

高内涵技术的新突破

使用热休克蛋白和细胞周期进行细胞毒性预测

原著: Suk J. Hong, Richik N. Ghosh 编译: 王珏 Isaac

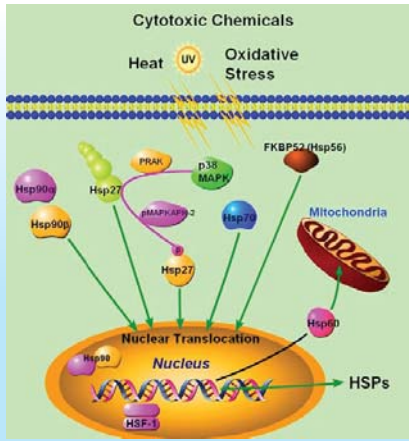
摘要

热休克蛋白 (HSPs) 是所有的有机体内非常重要的一类蛋白。尤其当遭遇到各种外界压迫时, HSP 对细胞的生理平衡和乃至生存都起到至关重要的作用, 此外在信号传导、细胞增殖和凋亡以及蛋白质动力学方面, HSP 都发挥着重要的功能。HSPs 主要有 5 大类: 小 HSPs、Hsp60 或者伴侣、Hsp70、Hsp90 以及 Hsp110。Thermo 公司开发了一系列 Cellomics® 高内涵筛选试剂盒, 对不同的 HSPs 进行基于细胞的高内涵分析, 可以用来快速准确地评估细胞的应激反应。这些试剂盒及检测方法可以对细胞内各类 HSPs 进行荧光标记、细胞成像和定量检测: (1) Hsp27 和 phospho-Hsp27, (2) Hsp60 和 Hsp90beta, (3) Hsp70 和 Hsp90alpha, 以及 (4) FKBP52 (Hsp59)。为了验证这些试剂盒的性能, 我们使用两种具有代表性的肿瘤细胞——A549 和 U2OS。使用不同的化合物处理这两种细胞后, 经过固定染色, 成像等步骤的前期准备后, 运用高内涵分析系统可以加以数据统计分析, 能够快速精确地判断和评估有毒化合物对细胞产生的刺激。这些数据都经过其他独立的毒性测试 (如 BrdU cell proliferation, p38 MAPK 和 cell loss) 所验证。HSPs 引起的细胞应激反应往往先于动物毒性 (可通过 LD50 来确定的), 因此这些数据不仅提供了药物的细胞毒性指示, 并且可能获得意料之外的各类细胞反应。总的来说, 使用基于细胞的自动化高内涵分析来监测 HSPs, 是对细胞应激分析的一种行之有效的策略。

背景介绍

热休克蛋白最主要的功能是作为分子伴侣促进蛋白质的折叠和合成。然而, 热休克蛋白的角色已经扩大到了细胞信号, 细胞生存, 蛋白质降解, 蛋白质寻靶和运输, 以及转录因子的调控中。热激、氧化、细胞因子、重金属、化疗试剂和激素等细胞刺激都是通过 HSF-1, STAT1, ATF3, c-Jun 等细胞因子进行转录调控来提高细胞中热休克蛋白的表达水平, 这种细胞应激反应对于维持细胞的动态平衡十分重要。热休克蛋白的诱导与加入细胞中物质的细胞毒性和亲脂性密切相关。也有报道提到, 小热休克蛋白的表达水平与许多人类疾病, 包括白内障, 癌症, 神经退行性疾病, 心血管疾病等有关。一种小热休克蛋白 HSP27 能够与细胞凋亡过程中的多种蛋白相互作用, 并且帮助保持细胞中结构完整性和膜稳定性。Hsp27 的 15 位、78 位和 82 位色氨酸能够被磷酸化修饰, 分别在 Akt、p38 和 MAPKAPK-2 的信号传导过程中扮演着重要的作用。Hsp60 有一些免疫学作用, 如在一些骨髓和血管细胞中诱导前炎性细胞因子的分泌。Hsp60 除了热刺激外, 还能伴随哺乳动物

