

慢性应激对大鼠行为和免疫细胞 热休克蛋白 70 表达的影响*

王玮文^{1,2} 邵枫³ 刘美³ 孙萌^{1,2} 林文娟^{1,2}

(¹中国科学院心理研究所心理健康重点实验室,北京 100101)

(²中国科学院心理研究所脑—行为研究中心,北京 100101) (³北京大学心理学系,北京 100871)

摘要 目的:研究慢性不确定应激对大鼠急性整体热水浴后外周血和脾脏免疫细胞热休克蛋白 70 (Heat shock protein 70, HSP70)表达的影响。方法:随机将大鼠分成慢性应激组和控制组(每组 14 只)。通过 4 周的慢性不确定性应激诱发实验组大鼠明显的抑郁行为,此期间控制组大鼠正常饲养。随后给予大鼠 42 度整体热水浴刺激,维持直肠温度 41.25min。热刺激后 6h,采用流式细胞仪测定大鼠外周血和脾脏免疫细胞 HSP70 水平。结果:与控制组大鼠相比,慢性应激大鼠在急性热刺激后 HSP70 合成明显减少。控制组大鼠的所有被检测的免疫细胞热应激后 HSP70 合成均明显增加。相反,慢性应激大鼠仅在外周血的单核细胞和粒细胞检测到 HSP70 合成增加,同时升高的水平明显低于控制组大鼠。结论:慢性应激降低大鼠免疫细胞 HSP70 的热诱导反应,提示 HSP70 保护性作用减弱可能参与了慢性应激损害免疫细胞功能的生物学过程。

关键词 热休克蛋白 70,应激,免疫细胞,流式细胞仪。

分类号 B845

1 前言

慢性应激损害免疫功能,导致免疫细胞对各种刺激的抵抗力下降及免疫相关疾病,如肿瘤、感染性疾病的易感性增加^[1]。在受到应激刺激时,机体从系统水平到单细胞水平广泛地发生反应。以往的研究着重于探讨神经内分泌系统,主要包括下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴和交感神经系统及其释放的神经递质、激素在应激诱发的免疫改变中的介导作用。然而,从细胞水平探讨应激改变免疫细胞功能机制的研究工作十分缺乏,对免疫细胞自身的应激反应特点知之甚少。

细胞应激反应的一条基本途径是合成一类高度保守的蛋白—热休克蛋白(heat shock protein, HSP)。其中,HSP70 对应激条件最敏感,且被认为是功能最重要的一类热休克蛋白。多种应激刺激能够诱导 HSP70 合成。HSP70 通过“分子伴侣”作用参与细胞生理功能的调节,如促进新生多肽链的正确折叠、转运和组装,以及变性蛋白质的修复、清除等,在保持细胞形态完好,以及对抗应激诱导的细胞

损伤和细胞凋亡中发挥着重要的作用,因而被认为是具有重要应激保护作用的分子^[2]。研究表明,在各种应激条件下,表达高水平 HSP70 的细胞形态上保持完好并且具有活力,而表达水平低或未表达 HSP70 的细胞功能则严重受损,甚至死亡^[3]。例如,适度热应激(低于 42.9 诱导的 HSP70 表达增加能够提高细胞对随后多种严重刺激的抵抗能力,表现在细胞的凋亡率降低,应激后的功能恢复改善,称为“获得性耐受”。进一步采用 HSP70 拮抗剂和基因敲除技术选择性地降低细胞 HSP70 表达的方法,证实了细胞的这种应激耐受作用是 HSP70 依赖的^[4]。因此,在受到应激刺激时,细胞能否产生适时和足够强度的 HSP70 反应是细胞功能状态和抗应激能力良好的重要生物学标志^[5]。

由于 HSP70 是细胞共享的抗应激保护机制,因而可以推测,慢性应激可能通过降低 HSP70 保护作用的途径导致细胞对继发性损害的易感性增加。事实上,一些研究证据支持这一设想。例如,慢性应激诱导抑郁行为的大鼠急性强迫游泳应激后,海马 CA3 区和齿状回内 HSP70 的表达较对照组显著降

收稿日期:2007-01-10

*国家自然科学基金项目资助(批准号:30500158,30670708)。

通讯作者:林文娟, E-mail: Linwj@psych.ac.cn

低,提示慢性应激使海马神经细胞对急性应激的HSP70反应受抑制,对细胞的应激保护作用减弱^[6]。这与重症抑郁患者海马细胞凋亡增加、体积萎缩的症状是一致的^[7]。

