

HSP 90 在原发性肾病综合征发生和治疗中的意义

欧阳涓¹, 姜 佺^{1,2}, 谭 敏³, 崔颖鹏¹, 李晓艳²

(中山大学附属第一医院 1. 检验医学部, 2. 肾内科, 3. 外科, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】热休克蛋白 90(HSP90)是糖皮质激素受体(GR)的伴侣蛋白,本研究探讨 HSP90 在原发性肾病综合征(INS)发生和糖皮质激素(GC)在治疗中的作用本质。【方法】以 INS 患者和 GC 敏感、抵抗的细胞株为研究对象,分析其 HSP90、GR 表达水平及 HSP90 的亚细胞分布;并采用 HSP90 特异性阻断剂研究 HSP90 对 GC 反应性的影响。【结果】与对照组比较,INS 患者 HSP90 mRNA 表达水平明显增高;而且 INS 患者中 GC 抵抗组 HSP90 mRNA 表达显著高于 GC 敏感组 ($P < 0.05$)。深入研究发现对照组的 HSP90 主要分布在细胞浆中,核内仅有微量分布;INS 患者的 HSP90 表达有所增加,并且 GC 抵抗组与敏感组比较,HSP90 明显趋向细胞核内分布 ($P < 0.001$)。用 HSP90 特异性阻断剂后发现激素敏感细胞株的 GC 反应性也显著下降 ($P < 0.01$)。【结论】研究表明 HSP90 的异常表达及亚细胞分布变化可能是导致 GC 抵抗的重要机制,其一方面可能影响内源性 GC 对神经-内分泌-免疫网络的功能调节,进而影响机体免疫内环境的稳定,从而参与 INS 等免疫损伤性疾病的发病;另一方面则可能干预患者对外源性 GC 的治疗反应,影响临床疗效。

关键词: 热休克蛋白 90; 分子伴侣; 受体; 糖皮质激素

中图分类号: R593

文献标识码 A

文章编号: 1672-3554(2006)06-0661-06

Significance of Heat Shock Protein 90 in Glucocorticoid Resistance in Idiopathic Nephrotic Syndrome

OUYANG Juan¹, JIANG Tang^{1,2}, TAN Min³, CUI Ying-peng¹, LI Xiao-yan²

(1. Department of Laboratory Medicine, 2. Department of Nephrology, 3. Department of Surgery, The First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】Heat shock protein 90 (HSP90) is the chaperon protein of the glucocorticoid (GC) receptor, which is supposed to be the key factor of GC response. Thus, this study was designed to define the mechanisms of GC-resistance in the idiopathic nephrotic syndrome (INS) related to HSP90. 【Methods】The INS patients and the cell lines with different GC response were included in the present study. RT-PCR and the confocal immunofluorescence test were performed to investigate the expression and the subcellular localization of the GC receptor and HSP90. 【Results】The level of HSP90 mRNA expression in the INS patients was significantly higher than that in healthy control, and HSP90 expression in the GC-resistant INS patients was higher than that in the GC-sensitive INS patients. The distribution of HSP90 in the GC-resistant INS group was greater in the nuclei than that of the GC-sensitive INS group. When the function of HSP90 was blocked by the HSP90 specific inhibitor, GC sensitivity of the GC-sensitive cells decreased remarkably. 【Conclusion】These results indicate that HSP90 plays a vital role in GC-response. The abnormality in the mRNA level and subcellular distribution of HSP90 in GC-resistant INS patients may be etiologic significant in endogenous/synthetic GC resistance. It may disturb immunoendocrine regulation via endogenous GC and immune homeostasis, thus be involved in the occurrence of the immune-mediated diseases; it may also influence patient's response to synthetic GC treatment, and result in treatment failure.

