

· 实验研究 ·

热休克预处理对实验性自身免疫性 脑脊髓炎大鼠模型的保护作用

张金凤¹, 黄榕¹, 徐俊², 金世杰³, 杨于嘉¹

(1. 中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008; 2. 湖南省人民医院儿科,
湖南 长沙 410006; 3. 湖南省儿童医院, 湖南 长沙 410007)

[摘要] **目的** 观察热休克预处理对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)热休克蛋白70(HSP70)表达及神经细胞凋亡的影响,探讨其对EAE模型的保护作用。**方法** 将36只Wistar大鼠随机分为对照组(CON), EAE组和热休克预处理组(HSP)。EAE组,采用Wistar大鼠制作EAE模型;HSP组给予热休克预处理;CON组不行特殊处理。观察临床症状,进行神经功能评分。于免疫后14~17 d处死动物,取脊髓行苏木精-伊红染色,HSP70免疫组化及神经细胞的凋亡的检测。**结果** HSP能明显改善EAE临床症状,降低临床评分,延缓发病($P<0.05$),增加脊髓HSP70阳性细胞表达(21.08 ± 0.87 vs 10.17 ± 0.51 , $P<0.01$),抑制神经细胞凋亡($21.92\pm1.00\%$ vs $58.92\pm1.67\%$, $P<0.01$)。**结论** 热休克预处理对EAE大鼠具有一定的神经保护作用,其保护机制可能与增加HSP70表达而导致神经细胞凋亡减少有关。

[中国当代儿科杂志,2007,9(6):563-566]

[关键词] 实验性自身免疫性脑脊髓炎;热休克蛋白70;细胞凋亡;大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)06-0563-04

Protective effects of heat shock preconditioning on the experimental autoimmune encephalomyelitis rats

ZHANG Jin-Feng, HUANG Rong, XU Jun, JIN Shi-Jie, YANG Yu-Jia. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Huang R, Email: hdoctor@tom.com)

Abstract: Objective To study the effects of heat shock preconditioning on the expression of heat shock protein-70 (HSP70) and apoptosis of the neuron in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) rats. **Methods** Thirty-six Wistar rats were randomly divided into control, EAE and heat shock preconditioning groups ($n=12$ each). The EAE animal model was induced with guinea pig myelin basic protein. Heat shock preconditioning was performed 24 hrs prior to the EAE model inducement. No treatment was done in the control group. The neurological signs were observed after immunization. The spinal cords were removed and stained with hematoxylin and eosin. HSP70 was detected by immunohistochemistry. Apoptosis of the neuron was measured by TUNEL. **Results** Heat shock preconditioning significantly alleviated clinical signs and neuronal injury. HSP70 expression in the heat shock preconditioning group was significantly higher than in the untreated EAE group (21.08 ± 0.87 vs 10.17 ± 0.51 ; $P<0.01$). Heat shock preconditioning suppressed apoptosis of the neuron compared with the EAE group (apoptosis rate: $21.92\pm1.00\%$ vs $58.92\pm1.67\%$; $P<0.01$). **Conclusions** Heat shock preconditioning might improve the neurological outcome in EAE rats, possibly through the induction of HSP70 synthesis and the reduction of apoptosis of the neuron in spinal cords.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(6):563-566]

Key words: Experimental autoimmune encephalomyelitis; HSP70; Apoptosis; Rats

实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是一种实验诱导的变态反应性疾病,由CD4⁺T淋巴细胞介导,以中枢神经系统脱髓鞘、部分轴索损伤为特征。其人类中枢神经系统脱髓鞘疾病——多发性硬化(multiple sclerosis, MS)具有很多共同的特征,是研究

MS常用的动物模型。热休克预处理(heat shock preconditioning, HSP)是将动物短时间暴露于非致死温度下使机体产生热休克蛋白的一种预处理方法,它可起到减轻致死性损伤对动物造成的损害作用,并对心、脑等多个器官有保护作用^[1]。我们对感染性脑水肿保护作用的研究证实,热休克预处理

