

HSF1 基因剔除对 HSR 抗内毒素血症的影响 *

陈广文 ** 王慷慨 刘 瑛 唐道林 肖献忠

(中南大学湘雅医学院病理生理学系, 长沙 410078)

摘要 利用内毒素(LPS)血症小鼠模型, 观察 HSF1 基因剔除对热休克反应(HSR)保护作用的影响. 采用腹腔注射 LPS 建立内毒素血症小鼠模型, HSR 采用肛温 42℃ 维持 15 min, 室温恢复 24 h, 利用 RT-PCR、苏木素-伊红(HE)染色、丙二醛测定以及死亡率, 计算和分析重要脏器组织中炎症介质基因的表达、脏器损伤程度及小鼠存活率. 注射 LPS 15 mg/kg 72 h 后 HSR+LPS(HSF1+/+)组存活率(7/15)显著高于 LPS(HSF1+/+)组(0/15)、LPS(HSF1-/-)组(0/14)和 HSR+LPS(HSF1-/-)组(0/14), 而注射 LPS 14 mg/kg 72 h 后, LPS(HSF1+/+)组存活率(5/15)显著高于 LPS(HSF1-/-)组(0/13)和 HSR+LPS(HSF1-/-)组(0/13). 在注射 LPS 12 h 后 LPS(HSF1+/+)组、LPS(HSF1-/-)组和 HSR+LPS(HSF1-/-)组的心、肺组织丙二醛含量显著升高, 但 HSR+LPS(HSF1+/+)组不升高. 肺组织炎症介质基因 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CCL-2、SOCS3、MCSF、GCSF、IL-15 在 LPS(HSF1-/-)组和 LPS(HSF1+/+)组表达上调, HSR+LPS(HSF1-/-)组除 IL-15 较低外其他上调更甚, HSR+LPS(HSF1+/+)组除 IL-1 β 和 TNF- α 较高外其他显著下调. 注射 LPS 后 LPS(HSF1+/+)组和 LPS(HSF1-/-)组的肺、肝、肾病理形态改变明显, HSR+LPS(HSF1+/+)组改变较轻, HSR+LPS(HSF1-/-)组改变更加严重. HSF1 基因剔除能显著消减 HSR 对内毒素血症小鼠的保护作用.

关键词 热休克反应, 内毒素血症, 基因剔除, 热休克因子 1, 炎症介质

学科分类号 R361.1

全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 一般指由感染或非感染因素刺激宿主引起的过度炎症反应, 这些因素刺激宿主免疫系统, 释放体液和细胞因子, 进一步影响血管张力和通透性, 并导致微循环障碍、器官功能衰竭. 自从美国胸外科医生与危重感染急救医学学会(ACCP/SCCM)1991 年在芝加哥联合召开的学术会议上进一步明确 SIRS 的概念^[1]以来, SIRS 在基础研究和临床诊疗中越来越受到重视. 热休克反应(heat shock response, HSR)^[2]是细胞、组织或机体遇短暂适度高温(42℃, 15 min)刺激后产生的一种应激反应, 可诱导产生热休克蛋白(heat shock protein, HSP). 热休克因子 1(heat shock factor-1, HSF1)^[3]是广泛存在于真核细胞内, 在应激情况下能诱导产生具有自身保护作用的热休克蛋白的一种生物因子. 热休克反应能有效提高机体自身抗损伤能力, 但 HSF1 基因在 HSR 保护作用中, 及二者与损伤因素的剂量之间存在什么样的关系仍不甚明了. 本文试图利用 HSF1 基因剔除小鼠, 注射不同剂量大肠杆菌内毒素复制的内毒素血症动物模型,

观察热休克因子缺失对小鼠内毒素血症的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

HSF1 基因敲除小鼠, 从美国德克萨斯大学引种, 中南大学湘雅医学院实验动物中心繁殖, 本室专人负责 HSF1 基因剔除小鼠的基因型检测^[4], 获取合格的 HSF1 基因敲除纯合子(HSF1-/-)和野生型(HSF1+/+)小鼠. 精制大肠杆菌内毒素即脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 美国 Sigma 公司生产. 髓过氧化物酶(MPO)和丙二醛(MDA)测试试剂盒(南京建成生物工程研究所). 炎症因子基因扩增引物由上海英骏生物技术有限公司合成. UV-1601 紫外分光光度计(日本岛津公司). 9700 型 PCR 仪(美国 AB 公司).

