

糖皮质激素受体和热休克蛋白 70 在大鼠创伤失血性休克肝组织中的变化及其意义

罗东林 周继红 刘宝华 熊仁平 叶秀峰 徐祥 陈金萍

【摘要】目的 从组织细胞受体水平探讨糖皮质激素受体(GR)和热休克蛋白 70 (HSP70)在创伤失血性休克后肝脏中的变化及其作用。**方法** 采用双侧股骨骨折伴失血性休克致严重创伤模型,动态观察伤后 8 h 大鼠肝组织 GR、HSP70、血清肝功能生化指标、肝脏病理等变化。采用蛋白质免疫印迹法(Western blot)测定肝组织 GR、HSP70 含量,并进行计算机图像分析。**结果** 单纯股骨骨折伤后,肝组织 GR 含量于伤后 1 h 即开始下降,6 h 降至最低,8 h 仍显著低于正常对照组;创伤合并休克后,GR 下降更加明显。HSP70 在单纯股骨骨折伤后迅速增加,6 h 达到峰值,8 h 仍持续在较高水平;创伤合并休克后,HSP70 升高更加显著。单纯股骨骨折伤后,血清丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TB)和白蛋白与正常对照组比较,差异均无显著性。但创伤合并休克后 4 h 和 2 h 血清 ALT 和 TB 分别开始明显增高($P < 0.01$),白蛋白则均下降($P < 0.01$)。创伤合并休克后 6 h 肝脏镜下肝窦内即出现较多炎性细胞浸润。**结论** GR 不足在严重创伤失血性休克后肝脏继发性损害过程中起重要作用,HSP70 可能参与了肝组织细胞抗损伤机制的启动。

【关键词】 创伤; 休克,失血性; 受体,糖皮质激素; 热休克蛋白; 肝损伤

Changes in glucocorticoid receptor and heat shock protein 70 in liver tissue after trauma with hemorrhagic shock in rats LUO Dong - lin, ZHOU Ji - hong, LIU Bao - hua, XIONG Ren - ping, YE Xiu - feng, XU Xiang, CHEN Jin - ping. Research Institute of Surgery, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

【Abstract】Objective To investigate changes and functions of glucocorticoid (GR) and heat shock protein 70 (HSP70) at the level of cellular receptor in liver in hemorrhagic shock after trauma. **Methods** Adult Wistar rats were used and a rat model of shock was reproduced by hemorrhaging accompanied by bilateral femur fracture. Changes in hepatic tissue GR, HSP70, pathology of liver, hepatic function markers in serum were dynamically observed. The expression of GR and HSP70 in hepatic tissue was assayed by Western blot and then analyzed with computer imaging system. **Results** Protein content of GR gradually decreased in hepatic tissue after trauma, reduced to the nadir at 6 hours after trauma, and it was decreased even more when trauma was added to bleeding. Protein content of HSP70 was gradually increased in hepatic tissue after severe trauma, peaking at 6 hours after trauma, and it maintained at a rather high level at 8 hours after trauma. It was even more increased in when hemorrhagic shock was followed by trauma. Alterations in hepatic function markers and pathology were not obvious after simple trauma. But after trauma was added to hemorrhagic shock, significant increase in alaine aminotransferase (ALT) and total bilirubin (TB) in serum was noted at 4 and 2 hours after trauma respectively (all $P < 0.01$), and albumin content was obviously decreased ($P < 0.01$). There were more inflammatory cell infiltration in hepatic sinusoids at 6 hours after trauma. **Conclusion** GR may play an important role in anti - injury mechanism of hepatic tissue cell after trauma with hemorrhagic shock. HSP70 may participate in initiating anti - injury mechanism of hepatic cells.

【Key words】 trauma; hemorrhagic shock; glucocorticoid receptor; heat shock protein; liver injury

严重创伤失血性休克与多器官功能衰竭(MOF)关系十分密切,肝脏在 MOF 的发生中起重要作用。糖皮质激素受体(GR)和热休克蛋白 70 (HSP 70)是休克状态下较重要的指标之一,推测其

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(G1999054200);重庆市自然科学基金资助项目(2004 - BB5068)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所四室,重庆医科大学病理教研室

作者简介:罗东林(1967 -),男(汉族),重庆市垫江县人,博士研究生,主治医师,主要从事创伤后肝脏继发性损害的研究,已发表论文 25 篇(Email:ldl1967@sina.com)。

