

冷库作业工人淋巴细胞中 HSP70 水平的研究

周 舫^{1,2}, 谷 庆³, 张仁忠⁴, 徐 海⁵, 何美安², 蒋长征², 吴逸明¹, 邬堂春²

(1. 郑州大学公共卫生学院, 河南 郑州 450052; 2. 华中科技大学同济医学院职业医学研究所, 湖北 武汉 430030; 3. 射阳县人民医院, 江苏 射阳 224300; 4. 射阳县疾病预防控制中心, 224300; 5. 射阳县卫生监督所)

摘要: 目的 研究冷应激对冷库作业工人体内 HSP70 水平的影响及可能的机制。方法 选取冷库作业工人为研究对象, 其中保鲜冷库 (0℃组) 53 人, 水产冷库 (-20℃组) 53 人; 另选年龄、性别、劳动强度与之匹配的、不从事有毒有害作业的村民 58 人作为对照。用 Western blot 法检测淋巴细胞 HSP70 水平。结果 0℃组和 -20℃组分别与对照组相比, 其淋巴细胞 HSP70 水平明显增高, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 0℃组与 -20℃组相比, HSP70 水平差异无显著性 ($P > 0.05$)。结论 低温环境作为一种应激因素, 可使体内热应激蛋白合成与表达增加。

关键词: 热应激蛋白 70 (HSP70); 冷应激; 生物标志物

中图分类号: R134.3; R446.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2004)03-0154-03

Survey on HSP70 level in lymphocytes of cold storage workers

ZHOU Fang^{1,2}, GU Qing³, ZHANG Ren-zhong⁴, XU Hai⁵, HE Mei-an², JIANG Chang-zheng², WU Yi-ming¹, WU Tang-chun²

(1. College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Institute of Occupational Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 3. People's Hospital of Sheyang, Sheyang 224300, China; 4. Center for Disease Control and Prevention of sheyang, Sheyang 224300, China; 5. Sheyang Institute for Health Inspection, Sheyang 224300, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of cold stress on HSP70 and the possible mechanism. **Method** 53 workers working under 0℃ and 53 workers working under -20℃ were respectively as 0℃ and -20℃ cold storage groups and 58 matched villagers as control, using Western-dot-blotting to determine HSP70. **Result** HSP70 levels increased significantly in both cold storage groups ($P < 0.05$) compared with control group but no difference between 0℃ and -20℃ group ($P > 0.05$). **Conclusion** The increase of HSP70 in cold storage groups suggested that low temperature might be a stress factor of working environment and HSP70 might be a reliable biomarker of this kind of occupational hazards.

Key words: Heat stress protein 70 (HSP70); Cold stress; Biomarker

长期从事低温作业除可引起冻伤外, 还可对人的心血管系统、免疫系统、中枢神经系统以及骨关节产生危害, 导致一些相关疾病。目前, 对于低温作业导致的危害及其机制研究相对较少。

热应激蛋白是由于环境因素作用于机体, 诱导机体产生的一组蛋白质。其主要作为分子伴侣, 参与蛋白质的合成、折叠、装配和转运, 协助变性蛋白质的复性与清除。热应激蛋白是近来劳动卫生界研究的热点之一, 已有许多研究结果表明其与职业危害因素存在相关关系, 因此有学者提出将热应激蛋白抗体作为职业危害的生物标志物。在很多疾病状态下, 血浆中可以测到热应激蛋白抗体表达升高, 如慢性苯中毒^[1]、高温中暑^[2]、某些自身免疫性疾病等。本研究以冷库作业工人为研究对象, 检测淋巴细胞 HSP70

水平, 以探讨低温作业对机体可能的危害与机制。

1 对象与方法

1.1 对象

选取江苏省某县冷库作业工人 106 人, 其中保鲜冷库 (0℃组) 53 人, 水产冷库 (-20℃组) 53 人。另选年龄、性别、劳动强度与之相仿、不从事有毒有害作业的村民 58 人作对照组。

