DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.017

论著

文章编号:1000-5404(2004)23-2126-03

HSP70对严重烧伤大鼠保护作用的实验研究

李晓鲁,彭毅志,袁志强,黄跃生,杨宗城 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 寻找对严重烧伤早期缺血缺氧性损伤的可行性保护途径。方法 构建含HSP70的重组腺病毒载体,股静脉注射该腺病毒载体48 h后,检测大鼠严重烧伤后6 h其血清中内毒素及LDH、IL-1α、IL-1β、IL-6、TNF-α细胞因子水平。结果 未转染组大鼠严重烧伤后6 h血清中内毒素及检测的细胞因子水平较正常对照组明显升高。静脉注射含HSP70重组腺病毒组大鼠严重烧伤后血清中上述指标的检测水平与未转染组比较明显降低,但仍显著高于正常对照组。结论 静脉注射含HSP70重组腺病毒可减轻严重烧伤后大鼠的缺血缺氧性损伤,但不能完全阻断该损伤。

关键词:热休克蛋白70(HSP70);腺病毒;烧伤;缺血缺氧
中图法分类号:Q51;R392.11;R644.02 文献标识码:A

Experimental study of protective effect of HSP70 gene transfection on severely burnt rats *in vivo*

LI Xiao-lu, PENG Yi-zhi, YUAN Zhi-qiang, HUANG Yue-sheng, YANG Zong-cheng (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Objective: Objective To find an effective way to attenuate the intestinal hypoxic/ischemic injury following severe burn. Methods The recombinant adenovirus (Ad-HSP70) was constructed by the clone selection. At 48 h after transfection of the adenovirus into the femoral vein, the serum levels of toxin and cytokines LDH, IL-1α, IL-1β, IL-6, and TNF-α were detected by ELISA. Results The toxin and cytokine levels in severely burnt rats were significantly increased as compared with those in the normal control group. However, in the transfected group, the levels were significantly lower than those in the injury group, but still higher than those in the normal control group. Conclusion Ad-HSP70 transfetion in rats could successfully induce HSP70 overexpression in intestinal mucosa, which could protect the rats against the hypixic/ischemic injury in intestinal mucosa after severe burn.

Key words: heat shock protein 70; adenovirus; burn; hypoxia/ischemia

肠道不仅是消化吸收器官,肠粘膜本身也是机体一道十分重要的防御屏障,在严重烧创伤、放射损伤、外科急重症等许多病理情况下均可发生肠粘膜上皮细胞的损伤,肠腔中的大量细菌及内毒素可因此侵入肠系膜淋巴结、内脏器官及体循环,引起肠源性感染。动物实验和临床研究证明,肠源性感染与严重烧伤引起的顽固性休克,难以控制的早期爆发性败血症的发生和发展密切相关,并且在多脏器功能障碍的发病机制中起重要作用。因此,如何减轻肠粘膜损伤及促进损伤后再修复已成为一个重要课题,由于分子量为70×10^3的诱导型热休克蛋白70(heat shock protein70, HSP70)在正常细胞中水平较低,而在应激状态下可显著升高,保护机体(或细胞)在随后的致死性应激中不受或少受伤害,因此成为热休克蛋白中广受关注、研究最深入的一种[1]。因此,我们在实验中选用复制缺陷型腺病毒载体转染外源性HSP70基因,通过腺病毒载体静脉注射观察转染基因过度表达(overexpression)对严重烧伤后肠粘膜的保护作用,并对其相关机制进行探讨。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G199054202);国家杰出青年科学基金资助项目(30125040);全军医学科学技术研究"十五"计划指令性课题(01L066);教育部高等学校骨干教师资助计划项目(2000);军队临床高新技术重大项目(2002)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G199054202), the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30125040), the Mandatory Scientific Research Project of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01L066), the Research Fund for Key Teachers in Higher Institutes of State Education Ministry of China (2000), and the Key Research Program for Clinical High-tech Research of PLA (2002)
作者简介:李晓鲁(1973-),女,河南省南阳市人,博士,主治医师,主要从事严重烧伤脏器损害的防治方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754148-8004
收稿日期:2004-09-10;修回日期:2004-11-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　病毒载体制备

含 HSP70 的重组腺病毒载体 Ad-HSP70 由本所制备并鉴定[2]。

1.2　动物准备

健康 Wistar 大鼠 18 只, 体质量 180～220 g, 雌雄不拘, 由第三军医大学实验动物中心提供。称重后, 按编号随机分组。

1.3　器材准备

用于内毒素检测的塑料制品清洗干净后在 30% 双氧水中浸泡 4 h, 再用无热原水冲洗干净烘干后 ^{60}Co 照射。玻璃器材清洗干净后烘干经 ^{60}Co 照射。

