

• 论 著 •

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00773

家兔发热诱导热休克转录因子 1 聚合对体温及下丘脑 cAMP 含量的影响

白 宁¹, 金莲锦², 曹 宇^{1*}

1. 中国医科大学基础医学院生理学教研室, 沈阳 110001
2. 牡丹江医学院附属红旗医院, 牡丹江 157011

[摘要] 目的: 观察热休克转录因子 1(HSF1)聚合对家兔脂多糖(LPS)诱发性发热反应的影响, 并研究其与下丘脑 cAMP 含量变化的关系, 以探讨 HSF1 是否参与热限作用及可能的机制。方法: 家兔随机分成 4 组: (1) 对照组(N); 注射无水乙醇; (2) 槲皮素组(Q); 注射槲皮素-无水乙醇溶液(2.5 $\mu\text{mol/L}$); (3) LPS 组(L); 注射无水乙醇, 10 min 后静脉注射脂多糖(LPS, 0.5 $\mu\text{g/kg}$); (4) 槲皮素+LPS 组(Q+L); 注射槲皮素-无水乙醇溶液(2.5 $\mu\text{mol/L}$), 10 min 后静脉注射 LPS(剂量同 L 组)。通过复制 LPS 性发热家兔模型诱导 HSF1 聚合, 观察聚合的 HSF1 对 LPS 性发热效应的影响, 并用放射免疫法检测下丘脑中 cAMP 含量的变化。结果: Q+L 组与 L 组比较, 在 240~360 min 期间即时体温与基础体温之差(ΔT)差异显著($P < 0.05$), 6 h 体温反应指数(TRI_6)为 8.32 ± 0.63 , 明显高于 L 组($P < 0.01$)。Q+L 组各时间点的 cAMP 含量与 L 组相比明显增加($P < 0.01$)。HSF1 三聚体的表达从致热后 60 min 开始逐渐增多, 达到体温最高值时(180 min)为对照水平的 1.77 倍, 此后, 随着 HSF1 三聚体表达水平的进一步升高, 体温逐渐下降。而预先使用槲皮素抑制 HSF1 的聚合, Q+L 组的 HSF1 三聚体的表达量在 60、180、240、360 min 组均低于对应的 L 组($P < 0.05$), HSP70 表达水平相应降低; cAMP 含量增多, 发热幅度升高, 发热时程延长。结论: 聚合的 HSF1 对 LPS 性发热有抑制效应, 此作用可能与抑制下丘脑 cAMP 的生成有关。

[关键词] 发热; 热限; 热休克因子 1; 环 AMP; 体温

[中图分类号] R 364.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0773-05

Fever-induced polymerization of heat shock factor 1 influences body temperature and cAMP content in hypothalamus of rabbits

BAI Ning¹, JIN Lian-jin², CAO Yu^{1*}

1. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China
2. Affiliated Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the effects of heat shock factor 1 (HSF1) polymerization on the LPS-induced febrile reaction in rabbits and study its relationship with cAMP content, so as to investigate whether HSF1 plays a role in the fever limiting function and the possible mechanisms. **Methods:** Seventy rabbits were randomly divided into 4 groups: (1) Normal control group(N), injection of ethanol in the lateral ventricle; (2) Quercetin group(Q), injection of quercetin and ethanol solution (2.5 $\mu\text{mol/L}$); (3) Lipopolysaccharide group(L), LPS(0.5 $\mu\text{g/kg}$) was injected 10 min after injection of ethanol; (4) Quercetin plus LPS group(Q+L), LPS was injected 10 min after injection of quercetin plus ethanol(2.5 $\mu\text{mol/L}$). The polymerization of HSF1 was induced by reproducing LPS-induced febrile reaction model in rabbits to assess the influence of polymerized HSF1 on LPS-induced febrile reaction. The content of cAMP in the hypothalamus was measured by radioimmunoassay. The expression of HSF1 and HSP70 protein in the hypothalamus was detected by Western blotting. **Results:** The difference between basal temperature and temperatures of defined time points ΔT (240-360 min) of Q+L group was significantly higher than that of L group ($P < 0.05$); TRI_6 was 8.32 ± 0.63 in Q+L group, significantly higher than that of L group ($P < 0.05$); and the contents of cAMP of Q+L group at all time points were significantly higher than those of the L group ($P < 0.01$). Polymeric HSF1 content started to increase at 60 min after LPS injection and obviously increased when the body temperature reached the peak (180 min, being 1.77 folds that of the control level); then with the increase of HSF1 trimerization, the body temperature began