在创伤休克后与肝组织细胞的损伤及其抗损伤有关。为此,通过复制双侧股骨骨折伴失血性休克模型,观察 GR 和 HSP70 在创伤致失血性休克肝组织中的变化及其对肝损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 创伤伴失血性休克模型制备: Wistar 大鼠 88 只,雌雄各半,体重(228±26)g。用质量分数为 1.5%的戊巴比妥钠(20 mg/kg)腹腔注射麻醉后,仰卧于固定台,折断双侧股骨中段,右侧股动脉插管用于放血[维持血压在 40 mm Hg(1 mm Hg =

0.133 kPa)),用三通连接压力传感器,通过多道生理记录仪监测血压。放血,复制创伤致失血性休克动物模型。

1.2 动物分组:大鼠随机分成 3 组:正常对照组($n=8$)不制模;骨折组($n=40$)只造成双侧股骨骨折不造成失血性休克;骨折伴失血性休克组($n=40$)制备双侧股骨骨折伴创伤致失血性休克模型。

1.3 观察指标:各组分别于伤后 1、2、4、6 和 8 h 活杀大鼠,取股动脉血及肝脏标本,用蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测肝组织 GR 蛋白和 HSP70 含量,在 PECBIAS-6803 图像分析仪上测定表达产物的吸光度值(A 值);用全自动生化分析仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TB)及白蛋白;光镜下观察肝脏病理变化。

1.4 统计学处理:全部数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用配对资料 t 检验;用 SPSS 软件处理数据; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝组织 GR 蛋白含量的变化(表 1):伤后 1 h GR 含量即开始减少,并随伤后时间延长呈进行性下降,伤后 6 h 降至最低,伤后 8 h 仍显著低于正常对照组。骨折伴失血性休克组 GR 较单纯骨折组下降更加明显。

2.2 肝组织 HSP70 含量的变化(表 2):HSP70 在

正常对照大鼠肝组织中表达极低。创伤后即刻开始表达,随伤后时间延长表达量逐渐增加,伤后 6 h 达到峰值,伤后 8 h 仍持续在较高水平。骨折伴失血性休克组 HSP 70 较单纯骨折组升高显著。

2.3 血清 ALT、TB 和白蛋白变化(表 3):双侧股骨骨折后 ALT 和 TB 随时间延长有逐渐增高的趋势,白蛋白有逐渐下降的趋势,但与正常对照组比较,差异均无显著性。双侧股骨骨折伴失血性休克后,ALT 和 TB 分别于伤后 4 h 和 2 h 即较正常对照组及单纯骨折组明显升高,伤后 8 h 进一步升高,白蛋白则明显下降。

2.4 肝组织病理学变化:骨折组伤后 8 h 肝脏大体解剖无明显变化;光镜下肝细胞结构正常,排列整齐,肝窦内无明显炎性细胞浸润。骨折伴失血性休克组伤后 2 h 肝脏大体解剖即可见淤血、肿胀;光镜下见肝窦扩张、淤血明显,伤后 4 h 上述改变更加显著,肝小叶结构紊乱,部分肝细胞变性、坏死,伤后 6 h 和 8 h 肝窦内有较多中性粒细胞浸润。

3 讨论

本实验研究显示,单纯双侧股骨骨折后 8 h,大鼠肝脏的大体解剖及光镜下改变无明显变化;GR 蛋白于伤后即刻下降,HSP70 表达增多,但伤后早期肝脏继发性损伤并不明显。双侧股骨骨折合并失血性休克后,肝脏出现明显淤血、肿胀,肝窦内有较

表 1 创伤休克后大鼠肝组织 GR 蛋白含量的变化($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Changes of the content of GR protein in hepatic tissue in rats with trauma after shock($\bar{x}\pm s, n=8$) A 值

组别	伤后 1 h	伤后 2 h	伤后 4 h	伤后 6 h	伤后 8 h
骨折组	20.9±3.6	17.8±3.2	15.6±2.6**	13.5±2.4**	16.7±2.8*
骨折伴失血性休克组	17.5±3.1	15.2±2.5*	11.6±2.0**△	9.8±1.7**△	11.3±2.0**△

注:正常对照组 GR 蛋白含量为 22.8±3.8;与正常对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与骨折组相应时间点比较:△ $P<0.01$

