

## 急性热应激后小鼠的抗氧化能力和 *Hsp70* 基因的表达

陆蓓玲<sup>1,2</sup>, 王兰芳<sup>1\*</sup>

(1. 同济大学 医学院, 上海 200092; 2. 上海市新中高级中学, 上海 200436)

**摘 要:** 为研究急性热应激后小鼠抗氧化酶活性的变化及其肝脏热休克蛋白 70 基因(*Hsp70*)的表达规律, 选取 5~6 周龄健康昆明雄性小鼠 56 只, 平均分成 7 组(1 个对照组和 6 个急性高温处理组)。6 个急性高温处理组小鼠分别为 41 °C、急性高温处理 2 h 后再置于 25 °C 环境中 0、2、6、12、24、48 h 的小鼠。分别测定各处理小鼠的脏器指数、血清和肝脏中抗氧化酶的活性, 用 RT-PCR 方法检测肝脏中 *Hsp70-1*, *Hsp70-3* 基因的表达。结果表明, 急性热应激处理后, 小鼠脏器指数在 48 h 内没有明显变化。血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性显著升高( $P < 0.05$ ), 其中, 0 h 组和 6 h 组显著高于对照组( $P < 0.05$ ); 24 h 组和 48 h 组与对照组的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。血清中丙二醛(MDA)含量 6 h 组最高, 显著高于对照组( $P < 0.05$ ); 24 h 组与对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。血清中谷胱甘肽(GSH)含量各应急处理组与对照组差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。肝脏 SOD 活性 6 h 组和 24 h 组显著高于对照组( $P < 0.05$ ), 48 h 组与对照组的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。肝脏 MDA 含量 0 h 组最高, 极显著高于对照组( $P < 0.01$ ), 6、24、48 h 组与对照组的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。肝脏 GSH 含量 0 h 组最高, 极显著高于对照( $P < 0.01$ )。 *Hsp70-1* 的表达丰度 0、2、6、12、24 h 组均显著高于对照组和 48 h 组( $P < 0.05$ ), 48 h 组和对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。 *Hsp70-3* 的表达丰度 0、2、6、12 h 组均显著高于对照组( $P < 0.01$ ), 24 h 组、48 h 组与对照组的差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。急性高温处理可引起小鼠血清和肝脏中 SOD 活性和 MDA 含量的升高, 以及肝脏中 *Hsp70* 的高表达, 且不同时间的表达量不同, 但其抗氧化酶活性、MDA 含量以及 *Hsp70* 表达丰度均在热应激后 48 h 基本恢复正常水平。

**关 键 词:** 小鼠; 热应激; 热休克蛋白 70; 抗氧化能力

中图分类号: R151.2 文献标志码: 文章编号: 1007-1032(2011)06-0650-04

## Anti-oxidative ability and *Hsp70* gene expression in heat-stressed mice

LU Bei-ling<sup>1,2</sup>, WANG Lan-fang<sup>1\*</sup>

(1. School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Xinzhong High School, Shanghai 200436, China)

**Abstract:** To investigate the anti-oxidative ability and *Hsp70* gene expression in hyperthermia induced mice, Kunming male mice, 5~6 weeks old, were divided randomly into seven groups, one control group and six experimental groups. Mice in experimental groups were treated with high temperature (41 °C, 2 h). Organ index, antioxidant enzyme activities, and *Hsp70-1*, *Hsp70-3* gene expression in liver were determined at 0, 2, 6, 12, 24 and 48 h after heat stress. The results indicated there was no significant difference in organ index and serum GSH between the experimental groups and the control, and SOD and MDA level in serum and liver increased significantly after heat stress ( $P < 0.05$ ). In serum, SOD levels at 0 h and 6 h were significantly higher than those in the control ( $P < 0.05$ ), and at 24 h and 48 h, there was no significant difference ( $P > 0.05$ ); MDA level at 6 h was the highest, which was significantly higher compared with the control ( $P < 0.05$ ), and at 24 h there was no significant difference ( $P > 0.05$ ). In liver, SOD activities at 6 and 24h were significantly higher compared to the control ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference at 48h ( $P > 0.05$ ); MDA level was the highest at 0 h, which was significantly higher compared with the control ( $P < 0.05$ ), and there was no

