



高温高湿环境下颅脑火器伤后兔脑HSP70变化

近年研究发现在多种创伤性脑损伤动物模型中热休克蛋白70 (HSP70) 均有表达[1][2], HSP70蛋白表达增加对脑损伤后神经功能损害具有一定的保护作用, 减轻脑继发性损害。本研究探讨HSP70在高温高湿特殊环境下颅脑火器伤后的变化及其作用。

1 材料和方法

1.1 主要实验仪器与材料

仿真模拟热气候舱由南方医科大学热带医学研究所提供, 可调节温度、湿度、风速、辐射强度等。脑立体定向仪, Powlab/8sp生理记录仪, Bio-Rad Mini-Protein II 电泳槽, Bio-Rad Mini-Trans-Blot 转移槽, Bio-Profil型图像分析仪。HSP70单抗、HSP70标准品、PMSF、Aprotinin、DTT、SDS、DAB、EDTA、Tween-20均为Sigma产品。

1.2 实验动物分组及处理

参照猫脑枪弹伤模型[3]制作兔颅脑枪弹伤模型。Powlab/8sp生理记录仪动态监测生命体征变化。选用体质量(2.3±0.3) kg的新西兰大白兔24只随机分成3组, 每组8只。常温对照组: 置于温度(T) (22.0±0.5) °C、相对湿度(RH) 50%的仿真模拟气候舱中; 常温枪伤组: 颅脑枪弹伤后即置于T(22.0±0.5) °C、RH 50%的仿真模拟气候舱中; 高温高湿枪伤组: 颅脑枪弹伤后即置于T(39.0±0.5) °C、RH 80%~85%的仿真模拟气候舱中。上述各组动物送入仿真模拟气候舱中受湿热处理2 h, 2 h内未死亡注入空气处死。死前抽血5 ml, 即时分离淋巴细胞。死亡后取大脑皮质、下丘脑, 于-80 °C贮存。所用动物均由南方医科大学实验动物中心提供。

1.3 HSP70的检测

1.3.1 脑组织匀浆的制备 取100 mg脑组织加500 μl含EDTA和Aprotinin的悬浮缓冲液, 冰浴中匀浆、超声破碎, 取300 μl匀浆, 加入2×SDS凝胶加样缓冲液240 μl, 再加入DTT 60 μl混匀。沸水煮浴、离心, 取上清液, Lowry法测定蛋白质浓度[4]。

1.3.2 淋巴细胞可溶性蛋白质的提取[5] 5 ml淋巴细胞分离液面上缓慢加入等体积抗凝血样品, 离心, 吸出淋巴细胞层, D-hanks液清洗两遍, 离心收集淋巴细胞。冰浴中用预冷的PBS液洗涤淋巴细胞, 离心, 吸出上清液, 冰浴中剪碎、超声破碎。加等体积的2×SDS凝胶加样缓冲液。沸水煮浴、离心, 取上清液, Lowry法测定蛋白质浓度[4]。

1.3.3 Western blot检测HSP70 采用Western blot法, 等量匀浆上样, 进行12% SDS-PAGE。电泳结束, 取一胶作考马斯亮蓝R250染色, 鉴定电泳效果。电转仪将蛋白转移到硝酸纤维素膜(NC膜)。用丽春红S染色标记出HSP70标准品参照蛋白的位置。NC膜经过封闭、漂洗后, 分别加入一抗(HSP70单抗)、二抗孵育。应用化学发光和X线片显示。用Bio-Profil图像分析仪对显影带进行定量分析。根据各蛋白样品与标准蛋白显色积分的灰密度的比值, 求出各样品中HSP70的值(μg/mg prot.)。

2 结果

2.1 动物生命体征的变化

受高温高湿环境的作用加重了颅脑枪弹伤后生命体征的紊乱，加快了呼吸、循环、体温调节的衰竭，高温高湿恶劣环境的影响比单纯枪伤更加明显。

2.2 动物的死亡率

常温对照组和常温枪伤组在伤后2 h内无动物死亡，而高温高湿颅脑枪伤组在实验的2 h内动物死亡达到6只，仅有2只动物存活。

2.3 各实验组处理2 h后HSP70的变化

各组处理2 h后HSP70的变化见表1。

表 1 各组处理 2 h 后 HSP70 含量的变化 ($n=8$, $\mu\text{g}/\text{mg prot.}$)

Tab.1 Expression of HSP70 after exposure to different environmental treatments for 2 h in each group ($n=8$, $\mu\text{g}/\text{mg prot.}$)

Group	Hypothalamus	Cortex	Lymphocytes
Control	27.1±6.3	28.9±7.6	37.4±3.8
NT gunshot	33.6±5.6*	30.4±6.7	38.3±3.7
HHE gunshot	43.3±10.2**	44.9±13.4**	49.3±4.1**

HSP70: Heat shock protein 70; NT: Normal temperature; HHE; Hot and humid environment. * $P < 0.05$ vs control group; ** $P < 0.05$ vs NT gunshot group

