

急性创伤患者早期中性粒细胞热休克蛋白 72 的表达意义

胡丹 曲彦 陈富强 罗兵

【摘要】目的 探讨急性创伤患者应激早期各时间段中性粒细胞中热休克蛋白 72(HSP72)含量及其编码基因表达与患者预后的相关性。**方法** 随机选取收入重症监护治疗病房的急性生理学与慢性健康状况 II(APACHE II)评分 ≥ 18 分的患者 30 例,分离创伤后 0~1 d、2~6 d 和 7~14 d 的中性粒细胞。应用免疫组化技术检测 HSP 72 的蛋白表达,半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 HSP72 mRNA 表达水平,同时记录患者 2 个月的存活率。**结果** HSP72 在急性应激后表达明显增强,表达高峰在 2~6 d,存活组 HSP72 的水平较死亡组明显升高。**结论** HSP72 的蛋白和基因水平表达高峰在急性创伤后 2~6 d,其含量及表达与急性创伤患者 2 个月存活率存在相关性。

【关键词】 急性创伤; 中性粒细胞; 热休克蛋白 72; 存活率

Expression of heat shock protein 72 in leukocytes from patients with acute trauma and its relationship with survival HU Dan*, QU Yan, CHEN Fu-qiang, LUO Bing. *ICU The Municipal Hospital of Qingdao, Qingdao 266011, Shandong, China

Corresponding author: QU Yan

【Abstract】Objective To determine the expression of heat shock protein 72(HSP 72) in leukocytes of patients with acute trauma, and evaluate its relationship with survival. **Methods** Thirty acute trauma patients with acute physiology and chronic health evaluation II (APACHE II) ≥ 18 were included as study subjects. Blood samples were serially obtained at three time points: days 0 - 1, days 2 - 6 and days 7 - 14 after the trauma. Expression of HSP72 was assessed with immunohistochemistry, and the expression of HSP72 mRNA was assessed with semi-quantified reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR), and the relationship between their levels and the survival rate (survival period > 2 months) was analyzed. **Results** The expression of HSP72 was significantly enhanced on posttrauma days 2 - 6. The levels of HSP72 in the survivor groups were higher than that in non-survivors. **Conclusion** The study suggests that acute trauma can lead to a marked elevation of HSP72, and its peak level appears on days 2 - 6, which might be correlated with 2-month survival of the afflicted patients.

【Key words】 acute trauma; leukocyte; heat shock protein 72; survival rate

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是生物体在不利环境下产生的一种非特异性蛋白质产物,其结构具有高度的保守性。各种应激因素诱导 HSP 合成后,机体耐热、耐低温、抗感染以及抗毒素等相应适应能力增强。HSP 作为机体的自我保护机制参与应激反应,在保护细胞免受各种应激损害的机体自我保护机制中,扮演了一个重要角色。本研究中收集 30 例重症监护治疗病房(ICU)患者的外周血标本,检测急性创伤早期各时间段中性粒细胞 HSP72 及其编码基因的表达,旨在探讨 HSP72 水平与急性创伤患者存活率的关系。

1 资料与方法

1.1 病例选择:随机选取 2003 年 11 月—2004 年

基金项目:山东省青岛市科技局科技计划项目(03-2-NY-15-3)

作者单位:266011 青岛市市立医院 ICU(胡丹,曲彦),麻醉科(陈富强),青岛大学医学院分子生物学教研室(罗兵)

作者简介:胡丹(1971-),女(满族),辽宁省沈阳市人,医学硕士,主治医师。

5 月收住本院外科 ICU 的脑外伤、腹部闭合伤或开放伤、胸腹联合伤、多发性骨折以及大手术后患者 30 例;入住 ICU 后急性生理学与慢性健康状况 II(APACHE II)评分均 ≥ 18 分;男 20 例,女 10 例;年龄 18~84 岁,平均 55.9 岁。根据 APACHE II 评分又分为低评分组(< 50 分)和高评分组(≥ 50 分);同时根据预后分为存活组和死亡组。