细胞里的线粒体特异性应激反应诱导出来。在心脏和肌肉细胞发生局部缺血性损伤后, 它能够保护线粒体的功能, 并抑制细胞死亡。Hsp90 是真核细胞中一种大量存在的蛋白, 它有两种单独的异构体: α 和 β 。Hsp90 和许多其它辅助伴侣蛋白一起, 表现出了伴侣蛋白的活性, 在各种信号途径相关的特异性蛋白折叠中发挥着重要的作用。Hsp70 不仅能够防止蛋白聚集, 帮助蛋白折叠, 而且能够引导蛋白穿过细胞器官的膜结构, 分解寡聚蛋白质的结构, 促进不稳定蛋白质的水解, 控制折叠蛋白的生物学活性。Hsp70 的核定位与细胞刺激和细胞生长有关。FKBP52(HSP59) 是一种大的亲免疫蛋白, 能够与免疫抑制药物 FK506 结合, 在神经系统中具有神经营养活性。FKBP52 含有 3 个 TPR 结构域, 能够介导和 HSP90 之间的蛋白-蛋白相互作用, C 末端区域还含有一个钙调蛋白的结合位点。因为热休克蛋白的伴侣蛋白功能与许多人类疾病, 包括癌症, 神经退行性疾病, 心血管疾病等有关, 因此这些伴侣蛋白已经成为药物开发的新靶点。



