

热休克蛋白 70 与 2 型糖尿病合并脑缺血的进展

霍福贵 高萍

【摘要】 2型糖尿病合并脑缺血疾病越来越受关注,它是2型糖尿病患者致死、致残的主要原因之一,严重影响患者的生存和生活质量。缺血性脑梗死的发生与炎症反应、细胞凋亡等有关。近年来,与炎症和细胞凋亡相关的热休克 70 (HSP70) 家族因具有广泛的生物学功能而成为生命科学研究中的热点,并且其在脑缺血中的神经保护作用的研究越来越受到重视,现就 HSP70 与糖尿病合并脑缺血性疾病的关系作一综述。

【关键词】 糖尿病, 2型; 脑缺血; HSP70 热休克蛋白质类

The progress of heat shock protein 70 and type 2 diabetes mellitus with cerebral ischemia HUO Fu-gui, GAO Ping. Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Corresponding author: GAO Ping, Email: pinggao0411@yahoo.com.cn

【Abstract】 Type 2 diabetes mellitus with cerebral ischemic disease have been growing concerned, it is one of the main reasons of death, disability in type 2 diabetes mellitus, affecting patients' survival and quality of life seriously. The occurrence of cerebral infarction is in related with inflammation and apoptosis. In recent years, inflammation and apoptosis-related heat shock 70 (HSP70) family has become a hot spot in life science research because of its extensive biological functions, and the research about its neuroprotections in cerebral ischemia have received more attention, Now we have a review on the relationship of HSP70 and diabetic patients with cerebral ischemic disease .

【Key words】 Diabetes mellitus, type 2; Brain ischemia; HSP70 heat-shock proteins

一、热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 70 的概念及其与脑缺血的关系简介

HSP首先是在果蝇体内发现的。除环境高温以外,其他应激原如缺氧、寒冷、感染、饥饿、创伤、中毒等也能诱导细胞生成HSP。因此,HSP又称应激蛋白(stress protein, SP),HSP按其相对分子质量大小分为为4个家族:HSP90家族、HSP70家族、HSP60家族和小分子HSP家族。HSP70是HSP家族中最保守、在应急情况下产生较多的蛋白。目前发现4种不同成员^[1]:HSP72在正常细胞中并不表达或微量表达,在应激状态下则迅速增加,属于诱导型HSP70;HSP73广泛存在与细胞中,属于结构型HSP70;HSP75与HSP78分别位于线粒体和内质网腔,后两种蛋白在应激时表达量较低。

HSP70各种动物中普遍存在,具有良好的保守性。HSP70在正常大鼠中不表达或者很少表达,在缺血应激的情况下脑内其他蛋白合成被不同程度的抑制而HSP70可以迅速被诱导并大量表达,保护受损神经细胞免受缺血应激的损害,曾有研究证实,实验动物对应激反应存在“热耐受”现象^[2];其产生与HSP70有关。同时发现经过短暂亚致死性脑缺血预处理的大鼠,在后来致死性缺血情况下,脑细胞存活率升高、梗死面积减小,该

现象被称为“脑缺血耐受”。脑缺血耐受对脑细胞具有很强的保护作用,HSP尤其是HSP70在脑缺血耐受中有重要作用。HSP70在缺血再灌注大鼠中的表达因缺血类型和严重程度不同。轻度脑缺血可引起HSP70基因的转录和翻译,中度缺血可引起HSP70基因的转录而不能翻译,重度缺血时HSP70基因的转录和翻译均停止^[3],在全脑缺血模型中HSP70表达在诸如海马、丘脑、纹状体、皮层等选择性的易损区,短暂缺血时HSP70 mRNA缺血数小时在海马能够测定并且可以翻译蛋白质,进一步的缺血HSP70 mRNA缺血数小时在海马仍能够测定但是随细胞死亡而减少并且仅仅表达在CA1区,HSP70在CA1区不能表达。局部缺血中,HSP70仅仅表达在梗死周围的神经元和神经胶质细胞,尽管在梗死区内皮细胞也有表达^[4]。但在梗死区中心HSP70表达相对较少,这与HSP70只表达在对缺血抵抗存活区域细胞中,在神经元缺失的区域表达较少的文献记载是一致的,并且脑缺血时,不同脑区细胞产生的HSP70的表达量方面也有不同,Kawagoe等^[5]研究发现在CA3区HSP70 mRNA与HSP70蛋白表达均较多,而且HSP70 mRNA诱导表达的持续时间长于CA1区,提示不同脑区的坏死程度不同,与HSP70基因在转录和翻译水平的不同。

