论著

文章编号:1000-5404(2008)09-0844-04

轴索损伤后热休克蛋白70的变化对Tau蛋白表达的影响

何朝晖,孙晓川,李 峰,江 涌,郑履平 (重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

摘 要:目的 观察大鼠轴索损伤后相应神经元内热休克蛋白(heat shock protein 70,HSP70)和Tau蛋白表达的变化及热应激对其表达的影响,探讨HSP70神经保护作用的机制。方法 将57只雄性Wistar大鼠分为正常对照组(A组,3只)、单纯视神经牵拉伤组(B组,18只)、单纯热应激处理组(C组,18只)和热应激预处理牵拉伤组(D组,18只)。对B组大鼠右侧视神经施予牵拉,对C组大鼠施予热应激处理,D组大鼠经热应激预处理24 h后再对右侧视神经施予牵拉。B、C、D组分别在伤后4、8、16 h,1、3、5 d各处死3只动物。光镜下观察视神经、视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells,RGCs)的形态学变化,免疫组化染色检测各组动物RGCs中HSP70、Tau蛋白的表达情况。结果 牵拉伤后视神经轴索、RGCs的形态发生明显的病理变化,热应激预处理再致伤后上述病理改变有显著改善。单纯牵拉伤可使RGCs中HSP70、Tau蛋白的表达增强,单纯热应激处理后HSP70的表达增强、Tau蛋白的表达不受影响,热应激预处理后再致伤使HSP70的表达明显增强、高峰表达时间提前、维持时间延长,而Tau蛋白的表达明显减弱。结论 Tau蛋白表达增强可能参与了迟发性轴索断裂及迟发性神经元凋亡;HSP70可能通过减轻Tau蛋白的异常聚集而发挥神经保护作用,增强内源性神经保护作用可能是弥漫性轴索损伤治疗的新途径。

关键词:应激,热;热休克蛋白;Tau;轴索损伤
中图法分类号:R341;R446.9;R651.15 文献标识码:A

Protective role of HSP70 in rats after axonal injury by down-regulating Tau expression

HE Zhao-hui, SUN Xiao-chuan, LI Feng, JIANG Yong, ZHENG Lu-ping (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the expressions of heat shock protein 70 (HSP70) and Tau in retinal ganglion cells (RGCs) after stretch injury to right optic nerve in rats and the effect of heat stress on HSP 70 and Tau expressions in order to explore the mechanism of neuroprotective role of HSP70. Methods Fifty-seven male Wistar rats were randomly divided into 4 groups, that is, control group (Group A, 3 rats), stretch-only group (Group B, 18 rats), heat stress group (Group C, 18 rats) and heat stress pretreatment plus stretch group (Group D, 18 rats). Stretch injury was induced in the right optic nerves of rats according to Gennarelli's model stimulating diffuse axonal injury. Heat stress was applied to animals by keeping their rectal temperature up to 42 ℃ in water bath. Animals in Group D inflicted the stretch injury 24 h after heat stress. Three rats respectively from Group B, Group C and Group D were killed at 4, 8 and 16 h, 1, 3 and 5 d after injury respectively. Morphological changes of optic nerves and RGCs after stretch injury were examined under light microscope. The expressions of HSP70 and Tau in RGCs were observed using immunohistochemistry. Results Obvious pathological changes of axons and RGCs after stretch injury were identified morphologically or quantitatively, and significantly ameliorated through pretreatment with heat stress before stretch injury. The increased expressions of HSP70 and Tau in RGCs occurred Group B. The increased expression of HSP70 and no change of expression of Tau were observed in Group C. A much more enhanced expression of HSP 70 with an earlier peak and longer maintenance period and a significantly decreased expression of Tau were found in Group D. Conclusion The increased expression of Tau is associated to delayed axotomy and neuron apoptosis. The neuroprotection of HSP70 is likely based its effect on reducing aggregation of Tau. A new approach to treatment of diffuse axonal injury (DAI) may be developed through the enhancement of intrinsic neuroprotective functions.

