}.将其导入细胞后发现正常时,全长 HSP70 主要定位于细胞浆;当过氧化氢处理后 1 h, HSP70 大部分进入细胞核中.采用免疫印迹进一步分析核仁蛋白质发现,当细胞处于氧化应激时,细胞核仁中出现一定量的 HSP70.

随后,采用生物信息学分析发现,在 HSP70 N 端第 246~273 位的共 28 个氨基酸残基有两个相互重叠的双向核定位信号(<http://www.expasy.org/prosite/>).为进一步阐明核定位信号(nuclear localization signal, NLS)对 HSP70 的细胞核转位及抗核仁损伤作用的影响,本研究构建了一个缺失 NLS 结构域的 HSP70 突变体表达载体 pcDNA3.1(-)-HSP70^{ΔNLS},同时还构建了其相应的绿色荧光蛋白表达载体 pEGFP-N1-HSP70^{ΔNLS}.分别导入细胞后再用过氧化氢处理,发现氧化应激不能导致 HSP70^{ΔNLS} 从细胞浆向细胞核及核仁移位,因而失去了抑制核仁分离的作用.

为检验转入 C₂C₁₂ 细胞内且高表达的 HSP70^{WT} 与 HSP70^{ΔNLS} 的生物学活性,本研究检测了转基因对过氧化氢所致细胞乳酸脱氢酶释放率的影响,结果显示,无论是全长 HSP70 还是去掉核定位信号的 HSP70 突变体均能显著抑制过氧化氢所致乳酸脱氢酶的释放.另外我们还采用蛋白质工程技术分离纯化了 HSP70^{WT} 与 HSP70^{ΔNLS} 蛋白,分子伴侣功

能分析的初步结果展示, HSP70^{WT} 与 HSP70^{ΔNLS} 蛋白均能使热失活的乳酸脱氢酶恢复活性,体外蛋白重叠实验的初步结果展示,两者均仍具有与核仁蛋白质 C23(核仁素)结合的能力(结果未展示).这一结果提示,导入细胞且高表达的 HSP70^{WT} 与 HSP70^{ΔNLS} 均具有生物学活性.

综合以上所有结果,我们认为氧化应激时,通过 NLS 的介导, HSP70 从细胞浆向细胞核及核仁转位,而使其抗核仁损伤作用得以发挥.

尽管本研究从一个侧面阐明了 NLS 决定 HSP70 的胞核及核仁转位特性,从而影响着 HSP70 抑制核仁分离的作用,但 HSP70 作为分子伴侣蛋白,其核仁中的靶分子是什么及其相互作用关系如何,还有待深入研究.

参考文献

- Xiao X Z, Benjamin I J. Stress-response proteins in cardiovascular disease. *Am J Human Genet*, 1999, **64**: 685~690
- Kregel K C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, 2002, **92**: 2177~2186
- 肖献忠. 心血管内源性保护的分子机制. *中国病理生理学杂志*, 2002, **18** (13): 1660~1662
Xiao X Z. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2002, **18** (13): 1660~1662
- 将碧梅, 肖卫民, 肖献忠. 热休克预处理抑制过氧化氢所致心肌细胞 Smac 的释放及细胞凋亡. *湖南医科大学学报*, 2003, **28** (6): 567~571
Jiang B M, Xiao W M, Xiao X Z. *Bull Hunan Med Univ*, 2003, **28** (6): 567~571
- Komarova E Y, Afanasyeva E A, Guzhova I V, *et al.* Downstream caspases are novel targets for the antiapoptotic activity of the molecular chaperone hsp70. *Cell Stress Chaperones*, 2004, **9** (3): 265~275
- 王慷慨, 蒋磊, 肖献忠, 等. 热休克蛋白 70 对氧化应激所致核仁素裂解的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (4): 373~377
Wang K K, Jiang L, Xiao X Z, *et al.* *China J Arterioscler*, 2004, **12** (4): 373~377
- Hernandez V D, Louvet E. The nucleolus: structure, functions, and associated diseases. *Med Sci*, 2004, **20** (1): 37~44
- Leung A K, Lamond A I. The dynamics of the nucleolus. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2003, **13** (1): 39~54
- Horky M, Wurzer G, Kotala V, *et al.* Segregation of nucleolar components coincides with caspase-3 activation in cisplatin-treated HeLa cells. *J Cell Sci*, 2001, **114** (Pt 4): 663~670
- Nadano D, Sato T A. Caspase-3-dependent and -independent degradation of 28S rRNA may be involved in the inhibition of protein synthesis during apoptosis initiated by death receptor engagement. *J Biol Chem*, 2000, **275** (18): 13967~13973
- 王慷慨, 邓恭华, 肖献忠, 等. 热休克蛋白 70 对过氧化氢所致乳

