

人脑挫伤后 HSP70 和 iNOS 表达研究

张巍^{1,2}, 汪德文¹, 孙晓东³, 曹明⁴, 胡更奕¹, 赵海南⁵, 王斌⁶ (1.中国医科大学法医学院, 辽宁 沈阳 110001; 2. 沈阳市公安局交警支队, 辽宁 沈阳 110003; 3. 沈阳市公安局治安特警支队, 辽宁 沈阳 110003; 4.新民市公安局, 辽宁 新民 110300; 5.沈阳市胸科医院, 辽宁 沈阳 110044; 6.沈阳市监管支队看守所, 辽宁 沈阳 110031)

[摘要] 目的 探讨人脑挫伤后不同时间内 HSP70 和 iNOS 表达的变化关系。方法 应用免疫组织化学染色观察 35 例人脑挫伤组织 HSP70 和 iNOS 表达的变化规律。结果 HSP70 阳性细胞在即刻死亡组表达强度最大, 伤后急剧下降, 至 24h 达最低, 以后逐渐恢复。iNOS 阳性细胞表达强度在伤后 48h 升高至最大, 以后逐渐下降, 在伤后 11d 仍有弱表达。结论 HSP70 和 iNOS 免疫组化染色可以作为推断人脑挫伤经过时间的有效指标。

[关键词] 脑挫伤; HSP70; iNOS; 免疫组织化学

[中图分类号] DF795.1 [文献标识码] A [文章编号] 1004-5619(2005)01-0024-03

A Study on the Expression of HSP70 and iNOS after Human Brain Contusion

ZHANG Wei, WANG De-wen, SUN Xiao-dong, et al. (School of Forensic Medicine, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[Abstract] **Objective** To study the relationship between expression of HSP70, iNOS and traumatic brain contusion (TBI) in different posttraumatic intervals. **Methods** 35 samples of brain contusion were examined using immunohistochemical staining to evaluate the expression of HSP70 and iNOS. **Results** Maximal HSP70 expression was found at 0h after brain contusion. The intensity of HSP70 staining decreased remarkably to the minimum at 24 h after TBI, then increased gradually. Expression of iNOS positive cells increased significantly and reached the maximum level 48h after TBI, then the expression decreased gradually from the 2nd day to the 11th day. **Conclusion** The changes of HSP70 and iNOS immunohistochemical staining can be used as a referential data for estimating time interval after human brain contusion.

[Key words] brain contusion; HSP70; iNOS; immunohistochemistry

随着医学界对中枢神经系统创伤后分子病理学认识的提高以及免疫组织化学技术的进步, 人们从免疫组织化学和分子生物学的角度, 对脑挫伤与伤后经历时间的关系做了大量的研究。由于受到检材要求所限, 在此方面的研究多为模拟脑挫伤的动物实验, 有关免疫组织化学的实际案例标本实验甚少, 从而造成了理论研究与实际鉴定工作相“脱钩”的现象。故本实验采用实际工作中的案例标本, 利用免疫组织化学染色, 旨在了解人脑挫伤后 HSP70 和 iNOS 的表达, 揭示其表达与人脑挫伤形成时间变化关系, 为脑挫伤时间判定实际鉴定工作提供一条可行的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验分组

选取 35 例因重度颅脑损伤死亡的且大脑皮质有明显脑挫伤灶的案例脑组织标本作为实验对象(尸体

经冷藏冰箱保存, 死后 1~3 d 解剖), 按损伤时间分为即刻死亡组、12 h 组、24 h 组、48 h 组、3 d 组、7 d 组和 11 d 组, 每组 5 例。对照组选取非颅脑损伤且急性颅脑损伤致死案例 5 个, 各组男女不限, 年龄在 19~58 岁之间, 平均年龄为 38.09 岁。

1.1.2 实验试剂与器材

兔抗人结构型 HSP70 多克隆抗体(福建迈新生物技术开发公司; 稀释度 1:100), 兔抗人 iNOS 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司; 稀释度 1:50), SP 试剂盒(北京中山生物技术有限公司), SABC 试剂盒和 DAB 显色剂(武汉博士德生物工程有限公司)。

