文章编号:1000-5404(2007)15-1507-04

论著

热休克预处理对严重烫伤大鼠胃黏膜热休克蛋白60、70及iNOS表达的影响

张红艳[1],吕农华[2],谢 勇[2],郭光华[1],詹剑华[1],陈 江[2] (南昌大学第一附属医院:[1]烧伤中心,[2]消化科,南昌 330006)

提 要:目的 观察热休克预处理对严重烫伤大鼠胃黏膜热休克蛋白(heat shock protein,HSP)(HSP60、HSP70)和诱生型一氧化氮合酶(induced nitric oxidase synthase, iNOS)表达的影响,探讨热休克预处理对严重烫伤大鼠胃黏膜的保护作用机制。**方法** 将Wistar大鼠分为烫伤组及热休克预处理后烫伤组2个大组,观察不同处理组大鼠胃黏膜损伤指数(ulcer index, UI)变化。同时应用RT-PCR技术检测各组大鼠胃黏膜HSP70 mRNA表达,免疫组化染色分析胃黏膜组织中HSP60、HSP70、iNOS表达变化。**结果** 正常大鼠严重烫伤后iNOS表达显著增强,胃黏膜损害明显,热休克预处理能显著减轻大鼠严重烫伤后急性胃黏膜损害;与烫伤组比较,经热休克预处理后再烫伤大鼠胃黏膜HSP60和HSP70基因表达水平升高($P<0.05$),尤以HSP70为甚($P<0.01$),而iNOS表达受抑($P<0.01$)。**结论** 热休克预处理对大鼠严重烫伤后急性胃黏膜损害具有保护作用,其保护机制可能与HSP60、70诱导表达增强及iNOS表达受抑等机制有关。

关键词: 热休克预处理;烫伤;胃黏膜;热休克蛋白;诱生型一氧化氮合酶
中图法分类号: R394.2; R573.02; R644.06 **文献标识码:** A

Effects of heat shock preconditioning on expressions of HSP60, HSP70 and iNOS in gastric mucosa of burned rats

ZHANG Hong-yan[1], LU Nong-hua[2], XIE Yong[2], GUO Guang-hua[1], ZHAN Jian-hua[1], CHEN Jiang[2] ([1]Center of Burns, [2]Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract: Objective To observe the influence of heat shock preconditioning on the expressions of heat shock protein (HSP) 60, 70 and induced nitric oxidase synthase (iNOS) in gastric mucosa of severely burned rats and investigate the protective mechanism of burn-induced acute gastric mucosal lesion. **Methods** Ninety-six Wistar rats were divided into two groups: burn (B) and heat shock preconditioning before burn (HB). The extent of gastric mucosal lesions (UI) was evaluated grossly and histologically. HSP70 mRNA expression was determined by RT-PCR. Immunohistochemical method was used to analyze the protein expressions of iNOS, HSP60 and HSP70. **Results** Rats in B group were induced conspicuous gastric mucosal lesions, while UI in HB group was significantly lower. The expressions of HSP70 and HSP60 were significantly increased and the expression of iNOS was obviously decreased in HB group as compared with B group. **Conclusion** Heat shock preconditioning protects against acute gastric mucosal lesion caused by burn through enhancing the expressions of induced HSPs and reducing the iNOS expression.

Key words: heat shock preconditioning; burn; gastric mucosa; heat shock protein; induced nitric oxidase synthase

烧伤后应激性溃疡是烧伤患者最为常见的并发症之一,一旦合并大量出血,处理困难,病死率可高达10%~20%[1]。近年来研究表明一氧化氮合酶和热休克蛋白在胃黏膜损伤中的作用日益受到重视[2,3]。笔者以前的研究已证实热休克预处理(heat shock preconditioning, HS)可诱导热休克蛋白合成并对大鼠严重烫伤后急性胃黏膜损伤有保护作用[4]。为了进一步研究热休克预处理对烫伤大鼠胃黏膜的保护作用机制,本研究观察了热休克预处理对严重烫伤大鼠胃黏膜诱生型一氧化氮合酶(induced nitric oxidase synthase,iNOS)和热休克蛋白(heat shock protein ,HSP)表达的影响,并探讨了严重烫伤大鼠胃黏膜iNOS表达的意义及其与HSP的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