1.2 方法

1.2.1 劳动卫生学调查 包括作业场所温度, 工人作业时间、劳动强度等。

1.2.2 抗原检测 常规分离淋巴细胞, 低温冻存。采用 Western blot 法检测淋巴细胞 HSP70 抗原水平。具体步骤: 取冻存淋巴细胞复温; 去上清 (用滤纸吸干多余液体), 加入 5 倍体积冰冷悬浮缓冲液 [0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris·Cl (pH7.6), 0.001 mol/L EDTA (pH8.0), 100 μg/ml PMSF, 2 μg/ml Leupeptin], 立即混匀; 蛋白定量, 加入等体积 2×SDS 加样缓冲液, 吹打混

收稿日期: 2004-03-17; 修回日期: 2004-04-26

基金项目: 江苏省卫生厅预防医学科研基金资助项目 (Y2002025)

作者简介: 周舫 (1974-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 应激医

学、职业肿瘤

匀, 98 °C 变性 10 min; 灌胶, 按 10 μ L/孔加样; 电泳, 样品经 80 V, 20~30 min 在浓缩胶与分离胶交界得到压缩, 随后经 120~140 V, 60 min 分离; 转膜, 取凝胶, 300 mA, 40~60 min 转入 NC 膜; 丽春红 S 染色, 标记分子量标准; 封闭液封闭 37 °C, 1 h; I 抗 R70 抗体 (1:5 000) 孵育 4 °C 过夜, PBS-Tween 20 (0.05%) 洗 3 次, 5 min; II 抗 (HRP-羊抗兔 IgG) 1:5 000 反应 37 °C, 1 h; PBS-Tween 20 (0.05%) 洗 3 次, 5 min; DAB 显色液显色 2 min, PBS 终止。结果扫描保存, 计算积分光密度并将其量化。

1.2.3 统计分析 用 SPSS11.0 软件进行数据分析与整理。其结果以均数 $\bar{x} \pm s$ 或阳性的百分率表示。可信限根据组间差异显著性的不同水平, 以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 工作环境调查 保鲜冷库平均温度约为 0 °C, 水产冷库平均温度约为 -20 °C, 每天平均工作时间 4 h, 劳动强度中等。

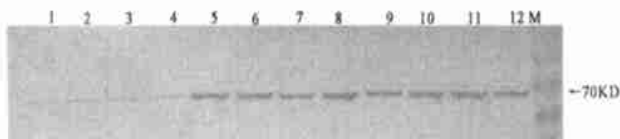
2.2 淋巴细胞中 HSP70 表达水平

0 °C 组与 -20 °C 组分别与对照组比较, 其 HSP70 水平明显增高, 差异有显著性 ($P<0.05$)。0 °C 组与 -20 °C 组相比, HSP70 水平差异无显著性 ($P>0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 冷库作业人员与对照人群淋巴细胞中 HSP70 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HSP70 (积分光密度)
0 °C 组	53	6 746.3 $\pm$ 834.9 *
-20 °C 组	53	6 517.4 $\pm$ 828.7 *
对照组	58	4 094.5 $\pm$ 574.2

* 与对照组相比, $P<0.05$



1~4 道: 对照组 5~8 道: 0 °C 组 9~12 道: -20 °C 组

图 1 冷库组与对照组淋巴细胞 HSP70 水平检测结果

3 讨论

关于热应激蛋白在不同人群或组织、细胞中表达水平的研究已有许多报道^[3], 针对各种应激因素的研究也屡见不鲜^[4~7]。冷应激时机体发生变化的机制及其预防措施的研究一直是特殊环境医学领域的重要课题。研究认为, 有 10 种基因与冷应激有关, 其中包括 HSP 基因家族^[8]。此外, 在细胞水平, 冷应激可以改变胞膜的脂质成分, 并能抑制蛋白合成与细胞增殖^[9]。环境中的物理、化学、生物因素及其引发的体

内生化学、生理、病理反应和产生的代谢产物, 均可诱导 HSP 的合成增加^[4~10], 从而赋予细胞或生物从各种应激状态中恢复的能力, 保护它们免受应激因素的损害^[11], 其中最为重要、诱导最强的是 HSP70。实验表明, 转入 HSP70 基因的大鼠心脏对缺血、缺氧的抵抗能力和恢复能力提高^[12]。HSP 表达增加, 提高了小鼠对类毒素致死效应的抵抗力^[13]。HSP70 还可保护细胞内的重要遗传物质 DNA, 在生物的生长、发育及分化过程中具有重要作用。同时, HSP70 与体内许多重要生物活性物质 (如类固醇、细胞因子、癌基因等) 有着密切联系, 参与体内多种调节过程。