* 国家重点基础研究发展规划项目(973)(2007CB512007)和国家自然科学基金重点资助项目(30330280).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-2355022, E-mail: chen8gd@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-08-09, 接受日期: 2007-09-30

1.2 方法

1.2.1 LPS 15 mg/kg 存活率观察. 取健康成年 HSF1+/+ 小鼠 30 只, HSF1-/- 小鼠 28 只, 雌雄不拘, 各随机分为 2 组. HSF1+/+ 小鼠: LPS(HSF1+/+) 组和 HSR+LPS(HSF1+/+) 组, 各 15 只; HSF1-/- 小鼠: LPS(HSF1-/-) 组和 HSR+LPS(HSF1-/-) 组, 各 14 只. HSR 即在注射 LPS 24 h 前, 动物经浅麻醉(戊巴比妥钠 35~40 mg/kg 腹腔注射), 置热环境行热预处理, 使直肠温度升至 42℃ 维持 15 min, 室温下恢复 24 h. 4 组动物均按 15 mg/kg 剂量从腹腔注射 LPS, 观察注射 LPS 后 0、12、24、36、48、60、72 h 小鼠存活率.

1.2.2 LPS 14 mg/kg 存活率观察. 取健康成年 HSF1+/+ 小鼠 30 只, HSF1-/- 小鼠 26 只, 雌雄不拘. 分别用随机数字表法分为 2 组. HSF1+/+: LPS(HSF1+/+) 组和 HSR+LPS(HSF1+/+) 组, 每组 15 只; HSF1-/-: LPS(HSF1-/-) 组和 HSR+LPS(HSF1-/-) 组, 每组 13 只. 除 LPS 剂量按 14 mg/kg 外, 其他处理方法和观察时间同 1.2.1.

1.2.3 心、肺组织 MPO 与 MDA 含量测定. 取 HSF1+/+ 小鼠 45 只, HSF1-/- 小鼠 42 只, 各随机分为 3 组. HSF1+/+ 小鼠: 对照(HSF1+/+) 组、LPS(HSF1+/+) 组和 HSR+LPS(HSF1+/+) 组, 各 15 只. HSF1-/- 小鼠: 对照(HSF1-/-) 组、LPS(HSF1-/-) 组和 HSR+LPS(HSF1-/-) 组, 各 14 只. 按体重注射 LPS 14 mg/kg, HSR+LPS 组小鼠在注射 LPS 前 24 h 行 HSR. 注射 LPS 后 12 h 取心、肺组织在 4℃ 做成 10% 的匀浆, 按试剂盒中说明测 MPO 和 MDA.

1.2.4 肺组织炎症介质基因表达检测. 取 HSF1+/+ 小鼠 9 只, HSF1-/- 小鼠 9 只, 各随机分为 3 组. HSF1+/+: 对照(HSF1+/+) 组、LPS(HSF1+/+) 组和 HSR+LPS(HSF1+/+) 组, 各 3 只. HSF1-/-: 对照(HSF1-/-) 组、LPS(HSF1-/-) 组和 HSR+LPS(HSF1-/-) 组, 各 3 只. 注射 LPS 14 mg/kg, HSR 处理与前同. 注射 LPS 后 12 h 取肺组织速冻于液氮, 按 TRIzol 总 RNA 分离试剂盒说明书抽提 RNA. 用 RT-PCR 方法^[9]扩增炎症介质基因 CCL2、COCS3、MCSF、GCSF、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-15, 观察其差异表达并进行图象分析获得半定量 RT-PCR 结果. 炎症介质基因的各组电泳照片用 Adobe Photoshop 图像处理软件处理, 最终制成反转片备用.

1.2.5 肝、肺、肾组织病理形态学观察. 取

HSF1+/+ 小鼠 3 只, HSF1-/- 小鼠 3 只, 各随机分为 3 组. HSF1+/+ 小鼠: 对照(HSF1+/+) 组、LPS(HSF1+/+) 组和 HSR+LPS(HSF1+/+) 组, 各 1 只. HSF1-/-: 对照(HSF1-/-) 组、LPS(HSF1-/-) 组和 HSR+LPS(HSF1-/-) 组, 各 1 只. 注射 LPS 14 mg/kg, HSR 处理同前. 注射 LPS 后 12 h 取心、肝、肺、肾组织, 10% 福尔马林固定, 组织学切片 HE 染色, 光镜下(肺 200 $\times$, 肝、肾 400 $\times$)观察形态学改变并照相.

2 结 果

2.1 LPS 15 mg/kg 72 h 存活率

LPS(HSF1+/+) 组、LPS(HSF1-/-) 组和 HSR+LPS(HSF1-/-) 组在注射 LPS 15 mg/kg 后存活率明显下降, 与注射 LPS 前即 0 h 比 24~72 h $P < 0.01$. HSR+LPS(HSF1+/+) 组在注射 LPS 后 24~72 h 存活率显著高于其他 3 组, 组间比较 $P < 0.05 \sim 0.01$. 但 LPS(HSF1+/+) 组和 LPS(HSF1-/-) 组在注射 LPS 后, 在 2 组间存活率没有显著差别(图 1).

