DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.023
第25卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 19
2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

文章编号:1000-5404(2003)19-1737-04

论著

亚砷酸钠诱导HSP70对大鼠烫伤后早期肠粘膜损害的保护作用

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

提 要:目的 研究热休克蛋白70(HSP70)在大鼠烫伤后早期肠粘膜损害中的作用。方法 90只Wistar大鼠随机分为单纯烫伤组(B组)、亚砷酸钠预处理组(SA组)及亚砷酸钠+槲皮酮预处理组(SA+Qu组),另取6只大鼠作为正常对照。Westem blot检测HSP70蛋白表达情况,于30%TBSA Ⅲ度烫伤后3、6、12、24、48 h检测血浆内毒素及D-乳酸含量变化,肠粘膜组织石蜡切片HE染色后观察肠粘膜损害情况。结果 亚砷酸钠预处理可显著诱导HSP70蛋白表达,槲皮酮预处理可明显抑制HSP70的诱导;SA组伤后各时相点小肠组织病理评分明显低于B组,大鼠烫伤后血浆内毒素及D-乳酸水平均有不同程度的升高,SA组伤后多数时相点血浆内毒素及D-乳酸水平显著低于B组,SA+Qu组小肠组织病理评分及血浆D-乳酸和内毒素水平与B组无显著差别。结论 亚砷酸钠诱导的HSP70表达增加可明显减轻大鼠严重烫伤后早期的肠粘膜屏障破坏,降低肠粘膜通透性,减少肠道内毒素移位。

关键词:热休克蛋白;肠道;烧伤
中图法分类号:Q51;R644.02;R914.3 文献标识码:A

Protective effects of HSP70 induced by sodium arsenite on intestinal mucosa injury in scalded rats

YUAN Zhi-qiang, PENG Yi-zhi, LI Xiao-lu, HUANG Yue-sheng, YANG Zong-cheng (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of heat shock protein 70 (HSP70) on intestinal mucosa injury in scalded rats. Methods A total of 90 Wistar rats were randomly divided into 3 groups: simple burn group (Group B), sodium arsenite pretreatment group (Group SA) and sodium arsenite plus quercetin pretreatment group (Group SA+Qu). The other 6 Wistar rats were used as the normal control. HSP70 expression in small intestine samples was determined by Western blotting. Plasma endotoxin and D-lactic acid content were determined at 3, 6, 12, 24 and 48 h after 30% TBSA Ⅲdegree scald. Damage to intestinal mucosa was observed by pathological section with HE staining. Results Sodium arsenite pretreatment could significantly increase HSP70 expression. Quercetin could inhibit HSP70 expression induced by sodium arsenite in the small intestine. Intestinal pathological grading in Group SA was significantly lower than that in Group B at different time points after scald. Plasma endotoxin and D-lactic acid content in Group SA were significantly lower than those in Group B at most time points after scald. There was no difference between Group B and Group SA+Qu. Conclusion The enhanced HSP70 expression induced by sodium arsenite can attenuate the intestinal mucosal barrier injury and decrease the permeability of intestinal mucosa and the translocation of endotoxin from gut in scalded rats.

Key words: heat shock protein; intestine; burn

肠道是对缺血、缺氧损伤最敏感的器官之一,其缺氧性损伤普遍存在于严重创(烧)伤后的病理生理过程中,严重烧伤后,由于肠粘膜屏障损害、免疫功能受抑和肠道菌群紊乱,肠道中的微生物和内毒素可通过受损的肠粘膜屏障侵入到体循环及其它脏器,形成肠源性感染。后者可成为导致全身性炎症反应综合征(SIRS)乃至多脏器功能不全(MODS)的启动因素[1~3]。因此,如何减轻烧伤早期肠粘膜损伤,保护肠粘膜屏障功能已成为目前烧、创伤防治研究的重要课题。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202);全军首批临床高新技术重大项目(2000);全军"十五"指令性课题(01L066);教育部高等学校骨干教师资助计划项目(2000)
作者简介:袁志强(1976-),男,湖南省汝城县人,博士研究生,医师,主要从事烧伤后缺血缺氧性损害及感染防治方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754148-8051
通信作者:彭毅志,电话:(023)68754175;E-mail:yizhipen@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-08-11;修回日期:2003-08-27

