

文章编号:1005-6947(2007)05-0429-04

· 胰腺炎专题研究 ·

热休克蛋白 27 在大鼠急性胰腺炎中的表达及其对细胞间连接的影响

何忠野, 葛春林, 郭克建, 郭仁宣

(中国医科大学附属第一医院 普通外科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 探讨热休克蛋白 27 (HSP27) 在轻型急性胰腺炎 (MAP) 及重症急性胰腺炎 (SAP) 大鼠模型中的表达及其对腺泡细胞间连接的影响。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 90 只, 随机分 3 组: A 组为 SAP 组, B 组为 MAP 组, C 组为对照组。3 组动物于成模后 1, 3, 8h 分批处死。检测血清淀粉酶 (SAM), 计算胰腺系数; Western-blot 半定量分析 HSP27 蛋白和磷酸化蛋白含量; RT-PCR 半定量分析 HSP27 mRNA 表达; 透射电镜观察细胞间连接的变化。**结果** A, B 组 SAM 水平升高, 但 B 组明显低于 A 组 ($P < 0.05$); A 组胰腺系数迅速升高并持续增长, 间质水肿严重 ($P < 0.05$), 细胞间连接损伤; B 组间质水肿比 A 组轻 ($P < 0.05$), 细胞连接比较稳定; A, B 两组 HSP27 蛋白及其 mRNA 表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$), B 组明显高于 A 组 ($P < 0.05$); B 组 HSP27 磷酸化蛋白 (Ser78) 含量显著高于对照组和 A 组 ($P < 0.05$), A 组与对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。**结论** 细胞间连接破坏是急性胰腺炎的共同特征, 但 SAP 损伤更严重, 可能与细胞间连接调控因子 HSP27 及其磷酸化表达相对下降。提示 HSP 在 AP 发生、发展中具有重要作用。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(5): 429-432]

关键词: 胰腺炎/病理学; 热休克蛋白; 细胞连接; 模型, 动物

中图分类号: R657.51 **文献标识码:** A

Effects of HSP27 expression on the adhesion junction of cells during acute pancreatitis in rats

HE Zhong-ye, GE Chun-lin, GUO Ke-jian, GUO Ren-xuan

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To explore the effects of heat shock protein 27 (HSP27) expression on adhesion junction of cells during severe acute pancreatitis (SAP) and mild acute pancreatitis (MAP) in rats.

Methods Ninety male Wistar rats were divided randomly into three groups: Group A (SAP), Group B (MAP) and group C (control). Rats in the three groups were killed at 1 h, 3 h. and 8 h after model made respectively. The levels of serum amylase (SAM) and histopathology score were measured. Changes of adhesion junctions were examined by electron microscopy. HSP27 and its phosphorylation were measured by Western-blotting. The expression of HSP27 mRNA was determined by RT-PCR. **Results** Levels of SAM increased in group A and group B, but was markedly lower in Group B ($P < 0.05$). In group A, there was a rapid and sustained increase in levels of pancreatic indexes, and severe interstitial edema ($P < 0.05$), and damages of adhesion junctions were observed. In group B, there was moderate pancreatic edema and disruption of adhesion junctions. The expression of HSP27, its mRNA and its phosphorylation levels were lower in group A than those in group B ($P < 0.05$). **Conclusions** Alterations of adhesion junction are a common feature of AP, but the damage of HSP27 and its phosphorylation which regulate adhesion junctions were more severe during SAP. The results suggest that HSP plays an important role in the onset and development of AP.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(5): 429-432]

Key words: Pancreatitis/pathol; Heat Shock Protein; Cell Adhesion Junction; Moded, Animal

