

· 基础研究 ·

复苏液体对重度失血性休克大鼠心肌热休克蛋白 90 α 表达的影响*杨晓鲲, 徐明元, 徐贵森 Δ

(成都军区总医院急诊科, 成都 610083)

摘要:目的 用不同种类液体对重度失血性休克大鼠进行复苏后, 对比大鼠心肌组织中热休克蛋白(HSP)90 α 的表达、变化规律及大鼠生存率, 为临床治疗失血性休克选择复苏液体提供参考。方法 建立失血性休克大鼠模型, 分别运用乳酸林格液、聚明胶肽注射液、高渗氯化钠右旋糖酐进行液体复苏, 测定大鼠心肌组织中 HSP90 α 蛋白的表达及大鼠死亡率。结果 重度失血性休克后运用不同种类液体进行复苏, 大鼠心肌组织 HSP90 α 表达、大鼠死亡率差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 重度失血性休克可以诱导大鼠心肌组织中 HSP90 α 的表达, 当用不同液体进行复苏后各组 HSP90 α 的表达不同且具有一定的规律性, 提示 HSP90 α 作为一个重要的调控分子参与失血性休克后心肌组织的保护机制。

关键词: 复苏液体; 失血性休克; 热休克蛋白 90 α

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.32.032

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)32-3932-03

Expression changes of HSP90 α in cardiac muscles in rats with severe hemorrhagic shock by the treatment of different resuscitating fluid*

Yang Xiaokun, Xu Mingyuan, Xu GuiSen Δ

(Department of Emergency, General Hospital of Chengdu Military Command Area, Chengdu, Sichuan 610083, China)

Abstract: Objective To explore the expression changes of HSP90 α in cardiac muscles and survival rates in rats by using the different fluids to resuscitate the severe hemorrhagic shocked rats, and provide reference for the clinical treatment of hemorrhagic shock with different resuscitation fluids. **Methods** Uncontrolled hemorrhagic shock rats model was established, using lactic acid salinger liquid, poly peptide injection gelatin, hypertonic sodium chloride dextran for fluid resuscitation respectively, and then checked the HSP90 α expression changes and survival rates in rats. **Results** the expressions of HSP90 α in myocardial tissue and the mortality in rats were different after using different resuscitation fluids in severe hemorrhagic shock rats, difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** the expression of HSP90 α in cardiac muscles of rats could be induced by severe hemorrhagic shock, the HSP90 α expressed differently and regularly after using different resuscitating fluids, it implied that the HSP90 α played an important role in the hemorrhagic rats cardiac as a regulating factor.

Key words: resuscitating fluids; hemorrhagic shock; heat shock proteins 90 α

众所周知, 液体复苏是休克早期治疗的重要手段之一^[1]。目前有关休克液体复苏的液体种类有晶体液和胶体液, 晶体液主要有乳酸林格液, 胶体液主要有血浆以及各种代血浆制品, 最近有报道显示高渗氯化钠右旋糖酐对恢复失血性休克血容量有较好效果^[2-3]。休克特别是重度失血性休克发生后, 机体各脏器处于一种应激受损状态, 由于心脏的特殊地位, 其功能的变化对于休克患者的血流动力学会产生直接的影响, 进而影响其余各个脏器的功能, 所以对于研究心脏的保护机制具有特别重要的意义。作者早期的研究发现热休克蛋白(HSP)90 α 作为一种调控分子(分子伴侣)与其他分子(如 HIF-1 α)一道间接参与保护心肌组织的过程^[4-5]。本实验通过对实验大鼠相同程度失血性休克采用不同液体进行复苏, 并对复苏后不同时间点心肌细胞中 HSP90 α 含量进行测定, 同时观察不同组别中大鼠的存活率, 以评估不同复苏液体对休克大鼠心肌的保护作用及对大鼠生存率的影响。

1 材料与方

1.1 实验动物 SD 大鼠(由本院实验动物中心提供)240 只, 14~16 周龄, 雌雄各半, 体质量(223.0 \pm 19.2)g。所有大鼠实验前禁食、自由饮水, 实验当日用戊巴比妥钠麻醉, 于右侧股动

脉、股静脉和右颈动脉插管(导管内径 0.58 mm, 外径 0.965 mm), 股动脉插管经三通管连接汞血压计和玻璃注射器, 供观察血压和放血, 经插管注射肝素钠生理盐水(500 U/kg)抗凝, 股静脉插管给药。

1.2 材料 乳酸林格液(LR), 聚明胶肽注射液(汉华龙生物制药有限公司生产, HES), 高渗氯化钠右旋糖酐(7.5% NaCl/6% Dextran40, HSD), 羊抗大鼠 HSP90 α 多克隆抗体(Merck 公司); 辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG(武汉博士德公司); 硝酸纤维素膜(北京鼎国生物技术公司); 考马斯亮蓝蛋白定量检测试剂盒(南京建成生物技术公司); 垂直电泳仪及半干转移电泳仪; 紫外分光光度仪; 免疫组化试剂盒(北京中山公司)。

