

• 论著 •

脑脊液热休克蛋白 70 水平对小儿中枢神经系统感染的鉴别诊断价值

康睿 曹励之 唐道林 张国元 俞燕 肖献忠

【摘要】 目的 探讨脑脊液(CSF)中热休克蛋白 70(HSP70)的变化及其在小儿中枢神经系统感染中的诊断价值。**方法** 采用蛋白质免疫印迹技术检测 13 例化脓性脑膜炎(化脑组)、38 例病毒性脑膜炎(病脑组)、7 例结核性脑膜炎(结脑组)及 46 例非中枢神经系统感染患儿(对照组)CSF 中 HSP70 水平。常规生化检测 CSF 的细胞总数、白细胞数、乳酸脱氢酶(LDH)、蛋白定量、腺苷脱氨酶、葡萄糖、压力及氯(Cl^-)水平。**结果** 化脑组(76.61 ± 27.69)、病脑组(33.65 ± 16.93)及结脑组(65.85 ± 33.16)的 HSP70 水平均高于对照组(23.28 ± 19.77),差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);化脑组及结脑组 HSP70 水平均高于病脑组(P 均 < 0.01);化脑组与结脑组之间 HSP70 水平差异无显著性($P > 0.05$)。相关性分析显示:HSP70 水平增高程度与 CSF 的细胞总数($r = 0.298, P = 0.002$)、白细胞数($r = 0.274, P = 0.005$)、LDH($r = 0.322, P = 0.001$)、蛋白定量($r = 0.629, P < 0.001$)、腺苷脱氨酶水平($r = 0.363, P = 0.001$)均呈显著正相关,与 CSF 中葡萄糖水平呈显著负相关($r = -0.443, P < 0.001$),与 CSF 压力($r = 0.001, P = 0.993$)及 Cl^- 水平($r = 0.148, P = 0.133$)无相关性。**结论** 小儿中枢神经系统感染时,CSF 中 HSP70 增高;检测 CSF 中 HSP70 水平有助于化脑、结脑与病脑的鉴别诊断。

【关键词】 脑膜炎; 中枢神经系统感染; 脑脊液; 热休克蛋白 70

Significance of heat shock protein 70 in cerebrospinal fluid in differential diagnosis of central nervous system infection in children KANG Rui*, CAO Li-zhi, TANG Dao-lin, ZHANG Guo-yuan, YU Yan, XIAO

Xian-zhong. * Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China

Corresponding author: CAO Li-zhi (Email: caolizhi318@hotmail.com)

【Abstract】 Objective To investigate the diagnostic value of heat shock protein 70 (HSP70) in central nervous system infection (CNSI) in children. **Methods** The level of HSP70 in the cerebrospinal fluid (CSF) was determined in children with CNSI of different etiology. The concentration of HSP70 was determined in the CSF of 104 children, among them 13 patients had purulent meningitis (PM), 38 patients had acute viral meningitis (VM), 7 patients had tuberculous meningitis (TM), and 46 with no CNSI to serve as controls. The concentration of HSP70 was determined by Western blotting assay. The CSF specimens were also analyzed for the total cellular score (TCS), white blood cell count (WBC), lactate dehydrogenase (LDH), protein content (PC), adenosine deaminase (ADD), glucose, chloride content (Cl^-), and pressure. **Results** The CSF level of HSP70 was significantly higher in the PM, TM and VM groups (76.61 ± 27.69 , 65.85 ± 33.16 , 33.65 ± 16.93) compared with the control group (23.28 ± 19.77 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$). The HSP70 concentration was markedly higher in the CSF of patients with PM and TM than patients with VM (both $P < 0.01$). No significant difference was found between PM group and TM group in HSP70 level in CSF ($P > 0.05$). The concentration of HSP70 in the CSF was positively correlated to TCS ($r = 0.298$, $P = 0.002$), WBC ($r = 0.274$, $P = 0.005$), LDH ($r = 0.322$, $P = 0.001$), PC ($r = 0.629$, $P < 0.001$), ADD ($r = 0.363$, $P < 0.001$), and negatively correlated to the glucose ($r = -0.443$, $P < 0.001$) in CSF. The HSP70 concentration was not correlated to the Cl^- ($r = 0.148$, $P = 0.133$) and pressure ($r = 0.001$, $P = 0.993$) of CSF. **Conclusion** HSP70 is increased in the CSF of patients with CNSI. It may be one of the pathophysiological mechanisms of acute infection of the central nervous system. The level of HSP70 in CSF may be a valuable index in the differential diagnosis of CNSI, and it may be helpful in differentiating PM and TM from VM.

