

热休克蛋白 90 与人精子氧化应激相关性的初步研究

谢海锋 李 坤 陈爱君 倪 崖

摘 要 **目的** 探讨热休克蛋白 90(HSP90)与人精子氧化应激是否相关。**方法** 人精子标本经 percoll 分离处理后,分别用含 0、100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的获能培养基应激刺激 2h,用免疫印迹法检测和灰度分析法定量分析了不同氧化应激状态下精子 HSP90 表达水平,用相同方法进一步考察 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 应激刺激 0、0.5、1 和 2h 后 HSP90 表达水平。**结果** 不同浓度 H_2O_2 应激刺激人精子 2h 后,各组间 HSP90 表达水平具有统计学差异,400 $\mu\text{mol/L}$ 组 HSP90 表达量较 0 $\mu\text{mol/L}$ 组明显降低;200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 应激刺激人精子不同时间后各组间 HSP90 表达水平亦具有统计学差异,在 0.5h 时 HSP90 表达水平最低,后随时间延长表达水平又逐步升高。**结论** 氧化应激时人精子 HSP90 表达水平可发生变化,且与活性氧浓度和应激时间相关,推测 HSP90 可能参与人精子氧化应激过程。

关键词 HSP90 氧化应激 精子 H_2O_2

[中图分类号] R34 [文献标识码] A

Preliminary Study on the Association between Heat Shock Protein 90 and Oxidative Stress in Human Spermatozoa. Xie Haifeng, Li Kun, Chen Aijun, et al. School of Medical Lab Science, School of Life Sciences, Wenzhou Medical University, Zhejiang 325035, China

Abstract Objective To investigate whether heat shock protein 90(HSP90) is involved in oxidative stress in human spermatozoa. **Methods** Spermatozoa were stimulated respectively by 0, 100, 200 and 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 2h in culture medium after the samples were separated and prepared by percoll. Western blot and gray intensity analysis were carried out to determine the levels of HSP90 expression. Furthermore, the levels of HSP90 expression were evaluated by the same method after spermatozoa were stimulated by 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 0, 0.5, 1 and 2h respectively. **Results** HSP90 expression levels had significant difference among groups treated with different concentrations of H_2O_2 for 2h. The level of 400 $\mu\text{mol/L}$ group was significantly lower than 0 $\mu\text{mol/L}$ group. HSP90 expression levels also appeared significantly different among groups which were stimulated for different lengths of times at H_2O_2 concentration of 200 $\mu\text{mol/L}$. The level was lowest at 0.5h, then increased with the extended time of incubation. **Conclusion** Expression levels of HSP90 protein changed in response to oxidative stress and were associated with the concentration of ROS and the time of stimulation by oxidative stressor. It implies that HSP90 is involved in oxidative stress in human spermatozoa.

Key words HSP90; Oxidative stress; Spermatozoa; H_2O_2

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)又称应激蛋白,是当增高的热度、病原体、细胞因子、理化有害因素等刺激伤害生物细胞时激活 HSP 基因编码合成的一类生物进化上高度保守的蛋白质。热休克蛋白 90(HSP90)是存在地正常体细胞内的一类大小约为 90kDa 的热休克蛋白,其参与蛋白质合成、折叠、装配、转运和降解过程以维持细胞蛋白自稳,对真核生物的存活起关键作用,同时它还能提高细胞对应激原

的耐受性,增强抗氧化作用,使细胞维持正常的生理功能^[1-3]。

过高浓度的活性氧(reactive oxygen species, ROS)可诱导细胞的脂类、蛋白和 DNA 氧化损伤,而睾丸在炎症、感染等病理条件下可致局部 ROS 产生过多使精子处于氧化应激状态,影响精子膜流动性和精子活力,是导致男性不育的重要因素之一^[4-6]。HSP90 存在于人成熟精子中,其是否参与人精子氧化应激目前国内外尚无文献报道^[7]。本实验用 H_2O_2 体外模拟氧化应激,检测精子在不同 H_2O_2 浓度刺激相同时间和同浓度 H_2O_2 刺激不同时间后 HSP90 表达水平,以探讨 HSP90 与精子氧化应激的相关性。

材料与方法

1. 材料:(1)培养基与试剂:瑞典 Pharmacia LKB Percoll

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170554);浙江省自然科学基金资助项目(Y2100058)