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

我们以往的体外研究表明热休克预处理诱导热休克蛋白70(Heat shock protein 70, HSP70)产生可明显减轻肠上皮细胞IEC-6的缺氧再给氧损伤[4]。但诱导HSP70表达对烧伤后肠道损害的影响尚不清楚,本研究采用大鼠烫伤模型,通过亚砷酸钠诱导HSP70表达,观察了其对严重烧伤所致肠道粘膜损害的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

亚砷酸钠、槲皮酮及D-乳酸(Sigma公司),HSP70抗体(Calbiochem公司),羊抗鼠IgG-HRP(北京中山),超信号皮克级western检测试剂盒(美国Pierce公司),D-乳酸脱氢酶(D-LDH, Roche公司),内毒素检测鲎试剂(上海伊华临床科技有限公司),BCA-200蛋白定量试剂盒((Pierce公司),半干转移电泳仪(Pharmacia),紫外分光光度仪(Beckman)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 健康Wistar大鼠90只(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不限,体质量(230±25) g。将动物随机分为3组:单纯烫伤组(B组, n=30),大鼠30%TBSA Ⅲ度烫伤处理;SA预处理组(SA组, n=30),大鼠经腹腔注射SA预处理24 h后,再造成30%TBSA Ⅲ度烫伤;SA+Qu预处理组(SA+Qu组, n=30),大鼠经腹腔注射SA+槲皮酮24 h后,再造成30%TBSA Ⅲ度烫伤。另取6只大鼠作为正常对照组。前3组分别于烧伤后3、6、12、24、48 h活杀大鼠后采集标本。每组各时间点6只大鼠。

1.2.2 烫伤模型 健康成年Wistar大鼠,伤前禁食12 h,1%戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔麻醉,背部电推剃毛,置剃毛区于92 ℃水浴中18 s,造成30%体表面积Ⅲ度烫伤(病理切片证实,本文统称为烧伤)。伤后按40 ml/kg腹腔注入乳酸林格液补液。

1.2.3 HSP70表达的诱导 参考Tsuruma等[5]的方法,健康成年Wistar大鼠9只,通过腹腔注射亚砷酸钠(Sodium arsenite, SA)(6 mg/kg)以诱导HSP70表达(n=3),腹腔注射SA的同时注射槲皮酮(Quercetin, Qu)(5 mg/kg)以阻断HSP70的表达(n=3),在注射药物后24 h处死动物并取回肠(距回盲部约5 cm处)组织标本存于液氮,余下3只大鼠作正常对照。以备Western Blot检测HSP70蛋白表达情况。

1.3 观察指标

1.3.1 HSP70蛋白表达的检测 称取约0.1 g小肠组织并用预冷PBS漂洗2次,加入1 ml RIPA裂解液(含50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% NP-40、1%脱氧胆酸钠、0.1% SDS, 20 μg/ml Aprotinin、20 μg/ml Pepstatin和20 μg/ml PMSF)后用玻璃匀浆器匀浆。15 000× g 离心10 min,收集上清。以BSA作为标准蛋白,采用BCA法测定方法进行蛋白定量。50 μg总蛋白经8%的SDS-PAGE电泳分离,用半干转移电泳仪将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上;之后用50 g/L脱脂奶粉-TBS溶液在室温封闭1 h,加入特异性HSP70(Mouse IgG)一抗在4 ℃条件下保温过夜;TBS洗膜,每次10 min,洗3次;二抗使用羊抗鼠IgG-HRP于37 ℃孵育1 h,再用洗涤液洗3次;之后用化学发光底物孵育,硝酸纤维素膜于暗室中用感光胶片感光、冲洗。所得结果经扫描后用Quantity one软件(Bio-Rad)进行统计学分析。

