

高血压脑梗死与血浆热休克蛋白 70 抗体水平关系的研究

范德义 姜丹 董明国 卢俊 张智燕 张爱琳

【摘要】 目的 通过测定高血压脑梗死患者血浆热休克蛋白 70(HSP70)抗体水平,探讨 HSP70 抗体与脑梗死损伤程度的关系及其在脑梗死发病机制中的作用。**方法** 100 例脑梗死患者经头颅 CT 或 MRI 确诊,其中男 64 例,女 36 例;高血压者 67 例,血压正常者 33 例。选 100 名社区居民作为对照组,其中男 58 名,女 42 名;高血压者 35 名,血压正常者 65 名。采用蛋白质免疫印迹-酶联免疫吸附法(Western blot-ELISA)测定血浆 HSP70 抗体,并进行 Logistic 回归分析。**结果** 脑梗死组 HSP70 抗体阳性率明显高于对照组(69%比 13%);脑梗死组高血压者 HSP70 抗体阳性率明显高于血压正常者(57%比 12%),对照组高血压者 HSP70 抗体阳性率亦高于血压正常者(11%比 2%)。上述结果差异均有显著性(P 均 <0.05)。**结论** HSP70 抗体增多与高血压脑梗死发病相关,可作为高血压脑缺血时一种分子生物学诊断指标;HSP70 抗体表达越强,脑梗死病情越严重。因此,HSP70 抗体增高是反映脑组织损伤程度的标志。

【关键词】 脑梗死; 高血压; 热休克蛋白; 抗体

Study on plasma antibodies against heat shock protein 70 in the hypertensive patients with cerebral infarction

FAN De-yi *, JIANG Dan, DONG Ming-guo, LU Jun, ZHANG Zhi-yan, ZHANG Ai-lin. * The Affiliated Hospital of Wuhan University of Science & Technology, Wuhan 430064, Hubei, China

【Abstract】 Objective To determine the level of heat shock protein 70 (HSP70) antibody in the hypertensive patients with cerebral infarction and explore the role of plasma antibody against HSP70 in the pathogenesis of cerebral infarction and its relationship to the brain tissue damage. **Methods** One hundred patients with CT or MRI confirmed cerebral infarction were enrolled in the study, in whom 64 were male, and 36 female. Among them, 67 patients were having hypertension and 33 with normal blood pressure. One hundred healthy individuals, including 58 male and 42 female, served as the control group. The level of plasma HSP70 antibody was determined with Western blot-enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA) technique. **Results** Patients with cerebral infarction had a significantly higher incidence (69%) of antibodies to HSP70 compared to the low incidence (13%) of antibodies to HSP70 in the controls. Patients with hypertension had a high incidence (57%) of antibodies to HSP70 compared to the low incidence (12%) of antibodies to HSP70 in patients with normal blood pressure in cerebral infarction group. Patients with hypertension in the control group had a higher incidence (11%) of antibodies to HSP70 compared to the low incidence (2%) of antibodies to HSP70 in the same group. **Conclusion** There is a significant difference in the level of antibodies to HSP70 between patients with cerebral infarction and controls. Elevation in the level of antibodies to HSP70 may reflect the degree of brain tissue damage.

【Key words】 cerebral infarction; hypertension; heat shock protein 70; antibodies

目前,对脑梗死(cerebral infarction)发病机制的研究尚不十分清楚,认为多种抗体和细胞因子与此病的发生、发展有关。热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是机体在遭遇各种应激性侵害时发生热应激反应(heat stress response)所产生的一组高度保守蛋白质^[1,2],它可以对抗环境变化所致的细胞损伤。本研究旨在观察 HSP70 抗体对脑梗死的作用,探讨 HSP70 抗体参与脑梗死发病机制,这对判断脑梗死患者脑组织损伤程度具有重要临床意义。报告如下。

基金项目:武汉科技大学科研基金资助项目(2004143)