[收稿日期] 2007-12-10 **[接受日期]** 2008-05-27

[基金项目] 国家自然科学基金(30270198); 高等学校博士学科点专项科研基金(2006159004). Supported by National Natural Science Foundation of China(30270198) and Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education(2006159004).

[作者简介] 白 宁, 硕士生, 讲师. E-mail: baining_cmu@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel : 024-23256666-5301, E-mail: caoy5955@sina.com

to decrease. When pretreatment with quercetin was performed to inhibit polymerization of HSF, the levels of HSF1 trimerization at 60 min, 180 min, 240 min, and 360 min in Q+L group were significantly lower than those in the corresponding L group (all $P < 0.05$); meanwhile, the expression of HSP70 was decreased, the content of cAMP was increased, the febrile reaction was intensified and the time course of the febrile reaction was extended. **Conclusion:** Polymeric HSF1 can inhibit the LPS-induced febrile reaction, which is probably related to the down-regulation of cAMP content in the hypothalamus.

[KEY WORDS] fever; fever limit; heat shock transcription factor 1; cyclic AMP; body temperature

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7): 773-777]

热休克转录因子 1 (heat shock transcription factor, HSF1) 是在多种应激原刺激下, 由无活性的单体聚合成有活性的三聚体, 可直接被热刺激激活^[1-2]。一般情况下, 机体在炎症性发热时体温升高不超过 41℃, 这种现象称为热限 (fever limit), 提示体内存在调控体温的自限系统。研究^[3]显示 HSF1 具有降低外周内生性致热原产生的作用, 进而限制体温的升高, 但是否参与了发热时中枢体温调控过程还不清楚。本实验应用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 复制家兔发热模型, 诱导 HSF1 聚合, 观察聚合的 HSF1 对 LPS 性发热效应及下丘脑中 cAMP 含量变化的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物来源及饲养分组 选用新西兰健康雄性家兔, 体质量 2.0~2.5 kg, 基础体温 38.5~39.5℃, 由中国医科大学实验动物中心提供。在室温 (22±1.0)℃, 湿度 40%~60%, 昼夜光照节律 12 h : 12 h 的条件下单笼饲养, 自由饮食。

1.2 实验分组及实施方法 将 70 只家兔随机分成 4 组: (1) 对照 (N) 组: 侧脑室注射无水乙醇 40 μl, 10 min 后耳缘静脉注射生理盐水 (1 ml/kg); (2) 槲皮素 (Q) 组: 侧脑室注射槲皮素-无水乙醇溶液 (2.5 μmol/L, 陕西慧科植物开发有限公司) 40 μl, 10 min 后耳缘静脉注射生理盐水 (1 ml/kg); (3) LPS (L) 组: 侧脑室注射无水乙醇 40 μl, 10 min 后经耳缘静脉注射 LPS (用无热原生理盐水稀释, 0.5 μg/kg, Sigma 公司); (4) 槲皮素+LPS (Q+L) 组: 侧脑室注射槲皮素-无水乙醇溶液 40 μl, 10 min 后耳缘静脉注射 LPS (剂量同 L 组)。

侧脑室插管用 1% 戊巴比妥钠 (3 ml/kg) 静脉麻醉动物, 将其头部固定于兔台上, 暴露前囟, 参照 Sawyer 兔脑图谱, 用牙科钻在颅骨表面钻孔, 将外径为 1 mm 的塑料管插入一侧侧脑室 (P: 1 mm; L: 4 mm; H: 5 mm), 然后用牙科水泥固定。术后动物单笼饲养, 恢复 1 周进行实验。实验结束后检查插管位置, 舍掉位置不正确的数据。

