

• 基础研究 •

股骨头骨骺缺血再灌流关节软骨诱导型一氧化氮合成酶及热休克蛋白 70表达的免疫组化研究

张敬东, 陈华, 温宏, 毛方敏, 李彬
(温州医学院附二院骨科, 浙江 温州 325027)

【摘要】 目的: 探讨发育期髋关节股骨头骨骺关节软骨缺血再灌流后的诱导型一氧化氮合成酶 (NOS) 及热休克蛋白 70(HSP70) 的表达。方法: 制作 4 周龄 SD 大鼠缺血再灌流及对照模型, 每组各 40 只, 于术后 3、6、12、24、48 h、5 d、2、4 周不同时间点对股骨头骨骺关节软骨 NOS 及 HSP70 进行免疫组织化学检测。结果: 缺血再灌流组 24、48 h、5 d、2 周时点的关节软骨浅层、中层 NOS 表达增强 ($P < 0.05$), 缺血再灌流组 24、48 h、5 d 有关节软骨浅层、中层 HSP70 的增强表达 ($P < 0.05$)。结论: 发育期髋关节缺血再灌流损害后存在关节软骨的 NOS 损害机制及 HSP70 内源性细胞保护机制。

【关键词】 一氧化氮合成酶; 热休克蛋白; 缺血再灌流; 关节软骨

Expression of NOS and HSP70 on articular cartilage of femur head epiphyses after ischemia reperfusion ZHANG Jing-dong, CHEN Hua, WEN Hong, MAO Fang-min, LI Bin. Department of Orthopaedic, the Second Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective To explore the expression of NOS and HSP70 in articular cartilage of femur head epiphyses after dealt with ischemia reperfusion. **Methods** Four weeks Sprague Dawley rats were classified randomly two groups: experiment group and control group 40 animals in each group. Articular cartilage of femur head epiphyses was collected in 3, 6, 12, 24, 48 hours, 5 days, 2 and 4 weeks after the operation. Expression of NOS and HSP70 were analyzed by immunohistochemical technique. **Results** The expression of NOS were significantly increased from 24 hours to 2 weeks after dealt with ischemia reperfusion in experiment group ($P < 0.05$), the expression of HSP70 were significantly increased from 24 hours to 5 days in experiment group ($P < 0.05$). **Conclusion** Both NOS injury and HSP70 protection exist in articular cartilage in development stage after ischemia reperfusion.

Key words Nitric oxide synthetase, NOS; Heat shock protein HSP70; Ischemia reperfusion; Articular cartilage

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(8): 537-539 www.zggssz.com

诱导型一氧化氮合成酶 (NOS) 一旦激活, 可持续表达, 使一氧化氮水平增高, 协同多种细胞因子增加软骨损害^[1]。热休克蛋白 70(HSP70) 是一类高度保守性的、具有分子伴侣作用的蛋白^[2], 具有内源性细胞保护作用。本实验用免疫组化方法研究缺血再灌流后股骨头骨骺关节软骨细胞 NOS、HSP70 的表达及其规律。

1 材料和方法

1.1 动物分组 4 周龄雄性 SD 大鼠, 体质量 (75 ± 10) g 按抽签法随机分为缺血再灌流组和对照组, 每组 40 只。缺血再灌流组以 5% 水合氯醛 6 ml/kg 腹腔内注射麻醉, 取下腹部正中切口入腹, 推移肠管、睾丸, 切开下腹膜, 暴露双侧髂总动脉分叉处腹主动脉, 以无损伤血管夹夹闭分叉处或稍上方腹主动脉, 3 h 后拆除血管夹, 关闭切口。对照组开腹暴露腹主

动脉 5 min 常规关腹。

1.2 标本采集 缺血再灌流及对照组分别于术后 3、6、12、24、48 h、5 d、2、4 周随机活体取左侧股骨头骨骺 5 个, 于股骨头凹外侧缘顺股骨头骨骺纵轴切开, 以 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋。

1.3 免疫组化检测 实验步骤: NOS、HSP70 均用 LSAB 法检测, 步骤相同如下: ①作 4 μm 厚石蜡切片 (顺股骨头骨骺纵轴切片以确保关节软骨全厚层切片), 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化。② 3% H₂O₂ 室温处理 15 min 消除内源性过氧化物酶活性。蒸馏水洗, PBS 冲洗 5 min × 2。③ 1% 胰蛋白酶消化 10 min 修复抗原。④ 3% 正常血清处理, 37 °C, 20 min, 用滤纸吸去血清, 不洗。⑤ 滴加第 1 抗体 (工作浓度 1: 100), 37 °C 孵育 60 min。⑥ 0.01 M PBS (pH 7.2 下同) 冲洗 5 min × 2。⑦ 滴加生物素标记第 2 抗体 (工作浓度 1: 150), 37 °C 孵育 30 min。⑧ PBS 冲洗 5 min × 2。⑨ 滴加 Streptavidin (辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素), 37 °C 孵育 30 min。⑩ PBS 冲