Key words: heat-shock proteins 90; molecular chaperons; receptors; glucocorticoid

[J SUN Yat-sen Univ, 2006, 27(6):661-666]

收稿日期: 2006-06-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370661)

作者简介: 欧阳涓(1972-), 女, 湖北武汉人, 博士生; 姜 佺, 教授, 博士生导师, 通讯作者, E-mail: jennyj@vip.163.com

原发性肾病综合征 (idiopathic nephrotic syndrome, INS) 是一种临床常见的免疫损伤性疾病。INS 患者的预后很大程度上取决于患者对糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 治疗的反应性。临床上存在着 GC 敏感、GC 抵抗等不同人群。对于 GC 抵抗型患者, 即使加大临床 GC 用量, 也并不能改善其症状和预后, 反而易导致种种副作用的产生。事实上, GC 作为体内神经-内分泌-免疫调节网络中的重要分子, 在免疫内环境稳定以及免疫损伤性疾病的发生中也可能起着十分重要的作用。我们既往研究^[1]尚发现 GC 抵抗与狼疮性肾炎的发生、发展有密切关系。因此, 对临床 GC 抵抗的机制进行深入探讨对于阐明免疫损伤性疾病的发病机制, 并在临床上开展以 GC 反应为基础的个体化治疗具有重要意义。GC 效应的发挥需通过糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 介导。热休克蛋白 90 (HSP90) 是 GR 的重要伴侣蛋白, 它主要分布在细胞浆中, 与 GR 功能发挥有着密切关系^[2]。深入研究 HSP90 在不同 GC 反应 INS 患者 PBMC 中的表达、分布及其与 GC 效应发挥、治疗作用之间的关系乃至调节机制有助于揭示 INS 发病的本质并指导临床更合理的使用 GC。

1 对象与方法

1.1 研究对象

51 例 INS 患者来自中山大学附属第一医院肾内科。患者平均年龄 (32 ± 12) 岁。51 例患者接受了常规标准 GC 疗程。根据患者对 GC 反应性, 将患者分为两组: 一组为 GC 敏感组: GC (泼尼松) 足量治疗 8 周时和 GC 减量后, 尿蛋白持续为阴性者, 共 25 例; 一组为 GC 抵抗组: 泼尼松足量治疗 8 ~ 12 周, 尿蛋白仍维持在 (++) 以上, 共 26 例患者。两组病例的发病年龄、病程、GC 用量、血尿素氮、肌酐和白蛋白水平差异无显著意义, 为了消除药物对实验可能存在的干扰, 所有标本的收集均在清晨病人服用激素和其它药物之前进行。健康对照组: 选择了 23 例健康献血员作为对照, 平均年龄 (31 ± 11) 岁。在静脉采血前 1 周内, 未患感染性疾病, 未曾服用过 GC 和免疫抑制剂。所有标本分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 待用。C7H2 细胞和 C1 细胞分别为 GC 敏感和 GC 抵抗的淋巴细胞系细胞

株, 由澳州 Tyrlean 研究所 Kofler 教授馈赠。

1.2 试剂

无酚红 RPMI-1640 培养基购自 HYCLONE 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 地塞米松 (dexamethasone, DEX) 购自 SIGMA 公司 (批号 112K8931); 格尔得霉素/GA 购自 ALEXIS 公司 (批号 L09452); 碘化丙啶/PI、吖啶橙/AO 购自 SIGMA 公司; 溴化乙锭/EB 购自广州威佳公司。小鼠抗人 HSP90 单克隆一抗 (批号: B310406) 和 FITC 标记羊抗小鼠二抗 (批号: 108408) 购自 Stressgen 公司。总 RNA 提取试剂 Trizol (批号: 117336) 购自 Invitrogen 公司。逆转录试剂盒 (批号: 0920) 和 PCR 试剂 (批号: 4652) 购自 MBI 公司。淋巴细胞分离液购自上海生化试剂二厂。

1.3 引物

HSP90 引物序列来自文献^[3], HSP90 上游引物: 5' GTC TGG GTA TCG GAA AGC AAG 3'; HSP90 下游引物: 5' CTG AGG GTT GGG GAT GAT GTC 3', 扩增片段长度 303 bp。GR 引物自行设计, 序列为: 上游引物: 5' TTA CCA CAA CTC ACC CCT ACC 3'; 下游引物: 5' GGC TCT TCA GAC CGT CCT TA 3', 扩增片段长度 475 bp。为进行半定量分析的需要, 以 β -actin 为内参照, β -actin 上游引物: 5' GGA TTC CTA TGT GGG CGA 3'; 下游引物: 5' GGA ACC GCT CAT TGC CAA TG 3', 扩增片段长度 617 bp。上述引物均由上海生物工程技术公司合成。

