

热休克蛋白 72 和 Toll 样受体 4 在肝肾综合征大鼠肾组织中的表达及作用研究

晏春根 朱冬芳 王锋

【摘要】 目的 探讨肾组织热休克蛋白 72(HSP72)和 Toll 样受体 4(TLR4)的表达及其在肝肾综合征发生中的作用。方法 采用胆总管结扎(BDL)法诱导肝硬化致肝肾综合征大鼠模型(BDL 组),术后 1、2、4 和 6 周各选 6 只大鼠从股静脉取血及肝、肾组织标本。检测血浆丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TBil)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)。用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆 HSP72、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量。将肝、肾组织称重,并制备标本;用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质免疫印迹法(Western blotting)分别检测肾组织 HSP72 和 TLR4 的 mRNA 及蛋白表达。同时以假手术(Sham)组为对照。结果 与 Sham 组比较,BDL 组各时间点 ALT 和 TBil 均明显升高(P 均 <0.05),4 周和 6 周 BUN 和 Cr 也明显升高(P 均 <0.05);血浆 HSP72 含量均显著减少,尤以 4 周和 6 周时最为明显;而 TNF- α 含量各时间点却显著增多(P 均 <0.01)。BDL 组各时间点肾组织 HSP72 mRNA 及其蛋白表达均显著低于 Sham 组(P 均 <0.01),而 TLR4 mRNA 及其蛋白表达量却显著高于 Sham 组(P 均 <0.01)。结论 肾组织 HSP72 表达减少可能有助于 TLR4 炎性信号通路激活,并可能与肝硬化并发的肝肾综合征发生相关。

【关键词】 肝肾综合征; 热休克蛋白 72; Toll 样受体 4; 肝硬化

Study on the expressions and roles of renal heat shock protein 72 and Toll-like receptor 4 in hepatorenal syndrome in rat YAN Chun-gen*, ZHU Dong-fang, WANG Feng. * Department of Internal Medicine, Hospital Affiliated to Medical College, Shaoxing College of Arts and Science, Shaoxing 312000, Zhejiang, China

【Abstract】 **Objective** To explore the expressions and roles of renal heat shock protein 72(HSP72) and Toll-like receptor 4(TLR4) during development of hepatorenal syndrome in rat. **Methods** Following bile duct ligation (BDL), a biliary cirrhosis and hepatorenal syndrome rat model was reproduced. The blood, the renal and hepatic tissues of the rats were examined at 1, 2, 4 and 6 weeks (6 rats were used in each week) after BDL. Blood was withdrawn from the femoral vein and centrifuged. The plasma concentrations of alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBil), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cr) were measured, and those of the HSP72 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were assessed with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). After weighing liver and kidney and expressions of HSP72 and TLR4 in renal tissue were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. All data were compared with control group (C group). **Results** The plasma levels of ALT, TBil at each week and of BUN, Cr at 4 and 6 weeks were increased significantly (all $P < 0.05$). The concentration of plasma HSP72 and the expressions of renal HSP72 mRNA and protein were lower (especially at 4 and 6 weeks, both $P < 0.01$) in BDL rats compared with sham operation rats. But the plasma TNF- α levels and renal TLR4 (mRNA and protein) expressions were significantly higher than those of sham operation rats (all $P < 0.01$). **Conclusion** Decreased expression of renal HSP72 may contribute to activate the TLR4-initiating inflammatory signal pathway, attributing partly to the pathogenesis of hepatorenal syndrome in biliary cirrhosis.