人类对于HSP70的研究无论从基因水平还是从翻译水平上大都局限在动物研究阶段,对于其在人类方面的影响研究相对较少。人类HSP70基因定位于1、5、6、9、11和14号染色体上,21号染色体上也可能存在HSP70基因^[6],HSP70-1、HSP70-2

和 HSP70-hom 3 个基因来编码 HSP70 蛋白质。HSP70-1 基因在 -110、120、190、等位点存在多态性, HSP70-2 基因在 145(A/G)、1267(A/G)、2074(G/C) 和 2257 位点存在多态性; HSPTO-hom 基因在 1097、2437(T/C)、2180(G/A) 和 2763(G/A) 位点存在多态性^[7]。目前关于 HSP70-1 基因多态性与疾病关系方面的研究大多是自身免疫性疾病和炎性疾病^[8]。Ridker 等^[9]发现体内持续的低水平的炎症反应是导致动脉粥样斑块和血栓形成的主要因素, 并且在 Ross^[10]的报道中指出动脉粥样硬化的过程中有炎症反应的参与, 而动脉粥样硬化是导致脑缺血发作的主要因素。刘建平等的研究发现: HSP70-1 b2 等位基因频率明显比对照组高(36.64% vs. 21.99%, $P < 0.001$), 提示其与缺血性脑卒中存在关联性, 这与 Zee 等^[11]对高加索人的研究结果不一致, 可能由于人种的原因(高加索人为白种人, 而中国人是黄种人), 而 HSP70-2 基因多态性与 2 型糖尿病合并动脉粥样硬化存在关联, 并可能是脑缺血的一个重要危险因素^[12], 正常情况下 HSP70 的表达有利于稳定粥样斑块, 具有预防其破裂功能, HSP70 异常增多可使斑块内单核细胞中白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 表达上调, 进而使斑块稳定性降低甚至造成破裂。Robertina 等研究发现, HSP70-2 (1267A/G) 基因携带 G 基因的纯合子或杂合子发生斑块破裂可能性比 A/A 基因型高 1.86 倍。同时发现携带有 G 基因的细胞因子 IL-6、TNF- α 和 γ -干扰素(INF- γ) 表达增加, 可能因为慢性炎症反应导致细胞因子 IL-6、TNF- α 和 INF- γ 释放增加, 和 HSP70 的热休克转录因子 1 相互作用, 导致了 HSP70 非正常过量表达^[13]。

二、HSP70 基因多态性与脑梗死

脑梗死是脑缺血时的严重表现形式, 是使脑缺血患者致死和致残的主要原因。在一项关于国内一项关于 HSP70 基因多态性与脑中风的研究中, 用限制性内切酶 BsrB I 识别 HSP70-1 基因 190G/C 双等位基因多态性并消化。得到 3 种 HSP70-1 基因型: b1b1、b1b2 和 b2b2。结果病例组的 b2 等位基因的频率明显高于对照组(36.64% vs. 1.9%, $P < 0.001$)^[14]。Logistic 回归分析表明 +190 b2b2 和 b1b2 基因型是脑梗死发病的独立危险因素 (OR 5.41)。可见脑梗死的发生与遗传关系密切。

三、HSP70 表达与脑梗死

在金醒昉等^[15]对老年脑梗死患者与正常老年对照 Western blot 方法检测淋巴细胞 HSP70 水平中结果发现起病 24 h 内, 轻型、中型及重型脑梗死 HSP70 表达水平较对照组显著升高, 随后的时间里, 三组的 HSP70 含量较开始有所降低, 轻型比重型组下降较快, 轻型脑梗死组 HSP70 的表达水平反而低于重型脑梗死组 ($P < 0.01$)。据此可以推断 HSP70 不仅可以作为缺血开始的敏感型指标, 还可以估计预后。并且可以根据有关人员作出的 40 岁以上健康中老年人外周血淋巴细胞中 HSP70 基础表达的警戒参考范围^[16], 来测定患者 HSP70 表达水平, 与相同年龄段健康人群比较来初步判定患者对缺血的耐受性。有研究指出, HSP70 表达在机体遭受应激后迅速升高, 表达高峰在应激后 6 h^[17-18], 因此可以将 HSP70 作为脑缺血早期敏感的检测指标, 发觉患者有脑梗死的相关症状和体征。即刻抽血检测患

