

热休克蛋白对动脉壁的病理生理学意义

叶平 综述 王士雯 审校

(解放军总医院, 北京 100730)

热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)是由 20 余种蛋白质组成的蛋白质家族的总称。从原生细胞、动物到人类,不同种属的 HSP 的氨基酸序列具有高度同源性^[1]。根据 HSP 分子量不同,分为 HSP 90(分子量 90 kDa)、HSP 70(分子量 70 kDa)、HSP60 和小分子量的 HSP 族。由于不同种属间 HSP 的氨基酸序列具有高度同源性,宿主对病原体的 HSP 和对自身的 HSP 可产生交叉免疫反应,因此 HSP 具有抗原性。某些疾病,如动脉粥样硬化(atherosclerosis, As),系统性硬化症等与 HSP 的抗原性有关^[2]。

在各类 HSP 中,对哺乳动物的 HSP70 的研究最为广泛。HSP70 具有转运细胞内新合成的蛋白质及清除变性蛋白质的功能,对防止细胞损伤及加速损伤后细胞修复具有重要意义。在多种应激因子的刺激下,HSP 含量增加有利于抵御外来刺激的影响,保护细胞免于受损^[3]。

如果动脉壁长期受到高血压、毒素、高血症脂和氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, LDL)等因素的刺激,血管内皮细胞和平滑肌细胞不能对这些刺激产生相应防御反应,血管壁就会受损,继而出现病变。近年来的研究显示,血压急性升高引起血流动力学变化时,动脉壁的 HSP70 含量增加,这是对动脉壁的一种保护性反应;而在 As 区域 HSP60 含量增加,说明 HSP60 可能参与 As 的病理过程^[3]。本文综合近年来对 HSP 的研究进展,就应激状态下 HSP 对动脉壁的病理生理意义作一简要综述。

1 热休克蛋白与急性高血压

1.1 血流动力学应激反应中热休克蛋白的产生

热休克蛋白功能和调节的研究大多来自体外细胞培养的结果^[1]。虽然已知在整体动物中不同刺激可诱导 HSP 产生,但对 HSP 在体内如何被诱导所知甚少。最近 Udelan 等^[4]用限制动物活动和外科手术方法在大鼠主动脉选择性地诱导 HSP70 mRNA 的表达和 HSP70 的产生。 α 受体拮抗剂(哌唑嗪)可抑制活动受限制大鼠的 HSP70 基因在主动动的表达,而 α 受体兴奋

剂(新福林)可诱导这种表达。提示 HSP70 在活动受限制动物中的表达是通过 α 受体介导的。但另有研究结果提示,给动物注射血管加压素、多巴胺或可卡因,至少可部分效仿这种诱导作用,提示 α 受体以外的其他受体途径也可能发挥重要作用^[5,6]。此外,气流冲击使大鼠血压升高也可诱导 HSP70 基因的表达^[7]。

Xu 等^[8]给大鼠体内注射四种作用机理不同的药物(新福林、多巴胺、At II 和内皮素 I)使血压升高,观察血压升高与血管壁的 HSP70 mRNA 表达之间的关系。结果显示:血管加压素诱导的 HSP70 mRNA 表达呈剂量依赖型,而其他药物诱导 HSP70 基因的表达量与血压升高的程度相关。血管扩张剂硝普钠非特异性抑制上述药物的升压作用,可阻滞 HSP70 的表达。老龄动物在活动受限制后血压升高不明显,HSP70 的表达应较年青动物为轻。这些发现支持一个假设,即 HSP70 基因在动脉壁的表达是对急性高血压的一种生理性反应。

1.2 热休克蛋白 70 基因表达的机理

虽然 HSP70 mRNA 表达的确切机制并不清楚,但可推测急性高血压期间血流动力学改变造成的机械刺激是诱导动脉壁 HSP70 基因表达的主要原因之一。早期研究使用离体灌注心脏,牵拉心肌和增加心内压诱导动脉壁 HSP70 基因的表达^[9]。最近研究发现,如将老龄鼠的主动脉移植于年青鼠的体内,动脉壁 HSP70 基因的表达量高于老龄鼠;相反,如将年青鼠的主动脉移植于老龄鼠的体内,主动脉壁的这种反应减轻^[10]。说明主动脉所处的内环境对 HSP70 表达的影响较血管本身更为重要,即 HSP70 的表达量取决于宿主在应激状态下血压升高的能力。这种能力随年龄增加而降低。

热休克反应的调节取决于基因转录水平,由一种或多种热休克因子(heat shock factors, HSF)所介导。这些 HSF 与一种存在于 HSP 基因启动子区的热休克成份(heat shock element, HSE)发生相互作用^[1]。HSF 以非 DNA 结合状态存在于细胞内,在不同应激状态下被激活后与 DNA 结合。目前对 HSF 激活过程了解不多,但根据体外细胞培养的研究结果推测,这一过程涉及 HSF 由一聚体变为三聚体的寡聚化过程,以及与

