

热应激对大鼠肝组织及人前列腺癌 PC-3 细胞 RhoB 表达的影响

刘亚萍, 李忆东, 王晓慧, 杨 瑞, 卢 建*

(第二军医大学基础部病理生理学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 观察烫伤后大鼠肝脏组织及热应激后前列腺癌 PC-3 细胞小 G 蛋白 RhoB 表达的变化, 探讨热应激对体内外 RhoB 表达的影响。 **方法:** 制备雄性 SD 大鼠 30% 体表面积Ⅲ度背部烫伤模型, 烫伤后 2、4、8、16 h 取相应大鼠肝脏组织 ($n=6$), 应用 RT-PCR 和 Western 印迹分析测定 RhoB mRNA 和蛋白水平, 并以正常大鼠肝脏组织作对照 ($n=6$)。制备人前列腺癌 PC-3 细胞热应激模型, 热应激后 0.5、1、2、4、8 h 取细胞检测 RhoB 的表达, 并以未处理细胞作对照。 **结果:** 烫伤后 4 h, 大鼠肝组织 RhoB mRNA 表达量最高, 为正常对照的 3.2 倍 ($P<0.01$), 8 h 开始下降; 而 RhoB 蛋白表达量在烫伤后 8 h 最高 ($P<0.01$)。PC-3 细胞 RhoB mRNA 在热应激后 2 h 时开始上调; 4 h 时达到最大值, 约为对照的 2.8 倍 ($P<0.01$); 热应激后 8 h RhoB 蛋白表达量最高 ($P<0.01$)。 **结论:** 在体内、体外实验中热应激均能上调小 G 蛋白 RhoB mRNA 和蛋白的表达。

[关键词] 热应激; 烫伤; 小 G 蛋白; RhoB; 肝; 前列腺肿瘤

[中图分类号] R 644 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)04-0381-04

Effect of heat stress on expression of small G protein RhoB in rat livers and human prostate cancer cell line PC-3 cells

LIU Ya-ping, LI Yi-dong, WANG Xiao-hui, YANG Rui, LU Jian* (Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the changes of the small G protein RhoB expression in scalded rat livers and heat-stressed human prostate cancer cell line PC-3, so as to discuss the influence of heat stress on expression of RhoB *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** Third degree burns of 30% total body surface area (TBSA) model was established with SD rats on the back. The expression of RhoB mRNA and protein in the liver was determined by RT-PCR and Western blot 2 h, 4 h, 8 h and 16 h ($n=6$) after scalding; the liver tissues of normal rats were taken as control ($n=6$). PC-3 cells were allowed to recover for 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h and 8 h in a cellular heat stress model and the expression of RhoB in mRNA and protein were determined by RT-PCR and Western blot, respectively; untreated PC-3 cells were taken as control. **Results:** The expression of RhoB mRNA in the livers peaked 4 h after scalding, being about 3.2 folds that of the control group ($P<0.01$); the expression began to decline 8 h after scalding. The expression of RhoB protein peaked 8 h after scalding, significantly higher than that of the control ($P<0.01$). RhoB mRNA level began to increase 2 h after heat stress treatment and peaked at 4 h, being about 2.8 folds that of the control ($P<0.01$). The expression of RhoB protein reached its maximum at 8 h after heat stress treatment ($P<0.01$).

Conclusion: Heat stress can up-regulate the expression of RhoB mRNA and protein *in vivo* and *in vitro*.