【Key words】 hepatorenal syndrome; heat shock protein 72; Toll-like receptor 4; cirrhosis

肝硬化失代偿期易并发肝肾综合征,后者加重了肝组织损伤,其发生机制非常复杂。近来有研究表明,炎性损伤是肝肾综合征发生的主要机制之一,热

休克蛋白(HSPs)参与了其发生过程^[1]。随着分子免疫学的发展,现在认为,HSPs 不仅是分子伴侣,而且可作为内源性“危险分子”被 Toll 样受体(TLRs)识别,从而参与炎性应答^[2]。本研究从 TLR4 的表达变化来探讨 HSP72 在肝肾综合征中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂:SD 大鼠购于浙江大学医学实验动物中心,雌雄不限,体重 220 g~250 g,给予标准饮食,在(22±2)℃、12 h 白天/黑夜循环、湿度

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y204425, Y206456);浙江省绍兴市科技计划项目(2007A3303)

作者单位:312000 浙江绍兴,文理学院医学院附属医院(晏春根,朱冬芳);200233 上海交通大学附属第六人民医院(王锋)

作者简介:晏春根(1970-),男(汉族),江西省人,医学硕士,副教授,副主任医师(Email:ycg28@163.com)。

(55±5)%的动物房中饲养。TRIzol 购于美国 Invitrogen 公司;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购于美国 Promega 公司;TritonX-100 蛋白裂解液购于美国 Sigma 公司;山羊抗大鼠 HSP72、TLR4、三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体及过氧化物酶标记的兔抗山羊免疫球蛋白 G(IgG)抗体购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;大鼠 HSP72 试剂盒购于加拿大 Stress Gen Biotechnologies 公司(检测最低剂量为 0.8 μg/L);大鼠肿瘤坏死因子-α(TNF-α)试剂盒购于深圳晶美公司(进口分装);其余试剂均购于上海生工公司。

1.2 β-actin、HSP72、TLR4 的 mRNA 引物: TLR4 引物(600 bp, NM_019178):上游 5'-CCA AGA ACC TAG ATC TGA GC-3',下游 5'-GGA CAT GTA AAC CAG TCA TG-3';HSP72 引物(617 bp, NM_031971):上游 5'-GCA GTC GGA CAT GAA GCA CT-3',下游 5'-CGA ACA GAG AGT CGA TCT CC-3';β-actin 引物(270 bp, NM_031144):上游 5'-GTA GCC ATC CAG GCT GTG TT-3',下游 5'-GAA GTC TAG GGC AAC ATA GC-3'。引物均由上海生工公司合成。

1.3 大鼠肝肾综合征模型制备:大鼠实验饲养 1 周后,按随机数字表法分两组。用胆总管结扎(BDL)法诱导肝硬化致肝肾综合征模型(BDL 组)^[1];戊巴比妥腹腔注射麻醉大鼠,开腹暴露胆总管,用丝线在胆总管远端和近端结扎,于两个结扎点中间剪断胆总管,关腹。假手术(Sham)组仅开腹,暴露胆总管但不剪断,再关腹。两组分别于术后 1、2、4 和 6 周各取 6 只大鼠称重,股静脉采血;然后用戊巴比妥腹腔注射麻醉后处死取肝、双肾并称量。200 mg 肾组织置于-70℃液氮中保存备用;肝、肾组织各 500 mg 以体积分数为 10%甲醛固定,石蜡包埋、切片;苏木素-伊红(HE)染色。由两位病理医师双盲评价肝、肾组织病理。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 血浆丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TBil)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)含量检测:用 TMS-1024 全自动生化仪检测。

1.4.2 血浆 HSP72、TNF-α 含量检测:用酶联免疫吸附法(ELISA)检测,操作按试剂盒说明书要求进行,于波长 450 nm 处检测样本吸光度(A)值,分别用 HSP72、TNF-α 标准液绘制曲线,并计算各样本含量。

1.4.3 总 RNA 抽提以及逆转录-聚合酶链反应

(RT-PCR)检测:将肾组织进行匀浆,TRIzol 抽提 RNA,禽类成髓纤维病毒逆转录酶(AMV 酶)42℃ 逆转录,25 μl PCR 反应体系,β-actin 为内参照。扩增参数:94℃ 5 min;94℃ 40 s,56℃(HSP72)/52℃(TLR4) 40 s,72℃ 90 s,35 个循环;72℃ 5 min。用 DL2000 Mark 确定 PCR 产物大小,电泳。置凝胶电泳处理系统中(YLN2000)成像,应用 Tanon Gis2.0 软件半定量分析 HSP72/β-actin、TLR4/β-actin 灰度比值。

