

[文章编号] 1000 - 4718(2006)09 - 1820 - 05

## HSP70 对大鼠肝脏局部缺血再灌注后炎症反应的影响\*

安冬艳, 赵 祯, 曹 宇<sup>△</sup>

(中国医科大学生理教研室, 辽宁 沈阳 110001)

**[摘要]** 目的: 通过热应激预处理诱导 HSP70 表达, 探讨其对肝脏缺血再灌注损伤后炎症反应的影响。方法: 采用大鼠局部缺血再灌注模型(IR 组), 并在热应激预处理(H + IR 组)及槲皮素 + 热应激预处理(Q + H + IR 组)条件下观察肝脏缺血再灌注后 HSP70、ICAM - 1 的表达及 MPO 的活性; 测定血清 ALT 和 AST 的活性; 电镜观察肝细胞结构的改变。结果: 在 H + IR 组检测的各时点 HSP70 表达均明显高于其它两组, 对肝脏进行缺血再灌注后, 肝细胞损伤较轻, 血清 ALT、AST 升高不明显( $P < 0.01$ ); 肝组织中 ICAM - 1 表达增加, 以再灌注后 6 h 最显著, MPO 活性升高以 12 h 最为显著, 但两者变化均低于 IR 组和 Q + H + IR 组( $P < 0.01$ )。结论: 热应激预处理诱导产生 HSP70 蛋白能够降低大鼠肝脏缺血再灌注损伤过程 ICAM - 1 的表达和 MPO 活性的改变, 进而抑制炎症反应引起的肝脏损伤。

**[关键词]** 热休克蛋白质 70; 再灌注损伤; 胞间粘附分子 1; 过氧化物酶; 肝

**[中图分类号]** R657.3

**[文献标识码]** A

### Effects of heat shock protein 70 on inflammation after hepatic local ischemia/reperfusion in rats

AN Dong - yan, ZHAO Zhen, CAO Yu

(Department of Physiology, China Medical University, Shenyang 11001, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To study the effects of heat shock protein 70 (HSP70) induced by the heat stress pretreatment on inflammation after hepatic ischemia/reperfusion. **METHODS:** With the hepatic local ischemia/reperfusion model (IR group), heat stress pretreatment (H + IR group) and injecting quercetin before heat stress pretreatment (Q + H + IR group) were performed. The HSP70, intercellular adhesion molecule - 1 (ICAM - 1) and the myeloperoxidase (MPO) activity were detected. The levels of serum ALT and AST and histological changes of the hepatocytes were also observed. **RESULTS:** In H + IR group, the HSP70 expression was higher than that in other groups at each time point, after performing ischemia - reperfusion, hepatic injury was slighter. The levels of serum ALT and AST were increased slightly ( $P < 0.01$ ). The expression of ICAM - 1 and the changes of MPO activity increased and peaked respectively at 6 h and 12 h after reperfusion. However, they were lower in H + IR group than those in IR group and Q + H + IR group. **CONCLUSION:** The HSP70 induced by heat stress pretreatment reduces the expression of ICAM - 1 and the changes of MPO activity during hepatic ischemia - reperfusion, then hepatic injury is depressed from the inflammation.

**[KEY WORDS]** Heat - shock proteins 70; Reperfusion injury; Intercellular adhesion molecule - 1; Peroxidase; Liver

肝脏缺血再灌注损伤是影响肝脏手术后临床效果的重要问题之一, 其复杂的发病机制中细胞炎症因子的产生、中性粒细胞浸润所介导的损伤起重要作用<sup>[1]</sup>。热应激预处理即是预先给予机体组织或细胞一定强度的温热刺激致使其发生热休克反应, 产

生热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs), 其中 HSP70 是一组基因序列和蛋白质结构高度保守的内源性、保护性蛋白质家族, 具有“分子伴侣”和提高细胞对应激原的耐受性等生物学功能<sup>[2]</sup>。目前的研究已证实, HSP70 具有抵抗肝脏缺血再灌注损伤, 保护

[收稿日期] 2004 - 12 - 08

[修回日期] 2005 - 03 - 14

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30270198); 沈阳市自然科学基金资助项目(No. 041129)

