

文章编号:1005-6947(2005)03-0190-04

· 实验研究 ·

HSP70 基因转染对大鼠脓毒症早期外周血细胞因子的影响

程应东¹, 梁平¹, 张朝军¹, 姚榛祥², 杨从冰¹

(1. 第三军医大学附属新桥医院 普通外科, 重庆 400037; 2. 重庆医科大学附一院 普通外科, 重庆 400016)

摘要:目的 探讨 HSP70 基因转染对大鼠脓毒症早期外周血细胞因子的影响。方法 采用盲肠结扎穿孔 (cecal ligation puncture, CLP) 制作脓毒症的病理模型并转染 HSP70 基因, 分析 HSP70 基因转染前后外周血细胞因子 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 的变化。结果 CLP 组血清 TNF- α 浓度 3h 开始升高, 6h 达到峰值 ($t_{\text{TNF-}\alpha} = 16.506, P < 0.01$); IL-1 β 浓度 6h 显著增高, 24h 达到峰值 ($t_{\text{IL-1}\beta} = 22.536, P < 0.01$); IL-6 浓度 3h 显著升高, 12h 达到峰值 ($t_{\text{IL-6}} = 33.977, P < 0.01$); IL-10 浓度 24h 显著升高, 48h 达到峰值 ($t_{\text{IL-10}} = 15.056, P < 0.01$), 72h 恢复到对照组水平。HSP70 基因转染组 6h 的 TNF- α , 12h 的 IL-6, 24h 的 IL-1 β 血清浓度与对照组相比都没有明显的差异 ($t_{\text{TNF-}\alpha} = 0.580; t_{\text{IL-6}} = 1.589; t_{\text{IL-1}\beta} = 0.802; P > 0.05$)。48h 的 IL-10 的血清浓度与对照组相比差异有显著性 ($t_{\text{IL-10}} = 3.796, 0.01 < P < 0.05$)。结论 HSP-70 基因转染能下调外周血促炎细胞因子表达, 不影响抗炎细胞因子的表达。提示 HSP-70 基因转染具有抗炎作用, 对于防治脓毒症及多脏器功能不全具有潜在的临床应用价值。

关键词: 脓毒症/遗传学; 转染; 基因, HSP70

中图分类号: Q343.1; Q517

文献标识码: A

Effect of HSP70 gene transfection to rat peripheral blood cytokines in the early phase of sepsis

CHENG Ying-dong¹, LIANG Ping¹, ZHANG Chao-jun¹, YAO Zhen-xiang²,
YANG Cong-bing¹

(1. Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 410006, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of HSP70 gene transfection to peripheral blood cytokines in the early phase of sepsis in rats. **Methods** A rat model of sepsis was established by cecal ligation and puncture (CLP), and adenovirus-mediated HSP70 gene transfection was performed in the CLP rats. Serum TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 were measured before and after HSP70 gene transfection. **Results** In CLP rats, serum TNF- α increased at 3h and peaked at 6h ($t_{\text{TNF-}\alpha} = 16.506, P < 0.01$). Serum IL-1 β began to elevate at 6h and reached the peak at 24h ($t_{\text{IL-1}\beta} = 22.536, P < 0.01$). Serum IL-6 was significantly higher than control group at 3h, and peaked at 12h ($t_{\text{IL-6}} = 33.977, P < 0.01$). IL-10 began to increase at 24h, reached its peak at 48h ($t_{\text{IL-10}} = 15.056; P < 0.01$), and returned to the level of control group at 72h. In HSP70 gene transfection rats, the pro-inflammation cytokine level of TNF- α at 6h, IL-6 at 12h, IL-1 β at 24h was inhibited, but anti-inflammation cytokine level of IL-10 at 48h was not inhibited. **Conclusions** HSP70 gene transfection might down-regulate the overexpression of pro-inflammatory cytokines in the body, and the expression of anti-inflammation cytokines was not inhibited. These results suggested that

收稿日期:2004-01-21; 修订日期:2005-01-24。

作者简介:程应东(1964-),男,湖北广水人,第三军医大学附属新桥医院主治医师,博士,主要从事普通外科常见病方面的研究。

通讯作者:程应东 023-66858238, 13983801913(手机); E-mail:Chengyingdong@medmail.com.cn。

transfection of HSP70 gene can provide protective effects against sepsis. HSP70 gene transfection might be of clinical relevance in the prevention and treatment of sepsis and MODS.