CLC number: R657.51

Document code: A

收稿日期:2006-07-11; 修订日期:2006-10-17。

作者简介:何忠野,男,辽宁沈阳人,中国医科大学附属第一医院副主任医师,主要从事胆胰外科方面的研究。

通讯作者:郭仁宣 E-mail:hzy_1971@163.com

在急性胰腺炎(AP)发生的早期阶段,细胞连接结构破坏,细胞间隙扩大,使腺泡腔内富含蛋白及消化酶的液体通过细胞间隙进入间质引起胰腺水肿。小热休克蛋白27(heat shock protein 27, HSP27)在AP时参与了连接复合体形成的调控^[1],因而认为HSP27的表达可能对AP的结果有影响。轻型急性胰腺炎(MAP)预后较重症急性胰腺炎(SAP)为好^[2]。本研究通过探讨HSP27在不同类型AP模型中的表达及其对细胞间连接的影响,旨在进一步了解AP发病机制的异同及其发生、发展规律。

1 材料和方法

1.1 材料

牛磺胆酸钠购自Sigma公司;10%水合氯醛注射液系本院制剂室制备;透射电镜、SXP-1B手术显微镜购自上海光学仪器厂;多克隆兔抗HSP27抗体购自武汉博士德公司;HSP27磷酸化抗体(Ser78)购自深圳精美生物试剂公司;聚合酶链反应(PCR)引物及试剂盒为TaKaRa公司产品。雄性Wistar大鼠90只,体重200~250g,由本校实验动物中心提供。

1.2 实验设计与方法

1.2.1 建立AP模型 动物于实验前12h禁食,不禁水。随机分为3组,每组30只。A组为SAP组,B组为MAP组,C组为假手术对照组。采用胰胆管注射方法复制动物模型^[3]。腹腔注射10%水合氯醛以0.3mL/100g体重麻醉动物后剖腹。在手术显微镜下通过胆胰管分别逆行注射5%(SAP)和2%(MAP)牛磺胆酸钠0.1mL/100g体重,注射速度0.1mL/min。C组仅翻动胰腺不作上述处理。各组动物分别在1,3,8h分批处死,每时点杀10只。剖腹后,迅速切取胰腺去除脂肪、淋巴结,称湿重。切取1mm×1mm×1mm固定于2%戊二醛溶液中送电镜检查,其余组织部分HE染色,另部分存于-70℃冰箱内备检。

1.2.2 SAM及病理分数 测定3组动物各时点的淀粉酶(SAM)值。切片HE染色后依Spormann H方法进行病理评分。

1.2.3 计算胰腺系数和透射电子显微镜观察 按公式计算:胰腺系数=胰腺湿重(g)/大鼠体重(g)×100%。拟进行电镜观察的标本,以2%戊二醛固定,环氧树脂618包埋,800A超薄切片,透射电镜观察。

1.2.4 免疫印迹(Western-blot)分析 200mg胰

腺组织研磨粉碎后,加入1000μL新鲜配制的冷蛋白裂解液(50mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 150mmol/L NaCl, 2mmol/L EDTA, 1% SDS),经4℃,14000r/min离心10min,去上清液并测定蛋白浓度,取40μg蛋白与上样缓冲液混合,煮沸5min,置于SDS变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移至PVDF膜,用5%脱脂奶粉液封闭过夜,分别与1:200的多克隆兔抗HSP27抗体和HSP27磷酸化抗体(Ser78)孵育后加入二抗孵育60min显色。采用凝胶成像分析系统(GDS-8000)测定条带的面积和灰度值,所得积分灰度值代表蛋白的表达量。