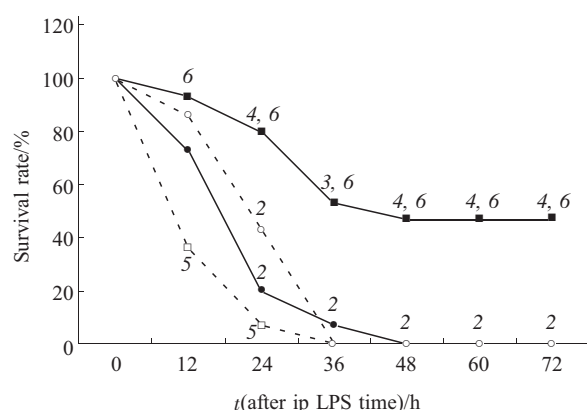


Fig. 1 HSF1 knock out mice survival percentage change after injects LPS (15 mg/kg) 72 h

vs LPS 0 h ² $P < 0.01$; vs LPS (HSF1+/+) ³ $P < 0.05$, ⁴ $P < 0.01$; vs LPS (HSF1-/-) ⁵ $P < 0.01$; vs HSR+LPS (HSF1-/-) ⁶ $P < 0.01$. ■—■: HSR+LPS(HSF1+/+); ●—●: LPS(HSF1+/+); □—□: HSR+LPS(HSF1-/-); ○—○: LPS(HSF1-/-).

2.2 LPS 14 mg/kg 72 h 存活率

LPS(HSF1+/+) 组、LPS(HSF1-/-) 组和 HSR+LPS(HSF1-/-) 组在注射 LPS 后存活率显著下降, 与注射 LPS 前(0 h)比较, 24 h $P < 0.05$, 36~72 h $P < 0.01$. HSR+LPS(HSF1+/+) 组注射 LPS 后存活率显著高于 LPS(HSF1-/-) 组和 HSR+LPS(HSF1-/-) 组, 36~72 h 组间比较 $P < 0.01$, 各时间点存活率

比 LPS(HSF1+/+)组略高, 但 2 组间差别无显著性. LPS(HSF1+/+)组在注射 LPS 后存活率比 LPS(HSF1-/-)组和 HSR+LPS(HSF1-/-)组显著较高, 36~72 h 2 组比较 $P < 0.05 \sim 0.01$. LPS(HSF1-/-)组和 HSR+LPS(HSF1-/-)组在注射 LPS 后 2 组间各时间点均无显著差别(图 2).

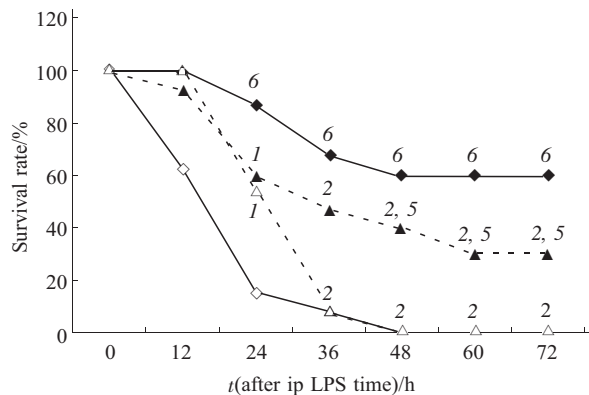


Fig. 2 HSF1 knock out mice survival percentage change after injects LPS(14 mg/kg) 72 h

vs LPS 0 h $^1P < 0.05$, $^2P < 0.01$; vs LPS (HSF1-/-) group $^3P < 0.01$; vs LPS (HSF1-/-) group and HSR+LPS (HSF1-/-) group $^4P < 0.01$. ◆◆: HSR+LPS(HSF1+/+); ▲▲: LPS(HSF1+/+); ◇◇: HSR+LPS(HSF1-/-); △△: LPS(HSF1-/-).

2.3 心、肺组织髓过氧化物酶 (MPO) 含量

注射 LPS 14 mg/kg 12 h 后心、肺组织 MPO 含量在 LPS(HSF1+/+)组明显较对照(HSF1+/+)组高, 2 组间比较 $P < 0.01$. HSR+LPS(HSF1+/+)组心、肺组织 MPO 含量明显较 LPS(HSF1+/+)组低, 2 组间比较 $P < 0.01$. 对照(HSF1-/-)组、LPS(HSF1-/-)组和 HSR+LPS(HSF1-/-)组, 肺组织 MPO 水平各组间没有显著性差别, LPS(HSF1-/-)组心肌组织 MPO 水平较对照(HSF1-/-)组和 HSR+LPS(HSF1-/-)组高(表 1).

2.4 心、肺组织丙二醛 (MDA) 含量

注射 LPS 14 mg/kg 12 h 后心、肺组织 MDA 含量在 LPS(HSF1+/+)组显著较对照(HSF1+/+)组高, 2 组间比较 $P < 0.01$. HSR+LPS(HSF1+/+)组心、肺组织 MDA 含量明显较 LPS(HSF1+/+)组低, 2 组间比较 $P < 0.01$. LPS(HSF1-/-)组心、肺组织 MDA 含量明显较对照(HSF1-/-)组高, 2 组间比较 $P < 0.05 \sim 0.01$. HSR+LPS(HSF1-/-)组心、肺组织 MDA 含量比 LPS(HSF1-/-)组不低, 甚至略高(表 1).