Key words: SEPSIS/genet; TRANSFECTION; GENES, HSP70

CLC number: Q343.1; Q517

Document code: A

脓毒症是外科常见的并发症,常导致脓毒症性休克和多脏器功能不全综合症(MODS)。大量的炎性细胞因子在脓毒症的发生发展中起着重要作用,其中包括促炎细胞因子和抗炎细胞因子。本研究采用盲肠结扎穿孔(CLP)模型,并转染 HSP70 基因,探讨 HSO70 基因转染对脓毒症早期外周血细胞因子变化的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验动物选用 Wistar 大鼠,3~5 个月龄,体重 180~250g,雌雄不拘(第三军医大学动物实验中心提供)。ELISA 试剂盒购自北京邦定泰克生物技术公司。AdCMVHSP70 由第三军医大学烧伤研究所提供。

1.2 动物模型制备

(1) CLP 动物模型参照文献报道^[1]的方法进行。动物在实验前 1d 禁食,术前称重,0.3% 的戊巴比妥(1 mL/100g)腹腔注射麻醉,中下腹正中做一长约 1.5~2cm 切口,找到盲肠,在盲肠末端 1/3 处结扎盲肠,18 号针头穿刺结扎的盲肠 2 次,使少量肠内容物自穿刺孔溢出,1-0 丝线关闭腹部切口。术终时生理盐水 40 mL/kg 皮下注射。(2)假手术对照组除盲肠既不结扎也不穿孔外,其余与 CLP 组相同。

1.3 基因转染

CLP 后 30min 自大鼠尾静脉注入低温保存的 AdCMVHSP70 100 μ L(含 2×10^{10} 病毒空斑形成单位)。

1.4 采集标本

分别在 CLP 后 3,6,12,24,48,72h 及基因转染后 6,12,24,48h 杀鼠采血,分离血清置 -70 $^{\circ}$ C 备用。假手术组术后 3h 采血。

1.5 检测项目及方法

HSP70 基因转染后,应用抗-HSP70 抗体及 Western Blot 技术检测 HSP70 蛋白的表达。参照 ELISA 试剂盒说明书的方法分别测定血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α),白细胞介素 1 β (IL-1 β),白细胞

介素 6(IL-6)和白细胞介素 10(IL-10)的浓度。

1.6 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行 t 检验及直线相关分析。

2 结 果

2.1 HSP70 蛋白表达

Western Blot 结果显示基因转染后 HSP70 蛋白表达显著增多(图 1)。

1:对照组;2:CLP 组;3:空白载体对照组;4:HSP70 基因转染组

图 1 基因转染后各组 HSP70 蛋白表达

2.2 细胞因子的变化

2.2.1 TNF- α CLP 后 3h 明显上升($t = 12.508$, $P < 0.01$),6h 达到峰值,12h 仍然明显高于对照组水平($t = 5.511$, $P < 0.01$),24h 接近对照组水平。

2.2.2 IL-1 β CLP 后 3h 没有明显变化($t = 0.556$, $P > 0.5$),6h 显著高于对照值($t = 6.672$, $P < 0.01$),24h 达到峰值,48h 仍然明显高于对照组水平($t = 4.587$, $P < 0.01$),72h 恢复至对照组水平。

2.2.3 IL-6 CLP 后 3h 明显升高($t = 5.854$, $P < 0.01$),12h 达到峰值,24h 仍然明显高于对照组($t = 6.932$, $P < 0.01$),48h 接近对照组水平,72h 已明显低于对照组水平($t = 6.780$, $P < 0.01$)。

2.2.4 IL-10 CLP 后 12h 内没有明显变化($t = 3.385$, $P > 0.5$),24h 明显高于对照组($t = 9.984$, $P < 0.01$),48h 达到峰值,72h 仍然明显高于对照组水平($t = 4.561$, $P < 0.01$)。

CLP 后外周血 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 的变化,见表 1,图 2。

表1 CLP后外周血中TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10浓度(pg/mL)的变化($n=6, \bar{x} \pm s$)