[收稿日期]2007-03-20;[修回日期]2007-05-08
[基金项目]湖南省自然科学基金资助项目(02jjy3015)。
[作者简介]张金凤,女,硕士,主治医师。主攻方向:小儿神经疾病。现在佛山市顺德区妇幼保健院,邮编:528000。
[通讯作者]黄榕,教授,硕士生导师,中南大学湘雅医院儿科,邮编410008。

的保护机制与热休克蛋白 70 (HSP70) 表达增加有关^[2]。HSP70 与 EAE 关系目前尚不清楚, 本研究拟通过建立大鼠 EAE 动物模型, 观察热休克预处理后 EAE 大鼠脊髓中 HSP70 蛋白水平的表达及与神经细胞凋亡的关系, 探讨热休克预处理对 EAE 大鼠模型保护作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 小鼠抗 HSP70 单克隆抗体购自 Santa Cruz, 免疫组化染色 SP 试剂盒及 DAB 显色剂购自北京中杉生物技术有限公司, 卡介苗、百日咳菌液购自北京生物制品研究所。TUNEL 原位凋亡试剂盒购自美国罗氏公司。

1.1.2 实验动物分组及处理 健康豚鼠 3 只, 体重 400 ~ 450 g, 雌雄不拘。根据文献^[3,4]提示选取健康的、6 ~ 8 周龄的雌性 Wistar 大鼠作为模型动物, 符合二级动物标准, 体重 180 ± 20 g, 由湖南农业大学实验动物中心提供。将 36 只 Wistar 大鼠随机分为空白对照组 (CON); 实验性自身免疫性脑脊髓炎组 (EAE 组); 热休克预处理组 (HSP 组)。每组 12 只, CON 组和 EAE 组不做预处理。HSP 组给予热休克预处理后再行 EAE 模型制作。常规饲养, 自由进食、饮水。

1.2 方法

1.2.1 热休克预处理 大鼠麻醉后, 置 45 °C 水浴箱中, 使其肛温升至 42 °C 后, 转至 42 °C 水浴箱中维持 15 min, 然后置室温恢复 24 h 后, 重新麻醉制作 EAE 模型。

1.2.2 EAE 动物模型制备 参照林嘉友等^[5]方法。取羊毛脂 10 g 与石蜡油 40 mL 加热混匀, 高压灭菌后 4 °C 保存, 使用时加入卡介苗 (终浓度为 10 mg/mL), 制备成完全福氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA)。取豚鼠脊髓制成 50% (重量/体积) 生理盐水匀浆, 与等量完全福氏佐剂混匀制成完全福氏佐剂 - 豚鼠全脊髓匀浆 (guinea pig spinal cord homogenate in complete Freund's adjuvant, CFA-GP-SCH), 然后 Wistar 大鼠每足垫皮内注射 CFA-GP-SCH 乳剂 0.1 mL, 每只共注射 0.4 mL。左足背皮下注射百日咳菌液 0.05 mL (5×10^9 个菌体)。

1.2.3 神经功能评分与取材 从免疫当日起采用双人双盲法记录 3 组动物体重变化、神经功能评分、发病时间。EAE 神经功能评分标准: 0 分, 无症状; 1 分, 动物尾部肌张力低; 2 分, 动物尾部麻痹 + 后肢肌张力低; 3 分, 尾麻痹 + 后肢肌张力重度低; 4 分, 尾麻痹 + 四肢麻痹; 5 分, 濒死状态。免疫后

14 ~ 17 d 处死动物, 以 0.1 M PBS 经左心室灌注至肝脏变白, 再以 4% 多聚甲醛灌注至尾部僵直, 留取脊髓, 经 4% 多聚甲醛固定 24 h, 然后常规石蜡包埋、切片, 片厚 5 μm, 行常规苏木精-伊红染色光镜观察 CNS 病理改变, 以及 HSP70 免疫组化, TUNEL 法检测神经细胞的凋亡。