作者单位:430064 武汉科技大学附属医院(范德义,姜丹,董明国,张智燕,张爱琳);430015 武汉,江汉大学卫生技术学院病理教研室(卢俊)

作者简介:范德义(1953-),男(汉族),湖北谷城人,副主任医师。

1 对象与方法

1.1 研究对象:选择 2003 年 1 月—2004 年 10 月经头颅 CT 或 MRI 确诊的脑梗死患者 100 例,其中男 64 例,女 36 例;平均年龄(59.2 ± 10.1)岁;高血压者 67 例,血压正常者 33 例。同时选择 100 名社区居民作为对照组,其中男 58 名,女 42 名;平均年龄(58.1 ± 8.3)岁;高血压者 35 名,血压正常者 65 名。两组性别和年龄经统计学处理差异均无显著性(P 均 >0.05),有可比性。

1.2 检测方法:采清晨空腹受试者静脉血 4 ml,肝素抗凝,500 r/min(离心半径 15 cm)离心 15 min,分离血浆,置 -80°C 冰箱保存备用。采用蛋白质免疫印迹-酶联免疫吸附法(Western blot-ELISA)检测 HSP70。

1.2.1 HSP70 抗原制备:用质量分数为 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离方法从细菌表达物中分离 HSP70 抗原,并将这种重组抗原电转移至硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜上,丽春红 S 染色,剪裁下含 HSP70 抗原的宽 2 mm NC 膜条,裁成 2 mm×2 mm 小片,加入 96 孔酶标板,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 30 min 后,封闭液于 37℃ 封闭 1 h 备用。

1.2.2 血浆 HSP70 抗体检测:①将细菌表达的重组人类 HSP70 抗原进行 SDS-PAGE,电转移至 NC 膜上,切下含 HSP70 抗原的 NC 膜条并裁成 2 mm×2 mm 小片,分装 96 孔酶标板。②每孔加入 200 μl PBS 清洗 30 min,吸去 PBS。③加入封闭液,37℃ 封闭 1 h 或 4℃ 封闭过夜。④按 1:10、1:40 和 1:80 稀释待检血浆,各加入 200 μl 稀释液于酶标孔中,记下加样顺序,37℃ 温育 2 h 或 4℃ 过夜,使相应抗体与 NC 膜上 HSP70 抗原结合。⑤200 μl PBS-体积分数为 0.05% 的吐温(Tween)20 洗涤 10 min,重复 6 次。⑥每孔加入 200 μl 1:500 稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG,37℃ 温育 2 h。⑦200 μl PBS-0.05% Tween 20 洗涤 10 min,重复 8 次。⑧100 μl 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色液显色 5~10 min,37℃ 温育可加快显色速度。⑨立即吸出显色液,用 PBS-0.05% Tween 20 洗涤 3 次以终止显色反应,亮光下判断结果。

阳性结果为 NC 膜一面中间有一条肉眼清晰可见的棕色条带,另一面无或极弱;阴性无棕色条带。

1.3 统计学方法:结果用 χ^2 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑梗死与 HSP70 抗体的关系(表 1):脑梗死组 HSP70 抗体阳性率明显高于对照组(69% 比 13%),差异有显著性($P < 0.05$)。

表 1 脑梗死与 HSP70 抗体的关系

Table 1 Relationship of cerebral infarction and HSP70 antibody

组别	例数(例)	HSP70 抗体阳性	HSP70 抗体阴性	P 值
脑梗死组	100	69	31	<0.05
对照组	100	13	87	

2.2 高血压与 HSP70 抗体的关系(表 2):脑梗死组高血压者 HSP70 抗体阳性率明显高于血压正常者,差异有显著性($P < 0.05$)。对照组高血压者 HSP70 抗体阳性率亦明显高于血压正常者,差异亦有显著性($P < 0.05$)。

表 2 高血压与 HSP70 抗体的关系

Table 2 Relationship of hypertension and HSP70 antibody

组别	例数(例)	HSP70 抗体阳性	HSP70 抗体阴性	P 值
脑梗死组	高血压	67	57	<0.05
	血压正常	33	12	
对照组	高血压	35	11	<0.05
	血压正常	65	2	