正常情况下, HSP70 在血浆中检出率较低, 但也有研究表明其在特定人群中表达率增高。通过本研究发现: 0 °C 组与 -20 °C 组分别与对照组相比, 其淋巴细胞 HSP70 水平明显增高, 差异有显著性 ($P<0.05$); 0 °C 组与 -20 °C 组相比, HSP70 水平差异无显著性 ($P>0.05$)。可见, 长期在低温环境中工作对人体是一种应激因素, 使体内热应激蛋白合成与表达增加, 体内 HSP70 水平升高的个体可能对冷应激更加敏感。不管在转录还是翻译水平, HSP 的表达均被复杂的调控因素所控制^[14], 而且体内 HSP70 的高水平似乎也并非总是起保护作用, 在特定条件下, 它也可能是一种危险标志^[15]。如 Xiao 等人测定了高温环境大负荷训练导致中暑的病人淋巴细胞中的 HSP70 水平, 结果表明其水平显著高于对照组, 从而提出可将 HSP70 作为衡量应激易感性的生物标志物。但由于没有热应激前的 HSP70 水平测试, 因此难以确定中暑个体是在热应激以前就有较高的内源性 HSP70 水平还是对应激因素反应更加强烈才导致了淋巴细胞内较高水平的 HSP70^[16]。Fehreback 等人的研究表明, 训练有素的运动员淋巴细胞的 HSP 基本水平低于未受训练的人, 但经体外热应激处理后, 其反应则强于对照组。由此看来, 应激前 HSP70 的水平似乎并不能决定应激反应的强弱^[17]。但也有与之相悖的报道, 认为 HSP70 基础水平决定了应激反应的强弱^[18]。因此, 在未来的研究中如果能同时研究应激前后及应激过程中 HSP 的水平及变化情况, 将会有助于确定热应激蛋白发生变化的阶段并揭示究竟是基础水平还是诱导产生的 HSP 在应激反应中起决定作用。

HSP 对大脑、心脏、肾脏等器官有保护作用, 而这些器官都与体温调节有关。在低温作业环境中, 体温随环境温度降低, 血液与皮肤温度也随之下降, 刺激下丘脑体温调节中枢, 从而活化神经系统并引起神

经、呼吸、循环、内分泌和泌尿系统的改变。可以推测冷应激刺激诱导 HSP70 的产生, 随着细胞受损或坏死, 氧化应激反应的出现, 生物膜损伤加重, 胞内蛋白(包括 HSP70)被释放出来^[19], 引起免疫系统的迅速反应。已有研究表明应激蛋白在免疫细胞激活和细胞因子产生中是有效的调节剂^[13]。我们认为, 冷作业工人外周血淋巴细胞 HSP70 水平的增高可能与保护机体免受冷应激损害有关。

参考文献:

- [1] 陈胜, 徐耘, 肖成峰. 苯作业工人血浆热应激蛋白水平研究 [J]. 中国工业医学杂志, 1999, 12 (5): 260-262.
- [2] 潘勤, 肖成峰, 吴奋. 中暑患者几种热应激蛋白抗体滴度分析 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2000, 18 (12): 330-332.
- [3] 陈胜, 海涛, 王瑞波. 焦炉工外周血淋巴细胞热应激蛋白 70 水平与 DNA 损伤的关系 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2000, 18 (6): 324-326.
- [4] Wu TC, Tanguay RM, Wu Y, et al. Presence of antibody to heat stress proteins and its possible significance in worker exposed to high temperature and carbon monoxide [J]. Biomed Environ Sci, 1996, 9: 370-379.
- [5] Ohtsuka K, Laszlo A. The relationship between HSP70 localization and heat resistance [J]. Exp Cell Res, 1992, 202: 507-518.
- [6] Ciocca DR, Fuqua SA, Lock-Lim S. Response of human breast cancer cell to heat shock and chemotherapeutic drugs [J]. Cancer Res, 1992, 52: 3648-3654.
- [7] Favatier F, Bom man L, Hightown IE, et al. Variation in HSP gene expression and HSP polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance [J]. Cell Stress Chap, 1997, 2: 141-155.
- [8] Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL. Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression [J]. J Appl Physiol, 2002, 92 (4): 1725-1742.

