

黄朴, 孙瑜, 李覃, 等. 2009. 蓝藻水华粗提物对小鼠肝脏 HSP70 GRP78 表达的影响 [J]. 环境科学学报, 29(6): 1278- 1282

Huang P, Sun Y, Li T, *et al* 2009 Effect of cyanobacterial bloom extract on the expression of HSP 70 and GRP 78 in mouse liver[J]. A c t a S c i e n t i a e C i r c u m s t a n t i a e, 29(6): 1278- 1282

蓝藻水华粗提物对小鼠肝脏 HSP70, GRP78 表达的影响

黄朴, 孙瑜, 李覃, 徐立红*

浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 杭州 310058

收稿日期: 2008-09-08 录用日期: 2009-04-22

摘要: 为研究在活体条件下自然水环境中蓝藻水华对生物体的毒性效应, 将小鼠连续 7d 经灌胃暴露于不同浓度的蓝藻水华粗提物, 通过 western-blotting 法测定小鼠肝组织中热应激蛋白 HSP70 与内质网应激相关的 GRP78、CHOP 以及 caspase-12 蛋白表达水平. 结果显示, 随着暴露浓度的提高, 在最高浓度组, HSP70、GRP78 的表达水平显著提高, 但未见 CHOP 和 caspase-12 表达的明显改变. 研究结果表明, 蓝藻水华粗提物使小鼠肝组织处于内质网应激状态.

关键词: 蓝藻水华粗提物; 小鼠肝组织; HSP70 GRP78 CHOP; caspase-12

文章编号: 0253-2468(2009) 06-1278-05 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effect of cyanobacterial bloom extract on the expression of HSP 70 and GRP 78 in mouse liver

HUANG Pu, SUN Yu, LI Tan, XU Lihong*

Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058

Received 8 September 2008; accepted 22 April 2009

Abstract In order to study the toxic effect of cyanobacterial bloom on animals, cyanobacterial bloom extract was administered orally to ICR mice for 7 days with different dosages. The expression level of HSP 70, GRP78, CHOP and caspase-12 were measured by western blotting. The results showed that after 7 days of exposure to cyanobacterial bloom extract, the expression level of HSP 70 and GRP 78 in mice liver was increased significantly between the control and treatment groups, but there were no significant changes in CHOP and caspase-12 expression. This evidence suggests that endoplasmic reticulum (ER) stress may be induced after treatment with cyanobacterial bloom extract.

Keywords cyanobacterial bloom extract; HSP70 GRP 78 CHOP; caspase-12

1 引言 (Introduction)

水体富营养化已经成为全球关注的环境热点问题. 富营养化直接导致藻类大量生长, 产生“水华”, 严重影响了水质和人类健康. 蓝藻是最常见的淡水藻类, 其中的微囊藻属、颤藻属、鱼腥藻属、念珠藻属可产生微囊藻毒素, 已有研究证明蓝藻水华中的微囊藻毒素与人群中的肝癌发生密切相关 (Yoshizawa *et al.*, 1990; Nishiwaki *et al.*, 1992; Toviola *et al.*, 1997; Humpage *et al.*, 2000). 近年来, 国内外许多学者对蓝藻毒素的成

分、结构、对人和动物的危害以及水华形成的因素等方面进行了大量研究 (Yoshizawa *et al.*, 1990; Camichael, 1992; Dawson, 1998; Kuiper-Goodman *et al.*, 1999; Amorin *et al.*, 1999; US EPA, 2006; Feng *et al.*, 2006; Xing *et al.*, 2008). 但对自然条件下天然的蓝藻水华对生物的毒性作用的分子机制国内外还未有文献报道. 本研究探讨了活体条件下天然水体蓝藻水华提取物暴露对小鼠的应激蛋白 HSP70、GRP78、CHOP 以及 caspase-12 的表达的影响, 以期在分子水平揭示天然蓝藻水华对哺乳动物应激系统产生的作用.