HSP 的功能

- 细胞凋亡
- 蛋白合成
- 蛋白翻译
- 折叠
- 蛋白降解
- 信号传导
- 先天免疫
- 后天免疫
-

图1: 各类HSP的功能

实验

1. HSP对于CuSO₄刺激的反应

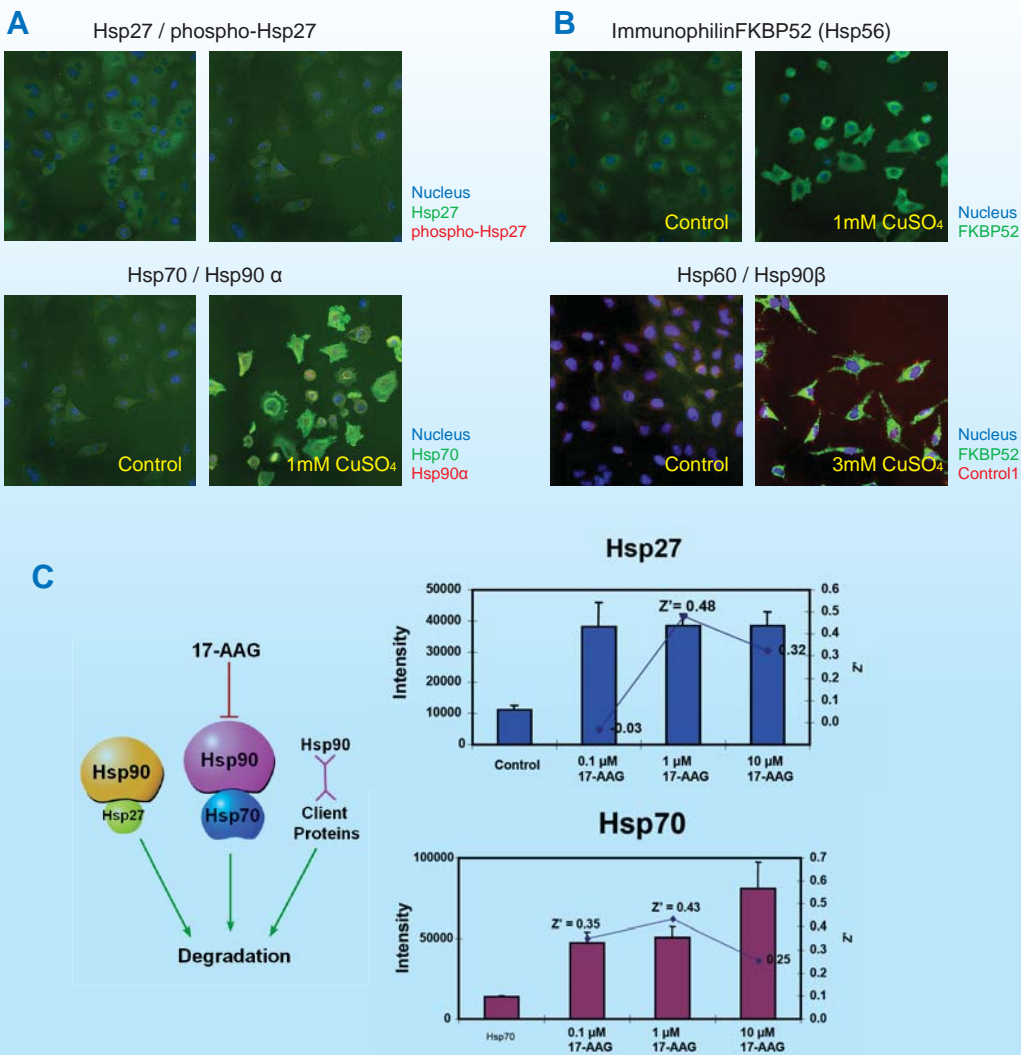


图2: (A, B) 用 Cellomics HCS 试剂盒对 A549 细胞进行染色, 显示细胞中的 Hsp27、磷酸化 Hsp27、Hsp70、Hsp90 和 FKBP52 在 CuSO₄ 处理 24 小时后的表达水平得到提高, 并且 HSPs 都在细胞核内聚集。用 3 mM CuSO₄ 处理 24 小时后, 线粒体中的 Hsp60 得到增多。(C) 用 Hsp90 的特异性抑制剂 17-AAG 处理, 结果抑制 Hsp90 介导的蛋白降解, 提高了 Hsp27 和 Hsp70 的表达水平。

