

## • 研究报告 •

## 腺病毒介导的热休克蛋白 70 对脑缺血缺氧大鼠保护作用的研究

卞姗姗 宋晓彩 胡丹 曲彦

【关键词】 热休克蛋白 70; 腺病毒; 缺血缺氧; 脑

热休克蛋白(HSP)是生命体在高温、发热、缺血、缺氧、病毒感染以及炎症等不良环境因素作用下所产生的一组蛋白质,能保护机体或细胞不受或少受伤害,这一反应过程称为热休克反应<sup>[1]</sup>。研究证明,采用基因工程技术诱导 HSP70 高效表达对心、肺、肠等器官的损伤有保护作用<sup>[2-4]</sup>。本课题组前期成功构建了携带 HSP70 编码基因的重组腺病毒表达载体,并在体外研究中观察到其对神经细胞的缺血缺氧损伤具有保护作用<sup>[5]</sup>。在此基础上,本研究中将重组腺病毒载体通过尾静脉注入脑缺血缺氧大鼠体内,观察重组腺病毒介导的外源性 HSP70 表达对脑缺血缺氧大鼠的保护效应,有望为脑缺血缺氧的防治提供可行性的基因治疗途径。

## 1 材料与方 法

1.1 重组腺病毒载体制备:HSP70 编码基因重组腺病毒载体(vAd-HSP70)由本课题组制备并鉴定<sup>[6]</sup>。

1.2 主要实验试剂:TRIZol 试剂购自美国 GIBCO 公司,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自美国 Promega 公司,HSP70 免疫组化试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司。HSP70 编码基因引物参考文献<sup>[7]</sup>的方法进行设计,由南京金斯瑞生物科技服务有限公司合成。HSP70 引物序列:上游 5'-GCAA GGCCAACAAGATCACCATCA-3',下游 5'-TCCTCTTTCTCAGCCAGCGTGT TTA-3',扩增产物大小为 286 bp。内参照基因  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)引物序列:上游 5'-ATGCCATCCTGCGTCTGGA CCTGGC-3',下游 5'-AGCATTTGCG

GTGCACGATGGAGGG-3',扩增产物大小为 606 bp。

## 1.3 实验 1

1.3.1 实验分组:取 20 只昆明种小鼠,雌雄不拘,体重 20~25 g,购自青岛市药品检验所,动物合格证号:SCXK(鲁)2009-0007。按随机数字表法分为对照组及 vAd-HSP70 24、48、72 h 组,每组 5 只。取-80℃冻存的重组腺病毒悬液,37℃水浴快速溶解,取 0.5 ml 经小鼠尾静脉注射进行感染;对照组注射等量生理盐水。

1.3.2 RT-PCR 检测 HSP70 mRNA 的转录水平:分别于静脉注射 vAd-HSP70 24、48 和 72 h 处死小鼠,取脑组织。用 TRIzol 一步法提取 RNA,逆转录合成 cDNA。PCR 反应体积为 25  $\mu$ l。扩增条件:94℃预变性 2 min;94℃1 min,52℃1 min,72℃1 min,共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min,4℃保存。取 5  $\mu$ l PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色,凝胶成像系统观察并记录结果。采用 Quantity One 灰度分析软件计算 HSP70 与内参照  $\beta$ -actin 的吸光度(A)值比值以表示 HSP70 mRNA 相对表达量。每组重复 3 次。

## 1.4 实验 2

1.4.1 实验分组:Wistar 大鼠 75 只,体重 180~220 g,雌雄不拘,购自青岛市药品检验所,动物合格证号:SCXK(鲁)2009-0007。按随机数字表法分为正常对照组、模型组、vAd-HSP70 组(静脉注射转染的 vAd-HSP70 48 h 后给予缺血缺氧处理),每组 25 只。