N 组和 Q 组于注射生理盐水后 180 min 时立即

断头, L 组和 Q+L 组分别在给予 LPS 后 0、30、60、180、240 和 360 min 时立即断头, 打开颅骨顶, 暴露脑组织, 按兔脑图谱以灰结节和视交叉的中心点为界定部位, 取出下丘脑组织, 立即投入液氮中速冻固定, 20 min 后存放于 -70℃ 冰箱内保存待测。各实验条件下采样均来自 5 只家兔。

1.3 体温的测量 实验前 3 d, 每天让动物在实验环境中模拟测温 3 h。使用数字温度计 (北京师范大学司南仪器厂) 测量体温。家兔放在特制的兔箱内, 将涂有石蜡油的温度计探头插入直肠内 10 cm 并用胶布固定于尾根部, 待体温稳定后每隔 15 min 测温, 取 3 次的平均值作为基础体温, 实验中每隔 10 min 测温 1 次, 直到实验结束。测算出即时体温与基础体温之差 ΔT (°C), 最大体温变化值 ΔT_{\max} (°C) 及体温反应指数 (thermal response index, TRI; 为体温曲线与时间轴的面积积分, TRI_6 为注射后 6 h 测得值)。

1.4 下丘脑中 cAMP 含量的测定 家兔下丘脑组织称量 (50 mg) 后加 2 ml 冰醋酸进行匀浆, 2 200×g 离心 15 min, 取上清于 60℃ 烘箱中烘干, 之后按照 cAMP 放免试剂盒 (上海中医药大学同位素室) 说明书进行测定。

1.5 采用 Western 印迹方法检测下丘脑中 HSF1 表达 取家兔下丘脑组织 100 mg, 加 0.4 ml 预冷的裂解液进行匀浆, 4℃, 8 800×g 离心 30 min, 取上清, 再进行蛋白定量后, 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (分离胶 7.5%、浓缩胶 4.0%) 分离蛋白质; 将凝胶经电转移至硝酸纤维素膜; 硝酸纤维素膜经封闭液浸泡, 4℃ 过夜, 漂洗; 加抗 HSF1 抗体 (1 : 1 000) (NeoMarKer 公司), 二抗为兔抗大鼠二抗 (1 : 1 000), 室温显色后用自动电泳凝胶成像分析仪扫描, 并以灰度积分值 (integrated density value, IDV) 表示含量, 对照选用抗 β -肌动蛋白抗体。

1.6 采用 Western 印迹方法检测下丘脑中热休克蛋白 (HSP) 70 表达 实验方法同上, 加抗 HSP70 抗体 (1 : 500) (武汉博士德生物有限公司), 二抗为羊抗兔 IgG (1 : 1 000), 室温显色后用自动电泳凝胶成像分析仪扫描, 并以 IDV 值表示含量, 对照选用抗 β -

肌动蛋白抗体。

1.7 统计学处理 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。采用单因素方差分析和 t 检验进行组间比较。

2 结果

2.1 各实验组家兔的体温变化 图 1 显示了在不同处理条件下体温变化曲线, 可见 Q 组与 N 组比较各时间点的 ΔT 无明显差异 ($P > 0.05$)。给家兔静脉注射 LPS 可引起双峰热, 注射 LPS 后 60 min 时家兔体温上升达第 1 个高峰, 为 $(1.32 \pm 0.17)^\circ\text{C}$, 之后略有回降, 在注射后 180 min 时, 体温上升达第 2 个高峰, 为 $(1.84 \pm 0.15)^\circ\text{C}$, 第 2 峰高于第 1 峰, 在 360 min 左右回降至接近基础水平。L 组与 N 组比较, 在 60~300 min 期间 ΔT 差异显著 ($P < 0.05$)。

Q+L 组的体温变化也呈双峰热, 第 1 峰和第 2 峰略高于 L 组, 与 L 组比较, 发热时程延长, 在 420 min 左右体温回降至接近基础水平; 发热幅度升高, 在 240~360 min 期间 ΔT 差异显著 ($P < 0.05$); TRI_6 为 8.32 ± 0.63 , 明显高于 L 组 ($P < 0.01$, 表 1)。Q+L 组与 N 组比较, 在 60~360 min 期间 ΔT 差异非常显著 ($P < 0.01$)。

