DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.012
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
1620 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)18-1620-03

HSP70在严重烧伤大鼠心肌中的表达及其保护作用的研究

袁志强,彭毅志,李晓鲁,张家平,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)在严重烧伤大鼠心肌中的表达变化规律,并观察诱导热休克反应对烧伤后心肌损害的保护作用。方法 72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),于致伤前及30%TBSA Ⅲ度烫伤后3、6、12、24、48 h检测血清心肌钙蛋白I含量变化,Western blot检测心肌组织HSP70蛋白表达情况。结果 大鼠严重烧伤后3 h心肌组织HSP70蛋白表达显著升高,伤后48 h达高峰。大鼠烫伤后3 h血清心肌钙蛋白I(cTnI)含量即开始明显升高,伤后12 h达高峰。亚砷酸钠预处理可显著诱导机体的热休克反应,SA组伤后多数时相点血清cTnI含量显著低于B组,且波动幅度较小。结论 严重烧伤早期即可引起心肌组织HSP70蛋白表达显著增强,HSP70蛋白可能在烧伤后早期心肌损害中发挥其内源性抗损伤机制。

关键词:热休克蛋白;心肌;烧伤
中图法分类号:R322.1+1;R394.3;R644 文献标识码:A

Expression of heat shock protein 70 in myocardium of severely burned rats and its protective effect

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

Abstract: **Objective** To study the expression of heat shock protein 70 (HSP70) in myocardium and the protective effect of heat shock response on myocardium of scalded rats. **Methods** A total of 72 Wistar rats were randomly divided into 2 groups: simple burn group (B group) and sodium arsenite pretreatment group (SA group). Changes of serum cardiac troponin I (cTnI) content were determined at 0, 3, 6, 12, 24 and 48 h after 30% full-thickness scald injury. Samples of myocardium were taken for the determination of HSP70 expression by Western blot analysis. **Results** HSP70 expression in myocardium increased significantly at 3 h after scald injury. The level of HSP70 was highest at 48 h after scald. Serum cTnI content increased significantly at 3 h after scald injury and reached the peak at 12 h after scald injury. Heat shock response could be induced by sodium arsenite pretreatment. SA group showed a significantly lower serum cTnI content. **Conclusion** Severe burn injury causes a significantly increased expression of HSP70 in myocardium. HSP70 may have endogenous anti-injury effect on early burn injury of the myocardium.

Key words: heat shock protein; myocardium; burn

热休克反应(Heat shock response, HSR)是机体在遇到短暂高温、缺血缺氧以及某些化学物质如乙醇、亚坤酸钠等应激刺激时发生的一种以基因表达和调控变化为特征的细胞应激反应,HSR启动热休克基因表达,产生一组普遍存在于生物界并且高度保守的热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)。其中HSP70家族是最主要和研究最为深入的一种[1]。近年来研究显示HSP70作为一种细胞内源性保护蛋白[2],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。严重烧伤及伤后早期导致的组织细胞缺血缺氧、炎症介质释放、细菌内毒素产生等多种因素作为严重的应激必然会诱导机体产生强烈的应激反应,本研究通过严重烧伤大鼠模型,观察了HSP70在烧伤后早期心肌组织中的表达变化规律,并通过亚砷酸钠预处理诱导

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202);国家杰出青年科学基金资助项目(30125040);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);军队首批临床高新技术重大项目(2002)

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:2003-07-18;修回日期:2003-08-24

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

热休克反应, 探讨了其对烧伤后早期心肌损害的保护作用。

1　材料和方法

1.1　主要试剂和仪器

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), BCA-200 蛋白定量试剂盒(Pierce 公司), 大鼠血清心肌钙蛋白 I(Cardiac Troponin I, cTnI) ELASA 检测试剂盒(Lifekey 公司), 亚砷酸钠(Sigma 公司), 垂直电泳仪及半干转移电泳仪(Pharmacia), 紫外分光光度仪(Beckman)。

1.2　方法

1.2.1　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, 本研究统称为烧伤)。伤后按 40 ml/kg 腹腔注入乳酸林格液补液。

1.2.2　动物分组　　实验用健康 Wistar 大鼠 72 只(第三军医大学实验动物中心提供), 雌雄不拘, 体质量(230±25) g。将动物随机分为 2 组: 单纯烫伤组(B 组, n= 36), 大鼠 30 %TBSA III度烫伤处理; SA 预处理组(SA 组, n= 36), 参考文献[3] 方法, 通过腹腔注射亚砷酸钠(Sodium arsenite, SA)(6 mg/kg)以诱导热休克反应, 大鼠经腹腔注射 SA 预处理 24 h 后, 再造成 30 %TBSA III度烫伤; 分别于致伤前及伤后 3、6、12、24、48 h 处死大鼠后采集心肌组织及腹主动脉血。每组各时相点 6 只大鼠。