兔抗大鼠iNOS多抗、小鼠抗大鼠HSP70单抗、羊抗大鼠HSP60多抗为美国Sant Cluz公司产品;链霉卵白素法免疫组化

作者简介:张红艳(1971-),女,江西省丰城市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事严重烧伤后脏器功能损害发病的分子机制及热休克蛋白的保护作用方面的研究,发表论文11篇。电话:(0791)8692537, E-mail:zhycn2008@163.com
通讯作者:吕农华,电话:(0791)8692705, E-mail:lunonghua@163.com
收稿日期:2006-08-28;修回日期:2007-03-12

检测试剂盒为北京中山生物工程公司产品。总 RNA 提取试剂盒,华美生物工程公司产品; A3801 逆转录酶、随机引物、RNasin、*Taq* 酶、DNA Marker DL 2000 为日本 TaKaRa 公司产品。DU 640核酸蛋白分析仪(美国 Beckman 公司);FR-980 生物电泳图像分析仪(上海复日公司);蒸汽烫伤实验仪(南昌大学第一附属医院烧伤研究所)。

1.2 实验动物及分组

清洁级 Wistar 大鼠,体质量 200~250 g,雌雄各半,购自南昌大学医学院实验动物科学部。将 96 只大鼠按随机数字表分为 2 大组:①烧伤组(B 组):共 48 只大鼠,其中 8 只大鼠不烫伤,作为正常对照。另外 40 只大鼠制作烧伤后急性胃黏膜损伤模型,分为烧伤后 3、6、12、24、48 h 5 个小组,每个小组 8 只。②热休克预处理+烧伤组(HB 组):共 48 只大鼠,其中 40 只大鼠经热休克处理[5] 20 h 后进行烧伤,时相点同 B 组。另外 8 只大鼠单纯进行热休克预处理,不烫伤,作为实验对照。

1.3 严重烧伤后急性胃黏膜损伤模型制备

大鼠背部以 10% 硫化钠脱毛后,2.5% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔内注射麻醉。将蒸汽烫伤实验仪致伤大鼠背部 8 s,造成 30% TBSA Ⅲ度烫伤。

1.4 标本采集

将各时相点大鼠沿胃大弯剪开胃,进行病理损伤指数的计分。并分别在胃窦、体及病损处各取 2 mm×2 mm 胃黏膜 1 块,置 10% 甲醛溶液中 4 ℃ 固定 48 h,用于病理学及免疫组织化学检查。另取胃腺区黏膜约 150 mg,迅速置于液氮中保存,用于 RT-PCR 检测。

