

文章编号:1005-6947(2007)12-1159-03

· 基础研究 ·

急性胆囊炎患者腹腔镜手术前后 HSP70 表达差异的研究

朱世斌¹, 张鹤文²

(1. 云南省会泽县第二人民医院 普通外科, 云南 会泽 654211; 2. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 比较急性胆囊炎患者腹腔镜手术前后血液中热休克蛋白 70 (HSP70) 的表达差异, 从分子和蛋白质水平探讨 HSP70 与急性胆囊炎的关系。**方法** 以急性胆囊炎行腹腔镜手术的住院患者 85 例为研究对象, 应用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测手术前后的静脉血中 HSP70 的量; 随机抽取其中 4 例, 提取其血液中的总 RNA 和蛋白质, 分别用 RT-PCR 和 Western-blotting 检验 HSP70 在 mRNA 和蛋白质水平的表达, 并用 Bio-rad 公司的 quantity one 软件进行图像数据分析。**结果** ELISA 结果显示, 急性胆囊炎患者腹腔镜手术前 HSP70 为 181.42 ± 13.58 , 手术后为 63.74 ± 9.03 , 差异有显著性 ($P < 0.05$)。RT-PCR 和 Western-blotting 结果显示, 患者腹腔镜手术后 HSP70 水平较手术前显著降低。**结论** HSP70 与急性胆囊炎关系密切, 可能系因急性炎症刺激机体的 HSP70 表达增高, 而腹腔镜手术清除炎症病灶后 HSP70 的表达迅速降低。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(12): 1159-1161]

关键词: 胆囊炎, 急性; 热休克蛋白 70; 胆囊切除, 腹腔镜

中图分类号: R 657.4

文献标识码: A

Research on the expression difference of hot shock protein 70 before and after laparoscopic cholecystectomy for acute cholecystitis patients

ZHU Shi-bin¹, ZHANG Ge-wen²

(1. Department of General Surgery, the Second People's Hospital of Huize County, Huize, Yunnan 654211 China; 2. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: Objective To compare the expression difference of heat shock protein 70 (HSP70) in blood of acute cholecystitis (AC) patients before and after laparoscopic cholecystectomy, and to explore the relationship between HSP70 and AC at molecular and proteinic level. **Methods** Subjects in the study included 85 in-hospital AC patients who received laparoscopic cholecystectomy. Blood before and after laparoscopic operation were obtained. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the quantity of HSP70. Four subjects were randomly selected and the total RNA and protein in blood were extracted. RT-PCR and Western-blotting were applied to determine the expression of HSP70. The data on the figure was analysed with the software Quantity one of Bio-rad Company. **Results** The expression level of HSP70 of acute cholecystitis patients before laparoscopic cholecystectomy (181.42 ± 13.58) was significantly higher than that of those patients after laparoscopic cholecystectomy (63.74 ± 9.03) ($P < 0.05$). The results of RT-PCR and Western-blotting showed that the HSP70 expression level of acute cholecystitis patients decreased notably after laparoscopic operation. **Conclusions** HSP70 is related closely with

收稿日期: 2007-09-25; 修订日期: 2007-12-04。

作者简介: 朱世斌, 男, 云南会泽人, 云南省会泽县第二人民医院主治医师, 主要从事胆囊炎致病机制及腹腔镜手术治疗方面的研究。

通讯作者: 朱世斌 E-mail: rwq198009@163.com

acute cholecystitis and its expression level increases when stimulated by acute inflammation. The expression level of HSP70 rapidly declines when the inflammatory focus is eliminated by laparoscopic operation.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16 (12) : 1159 - 1161]

Key words: Cholecystitis, Acute; Heat Shock Protein 70; Cholecystectomy, Laparoscopic

CLC number: R 657.4

Document code: A

急性胆囊炎 (acute cholecystitis, AC) 为外科常见的急症, 如不及时处理, 可能出现胆囊穿孔、胆汁性腹膜炎、胆囊周围脓肿、内瘘等并发症。目前, 对于本病致病机制的研究多限于病原体感染^[1-2]、器质性胆囊管阻塞^[3-4]以及化学刺激等, 而从基因、蛋白质分子水平探讨其机制的研究较少。本研究以热休克蛋白 70 (heat shock protein, HSP70) 为指标, 研究急性胆囊炎患者腹腔镜手术前后血液中 HSP70 的表达差异, 以期了解本病的发生与 HSP70 的关系。

1 资料和方法

1.1 一般资料

研究对象为云南省会泽县第二人民医院于 2006 年 1 月—12 月收治的 85 例行腹腔镜手术治疗的急性胆囊炎患者, 其中男性 29 例, 女性 56 例; 平均年龄 (51.7 ± 4.1) 岁。

