DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.039


expression in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Lett, 2002, 177(1): 13-19.
[13] Hassan K A, El-Naggar A K, Soria J C, *et al*. Clinical significance of cyclin B1 protein expression in squamous cell carcinoma of the tongue[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(8): 2458-2462.
[14] Huang T S, Shu C H, Chao Y, *et al*. Activation of MAD2 checkprotein and persistence of cyclin B1/CDC2 activity associate with paclitaxel-induced apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Apoptosis, 2000, 5(3): 235-241.
[15] Sarafan-Vasseur N, Lamy A, Bourguignon J, *et al*. Overexpression of B-type cyclins alters chromosomal segregation[J]. Oncogene, 2002, 21(13): 2051-2057.
[16] Yu M, Zhan Q, Finn O J. Immune recognition of cyclin B1 as a tumor antigen is a result of its overexpression in human tumors that is caused by non-functional p53[J]. Mol Immunol, 2002, 38(12-13): 981-987.
[17] Manni I, Tunici P, Cirenei N, *et al*. Mxi1 inhibits the proliferation of U87 glioma cells through down-regulation of cyclin B1 gene expression[J]. Br J Cancer, 2002, 86(3): 477-484.
[18] Lin H, Liu X Y, Subramanian B, *et al*. Mitotic arrest induced by XK469, a novel antitumor agent, is correlated with the inhibition of cyclin B1 ubiquitination[J]. Int J Cancer, 2002, 97(1): 121-128.

（编辑 薛国文）

# 综述

文章编号：1000-5404(2003)18-1678-03

## 低氧与应激蛋白研究进展

## Advances in the researches of hypoxia and stress reaction protein

胡宗海 综述，胡 娟 审校 （第三军医大学成都军医学院军事医学教研室，成都 610083）

无论单细胞生物还是多细胞生物，应激都是一种重要的对外界环境的一种适应性反应。应激反应使机体产生一些非特异性的产物，即应激蛋白（Stress response proteins, SRP），对于机体适应外界环境起到重要的保护作用，其结构具高度的保守性。应激蛋白的分类也未统一，有学者把它分为热休克蛋白（Heat shock proteins, HSP）、糖调蛋白（Glucose-regulated proteins, GRP）及泛素（Ubiquitin）。其分子量为（8～110）×$10^3$[1]。但有的学者把糖调蛋白和泛素都归为热休克蛋白家族，因而应激蛋白与热休克蛋白这两个词在一些文章中经常互换[2]。

### 1 热休克蛋白

HSP是应激蛋白中研究得较为深入的一大类应激蛋白，因最先发现于热应激反应，故而命名热休克蛋白，此后发现缺血、缺氧也可诱导HSP的合成。热休克蛋白又叫HSPs超家族，包括在各种生物体内大量不同分子量的HSP：HSP110、HSP90、HSP70、HSP60，以及分子量在16×$10^3$～40×$10^3$的一组小HSP。HSP不仅作为机体的自我保护机制参与应激反应，还有极为重要的生理意义。大致包括如下功能：①HSP作为分子伴侣与新生未折叠、错折叠或聚集的蛋白质相结合，使某些蛋白质聚集物解离，加速正确的肽链折叠和重折叠，维持某些蛋白质的伸展状态以利其跨膜转运，在线粒体、内质网等不同区域内发挥作用。同时还促进某些变性蛋白质的降解和清除，重新激活某些酶的活性，以维持细胞的功能和生存。②HSP参与细胞的周期调控、胞内信号转导和凋亡等重要过程[3]。③HSP可以成为肿瘤或感染性疾病中的免疫优势抗原激发宿主的免疫反应，肿瘤组织中提取的HSP90-peptide复合物可激活携带该肿瘤的个体的$CD8^+$细胞毒性T细胞而产生抗瘤作用[4]。④组成细胞核及胞浆内的骨架结构，具有支持作用。⑤增加细胞内糖原储存能力。HSP所具有的以上这些功能会增加机体对于低氧所造成的不利环境而产生适应性。

