

· 论 著 ·

# 热应激预处理加强皮瓣组织存活的作用及其与 HSP<sub>70</sub> 合成的关系

吴建明<sup>1\*</sup>, 吴包金<sup>1</sup>, 林子豪<sup>1</sup>, 倪灿荣<sup>2</sup>, 刘 麒<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长征医院整形外科, 上海 200003; 2. 长海医院病理科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**探讨热应激预处理对皮瓣组织的保护作用及其与皮瓣中 HSP<sub>70</sub> 合成量的关系。**方法:**制作大鼠腹部岛状超长随意皮瓣活体原位热缺血模型, 采用免疫组织化学(EnVision 法)观察一定时间内不同温度(40、41、42、43、44 °C)热应激预处理后, 皮瓣中 HSP<sub>70</sub> 合成情况及其与皮瓣存活率的关系。**结果:**加热至 40~44 °C 30 min, HSP<sub>70</sub> 的合成量随温度升高而增多。相关分析表明, 除对细胞的致死性温度 44 °C 外, 其余各组皮瓣的 HSP<sub>70</sub> 合成量与皮瓣存活率呈正相关( $r=0.7577, P<0.01$ ), 41~43 °C 为诱发热休克反应、产生 HSP<sub>70</sub> 并发挥抗有害因素损伤作用、进而保护皮瓣的适宜温度。**结论:**HSP<sub>70</sub> 对皮瓣组织具有保护作用, 热应激预处理改善皮瓣存活率的保护作用与皮瓣内 HSP<sub>70</sub> 合成量呈正相关。

**[关键词]** 热应激预处理; 皮瓣; 热休克蛋白

**[中图分类号]** R 622 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)01-0024-03

## Heat stress pretreatment protecting island flaps and its relationship with content of HSP<sub>70</sub> in rats

WU Jian-ming<sup>1\*</sup>, WU Bao-jin<sup>1</sup>, LIN Zi-hao<sup>1</sup>, NI Can-rong<sup>2</sup>, LIU Qi<sup>1</sup> (1. Department of Plastic Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Shanghai 200433)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the relationship between the protective effect of heat stress pretreatment on island flaps and the content of HSP<sub>70</sub> in rats. **Methods:** Animal model of heat ischemia *in situ* was established by creating a right lower abdominal island random flap in the SD rats. The HSP<sub>70</sub> contents in the island flap at various times after pretreatment was detected by immunohistochemical method and the relationship between the change of HSP<sub>70</sub> in the flaps and their survival rate was analyzed statistically. **Results:** HSP<sub>70</sub> increased significantly along with the elevation of temperature within 40 °C-44 °C. Correlation analysis showed a positive correlation between the HSP<sub>70</sub> content and the survival rate of the flaps in all groups except 44 °C group, which was the deadly temperature to cells ( $r=0.7577, P<0.01$ ). The temperature within 41 °C-43 °C induced heat shock reaction and produced HSP<sub>70</sub> to counter the deleterious factors to protect the flaps. **Conclusion:** HSP<sub>70</sub> can protect the flaps and there is a positive correlation between heat stress pretreatment improving the survival of the island flap and the HSP<sub>70</sub> content in flap.

**[KEY WORDS]** heat stress pretreatment; skin flap; heat shock protein

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(1):24-26]

热应激预处理保护作用最先应用的领域为肿瘤的高温疗法, 即利用多种方法将人体全身加热至 40~42 °C, 或局部加热至 40~45 °C, 以达到杀死肿瘤细胞、治疗肿瘤疾患的目的。这种方法和放疗或化疗联用, 可以消除很多常规疗法难以治疗的肿瘤。无论是培养细胞还是生物体, 一旦暴露于强热环境中, 它们将合成一组在遗传上高度保守并具有重要作用的热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs), 其中 HSP<sub>70</sub> 是哺乳类动物细胞在热休克反应时表达最多的一类 HSPs<sup>[1, 2]</sup>。众多实验证实, HSPs 具有明显地抗缺血缺氧等有害因素对组织的损伤及维护组织细胞活性的作用。最近研究发现, 预先热应激处理大鼠, 能明显减轻缺血-再灌注损伤的影响<sup>[3~5]</sup>。而热休克预处理对皮瓣组织存活及其缺血-再灌注

