DOI:10.16016/j.1000-5404.1998.04.011

严重烧伤大鼠肾脏热休克蛋白72基因表达的研究*

刘 理** 杨宗城 赵阳兵 傅祖红 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆,400038

提 要 目的:研究严重烧伤和热休克处理大鼠肾脏热休克蛋白72(HSP72)基因表达,并讨论其作用和意义。方法:采用HSP72特异性引物,利用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和原位杂交技术观察肾脏HSP72 mRNA变化;用免疫印迹观察蛋白质表达的变化。结果:①烧伤早期大鼠肾脏热休克蛋白表达是逐渐增加的,到24 h,其mRNA和蛋白质均处于高表达水平。②热休克预处理后大鼠肾脏热休克蛋白表达峰值在6 h~12 h,在24 h其表达水平仍比正常对照高。③HSP72 mRNA在近曲小管、远曲小管、集合管和髓袢上皮细胞均有分布。结论:烧伤后肾脏HSP72 mRNA表达较热预处理后时间长,HSP72分布广泛。

关键词 烧伤;肾脏;热休克蛋白;基因表达
中图法分类号 R644;Q51

严重烧伤不仅造成烧伤局部热损伤,也带来许多的内脏并发症,多器官功能障碍是这种全身性损伤的最典型的表现;同时伴随严重的应激反应,它与烧伤后的许多病理生理变化有密切关系,因此近年对严重烧伤后病理生理学变化及其物质基础进行了广泛的研究[1]。热休克蛋白(Heat shock protein,HSP)是一种应激蛋白,在进化上高度保守,可由多种应激因素诱导,参与许多重要的病理生理学过程。本实验旨在探讨严重烧伤后肾脏热休克蛋白HSP72基因表达变化,为进一步研究热休克蛋白的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型与分组

健康Wistar大鼠,体重180 g~220 g,由四川省中药研究所实验动物中心提供。随机分为3组:烧伤组;热休克组;对照组。烧伤模型按本所常规制作;热休克模型制作按Emami[2]的方法改进、优化后进行。将麻醉后大鼠加热;当肛温升至42℃时开始计时,维持肛温在42℃±0.5℃ 15 min。热处理后置动物于室温(>25℃)环境恢复至正常体温。动物自由进食、饮水。观察5个时相点:处理后1、3、6、12、24 h及对照。

1.2 观察指标与方法

①RT-PCR检测肾HSP72 mRNA表达,肾组织总RNA提取使用Promega试剂盒,RT-PCR使用宝灵曼试剂盒;上游引物:5'-TGC TGA CCA AGA TGA AG-3';下游引物:5'-AGA GTC GAT CTC CAG GC-3',这对引物特异扩增491bp大鼠的HSP72 cDNA处段[3],并同时扩增鼠β-actin用作对照。采用E. Noiri所发表的引物序列,上游引物:5'-GTG GGC CGC CCT AGG CAC CA-3',下游引物:5'-GAA ATC GTG CGT GAC ATT AAA GA-3',这对引物可以特异地扩增538bp的β-actin cDNA片段[4](引物均由上海细胞所合成)。②热休克蛋白72 mRNA原位杂交研究:质粒pH 2.3,含全长HSP72 cDNA(由Morimoto教授惠赠)。HSP72 cDNA质粒转化、扩增、抽提、纯化采用分子克隆的方法;BamH Ⅰ和Hind Ⅲ双酶切pH 2.3后,用QIAgene公司的试剂盒QIA quick Gel Extraction Kits回收目的cDNA片段,HSP72 cDNA探针用宝灵曼的地高辛标记检测试剂盒进行标记;组织的取材、切片和原位杂交均参照文献[5]的方法。③热休克蛋白72免疫印迹观察,根据分子克隆的方法,并采用特异抗HSP72的单克隆抗体(由Dr. Welch赠送)。

RT-PCR和免疫印迹结果均利用薄层扫描进一步分析。

2 结果

2.1 烧伤及热休克后鼠肾HSP72表达变化

2.1.1 烧伤后鼠肾HSP72 mRNA变化 肾脏热休克蛋白HSP72 mRNA RT-PCR产物的电泳图,见图1。烧伤后1 h HSP72 mRNA的表达就开始增加,随着伤后时间的延长,mRNA的表达逐渐增加,在伤后24 h,mRNA的表达量仍较高,无下降趋势。

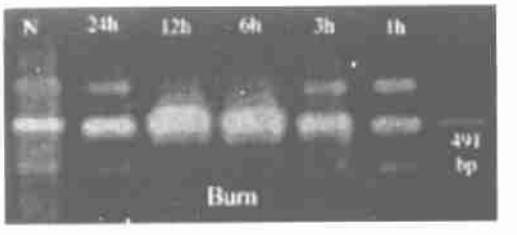


图1 烧伤后HSP 72 mRNA变化 (RT-PCR)

Fig 1 The changes of HSP 72 mRNA after burns (RT-PCR)

