

## • 论著 •

热休克蛋白 70 对感染性脑水肿核转录因子- $\kappa$ B 及其抑制蛋白的影响

毛定安 杨于嘉 俞燕

**【摘要】 目的** 探讨热休克蛋白 70 (HSP70) 对感染性脑水肿大鼠核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 活化及 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白- $\alpha$  (I- $\kappa$ B $\alpha$ ) 的影响及意义。**方法** 制备百日咳菌液大鼠感染性脑水肿模型。72 只 SD 大鼠随机分为对照组 (NS 组)、感染性脑水肿组 (BE 组) 及热休克处理组 (HSP 组), 各组分别于注射百日咳菌液或生理盐水 4、8 和 24 h 处死, 取脑组织, 采用 Western 印迹杂交分析法检测脑组织 HSP70 及 I- $\kappa$ B $\alpha$  表达, 凝胶电泳迁移率检测法 (EMSA) 检测神经细胞核提取物 NF- $\kappa$ B 活性。**结果** 在热休克处理后, HSP 组各时间点 HSP70 表达明显增加, 与 NS 组和 BE 组比较差异均有显著性 ( $P$  均  $< 0.01$ )。在 BE 组各时间点中, NF- $\kappa$ B 均显示明显的滞留条带, 提示 NF- $\kappa$ B 活性明显增强, 而 I- $\kappa$ B $\alpha$  表达则明显减低。HSP 组各时间点中, NF- $\kappa$ B 滞留条带与 BE 组比较明显减低, 而 I- $\kappa$ B $\alpha$  表达则明显增强。**结论** HSP70 表达增加可抑制 NF- $\kappa$ B 活化及 I- $\kappa$ B $\alpha$  蛋白降解, 提示 HSP70 对感染性脑水肿具有保护作用, 其机制可能与抑制 NF- $\kappa$ B 活化及 I- $\kappa$ B $\alpha$  蛋白降解有关。

**【关键词】** 脑水肿, 感染性; 热休克蛋白; 核转录因子- $\kappa$ B; 核转录因子- $\kappa$ B 抑制蛋白- $\alpha$

**Effect of heat shock protein 70 on nuclear factor - $\kappa$ B/inhibitor protein - $\alpha$  of nuclear factor - $\kappa$ B in brain edema induced by infection in rat** MAO Ding-an\*, YANG Yu-jia, YU Yan.\* Department of Pediatrics, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan, China

**【Abstract】 Objective** To study the effect of heat shock protein 70 (HSP70) on activation of nuclear factor - $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and degradation of inhibitor  $\kappa$ B- $\alpha$  protein (I- $\kappa$ B $\alpha$ ) in brain edema induced by Pertussis bacilli infection in rats. **Methods** Brain edema was induced by injection of Pertussis bacilli suspension via the left internal carotid artery. Seventy-two Sprague-Dawley rats were divided randomly into brain edema group, pretreatment with heat shock group, and normal saline control group. The rats were sacrificed 4, 8 and 24 hours after injection of Pertussis bacilli and normal saline, respectively. HSP70 expression and the degradation of I- $\kappa$ B $\alpha$  were assayed in all animals with Western blot analysis. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed to assess NF- $\kappa$ B activation of nuclear extract of neurones. **Results** The results showed that HSP70 expression was significantly increased in heat shock group compared with control group and brain edema group. The activity of NF- $\kappa$ B started to increase at 2 hours in brain edema group and peaked at 24 hours. The expression of I- $\kappa$ B $\alpha$  began to decrease at 2 hours and reached the lowest level at 24 hours. In heat shock group the activity of NF- $\kappa$ B complexes was lower than that in brain edema group, and the expression of I- $\kappa$ B $\alpha$  higher than that in brain edema group at corresponding time points. **Conclusion** HSP70 shows a protective effect on development of brain edema as its expression increases. The mechanism might be associated with its inhibitory effect on degradation of I- $\kappa$ B $\alpha$  and activation of NF- $\kappa$ B.