1.4.4 蛋白质抽提及蛋白质免疫印迹法(Western blotting)分析:肾组织中加入质量分数为 1%的 TritonX-100 蛋白裂解液,匀浆、离心、弃沉淀,上清液用冰磷酸盐缓冲液漂洗 3 次,离心弃上清液,加 50 μl 95℃的 2×Laemmli 十二烷基硫酸钠(SDS)缓冲液,将样本放入沸水振荡水浴中 5 min,质量分数为 10%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质。将蛋白转到尼龙膜上,放入含质量分数为 5%脱脂牛奶的 Tris-HCl 缓冲液中 37℃ 孵育 1 h。更换 5%脱脂牛奶的 Tris 缓冲液(TBS),加入山羊抗大鼠 HSP72(1:2 000)/TLR4(1:2 000)、GAPDH(1:3 000)单克隆抗体,37℃ 孵育 2 h,1%脱脂牛奶 TBS 洗膜 15 min×4,分别加入过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG(1:2 000)室温振荡孵育 1 h,压片、定影、显影、洗片。Tanon Gis2.0 软件半定量分析 HSP72/GAPDH、TLR4/GAPDH 灰度比值。

1.5 统计学处理:计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用 SPSS10.0 软件进行方差分析、Mann-Whitney U 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝肾综合征模型的评价(表 1):BDL 组各时间点大鼠的肝脏和肾脏重量均较 Sham 组显著增加(P 均 <0.05)。组织病理学观察结果表明,BDL 组在术后 4 周和 6 周出现典型的肝硬化表现,Sham 组无假小叶形成;两组大鼠术后各时间点肾组织无明显病理变化。BDL 组术后各时间点 ALT、TBil 含量均较 Sham 组显著升高(P 均 <0.05);而术后 1 周和 2 周 BDL 组 BUN、Cr 含量与 Sham 组比较差异无统计学意义(P 均 >0.05),但在 4 周和 6 周却显著升高(P 均 <0.05)。

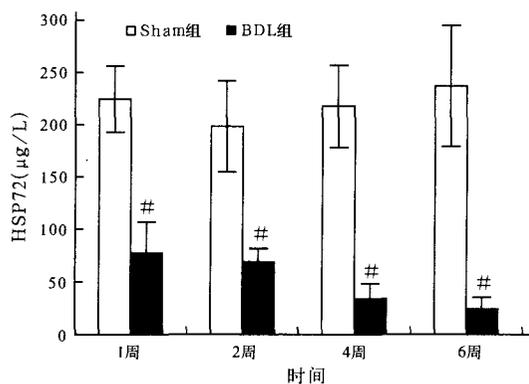
2.2 血浆 HSP72、TNF-α 含量(图 1,图 2):BDL 组各时间点血浆 HSP72 含量均较 Sham 组显著下降,尤以 4 周和 6 周时下降更为显著(P 均 <0.01);而 BDL 组各时间点血浆 TNF-α 含量均显著高于 Sham 组(P 均 <0.01)。