[KEY WORDS] heat stress; scalding; small G protein; RhoB; liver; prostatic neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(4): 381-384]

RhoB 属于小 G 蛋白 Rho 亚家族, 与 GTP 结合是其活性形式。RhoB 激活后能进一步激活下游信号转导通路, 调节细胞骨架重组、囊泡运输, 在细胞运动、增殖和凋亡等过程中发挥复杂多样的生物学效应^[1-2]。已有的研究表明 RhoB 是一个早期反应基因, 多种刺激, 如生长因子、细胞因子以及基因毒应激(如放射线、紫外线、化学毒物及抗癌药)等均能迅速上调 RhoB mRNA 和蛋白质水平的表达^[3-8]。热应激是一种非基因毒应激性应激原, 与临床关系密切。本研究观察烫伤后大鼠模型肝脏组织及热应激后前列腺癌 PC-3 细胞 RhoB 表达的变化, 探讨非基因

毒应激(热应激)在体内外对 RhoB 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 TRIzol Reagent 购自 Gibco BRL 公司; 兔抗小鼠 RhoB 多克隆抗体(SC-180)购自 Santa Cruz 公司; 小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体为 Sigma 产品; 羊抗兔、兔抗小鼠 AP 标记二抗购自华美生物工程公司; RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公

[作者简介] 刘亚萍, 硕士生。E-mail: doudon-8011@163.com

* Corresponding author. E-mail: lujian326@yahoo.com

司;人前列腺癌 PC-3 细胞由美国 Gerogetown 大学张世民博士惠赠。

1.2 动物分组与烫伤模型复制 正常清洁级 SD 大鼠(购自第二军医大学实验动物中心),体质量 220~250 g,雄性,随机分为正常对照组及烫伤后 2、4、8、16 h 组,每组 6 只。大鼠烫伤模型参考文献^[9]的方法将其背部剪毛,肌内注射 20% 乌拉坦(100 mg/kg)麻醉后,将剪毛区置于 100℃ 水中 15 s,造成 30% 体表面积Ⅲ度烫伤,伤后腹腔注入生理盐水 20 ml 抗休克,分笼喂养,自由进食。分别在上述各时间点处死动物并取其肝组织置液氮中保存。

1.3 细胞培养及热应激模型的复制 人前列腺癌 PC-3 细胞常规培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 的培养基中,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育,每周传代 1~2 次。细胞热应激模型参考徐晓辉等^[10]的人肝癌细胞系 SMMC-7721 热应激模型,即取生长良好的细胞(密度 80% 左右),置于 42℃ 水浴中 1 h,而后置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中恢复 1 h。

1.4 RT-PCR 检测 RhoB mRNA 的表达 采用一步法抽提细胞总 RNA,琼脂糖凝胶电泳结果显示 RNA 保持了良好的完整性,紫外分光光度法确定 RNA 的量和纯度。用 Primer5.0 软件设计并合成(上海生工公司)RhoB 引物:上游引物为 5'-TGC TGA TCG TGT TCA GTA AG-3',下游引物为 5'-AGC ACA TGA GAA TGA CGT CG-3';扩增片段长度为 189 bp。GAPDH 的上游引物为 5'-TTC ATT GAC CTC AAC TAC ATG-3',下游引物为 5'-GTG GCA GTG ATG GCA TGG AC-3',扩增片段长度为 443 bp。以总 RNA 为模板按逆转录试剂盒上的说明进行逆转录反应。反应条件为:25℃ 10 min,42℃ 60 min,70℃ 10 min。PCR 反应体系总体积为 20 μl,反应条件为:95℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,共扩增 26 个循环,于最后 72℃ 延伸 10 min,扩增产物置于 4℃ 备用。

1.5 Western 印迹检测 RhoB 蛋白的表达 取大鼠肝组织(100 mg)或收集 PC-3 细胞(1×10⁶ 个),按试剂盒说明加入 RIPA 充分裂解细胞,经 BCA 法进行蛋白定量后,取 80 μg 蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳,常规转膜。室温下 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入 1:300 稀释的兔抗小鼠 RhoB 多克隆抗体(SC-180),4℃ 过夜,经 TBST 充分洗涤后再与 1:1 000 稀释的抗兔 IgG-AP 室温孵育 2 h,TBST 充分洗涤后,采用 AP 化学发光试剂盒显色。

1.6 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Students' *t* 检验进行组间差异显著性检验。

