基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-1039-03

失血性休克大鼠海马中 HSP70 表达及死后稳定性研究

曹峻华,邓世雄
(重庆医科大学基础医学院法医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨失血性休克死亡大鼠海马中热休克蛋白(Heat-shock protein 70,HSP70)的表达情况以及其死后稳定性。方法:健康 SD 大鼠 105 只,随机分成 5 组:正常组、假手术组、失血性休克组、创伤对照组、死后稳定性组。采用放血法使大鼠动脉血压降至 40 mmHg,建立大鼠失血性休克模型(休克组、稳定性组)及重物砸伤脑组织建立脑挫伤模型(创伤组),运用免疫组化和图像分析技术,检测生前以及死后不同时间点大鼠海马中 HSP70 的表达变化规律。结果:与正常组、假手术组和创伤对照组比较,失血性休克 1h 后各亚组海马 HSP70 均表达明显增强($P<0.01$),死后稳定性组各时间点 HSP70 表达无显著性差异($P>0.05$)。结论:HSP70 在失血性休克大鼠海马中特异性表达,在 -20℃条件下,死后稳定性好。

【关键词】免疫组织化学;热休克蛋白;失血性休克;死后稳定性
【中国图书分类法分类号】R795.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-22

Expression and postmortem stability of HSP70 in hippocampus of hemorrhagic shock rat

CAO Jun-hua, et al
(*Department of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression and postmortem stability of HSP70 in hippocampus of hemorrhagic shock rat. *Methods*: 105 healthy SD rats were randomly divided into 5 groups: normal group, sham operation group, hemorrhagic shock group, traumatic control group and postmortem stability group. In hemorrhagic shock group and postmortem stability group, rats were submitted by controlled bleeding, with the mean arterial pressure kept around 40mmHg. And in traumatic group, brain contusion was induced by piston impact. After that, the regulation of HSP70 expression in hippocampus of each group was detected by immunohistochemistry technique, and evaluated with image analysis technique and statistic system. *Results*: One hour after hemorrhagic shock, HSP70 expression in hippocampus was significantly higher in each shock subgroups compared with that in normal group and sham group ($P<0.01$), but there was no significant difference in HSP70 expression among each subgroups of postmortem stability group ($P>0.05$). *Conclusion*: HSP70 is specifically expressed in hippocampus of hemorrhagic shock rat, and showed nice postmortem stability under the environment of -20℃.

【Key words】Immunohistochemistry; Heat-shock proteins; Hemorrhagic shock; Postmortem stability

失血性休克死亡是交通事故、医疗责任事故以及刑事犯罪中一个常见的原因,如何利用比较客观准确的方法推断出血至死亡所经历的时间,是法医病理学上的一大难题。热休克蛋白 70(Heat-shock protein 70,HSP70)作为缺血缺氧所诱导的一种细胞保护性物质而日益受到医学界的广泛关注,本文拟运用免疫组化技术对失血性休克大鼠海马中 HSP70 表达及死后稳定性作一研究,并探讨其在法医学上的意义。

作者介绍:曹俊华(1981-),男,硕士,
研究方向:法医病理学。
通讯作者:邓世雄,男,教授,E-mail:dengshixiong1963@163.com。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康 SD 大鼠 105 只,体重(230 ± 30)g,雌雄不限(由重庆医科大学实验动物中心提供),随机分为正常组(5 只)、假手术组(5 只)、创伤对照组(25 只)、失血性休克组(25 只)、死后稳定性组(45 只)。其中创伤对照组与失血性休克组各分为 5 个亚组,即创伤 / 休克 0、0.5、1、1.5、2 h 组;死后稳定性组分为 9 个亚组,即死后 6、12 h、1、2、3、4、5、6、7 d 组;每个亚组均 5 只大鼠。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗鼠 HSP70 抗体、SABC 试剂盒和 DAB 显色剂(武汉博士德生物工程有限公司);BL-410 生物实验系统(泰盟科技);