1.3 方法 将实验动物按随机数字表法分为对照组(C 组, 不补液组)、HES 组、HSD 组、LR 组, 各 60 只; LR 组的补液量与失血量一致, HES 组按 20 mL/kg 补入, HSD 组按 6 mL/kg 补入, 然后各组以 45% 放血量分别做休克模型, 休克后根据实验设计给予相应液体复苏^[6]。分别于休克前, 输液后 1、3、6、12、24 h 剖杀大鼠($n=30$)取心脏, 行免疫组化和心肌组织内 HSP90 α 表达含量测定。另外各组剩余大鼠($n=30$)观察 24 h

存活率(从复苏开始起计时)。

1.3.1 HSP90 α 蛋白的表达及变化规律 参照马计等^[7]的方法提取大鼠心肌组织总蛋白,之后用 Lowry¹法测样品浓度,进行蛋白定量,40 μ g 总蛋白加入等体积的上样缓冲液后用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶常温下进行电泳分离,积层胶 70 V、30 min,分离胶 110 V、2.5 h。电泳完毕后一半胶用作考马斯亮蓝染色,另一半胶用半干转移电泳仪 70 mA、1 h,常温下将蛋白质转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)上,经丽春红染色确定转膜成功,将膜经磷酸盐缓冲液(PBS)充分洗涤后,用 TBST 含(5%脱脂奶粉)于室温下封闭 2 h,加入 HSP90 α 多克隆抗体(羊抗大鼠 1:500),于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,NaCl-Tris 液充分洗膜后,加人辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊二抗(1:5 000),室温下孵育 1 h 再次充分洗膜,最后用化学发光试剂于暗室中用胶片定影、显影,得到的结果经扫描后用 Quantity one 软件进行统计学分析,同时测定产物条带的积分光密度值(OD) \times 面积以确定蛋白含量。

1.3.2 免疫组化 S-P 法检测 HSP90 α 蛋白相关抗原^[7] 主要步骤:取剖杀的大鼠心脏组织用 10% 中性甲醛液固定标本,石蜡切片至 5 μ m。(1)组织切片 5 μ m,常规脱蜡,蒸馏水洗;(2)3%过氧化氢,37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 以抑制内源性过氧化物酶活性,PBS 洗 4 \times 5 min;(3)HSP90 α 采用微波抗原修复(3 档,10 min),PBS 洗 4 \times 5 min;(4)正常羊血清 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 以减少非特异性反应;(5)一抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,PBS 洗 4 \times 5 min;(6)辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,PBS 洗 4 \times 5 min;(7)链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,PBS 洗 4 \times 5 min;(8)DAB 显色液显色,自来水冲洗终止反应;(9)苏木精复染,脱水,透明,封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对实验数据进行 *t* 检验,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同复苏液体对失血性休克大鼠心肌组织中 HSP90 α 表达的影响 蛋白免疫印迹结果表明,失血性休克后,各组中 HSP90 α 的表达较休克前都会发生增强,但随着液体复苏的开始,表达又会逐渐减弱,而且不同复苏液体对于失血性休克后

大鼠心肌组织中 HSP 90 α 的表达呈现出一定的规律性,且不同时间点中表达强弱的顺序都是 HSD 组>HES 组>LR 组,见图 1、表 1。重复测量方差分析结果:各组间 HSP 90 α 含量差异有统计学意义($P<0.01$),C 组>HSD 组>HES 组>LR 组。由图和表可见,开始差异不明显,以后逐渐显著,随时间逐渐升高,第 3、第 6 小时达到峰值,然后下降,第 12 小时过后有所升高,升高幅度各组不同,C 组最大,LR 组最小。