慢性不确定性应激是最常用的诱发抑郁的动物模型。研究表明,慢性不确定性应激能够诱发动物抑郁行为,抑制免疫细胞功能,增加免疫细胞凋亡比率^[8]。但是慢性不确定性应激对免疫细胞应激反应的影响尚不清楚。本研究采用该应激模式,以行为作为应激诱发抑郁强度的指标,考察慢性应激是否对大鼠脾脏和外周血免疫细胞HSP70反应有影响。

2 材料和方法

2.1 动物

采用雄性Wistar大鼠28只,体重180~220g,购自维通利华实验动物中心。实验大鼠单笼喂养。光暗周期为12:12h(光照时间0600~1800h),室温22.0~23.0。大鼠实验前至少适应环境7天,最初的3天每天接受3min抚摸以避免操作性应激。适应期内自由摄食和饮水。

2.2 慢性不确定性应激程序

将动物随机分成慢性应激(chronic stress, CS)组和控制(control, C)组,每组各14只。给与CS组大鼠4周不确定性应激。在此期间,C组大鼠正常饲养。4周应激期间,CS组动物随机接受8种不同的刺激:足电击(强度1.0mA,每次电击5s,间隔15s,共计60次);强迫冷水游泳(4度冷水,5min);悬尾(6min);食物剥夺(24h);水剥夺(24h);过夜照明或昼夜颠倒;束缚应激(3h);倾斜鼠笼(45°)。每天随机给与1~2种刺激。

2.3 行为测定

2.3.1 糖精水测试 经20h隔夜剥夺饮水后,进行4h双瓶测定(一瓶饮用水,一瓶0.5%糖精水溶液),测量动物饮水和糖精水的摄入量。糖精水测试每周进行一次。

2.3.2 旷场行为测定 慢性应激前和末次应激后24h进行旷场测验,用计算机自动摄像系统记录大鼠在旷场中5min的水平活动距离,反映应激对大鼠自发活动量的影响。

2.4 急性整体热刺激程序

行为测试后,CS组和C组大鼠分别分成两组,一组受到整体热应激(heat stress, HS)(慢性应激-热刺激(CS-HS)组($n=8$);控制组-热刺激(C-

HS)组($n=8$),另一组在笼中不受干扰作为对照组(慢性应激-非热刺激(CS-NS)组($n=6$),控制组-非热刺激(C-NS)组($n=6$))。急性整体热应激具体方法是,用水合氯醛(10%,3.5ml/Kg)麻醉大鼠。将体温计插入大鼠直肠内约3cm处进行体温监测。然后将大鼠颈部以下浸入42~42.5℃水中,待其直肠温度达到41度后,维持直肠温度41~41.5±0.25min。

2.5 血样和组织收集

热应激后6h将大鼠断头,取血和脾脏。预实验结果表明,应激后6h外周血和脾脏细胞表达高水平的HSP70。EDTA抗凝血室温放置,脾脏用0.1M磷酸盐缓冲液(含2%胎牛血清)冰存,随后进行流式细胞仪分析测定。

2.6 流式细胞仪测定

2.6.1 抗体和试剂 FITC标记的大鼠抗诱导型HSP70单克隆抗体(clone C92F3A-5, SPA-810, Stressgen, Canada),0.1M磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS),胎牛血清(Fetal calf serum, FCS)(拜尔迪生物试剂公司,北京),溶血素及固定/破膜剂(Becton Dickinson公司,美国),FITC标记的小鼠IgG同型对照抗体(Becton Dickinson公司,美国),流式细胞仪(FACSCalibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)和分析软件(Cell Quest software (Becton Dickinson Immunocytometry Systems))。抗体和试剂的使用均按照操作指南进行。

2.6.2 脾脏单细胞制备 在一次性的无菌平皿中置双层2cm×2cm无菌纱布,加入3ml预冷的PBS-2%FCS洗液。脾脏去除结缔组织后放入皿中的纱布中,用无菌弯镊碾磨分散脾细胞,得到脾单细胞悬液。脾单细胞悬液经1500r/min离心5min,弃上清;再用PBS-2%FCS洗细胞一次。

2.6.3 流式细胞仪分析 胞内诱导型HSP70的测定参照Exton(1998)的方法^[9]。主要步骤有:(1)红细胞裂解:200μl全血或脾脏单细胞悬液中加入2ml红细胞裂解液,立即轻柔涡旋混匀,室温放置5min后,加入2ml PBS-2%FCS终止裂解。1500r/min离心5min,小心弃上清。再用冷PBS-2%FCS洗1遍。然后显微镜下用细胞计数板计细胞数,用PBS-2%FCS调细胞数至 1×10^7 /ml。(2)固定和破膜:100μl细胞悬液(约 10^6 个细胞)加入固定和破膜液500μl,迅速混匀,室温孵育10min,2ml PBS-2%FCS洗1次;离心后弃上清;(3)胞内染色:加入