指标	假手术对照	时间(h)					
		3	6	12	24	48	72
TNF- α	128.1 \pm 11.6	237.2 \pm 24.2 ^{1),2)}	332.8 \pm 22.7 ^{1),2)}	167.7 \pm 17.6 ¹⁾	131.1 \pm 11.6	155.4 \pm 23.7	117.2 \pm 10.9
IL-1 β	43.9 \pm 4.8	44.9 \pm 5.6	57.3 \pm 3.8 ^{1),2)}	104.7 \pm 8.8 ^{1),2)}	151.1 \pm 9.3 ^{1),2)}	67.9 \pm 9.4 ^{1),2)}	49.3 \pm 8.3
IL-6	83.7 \pm 6.9	110.4 \pm 9.6 ^{1),2)}	154.4 \pm 13.3 ^{1),2)}	269.2 \pm 15.1 ^{1),2)}	114.3 \pm 8.8 ^{1),2)}	70.1 \pm 10.9 ¹⁾	47.9 \pm 10.7
IL-10	26.4 \pm 4.7	25.7 \pm 3.8	29.1 \pm 1.7	33.0 \pm 4.0	84.6 \pm 13.3 ^{1),2)}	146.3 \pm 16.4 ^{1),2)}	39.0 \pm 4.8 ^{1),2)}

注:与对照组比,1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$

转染前相比无显著性差异($t_{IL-6} = 1.589, P > 0.05$); HSP70基因转染后24h的IL-1 β 血清浓度与转染前相比无显著性差异($t_{IL-1\beta} = 0.802, P > 0.05$); HSP70基因转染后48h的IL-10血清浓度与转染前相比有显著性差异($t = 3.796, 0.01 < P < 0.05$)(表2)。

图2 大鼠CLP后外周血细胞因子的变化

2.3 转染后的细胞因子变化

转染HSP70基因后CLP大鼠血清TNF- α 高峰值为6h; IL-6高峰值为12h; IL-1 β 高峰值为24h; IL-10高峰值为48h(图3)。

HSP70基因转染后6h的TNF- α 血清浓度与转染前相比无显著性差异($t_{TNF-\alpha} = 0.580, P > 0.05$); HSP70基因转染后12h的IL-6血清浓度与

图3 转染HSP70基因对CLP大鼠血清细胞因子的影响

表2 HSP70基因转染对CLP大鼠血清细胞因子(pg/mL)的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)

大鼠	TNF- α (6h)		IL-6(12h)		IL-1 β (24h)		IL-10(48h)	
	对照组	转染组	对照组	转染组	对照组	转染组	对照组	转染组
1	115.5	128.1	120.5	145.5	58.4	68.1	17.3	27.5
2	102.8	88.2	136.4	136.7	55.4	40.3	22.8	29.7
3	123.4	100.2	115.4	128.4	42.3	45.2	23.4	36.8
4	96.7	94.3	120.7	118.3	66.7	51.7	28.6	31.4
5	105.5	113.6	122.3	126.1	45.8	43.6	23.4	42.3
均值	108.58	104.88	123.06	131.0	53.72	49.78	23.1	33.5
标准差	10.71	16.03	7.90	10.43	9.83	11.05	4.01	5.98
t 值		0.580		1.589		0.802		3.796
P 值		0.68068		0.2143		0.48256		0.0142 [†]

注:与对照组比[†] $P < 0.05$

3 讨论

脓毒症及其并发的 MODS 是外科监护室患者死亡的主要原因。内毒素刺激免疫系统和血管内皮系统的炎症效应细胞产生大量的炎性介质,其中主要有促炎细胞因子如 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和抗炎细胞因子如 IL-10 等^[2~4]。TNF- α 是机体受到有害刺激后最初分泌、起关键始动作用的细胞因子,其核心作用是在炎症反应中激活细胞因子级联反应。IL-1 β 可由内毒素直接刺激产生,也可由 TNF- α 诱导产生,IL-1 β 升高后可与 TNF- α 协同作用共同刺激 IL-6 的产生。IL-6 既能促进炎症反应,也能限制炎症反应。研究^[5]发现,通过监测 IL-6 的变化可以提高脓毒症鉴别诊断的精确程度;血清 IL-6 的浓度能够反映心肌功能不全和疾病的严重程度,IL-6/IL-10 的值比 TNF- α /IL-10 的值更能反映外科手术中促炎/抗炎细胞因子的平衡关系,也能代表脓毒症的炎症状态^[6]。这些促炎细胞因子之间相互作用可形成许多正反馈环,导致炎症反应的持续加重。IL-10 主要由 Th2 细胞产生,它可抑制单核细胞合成和分泌多种细胞因子,通过调节 TNF- α , IL-1 β , IL-6 的产生来减轻炎症反应,它们之间的相互作用形成复杂的互动关系,形成所谓的“炎症瀑布效应”。