1.3.2 病理学观察 动物处死后立即取距回盲部约5 cm处回肠组织,10%甲醛固定。脱水后石蜡包埋,切片厚度为2 μm,HE染色后光镜下观察。根据Chiu氏六级评分[6]对小肠的损伤程度进行评定。0分:正常粘膜绒毛;1分:上皮下间隙增大,通常在绒毛的尖端,常伴随有毛细血管淤血;2分:上皮下间隙扩张伴随上皮层同固有层的中度分离;3分:绒毛两侧上皮层大量的同固有层分离,部分绒毛顶端破损;4分:绒毛破损伴随固有层毛细血管暴露,可能观察到固有层的细胞成分增多;5分:固有层破坏和不完整、出血和溃疡。双盲法判读肠粘膜病理切片并记分。

1.3.3 血浆内毒素及D-乳酸含量检测 血浆内毒素标本收集和测定所用的所有器材均经蒸馏水清洗、烘干,高压蒸气消毒后用^{60}Co照射去热原。按各时相点抽取门静脉血于肝素抗凝管中,分离血浆于-20 ℃冻存待测。采用基质偶氮显色法鲎试验测定其内毒素含量,按照试剂盒说明进行操作,结果以EU/L表示。按各时相点抽取腹主动脉血,分离血浆后置于-20 ℃冻存待测。血浆D-乳酸含量参照文献[7]方法改进,简述如下:取血清400 μl,加入5.8 mol/L高氯酸40 μl,充分振荡,冰浴10 min,4 ℃、10 000× g 离心10 min,取上清液200 μl,加入11.6 mol/L KOH 20 μl,充分振荡,冰浴10 min,4 ℃、10 000× g 离心10 min,取上清液125 μl入另一试管,分别加入1.667 g/L尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide-adenine dinucleotide, NAD)溶液(用pH 9.5甘氨酸-肼缓冲液配制)375 μl,600 000 U/L D-LDH(Roche公司)50 μl,置25 ℃水浴90 min,340 nm测定吸光度。另用D-乳酸(Sigma公司)按上述操作绘制标准曲线,根据标准曲线计算血浆D-乳酸含量。

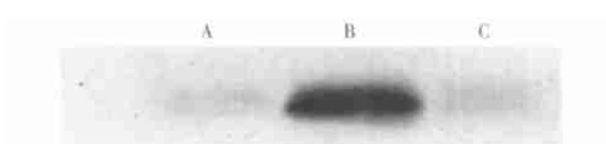
1.4 统计学处理

各项数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0软件进行t检验或方差分析。

2 结果

2.1 小肠组织HSP70蛋白的表达

Western bloting结果表明,正常大鼠小肠组织HSP70蛋白有痕量表达,注射SA后24 h,小肠组织HSP70蛋白表达量明显增加(P<0.01),而注射槲皮素后可以明显阻断其表达,见图1。



A: Control; B: SA pretreatment; C: SA+Qu pretreatment

图1 亚砷酸钠诱导大鼠小肠组织HSP70表达(Western blot)

Fig 1 Induction of HSP70 expression in rat small intestine by sodium arsenite (Western blot)

2.2 组织形态学变化

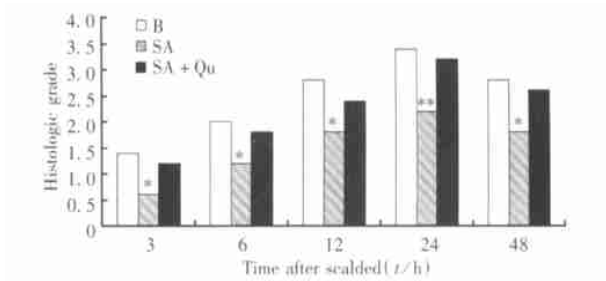
正常对照组大鼠回肠粘膜上皮细胞结构完整,排列整齐,病理评分为0分;烧伤后3 h肠粘膜固有层水肿,中性粒细胞浸

