

· 论著 ·

严重烧伤早期肠黏膜组织热休克蛋白 70 的表达规律

袁志强 彭毅志 李晓鲁 黄跃生 杨宗城

【摘要】目的 探讨大鼠烧伤后早期肠黏膜组织热休克蛋白 70(HSP70)的表达变化规律及其意义。**方法** 采用大鼠烫伤模型,通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质免疫印迹(Western blot)及免疫组化等方法,检测伤后 3、6、12、24 和 48 h 不同时间点肠黏膜组织内 HSP70 及热休克因子 1(HSF1)的表达分布情况。**结果** 烫伤后 3 h 肠黏膜组织内 HSP70 mRNA 及蛋白表达均显著增加,分别在伤后 6 h 和 12 h 达高峰,伤后 48 h 仍高于正常对照组(P 均 <0.01);伤后 3 h 大鼠肠黏膜组织 HSF1 出现一过性降低,伤后 6 h 其表达显著高于正常对照组,并呈逐渐增加的趋势直至持续到伤后 48 h(P 均 <0.01)。**结论** 严重烧伤早期肠黏膜组织 HSP70 及 HSF1 表达均显著增加,提示严重烧伤早期即可引起肠黏膜组织细胞的应激反应,可能与细胞的自我保护机制启动有关。

【关键词】 热休克蛋白; 肠黏膜; 烧伤

Expression of heat shock protein 70 in intestinal mucosa during the early stage after severe burns and its significance YUAN Zhi-qiang, PENG Yi-zhi, LI Xiao-lu, HUANG Yue-sheng, YANG Zong-cheng. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Corresponding author: PENG Yi-zhi (Email: yizhipen@mail.tmmu.com.cn)

【Abstract】Objective To study the expression of heat shock protein 70 (HSP70) in intestinal mucosa during the early stage after severe burn injury and its significance. **Methods** With a model of 30% total body surface area (TBSA) full-thickness burned rats, the expression and distribution of HSP70 and heat shock factor-1 (HSF1) in intestinal mucosal were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blot and immunohistochemistry at 3, 6, 12, 24 and 48 hours postburn. **Results** The expression of HSP70 mRNA and protein in intestinal mucosa increased markedly at 3 hours after severe burns, peaked at 6 and 12 hours, and lasted for 48 hours postburn (all $P < 0.01$). Following a slight decline at 3 hours postburn, the expression of HSF1 increased gradually, and reached a highest level at 48 hours postburn (all $P < 0.01$). **Conclusion** The expression of HSP70 and HSF1 markedly increase in intestinal mucosa following severe burn injury. It is suggested that the self-protective mechanism of cells might explain the increase of HSP70 expression.

【Key words】 heat shock protein; intestinal mucosa; burns

热休克蛋白(HSPs)是细胞在各种不良环境因素作用下产生的一组高度保守应激蛋白,它普遍存在于整个生物界,几乎所有的细胞均能合成^[1]。我们前期的研究已经发现,热休克蛋白 70(HSP70)作为一种非特异性的细胞内源性保护蛋白,在防止应激引起的细胞损害或使受损细胞恢复方面起着重要作用^[2]。严重烧伤及伤后早期导致的组织细胞缺血、缺氧、炎症介质释放、细菌内毒素产生等多种因素作为严重的应激,必然会诱导机体产生强烈的应激反应。本实验旨在探讨严重烧伤早期肠黏膜组织 HSP70 及其调控因子——热休克因子(HSF)的表达变化规

律,为进一步研究 HSP70 在烧伤后肠黏膜损害中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器: HSP70 抗体(Calbiochem 公司生产), HSF1 抗体(NeoMarkers 公司生产),羊抗鼠 IgG-HRP(北京中山公司生产),链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化染色试剂盒(北京中山), Tripure 分离试剂(Tripure Isolation Reagent, Roche, American 生产),超信号皮克级蛋白质免疫印迹(Western blot)检测试剂盒(Pierce 公司生产),逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)两步法试剂盒(Takara 公司生产),半干转移电泳仪(Pharmacia),紫外分光光度仪(Beckman)。

1.2 动物分组与烫伤模型制备: 健康成年 Wistar 大鼠 18 只(第三军医大学实验动物所提供),雌雄不限,体重 200~250 g。随机分为正常对照组及烫伤后 3、6、12、24 和 48 h 共 6 个组,每组 3 只。正常对照组