1.2 实验方法

1.2.1 血标本处理:采急性创伤后 0~1 d、2~6 d 和 7~14 d(分别定义为第 1、2 和 3 期)患者外周静脉血,用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,室温下放置 30 min。取沉淀后上部血浆,用 Percoll 试剂分离中性粒细胞,制备细胞涂片,用免疫组化方法检测,余下用 TRIzol 试剂提取中性粒细胞的总 RNA,均于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存待用。

1.2.2 半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 HSP72 编码基因的表达:用 TRIzol 试剂提取中性粒细胞总 RNA,取 $1\text{ }\mu\text{g}$ RNA 参照逆转录试剂

盒(Promega 公司)要求的标准条件合成 cDNA 作为 PCR 反应的模板。根据 HSP72 全基因序列设计特异性引物。引物序列如下:P1:5'-CAACGGGC-GCGACCTGAACA-3'; P2:5'-CCTCTCGCC-TCGTACACCTGGAT-3'。用磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参,与特异性引物在同一体系中进行扩增。PCR 产物用质量分数为 2%的琼脂凝胶电泳,用凝胶成像系统测定扩增条带的吸光度值,用目的基因与内参照基因吸光度的比值表示目的基因的相对表达水平。

1.2.3 免疫组化检测:采用 Neo Markers 公司鼠抗人 HSP72 单克隆抗体和北京中山生物技术有限公司的免疫组化试剂盒检测中性粒细胞 HSP72 表达情况。根据阳性细胞数量和强度将检测标本分为不表达、低表达和高表达,由 3 个有经验的读片专家分别读片,取其平均值。

1.3 预后:观察 2 个月患者的存活和死亡情况。

1.4 统计学处理:结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,实验资料应用 SPSS 11.5 统计软件包进行处理,计量资料用 *t* 检验和方差分析,计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况(表 1):30 例患者平均 APACHE II 评分 66.6 分;低评分组 11 例,平均 38.9 分,60 岁以上者 7 例;高评分组 19 例,平均 79.5 分,60 岁以上者 11 例。年龄 ≥ 60 岁者 18 例, < 60 岁者 12 例。60 岁以上者死亡 8 例,占总例数的 26.7%;60 岁以下者死亡 4 例,占 13.3%。

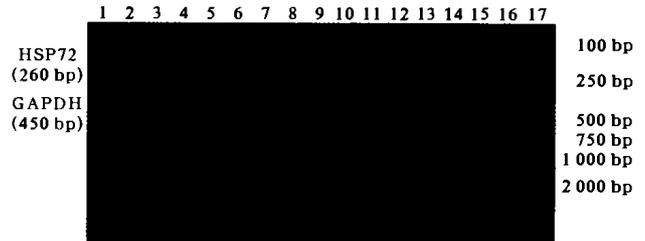
表 1 30 例患者的一般资料

Table 1 Clinical data of 30 patients

组别	例数(例)	年龄(岁)	男/女(例)	APACHE II 评分(分)
全部患者	30	55.9	20/10	66.6
低评分组	11	64.5	8/3	38.9
高评分组	19	54.3	11/8	79.5
存活组	18	51.9	13/5	49.2
死亡组	12	59.1	7/5	101.5

2.2 HSP72 表达水平及相关因素分析(图 1,表 2):急性创伤患者在整个观察期间 HSP72 表达水平有不同程度增强,第 2 期 HSP72 mRNA 与第 1 期、第 3 期比较差异均有显著性($P_1 = 0.0002$ 和 $P_2 = 0.0021$),第 1 期与第 3 期比较差异无显著性($P = 0.4600$),说明其表达高峰在 2~6 d。与死亡组比较,存活组 HSP 72 mRNA 表达水平较高,第 2 期和第 3 期差异有显著性($P_1 = 0.0090$, $P_2 = 0.0480$),第 1 期差异无显著性($P = 0.1078$)。高评分组与低评分组 3 期间比较差异无显著性(P 均 > 0.05)。

2.3 免疫组化结果分析(表 3):大部分患者在 2~6 d 的细胞涂片中可观察到较多的阳性细胞且着色相对较深,0~1 d 和 7~14 d 大部分为弱阳性或是阴性,个别病例在 7~14 d 也出现了强阳性表达,3 组间比较差异有显著性($P = 0.0400$)。进一步验证了急性创伤早期中性粒细胞中 HSP72 蛋白在不同时期表达强弱不同,创伤后 2~6 d 是其表达高峰。