洗 5 min × 2。⑪DAB显色。⑫苏木素轻度复染,室温 5 m in, 盐酸乙醇分色,自来水反蓝 20 m in。⑬梯度乙醇脱水。⑭二甲苯透明,中性树脂封片。NOS抗体购自武汉博士德生物技术有限公司; HSP70抗体购自北京中山生物技术有限公司。切片观察胞浆呈棕黄色为阳性反应。

1.4 光镜观察与图像分析 切片进行头骺关节软骨各层的着色情况观察,肉眼判断着色强弱情况。对缺血再灌注组及对照组,随机抽取各时点 3例切片,每例切片随机选择 2个高倍视野,在美国产 Nikon & Spot图像处理系统仪上对着色强度进行灰度分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 10.0软件,图像分析的表达灰度采用组间方差分析及配对 *t* 检验, *P* < 0.05,差异有显著性意义。

2 结果

2.1 光镜观察 在缺血再灌注后 3 h 未见明显的 NOS 表达,缺血再灌注后 6 h 有 NOS 的表达,着色强度较弱,12 h 的 NOS 着色也较弱,24 48 h 5 d 2周时点的 NOS 表达着色增强(见图 1),4周时点着色强度有所减弱。在对照组未见明显的 NOS 的着色信号。缺血再灌注组各时点均有 HSP70 的表达着色,而在 24 48 h 5 d 时点的着色强度偏强(见图 2)。在对照组头骺关节软骨各层有一定程度的 HSP70 表达着色,各时点着色强度较为一致。

2.2 图像分析 缺血再灌注组股骨头骺关节软骨浅层、中层的 NOS 表达灰度规律见表 1。表 1 中的数字显示 NOS 的着色强度,数值越大,着色越强。在缺血再灌注组的浅层及中层 24 48 h 5 d 2周有 NOS 的表达高峰,经组间方差分析统计处理,差异有显著性统计学意义 (*P* < 0.05)。

缺血再灌注组及对照组各时点股骨头骺关节软骨浅层、中层的 HSP70 表达灰度见表 2。表 2 中 HSP70 强度数值越大,着色越强。缺血再灌注组和对照组各时点关节软骨浅层及中层 HSP70 表达灰度经配对 *t* 检验的比较,在 24 h 至 5 d 时点 *P* < 0.05,差异具有显著性意义。

3 讨论

一氧化氮合成酶一般有两型,即正常情况下就存在于细胞内的固有型 (constitutive nitric oxide synthase, cNOS) 和往往在刺

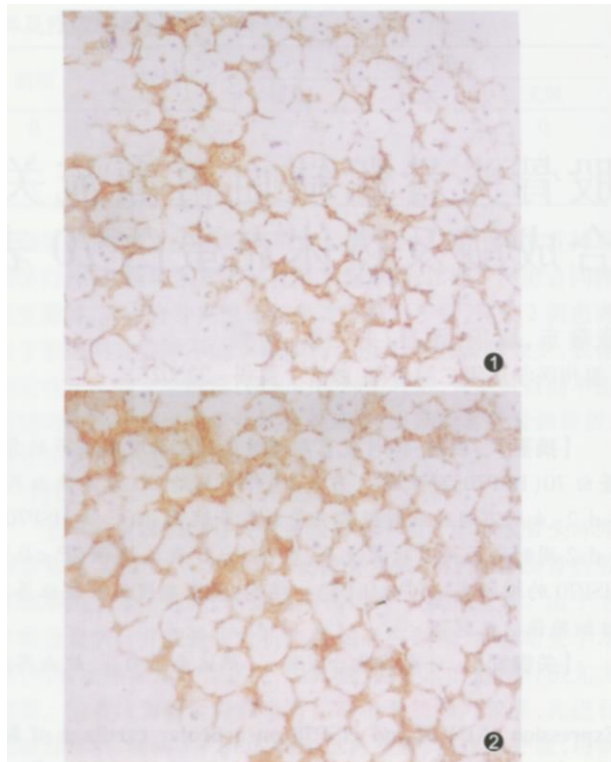


图 1 缺血再灌注组 5 d 时点关节软骨中层 NOS 免疫组化染色,中层软骨细胞阳性着色信号强 DAB × 400 图 2 缺血再灌注组 24 h 时点 HSP70 免疫组化染色,中层软骨细胞阳性着色,着色强度强 DAB × 400