HSP70家族是研究得较为深入的一组热休克蛋白家族，这一家族中有众多成员，其分子量约为70×$10^3$的高度保守的且具有微弱ATP酶活性的分子，主要有两个结构域：N端的ATP结构域和C端的多肽结合结构域。HSP70是HSP家族中最丰富的一种，其与细胞的抗损伤至关重要，在细胞生命活动中蛋白质的跨膜运输、折叠、解离、降解和立体构象的维持、改建及修复过程中均起着重要作用，属于分子伴侣蛋白，另外在蛋白质的分解代谢中也起着重要的作用[5]。Yu等[6]人发现用2-去氧葡糖饲养的老鼠会提高HSP70由缺血而引起缺氧时的表达量，从而增强机体对低氧的保护作用。

血红素加氧酶-1（Heme oxygenase-1, HO-1）是HO的一种同工酶，由于它与HSP70和应激蛋白P32结构类似，所以有人将HO-1归入HSP家族，称为HSP32。HO-1为诱导型，主要分布于脾、肝脏、骨髓等单核巨噬细胞系统，组织含量依次为肺＞肝＞脑＞心，其中脾脏内HO-1活性最高。人HO-1基因大约14 kb，含4个内含子和5个外显子，288个氨基酸残基、分子量为32 kD的蛋白，而大鼠HO-1则含289个氨基酸残基，二者同源性高达80%，表明HO-1基因高度保守。在其5′-UTR含有抗氧化反应元件、金属反应元件和c-myc/max异二聚体、活化蛋白、热休克因子、NF-κB等结合位点[7]，因此，多种刺激都可诱导其产生。Ryter等[8]发现在低氧8 h后及在丝裂原活化的蛋白激酶（Mitogen activated protein kinase, MAPK）信号作用下，鼠肺动脉内皮细胞HO-1mRNA即有表达。Grabellus等[9]发现心衰病人心肌细胞内有大量的HO-1表达，另外内皮细胞及成纤维细胞内也有表达，与正常人心脏组织内的含量有明显升高。体外实验中用新

作者简介：胡宗海（1971－），男，四川省仁寿县人，硕士研究生，主要从事低氧免疫方面的研究，发表论文5篇。电话：(028)86579134
收稿日期：2002-11-05；修回日期：2002-12-20

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

生鼠的心肌细胞在低氧条件下培养下, 发现 HO-1 的含量是常氧时的 6 倍。

HO-1 的功能主要是氧依赖性的血红素分解代谢通路上的关键酶, 除了能够控制血红素含量外, 在铁再生、一氧化碳(CO)和胆绿素的代谢上起重要作用。CO 能激活细胞内可溶性鸟苷酸环化酶, 增加 cGMP 的合成, 使血管平滑肌松弛, 抑制血小板凝聚, 从而增加血流量和血管通透性, 使缺氧组织得到充足的氧气供应。Morita 等[10] 发现血管平滑肌细胞中 HO-1 表达, 持续 48 h 后降低, 而且低氧诱导的 cGMP 升高主要由 HO-CO 系统介导, 可见 HO-CO 可能在抑制慢性应激导致的高血压中起决定性作用。HO-CO 还具有抑制内皮增殖、介导应激免疫抑制、影响学习和记忆、调节下丘脑和全身内分泌、参与吗啡耐受机制等功能。

氧调蛋白(Oxygen-regulated protein, ORP)ORP150 是低氧应激下所合成的一种独特的应激蛋白, 最先发现于星形胶质细胞内质网上, 有学者也把其归属于 HSP70 家族。Kuwabara 等[11] 发现鼠星形胶质细胞和小胶质细胞在 $PO_2$ 大约在 14 mm Hg 的低氧条件下 24 h 内即合成 ORP150, 并且在恢复至常氧条件下 24 h 后其浓度将下降。而在其它一些应激如热应激等条件下并不能引起 ORP150 的合成, 并且只由星形胶质细胞所合成, 而其它一些细胞如内皮细胞并不能合成该蛋白。后来 Matsushita[12] 又发现在人主动脉粥样硬化时, 心肌组织内巨噬细胞也能合成 ORP150, 但主要还是在神经元细胞内合成, 缺血 3 h 内在受损的神经元细胞内即发现有 ORP 的升高, 其合成也受到其它一些应激蛋白的调整。Miyazaki 等[13] 发现缺氧的沙鼠脑组织内及低氧培养的神经元细胞均有 ORP150 表达; 感染有 ORP150 反义结构物的腺病毒会使神经元细胞变得易破裂, 而感染带有 ORP150 的腺病毒在缺血时会延迟神经元细胞的死亡。表明机体缺血、缺氧时, ORP 在细胞内保护机体耐受缺血缺氧所造成的损害。