2 结果

2.1 烫伤对大鼠肝脏组织小 G 蛋白 RhoB mRNA 和蛋白表达的影响 与正常对照相比,烫伤能够上调大鼠肝脏组织 RhoB mRNA 和蛋白的表达,且具有时间依赖性特点,其中烫伤后 4 h 达到最大值,约为对照组的 3.2 倍($P < 0.01$)(图 1A、1B);烫伤后 8 h 肝组织 RhoB 蛋白表达量最高(图 1C)。我们用同样的方法观察了烫伤后肺组织 RhoB 的表达,发现烫伤也能诱导肺组织 RhoB 的表达(结果没有显示),表明烫伤对 RhoB 的诱导作用没有组织特异性。

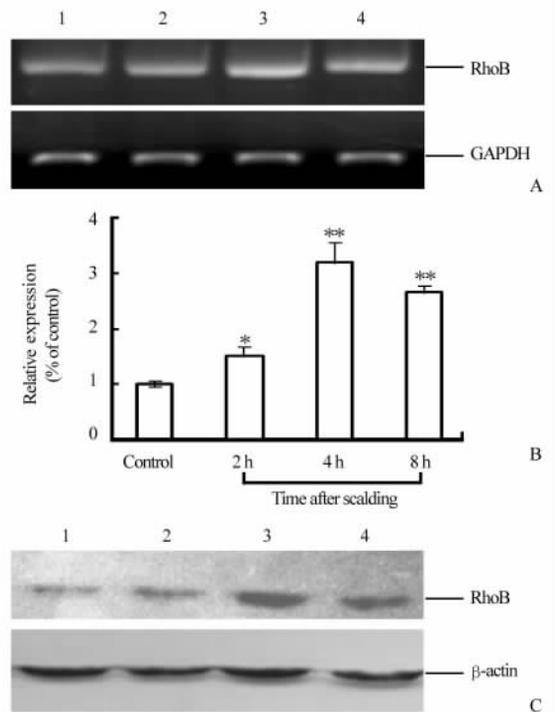


图 1 烫伤上调大鼠肝组织中 RhoB mRNA 和蛋白的表达

Fig 1 Up-regulation of RhoB mRNA and protein expression in rat liver after scalding

A: The expression of RhoB mRNA and the internal control GAPDH mRNA was analyzed by RT-PCR. 1: Control group; 2: 2 h after scalding; 3: 4 h after scalding; 4: 8 h after scalding. B: The relative expression of RhoB mRNA(% of control). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. C: The expression of RhoB protein was analyzed by Western blotting. β -actin served as the internal control. 1: Control group; 2: 4 h after scalding; 3: 8 h after scalding; 4: 16 h after scalding

2.2 热应激对 PC-3 细胞中小 G 蛋白 RhoB mRNA 和蛋白表达的影响 RhoB mRNA 在热应激后 2 h 时开始上调,4 h 时达到最大值,约为对照组的 2.8 倍($P < 0.01$)(图 2A、2B);RhoB 蛋白表达量也明显增高(图 2C),表明热应激本身也可以快速诱导 PC-3