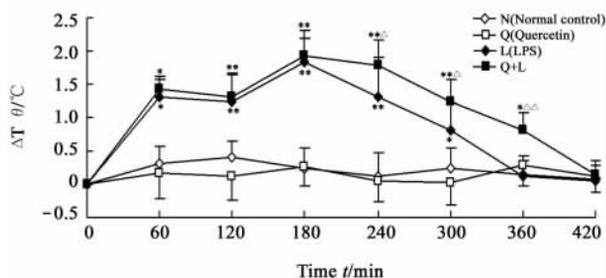


图 1 各组家兔的平均体温变化曲线

Fig 1 Curve of rabbit body temperature responses in each group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs L group. $n = 5, \bar{x} \pm s$

表 1 家兔的最大体温变化值 (ΔT_{\max}) 和 6 h 体温反应指数 (TRI_6) 检测结果

Tab 1 Maximum change of temperature (ΔT_{\max}) and thermal response index (TRI_6) of rabbits

($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Group	$\Delta T_{\max} \theta/^\circ\text{C}$	TRI_6
Normal control	0.30 ± 0.16	1.46 ± 0.22
Quercetin	0.28 ± 0.19	0.76 ± 0.27
LPS	$1.84 \pm 0.15^{**}$	$5.92 \pm 0.43^{**}$
Quercetin+LPS	$1.92 \pm 0.08^{**}$	$8.32 \pm 0.63^{**\Delta\Delta}$

** $P < 0.01$ vs normal control; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs LPS group

2.2 下丘脑组织 cAMP 含量的变化 由图 2 可见, L 组下丘脑中 cAMP 的含量在注射 LPS 后 60 min 开始升高, 180 min 达到高峰, 与 N 组比较增加了 1.4 倍, 360 min 时回降至基础水平, 在 60、180、240 min 组 cAMP 的含量与 N 组比差异显著 ($P < 0.01$)。Q+L 组各时间点的 cAMP 含量与 L 组相比明显增加 ($P < 0.01$)。cAMP 含量的变化与体温的变化呈正相关 ($r = 0.890, P < 0.01$), $Y = 0.300 + 0.266X$ 。

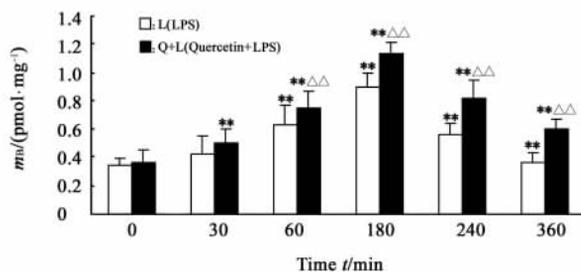


图 2 家兔 LPS 性发热不同时相下丘脑中 cAMP 的含量
Fig 2 Content of cAMP in hypothalamus of rabbits in LPS-induced fever at different time points

** $P < 0.01$ vs 0 min; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs L group. $n = 5, \bar{x} \pm s$

2.3 下丘脑组织 HSF1 表达量的变化 图 3 显示了 Western 印迹方法分析不同时相下丘脑中 HSF1 的表达水平。可见, 在 L 组和 Q+L 组, HSF1 三聚体表达量逐渐增多, 在体温处于高峰值时 (180 min) 明显增加, 之后, HSF1 三聚体表达量仍继续增多, 体温逐渐下降。在 L 组体温处于高峰值时, HSF1 三聚体表达量为基础状态的 1.77 倍, 360 min 时增加到 2.13 倍。Q+L 组的 HSF1 三聚体的表达量在 60、180、240、360 min 组均低于对应的 L 组 ($P < 0.05$)。在致热 180 min (体温达最高值) 以后, HSF1 三聚体含量与体温的变化呈负相关 ($r = -0.897, P < 0.01$), $Y = 4.959 - 0.458X$ 。