其它 HSP 家族成员: HSP27 是小 HSP 家族成员之一, 其功能为参与调节细胞的生长与分化及作为分子伴侣保护功能之外, 还具有其它生物学功能, 如与 Bcl-1 在不同水平下调节细胞凋亡、影响细胞骨架及细胞迁移、促进受伤神经元的存活、轴突的生长, 还与凝血酶预适应造成的对脑水肿的耐受及与细胞抗药性有关。Kayyali 等[14] 发现在低氧条件下培养的肺毛细血管内皮细胞首先其 MAPK p38 活化, 然后激活 MK2 酶的磷酸化作用, 继而引起 HSP27 的磷酸化, 最终导致细胞内肌动蛋白的重分配而影响细胞骨架的改变。HSP47 是存在于内质网内与前胶原蛋白分子结合, 参与前胶原的折叠、装配、修饰、转运等过程, 被认为是胶原特异性分子伴侣, 在胶原合成及病理性纤维化过程中发挥重要作用, Takeda 等[15] 发现在梗死的心肌组织内有 HSP47 及其 mRNA 表达, 纤维母细胞在低氧条件下培养比常氧培养时, HSP47 有更高的表达, 说明低氧是诱导 HSP47 表达的主要原因之一。

## 2　其它应激蛋白

GRP 是与钙结合的存在于内质网上的一组蛋白, 包括 GRP74、GRP78、GRP94 及 GRP170 等, 是机体在低氧、糖饥饿及低 pH 等应激条件下产生, 常出现在机体肿瘤组织中所造成的低氧环境中, 其中研究得最多的是 GRP78。Fernandez 等[16] 发现胸腺肿瘤组织中 GRP78 及其 mDNA 表达明显, 并且在体外实验中证实 GRP78 能够抵抗肿瘤细胞的凋亡, 在肿瘤的化学治疗中, 会抵抗化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用, 而对肿瘤细胞起到保护作用。

泛素是一种分子量较小的蛋白质, 为一种高度保守的 76 个氨基酸残基的蛋白, 游离存在于细胞内或共价缀合到各种胞浆、核及膜蛋白上。从酵母到人类的各种生物中, 这种小蛋白参与了各种细胞过程, 包括细胞分裂, DNA 修复以及细胞程序化死亡; 泛素的一个重要的功能就是帮助清理细胞。一种泛素连接酶将一串泛素分子连接到无用的蛋白质上, 激活蛋白酶体, 后者降解蛋白, 转录因子在完成了开放基因的功能之后也会被清除掉, 因此泛素可以有效地关闭基因, 另外还可能在启动 DNA 转录的过程中发挥作用。编码泛素的基因有两种, 即多聚泛素基因和融合基因(即编码单个泛素的基因), 在常氧条件下, 这两种基因均存在于细胞内, 但在低氧条件下, 多聚泛素基因会被大量激活, 其 mRNA 所产生的多聚泛素, 较之于多个基因分别产生泛素更为经济和迅速, 这样可以减少代谢的繁琐, 更好地适应低氧应激[17]。因为与底物蛋白结合并介导底物降解的泛素是多聚泛素, 所以多聚泛素基因的表达更有利于蛋白质分解代谢的需要。

随着研究的逐渐发展, 越来越多的 SRP 被发现。Graven 等[18] 于 1995 年发现了一组有别于 HSP 及 GRP 的低氧应激时产生的低氧相关蛋白(HAP), 其中一种为糖酵解酶—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH), 由暴露于低氧环境下的内皮细胞所合成的。近来 Graven 等[19] 发现人和牛主动脉内皮细胞在低氧条件下表达另外一种 HAP, 其分子量为 $56\times 10^3$ 的二硫化物异构酶(Protein Disulfide Isomerase, PDI), 在暴露于 0% 氧气状态下 18 h 后即可检测到 PDImRNA 的表达。PDI 的功能是做为脯氨酸羟化酶的亚单位、蛋白质折叠的催化剂、分子伴侣。Fox 等[20] 发现了一种低氧条件下由 540 bp 基因片段所控制的并由内皮细胞合成的烯醇化酶, 也是一种糖分解酶。