HSF 的过磷酸化有关^[11]。

哺乳动物有两种特异性 HSF, 受特异性信使系统支配。HSF1 参与高温、重金属和氨基酸类似物诱导 HSP70 表达基因的过程; 而 HSF2 在体内试验中与人红细胞分化期含铁原卟啉氯化血红蛋白刺激的 HSP70 基因表达有关^[12]。最近的研究结果显示, HSP70 在动脉壁的产生由高血压激活 HSF1 所介导。大鼠被捆绑或给予升压拒绝药 血压急性升高。鼠的血管蛋白与含 HSE 序列的 DNA 结合, 蛋白-DNA 复合物中含有 HSF1。虽然鼠主动脉壁的 HSF1 含量较其他组织明显低, 但以过磷酸化形式存在^[13]。表明在血流动力学应激期, HSF1 呈激活状态, 诱导 HSP70 的产生。

急性高血压如何触发 HSF1 的激活过程尚不明了。有人假设血压升高对血管壁的牵拉作用, 使细胞支架蛋白移位, 平滑肌细胞中的其他蛋白变性。变性蛋白激活 HSF1, 成为启动 HSP70 基因转录的信使。在此过程中, 内皮细胞和平滑肌细胞中新生的蛋白质也是激活 HSF1 的信使系统, 刺激 HSP70 基因的表达。急性血压升高还激活有丝分裂激活蛋白激酶(MAPK)的连锁反应, 继而激活其他转录因子—激动蛋白-1(AP-1)^[14]。AP-1 启动多种基因转录, 导致细胞增殖。

1.3 热休克蛋白在血流动力学应激反应中的作用

过度劳累、药物毒性、噪音及精神压力等都可使血压升高, 可能严重损伤血管壁, 甚或导致局部血管破裂。急性高血压时血管壁 HSP70 基因表达量增加说明 HSPs 对细胞的保护作用。

血流动力学变化刺激动脉壁, 激活 AP-1, 诱导基因转录, 继而加速蛋白质合成。HSP70 保护新生的多肽链和大分子复合物, 可在细胞恢复正常环境时加速正常蛋白质的合成过程。HSP70 促进在血流动力学应激状态下受损和移位的蛋白质的修复, 加速不可逆性损伤的蛋白质的降解和清除。因此, HSP70 有利于维持应激状态下血管细胞内环境的恒定^[15]。

此外, 血管壁的 HSP70 还有三种功能: ①HSP70 对非应激细胞内的蛋白折叠, 蛋白选择和大分子蛋白复合物的组合等发挥分子前体作用; ②HSP70 参与调节基因的信息传递过程, HSP70 可调节自身基因的表达将 3 中第 4 小段排至第 3 小段; ③HSP70 的产生与细胞增殖有关, 特别是在细胞合成期更为明显。细胞受到刺激后, 细胞内 HSP70 基因表达暂时性地与极早期反应基因 *c-fos* 和 *c-jun* 的表达相一致^[11]。*c-fos* 和 *c-jun* 基因形成不同二聚体的 AP-1, 在细胞增殖中发挥转录因子作用^[16]。急性高血压可同时激活 AP-1 和 HSF1 两种转录因子, 刺激 HSP70 和 *c-jun* 的产生, 参

与血流动力学应激状态下对血管平滑肌细胞增殖的调节。

最近的研究热点集中于 HSP70 对心血管疾病的保护作用。例如: 通过转基因动物使 HSP70 基因过度表达, 动物对缺血损伤的抵御力增强^[16]。As 病变部位 HSP70 含量增多可能有利于动脉壁平滑肌细胞的存活^[17]。深入研究 HSP70, 将有利于进一步说明血管壁 HSP70 含量增加可否增强血管壁在血流动力学应激状态下的自我保护能力。

2 热休克蛋白与慢性高血压

慢性高血压是人类常见的心血管疾病, 其机理在于血管壁平滑肌细胞的增生, 导致血管壁增厚、硬化。最近研究表明, 自发性高血压动物受到热刺激后血管壁的 HSP70 基因的表达量明显高于正常血压动物。体外细胞培养和动物体内试验显示这种过度表达呈血压依赖性, 并与 HSP70 基因的多态性有关^[18]。Blake 等报道, 气流应激状态下可使正常血压鼠主动脉的 HSP70 基因表达增强, 同时发生慢性高血压^[17], 但机理不明。