10 μ l(约 1 μ g) HSP70 - FITC单克隆抗体(1:10稀释),避光,室温孵育 30min,然后用 PBS - 2% FCS彻底清洗 2次。加入 500 μ l PBS - 2% FCS上机测定。为了控制细胞自发荧光和非特异性染色的影响,阴性控制染色采用 FITC标记的同型对照小鼠 IgG抗体,胞内染色过程与 HSP70孵育过程相同。

(4)流式细胞仪分析:标记的样品用 BD CellQuest软件系统获取和分析数据。数据以 HSP70平均荧光强度(MFI)表示,并通过同型对照样本的背景荧光校正 MFI以消除自发荧光和非特异性染色的影响。外周血淋巴细胞、单核细胞和粒细胞亚群根据前向角和侧向角反射光信号散点图通过颗粒度和大小的不同分群并设门。

2.7 数据分析

数据分析采用 SPSS 10统计分析软件系统。所

有数值以 $M \pm SE$ 表示。应用学生 t -检验比较两组间的差异。One-way analysis of variance(One-way ANOVA)比较多组间的差异,进一步 post-hoc分析两组间差异采用 LSD。 $p < 0.05$ 为差异显著, $p < 0.01$ 为差异极显著。HSP70表达水平和行为间的相关分析采用 Pearson相关分析(two-tailed)。

3 结果

3.1 行为测试结果

3.1.1 大鼠体重测定结果 大鼠体重测定结果 t -检验分析表明,慢性应激组和控制组在适应期体重没有差异。应激一周后,实验组的体重明显低于控制组($p < 0.05$),这种差异随着应激时间的延长而加剧,在应激 2周后达到极显著水平($p < 0.01$)(见表 1)。

表 1 慢性应激组和控制组体重比较(克)($M \pm SE$)

组别	适应第 1周	适应第 2周	应激第 1周	应激第 2周	应激第 3周	应激第 4周
慢性应激组	251.7 \pm 20.8	311.5 \pm 19.9	338.9 \pm 21.7	353.3 \pm 25.3	372.7 \pm 24.7	386.3 \pm 28.0
控制组	246.9 \pm 16.2	304.8 \pm 19.2	351.6 \pm 20.5*	392.8 \pm 21.1**	419.5 \pm 34.6**	445.4 \pm 41.1**

注: *: $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

3.1.2 糖水测试 糖水测试结果如图 1。应激前,慢性应激组和控制组大鼠的糖水摄入量的基线水平没有明显差异。自应激第二周起,应激组大鼠的糖水摄入量显著低于控制组($p < 0.05$),并在应激第四周达到了极显著水平($p < 0.01$)。两组大鼠的饮用水摄入量在整个应激期间没有显著差别。

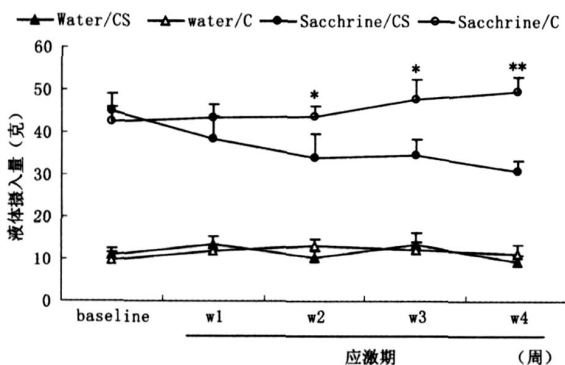


图 1 慢性应激组和控制组大鼠基线和慢性应激期间饮用水和糖水摄入量($M \pm SE$)

注: water/c,控制组饮用水摄入量; water/cs,慢性应激组饮用水摄入量; sacchrine/c,控制组糖水摄入量; sacchrine/cs,慢性应激组糖水摄入量。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$,慢性应激组 vs控制组的糖水摄入量

3.1.3 旷场行为 慢性应激前后大鼠的旷场水平活动距离结果如图 2。应激前,慢性应激组和控制组大鼠在旷场中的自发活动量没有差异。经四周不确定性慢性应激后,应激组大鼠的水平活动距离明显低于对照组($p < 0.01$)。