BX-41 显微镜图像采集系统(日本 Olympus 公司);GD-8 型病理影像多媒体操作系统(成都金盘电子科大多媒体技术)。

1.3 模型建立与取材

实验前 12 h 大鼠禁食,自由饮水,实验当日用戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉。失血性休克组大鼠麻醉后仰卧固定于老鼠板上,右侧股动脉插管并接三通管以供观察血压,肝素钠 500 U/kg 全身肝素化,连接注射器放血。采用改良 Wigger's 失血性休克模型,于术毕血压稳定 10 min 后开始放血,在 10min 内将平均动脉血压(MAP)降至 40 mmHg,按实验分组要求分别在血压降至 40 mmHg 即刻(0)、0.5、1、1.5、2 h 后,迅速放血处死大鼠,立即取脑。死后稳定性组大鼠模型建立同失血性休克组,在血压降至 40 mmHg 2 h 后放血处死大鼠,置于 -20℃冰箱,按实验分组要求分别在死后 6、12 h、1、2、3、4、5、6、7 d 取脑。假手术组只插管不放血,于术毕血压稳定 10 min 后断颈处死取脑。正常组直接断颈处死取脑。创伤对照组大鼠麻醉后俯卧位固定于脑立体定向仪上,消毒皮肤,头皮正中切开,切口长 2 cm,剥离骨膜,暴露前囟和左顶骨,用牙科钻在冠状缝后 2 mm,矢状缝左侧 2 mm 处钻一直径 5 mm 圆形骨窗,保持硬膜完整。将撞杆置于硬膜上,用 10 g 砝码从 20 cm 高处沿外周导管坠落, 撞击撞杆从而撞击硬膜,致左顶叶发生脑挫裂伤。打击后切口内滴注 4 万单位硫酸庆大霉素 4、5 滴,骨蜡封闭骨窗,缝合头皮,按实验分组要求分别于伤后即刻(0)、0.5、1、1.5、2 h 取脑。

1.4 标本处理

所有脑组织均 4%多聚甲醛固定 24 h 后,石蜡包埋,取海马部位脑组织冠状连续切片,切片厚 3 μm ,分别做 HE 染色和 HSP70 免疫组化染色,免疫组织化学染色依照 SABC 试剂盒说明书操作,PBS 代替一抗作阴性对照。

1.5 图像分析及统计学处理

各组免疫组织化学染色切片用图像分析仪对阳性反应产物进行定量检测分析,每张切片随机选 5 个高倍视野,测量每个视野的平均光密度(OD 值)。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析,多组间比较采用方差分析,两组间的比较采用 LSD 法,失血性休克组与创伤对照组间的比较用配对 t 检验,$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 常规 HE 染色

正常组、假手术组海马锥体细胞结构清楚。创伤对照组于伤后 0.5 h 出现海马周围血管扩张充血,部分血管间隙增大,随时间延长无其他特殊改变出现。失血性休克组海马于休克后 0.5 h 即出现部分神经元尼氏体消失,细胞核染色浅淡,明显肿胀,呈空泡样,核仁清晰可见,周围毛细血管空虚,随时间延长,变性细胞核逐渐增多,至休克后 2 h,锥体细胞核广泛空泡样变,部分锥体细胞缺失。死后稳定性组海马锥体细胞改变同失血性休克 2 h 组。

2.2 免疫组织化学染色

HSP70 免疫组织化学染色切片中,阳性表达信号为棕黄色。正常组、假手术组呈弱阳性表达,失血性休克组海马组织和血管壁于休克 1 h 后出现阳性表达,此后表达逐渐增强,至 2 h 呈强阳性表达,部分锥体细胞核内也可见阳性表达。创伤对照组仅在血管壁和红细胞见阳性表达,海马组织表达呈弱阳性。死后稳定性各亚组表达情况与休克 2 h 组相似。