Table 1 HSR to heart and lungs MPO and MDA influence

Group	MPO/(U·g ⁻¹)		MDA/(U·mg ⁻¹)	
	Lung	Heart	Lung	Heart
Control(HSF1+/+) (n=15)	3.76 ± 0.36	3.26 ± 0.49	1.81 ± 0.63	12.30 ± 2.13
LPS(HSF1+/+) (n=15)	5.01 ± 0.52 ¹	4.12 ± 0.26 ¹	3.96 ± 0.82 ¹	15.62 ± 2.56 ¹
HSR+LPS(HSF1+/+) (n=15)	3.73 ± 0.46 ²	3.16 ± 0.35 ²	2.88 ± 0.77 ²	12.41 ± 1.76 ²
Control(HSF1-/-) (n=14)	3.40 ± 0.66	2.78 ± 0.59	1.89 ± 0.35	5.79 ± 1.33
LPS (HSF1-/-) (n=14)	3.62 ± 0.20	3.42 ± 0.33 ⁴	2.85 ± 0.25 ⁴	7.17 ± 1.70 ³
HSR+LPS(HSF1-/-) (n=14)	3.19 ± 0.58	2.51 ± 0.30	3.22 ± 0.30	7.32 ± 1.00

vs Control(HSF1+/+) $^1P < 0.01$; vs LPS(HSF1+/+) $^2P < 0.01$; vs Control (HSF1-/-) $^3P < 0.05$, $^4P < 0.01$.

2.5 致炎性炎症介质基因的表达

LPS(HSF1+/+)组和 LPS(HSF1-/-)组在注射 LPS 12 h 后, 白介素 1β(interleukin 1β, IL-1β)、白介素 6(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF-α)和巨噬/单核细胞趋化因子 1(macrophage/monocyte chemotactic protein1, MCP1)CCL2 表达均显著升高, 与相应的对照(HSF1+/+)组和对照

(HSF1-/-)组比较 $P < 0.01$. HSR+LPS(HSF1+/+)组在注射 LPS 后, IL-6 和 CCL2 的表达受到明显抑制, 与 LPS(HSF1+/+)组比较 $P < 0.01$, IL-1β 和 TNF-α 的表达则不受影响. HSR+LPS(HSF1-/-)组在注射 LPS 后, 以上 4 种炎症介质基因的表达均不表现抑制, 相反 IL-6 表达更高, 与 LPS(HSF1-/-)组比较 $P < 0.01$ (表 2 和图 3).

Table 2 HSF1 gene rejects to the lung sends the inflammation medium gene expression influence

Group	IL-1β	IL-6	TNF-α	CCL2
Control(HSF1+/+) (n=3)	19.69 ± 4.76	10.54 ± 3.35	101.05 ± 10.90	9.67 ± 3.26
LPS(HSF1+/+) (n=3)	51.54 ± 8.46 ²	129.65 ± 20.21 ²	151.77 ± 8.64 ²	157.53 ± 19.29 ²
HSR+LPS(HSF1+/+) (n=3)	49.75 ± 8.75	32.43 ± 7.52 ^{5,7}	151.26 ± 14.41	69.26 ± 14.02 ^{5,7}
Control(HSF1-/-) (n=3)	20.70 ± 4.41	10.27 ± 3.71	80.71 ± 15.28	9.91 ± 1.75
LPS (HSF1-/-) (n=3)	80.91 ± 19.78 ³	170.62 ± 17.43 ³	151.37 ± 13.31 ³	163.05 ± 17.13 ³
HSR+LPS(HSF1-/-) (n=3)	103.39 ± 6.92	240.63 ± 19.63 ⁷	151.49 ± 11.61	168.04 ± 21.78

vs Control(HSF1+/+) $^2P < 0.01$; vs Control (HSF1-/-) $^3P < 0.01$; vs LPS(HSF1+/+) $^5P < 0.01$; vs LPS(HSF1-/-) $^7P < 0.01$.

2.6 抗炎性炎症介质基因的表达

LPS(HSF1+/+)组和 LPS(HSF1-/-)组在注射 LPS 后, 细胞因子信号转导抑制因子 SOCS3、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, MCSF)、粒细胞集落刺激因子(GCSF)和白介素 -15(interleukin 15, IL-15)表达均显著升高, 与相应的对照(HSF1+/+)组和对照(HSF1-/-)组比较 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$. HSR+LPS(HSF1+/+)组在注射

LPS 后, 以上 4 种抗炎因子的表达均受到明显抑制, 与 LPS(HSF1+/+)组和 LPS(HSF1-/-)组比较 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$. HSR+LPS(HSF1-/-)组在注射 LPS 后, SOCS3、MCSF 和 GCSF 的表达仍然很高, 只有 IL-15 的表达受到显著抑制, 与 LPS (HSF1-/-)组比 $P < 0.01$. 然而, MCSF 和 IL-15 的基础表达在对照(HSF1+/+)组显著高于对照(HSF1-/-)组, 两组比较 $P < 0.05$. 详见表 3 和图 3.