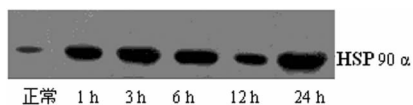


图 1 失血性休克大鼠心肌组织 HSP90 α 表达及变化

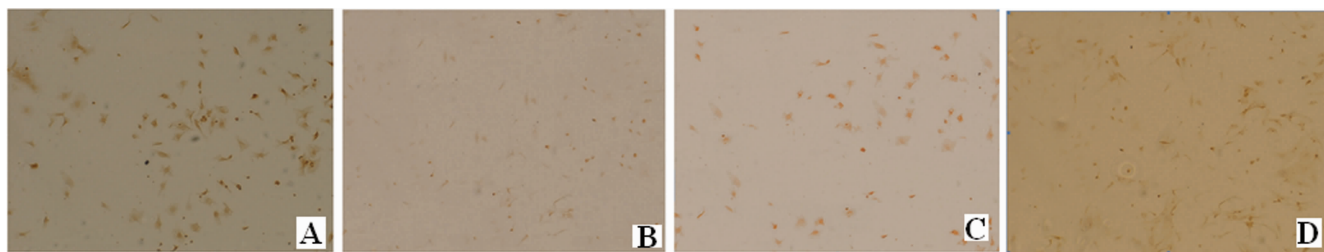
2.2 失血性休克大鼠心肌组织中 HSP90 α 表达免疫组化结果

免疫组化结果表明,失血性休克发生后,各组中 HSP 90 α 的表达较休克前都会发生增强,表现为细胞质内 HSP90 α 表达量增加,甚至细胞核内也有较大量的表达,但随着液体复苏的开始,表达又会逐渐减弱,而且不同复苏液体对于失血性休克后大鼠心肌组织中 HSP90 α 的表达呈现出一定的规律性,且不同时间点中表达强弱的顺序都是 C 组>HSD 组>HES 组>LR 组。见图 2。

表 1 各组失血性休克大鼠不同时间点 HSP90 α 含量 (OD \times mm², $\bar{x}\pm s$, $n=30$)

组别	时间点				
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
C 组	2.26 \pm 0.41	3.89 \pm 0.52	3.77 \pm 0.48	3.14 \pm 0.36	4.05 \pm 0.60
HSD 组	2.21 \pm 0.45	3.55 \pm 0.42	3.57 \pm 0.52	2.88 \pm 0.33	3.56 \pm 0.46
HES 组	2.19 \pm 0.48	3.18 \pm 0.34	3.15 \pm 0.37	2.67 \pm 0.43	3.19 \pm 0.41
LR 组	2.15 \pm 0.38	2.95 \pm 0.32	2.76 \pm 0.33	2.36 \pm 0.49	2.60 \pm 0.46

2.3 各组失血性休克大鼠的存活率比较 经过各种复苏液治疗后的休克大鼠,均较 C 组的存活率显著提高,差异有统计学意义($P<0.01$),存活率顺序为:LR 组>HES 组>HSD 组>C 组。见表 2。



A: C 组; B: HSD 组; C: HES 组; D: LR 组。

图 2 免疫组化结果($\times 10$)

表 2 各组失血性休克大鼠存活率比较($n=30$)

组别	干预结果		
	存活(n)	死亡(n)	存活率(%)
C 组	8	22	26.67
HSD 组	18	12	60.00
HES 组	23	7	76.67
LR 组	27	3	90.00

3 讨 论

HSP 家族是机体中的一类应激蛋白,是生物进化过程中一个高度保守的蛋白质家族,正常生理情况下在所有的活体组织内都有构成性表达,但当机体受到诸如休克、高热、缺氧、低血糖、病毒感染等干扰时,表达就会明显升高而这其中 HSP90 α 和 HSP70 及小分子 HSP 在对机体的保护作用方面发挥着非常重要的角色^[8]。作者早期研究^[1]发现,HSP90 α 在休克早期即对心肌组织发挥着比较重要的保护作用,其最主要

的作用是通过与 HIF-1 α 的 bHLH-PAS 功能域相结合,发挥分子伴侣的作用,通过使 HIF-1 α 降解减少,使得 HIF-1 α 在胞核内短时间大量聚集,顺利地发挥 HIF-1 α 促红细胞再生,促进糖酵解关键酶的生成以使机体更有效地利用氧以及促进血管再生的生物功能。而本研究则在此基础上更进一步地深入了解了不同复苏液体对于心肌组织内 HSP90 α 表达的影响,以发掘出更为安全有效的复苏液体类型。从研究结果中可以看出,相同程度失血性休克后,不同类型液体进行复苏,能够明显地影响 HSP90 α 表达从而进一步产生对 HIF-1 α 产生过程的影响,本研究中,大鼠心肌组织中 HSP90 α 蛋白的表达明显不同,同时各组大鼠的存活率也不同。其中以 HSD 组 HSP90 α 表达最强且持续时间最久,HES 组其次,而 LR 组表达弱且持续时间较短,同时各组大鼠存活率比较 LR 组长于 HES 组长于 HSD 组。这说明了此 3 种复苏液体中 LR 能够最有效地复苏失血性休克机体,机制尽管可能是多方面的,但本研究说明其能有效地保护心肌组织,以更早、更有效地恢复机体的有效循环,HES 组次之,而 HSD 组效果则不如前二者。此前尽管有报道认为,7.5%高渗氯化钠能提高血清渗透压,将组织间隙的液体吸入血管床,有较好的血流动力学效果^[9],还可促进肿胀内皮的液体回流,改善微循环,提高组织灌注,同时抑制中性粒细胞释放炎症细胞因子^[10-14]。但至少本研究表明在重度失血性休克的机体中,其发挥的功效远不如 HES 和 LR,作者考虑由于高渗氯化钠含有大量的氯离子,大量输注后会引引起高氯性酸中毒,可能是其复苏效果不如另外两者的原因之一,另外其他方面的原因尚需要进一步的了解,因此在对机体复苏时应用应该适当地进行限制。此外在选择复苏液体时,每一种复苏液体的用量也是值得考虑的问题,有学者提倡在保证机体有效循环灌注的前提下,给予延迟(限制性)液体复苏^[15],这方面的具体机制仍需做进一步的研究以证实。另外不同的复苏液体到底是通过何种信号途径来对心肌组织内 HSP90 α 的表达产生变化并进而对整个机体产生影响的,这也是下一步研究的方向。

