DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.001
第25卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 9
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

文章编号:1000-5404(2003)09-0747-03

论著

严重烫伤大鼠肝脏热休克蛋白90α的表达变化及意义

王军平[1],粟永萍[1],刘贤华[1],赵景宏[2],秦 荣[3] (第三军医大学:[1]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038;附属新桥医院:[2]肾内科;[3]普通外科;重庆 400037)

提 要:目的 研究严重烫伤早期大鼠肝脏组织中糖皮质激素受体分子伴侣热休克蛋白90α(HSP90α)的表达变化及意义。方法 用免疫印迹技术分析严重烫伤后不同时相肝脏组织中HSP90α的表达量改变,通过免疫组化进一步观察HSP90α在肝细胞胞核中的表达变化。结果 大鼠严重烫伤后72 h内肝脏HSP90α的表达明显升高,尤其以12~48 h更为显著,在48 h左右肝细胞核内还出现HSP90α的异位高表达。结论 严重烫伤可以引起肝脏HSP90α异常高表达,这可能是严重创伤早期糖皮质激素受体表达和功能发生改变的原因之一。

关键词:烫伤;肝脏;大鼠;HSP90α
中图法分类号:R341;R392.31;R644 文献标识码:A

The changes and significance of the expression of HSP90α in the liver of severely scalded rats

WANG Jun-ping, SU Yong-ping, LIU Xian-hua, ZHAO Jing-hong, QIN Rong (Institute of Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of the expression of HSP90α in the liver of severely scalded rats at the early stage of stress. Methods The expression levels of HSP90α in the liver of rats at different time points after severe scald were detected by Western blotting and then the expression of HSP90α in the nucleuses was observed by immunohistochemistry. Results The expression of HSP90α significantly increased in the liver of rats after severe scald, especially during 12~48 h. Abnormal high expression of HSP90α in the nucleuses around was found at 48 h after scald. Conclusion The abnormal high expression of HSP90α due to severe scald may be one of the important causes resulting in the disorder of glucocorticoid receptor at the early stage of stress after severe trauma.

Key words: severe scald; liver; rats; HSP90α

热休克蛋白90(Heat shock protein 90, HSP90)是糖皮质激素受体的一种重要分子伴侣,它影响着糖皮质激素受体的活性与功能[1]。近年来,有关严重创伤时糖皮质激素受体变化的报道越来越多,但是人们对严重创伤条件下HSP90的表达变化及其对糖皮质激素受体影响方面的研究则缺乏重视。本研究以严重烫伤大鼠为实验动物模型,结合免疫印迹和免疫组化染色深入分析了烫伤后不同时间肝脏组织与细胞中HSP90α蛋白水平的表达变化,从而为揭示严重创伤后糖皮质激素受体受抑的分子机制提供了可靠的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康成年Wistar大鼠35只(本校实验动物中心提供),体质量200~250 g,雌雄不拘,5只作为正常对照组,30只作为烫伤组,烫伤组又设置烫伤后4、12、24、48、72、96 h 6个时相点,每个时相点5只大鼠。

1.2 模型制作

大鼠背部、臀部剪毛,置剪毛区于沸水中10 s,造成35%~40%体表面积Ⅲ度烫伤,分别于烫伤后上述各时相点断头处死取材。

1.3 HSP90α Western blot分析

首先提取肝组织总蛋白,以Bradford法测定蛋白质浓度,并将其置于-70 ℃待用。每个样品取40 μg蛋白质加入等体积2×SDS凝胶加样缓冲液,100 ℃煮沸5 min,经7%聚丙烯酰胺凝胶电泳后,80 mA电转移转膜4 h,1%BSA 4 ℃封闭过夜,加入1∶500稀释HSP90α一抗(Santa cruz美国)37 ℃孵育1 h,PBST洗膜,加1∶300稀释生物素标记二抗(武汉博士德公司)37 ℃孵育1 h,PBST洗膜,加1∶300稀释链霉素亲生物蛋白-过氧化物酶复合物37 ℃孵育1 h,PBST洗膜,DAB显色,照相。照片用Gel Doc2000凝胶成像系统进行分析处理,蛋白含量以平均光密度(ODu)×面积表示。