2.4 下丘脑组织 HSP70 表达的变化 从图 4 可见, 下丘脑组织中 HSP70 的表达水平在给予 LPS 后 180 min 时达高峰值, 且 Q+L 组各时间点 HSP70 的表达明显低于对应的 L 组, 进一步证实槲皮素抑制 HSF1 激活的作用。

2.5 下丘脑组织 HSF1 三聚体含量与 cAMP 含量变化的相关分析 LPS 致发热过程中, 在达到体温高峰以后 (180~360 min), 下丘脑中 HSF1 三聚体的含量与 cAMP 的含量变化之间呈负相关 ($r = -0.807, P < 0.01$), $Y = 5.284 - 1.333X$ 。

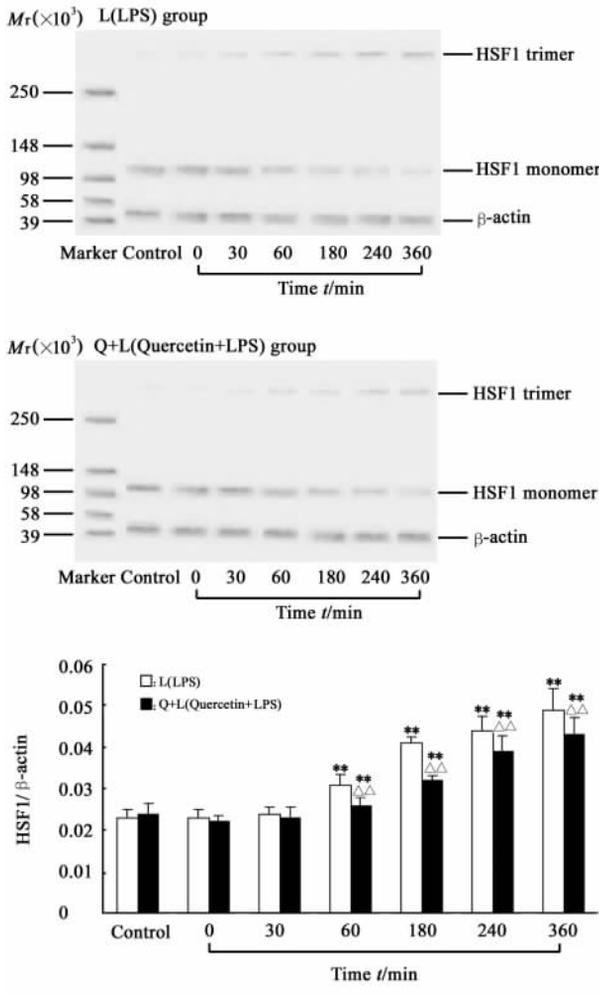


图3 家兔LPS性发热不同时相下丘脑中HSF1的表达

Fig 3 Expression of HSF1 in hypothalamus of rabbits with LPS-induced fever at different time points

N group as L group's control; Q group as Q+L group's control. * * P<0.01 vs control group; ΔΔ P<0.01 vs L group. n=5, x̄±s. HSF1 and β-actin expression were expressed as absolute value IDV

3 讨论

许多学者主张 cAMP 是内生致热原 (endogenous pyrogen, EP) 性发热的主要中枢介质^[4-6]。目前认为,当内生致热原通过血脑屏障进入中枢到达视前区-下丘脑前部 (preoptic-anterior hypothalamus area, PO/AH) 区,使该部位细胞内 Ca²⁺ 浓度下降,引起下丘脑内 Na⁺/Ca²⁺ 比值升高,解除了 Ca²⁺ 对细胞内 cAMP 代谢的负反馈抑制,结果下丘脑 cAMP 含量增加,cAMP 作用于 PO/AH 区的热敏神经元,改变其放电频率,提高体温调定点,使体温升高。