△通讯作者 Tel: 024 - 23256666; E - mail: caoy5955@sina.com

组织细胞的作用,但确切的生物学机制尚不清楚。本实验采用热应激预处理方法诱导大鼠肝脏 HSP70 表达,观察 HSP70 对肝脏缺血再灌注损伤中细胞炎症因子产生和中性粒细胞浸润程度的影响,旨在探讨 HSP70 保护缺血肝脏,减轻再灌注损伤的生物学机制,以期开发可行性治疗和预防措施。

## 材 料 和 方 法

### 1 实验动物

选用健康 Wistar 大鼠,雌雄不拘,体重 250-300 g,由中国医科大学实验动物中心提供。将 90 只大鼠随机分为 3 组,每组 30 只:(1)局部缺血再灌注(IR)组:进行肝脏局部缺血及再灌注处理,具体操作见后述方法 3;(2)热应激预处理+局部缺血再灌注(H+IR)组:进行热应激预处理后 16 h 再进行肝脏局部缺血及再灌注处理,具体操作见后述方法 2,3;(3)槲皮素+热应激预处理+局部缺血再灌注(Q+H+IR)组:在热应激预处理前 10 min 腹腔注射 1% 槲皮素(陕西慧科植物开发有限公司)7 mg/kg·BW,再进行同(2)处理。为确定槲皮素抑制 HSP70 合成的效果,预先分别采用 3、5、7、9 mg/kg·BW 槲皮素进行剂量依赖性实验,检测肝脏 HSP70 表达水平。

### 2 热应激处理

用 1% 戊巴比妥钠,40 mg/kg·BW 腹腔注射麻醉动物后,将数字式温度计的温度传感探头插入大鼠直肠内约 6 cm,测定直肠温度。然后将大鼠放入 45℃ 的电热恒温培养箱中进行加热处理,培养箱中湿度保持在 40%-60%,至其直肠温度达  $42 \pm 0.5$ ℃,保持 15 min,将大鼠移至室温环境中以备后续实验。

### 3 肝脏局部缺血再灌注模型

实验前大鼠禁食 12 h,自由饮水,腹腔注射麻醉同前,常规手术操作沿腹白线作约 1.5 cm 的切口,暴露肝脏,轻轻游离肝脏左、中叶肝蒂,用无创伤微血管夹夹闭入肝血流,造成左、中叶的缺血,40 min 后,松开微血管夹,进行再灌注。

### 4 检测指标及方法

**4.1 肝组织中 HSP70 的表达量** 应用 Western blotting 方法分别于热应激后 0、4、8、16、24、48 h 取部分肝脏组织,加预冷的裂解液,在冰浴中进行超声破碎,4℃,12 000×g,30 min 离心后取上清。用分光光度计测定样品中蛋白质的浓度。各取 50 μg 蛋白质,通过 9% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,电转移至硝酸纤维膜(华美生物工程公司)。使用兔抗大鼠 HSP70 单克隆抗体(NeoMarKer 公司)

(1:500),Ⅱ抗为羊抗兔 IgG(1:1 000)。使用碱性磷酸酶检测试剂盒(Vactastain ABC Kit Vector Laboratories,USA)室温下显色。用自动电泳凝胶成像分析仪(MetaMorp/DP10/BX41, UIC/OLYMPUS, US/JP)进行定量分析。

**4.2 肝组织中细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达** 应用免疫组织化学染色法将肝组织标本用 10% 中性甲醛固定,常规石蜡包埋,切片。参照即用型 SABC 免疫组化试剂盒和 DAB 试剂盒的使用说明书要求进行操作。ICAM-1 I 抗(武汉博士德生物工程有限公司)用 PBS 1:80 稀释,阴性对照采用 PBS 代替 I 抗。

**4.3 肝组织髓过氧化物酶(MPO)活性的测定** 采用比色法测定肝组织中 MPO 活性。具体操作按照南京建成生物工程研究所提供的试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明进行。

**4.4 肝功能测定** 用全自动生化分析仪测定血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天门冬氨酸转氨酶(AST)的活性。

**4.5 肝组织形态学观察** 取 0.2 cm×0.2 cm×0.3 cm 肝组织于 2.5% 戊二醛中固定,按透射电镜要求制片,常规铅铀双染色,电镜下观察肝脏组织学改变。取未缺血区肝组织作对照观察。

### 5 统计学处理

所有数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用方差分析。

## 结 果

### 1 各实验条件下肝脏组织中 HSP70 的表达水平

经热应激处理后,肝脏组织中 HSP70 的表达水平逐渐增加,在 16 h 达高峰,以后随时间的推移而减少,见图 1。若在热应激处理前,给予 HSP70 诱导合成抑制剂槲皮素,则可见 HSP70 蛋白表达呈现剂量依赖性抑制,即随着槲皮素注射剂量的增加,HSP70 表达下调,在所用槲皮素剂量达到 7 mg/kg 时可见明显的抑制效果,见图 2。

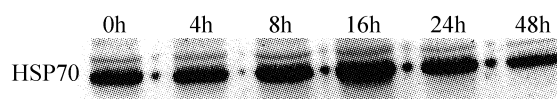


Fig 1 Expression of HSP70 after heat stress treatment in rat livers.