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

润, 中央乳糜管明显扩张, 粘膜上皮下间隙扩大; 12、24 h 后损伤更加明显, 部分绒毛顶端破损, 固有层毛细血管暴露。48 h 后损伤逐渐减轻。而在 SA 组上述病变明显较轻, 可见少数中性粒细胞浸润, 中央乳糜管轻度扩张, 但肠粘膜上皮完整。SA＋Qu 组肠粘膜的损伤程度与 B 组接近。各实验组小肠组织病理评分, 见图 2。

2.3　血浆 D-乳酸及内毒素含量变化

大鼠烫伤后 3 h 血浆 D-乳酸含量即开始升高, 到伤后 12 h 达高峰, 持续到伤后 48 h 仍高于正常。SA 预处理组各时相点血浆 D-乳酸含量均明显低于单纯烧伤组, 且变化幅度较小。SA＋Qu 组血浆 D-乳酸含量变化与单纯烧伤组无显著差异($P>0.05$)。大鼠烫伤后 3 h 血浆内毒素水平明显增加, 到伤后 12 h 达高峰, 持续到伤后 48 h 仍高于正常。SA 预处理组烫伤后 6 h 血浆内毒素水平开始升高, 各时相点血浆内毒素含量均明显低于单纯烧伤组, 伤后 48 h 血浆内毒素水平与正常对照无显著差异。SA＋Qu 组各时相点血浆内毒素水平变化与单纯烧伤组无显著差异($P>0.05$), 见表 1。



*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* B Group

图 2　亚砷酸钠诱导 **HSP70** 表达对大鼠烫伤后肠粘膜损伤的影响

Fig 2　Effects of HSP70 expression induced by sodium arsenite on intestinal mucosa injury in scalded rats

表 1　大鼠烫伤后血浆内毒素及 D-乳酸含量变化($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 1　Changes of plasma endotoxin and D-lactic acid in scalded rats($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Group		Time after scald(h)				
		3	6	12	24	48
D-lactic acid(mmol/L)						
Control	0.264±0.024					
B		0.340±0.031 *	0.362±0.023 **	0.583±0.020 **	0.476±0.022 **	0.377±0.020 **
SA		0.301±0.019 #△	0.326±0.019 *	0.429±0.021 **##	0.419±0.018 **#	0.289±0.018 #△
SA＋Qu		0.357±0.026 **	0.354±0.041 **	0.599±0.018 **	0.460±0.013 **	0.397±0.017 **
Endotoxin(EU/L)						
Control	104.8±14.3					
B		149.3±51.5 *	295.3±66.3 **	362.8±86.9 **	288.3±83.7 **	229.8±52.9 **
SA		112.0±33.4	187.8±46.8 *#△	247.2±61.0 **#	194.5±30.8 *#	126.2±45.9 #△
SA＋Qu		157.0±45.0 *	271.0±38.8 **	380.7±46.5 **	290.3±66.4 **	218.5±50.2 **

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* control;　#: $P<0.05$,　##: $P<0.01$ *vs* group B