1.2 主要试剂

HSP70 逆转录试剂盒购自 Takara (Clontech) 公司; 蛋白质抽提试剂盒 PRO-PREP 购自赛百盛公司; TRIzol 液购自三泰生物有限公司; 鼠抗人 HSP70 mAb (酶联免疫吸附试验和免疫印迹可共用) 购自晶美公司; 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成; 各种 DNA 和蛋白质标志物均购自 Takara 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 RNA 和蛋白质抽提及 HSP70 的 ELISA 检测 组织细胞总 RNA 抽提参照《分子克隆实验指南》^[5], 逆转录-聚合酶链反应 RT-PCR 按说明书进行; 蛋白质抽提和纯化按说明书进行, Western-blotting 参照文献^[6]进行; ELISA 按说明书进行。先绘制标准曲线, 再计算手术前后每一研究对象的 HSP70。

1.3.2 引物设计 本实验所用引物设计 (附表)。

附表 本实验中所用的引物序列

基因	正向引物	反向引物	碱基对 (bp)	基因登陆号
HSP70	5'-actattgctggtctcaatgt-3'	5'-tgtgagttcaacttgcaca-3'	900	AF352832
β-actin	5'-ctatccctgtacgcctcgg-3'	5'-cacaggactccatgccccc-3'	400	NM_001101

2 结果

2.1 HSP70 的 ELISA 检测结果

85 例急性胆囊炎患者腹腔镜手术前的 HSP70 为 181.42 ± 13.58, 腹腔镜手术后的 HSP70 为 63.74 ± 9.03。经统计学检验, 两者差异具有显著性 ($P < 0.05$) (图 1)。

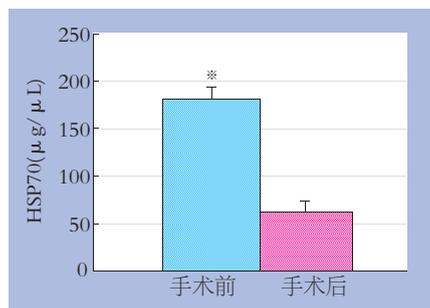


图 1 急性胆囊炎患者腹腔镜手术前后 HSP70 的 ELISA 检测结果

2.2 RT-PCR 检测结果

4 例急性胆囊炎患者血 HSP70 mRNA 水平手术后显著低于手术前 ($P < 0.05$) (图 2)。

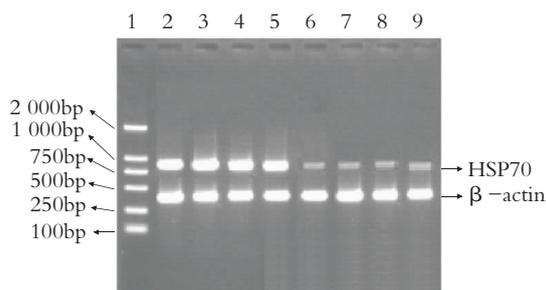


图 2 4 例急性胆囊炎患者腹腔镜手术前后血液 HSP70 的 RT-PCR 检测结果 1: Del 2000 Marker; 2~5: 手术前; 6~9: 手术后