细胞 RhoB 的表达。

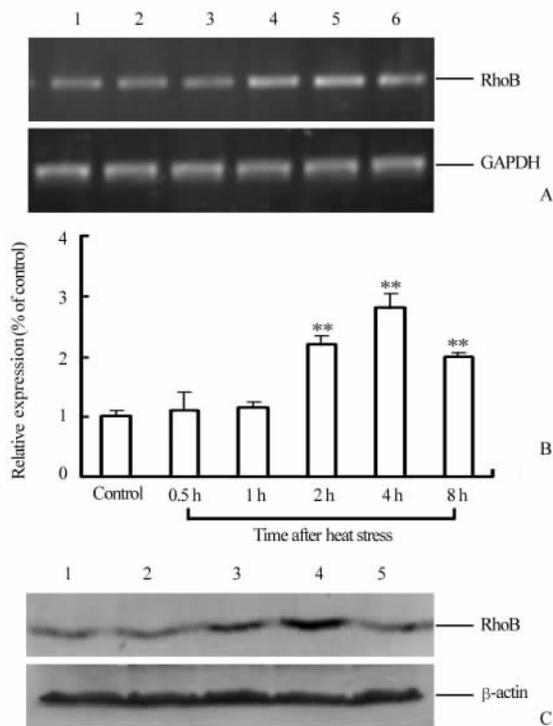


图2 热应激上调 PC-3 细胞中 RhoB mRNA 和蛋白的表达

Fig 2 Up-regulation of RhoB mRNA and protein in PC-3 cells after heat stress treatment

A: The expression of RhoB mRNA and the internal control GAPDH mRNA was analyzed by RT-PCR. 1: Control group; 2: 0.5 h after heat stress; 3: 1 h after heat stress; 4: 2 h after heat stress; 5: 4 h after heat stress; 6: 8 h after heat stress. B: The relative expression of RhoB mRNA (% of control). ** $P < 0.01$ vs control; $n = 3, \bar{x} \pm s$. C: The expression of RhoB protein was analyzed by Western blotting. β -actin served as an internal control; 1: Control group; 2: 2 h after heat stress; 3: 4 h after heat stress; 4: 8 h after heat stress; 5: 16 h after heat stress

3 讨论

小 G 蛋白 RhoB 能够抑制包括肿瘤细胞在内的多种细胞的增殖,并能够调节细胞的运动和凋亡。近年来的研究表明,多种基因毒应激能够诱导 RhoB mRNA 和蛋白的表达,RhoB 又可以通过影响 AKT 和转录因子 NF- κ B 的活性,参与细胞应激原反应,对细胞产生保护作用。如中波紫外线(UVB)能够诱导人角化细胞(HaCaT 细胞)中 RhoB 的表达,RhoB 的上调通过增加表皮生长因子受体(EGFR)的表达促进 AKT 的磷酸化(活化),活化的 AKT 可抑制 caspase 9 的活性而起到抑制凋亡的作用^[11]。本实验室前期的工作也发现,糖皮质激素(GC)可以在多种细胞中诱导 RhoB 的表达,而在人卵巢癌 HO-8910 细胞中 RhoB 能够提高 NF- κ B 的基础转录活性^[12-13]。NF- κ B 已被证实是参与细胞应激反应

的重要转录因子,具有保护细胞免受有害刺激的作用。已知多种非基因毒应激反应,如烫伤时有 GC 水平的明显增高和 NF- κ B 的激活,因此烫伤时 RhoB 的表达是否改变成为本研究重要观察对象。目前未见有热应激影响 RhoB 的表达方面的研究报道,为此,我们首先观察了烫伤对大鼠肝组织 RhoB 表达的影响,结果显示,烫伤后 2 h 时大鼠肝组织中 RhoB mRNA 的表达即开始增加,烫伤后 4 h 时表达量最高,为对照组的 3.2 倍($P < 0.01$);RhoB 蛋白的表达也增高,于烫伤后 8 h 表达量最高,表明烫伤可以诱导大鼠肝组织 RhoB 的表达。我们用同样的方法观察了烫伤后肺组织 RhoB 的表达,发现烫伤也能诱导肺组织 RhoB 的表达,表明烫伤对 RhoB 的诱导作用没有组织特异性。为进一步了解烫伤后 RhoB 的上调除了可能与 GC 对 RhoB 的诱导作用有关外,是否也是热刺激直接作用的结果,我们进一步观察了热应激对体外培养的前列腺癌 PC-3 细胞 RhoB 表达的影响。结果显示,热应激能快速诱导 RhoB 的表达,提示 RhoB 的表达不仅受 GC 的调节,热刺激本身也可以诱导 RhoB 的表达,烫伤后 RhoB 表达增多至少与这两方面的因素有关。