Table 3 HSF1 gene rejects to lung anti-inflammation medium gene expression influence

Group	SOCS3	MCSF	GCSF	IL-15
Control(HSF1+/+) (n=3)	10.08 ± 1.65	119.49 ± 10.20 ³	10.77 ± 1.86	78.77 ± 10.61 ³
LPS(HSF1+/+) (n=3)	141.04 ± 17.47 ²	182.81 ± 27.83 ¹	150.97 ± 19.03 ²	220.30 ± 13.42 ²
HSR+LPS(HSF1+/+) (n=3)	80.18 ± 23.79 ^{5,7}	74.30 ± 21.22 ^{6,8}	40.93 ± 15.42 ^{6,8}	50.28 ± 6.47 ^{6,8}
Control(HSF1-/-) (n=3)	21.78 ± 7.33	60.80 ± 23.20	10.82 ± 1.77	39.35 ± 6.45
LPS (HSF1-/-) (n=3)	141.64 ± 10.95 ⁴	171.95 ± 24.71 ⁴	130.61 ± 15.10 ⁴	202.61 ± 22.69 ⁴
HSR+LPS(HSF1-/-) (n=3)	152.07 ± 10.69	181.42 ± 21.54	169.19 ± 17.21	40.45 ± 5.28 ⁸

vs Control(HSF1+/+) ¹ $P < 0.05$, ² $P < 0.01$; vs Control (HSF1-/-) ³ $P < 0.05$, ⁴ $P < 0.01$; vs LPS(HSF1+/+) ⁵ $P < 0.05$, ⁶ $P < 0.01$; vs LPS (HSF1-/-) ⁷ $P < 0.05$, ⁸ $P < 0.01$.

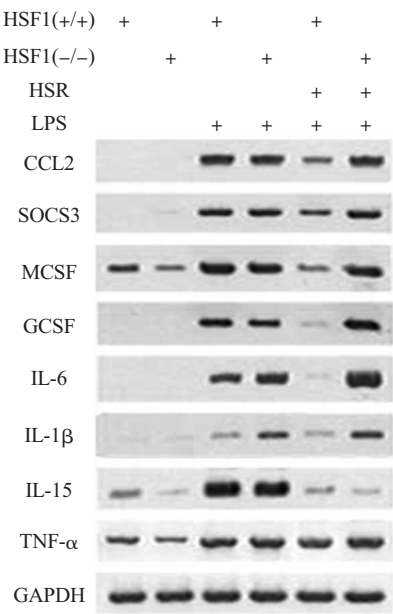


Fig. 3 HSF1 gene rejects to the lung inflammation medium gene expression influence

2.7 主要脏器病理形态学改变

2.7.1 肺脏. 对照(HSF1+/+)组, 肺血管内可见散在血细胞, 肺泡壁较薄, 呼吸上皮呈单层排列, 结构清晰. LPS(HSF1+/+)组, 肺血管内有凝血样物质, 白细胞附壁, 大量红细胞和白细胞渗出血管, 进入肺间质和肺泡腔, 肺泡壁增厚, 肺泡腔隙变窄. HSR+LPS(HSF1+/+)组, 血管内可见溶血样物质, 肺间质中红细胞和白细胞显著较少, 肺泡壁增

厚不如 LPS(HSF1+/+)组明显. 对照(HSF1-/-)组, 肺泡壁较厚, 除细胞呈复合多层叠合外, 肺泡结构和轮廓清晰. LPS (HSF1-/-)组, 血管内无血流状, 白细胞附壁非常典型, 游走进入肺泡腔的白细胞与肺泡壁呈多层叠合, 致使肺泡腔隙变窄. HSR+LPS(HSF1-/-)组, 肺血管内红细胞呈挤压状凝聚, 白细胞附壁, 肺泡壁呈多层叠合或崩解状. 见图 4a.

2.7.2 肝脏. 对照(HSF1+/+)组, 血管内血细胞清晰, 肝细胞、细胞核、核仁轮廓清晰. LPS(HSF1+/+)组, 肝管内凝血, 肝细胞缺血挛缩, 胞核肿胀或碎裂. HSR+LPS(HSF1+/+)组, 血管内凝血、肝细胞挛缩和核肿胀都较 LPS(HSF1+/+)组轻微. 对照(HSF1-/-)组, 肝管内血细胞和肝细胞形态规则、胞核、核仁轮廓清晰. LPS (HSF1-/-)组, 血管内白细胞附壁明显, 肝细胞肿胀, 细胞间轮廓不清, 胞核崩解. HSR+LPS(HSF1-/-)组, 肝管内凝血, 肝细胞缺血肿胀, 轮廓消失, 胞核肿胀、崩解. 见图 4b.