2.3 免疫组织化学染色图像分析与统计学处理

见图 1~6,表 1、2。

3 讨 论

HSP70 是机体遭受缺血、缺氧、创伤、感染等各种应急性刺激后诱导 HSP70 基因的表达而产生的一种热休克蛋白。大量的研究表明,在受损的神经元中 HSP70 基因的表达明显上调,HSP70 的合成显著增加,正常脑组织中 HSP70 含量极少,而在缺血时脑中蛋白合成普遍受到抑制的时候,应激反应却

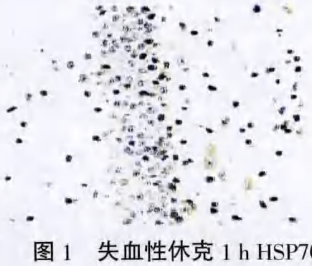


图 1 失血性休克 1 h HSP70 表达(SABC,×400)

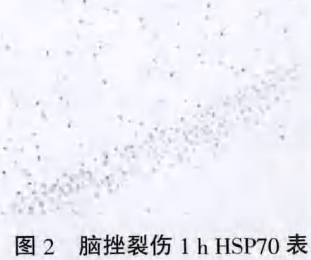


图 2 脑挫裂伤 1 h HSP70 表达(SABC,×400)

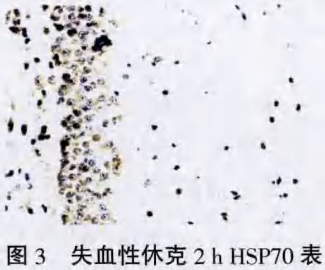


图 3 失血性休克 2 h HSP70 表达(SABC,×400)

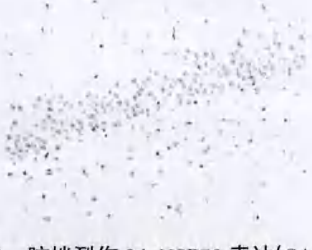


图 4 脑挫裂伤 2 h HSP70 表达(SABC,×400)

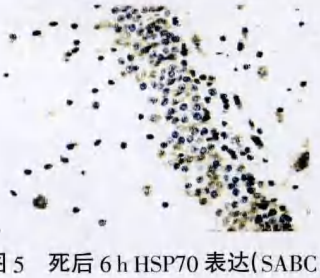


图 5 死后 6 h HSP70 表达(SABC,×400)

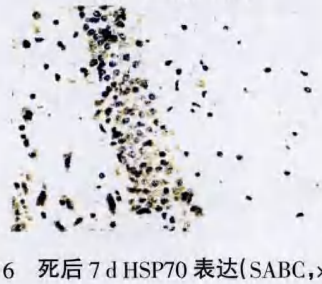


图 6 死后 7 d HSP70 表达(SABC,×400)

表 1 HSP70 在生前各组的表达

组别	失血性休克组	创伤对照组	正常组	假手术组
0.0 h	120.86 ± 0.97	121.46 ± 0.32	120.73 ± 0.94	121.15 ± 0.82
0.5 h	121.12 ± 0.85	121.68 ± 1.06	–	–
1.0 h	132.22 ± 0.88*	122.54 ± 0.15	–	–
1.5 h	141.56 ± 1.05*	123.36 ± 0.24	–	–
2.0 h	157.96 ± 0.49*	124.30 ± 0.19	–	–

注:方差分析,与正常组比较,* $P<0.01$;失血性休克组与创伤对照组配对 t 检验,$P<0.01$

表 2 HSP70 在死后各组的表达

组别	吸光度
0 h	157.96 ± 0.49
6 h	158.24 ± 0.67
12 h	158.22 ± 0.66
1 d	157.96 ± 0.79
2 d	158.28 ± 0.55
3 d	158.42 ± 0.80
4 d	158.48 ± 0.47
5 d	157.70 ± 1.02
6 d	158.34 ± 0.49
7 d	158.16 ± 1.08