者 HSP70 水平, 在时间上早于头颅 CT 检查获得检查结果, 进而为早期溶栓治疗提供依据。

四、HSP70 与糖尿病合并脑缺血的关系

糖尿病合并脑缺血严重威胁人类的健康, 是致死、致残的主要原因。糖尿病人群的脑血管患病率明显高于非糖尿病人群, 而脑梗死占脑血管疾病的 60%~80%, 其患病率为非糖尿病人群的 4 倍^[19]。脑梗死是由多个基因和环境因素共同作用导致的一类极其复杂的疾病, 遗传因素在脑梗死的发生中起重要作用, HSP70-1 基因多态性与老年脑梗死遗传易感性有关, HSP70-2 基因多态性与 2 型糖尿病合并动脉粥样硬化相关, 可能是脑梗死的一个重要危险因素^[20]。研究表明 HSP70-2 基因 1267 多态性位点携带 G 基因的纯合子基因型与 2 型糖尿病高度相关 (OR 1.97)^[12]。众所周知动脉粥样硬化是由于动脉内膜下脂质沉积, 平滑肌细胞增生及纤维化并伴有钙化形成粥样斑块。正如前文指出, 体内持续低炎症反应是导致动脉粥样斑块及血栓形成的主要因素, 造成脑缺血性损伤。姜毅等^[21]发现缺血性脑卒中与血浆炎症指标有密切关系, 炎症在血管壁损伤中起重要作用。也有研究表明糖尿病合并脑缺血患者早期血液中 IL-6、NF- κ B 和 TNF- α 含量明显增高^[22]。糖尿病患者的高血糖状态也会加重脑缺血后神经细胞的损伤, 国外文献报道有学者进行的非高血糖和高血糖小鼠短暂脑缺血再灌注的研究中发现高血糖脑缺血组与非高血糖组相比上调了 HSP70 mRNA 及 HSP70 蛋白的表达^[23], 在陈利国^[24]的研究报道中, 高血压和 2 型糖尿病患者白细胞中 HSP-70 基因表达明显高于正常对照组, 说明上述疾病发生时, HSP70 基因异常表达, HSP70 蛋白表达增加。还有研究表明患者糖尿病时间越长, 其血液中的 HSP70 蛋白水平也越高^[25], 同时川穹嗪等具有活血化瘀作用的药物具有提高病灶部位 HSP70 基因的转录、翻译水平, 使 HSP70 增加、表达增强, 起到保护局部细胞的作用^[26], 因此我们可以在临床上可以通过应用药物改善病变局部供血来诱导 HSP70 的表达起到保护受损细胞的目的。

五、脑缺血后 HSP70 表达神经保护的可能机制

脑缺血的发生发展过程涉及多种复杂病理机制, HSP70 在其过程中发挥多种作用。其具体可能的机制是: (1) 抗细胞凋亡。细胞凋亡过程和 HSP70: ①细胞凋亡蛋白酶的激活^[27]。②线粒体释放凋亡蛋白的参与^[28-29]: CytC (细胞色素 C) 作为凋亡因子, 从线粒体释放到细胞浆中, 和同源物 CED-4, 凋亡酶激活因子 1 (apoptotic pro-tease activating factor -1, Apaf -1), 三磷酸腺嘌呤脱氧核苷酸 (dATP) 相互作用形成凋亡体 (apopto-some), 并且激活 caspase-9 (蛋白酶-9), 从而启动 caspase 级联反应。caspase-9 激活 caspase-3, caspase-3 激活脱氧核糖核酸酶 (DNase), 导致细胞凋亡^[30]。HSP70 可以发挥对抗 Apaf-1 作用来抗细胞凋亡^[31-32]。③Bcl-2 蛋白家族的调节^[33]: Bcl-2 家族可分为两类: 一类是抗凋亡蛋白 (anti-apoptotic), 有 Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w。另一类是促凋亡蛋白 (pro-apoptotic), 包括 Bax、Bak 亚族以及仅含有 BH3 结构的如 Bid、Bad、Bim/Bod 和 PUMA 亚族^[34]。Bcl-2 家族成员之间可形成同源或异源二聚体, 在抗细胞凋亡中起着重要作用, Bcl-2 家族蛋白可以调节细