1.2.4 HSP70 免疫组织化学染色 将上述组织的脊髓腰膨大石蜡切片脱蜡至水, 3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min, 置于柠檬酸盐缓冲液中微波修复, 血清封片, 室温孵育 15 min, 滴加小鼠抗大鼠 HSP70 抗体 (1:50) 于 37 °C 孵育 2 h, PBS 洗 2 次, 滴加生物素标记的山羊抗小鼠 IgG, 37 °C 孵育 15 min, PBS 洗 2 次, 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 37 °C 孵育 15 min, DAB 显色后, 进行苏木素复染、脱水、透明、封片。细胞浆/核呈深棕色的细胞为 HSP70 阳性细胞。每一个标本取 3 张切片, 以均数 ± 标准差表示 HSP70 阳性细胞数。

1.2.5 TUNEL 法检测神经细胞凋亡 石蜡切片常规脱蜡至水, 3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min, 蒸馏水洗, PBS 浸泡; 蛋白酶 K 孵育室温 30 min, PBS 洗 5 min × 2 次, 擦干; 滴加 TUNEL 反应混合溶液, 37 °C 孵育 60 min, PBS 洗 5 min × 3 次, 擦干; 滴加转化剂-POD, 37 °C 孵育 30 min, PBS 洗 5 min × 3 次。DAB 显色, 脱水, 透明, 中性树胶封片。阴性对照: 用标记溶液代替 TUNEL 反应混合液, 余步骤同前; 阳性对照: 经过固定和通透的样本用 DnaseI 使之产生 DNA 链缺口, 余步骤同前。凋亡细胞于 TUNEL 染色后细胞核呈棕色或棕褐色。光镜下观察切片 TUNEL 染色情况。并计数连续两张切片阳性细胞, 取其平均数。

1.2.6 统计学处理 用 SPSS 13.0 统计软件处理, 计量资料数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组数据均经正态检验和方差齐性检验, 正态分布资料多组间两两比较采用单因素方差分析, 计数资料采用 Fisher 确切概率法检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 临床表现

EAE 组大鼠在免疫后第 10 天开始发病, 第 15 天病情达高峰, 临床表现从体重下降、尾部无力、拖地, 发展到四肢无力, 麻痹, 大小便失禁, 甚至濒死状态。个别大鼠仅表现腹胀, 便秘, 肠梗阻。观察过程中各组大鼠无死亡。CON 组无发病。EAE 组发病率 91.7%, HSP 组大鼠发病率为 58.3%, 两组比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。起病时间 EAE 组为

9.42 ± 0.48 d, HSP 组为 14.58 ± 0.45 d, 两组比较 HSP 组起病明显延迟 ($P < 0.05$)。神经功能评分 HSP 组评分 1.83 ± 0.32, 较 EAE 组评分 2.88 ± 0.29 明显降低 ($P < 0.05$)。EAE 组体重增加值较 CON 组明显减低, HSP 组大鼠体重较 EAE 组明显增加 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠发病情况比较 (n=12)					
组别	发病数 (个)	发病率 (%)	体重增长值 (g)	免疫后起病 (d)	神经功能 评分(分)
CON	0	0	23.25 ± 2.06	—	—
EAE	11	91.67	7.92 ± 0.91 ^a	9.42 ± 0.48	2.88 ± 0.29
HSP	7	58.33 ^b	17.22 ± 1.28 ^b	14.58 ± 0.45 ^b	1.83 ± 0.32 ^b

a 与 CON 组比较 $P < 0.05$; b 与 EAE 组比较 $P < 0.05$

2.2 脊髓病理改变

从苏木精-伊红染色看, 对照组大鼠脊髓染色均匀, 神经细胞胞体清晰, 轮廓正常, 胞质内尼氏体分布均匀, 胞核及核仁清晰可见。EAE 组脊髓内可见大量炎性细胞浸润, 围绕血管周围形成“袖套样”改变, 神经元细胞肿胀, 核膜、核仁模糊, 神经元胞体