表 2 创伤休克后大鼠肝组织 HSP70 含量的变化($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Changes of the HSP70 content in hepatic tissue in rats with trauma after shock($\bar{x}\pm s, n=8$) A 值

组别	伤后 1 h	伤后 2 h	伤后 4 h	伤后 6 h	伤后 8 h
骨折组	6.32±0.86	10.60±1.22*	16.40±1.45*	22.30±2.86*	18.30±1.88*
骨折伴失血性休克组	12.50±1.31*△	18.20±1.87*△	36.40±4.48*△	40.60±6.31*△	35.60±4.41*△

注:正常对照组 HSP70 含量为 4.25±0.52;与正常对照组比较:* $P<0.01$;与骨折组相应时间点比较:△ $P<0.01$

表 3 大鼠血清 ALT、TB 和白蛋白的变化($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Changes of serum ALT, TB and albumin in rats with trauma after shock($\bar{x}\pm s, n=8$)

指标	组别	伤后 1 h	伤后 2 h	伤后 4 h	伤后 6 h	伤后 8 h
ALT($\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$)	骨折组	540.6±62.2	554.6±64.6	572.4±62.2	585.6±66.2	596.6±70.2
	骨折伴失血性休克组	552.6±64.2	575.6±63.2	640.6±80.2*△	720.6±87.2*△	830.6±106.2*△
TB($\mu\text{mol/L}$)	骨折组	1.7±0.2	1.8±0.3	2.0±0.4	2.1±0.4	2.3±0.5
	骨折伴失血性休克组	2.5±0.6	3.4±0.9*△	4.7±1.1*△	6.5±1.6*△	8.8±1.9*△
白蛋白(g/L)	骨折组	19.2±2.8	17.5±2.4	16.4±2.2	16.2±1.8	15.2±1.6
	骨折伴失血性休克组	17.2±2.4	15.5±1.8*	13.3±1.6*△	11.6±1.2*△	9.4±0.9*△

注:正常对照组 ALT 为(536.8±60.0) $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$,TB 为(1.6±0.2) $\mu\text{mol/L}$,白蛋白为(20.6±3.4) g/L ;与正常对照组比较:

* $P<0.01$;与骨折组相应时间点比较:△ $P<0.01$

多炎性细胞浸润,肝小叶结构紊乱,部分肝细胞变性,GR 蛋白下降更加明显,HSP70 表达显著增加,肝脏继发性损害明显加重。表明在这一病理过程中,GR 不足与 HSP70 增多在肝脏损伤与抗损伤的发生机制中发挥重要作用。

研究表明,在创伤、失血、感染等应激情况下,大鼠血中糖皮质激素(GC)浓度升高,而肝脏 GR 却显著减少,且伴有 GC 效应的降低^[1]。GC 效应是机体最为重要的应激反应之一,而 GR 是 GC 效应发挥的关键环节^[2]。应激时 GC 分泌增加,其对机体的保护机制尚未完全阐明,目前认为与下列因素有关:①GC 促进蛋白质分解,增加糖异生,抑制外周组织对葡萄糖的利用,使血糖升高;②GC 能维持心血管对儿茶酚胺的稳定性,稳定溶酶体膜,有抗休克的作用;③GC 有抑制磷脂酶 A₂(PLA₂)的作用,使前列腺素(PGs)、白细胞介素(ILs)和血栓素 A (TXA)生成不足,发挥抗炎效应^[3];④GC 具有拮抗细菌内毒素损害的作用,可改善毒血症症状,通过稳定溶酶体膜减少产热原细胞产生内源性致热原的释放^[4]。GC 生物学效应的发挥取决于靶细胞上 GR 的介导,GR 不足时,GC 不能发挥其抗内毒素和抗炎作用。有人提出 GC 与其受体 GR 的复合物是体内最重要的抗炎机制,并在内毒素血症中得到证实^[1]。GR 减少可以导致肾上腺糖皮质激素功能不全,从而导致休克的加重^[5];并且失血程度越重,GR 越低,其死亡率也越高^[6]。阻断 GR 后致严重胸部撞击伤伴单侧股骨折后,肝脏亦出现了严重的继发性损害,并且阻断程度越重,肝脏损害越重^[7]。说明 GR 不足可能参与了创伤休克后肝功能损害,甚至多器官功能不全的发生。