2. CuSO₄刺激HSP的剂量依赖

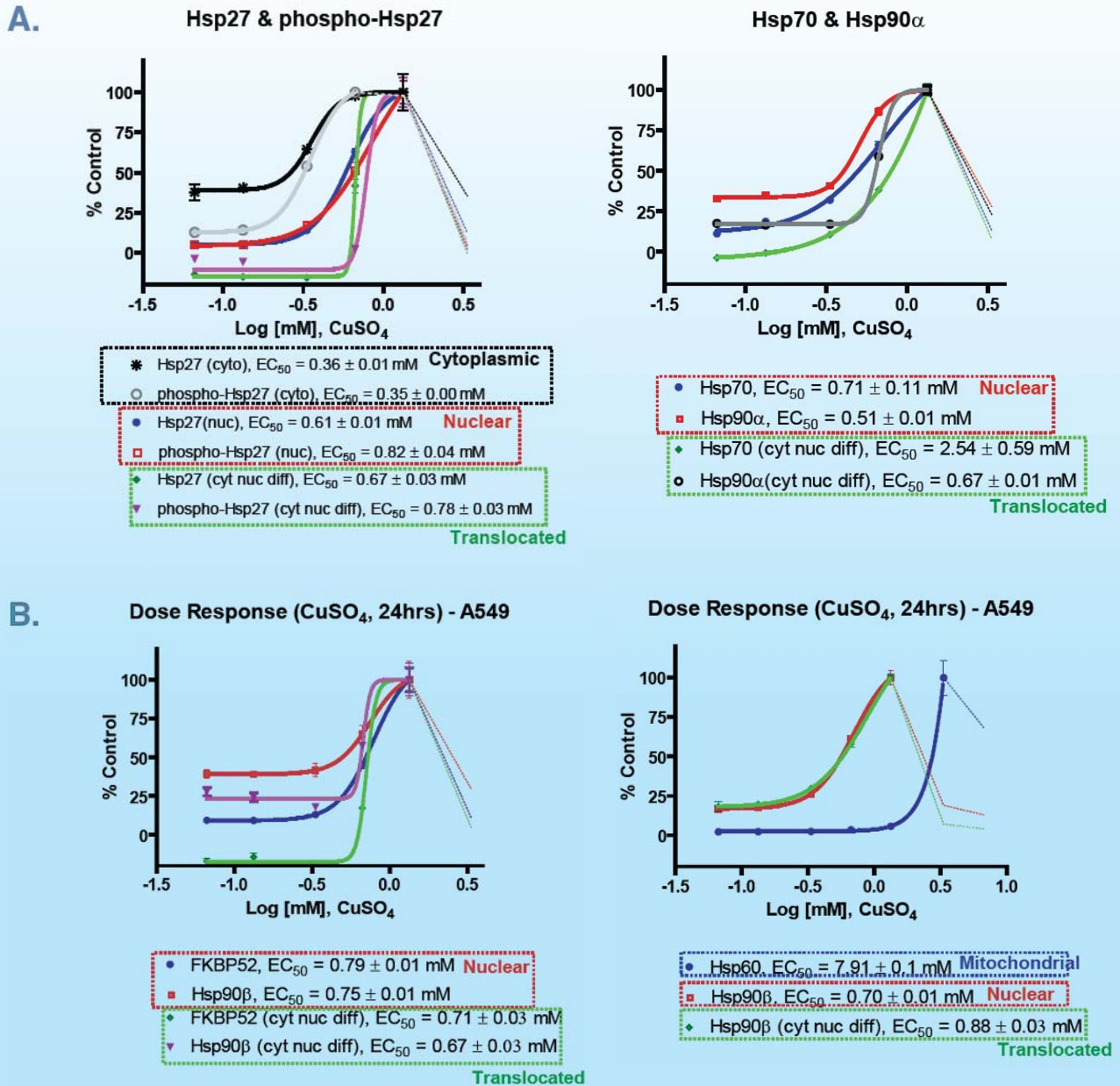


图 3: (A, B) 细胞质中的 HSPs 含量首先提高, 然后 CuSO₄ 处理使得 HSPs 转移到细胞核内。cyto: 细胞质, nuc: 细胞核, cyt nuc diff: 细胞质和细胞核中的荧光强度差。注意在高浓度下 HSPs 没有诱导。

3. HSP蛋白的药物特性 (体外HCS调节和动物毒性分析LD50比较)

- 紫杉醇 Paclitaxel – Rat LD50=32.5 mg/kg
- 鱼藤酮 .Rotenone – Rat LD50 = 132 – 1500 mg/kg
- Cisplatin Rat LD50 = 32.7 mg/kg
- Staurosporine Mouse LD50 i.p. = 6.6 mg/kg
- 缬氨霉素 Valinomycin Rat LD50 = 4 mg/kg

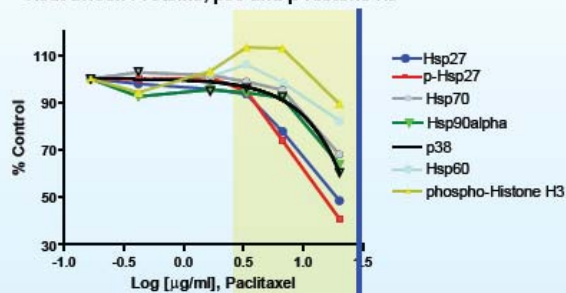
1. 紫杉醇 Paclitaxel

Paclitaxel Dose Response in A549

EC50 or IC50

Hsp27	phospho-Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90alpha	Nuclear Size	Cell Number	BrdU	phospho-Histone H3	p38
8.454	7.394	7.330	41.78	68.61	7.532	6.119	1.995		382.9