损伤的影响, 迄今尚未见详细报道。本研究旨在探讨热应激预处理的保护作用与皮瓣中 HSP<sub>70</sub> 合成量的关系, 探讨热应激预处理改善皮瓣存活率的机制。

### 1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂 红外线热疗仪, 715 型针型半导体测温计, 三用紫外线分析仪, 半导体点温计(上海医用仪表厂), MIAS 2000 病理图像分析仪。一抗 HSP<sub>70</sub> 单克隆抗体及免疫组化试剂盒均系 DA-KO 公司产品。

[基金项目] 上海市科技发展基金(994119042)。

[作者简介] 吴建明(1963-), 男(汉族), 硕士, 副教授, 硕士生导师。现在复旦大学附属华山医院整形外科, 上海 200040。

\* Corresponding author. E-mail: wujianming63@sohu.com

1.2 动物及分组 SD雌性大鼠48只,购自第二军医大学实验动物中心,体质量250~300g,分为对照组和实验组(热应激预处理组),后者分别加热至40、41、42、43、44℃,按加热温度不同又分别分为实验I、II、III、IV、V组。对照组及实验各组各8只动物。

1.3 动物模型制备 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉。实验组及对照组的动物模型参考Myers模式,大鼠背部脱毛后,于大鼠背侧正中设计一长8 cm、宽2 cm,蒂部位于尾侧髂棘水平的超长随意皮瓣。从深、浅筋膜之间潜行分离制备皮瓣。

#### 1.4 动物处理及观察项目

1.4.1 热应激预处理方法及皮瓣存活率计算 每组4只大鼠加热后8 h取标本,取材部位为纵轴方向上皮瓣边缘中远1/3处。热应激预处理组:用红外线热疗仪照射大鼠背部皮瓣,距离40 cm,升温时间20 min,用715型针型半导体测温计监测,使皮瓣皮面温度升到43℃,真皮下温度42℃,持续30 min。受热后大鼠在室温下恢复6 h。预热应激后6 h,掀起整个皮瓣,皮瓣下置硅胶膜隔离,原位间断缝合,第7天测量存活长度。皮瓣存活参照Sasaki等<sup>[6]</sup>的方法以长度表示,存活长度与总长度之比的百分数为存活率。由于皮瓣存活部与坏死部之间界限多不与蒂部平行,故测量3个数值,即蒂部到最远界限、最近界限和中点3个长度,取其平均值作实际存活长度。对照组:不加热,其余同实验组。

1.4.2 标本采集取材及HSP<sub>70</sub>的检测 采用En-Vision 二步法检测对照组及实验组皮瓣组织内HSP<sub>70</sub>表达,并对其进行计算机图像半定量分析。每组4只大鼠加热8 h后切取标本,部位为纵轴方向皮瓣边缘中远1/3处,切取0.2 cm×0.2 cm皮瓣组织,将其迅速置于液氮预冷的异戊烷中防止冰晶形成,OCT包埋,置于-70℃冻存,保存时间不超过1个月。冰冻切片机(温度设置-22℃)10 μm厚连续切片,丙酮固定15 min 预处理,微波抗原修复后,置于PBS液中,滴加3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,室温下孵育10 min;PBS漂洗10 min,滴加一抗HSP<sub>70</sub>4℃过夜;PBS漂洗10 min后EnVision™ 37℃孵育30 min;PBS冲洗3×3 min,DAB显色,苏木精复染,中性树胶封片,光镜下观察。以PBS替代一抗为阴性对照。

1.4.3 阳性细胞判定标准及半定量分析 以细胞着棕色为阳性,着色部位位于胞核和胞质。皮瓣组织HSP<sub>70</sub>免疫组化染色在同一条件下一次完成。200倍光镜下随机选取10个视野观察阳性细胞的分布及染色情况,测量框大小为25×25像素点,256

个灰度级(0为黑,225为白),分别调定灰度值,由MIAS 2000病理图像分析仪免疫组化测量系统对捕获图像进行自动分析,测得平均阳性表达面积及着色区域的相对灰度值,计算HSP<sub>70</sub>染色阳性率(可间接反映HSP<sub>70</sub>合成量的相对变化)。