胞凋亡的线粒体途径, Bcl-2 蛋白的减少与凋亡的发生有关。④抑制凋亡蛋白酶活性下降^[35]。Beere 等^[36]表明 HSP70 增加可抑制由应激诱导的 c-Jun-N-terminal 激酶 (JNKs) 的激活和应激激酶 P38 (HO1) 的活性, 减少细胞凋亡。Giffard 等^[37]研究发现 HSP70 可以减少蛋白质的聚集抑制细胞的凋亡。(2) 分子伴侣作用。HSP70 是公认的主要的伴侣蛋白 (chaperonin) 之一。与新生、未折叠、错折叠或聚集的蛋白质相结合, 抑制应激状态下错误蛋白的合成和聚集, 减少产生不溶性聚集物, 加速正确的肽链折叠; 维持某些肽链的伸展状态, 以利于跨膜转运, 以提高受损细胞的存活率。(3) 抗氧化作用。缺血性脑损伤后常伴有大量氧自由基的产生, HSP70 通过抵抗氧自由基对细胞造成的损害来保护细胞。(4) 抗炎效应: 炎症在缺血性脑损伤过程中起着重要作用, 炎症可以激活诱导型一氧化氮合酶 (inducible NOS, iNOS) 和 NADPH 氧化酶产生活性氧化物, HSP70 通过限制活性氧化物的产生来发挥抗炎作用。(5) 免疫作用: HSP 通常被认为是细胞内的蛋白质, 只是在细胞内发挥功能。然而有研究证明 HSP70, 能释放到细胞外环境中, 调节免疫细胞功能^[38]。外源性 eHSP70 能刺激单核/巨噬细胞、树突状细胞 (DC)、血管内皮细胞合成和释放各种促炎因子, 如一氧化氮 (NO), TNF- α , IL-1, IL-6 等, 从而增强细胞的免疫功能^[39-40]。eHSP70 还具有刺激 DC 细胞的抗原呈递细胞功能, 激发 T 细胞介导的适应性免疫反应^[41-42]。因此 HSP70 兼有调节固有免疫和适应性免疫的作用。

综上所述, 诱导型 HSP70 在脑缺血过程中具有重要的神经保护作用, 在脑缺血再灌注损伤的缺血耐受诱导和保护缺血细胞方面扮演着多方面的角色, 对抗炎性刺激、抗细胞凋亡等方面发挥着巨大作用, HSP70 在各类脑损伤中的表达不仅是细胞受损的标志, 而且是脑损伤病情恶化的预测指标^[43]。这对于患者早期发现病情和改善愈后具有参考价值, 并且本文还在 HSP70 的临床治疗方面也给予了一定介绍 (尽管介绍较少), 但是目前大多对于 HSP70 的研究仅仅针对缺血性疾病的早期 (数小时或者数天), 而对于其在疾病的后期作用研究的相对较少, 还有 HSP70 过量表达方面的利弊关系学术界存在一定的争议和分歧, 因此以后继待解决的问题是在深化既有研究的基础上, 对其在疾病长期中的效应和解决上述分歧以及如何应用 HSP70 于临床治疗方面有所突破, 以便更好地应用于临床, 指导患者的治疗和愈后。