Heat Shock Proteins, p38 and p-Histone H3

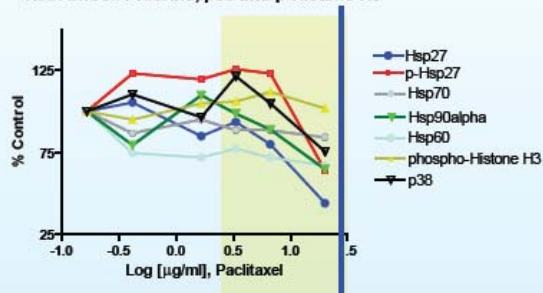


Paclitaxel Dose Response in U2OS

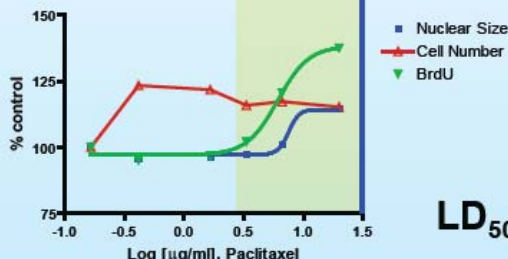
EC50 or IC50

Hsp27	phospho-Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90alpha	Nuclear Size	Cell Number	BrdU	phospho-Histone H3
1571		0.1346	0.0003399	7.573	0.01510	2.850	41540	1.370

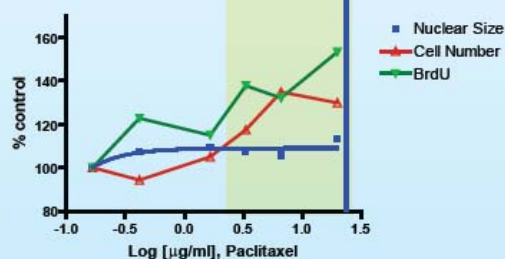
Heat Shock Proteins, p38 and p-Histone H3



Nuclear Size, Cell Number and Cell Proliferation



Nuclear Size, Cell Number and Cell Proliferation



$LD_{50} \approx \text{Log } 1.5$

Cells Vulnerable to Cell Stress

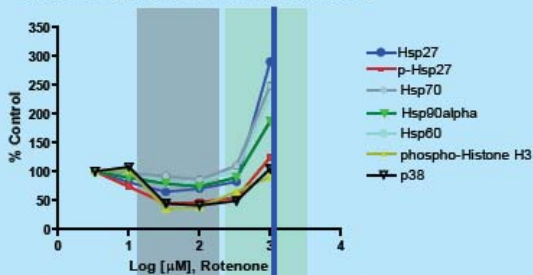
2. 鱼藤酮 Rotenone

Rotenone Dose Response in A549

EC50 or IC50

Hsp27	phospho-Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90alpha	Nuclear Size	Cell Number	BrdU
964.1	9.093	527.6	452.9	724.1	11.70	8.289	9.929

Heat Shock Proteins, p38 and p-Histone H3

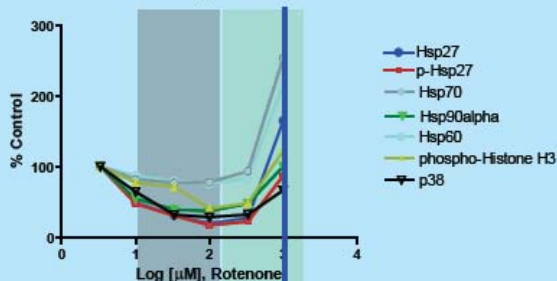


Rotenone Dose Response in U2OS

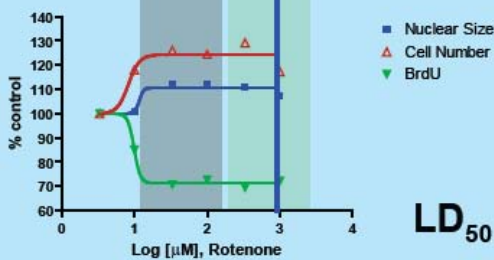
EC50 or IC50

phospho-Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90alpha	Nuclear Size	Cell Number	BrdU	phospho-Histone H3
5.547		684.5		5067	5.291	13.35	7.390