1.2.5 mRNA表达分析 取胰腺组织约100mg,加入RNAout 1mL(天泽基因工程有限公司)研磨吹打成匀浆,依次以氯仿、异丙醇、乙醇及ddH₂O等抽提RNA后,逆转录为cDNA(TaKaRa逆转录试剂盒);应用德国Primer Express引物设计软件进行引物设计(引物由大连宝生物公司合成)。引物序列为:HSP27(262bp),上游,5'-ACGAAGAAAGCCAGGATGAA-3';下游,5'-GATGGG-TAGCAAGCTGAAGG-3'。β-actin(700bp),上游,5'-GCCAACCGTGAAAAGATG-3';下游,5'-CCAG-GATAGAGCCACCAAT-3'。PCR反应条件如下:94℃预变性3min,94℃45s,61℃40s,72℃1min,扩增35个循环,72℃延伸10min,4℃终止反应。取10μL扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳(45V,120min),溴化乙锭染色后,于凝胶成像分析系统(GDS-8000)中进行条带密度扫描分析,以HSP27与β-actin条带密度比值表示HSP27 mRNA的表达水平。

1.3 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ (率的比较经正态性转换)表示。统计采用SPSS软件One-way ANOVA, Tukey-t检验方法。

2 结果

2.1 SAM值(U/L)及病理分数的变化

A组各时点SAM和病理分数明显升高,与C组差异有显著性($P < 0.05$);B组各时点明显低于A组($P < 0.05$)(附表)。

2.2 胰腺系数变化

制模1h后,A组胰腺含水量开始增加,胰腺系数均持续升高,与C组比较差异有显著性($P < 0.05$);B组各时点明显低于A组($P < 0.05$)(附表)。

2.3 超微结构的改变

透射电镜观察显示:A组在1h后出现细胞间连接破坏,细胞间隙增宽;此时B组细胞间连接仍保持完整,3h后才发生变化(图1)。

2.4 HSP27 及其磷酸化蛋白(Ser78)表达的变化

C组各时点 HSP27 蛋白均呈低表达。A组 HSP27 蛋白表达于造模后1h即有增高,3h后达顶峰,之后逐渐下降,8h恢复到正常水平。B组各时点 HSP27 蛋白表达水平,均显著高于A组,差异均有显著性($P < 0.05$)(附表)(图2);A组与对照组比较1h,3h点亦高于C组($P < 0.05$)。B组各时点 HSP27 磷酸化蛋白(Ser78)含量亦显著高于对照组及A组($P < 0.05$);

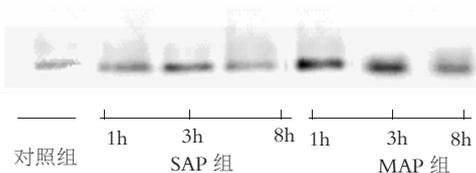


图2 HSP27 蛋白在3组组织中的表达

2.5 HSP27 mRNA 表达

RT-PCR对胰腺组织中 HSP27 mRNA 水平的半定量检测结果:A,B两组 mRNA 表达水平高于C组(均 $P > 0.05$);B组各时点又显著高于A组($P < 0.05$)(附表)(图4)。

A组与对照组比较无显著性差异(均 $P > 0.05$)(附表)(图3)。

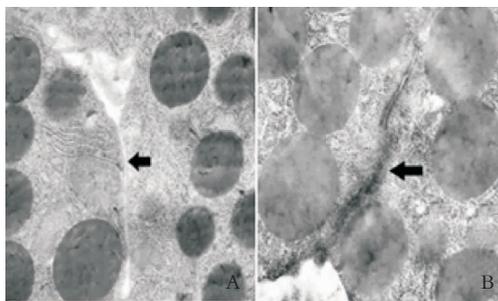


图1 电镜观察细胞连接变化(箭头所指为细胞间连接复合体)($\times 20\ 000$) A:SAP 1h 细胞间连接破坏;B:MAP 1h 细胞间连接复合体结构完好