1.5 胃黏膜损伤指数测定

胃黏膜损伤指数(ulcer index, UI)测定参考 Guth[6] 标准。

1.6 胃黏膜内 iNOS、HSP60、70 蛋白表达的检测

采用过氧化酶标记的链霉卵白素法(S-P 法)染色,按 S-P 试剂盒说明书步骤具体操作。

1.7 HSP70 mRNA 表达的检测

采用 RT-PCR 法。主要步骤如下:(1)总 RNA 的提取:按华美总 RNA 提取试剂盒说明书操作。(2)RNA 定量及纯度鉴定:①用 Beckman DU 640 核酸蛋白分析仪测 260 nm 波长下的吸光度值,按下列公式计算 RNA 的含量:RNA 浓度(mg/ml)=40×(1/光程)×*A*(260)×稀释倍数。②RNA 纯度鉴定:于核酸蛋白分析仪测 260 nm 及 280 nm 处的吸光度值,一般要求 *A*(260)/*A*(280)大于 1.7 以上方可用于逆转录。(3)逆转录(RT)及聚合酶链反应(PCR):①HSP70 引物扩增片段作测定目的片段,β-actin 引物扩增片段作内对照。HSP70 正义引物序列:5′- CCAGGCGTGCCCCAGATCGAGGTGA -3′ 反义引物序列:5′ -ATTTAAATCTAATCTACCTCCTCAATGGTGGG-3′,扩增片段长度 532 bp。β-actin 正义引物序列:5′-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3′,反义引物序列:5′-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3′。这对引物可特异地扩增 308 bp 的 β-actin cDNA 片段。②在冰盒上调制 PCR 反应体系:10×buffer 5 μl(含 Mg^{2+} 20 μmol);2.5 mmol/L dNTP 4 μl;HSP70 及 β-actin 引物各 1 μl 共 4 μl;cDNA 5 μl;*Taq* 酶 0.5 μl;DEPC 处理水 31.5 μl;石蜡油 50 μl。PCR 扩增循环系数:94 ℃ 2 min,60 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min 30 s,共 30 个循环,最后在 72 ℃ 下延伸 5 min。(4)琼脂糖凝胶电泳:取 10 μl PCR 反应产物上样,进行质量浓度为 1.5 g/L 的琼脂糖凝胶电泳后,在紫外透射仪下观察及拍照。(5)结果用 FR-980 生物电泳图像分析仪进行扫描分析,以 HSP70 产物条带与 β-actin 产物条带的积分之比值表示。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验和直线回归相关分析。

2 结果

2.1 HS 对烧伤大鼠胃黏膜 UI 的影响

大鼠烧伤后胃黏膜损伤的程度用 UI 表示。从表 1 可以看出,大鼠烧伤后 6 h 可见明显的胃黏膜损伤,并且损伤程度呈时间依赖性增加,伤后 24 h 胃黏膜损伤程度最严重(UI=12.74±1.92)。经 HS 后烧伤大鼠各时相点 UI 均低于烧伤组,其中伤后 6、12、24、48 h 有统计学差异($P<0.05$, $P<0.01$)。

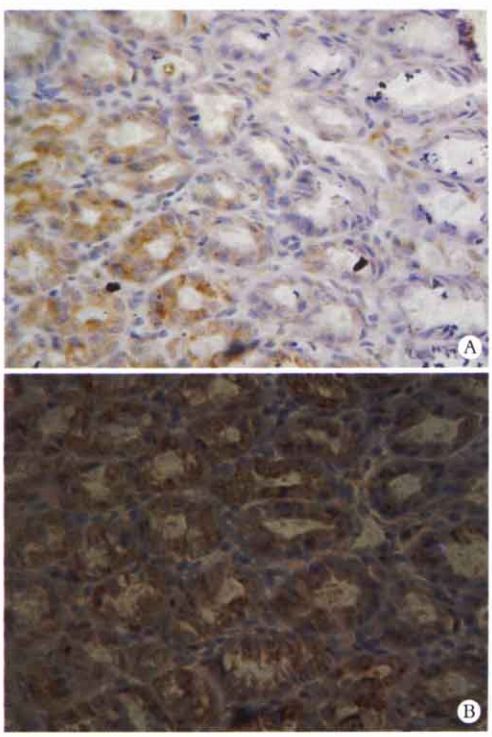
表 1 HS 对烧伤大鼠胃黏膜 UI 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	伤前	伤后时间(t/h)				
		3	6	12	24	48
B 组	0	0.63±0.54	2.14±0.65	8.65±0.92	12.74±1.92	2.54±0.78
HB 组	0	0.58±0.47	0.71±0.56[a]	4.19±0.63[b]	6.28±0.70[b]	0.98±0.67[a]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与 B 组比较