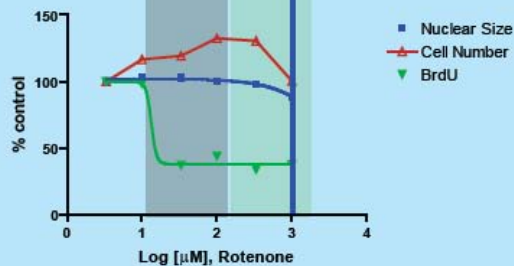
Heat Shock Proteins, p38 and p-Histone H3



Nuclear Size, Cell Number and Cell Proliferation



Nuclear Size, Cell Number and Cell Proliferation



$LD_{50} \approx \text{Log } 3$

Two Cell responses: Vulnerable/Toxic

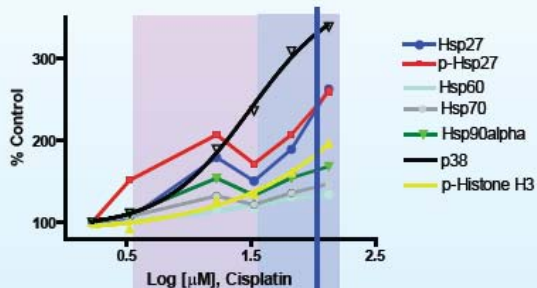
3. Cisplatin

Cisplatin Dose Response in A549

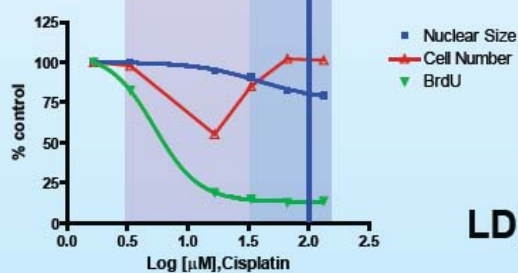
EC50 or IC50

Hsp27	phospho Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90alpha	Nuclear Size	Cell Number	BrdU	phospho-Histone H3	p38
4.726	3.211	35.45	4.037	4.058	38.98	37.33	5.302	3105	31.21

Heat Shock Proteins, p38 and p-Histone H3



Nuclear Size, Cell Number and Cell Proliferation

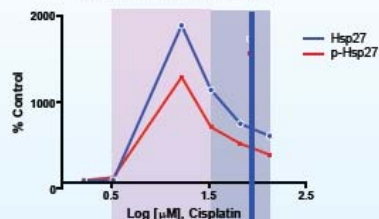


$LD_{50} \approx \text{Log } 2$

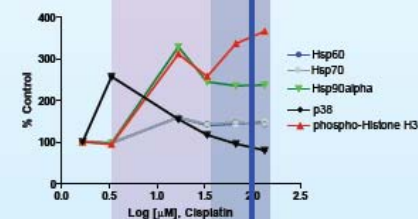
Cisplatin Dose Response in U2OS

Hsp27	phospho Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90alpha	Nuclear Size	Cell Number	BrdU	phospho-Histone H3	p38
4.392	4.298	9.693	17.80	36.49	4.258	8.566	27.34		