表 1 两组大鼠术后组织及生化结果($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Weight of renal and hepatic tissues and results of biochemical marks in bile duct - ligated and control rats($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 时间 | 动物数(只) | 肝脏/体重(%) | 肾脏/体重(%) | ALT(U/L) | TBil(μ mol/L) | BUN(mmol/L) | Cr(μ mol/L) |
|--------|-----|--------|------------------|------------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| Sham 组 | 1 周 | 6 | 3.71 \pm 0.12 | 0.60 \pm 0.02 | 60.87 \pm 2.95 | 17.09 \pm 1.32 | 6.34 \pm 1.08 | 92.49 \pm 35.86 |
| | 2 周 | 6 | 4.06 \pm 0.19 | 0.58 \pm 0.04 | 56.68 \pm 6.65 | 16.72 \pm 3.96 | 5.95 \pm 2.19 | 88.54 \pm 7.37 |
| | 4 周 | 6 | 3.72 \pm 0.63 | 0.57 \pm 0.03 | 54.47 \pm 3.14 | 17.36 \pm 4.72 | 5.62 \pm 1.97 | 90.65 \pm 9.21 |
| | 6 周 | 6 | 3.59 \pm 0.18 | 0.59 \pm 0.18 | 49.43 \pm 8.57 | 15.84 \pm 3.91 | 6.47 \pm 2.46 | 98.07 \pm 6.48 |
| BDL 组 | 1 周 | 6 | 6.14 \pm 0.27* | 0.78 \pm 0.11* | 118.43 \pm 15.09* | 127.53 \pm 32.76* | 6.29 \pm 3.42 | 87.63 \pm 5.39 |
| | 2 周 | 6 | 5.48 \pm 0.31* | 0.81 \pm 0.13* | 126.54 \pm 24.38* | 237.08 \pm 56.12* | 6.24 \pm 2.56 | 92.13 \pm 8.09 |
| | 4 周 | 6 | 6.07 \pm 0.53* | 0.83 \pm 0.13* | 113.00 \pm 17.08* | 284.07 \pm 45.83* | 11.38 \pm 2.36* | 195.86 \pm 12.09* |
| | 6 周 | 6 | 6.11 \pm 0.32* | 0.81 \pm 0.12* | 121.46 \pm 23.35* | 301.16 \pm 78.68* | 13.25 \pm 4.82* | 256.73 \pm 33.86* |

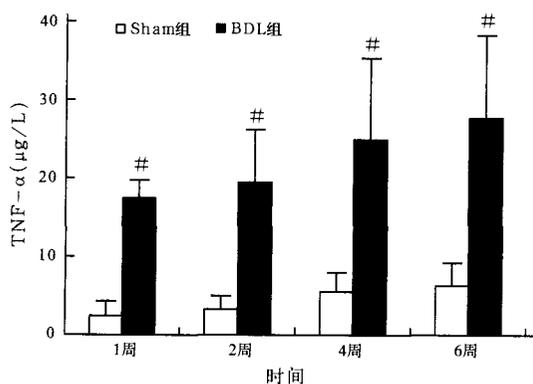
注:与 Sham 组同期比较 * $P < 0.05$



注:与 Sham 组同期比较: # $P < 0.01$

图 1 两组大鼠术后血浆 HSP72 含量

Figure 1 Plasma concentration of HSP72 in two groups



注:与 Sham 组同期比较: # $P < 0.01$

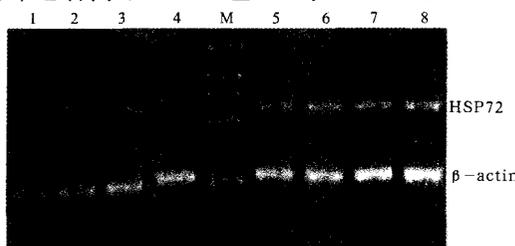
图 2 两组大鼠术后血浆 TNF-α 含量

Figure 2 Plasma concentration of TNF-α in two groups

2.3 肾组织 HSP72 和 TLR4 的 mRNA 表达(图 3, 图 4):Sham 组术后肾组织 HSP72 mRNA 表达稳定;BDL 组仅有轻度表达,术后 4 周和 6 周出现肝硬化及肝肾综合征后其表达均较 Sham 组显著减少 (P 均 < 0.01)。两组术后各时间点均有 TLR4 mRNA 表达,且 BDL 组的 TLR4 mRNA 表达显著高于 Sham 组 (P 均 < 0.01)。

2.4 肾组织 HSP72 和 TLR4 的蛋白表达(图 5, 图 6):肾组织 HSP72 和 TLR4 的蛋白表达变化类

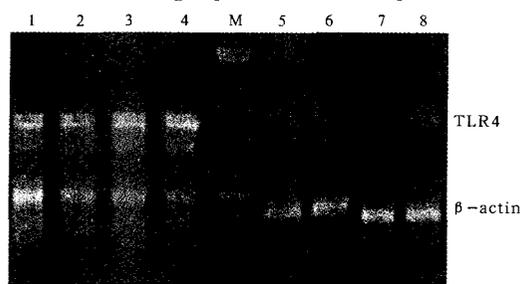
似其 mRNA 表达,表现为 BDL 组各时间点 HSP72 表达均显著低于 Sham 组 (P 均 < 0.01),而 TLR4 表达却显著高于 Sham 组 (P 均 < 0.01)。