内尼氏体减少。HSP 组脊髓内炎性细胞较 EAE 组减少, 部分神经细胞肿胀, 核膜核仁稍模糊 (见图 1A ~ C)。

2.3 HSP70 免疫组化和神经细胞凋亡

正常组大鼠脊髓内 HSP70 阳性细胞偶见, EAE 组 HSP70 阳性表达的神经元较正常组增多, 热休克预处理后 HSP70 表达水平显著高于 EAE 组 ($P < 0.01$)。神经元凋亡在正常大鼠出现稀少, EAE 大鼠起病急性期神经元凋亡明显增加, 可见核染色质浓缩, 核缩小、核碎裂, 及凋亡小体。热休克预处理组神经元凋亡明显减少, ($P < 0.01$)。见图 1D ~ I 和表 2。

表 2 HSP70 表达水平和凋亡细胞百分率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HSP70 表达水平	凋亡细胞百分率 (%)
CON	12	1.67 ± 0.31	2.58 ± 0.47
EAE	12	10.17 ± 0.51 ^a	58.92 ± 1.67 ^a
HSP	12	21.08 ± 0.87 ^b	21.92 ± 1.00 ^b

a 与 CON 组比较 $P < 0.01$; b 与 EAE 比较 $P < 0.01$

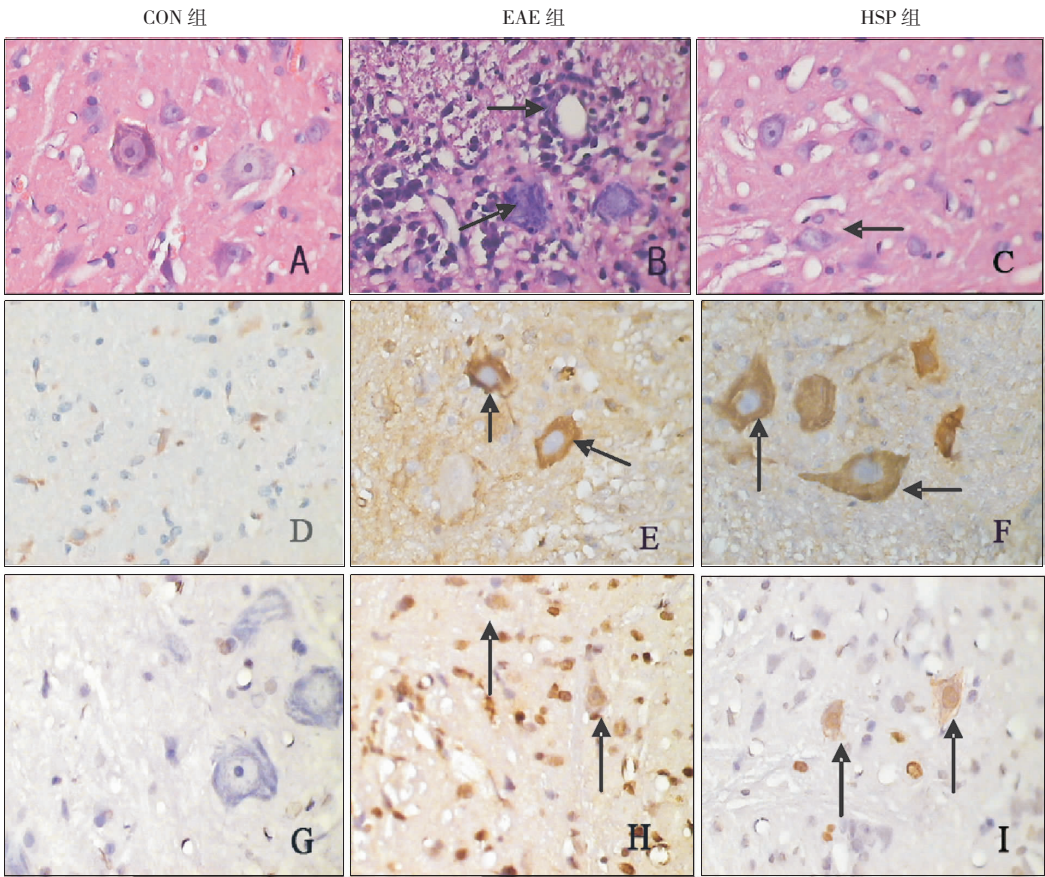


图 1 各组大鼠脊髓病理改变。A, D, G 为正常组; B, E, H 为 EAE 组; C, F, I 为 HSP 组。A ~ C 为苏木精-伊红染色, D ~ F 为 HSP70 免疫组化, DAB 显色; G ~ I 为 TUNEL 检测细胞凋亡, DAB 显色 (400 ×)。与正常组相比 EAE 组炎性细胞浸润增多, 可见血管套和神经元的破坏, 神经元 HSP70 表达增高、神经元凋亡也增多; 热休克预处理后炎性细胞减少, 神经元结构清晰, HSP70 表达更高, 神经元凋亡明显抑制。阳性细胞如箭头所示。

3 讨论