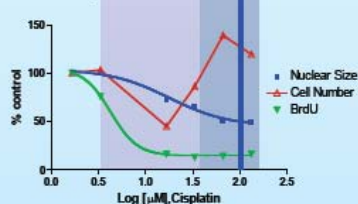
Hsp 27 and phospho-Hsp27



Heat Shock Proteins, p38 and p-Histone H3



Nuclear Size, Cell Number and Cell Proliferation



Different Drug Phases: Acute Cytotoxicity/2nd Cell Stress Phase

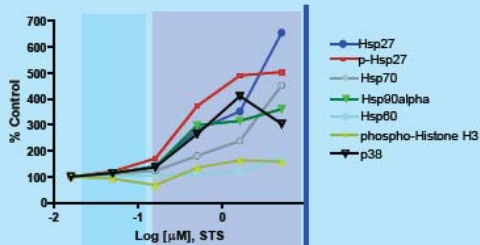
4. Staurosporine

Staurosporine Dose Response in A549

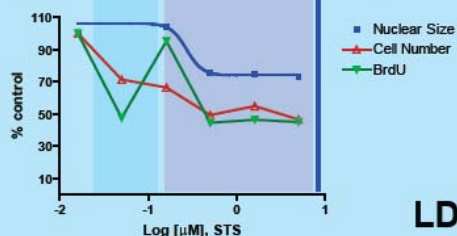
EC50 or IC50

Hsp27	phospho Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90alpha	Nuclear Size	Cell Number	BrdU	phospho-Histone H3	p38
5172	0.3567	281.6	2128	0.3000	0.2710	3.1343e-005	6.1954e-005	0.4698	0.4427

Heat Shock Proteins, p38 and p-Histone H3



Nuclear Size, Cell Number and Cell Proliferation

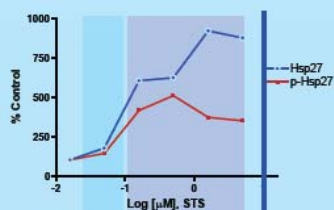


$LD_{50} \approx \text{Log } 1$

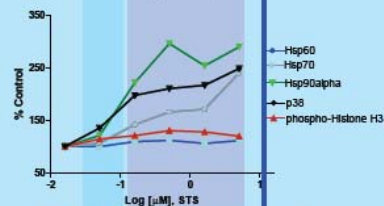
Staurosporine Dose Response in U2OS

Hsp27	phospho Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90alpha	Nuclear Size	Cell Number	BrdU	phospho-Histone H3	p38
0.1226	0.05545	0.1202	628790	0.1218	0.1996	0.06029	0.0004134	0.03532	0.01690