Key words: stress; heat; heat shock protein 70; Tau; axonal injuries

作者简介:何朝晖,男,重庆市人,博士,副主任医师,主要从事颅脑损伤方面的研究,发表论文23篇。电话:(023)89011150,E-mail:geno_he@yahoo.com.cn
通信作者:孙晓川,电话:(023)89011152,E-mail:sunxch@cta.cq.cn
收稿日期:2007-03-19 修回日期:2007-09-08

在颅脑外伤中，弥漫性轴索损伤（diffuse axonal injury，DAI）是最为常见、后遗症最为严重的损伤类型之一，至今尚缺乏针对性的有效治疗手段。近年来，DAI 后发生迟发性轴索断裂的观念已为越来越多的学者所接受[1,2]。临床观察表明，部分 DAI 患者可有相当程度的功能恢复，提示有相当部分的受损轴索能避免发生延迟性断裂，并出现结构修复及功能恢复。这是否意味着轴索损伤后早期机体可能存在某种自我保护机制，是否意味着某种新的治疗途径的可能，本实验将进行探讨。

1　材料与方法

1.1　大鼠分组与致伤

成年健康雄性 Wistar 大鼠 57 只，体质量（250 ± 20）g，分为 4 组：正常对照组（A 组）3 只、单纯视神经牵拉伤组（B 组）18 只、单纯热应激处理组（C 组）18 只、热应激预处理牵拉伤组（D 组）18 只。B、C、D 组按大鼠处死时间又各下设 6 个时相点：4、8、16 h、1、3、5 d，每个时相点 3 只大鼠。A 组除麻醉外不作任何处理；B 组按本课题组已报道的致伤方式对大鼠右侧视神经施予牵拉[1]；C 组予以热应激处理：腹腔注射麻醉，将大鼠置于 45 ℃水浴箱中，使其肛温升至 42 ℃后，转至 42 ℃水浴箱中维持 15 min，然后放置室温恢复 24 h；D 组经热应激预处理 24 h 后按 B 组方式致伤。

1.2　病理取材

B、C、D 组大鼠在各个时相点腹腔注射麻醉后，开胸经左心室升主动脉插管，予等渗盐水 100 ml 快速冲洗，40 g/L 多聚甲醛/0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS，4 ℃，pH 7.4）灌注 400 ml。切开右眼外眦，向前牵拉眼球，暴露视神经，在球后视神经 5 mm 处剪断，将眼球连同视神经放入 40 g/L 多聚甲醛/0.1 mol/L PBS，4 ℃冰箱固定 24 h。A 组大鼠腹腔注射麻醉后用上述方法取材。标本常规脱水、浸蜡。每只大鼠的组织蜡块以 5 μm 厚度连续切片 8 张，其中 4 张行 HE 染色，其余 4 张行免疫组化染色。

1.3　HSP70、Tau 蛋白免疫组化染色

切片常规脱蜡脱水，体积分数 3% H_2O_2 灭活内源性酶，微波修复抗原。滴加山羊血清封闭液，室温 20 min；HSP70 一抗（或 Tau 一抗）（1∶100，武汉博士德公司），4 ℃冰箱过夜；滴加二抗工作液，37 ℃ 20 min；滴加链霉素亲和素-过氧化合酶复合物（SABC），37 ℃ 20 min。联苯二胺（DAB）显色，苏木精复染；脱水透明，中性树胶封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4　图像分析

1.4.1　组织病理学观察　　光镜下对来自 A、B、C、D 组的 HE 染色切片进行病理学检查。

1.4.2　视网膜神经节细胞（retinal ganglion cells，RGCs）计数　　本课题组前期的实验结果显示，单纯热应激处理对 RGCs 计数无明显影响；大鼠轴索损伤后 RGCs 数量在伤后 1 ~ 3 d 开始减少，第 5 天达到高峰，并可持续至伤后 1 周以上[1]。故本次实验只对 A 组、B 组 5 d 和 D 组 5 d 的 RGCs 进行计数。从每只大鼠选择 1 张 HE 染色切片，光镜下恒定倍数（×200）观察。在每张 HE 切片上选取 4 个视野，计数每个视野的 RGCs，每组共产生 12 个视野，同时计算每组每个视野 RGCs 平均数。