### 图 1 热应激处理后 HSP70 的表达情况

### 2 肝脏缺血再灌注后 ICAM-1 表达的免疫组织化学染色分析

图 3 显示的是各组在缺血再灌注 6 h 后肝脏

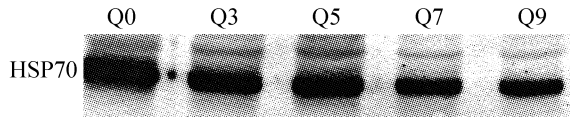


Fig 2 Expression of HSP70 at 16 h after heat stress treatment, and with quercetin (0, 3, 5, 7, 9 mg/kg, ip) 10 min before undergoing heating.

图2 注射槲皮素后 HSP70 的表达

ICAM - 1 表达的免疫组织化学染色图像。ICAM - 1 阳性反应产物呈棕黄色颗粒, 主要位于肝小叶中央静脉内皮细胞和肝窦内皮细胞的胞膜上。可见 H + IR 组图像中的阳性反应产物明显少于 IR 组和 Q + H + IR 组。采用显微图像分析仪, 以整合吸光度进行定量分析。结果显示, 各实验组 ICAM - 1 的表达均随缺血再灌注时间的延长而增加, 6 h 达高峰, 随后逐渐降低, 在各时点 H + IR 组 ICAM - 1 表达值均明显低于 IR 组 ( $P < 0.01$ ), Q + H + IR 组与 IR 组比较, ICAM - 1 表达水平无显著区别 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

### 3 缺血再灌注后肝组织中 MPO 活性变化

各实验组肝脏组织中 MPO 活性均随缺血再灌注时间的延长逐渐增强, 12 h 时达高峰, 而 H + IR 组各时点均比同一时点 IR 组和 Q + H + IR 组 MPO 活性低 ( $P < 0.01$ ), IR 组和 Q + H + IR 组 MPO 活性比较无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

### 4 缺血再灌注后各组大鼠血清酶活性的改变

各组血清酶 ALT 活性变化与 AST 活性变化趋势一致。3 组 ALT 及 AST 活性均随缺血再灌注时间的延长而逐渐升高, 6h 达高峰, 随后缓慢下降。但

经过热休克预处理 (H + IR 组) 血清酶活性改变幅度低于 IR 组 ( $P < 0.01$ ), IR 组和 Q + H + IR 组比较无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 见表 3, 表 4。

### 5 肝组织电镜下观察

电镜观察可见, 未缺血区肝组织细胞界限清楚, 线粒体未见肿胀。经过热应激预处理后再进行缺血再灌注 (H + IR 组), 仍可见清楚的肝细胞界限, 细胞内少量线粒体肿胀, 部分线粒体可观察到嵴的存在, 也可见到内质网。未进行热应激预处理而进行缺血再灌注 (IR 组) 的情况下, 出现肝细胞界限不清楚, 细胞内大量线粒体肿胀, 破裂。热应激预处理前使用槲皮素抑制 HSP70 表达 (Q + H + IR 组) 时, 肝细胞界限模糊, 大量线粒体亦出现肿胀、破裂、溶解, 部分细胞核固缩。见图 4。

## 讨 论

肝脏缺血再灌注损伤常见于肝脏手术后、失血性休克等情况下发生的临床病理生理过程, 相关问题长期受到学者们的广泛关注和深入的研究。本研究显示, 肝脏经缺血再灌注后显示肝脏损伤的血清中 AST、ALT 活性随缺血再灌注的进行而逐渐升高, 6 h 达最高值后缓慢下降。电镜下也观察到肝细胞一定程度的损伤。而经过热应激预处理后再进行缺血再灌注, 可见肝细胞损伤明显减轻。但在热应激预处理前预先应用槲皮素, 则可明显减弱热应激预处理对其后进行的缺血再灌注时肝脏损伤的影响。槲皮素是一种生物类黄酮, 广泛存在于植物当中, 能通过抑制热休克因子 - 1 的激活而抑制 HSP70 的合