【Key words】 meningitis; centrar nervous system infections; cerebrospinal fluid; heat shock protein 70

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30330280);国家自然科学基金面上项目(30500485)

作者单位:410008 湖南长沙,中南大学湘雅医院儿科(康睿,曹励之,张国元,俞燕);410008 湖南长沙,中南大学湘雅医学院病理生理学教研室和休克研究室(唐道林,肖献忠)

通讯作者:曹励之,教授(Email:caolizhi318@hotmail.com)

作者简介:康睿(1976-),女(汉族),黑龙江省人,医学博士(Email:ruikangkang@gmail.com)。

近年已发现,细胞因子在中枢神经系统感染性疾病发生发展中起重要作用,其作为免疫递质可影响神经系统的各项功能。热休克蛋白(HSP)是机体内重要的应激蛋白,有研究显示,在烧伤(创伤)、感染及脑水肿时,当细胞内 HSP70 表达增高,具有抗感染、抗细胞凋亡及抗损伤的作用^[1-8];还有研究显示,HSP70 一旦释放到细胞外,即成为一种细胞因子,参与免疫调控和免疫反应^[9,10]。2005 年 6—12 月,对我院儿科收治的 58 例中枢神经系统感染患儿脑脊液(CSF)中 HSP70 水平进行检测,以期探讨其在中枢神经系统感染鉴别诊断中的价值。

1 对象与方法

1.1 对象:选择受试对象共 104 例。化脓性脑膜炎(化脑组)13 例中男 7 例,女 6 例,年龄(5.57±4.41)岁;根据 CSF 常规、生化、细菌学检查,以及临床表现、抗生素治疗有效而确诊。病毒性脑膜炎(病脑组)38 例中男 21 例,女 17 例;年龄(4.96±3.65)岁;根据流行病学史、临床表现、CSF 常规、生化改变,以及细菌学检查阴性综合判断。结核性脑膜炎(结脑组)7 例中男 3 例,女 4 例;年龄(3.50±2.17)岁;根据结核密切接触史、临床表现、典型结脑 CSF 改变、CSF 抗结核抗体阳性或 CSF 抗酸细菌培养阳性和抗结核治疗有效确诊。对照组 46 例中男 24 例,女 22 例;年龄(5.23±2.94)岁;要求不具有神经系统疾病及感染性疾病,但具有腰穿指征的同期住院患儿。各组患儿年龄差异无显著性。

1.2 方法:入院 24 h 内进行 CSF 常规、生化及细菌学检查。另取 CSF 1.0~1.2 ml,4℃、5 000 r/min (离心半径 20 cm)离心 10 min,取上清液置-80℃冰箱保存待测。CSF 中 HSP70 的测定采用蛋白质免疫印迹技术。取 15 μl 的 2×十二烷基硫酸钠(SDS)

加样缓冲液〔含 100 mmol/L Tris-HCl(pH 6.8),质量分数为 4%的 SDS,体积分数为 20%的甘油,200 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT),质量分数为 0.1%的溴酚蓝〕与 30 μl CSF 混匀,沸水煮 5 min,然后经质量分数为 10%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离、转膜和质量分数为 2%的白蛋白 4℃封闭过夜,依次加入鼠抗 HSP70 单克隆抗体(美国 Stressgen 公司,1:1 000)、辣根过氧化物酶(HRP)耦联的兔抗鼠二抗(武汉博士德公司,1:1 000),室温下孵育 2 h,用 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色(武汉博士德公司),拍摄照片,扫描后通过 Band Leader 软件进行蛋白条带灰度定量分析(用灰度值表示,该值越高,含量越高)。

1.3 统计学处理:用 SPSS11.5 软件进行资料处理;所有数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,根据资料性质分别采用单因素方差分析(两组之间用 LSD 法两两比较)及直线相关分析(Pearson 法); $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 CSF 常规、生化及细菌学检查结果(表 1):各组 CSF 细胞总数、白细胞数、葡萄糖、乳酸脱氢酶(LDH)、蛋白定量、腺苷脱氨酶、压力、HSP70 比较差异均有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$),结脑组氯(Cl^-)仅与化脑组比较差异有显著性($P<0.05$)。

2.2 各组 CSF 中 HSP70 检测结果(表 1):化脑组、病脑组及结脑组 HSP70 水平均高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);化脑组及结脑组 HSP70 水平均高于病脑组(P 均 <0.01);化脑组与结脑组之间 HSP70 水平差异无显著性($P>0.05$)。