收稿日期: 2011-06-14

基金项目: 上海市公卫人才计划(GW2008090)

作者简介: 陆蓓玲(1981—), 女, 上海人, 硕士研究生, 主要从事营养与食品卫生学研究, lbi\_beibei@hotmail.com; \*通信作者, lanfangwlf@yahoo.com.cn

significant difference at 6 h ( $P > 0.05$ ); and GSH level was also the highest at 0 h, which was significantly higher compared with the control ( $P < 0.01$ ). Gene expression of *Hsp70-1* at 0, 2, 6, 12 and 24 h were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.01$ ), and no significant difference was detected at 48 h ( $P > 0.05$ ). Gene expression of *Hsp70-3* at 0, 2, 6 and 12 h significantly higher than those in the control group ( $P < 0.01$ ), and no significant difference was detected at 24 and 48h ( $P > 0.05$ ). In conclusion, acute heat stress resulted in the increased SOD and MDA levels in serum and liver, and the increased expression of *Hsp70* genes, and all these indexes were almost restored to the control level at 48 h after heat stress.

**Key words:** mice; heat stress; heat shock protein 70; anti-oxidative ability

热应激能够引起机体活性氧的产生,造成氧化损伤,改变胞内的信号传递<sup>[5]</sup>,降低生产性能及免疫功能,甚至引起死亡<sup>[1]</sup>。应激状态下有些药物和营养素与机体抗氧化能力及热休克蛋白70(heat stress protein 70, *Hsp70*)的表达有关<sup>[2-4]</sup>,因此,了解应激后机体的抗氧化能力以及*Hsp70*的表达意义重大。笔者研究急性高温处理小鼠的抗氧化能力及肝脏*Hsp70*基因在不同时相的表达,旨在探明某些营养素和药物延缓或改善应激的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

昆明种 5~6 周龄雄性小鼠 56 只,购自中科院上海实验动物中心;RNA 酶抑制剂(40 U/ $\mu$ L),无 RNase 的 DNA 酶、M-MLV 逆转录酶(200 U/ $\mu$ L)、dNTPs 和 Agarose 均购自 Promega 公司;Trizol、*Taq*DNA 聚合酶和 PCR marker 均购自 TaKaRa;溴化乙锭(EB)和焦碳酸二乙酯(DEPC)购自 Amersco 公司;随机引物 dT18 和  $\beta$ -actin、*Hsp70.1*、*Hsp70.3* 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;其他试剂均为国产,分析纯。

### 1.2 试验设计

将 56 只小鼠随机分成 7 组(1 个对照组和 6 个试验组)。试验组小鼠在饲养 5 d 后进行热应激处理:将小鼠置于 41 °C,相对湿度 60%的环境中。对照

组不做热应激处理。处理 2 h 后将小鼠取出,置于 25 °C 环境中,于取出小鼠后 0、2、6、12、24、48 h 各取 8 只小鼠,称重;迅速分离小鼠的肝脏、脾脏和胸腺,称重,计算对照组和热应激后 0、6、24、48 h 小鼠的脏器指数;将肝脏用液氮速冻, - 80 °C 保存。

用 RT-PCR 法检测热应激后 0、2、6、12、24、48 h 小鼠肝脏中 *Hsp70-1* 和 *Hsp70-3* 基因的表达。

摘取小鼠的眼球分离血清,使用南京建成生物工程研究所的试剂盒检测对照组和试验组小鼠应激处理后 0、6、24、48 h 组小鼠血液和肝脏中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)和丙二醛(MDA)的含量,分析小鼠的抗氧化能力。

### 1.3 肝脏中 *Hsp-1*、*Hsp70-3* 基因的 RT-PCR 检测

*Hsp70-1*、*Hsp70-3*、 $\beta$ -actin 引物使用 Primer Premier 5.0 设计。各基因引物序列及扩增片段大小见表 1。肝脏 RNA 采用 Tizol 分离,逆转录后分别取模板对 *HSP70-1*、*HSP70-3* 和  $\beta$ -actin 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。反应结束后取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶成像系统拍照,并使用复日科技 Smart View 电泳分析软件进行光密度分析。