注:1~16:患者;17:DNA Marker

图 1 半定量 PCR 检测中性粒细胞中 HSP72 DNA 的扩增
Figure 1 Semi-quantitative PCR analysis of HSP72 cDNA amplification in leukocyte

表 2 HSP72 编码基因表达的动态变化及相关因素($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Levels trend of HSP72 and related factors($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	第 1 期(0~1 d)	第 2 期(2~6 d)	第 3 期(7~14 d)
存活组	18	1.10±0.41	1.69±0.56*	1.22±0.44*
死亡组	12	0.87±0.30	1.16±0.41	0.90±0.36
高评分组	19	0.98±0.35	1.46±0.61	1.06±0.48
低评分组	11	1.04±0.45	1.50±0.50	1.15±0.37
总体	30	1.00±0.38	1.48±0.56 Δ \times	1.10±0.44 \times

注:与同期死亡组比较:* $P = 0.0090$;# $P = 0.0480$;总体间比较:与第 1 期比较: $\Delta P = 0.0002$, $\times P = 0.4600$;与第 3 期比较: $\circ P = 0.0021$

表 3 30 例患者中性粒细胞中 HSP72 蛋白表达的比较
Table 3 Comparison of HSP72 protein expression in leukocytes within periods after acute trauma 例

分期	HSP72 阴性	HSP72 阳性	HSP72 强阳性
第 1 期(0~1 d)	19	8	3
第 2 期(2~6 d)	8	14	8
第 3 期(7~14 d)	17	9	4

2.4 预后与 APACHE II 评分(表 4):存活与死亡两组中,低评分与高评分比较,差异有显著性($F = 6.9139$, $P < 0.01$)。

表 4 存活与死亡两组 APACHE II 评分的关系

Table 4 Relationship of APACHE II score between survivor and non-survivor 例

组别	APACHE II 评分		总计
	低评分	高评分	
存活组	10	8	18
死亡组	1	11	12
总计	11	19	30

3 讨论

本研究结果显示, HSP72 蛋白和基因水平的表达高峰在急性创伤后 2~6 d, 其表达强弱与创伤后 2 个月生存率具有明显的相关性, 即表达相对增强, 创伤后存活率越高。提示 HSP72 蛋白和基因的检测可作为判断急性创伤患者预后的客观指标。

哺乳类动物 HSP70 按表达情况可分为结构型 HSP70(HSP73)和诱导型 HSP70(HSP72)。正常细胞可表达 HSP73, 应激情况下略增加; HSP72 仅出现于应激状态下的炎性细胞或损伤的组织细胞^[1]。动物实验表明, 预先增高的 HSP 表达能够减轻小鼠由中性粒细胞介导的肺再灌注损伤, HSP 被认为可以与易化蛋白结合, 稳定新形成的蛋白并且修复破坏的蛋白^[1]。缺血预适应兔的心肌可诱导心肌细胞 HSP72 的合成增加, 且一氧化氮合酶(NOS)可能参与了 HSP72 的表达^[2]。Ribeiro 等^[3]报道了在创伤前提高 HSP 表达可以降低脓毒症实验鼠的死亡率。Wang 等^[4]研究认为, HSP72 的预表达增强可阻断成人内皮细胞由激活的中性粒细胞所介导的坏死。因而认为 HSPs 表达增强可保护细胞免于创伤损害。Hashiguchi 等^[5]研究证实, 在严重创伤急性期, 中性粒细胞 HSPs 表达增高, 可有效调节中性粒细胞的功能, 有利于机体恢复。机体遭受损害后, 在不同组织中都可产生应激反应, 血液循环中的细胞是惟一可以从机体稳定获得的细胞。严重创伤后, 中性粒细胞在宿主防御及系统炎性反应机制中占有重要地位, 因此本研究选择检测中性粒细胞中的 HSP72 表达情况来反映机体系统的应激反应状态。

