

# 急性心肌缺血/再灌注 HSP70 和 Fos 蛋白的表达 及其法医病理学意义

王曙光<sup>1</sup>, 徐小虎<sup>2</sup>, 陈玉川<sup>1</sup>, 成建定<sup>1</sup>, 胡丙杰<sup>1</sup>, 陈梅珍<sup>2</sup>, 黄旭平<sup>1</sup>

(1. 中山医科大学法医系法医病理学教研室, 广东 广州 510089; 2. 汕头大学医学院法医学教研室, 广东 汕头 515031)

**摘要:** 【目的】研究大鼠急性心肌缺血后不同时间再灌注心脏不同区域 HSP70 和 Fos 蛋白表达的规律, 为心肌缺血/再灌注损伤所致心性猝死的法医学诊断提供形态学依据。【方法】结扎大鼠左冠状动脉前降支建立急性心肌缺血/再灌注模型。用免疫组织化学方法, 观察心肌缺血后不同时间再灌注 HSP70 和 Fos 蛋白在心肌组织表达的改变。【结果】对照组心肌组织无 Fos 和 HSP70 表达。心肌缺血 15 min 再灌注 0.5 h 后 Fos 蛋白即在缺血区域表达, 随着再灌注时间延长表达增强; 非缺血区域 1 h 始有表达, 缺血区域表达明显强于非缺血区域。心肌缺血区域再灌注 1 h 后 HSP70 始有表达, 随着再灌注时间延长表达增强; 非缺血区域心肌 2 h 始有表达, 且明显弱于缺血区域。再灌注早期 HSP70 和 Fos 首先在心肌内层表达, 随着时间延长表达向心肌外层扩展。【结论】心肌缺血/再灌注早期不同时间 HSP70 和 Fos 蛋白表达有不同的区域性及强度, 有可能为早期心肌缺血/再灌注提供一项新的辅助诊断的形态学指标。

**关键词:** 心肌再灌注损伤/病理学; 热休克蛋白质类 70; 原癌基因蛋白质 C-FOS 类; 免疫组织化学; 法医学  
中图分类号: R541.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)02-0116-03

## The Expressions of Fos Protein and HSP70 on Acute Myocardial Ischemia/Reperfusion and the Significance in Forensic Pathology

WANG Shu-guang<sup>1</sup>, XU Xiao-hu<sup>2</sup>, CHEN Yu-chuan<sup>1</sup>, CHENG Jian-ding<sup>1</sup>,  
HU Bing-jie<sup>1</sup>, CHEN Mei-zhen<sup>2</sup>, HUANG Xu-ping<sup>1</sup>

(1. Department of Forensic Pathology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China;  
2. Institute of Forensic Medicine, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China)

**Abstract:** 【Objective】To study the expressions of Fos protein and HSP70 in the early stage of acute myocardial ischemia/reperfusion (I/R) in rats, and search the objective morphologic evidence for the forensic practice. 【Methods】I/R rat model was induced by ligation of the anterior branch of the left coronary artery. The expressions of Fos protein and HSP70 were detected with immunohistochemistry. 【Results】There were no expressions of Fos protein and HSP70 in control group. Fos protein began to express 0.5 h after reperfusion following 15 min ischemia in the ischemic areas, 1 h in the non-ischemic areas and more evidence with prolongation of reperfusion. The expression of HSP70 began to increase in myocytes 1 h after I/R in the ischemic areas, 2 h in the non-ischemic areas and more evidence with prolongation of reperfusion. The expressions of both of Fos protein and HSP70 were weaker in non-ischemic areas than in ischemic areas. Meanwhile the expressions of HSP70 and Fos protein appeared first in the inner layer of myocardium and extended toward the outer layer of myocardium. 【Conclusion】I/R induced the expressions of HSP70 and Fos protein and the location and intensity changed in difference stages. These results may be beneficial to the diagnosis of the early stage of acute myocardial I/R.

收稿日期: 2000-09-06

基金项目: 汕头大学医学院“211”工程重点学科建设资助课题(199913)

作者简介: 王曙光(1964-), 男, 山东泰安人, 博士生, 主治医师。

**Key words:** myocardial reperfusion injury/pathology; heat-shock proteins 70; proto-oncogene proteins c-fos; immunohistochemistry; forensic medicine