1.4 INS 患者 PBMC 中 HSP90 和 GR mRNA 的表达分析

总 RNA 抽提及 cDNA 合成: 采用改良的异硫氰酸胍法 (TRIZOL 试剂), 按试剂说明书进行。用含甲醛的琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性、核酸蛋白测定仪 (Eppendorf 公司) 确定 RNA 的浓度和纯度。

PCR: 在 0.2 mL PCR 薄壁管中分别加入 10 × PCR 缓冲液 5 μ L, 5 - 目的引物 (10 μ mol/L) 2.5 μ L, 3 - 目的引物 (10 μ mol/L) 2.5 μ L, 5 - β -actin 引物 (10 μ mol/L) 1.25 μ L, 3 - β -actin 引物 (10 μ mol/L) 1.25 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, MgCl₂ (25 mmol) 3 μ L, TaqDNA 聚合酶 (1 U/ μ L) 1 μ L, cDNA 产物 2 μ L, 去离子水 33 μ L, 混匀, 在热循环仪上进行 PCR 反应, 条件如下: 预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 53 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,

GR、HSP90 循环次数 28 次, β -actin 循环次数 25 次;最后 72 延伸 10 min。

PCR 产物的电泳及扫描分析: 取 10 μ L PCR 产物与 2 μ L 6 \times 上样缓冲液混合后上样, 于 15 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳, 电泳结果紫外检测仪上观察, 用全自动凝胶成像系统 (FluorchemTM 8900) 成像及进行扫描定量分析, 记录各条 DNA 扩增带积分光密度, 将每一种目的 DNA 扩增片段积分光密度与相应的内参照 β -actin 扩增片段积分光密度的比值作为其 mRNA 水平的半定量指标。

1.5 INS 患者的 PBMC 中 HSP90 的分布

所用玻片经多聚赖氨酸预处理, 取 PBMC 少许涂片, 依次经过 4 丙酮固定, PBS 洗涤, 37 封阻液封闭 30 min, 加入小鼠抗人 HSP90 单克隆抗体 (稀释度 1 100), 4 过夜, PBS 洗涤后, 滴加 FITC 标记的羊抗小鼠二抗 (稀释度 1 250), 37 孵育 2 h, PBS 洗涤, 缓冲甘油封片, 共聚焦显微镜下观察 HSP90 的荧光强度及亚细胞分布。阴性对照用 0.01 mol/L PBS 代替一抗。每张细胞涂片随机取约 5 个高倍视野, 约 80 个细胞进行评分。每个细胞 HSP90 核浆分布按文献[5]标准评分: 4 分胞核荧光强度明显高于细胞浆荧光; 3 分胞核荧光强度较细胞浆荧光略强; 2 分胞核荧光强度与细胞浆荧光强度相似; 1 分胞核荧光强度较细胞浆荧光弱; 0 分胞核荧光强度明显弱于细胞浆荧光。由于生理情况下, HSP90 以胞浆分布为主, 细胞核内仅有少量表达。因此所有细胞按荧光强度胞浆大于胞核 (评分 < 2) 或者荧光强度胞核大于等于胞浆 (评分 \geq 2) 分为两组。

1.6 细胞培养

C7H2、C1 细胞悬于含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素的无酚红 RPMI-1640 完全培养基中, 调整细胞数 10^6 /L, 并用台盼蓝染色判断细胞活力, 然后加入 24 孔板。每孔加入细胞悬液 1 mL, 共分 4 组, 每组设 4 个复孔。分别按组加入 HSP90 特异性阻断剂格尔德霉素 (GA 1 μ mol/L)、DEX (1 μ mol/L)、GA+DEX, 另设自发培养孔作为空白对照。由于 GA 是用 DMSO 作为溶媒, 因此在自发培养孔和 DEX 孔加入相同浓度的 DMSO (体积分数 0.5%) 作为平行对照。37 二氧化碳培养箱 (体积分数 5% CO₂, 95% 空气) 中培养 48 h 后进行细胞凋亡的定量和定性检测。