如果在细胞培养中长期给予某种刺激, 热休克反应呈减弱状态, Sorger 等^[11]认为这是对刺激的一种耐受反应。慢性高血压可能以同样的机理影响 HSP70 基因的表达。自发性高血压大鼠 SHR 的基础收缩血压已达 150 mmHg, 处于非应激状态的 SHR 动脉壁的 HSP70 基因表达无变化, 但在正常血压大鼠足以诱导 HSP70 基因表达^[8]。如果给予 HSRs 某些应激刺激使其血压高于基础水平, HSP70 基因表达增强。由此提示, 慢性高血压的 HSP70 表达量取决于血压急性升高, 而非应激状态的基础血压水平关系不大。慢性高血压时机体已适应于高血压状态, 造成动脉壁 HSP70 基因表达的血压阈值要高于慢性高血压的基础血压水平。

3 热休克蛋白与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化为一慢性进行性疾病。Berberian 等^[20]首先报道人类 As 部位 HSP70 含量增加, 对平滑肌细胞的存活有保护作用。但是 Xu 等^[21]用 HSP60 的类似物 HSP65 免疫兔, 促使血总胆固醇值正常的兔发生 As 病变, 提示对 HSP65 的免疫反应可能直接促进 As 的病理过程。

3.1 热休克蛋白 60 的产生

在应激状态下血管平滑肌细胞产生 HSP60。采用识别分枝杆菌 HSP60 和人类 HSP60 共同抗原决定簇的单克隆抗体(ML-30)标记细胞观察到, 主动脉内皮细

胞在体外经高温和重组肿瘤坏死因子 α 刺激后,合成大量的HSP60。细菌毒素、过氧化物等,使也可刺激主动脉内皮细胞HSP60含量增加。OLDL作为As的重要危险因素,在体外可诱导内皮细胞合成HSP70和HSP60^[22]。另外,在人和兔As病变表层的内皮细胞中HSP60含量明显高于其他正常动脉内膜,说明HSP60可能与As的发生有关。

3.2 热休克蛋白60抗体

流行病学研究显示:超声发现有颈动脉动脉硬化病变者的血清抗分枝杆菌HSP65抗体(与HSP60有交叉反应)水平明显高于无As病变者,并独立于其他As的危险因素^[21],说明HSP65抗体水平与颈As病变有显著的相关性。其他心血管疾病,如心肌病患者也有血清HSP60抗体水平升高^[23]。上述结果提示,测定血清HSP65抗体可能成为有助于判断心血管疾病及其预后的一项新指标。

热休克蛋白60抗体的产生机理可能为^[24]:①易感个体感染HSP60同源物后可产生自身免疫反应;②病毒感染使HSP60多肽整合入未成熟的病毒,这些多肽在体内具免疫原性;③病毒感染后HSP60结构改变或翻译后修饰,HSP60本身具有免疫原性;④常规注射疫苗(特别是热灭活细菌可诱导HSP抗体的产生。

3.3 对热休克蛋白60的免疫反应与动脉粥样硬化

使用含HSP65抗体的人类血清和对不同类型细胞特异性的抗体,以双萤光标记As病变,显示病变处的内皮细胞、巨噬细胞和平滑肌细胞内存在的高浓度的HSP60^[24]。Schett等^[25]以结合层析法纯化As患者的HSP65抗体,发现这些抗体对内皮细胞介导毒性作用。通过免疫印迹法显示,这些抗体在热休克处理内皮细胞内可特异性地与重组分枝杆菌HSP65、重组人HSP60和60kDa蛋白结合。通过补体介导的细胞毒性,或周围血中单核细胞抗体依赖性细胞毒性,使热休克性内皮细胞被溶解。说明As患者体内的这些自身抗体不仅与分枝杆菌HSP65起反应,而且还与平滑肌细胞中的HSP60起反应,成为As病变的始动因子之一。此外,As病变中T细胞群也与分枝杆菌的HSP65发生特异性反应,提示细胞介导的对HSP60的免疫反应参与As的发病。

动脉粥样硬化发病中的免疫机制可归纳为:高胆固醇血症、热处理、感染、血流动力学变化等各种刺激因素可刺激内皮细胞产生HSP,并使位于内皮细胞表面的HSP60抗原决定簇被显露。血循环中的抗HSP65抗体、抗HSP60抗体或T细胞便可与暴露于细胞表面的HSP60发生反应。由于HSP与非HSP间序

列的同源性,抗HSP60抗体和T细胞还可与主动脉内皮细胞的非HSP有交叉反应,进而损伤内皮细胞,产生早期As病变。然后抗体穿过早期As病变处受损的内皮细胞,与巨噬细胞或泡沫细胞表面大量存在的HSP60特异性结合,细胞溶解,坏死组织成为进展期As病变的核心。其结果使内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞释放不同的细胞因子,这些细胞因子又进一步促进病变处的细胞增生,加速As病变的发展。