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 20777067); 浙江省自然科学基金 (No. Y206088)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20777067) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. Y206088)

作者简介: 黄朴 (1968—), 女, 博士研究生; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: xulihong@zju.edu.cn

Biography HUANG Pu (1968—), female Ph.D. candidate; * Corresponding author; E-mail: xulihong@zju.edu.cn

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 试剂

微囊藻毒素 (microcystin)-LR 和 (microcystin)-RR 的标准品购自 Sigma 公司。HSP70 一抗 (兔来源单克隆抗体)、GRP78 一抗 (山羊来源单克隆抗体)、CHOP 一抗 (小鼠来源单克隆抗体)、caspase-12 一抗 (大鼠来源单克隆抗体)、western blotting 发光剂均购自 Santa Cruz 公司; 山羊抗鼠辣根过氧化物酶——IgG (HRP-IgG) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 鼠抗 GADPH (小鼠来源单克隆抗体) 购自上海康成生物技术有限公司; 硝酸纤维素膜购自 BIO-RAD 公司; 滤纸购自 Whatman 公司; 医用感光胶片购自 Kodak 公司; 其余试剂均为市售分析纯。

2.2 水华样品的采集及藻浆粗提物的制备

采集昆明滇池蓝藻水华, 镜检显示以铜绿微囊藻为主, 藻浆连续冻融 3 次, 3000 g 离心 30 min 收集上清, 即为蓝藻水华粗提物, 内含藻细胞中的可溶性成分, 分装后 -80°C 冰箱保存。

2.3 粗提物中 Microcystin 浓度测定

蓝藻水华粗提物按照 Harada 等方法提取、纯化微囊藻毒素 (Harada *et al.*, 1988), 用 HPLC 测定其 microcystin-LR 和 microcystin-RR 的浓度。以其所含 microcystin (LR + RR) 为标准对蓝藻水华粗提物用蒸馏水稀释到不同实验浓度。

HPLC 分析条件: 分析柱为 COSMOSIL C₁₈ (4.6 mm × 150 mm), 流动相为 0.05 mol L⁻¹ KH₂PO₄ (pH 3): 甲醇 (体积比) 为 58:42, 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 238 nm, 柱温 25°C, 样品进样量 10 μL。

2.4 动物分组及处理

购自浙江医学科学院的 25 只健康雄性 ICR 小鼠 (体重 18~20 g), (24 ± 1)°C 环境下驯养 3 d 自由饮水、摄食。实验小鼠随机分成 5 组, 平均每组 5 只。处理组用蓝藻水华粗提物灌胃, microcystin (LR + RR) 含量分别为 4.65、23.25、45.6、93.0 μg · kg⁻¹, 对照组用蒸馏水灌胃。每天灌胃 1 次, 连续 7 d 第 8 天处死小鼠。

2.5 动物样本采集及组织蛋白提取

小鼠处死后迅速取出肝脏, 冰冷生理盐水清洗后分装于冷冻管中, 液氮速冻, -80°C 低温冰箱保存备用。

取肝组织样品, 以 1:10 (g · mL⁻¹) 的比例加入组织匀浆液 (50 mmol L⁻¹, 15 mmol L⁻¹ EDTA, 150

mmol L⁻¹ NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 8.0, 1 mmol L⁻¹ PMSF)。匀浆后 12000g 4°C 离心 20 min 取上清, 用 Folin 法测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度为 5 μg · μL⁻¹ 后, 分装置 -80°C 保存。

2.6 蛋白免疫印记 (Western blotting)

取 10 μL 上述提取的组织蛋白液加入等体积 2 倍上样缓冲液, 混匀后 100°C 水浴 5 min。等压电泳 (5% 积层胶 50V, 12% 分离胶 90V)。电泳结束后以 100V 等压转膜 90 min。

将结合有目的蛋白的硝酸纤维素膜用 5% 脱脂奶粉封闭 3h, 然后取出放入各自相应的浓度适当的一抗中 (HSP70 为 1:200, GRP78 为 1:200, CHOP 为 1:150, caspase 12 为 1:200, GADPH 为 1:5000), 4°C 孵育过夜。然后 TBST (50 mmol L⁻¹ Tris-Cl, pH 7.6, 150 mmol L⁻¹ NaCl, 0.1% Tween 20) 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min。洗膜结束后各膜放入 1:2000 稀释的相应二抗中, 室温孵育 2h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。暗室中取 1.5 mL ECL 发光液覆盖各膜, 暗盒内使 X 光胶片曝光。显影定影后观察结果。