急性心肌缺血是造成心脏性猝死的主要原因,而一定时间缺血后再灌注不但可以加重心肌损伤,还可造成致命性心律失常。据报道在冠心病猝死者中,只有10%可见冠状动脉的新鲜血栓,而90%并无上述病变。说明尚有很多情况是由冠脉痉挛突然缓解和血栓溶解后再灌注所造成的。由于缺血时间过短,常规HE等染色技术看不出心肌的明显变化,难以作出心脏性猝死的诊断,给法医学检案带来很大困难。因此寻找能对短期心肌缺血/再灌注做出早期诊断的方法便格外重要。热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)为组织损伤的早期标志,在组织细胞没发生坏死以前即可表达<sup>[1]</sup>。而c-fos的产生有助于HSP70转录过程的激活,可能是HSP70表达的始动者<sup>[2]</sup>,Fos为c-fos的蛋白产物。我们检测实验性大鼠心肌缺血/再灌注心肌局部的HSP70和Fos蛋白,探讨两者表达的共同规律及其差异,以期能为心脏性猝死的法医学诊断提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物分组及模型的制备

中山医科大学动物中心提供成年Wistar大鼠42只,随机分为7组,每组6只,雌雄不限,体质量250g左右。分别为断颈处死组;心肌缺血15min组;缺血15min后再灌注0.5h组、1h组、2h组、4h组、6h组。大鼠用戊巴比妥钠45mg/kg腹腔麻醉后,立即气管插管,开胸后行人工呼吸(DH-140型动物人工呼吸机,中国浙江)。胸骨左侧扪及心脏搏动处行纵行切口,剪断肋骨两根,将心脏挤出胸腔外。以肺动脉圆锥及左心耳交界处的冠状静脉主干为标志(此处冠状动、静脉并行,动脉位于静脉之下),以0/3丝线穿过左心耳下缘的心肌浅层,穿线后将丝线两端套入一直径2mm的聚乙烯管中,抽紧丝线,将塑料管压向冠状动脉并结扎,15min后剪掉塑料管及丝线。在不同时间取出心脏,40mL/L福尔马林固定,分别取缺血区域(左冠脉前降支支配区)及正常区域(右心室)组织进行石蜡包埋。常规HE染色。

### 1.2 HSP70、Fos免疫组织化学

HSP70和Fos抗(美国Sigma生物试剂公司),

SABC试剂盒(武汉博士德公司),DAB显色剂(武汉博士德公司)。各组心脏标本石蜡切片厚5 $\mu$ m,免疫组织化学染色照说明书进行。PBS取代一抗作阴性对照。

### 1.3 图像分析及统计学处理

各组照片均应用Quantiment-520图像分析仪(英国剑桥)对免疫组化阳性反应进行定量分析。每张切片随机选取10个高倍视野,测量一定面积内阳性信号面积(HSP70)、阳性细胞率(Fos)及阳性信号平均灰度值,计算阳性指数(PI),PI(HSP70)=阳性信号面积 $\times$ 阳性信号平均灰度值/测定面积,PI(Fos)=阳性细胞率 $\times$ 阳性信号平均灰度值。所有数据应用SPSS for Windows软件包进行方差分析、t检验等统计学处理,数据应用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 2 结 果

### 2.1 常规HE染色

正常对照组和不同时间缺血/再灌注组心肌细胞均染色清晰,横纹清楚。细胞核致密,染色清晰。未见细胞坏死。

### 2.2 HSP70和Fos免疫组织化学染色

对照组心肌组织无Fos蛋白和HSP70表达。实验组Fos蛋白再灌注0.5h后即在缺血区域表达,非缺血区域1h时始有表达。再灌注1h后HSP70始在缺血区域表达,非缺血区域2h始有表达。两者均随着再灌注时间延长表达增强,且非缺血区域表达始终弱于缺血区域。同时发现再灌注早期HSP70和Fos蛋白均先于心肌内层表达,随着时间延长表达向心肌外层扩展。再灌注0.5hFos表达主要在心肌内层,1h时即已扩展到心肌全层,4h时心肌外层表达明显强于心肌内层。再灌注1、2h时HSP70表达主要在心肌内层,4、6h时表达扩展至心肌全层。