**【Key words】** infective brain edema; heat shock protein; nuclear factor - $\kappa$ B; inhibitor  $\kappa$ B - $\alpha$  protein

感染性脑水肿是由于各种脑部或全身疾病所引起, 具有细胞毒性和血管源性脑水肿的特点。我们以往的研究发现, 热休克反应能诱导热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 合成以产生对感染性脑水肿的保护作用, 但是其作用机制仍不十分清楚<sup>[1]</sup>。近年来文献报道认为, HSP70 可通过对核转录因子- $\kappa$ B/核转录因子- $\kappa$ B 抑制蛋白- $\alpha$  (nuclear

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870251)

作者单位: 410011 长沙, 中南大学湘雅二医院儿科 (毛定安); 中南大学湘雅医院 (杨于嘉, 俞燕)

作者简介: 毛定安 (1956-), 男 (汉族), 湖南省永州市人, 医学博士, 教授, 主任医师。

factor - $\kappa$ B/inhibitor  $\kappa$ B - $\alpha$  protein, NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B $\alpha$ ) 的作用来保护脑组织<sup>[2,3]</sup>。本研究拟采用 Western 印迹分析法检测脑组织 HSP70 及 I- $\kappa$ B $\alpha$  表达, 凝胶电泳迁移率法 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 检测神经细胞核提取物 NF- $\kappa$ B 活性, 观察 HSP70 对脑水肿大鼠 NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B $\alpha$  的影响及其意义。

## 1 材料与方法

**1.1 感染性脑水肿模型制备及实验动物分组:** 建立百日咳菌液所致大鼠感染性脑水肿模型<sup>[1]</sup>。大鼠用质量分数为 25% 的乌拉坦 4 ml/kg 腹腔注射麻醉

后,取颈正中切口,分离左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉分支,结扎翼腭动脉和枕动脉,夹闭左颈外动脉后,从左颈总动脉穿刺向左颈内动脉注入百日咳菌液 0.2 ml/kg,制备感染性脑水肿模型。对照组(NS组)用同法注射等量生理盐水。

72 只健康 SD 大鼠,体重(210±30)g,雌雄各半,随机分为 3 组,每组 24 只。①NS 组:给予生理盐水;②感染性脑水肿组(BE 组):不行预处理,置室温中,24 h 后制备模型;③热休克处理组(HSP 组):大鼠用质量分数为 2%的戊巴比妥钠麻醉后,置 45℃水浴箱中,使其肛温升至 42℃时,移至 42℃水浴箱中维持 15 min,然后置室温恢复 24 h,即制成感染性脑水肿模型。其中各组按时间又分为 4、8 和 24 h 3 个亚组。上述各组动物分别观察至相应时间后断头处死。

**1.2 Western 印迹分析法检测脑组织 HSP70 的表达:**动物断头处死,立即取左侧大脑组织约 150 mg,按文献<sup>[4]</sup>方法稍作修改,制备蛋白质样本。根据蛋白定量结果各组取等量蛋白质 100 μg,经质量分数为 8%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),直至溴酚蓝达凝胶底部。取出凝胶,置 4℃冰箱的电转移槽中进行电转移,将蛋白质转至硝酸纤维素膜上。取出硝酸纤维素膜,用封闭液[磷酸盐缓冲液(PBS)中含质量分数为 0.05%的吐温-20 和 1%的牛血清白蛋白]后,按 1:1 000 加入抗 HSP70 单克隆抗体(单抗),4℃下平缓摇动过夜,用含吐温-20 磷酸盐缓冲液溶液(PBS-T)洗膜;按 1:2 000 加入碱性磷酸酶(AKP)标记羊抗鼠 IgG 抗体,室温内 2 h, PBS 洗膜,加入 AKP 生色底物缓冲液,室温下平缓摇动,观察生色过程,至蛋白条带显色清晰时终止反应。拍摄照片,记录实验结果。重复 3 次,照片结果用 CS-930 扫描仪进行密度分析。

**1.3 Western 印迹分析法检测脑组织 I-κBα 表达:**具体方法同检测脑组织 HSP70 表达。

**1.4 核抽提物的制备:**操作按文献<sup>[5]</sup>方法略加改进。断头后迅速取左侧大脑组织 200 mg,用冷 PBS 洗净红细胞。1:10 SMTD-苯甲基磺酰氟(PMSF)[由 0.25 mol/L 蔗糖,1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.85),1 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT),0.1 mmol/L PMSF 组成]缓冲液机械匀浆,钢目过滤;再加入 SMTD-PMSF 液体 2 ml,混匀,机械匀浆;加入体积分数为 1%的 Triton-X100 再次匀浆,冰上孵育 15 min;4℃下 1 000×g 离心 10 min,共 2 次。取沉淀涂片,用体积分数为