2.7.3 肾脏. 对照(HSF1+/+)组, 肾小管细胞轮廓清晰, 肾小球形态正常. LPS(HSF1+/+)组, 肾血管和肾小球内出现广泛凝血, 肾小管细胞出现缺血坏死形态. HSR+LPS(HSF1+/+)组, 肾血管和肾小球凝血减轻, 肾小管细胞缺血坏死形态比 LPS (HSF1+/+)组明显较轻. 对照(HSF1-/-)组, 肾小管细胞轮廓清晰, 肾小球形态正常. LPS (HSF1-/-)

组, 肾血管与肾小球内凝血明显, 肾小球挛缩. HSR+LPS(HSF1^{-/-})组, 肾血管内凝血, 肾小球呈

现无血流形态, 红细胞和白细胞大量进入组织间隙. 见图 4c.

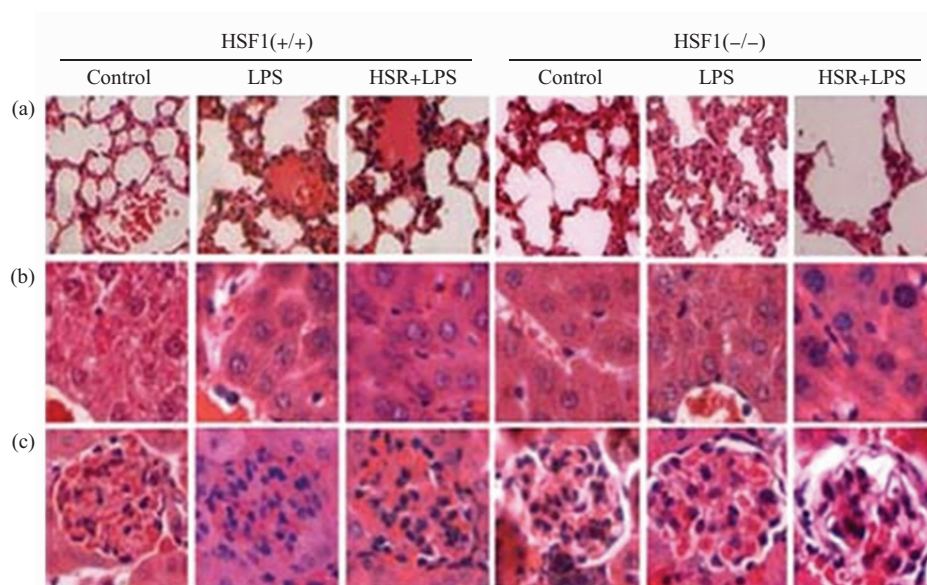


Fig. 4 Pathology morphology change of the HSF1 knock out mice after the HSR and ip LPS

(a) Lung (200 $\times$). (b) Liver (400 $\times$). (c) Kidney (400 $\times$).

3 讨 论

HSF1 广泛存在于真核生物细胞内, 在应激调节与基因转录中起重要作用. 在热休克基因的表达过程中, HSF1 与相应启动子结合, 启动基因的转录过程, 最终促进 HSP 的表达^[6]. 热休克反应的保护作用主要是通过调节热休克因子 1 的转录活性, 提高 HSP 的合成来实现. HSF1 通过与 HSBP 和 HSP70 形成复合物, 调节自身活性, 对 HSP 的合成进行调控. 在某些病理情况下, 当细胞受到炎症因子攻击时, 热休克细胞可耐受这种攻击.

HSR 能有效提高生物体自身的抗损伤能力. 本室早期研究亦证明, HSR 可以有效提高大鼠抵抗内毒素损伤和致死作用^[7]. 本研究利用 HSF1 基因剔除小鼠进一步证实, HSR 能提高 HSF1^{+/+}小鼠在注射 LPS 后的存活率, 但不能提高 HSF1^{-/-}小鼠的存活率, 揭示了当 HSF1 基因剔除后 HSR 不能发挥保护作用, 或 HSR 发挥保护作用必须依赖于 HSF1 基因^[8]. 从未经 HSR 的各组发现, 注射 LPS 15 mg/kg, HSF1^{+/+}小鼠不能抵抗 LPS 的致死作用, 说明 HSR 和 HSF1 在抵抗高剂量 LPS (15 mg/kg) 的损伤, 发挥内源性保护作用中二者相辅相成. 未经 HSR 的 HSF1^{+/+}小鼠在注射 LPS 14 mg/kg 后, 存活率一直保持较高, 可见, HSF1^{+/+}

小鼠可以不依赖于 HSR 的诱导, 也具有内源性抵抗较低剂量 LPS 的致死作用, 这种保护作用与 HSF1 介导的基础表达有关. 在注射 LPS 14 mg/kg 的 HSR+LPS(HSF1^{+/+})组和 LPS(HSF1^{+/+})组, 2 组间存活率差别没有显著性, 但可以看出 HSR+LPS (HSF1^{+/+})组存活率更高.