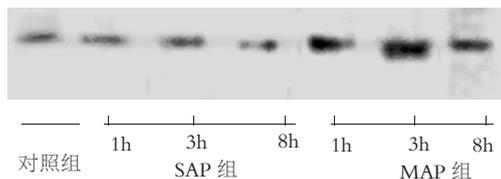


图3 HSP27 磷酸化蛋白(Ser78)在3组组织中的表达

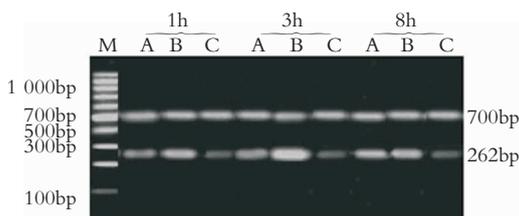


图4 HSP27 mRNA 在3组组织中的表达 A:SAP组; B:MAP组;C:对照组

附表 SAM 等的检测结果($\bar{x} \pm s$)

项目	n	A组			B组			C组		
		1h	3h	8h	1h	3h	8h	1h	3h	8h
SAM(U/L)	10	3589.5 ± 231.6 ¹⁾	6022.9 ± 531.2 ¹⁾	12207.2 ± 593.6 ¹⁾	1917.9 ± 194.8 ^{1),2)}	2689.8 ± 521.1 ^{1),2)}	5652.7 ± 443.8 ^{1),2)}	725.5 ± 223.2	706.2 ± 115.9	749.7 ± 124.5
HSP27(U)	10	40.3 ± 0.8 ¹⁾	52.1 ± 1.2 ¹⁾	26.3 ± 0.9	50.1 ± 1.3 ^{1),2)}	70.2 ± 1.1 ^{1),2)}	39.3 ± 0.7 ^{1),2)}	24.2 ± 0.8	25.0 ± 0.7	25.4 ± 1.1
HSP27磷酸化(U)	10	23.7 ± 0.4	22.7 ± 1.0	24.3 ± 0.8	50.2 ± 0.7 ^{1),2)}	67.9 ± 1.4 ^{1),2)}	40.2 ± 1.2 ^{1),2)}	23.3 ± 1.5	22.8 ± 1.6	22.9 ± 1.0
HSP27mRNA	10	1.1 ± 0.06 ¹⁾	1.3 ± 0.05 ¹⁾	0.8 ± 0.07 ¹⁾	1.4 ± 0.05 ^{1),2)}	2.1 ± 0.04 ^{1),2)}	1.2 ± 0.05 ^{1),2)}	0.6 ± 0.04	0.6 ± 0.04	0.62 ± 0.06
病理评分	10	5.8 ± 0.4 ¹⁾	9.7 ± 0.8 ¹⁾	11.8 ± 1.2 ¹⁾	3.5 ± 0.8 ^{1),2)}	5.5 ± 0.5 ^{1),2)}	7.0 ± 0.9 ^{1),2)}	0	0	0
胰腺系数	10	3.3 ± 0.3 ¹⁾	3.6 ± 0.3 ¹⁾	4.9 ± 0.5 ¹⁾	2.9 ± 0.1 ²⁾	3.3 ± 0.2 ^{1),2)}	3.8 ± 0.2 ^{1),2)}	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.2	2.8 ± 0.1

注:1)与C组比较 $P < 0.05$; 2)与A组比较 $P < 0.05$

3 讨论

在 cholecystokinin (CCK) 诱导的大鼠 MAP 和小鼠 SAP 中,细胞极性消失,间隙扩大,引起胰腺组织水肿。细胞间隙扩大的机制是由于细胞连接复合体结构的破坏。这一结构不仅调控细胞间的黏附和连接,而且还影响细胞内 actin 细胞骨架的结

构和细胞内蛋白的极性分布^[4]。HSP27 是一种小热休克蛋白,可由细胞应激性刺激诱导表达,起分子伴侣作用^[5]。有研究发现,HSP27 高表达可通过稳定细胞间连接复合体而起到减轻胰腺水肿的作用^[6]。HSP27 的调节机制依赖于它的蛋白及磷酸化蛋白表达,通过 p38-MAPK 信号传导路活化