2.7 图像分析及统计学处理

胶片条带灰度扫描后用 quantity one 图象分析软件分析, 采用目的条带与内参 GADPH 灰度值之比作为结果。将对照组的值设为 1, 其余各组以相对倍数表示。结果用 SPSS 12.0 统计软件处理, 采用单因素方差分析法 (ANOVA), 以 $p < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果 (Results)

3.1 蓝藻水华粗提物中 microcystin-LR 和 microcystin-RR 的浓度

经 HPLC 测定, 蓝藻水华粗提物中 microcystin-LR 和 microcystin-RR 的浓度分别为 2882 μg L⁻¹ 和 6378 μg L⁻¹, 其保留时间分别为 (5.217 ± 1) min 和 (8.925 ± 1) min。此外, HPLC 图谱显示蓝藻水华粗提物还含有某些未知成分 (见图 1)。

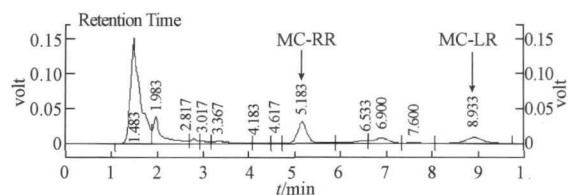


图 1 蓝藻水华粗提物的 HPLC 检测图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of cyanobacterial bloom extract

3.2 蛋白免疫印迹

图 2 为不同剂量的蓝藻水华粗提物灌胃后小鼠

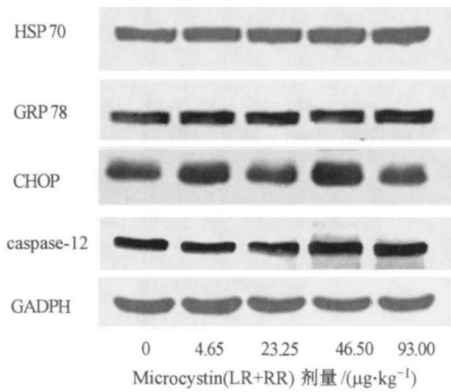


图 2 不同剂量的蓝藻水华粗提物对小鼠肝组织 HSP 70, GRP 78, CHOP and caspase-12 表达影响的免疫印迹图

Fig. 2 Representative autoradiographs of HSP 70, GRP 78, CHOP and caspase-12 expression in mouse liver tissue after treatment with cyanobacterial bloom extract

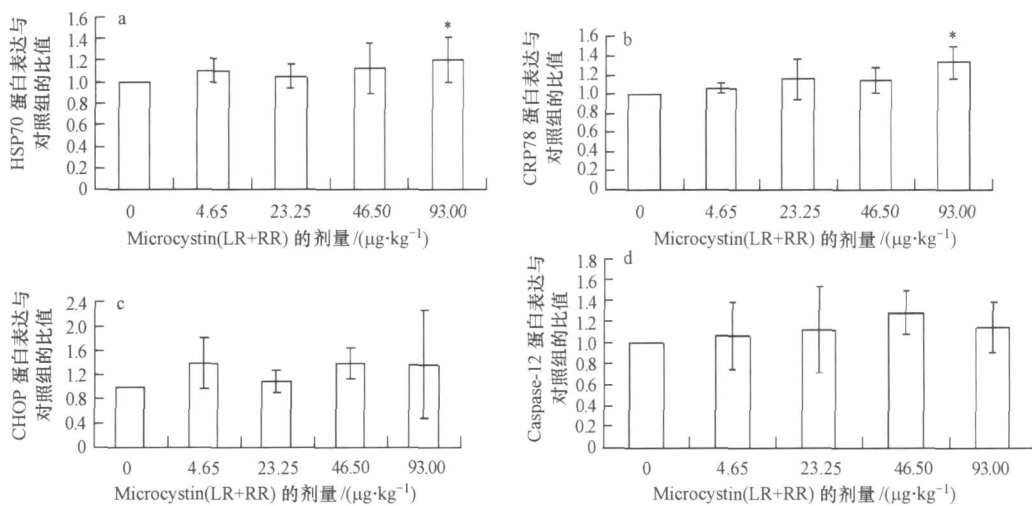


图 3 不同剂量蓝藻水华粗提物暴露后小鼠肝组织 HSP 70, GRP 78, CHOP and caspase-12 的表达变化

Fig. 3 Changes of the expression of HSP 70, GRP 78, CHOP and Caspase-12 in mouse liver after treatment with cyanobacterial bloom extract ($n=3$, * Compared with the control $p < 0.05$)