1.4.2 脑缺血缺氧大鼠模型制备:用 10%的水合氯醛麻醉大鼠后仰卧位固定,颈正中切口,分离右颈总动脉并用丝线永久结扎,缝合切口。2 h 后将大鼠放入 2 000 ml 密闭容器内,置于 37℃水浴中,以 1.5 L/min 的速度输入含 8%O<sub>2</sub> 和 92%N<sub>2</sub> 的混合气体,持续 2 h 进行低氧处理。

1.5 检测指标及方法:分别于缺血缺氧后 2、24、48、72 h 及 7 d 处死大鼠,正常

对照组于相应时间处死大鼠。分离两侧脑组织,左侧脑组织于 4%多聚甲醛溶液中固定,常规脱水,石蜡包埋,用于苏木素-伊红(HE)染色及免疫组化染色;右侧脑组织用于 RT-PCR 检测。

1.5.1 RT-PCR 检测 HSP70 mRNA 表达:操作步骤同 1.3.2。

1.5.2 免疫组化检测 HSP70 表达:切片脱蜡入水;3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶;0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 值 6.0)微波抗原修复;正常山羊血清封闭 20 min;滴加 1:100 兔抗 HSP70 多克隆抗体,室温孵育 2 h,依次加入生物素化二抗和卵白素-生物素-过氧化物酶(ABC)复合物,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,显微镜下控制反应时间,苏木素复染,蒸馏水洗,系列乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。每只大鼠制备 3 张脑组织病理切片用于染色,细胞质内有棕黄色颗粒为阳性细胞。采用双盲法,每张切片在 100 倍光镜下随机选取 5 个视野计数阳性细胞数。结果按以下标准来判断:将染色程度分为 4 级,0 级为背景颜色,1 级为微弱染色,2 级为中度染色,3 级为强染色<sup>[8]</sup>。

1.5.3 脑组织病理学观察:石蜡切片行 HE 染色,光镜下观察组织病理改变。

1.6 统计学处理:采用 SPSS 13.0 统计软件,定量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用 *t* 检验或单因素方差分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 外源性脑组织 HSP70 的转录表达(图 1):注射重组腺病毒 vAd-HSP70 后 24、48、72 h 均可观察到 HSP70 编码基因 286 bp 的特异扩增带,对照组无此条带。证明目的基因可有效转录。HSP70 的转录水平以注射重组腺病毒 48 h 最高(0.812 $\pm$ 0.234),与 24 h(0.470 $\pm$ 0.139)和 72 h(0.409 $\pm$ 0.060)时比较差异均有统计学意义(均 *P*<0.05);24 h 与 72 h 比较无明显差异(*P*>0.05)。

2.2 RT-PCR 检测各组大鼠脑组织

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.

2011.06.014

基金项目:山东省科技发展计划项目(2005GG4402023)

作者单位:266011 山东,青岛大学医学院附属青岛市市立医院 ICU

通信作者:曲彦,Email:qdquyan@yahoo.com.cn

HSP70 mRNA 表达(图 2;表 1);正常对照组大鼠 HSP70 mRNA 表达极其微弱。模型组在缺血缺氧后 2 h 即可观察到 HSP70 mRNA 表达,24 h 达高峰,48 h 仍维持较高水平,72 h 开始下降,7 d 时下降明显,但仍高于正常对照组(均  $P < 0.05$ )。vAd-HSP70 组在缺血缺氧后 2 h 可见 HSP70 mRNA 明显表达,48 h 达高峰,至 7 d 仍有表达;各时间点 HSP70 mRNA 表达均明显高于正常对照组(均  $P < 0.05$ ),且在缺血缺氧 2、48、72 h 时 HSP70 mRNA 表达明显高于模型组(均  $P < 0.05$ )。

**2.3 免疫组化检测** 各组大鼠脑组织 HSP70 表达(图 3;表 1);正常对照组未观察到典型 HSP70 阳性细胞,染色较弱,呈 1 级染色。模型组缺血缺氧后 2 h 可见少量的 HSP70 阳性细胞,24~48 h 达高峰,染色增强,72 h 开始减少,7 d 明显下降,但仍高于正常对照组(均  $P < 0.05$ )。vAd-HSP70 组各时间点 HSP70 阳性表达均较模型组增多,以 2、48、72 h 最为明显(均  $P < 0.05$ )。

