

# 热休克反应中小鼠心脏 HSP70 表达的 免疫组织化学研究\*

郭 玫 张顺利 张文学 魏纪东 张新胜 薛德明 徐存拴

(河南师范大学生命科学学院 新乡 453002)

**摘要:**用免疫组织化学方法研究了小鼠心脏在不同温度(40、42、44、46℃)热休克处理后,各恢复期(2、4、8、12、24 小时)HSP70 的表达。结果表明,(1)44、46℃热处理能诱导心肌细胞合成 HSP70,以 46℃为多( $P < 0.01$ ),且于恢复期 4~8 小时为合成高峰( $P < 0.01$ );(2)阳性免疫反应定位于心肌细胞质中,核呈阴性反应。提示了心脏有较强的耐热能力。

**关键词:**小白鼠;心脏;免疫组织化学;热休克蛋白 70(HSP70)

**中图分类号:**Q256 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2001)02-15-04

---

\* 中法先进技术合作项目(B96-11)及河南省教委自然科学基金项目(No. 97180014);

第一作者简介 郭玫,女,35岁,副教授,学士;研究方向:组织学与胚胎学;Email: lgn@fun.21cn.com

收稿日期:1999-09-19,修回日期:2000-07-23

# The Immunohistochemical Study of HSP70 Expression of the Mouse Heart in Heat Shock Response

GUO Mei ZHANG Shun-Li ZHANG Wen-Xue WEI Ji-Dong ZHANG Xin-Sheng  
XUE De-Ming XU Cun-Shuan

(College of Life Science, Henan Normal University Xinxiang 453002, China)

**Abstract:**The immunohistochemical method was used to analyze the expression of HSP70 in the heart of the mice which were treated at different temperature (40,42,44,46℃) for 30 minutes and had different recovery time (2,4,8,12,24 h). The results show that: (1) Cardiac muscle cells could synthesize HSP70 at 44℃ and 46℃, HSP70 was increased in 46℃ group ( $P < 0.01$ ). There was peak value of HSP70 after 4 ~ 8 h recovery ( $P < 0.01$ ). (2) Positive immunoreactivity was localized in the cytoplasm while nucleus was negative. It suggests that the heart have strong thermotolerance in the heat shock.

**Key words:** Mouse; Heart; Immunohistochemistry; Heat shock protein70 (HSP70)

热休克反应以热休克蛋白(HSP)的合成成为主要标志。HSP能提高细胞的耐受力<sup>[1]</sup>,在细胞热休克反应中对异常蛋白质的降解起重要作用<sup>[2,3]</sup>,对热休克后细胞的生存是必需的<sup>[4-6]</sup>。其中HSP70是最保守、最普遍的一种,在蛋白质的折叠、组装、解聚、降解中起重要作用<sup>[7]</sup>。有关HSP的诱导有许多研究,但多以体外培养的细胞为实验材料<sup>[4,8]</sup>,对整体动物HSP的合成规律研究较少。且研究多采用Western blot或放射自显影等方法,热休克诱导小鼠心脏HSP的表达尚未见报道。本文以免疫组织化学方法对小鼠热休克后心脏HSP70的表达、定位和动态变化进行了研究。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物及热休克处理** 昆明种小鼠,7~8周龄,体重(22±2)g,雌雄各半,购自河南省医学实验动物中心。随机分为对照组和实验组,对照组不做热休克处理,实验组动物分别置于40、42、44、46℃恒温箱热休克处理30分钟,各种温度处理的动物均分5组(每组10只),分别于室温恢复2、4、8、12、24小时后取材。

**1.2 标本制备及免疫组化染色** 将各组动物放血处死,速取心脏放入10%福尔马林固定24

小时,常规石蜡切片,6μm厚连续切片,间隔60μm取一片,每只动物取5片,以过氧化物酶标记的链霉菌白素(sp)法做免疫组化染色,全部标本在加一抗前均做微波炉抗原修复。DAB显色,苏木精复染。以PBS取代一抗做阴性对照。所用抗体及来源和工作浓度见表1。

表1 免疫组化所用抗体及其来源和工作浓度

试剂	工作浓度	作用时间	来源
鼠抗 HSP70	1:800	4℃ 24 h	Sigma 公司
羊抗鼠 IgG	1:200	37℃ 30 min	美国 Zymed 公司
SA-HRP	1:200	37℃ 30 min	美国 Zymed 公司