热休克预处理是机体内源性保护机制之一,亚致死量的刺激所诱导的热应激反应可使细胞对随后发生的致死性损伤产生耐受,减轻致死性损伤对机体细胞的破坏作用。HSP70 在正常细胞中含量较低,在应激状态下,当其他蛋白合成明显受到抑制时,其合成量反而显著增加。因此它成为热休克蛋白中最引人关注的一个家族。

HSP70 的增加是组织受到应激后产生的内源性保护蛋白,因而又称热应激蛋白。本实验发现,在 MBP 免疫刺激发病的 EAE 大鼠脊髓内 HSP70 表达较正常大鼠明显增高,且阳性细胞主要位于灰质内,部分阳性细胞在白质内。热应激后增加更明显,说明热应激能刺激 EAE 大鼠产生更多的 HSP70 蛋白。在 HSP70 增高的同时,大鼠神经功能评分降低,体重增加,发病延迟。提示 HSP70 的表达增加对 EAE 大鼠发病可能有抑制作用。李峰等^[6]的研究也显示,热应激可诱导少突胶质细胞和视网膜神经节细胞中 HSP70 的表达,从形态学上和病理上能明显减轻大鼠视神经受牵拉后对神经元和少突胶质细胞的损伤,并因此推测,热休克预处理通过提前、增高及延长 HSP70 的表达来发挥对视神经的保护作用。同时本实验发现预处理产生的保护作用需要两个重要条件,即预处理对机体的影响程度及其与创伤的间隔时间。预处理的目的是在不引起神经损伤的同时使基因表达出保护性蛋白,所以我们预处理的温度设置在肛温 42℃。另外,在预处理后 24 h 制作模型也是为了使机体有时间表达 HSP70。

EAE 中细胞的凋亡对疾病的进展和恢复起着重要作用。通过对 MS 患者 MRI 和尸检发现,神经元与轴索的损害与其慢性神经功能障碍密切相关。多发性硬化患者的脑脊液可以诱发体外培养的神经元的凋亡^[7]。在髓鞘少突胶质细胞糖蛋白诱导的视神经炎中发现有神经元的凋亡^[8]。Bo 等^[9]通过对 MS 患者大脑皮层的病理学研究发现病灶区域神经元的密度明显减低,灰质脱髓鞘和神经元的丢失与残疾和认知障碍相关。本研究发现在 EAE 大鼠脊髓内同样也存在着神经元的凋亡。神经元凋亡增加的同时,大鼠症状明显,神经功能评分也增高。说明神经元的凋亡与神经功能障碍相关。