HIF- α 稳定细胞连接结构^[7-8]。

本研究发现细胞连接复合体解聚、破坏是不同类型的实验性急性胆源性胰腺炎的共有特征,进一步说明了细胞连接的变化是 AP 发生、发展中的早期事件。在 SAP 发病早期即有胰腺水肿形成并随病程发展逐渐加重,与之相伴随的是细胞间黏连复合体严重破坏,细胞间隙扩大。而 MAP 细胞连接受损程度较轻,说明细胞连接的变化可能对于 AP 的预后或分型有影响。HSP27 是细胞连接复合体结构的上游调控因子,本研究发现 AP 时 HSP27 蛋白表达升高;此结论同 Tashiro 等^[9]的报道相似。其可能原因是,AP 时 HSP27 可由氧自由基、细胞因子等损伤因素诱导表达,起细胞应激保护作用^[10-11]。在 MAP 中,HSP27 蛋白及其 mRNA 表达均明显高于 SAP,揭示 HSP27 的表达对 AP 的结果和分型亦有影响。同时因 HSP27 mRNA 表达不同,也说明 AP 早期已有基因表达的改变。因 HSP27 以磷酸化依赖方式调节细胞连接的变化,本研究结果显示,MAP 时 HSP27 Ser78 表达明显升高,SAP 中该蛋白的表达与对照组无明显差别。提示 SAP 时,虽然 HSP27 蛋白表达升高,但因蛋白磷酸化程度相对较低而导致对细胞连接结构稳定能力下降,细胞水肿较重。

总之,本研究揭示了细胞连接复合体损伤是 AP 的共有特征,但在不同阶段其表达有明显差异,SAP 损伤较 MAP 更严重,这主要是因为调控因子 HSP27 及其磷酸化表达相对下降。说明在 AP 发生、发展中炎症介质的表达是不同的。

参考文献:

[1] Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, *et al.* Heat shock proteins: endogenous modulations of apoptotic cell death [J].

Biochem Biophys Res Commun, 2001, 286 (5): 433 - 442.

- [2] 中华医学会胰腺学组. 急性胰腺炎的临床诊断及分级标准(1996年第二次方案)[J]. 中华外科杂志, 1997, 35 (7): 773 - 775.
- [3] 王念林,陈昱,王晖. 活体实验性胰腺炎动物模型的选择[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9 (2): 125 - 129.
- [4] Sugi K, Musch MW, Field M, *et al.* Inhibition of Na⁺/K⁺ - ATPase by interferon- γ down-regulates intestinal epithelial transport and barrier function [J]. Gastroenterology, 2001, 120 (13): 1393 - 1403.
- [5] Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 286 (1): G189 - G196.
- [6] Balog A, Gyulai Z, Boros LG, *et al.* Polymorphism of the TNF- α , HSP70-2, and CD14 genes increases susceptibility to severe acute pancreatitis [J]. Pancreas, 2005, 30 (2): 46 - 50.
- [7] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15 (1): 1 - 12.
- [8] Weber H, Huhns S, Luthen F, *et al.* Calpain activation contributes to oxidative stress-induced pancreatic acinar cell injury [J]. Biochem Pharmacol, 2005, 70 (10): 1241 - 1252.
- [9] Tashiro M, Schfer C, Yao H, *et al.* Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells [J]. Gut, 2001, 49 (2): 241 - 250.
- [10] Concannon CG, Gorman AM, Samali A, *et al.* On the role of HSP27 in regulating apoptosis [J]. Apoptosis, 2003, 8 (1): 61 - 70.
- [11] Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis [J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2002, 9 (4): 401 - 410.

关于优先处理、录用课题论文的启事

为及时反映全国各地临床医学的新成果、新技术、本刊将对获得国家、省、市等各类科研基金资助、立项课题的来稿,尽快审稿,对可用稿件尽快刊登。敬请全国各地医药科研临床工作者踊跃投稿。投稿时请附相关材料、资助项目文件的复印件、单位介绍信,并在稿件左下方脚注中注明基金资助项目名称、编号。