作者单位:325035 温州医科大学检验医学院、生命科学院(谢海锋、倪崖);310013 杭州,浙江省医学科学院生殖医学研究中心(李坤、陈爱君)

通讯作者:倪崖,电子信箱:niya99@126.com

分离液;美国 Abcam 兔抗 HSP90 多克隆抗体(ab13495)、兔抗 β -tubulin 多克隆抗体(ab6046);美国 Invitrogen 羊抗兔 IgG H&L(HRP);江苏碧云天 SDS 裂解液和 BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒和蛋白上样缓冲液(5X);美国 Pierce ECL plus 化学发光试剂盒;美国 Thermo Fisher 预染蛋白质 Marker;美国 Millipore PVDF 膜;上海远大过氧化物有限公司 H_2O_2 试剂(30% 分析纯);200mmol/L H_2O_2 储存液按文献[8]配置;人输卵管液(human tubal fluid, HTF)培养基配制参考文献^[9, 10],所需试剂及药品购自上海化学试剂有限公司或 Sigma Aldrich 公司。(2)仪器:美国 Thermo Multiskan MK3 酶标仪、Thermo Forma 直热式 CO_2 孵箱;上海天能 VE-180 垂直电泳槽;美国 Bio-Rad 半干转印系统及电泳仪电源;美国 Millipore Simplicity 超纯水系统;上海力康 Neofuge 15R 台式高速冷冻离心机;美国 Alpha Innotech FluorChem FC2 化学发光凝胶成像系统;美国 Molecular Device SpectraMax M4 多模式微孔板测度仪。

2. 方法:(1)精液标本采集、处理及精子培养:本实验经浙江省医学科学院人类伦理委员会审查通过。供精者(25~35 周岁健康男性)在禁欲 3~5 天后,用手淫法收集精液标本于一次性洁净取精杯,37℃ 水浴 30min 至完全液化。用于实验的标本均达世界卫生组织(WHO)(1999 年)正常精液参数标准:体积 $\geq 2\text{ml}$;精子浓度 $\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$;A+B 级精子所占比例 $\geq 50\%$ 或 A 级精子 $\geq 25\%$;活精子比例 $\geq 85\%$ 。精液标本处理参考文献^[9, 10]。精液标本通过 Percoll 非连续(40%、80%)密度梯度离心分离($600 \times g$, 15min)去除死精子和细胞碎片等杂质。Percoll 分离液中含有 4mg/ml BSA 并在使用前水浴平衡至 37℃。小心吸取并弃去上层液体,细胞沉淀用 2ml 37℃ 新鲜 HTF 重悬并离心($300 \times g$, 5min),以洗去残存 Percoll 分离液。弃去上清并用 37℃ 新鲜 HTF 重悬,调整精子密度至 $(20 \sim 30) \times 10^6/\text{ml}$ 。处理后的精子根据实验设计进行等分,加入 20mmol/L H_2O_2 储备液使其终浓度达所需浓度,并迅速混匀,置于 37℃ 含 5% CO_2 的恒温箱应激培养至所需时间。(2)蛋白提取及免疫电泳分析:将培养后的精子用 0.5ml PBS 清洗两次,所得细胞沉淀用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 SDS 裂解液抽提后,用 BCA 试剂盒进行蛋白定量^[10, 11]。取适量样品加入 1/4 体积 5× 上样缓冲液并混匀,水浴煮沸 5min。各组取 6 μg 蛋白行 SDS-PAGE(5% 浓缩胶,10% 分离胶)电泳。分离的蛋白用半干转法,40mA 条件下转膜 70min,将目的蛋白转至 PVDF 膜上。膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2h,后将膜放入一抗 HSP90(1:5000)或 β -tubulin(1:10000)反应,4℃ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,于 HRP 标记二抗(1:10000)室温孵育 2h, TBST 洗涤 3 次,加化学发光底物后用化学发光凝胶成像仪拍照。以 β -tubulin 作内参,用成像仪配套软件 Alpha view 统计分析各组 HSP90 与 β -tubulin 条带灰度,其中 HSP90 表达水平用 HSP90 与 β -tubulin 条带灰度比表示。