2.3 HSP70 抗体与脑梗死危险因素的关系(表 3):用非条件 Logistic 回归分析方法,变量赋值如下:①脑梗死组=1,对照组=0;②男=1,女=2;③年龄≤50 岁=1,51~60 岁=2,61~70 岁=3,71~80 岁=4;④HSP70 抗体阴性=0, HSP70 抗体阳性=1。把上述变量引入 Logistic 回归方程,退出方程标准为 $\alpha=0.1$ 。Logistic 回归方程为:脑梗死 = $-0.8782 + 0.7013 \times \text{高血压} + 0.5967 \times \text{HSP70 抗体}$ 。从该方程中可见 HSP70 抗体被引入最佳回归模型($\alpha=0.1$ 的水准),提示 HSP70 抗体可能是脑梗死发病的原因之一。

表 3 脑梗死危险因素多因素非条件 Logistic 回归分析

Table 3 Multivariate non-condition Logistic regression analysis on risk factors of cerebral infarction

因素	偏回归系数	标准误	χ^2 值	P 值	OR
常数	-0.8782	0.5097	3.6760	0.0552	
性别	0.3819	0.3156	1.4698	0.3186	1.564
年龄	0.0284	0.3978	0.0360	0.7730	1.038
高血压	0.7013	0.4028	4.2015	0.0647	2.301
HSP70 抗体	0.5967	0.2692	9.2240	0.0114	2.163

注:OR 为相对比值比

3 讨论

HSPs 基因表达的调控机制认为,HSPs 表达与 HSPs 基因上游的热休克因子(HSF)相互作用有关。脑组织缺血、缺氧后可导致 HSF 表达,并诱导 HSF 的产生。HSF 与热休克元件(HSE)结合,诱导 HSPs 基因的转录,产生大量的 HSP mRNA,从而导致快而高水平的 HSPs 表达^[3,4]。实验研究显示,将表达 HSP70 基因编码的单纯疱疹病毒直接注射到大鼠脑内,使部分神经元转染,再造成大鼠大脑中动脉栓塞,结果显示神经元存活率较对照组提高 62.3%~95.4%,提示 HSP70 能保护脑组织,对抗缺血所致的损伤作用^[5]。

近年研究发现,HSP70 是细胞内重要的信号转导分子,并在免疫应答中发挥抗原呈递作用,参与抗感染和肿瘤免疫,因而 HSP70 抗体的异常表达可能提示机体免疫功能存在紊乱^[6]。亦有报道,HSPs 抗体直接参与了动脉粥样硬化的形成过程,在动脉粥

样硬化的发生部位富含 γ/δ T 细胞,而这种 T 细胞易于对 HSPs 作出应答反应^[7]。在此过程中,一方面神经内分泌因子如糖皮质激素、儿茶酚胺、内啡肽、血管加压素、促肾上腺皮质激素(ACTH)、雄激素、雌激素、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)等通过作用于免疫细胞膜上的受体而调节免疫反应;另一方面免疫细胞可释放多种神经内分泌激素,如内啡肽、ACTH、催乳素、P 物质、促黄体生成激素(LH)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、催产素等,这些激素可在局部和全身发挥作用,参与应激反应的调控。

流行病学调查研究显示,在长期的精神心理应激原作用下,高血压的发病率明显上升。这种应激可造成血管痉挛、动脉内皮损伤、多形核白细胞增多、红细胞沉降率加快、血小板黏附与聚集。加上应激时分泌的多种激素,可使脂肪分解加强、血脂水平升高,最终导致脑梗死发生而危及生命。