1.4　烧伤模型的制作

按本所常规制作。1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉, 背部推毛, 20% Na_2S 脱毛并清洁皮肤, 将脱毛区置于(92±1)℃水浴中 18 s, 造成 30%TBSA Ⅲ度烫伤(病理切片证实, 本研究通称烧伤), 伤后立即按 40 ml/kg 腹腔注入生理盐水抗休克, 烧伤后动物分笼饲养, 自由进食饮水。伤后 6 h 观测各项指标。

1.5　实验动物分组及 Ad-HSP70 转染方法[3]

随机将动物分为正常对照组(除不予烧伤外, 其余处理均与烧伤组相同), 单纯烧伤组, Ad-HSP70 静脉注射转染烧伤组。每组 6 只大鼠。于烫伤前 48 h, 取－80 ℃冻存的腺病毒液, 37 ℃水浴快速溶解, 检测病毒滴度为(3.57×10^{10}) pfu/ml。混匀后, 无菌操作, 取 2 ml 进行相应组别大鼠股静脉注射, 对照组注射 2 ml 生理盐水。

1.6　血清学指标检测

血清中乳酸脱氢酶活力测定(南京建成生物工程有限公司试剂盒)。乳酸脱氢酶能催化乳酸生成丙酮酸, 丙酮酸与 2, 4-二硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯腙, 在碱性溶液中呈棕红色, 通过比色可求出酶活力。

内毒素测定(南京建成生物工程有限公司试剂盒): 去除抑制因子: 取大鼠静脉血 1 ml 置于无热原肝素中, 500 r/min 离心 5 min, 取血浆 0.1 ml, 加入无热原生理盐水 0.2 ml、Tris-HCl 缓冲液 0.2 ml 混匀, 置于 100 ℃水浴加热 10 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液检测。

IL-1α、IL-1β、IL-6、TNF-α 测定(ENDOGEN 公司试剂盒): 采用 ELISA 方法。按说明书操作。

1.7　统计学处理

结果采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析及均数间多重比较。

2　结果

2.1　重组腺病毒 Ad-HSP70 静脉注射转染对烧伤大鼠血清中 LDH 活力的影响

大鼠烧伤后血清中 LDH 活力较对照组明显升高($F=160.345$, $P=0.000$), 转染组大鼠烧伤后血清中 LDH 活力较烧伤组下降明显($F=109.271$, $P=0.000$), 见图 1。

2.2　静脉注射转染重组腺病毒 Ad-HSP70 对烧伤大鼠血清内毒素水平的影响

大鼠严重烧伤后 6 h 血清内毒素水平即较对照组明显上升($F=85.621$, $P=0.000$)。静脉注射转染组大鼠烧伤后内毒素水平较单纯烧伤组明显下降($F=160.196$, $P=0.000$), 见图 2。

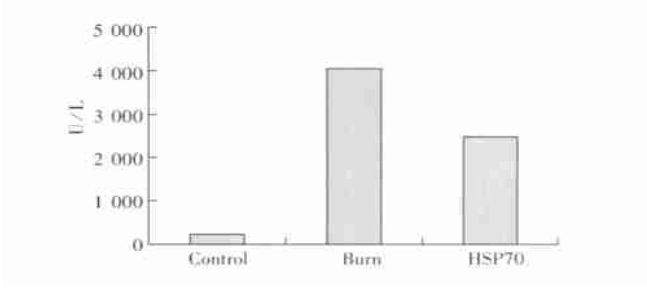


图 1　重组腺病毒 **Ad-HSP70** 静脉注射转染对烧伤大鼠血清中 **LDH** 活力的影响($n=6$)

Fig 1　Effects of recombinant Ad-HSP70 transfection on serum LDH activity in burnt rats ($n=6$)

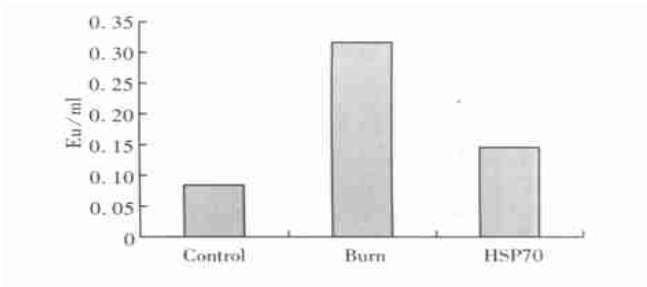


图 2　重组腺病毒 **Ad-HSP70** 静脉注射转染对烧伤大鼠血清中内毒素水平的影响($n=6$)