表 1 基因 *HSP70-1*、*HSP70-3* 和  $\beta$ -actin 进行 RT-PCR 扩增所用的引物序列

Table 1 primers for genes *HSP70-1*, *HSP70-3* and  $\beta$ -actin

基因	引物序列	片段长度/bp
$\beta$ -actin	5'-CTGGCACCACCTTCTACAAT-3'	635
	5'-TGTTGGCATAGAGGTCTTTACGG-3'	
<i>Hsp70-1</i>	5'-TGCTTGGGCACCGATTACTGTCAAGG-3'	285
	5'-GGCAGCTAGACTATATGTCTTCCCAGGCTACTG-3'	
<i>Hsp70-3</i>	5'-AGATATGTGGCCTTGAGGACTGTCATTATTTTC-3'	220
	5'-CTGGGGCAGTGCTGAATTGAAGAATATA-3'	

## 1.4 数据统计方法

采用软件 SAS8.2 进行方差分析和多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 急性热应激对小鼠脏器指数的影响

表 2 结果表明,热应激对小鼠的肝脏指数、脾脏指数以及胸腺指数的影响都不显著( $P > 0.05$ )。

表 2 急性热应激后小鼠的脏器指数

组别	肝脏指数	脾脏指数	胸腺指数
对照	50.57±7.28	6.15±2.26	2.96±0.49
0 h 组	44.24±6.07	4.99±1.65	3.07±0.55
6 h 组	46.27±8.25	4.87±1.77	2.75±0.67
24 h 组	48.04±6.53	4.95±1.16	2.92±0.56
48 h 组	45.39±5.98	5.21±1.57	2.89±0.54

### 2.2 急性热应激对小鼠血清抗氧化能力的影响

表 3 结果表明,热应激处理后,小鼠血清中 SOD 水平显著升高( $P < 0.05$ ),其中,6 h 组和 0 h 组显著高于对照组( $P < 0.05$ ),而 48 h 组明显下降,但与对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。血清中 MDA 含量在热应激处理后 6 h 显著增加,显著高于对照组;24 h 组有所下降,与对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。热应激处理对血清中 GSH 含量的影响不显著( $P > 0.05$ )。

表 3 急性热应激后小鼠血清的抗氧化指标

组别	SOD/(U·mL <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mL <sup>-1</sup> )	GSH/(mg·g <sup>-1</sup> )
对照	(196.15±47.41)b	(8.17±0.71)bcAB	354.67±21.30
0 h 组	(249.61±60.05)a	(9.26±0.57)abAB	360.77±26.03
6 h 组	(215.71±41.29)a	(9.87±1.86)aA	353.43±31.30
24 h 组	(197.82±51.27)b	(7.63±1.19)cB	361.79±14.15
48 h 组	(189.45±46.98)b	(8.21±1.57)abcAB	357.18±27.66

### 2.3 急性热应激对小鼠肝脏抗氧化能力的影响

表 4 结果表明,热应激处理后,小鼠肝脏中 SOD 活性显著升高( $P < 0.05$ ),其中,6 h 组和 24 h 组显著高于对照组( $P < 0.05$ );48 h 组下降,但与对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。肝脏 MDA 含量在热应激处理后显著增加,0 h 组最高,极显著高于对照组;6 h 组有所下降,与对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。GSH 含量 0 h 组极显著高于对照组( $P < 0.01$ )。