3. 统计学方法:实验结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

应用 SPSS 19.0 进行统计分析,采用单因素方差(one-way ANOVA)分析。若方差不具有齐性($P < 0.05$),组间两两比较用 Dunnett's T3 检验,否则采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. HSP90 在不同浓度 H_2O_2 刺激人精子 2h 后的表达水平:0 $\mu\text{mol/L}$ 组精子 HSP90/ β -tubulin 灰度比为 0.31 ± 0.05 , 100 $\mu\text{mol/L}$ 组为 0.27 ± 0.04 , 200 $\mu\text{mol/L}$ 组为 0.24 ± 0.04 , 400 $\mu\text{mol/L}$ 组为 0.18 ± 0.04 。方差分析结果显示各组间 HSP90 含量具有统计学差异($P < 0.05$)。两两比较结果显示 0 $\mu\text{mol/L}$ 组与 400 $\mu\text{mol/L}$ 组具有统计学差异($P < 0.01$),表明成熟人精子经 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养刺激 2h 后, HSP90 表达水平明显降低,详见图 1。

2. HSP90 在 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激人精子不同时间后的表达水平:0h 组精子 HSP90/ β -tubulin 灰度比为 0.26 ± 0.03 , 0.5h 组为 0.17 ± 0.05 , 1h 组为 0.23 ± 0.05 , 2h 组为 0.28 ± 0.07 。方差分析结果显示各组间 HSP90 含量具有统计学差异($P < 0.05$)。两两比较结果显示 0h 组与 0.5h 组精子 HSP90 含量具有统计学差异($P < 0.05$), 0.5h 组与 2h 组精子 HSP90 含量具有统计学差异($P < 0.01$)。结果表明在 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激人精子时, 0.5h 时 HSP90 表达量明显下降,随着刺激时间的延长, HSP90 表达水平又逐渐回升达正常水平,详见图 2。

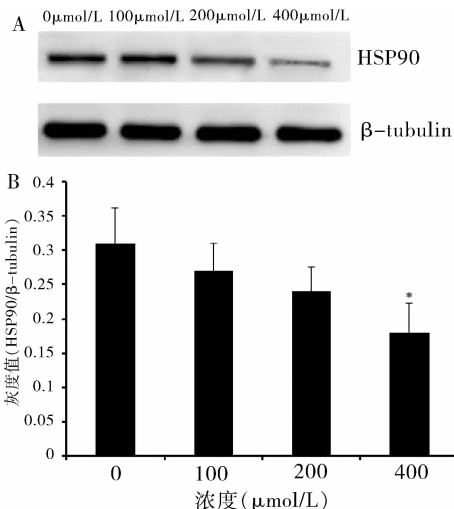


图 1 不同浓度 H_2O_2 对人精子 HSP90 表达水平的影响

A. 不同浓度 H_2O_2 刺激人精子 2h 后 HSP90 和 β -tubulin 的 Western blot 法检测结果; B. 不同浓度 H_2O_2 刺激人精子 2h 后 HSP90 和 β -tubulin 的表达分析。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, * $P < 0.01$ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

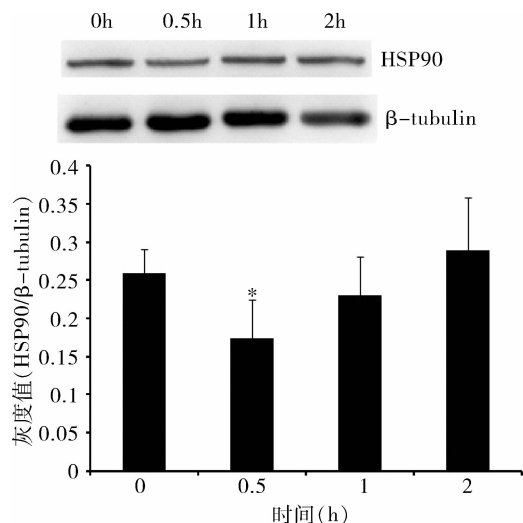


图 2 H_2O_2 处理不同时间对人精子 HSP90 表达水平的影响

A. $200\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激不同时间后人精子 HSP90 和 β -tubulin 的 Western blot 检测结果; B. $200\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激不同时间后人精子 HSP90 和 β -tubulin 的表达分析。与 0h 组比较, * $P < 0.05$ ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