表 1 缺血再灌注后肝组织中 ICAM - 1 的表达

Tab 1 Expression of ICAM - 1 in the livers after ischemia - reperfusion (Integrated A value.  $\bar{x} \pm s. n = 6$ )

Group	Time after ischemia - reperfusion (h)				
	0	3	6	12	24
IR	86.89 ± 7.85	526.99 ± 29.77	735.10 ± 39.19	413.06 ± 37.56	214.68 ± 33.92
H + IR	57.61 ± 4.54 <sup>#</sup>	368.05 ± 36.94 <sup>#</sup>	551.37 ± 35.42 <sup>#</sup>	203.17 ± 21.91 <sup>#</sup>	143.84 ± 22.55 <sup>#</sup>
Q + H + IR	85.96 ± 7.57 <sup>*</sup>	516.71 ± 23.30 <sup>*</sup>	736.12 ± 47.78 <sup>*</sup>	419.27 ± 33.42 <sup>*</sup>	216.41 ± 30.76 <sup>*</sup>

<sup>#</sup> $P < 0.01$  vs IR group or Q + H + IR group; <sup>\*</sup> $P > 0.05$  vs IR group.

表 2 肝脏缺血再灌注后组织中 MPO 活性变化

Tab 2 Changes of MPO activity in the livers after ischemia - reperfusion (U/L.  $\bar{x} \pm s. n = 6$ )

Group	Time after ischemia - reperfusion (h)				
	0	3	6	12	24
IR	0.0322 ± 0.0057	0.0882 ± 0.0051	0.0996 ± 0.0072	0.1461 ± 0.0369	0.0776 ± 0.0096
H + IR	0.0297 ± 0.0027	0.0521 ± 0.0049 <sup>#</sup>	0.0639 ± 0.0058 <sup>#</sup>	0.0831 ± 0.0071 <sup>#</sup>	0.0571 ± 0.0054 <sup>#</sup>
Q + H + IR	0.0353 ± 0.0036	0.0833 ± 0.0059 <sup>*</sup>	0.0967 ± 0.0063 <sup>*</sup>	0.1253 ± 0.0104 <sup>*</sup>	0.0821 ± 0.0087 <sup>*</sup>

<sup>#</sup> $P < 0.01$  vs IR group or Q + H + IR group; <sup>\*</sup> $P > 0.05$  vs IR group.

表3 肝脏缺血再灌注后血清酶ALT活性的改变

Tab 3 Changes of ALT activity in the serum after ischemia - reperfusion (U/L.  $\bar{x} \pm s$ . n=6)

Group	Time after ischemia - reperfusion (h)				
	0	3	6	12	24
IR	155.83 ± 27.54	398.00 ± 59.91	928.17 ± 64.01	667.00 ± 50.04	403.00 ± 29.61
H + IR	106.50 ± 15.83 <sup>#</sup>	283.00 ± 44.31 <sup>#</sup>	771.00 ± 80.43 <sup>#</sup>	408.67 ± 37.44 <sup>#</sup>	163.83 ± 13.53 <sup>#</sup>
Q + H + IR	145.00 ± 33.55 <sup>*</sup>	410.33 ± 35.13 <sup>*</sup>	924.83 ± 84.63 <sup>*</sup>	695.67 ± 32.14 <sup>*</sup>	394.50 ± 75.91 <sup>*</sup>

<sup>#</sup>P < 0.01 vs IR group or Q + H + IR group; <sup>\*</sup>P > 0.05 vs IR group.

表4 肝脏缺血再灌注后血清酶AST活性的改变

Tab 4 Changes of AST activity in the serum after ischemia - reperfusion (U/L.  $\bar{x} \pm s$ . n=6)

Group	Time after ischemia - reperfusion (h)				
	0	3	6	12	24
IR	233.33 ± 30.05	495.17 ± 57.79	1 053.17 ± 131.51	729.00 ± 21.15	523.00 ± 57.23
H + IR	172.83 ± 15.41 <sup>#</sup>	410.00 ± 48.36 <sup>#</sup>	818.00 ± 89.43 <sup>#</sup>	525.00 ± 57.05 <sup>#</sup>	292.00 ± 25.87 <sup>#</sup>
Q + H + IR	255.67 ± 28.08 <sup>*</sup>	516.17 ± 67.19 <sup>*</sup>	1 009.33 ± 137.11 <sup>*</sup>	740.17 ± 35.11 <sup>*</sup>	608.00 ± 58.35 <sup>*</sup>

<sup>#</sup>P < 0.01 vs IR group or Q + H + IR group; <sup>\*</sup>P > 0.05 vs IR group.