4 讨论 (Discussion)

水体富营养化导致蓝藻水华爆发, 由此而产生的大量毒素不仅严重影响水质, 也极大的威胁着人类和淡水生物的健康. 蓝藻主要毒素之一的微囊藻毒素 (microcystins, MC) 是强烈的肿瘤促进剂, 长期饮用含有 MC 的水可导致肝损伤甚至诱发肝癌 (Yoshizawa *et al.*, 1990; Nishiwaki-Matsushina *et al.*, 1992; Tovioh *et al.*, 1997; Humpage *et al.*, 2000), 蓝藻纯毒素可以诱导细胞凋亡并影响凋亡

肝组织的 HSP70, GRP78, CHOP, caspase-12 以及内参照 GADPH 的表达变化. 随着染毒剂量的升高, HSP70 和 GRP78 的表达有升高趋势, 而 CHOP 和 caspase-12 的表达虽有改变, 但最终统计学分析显示, 与对照组相比无统计学差异.

3.3 胶片扫描数据处理

对蛋白免疫印迹条带的数据分析见图 3. 结果表明在蓝藻水华粗提物灌胃处理后, 小鼠肝组织 HSP70 和 GRP78 的表达有升高趋势, 在染毒剂量达到最高浓度 ($93.00 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 时, 其表达与对照组相比有统计学差异. 而 CHOP 的表达改变较为复杂, 先升后降随后又随染毒剂量的升高表达上升, caspase-12 的表达虽有上升趋势, 但统计学分析显示, 与对照组相比, CHOP 和 caspase-12 表达的改变没有出现显著性差异.

相关蛋白水平 (Mc demott *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2008). 但是生物体是生活在复杂的环境中, 其生存受众多毒素和因素影响. 我们的前期实验发现, 蓝藻水华粗提物能诱导促凋亡蛋白 Bax 的表达上调, 同时 Bax/Bcl-2 的比值升高, 显示蓝藻水华粗提物可能促使小鼠肝细胞趋于凋亡 (Huang *et al.*, 2008). 本实验采用蓝藻水华粗提物 (其成分更接近天然蓝藻水华) 染毒小鼠, 检测动物体内生物应激系统相关蛋白的表达改变, 旨在分子水平进一步探究蓝藻水华对动物应

激系统的影响。

热休克蛋白 (heat shock protein HSP) 是机体在应激状况下合成的高度保守的蛋白, 是细胞对各种应激反应的标志蛋白, 对应激损伤具有一定的保护作用。根据其分子大小, HSP可分为几大家族, 其中 HSP70是最重要、应激后表达量最大的 HSP 家族。HSP70家族是体内重要的分子伴侣蛋白, 除了参与蛋白质合成、加工等生理过程外 (Maver *et al*, 2005), 还具有抗凋亡、抗氧化、热耐受以及免疫调节等多种生理功能 (Yenari *et al*, 2005; Beere *et al*, 2001; Ray *et al*, 2004)。在多种应激状态下 HSP70迅速表达。在本实验中, 高浓度组 ($93\ 00\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的蓝藻水华粗提物处理后小鼠肝脏的 HSP70表达上升, 这与 Jayaraj等在 Microcystin-LR 染毒小鼠的实验结果相同, 表明蓝藻水华粗提物已使小鼠肝细胞处于应激状态, 引起 HSP70的大量表达以保护细胞。

许多理化因素, 如紫外线、营养物缺乏、氧化应激、毒物、药物以及钙稳态失衡等, 都可引起内质网生理功能紊乱而产生内质网应激 (ER stress)。当应激过强或持续时间过长, 超过内质网的自稳定能力时, 会导致由内质网途径引起的细胞凋亡。研究已发现部分蛋白与内质网应激反应有关 (Groenendyk *et al*, 2005; Kaufman *et al*, 2004)。