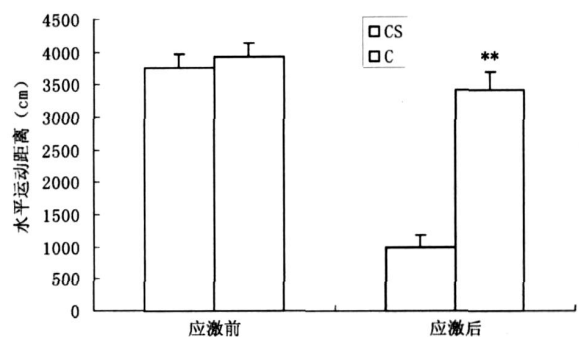


图 2 慢性应激组和控制组旷场水平活动距离(cm)($M \pm SE$)

注: C:控制组; CS:慢性应激组 ** : $p < 0.01$,应激后 C组 vs CS组

3.2 急性热刺激诱导的脾脏免疫细胞 HSP70表达 急性热刺激对脾细胞 HSP70合成的影响见图 3。One-way ANOVA分析表明,脾细胞 HSP70表达水平组间差异显著, $F(3, 24) = 10.59$, $p = 0.014$ 。进一步 post-hoc分析表明,控制组大鼠热刺激前后

脾细胞的 HSP70 表达水平存在显著差异,热刺激诱发控制组大鼠脾细胞 HSP70 表达明显增加(C-HS组 vs C-NS组, $p < 0.05$),而慢性应激组大鼠热刺激前后脾细胞的 HSP70 水平间没有明显差别,尽管热刺激后慢性应激组大鼠脾细胞的 HSP70 水平也有轻微上升(CS-HS组 vs CS-NS组, NS)。而且,慢性应激组和控制组在热刺激后脾细胞的 HSP70 表达水平间也有明显差异,控制组大鼠热诱导的脾细胞 HSP70 合成水平明显高于慢性应激组(C-HS组 vs CS-HS组 $p < 0.05$)。此外,慢性应激本身并不影响脾细胞 HSP70 的基础表达水平(CS-NS vs C-NS, NS)。

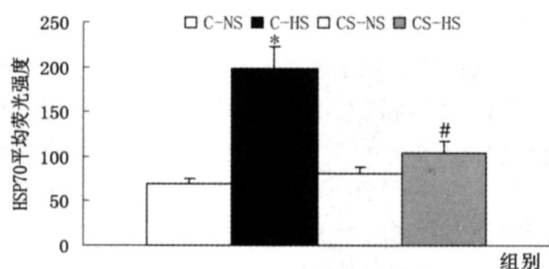


图3 急性热刺激诱导的脾细胞 HSP70 表达 ($M \pm SE$)

注: HSP70 水平以平均荧光强度 (MFI) 表示。C-HS: 受到热刺激的控制组; C-NS: 未受热刺激的控制组; CS-HS: 受到热刺激的慢性应激组; CS-NS: 未受热刺激的慢性应激组。

*: $p < 0.05$, C-HS组 vs C-NS组; #: $p < 0.05$ C-HS组 vs CS-HS组

3.3 急性热刺激诱导的外周血免疫细胞 HSP70 表达

利用前向角和侧向角反射光信号散点图设门区分外周血白细胞的淋巴细胞、单核细胞和粒细胞亚群。急性热刺激对每一亚群细胞的 HSP70 合成的影响如图 4A-C。One-way ANOVA 分析表明各种类型细胞的 HSP70 表达水平组间差异显著(淋巴细胞: $F(3, 24) = 4.973$, $p = 0.048$; 单核细胞: $F(3, 24) = 7.196$, $p = 0.022$; 粒细胞: $F(3, 24) = 7.085$, $p = 0.024$)。进一步 post-hoc 分析表明,热刺激显著诱导控制组和慢性应激组大鼠单核细胞和粒细胞的 HSP70 表达(单核细胞: C-HS组 vs C-NS组 $p < 0.01$; CS-HS组 vs CS-NS组 $p < 0.05$; 粒细胞: C-HS组 vs C-NS组, $p < 0.05$; CS-HS组 vs CS-NS组 $p < 0.05$); 控制组的淋巴细胞 HSP70 水平在热刺激后明显升高(C-HS组 vs C-NS组 $p < 0.05$),而慢性应激组淋巴细胞的 HSP70 水平在热刺激后也有一定程度的升高,但与未受热刺激的对