1.5 统计学处理 各实验组与对照组间均数差别的两两比较用Dunnett-*t*检验,并对5种温度预处理后HSP<sub>70</sub>的合成量与皮瓣存活率相互关系进行相关分析,由SPSS 6.12统计软件完成。

## 2 结果

2.1 对照组及实验各组的皮瓣存活率 对照组及实验I组皮瓣存活率[(3.61±0.41)% vs (4.19±0.43)%]相差不显著;实验II、III、IV组皮瓣存活率分别为(4.89±0.27)%、(5.15±0.54)%、(5.55±0.34)% ,均显著高于对照组( $P<0.01$ );而实验V组皮瓣存活率为(2.27±0.44)% ,显著低于对照组( $P<0.01$ )。

2.2 皮瓣存活率与HSP<sub>70</sub>合成量的关系 皮瓣组织HSP<sub>70</sub>免疫组化染色结果见图1。对照组未见HSP<sub>70</sub>的表达;实验I、II、III、IV、V组HSP<sub>70</sub>染色阳性率分别为(5.27±2.69)%、(18.25±7.94)%、(41.17±11.02)%、(57.39±8.98)%、(70.62±7.34)%。相关分析表明,除外对细胞的致死性温度44℃(V组)外,其余各组皮瓣的HSP<sub>70</sub>细胞阳性率与皮瓣存活率呈正相关( $y=3.5749+0.454\ln x$ ,  $r=0.7577$ ,  $P<0.01$ )。

## 3 讨论

热应激预处理即预先给生物或培养细胞强烈热刺激致其发生热休克反应产生HSPs,从而保护缺血缺氧组织的一种预处理方法。有关热应激预处理对组织器官的保护作用,学者们已进行了大量的研究。关于HSP<sub>70</sub>的代谢变化及HSP<sub>70</sub>合成量与其保护作用的关系,离体实验报道较多,然而其在动物体内的情况如何,却未见详尽论述。

Rinaldo等<sup>[7,8]</sup>对培养的内皮细胞研究表明,热应激反应2 h后,HSP<sub>70</sub>开始合成,4 h大量增加,8~24 h为高峰。这一结果与本研究对大鼠进行的在体实验研究结果相似。但不同之处为:HSP<sub>70</sub>被诱导合成后,其在动物体内存在的时间比在培养细胞内存在的时间更长。一次热应激预处理诱导合成的HSP<sub>70</sub>可在皮瓣组织中存在长达5 d,意味着其保护作用时间较长,可帮助皮瓣度过暂时缺血缺氧期,维持皮瓣活力,直至皮瓣血运重建。我们对HSP<sub>70</sub>

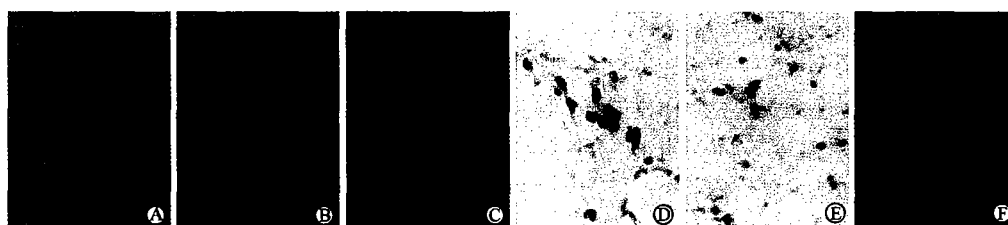


图1 皮瓣组织内 HSP<sub>70</sub>表达的免疫组化染色

Fig 1 Immunohistochemistry staining for HSP<sub>70</sub> in rat flaps (EnVision; A-C: ×400; D-F: ×200)

A: Negative expression of HSP<sub>70</sub> in the control group; B-F: Positive expression of HSP<sub>70</sub>

in the experimental group with heat stress pretreatment at 40°C, 41°C, 42°C, 43°C and 44°C respectively

的检测显示:经热应激预处理的皮瓣组织细胞中有大量的 HSP<sub>70</sub>合成,不同温度(40、41、42、43、44°C) 30 min 热应激预处理后, HSP<sub>70</sub>的合成量随温度升高而增多。相关分析表明,40~43°C 范围内皮瓣中 HSP<sub>70</sub>合成情况与皮瓣存活率呈正相关。提示在一定的温度范围内, HSP<sub>70</sub>对组织有重要的保护作用,而且这种保护作用的程度与 HSP<sub>70</sub>合成量密切相关。