1.4.3　HSP70、Tau 蛋白表达　　选择视网膜 4 个视野及视神经 4 个视野，分别拍摄照片各 4 张，这样每个时相点共有 12 张视网膜照片和 12 张视神经照片。将全部照片输入计算机，应用北航 CM-2000B 型生物医学图像分析系统进行处理，自动得出每个时相点平均吸光度值。吸光度值越高，说明阳性表达越强。

1.5　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较行 q 检验。

2　结果

2.1　组织病理学观察

2.1.1　正常视网膜、视神经　　视网膜由分界清楚的 3 层细胞组成：外核层细胞、内核层细胞和 RGCs。RGCs 呈单层排列，其轴索穿出筛板后成为球后视神经。正常视神经纤维排列紧密、整齐。

2.1.2　B、D 组视网膜及视神经的病理改变　　视神经牵拉伤后 5 d，RGCs 细胞体空泡化，细胞脱失现象明显（图 1）。热应激预处理再致伤后 5 d，RGCs 的形态、数量未见明显异常（图 2）。视神经牵拉伤伤后 16 h，视神经出现脱髓鞘前期改变，空泡增多。伤后 5 d，视神经纤维排列紊乱，分布稀疏。热应激预处理再致伤后 3 d，视神经纤维形态学改变不明显；伤后 5 d，视神经纤维排列比较整齐，分布有序（图 3）。

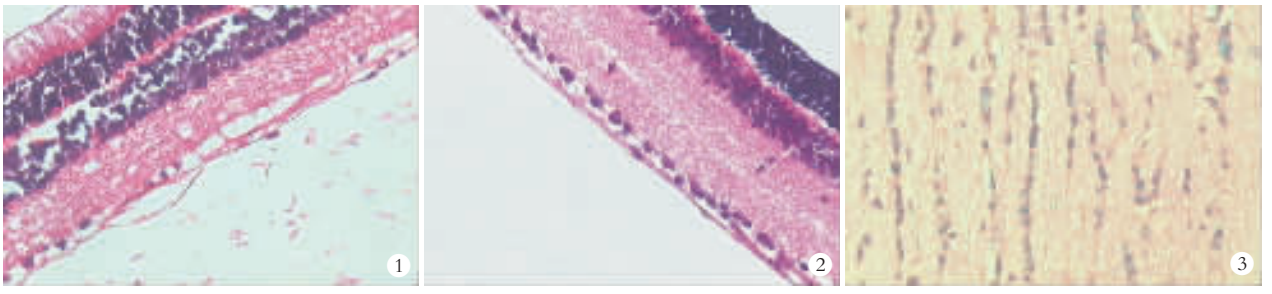


图 1　单纯视神经牵拉伤后 5 d 的视网膜神经节细胞　（HE ×200）

图 2　热应激预处理再致伤后 5 d 的视网膜神经节细胞　（HE ×200）

图 3　热应激预处理再致伤后 5 d 的视神经纤维　（HE ×200）

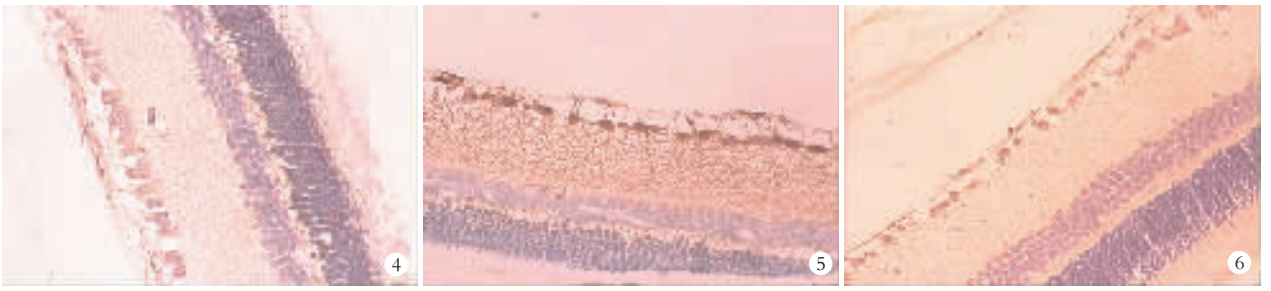


图4 单纯牵拉伤后1 d RGCs HSP70 阳性表达 (SABC×200)