Fig 2　Effects of recombinant Ad-HSP70 transfection on serum endotoxin in burnt rats ($n=6$)

2.3　静脉注射转染重组腺病毒 Ad-HSP70 对烧伤大鼠血清中细胞因子水平的影响

大鼠严重烧伤后 6 h 血清中细胞因子 IL-1α、IL-1β、IL-6 与 TNF-α 水平均较伤前明显升高, 各组 F 值分别是 20.117, 20.527, 94.892, 33.189, P 值均为 0.000。相差非常显著。静脉注射转染重组腺病毒 Ad-HSP70 后与正常对照组比较 P 值分别为 0.008, 0.013, 0.000, 0.000。与单纯烧伤组比较 P 值分别为 0.005, 0.003, 0.000, 0.000。显示静脉注射转染重组腺病毒 Ad-HSP70 可成功诱导 HSP70 在大鼠肠粘膜的过度表达, 从而明显改善大鼠严重烧伤后血清中上述细胞因子水平(表 1)。

表 1　重组腺病毒 **Ad-HSP70** 静脉注射转染对烧伤大鼠血清中细胞因子水平变化的影响($n=6$, pg/ml)

Tab 1　Effects of recombinant Ad-HSP70 transfection on serum cytokines in burnt rats ($n=6$, pg/ml)

Group	IL-1α	IL-1β	IL-6	TNF-α
Control	7.28±3.81	8.33±2.99	30.92±6.53	56.00±11.71
Burn	35.96±10.04 **	141.66±63.07 **	399 ±93.07 **	297.71±78.57 **
HSP70	22.36±7.64 **##	66.8 ±38.14 **##	185.5 ±65.23 **##	105.14±50.74 **##

**: $P<0.01$, *vs* control; ##: $P<0.01$, *vs* burn

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

大量动物实验和临床资料表明严重烧伤可导致胃肠道粘膜损伤，使肠系膜血管收缩从而损伤肠粘膜屏障的完整性[4]。可引起小肠肠上皮细胞凋亡增加，屏障功能破坏。近来研究表明，谷氨酰胺对维持烧伤后肠道功能有重要作用，其主要机制与诱导 HSP70 的过度表达有关[5]。

乳酸脱氢酶（LDH）是糖酵酶，广泛存在于机体组织细胞内，当细胞受到损伤时可释放出来，损伤越严重，该酶释放量越多。本实验研究结果表明烧伤 6 h 后大鼠血清中 LDH 活性明显上升，而用腺病毒载体 Ad-HSP70 预处理后 LDH 活性较单纯烧伤组降低明显，但与正常对照组比较仍有明确的升高，证明腺病毒载体介导的 HSP70 基因过度表达可拮抗严重烧伤大鼠的肠粘膜损伤，减轻细胞损伤，从而抑制 LDH 释放入血，但并不能完全阻断或修复该损伤。

肠道是体内最大的储内毒素库，血浆内毒素水平可间接反映肠粘膜完整性。烧伤后血浆内毒素水平明显高于伤前，且伤后 1 d 就达峰值，并伴随整个伤程高居不下。说明伤后肠粘膜损伤发生早，持续时间长。肠道缺血、缺氧造成肠蠕动减弱，肠道菌群发生变化，G^- 杆菌大量繁殖，成为肠源性感染的促进因素[6]。肠上皮细胞增殖受抑是肠粘膜屏障完整性破坏的又一原因，肠道具有较强的自我修复能力[7]。而严重烧伤后强烈的应激反应导致肠道长时间缺血缺氧，将严重削弱肠上皮细胞的增殖活性。实验结果显示，大鼠烧伤后肠粘膜的修复能力明显低于伤前，在此基础上加重肠粘膜缺血、缺氧性损害，粘膜的屏障功能障碍，通透性增加。肠道蓄积的 LPS 通过门静脉循入肝脏，激活枯否细胞产生大量的细胞因子，放大炎症介质的级联反应，进一步加重脏器损害。