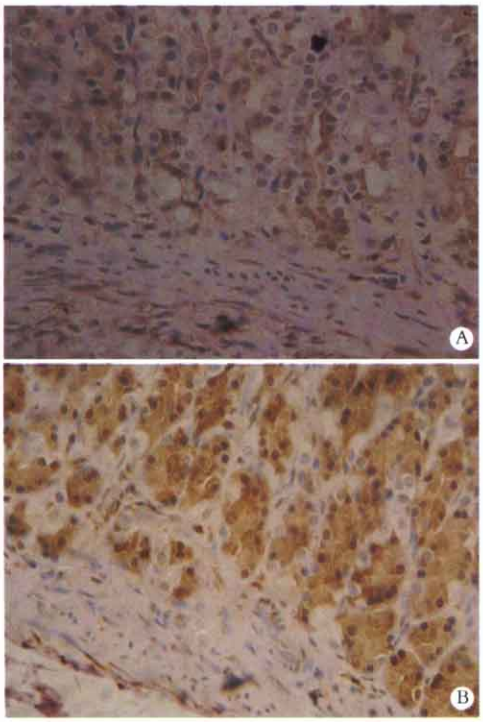
2.2 HS 对烧伤大鼠胃黏膜 HSP60、HSP70 和 iNOS 表达的影响

与 B 组比较,HB 组大鼠胃黏膜 HSP60 及 70 表达显著增强(图 1、2)。大鼠严重烧伤后胃黏膜可见 iNOS 随烧伤时间延长呈逐渐上升趋势,伤后 24 h 表达呈强阳性,经 HS 后再烧伤的 HB 组大鼠,其胃黏膜 iNOS 表达明显受抑(图 3)。各时相点 HSP60、70 和 iNOS 表达图像分析结果 A 值详见表 2。



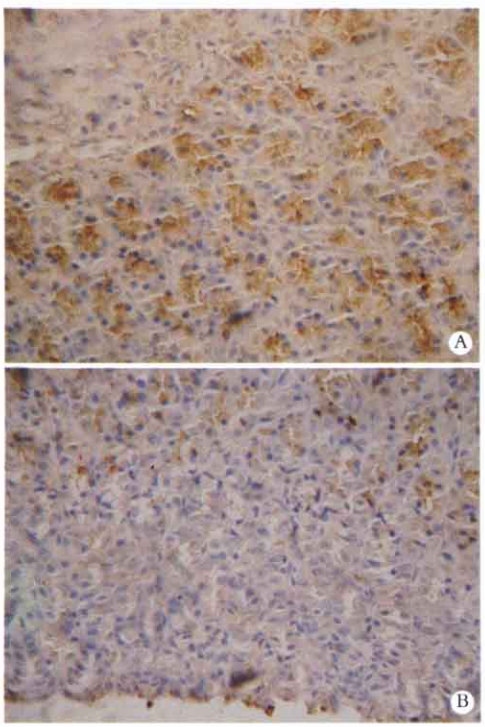
A: B 组; B: HB 组

图 1 两组大鼠伤后 24 h HSP60 免疫组化染色比较 (S-P×400)



A：B 组；B：HB 组

图 2　两组大鼠伤后 24 h HSP70 免疫组化染色比较　（S-P×400）

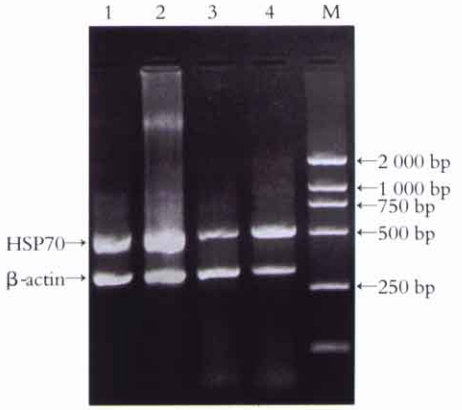


A：B 组；B：HB 组

图 3　两组大鼠伤后 24 h iNOS 免疫组化染色比较　（S-P×400）

2.3　HS 对烧伤大鼠胃黏膜 HSP70 mRNA 表达的影响

两组大鼠伤后 HSP70 mRNA 表达见图 4。各组大鼠胃黏膜 HSP70 mRNA 与 β-actin mRNA 积分比值见表 3。从表 3 可见，HB 组可诱导正常大鼠胃黏膜 HSP70 mRNA 过度表达（$P<0.05$），且在伤后各时相点 HSP70 mRNA 表达均明显高于 B 组（$P<0.05$，$P<0.01$）。