GRP 78 (glucose regulated protein, 葡萄糖调节蛋白 78) 是由内质网合成和分泌的分子伴侣, 参与内质网内蛋白质的加工过程。GRP78是公认的内质网应激最敏感的标志蛋白之一 (Hu *et al*, 2004; Lin *et al*, 1993; Nakatani *et al*, 2005; Qiu *et al*, 2005)。当内质网应激时, GRP78的表达迅速增加, 以帮助内质网内的未成熟或错误折叠的蛋白质正确加工。CHOP/GADD153 (growth arrest and DNA damage-inducible gene 153) 是内质网应激反应的另一标记蛋白, 其高表达会导致细胞生长停滞或细胞凋亡。研究发现, CHOP在正常细胞中不表达或低表达 (Wang *et al*, 1996), 但当多种不同的刺激引起内质网应激时, CHOP的表达被明显诱导, 并与 C/EBP 或 Jun/Fos 家族蛋白形成杂二聚体, 下调 Bcl-XL 等抗凋亡基因的表达并促进活性氧的生成和 GSH 的耗竭 (Ubeda *et al*, 2000; Tang *et al*; 2002; Corazzari *et al*, 2005)。caspase12 位于内质网的胞质面, 是内质网凋亡通路特异激活的 caspase 家族成员 (Nakagawa *et al*, 2000)。受内质网应激信号的刺

激, caspase12高表达, 其自身二聚化以及自我切割生成活性片段的能力增强, 导致内质网途径的细胞凋亡发生 (Nakagawa *et al*, 2000; Rao *et al*, 2002)。

本研究发现, 在高浓度蓝藻水华粗提物处理组 ($93\ 00\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 小鼠肝组织内质网应激蛋白 GRP78的表达上升, 显示内质网应激已经发生。但没有发现 CHOP 和 caspase-12 的表达显著改变, 表明此时内质网应激反应较轻, 损伤尚在内质网的自我修复的能力之内, 由此起始的细胞凋亡途径并未启动。通过系列的保护机制, 如热休克蛋白 HSP70 GRP78 等分子伴侣的表达上升, 提高它们在胞内的含量, 清除少量未折叠蛋白或使错误折叠的蛋白正确折叠, 使内质网功能得以恢复到正常。

5 结论 (Conclusions)

1) 蓝藻水华粗提物暴露使小鼠肝组织发生内质网应激, 应激标志蛋白 GRP78 和 HSP70 表达上调。

2) 与细胞内质网凋亡途径相关的蛋白 CHOP 和 caspase-12 等的表达尚未发生改变, 显示内质网应激程度较轻, 尚在内质网的自稳定能力范围之内。

责任作者简介: 徐立红 (1960—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事环境毒理学、生化毒理学的研究, 发表论文 100 余篇。

参考文献 (References):

- Amorin A, Vasconcelos V. 1999. Dynamics of microcystin in the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Toxicol* 37: 1041—1052
- Beere H M, Green D R. 2001. Stress management: heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis [J]. *Trends Cell Biol* 11(1): 6—10
- Camichael W W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins [J]. *J Appl Bacteriol* 72: 445—459
- Chen T, Wang Q, Cui J *et al*. 2005. Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR: a combined transcriptomic, proteomic and simulation strategy [J]. *Mol Cell Proteomics* 4: 958—974
- Corazzari M, Lovat P E, Oliverio S. 2005. Fenretinide: a P53-independent way to kill cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 331(3): 810—815
- Dawson R M. 1998. The toxicology of microcystins [J]. *Toxicol* 36(6): 953—962
- Feng X G, Ding Z, Wei T, *et al*. 2006. Identification and determination of microcystins in source water and water bloom sample from Meiliang Bay, Taihu Lake, China [J]. *Biomedical and Environmental Sciences* 19(3): 225—231
- Fu W Y, Chen J P, Wang X M, *et al*. 2005. Altered expression of p53,