3 讨论

HSP是生物体在热应激及其他多种应激(缺氧、NO等)下，快速转录并优先翻译合成的一组特殊的高度保守的蛋白质，它能保护机体(或细胞)不受或少受伤害[6][7]。HSP70家族是动物体细胞中最主要的一族应激蛋白，相对分子质量为70 000，等电点介于pH 5.2~6.3[8]。HSP70在正常细胞中水平较低，而在应激状态下可显著升高。HSP70主要通过其分子伴侣作用，维护细胞的正常功能与生存[9][10]。在多种创伤性脑损伤动物模型中HSP70均有表达[1][2][11]。近年有关脑缺血、脑创伤后HSP70的研究较多，但在特殊环境如高温高湿环境下颅脑火器伤HSP70的表达和变化未见报道。本实验研究利用仿真模拟热气候舱，建立了高温高湿的特殊环境气候，观察兔颅脑火器伤后生命体征变化、死亡率与HSP70的变化，结果发现高温高湿气候环境下动物生命体征变化显著，呈紊乱状态；增高了动物颅脑火器伤的死亡率，高温高湿枪伤组在实验的2 h内绝大多数动物死亡，其中30 min就出现1只动物死亡，1 h内又增加3只死亡，到2 h后只有2只动物存活，而常温对照组、常温枪伤组在实验的2 h内无动物死亡。本研究发现：(1)正常对照组的淋巴细胞、大脑皮层、下丘脑中HSP70含量不同，表明HSP70基础含量因各种细胞的功能而异，提示不同组织类型的细胞可能具有诱导热休克反应的

不同的温度设定点,造成各类型细胞的基础储备值不一;(2)外周血淋巴细胞中HSP70水平在枪伤、高温高湿枪伤应激后均上升,高温高湿枪伤后HSP70的升高显著;与大脑皮质、下丘脑的HSP70增加趋势相一致。提示可用对机体损伤较小的抽外周血样品评估整体的高温高湿火器伤的热应激水平。

本实验结果显示单纯枪伤应激后淋巴细胞、大脑组织的皮质、下丘脑中HSP70升高,这两个部位脑组织HSP70的变化差异无统计学意义,与常温对照组比较差异无统计学意义。高温高湿枪伤应激后淋巴细胞、大脑皮质、下丘脑中HSP70较应激前显著上升;但大脑皮质与下丘脑HSP70的变化无明显差别,可能与大脑皮质是易损伤区有关。与体温调节最重要的下丘脑部位一样,细胞合成大量的HSP,以提供更多的保护。但高温高湿颅脑伤后的动物继续接受高温高湿的强烈热应激,结果内外环境的高温刺激,导致机体最后的自我保护(HSP70显著增加的保护作用等)调节机制丧失,促进兔死亡。说明高温高湿环境引起颅脑火器伤的继发性损害,是颅脑火器伤后的二次创伤。因此尽快脱离高温高湿环境,迅速降温是救治高温高湿颅脑火器伤的有效措施。通过对HSP深入研究,将有助于对热应激、热损伤研究提高到分子生物学水平,进一步阐明热应激与热损伤的分子机理,指导在实践中开发出诱导HSP的高表达,加快热适应、对抗热损伤的药物,将有助于提高高温高湿火器伤的救治水平。

参考文献:

- [1]Raghupathi R, Welsh FA, Lowenstein DH, et al. Regional induction of c-fos and heat shock protein-70 mRNA following fluid percussion brain injury in the rat[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1995, 15(3): 467-3.
- [2]Allen GV, Chase T. Induction of heat shock proteins and motor function deficits after focal cerebellar injury[J]. Neuroscience, 2001, 102(4): 603-41.
- [3]Carey ME, Saran GS, Farrell JB, et al. Experimental missile wound to the brain[J]. J Neurosurg, 1989, 71(7): 754-64.
- [4]Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(2): 248-54.
- [5]Mielke K, Brecht S, Dorst A, et al. Activation and expression of JNK1, p38 and ERK kinase, c-Jun N-terminal phosphorylation and c-jun promoter binding in the adult rat brain following kainate-induced seizures[J]. Neuroscience, 1999, 91(2): 471-83.
- [6]Lindquist S. The heat-shock response[J]. Annu Rev Biochem, 1986, 55(8): 1151-9.
- [7]Planas AM, Soriano MA, Estrada A, et al. The heat shock stress response after brain lesions: induction of 72 kDa heat shock protein and protein synthesis inhibition[J]. Prog Neurobiol, 1997, 51(6): 607-36.
- [8]Morimoto RL, Tissieres A. Stress proteins in biology and medicine[M]. Cold Spring Harbor: CSHL Press, 1990. 1-36.
- [9]Hart FU. The role of molecular chaperones in protein folding[J]. FASEB J, 1996, 9(10): 1559-69.
- [10]Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding[J]. Nature, 1996, 381(6583): 571-9.
- [11]Cao Y, Ohwatari N, Mastumoto T, et al. TGF-beta1 mediates 70-kDa heat shock protein induction due to ultraviolet irradiation in human skin fibroblasts[J]. Pflugers Arch, 1999, 438(3): 239-47.