- [9] Fujita J. Cold shock response in mammalian cells [J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 1999, 1 (2): 243-255.
- [10] Wu TC, Tanguay RM, He H, et al. The combined effects of high temperature and carbon monoxide on the heat stress response [J]. J Tongji Med Univ, 1995, 14 (3): 178.
- [11] Angelid CE, Lazarid I, Pagoulas GN. Constitutive expression of heat shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance [J]. Eur J Biochem, 1991, 199: 35.
- [12] Currie RW, Tanguay RM, Kingma JG. Heat shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit heart [J]. Circulation, 1993, 87: 963.
- [13] Hotchkiss R, Nummally I, Lindquist S, et al. Hyperthermia protects mice against the lethal effects of endotoxin [J]. Am J Physiol, 1993, 265: 1447.
- [14] Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators [J]. Genes Dev, 1998, 12: 3788-3796.
- [15] Moseley PL. Exercise, stress, and the immune conversation [J]. Exerc Sport Sci Rev, 2000, 28: 128-132.
- [16] Chengfeng Xiao, Tangchun Wu, Aiming Ren, et al. Basal and inducible levels of HSP 70 in patients with acute heat illness induced during training [J]. Cell Stress and Chaperones, 2003, 8 (1): 86-92.
- [17] Fehrenbach E, Niess AM, Schlotz E, et al. Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leukocytes of endurance runners [J]. J Appl Physiol, 2000, 89: 704-710.
- [18] Boshoff T, Lombard F, Eiselen R, et al. Differential basal synthesis of HSP70/Hsc70 contributes to interindividual variation in HSP70/Hsc70 inducibility [J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57: 1317-1325.
- [19] Wu T, Tanguay RM, Wu Y, et al. Presence of antibodies to heat stress proteins in workers exposed to benzene and in patients with benzene poisoning [J]. Cell Stress Chaperones, 1998, 3: 161-167.

502 胶水致眼化学伤 79 例分析

林 静¹, 冯艳春²

(1. 沈阳医学院附属中心医院, 辽宁 沈阳 110024;

2. 辽宁武警总队医院, 辽宁 沈阳 110031)

1 一般资料

79 例患者中男 66 例, 女 13 例, 年龄 18~58 岁。装修工人 32 例, 家具厂工人 20 例, 橡胶厂工人 23 例, 其他工种 4 例。病人均为单眼损伤。伤后就诊时间 1 h~5 d, 24 h 内就诊者 65 例, 2~3 d 就诊者 10 例, >4 d 4 例。有 2 例病人伤后自行处理, 然后在当地医院就诊, 来我院时角膜已出现炎症。79 例患者眼睑部灼伤 23 例, 结膜灼伤 10 例, 角膜灼伤 20 例, 眼睑、结膜、角膜混合伤 26 例。临床表现为上、下睑睫毛被白色膜状物黏着致使睁眼困难, 结膜充血, 结膜、角膜可见白色膜状物附着, 畏光、流泪、眼痛、视力下降。

2 治疗方法

用湿纱布浸泡受伤眼睑及睑缘处, 轻轻分离睑缘处膜状胶物, 如分离有困难, 上、下睑睫毛仍黏着在一起, 可用小弯剪刀将睫毛连同白色膜状物一同剪开。以地卡因点眼后, 将结膜、角膜黏着白色膜状胶物用湿棉签或无齿镊将之擦取或去除干净, 然后予庆大霉素 2 U 结膜下注射, 单眼包盖, 第 2 天复诊。经积极治疗, 仅 6 例遗留角膜薄翳, 余无并发症, 治疗后视力恢复正常。

笔者认为, 附着在眼部的 502 胶物清理干净后, 对眼部的损伤即停止, 所以发病后尽早就诊是治愈的关键。在 79 例病例中, 伤后 24 h 内就诊者无后遗症发生, 而伤后 3 d 以后就诊及处理不当者留有角膜薄翳, 可影响视力。此外, 医生在遇到此类患者时应慎重, 不能强行处理, 以免增加新的损伤, 给患者带来痛苦。

(收稿日期: 2004-03-19; 修回日期: 2004-04-06)