图5 热应激预处理再致伤后16 h RGCs HSP70 强阳性表达 (SABC×200)

图6 单纯牵拉伤后8 h RGCs Tau 蛋白阳性表达 (SABC×200)

2.1.3 A、B 组及 D 组间 RGCs 数量比较 A、B 组 5 d 及 D 组 5 d RGCs 数分别为(26.5±1.3)、(7.2±4.6)、(25.3±2.1)。B 组 RGCs 数量低于 A 组和 D 组($P<0.01$),但 A 组与 D 组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 视神经牵拉伤后 HSP70 表达的变化及热应激处理对其表达的影响

A 组 RGCs 中 HSP70 呈弱阳性表达。B 组 RGCs 中 HSP70 的表达在各个时相点明显增加,1 d 达到高峰(图 4)。C 组 RGCs 中 HSP70 阳性表达与 A 组比较也有明显增强,除 5 d 外,差异均有统计学意义($P<0.05$)。D 组 RGCs 中 HSP70 阳性表达增强更加明显(图 5),其特点是在伤后早期更为显著,高峰时相点比 B、C 组提前,维持时间比 C 组长。见表 1。

2.3 视神经牵拉伤后 Tau 蛋白表达的变化及热应激处理对其表达的影响

A 组 RGCs 中 Tau 蛋白呈阳性表达。B 组伤后 4~16 h 表达增加,8 h 达高峰(图 6);1 d 后则降低到正常水平以下。C 组阳性表达与 A 组相比无显著性差异($P>0.05$)。D 组 RGCs 中 Tau 蛋白牵拉伤后 4 h 表达下降,1 d 降至最低;3 d 恢复到 C 组水平(表 2)。

表1 视神经牵拉伤后不同时间 RGCs 中 HSP70 表达的变化及热应激的影响($n=12$, $\bar{x}\pm s$)

组别	4 h	8 h	16 h	1 d	3 d	5 d
B 组	0.22 ± 0.06^{a}	0.23 ± 0.07^{a}	0.26 ± 0.04^{b}	0.28 ± 0.03^{b}	0.22 ± 0.05^{a}	0.21 ± 0.04^{a}
C 组	0.20 ± 0.03^{a}	0.20 ± 0.03^{a}	0.20 ± 0.03^{a}	0.21 ± 0.04^{a}	0.20 ± 0.03^{a}	0.19 ± 0.02
D 组	0.22 ± 0.04^{b}	0.25 ± 0.07^{bc}	0.31 ± 0.05^{bd}	0.25 ± 0.06^{bc}	0.21 ± 0.04^{a}	0.20 ± 0.03^{a}

A 组:0.18±0.04;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 A 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 C 组比较

表2 视神经牵拉伤后不同时间 RGCs 中 Tau 蛋白表达的变化及热应激的影响($n=12$, $\bar{x}\pm s$)

组别	4 h	8 h	16 h	1 d	3 d	5 d
B 组	0.29 ± 0.05^{a}	0.33 ± 0.04^{b}	0.27 ± 0.03^{a}	0.23 ± 0.03^{a}	0.20 ± 0.04^{b}	0.24 ± 0.02
C 组	0.25 ± 0.05	0.25 ± 0.05	0.25 ± 0.05	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.05	0.25 ± 0.04
D 组	0.23 ± 0.04	0.21 ± 0.05^{ac}	0.20 ± 0.06^{ac}	0.18 ± 0.03^{bd}	0.24 ± 0.04	0.25 ± 0.03

A 组:0.25±0.06;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 A 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 C 组比较

3 讨论

我们曾研究发现,视神经牵拉伤 4 h 后,大鼠轴突细胞骨架有显著的超微结构的变化,不但有微管数量的减少,提示有微管解聚发生,而且相互间的排列分布也被打乱,从而造成轴浆流运输中断,轴索肿胀,并由此引发连锁病理反应,最终于伤后数小时发生轴索中断,即迟发性轴索断裂[2]。而导致其根本病理变化微管解聚的更深层次的原因有待于进一步探讨。

3.1 Tau 蛋白与迟发性轴索断裂及神经元凋亡

微管由微管蛋白(tubulin)和微管相关蛋白(microtubule-associated protein, MAP)组成,Tau 蛋白是一种神经元 MAP,生理条件下广泛存在于神经元内,它的功能在于与微管蛋白结合促进其聚合形成微管,并维持已形成微管的稳定性。