HSP70 是热休克蛋白的主要成分,其主要功能是作为分子伴侣,提供细胞保护作用。提高机体 HSP70 含量的方法有两类:诱导内源性 HSP70 的表达和导入外源性 HSP70 基因。与自身热应激动员正常 HSP70 高水平表达的保护作用相比,通过基因转染诱导 HSP70 的高表达能更有效地保护重要脏器的损伤^[7]。腺病毒具有很好的细胞依附性、穿透性,能够避免胞内自溶降解,且不需要靶细胞进行复制表达外源基因,因而作为基因治疗的载体得到了广泛应用,这在本实验得到了进一步证实。

本研究中发现,脓毒症早期(<72h),促炎细胞因子明显高表达,抗炎细胞因子明显低表达,表明促炎细胞因子与抗炎细胞因子的表达处于失衡状态。尽管没有检测所有促炎和抗炎细胞因子的

表达,但可以看出一种趋势,即在脓毒症早期抗炎细胞因子可能不足以同促炎细胞因子相抗衡,使促炎细胞因子产生失控,从而导致全身炎症反应的失控,引起组织器官的损伤。转染 HSP70 后血清 TNF- α , IL-6, 和 IL-1 β 的浓度与对照组相比没有发生变化,说明 HSP70 转染后能够阻断体内促炎细胞因子的释放。研究^[8]报道,高表达的 HSP70 能够限制 LPS 诱导的 TNF- α 和 IL-1 β 的产生,应用反义 HSP70 DNA 转染能明显抑制在 LPS 诱导的 TNF- α , IL-1 β , IL-10 的产生,这些结果证实 HSP70 可以作为 LPS 诱导细胞因子产生的抑制剂。本研究中也发现,抗炎细胞因子 IL-10 在实验组与对照组中的表达存在差异,说明 HSP70 并未抑制抗炎细胞因子的产生,提示 HSP70 基因转染具有抗炎作用。这对于防治脓毒症及多脏器功能不全具有潜在的临床应用价值。

参考文献:

- [1] Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, *et al.* Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in murine cecal ligation and puncture model [J]. *Surgery*, 1983, 94(2): 331 - 338.
- [2] Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH, *et al.* Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle [J]. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol*, 2002, 283(3): R698 - R709.
- [3] Wang P, Li N, Li JS, *et al.* The role of endotoxin, TNF- α , and IL-6 in inducing the state of growth hormone insensitivity [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(3): 531 - 536.
- [4] Remick DG, Call DR, Ebong SJ, *et al.* Combination immunotherapy with soluble tumor necrosis factor receptors plus interleukin 1 receptor antagonist decreases sepsis mortality [J]. *Crit Care Med*, 2001, 29(3): 473 - 481.
- [5] Laborada G, Rego M, Jain A, *et al.* Diagnostic value of cytokines and C-reactive protein in the first 24 hours of neonatal sepsis [J]. *Am J Perinatol*, 2003, 20(8): 491 - 501.
- [6] Jerin A, Pozar-Lukanovic N, Sojar V, *et al.* Balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in liver surgery [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2003, 41(7): 899 - 903.
- [7] Weiss YG, Maloyan A, Tazelaar J, *et al.* Adenoviral transfer of HSP70 into pulmonary epithelium ameliorates experimental acute respiratory distress syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(6): 801 - 806.
- [8] Ding XZ, Fernandez-Prada CM, Bhattacharjee AK, *et al.* Over-expression of HSP70 inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced production of cytokines in human monocyte-derived macrophages [J]. *Cytokine*, 2001, 16(6): 210 - 219.