1.4 HSP90α免疫组织化学S-P染色

活杀大鼠后取适量肝脏组织,固定、石蜡包埋、切片。免疫组织化学染色按常规方法进行,HSP90α一抗为Santa cruz(美国)产品,生物素化二抗及链霉素亲生物蛋白-过氧化物酶复合物

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054200)
作者简介:王军平(1972-),男,河北省新乐县人,博士,讲师,主要从事创伤方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68752278
收稿日期:2002-03-12;修回日期:2002-06-01

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

为武汉博士德公司产品。阴性对照用0.01 mol/L PBS代替一抗，其余步骤不变。

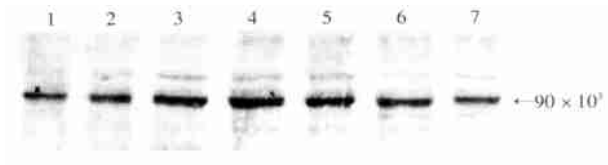
1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，各组间比较采用单因素方差分析，t 检验。

2 结果

2.1 大鼠严重烫伤后肝脏HSP90α Western blot结果

Western blot分析结果显示，严重烫伤后4 h时肝组织中HSP90α的表达量即开始升高，12～72 h显著高于正常对照，96 h又基本恢复正常。见图1，表1。



Band 1: normal control; Bands 2 to 7: 4, 12, 48, 72 and 96 h after scald

图1 严重烫伤大鼠肝组织HSP90α Western blot结果

Fig 1 Result of HSP90α in liver protein of severely scalded rats by Western blot

表1 大鼠严重烫伤后肝脏组织HSP90α含量的变化(ODu×mm², $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab 1 Changes of the expression of HSP90α in the liver of severely scalded rats (ODu×mm², $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Group	Control	Time after scald					
		4 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
HSP90 content (ODu×mm²)	2.12±0.15	2.29±0.20	3.94±0.14**	4.34±0.17**	3.91±0.22**	3.16±0.34*	2.16±0.17

*: $P<0.05$ **: $P<0.01$ *vs* control group

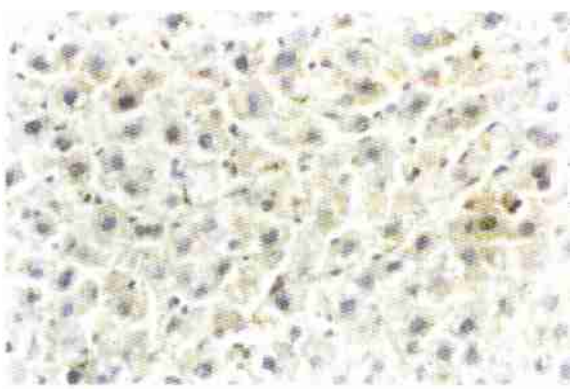


图2 正常大鼠肝组织HSP90α免疫组织化学染色结果 可见阳性着色较弱，呈浅棕褐色，主要分布在细胞浆中 (S-P×400)

Fig 2 Result of HSP90α by immunohistochemical staining in the liver of normal rats The positive stain is weak and mainly distributed in the cytoplasm (S-P×400)

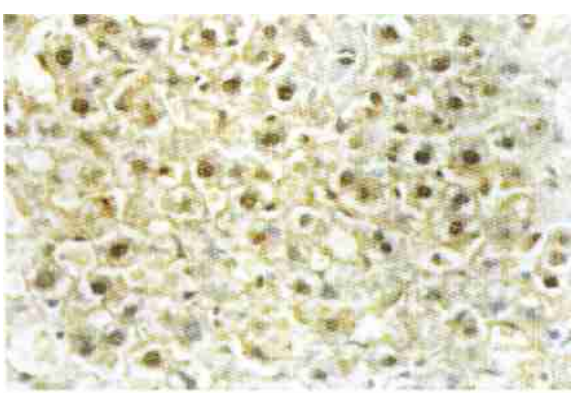


图3 大鼠严重烫伤后48 h肝组织HSP90α免疫组织化学染色结果 可见胞浆中阳性着色显著增强，且胞核内也出现较强的阳性着色，呈深棕褐色 (S-P×400)