石蜡切片机, 烤片机, MOTICAM 1300 图像分析仪, OLYMPUS BX60 显微镜照相系统。

1.2 方法

1.2.1 组织处理

切取带有脑挫伤灶及周围组织 3 cm×3 cm×3cm 大小的组织块, 立即浸入 10% 中性福尔马林溶液中固定 48 h, 取材后常规脱水, 石蜡包埋制成蜡块, 连续切片, 厚度 5 μm。

1.2.2 免疫组织化学染色

石蜡切片常规脱蜡至水; 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧

[作者简介] 张巍(1969-), 男, 辽宁沈阳人, 硕士, 主要从事交通事故及颅脑损伤的病理学研究, (电话)024-23903430。

化物酶;PBS冲洗;抗原修复;PBS冲洗;正常血清封闭;一抗,37℃1h;PBS冲洗;二抗,37℃30min;PBS冲洗;滴加 SP(HSP70)或 SABC(iNOS),37℃30min;PBS冲洗;DAB显色后水洗;苏木素复染,脱水、透明、封片。

1.2.3 图像分析与统计学处理

应用 MOTICAM 1300 图像分析仪,在 400 倍显微镜下对免疫组织化学染色呈阳性的细胞定量检测其灰度值,然后在 SPSS 10.0 for Windows 软件下进行方差分析统计学处理。

2 结果

2.1 HSP70 免疫组织化学染色

即刻死亡组神经细胞 HSP70 灰度值最小(表达最强),以后 HSP70 灰度值逐渐增大,至 24 h 组, HSP70 灰度值达最大(表达最弱),以后各实验组 HSP70 灰度值有所下降,11 d 组 HSP70 灰度值又再次升高(见图 1,表 1)。

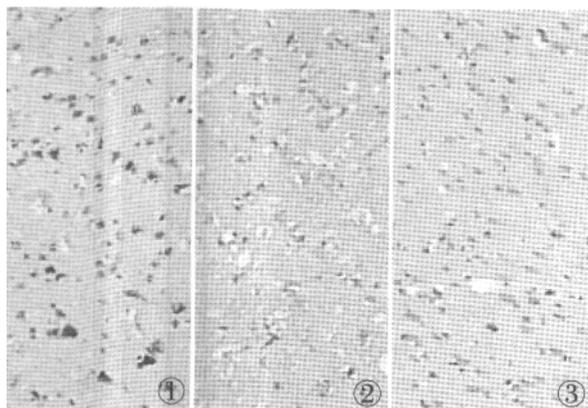


图 1 脑挫伤后 HSP 的表达($\times 400$)
1:0 h, 2:24 h, 3:3 d

2.2 iNOS 免疫组织化学染色

伤后阳性神经细胞 iNOS 灰度值开始降低,至 48h 组达最小,以后逐渐升高,11d 组阳性细胞 iNOS 灰度值达最大(见图 2,表 1)。

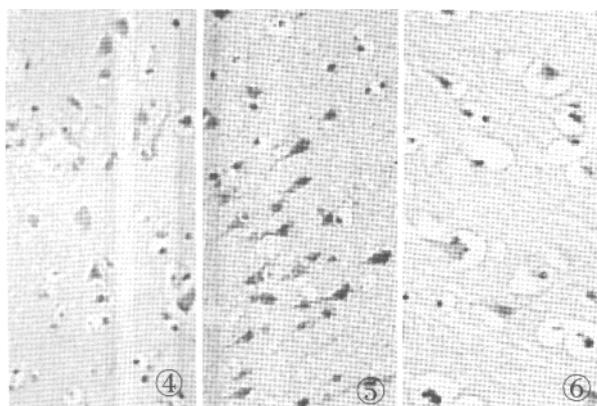


图 2 脑挫伤后 iNOS 的表达($\times 400$)
4:12h, 5:48h, 6:7d

表 1 脑挫伤后不同时间 HSP70 和 iNOS 染色阳性细胞灰度变化($\bar{x} \pm s$)