1.7 亚 G1 峰法定量检测 C7H2 细胞的凋亡

用巴氏滴管吹打均匀孔板中培养 48 h 后的细胞, 收集至 1.5 mL 的 EP 管中, 离心去掉培养基, 加入 1~2 滴 PBS 混匀成细胞悬液, 加入 1 mL 预冷的 (4) 体积分数 70% 的乙醇倒转混匀, 4 固定 2 h 以上。再次离心, (400 \times g, 5 min) 弃去乙醇。再重复洗涤 1 次。然后将细胞重新悬于 300 μ L DNA 染液 (含 100 mg/L PI 和 20 U/mL RNA 酶), 室温放置 30 min 进行 DNA 染色后上流式细胞仪 (BECKMAN COULTER ELITE) 检测。结果判断: 发生凋亡的细胞由于核内的 DNA 裂解成许多小片段, 在酒精固定后用细胞膜通透剂使小分子的 DNA 片段穿过胞膜丢失, 仅留下大片段 DNA, 这些丢失部分 DNA 的细胞在 DNA 染色后, 形成一个 DNA 含量小于 G1 期细胞的分布区, 在 DNA 图上, 凋亡细胞在 G1 峰前出现一个呈高斯分布的峰 (亚 "G1" 峰), 分析峰的百分比即可得出凋亡细胞的百分比。

1.8 AO/EB 荧光双染检测 C7H2 细胞凋亡

参考文献[4], 100 mg/L 染液吖啶橙 (AO), 100 mg/L 溴化乙锭 (EB), 用 PBS 配制混匀备用。按以下特征判断凋亡 PBMCs 细胞: 正常活细胞只被 AO 染色, 胞核呈绿色荧光, 但密度不均匀, 表现所谓 "结构样" 特征。胞膜完整的早期凋亡细胞也被 AO 染色, 但因核 DNA 浓缩致密, 并切割成大小不等的片段, 镜下呈现染色均一、荧光亢进的圆珠状小体; 胞膜受损的晚期凋亡细胞, 核形特征同早期凋亡细胞, 但因 EB 染色而发橙红色荧光。坏死细胞被 EB 染色, 发红色荧光, 但无凋亡小体结构。

1.9 统计学分析

计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多个样本均数比较采用方差分析; 计数资料用卡方检验分析。所有数据均用 SPSS10.0 统计软件处理。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组别 INS 患者 PBMC 中 GR、HSP90 mRNA 的表达

2.1.1 RNA 纯度和完整性的鉴定 含甲醛的 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果显示 RNA 保持了良好的完整性; 核酸蛋白检测仪检测结果显示, 所有 RNA 样品的 A₂₆₀/A₂₈₀ 均在 1.8~2.0 之间, A₂₆₀/A₂₃₀ >

2.0。

2.1.2 RT-PCR 产物的鉴定分析 RT-PCR 产物电泳后发现扩增产物均为单一、特异性产物;产物长度与理论设计要求片段长度相符。由于在引物设计时注意了上下游引物跨越内含子,从而防止了 RNA 样品中如果有 DNA 污染可能带来的干扰。

2.1.3 HSP90 与 GR mRNA 的表达分析 检测 PBMC 中 HSP90 mRNA 表达水平发现,所有 INS 患者(包括 GC 抵抗组和 GC 敏感组)的表达均高于健康对照组,且 GC 抵抗组 HSP90 mRNA 水平显著高于 GC 敏感组($P < 0.05$,表 1、图 1)。与此同时,PBMC 中 GR mRNA 的表达在 GC 抵抗组、GC 敏感组 INS 患者及健康对照组间未发现有明显差异($P > 0.05$)。HSP90/GR 比值分析显示:INS 组较健康对照组明显升高($P < 0.05$)。各组 GR 和 HSP90mRNA 相对表达量见(表 1)。

表 1 外周血单个核细胞中 GR、HSP90 mRNA 表达

Table 1 Expression of GR, HSP90 mRNA in peripheral blood mononuclear cell

Group	n	GR	HSP90	HSP90/GR
Controls	23	1.12 ± 0.18	0.98 ± 0.14	0.89 ± 0.16
GC sensitive	25	1.04 ± 0.10 ¹⁾	1.13 ± 0.21 ²⁾	1.09 ± 0.17 ²⁾
GC resistant	26	1.09 ± 0.15 ¹⁾	1.28 ± 0.25 ²⁾³⁾	1.18 ± 0.23 ²⁾
F		0.19	12.25	12.16
P		>0.05	<0.05	<0.05