以往的大量动物实验表明, 急性创伤后动物(以鼠为主)的 HSP72 表达增强, 并能保护创伤后的血管和肝脏功能, 并且 HSP72 表达高峰在创伤后 3~72 min^[6-8]。在急性创伤患者的 HSP72 表达如何, 与预后是否存在相关性, 国内外报道较少。本研究结果显示: 急性创伤后患者的 HSP72 表达增强, 并且在创伤后 2~6 d 有明显的表达高峰, 与 0~1 d 和 7~14 d 比较差异均有显著性; 创伤后 7~14 d 与 0~1 d 比较差异也有显著性, 推测个别病例表达高峰延迟(本研究中有 4 例)可能与新出现应激因素有关。McMurtry 等^[9]发现正常鼠在皮肤创伤 24 min 炎性细胞中 HSP72 的表达达高峰, 而糖尿病鼠延迟到第 3 d, 因此认为, 糖尿病鼠 HSP70 的表达延迟与其对炎症反应的能力受损有关, 并且这种延迟可能对糖尿病鼠受伤创口的愈合有利。本研究中延迟表达的 4 例患者中有 2 例同时患有糖尿病。生存组与

死亡组在 2~6 d 和 7~14 d 的表达水平都有差异, 其中 2~6 d 较 7~14 d 更为明显, 而 0~1 d 两组间则无差异。因此判断预后选取急性创伤后 2~6 d 检测 HSP72 水平较好。重症患者 APACHE II 评分高低可作为病情轻重的一个指标, 存活与死亡两组低、高分患者间比较差异明显, 提示高分组较低评分组死亡风险明显增加。

综上所述, 已有证据表明, 胃肠外给予谷氨酰胺可以缩短危重患者住院时间和降低病死率。Scharte 等^[10]研究被注射内毒素羊的心肌细胞, 认为胃肠外给予谷氨酰胺可以使其 HSP72 表达增强。因此我们设想, 对于检测结果相对较低者可以给予一些干预性治疗, 至于具体作用机制及方案, 需进一步探讨。本研究结果表明, 创伤后 2~6 d 是急性创伤患者 HSP72 和编码基因表达的高峰期, HSP72 的表达水平相对越高, 提示患者存活的可能性越大。HSP72 检测可以作为判断预后的预警指标。

参考文献:

- Broughan T A, Kvetnansky R K, Li D. Adrenergic regulation of adrenal and orctic heat shock protein[J]. *J Surg Res*, 1996, 63: 98 - 104.
- 郑斌, 党瑜华, 陈魁. 一氧化氮合酶在缺血预适应诱导第二心肌保护窗口中的作用[J]. *中国危重病急救医学*, 2001, 13: 598 - 600.
- Ribeiro S P, Villar J, Downey G P, et al. Sodium arsenite induces heat shock protein - 72 kilodalton expression in the lungs and protects rat against sepsis[J]. *Circ Care Med*, 1994, 22: 922 - 929.
- Wang J H, Redmond H P, Watson R W G, et al. Induction of heat shock protein 72 prevents neutrophil - mediated human endothelial cell necrosis[J]. *Arch Surg*, 1995, 130: 1260 - 1266.
- Hashiguchi N, Ogura H, Tanaka H, et al. Enhanced expression of heat shock proteins in leukocytes from trauma patients[J]. *J Trauma*, 2001, 50: 102 - 171.
- Mizushima Y, Wang P, Jarrar D. Preinduction of heat shock proteins protects cardiac and hepatic functions following trauma and hemorrhage[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000, 278: R352 - 359.
- Yamashita N, Hoshida S, Nishida M. Time course of tolerance to ischemia - reperfusion injury and induction of heat shock protein 72 by heat stress in the rat heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29: 1815 - 1821.
- Yamashita N, Hoshida S, Nishida M, et al. Heat shock - induced manganese superoxide dismutase enhances the tolerance of cardiac myocytes to hypoxia - reoxygenation injury[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29: 1805 - 1813.
- McMurtry A L, Cho K, Young L J, et al. Expression of HSP70 in healing wounds of diabetic and nondiabetic mice[J]. *J Surg Res*, 1999, 86: 36 - 41.
- Scharte M, Baba H A, Van Aken H, et al. Alanine - glutamine dipeptide not affect hemodynamics despite a greater increase in myocardial heat shock protein 72 immunoreactivity in endotoxemic sheep[J]. *J Nutri*, 2001, 131: 1433 - 1437.