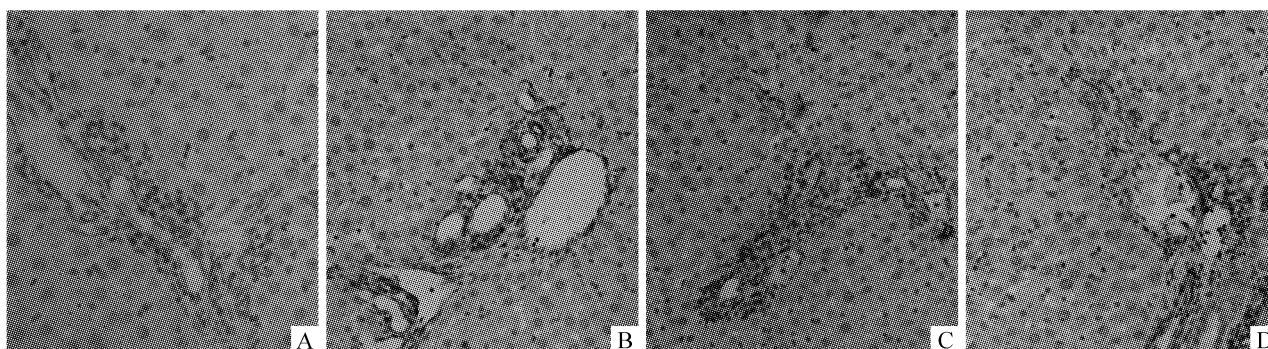


Fig 3 Immunohistochemistry staining of ICAM - 1 at 6 h after hepatic ischemia - reperfusion (SABC, ×100). A: PBS negative control; B: IR group; C: H + IR group; D: Q + H + IR group.

图3 肝脏缺血再灌注后6 h时ICAM-1的免疫组织化学染色

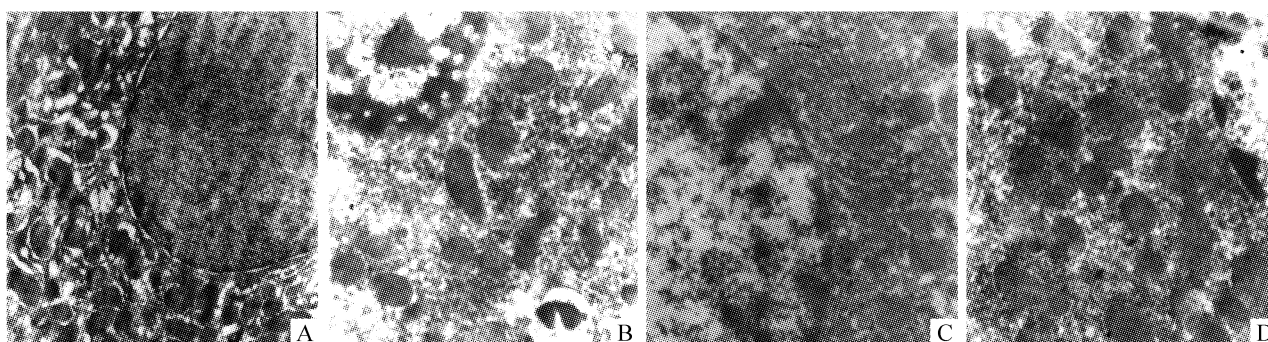


Fig 4 Ultrastructural changes of hepatocytes at 6 h after hepatic ischemia - reperfusion (TEM, ×15 000). A: control without ischemia - reperfusion (×8 000); B: IR group; C: H + IR group; D: Q + H + IR group.