- Bcl-2 and Bax induced by microcystin-LR *in vivo* and *in vitro* [J]. *Toxicol*, 46: 171—177
- Groenendyk J, Michalak M. 2005 Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis [J]. *Acta Biochim Pol* 52: 381—395
- Harada K, Suzuki M, Dahlem A M, *et al*. 1988. Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria [J]. *Toxicol*, 26: 433—439
- Huang P, Han Z, Couvillon A D, *et al*. 2004. Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death [J]. *J Biol Chem*, 279: 49420—49429
- Huang P, Zheng Y F, Xu L H. 2008. Oral administration of cyanobacterial bloom extract induced the altered expression of the PP2A, Bax and Bcl-2 in mice [J]. *Environmental Toxicology*, 23: 688—693 (in press)
- Humpage A R, Hardy S J, Moore E J *et al*. 2000. Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon [J]. *Toxicol Environ Health* 61 (3): 155—165
- Kaufman R J, Rutkowski D T. 2004. A trip to the ER: coping with stress [J]. *Trends Cell Biol* 14 (1): 20—28
- Kuiper-Goodman T, Falconer I, Fitzgerald J. 1999. Cyanobacterial toxins. In Chorus I, Bartram J (Eds), *Toxic Cyanobacteria in water* (first edition) [M]. E&FN Spon, London and New York: World Health Organization, 113—153
- Lin H Y, Mazzo-Welch P, Di Y P, *et al*. 1993. The 170-kDa glucose-regulated stress protein is an endoplasmic reticulum protein that binds immunoglobulin [J]. *Mol Biol Cell* 4: 1109—1119
- Maver M P, Bukau B. 2005. Hsp-70 chaperones: cellular function and molecular mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci* 64(6): 670—684
- McDemott C M, Ngo C W, Howard W, *et al*. 1998. The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types [J]. *Toxicol*, 36: 1981—1996
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, *et al*. 2002. An endoplasmic reticulum stress-specific Caspase cascade in apoptosis: Cytochrome c-independent activation of Caspase-9 by Caspase-12 [J]. *J Biol Chem*, 277: 34287—34294
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, *et al*. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β [J]. *Nature* 403: 98—103
- Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, *et al*. 2005. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes [J]. *J Biol Chem*, 280: 847—851
- Nishiwaki M, Matsushita R, Ohta T, Nishiwaki S *et al*. 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR [J]. *J Cancer Res Clin Oncol* 118(6): 420—424
- Qiu W, Kohen-Avramoglu R, Mahsekar S, *et al*. 2005. Glucosamine-induced endoplasmic reticulum stress promotes ApB100 degradation: evidence for Gp78-mediated targeting to proteasomal degradation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 571—577
- Rao R V, Castro-Oregon S, Frankowski H, *et al*. 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: An Apaf-1-independent intrinsic pathway [J]. *J Biol Chem*, 277: 21836—21842
- Rao R V, Hemel E, Castro-Oregon S, *et al*. 2001. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of Caspase activation [J]. *J Biol Chem*, 276: 33869—33874
- Ray S, Lu Y, Kaufmann S H, *et al*. 2004. Genomic mechanisms of p21^{BCR-ABL} signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 279(34): 35604—35615
- Tang J R, Nakamura M, Okura T, *et al*. 2002. Mechanism of oxidative stress-induced GADD153 gene expression in vascular smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(4): 1255—1259
- Toviola D M, Goldman R D, Garrod D, *et al*. 1997. Protein phosphatases maintain the organization and structural interaction of hepatic keratin intermediate filaments [J]. *J Cell Sci* 110 (1): 23—33
- Ubeda M, Habener J F. 2000. CHOP gene expression in response to endoplasmic reticular stress requires NFY interaction with different domains of a conserved DNA-binding element [J]. *Nucleic Acids Res* 28(24): 4987—4997
- US EPA. 2006. Toxicological reviews of cyanobacterial toxins: microcystins LR, RR, YR and LA (external review draft) [OL]. US Environmental Protection Agency, Washington, DC: EPA/600/R-06/139
- Wang X Z, Lawson B, Brewer J W. 1996. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153) [J]. *Mol Cell Biol* 16: 4273—4280
- Xing M L, Wang X F, Xu L H. 2008. Alteration of protein expression in apoptotic FL cells induced by MC-LR [J]. *Environ Toxicol* 23 (4): 451—458
- Yenari M A, Liu I, Zheng Z, *et al*. 2005. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection [J]. *Ann N Y Acad Sci* 1053: 74—83
- Yoshizawa S, Matsushima R, Watanabe M F, *et al*. 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity [J]. *J Cancer Res Clin Oncol* 116 (6): 609—614