**1.3 图像分析** 用MPLAS-500图像分析系统(同济医科大学生产)对结果进行分析。每片随机观察5个视野,测定每个视野的阳性反应面积占所观察视野面积的百分比,根据其均值和标准差做统计学分析。

## 2 结 果

**2.1 不同温度对 HSP70 表达的影响** 在40、42℃热处理的各组动物中,未能在心肌组织中检测到HSP70的表达。44℃组在恢复期2小时有少量HSP70表达,恢复期4小时达到高峰(图版I:1,2)。46℃组表达甚多,恢复期2小时即

有一定的 HSP70 合成(图版 I: 3), 4~8 小时 达到高峰(图版 I: 4), 之后逐渐减弱(表 2)。

表 2 热处理后心肌 HSP70 阳性面积百分比(% ,  $\bar{X} \pm S$ )

温度 (°C)	分 组(h)				
	2	4	8	12	24
44	8.40 ± 2.42	54.42 ± 7.58 <sup>Δ</sup>	28.16 ± 5.71	21.56 ± 4.83	20.43 ± 5.15
46	20.33 ± 4.35*	75.60 ± 9.96* <sup>Δ</sup>	77.42 ± 8.32* <sup>Δ</sup>	58.43 ± 8.49	56.74 ± 7.64

\* 与 44°C 组对应恢复时间相比,  $P < 0.01$ ;  $\Delta$ : 与本组恢复期 2 小时相比,  $P < 0.01$

**2.2 HSP70 在心肌细胞中的定位** 免疫组化染色的阳性部位呈黄色和棕黄色颗粒, 背景无色, 核呈蓝色。HSP70 集中定位在心肌细胞质中, 核及细胞膜均成阴性。正常对照和阴性对照不着色。

### 3 讨 论

热休克反应中, 不同的组织器官或细胞存在着不同的反应性, 有的细胞产生热耐受性, 有的细胞则发生损伤, 甚至死亡。细胞抗逆能力形成的共同分子机制——HSP 的诱导合成, 对细胞抵抗不利环境至关重要。我们曾发现热休克能诱导肝脏表达 HSP70<sup>[9]</sup>, 与之相比心脏需要较高的温度刺激才能表达 HSP70, 且表达迅速, 合成的高峰期有所提前, 说明心脏有较高的耐热能力。热处理使体温升高, 直接导致了机体呼吸和血液循环速率加快。心脏作为机体的泵血器官, 其较高的耐热能力对维持心肌细胞正常的生理功能有着重要意义。

有人证明 HSP68、HSP70、HSP110 主要分布于核或核仁区域, 它们在细胞质中合成, 合成后进入核内组成骨架结构。本研究显示, HSP70 免疫阳性反应定位于心肌细胞胞浆中, 未发现核中有 HSP70 表达, 因此, HSP70 合成后的保存、运输、分布还有待进一步研究。

HSP70 对热休克后细胞的复原起重要作用, 这一过程是 ATP 依赖性的, 利用水解 ATP 的能量可使 HSP70 与变性蛋白质解聚, 使之重新折叠复性<sup>[10, 11]</sup>。磷酸酶能水解磷酸酯键, 释放的无机磷酸可供 ATP 合成所需。以往我们的研究表明, 热休克后小鼠心肌细胞磷酸酶活性增强是细胞提高热耐受力的一条重要途

径<sup>[12]</sup>。本研究又显示, 热休克诱导 HSP70 合成、表达, 并出现高峰期, 且与磷酸酶活性的变化规律相一致, 提示磷酸酶与 HSP70 在细胞复原过程中起协同作用。

### 参 考 文 献

- [1] Laemmli, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 1970, 227: 680 ~ 685.
- [2] Xu, C.S., F. Fracella, L. Rensing *et al.* Stress response of lysosomal cysteine proteinases in rat C6 glioma cells. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997, 117B: 169 ~ 178.
- [3] 徐存控, 吉爱玲, 夏民等. C6 大白鼠神经胶质瘤细胞 HSP68 的修饰和降解分析. *生物化学与生物物理学报*, 1998, 30(2): 179 ~ 184.
- [4] Stoklosinski, A., H. Kruse, C. Richter-Landsberg *et al.* Effects of heat shock on neuroblastoma (NIE 115) cell proliferation and differentiation. *Exp. Cell Res.*, 1992, 200(1): 89 ~ 96.
- [5] Rosario, Mo, S.L. Perkins, D.A. O'Brien *et al.* Identification of the gene for the developmentally expressed 70 kDa heat-shock protein (P70) of mouse spermatogenic cells. *Dev. Biol.*, 1992, 150(1): 1 ~ 11.
- [6] Riabowol, K.T., L.A. Mizzen, W.J. Welch. Heat shock is lethal to fibroblasts microinfected with antibodies against HSP70. *Science*, 1988, 241: 433 ~ 436.
- [7] 朱大栩, 马更生. 热休克蛋白的生物学功能. *国外医学分子生物学分册*, 1993, 15(6): 275 ~ 278.
- [8] Pratt, W.B. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Bio. Chem.*, 1993, 268(29): 21 455 ~ 21 458.
- [9] 张顺利, 郭玫, 张新胜等. 热休克诱导小鼠肝脏表达热休克蛋白 70 的研究. *解剖学杂志*, 2000, 23(4): 329 ~ 332.
- [10] 王顺友, 朱忠勇. 热休克蛋白的产生及功能. *生理科学进展*, 1991, 22(4): 370 ~ 372.
- [11] 凌明圣, 徐明波, 姚志建. 分子伴侣 HSP70 研究进展.