内毒素活性成分 LPS 是导致发热的外源性致热原^[7]。LPS 引起发热的机制主要是通过诱导白细胞浸润,激活炎性细胞,释放内源性致热原,如白介素-

1 和肿瘤坏死因子-α 等的产生,进而直接或间接作用于体温调节中枢,导致下丘脑发热介质如 cAMP/PGE₂ 等的释放,使体温调定点上移,产热增加,散热减少而发挥致热作用^[8-10]。本实验利用具有代表性的外源性致热原 LPS 复制家兔发热模型。观察到家兔耳缘静脉注射 LPS 后,体温明显升高,在此基础上检测了下丘脑 cAMP 的表达量。结果显示,LPS 致热家兔下丘脑中 cAMP 在不同时相的含量变化与体温变化呈明显的正相关,进一步证实了 cAMP 是重要的中枢致热介质^[11]。

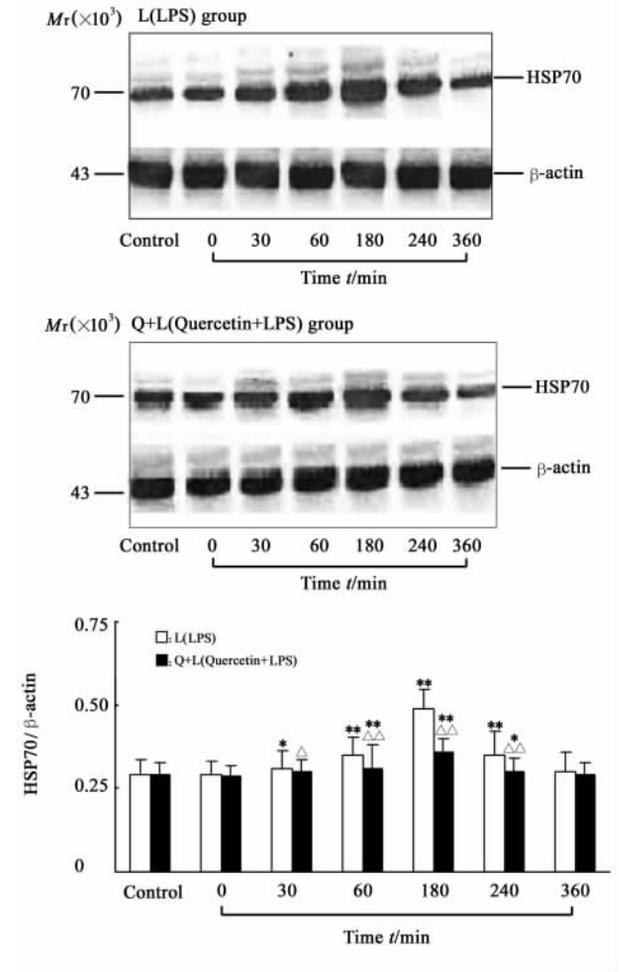


图4 家兔LPS性发热不同时相下丘脑中HSP70的表达

Fig 4 Expression of HSP70 in hypothalamus of rabbits with LPS-induced fever at different time points

N group as L group's control; Q group as Q+L group's control. * P<0.05, * * P<0.01 vs control group; Δ P<0.05, ΔΔ P<0.01 vs L group. n=5, x̄±s. HSP70 and β-actin expression was expressed as absolute value IDV

HSF1 作为在多种有害刺激的应激情况下调节 HSP70 基因转录的核蛋白被人们所认识^[12],当 HSF1 激活时由单体聚合成三聚体,聚合的 HSF1 能与热休克元件(heat shock element, HSE)结合,增加

HSP70的转录和蛋白质的合成^[13]。近年来的研究表明,HSF1参与多种细胞因子表达的调节。在敲除HSF1基因的小鼠中观察到,内毒素引起的IL-1 β 等细胞因子的表达上调,说明HSF1对IL-1 β 的基因表达具有抑制作用。在LPS致发热时HSF1通过抑制IL-1 β 、TNF- α 等内生性致热原基因的表达,参与限制体温升高的外周机制^[3,6]。有研究证明^[14],对分离的细胞核蛋白进行加温处理,可见HSF1被激活,提示HSF1可以直接“感受”温度刺激。我们推测在下丘脑组织中,HSF1在调控发热反应中可能具有重要的作用。本实验复制LPS性发热家兔模型,观察到下丘脑组织中HSF1三聚体的含量在体温升高过程中逐渐增多,达一定水平后,随着HSF1三聚体的含量进一步升高,cAMP含量逐渐减少,体温逐渐下降。相关分析显示,在达到体温高峰以后(180~360 min),下丘脑中HSF1三聚体的含量与cAMP的含量变化之间呈负相关($r=-0.807, P<0.01$)。