1.3　观察指标

1.3.1　HSP70 蛋白表达的检测　　称取约 0.1 g 心肌组织并用预冷 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、Pepstatin 和 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; 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, 滤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　血清心肌钙蛋白 I(cTnI)检测　　各时相点抽取腹主动脉血, 分离血清后于－20 ℃冻存待测。按照 ELISA 检测试剂盒说明书操作。

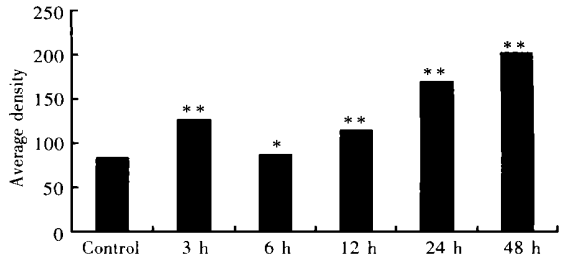
1.4　统计学处理

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　大鼠严重烧伤后心肌组织 HSP70 表达的变化

Western bloting 结果表明, 大鼠严重烧伤后心肌组织内 HSP70 蛋白表达显著增加, 见图 1。



*: P< 0.05, **: P< 0.01 *vs* control

图 1　严重烧伤后大鼠心肌 **HSP70** 蛋白表达变化(**Western blotting**)

Fig 1　Expression of HSP70 in rat myocardium after severe burn injury (by Western blotting)

2.2　SA 预处理后大鼠心肌组织 HSP70 的表达

注射 SA 后 24 h, 心肌组织 HSP70 蛋白表达量较正常对照显著增加(P< 0.01), 见图 2。

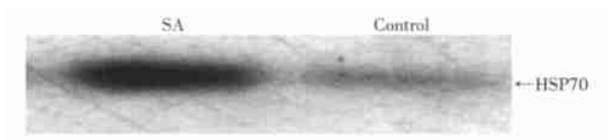


图 2　亚砷酸钠诱导大鼠心肌组织 **HSP70** 表达(**Western blotting**)

Fig 2　Induction of HSP70 expression in rat myocardium by SA (by Western blotting)

2.3　大鼠烧伤后血清 cTnI 含量的变化

大鼠烧伤后 3 h 血清 cTnI 含量显著升高, 到 12 h 达高峰, 伤后 48 h 仍高于正常对照。SA 预处理组大鼠烧伤后 6 h 血清 cTnI 含量开始升高, 但大多时相点血清 cTnI 含量均明显低于单纯烧伤组, 且变化幅度较小, 伤后 48 h 与正常对照无显著差异, 见表 1。

表 1　大鼠严重烧伤后血清 **cTnI** 含量变化($\bar{x}\pm s$, n= 6, ng/ml)

Tab 1　Changes of serum cTnI content in severely burned rats ($\bar{x}\pm s$, n= 6, ng/ml)

Group	Before scald	Time after scald (h)				
		3	6	12	24	48
B	1.29±0.06	3.32±0.11 *	6.02±0.43 *	13.26±0.78 *	7.35±0.93 *	4.73±0.15 *
SA	1.51±0.07	1.95±0.6 ##	4.13±0.22 *#	6.96±0.15 *##	4.05±0.19 *##	2.09±0.15 ##

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

3　讨论

近年来黄跃生等[4]经过系列的临床研究及动物实验证实了严重烧伤早期即出现心肌器质性损害, 并提出了"休克心"的概念。烧伤后导致的组织细胞缺血缺氧和失控性炎症反应是导致早期"休克心"的两大主要因素, 如何减轻、遏止其介导的心肌损伤效应是防治

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

“休克心”的关键。近年来,如何调动机体自身的抗损伤机制逐渐引起大家的注意。热休克蛋白是生物体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,近年文献[5,6]报道HSP70与心肌缺血再灌注损伤的保护作用关系密切,并可以作为反映细胞应激或损伤程度的标志。为此,本实验通过大鼠严重烧伤模型,观察了HSP70在烧伤后早期心肌组织中的表达变化规律,结果提示大鼠烧伤后3 h心肌组织中HSP70蛋白表达即显著升高,伤后6 h稍下降,随后表达量又逐渐增加,于伤后48 h达表达高峰,提示烧伤后早期即引起心肌组织细胞的应激反应,并启动了细胞的自我保护机制。为进一步探讨HSP70在烧伤后早期心肌损害中的作用,我们参考国外文献报道的方法,采用小剂量的亚砷酸钠诱导热休克反应,结果提示腹腔注射亚砷酸钠(6 mg/kg)后24 h心肌组织HSP70的表达显著增加。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[7,8],Wong等[9]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。我们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。提示通过亚砷酸钠(6 mg/kg)预处理可显著诱导机体的热休克反应。