讨 论

机体正常代谢时可产生一定量的 ROS, 其具有重要生理作用且与机体内部的抗氧化物质保持平衡, 如 ROS 对精子顶体反应及精卵融合等过程都是必须的^[12]。过高浓度的 ROS 可使细胞处于氧化应激状态, 使脂类、蛋白和 DNA 等发生氧化损伤, 若发生在生殖细胞则会影响男性生育及胚胎发育^[13]。HSP90 存在于牛、猫、狗、猪、马、人等多种哺乳动物的成熟精子, 在精子不同发生阶段其表达量和定位均可发生一定改变, 慢性热应激对兔睾丸精子 HSP90 表达水平亦有显著影响^[7,14,15]。然而氧化应激时精子 HSP90, 特别是人精子 HSP90 是否会出现表达量的改变, 国内外均未见文献报道。为明确 HSP90 与精子氧化应激的相关性, 研究人精子 HSP90 的生物学功能, 本实验用不同浓度 H_2O_2 与人成熟精子共培养 2h 和用 $200\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养精子不同时间后, 对精子 HSP90 表达水平进行检测分析。

笔者发现在不同浓度 H_2O_2 下培养 2h 后, $400\mu\text{mol/L}$ 组 HSP90 表达水平较其余各组显著降低并与 $0\mu\text{mol/L}$ 具有统计学差异。在同浓度 ($200\mu\text{mol/L}$) H_2O_2 下培养不同时间, 0.5h 时精子 HSP90 表达水平显著性降低, 而后又逐渐回升, 2h 组 HSP90 表达水平与 0.5h 组具有统计学差异, 而与 0h 组无统计学差异。因 ROS 可切断 HSP90 的 N 末端

氨基酸结构域而使蛋白失去相应功能, 所以笔者推测在 0.5h 时 HSP90 蛋白水平下降可能是由蛋白剪切水解造成, 随后人精子可能通过某些修复机制启动 HSP90 翻译表达补充蛋白损耗, 使 2h 后 HSP90 蛋白又回到 0h 水平^[16]。高浓度的 ROS 可影响精子细胞核与线粒体 DNA 完整性, 在 $400\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 条件下经 2h 培养, 精子 HSP90 水平较其余各组显著下降可能正是因为 H_2O_2 破坏了 HSP90 蛋白的修复机制所致^[8]。

综上所述, 笔者认为 HSP90 可能参与人精子氧化应激, ROS 增高除导致精子胞膜脂质过氧化使膜流动性下降外, 对 HSP90 的损耗也可能是其导致男性不育的机制之一。

参考文献

- Davenport EL, Moore HE, Dunlop AS, *et al.* Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells[J]. *Blood*, 2007, 110 (7): 2641 - 2649
- Wiech H, Buchner J, Zimmermann R, *et al.* Hsp90 chaperones protein folding in vitro[J]. *Nature*, 1992, 358 (6382): 169 - 170
- Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11 (7): 515 - 528
- Cooper DTG. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 120
- Tvrda E, Knazicka Z, Bardos L, *et al.* Impact of oxidative stress on male fertility - a review[J]. *Acta Vet Hung*, 2011, 59 (4): 465 - 484
- 焦瑞宝, 唐吉斌. 氧化应激与男性不育[J]. *现代检验医学杂志*, 2011, 26 (4): 13 - 15
- Miller D, Brough S, al - Harbi O. Characterization and cellular distribution of human spermatozoal heat shock proteins[J]. *Hum Reprod*, 1992, 7 (5): 637 - 645
- Sawyer DE, Mercer BG, Wiklendt AM, *et al.* Quantitative analysis of gene - specific DNA damage in human spermatozoa[J]. *Mutat Res*, 2003, 529 (1 - 2): 21 - 34
- Ni Y, Li K, Xu W, *et al.* Acrosome reaction induced by recombinant human zona pellucida 3 peptides rhuZP3a22 approximately 176 and rhuZP3b177 approximately 348 and their mechanism[J]. *J Androl*, 2007, 28 (3): 381 - 388
- Li K, Jin JY, Chen WY, *et al.* Secretory phospholipase A2 group IID is involved in progesterone - induced acrosomal exocytosis of human spermatozoa[J]. *J Androl*, 2012, 33 (5): 975 - 983
- Xu WM, Shi QX, Chen WY, *et al.* Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (23): 9816 - 9821
- Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, *et al.* Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of hu-