组别	结构型 HSP70	iNOS
对照组	143.00 \pm 8.39	154.36 \pm 6.81
即刻死亡组	144.44 \pm 8.94	153.00 \pm 5.80
12 h	153.56 \pm 10.21 ¹⁾²⁾	146.72 \pm 7.38 ¹⁾²⁾
24 h	171.69 \pm 11.20 ¹⁾²⁾	138.12 \pm 7.10 ¹⁾²⁾
48 h	162.84 \pm 11.23 ¹⁾²⁾	127.68 \pm 8.22 ¹⁾²⁾
3 d	158.64 \pm 7.18 ¹⁾²⁾	141.86 \pm 6.45 ¹⁾²⁾
7 d	157.54 \pm 6.19 ¹⁾	162.88 \pm 9.18 ¹⁾²⁾
11 d	167.54 \pm 8.94 ¹⁾²⁾	171.40 \pm 6.38 ¹⁾²⁾

1) 与对照组比较: $P < 0.01$; 2) 与邻近上组比较: $P < 0.01$

3 讨论

3.1 HSP70 免疫组织化学染色

HSP70 家族是 HSP 中最保守和最主要的一类,在多数生物中含量最多,在细胞应激后生成最为显著^[1],其能与蛋白分子结合,保护新合成的蛋白分子的恰当构型,防止在正确的多聚体形成前,蛋白亚单位不恰当的折叠和聚集;陪伴蛋白分子在细胞内转运、跨膜,参与蛋白质的折叠、伸展及多聚复合体的组装;当蛋白质受损变性时,能促使其恢复或加速其降解和消除,能重新激活某些酶的作用,以维护细胞的功能和生存^[2]。因此,HSP70 是脑损伤研究中最受关注的一种。HSP70 家族包括四类蛋白质,第一类为 HSP73,是哺乳动物细胞内的结构蛋白,属结构型 HSP70,又称为 HSP70 同源蛋白(HSC70),脑损伤后表达不增加^[3],第二类为诱导型 HSP70,在正常细胞内也有少量表达,细胞发生应激后,表达迅速增加^[4],属诱导型 HSP70,第三类为 GRP78,第四类为 GRP75。

目前研究认为结构型 HSP70 在脑损伤后的变化不明显,所以针对结构型 HSP70 的研究非常少。Seidberg^[3]等人应用 Western 印迹发现 8 例脑外伤手术患者的受损脑组织的结构型 HSP70 与对照组(非颅脑损伤死者的脑组织)相比没有差异。本实验发现在对照组和即刻死亡组 HSP70 表达最强,由于脑损伤后,挫伤周边区反应性缺血、缺氧,细胞反应性减低,从而抑制蛋白质的合成^[4],故伤后其表达下降,在 24h 组, HSP70 表达下降至最低。以后随局部脑机能的恢复, HSP70 表达逐渐升高。这与 Seidberg 的实验结果存在较大差异,原因是本实验从死因为重度颅脑损伤的案例取材,其颅脑损伤程度较 Seidberg 的实验对象更为严重,同时所采用的实验方法也不相同,所以,实验结果存在较大的差异。

3.2 iNOS 免疫组织化学染色

作为 NO 内源合成的关键酶 NOS 是一种同工酶,可分为神经元型 NOS(nNOS)、内皮型 NOS(eNOS)和诱导型 NOS(iNOS)三种亚型,其中 nNOS 和 eNOS 合称为结构型 NOS(cNOS),在细胞处于生理状态下即有表达。NOS 为一种可溶性酶,其表达可被细胞因子、细菌、脂多糖、多种试剂以及紫外光、创伤等诱导^[5]。有资料表明,神经元表达 cNOS 而不表达 iNOS,小胶质细胞和脑血管平滑肌细胞表达 iNOS 而不表达 cNOS;星形细胞和脑血管内皮细胞则表达 cNOS 和 iNOS。iNOS 在炎症、氧化反应中起到关键性作用,并被认为是诱导迟发性细胞凋亡的主要因子^[6]。