10%的甲醛固定,苏木素-伊红(HE)染色,观察细胞核的收集;取沉淀,用 0.3 mol/L NaCl-MTD 液(1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0,1 mmol/L DTT,0.3 mol/L NaCl)裂解细胞核,置干冰上 60 min;4℃下 14 500×g 离心 15 min,取上清,-70℃保存。并取微量上清用福林-酚法进行蛋白定量。

**1.5 EMSA 检测脑组织 NF-κB 的活性:**采用美国 Promega 公司的凝胶迁移检测系统(Gel shift assay system)试剂盒。按照说明采用[γ-<sup>32</sup>P]ATP 标记 NF-κB 结合序列寡核苷酸片段作探针,NF-κB 结合反应总体积为 20 μl,含结合缓冲液[体积分数为 20%的甘油,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,2.5 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),2.5 mmol/L DTT,0.25 mol/L NaCl,50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5,0.25 mg/ml 鲑精 DNA]。20 μg 核提取物及放射性比活度为 160 000 cpm 的探针,室温孵育 30 min,用 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶,在 0.5 mol/L 四溴乙烷(TBE)溶液中进行电泳。加样前预电泳 30 min,加样后在 100 V 电压中电泳 2 h,直到溴酚蓝达凝胶底部,停止电泳。取出凝胶,-70℃中行放射性自显影,24~48 h 后洗片,记录实验结果,密度扫描仪定量分析,各样本重复 3 次。用 HeLa 核提取物设置阴性对照、阳性对照、特异性竞争抑制及非特异性竞争抑制对照 4 个反应对照体系。

## 2 结果

**2.1 Western 印迹分析法检测脑组织 HSP70 的表达(表 1):**经 CS-930 扫描仪定量检测分析,密度面积扫描显示,NS 组 4、8 和 24 h 及 BE 组 4、8 h 脑组织中均有少量的 HSP70,而 HSP 组 4、8 h 较 NS 组、BE 组脑组织中 HSP70 含量明显增多,24 h BE 组和 HSP 组较 NS 组 HSP70 含量均增多,以 HSP 组增多最明显。

表 1 HSP70 Western 印迹分析法密度面积扫描值( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 1 Level of HSP70 expression in Western blot analysis at different groups( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	4 h	8 h	24 h
NS 组	0.32±0.04	0.52±0.14	0.46±0.04
BE 组	0.41±0.05	0.55±0.13	1.21±0.17*
HSP 组	1.50±0.33***	1.95±0.23***	3.01±0.53***

注:与 NS 组相应时间点比较:\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与 BE 组相应时间点比较:\*\*\* $P < 0.01$

**2.2 NF-κB DNA-蛋白质结合物活性测定(表 2):** NF-κB DNA 探针与核抽提物结合反应后显示,

NS 组仅隐约可见一条 DNA-蛋白质结合物滞留条带;BE 组 4、8 和 24 h 均显示明显滞留条带,以 24 h 最为明显;而 HSP 组 4、8 和 24 h 虽可见滞留条带,但与 BE 组比较明显减低。

表 2 EMSA 检测 NF- $\kappa$ B 和 Western 印迹分析法检测脑组织 I- $\kappa$ B $\alpha$  密度扫描分析(n=3)

Table 2 Level of NF- $\kappa$ B activation with EMSA and I- $\kappa$ B $\alpha$  expression in Western blot analysis in different groups(n=3)

组别	NF- $\kappa$ B 相对密度值	I- $\kappa$ B $\alpha$ 相对密度值
NS 组	1.000	1.000 0
BE 组 4 h	2.806	0.247 0
8 h	2.768	0.124 0
24 h	4.170	0.058 6
HSP 组 4 h	1.959	0.466 2
8 h	1.119	0.602 6
24 h	1.744	0.720 8

2.3 Western 印迹分析法检测脑组织 I- $\kappa$ B $\alpha$  表达(表 2):BE 组中 I- $\kappa$ B $\alpha$  表达从 4 h 到 24 h 逐渐减少。HSP 组 I- $\kappa$ B $\alpha$  表达比相应 BE 组明显增多。