Fig 3 Result of HSP90α by immunohistochemical staining in the liver of rats at 48 h after severe scald The positive stain is much stronger than normal and sore appears in the nucleuses (S-P×400)

2.2 大鼠严重烫伤后肝脏组织细胞中HSP90α免疫组织化学染色结果

正常情况下肝细胞中HSP90α阳性染色较弱，主要分布于细胞浆内，严重烫伤后阳性着色明显增强，在烫伤后48 h不仅胞浆内阳性着色显著增强，而且在一些细胞的胞核内也出现了强阳性着色，见图2，3。说明在严重创伤后肝脏组织中不仅出现HSP90α的表达增强，而且HSP90α在48 h左右还出现胞核内异位高表达。

3 讨论

HSP90是热休克蛋白(HSPs)家族的一个主要成员，它又分为α和β两种亚型，根据组织器官和所受的刺激不同，HSP90α和HSP90β的分布和表达也不尽相同。一般情况下，HSP90α易受热诱导，HSP90β易受有丝分裂的诱导。在高温、创伤等因素刺激时内脏组织中以HSP90α表达升高为主[2]。研究表明HSP90是糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, GR)的一种重要的伴侣蛋白，影响着GR活性和功能[2]。

本实验结果显示，大鼠严重烫伤后早期72 h内肝脏HSP90α的表达明显升高，尤其12～48 h期间非常显著高于正常对照。已知HSPs在多种损伤刺激和某些疾病发生过程中都会显著增多。对于这种现象，大多数研究认为HSPs是对机体起防御性保护作用[3,4]。但也有人提出HSPs可能具有一定的保护作用，但过高同样会造成损害，如已发现延迟性神经细胞死亡可能与HSPs持续性高表达而细胞内其它重要蛋白合成受阻有关[5]。从辩证的角度看，任何事情的发展都有一个度，超过这个度后反而会向相反的方向发展。应激是机体对外界有害刺激所作出的保护性防御反应，然而当外界刺激过于强烈如严重创伤时，机体在某些方面也会作出过度应激反应，而过度的应激反应同时也给机体带来了损害。热休克反应也是应激反应的一

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

种,严重创伤时它也会作出过度反应,因而,这时产生的过量 HSP90 与正常生理和一般性应激反应情况下的 HSP90 可能存在着功能性的差异,有可能反而会给机体带来损害。

有研究显示,激素抵抗型哮喘患者的外周血单核细胞有 HSP70、HSP90 表达,随着炎症程度的加重和持续时间的延长,它们的表达越强,而且 HSP90 基因表达水平越高,地塞米松越难以抑制淋巴细胞的增殖,从而表明 HSPs 的高表达对机体反而不利[6]。Bucci 等[7]发现,HSP90 的特异性阻断剂 geldanamycin 具有一定的抗炎能力,其抗炎作用可以被 GR 的拮抗剂 RU486 阻断,提示 HSP90 能够通过影响 GR 而诱导炎症发生。所以,严重烫伤后 HSP90 在细胞浆中的过高表达可能也会影响 GR 的活性与功能。

实验中通过免疫组织化学染色分析显示,HSP90α 在 48 h 左右还出现胞核内异位高表达。由于 HSP90 与 GR 结合而使后者处于失活状态,因此一般情况下 HSP90 都存在于胞浆中,如果在胞核内有 HSP90 的大量出现,必然会影响 GR 的转录激活作用,同时也会使 GR 潴留在细胞核内,阻碍其循环再利用[8,9]。所以,虽然我们对本实验所发现的 HSP90α 在严重烫伤后的高表达不能完全断定其利弊,但从对 GR 的影响来看 HSP90α 在细胞核内异位高表达会影响 GR 抗炎功能的发挥。

综合以上分析,可以推测 HSP90 的过高表达和在胞核内的异位表达可能参与了严重创伤后 GR 表达和功能改变过程。有关这方面的研究还需要进一步的分析与探讨。

参考文献:

[1] Pratt W B, Dalman F C, Meshinchi S, *et al*. The relationship between glucocorticoid receptor binding to Hsp90 and receptor function[J]. Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi, 1990, 66(12): 1185—1197.
[2] Hansen L K, Houchins J P, O'Leary J J. Differential regulation of HSC70, HSP70, HSP90 alpha, and HSP90 beta mRNA expression by mitogen activation and heat shock in human lymphocytes[J]. Exp Cell Res, 1991, 192(2): 587—596.
[3] Fukuda A, Osawa T, Oda H, *et al*. Oxidative stress response in iron-induced acute nephrotoxicity: enhanced expression of heat shock protein 90 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 219(1): 76—81.
[4] Mestril R, Chi S H, Sayen M R, *et al*. Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury[J]. J Clin Invest, 1994, 93(2): 759—767.
[5] Planas A M, Soriano M A, Estrada A, *et al*. The heat shock stress response after brain lesions: induction of 72 kDa heat shock protein (cell types involved, axonal transport, transcriptional regulation) and protein synthesis inhibition[J]. Prog Neurobiol, 1997, 51(6): 607—636.
[6] 姚 彬, 佟万成, 朱元珏, 等. 热休克蛋白 70、90 基因在糖皮质激素抵抗型哮喘患者血单个核细胞中的表达[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1998, 21(5): 289.
[7] Bucci M, Roviezzo F, Cicala C, *et al*. Geldanamycin, an inhibitor of heat shock protein 90 (Hsp90) mediated signal transduction has anti-inflammatory effects and interacts with glucocorticoid receptor *in vivo*[J]. Br J Pharmacol, 2000, 131(1): 13—16.
[8] Kojika S, Sugita K, Inukai T, *et al*. Mechanisms of glucocorticoid resistance in human leukemic cells: implication of abnormal 90 and 70 kDa heat shock proteins[J]. Leukemia, 1996, 10(6): 994—999.
[9] Kang K I, Meng X, Devin-Leclerc J, *et al*. The molecular chaperone Hsp90 can negatively regulate the activity of a glucocorticosteroid-dependent promoter[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(4): 1439—1444.

(编辑 陈聪连)

文章编号: 1000-5404(2003)09-0749-01

个案与短篇

乳腺癌肉瘤 1 例

A case report of breast carcinosarcoma

杨新征, 郭乔楠, 柳凤轩, 于冬梅 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所, 重庆 400038)

患者, 女, 49 岁, 2 个月前发现左侧乳房有一"鸡蛋"大小包块, 无疼痛, 皮肤无红肿及破溃, 乳头无溢血、溢液。20 d 前, 偶感疼痛, 呈隐痛, 劳动后加剧, 于 2002 年 4 月 18 日来我院就诊。

入院查体, 左乳无红肿, 未见皮肤破溃, 无橘皮样外观, 乳头无溢血、溢液, 外上象限扪及大小为 4 cm×4 cm×4 cm 包块, 质韧, 边界不清, 活动性差, 稍压痛, 表面不光滑, 腋窝未扪及肿大淋巴结。B 超示右乳外上象限探及一 3.5 cm×4 cm 不均质实性包块, 考虑为乳腺恶性肿瘤。穿刺病理结果: 左侧乳腺浸润性导管癌。遂行乳腺癌改良根治术。病理检查: 切除一侧乳房, 大小 15 cm×4 cm×4 cm, 乳腺外上象限见一 4.5 cm×3 cm×4 cm 大小肿块, 边界不清, 质地中等, 切面灰白灰褐色相间, 脂肪组织中找见绿豆大淋巴结 9 枚, 切面灰褐色, 质地中等。

光镜检查: 部分肿瘤细胞为圆形、卵圆形, 深染, 可见病理性核分裂像, 胞质丰富、红染, 部分胞质空化, 肿瘤细胞呈巢团状、条索状排列; 部分肿瘤细胞呈短梭形, 核为不规则形、深染, 核分裂像易见, 可见少量多核巨细胞及大量肿瘤性骨样基质, 并见肿瘤细胞直接成骨现象, 两种肿瘤成分无明显移行。9 枚淋巴结均未见肿瘤转移。病理诊断: 右乳腺癌肉瘤。

(下转 752 页)

作者简介: 杨新征(1978—), 男, 辽宁省阜新市人, 医师。电话: (023)68754434
通信作者: 郭乔楠, 电话: (023)68754497
收稿日期: 2002-05-18; 修回日期: 2002-09-30

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