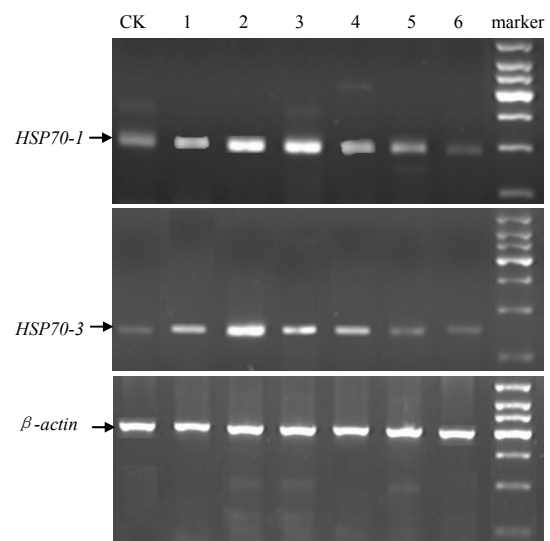
表 4 急性热应激后小鼠肝脏的抗氧化指标

Table 4 Anti-oxidative index of liver in mice responded to acute heat stress

组别	SOD 活性/ (U·mL <sup>-1</sup> )	MDA 含量/ (nmol·mL <sup>-1</sup> )	GSH 含量/ (mg·g <sup>-1</sup> )
对照	(150.61±27.32)b	(1.94±0.88)bB	(119.41±15.49)bcB
0 h 组	(178.42±26.07)ab	(2.93±0.73)aA	(153.07±42.31)aA
6 h 组	(192.28±39.25)a	(2.47±0.57)abAB	(142.75±20.32)acAB
24 h 组	(197.61±31.03)a	(2.21±0.97)bAB	(112.52±20.03)bbB
48 h 组	(161.29±25.99)b	(1.97±0.48)bbB	(115.69±14.91)bbB

### 2.4 急性热应激对小鼠肝脏中热应激蛋白 70 基因 mRNA 表达的影响

在正常情况下,肝脏组织中 *Hsp70-1* 和 *Hsp70-3* 的表达量很低(图 1)。急性热应激处理后,*Hsp70* 的表达水平显著升高,在 2~6 h 达到高峰(图 2、图 3)。*Hsp70-1* 的表达 0、2、6、12、24 h 组均显著高于对照组和 48 h 组( $P < 0.01$ ),48 h 组与对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。*Hsp70-3* 的表达 0、2、6、12 h 组均显著高于对照组( $P < 0.01$ ),24 h 组和 48 h 组表达水平显著下降,但与对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。



1、2、3、4、5、6 分别表示 0、2、6、12、24、48 h 组。

图 1 *Hsp70-1*、*Hsp70-3* 和  $\beta$ -actin 的电泳图谱

Fig.1 Electrophoretogram of *Hsp70-1*, *Hsp70-3* and  $\beta$ -actin genes

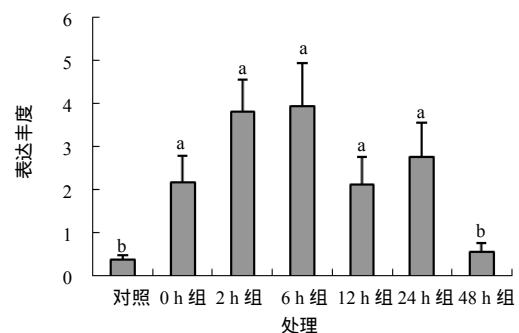
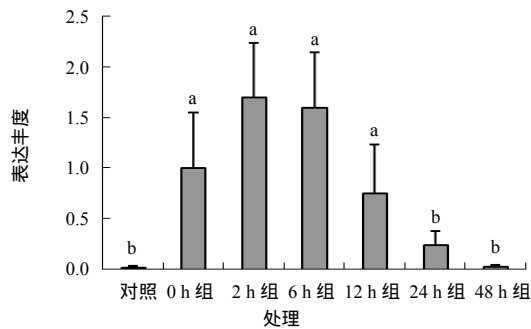


图 2 急性热应激后各处理 *Hsp70-1* 的表达丰度

Fig.2 Expression of *Hsp70-1* gene at different phases after heat stress

图 3 急性热应激处理后 *Hsp70-3* 的表达丰度Fig.3 Expression of *Hsp70-3* gene at different phases after heat stress