GR: glucocorticoid receptor; HSP90: heat shock protein 90; Compared with controls, 1) $P > 0.05$, 2) $P < 0.05$; Compared with the GC sensitive INS group, 3) $P < 0.05$

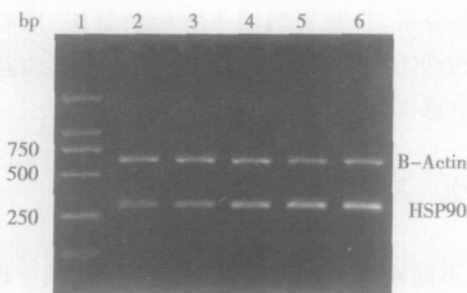


图 1 不同组别 HSP90 mRNA 表达

Fig.1 Expression of HSP90 mRNA in the different groups

HSP90: heat shock protein 90; lane 1: DNA Marker; lane 2: healthy control; lane 3, 4: GC- Sensitive INS patients; lane 5, 6: GC- Resistant INS Patients

2.2 INS 患者不同组别 PBMC 中 HSP90 蛋白的表达与分布

采用激光共聚焦技术观察 PBMC,显示 GC 敏感组 INS 患者 PBMC 中的 HSP90 表达增强,分布仍以细胞浆为主,而 GC 抵抗组 INS 患者增加的 HSP90 则明显趋向细胞核内分布($P < 0.001$);GC 不同反应性 INS 患者 PBMC 中 HSP90 亚细胞分布的分析(表 2)。

表 2 INS 患者外周血单个核细胞中 HSP90 的分布

Table 2 Distribution of HSP90 in the patients with idiopathic nephrotic syndrome

Group	n	HSP90 distribution	
		cytoplasm>nucleus	nucleus cytoplasm
GC sensitive	1425	970	455
GC resistant	1648	900	748

$\chi^2 = 25.973$, $P < 0.001$; n: the number of the cells; HSP90: heat shock protein 90; GC: glucocorticoid

2.3 HSP90 对 DEX 诱导 C7H2 凋亡的影响

流式细胞仪检测凋亡的结果显示,培养 48 h 后,DEX 处理 GC 敏感的 C7H2 细胞凋亡达 91.8%,而 GC 抵抗株 C1 细胞凋亡仅有 15.2%;自发培养组凋亡为 4.8%;加入 GA(1 $\mu\text{mol/L}$) 共同处理后,DEX 诱导 C7H2 凋亡显著减少(18.6% vs. 98.1%, $P < 0.01$)。(图 2)

3 讨论

众多免疫损伤性疾病的发生、发展都与机体免疫调节功能紊乱有着密切的关系^[5]:根据神经内分泌免疫调节学理论,机体免疫活动及其功能状态直接受神经、内分泌系统的调控。而 GC 作为下丘脑-垂体-肾上腺轴的关键分子,不仅在体内参与调节机体免疫功能,抑制免疫系统的过度活跃,而且在体外一直作为治疗性药物,对 INS、哮喘等免疫损伤性疾病发挥重要的治疗作用。临床研究发现存在有对 GC 不同反应性的个体,即表现为 GC 敏感、抵抗,而临床上 GC 抵抗的难治性肾综已成为治疗中最为棘手的问题。HSP90 作为 GR 的伴侣蛋白,它主要分布在细胞浆中。HSP90 与 GR 的结合可使其获得与 GC 配体结合的能力;而 HSP90-GR 复合物只有解离后,GR 才能与 DNA