- 鼠心肌细胞核仁损伤的保护作用. 中国动脉硬化杂志, 2002, **10** (5): 384~388
- Wang K K, Deng G H, Xiao X Z, *et al.* China J Arterioscler, 2002, **10** (5): 384~388
- 12 Al-Baker E A, Boyle J, Harry R, *et al.* A p53-independent pathway regulates nucleolar segregation and antigen translocation in response to DNA damage induced by UV irradiation. Exp Cell Res, 2004, **292** (1): 179~186
- 13 Benjamin I J, McMillan D R. Stress (heat shock) proteins molecular chaperones in cardio-vascular biology and disease. Circ Res, 1998, **83**: 117~132

Roles of Nuclear Localization Signal (NLS) in Inhibitory Effect of HSP70 on Nucleolar Segregation Induced by Oxidative Stress*

WANG Kang-Kai, E Shun-Mei, JIANG Lei, ZHANG Hua-Li,
LIU Ke, ZHANG Ling-Li, XIAO Xian-Zhong**

(Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract To clarify the roles of nuclear localization signal (NLS) in inhibitory effect of HSP70 on H₂O₂-mediated nucleolar segregation, four eukaryotic vectors pcDNA3.1 (-)-HSP70^{WT} (wild type), pcDNA3.1 (-)-HSP70^{ΔNLS} (truncated mutant of HSP70 without NLS), pEGFP-N1-HSP70^{WT}, and pEGFP-N1- HSP70^{ΔNLS} were constructed respectively. To mimic oxidative stress *in vitro*, final concentration of 1.0 mmol/L hydrogen peroxide (H₂O₂) was added into cultured C₂C₁₂ myogenic cells. Toluidine blue staining showed predominantly compact, centrally localized nucleoli in intact control cells, but in H₂O₂-treated cells, an early onset of nucleolar segregation could be found after 3 h. The nucleolar segregation could be inhibited significantly in heat shock-pretreated cells and pcDNA3.1 (-)-HSP70^{WT}-transfected cells. Fluorescence microscopy and immunoblotting for nucleolar protein showed that HSP70^{WT} was localized within cytoplasm in normal cells and redistributed to nucleus and nucleolus at 1 h after treatment with H₂O₂. NLS deletion mutation of HSP70 (pcDNA3.1 (-)-HSP70^{ΔNLS}) abolished H₂O₂-mediated translocation of HSP70 from cytoplasm to nucleus and nucleolus, and subsequently, its inhibitory effect on H₂O₂-mediated nucleolar impairment. It was suggested that wild type of HSP70 can attenuate significantly nucleolar segregation induced by oxidative stress. By mediating translocation of HSP70 from cytoplasm to nucleus and nucleolus, NLS played important role in the inhibitory effect of HSP70 against nucleolar impairment induced by oxidative stress.

Key words heat shock protein 70 (HSP70), nuclear localization signal (NLS), oxidative stress, nucleolus, nucleolar segregation

*This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G200056908) and The National Natural Sciences Foundation of China (30300177, 30270533).

**Corresponding author. Tel: 86-731-2355019, E-mail: xianzhongxiao@hotmail.com

Received: December 6, 2004 Accepted: January 31, 2005