1~4 依次为 BDL 组术后 6、4、2 和 1 周;M:Marker;
5~8 依次为 Sham 组术后 1、2、4 和 6 周

图 3 RT-PCR 法检测两组大鼠肾组织 HSP72 mRNA 表达
Figure 3 Renal HSP72 mRNA expression of rats detected by

RT-PCT in two groups at different time points



1~4 依次为 BDL 组术后 6、4、2 和 1 周;M:Marker;
5~8 依次为 Sham 组术后 1、2、4 和 6 周

图 4 RT-PCR 法检测两组大鼠肾组织 TLR4 mRNA 表达
Figure 4 Renal TLR4 mRNA expression of rats detected by
RT-PCT in two groups at different time points

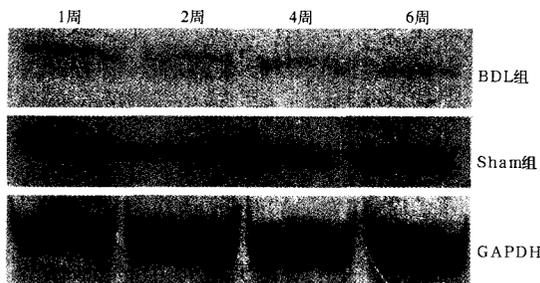


图 5 Western blotting 检测两组大鼠肾组织 HSP72 蛋白表达
Figure 5 Renal HSP72 protein expression of rats detected by
Western blotting in two groups at different time points

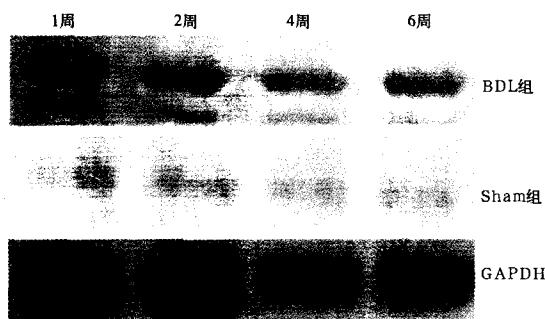


图 6 两组大鼠肾组织 TLR4 蛋白表达

Figure 6 Renal TLR4 protein expression of rats in two groups at different time point

3 讨论

HSPs 是高度保守蛋白,各种应激(如高温、毒物、重金属等)均可诱导其表达。由于正常细胞的 HSP72 大多表达很少甚至没有表达,而应激时却明显增加,因此,HSP72 是目前研究最深入的一种。已有研究表明,HSP72 在肝脏缺血/再灌注(I/R)时表达明显增加,提示 HSP72 可能是肝组织抗损伤机制的一个重要因素,并可能参与了肝组织细胞损伤机制的启动^[3]。HSP72 能够保护神经元、心、肾、肠、肝细胞免受热和(或)缺血诱导的细胞凋亡和细胞坏死,并将蛋白质分子移位至线粒体、内质网或叶绿体内发挥作用,使细胞蛋白质恢复原有的功能^[4-5]。

肾小管上皮细胞、间质平滑肌细胞、血管周神经细胞均表达 HSP72。作为分子伴侣,HSP72 对肾脏的保护作用已在肾 I/R 损伤、肾毒性损伤、阻塞性肾损伤等模型中得到证实^[1,6]。HSP72 也有抗细胞凋亡作用,如 HSP72 能阻止细胞色素 C 释放的凋亡小体形成,抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3)活性,同时还能降低 ATP 缺失后肾内细胞线粒体凋亡诱导因子的释放^[7]。