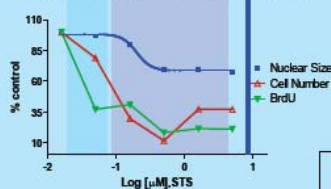
Hsp 27 and phospho-Hsp27



Heat Shock Proteins, p38 and p-Histone H3



Nuclear Size, Cell Number and Cell Proliferation



Phospho-Hsp27 & Hsp90 patterns reflect cell loss

Kinase inhibition-mediated Cell Cycle Block / Cytotoxicity

5. 缬氨霉素 Valinomycin

Valinomycin Dose Response in A549

Valinomycin Dose Response in U2OS

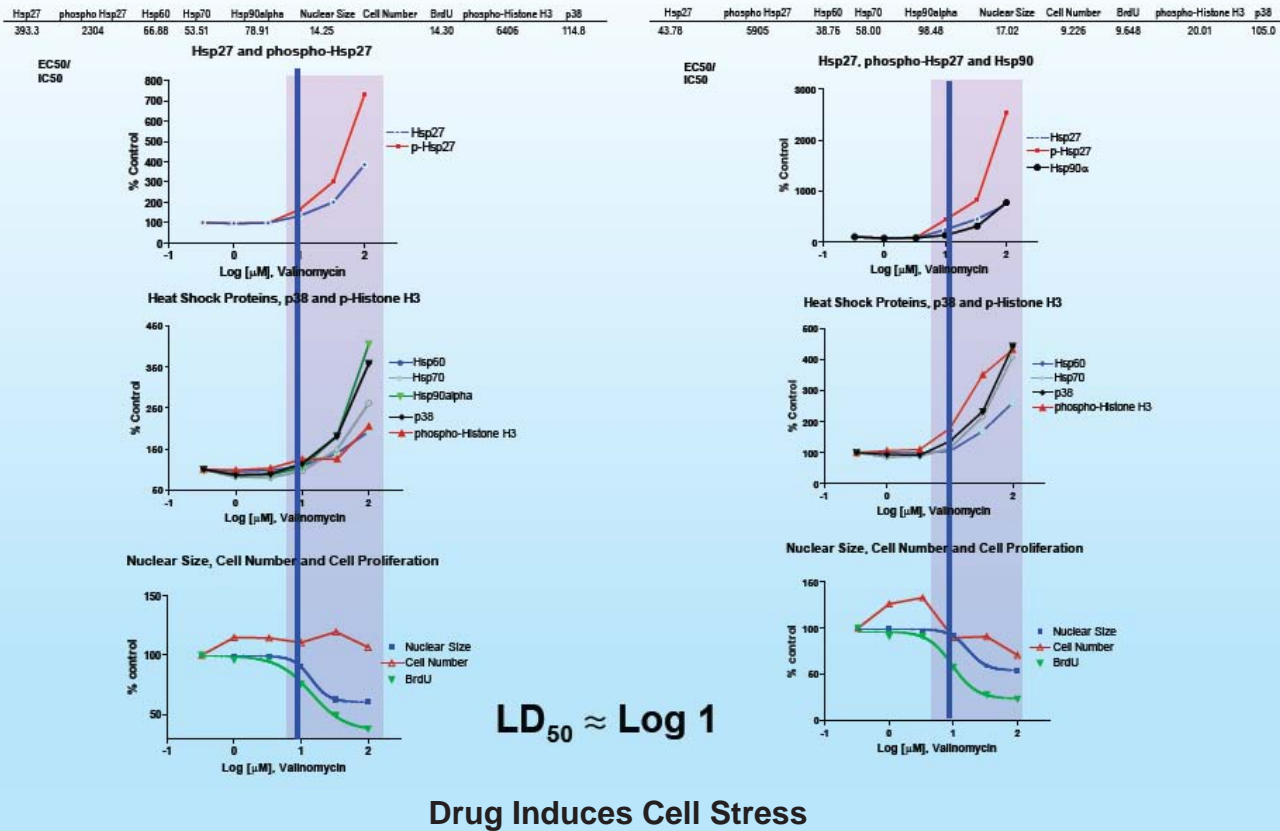


图 4: Hsp27, phospho-Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90, p38 MAPK 以及 phospho-Histone H3 都使用 HCS 进行细胞内定量测量。结合 BrdU 进行细胞增殖, 细胞核的大小和细胞数量都进行了测量, 作为细胞毒性对照 (Cellomics Cell Cycle I HCS 试剂盒)。(A) 五种具有不同毒性机理的化学药品对 A549 (肺癌) 和 U2OS (骨肉瘤) 两种细胞株进行了测试; (B) 紫杉醇处理在高剂量时降低了各种细胞类型的 HSP 含量, 并且使得细胞对于刺激更加敏感。(C) 鱼藤酮在低浓度时抑制了 BrdU 的结合, 并且增加了核的大小和细胞数目, 同时也降低了所有的 HSPs 和 p38。在高剂量时, 鱼藤酮激活了 HSPs, p38 和 phospho-Histone H3, 显示出对各种细胞类型都具有细胞毒性。BrdU 结合对于鱼藤酮引起的刺激具有很强的敏感性, 但是不能指示出高剂量鱼藤酮下的继发作用, 而 HSP 检测能够发现所有的细胞反应。

结论

- 热休克蛋白是对于细胞应激反应的极好的指示剂。
- 细胞周期标记物也是细胞生长, 细胞应激以及细胞死亡的高质量的指示剂。
- 利用细胞周期标记物和热休克蛋白的 HCS 检测, 给细胞生理学和细胞在各种药物治疗环境下的应激反应提供了更好的图片。这将引导人们去发现药物治疗产生的细胞反应。
- 在 HCS 检测中, 合适的目标组合和目标选择对于评价特异的细胞刺激尤为重要。Thermo Scientific Cellomics HCS 反应试剂盒提供了解决办法。