国内外多采用动物实验和细胞培养的方法对 HSPs 合成及功能进行研究,这种将哺乳动物细胞用于体外研究的方法只能限定在实验室条件下。而用 Western blot-ELISA 直接检测外周循环血中抗体是最常用的方法,它是继免疫荧光和放射免疫技术之后发展起来的一种免疫酶技术。它以免疫学反应为基础,是将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合的一种敏感性很高的实验技术。本研究结果显示,脑梗死组 HSP70 抗体阳性率明显高于对照组;无论有无脑梗死,高血压者 HSP70 抗体阳性率均明显高于血压正常者,表明 HSP70 抗体的高表达与高血压、动脉粥样硬化及脑梗死具有密切联系,HSP70 抗体表达的程度与高血压、动脉粥样硬化及脑梗死的严重程度呈正相关;回归分析也提示 HSP70 抗体可能是高血压和脑梗死

发病的原因之一。说明 HSP70 抗体参与了脑梗死的发病过程,并通过细胞免疫反应达到保护脑细胞的作用。但强烈而持久的病理性脑损害扰乱了机体免疫反应机制和神经-内分泌调节机制,导致脑细胞发生不可逆转的坏死。

综上所述:采用 Western blot-ELISA 测定血浆 HSP70 抗体,可作为高血压脑缺血时一种分子生物学诊断指标;且 HSP70 抗体表达越强,脑梗死病情越严重。因此,外周循环血中 HSP70 抗体增高是反映脑组织损伤程度的标志。

参考文献:

- 1 Wu T, Tanguay R M, Wu Y, et al. Presence of antibodies to heat stress proteins and its possible significance in workers exposed to high temperature and carbon monoxide[J]. Biome Environ Sci, 1996, 9: 370-379.
- 2 Kesik K, Janik-Spiechowicz E. Comparison of the mutagenicity of chemical agents released during coke production[J]. Int J Occup Med Environ Health, 1997, 10: 267-272.
- 3 Chan Y C, Shukla N, Abdus-Samee M, et al. Anti-heat-shock protein 70 kDa antibodies in vascular patients[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1999, 18: 381-385.
- 4 Hoppichler F, Lechleitner M, Traweger C, et al. Changes of serum antibodies to heat-shock protein 65 in coronary heart disease and acute myocardial infarction[J]. Atherosclerosis, 1996, 126: 333-338.
- 5 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.
- 6 Wu Tangchun, Chen Sheng, Xiao Chengfeng, et al. Presence of antibody against the inducible HSP70 in patients with acute heat-induced illness[J]. Cell Stress Chaperones, 2001, 6: 113-120.
- 7 Schett G, Metzler B, Mary M, et al. Macrophage-lysis mediated by autoantibodies to heat shock protein 65/60[J]. Atherosclerosis, 1997, 128: 27-38.

(收稿日期:2005-11-10 修回日期:2006-03-22)

(本文编辑:李银平)

• 启事 •

2006·第2届世界医学高峰会暨展览会(中国·上海)及国际应急医疗救援和急救医学论坛暨第1届上海瑞金国际急救医学研讨会会议通知

“2006·第2届世界医学高峰会暨展览会(中国·上海)”将于2006年6月18-20日在上海国际会议中心举行。论坛活动以“发展战略、科技创新”为主题,分为发展战略论坛和系列学术专题论坛两大版块,包括中外医院院长高峰会、新时期医学装备配置、利用和管理研讨会以及5场系列专题学术研讨会(分别为影像医学研讨会、临床检验医学论坛、医院信息化论坛、应急医疗救援暨急救医学研讨会、活体肾移植学术研讨会暨第1届活体肾移植学术班)。

由中华医学会上海急诊学会、上海交通大学医学院附属瑞金医院、美国急救医学会、法国急救医学会共同主办的“国际应急医疗救援和急救医学论坛暨第1届上海瑞金国际急救医学研讨会”将于2006年6月18-19日同时在上海国际会议中心举办。本次大会的主要议题包括:急救医学、灾害医学、公共卫生应急、医院急诊科建设与管理、复苏医学、院前急救、创伤急救、急救网络建设、急性中毒救治、危重病医学等。

了解详情内容请登陆大会官方网站:www.wmse.org.cn。

(大会会务组)