Fig 1 The NOS expression study on articular cartilage of femur head epiphyses after ischemia reperfusion in 5 d strong yellow in medial layer cartilage cyto DAB × 400 Fig 2 The HSP70 expression study on articular cartilage of femur head epiphyses after ischemia reperfusion in 24 h strong yellow in medial layer cartilage cyto DAB × 400

激因素诱导下形成的诱导型 (inducible nitric oxide synthase, iNOS),一氧化氮合成酶催化左旋精氨酸则生成一氧化氮, iNOS 的生理活性不需要钙离子及调钙蛋白的参与,其催化作用持续时间长,产生的一氧化氮量大(每个单位时间内能释放比 cNOS 所释放的一氧化氮多上千倍)。

表 1 缺血再灌注组各时点股骨头骺关节软骨浅层、中层的 NOS 表达灰度

Tab 1 The expression of NOS in articular cartilage of femur head epiphyses

部位	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	5 d	2周	4周
浅层	0.00	80.55	82.45	147.59	140.99	150.67	146.78	90.88
中层	0.00	86.56	92.22	148.62	147.51	152.74	146.55	101.13

表 2 两组各时点股骨头骺关节软骨浅层、中层 HSP70 的表达灰度

Tab 2 The expression of HSP70 in articular cartilage of femur head epiphyses

组别	3 h		6 h		12 h		24 h		48 h		5 d		2周		4周	
	浅层	中层	浅层	中层	浅层	中层	浅层	中层	浅层	中层	浅层	中层	浅层	中层	浅层	中层
缺血再灌注组	106.52	102.59	120.78	114.22	109.60	110.96	156.70	150.89	150.58	158.14	148.45	156.65	116.30	104.46	111.92	102.52
对照组	108.41	101.98	104.12	114.42	121.40	120.31	117.79	102.51	120.47	118.02	102.26	103.91	110.53	105.55	104.68	104.25

在缺血再灌注损伤后,生理情况下无 NOS表达的脊髓前角运动神经元 NOS表达所催化产生的一氧化氮对某些组织器官具有一定损害作用^[3-4],在缺血再灌注损伤中局部一氧化氮产生增多也可能是损伤机制之一。在对一些组织器官的缺血再灌注损伤的研究中,采用预处理的方式通过抑制 NOS的表达均可有利于改善缺血再灌注损伤^[5-7],研究认为,由 NOS催化产生的过量一氧化氮对组织器官具有一定的损伤作用。

在骨组织,一氧化氮能抑制骨吸收和调节成骨样细胞的活动^[8],提示它可能在骨发育、形成及退化过程中发挥一定作用。在软骨组织中,由于各种病理刺激, NOS激活后持续表达,可对关节软骨组织产生一定程度的损害作用^[1]。已有研究报道^[9-10],使用 NOS抑制剂具有保护软骨的作用。

本研究发现,对照组股骨头骨骺关节软骨并无明显的 iNOS表达,而在缺血再灌注后 6 h 即有 iNOS 的表达, 24 h~2 周时点均有明显的 NOS 表达, 4 周时点仍有一定程度的 iNOS 表达,说明在大鼠股骨头骨骺缺血再灌注关节软骨的损伤过程中, NOS 存在较长的持续表达,由 NOS 所催化产生的一氧化氮具有一定损伤机制,因此使用 NOS 抑制剂可能具有保护发育期软骨组织的作用。

热休克蛋白是在一些应激条件下,如热休克、感染、缺血等情况下有高效表达的一族蛋白。HSP70 是研究最广泛的热休克蛋白之一,具有“分子伴侣”(molecular chaperone 指参与介导从初生链到多亚基复合体装配的整个蛋白质生物合成过程的一类蛋白)的重要生理作用,所谓“分子伴侣”的作用有二:一方面阻断非生产性的蛋白之间的相互作用,另一方面则把正在生产的蛋白与其他蛋白隔开,使生产蛋白处于有利于折叠和装配的状态^[2]。在应激条件下,细胞内蛋白会发生部分或全部变性,此时热休克蛋白可识别变性蛋白表面的疏水性区域,协助变性蛋白进行重新折叠,或者将无法修复的蛋白转移至蛋白质降解系统,使之降解,从而避免细胞进一步受到损害,因此具有内源性的细胞保护作用。