2.3 CSF 中 HSP70 水平与 CSF 其他参数间的关系(表 2):HSP70 水平增高程度与 CSF 中细胞总

表 1 各组 CSF 常规、生化、细菌学及 HSP70 检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of result of diagnosis parameters and HSP70 levels in CSF in different groups($\bar{x}\pm s$)

组别	例数(例)	细胞总数($\times 10^6/L$)	白细胞数($\times 10^6/L$)	葡萄糖(mmol/L)	LDH(U/L)	蛋白定量(mg/L)
对照组	46	85.30±202.84	3.52±3.37	3.79±0.65	21.54±8.82	130±50
病例组	58	489.89±1 379.48	263.74±570.79	2.75±1.44	63.98±162.04	653±773
化脑组	13	1 736.76±2 586.18★▲	860.84±973.78★▲	0.81±0.63★▲	188.36±319.69★▲	1 650±990★▲
病脑组	38	123.02±224.02◆	47.10±99.84◆	3.68±0.67◆	25.55±10.70◆	260±150★◆
结脑组	7	165.85±220.72◆	330.85±249.39◇	1.32±0.52★◇△	41.60±29.72◆	900±560★◆

组别	例数(例)	腺苷脱氨酶(U/L)	压力(kPa)	Cl^- (mmol/L)	HSP70(灰度值)
对照组	46	0.45±0.49	1.10±0.46	113.93±5.39	23.28±19.77
病例组	58	1.65±3.29	1.28±0.71	114.49±5.60	47.17±28.73
化脑组	13	3.92±6.39★▲	1.11±0.37	117.31±5.42	76.61±27.69★
病脑组	38	0.82±0.57◆	1.36±0.61★	113.96±5.69	33.65±16.93★◆
结脑组	7	1.94±1.95	1.79±1.06★◇	112.10±3.73◇	65.85±33.16★▲

注:与对照组比较;★ $P<0.05$,▲ $P<0.01$;与化脑组比较;◇ $P<0.05$,◆ $P<0.01$;与病脑组比较;△ $P<0.05$,▲ $P<0.01$

数、白细胞数、LDH、蛋白定量、腺苷脱氨酶水平呈正相关,与 CSF 中葡萄糖水平呈负相关,与 CSF 压力及 Cl⁻ 水平无相关性。

表 2 中枢神经系统感染 CSF 中 HSP70 与其他指标之间的相关性

Table 2 Correlation of HSP70 levels to other parameters in CSF of central nervous system infection

指标	HSP70		指标	HSP70	
	r 值	P 值		r 值	P 值
细胞总数	0.298	0.002	蛋白定量	0.629	<0.001
白细胞数	0.274	0.005	腺苷脱氨酶	0.363	<0.001
葡萄糖	-0.443	<0.001	压力	0.001	0.993
LDH	0.322	0.001	Cl ⁻	0.148	0.133

3 讨论

HSP70 是机体内一种重要的应激蛋白,具有重要的分子伴侣功能,既能帮助蛋白质折叠与移位,防止蛋白质聚集,又能帮助变性蛋白质解聚及复性,促进严重受损蛋白质降解等,因而在细胞内源性保护中具有重要作用。近来发现 HSP70 能够被释放到胞外,作为一个危险信号触发机体的先天免疫反应,在先天免疫中可以强烈地活化抗原呈递细胞,促进树突状细胞成熟及诱导细胞因子和趋化因子释放,也能起到免疫佐剂和细胞因子一样的作用^[9,10]。

有关细胞外 HSP70 临床检测研究,国外主要集中在病理生理状态下血清 HSP70 的改变。Pockley 等^[11]发现,正常人外周血中能检测出 HSP70 及其抗体。文献报道在一些疾病情况下,如动脉粥样硬化、高血压、肾脏疾病、心肌梗死、镰形细胞贫血、系统性红斑狼疮等,患者血清 HSP70 水平增高^[10,12]。本研究结果显示,对照组非中枢神经系统感染患儿 CSF 的 HSP70 降低,而中枢神经系统感染时 CSF 的 HSP70 增高,细菌性较病毒性升高显著,但是结核性和化脓性之间差异不明显。因此,在病原体检出困难、CSF 常规检查不典型时,CSF 的 HSP70 检测对结脑与病脑或化脑与病脑的鉴别诊断有参考价值。此外,我们以前的研究表明,CSF 的 C-反应蛋白(也是一种应激蛋白)是鉴别细菌性脑膜炎(菌脑)和非细菌性脑膜炎的一项灵敏诊断指标^[13]。因此我们推测包括 HSP70 和 C-反应蛋白在内的应激蛋白可能在区分菌脑和病脑中具有重要作用。