基金项目:“973”国家重点基础研究发展规划项目(G1999054202)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通讯作者:彭毅志 (Email: yizhipen@mail.tmmu.com.cn)

作者简介:袁志强(1976-),男(汉族),湖南省汝城县人,医学博士,主治医师,主要从事烧伤后缺血、缺氧性损害及感染防治的研究。

不做任何处理,烫伤模型组动物伤前禁食 12 h,质量分数为 1% 的戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔麻醉,背部电推剃毛,置剃毛区于 92 °C 水浴中烫 18 s,造成总体表面积 30 % 的Ⅲ度烫伤(病理切片证实)。伤后补液按 40 ml/kg 腹腔注入乳酸林格液。分别在各时间点取动物的部分回肠(距回盲部约 5 cm)黏膜组织,立即置于液氮中冷冻保存。

1.3 观察指标

1.3.1 HSP70 及 HSF1 蛋白表达的检测:称取约 0.1 g 肠黏膜组织并用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 2 次,加入 1 ml 预冷蛋白裂解液[RIPA,内含 50 mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 体积分数为 1% NP-40, 质量分数为 1% 的脱氧胆酸钠, 0.1% 十二烷基硫酸钠(SDS), 20 μg/ml 抑肽酶、Pepstatin 和苯甲基磺酰氟化物(PMSF)]后用玻璃匀浆器匀浆。15 000×g 离心 10 min, 收集上清。以牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量测定。50 μg 总蛋白经 8 % 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离,用半干转移电泳仪将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上;之后用 50 g/L 脱脂奶粉-Tris 缓冲液(TBS 溶液)在室温下封闭 1 h,加入特异性 HSP70(Mouse IgG)或 HSF1 一抗在 4 °C 条件下保温过夜;TBS 洗膜,每次 10 min,洗 3 次;二抗使用羊抗鼠 IgG-HRP,于 37 °C 孵育 1 h,再用洗涤液洗 3 次;之后用化学发光底物孵育,硝酸纤维素膜于暗室中用感光胶片感光、冲洗。所得结果经扫描后用 Quantity one 软件(Bio-Rad)进行统计分析。

1.3.2 HSP70 mRNA 的表达:用 RT-PCR 检测。Tripure Isolation Reagent 提取肠黏膜组织总 RNA,用 Primer 5.0 引物设计软件设计引物序列,引物由上海生物工程有限公司合成。以 β-actin 作为内参照,HSP70 引物序列为:上游:5'-CGCTGGAG-CCCGTGGAGAAG-3',下游:5'-GCGGCCCTT-GTCGTTGGTGAT-3',扩增产物大小为 590 bp;β-actin 引物序列为:上游:5'-CAG TAA CAG TCC GCC TAG AA-3',下游:5'-GAT TAC TGC TCT GGC TCC TA-3',扩增产物大小为 175 bp。按 Takara 公司 RT-PCR 试剂盒说明书操作,扩增条件为:94 °C、30 s,55 °C、30 s,72 °C、30 s;30 个循环后 72 °C 延伸 10 min,PCR 产物在质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳后溴化乙锭(EB)染色,扫描定量,根据 HSP70 带吸光度(A)值/β-actin 带 A 值表示 HSP70 基因的相对表达量。每组重复 3 次。

1.3.3 HSP70 免疫组化检测:根据免疫组化染色试剂盒提供的说明书要求进行操作。回肠组织经体积分数为 10% 的中性缓冲甲醛溶液中固定后石蜡包埋、切片,常规脱蜡至水,体积分数为 0.3% 的过氧化氢室温孵育灭活内源性过氧化物酶活性,血清封闭后加 1:500 稀释的抗 HSP70 抗体,4 °C 过夜,滴加生物素标记的二抗,37 °C 孵育 15 min,加辣根酶标记的链霉卵白素,37 °C 孵育 15 min,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。显微镜下观察,照相记录结果。