随着分子免疫学研究的深入,近来的研究表明,TLRs 不仅能识别外源性病原相关分子模式(如脂多糖),且能识别内源性“危险分子”(如 HSPs)^[8-9]。HSPs 除具有“分子伴侣”的作用外,尚与免疫应答相关,但其作用机制尚不明确。由于胞浆和胞核内 HSP72(属诱导型 HSP70)在多种器官损伤中的保护作用已被大家所认同,且已有不少报道认为 HSPs 可作为 TLRs 的内源性配体,基于此,我们设想 HSP72 可能通过调控 TLRs 启动的炎性信号分子表达而抑制炎性损伤。虽然 Endoh 等^[1]最近报道了胆管结扎诱导的肝硬化大鼠肾功能不全时肾组织 HSP72、HSP25 表达显著下降,但作者未进一步研究这些 HSPs 表达下降与功能性肾衰竭的确切关系

及可能机制。我们成功地建立了 BDL 诱导肝硬化致肝肾综合征大鼠模型(通过血生化和肝、肾组织病理证实)。实验中我们也证实,BDL 后各时间点大鼠血浆 HSP72 含量以及肾组织 HSP72 的 mRNA 和蛋白表达均显著下降,这一结果支持了 Endoh 等提出“HSP72 表达下降可能与肾功能不全相关”的假设。

本实验中也检测到,BDL 扎后各时间点大鼠血浆 TNF- α 含量以及肾组织 TLR4 的 mRNA 和蛋白表达均显著高于 Sham 组,说明肝肾综合征发生过程中,在肾组织 HSP72 表达下降的同时,伴随有 TLR4 的高表达和 TNF- α 的高分泌。这些结果提示:①HSP72 的表达下降可能促进了由 TLRs 启动的炎性信号通路;②与肾 I/R 损伤机制类似,炎性损伤也是肝肾综合征发病机制之一;③增强肾组织表达 HSP72 的量可能有助于预防或减弱肝肾综合征的发生。由于目前 HSPs 与 TLRs 启动炎性信号通路关系的研究尚处于起步阶段,不同 HSPs 可能由不同 TLRs 或其复合物识别,尚需更多的实验以明确 HSPs 调控 TLRs 炎性信号通路中各分子表达的确切机制。

参考文献:

- Endoh A, Otaka M, Goto T, et al. Decreased renal expressions of heat shock protein - 72 and - 25 are associated with renal dysfunction in biliary cirrhotic rats [J]. *Hepatol Res*, 2006, 34 (4): 273 - 281.
- 任光圆,晏春根,谢青. Toll 样受体:免疫治疗的新靶位[J]. *中国新药与临床杂志*, 2004, 23(10): 718 - 723.
- 山峰,李望,马承泰,等. 维拉帕米和生脉注射液抗大鼠肝脏缺血/再灌注损伤的作用研究[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14 (1): 35 - 38.
- 黄帆,徐康,吴兴刚,等. 抗热休克蛋白 72 多克隆抗体血清的制备和检测[J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(9): 531 - 534.
- Lancaster G I, Febbraio M A. Exosome - dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(24): 23349 - 23355.
- Pockley A G, Georgiades A, Thulin T, et al. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension [J]. *Hypertension*, 2003, 42(3): 235 - 238.
- 毛海萍,余学清,李志坚,等. 热休克蛋白 72 抑制 ATP 耗竭时细胞色素 C 释放所诱导的肾小管上皮细胞凋亡[J]. *中华肾脏病杂志*, 2003, 19(3): 137 - 141.
- 晏春根,谢青,周霞秋,等. Toll 样受体 4 在 D - Gal/内毒素介导的急性肝损伤中的表达[J]. *中华传染病杂志*, 2004, 22(3): 141 - 144.
- 张磊,吴河水,陈燕,等. 一氧化氮对急性出血坏死性胰腺炎肝脏中 Toll 样受体 2/4 mRNA 表达的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(3): 161 - 164.

(收稿日期:2007-03-06 修回日期:2007-11-09)

(本文编辑:李银平)