照组相比没有明显差别(CS-HS组 vs CS-NS组, NS)。慢性应激组和控制组热刺激诱导的单核细胞和粒细胞 HSP70 表达水平间也有明显差异,控制组热诱导的单核细胞和粒细胞 HSP70 合成水平明显高于慢性应激组(单核细胞: C-HS组 vs CS-HS组 $p < 0.05$; 粒细胞: C-HS组 vs CS-HS组 $p < 0.05$)。慢性应激本身并不影响外周血各细胞亚群 HSP70 表达水平(CS-NS vs C-NS, NS)。另外,结果还表明热刺激的作用与细胞类型有关。与未经热处置的相应对照组相比,各细胞亚群的 HSP70 热诱导反应的强度不同,其中以单核细胞的 HSP70 反应最为强烈,淋巴细胞最弱。热应激后,控制组和慢性应激组的单核细胞 HSP70 平均荧光强度分别升高近 5 倍和 2.5 倍;粒细胞的 HSP70 MFI 分别升高近 3 倍和 2 倍。

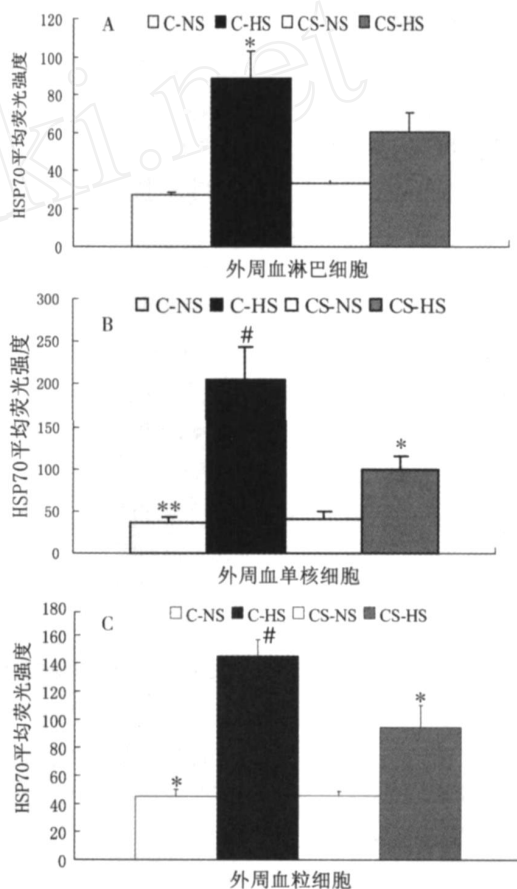


图4 急性热刺激诱导的外周血免疫细胞 HSP70 表达 ($M \pm SE$)

注: HSP70 水平以平均荧光强度 (MFI) 表示。实验组的设置同图 3。A: 淋巴细胞, *: $p < 0.05$, C-HS组 vs C-NS组; B: 单核细胞, **: $p < 0.01$, C-HS组 vs C-NS组, #: $p < 0.05$, C-HS组 vs CS-HS组, *: $p < 0.05$ CS-HS组 vs CS-NS组; C: 粒细胞, *: $p < 0.05$, C-HS组 vs C-NS组, CS-HS组 vs CS-NS组, #: $p < 0.05$, C-HS组 vs CS-HS组

3.4 HSP70表达水平与行为相关分析

行为和 HSP70水平相关分析结果表明,脾细胞及外周血单核细胞和粒细胞的 HSP70平均荧光强度均与糖水消耗量显著正相关。脾细胞及外周血单

核细胞的 HSP70平均荧光强度与旷场水平活动距离显著正相关。糖水饮用量与水平活动距离显著正相关。脾细胞和外周血单核细胞 HSP70水平显著正相关。相关系数见表 2。

表 2 HSP70水平与糖水摄入量 and 旷场水平活动距离相关分析

指标	水平活动距离	糖水饮用量	脾脏 HSP70MFI	外周血淋巴 细胞 HSP70MFI	外周血单核 细胞 HSP70MFI
糖水饮用量	0.589*				
脾脏 HSP70MFI	0.885**	0.817*			
外周血淋巴细胞 HSP70MFI	0.574	0.491	0.256		
外周血单核细胞 HSP70MFI	0.798*	0.757*	0.793*	0.465	
外周血粒细胞 HSP70MFI	0.344	0.700*	0.155	0.310	0.339

注: * $p < 0.05$ (2-tailed); ** $p < 0.01$ (2-tailed).