1.4 统计学方法:所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS10.0 统计软件对数据进行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肠黏膜组织中 HSP70 及 HSF1 蛋白的表达:Western blot 结果(图 1)显示,正常大鼠肠黏膜组织中 HSP70 呈微量表达,烫伤后 3 h 其表达显著增加($t = 5.195, P = 0.007$);伤后 12 h 达高峰,为正常对照组的 4.3 倍,随后有所下降,但其表达量在伤后 48 h 仍高于正常对照 2 倍($t = 5.309, P = 0.006$)。正常对照大鼠肠黏膜组织 HSF1 有少量表达,伤后 3 h 出现一过性降低,伤后 6 h 其表达显著高于正常对照($t = 15.209, P = 0.000$),并呈逐渐增加的趋势,持续到伤后 48 h 达正常对照的 2.3 倍(图 2)。

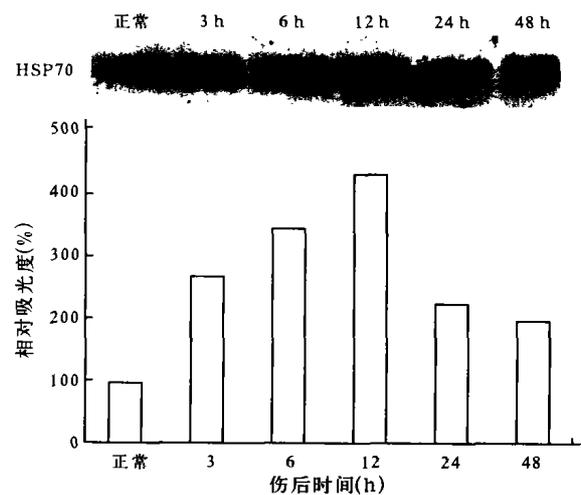


图 1 大鼠烫伤后肠黏膜组织 HSP70 蛋白表达变化
Figure 1 Expression of HSP70 protein in intestinal mucosa after severe burn

2.2 肠黏膜组织 HSP70 mRNA 的表达(图 3):正常大鼠肠黏膜组织 HSP70 mRNA 呈少量表达,烧伤后 3 h 表达显著增加($t = 10.607, P = 0.000$),伤后 6 h 达高峰,伤后 48 h 其表达仍高于正常对照组($t = 11.428, P = 0.000$)。