本研究从体内和体外实验中首次证实热应激这个非基因毒应激也能够诱导小 G 蛋白 RhoB 的表达,但对于热应激上调 RhoB 表达的确切机制以及 RhoB 上调的生物学意义还有待进一步的实验研究。

[参考文献]

- [1] Huang M, Prendergast G C. RhoB in cancer suppression[J]. *Histol Histopathol*, 2006, 21: 213-218.
- [2] DuHadaway J B, Du W, Donover S, et al. Transformation-selective apoptotic program triggered by farnesyltransferase inhibitors requires Bin1[J]. *Oncogene*, 2003,22:3578-3588.
- [3] Fritz G, Kaina B. Transcriptional activation of the small GTPase gene *rhoB* by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001,29:792-798.
- [4] Fritz G, Kaina B, Aktories K. The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments [J]. *J Biol Chem*, 1995,270:25172-25177.
- [5] Gnad R, Kaina B, Fritz G. Rho GTPases are involved in the regulation of NF-kappaB by genotoxic stress [J]. *Exp Cell Res*, 2001,264:244-249.
- [6] Westmark C J, Bartleson V B, Malter J S. RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light [J]. *Oncogene*, 2005,24:502-511.
- [7] Gerhard R, Tatge H, Genth H, et al. Clostridium difficile toxin A induces expression of the stress-induced early gene product RhoB [J]. *J Biol Chem*, 2005,280:1499-1505.
- [8] Liu A X, Cerniglia G J, Bernhard E J, et al. RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001,98:6192-6197.

[9] 魏 斌,李晓辉,李淑慧,等.严重烫伤大鼠心肌抑制性 G 蛋白 α 亚基的变化[J].中国危重病急救医学,2000,12:492-494.

[10] 徐晓辉,王学敏,谭金兴,等.人肝癌 SMMC-7721 细胞热休克反应条件的确立[J].第二军医大学学报,2002,23:920-921.

[11] Canguilhem B, Pradines A, Baudouin C, et al. RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. [J]. J Biol Chem, 2005,280:43257-43263.

[12] Chen Y X, Li Z B, Diao F, et al. Up-regulation of RhoB by glucocorticoids and its effects on the cell proliferation and NF-κB transcriptional activity[J]. JSBMB, 2006, 101:179-187.

[13] 陈玉霞,李宗斌,刁 飞,等.地塞米松抑制人卵巢癌细胞 HO-8910 增殖的分子机制:RhoB 信号通路的作用[J].中华医学杂志,2006,86:1400-1404.

[收稿日期] 2007-02-05 [修回日期] 2007-03-31

[本文编辑] 贾泽军,尹 茶

· 个案报告 ·

VHL 综合征一例报告

Von Hippel-Lindau disease: a case report

俞能旺,崔心刚,高 轶,阴 雷,徐丹枫* (第二军医大学长征医院泌尿外科,上海 200003)

[关键词] Hippel-Lindau 病;肾肿瘤;肾上腺肿瘤;小脑肿瘤;胰腺肿瘤

[中图分类号] R 73 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2007)04-0384-01