3　讨论

热休克蛋白是生物体(或离体培养细胞)在不良环境因素作用下所产生的一组具有高度保守性的应激蛋白, 其中 HSP70 家族是最保守和研究最为深入的一种[8]。近年来研究显示 HSP70 作为一种细胞内源性保护蛋白, 在防止应激引起的细胞损害或者使受损的细胞恢复方面起着重要作用。HSP70 家族包含诱导型的 HSP72 和结构型的 HSP73, HSP73 可存在于正常细胞中, 含量较高, 应激时略增加, 而 HSP72 在正常细胞中很少甚至没有。多种因素包括热休克、乙醇、亚砷酸钠及 HSP70 基因转染均可诱导细胞内 HSP70 的表达。亚砷酸钠可在不同的动物脏器或细胞诱导 HSP70 表达而不引起体温升高[9], Wong 等[10] 报道用亚砷酸钠预处理大鼠肺动脉平滑肌细胞可导致 HSP70 在蛋白和 mRNA 水平呈现时间、剂量依赖性的表达。关于亚砷酸钠的毒理作用已有报道[11], 大鼠给予口服 40 mg/kg 可表现为 LD_{50} 的明显毒性, 另有研究表明大鼠静脉注射亚砷酸钠＞8 mg/kg 时出现轻微的毒性反应包括嗜睡和腹泻[9]。由于热休克预处理时的整体加温可伴随一些与热休克反应无关的非特异性机制如糖皮质激素释放、前列腺素 E_2 产生等, 而亚砷酸钠能够较其它诱导因素更为有效的诱导热休克反应, 因此我们参考 Tsuruma 等[5] 的方法, 通过腹腔注射亚砷酸钠 (6 mg/kg) 以诱导机体热休克反应, 大鼠未出现嗜睡、低温等其他不良反应。槲皮酮, 一种黄酮类化合物, 以往的研究表明其可在 mRNA 聚集和转录水平特异性抑制 HSP 的合成而对其它蛋白合成没有影响[12]。因此为进一步排除 SA 其他的生物学效应, 我们采用槲皮酮(5 mg/kg)以抑制亚砷酸钠对 HSP 的诱导作用。本实验采用特异性抗诱导型 HSP70 的单克隆抗体, 免疫蛋白印迹结果显示腹腔注射亚砷酸钠(6 mg/kg) 24 h 后大鼠小肠组织 HSP70 表达明显增强, 而槲皮酮(5mg/kg)可显著抑制亚砷酸钠诱导的 HSP70 蛋白表达。

有研究表明诱导 HSP70 产生对热、缺血、氧化应激、脓毒症等引起的细胞凋亡或坏死均有一定的保护作用, 在脓毒症或内毒素血症小鼠诱导肠粘膜 HSP70 产生可增加 IL-6 的生成, 从而发挥保护作用; 通过热

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

预处理增加 HSP70 的表达，可以显著减轻大鼠小肠缺血再灌注损伤后的粘膜损伤、白细胞浸润和白三烯 B4 的产生[13]；通过热休克预处理诱导 HSP70 表达可显著降低严重烧伤后大鼠的死亡率[14]，但 HSP70 对严重烧伤后器官组织的具体保护作用及其机制尚未阐明。本研究显示诱导 HSP70 蛋白表达增加可显著减轻严重烫伤后早期的肠粘膜屏障破坏，SA 预处理组肠粘膜损伤评分明显低于单纯烧伤组，而用槲皮酮抑制亚砷酸钠的诱导作用后肠粘膜损伤评分与单纯烧伤组无显著差异。D-乳酸是肠道菌群中多种细菌特有的代谢、裂解的产物，而哺乳动物自身既不产生，也不能或仅能缓慢代谢 D-乳酸。因此血浆 D-乳酸浓度的变化可在一定程度上反映肠粘膜通透性的改变[15]。本结果显示，大鼠烫伤后血浆 D-乳酸及内毒素水平较正常对照明显升高，表明烫伤后肠粘膜通透性增高，屏障功能受损，导致肠道内毒素移位；而 SA 预处理组伤后血浆 D-乳酸及内毒素水平显著低于单纯烫伤组，SA＋Qu 预处理组与单纯烫伤组无显著差异。提示：SA 预处理对大鼠严重烫伤后早期肠粘膜屏障的损害存在保护作用，从而降低了烫伤后肠粘膜通透性，肠道内毒素移位减少，该保护作用伴随着肠组织 HSP70 表达的增强，而用槲皮酮抑制亚砷酸钠对肠 HSP70 表达的诱导后亚砷酸钠对烧伤大鼠肠粘膜的保护作用被抵消，以上结果提示 HSP70 至少部分地参与了该保护作用。由于 HSP 能从加强自身体内细胞本身抗损伤潜能出发，如果能进一步阐明 HSP70 在烧伤后早期组织缺血缺氧性损害中的保护作用，通过无毒性的药物或基因转染等手段诱导 HSPs 局部合理表达可使机体细胞耐受潜在损伤刺激的能力增加，将为严重烧创伤后肠道屏障的保护提供一个新的有效途径。

参考文献：

[1] Swank G M, Deitch E A. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes[J]. World J Surg, 1996, 20(4): 411－417.