目前不清楚正常人 CSF 是否存在 HSP70。本研究结果显示,HSP70 与 CSF 中蛋白定量的相关系数最大。CSF 蛋白质含量增高为血脑屏障被破坏的标志,当脑部感染时,脑膜和脉络丛毛细血管通透性增加,蛋白质分子容易透过,血液中的 HSP70 随之进入 CSF。HSP70 与 CSF 中细胞总数和白细胞数相

关,表明 CSF 中免疫炎性细胞增多,可能进一步促进了 HSP70 的主动分泌。LDH 反映中枢神经系统的缺氧和坏死程度,随着坏死细胞增加,HSP70 的被动释放也增加。葡萄糖是脑组织的能量来源,在化脑和结脑时,由于炎性细胞产生多,血脑屏障被破坏,故对葡萄糖的消耗增多。腺苷脱氨酶参与嘌呤分解代谢,在结脑患者中增高。Cl⁻ 在结脑时可降至 102 mmol/L 以下,化脑时多为 102~116 mmol/L。压力增高常见于颅内各种炎症性病变,如化脑、结脑、病脑、乙型脑炎、脊髓灰质炎等。

综上,本研究证实 CSF 中 HSP70 在不同感染类型中呈现不同的特异性改变,表明 HSP70 可能参与了脑膜炎神经体液免疫调节,临床检测 CSF 中 HSP70 有助于小儿中枢神经系统感染的鉴别诊断。

参考文献:

- 袁志强,彭毅志,李晓鲁,等. 严重烧伤早期肠黏膜组织热休克蛋白 70 的表达规律[J]. 中国危重病急救医学,2005,17(5):264-267.
- 胡丹,曲彦,陈富强,等. 急性创伤患者早期中性粒细胞热休克蛋白 72 的表达意义[J]. 中国危重病急救医学,2005,17(5):299-301.
- 毛定安,虞佩兰,杨于嘉. 热休克蛋白 70 对感染性脑水肿大鼠白介素和肿瘤坏死因子的影响及意义[J]. 中国危重病急救医学,2003,15(10):593-595.
- 毛定安,杨于嘉,俞燕. 热休克蛋白 70 对感染性脑水肿核转录因子-κB 及其抑制蛋白的影响[J]. 中国危重病急救医学,2005,17(11):644-646.
- 王慷慨,蒋磊,刘可,等. 热休克蛋白 70 对氧化应激所致核仁素裂解的影响[J]. 中国动脉硬化杂志,2004,12(4):373-377.
- 刘梅冬,张华莉,肖卫民,等. 转染 HSP70 基因对过氧化氢所致 RAW264. 7 细胞损伤的影响[J]. 医学临床研究,2004,21(10):1089-1092.
- 蒋碧梅,肖卫民,石永忠,等. HSP70 抑制 H₂O₂ 所致 C2C12 肌原细胞 Smac 从线粒体的释放及细胞凋亡[J]. 中南大学学报(医学版),2005,30(1):32-37.
- Tang D, Shi Y, Jang L, et al. Heat shock response inhibits release of high mobility group box 1 protein induced by endotoxin in murine macrophages[J]. Shock, 2005, 23(5):434-440.
- Asea A, Kraeft S K, Kurt-Jones E A, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14 - dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine[J]. Nat Med, 2000, 6(4):435-442.
- Asea A. Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72[J]. Exerc Immunol Rev, 2005, 11: 34-45.
- Pockley A G, Shepherd J, Corton J M. Detection of heat shock protein 70 (HSP70) and anti - HSP70 antibodies in the serum of normal individuals[J]. Immunol Invest, 1998, 27(6):367-377.
- Minota S, Cameron B, Welch W J, et al. Autoantibodies to the constitutive 73 - kD member of the hsp70 family of heat shock proteins in systemic lupus erythematosus[J]. J Exp Med, 1988, 168(4):1475-1480.
- 谢岷,杨于嘉,贾延. 颅内感染患儿血和脑脊液 C-反应蛋白检测的临床意义[J]. 中国当代儿科杂志,2002,4(5):389-390.

(收稿日期:2006-10-16 修回日期:2007-05-10)

(本文编辑:李银平)