缺血再灌注损伤过程中产生的 H_2O_2 也可诱导 HSP70 的合成, HSP70 能抑制 NOS 基因转录和 NOS 的合成,降低 iNOS 的活性,减少一氧化氮的合成,从而减轻过量一氧化氮及细胞因子对细胞的损害作用。 H_2O_2 的诱导效应可以解释为在细胞缺氧时再氧化作用过程中,通过修饰蛋白质的巯基而作为一种诱导剂诱导 HSP70 的产生^[11]。

在抗缺血再灌注损伤的实验研究中,已有各方面的报道论证 HSP70 在不同组织器官的细胞保护作用。HSP70 的快速表达对变性心肌蛋白的解聚发挥重要作用,缺血后心肌功能的恢复程度与 HSP70 的表达水平相关^[12]。在肾抗缺血再灌注损伤细胞凋亡的研究中,诱导产生的 HSP70 与抗凋亡机制密切相关^[13]。不管是采用何种方法,诱导 HSP70 产生增多均可以提高细胞抗应激能力^[14-15]。在本实验中发现,幼年 SD 大鼠的关节软骨细胞有一定程度的 HSP70 表达。股骨头骨骺缺血再灌注后,在 24 h、48 h、5 d 有增强的 HSP70 表达。由

此说明股骨头骨骺缺血再灌注后,关节软骨细胞的 HSP70 产生增多以拮抗其损害。

如何使用具有保护软骨的 NOS 抑制剂及如何通过预处理的方法增高 HSP70 表达以提高关节软骨细胞的内源性保护机制抗损害仍是值得进一步研究的方向。

参考文献

- Jang D, Murrell GA. Nitric oxide in arthritis. *Free Radic Biol Med*, 1998, 24(9): 1511-1519
- Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 1996, 381: 571-579.
- Dawson VL, Brahmabhatt HP, Mong JA, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal glial cortical cultures. *Neuropharmacology*, 1994, 33: 1425-1430
- 刘成龙, 靳安民, 周初松, 等. 大鼠脊髓损伤后一氧化氮合成酶基因表达的变化. *中华实验外科杂志*, 2001, 18(1): 74-75
- Huang SS, Wei FC, Hung LM. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte-endothelial cell interactions: role of nitric oxide and protein kinase C. *Circ J*, 2006, 70(8): 1070-1075
- Park JW, Qi WN, Lin JO, et al. Inhibition of NOS attenuates skeletal muscle reperfusion injury in extracellular superoxide dismutase knockout mice. *Microsurg*, 2005, 25(8): 606-613
- Shin SJ, Qi WN, Cai Y, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase promotes recovery of motor function in rats after sciatic nerve ischemia and reperfusion. *JH and Surg (Am)*, 2005, 30(4): 826-835
- Collin-Osdoby P, Nickols GA, Osdoby P. Bone cell function, regulation, and communication: a role for nitric oxide. *J Cell Biochem*, 1995, 57(3): 399-408
- Pelletier J, Jovanovic D, Fernandes JC, et al. Reduction in the structural changes experimental osteoarthritis by a nitric oxide inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999, 7(4): 416-418
- Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *J Rheumatol*, 1999, 26(9): 2002-2014
- Gray CC, Amrani M, Yacoub MH. Heat stress proteins and myocardial protection: experimental model or potential clinical tool? *Int Biochem Cell Biol*, 1999, 31(5): 559-573
- Gray CC, Amrani M, Smolenski R, et al. Cold cardioplegia: arrest enhances heat shock protein 70 in the heat shock rat heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, 121(6): 1130-1136
- Yang CW, Kim BS, Ahn J, et al. Preconditioning with sodium arsenite inhibits apoptotic cell death in rat kidney with ischemia/reperfusion or cyclosporine-induced injuries: The possible role of heat shock protein 70 as a mediator of ischemic tolerance. *Exp Nephrol*, 2001, 9(4): 284-294
- Rai R, Richardson C, Flecknell P, et al. Study of apoptosis and heat shock protein (HSP) expression in hepatocytes following radiofrequency ablation (RFA). *J Surg Res*, 2005, 129(1): 147-151.
- Baummeister S, Ofer N, Kleist C, et al. Reduction of skeletal muscle injury in composite tissue allotransplantation by heat stress preconditioning. *Plast Reconstr Surg*, 2004, 114(7): 1832-1841

(收稿日期: 2007-01-04 本文编辑: 王宏)