**2.4 脑组织病理观察**(图 4):正常对照组脑组织结构清晰,细胞轮廓清楚。模型组缺血缺氧 2 h 开始出现轻微的病理变化,表现为局限性神经元肿胀;24 h 可见部分神经细胞肿胀,体积变大,间质轻度水肿;48 h 间质水肿现象加重;72 h 上述现象进一步加重,细胞松散、间隙扩大,细胞明显水肿,脑微血管扩张、淤血,此种现象随缺血缺氧时间延长更加明显。vAd-HSP70 组缺血改变及细胞肿胀均较模型组减轻,大部分细胞无水肿,细胞周围间隙改变不明显。

**3 讨论**

HSP 是一类进化高度保守、广泛存在于原核和真核细胞内,可因高温、缺血及其他理化因素刺激而产生的一组蛋白质。HSP70 作为一种非特异性的细胞内源性保护蛋白,可防止应激引起的细胞损害并使受损细胞得以修复<sup>[9]</sup>。由于神经元细胞为不可再生细胞,任何原因造成的细胞损伤和死亡都会引起永久性神经损伤,导致脑缺血缺氧性损伤及不同程度的残疾,因此,对脑缺血缺氧的防治已成为国内外关注的研究热点。在正常生理情况下,HSP70 在脑组织内通常不表达或呈微弱表达,缺血缺氧时可引起 HSP70 表达增加,且其表达增加后可能有利于神经细胞损伤的修复<sup>[10-12]</sup>。

HSP70,热休克蛋白 70;M,DNA Marker DL 2000;1,对照组;2~4,重组腺病毒 vAd-HSP70 24、48、72 h 组

图 1 逆转录-聚合酶链反应检测小鼠脑组织外源性 HSP70 mRNA 转录水平

HSP70,热休克蛋白 70;M,DNA Marker DL 2000;1,正常对照组,2~6,缺血缺氧 2、24、48、72 h 及 7 d

图 2 逆转录-聚合酶链反应检测模型组(a)和重组腺病毒 vAd-HSP70 组(b)大鼠脑组织 HSP70 mRNA 表达水平

表 1 重组腺病毒 vAd-HSP70 对脑缺血缺氧大鼠脑组织 HSP70 的 mRNA 表达及阳性细胞计数的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	HSP70 mRNA				
	术后 2 h	术后 24 h	术后 48 h	术后 72 h	术后 7 d
正常对照组	0.034±0.008	0.040±0.008	0.032±0.006	0.048±0.005	0.040±0.005
模型组	0.776±0.486 <sup>a</sup>	1.809±0.414 <sup>a</sup>	1.416±0.553 <sup>a</sup>	0.970±0.039 <sup>a</sup>	0.346±0.090 <sup>a</sup>
vAd-HSP70 组	1.076±0.204 <sup>ab</sup>	1.954±0.193 <sup>a</sup>	2.809±0.185 <sup>ab</sup>	2.018±0.145 <sup>ab</sup>	0.428±0.112 <sup>a</sup>

  

组别	HSP70 阳性细胞数(个/HP)				
	术后 2 h	术后 24 h	术后 48 h	术后 72 h	术后 7 d
正常对照组	0	0	0	0	0
模型组	10.5±1.8 <sup>a</sup>	29.6±2.0 <sup>a</sup>	27.5±1.7 <sup>a</sup>	16.8±1.9 <sup>a</sup>	5.6±1.6 <sup>a</sup>
vAd-HSP70 组	19.8±2.6 <sup>ab</sup>	31.7±2.0 <sup>a</sup>	56.6±2.5 <sup>ab</sup>	44.6±1.8 <sup>ab</sup>	6.9±1.3 <sup>a</sup>