M：标准；1：B 组伤后 12 h；2：HB 组伤后 12 h；3：B 组伤后 24 h；4：HB 组伤后 24 h

图 4　两组大鼠伤后 HSP70 mRNA 表达

表 2　HS 对烧伤大鼠胃黏膜 HSP60、70 及 iNOS 表达的影响（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

组别	伤前	伤后时间（t/h）				
		3	6	12	24	48
B 组						
HSP60	0.28±0.07	0.56±0.10	0.51±0.07	0.48±0.09	0.31±0.04	0.29±0.04
HSP70	0.30±0.05	0.76±0.09	0.72±0.09	0.59±0.08	0.27±0.04	0.31±0.05
iNOS	0	0.09±0.01	0.20±0.04	0.32±0.05	0.54±0.05	0.29±0.04
HB 组						
HSP60	0.39±0.07	0.77±0.10[a]	0.71±0.08[a]	0.68±0.07[a]	0.53±0.08[a]	0.30±0.06
HSP70	0.46±0.05[a]	0.95±0.10[b]	0.86±0.10[b]	0.80±0.09[b]	0.64±0.09[b]	0.44±0.06[a]
iNOS	0	0	0.05±0.001[a]	0.12±0.003[b]	0.20±0.004[b]	0.11±0.001[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 B 组比较

表 3　各组大鼠胃黏膜 HSP70 mRNA 表达变化（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	伤前	伤后时间（t/h）				
		3	6	12	24	48
B 组	0.71±0.06	1.36±0.09	1.09±0.09	0.96±0.09	0.71±0.06	0.72±0.07
HB 组	0.97±0.07[a]	1.96±0.13[b]	1.51±0.10[b]	1.31±0.09[b]	1.03±0.08[b]	0.92±0.08[a]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 B 组比较

2.4　直线回归相关分析

UI 与 HSP70 呈显著负相关（$r=-0.794$，$P<0.05$）。UI 与 iNOS 表达变化呈显著正相关（$r=0.629$，$P<0.05$）。iNOS 与 HSP70 呈显著负相关（$r=-0.798$，$P<0.05$）。

3　讨论

热休克预处理即预先给生物或细胞强烈热刺激致其发生热休克反应，产生热休克蛋白。笔者以前的研究已证实大鼠经热处理诱导热休克蛋白产生后对严重烧伤大鼠急性胃黏膜损伤有保护作用[3,4]。本实验结

果也显示热休克预处理后烧伤大鼠各时相点胃黏膜损伤的程度均低于非热休克预处理组，热休克预处理组胃黏膜组织中 HSP70 及 HSP60 表达的水平较单纯烧伤组明显增高，表明热休克预处理诱导热休克蛋白过度表达后对严重烧伤大鼠胃黏膜有保护作用。但研究表明，热休克预处理对胃黏膜的保护作用除与热休克蛋白有关外，还可能存在别的机制[7]。

一氧化氮合酶存在原生型和诱生型两种同功异构体，一般认为结构型一氧化氮合酶（constitutive nitric oxide synthase，cNOS）表达变化受外界影响较小，而诱生型一氧化氮合酶（iNOS）则易被各种刺激诱导。本实验结晶提示，大鼠严重烧伤后胃黏膜 iNOS 表达显著增强，与胃黏膜损伤程度呈显著正相关（$r=0.629$ $P<0.05$），而经热休克预处理后烧伤大鼠，其胃黏膜 iNOS 表达明显受抑，胃黏膜损伤程度也显著减轻。研究表明，iNOS 在病理状态下表达，可持续释放大量 NO，在胃黏膜损害中起重要作用。有报道在束缚水浸应激期间发现大鼠胃黏膜损害发展时，胃黏膜 iNOS 活性显著增加，cNOS 活性降低[8]。iNOS 催化生成的 NO 具有细胞毒作用，可与氧自由基形成过氧亚硝酸盐，导致细胞脂质过氧化损伤。并可直接或间接与线粒体作用，抑制线粒体呼吸酶活性，参与介导线粒体损伤。严重烧伤后胃黏膜组织缺血、缺氧是导致胃黏膜急性损害的重要原因。缺血缺氧导致组织细胞损害的途径较多，最新研究表明线粒体可能是细胞缺血缺氧损害的核心细胞器[9]，线粒体损伤最终可导致胃黏膜细胞能量代谢障碍，而能量是细胞维持正常结构与功能及生命活动的基础。