4 讨论

慢性不确定性应激是最常用的抑郁动物模型^[8]。本研究行为测定结果表明,应激组动物在 4 周慢性应激后体重、糖水消耗量以及旷场水平活动距离均明显低于控制组 ($p < 0.01$)。快感缺乏和自发活动性降低是抑郁的典型症状,说明该慢性应激诱发了大鼠明显的抑郁情绪。

已有的研究表明,在受到应激刺激时,细胞 HSP70反应的速度和强度是细胞功能状态和抗应激能力良好的重要生物学标志。在各种应激条件下,表达高水平 HSP70的细胞形态上保持完好并且具有活力,而表达水平低或未表达 HSP70的细胞功能则严重受损,甚至死亡。预先诱导 HSP70高表达的细胞对随后多种严重刺激的耐受能力提高。进一步采用药物和基因技术选择性地升高或降低细胞 HSP70表达的方法证实,细胞的这种应激耐受作用是 HSP70依赖的^[2-5]。

本研究首次检验了慢性不确定性应激减弱免疫细胞 HSP70反应的假设,研究的结果支持这一假设。与控制组大鼠相比,慢性应激大鼠受到急性热刺激后导致 HSP70合成明显减少。控制组大鼠的所有被检测的细胞热应激后 HSP70合成均明显增加。而慢性应激大鼠仅在外周血的单核细胞和粒细胞检测到 HSP70合成增加,同时升高的水平明显低于控制组大鼠,表明慢性应激大鼠免疫细胞的 HSP70热诱导反应受到抑制。

其他研究报道,相同的应激模式能够导致啮齿类动物的多项免疫功能抑制,如胸腺萎缩、NK细胞活性减弱、淋巴细胞增殖反应和 T细胞依赖的抗体

反应降低以及淋巴细胞凋亡增加等^[10-12]。本研究发现了慢性不确定性应激对外周血和脾脏免疫细胞 HSP70反应的抑制作用。这一结果提示,免疫细胞 HSP70反应抑制可能是介导慢性应激所致免疫细胞抗应激能力受损的分子机制之一。

利用类似的应激模型,相关的研究也发现,慢性应激诱导抑郁行为的大鼠急性强迫游泳应激后,海马 CA3区和齿状回内 HSP70的表达较对照组显著降低,表明慢性应激使海马神经细胞对急性应激的 HSP70反应受抑制,对细胞的应激保护作用减弱,这与重症抑郁患者海马细胞凋亡增加、体积萎缩的症状是一致的^[6,7]。此外,人类和动物老化研究也证实,在热应激条件下,老年个体的外周血单核细胞和淋巴细胞 HSP70产生的阳性细胞百分率和表达量均明显低于青年个体^[13];热应激诱导的老年大鼠(20~22个月)肝和脾细胞 HSP70mRNA水平和 HSP70表达水平与青年大鼠(4~8个月)相比明显降低^[14]。同时研究还发现,温和应激诱导的 HSP70保护作用只对青年供体的细胞有效,对老年供体细胞则缺乏或没有这种保护作用^[15]。而当用转基因方法增加衰老细胞 HSP70表达后,其应激耐受反应明显恢复^[16]。这些研究和本研究结果都表明,细胞的 HSP70保护性机制受到破坏,可能是造成细胞抗应激性损害的能力降低的重要因素。

慢性应激抑制 HSP70合成的机制还不清楚。有研究发现,衰老细胞 HSP70诱导表达下降与胞内多种变性蛋白质堆积干扰 HSP70转录因子激活有关^[17]。慢性应激也能够导致细胞能量代谢障碍和异常蛋白增多^[18],但这与 HSP70反应降低间的关系还需进一步的研究证实。

此外,结果还表明,慢性应激组和控制组大鼠脾脏和外周血免疫细胞在生理状态下的HSP70表达水平低且没有差异。HSP70家族包含分子量为73kDa的结构型蛋白(HSC73)和分子量为72kDa的应激诱导型蛋白(HSP72)。结构性HSP70(HSC73)的表达对应激不敏感,刺激前后合成水平变化很小,而诱导型HSP72在生理水平含量很低,在应激刺激条件下合成增加,含量迅速升高,是参与细胞应激保护的主要分子^[2],本研究采用的是特异性的诱导型HSP70即HSP72的单克隆抗体。结果表明,在未受热刺激的生理状态下HSP72表达水平很低,这与其他文献的报道是一致的^[19]。