## 3　小结

低氧会导致机体发生一系列生理、病理的反应, 其中之一就是会引起机体表达一系列应激蛋白, 从而使机体适应外界环境。低氧不仅引起神经—内分泌—免疫系统发生应激, 而且消化和心血管系统也常被应激所累及。随着应激蛋白的逐渐发现的增多以及研究的逐渐深入, 这些应激蛋白对于研究低氧的预防、对低氧的早期诊断和治疗, 以及其它一些相关疾病如肿瘤的预防和治疗都会带来一定的帮助。

关键词: 低氧; 应激蛋白; 热休克蛋白
中图法分类号: R845.2$^+$2　　文献标识码: A

## 参考文献:

[1] Moseley P. Stress proteins and the immune response[J]. Immunopharmacology, 2000, 48(3): 299—302.
[2] Chen X, Easton D, Oh H J, *et al*. The 170 kDa glucose regulated stress protein is a large HSP70-, HSP110-like protein of the endoplasmic reticulum[J]. FEBS Lett, 1996, 380(1—2): 68-72.
[3] Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer[J]. Exp Cell Res, 1999.248(1): 30—43.
[4] Fehniger T A, Suzuki K, Ponnappan A, *et al*. Fatal leukemia in interleu-

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

kin-15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells[J]. J Exp Med, 2001, 193(2): 219—231.
[5] Grabstein K H, Eisenman J, Sshanebeck K, *et al*. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor [J]. Science, 1994, 264(5161): 965—968.
[6] Yu Z F, Mattson M P. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration reduce focal ischemic brain damage and improve behavioral outcome: evidence for a preconditioning mechanism[J]. J Neurosci Res, 1999, 57(6): 830—839.
[7] Elbirt K K, Bonkovsky H L. Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role[J]. Proc Assoc Am Physicians, 1999, 111(5): 438—447.
[8] Ryter S W, Xi S, Hartsfield C L, *et al*. Mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway regulates heme oxygenase-1 gene expression by hypoxia in vascular cells[J]. Antioxid Redox Signal, 2002, 4(4): 587—592.
[9] Grabellus F, Schmid C, Levkau B, *et al*. Reduction of hypoxia-inducible heme oxygenase-1 in the myocardium after left ventricular mechanical support[J]. J Pathol, 2002, 197(2): 230—237.
[10] Morita T, Kourembanas S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide[J]. J Clin Invest, 1995, 96(6): 2676—2682.
[11] Kuwabara K, Matsumoto M, Ikeda J, *et al*. Purification and characterization of a novel stress protein, the 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150), from cultured rat astrocytes and its expression in ischemic mouse brain[J]. J Biol Chem, 1996, 271(9): 5025—5032.
[12] Matsushita K, Matsuyama T, Nishimura H, *et al*. Marked, sustained expression of a novel 150-kDa oxygen-regulated stress protein, in severely ischemic mouse neurons[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1998, 60(1): 98—106.
[13] Miyazaki M, Ozawa K, Hori O, *et al*. Expression of 150-kd oxygen-regulated protein in the hippocampus suppresses delayed neuronal cell death [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(8): 979—987.
[14] Kayyali U S, Pennella C M, Trujillo C, *et al*. Cytoskeletal changes in hypoxic pulmonary endothelial cells are dependent on MAPK-activated protein kinase MK2[J]. J Biol Chem, 2002, 277(45): 42596—42602.
[15] Takeda K, Kusachi S, Ohnishi H, *et al*. Greater than normal expression of the collagen-binding stress protein heat-shock protein-47 in the infarct zone in rats after experimentally-induced myocardial infarction[J]. Coron Artery Dis, 2000, 11(1): 57—68.
[16] Fernandez P M, Tabbara S O, Jacobs L K, *et al*. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions[J]. Breast Cancer Res Treat, 2000, 59(1): 15—26.
[17] 陈建明, 余应年. 真核泛素缀合途径研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(2): 175—178.
[18] Graven K K, Farber H W. Hypoxia-associated proteins[J]. New Horiz, 1995, 3(2): 208—218.
[19] Graven K K, Molvar C, Roncarati J S, *et al*. Identification of protein disulfide isomerase as an endothelial hypoxic stress protein[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282(5): L996—1003.
[20] Fox T C, Mujer C V, Andrews D L, *et al*. Identification and gene expression of anaerobically induced enolase in Echinochloa phyllopogon and Echinochloa crus-pavonis[J]. Plant Physiol, 1995, 109(2): 433—443.