1 临床资料 患者,男,37岁,因“双侧肾上腺肿瘤、小脑肿瘤术后复查发现双肾肿瘤”于2006年6月7日入院。患者1984年因出现阵发性头痛、心悸、出汗、血压升高(最高220/120 mmHg, 1 mmHg=0.133 kPa),入当地医院诊断为“双侧肾上腺嗜铬细胞瘤”行“双侧嗜铬细胞瘤切除术”,术后病理证实诊断,术后症状缓解,血压降至正常。1997年因头晕、走路不稳入当地医院检查,诊断“小脑血管母细胞瘤”,行“后颅窝去骨瓣减压术”后症状好转。半个月前单位体检B超发现“双肾多发占位”,门诊收入我科。患者外祖父有肾肿瘤病史,母亲有“小脑肿瘤”病史。查体:意识清楚,语言确切,血压115/75 mmHg,心率70次/min,眼底检查未见渗出及血管畸形。颈软,两肺呼吸音清,心律齐,腹平软,肝脾肋下未触及,双肾区未及包块,肾区无叩击痛,外生殖器未触及异常。CT检查提示:(1)双肾多发性透明细胞癌;(2)胰腺内分泌类肿瘤,胰腺囊肿;(3)右侧肾上腺占位。MRI检查提示:(1)小脑血管母细胞瘤;(2)双肾多发性透明细胞癌,双肾多发性囊肿,右肾上腺嗜铬细胞瘤;(3)胰腺多发囊肿,胰腺内分泌瘤。血常规、电解质及肝、肾功能正常。2006年6月21日在全麻下行后颅窝小脑肿瘤切除术,术后病理证实为小脑血管母细胞瘤。2006年7月19日行左肾肿瘤根治术加右肾肿瘤剝除术和右肾上腺肿瘤切除术,术后病理证实为透明细胞癌和肾上腺嗜铬细胞瘤。术后恢复良好,出院复查肾功能正常。

2 讨论 VHL病(Von Hippel-Lindau disease)的发现和确立已有近百年的历史。尽管研究推测VHL为一抑癌基因,VHL病大多有VHL基因的突变,但VHL基因突变也见于一些散发性肿瘤患者^[1]。

国外统计资料显示,VHL病的发病率为1:36 000,至65岁其外显率为80%~90%,患者临床表现呈多样化,主要包括视网膜血管瘤、中枢神经系统成血管细胞瘤、肾癌、肾囊肿、胰腺肿瘤和囊肿、嗜铬细胞瘤、附睾肿瘤等病变。临床上将该病分为两种类型,即不伴有嗜铬细胞瘤的I型和伴有嗜铬细胞瘤的II型。目前为大多数学者所认同的诊断标准:

(1)至少有一个中枢神经系统血管母细胞瘤;(2)有中枢神经系统血管母细胞瘤及VHL内脏器官病变表现;(3)有家族史。该患者符合此诊断标准,且属于II型。

VHL的治疗目前主要是通过手术,对于胰腺、肾上腺、肾脏病变要考虑周全,经充分的术前准备后行同期手术治疗。其中泌尿系统病变在临床表现上常为双侧多发性,在治疗上具有其特点。对于嗜铬细胞瘤,多行肿瘤切除术,保留肾上腺。对VHL病双肾多发肾癌的治疗上争议较大:一部分学者主张保留肾单位治疗,可以避免早期透析、肾移植,且病例选择得当可以获得较高的5年、10年生存率;一部分学者认为由于VHL患肾可能包含无数个微小肿瘤,保留肾单位治疗最终肿瘤复发的概率很高,故主张早期做肾癌根治性切除术,术后行透析或肾移植^[2-3]。本例患者由于左肾有一个直径为6cm的较大肿瘤,故行左肾肿瘤根治术,右肾肿瘤较小,行肿瘤剝除术,同时行右肾上腺肿瘤切除术。胰腺肿瘤由于无明显症状,且临床诊断为良性,考虑本次手术同时处理了双肾和一侧肾上腺,手术时间较长,创伤已较大,故胰腺肿瘤未予同期处理,待患者本次手术康复后根据具体情况再行处理。

[参考文献]

[1] Shuin T, Yamazaki I, Tamura K, et al. Recent advances in ideas on the molecular pathology and clinical aspects of Von Hippel-Lindau disease[J]. Int J Clin Oncol, 2004, 9:283-287.

[2] 何柏身,彭光明. VHL 综合征的现代观[J]. 医学临床研究, 2005,22:995-996.

[3] 杜林栋,张道新. Von Hippel-Lindau 病并发肾癌的诊断和治疗[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004,25:127-129.

[收稿日期] 2006-10-29 [修回日期] 2007-03-21

[本文编辑] 贾泽军

[作者简介] 俞能旺,硕士生. E-mail: yunengwang@hotmail.com
* Corresponding author. E-mail: xudf-mr@vip. sina. com