参 考 文 献

- Giffard RG, Han RQ, Emery JF, et al. Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia: the complex roles of heat shock protein 70. *Anesthesiology*, 2008, 109: 339-348.
- Donnelly TJ, Sievers RE, Vissers FL, et al. Heat shock protein induction in rat hearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion? *Circulation*, 1992, 85: 769-778.
- 宋文丽, 皇甫秋霞, 孙静. 针刺对脑缺血大鼠热休克蛋白 70 表达影响的研究进展. *现代中西医结合杂志*, 2005, 14: 3308-3309.
- Kelly S, Yenari MA. Neuroprotection: heat shock proteins. *Curr Med Res Opin*, 2002, 18 Suppl 2: s55-60.
- Kawagoe J, Abe K, Sato S, et al. Distributions of heat shock protein (HSP) 70 and heat shock cognate protein (HSC) 70 mRNAs after transient focal ischemia in rat brain. *Brain Res*, 1992, 587: 195-202.
- Tavaria M, Gabriele T, Kola I, et al. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones*, 1996, 1: 23-28.
- Singh R, Kølvrå S, Bross P, et al. Heat-shock protein 70 genes and human longevity: a view from Denmark. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1067: 301-308.
- Porto I, Leone AM, Crea F, et al. Inflammation, genetics, and ischemic heart disease: focus on the major histocompatibility complex (MHC) genes. *Cytokine*, 2005, 29: 187-196.
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*, 2000, 342: 836-843.
- Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, 340: 115-126.
- Zee RY, Bates D, Ridker PM. A prospective evaluation of the heat shock protein 70 gene polymorphisms and the risk of stroke. *Thromb Haemost*, 2002, 87: 622-625.
- Giacconi R, Caruso C, Lio D, et al. 1267 HSP70-2 polymorphism as a risk factor for carotid plaque rupture and cerebral ischaemia in old type 2 diabetes-atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126: 866-873.
- 杨文慧, 何燕, 魏云鸿, 等. 热休克蛋白 70 基因多态性与脑梗死及其危险因素的相关性. *中华老年心脑血管病杂志*, 2010, 12: 1151-1152.
- Liu J, Cheng J, Peng J, et al. Effects of polymorphisms of heat shock protein 70 gene on ischemic stroke, and interaction with smoking in China. *Clin Chim Acta*, 2007, 384: 64-68.
- 金醒昉, 杨莉, 陈明, 等. 老年性脑梗塞患者 hsp70 的研究. *卫生研究*, 2003, 32: 466-468.
- 金醒昉, 杨莉, 冯道义, 等. 健康中老年人外周血热休克蛋白 70 水平的调查. *中华老年医学杂志*, 2003, 22: 92-94.
- 赵珺, 傅震. 热休克蛋白 70 及其在脑缺血中的作用. *国外医学脑血管疾病分册*, 2002, 10: 229-231.
- 肖成峰, 陈胜, 潘勤, 等. 人外周血淋巴细胞热应激蛋白 70 的流式细胞术检测. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2001, 19: 59-61.
- 董砚虎, 李娟娟. 2 型糖尿病与心脑血管障碍. *中国医师进修杂志*, 2006, 29: 3-6.
- Giacconi R, Cipriano C, Muti E, et al. Involvement of -308 TNF-alpha and 1267 Hsp70-2 polymorphisms and zinc status in the susceptibility of coronary artery disease (CAD) in old patients. *Biogerontology*, 2006, 7: 347-356.
- 姜毅, 孙雪林. 沿海地区冠心病患者冠状动脉病变与核因子 κ B 蛋白表达的相关性分析. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2011, 18: 232-235.
- 魏巍, 周颖奇, 张征, 等. 糖尿病合并缺血性脑卒中患者 NF- κ B、IL-6 及 TNF- α 水平的变化及临床意义. *海军医学杂志*, 2013(2): 29-31.
- Muranyi M, He QP, Fong KS, et al. Induction of heat shock proteins by hyperglycemic cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, 139: 80-87.
- 陈利国. 高血压病、2 型糖尿病血瘀证与非血瘀证患者白细胞 HSP70 基因表达研究. *山东中医药大学学报*, 2005, 29: 21-23.
- Nakhjavani M, Morteza A, Khajeali L, et al. Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes. *Cell Stress Chaperones*, 2010, 15: 959-964.
- 邓常青, 王敏, 贺福元. 补阳还五汤及其有效部位组方对沙土鼠脑缺血再灌注后脑组织热休克蛋白 70 表达的影响. *中国中西医结合杂志*, 2002, 22: 193-195.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*, 1998, 281: 1312-1316.
- Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, 2000, 6: 513-519.
- Mignotte B, Vayssières JL. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem*,

- 1998, 252: 1-15.
- [30] 曹智, 马骏, 袁文俊, 等. 热休克蛋白 60 与细胞凋亡. 生理科学进展, 2008, 39: 267-270.
- [31] Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 476-483.
- [32] Beere HM, Wolf BB, Cain K, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 469-475.
- [33] Reed JC, Jurgensmeier JM, Matsuyama S. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1366: 127-137.
- [34] 顾昊, 张颖冬. 脑梗死中神经细胞凋亡的分子机制与治疗展望[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5: 5397-5399.
- [35] Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem*, 2002, 277: 432-438.
- [36] Beere HM, Green DR. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol*, 2001, 11: 6-10.
- [37] Giffard RG, Xu L, Zhao H, et al. Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *J Exp Biol*, 2004, 207: 3213-3220.
- [38] Jolesch A, Elmer K, Bendz H, et al. Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system. *European journal of cell biology*, 2012, 91: 48-52.
- [39] Campisi J, Fleshner M. Role of extracellular HSP72 in acute stress-induced potentiation of innate immunity in active rats. *Journal of Applied Physiology*, 2003, 94: 43-52.
- [40] Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature Medicine*, 2000, 6: 435-442.
- [41] Lehner T, Wang Y, Whittall T, et al. Functional domains of HSP70 stimulate generation of cytokines and chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvant activity. *Biochemical Society Transactions*, 2004, 32: 629-632.
- [42] Hickman-Miller HD, Hildebrand WH. The immune response under stress: the role of HSP-derived peptides. *Trends in Immunology*, 2004, 25: 427-433.
- [43] da Rocha AB, Zanoni C, de Freitas GR, et al. Serum Hsp70 as an early predictor of fatal outcome after severe traumatic brain injury in males. *Journal of Neurotrauma*, 2005, 22: 966-977.

(收稿日期: 2013-11-25)

(本文编辑: 戚红丹)

霍福贵, 高萍. 热休克蛋白 70 与 2 型糖尿病合并脑缺血的进展 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7 (24): 11767-11770.

中华医学会
CHINESE MEDICAL ASSOCIATION
1915