图4 肝脏缺血再灌注后6 h肝细胞超微结构变化

成<sup>[3]</sup>。本结果提示,HSP70在热应激预处理减轻肝脏缺血再灌注损伤的保护作用中起重要作用。

近年来研究表明,肝脏缺血再灌注后的炎症反应是导致组织细胞损伤的重要因素。有研究显示,肝脏缺血再灌注早期即有枯否细胞的激活,并产生

大量活性氧物质(radical oxygen species,ROS)和许多炎性细胞因子<sup>[1,4]</sup>。在细胞趋化因子、细胞黏附分子等共同作用下,使中性粒细胞(polymorph nuclear leukocyte,PMN)趋化、黏附、聚集、活化,进而介导炎症反应<sup>[1]</sup>。PMN介导再灌注损伤的机制包括阻塞微小

血管,加重微循环障碍;释放活性氧产物和蛋白酶;增加血管通透性,引起组织水肿等<sup>[5]</sup>。为确定肝组织中 PMN 的浸润程度,我们测定了肝组织中 MPO 活性的变化。MPO 是存在于中性粒细胞内的一种耐高温酶,可作为 PMN 浸润的定量指标<sup>[6]</sup>。本实验结果表明,各实验组大鼠肝组织中 MPO 活性均随缺血再灌注时间的延长而升高,但是在 HSP70 高表达的 H + IR 组,MPO 活性改变显著低于 IR 组和 Q + H + IR 组。细胞黏附分子是一类存在于细胞表面的糖蛋白,主要作用为促进细胞之间和细胞与组织间的黏附。ICAM - 1 是细胞黏附分子超家族的成员之一,可由多种刺激因素介导在单核细胞、内皮细胞及激活的淋巴细胞等多种类型细胞中表达。在肝脏缺血再灌注过程中,ICAM - 1 的主要作用是使 PMN 与肝窦内皮细胞牢固结合,同时还可诱导内皮细胞表面 P - selectin 的表达,促进 PMN 黏附及活化。本实验结果显示,经过热应激预处理诱导 HSP70 高表达能够明显降低缺血再灌注后肝细胞 ICAM - 1 的表达。并且 ICAM - 1 的表达时程早于 MPO 活性变化时程。

本研究显示大鼠肝脏经缺血再灌注后造成肝组织结构 and 功能的严重损伤,通过热应激预处理诱导 HSP70 高表达能够明显减轻肝脏的炎症反应程度。此作用可能与 HSP70 下调 ICAM - 1 的表达,进而降低 PMN 浸润程度有关。HSP70 能促进机体内源性抗氧化物触酶的产生,同时可通过抑制生成氧自由基的关键酶 - NADPH 氧化酶,减少 ROS 产生<sup>[7]</sup>。ROS 和肿瘤坏死因子等可上调黏附分子如 ICAM - 1 等的表达,介导 PMN 黏附于肝窦内皮细胞<sup>[4]</sup>。因此,我们推测 HSP70 蛋白下调 ICAM - 1 表达,减少

PMN 浸润可能与其抑制 ROS 产生有关。但其具体调控机制还有待于进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Suzuki S, Toledo - Pereyra LH, Rodrigue FJ, et al. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury: modulating effects of FK506 and cyclosporine[J]. *Transplantation*, 1995, 55(6): 1265 - 1272.
- [2] 赵 敏,孟 醒. 谷氨酰胺对脂多糖血症大鼠热休克蛋白 70 和肿瘤坏死因子 -  $\alpha$  表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(8): 1587 - 1589.
- [3] 钟 华,顾春红,矫 强,等. 槲皮素对 K562/A02 细胞株热休克蛋白 mRNA 及蛋白质表达的影响[J]. *上海第二医科大学学报*, 2003, 23(4): 312 - 314.
- [4] Ohkohchi N, Shibuya H, Tsukamoto M, et al. Kupper's cells modulate neutrophil activity by superoxide anion and tumor necrosis factor - delta in reperfusion injury of liver transplantation - mechanisms of radical generation and reperfusion injury after cold ischemia [J]. *Transplant Proc*, 1999, 31(2): 1055 - 1058.
- [5] 张 蕾,陈雨信,寿楠海. 中性粒细胞介导的肝脏缺血再灌注损伤[J]. *中国现代普外科进展*, 2003, 6(2): 65 - 67.
- [6] Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, et al. Correlation between myeloperoxidase - quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat - effects of neutrophil depletion[J]. *Stroke*, 1994, 25(7): 1475 - 1496.
- [7] Yamamoto Y, Kume M, Yamaoka Y, et al. Implication of heat shock protein during liver surgery and liver perfusion [J]. *Recent Results Cancer Res*, 1998, 147(1): 72 - 157.