注:方差分析,与 0 h 组比较及各相邻组比比较,差异无统计学意义,$P>0.05$

可诱导 HSP70 的表达。HSP70 具有神经保护作用,Li[1]等研究发现,缺血脑组织中表达 HSP70 的神经元形态上保持完整并具有活性,而未表达 HSP70 的神经元则坏死,或者没有受到应激。经全脑缺血预处理后的 HSP70 表达明显上调的海马,其对缺血缺氧的耐受能力明显增加。

失血性休克发生后个体的存活时间推断,对于确定案发时间、划定犯罪嫌疑人、重建犯罪现场均具有重要意义。统计资料表明,对于未经有效治疗的失血性休克伤者,2 h 内死亡数占总死亡数的 63.49%[2],也有资料显示,非控制性失血性休克大鼠在 2.5 h 内全部死亡[3],而海马组织对缺血缺氧最为敏感,因此本实验首次使用免疫组织化学的方法,对单纯失血性休克 2 h 内大鼠海马中 HSP70 表达进行研究。实验结果显示,失血性休克 1 h 组海马区 HSP70 阳性表达强度较正常组和假手术组即有显著性差异($P<0.01$)。考虑其原因可能为在缺血缺氧早期细胞中即有 HSP70mRNA 的转录,但由于失血性休克发生后机体自身的调节机制,大脑血供并未完全中断,因此直到休克后 1 h,部分受损细胞才合成 HSP70,随着休克持续时间延长,受损细胞数量增加,HSP70 合成也增加。本实验观察的结果,与 Li[1]的研究基本相符。创伤对照组海马的 HSP70 表达一直处于很低的水平,各时间组之间无显著性差异($P>0.05$),而自休克 1 h 组起,休克组与对应的创伤组比较有统计学差异($P<0.01$)。Chen M[4]等在伴随有继发性低氧、轻度低血压的控制性皮质冲压损伤(Controlled cortical impact,CCI)大鼠模型上观察发现,HSP70mRNA 于伤后 6 h 开始在海马区转录,而 HSP70 蛋白则于伤后 24 h 才在海马中表达。本实验观察时间仅至伤后 2 h,因此无法观察到 HSP70 的表达。这提示在失血性休克状态下海马中 HSP70,远较颅脑损伤时表达得早且显著,HSP70 是用于推断失血性休克后存活时间的一个比较特异性指标。

由于冻存尸体时间最长不得超过 1 周[5],本实验将失血性休克 2 h 后死亡大鼠存放于-20℃环境 1 周,以对 HSP70 的死后稳定性进行研究。结果显示,死后 6 h~7 d,各时间组 HSP70 表达强度与死后即刻比较无显著性差异($P>0.05$),各组间比较也无显著性差异($P>0.05$)。这提示,在-20℃条件下,1 周内 HSP70 表达强度受时间因素的影响不大,稳定性好。这可能与低温环境下,各种酶活性处于很低水平,组织自溶和蛋白质降解受到抑制有关。从本实验中我们可以发现,大鼠失血性休克持续 1 h 后,海马中 HSP70 特异性表达,并在-20℃条件下,可稳定表达 1 周。这为失血性休克发生后个体存活时间的推断,提供了一个可供参考的指标,但其在人体中的运用有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Li Y, Chopp M, Garcia J H, et al. Distribution of the 72-kd heat-shock protein as a function of transient focal cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 1992, 23(9): 1292-1298.

[2] 李希兰,程晓斌,姚元章,等.创伤失血性休克的特点及预后分析[J].创伤外科杂志,2003,5(3): 208-210.

[3] 刘良明.有关战(创)上休克早期液体复苏的一些新概念[J].创伤外科杂志,2006,8(2):101-104.

[4] Chen M, Clark R S, Kochanek P M, et al. 72-kDa heat shock protein and mRNA expression after controlled cortical impact injury with hypoxemia in rats [J]. J Neurotrauma, 1998, 15(3): 171-181.

[5] 法医病理学检材的提取、固定、包装、送检方法[S].GA/T148-1996.

(责任编辑:冉明会)