各组心脏不同区域免疫组化染色图像分析处理结果见表1。

## 3 讨 论

心肌缺血再灌注所致心脏性猝死,往往由于缺

表 1 心肌细胞 HSP70、Fos 蛋白免疫组化染色阳性指数

Table 1 Index of HSP70 and Fos protein positive staining in myocardial myocytes

Group	Index of HSP70 positive staining		Index of Fos positive protein staining	
	Ischemic area	Non-ischemic area	Ischemic area	Non-ischemic area
Control	0.04±0.02	0.02±0.01	0.04±0.02	0.03±0.01
Ischemia 15 min	0.06±0.02	0.02±0.01	0.04±0.03	0.04±0.02
Reperfusion 0.5 h	0.07±0.02	0.03±0.01	6.28±4.36 <sup>2)</sup>	0.08±0.05
Reperfusion 1 h	0.26±0.11 <sup>1)</sup>	0.04±0.02 <sup>3)</sup>	16.2±11.8 <sup>2)</sup>	2.47±3.69 <sup>2),3)</sup>
Reperfusion 2 h	1.10±0.62 <sup>2)</sup>	0.09±0.06 <sup>1),3)</sup>	22.3±13.5 <sup>2)</sup>	10.1±8.77 <sup>2),3)</sup>
Reperfusion 4 h	3.22±1.72 <sup>2)</sup>	0.59±0.35 <sup>2),3)</sup>	30.1±16.1 <sup>2)</sup>	15.8±14.3 <sup>2),3)</sup>
Reperfusion 6 h	5.90±2.02 <sup>2)</sup>	1.42±1.02 <sup>2),3)</sup>	34.2±24.7 <sup>2)</sup>	20.9±17.4 <sup>2),3)</sup>

Compared with control group(A1 group): 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$ . Non-ischemic areas compared with ischemic areas; 3)  $P < 0.01$

血时间过短,而无有诊断意义的常规病理学改变,这给判断死因带来很大困难。目前仍未发现一种灵敏、可靠和特异的检测早期心肌缺血再灌注的病理形态学方法,故其诊断仍然是法医病理学领域中的一大难题。

Fos 和 HSP70 在正常心肌很少表达,而在冠脉阻塞或再灌注时,则快速表达<sup>[3]</sup>。Plumier<sup>[4]</sup>报道心肌缺血 30 min 再灌注 30 min 后 HSP70、c-fos mRNA 在缺血区域表达,而在非缺血区域较少或不表达。本研究室曾对不同时间缺血相同时间再灌注 Fos 蛋白的表达进行研究,发现在缺血区域,心肌缺血 30 min 再灌注 30 min 后始有 Fos 蛋白表达,缺血 90 min 后再灌注表达增强,缺血 180 min 表达有所减弱<sup>[5]</sup>。本研究对短暂心肌缺血后不同时间再灌注引起局部 Fos 蛋白和 HSP70 的变化进行观察,结果表明在缺血区域, Fos 蛋白、HSP70 分别在心肌缺血 15 min 再灌注 0.5 h、1 h 后始有弱表达。与以往不同的是在非缺血区域 Fos 蛋白、HSP70 也分别在再灌注 1 h、2 h 后出现表达,且随着时间的增加表达增强,但非缺血区域表达始终弱于缺血区域。心肌缺血再灌注时 HSP70 产生的主要原因可能为,氧自由基产生扰乱了蛋白质代谢,产生了分子作用的底物,从而导致热休克因子 1 (HSF1) 激活,诱导 HSP70 蛋白产生和 HSP70 mRNA 基因的表达<sup>[6]</sup>。而 Fos 蛋白表达亦与氧自由基的产生有很大关系<sup>[5]</sup>。非缺血区(右冠脉支配区) HSP70 和 Fos 表达的可能原因为心肌缺血及再灌注造成心功能明显下降,同时伴心律失常反复发作,引起冠状动脉血流量降低,造成全心缺血及 ATP 合成明显减少,使蛋白质变性所致。以往的

研究结果不表达可能是由于再灌注时间过短所致。再灌注早期 HSP70 和 Fos 蛋白均主要先于心肌内层表达,随着时间延长表达向心肌外层扩展。这也说明一般情况下心内膜缺血往往早于心外膜。从时间和表达区域来看, HSP70 和 Fos 蛋白表达有类似特点,但 Fos 蛋白表达早于 HSP70 表达,此现象亦支持原癌基因是 HSP 表达始动基因的观点。

HSP70 和 Fos 蛋白表达有可能为早期心肌缺血/再灌注提供一项新的辅助诊断的形态学指标。

#### 参考文献:

- [1] Pearigen P, Gwinn R, Simon R P, *et al.* The effects *in vivo* of hypoxia on brain injury[J]. *Brain Res*, 1996, 725 (1): 184.
- [2] Sharp F R. Heat-shock protection[J]. *Trends Neurosci*, 1999, 22(3): 97.
- [3] Tajima M, Isoyama S, Nitta Y, *et al.* Attenuation of HSP expression by coronary occlusion in hypertrophied hearts[J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(2 pt 2)H: 526.
- [4] Plumier J C, Robertson H A, Currie R W, *et al.* Differential accumulation of mRNA for immediate early genes and heat shock gene in heart after ischemic injury[J]. *J Mol Cardiol*, 1996, 28(6): 1251.
- [5] 马孟云, 徐小虎, 陈玉川. 大鼠心肌急性缺血再灌注 Fos 蛋白表达及其意义[J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(4): 272.
- [6] Nishizawa J, Nakaki A, Matsuda K. Reactive oxygen species play an important role in the activation of heat shock factor 1 in ischemic reperfused heart[J]. *Circulation*, 1999, 99(7): 934.

(编辑 黄小延)