本工作还进一步发现,外周血不同类型的免疫细胞对热刺激的HSP70反应性存在差异。热刺激导致控制组大鼠外周血淋巴细胞、单核细胞和粒细胞的HSP70表达均明显升高,但不同细胞亚群HSP70反应的强度不同。单核细胞、粒细胞和淋巴细胞的HSP70平均荧光强度与未受热刺激的大鼠相应细胞相比分别升高近5倍、3倍和2倍,表明单核细胞对热刺激的HSP70反应最为强烈,淋巴细胞最弱。其他研究者也发现,39度整体热水浴2h明显增加外周血白细胞的HSP70应激反应。其中单核细胞对热刺激的HSP70反应最敏感和最强烈,粒细胞次之,淋巴细胞的反应最弱^[20]。此外,本研究还发现,尽管慢性应激降低了细胞的HSP70热诱导反应,但不同类型细胞的反应特点仍然是类似的,慢性应激组大鼠热刺激后单核细胞、粒细胞的HSP70平均荧光强度较对照组分别升高近2.5倍、2倍,淋巴细胞的HSP70水平也有一定程度的升高,但未达到显著水平。总的来说,单核细胞对热刺激的HSP70反应都是最敏感和最强烈的。

通过对抑郁行为与HSP70水平的相关分析,本研究表明,大鼠的糖水饮用量和水平旷场水平活动距离与HSP70水平间存在正相关关系。糖水饮用量和水平活动越少,HSP70表达水平越低。也即抑郁程度越严重,对细胞HSP70诱导的抑制作用越明显。一些研究也报道,重症抑郁患者外周血单个核细胞的HSP70-1基因mRNA 162base缺乏和转录异常^[21,22]。

综上所述,HSP70反应能力是细胞功能是否正常或良好的重要生物学指标,反映了细胞对刺激的耐受能力。本研究结果发现,慢性应激降低了大鼠免疫细胞的HSP70诱发水平,表明免疫细胞的抗应激保护性机制受损,提示HSP70可能参与了应激损

害免疫细胞功能的生物学过程。目前正在进行的研究工作将进一步探讨HSP70在应激免疫调节中的作用及其作用途径。

参 考 文 献

- 1 Black P H, Garbutt L D. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *Journal of Psychosomatic Research*, 2002, 52: 1~23
- 2 Kiang J G, Tsokos G. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology & Therapeutics*, 1998, 80(2): 183~201
- 3 Mosser D D, Caron A W, Bourget L, et al. The Chaperone function of hsp70: Is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(19): 7146~7159
- 4 Kevin C. Molecular Biology of the more regulation. *Journal of Applied Physiology*, 2002, 92: 2177~2186
- 5 Li Weihui, Li Lingjiang, Liu Zhenin. Heat shock protein: biomarker of cellular stress response (in Chinese). *Foreign Medical Sciences, Section of Psychiatry*, 2002, 4: 248
(李卫晖,李凌江,刘哲宁.热休克蛋白—细胞应激反应的生物标志.国外医学精神病学分册,2002,(4):248)
- 6 Peng Miao, Han Jiyang, Zhu Yuzhang, et al. Effects of chronic unpredictable mild stress on the levels of heat-shock protein 70 in the rat hippocampus after acute forced-swimming (in Chinese). *Chin J Nerv Ment Dis*, 2005, 31(5): 326~329
(彭淼,韩继阳,朱宇章等.慢性应激抑郁模型大鼠强迫游泳后海马中HSP70的表达.中国神经精神疾病杂志,2005,31(5):326~329)
- 7 Tafeta G E, Bernardini R. Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2003, 27: 893~903
- 8 Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 1997, 134: 319~329
- 9 Exton M S, Von Horsten S, Schult M, et al. Behaviorally conditioned immunosuppression using cyclosporine A: central nervous system reduces L-2 production via splenic innervation. *J Neuroimmunology*, 1998, 88: 182~191
- 10 Silberman D M, Ayelli-Edgar V, Zorrilla-Zubilete M, et al. Impaired T-cell dependent humoral response and its relationship with T lymphocyte sensitivity to stress hormones in a chronic mild stress model of depression. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2004, 18: 81~90
- 11 Kubera M, Basta-Kaim A, Holan V, et al. Effect of mild chronic stress, as a model of depression, on the immunoreactivity of C57BL/6 mice. *International Journal of Immunopharmacology*, 1998, 20: 781~789
- 12 Shi Y F, Devadas S, Greenelth K M, et al. Stressed to death: Implication of lymphocyte apoptosis for psychoneuroimmunology. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2003, 17: S18~S26
- 13 Njemini R, Demanet C, Lambert M, et al. Age-related decrease in the inducibility of heat-shock protein 70 in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Clinical Immunology*, 2002, 22(4): 195~205
- 14 Gutschmann-Conrad A, Mohammad A, Pahlavani A R, et al. Expression of heat shock protein 70 decreases with age in