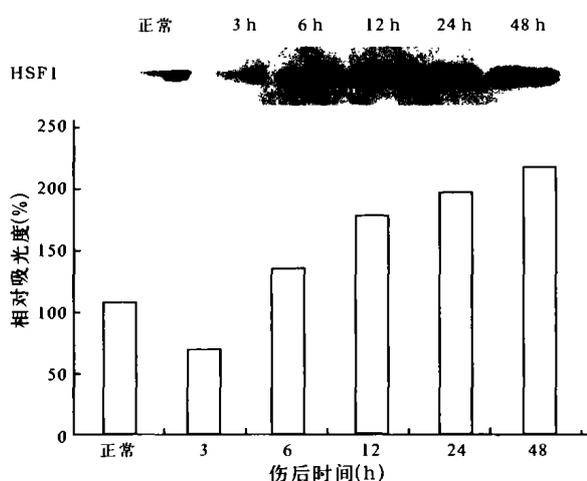


图2 大鼠严重烧伤后肠黏膜组织 HSF1 蛋白表达变化

Figure 2 Expression of HSF1 protein in intestinal mucosa after severe burn

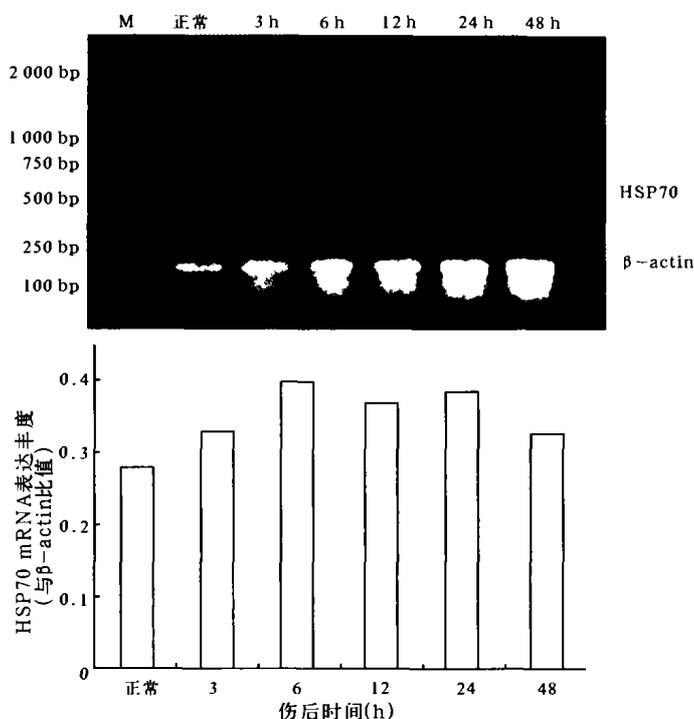


图3 大鼠严重烧伤后肠黏膜组织 HSP70 mRNA 表达变化

Figure 3 Expression of HSP70 mRNA in intestinal mucosa after severe burn

2.3 肠黏膜组织中 HSP70 的表达分布(彩色插图 4, 图 5): 正常大鼠肠黏膜未见明显的 HSP70 阳性细胞; 烧伤后 3 h 大鼠肠黏膜组织即可见 HSP70 表达, 阳性细胞表现为棕褐色阳性颗粒弥散性分布于细胞胞浆和部分胞核中, 主要分布在肠黏膜绒毛远端肠上皮细胞及固有层内细胞。伤后 12 h 最为明显, 伤后 48 h 依然呈强阳性表达。

3 讨论

严重烧伤不仅造成局部皮肤的热力损伤, 由于伤后大量体液外渗, 导致机体有效血容量不足, 进而

引起各脏器组织的缺血、缺氧。此外, 烧伤造成的皮肤屏障损害, 肠道低血流量引起的肠黏膜屏障功能破坏还可导致感染、全身失控性炎症反应等。本研究中采用诱导型 HSP70 单克隆抗体检测了大鼠烫伤早期肠黏膜组织 HSP70 表达的变化情况。结果发现, 在正常大鼠肠黏膜组织中仅检测到 HSP70 微量表达; 而烫伤后 3 h 即可观察到诱导型 HSP70 的表达显著增加, 为正常的 2.6 倍, 伤后 12 h 其表达达高峰, 并持续到伤后 48 h 仍高于正常对照; HSP70 mRNA 的水平同样在伤后呈显著增加的趋势。我们认为, 伤后肠黏膜 HSP70 表达增加并非烫伤局部热力所诱导的热应激反应所引起, 其原因为: ①尽管大面积烫伤后由于局部高温可引起邻近组织的热应激反应, 从而诱导组织细胞内产生 HSP70, 但是小肠组织远离烫伤部位, 受温度影响小。根据 Blake 等^[3]的研究报道, 本实验中的烫伤大鼠模型尚不足以引起全身器官温度的升高。②大鼠烫伤后 HSP70 表达增加不但出现早, 而且持续时间长, 伤后 48 h 仍高于正常, 表明除烫伤本身对机体是一严重应激外, 还存在其他应激因素对机体组织细胞的持续刺激。烧伤早期引起机体的一系列应激反应, 如体液-内分泌改变、组织缺血缺氧、组织过氧化损伤、炎症反应等均可能参与了对机体内 HSP70 表达的诱导。因为以上一些因素在大鼠烫伤后一直持续存在, 从而导致了肠黏膜组织 HSP70 持续高表达, 以调动机体自身的抗损伤机制。

本室以往的研究表明, 严重烧伤早期肠黏膜损害最明显为伤后 12 h 左右^[4], 与本实验中所观察到的肠黏膜组织 HSP70 表达高峰时间基本一致。目前认为 HSP70 水平可在一定程度上反映机体的应激水平或受损程度, 作为细胞应激反应的生物标志^[5]。免疫组化结果显示, 正常大鼠肠黏膜组织未检测到 HSP70 表达; 烫伤后大鼠肠黏膜组织 HSP70 呈阳性表达, 主要分布在黏膜绒毛远端的肠上皮细胞及固有层内细胞, 胞浆和部分胞核内均有表达。而严重烧伤后由于有效血容量减少, 为保证心、脑等重要脏器的血供, 机体内血流会出现再分布, 肠道血流量代偿性减少, 导致肠黏膜绒毛缺血, 由于特殊的血管解剖学及对流氧交换机制, 肠绒毛远端是对局部缺氧最敏感也是受缺血、缺氧影响最为严重的部位, 本研究结果也证实 HSP70 与细胞应激程度的相关性。