冯海龙^[7]在大鼠重型脑伤后一氧化氮/诱生型一氧化氮合酶神经细胞毒性的作用机制的研究中发现,重型脑外伤后 iNOS 活性明显升高,伤后 12 h iNOS 活性即出现增高现象,伤后 1~3 d iNOS 活性达到高峰,持续时间长达 1 周,伤后 2 周 iNOS 活性降至对照组水平。Gahm^[8]等人检测了 8 例脑外伤后 3 h 至 5 d 手术患者的脑挫伤组织的 iNOS 免疫组化染色,发现 iNOS 在神经细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞中表达,并在伤后 6 h 出现,于伤后 8 h 至 23 h 达高峰。而有学者认为外伤性脑损伤后,iNOS 不在神经细胞中表达^[9]。本实验显示,iNOS 在神经细胞、胶质细胞、血管内皮细胞中均有表达,在即刻死亡组神经细胞中 iNOS 呈弱表达,伤后 12 h 表达升高,至 48 h 达高峰,以后逐渐下降,在伤后 11 d 仍有弱表达。实验结果与有关文献报道基本一致。

HSP70 和 iNOS 的表达与脑挫伤时间均有一定的变化规律,且本实验以实际案例中的人脑挫伤标本为实验对象,推断脑挫伤形成时间,因此,使实验结果具有实际应用的可行性。

参考文献:

[1] 谷文萍.热休克蛋白 70 研究进展[J].国外医学·神经病学神经外科学分册,1999,26(2):57-59.

[2] Wynn RM, Davie JR, Cox RP, *et al.* Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases, and matchmakers[J]. J Lab Clin Med,1994,124(1):31-36.

[3] Seidberg NA, Clark RS, Zhang X, *et al.* Alterations in inducible 72-kDa heat shock protein and the chaperone cofactor BAG-1 in human brain after head injury[J].J Neurochem,2003,84(3):514-521.

[4] Kiessling M, Dienel GA, Jacewicz M, *et al.* Protein synthesis in postischemic rat brain: a two-dimensional electrophoretic analysis.J Cereb Blood Flow Metabol,1986,6(6):642-649.

[5] 钟慈声.一氧化氮的生物医学[M].上海:上海医科大学出版社,1997.

[6] Wada K, Chatzipantelli K, Busto R, *et al.* Role of nitric oxide in traumatic brain injury in the rat[J].J Neurosurg,1998,89:807-818.

[7] 冯海龙,高立达,黄光富,等.大鼠重型脑伤后一氧化氮/诱生型一氧化氮合酶神经细胞毒性的作用机制[J].中华创伤杂志,2000,16(7):416-418.

[8] Gahm C, Holmin S, Mathiesen T. Nitric oxide synthase expression after human brain contusion [J]. Neurosurgery,2002,50(6):1319-1326.

[9] Orihara Y, Ikematsu K, Tsuda R, *et al.* Induction of nitric oxide synthase by traumatic brain injury[J]. Forensic Sci Int,2001,123(2-3):142-149.

(收稿日期:2003-10-28)

(本文编辑:刘宁国)

(上接第 23 页)of acute myocardial infarction[J].J Am Coll Cardiol,1991, 18(1): 38-43.

[5] Miyaauchi T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system [J]. Ann Rev Physiol, 1999,61: 391-415.

[6] Brunner F. Interaction of nitric oxide and endothelin-1 in ischemia/reperfusion injury of rat heart [J].J Mol Cell Cardiol, 1997,29(9): 2363-2374.

[7] Cesari M, PAVAN E, Sacchetto A, *et al.* Endothelin-1: A scientist's curiosity, or a real player in ischemic heart disease?[J]. Am Heart J, 1996,132(6): 1236-1243.

[8] Tamirisa P, William HF, Anil K, *et al.* Endothelin and endothelin antagonis-in:roles in cardiovascular health and disease[J]. Am Heart J,1995,130(3): 601-610.

[9] 高建川,杨宗城.内皮素受体及其信息传递机制[J].国外医学·分子生物学分册,1995,17(2): 65-68.

[10] 陈建康,邹万忠,由江峰.内皮素基因在大鼠不同器官中的表达 [J]. 北京医科大学学报,1996,28(4): 262-264.

[11] 李永明,赵玉琪.实用分子生物学方法手册[M].第 1 版.北京:科学技术出版社,1998.

(收稿日期:2004-02-26)

(本文编辑:刘宁国)