参考文献

- Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock protein genes. *Science*, 1993, **259**: 1409~410.
- Wick G. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today*, 1995, **16**: 27~33.
- Young RA, Elliot TJ. Stress proteins, infection and immune surveillance. *Cell*, 1989, **59**: 5~8.
- Udelsman R, Blake MJ, Stagg CA, et al. Vascular heat shock protein expression in response to stress. *J Clin Invest*, 1993, **91**: 465~473.
- Blake MJ, Buckley DJ, Buckley AR, et al. Dopaminergic regulation of heat shock protein 70 expression in adrenal gland and aorta. *Endocrinology*, 1993, **132**: 1063~1070.
- Blake MJ, et al. Neural and endocrine mechanisms of cocaine-induced 70 kDa heat shock protein expression in aorta and adrenal gland. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, **268**: 522~529.
- Blake MJ, Blevay LM, Halas ES, et al. Blood pressure and heat shock protein expression in response to acute and chronic stress. *Hypertension*, 1995, **25**: 539~544.
- Xu Q, Li DG, Holbrook NJ, et al. Acute hypertension induces heat shock protein gene expression in rat aorta. *Circulation*, 1995, **92**: 1223~229.
- Knowlton AA, Eberli FR, Brecher P, et al. A single myocardial stretch or decreased systolic fiber shortening stimulates the expression of heat shock protein 70 in the isolated, perfused rabbit heart. *J Clin Invest*, 1991, **88**: 2018~2025.
- Udelsman R, Li DG, Stagg CA, et al. Aortic cross-transplantation between young and old rats: effect upon heat shock protein 70 response. *J Gerontol*, 1995, **50A**: B187~192.
- Sorger PK. Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*, 1991, **65**: 363~366.
- Sistonen L, Sarge KD, Morimoto RI, et al. Human heat shock factor 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce HSP70 gene transcription. *Mol Cell*

Biol, 1994, **14**: 2 087~099.

13 Xu Q, Fawcett TW, Udelsman R, et al. Activation of heat shock transcription factor 1 in rat aortas in response to high blood pressure. *Hypertension*, 1996, **28**: 53~57.

14 Xu Q, Liu Y, Gorospe M, et al. Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest*, 1996, **97**: 508~514.

15 Knowlton AA. The role of heat shock protein in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, **27**: 121~131.

16 Marber MS, Mestril R, Chi SH, et al. Overexpression of the rat inducible 70 kDa heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest*, 1995, **95**: 1 446~456.

17 Johnson AD, Berberian PA, Tytell M, et al. Differential distribution of 70 kDa heat shock protein in atherosclerosis; its potential role in arterial SMC survival. *Arterioscler Thromb Vaso Biol*, 1995, **15**: 27~36.

18 Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 16 483~486.

19 Hamet P, Kong D, Pravence M, et al. Restriction fragment length polymorphism of HSP70 gene, localized in the RTI complex, is associated with hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1992, **19**: 611~614.

20 Berberian PA, et al. Immunohistochemical localization of heat shock protein 70 in normal appearing and atherosclerotic specimens of human arteries. *Am J Pathol*, 1990, **136**: 71~80.

21 Xu Q, Willeit J, Marosi M, et al. Association of serum antibodies to heat shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet*, 1993, **341**: 255~259.

22 Zhu W, Roma P, Pellegata F, et al. Oxidized-LDL induces the expression of heat shock protein 70 in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **200**: 389~394.

23 Latif N, Baker CS, Dunn MJ, et al. Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and Western blotting. *J Am Coll Cardiol*, 1993, **22**: 1 378~384.

24 Xu Q, Luef G, Weimann S, et al. Staining of endothelial cells and macrophages in atherosclerotic lesions with human heat shock protein-reactive antisera. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13**: 255~259.

25 Schett G, Xu Q, Amberger A, et al. Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 2 569~577.

(1997-04-09 收到, 1997-06-10 修回)

名词术语的汉英对照及缩写(IV)

纤维蛋白原	fibrinogen
动脉成形术	arterioplasty
动脉硬化性闭塞	arteriosclerotic occlusion, ASO
动脉阻塞性疾病	arterial occlusive (obstructive) disease, AOD
动脉硬化性阻塞性疾病	arteriosclerotic occlusive disease, ASOD
动脉氧去饱和	arterial oxygen desaturation, AOD
动脉粥样硬化形成	atherogenesis
氯化三苯基四氮唑	triphenyltetrazolium chloride, TTC
氯化四甲铵	tetramethyl ammonium chloride, TMAC
氯化四乙铵	tetraethyl ammonium chloride, TEAC
平均光密度	average optical density, AOD
牛磺胆酸钠	sodium taurocholate, SDC
牛磺去氧胆酸	taurodeoxycholic acid, TdCA
凝血酶原	thrombogen