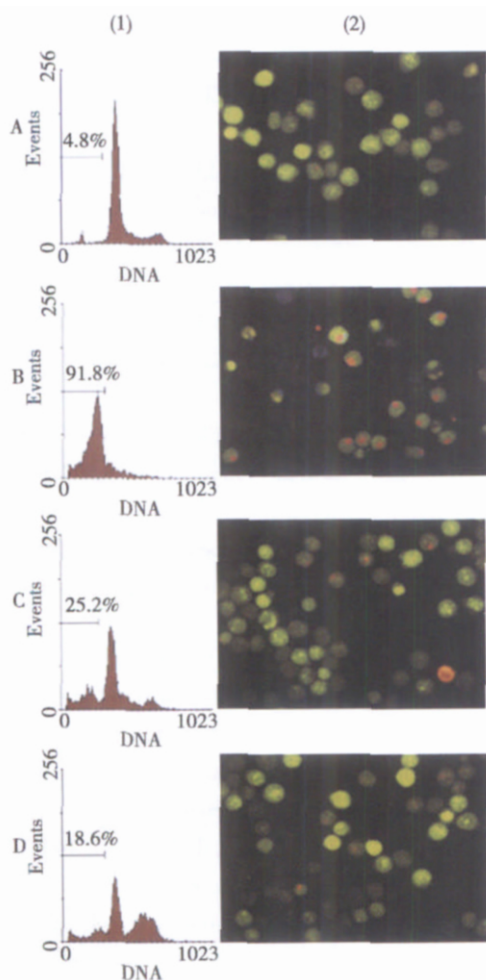


图2 HSP90抑制剂GA阻断地塞米松诱导的C7H2细胞的凋亡

Fig.2 HSP90 inhibitor - GA blocked apoptosis of C7H2 induced by dexamethasone

HSP90: heat shock protein 90; C7H2 were incubated for 48 h at 37 °C either in culture medium alone (A) or with 1 μmol/L DEX (B) or with 1 μmol/L HSP90 inhibitor, GA (C) or with 1 μmol/L DEX and 1 μmol/L GA (D). (1) Quantitative flow cytometric analysis of DNA content in C7H2 by PI staining; (2) Morphologic change of apoptosis in C7H2 by dual staining with AO/EB

结合,从而发挥其调控相应基因转录的作用。本研究着重分析了不同GC反应INS患者中HSP90的表达、分布及与GR受体的关系以及HSP90在GC效应发挥中所起的作用。

首先我们研究发现了INS患者HSP90mRNA的表达明显高于健康对照组,这一现象可能与HSP90在炎症等病理状态下应激性增加有关^[6]。根据临床INS患者对GC治疗的不同反应性,我们将患者分成了GC敏感、GC抵抗组,对比分析发现GC抵抗组INS患者HSP90 mRNA水平高于

GC敏感组INS患者(1.28 ± 0.25 vs 1.13 ± 0.21, P < 0.05)。我们考虑GC抵抗组的INS患者之所以会表达高水平的HSP90的原因可能是由于该组患者对内源性GC的抵抗,从而表现有较为明显的肾脏免疫损伤及炎症过程,HSP90水平也相应增高;另一方面HSP90的高水平表达可能以某种方式直接或者间接地干扰、影响了GR功能的正常发挥,也即HSP90的异常表达可能成就了GC抵抗的物质基础,从而参与了损伤和炎症的病理过程并影响了临床GC治疗的疗效发挥。

然而高水平表达的HSP90对其client蛋白GR的表达及功能究竟有什么样的影响呢,我们进一步分析了GR和HSP90的关系变化,结果发现INS患者的HSP90/GR比值明显高于健康对照组,而INS患者的GR表达并没有呈现与HSP90的同步升高。我们还发现GC抵抗组和敏感组之间HSP90/GR比值并没有发现有显著差别(1.18 ± 0.23 vs 1.09 ± 0.17, P > 0.05),因此我们考虑HSP90表达增加可能并不完全是通过与GR表达量的消涨/比例来影响GR功能状态及GC反应性。为此我们又进一步观察了HSP90在PBMC中的亚细胞分布。生理情况下,HSP90主要存在于细胞浆中,细胞核中仅有微量分布。本研究结果发现在GC敏感组中,HSP90的分布仍然以细胞浆为主,而GC抵抗组中,HSP90呈现重新分布在核内的趋势。我们推测,有以下几种可能导致HSP90的这一重新分布: HSP90在胞浆中与GR受体结合减少,抑或解离增多,使得游离HSP90向核内转移的可能性增加;某种机制促进HSP90-GR复合物在不解离的情况下,发生核转位;正常与GR相伴进入细胞核内的HSP90,由于某种原因发生代谢异常,在核内积聚,难以回到胞浆进入下一个循环。无论是上述何种原因,都将导致HSP90本身的代谢乃至循环异常,并通过以下机制影响GR功能以及GC效应的发挥: HSP90与GR结合障碍可能直接影响GR与配体GC的结合; HSP90-GR复合物不解离而进入核转位可能直接干预GC与DNA反应元件的结合;核内HSP90浓度增高也可能与活化的GR再度结合,从而抑制GR与DNA反应元件的结合,影响相应靶基因的激活。Kang^[7]等通过体外实验的方法曾发现GR与GC结合即受体活化后,细胞核内HSP90/GR比率增高可以减弱细胞对GC的反应,GC浓度越高,这种负