细胞凋亡是由一些基因控制的,很多因素可激活这些基因而导致细胞凋亡。热休克蛋白作为分子伴侣参与细胞凋亡的过程。Lee 等^[10]在 HSP70 基因敲除小鼠的局灶性脑缺血模型中观察到,基因敲除小鼠与普通小鼠相比,脑梗死体积明显增大,神经

细胞凋亡数明显增加。而过表达大鼠 HSP70 的转基因小鼠在局灶性脑缺血再灌注损伤后,其脑梗死体积较普通小鼠明显减小,海马 CA1 和 CA3 区嗜酸性细胞亦明显减少,提示过表达 HSP70 可抑制神经细胞凋亡,减轻神经损伤^[11]。

通过我们的实验确实发现对照组的脊髓中 HSP70 阳性细胞偶见,HSP70 蛋白的表达在 EAE 组动物发病急性期增加,热休克预处理组增加更明显,而神经细胞凋亡百分比在 HSP 组 HSP70 表达增高的同期降低。推测热休克预处理可能通过增加 HSP70 的表达抑制实验性自身免疫性脑脊髓炎脊髓神经细胞的凋亡。虽然内源性的 HSP70 在 EAE 中有所增加,但其量和持续时间均不足以产生有效的保护作用。因此,我们设计通过热休克预处理来增加内源性 HSP70 的量和持续时间,从而起到抗神经细胞凋亡的作用。

[参 考 文 献]

[1] Xi L, Tekin D, Bhargava P, Kukreja RC. Whole body hyperthermia and preconditioning of the heart: basic concepts, complexity and potential mechanisms [J]. *Int J Hyperthermia*, 2001, 17 (5):439-455.

[2] 黄榕,罗芳,余小河,杨于嘉.姜黄素诱导 HSP70 及对大鼠感染性脑水肿保护作用的研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2003, 5 (2):109-112.

[3] Fillmore PD, Blankenhorn EP, Zachary JF, Teuscher C. Adult gonadal hormones lectively regulate sexually dimorphic quantitative traits observed in experimental allergic encephalomyelitis[J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(1):67-75.

[4] Maccio DR, Ditamo Y, Degano AL, Roth GA. Interaction between gonadal steroids and neuroimmune system in acute experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in Wistar rats[J]. *Autoimmunity*, 2004, 37(1):17-25.

[5] 林嘉友.实验性变态反应脑脊髓炎动物模型[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2003, 10(1):33-34.

[6] 李峰,孙晓川,唐文渊,吕长虹,夏海经,刘洪恩,等.热应激对大鼠轴索损伤的保护作用[J]. *中华创伤杂志*, 2005, 21(4):254-259.

[7] Cid C, Alvarez-Cermeno JC, Regidor I, Plaza J, Salinas M, Alcazar A. Caspase inhibitors protect against neuronal apoptosis induced by cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients[J]. *J Neuroimmunol*, 2003, 136(1):119-124.

[8] Sattler MB, Demmer I, Williams SK, Maier K, Merkler D, Gadjanski I. Effects of interferon-beta-1a on neuronal survival under autoimmune inflammatory conditions[J]. *Exp Neurol*, 2006, 201 (1):172-181.

[9] Bo L, Geurts JJ, Mork SJ, van der Valk P. Grey matter pathology in multiple sclerosis[J]. *Acta Neurol Scand Suppl*, 2006, 183:48-50.

[10] Lee SH, Kwon HM, Kim YJ, Lee KM, Kim M, Yoon BW. Effects of HSP70.1 gene knockout on the mitochondrial apoptotic pathway after focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2004, 35(9):2195-2199.

[11] Tsuchiya D, Hong S, Matsumori Y, Kayama T, Swanson RA, Dillman WH, et al. Overexpression of rat heat shock protein 70 reduces neuronal injury after transient focal ischemia, transient global ischemia, or kainic acid-induced seizures [J]. *Neurosurgery*, 2003, 53(5):1179-1188.

(本文编辑:吉耕中)