槲皮素是一种广泛存在于自然界的黄酮化合物,能抑制HSF1的活化,从而也抑制了HSP70基因转录和蛋白表达。本实验预先应用槲皮素,则HSF1三聚体表达量在60、180、240、360 min组均低于对应的L组,并且各时间点HSP70的表达也明显低于对应的L组,这说明槲皮素抑制了HSF1的活化和HSP70的表达;同时检测下丘脑组织中cAMP含量在Q+L组显著高于L组,并且观察到LPS性发热幅度增高,发热时程延长。以上结果提示下丘脑组织中的HSF1可能通过触发某种机构抑制cAMP的合成与释放,进而限制体温的升高。

综上所述,在LPS致热过程中,体温升高到一定程度可诱导下丘脑HSF1的聚合,而活化的HSF1通过抑制中枢发热介质cAMP的产生,可能是限制体温升高的重要途径之一。那么HSF1又是如何抑制cAMP的产生的,是否与调控细胞内Ca²⁺浓度有关,或通过对其他代谢酶活性的调节而起作用等问题均有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Yamamoto A, Mizukami Y, Sakurai H. Identification of a novel

- class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisia* [J]. *Biol Chem*, 2005, 280:11911-11919.
- [2] Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11: 441-469.
- [3] 马中女, 曹宇. 家兔发热过程中单核细胞 HSF1 聚合与 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达的关系 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2006, 22: 445-448.
- [4] 徐方云, 李楚杰. 家兔 EP 性发热时血浆、脑脊液和不同脑区组织 cAMP 含量的变化 [J]. *中国病理生理杂志*, 1997, 13: 52-56.
- [5] 齐云, 霍海如, 郭淑英, 周军, 田甲丽, 姜廷良. 发热及低体温大鼠下丘脑中腺苷酸环化酶活性与环 2 磷酸腺苷含量的变化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18: 371-373.
- [6] Leon L R. Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice [J]. *J Appl Physiol*, 2002, 92: 2648-2655.
- [7] Klir J J, Roth J, Szelenyi Z, McClellan J L, Kluger M J. Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in LPS fever in rat [J]. *Am J Physiol*, 1993, 265: R512-R517.
- [8] Tavares E, Minano F J, Maldonado R, Dascombe M J. Endotoxin in fever in granulocytopenic rats: evidence that brain cyclooxygenase-2 is more important than circulating prostaglandin E₂ [J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80: 1375-1387.
- [9] Steiner A A, Ivanov A I, Serrats J, Hosokawa H, Phayre A N, Robbins J R, et al. Cellular and molecular bases of the initiation of fever [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4: e284.
- [10] 章卓, 万敬员, 李洪忠, 罗福玲, 周岐新, 张力. 积雪草苷对脂多糖诱导大鼠发热的预防及对相关炎症因子的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2007, 21: 229-234.
- [11] 岳晓莉, 蒋玉凤, 刘智勤, 樊永平, 王文荣, 任丽薇, 等. 脑热清对 EP 性发热家兔下丘脑及脑脊液 cAMP 含量的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21: 172-174.
- [12] Nicoll W S, Boshoff A, Ludewig M H, Hennessy F, Jung M, Blatch G L. Approaches to the isolation and characterization of molecular chaperones [J]. *Protein Expr Purif*, 2006, 46: 1-15.
- [13] Tai L J, McFall S M, Huang K, Demeler B, Fox S G, Brubaker K, et al. Structure-function analysis of the heat shock factor-binding protein reveals a protein composed solely of a highly conserved and dynamic coiled-coil trimerization domain [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 735-745.
- [14] Ohnishi K, Matsumoto H, Takahashi A, Wang X, Ohnishi T. Heat shock transcription factor, HSF, is activated by ultraviolet irradiation [J]. *Photochem Photobiol*, 1996, 64: 949-952.

[本文编辑] 李丹阳, 邓晓群