* 全军"九五"指令性项目,No. 96L043

** 刘 理,男,35岁,讲师,博士,现在附属新桥医院肾内科 重庆,400037

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

2.1.2 热休克处理后肾 HSP72 mRNA 变化 大鼠经热休克处理后肾脏 HSP72 mRNA 的表达变化见图 1。结果提示，热休克后第 1 小时肾 HSP72 mRNA 表达就开始增加，在热休克后第 6 小时和第 12 小时，HSP mRNA 的表达达到最大值，第 24 小时 mRNA 的表达下降明显，但与正常对照相比较仍较高。

2.2 肾脏 HSP72 原位杂交结果

2.2.1 烧伤后原位杂交结果 正常肾组织内 HSP72 mRNA 表达较少，偶见在肾小管有分布；烧伤后 HSP72 mRNA 表达开始增加，但其分布局限于肾小管（包括近曲小管与远曲小管）细胞浆中，肾小球偶见有 mRNA 分布，其表达量逐渐增加，与 RT-PCR 相同，在第 24 小时表达仍较高，在小血管内皮及外膜可见 HSP72 mRNA 的表达。

2.2.2 热休克后原位杂交结果 热休克后 HSP72 mRNA 在肾脏的分布与烧伤后类似，主要分布于肾小管（包括远曲小管和近曲小管）细胞浆中，其表达量在 6 h～12 h 较高，而在第 24 小时的 mRNA 表达量已开始回降，这些变化与 RT-PCR 的变化相似。

2.3 烧伤及热休克后 HSP72 免疫印迹变化

2.3.1 烧伤后 HSP72 蛋白免疫印迹变化及其薄层扫描见图 2；随着烧伤后时间的延长，肾脏内热休克蛋白的含量也逐渐增加，说明烧伤对热休克蛋白的诱导是一个持续的过程。

2.3.2 热休克后肾脏内 HSP72 蛋白热休克蛋白免疫印迹，见图 2，热休克蛋白在肾脏的积累增加的速度比烧伤快。在热休克后 12 h，热休克蛋白在肾脏的积累达到最大值，以后下降。



图 2 烧伤后 HSP 72 免疫印迹变化

Fig 2 Western blotting of HSP 72 after burns

3 讨论

热休克蛋白在动物肾脏内表达及分布情况研究报告不多。主要研究肾缺血，庆大霉素中毒后肾脏热休克蛋白的变化情况。到目前，仍未见到严重烧伤动物模型中，肾脏 HSP72 表达变化的研究报告。我们利用 RT-PCR、原位杂交和免疫印迹技术从几个方面研究了哺乳动物肾脏细胞中热休克蛋白 70 家族的主要成员 HSP72（诱生型）在烧伤和热休克后的表达变化。发现烧伤和热休克（42℃ 15 min）后，肾脏 HSP72 的表达特征不同，其 mRNA 在肾脏分布随着烧伤和热休克处理动物后时间的变化而变化。热休克处理动物后，热休克蛋白表达快。我们最早检测时间是处理后 1 h，此时 HSP72 mRNA 已经升高，蛋白质的表达也增加。有作者发现热休克处理后 1 h 各组织 HSP72 表达均增高，肝脏表达最高，心脏表达最低，其表达持续时间为 10 d。对肾脏乳头、髓质、皮质分别研究，发现以肾乳头 HSP72 表达最高[5]。研究证明以热休克处理动物或细胞，不同的处理条件和不同的细胞其热休克蛋白表达不同[6,7]。然而在用 42℃液体灌注离体心脏后，其 HSP72 mRNA 可在灌注后立即升高[6]。我们的结果是在 12 h 表达最高。这些研究报告都说明了热预处理后 HSP 表达变化与处理方式、时间、不同组织细胞均有关系。为什么会出现这种现象，机制不明，可能与不同组织细胞对热环境应激的不同反应有关。

烧伤早期脏器损害的重要发病因素是烧伤休克所致的全身性内脏血液灌流不良，也是烧伤并发症多器官功能衰竭的主要原因。我们研究所以往的研究已经证明严重烧伤休克可导致严重的脂质过氧化反应，而造成内脏器官的损伤[1]。烧伤所致的严重应激反应使体内儿茶酚胺、血管紧张素、抗利尿激素增加也加重这些反应。因为单纯缺血、热休克蛋白表达时间较短[2]，而我们发现烧伤后 HSP72 mRNA 在 24 h 仍处于高表达，其蛋白质表达水平也很高。这与单纯缺血诱导的 HSP72 表达有明显不同，提示有其它因素参与其诱导。根据我们的观察，热休克蛋白的诱导表达可能有缺血、脂质过氧化和神经内分泌等诸多因素参与。对下丘脑-垂体轴和交感神经系统与 HSP72 的关系研究发现：HSP72 mRNA 的表达可能直接受垂体激素（ACTH）调节或者是多巴胺类物质作用于效应器官受体而起作用；肾上腺素拮抗剂抑制 HSP 表达，而其激动剂则增加 HSP72 表达[7]。