为了进一步证实 HSF1^{+/+}小鼠不经 HSR 诱导能有效抵抗较低剂量 LPS (14 mg/kg) 的损伤作用, 进一步观察了 HSF1^{+/+}和 HSF1^{-/-}小鼠在注射 LPS 14 mg/kg 后 12 h 组织髓过氧化物酶、脂质过氧化产物、炎症介质基因差异表达和病理形态学改变.

MPO 是嗜中性粒细胞的核心酶, 在注射 LPS 的野生型小鼠心、肺组织中 MPO 升高, 表明嗜中性粒细胞被激活并在局部组织集结扣留增加. 经热休克预处理后注射 LPS 的野生型小鼠心、肺组织中 MPO 的含量不增加, 表明热休克反应对野生型小鼠有保护作用. MDA 是脂质的过氧化产物, 在注射 LPS 的野生型和纯合子小鼠心、肺组织中 MDA 均升高, 表明脂质过氧化增加, 细胞膜受损明显. 经热休克预处理后注射 LPS 的野生型小鼠心、肺组织中 MDA 增加较少或不增加, 而经热休克预处理后注射 LPS 的纯合子小鼠心、肺组织 MDA 的增加不受影响. 表明, HSR 对野生型小鼠具有保护作用, 但 HSF1 基因剔除后抵抗 LPS 引起

的细胞膜脂质过氧化损伤的能力更弱, HSR 亦不能使 HSF1 基因剔除小鼠有效地发挥抗脂质过氧化作用. 野生型小鼠经热休克反应, HSF 启动基因转录, 促进 HSP 的表达. HSP70 可通过抵抗氧自由基对细胞膜脂质损伤和加速修复, 发挥细胞保护作用. HSP70 能减轻细胞膜蛋白的变性, 保护细胞蛋白质、rRNA 及 DNA 的合成途径以及细胞内 mRNA 加工途径免受损伤. 此外, 可加速损伤严重而不能修复的蛋白质的降解, 促进细胞膜上 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶活性的修复.

从肺、肝、肾的组织形态学观察亦证实, 经热休克反应的野生型小鼠形态学改变较轻. 未经热休克处理的纯合子小鼠与未经热休克处理的野生型小鼠相比, 前者的抗内毒素损伤能力更弱, 形态学改变更严重. 说明 HSF1 基因剔除后抵抗内毒素对组织形态学损伤的能力更弱, HSR 不但不能对其起保护作用反而加重了病理形态学的改变.

细胞因子是全身炎症反应综合征的重要介质^[9]. 循环中的内毒素与巨噬细胞膜上脂多糖蛋白和 CD14 受体结合导致炎症介质基因的激活和表达, 并在全身炎症反应的发生和发展中起重要作用^[10, 11]. 本研究发现, 热休克反应能明显调低内毒素引起的野生型小鼠白介素 6(interleukin 6, IL-6)和巨噬/单核细胞趋化因子 1(Macophage/monocyte chemotactic protein1, MCP1)CCL2 的表达. IL-6 被认为前炎症因子, 在损伤反应中有多元化作用, 能抑制内毒素诱导的 TNF- α 合成及 TNF- α 诱导的 IL-1 合成, 由于循环中 IL-6 的清除率远低于其他细胞因子, 因此其水平能反映疾病的严重程度及预后情况. CCL2 通过介导白细胞与上皮细胞的粘附过程, 启动穿越上皮的移植和组织入侵, 调节细胞的运输过程. CCL2 起趋化作用, 活化白细胞, 促进细胞脱颗粒, 释放组织胺, 产生生物活性物质, 引起呼吸爆发. 在内毒素所致的全身炎症反应中, 从 HSF1 基因剔除鼠的野生型小鼠炎症介质基因差异表达结果可以看出, IL-6 和 CCL2 这 2 种致炎性炎症介质基因的表达被调低, 可能是热休克反应起保护作用的主要方面.

抗炎性炎症介质基因(SOCS3、MCSF、GCSF 和 IL-15)的表达, 在热休克反应后注射 LPS 的纯合子小鼠和未行热休克反应注射 LPS 的纯合子小鼠没有差别. 热休克反应对注射 LPS 的野生型小鼠的抗炎性炎症介质基因的表达有显著抑制, 说明 HSR 能调低抗炎性炎症介质基因 SOCS3、MCSF、