(编辑 陈聪连)

(上接1673页)

## 讨论

先天性巨结肠症是由于直肠及结肠远端肠壁肌间 Auerbach 神经丛和粘膜下 Meissner 神经丛的神经节细胞缺如而致的一种肠道发育畸形, 在胃肠道畸形中占第二位, 新生儿发病率为 1/5 000. 在成人中更为少见, 其典型表现是患者从婴儿期开始反复发作顽固性便秘, 但少数病例症状可较轻, 直至成人后方出现明显的症状, 常易造成误诊与漏诊[1]。误诊的主要原因有: ①多数患者为短段型或狭窄段相对较短者, 因年幼时症状较轻, 未予注意, 或因症状不重而采用非手术治疗; ②少数患者至成年后开始发病, 本例患者自 13 岁左右出现明显便秘, 其原因未明; ③接诊医师对该病重视不够。在诊断上: ①患者多有腹胀, 可出现急性回肠、结肠炎发作, 表现为急性腹泻; ②很少有急性机械性小肠梗阻的腹部绞痛、剧烈的呕吐, 相当一部分患者在幼儿时期就有便秘, 因习以为常, 以致入院时将既往病史忽略, 因而结肠中存在粪便团块十分常见; ③钡剂灌肠检查和直肠、结肠活组织检查是目前诊断成人先天性巨结肠的主要方法。造影时呈现的主要影像特点有: ①狭窄段: 根据神经节细胞缺失的范围, 其狭窄段可长可短, 通常局限在直肠及乙状结肠远端。②移行段: 多呈漏斗状; 少数神经节细胞缺如, 肠段位于肛门直肠交界处者, 仅显示扩张段而无移行段。③扩张段: 狭窄近端结肠肠管扩张, 肠壁增厚。钡剂灌肠可以明确痉挛狭窄部位、范围及程度。狭窄段及移行部多位于直肠及乙状结肠, 狭窄段边缘光滑整齐, 移行部呈漏斗状, 扩张段肠管粘膜粗大呈锯齿状, 结肠袋消失。直肠活检也有助于诊断, 病理表现为肌间及粘膜下的神经丛均无神经节细胞。

先天性巨结肠的治疗方法包括非手术治疗和手术治疗, 其目的是排除大便, 消除梗阻。非手术治疗主要是调节饮食, 保持肠道润滑, 促进通便, 为手术作准备, 在无手术禁忌的情况下, 应尽早手术[2]。手术的基本方法是切除因无神经节细胞而发生痉挛的肠管和因粪便淤积而扩张肥厚形成的巨结肠, 将两断端用各种形式吻合, 保留肛门内括约肌以免大便失禁。目前较常用的术式有 4 种[3]。本例患者我们采用改良 Duhmel 手术, 方法是将乙状结肠和部分直肠切除后, 经肛门用吻合器于齿状线上 2 cm 将横结肠和直肠在直肠后壁无张力吻合。该方法的优点有: ①操作时间短, 创伤小、出血相对较少; ②不需解剖盆腔神经和直肠粘膜, 可减少术后肛门狭窄的发生; ③改变了原来使用夹具吻合的方法, 减轻了患者的痛苦, 缩短了住院时间; ④保留内括约肌功能, 避免了大便失禁的发生。

关键词: 先天性巨结肠
中图法分类号: R656.9 文献标识码: B

## 参考文献:

[1] 许戈良, 王仕堂, 邹卫龙. 成人先天性巨结肠 10 例误诊分析[J]. 临床误诊误治, 2002, 15(5): 345.
[2] 徐树彬, 赵增顺, 姜 坤. 成人先天性巨结肠症的诊治问题[J]. 临床误诊误治, 2001, 14(3): 210.
[3] 谢家伦, 王吉甫. 先天性巨结肠的术式选择[J]. 中国实用外科杂志, 1994, 14(9): 568.

(编辑 张大春)

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