Tau 蛋白本身是一种磷酸蛋白,主要通过磷酸化和去磷酸化调节,进而影响微管系统的装配和稳定性。在 Alzheimer 病变神经元中,异常过度磷酸化的 Tau 蛋白聚集形成双螺旋细丝(paired helical filaments, PHFs),PHFs 螺旋缠绕形成神经元纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs),异常 Tau 蛋白不仅丧失了促进微管组装的能力,而且促进正常微管相关蛋白与微管的分离,使微管崩解[3]。而轴索损伤后发生迟发性轴索断裂是否与 Tau 蛋白的异常变化引发的微管崩解有关,国内外文献尚少见报道。

本研究结果显示,视神经牵拉伤 4~16 h 后 RGCs 中 Tau 蛋白表达增加,并在 8 h 达到高峰。Tau 蛋白表达增加可能是由于机械性的损伤造成轴浆流运输阻滞导致 Tau 蛋白在神经元内异常聚积[4]。我们曾报道,大鼠视神经牵拉伤 4 h 后,微管不但排列紊乱,且数量减少甚至消失[2]。Tau 蛋白表达异常与微管崩解在时相上的重叠提示二者的变化具有相关性,一方面 Tau 蛋白的异常聚积可使新的微管等细胞骨架成份合成障碍,另一方面可导致微管崩解增加,使轴突内微管数目明显下降,从而进一步影响正常的轴浆转运,形成恶性循环,导致继发性轴索断裂[5]。我们认为,轴索损伤后 Tau 蛋白的异常变化能够在一定程度上解释受损轴索在经历数小时的肿胀期后再出现迟发性轴索断裂的现象。

我们以前的研究[1]及本次实验均证实大鼠视神经牵拉伤后发生迟发性神经元凋亡，导致 RGCs 数量减少。Eizenberg 等[6]认为凋亡细胞的形态变化之一是膜大泡的形成，而膜大泡的形成正是细胞骨架变化的结果。Tau 蛋白的异常聚积可使微管结构失去稳定性，引起 Bcl-2 磷酸化，导致 Bcl-2 与 Bax 结合能力下降，除本身失去抗凋亡能力外，也释放了后者的促凋亡活性[7]。神经元凋亡又可导致胞体神经营养因子分泌功能下降，新的微管微丝等细胞骨架成份合成障碍，受损轴突进一步变性、坏死，最终导致胞体及其轴突消失[4]。因此我们认为，轴索损伤后 Tau 蛋白的增高还与迟发性神经元凋亡有关。

3.2　HSP 对 Tau 蛋白表达的影响

目前认为，HSP 的诱导表达是生物体在长期进化过程中保留下来的自我保护机制之一。我们先前的实验研究已经证实，HSP70 能明显改善轴索损伤后的病理变化[8]。

HSP70 作为一种分子伴侣，可与蛋白质结合，促进蛋白质的正确折叠，同时可消除变性蛋白质或与变性蛋白质结合以维持蛋白自稳[9]。研究表明，HSP70 水平增高可降低 Tau 蛋白磷酸化程度，增强 Tau 蛋白和微管的结合能力，抑制 PHFs 螺旋缠绕形成神经元纤维缠结，从而增强新生细胞骨架的合成，减轻微管的崩解，起到神经保护作用[10]。本研究对 HSP70 是否通过调节 Tau 蛋白的表达而发挥神经保护作用进行了探讨。

本实验结果显示，视神经牵拉伤 4 h 后 RGCs 中 HSP70 表达增加，1 d 达到高峰，5 d 仍然维持在较高水平。牵拉伤 4 h 后 RGCs 中 Tau 蛋白也表达增加，8 h 达到高峰。组织病理学检查结果表明，视神经遭受牵拉伤后，视神经、RGCs 先后表现出损伤征象，并逐渐加重，至伤后 5 d 病理改变最为明显。Tomimoto 等[11]也发现，在不可逆损害的神经元中 HSP70 的表达上调，但在可逆性损伤的神经元中，HSP70 的表达更早、更强烈，提示 HSP70 的表达越早、越强烈，对神经元的保护作用就越强。我们认为，尽管牵拉伤可诱导 RGCs 增强表达 HSP70，启动内源性保护机制，但尚不能充分调节或抑制 Tau 蛋白的表达，Tau 蛋白的表达在伤后增强，并能在 HSP70 表达高峰前达到峰值，说明单纯牵拉伤诱导的 HSP70 表达尚不够强、不够快，所产生的神经保护作用有限，尚不具备充分足够的神经保护作用，故不能避免或减轻伤后病理变化的发生及发展，