HSP 的诱导调节机制十分保守^[6]。已有研究发现, 在 HSP 基因 DNA 5'-转录起始点上游的 44~46 位核苷酸序列有-CTnGAAnnTTCnAG-的共同

序列,这一共同序列称为热休克元件(HSE)。启动 HSPs 基因需要有特异性的 HSF 与 HSE 结合^[7]。HSF 家族至少有 HSF1、HSF2、HSF3 及 HSF4 共 4 个成员,其中 HSF1 为诱导型,仅在应激反应时大量表达,启动热休克基因的转录,故在损伤后的应激反应中作用大于其他 HSF^[8]。本实验结果发现,作为 HSP70 上游调控因子的 HSF1 在正常情况下有少量表达;而严重烫伤大鼠伤后肠黏膜组织 HSF1 表达在伤后 3 h 低于正常,而后出现逐渐增加的趋势,直至伤后 48 h。提示伤后的一系列应激因素引起了 HSF1 的表达增加,进而启动 HSP70 基因转录,使得 HSP70 的合成在伤后显著增加。尽管本实验中我们没有检测 HSF1 的 DNA 结合活性,但是结合 HSP70 的表达增加,不难推测烫伤后肠黏膜组织 HSF1 表达增加涉及了 HSP70 的调控。

综合以上分析,本实验结果提示:烧伤后早期的一系列病理生理学改变引起肠黏膜组织细胞的应激反应,HSP70 表达显著增加,可能与细胞的自我保护机制启动有关。同时,作为 HSP70 上游调控因子的 HSF1 表达在伤后 3 h 短暂降低后出现逐渐增加的趋势,可能与伤后早期组织细胞 HSF1 参与调节 HSP70 转录合成等生物学功能有着密切关系。而

HSP70 作为非特异性的细胞内源性保护蛋白,在烧伤早期脏器损害中的作用尚不清楚。HSP70 这一内源性抗损伤机制是否参与了对烧伤早期肠黏膜组织细胞损害的保护作用,还有待进一步明确。

参考文献:

- 1 Maio A D. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams[J]. Shock, 1999, 11: 1-12.
- 2 袁志强,李晓鲁,彭毅志. 热休克预处理对肠上皮细胞缺氧-再给氧损伤的保护作用及其机制[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 265-268.
- 3 Blake M J, Gershon D, Fargnoli J, et al. Discordant expression of heat shock protein mRNAs in tissues of heat-stressed rats[J]. J Biol Chem, 1990, 265: 15275-15279.
- 4 彭曦,汪仕良,冯晋斌,等. 早期肠道喂养改善烧伤后肠道血液灌流的实验研究[J]. 中华外科杂志, 1999, 37: 507-509.
- 5 Welch W J. Heat shock proteins as biomarkers for stroke and trauma[J]. Am J Med, 2001, 111: 669-670.
- 6 Santoro M G. Heat shock factors and the control of the stress response[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59: 55-63.
- 7 Kiang J G, Tsokos G C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology[J]. Pharmacol Ther, 1998, 80: 183-201.
- 8 Christians E S, Yan L J, Benjamin I J, et al. Heat shock factor 1 and heat shock proteins: critical partners in protection against acute cell injury[J]. Crit Care Med, 2002, 30 Suppl 1: S43-50.

(收稿日期: 2004-11-26 修回日期: 2005-04-25)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