### 3 结论与讨论

应激后 SOD、GSHpx 等抗氧化酶活性的升高有利于清除活性氧，降低机体损伤程度。Bhusari 等<sup>[6]</sup>认为长期热应激会导致小鼠肝脏中 CAT 和 SOD 活性显著升高，GPX 活性显著下降。Zhang 等<sup>[5]</sup>认为急性热应激能引起小鼠肝脏中 CAT 和 SOD 活性显著升高。本试验结果表明，高温急性处理可使小鼠肝脏和血清中 MDA 含量显著升高，这说明在高温下机体发生了过氧化反应。肝脏中 MDA 含量在应激后 0 h 最高，血清中 MDA 含量在应激后 6 h 最高，随着时间的延长，MDA 含量逐渐下降，48 h 组与对照组的差异均没统计学意义，说明热应激处理 48 h 后 MDA 含量已恢复正常，表明随着时间的延长机体的氧化损伤逐渐减小。应激后肝脏和血清中 SOD 含量显著升高，其中肝脏 SOD 活性在应激后 24 h 最高，血清 SOD 活性在应激后 6 h 最高。肝脏 GSH 活性在应激后先升后降，48 h 组与对照组的差异均没统计学意义。热休克蛋白普遍存在于从原核细胞到高等真核细胞的整个生物界，高温、缺氧、寒冷、创伤等都可以引起热休克蛋白的大量产生。按照相对分子质量的大小，热休克蛋白有 Hsp90、Hsp70、Hsp60 及小分子 Hsp 等家族，其中 Hsp70 是目前研究较多的，也是最重要的一类热休克蛋白<sup>[7]</sup>。

Hsp70 有多种功能，是一种非特异性保护蛋白。在高温及各种有害因素刺激下，Hsp70 合成显著增加，Hsp70 的表达有利于细胞生存，能提高机体耐热等抗应激能力<sup>[8-12]</sup>。Mustafi 等<sup>[13]</sup>认为热应激可激活 p38MAPK 通路，进而激活 Akt 通路，最终介导 Hsp70 和 SOD 的表达。本试验中，急性热应激处理可引起小鼠肝脏 *Hsp70* 的高表达，且表达有时间性。

高温处理后 0 h 即引起 *Hsp70* 的高表达，2~6 h 达到高峰，12 h 后开始下降。

#### 参考文献:

- [1] Quinteiro-Filho W M, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, et al. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens[J]. Poultry Science, 2010, 89(9): 1905–1914.
- [2] Zaidi S M, Al-Qirim T M, Banu N. Effects of antioxidant vitamins on glutathione depletion and lipid peroxidation induced by restraint stress in the rat liver[J]. Drugs in RD, 2005, 6(3):157–165.
- [3] Sahin K, Orhan C, Tuzcu M, et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defense system via modulating hepatic nuclear transcription factors in heat-stressed quails[J]. Poultry Science, 2010, 89(10):2251–2258.
- [4] Halıcı M, Imik H, Koc M, et al. Effects of  $\alpha$ -lipoic acid, vitamins E and C upon the heat stress in Japanese quails[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2011.01156.x.
- [5] Zhang H J, Xu L, Drake V J, et al. Heat-induced liver injury in old rats is associated with exaggerated oxidative stress and altered transcription factor activation[J]. FASEB Journal, 2003, 17: 2293–2295.
- [6] Bhusari S, Hearne L B, Spiers D E, et al. Transcriptional profiling of mouse liver in response to chronic heat stress[J]. Journal of Thermal Biology, 2008, 33(3): 157–167.
- [7] Linquise S, Craig E A. The heat shock proteins[J]. Annual Review of Genetics, 1998, 22: 631–637.
- [8] Mayer M P, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005, 62:670–684.
- [9] Calderwood S K, Khaleque M A, Sawyer D B, et al. Heat shock proteins in cancer: Chaperones of tumorigenesis[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2006, 31:164–172.
- [10] Calderwood S K, Ciocca D R. Heat shock proteins: Stress proteins with Janus-like properties in cancer[J]. International Journal of Hyperthermia, 2008, 24:31–39.
- [11] Chakraborty P K, Banerjee Mustafi S, Ganguly S, et al. Resveratrol induces apoptosis in K562 (*Chronic myelogenous leukemia*) cells by targeting a key survival protein Hsp70[J]. Cancer Science, 2008, 99:1109–1116.
- [12] Franklin T B, Krueger-Naug A M, Clarke D B, et al. The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system[J]. International Journal of Hyperthermia, 2005, 21, 379–392.
- [13] Mustafi S, Chakraborty P K, Dey R S, et al. Heat stress upregulates chaperone heat shock protein 70 and antioxidant manganese superoxide dismutase through reactive oxygen species (ROS), p38MAPK, and Akt[J]. Cell Stress Chaperones, 2009, 14(6):579–589.

责任编辑: 王赛群