- hepatocytes and splenocytes from female rats *Mechanisms of Ageing and Development*, 1999, 107: 255 ~ 270
- 15 Honma Y, Masato T, Takayama M, et al Aging abolishes the cardioprotective effect of combination heat shock and hypoxic preconditioning in reperfused rat hearts *Basic Research in Cardiology*, 2002, 97: 489 ~ 495
- 16 Alsbury S, Papageorgiou I K, Latchman D S Heat shock proteins can protect aged human and rodent cells from different stressful stimuli *Mechanisms of Ageing and Development*, 2004, 125: 201 ~ 209
- 17 Tanabe M, Kawazoe Y, Takeda S, et al Disruption of the HSF3 gene results in the severe reduction of heat shock gene expression and loss of thermotolerance *The EMBO Journal*, 1998, 17 (6): 1750 ~ 1758
- 18 Cabai V L, Meriin A B, Yaglom J A, et al Role of HSP70 in regulation of stress-kinase JNK: implication in apoptosis and aging *FEBS Letter*, 1998, 438 (1 (2)): 1 ~ 4
- 19 Somji S, Todd J H, Sens M A, et al Expression of the constitutive and inducible forms of heat shock protein 70 in human proximal tubule cells exposed to heat, sodium arsenite, and CdCl₂ (2). *Environmental Health Perspectives*, 1999, 107: 887 ~ 893
- 20 Oehler R, Pusch E, Zellner M, et al Cell type specific variations in the induction of hsp70 in human leukocytes by feverlike whole body hyperthermia *Cell Stress & Chaperones*, 2001, 6 (4): 306 ~ 315
- 21 Shimizu S, Nomura K, Ujihara M, et al An allele-specific abnormal transcript of the heat shock protein 70 gene in patients with major depression *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 219: 752 ~ 754
- 22 Takimoto T, Nakamura K, Uenod H, et al Major depression and heat shock protein 70-1 gene *Clinica Chimica Acta*, 2003, 332: 133 ~ 137

Effects of Chronic Stress on Behavior and Heat Shock Protein 70 Expression in Immune Cells

Wang Weifen^{1,2}, Shao Feng³, Liu Mei³, Sun Meng^{1,2}, Lin Wenjuan^{1,2}

⁽¹⁾ Key Lab of Mental Health, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

⁽²⁾ Brain-behavior Research Center, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

⁽³⁾ Department of Psychology, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract

Chronic stress can suppress organisms' resistance to adverse stimuli in the environment. The stress responses occur at both the system and single-cell levels. Although many studies have investigated the neuroendocrine mechanisms underlying the effects of stress on health, the characteristics of cellular stress response are still poorly understood. One manner in which cells resist damage and/or death induced by stress is to synthesize a highly conserved set of intracellular proteins, termed heat shock protein (HSP). In particular, the 70-kDa HSP (HSP70) is essential for cellular recovery after stress as well as survival and maintenance of normal cellular function. It has been demonstrated that the expression of high levels of HSP70 is associated with an increased resistance of cells to challenges that would otherwise lead to cell injury and/or death. Therefore, the intensity of an HSP70 response to stress is an important biomarker of how the cell tolerates stress damage.

This study aimed to determine whether prior chronic stress inhibited the synthesis of HSP70 in immune cells in the peripheral blood and spleen of rats exposed to an acute hot water bath. Twenty-eight rats were randomly divided into 2 groups with 14 rats in each group: the control group (C) and the chronic stress group (CS). CS rats were exposed to chronic unpredictable stress for 4 weeks to induce depressive-like behavior. The controls were stress-free. Thereafter, 8 rats in each group were exposed to acute heat stress (C-heat shock and CS-heat shock) to induce whole-body hyperthermia (maintaining the core temperature at 41 °C for 25 minutes). The other rats remained undisturbed in their home cages (C-no heat shock and CS-no heat shock). All rats were decapitated 6 hours after the completion of the treatments. The blood and spleen were collected and the level of HSP70 expression in the leukocytes was measured using flow cytometry.

It was found that CS rats showed a decreased cellular HSP70 expression following the heat treatment, while a significant increase in the synthesis of HSP70 was observed in all types of immune cells from C rats. However, in CS rats, such HSP70 changes were only detected in the monocytes and granulocytes. Further, the increasing degree of heat-induced cellular HSP70 expression in CS rats was less pronounced than that observed in C rats.

These results demonstrated that chronic stress decreased heat-induced HSP70 response in immune cells. Further, they suggested that the deficit of HSP70 might be involved in the suppressive modulation of the immune function induced by chronic stress.

Key words heat shock protein 70, chronic stress, immune cells, flow cytometry.