注,HSP70,热休克蛋白 70;与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 3 光镜下观察重组腺病毒 vAd-HSP70 对脑缺血缺氧大鼠脑组织热休克蛋白 70 (HSP70)表达的影响 正常对照组(a)脑细胞 HSP70 表达阴性;模型组缺血缺氧 7 d(b)脑细胞可见少量 HSP70 阳性表达,呈棕色颗粒(箭头所示);vAd-HSP70 组缺血缺氧 48 h(c)脑细胞 HSP70 阳性表达最明显,染色最深,呈棕色颗粒(箭头所示) 免疫组化 ×100

图 4 光镜下观察重组腺病毒 vAd-HSP70 对脑缺血缺氧大鼠脑组织病理改变的影响 正常对照组(a)脑组织细胞正常,细胞间隙正常;模型组缺血缺氧 7 d(b)神经元肿胀,间质水肿,细胞松散,间隙扩大;vAd-HSP70 组缺血缺氧 48 h(c)脑细胞轻度水肿,细胞间隙改变不明显 HE ×100

本研究中首先经小鼠尾静脉注射 vAd-HSP70, 检测脑组织 HSP70 mRNA 转录水平, 结果注射 48 h 后表达水平最高, 因此选择重组腺病毒 Ad-HSP70 预处理 48 h 后进行大鼠脑组织缺血缺氧, 结果显示正常对照组中几乎检测不到 HSP70 mRNA 的表达, 而在模型组和 vAd-HSP70 预处理组均可检测出表达, 表明缺血或缺氧刺激可以诱导 HSP70 的表达, 这与 Corbucci<sup>[13]</sup>证实缺血后 HSP70 转录体因子明显激活一致。缺血缺氧后 HSP70 阳性表达率总的趋势为 2 h 出现, 48 h 达高峰, 72 h 呈逐渐下降趋势, vAd-HSP70 预处理组各时间点 HSP70 表达均较模型组升高, 以 48 h 最为明显。表明随脑缺血缺氧时间延长, 细胞结构和功能破坏, 48 h 内受损脑组织的应激和抗损伤能力较强, 因而可产生 HSP70 以进行抗损伤和修复。随脑缺血缺氧时间延长, 脑细胞受损加重, 能够产生 HSP70 的能力也大大下降。组织病理学也显示, vAd-HSP70 组脑组织损伤程度较模型组轻, 进一步证明了 HSP70 对损伤后神经元的抗损伤及修复能力有重要作用。毛定安等<sup>[14]</sup>认为该作用可能与 HSP70 抑制白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )生成有关。

本实验中采用携带人全长 HSP70 编码基因的重组腺病毒表达载体注入缺血缺氧大鼠模型, 检测 HSP70 表达, 结果证实重组腺病毒可以介导外源性 HSP70 在缺血缺氧大鼠脑组织中高效

表达。组织病理学分析表明, 腺病毒介导的外源性 HSP70 表达对缺血缺氧大鼠具有明确的保护作用, 为进一步开展临床脑缺血缺氧的防治提供了依据。

参考文献

[1] Richard V, Kaeffer N, Thuillez C. Delayed protection of the ischemic heart, from pathophysiology to therapeutic applications. *Fundam Clin Pharmacol*, 1996, 10, 409-405.  
 [2] Jayakumar J, Suzuki K, Khan M, et al. Gene therapy for myocardial protection, transfection of donor hearts with heat shock protein 70 gene protects cardiac function against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*, 2000, 102, 302-306.  
 [3] Weiss YG, Maloyan A, Tazelaar J, et al. Adenoviral transfer of HSP-70 into pulmonary epithelium ameliorates experimental acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*, 2002, 110, 801-806.  
 [4] 李晓鲁, 彭毅志, 袁志强, 等. HSP70 基因转染对缺氧-再复氧肠上皮细胞生长能力影响的研究. *中国危重病急救医学*, 2003, 15, 81-83.  
 [5] 杨芳芳, 徐小娜, 胡丹, 等. 腺病毒介导的热休克蛋白 70 在神经元和胶质细胞中的抗缺氧研究. *中国危重病急救医学*, 2008, 20, 681-684.  
 [6] 徐小娜, 曲彦. 热休克蛋白 70 重组腺病毒载体的构建及鉴定. *青岛大学医学院学报*, 2008, 44, 162-164, 167.  
 [7] 王海英, 刘家浩, 唐洪丽, 等. 神经节苷