- man sperm function[J]. J Cell Sci, 1995, 108 (Pt 5): 2017-2025
- 13 Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy[J]. Hum Reprod, 2011, 26 (7): 1628-1640
- 14 Volpe S, Galeati G, Bernardini C, et al. Comparative immunolocalization of heat shock proteins (Hsp)-60, -70, -90 in boar, stallion, dog and cat spermatozoa[J]. Reprod Domest Anim, 2008, 43 (4): 385-392
- 15 Pei Y, Wu Y, Qin Y. Effects of chronic heat stress on the expressions of heat shock proteins 60, 70, 90, A2, and HSC70 in the rabbit testis[J]. Cell Stress Chaperones, 2012, 17 (1): 81-87
- 16 Beck R, Dejeans N, Glorieux C, et al. Hsp90 is cleaved by reactive oxygen species at a highly conserved N-terminal amino acid motif[J]. PLoS One, 2012, 7 (7): e40795
- (收稿日期: 2013-12-03)
(修回日期: 2014-02-13)

类风湿关节炎常用中药的药性特点初步分析

王 威 翟华强 孙文燕

摘 要 **目的** 通过文献查阅及整理,对中医药治疗类风湿关节炎进行系统回顾与用药规律分析。**方法** 借鉴循证医学的思路与方法,按活动期用药和稳定期用药分类,以中国期刊全文数据库(CNKI)、万方数据库、中国生物医学文献数据库(CBM)为主库,检索词为“RA”、“类风湿关节炎”、“中医药”收集近10年中医药治疗类风湿关节炎组方资料。将药物进行归纳、整理,分析中药的性、味、归经。**结果** (1)活动期用药特点:四气方面,温性药使用频次最高,使用频率占43.2%,其次是寒性药占30.7%,平性药占18.2%。五味方面,苦味药使用频率最高,占34.9%,其次是辛味药占30.1%,甘味药占25.7%。归经方面,归肝经最多,占23.3%,归脾经占16.8%,归肺经占13.4%,归胃经占12.4%。毒性方面,有毒中药占11.4%,无毒中药占88.6%。功效方面,祛风湿药使用频率最高,占21.5%,其次是活血化瘀药占16.8%,清热药占13.6%,补虚药占12.5%,解表药占11.4%。(2)稳定期用药特点:四气方面,温性药使用频次最高,占45.6%;其次是平性药占25.1%,寒性药占23.3%。五味方面,甘味药使用频率最高,占33.8%,其次是辛味药占29.5%,苦味药占25.4%。归经方面,归肝经最多,占26.1%,归脾经占15.4%,归肺经占14.8%,归肾经占13.2%。毒性方面,有毒中药占12.1%,无毒中药占87.9%。功效方面,补虚药使用频率最高,占22.7%,其次是祛风湿药占20.8%,活血化瘀药占16.1%,解表药占13.2%,清热药占10.7%。**结论** 临床用于治疗类风湿关节炎的中药以温性为主,多辛味,及归肝、肺经药物,说明中医多以祛风除湿、活血化瘀等为治则。性温,味辛,归肝、脾经等中药对治疗RA有着重要意义,有助于更好的指导临床遣方组药。

关键词 类风湿关节炎 中医药 药性

[中图分类号] R593

[文献标识码] A

Preliminary Analysis of the Herbal Features of Chinese Medicine for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Wang Wei, Zhai Huaqiang, Sun Wenyan. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract Objective To review and analysis the property of Chinese medicine for the staged treatment of rheumatoid arthritis, through literature review and organize. **Methods** We referenced the ideas and methods of evidence-based medicine, according to the active and stable period medication classification, the Chinese journal full text database (CNKI), Wan Fang, Chinese biomedical literature database (CBM) as main base, searching for the word “RA”, “rheumatoid arthritis”, “Chinese medicine” to collect the treatment of rheumatoid arthritis clinical literature of traditional Chinese medicine in recent ten years. We analyzed the flavor and channel tropism of the traditional Chinese medicine which were summarized and collated. **Results** (1) In the treatment of rheumatoid arthritis activity period, firstly, for the four nature statistics, warm medicine was 43.2%, which was the highest frequency of use, cold medicine was 30.7% and leveling drug was 18.2%. Second, for the five tastes statistics, bitter drug was 34.9%, pungent drug accounted for 30.1%, sweet medicine was 25.7%. Third, channel tropism statistics, 23.3% was owned by the liver, the spleen was 16.8%, 13.4% was owned by

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81373887);国家中医药管理局中医药信息化项目(ZYXX-2012);中国博士后科学基金面上项目(2012M510346)

作者单位:100102 北京中医药大学中药学院(王威、翟华强、孙文燕);100875 北京师范大学资源学院资源生态与中药资源研究所(翟华强)

通讯作者:翟华强,博士后,副教授,副主任医师,电子信箱:34873235@qq.com