HSP 是细胞受应激原刺激后诱导产生的一组应激蛋白,一般认为 HSP70 可以提高细胞的应激能力,抵御各种损害因素的影响,起到保护细胞的作用。研究表明,HSP70 能参与免疫反应,保护细胞,对抗肿瘤坏死因子和内毒素的损伤^[8]。本实验结果显示,HSP70 在创伤后即开始在肝组织中表达,创伤后 8 h 仍维持较高水平,提示 HSP70 可能是创伤后早期参与肝组织细胞抗损伤机制的一个重要因素,并可能参与了肝组织细胞抗损伤机制的启动。已证实高浓度的活性氧和细胞因子均可诱导 HSP70 表达,HSP70 通过抑制活性氧和细胞因子起到保护细胞和组织免受炎症损伤的作用^[9]。HSP70 对脑缺血、缺氧性损伤有一定保护作用,缺血耐受的产生被认为与 HSP70 表达密切相关^[10]。袁志强等^[11]报道,

烧伤后早期 HSP70 在肠黏膜组织细胞表达显著增加,可能与细胞启动自我保护机制有关。本实验中注意到,严重创伤合并休克后,肝组织 GR 明显减少,HSP70 增加,出现明显的肝功能损害,提示 GR 与 HSP70 在创伤休克过程中肝组织细胞损伤与抗损伤方面存在某种联系。通常情况下,GR 与 HSP70 和 HSP90 等分子伴侣结合而失活,一旦 GC 与其结合,分子伴侣蛋白则会从 GR 上解离出来,后者便被激活,由胞浆进入胞核,从而发挥其转录调控作用;任何作用于分子伴侣蛋白的因素都会影响 GR 由胞浆向胞核的转运,从而间接地调节 GR 的活性^[12]。但 GR 和 HSP70 在肝组织细胞损伤与抗损伤方面如何协调发挥作用,究竟是独立发挥生物学效应,还是相互作用,则有待进一步研究。

参考文献:

- 1 徐仁宝.糖皮质激素受体减少在休克发生中的作用——一个新假说[J].生命科学,1997,9:78-80.
- 2 黎鳌.创伤后脏器功能不全[M].石家庄:河北科学技术出版社,1999.612-615.
- 3 Bishop M H, Shoemaker W C, Appel P L, et al. Prospective, randomized trial of survivor values of cardiac index, oxygen delivery, and oxygen consumption as resuscitation endpoints in severe trauma[J]. J Trauma, 1995, 38:780-788.
- 4 De Bosscher K, Vanden B W, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors [J]. J Neuroimmunol, 2000, 109: 16-22.
- 5 林海,肖素芳,林忠清,等.糖皮质激素受体减少对严重烫伤大鼠体内炎症介质水平的影响[J].中国病理生理杂志,2000,16:60-62.
- 6 石汉平,李建珍,秦路平,等.失血大鼠肝、脑组织糖皮质激素受体的变化及其意义[J].中国危重病急救医学,1996,8:577-578.
- 7 罗东林,周继红,刘宝华,等.糖皮质激素受体与严重创伤后早期肝脏损害[J].中华创伤杂志,2002,18:467-469.
- 8 Meldrum K K, Burnett A L, Meng X, et al. Liposomal delivery of heat shock protein 72 into renal tubular cells blocks nuclear factor-kappa B activation, tumor necrosis factor-alpha production, and subsequent ischemia-induced apoptosis[J]. Circ Res, 2003, 92:293-299.
- 9 Vanitallie T B. Stress, a risk factor for serious illness [J]. Metabolism, 2002, 51:40-45.
- 10 Willoughby D S, Priest J W, Nelson M. Expression of the stress proteins, ubiquitin, heat shock protein 72, and myofibrillar protein content after 12 weeks of leg cycling in persons with spinal cord injury [J]. Arch Phys Med Rehabil, 2002, 83:649-654.
- 11 袁志强,彭毅志,李晓鲁,等.严重烧伤早期肠黏膜组织热休克蛋白 70 的表达规律[J].中国危重病急救医学,2005,17:264-267.
- 12 Bertorelli G, Bocchino V, Olivieri D, et al. Heat shock protein interactions with the glucocorticoid receptor [J]. Pulm Pharmacol Ther, 1998, 11:7-12.

(收稿日期:2005-06-09 修回日期:2005-10-28)

(本文编辑:郭方)