脂 GM1 与亚低温对缺氧缺血后脑中 HSP70、NPY 表达的影响. *江苏医药*, 2007, 33, 592-595.  
 [8] Liu Y, Kato H, Nakata N, et al. Temporal profile of heat shock protein 70 synthesis in ischemic tolerance induced by preconditioning ischemia in rat hippocampus. *Neuroscience*, 1993, 56, 921-927.  
 [9] 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. *中国危重病急救医学*, 2002, 14, 265-268.  
 [10] Moseley P. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology*, 2000, 48, 299-302.  
 [11] Gray CC, Amrani M, Yacoub MH. Heat stress proteins and myocardial protection: experimental model or potential clinical tool. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31, 559-573.  
 [12] 张韬, 段志泉, 毛羽, 等. 缺血预处理对犬脊髓损伤及热休克蛋白 70 表达影响的研究. *中华外科杂志*, 2004, 42, 1353-1356.  
 [13] Corbucci GG. Adaptive changes in response to acute hypoxia, ischemia and reperfusion in human cardiac cell. *Minerva Anestesiol*, 2000, 66, 523-530.  
 [14] 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. *中国危重病急救医学*, 2003, 15, 593-595.

(收稿日期: 2010-09-12)

(本文编辑: 李银平)

• 消息 •

中国科技信息研究所 2010 年版《中国科技期刊引证报告》(核心版)  
——临床医学类及中医学与中药学类影响因子和总被引频次前 10 位排序表

期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	总被引频次	排位	期刊名称	影响因子	排位
中国感染与化疗杂志	1.885	1	中华医院感染学杂志	8 412	1	中国中西医结合急救杂志	1.039	1
中华医院感染学杂志	1.812	2	中华误诊学杂志	4 997	2	河南中医学院学报	0.886	2
中国危重病急救医学	1.130	3	中国危重病急救医学	3 029	3	针刺研究	0.823	3
中国血吸虫病防治杂志	1.026	4	中华检验医学杂志	2 933	4	中西医结合学报	0.787	4
中国循证医学杂志	0.892	5	实用医学杂志	2 784	5	中国中西医结合杂志	0.730	5
中华临床营养杂志	0.741	6	中国急救医学	1 993	6	中国针灸	0.729	6
实用临床医药杂志	0.688	7	中华老年学杂志	1 917	7	中国中药杂志	0.707	7
中华实用诊断与治疗杂志	0.665	8	中华急诊医学杂志	1 898	8	中华中医药杂志	0.661	8
中国输血杂志	0.650	9	中华皮肤科杂志	1 794	9	吉林中医药	0.652	9
中国感染控制杂志	0.648	10	实用临床医药杂志	1 478	10	中草药	0.627	10

——影响因子总排序表中前 100 位医学类期刊名单

期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	影响因子	排位
中国感染与化疗杂志	1.885	12	中华儿科杂志	1.340	59	中国危重病急救医学	1.130	90
中华医院感染学杂志	1.812	14	中华康复医学杂志	1.339	60	中国免疫和疫苗	1.127	91
中华结核和呼吸杂志	1.492	38	中国药理学通报	1.266	68	新乡医学院学报	1.099	98
中华护理杂志	1.485	40	中国临床保健杂志	1.194	79			
中华心血管病杂志	1.391	53	中国实用外科杂志	1.141	88			