国外医学分子生物学分册, 1993, 15(5):227~230.

酶活性的影响. 上海实验动物科学, 1998, 18(2):73~

[12] 张顺利, 郭玫, 张新胜等. 热休克对小鼠心、肝、肾磷酸

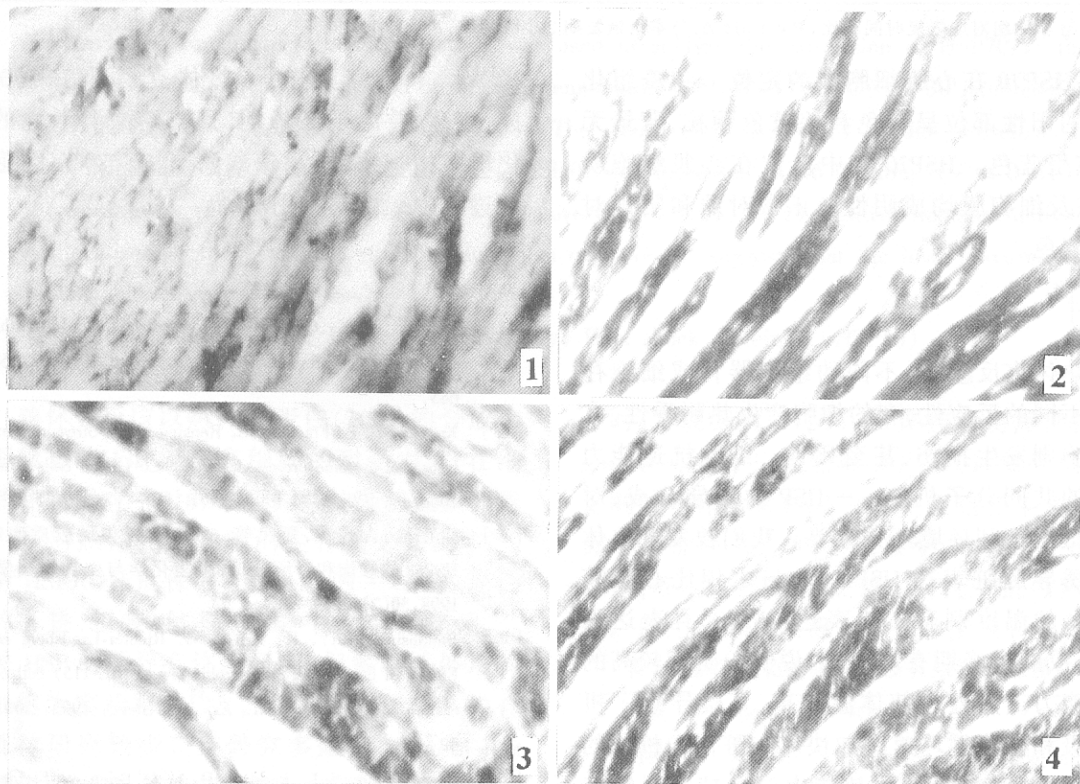
76.

郭玫等:热休克反应中小鼠心脏 HSP70 表达的免疫组织化学研究

图版 I

GUO Mei *et al.*: The Immunohistochemical Study of HSP70 Expression of the  
Mouse Heart in Heat Shock Response

Plate I



1.44℃组恢复2小时 HSP70 呈弱阳性表达 ×100; 2.44℃组恢复4小时 HSP70 呈中阳性表达 ×400;  
3.46℃组恢复2小时 HSP70 呈阳性表达 ×400; 4.46℃组恢复4小时 HSP70 呈强阳性表达 ×400