[2] 邓诗琳，曹丽萍. 烧伤后肠道屏障功能障碍及防治策略[J]. 中华烧伤杂志，2002, 18(4): 201－202.

[3] 盛志勇. 严重烧伤后多器官功能障碍综合征的防治[J]. 中华烧伤杂志，2000, 16(3): 133－136.

[4] 袁志强，李晓鲁，彭毅志. 诱导 HSP70 减轻肠上皮细胞缺氧/再给氧的损伤[J]. 世界华人消化杂志，2002, 10(7): 800－805.

[5] Tsuruma T, Yagihashi A, Watanabe N, *et al*. Heat-shock protein73 protects against small intestinal warm ischemia-reperfusion injury in the rat[J]. Surgery, 1999, 125(4): 385－395.

[6] Chiu C J, Scott H J, Gurd F N. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. Ⅱ. The protective effect of intraluminal glucose as energy substrate [J]. Arch Surg, 1970, 101(4): 484－488.

[7] Brandt R B, Siegel S A, Waters M G, *et al*. Spectrophotometric assay for D(-)-lactate in plasma[J]. Anal Biochem, 1980, 102(1): 39－46.

[8] 袁志强，彭毅志. 热休克蛋白－细胞的内源性保护蛋白[J]. 生命的化学，2001, 21(6): 503－505.

[9] Ribeiro S P, Villar J, Downey G P, *et al*. Sodium arsenite induces heat shock protein 72 Kilodalton expression in the lung and protects rats against sepsis[J]. Crit Care Med, 1994, 22(6): 922－929.

[10] Wong H R, Mannix R J, Rusnak J M, *et al*. The heat-shock response attenuates lipopolysaccharide-mediated apoptosis in cultured sheep pulmonary artery endothelial cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996, 15(6): 745－751.

[11] Budavari S. The Merck Index[M]. 11th ed. Rahway, NJ: Merck &Co, 1989. 1356.

[12] Wei Y Q, Zhao X, Kariya Y, *et al*. Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein[J]. Cancer Res, 1994, 54(18): 4952－4957.

[13] Stojadinovic A, Kiang J, Smallridge R, *et al*. Induction of heat-shock protein 72 protects against ischemia/reperfusion in rat small intestine[J]. Gastroenterology, 1995, 109(2): 505－515.

[14] Meyer T N, da Silva A L, Vieira E C, *et al*. Heat shock response reduces mortality after severe experimental burns[J]. Burns, 2000, 26(3): 233－238.

[15] 孙晓庆，付小兵，张 蓉，等. 创伤后肠道通透性改变血浆标志物 D-乳酸的实验研究[J]. 中国危重病急救医学，2000, 12(8): 476－478.

（编辑 刘洪娥）

欢迎订阅《中南药学》杂志

《中南药学》杂志（国际刊号：ISSN 1672－2981；国内刊号：CN43－1408/R）是由湖南省药学会主办，国内外公开发行的综合性药学学术期刊。本刊 2003 年创刊，内容涵盖药剂、药理、药物分析、药物化学、生化药物、中药及天然药物、医院药学、药学教育等。栏目有综述、专题讲座、研究论文、科研简报、中药与天然药物、新药评介、药物与临床、临床药学、药物不良反应、临床用药问题解答、学术争鸣等 20 余个栏目。本刊办刊的特点是普及与提高相结合，以提高为主；理论与实践相结合，以实践为主，面向全国医药工作者。欢迎全国医药高等院校、制药企业、医院、科研机构、图书馆、医药情报资料室以及其他医药单位和个人订阅。

本刊为双月刊，大 16 开本，64 页，逢双月 20 日出版，每期定价 10.00 元，全年订价 60 元。如需订阅，可直接汇款至杂志社或到当地邮局订阅，邮发代号 42－290。为准确投递，务请工整无误书写详细地址、姓名及邮政编码。

地 址：长沙市人民中路 86 号中南大学湘雅二医院内 邮 编：410011

电 话：(0731)2258487, 4895602 传 真：(0731)2258487

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