心肌钙蛋白是心肌结构蛋白,其中cTnI是肌原纤维ATP酶的抑制性亚单位,其在胎儿或成人骨骼肌中不表达,具有高度的心脏特异性。cTnI以两种形式存在于心肌细胞内,小部分(约3%)为可溶性游离于胞浆中,而大部分以结构蛋白形式固定于肌原纤维上,为不可溶性。其血中浓度变化可特异地反映心肌结构蛋白的破坏情况,且与心肌损伤程度存在密切平行关系,被视为目前判断心肌损伤最特异和敏感的指标[10]。本实验结果显示烧伤后3 h血清cTnI水平即明显升高,伤后12 h达高峰,48 h仍高于正常水平。提示伤后早期即存在有心肌损害,而且逐渐加重。SA预处理组血清cTnI含量明显低于单纯烧伤组,且波动幅度较小,伤后48 h已经恢复正常水平,表明SA预处理诱导的热休克反应对烧伤后早期心肌损伤有明显的保护作用。SA预处理后心肌组织HSP70表达显著增强,提示HSP70至少部分地参与了该保护作用。关于HSP70对心肌的保护作用已有较多文献报道[5,11],但其具体机制目前尚未明确,研究表明其分子伴侣功能、激活ATP敏感的钾离子通道[12]、维护线粒体功能[13]、抗凋亡[14]及抑制炎性细胞因子[15]释放作用可能参与了对心肌的保护作用机制。

我们的实验结果首次揭示了HSP70在严重烧伤后心肌中的表达变化规律,诱导机体的热休克反应对烧伤后早期心肌损害存在明显的保护作用,HSP70可能涉及了在烧伤后早期心肌损害时的细胞内源性抗损伤机制,但其具体机制尚需要继续实验深入探讨,HSP70作为细胞内在的保护性蛋白,进一步研究其在烧伤后早期缺血缺氧性损害中的作用及其变化规律,可为深入认识烧、创伤后早期的病理生理变化和防治早期损害奠定理论基础。

参考文献:

[1] De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams[J]. Shock, 1999, 11(1): 1-12.

[2] 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.

[3] Tsuruma T, Yagihashi A, Watanabe N, *et al*. Heat-shock protein-73 protects against small intestinal warm ischemia-reperfusion injury in the rat [J]. Surgery, 1999, 125(4): 385-395.

[4] 黄跃生,杨宗城,迟路湘,等. 烧伤后“休克心”的研究[J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(5): 275-278.

[5] Delogu G, Signore M, Mechelli A, *et al*. Heat shock proteins and their role in heart injury[J]. Curr Opin Crit Care, 2002, 8(5): 411-416.

[6] Pockley A G. Heat shock proteins in health and disease: Therapeutic targets or therapeutic agents? [J]. Expert reviews in molecular medicine, 2001, 21(9): 1-21.

[7] Brown I R, Rush S J. Induction of a ‘stress’ protein in intact mammalian organs after the intravenous administration of sodium arsenite[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1984, 120(1): 150-155.

[8] 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 Medi, 1994, 22(6): 922-929.

[9] 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.

[10] Murphy J T, Horton J W, Purdue G F, *et al*. Evaluation of troponin-I as an indicator of cardiac dysfunction after thermal injury[J]. J trauma, 1998, 45(4): 700-704.

[11] Gray C C, Amrani M, Yacoub M H. Heat stress proteins and myocardial protection: experimental model or potential clinical tool? [J]. Int J Biochem Cell Biol, 1999, 31(5): 559-573.

[12] Eells J T, Henry M M, Gross G J, *et al*. Increased mitochondrial K^+-ATP channel activity during chronic myocardial hypoxia[J]. Circ Res, 2000, 87(10): 915-921.

[13] Sammut I A, Jayakumar J, Latif N, *et al*. Heat stress contributes to the enhancement of cardiac mitochondrial complex activity[J]. Am J Pathol, 2001, 158(5): 1821-1831.

[14] Suzuki K, Sawa Y, Kagisaki K, *et al*. Reduction in myocardial apoptosis associated with overexpression of heat shock protein 70[J]. Basic Res Cardiol, 2000, 95(5): 397-403.

[15] Grunenfelder J, Zund G, Stucki V, *et al*. Heat shock protein upregulation lowers cytokine levels after ischemia and reperfusion[J]. Eur Surg Res, 2001, 33(5-6): 383-387.

(编辑 张 宁)

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