在正常对照大鼠，是否有 HSP72 表达尚有争论，Leung 等[8]克隆的诱导型基因在正常时的组织细胞中是没有基础表达的。因为所克隆的基因的启动子不含 TATA 和 CAAT 盒，而它们对于热休克蛋白的基础表达很重要[3]。根据我们的观察，HSP72 mRNA 有基础表达，与我们所研究基因相同的其它报告中，都发现 HSP72 mRNA 有基础表达[6]。用 Welch 教授提供的特异性抗诱导型 HSP72 抗体也在对照大鼠检出低丰度的 HSP72，同样提示 HSP72 有基础表达。目前对于这个问题尚无好的解释。

严重烧伤后的病理生理变化已得到了多方面的研究，与热休克蛋白诱导有关的多种病理生理变化在烧伤中均存在。从我们的结果可以推论烧伤后热休克蛋

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

白的诱导与烧伤后肾脏缺血缺氧、氧化应激损伤等有关。因为这些因素可以造成蛋白质变性损伤，而热休克蛋白的诱导与蛋白质变性有着必然的联系[9]。神经内分泌机制引起热休克蛋白表达则有所不同，Blake 发现在肾上腺，应激后增加的 ACTH 与其细胞受体结合，增加细胞内 cAMP 含量；可能同时还有 G 蛋白的参与，但最终可能是通过激活 HSF 而诱导热应激蛋白的表达[7]，而其具体方式则不了解。然而增加的细胞内 Ca^{2+} 则可能参与 HSF 从细胞浆向细胞核的转移，促使 HSP 基因的转录有一定关系[10]。

参考文献

1 杨宗城，赵琢道，黄跃生.烧伤后多脏器功能衰竭发病机理的临床研究.中华整形烧伤外科杂志，1992；8(1)：8

2 Emami A, Schwartz J H, Borkan S C. Transient ischemia or heat stress induces a cytoprotectant protein in rat kidney. Am J Physiol，1991；260(4Pt2)：F479

3 Longo F M, Wang S, Narasimham P *et al*. cDNA cloning and expression of stress-inducible rat HSP70 in normal and injured rat brain. J Neurosci Res，1993；36(1)：325

4 Noiri E, Kuwata S, Nosaka K *et al*. Tumor necrosis factors mRNA expression in lipopolysaccharide stimulated rat kidney. Am J Path，1994；144(6)：1159

5 蔡文琴，王伯沅主编.实用免疫细胞化学及核酸分子原位杂交技术.成都：四川科学技术出版社，1994：408～410

6 Robinson B L, Morita T, Toft D O *et al*. Accelerated recovery of postischemic stummed myocardium after induced expression of myocardial heat-shock protein. J Thorac Cardiovasc Surg，1995；109(4)：753

7 Udelsman R, Blake M J, Stagg C A *et al*. Vascular heat shock protein expression in response to stress. Endocrine and autonomic regulation of this age-dependent response. J Clin Invest，1993；91(2)：465

8 Leung T K, Rajendran MY, Monfries C *et al*. The human heat-shock protein family: expression of novel heat inducible HSP70(HSP70B) and isolation of its cDNA and genomic DNA. Biochem J，1990；267(1)：125

9 Mosser D D, Duchaine J, Massie B. The DNA-binding activity of the human heat shock transcription factor is regulated *in vivo* by HSP70. Mol Cell Biol，1993；13(9)：5427

10 Kiang J G, Carr F E, Burns M R *et al*. HSP72 synthesis is promoted by increased in Ca^{2+} or activation of G-protein but not pHi or cAMP, Am J Physiol，1994；267(1pt1)：C104

(收稿：1998-01-20；修回：1998-05-14)

(编辑　张大春)

Study of expression of renal heat shock protein 72 gene after severe burns in rats*

Liu Li, Yang Zongcheng, Zhao Yangbing, Fu Zuhong, Li Ao (Institute of Burn Injury, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing，400038)

Abstract Objective: The expression of heat shock protein 72 gene (HSP 72) in the renal tissue was observed after severe burn and heat shock in rats and its effects and significance discussed. Methods: The expression of HSP 72 mRNA was determined with RT-PCR, the expression of HSP 72 protein with western blotting and its distribution with hybridization *in situ*. Results: ①After burn injury, the expression of HSP 72 mRNA and protein was increased progressively in the early stage and it reached a high level in the 24th hour postburn and remained at that level since then. ②The accumulation of HSP 72 mRNA and protein reached the peak in the period from 6th to 12th hour in the kidneys. Even in the 24th hour, the level of HSP 72 mRNA and protein remained quite high. ③In the rat kidneys, HSP 72 mRNA distributed in the epithelial cells of the proximal and distal convoluted tubules and collecting tubes. Conclusion: The expression of HSP 72 gene after burns remained longer than heat shock and its distribution was quite wide with high expression level.

Key words burns；kindneys；heat shock protein gene

* This project was supported by the "Ninth five" obligatory budget of PLA，No. 96L043

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