本实验研究结果提示，热休克预处理大鼠 iNOS 表达与 HSP70 表达呈显著负相关（$r=-0.798$，$P<0.05$），HSP70 与 UI 呈显著负相关（$r=-0.794$，$P<0.05$）。一般认为 HSPs 作为分子伴侣[10]与新生未折叠或错折叠蛋白质结合，改变其空间结构，加速正确肽链的折叠和重折叠，同时还促进某些变性蛋白质的降解与消除，恢复酶的活性。有研究表明[11]，在脓毒症大鼠模型中，通过亚砷酸钠诱导 HSPs 过度表达后，可抑制 iNOS 表达。笔者推测热休克预处理后诱导产生过量表达的 HSPs 是否通过分子伴侣作用促进病理性大量表达的 iNOS 降解和清除，降低其对胃黏膜组织细胞的毒性作用，但具体机制如何，尚需进一步的研究来证实。

参考文献：

[1] Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek S J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury [J]. J Physiol Pharmacol, 2002, 53(1): 39-50.

[2] 颜 洪，彭 曦，汪仕良，等. 烧伤大鼠胃组织中一氧化氮合酶的变化观察[J]. 第三军医大学学报，2000，22(12)：1126-1128.

[3] 张红艳，吕农华. 热休克蛋白与应激后胃黏膜保护[J]. 中华消化杂志，2004，24(2)：123-125.

[4] 张红艳，吕农华，谢勇，等. 热休克预处理对大鼠烧伤后急性胃黏膜损伤的保护作用[J]. 现代消化及介入诊疗，2004，9(1)：11-13.

[5] Itoh Y H, Noguchi R. Pre-treatment with mild whole-body heating prevents gastric ulcer induced by restraint and water-immersion stress in rats[J]. Int J Hyperthermia, 2000, 16(2): 183-191.

[6] Guth P H, Aures D, Paulson G. Topical aspirin Plus Hcl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine[J]. Gastroenterology, 1979, 76(1): 88-93.

[7] Oksala N, Alhava E, Paimela H. Heat shock preconditioning and eicosanoid pathways modulate caspase 3-like activity in superficially injured isolated guinea pig gastric mucosa[J]. Eur Surg Res, 2004, 36(2): 67-73.

[8] Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Role of gastric mucosal constitutive and inducible nitric oxide synthases in the development of stress-induced gastric mucosal lesions in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 236(2): 275-279.

[9] 黄跃生. 烧伤早期脏器损害防治的研究进展[J]. 中华烧伤杂志，2003，19(5)：257-260.

[10] Fan H, Kashi R S, Middaugh C R, *et al*. Conformational lability of two molecular chaperones Hsc70 and gp96: effects of pH and temperature[J]. Arch Biochem Biophys, 2006, 447(1): 34-45.

[11] Hauser G J, Wasserloos K, Dayao E K, *et al*. Effect of sodium arsenite on iNOS expression and vascular hyporeactivity associated with cecal ligation and puncture in the rat[J]. Shock, 2001, 15(1): 73-76.

（编辑 张大春）

《军医大学学报》（英文版）征稿启事

Journal of Medical Colleges of PLA 是由3所军医大学和南方医科大学共同主办的、国内外公开发行的综合性医学学术类英文期刊，是中国英文版科技论文统计源期刊，并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库、重庆维普数据库。国内统一刊号：31-1002/R，国际标准刊号：ISSN 1000-1948。双月刊。设有论著、技术与方法、个案报道、交流等栏目。若无彩图，无需缴纳版面费；亦不收取审稿费；无稿酬。投稿要求：中（或大摘要）、英文稿各1份，照片提供3份。电子投稿 E-mail：kimliu@mail.tmmu.com.cn。需以附件形式单独提供 JPG 或 TIF 格式的照片。电子投稿请注明英文版。联系地址：重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部（400038）。电话：（023）68752782。