性调节作用越明显。而 Katsuya 等^[9]发现人为增加核 HSP90 可以使 GR 滞留在细胞核中。

为了进一步证实我们在 INS 研究中的发现,我们选择了 GC 敏感和 GC 抵抗的细胞株作为体外研究对象,并采用了 HSP90 特异性阻断剂 GA 进行干预。GA 是一种苯醌类大环内酯类抗生素,具有特异性结合和拮抗 HSP90 的作用^[9],它主要抑制 HSP90 的功能,但可以上调 HSP90 表达水平^[10]。结果发现在加入外源性 GC 后,GC 敏感株细胞凋亡可以达 91.8%,GC 抵抗株细胞凋亡仅 15.2%,而再用 GA 阻断 HSP90 功能后,GC 诱导 C7H2 凋亡的效应发挥被显著阻断 (91.8% vs 18.6%),说明 HSP90 在 GC 效应发挥中有着重要作用。

我们的研究结果表明,HSP90 表达及亚细胞分布可能在 GR 介导的 GC 反应性发挥中起重要作用。体外用 GA 阻断 HSP90 将会明显影响 GC 效应的发挥。目前用 GA 阻断 HSP90 尚不能完全模拟 HSP90 核内高表达的模型,为此我们拟进一步采用分子生物学手段建立该模型,并研究核中 HSP90、GR 的蛋白相互作用,及此时 GR 与相应 DNA 反应元件之间的关系变化。免疫损伤性疾病的发生和临床上 GC 抵抗现象的出现是一个非常复杂的病理生理过程。HSP90 作为热休克蛋白超家族中的一个重要成员,其许多新的生物学功能正被人们所认识和阐明^[10]。我们的研究表明,HSP90 的表达及分布异常可能在免疫损伤性疾病的发病以及临床上 GC 抵抗的产生中起重要作用。显然,该研究对揭示免疫性疾病发病的本质及为临床提供更为合理的治疗方案具有深远的意义。

参考文献:

[1] JIANG T, LIU S, TAN M, et al. The phase-shift

mutation in the glucocorticoid receptor gene: potential etiologic significance of neuroendocrine mechanisms in lupus nephritis [J]. *Clin Chim Acta*, 2001, 313(1-2): 113-117.

[2] PRATT W B, MORISHIMA Y, MURPHY M, et al. Chaperoning of glucocorticoid receptors [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2006(172):111-138.

[3] VACHIER I, CHIAPPARA G, VIGNOLA A M, et al. Glucocorticoid receptors in bronchial epithelial cells in asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158(3): 963-970.

[4] COLIGAN J E, KRUISBEEK A M, MARGULIES D H, et al. (eds.): *Current Protocols in Immunology* [M]. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1995: 983-985.

[5] STERNBERG E M. Neuroendocrine regulation of auto-immune/inflammatory disease [J]. *J Endocrinol*. 2001, 169(3): 429-435.

[6] KAUFMANN S H. Heat shock proteins and immune response [J]. *Immunol Today*, 1990, 11(4): 129-136.

[7] KANG K I, MENG X, DEVIN-LECLERC J, et al. The molecular chaperone Hsp90 can negatively regulate the activity of a glucocorticosteroid-dependent promoter [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(4): 1439-1444.

[8] TAGO K, TSUKAHARA F, NARUSE M, et al. Regulation of nuclear retention of glucocorticoid receptor by nuclear Hsp90 [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 213 (2): 131-138.

[9] NECKERS L. Chaperoning oncogenes: Hsp90 as a target of geldanamycin [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2006, (172):259-277.

[10] KAMAL A, BOEHM MF, BURROWS F J. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation [J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10(6): 283-290.

(编辑 王晓鹰)

热烈祝贺中山大学公共卫生学院建院 30 周年!