GCSF 的表达, 这种抑制作用是通过 HSF1 起作用的. HSR 对野生型小鼠和纯合子小鼠都能调低 IL-15 的表达, 说明 HSR 引起 IL-15 表达降低与 HSF1 无关. 在热休克反应对内毒素所致的全身炎症反应的保护作用中, 抗炎性炎症介质基因的诱导表达不起决定性作用. 然而, MCSF 和 IL-15 的基础表达在对照(HSF1+/+)组显著高于对照(HSF1-/-)组, 即两者的基础表达在野生型小鼠较高、在纯合子小鼠较低, 可能是野生型小鼠在抵御来自自然界的诸多损伤因素, 在生长发育和繁殖能力方面优于纯合子鼠的重要原因, 是否与 HSP 的基础表达较高有直接关系尚待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Bone R C, Balk R A, Cerra F B, *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, 1992, **101**(6): 1644~1655
- 2 Havashida N, Inouye S, Fujimoto M, *et al.* A novel HSF1-mediated death pathway that is suppressed by heat shock proteins. *EMBO J*, 2006, **25**(20): 4773~4783
- 3 Dai C, Whitesell L, Rogers A B, *et al.* Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell*, 2007, **130**(6): 1005~1008
- 4 陈广文, 刘喜玲, 肖献忠. PCR 方法在 HSF1 基因敲除小鼠基因型分析中的作用. *中国实验动物学报*, 2002, **10**(2): 9~12
Chen G W, Liu X L, Xiao X Z. *Acta Laboratorum Animalis Scientia Sinica*, 2002, **10**(2): 9~12
- 5 梁国栋. 最新分子生物学实验技术. 北京: 科学出版社, 2001. 129~149
Liang G D. *The Newest Molecular Biology: Experimental Technology*. Beijing: Science Press, 2001. 129~149
- 6 Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L. Role of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response. *FASEBJ*, 2001, **15**(7): 1118~1131
- 7 陈广文, 詹群珊, 肖献忠等. 热休克反应对大鼠内毒素血症肺损伤的保护作用及机制. *湖南医科大学学报*, 1992, **17**: 28~31
Chen G W, Zhan Q S, Xiao X Z, *et al.* *Bulletin of Hunan Medical University*, 1992, **17**(Supple): 28~31
- 8 Christisns E S, Benjamin I J. Heat shock response: lessons from mouse knockouts. *Handb Exp Pharmacol*, 2006, (172): 139~152
- 9 Koch T. Origin and mediators involved in sepsis and the systemic inflammatory response syndrome. *KidneyInt*, 1998, **53**(Suppl 64): S~66
- 10 Wright S D, Ramos R A, Tobias P S, *et al.* CD14, a receptor for complex of lipopolysaccharide and LPS binding protein. *Science*, 1990, **249**(4975): 1431~1433
- 11 Bazil V, Strominger J L. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol*, 1991, **147**(5): 1567~1574

Role of HSF1 Knock-out in Protection of Heat Shock Response Against Endotoxemia*

CHEN Guang-Wen**, WANG Kang-Kai, LIU Ying, TANG Dao-Lin, XIAO Xian-Zhong

(Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract Using LPS mediated-endotoxemia BalB/C mice, the role of heat shock factor 1 (HSF1) in heat shock response (HSR) was observed. HSR was performed with 42°C for 15 min, and recovery for 24 h at room temperature. Endotoxemia model in mouse was achieved by intra-peritoneal injection of LPS at 14 or 15 mg/kg. Lung injury and expression of inflammatory mediators were evaluated with myeloperoxidase (MPO) and maleic dialdehyde (MDA) in heart and lung, RT-PCR, hemotoxylin-eosin (HE) staining and mortality. The data showed that the survival rate was higher in HSR+LPS (HSF1+/+) group (7/15) than that in LPS (HSF1+/+) group (0/15), LPS (HSF1-/-) group (0/14) or HSR+LPS (HSF1-/-) group (0/14) within 72 h after injection of LPS at 15 mg/kg. Similarly, the survival rate was also higher in LPS (HSF1+/+) group (5/15) than that in LPS (HSF1-/-) group (0/13) or HSR+LPS (HSF1-/-) group (0/13) within 72 h after injection of LPS at 14 mg/kg. HSR significantly suppressed production of MPO and MDA induced by LPS in lung and heart in HSF1+/+ mice, but had no such effects in HSF1-/- mice after 12 h treatment with 14 mg/kg LPS. The inflammatory mediators, including SOCS3, MCSF, GCSF, IL-1 β , IL-6, CCL-2 and IL-15 were up-regulated both in HSF1+/+ and HSF1-/- mice after 12 h treatment with LPS at 14 mg/kg, and HSR repressed LPS-induced up-regulation of SOCS3, MCSF, GCSF, IL-15, IL-6 and of CCL-2 in HSF1+/+ mice, but not in HSF1-/- mice. HE staining indicated that LPS at 14 mg/kg could mediate significant morphological changes, including necrosis, intravascular coagulation and leukocytes aggregation, and adherence in lung, liver and kidney in HSF1+/+ and HSF1-/- mice. The morphological changes in these organs were attenuated with HSR in HSF1+/+ mice, but exacerbated in HSF1-/- mice. Those results suggested that HSF1 knock out could significantly block the protection of HSR against LPS mediated-endotoxemia in BalB/C mice.

Key words heat shock response (HSR), gene knock out, heat shock factor 1 (HSF1), endotoxemia, inflammatory mediators

*This work was supported by a grant from National Basic Research Program of China (2007CB512007) and The National Natural Science Foundation of China (30330280).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-2355022, E-mail: chen8gd@yahoo.com.cn

Received: August 9, 2007 Accepted: September 30, 2007