本实验结果还提示，热应激处理后再施予牵拉伤，HSP70 表达增加更加显著，明显强于单纯牵拉伤组，且高峰时间提前，3 d 才降至单纯热应激组水平，但仍然高于正常对照组。我们比较观察到，热应激预处理后再施予牵拉伤，RGCs 中 Tau 蛋白伤后 4 h 表达下降并低于正常对照组，1 d 降至最低。组织病理学检查结果显示，与单纯牵拉伤后 RGCs 层胞体空泡化、细胞脱失现象相比，热应激预处理再致伤后 5 d，RGCs 的形态、数量未见明显异常。以上结果均表明，经过热应激预处理后再施予牵拉伤可显著提高 RGCs 中 HSP70 的表达，其表达高峰时间提前，维持时间延长。HSP70 水平明显增高可增强对神经元内异常聚积的 Tau 蛋白清除，致 Tau 蛋白表达明显减弱，进而减轻或消除由 Tau 蛋白的异常聚积诱发的一系列病理反应，从而达到神经保护作用。因此，可以认为，热应激可显著提高 RGCs 中 HSP70 的表达，进而通过减轻 Tau 蛋白的异常聚集发挥神经保护作用。

以上研究结果提示，选择合适的刺激手段可提高 HSP70 的表达以增强其神经保护作用可能是治疗 DAI 的一种新的途径。相信随着生物技术研究的发展，HSP 将在不远的将来被应用于临床，为颅脑损伤患者解除病痛。

参考文献：

[1] 孙晓川，卢海涛，郑履平，等. 弥漫性轴索损伤对神经元影响的实验研究[J]. 创伤外科杂志，2003，5(6)：426－428.

[2] 孙晓川. 轴突细胞骨架对非中断性轴索损伤的反应及在亚低温治疗后的早期改变[J]. 中华创伤杂志，2000，16(10)：585－588.

[3] Jenkins S M，Zinnerman M，Garner C，*et al*. Modulation of tau phosphorylation and intracellular localization by cellular stress. [J] Biochem J，2000，345 Pt 2：263－270.

[4] Kanayama G，Takeda M，Niigawa H，*et al*. The effects of repetitive mild brain injury on cytoskeletal protein and behavior[J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol，1996，18(2)：105－115.

[5] 孙晓川，Maxwell W L，Graham D I，等. 视神经轴索损伤早期郎飞结超微结构研究[J]. 中华创伤杂志，1999，15(6)：422－425.

[6] Eizenberg O，Faber-Elman A，Gottlieb E，*et al*. p53 plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of central nervous system-associated cells[J]. Mol Cell Biol，1996，16(9)：5178－5185.

[7] 褚燕琦，李　林. Tau 蛋白的磷酸化与 Alzheimer 病的神经元凋亡[J]. 中国老年学杂志，2005，25(3)：351－354.

[8] 李　峰，孙晓川，唐文渊，等. 热应激对大鼠轴索损伤的保护作用[J]. 中华创伤杂志，2005，21(4)：254－259.

[9] 李晓鲁，彭毅志，袁志强，等. HSP70 对严重烧伤大鼠保护作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(23)：2126－2128.

[10] Dou F，Netzer W J，Tanemura K，*et al*. Chaperones increase association of tau protein with microtubules[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2003，100(2)：721－726.

[11] Tomimoto H，Takemoto O，Akiguchi I，*et al*. Immunoelectron microscopic study of c-Fos，c-Jun and heat shock protein after transient cerebral ischemia in gerbils[J]. Acta Neuropathol (Berl)，1999，97(1)：22－30.

（编辑　邓强庭）