HSP<sub>70</sub>对皮瓣组织细胞的保护作用可能从下列3个途径实现<sup>[9~13]</sup>:(1)保持细胞内蛋白质的结构及细胞自稳 HSP<sub>70</sub>的分子伴侣作用。皮瓣缺血、缺氧达6~8 h时,组织细胞内蛋白开始出现变性,细胞内受损的蛋白肽链分子空间结构发生改变,以致丧失原有功能;而经热应激处理的大鼠,其皮瓣细胞内产生有大量的 HSP<sub>70</sub>,它能使蛋白质变性的肽链重新折叠,恢复螺旋原型及其构象,同时 HSP<sub>70</sub>还有助于清除已坏死的蛋白,从而维持细胞的活力。(2) HSP<sub>70</sub>参与了细胞内酶活性的调控,并具有细胞内抗氧化作用,因而能降低缺血再灌注中氧自由基对组织细胞的损害,使得遭受损伤的皮瓣受到保护。(3)支持作用。HSP<sub>70</sub>能形成细胞骨架结构,提高细胞对应激反应的耐受力。

[参考文献]

[1] Rucker M, Schafer T, Roesken F, *et al.* Local heat-shock priming-induced improvement in microvascular perfusion in osteomyocutaneous flaps is mediated by heat-shock protein 32[J]. *Br J Surg*, 2001, 88(3): 450-457.  
 [2] Rucker M, Schafer T, Roesken F, *et al.* Reduction of inflammatory response in composite flap transfer by local stress conditioning-induced heat-shock protein 32[J]. *Surgery*, 2001, 129(3): 292-301.  
 [3] Koenig WJ, Lohner RA, Perdrizet GA, *et al.* Improving acute skin-flap survival through stress conditioning using heat shock

and recovery[J]. *Plast Reconstr Surg*, 1992, 90(4): 659-664.  
 [4] Wang BH, Ye C, Stagg CA, *et al.* Improved free musculocutaneous flap survival with induction of heat shock protein[J]. *Plast Reconstr Surg*, 1998, 101(3): 776-784.  
 [5] Ghavami A, Nutt MP, Hardy SP. Heat shock protein and high-dose aspirin: effects on random skin flap survival in a rat model [J]. *Ann Plast Surg*, 2002, 48(1): 60-67.  
 [6] Sasaki GH, Pang CY. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1980, 65(2): 152-158.  
 [7] Rinaldo JE, Gorry M, Strieter R, *et al.* Effect of endotoxin-induced cell injury on 70-kD heat shock proteins in bovine lung endothelial cells[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1990, 3(3): 207-216.  
 [8] Kabakov AE, Budagova KR, Bryantsev AL, *et al.* Heat shock protein 70 or heat shock protein 27 overexpressed in human endothelial cells during posthypoxic reoxygenation can protect from delayed apoptosis [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2003, 8(4): 335-347.  
 [9] 吴建明, 林子豪, 刘 麒, 等. 热应激预处理对皮瓣缺血再灌注损伤的影响及机制[J]. *中华整形烧伤外科杂志*, 1999, 15(5): 351-353.  
 [10] 杨大平, 马 辉, 夏双印. 缺血预处理后热休克蛋白对皮瓣成活的影响及作用机理[J]. *中华整形烧伤外科杂志*, 2002, 18(1): 22-24.  
 [11] Grossin L, Etienne S, Gaborit N, *et al.* Induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibitor MG 132 protects articular chondrocytes from cellular death *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biorheology*, 2004, 41(3-4): 521-534.  
 [12] Kiang JG. Genistein inhibits herbimycin A-induced over-expression of inducible heat shock protein 70 kDa [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 245(1-2): 191-199.  
 [13] Zhang Y, Zuiderweg ER. The 70-kDa heat shock protein chaperone nucleotide-binding domain in solution unveiled as a molecular machine that can reorient its functional subdomains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(28): 10272-10277.

[收稿日期] 2004-05-05

[修回日期] 2004-08-12

[本文编辑] 孙 岩