TNF 是由多种单核吞噬细胞产生的细胞因子，是参与炎症反应最重要的介质之一，对其它细胞因子参与炎症反应起诱导和调节作用。IL-6 由 T 细胞、单核细胞等产生，可作为反映机体炎症与疾病严重程度的重要指标[8]。研究显示，烧伤患者血中 TNF、IL-6 及 IL-8 水平在伤后第 1 ~3 天均迅速升高并达峰值或接近峰值。机体所产生高水平的 TNF、IL-6 及 IL-8，一方面与炎症细胞相互作用，加重局部炎症反应；另一方面，高浓度 TNF 可激活细胞因子级联反应，进一步诱发 IL-6、IL-8 释放[9]，因此，整体上看它们间呈正相关。炎症介质反应放大和自身正反馈反应环的存在是创面烧伤脓毒症发生发展的主要机制之一。

我们以往的体外实验已证实，重组腺病毒介导的 HSP70 过度表达可保护肠上皮细胞的缺氧再复氧损伤[10,11]。在本次实验中选择了烧伤大鼠血清中 LPS 及 TNF-α、IL-1、IL-6 等细胞因子指标，观察腺病毒载体 Ad-HSP70 转染对这些细胞因子水平的影响。实验表明大鼠烧伤后 6 h 即出现明确的上述细胞因子水平的明显增高。而利用腺病毒载体 Ad-HSP70 转染预处理大鼠 2 d 后再进行烫伤处理，血清中的相关检测因子水平都有较大幅度下降，与单纯烧伤组比较相差显著。但与对照组比较还是有明显的增高趋势，说明利用腺病毒载体介导的 HSP70 高表达可抑制严重烧伤后大鼠血清 LPS、TNF-α、IL-1、IL-6 等细胞因子的升高，从而进一步减轻炎症介质反应放大和自身正反馈反应环等瀑布效应，减少“二次打击”的发生。但并不能完全阻断炎症反应。该种可降低细胞因子水平的具体机制我们分析与抑制前述烧伤后的损伤机制有关：拮抗缺血缺氧损伤；抑制肠上皮细胞的凋亡；维持肠上皮细胞的增殖、修复能力等。从而保护肠粘膜机械屏障结构（病理标本证实），减轻细菌、内毒素等肠移位的发生，降低了血清中相关细胞因子的表达，从而抑制了炎症介质放大反应和自身正反馈反应，减少了全身性炎症反应综合征的发生，改善动物转归预后。

参考文献：

[1] Tsukimi Y, Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing[J]. Biol Pharm Bull, 2001, 24(1): 1—9.

[2] 李晓鲁，彭毅志，袁志强，等. 含人HSP72重组腺病毒制备及其在肠上皮细胞中的表达[J]. 世界华人消化杂志，2002，10(10)：1162—1165.

[3] Chao J, Kato K, Zhang J J, *et al*. Human adrenomedullin gene delivery protects against cardiovascular remodeling and renal injury[J]. Peptides, 2001, 22(11): 1731—1737.

[4] Ramzy P I, Wolf S E, Irtun O, *et al*. Gut epithelial apoptosis after severe burn: effects of gut hypoperfusion[J]. J Am Coll Sur, 2000, 190(3): 281—287.

[5] Melis G C, ter Wengel N, Boelens P G, *et al*. Glutamine: recent developments in research on the clinical significance of glutamine[J]. Curr Opinion Clin Nutr Metab Care, 2004, 7(1): 59—70.

[6] 马 利，黎 鳌，肖光夏. 肠源性感染的实验研究[J]. 第三军医大学学报，1990，12(1)：1—69.

[7] Gibson P R, Anderson R P, Mariadason J M, *et al*. Protective role of the epithelium of the small intestine and colon[J]. Inflamm Bowel Dis, 1996, 39(2): 279—302.

[8] Biffl W L, Moore E E, Moore F A, *et al*. Interleukine 6 in the injured patient[J]. Ann Surg, 1996, 224(5): 647—664.

[9] Zhou S, Liao X, Li X, *et al*. Poly-D, L-lactide-co-poly (ethylene glycol) microspheres as potential vaccine delivery systems[J]. J Control Release, 2003, 86(2-3): 195—205.

[10] 李晓鲁，袁志强，彭毅志. 重组腺病毒介导的HSP70转染对肠上皮细胞缺氧再复氧损伤的防护作用[J]. 中华医学杂志，2002，82(16)：1102—1104.

[11] 李晓鲁，彭毅志，袁志强. HSP70基因转染对缺氧再复氧肠上皮细胞的生长能力影响的研究[J]. 中国危重病急救医学，2003，15(2)：81—83.

（编辑 刘洪娥）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net