2.3 Western-blotting 检测结果

4 例急性胆囊炎患者腹腔镜手术后血液中 HSP70 蛋白水平显著低于手术前结果 ($P < 0.05$) (图 3)。

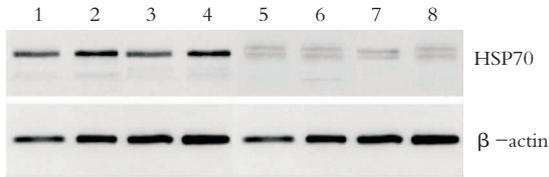


图3 4例急性胆囊炎患者腹腔镜手术前后血液HSP70的Western-blotting检测结果 1~4:手术前;5~8:手术后

3 讨论

应激状态下,会引起机体的一系列变化,包括一些激素和基因表达的改变^[7]。HSP是一组高度保守、与应激相关的蛋白,在细胞正常发育和多种应激状态下对维持细胞的稳定性具有重要作用^[8-9],HSP70作为“分子伴侣”参与蛋白的折叠、转运、转位和生物合成等生理过程^[10],应急情况下,HSP70对损伤细胞具有修复作用^[11]。研究^[12-13]表明,HSP70是最重要的应激蛋白,许多因素如热应激、化学物质(氧自由基、乙醇等)、缺血缺氧、感染及严重创伤等均可导致HSP70在应激细胞中的高表达。动物实验^[14-15]也证明,在应激状态下动物的HSP70的转录产物高于正常组。程应东等^[16]还发现,将大鼠做成脓毒症模型,结果导致大鼠体内细胞因子应激性升高,然而,脓毒症模型的大鼠转染HSP70基因后,细胞因子水平与对照组没有显著性差异,说明HSP70可以控制炎症的发展。关于HSP70与人类疾病的关系,王鹤等^[17]研究发现,HSP70水平与应激性胃溃疡出血成正比关系,即胃出血越严重,HSP70表达水平越高,随着溃疡的好转,HSP70的表达也降低,说明HSP70表达在促进应激性溃疡恢复方面具有非常重要的作用。然而,目前还没有HSP70与AC相互关系的研究报道,本研究结果提示HSP70与AC密切相关,可能由于急性感染后HSP70应激性升高所致,至于HSP70是否与AC的发生有关,还有待进一步的动物实验以及分子流行病学研究证实。

腹腔镜行胆囊切除术已在全世界范围内广泛应用,尽管其并发症比传统手术略高,但手术创伤小,患者痛苦少,恢复快,比较安全,合并抗生素治疗可以快速消除炎症病灶。本研究结果显示,急性胆囊炎患者发病时的HSP70表达无论是在mRNA还是蛋白质水平都非常高,但在腹腔镜胆囊切除后,HSP70表达水平迅速降低,说明炎症的

消除可以迅速降低HSP70的表达,提示HSP70的检测可以反映机体炎症的程度。

参考文献:

- [1] Rodríguez VE, Freuler CB, Ezcurrea C, *et al.* Acute cholecystitis and biliary tract infections due to *Candida* [J]. *Rev Iberoam Micol*, 2007, 24(2):152-154.
- [2] Baitello AL, Colleoni Neto R, Herani Filho B, *et al.* Bacteremia—prevalence and associated factors in patients with acute calculous cholecystitis [J]. *Rev Assoc Med Bras*, 2004, 50(4):373-379.
- [3] Venneman NG, van Erpecum KJ. Gallstone disease: Primary and secondary prevention [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2006, 20(6):1063-1073.
- [4] Choudhury SY, Kaiser MS. Varied presentation of biliary ascariasis and its consequences [J]. *Mymensingh Med J*, 2006, 15(2):150-152.
- [5] 金冬雁,黎孟枫,侯云德,等.译. J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M],第2版.北京:科学出版社,1992. 343-355.
- [6] Lee C. Protein extraction from mammalian tissues [J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 362:385-389.
- [7] Ferrando AA, Wolfe RR. Restoration of hormonal action and muscle protein [J]. *Crit Care Med*, 2007, 35(9 Suppl):S630-634.
- [8] Kiang JG, Ding XZ, McClain DE. Overexpression of HSP-70 attenuates increases in $[Ca^{2+}]$ and protects human epidermoid A-431 cells after chemical hypoxia [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998, 149(2):185-194.
- [9] Rafiee P, Shi Y, Pritchard KA Jr, *et al.* Cellular redistribution of inducible Hsp70 protein in the human and rabbit heart in response to the stress of chronic hypoxia: role of protein kinases [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(44):43636-43644.
- [10] Gething M J, Sambrook J. Protein folding in the cell [J]. *Nature*, 1992, 355(6355):33-45.
- [11] William J W. How cells responds to stress [J]. *Scientific American*, 1993, 5:34-41.
- [12] Minowada G, Welch WJ. Clinical implications of the stress response [J]. *J Clin Invest*, 1995, 95(1):3-12.
- [13] Stojadinovic A, Kiang J, Goldhill J, *et al.* Induction of the heat shock response prevents tissue injury during acute inflammation of the rat ileum [J]. *Crit Care Med*, 1997, 25(2):309-317.
- [14] Fiorenza MT, Bevilacqua A, Canterini S, *et al.* Early transcriptional activation of the hsp70.1 gene by osmotic stress in one-cell embryos of the mouse [J]. *Biol Reprod*, 2004, 70(6):1606-1613.
- [15] Guo JS, Chau JF, Shen XZ, *et al.* Over-expression of inducible heat shock protein 70 in the gastric mucosa of partially sleep-deprived rats [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2004, 39(6):510-515.
- [16] 程应东,梁平,张朝军,等. HSP70基因转染对大鼠脓毒症早期外周血细胞因子的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(3):214-217.
- [17] 王鹤,曲彦,胡丹. 热休克蛋白70对应激性胃溃疡黏膜的保护作用 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(7):712-716.