### 3 讨论

本研究中所采用的大鼠百日咳脑水肿模型类似于急性、弥漫性、感染性全脑水肿。在感染性脑水肿中,有肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )及一氧化氮(NO)等细胞因子大量生成,而这些细胞因子的活化大部分受 NF- $\kappa$ B 的调控<sup>[6]</sup>。NF- $\kappa$ B 是 1986 年由 Sen 等首次从小鼠 B 淋巴细胞核中检测到的一种能与免疫球蛋白  $\kappa$  轻链基因增强  $\kappa$ B 序列特异性结合的核蛋白因子<sup>[7]</sup>,在静息状态下与抑制性蛋白 I- $\kappa$ B 结合,并以非活性状态存在于胞浆内。在许多刺激因素如细菌、病毒产物和特定细胞因子作用下,由于 I- $\kappa$ B 的磷酸化和通过蛋白酶体途径的降解,使 NF- $\kappa$ B 活化,与 I- $\kappa$ B 解离后,NF- $\kappa$ B 移位入核,与 DNA 的特定序列结合,激活转录,导致多种细胞因子表达增加,在许多炎症疾病中发挥重要作用。本研究结果表明,24 h BE 组大鼠 NF- $\kappa$ B DNA 结合蛋白活性明显增高,而 I- $\kappa$ B 表达明显降低,并持续到 24 h。这一结果提示,在百日咳菌液的作用下,脑组织神经细胞中 I- $\kappa$ B 降解,NF- $\kappa$ B 被激活,由于 NF- $\kappa$ B 能够诱导编码许多促炎症细胞因子(如 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$ )和化学因子(如 NO)等的基因转录,从而引起细胞因子及 NO

等产物大量产生,对神经细胞产生损伤作用,导致脑水肿的形成和加重。说明 NF- $\kappa$ B 活化、I- $\kappa$ B 降解在感染性脑水肿中可能具有重要作用。

我们以前的研究证实,HSP 对感染性脑水肿有显著的保护作用,并发现这种保护作用与脑组织中 HSP70 基因转录增强和 HSP70 的合成增加有关<sup>[1]</sup>。本研究发现,4、8 和 24 h HSP 组 NF- $\kappa$ B 活性均明显降低,而 I- $\kappa$ B $\alpha$  表达明显增加,提示 HSP 70 表达增加时,可抑制 NF- $\kappa$ B 活化及 I- $\kappa$ B $\alpha$  蛋白降解,从而对感染性脑水肿具有保护作用。这一保护作用的机制可能是 HSP70 与 NF- $\kappa$ B 一样也出现核易位,在细胞核内通过竞争进入核孔转运的 NF- $\kappa$ B 复合体阻止其活化<sup>[8]</sup>;同时 HSP70 也能够直接作用于 I- $\kappa$ B $\alpha$  蛋白降解,抑制 NF- $\kappa$ B 的活性<sup>[9]</sup>,从而部分阻断细胞因子的产生,使炎症因子合成减少,减轻脑组织损害,对感染性脑水肿产生保护作用。

### 参考文献:

- 1 毛定安,虞佩兰,杨于嘉.热休克蛋白 70 对感染性脑水肿大鼠白介素和肿瘤坏死因子的影响及意义[J].中国危重病急救医学,2003,15:593-595.
- 2 Wong H R,Ryan M,Wispe J R. The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I- $\kappa$ B degradation and NF- $\kappa$ B nuclear translocation [J]. Biochem Biophys Res Commun,1997,231:257-263.
- 3 Heneka M T,Gavrilyuk V,Landveth G E,et al. Noradrenergic depletion increases inflammatory responses in brain: effects on I kappa B and HSP70 expression [J]. J Neurochem,2003,85:387-398.
- 4 萨姆布鲁克,弗里奇,曼尼阿蒂斯,著.金冬雁,黎孟枫,译.分子克隆实验指南[M].第 2 版.北京:科学出版社,1992.16-347.
- 5 Ichikawa K,DeGroot L J,Refetoff S,et al. Nuclear thyroid hormone receptors in cultured human fibroblasts: improved method of isolation, partial characterization, and interaction with chromatin [J]. Metabolism,1986,35:861-868.
- 6 Blackwell T S,Christman J W. The role of nuclear factor- $\kappa$ B in cytokine gene regulation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol,1997,17:3-9.
- 7 Baldwin A S. The NF- $\kappa$ B and I- $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights [J]. Annu Rev Immunol,1996,14:649-681.
- 8 Silver P A. How proteins enter the nucleus [J]. Cell,1991,64:489-497.
- 9 Freitas M S,Spohr T C,Benedito A B,et al. Neurite outgrowth is impaired on HSP70-positive astrocytes through a mechanism that requires NF- $\kappa$ B activation [J]. Brain Res,2002,958:359-370.

(收稿日期:2005-03-13 修回日期:2005-09-02)

(本文编辑:李银平)

热烈祝贺北京医学会危重病专业委员会成立