大剂量联合应用免疫球蛋白和抗生素提高严重脓毒症患者术后存活率

最近西班牙和阿根廷学者选取 7 所教学医院中的外科重症监护治疗病房(SICU)患者进行了一项前瞻、随机、双盲的对照研究,评价大剂量静脉注射浓缩 IgM 抗体(IVIG)对腹部脓毒症辅助治疗的效果。纳入对象包括发病后 24 h 内进入 SICU 的严重脓毒症和由腹腔器官感染所致的脓毒性休克患者。按随机原则分组,实验组给予抗生素+7 ml·kg⁻¹·d⁻¹ IVIG 进行治疗,对照组给予抗生素+相同剂量的人血白蛋白。在入选的 56 例患者中,总体病死率为 37.5%,其中 20 例休克患者的病死率为 55.0%,36 例严重脓毒症患者的病死率为 25.0%。实验组的病死率为 27.5%,对照组为 48.1%($P=0.06$)。实验组与对照组比较,器官功能衰竭评分为(1.0±0.6)分比(1.2±0.9)分,器官功能障碍评分为(1.7±1.1)分比(1.8±1.0)分,二次手术率为 17.2%比 29.6%,差异均无显著性。其中 8 例患者(占 14.3%)在早期未使用足量的抗生素治疗,7 例(占 87.5%)死亡。回归分析显示,早期应用抗生素是惟一与死亡相关的独立变量。因而研究者得出结论:在应用大剂量免疫球蛋白时,联合使用足量抗生素可提高腹部脓毒症患者的存活率,早期使用足量抗生素对预后将产生至关重要的影响。

蒲践一,编译自《Shock》,2005,4:298-304;胡森,审校

流式细胞术检测外周血白细胞产生的巨噬细胞趋化抑制因子

越来越多的证据表明,氧化还原酶趋化抑制因子(MIF)是调节内毒素以及核转录因子产生的重要因子,因此在严重脓症患者免疫治疗中有可能成为一种新的靶因子。而迄今为止,MIF 主要采用酶联免疫吸附法检测,对不同白细胞亚群 MIF 的表达则无法进行分析。最近,德国学者报道了高灵敏的流式细胞术用于 MIF 细胞内水平检测的方法。这种方法既能应用于经体外培养全血白细胞内 MIF 的测定,也能用于未经培养的人全血白细胞亚群分析,对 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、巨噬细胞和粒细胞分别进行检测。应用佛波脂/离子霉素对体外培养的全血进行刺激时发现,MIF 在 CD3⁺淋巴细胞内的表达增加 1 倍,在 CD14⁺巨噬细胞中的表达增加 3 倍。通过检测 22 名健康供血者血白细胞亚群中 MIF 的水平,发现其在 T 淋巴细胞内的表达比在 B 淋巴细胞和巨噬细胞中高 2 倍。

刘庆阳,编译自《Free Radic Biol Med》,2005,38:1170-1179;胡森,审校

严重烧伤早期肠黏膜组织热休克蛋白70的表达规律

(正文见264页)



图4 正常大鼠肠黏膜组织未见HSP70的表达 (免疫组化 ×200)
Figure 4 Expression and contribution of HSP 70 in intestinal mucosa in control(immunohistochemistry, ×200)



图5 大鼠烫伤后12 h肠黏膜组织HSP70的表达与分布 (免疫组化, ×200)
Figure 5 Expression and contribution of HSP 70 in intestinal mucosa at 12 hours postburn(immunohistochemistry, ×200)

血肿内注射肝素对猪脑叶出血后血肿周围水肿的影响

(正文见276页)

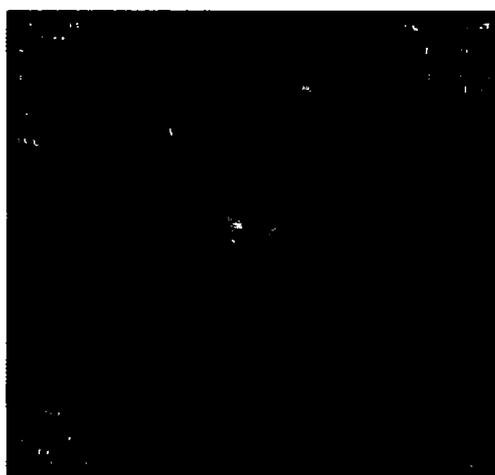


图1 肝素组血肿内注射肝素60 min后T2*WI显示病灶
Figure 1 Lesion shown on T2*WI at 60 minutes after injecting 500 U heparin into the center of hematoma in heparin group



图2 肝素组血肿内注射肝素24 h后 T2*WI显示病灶
Figure 2 Lesion shown on T2*WI at 24 hours after ICH in heparin group



图3 肝素组24 h FLAIR序列显示灶周水肿
Figure 3 Perilesion edema shown on FLAIR at 24 hours after ICH in heparin group



图4 肝素组24 h ADC Map 灶周向部ADC值升高 (红色) 与降低 (绿色) 并存
Figure 4 ADC map on 24 hours after ICH showing increased (red) and decreased (green) around hematoma in heparin group

hll