参考文献:

- [1] 蒋荣成,吕志诚.失血性休克液体复苏研究的新进展[J].中国急救医学,2004,24(6):432-433.
- [2] 刘智舜,王筑生.高渗氯化钠在低血容量休克中的作用[J].中华医学写作杂志,2000,7(6):661-662.
- [3] 陈耀清,江宗贤,张彩文,等.闭合性腹部多脏器 26 例分析[J].衡阳医学院学报,1999,20(12):1094-1096.
- [4] 陈星宇,杨晓鲲.缺氧诱导乳鼠心肌细胞 hsp90 表达及变化[J].兰州大学学报:医学版,2007,33(2):17-20.
- [5] 党永明,黄跃生,陈丽峰.烫伤诱导大鼠心肌细胞缺氧诱导因子-1 α 定位表达的研究[J].第三军医大学学报,2003,25(18):1602-1605.
- [6] 李涛,刘良明,刁有芳,等.几种不同液体复苏失血性休克大鼠的适宜量研究[J].第三军医大学学报,2008,30(3):199-202.
- [7] 马计,张端莲,高凌,等.糖尿病大鼠心肌组织中 Survivin 蛋白表达的影响[J].数理医药学杂志,2008,21(2):154-156.
- [8] Csermely P, Schnaider T, Soti C, et al. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review [J]. Pharmacol Ther, 1998, 79(2):129-168.
- [9] Doyle JA, Davis DP, Hoyt DR. The use of hypertonic saline in the treatment of traumatic brain injury [J]. Trauma, 2001, 50(2):367-383.
- [10] Emin KA, VijayVK. Effects of hypertonic dextran in hypovolemic shock: a prospective clinical trial [J]. Injury, 2004, 35(5):500-506.
- [11] Gurfinkel V, Poggetti RS, Fontes B, et al. Hypertonic saline improves tissue oxygenation and reduces systemic and pulmonary inflammatory response caused by hemorrhagic shock [J]. J Trauma, 2003, 54(6):1137.
- [12] 余伶俐,简道林,吕作均.高渗高胶液对失血性休克大鼠细胞免疫功能的影响[J].中华医学杂志,2006,30(4):309-310.
- [13] 周小洁,潘景业,金可可,等.失血性休克再灌注大鼠血液 NO、NOS 的改变和丹参的作用[J].浙江临床医学,2005,7(7):676-677.
- [14] 李秀梅,王蕾,甘子明,等.大鼠失血性休克及再灌注后小动脉的形态学改变[J].新疆医科大学学报,2006,29(11):1047-1049.
- [15] Kim SH, Safar P, Capone A, et al. Hypothermia is and minimal fluid resuscitation increase survival after uncontrolled hemorrhagic shock in rat [J]. J Trauma, 1997, 42(2):213-222.
- [9] 张亚密,彭轶霞,管宏钟.山仙颗粒合并介入疗法治疗肝癌观察[J].陕西中医学院学报,2005,28(1):31-32.
- [10] 高英堂,张世光,宋文芹,等.四株肝癌细胞系的抑癌基因甲基化谱分析[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2011,5(11):3137-3140.
- [11] 陆英,张洁.仙鹤草水提物急性毒性和遗传毒性实验研究[J].长春中医药大学学报,2011,27(5):709-711.
- [12] Wong WW, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway [J]. IUBMB Life, 2008, 60(6):390-397.
- [13] Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide [J]. Oncogene, 2004, 23(16):2809-2818.
- [14] 袁丽华,郭武华,肖志华,等. SUMO-1 基因沉默对肝癌细胞株 SMMC-7721 bcl-2 及 c-myc 基因表达的影响 [J]. 重庆医学, 2010, 39(19):2578-2580.
- [15] Song G, Luo Q, Qin J, et al. Effects of oxymatrine on proliferation and apoptosis in human hepatoma cells [J]. Colloids Surf Biointerfaces, 2006, 48(1):1-5.

(收稿日期:2013-07-08 修回日期:2013-08-13)

(收稿日期:2013-07-14 修回日期:2013-08-03)