

# 冷库工人血浆中 HSP70 抗体及脂质过氧化水平的研究

周舫<sup>1,2</sup>, 张巧<sup>1</sup>, 姚武<sup>1</sup>, 谷庆<sup>3</sup>, 张仁忠<sup>4</sup>, 徐海<sup>5</sup>, 何美安<sup>2</sup>, 邱堂春<sup>2</sup>, 吴逸明<sup>1\*</sup>

(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, 江苏 射阳 224300; 5. 射阳县卫生监督所, 江苏 射阳 224300)

**摘要:** 目的 研究低温作业人群中 HSP70 抗体水平及血浆中 SOD、GSH、MDA 等脂质过氧化指标水平, 探讨低温作业对人可能的危害与机制。方法 选冷库作业工人作为研究对象, 其中保鲜冷库 (0℃组) 53 人, 水产冷库 (-20℃组) 53 人, 另选不从事有毒有害职业的村民 57 人作为对照。用 Western blot-ELISA 法研究血浆中热应激蛋白抗体表达水平, 用试剂盒检测血浆中 SOD、GSH、MDA 等生化指标。结果 对照组 57 人中有 3 人出现血浆 HSP70 抗体 1:10 阳性, 阳性率为 5%; 而 0℃组 53 人中有 14 人阳性, 占 26%; -20℃组 53 人有 11 人出现阳性 (21%)。对照组 1 人出现 1:20 阳性 (2%), 0℃组有 8 人阳性, 占 15%; -20℃组也有 8 人出现阳性 (15%)。0℃组与 -20℃组分别与对照组相比, 其血浆 HSP70 抗体水平明显增高, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。此外, 0℃组与 -20℃组中还各有 1 人出现 1:40 阳性, 而对照组没有检出。0℃组与 -20℃组相比, HSP70 抗体水平差异没有显著性 ( $P > 0.05$ )。对于各生化指标, 0℃组与 -20℃组分别与对照组相比, 其血浆中 SOD 活性、GSH 含量均下降, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。而 MDA 含量增高 ( $P < 0.05$ )。0℃组与 -20℃组相比, 各指标差异均无显著性。结论 在冷作业工人中存在着血浆中 HSP70 抗体水平的升高及脂质过氧化程度加重。

**关键词:** 热应激蛋白 70 (HSP70); 低温作业; 抗体滴度; 脂质过氧化; 生物标志物

中图分类号: R594.2; R446.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X (2005)02-0070-03

## Plasma levels of HSP70 antibody and lipid peroxidation in cold storage workers

ZHOU Fang<sup>1,2</sup>, ZHANG Qiao<sup>1</sup>, YAO Wu<sup>1</sup>, GU Qing<sup>3</sup>, ZHANG Ren-zhong<sup>4</sup>, XU Hai<sup>5</sup>, HE Mei-an<sup>2</sup>, WU Tang-chun<sup>2</sup>, WU Yi-ming<sup>1</sup>

(1. School 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 possible hazard and its mechanism of the work at low temperature. **Method** 53 workers working under 0℃ and 53 workers working under -20℃ were selected as 0℃ and -20℃ group respectively, and 57 matched villagers as the controls. The plasma titres of HSP70 antibody were determined by Western blot-ELISA. The activities of SOD and the concentration of GSH, MDA in plasma were determined with kits. **Result** The prevalence rates of plasma titres reached 1:10 were 5% (3 persons), 26% (14 persons) and 21% (11 persons) respectively in control group, 0℃ group and -20℃ group; the prevalence rates of 1:20 titres were 2% (1 person), 15% (8 persons) and 15% (8 persons), respectively. The average levels of HSP70 antibody in 0℃ and -20℃ group were all significantly higher than that of control ( $P < 0.05$ ). In addition, each low temperature group had one case (2%) with 1:40 plasma titre of HSP70 antibody, but there was no significant difference between 0℃ and -20℃ group in HSP70 antibody levels. Compared with control group, the levels of SOD, GSH were lower and the MDA levels were higher in 0℃ and -20℃ group ( $P < 0.05$ ), there was also no significant difference between 0℃ and -20℃ group in these lipid peroxidation indices. **Conclusion** The plasma levels of HSP70 antibody and lipid peroxidation are raised in the cold storage workers.

**Key words:** Heat stress protein 70 (HSP70); Work at low temperature; Antibody titre; Lipid peroxidation; Biomarker

热应激蛋白 (HSPs) 是环境因素诱导机体产生的

一组蛋白质, 具有很多生物学功能。首先, HSPs 具有使细胞或生物从各种应激中恢复和保护它们免遭应激因素损害的功能, 其中最为明显的是热耐受的形成; 第二, HSPs 可保护细胞内的重要遗传物质 DNA, 在生物的生长、发育及分化过程中也具有重要作用;

收稿日期: 2004-11-15; 修回日期: 2004-12-14

基金项目: 教育部“211”重点学科研究项目, 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。

\* 通讯作者

第三, HSPs 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)有密切联系, 参与体内许多调节过程; 第四, HSPs 具有分子伴侣的功能。热应激蛋白主要分布于胞浆或胞核, 极少释放入血液, 因此在血浆中难以检测到。但在很多疾病状态下, 血浆中可以测到热应激蛋白抗体表达升高。有许多研究表明热应激蛋白与职业危害因素存在相关关系<sup>[1, 2]</sup>, 因此劳动卫生界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。

机体自由基的生成与清除需保持动态平衡, 氧化与抗氧化系统之间的失衡状态称为“氧化应激反应”, 可进一步触发炎症、动脉粥样硬化、基因突变及癌症等。近年研究表明, 组织细胞损伤与氧自由基所致的脂质过氧化有关<sup>[3]</sup>。

低温作业在有害因素分类中属于物理因素中的不良气象条件, 长期从事低温作业可引起多系统、多器官的损害。因此, 本研究选取江苏省某县冷库作业工人为研究对象, 研究血浆中热应激蛋白抗体表达水平及 SOD、GSH、MDA 水平, 以探讨低温作业对人可能的危害与机制。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选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, 另选不从事有毒有害职业的村民57人作为对照。

### 1.2 研究方法

1.2.1 一般情况调查 主要包括姓名、性别、年龄、职业史、家族史、个人史等。

1.2.2 作业场所劳动卫生学调查 主要调查作业场所温度, 工人作业时间、劳动强度等。

1.2.3 抗体检测 用 SDS-PAGE 方法分离纯化的热应激蛋白 70 (heat stress protein 70, HSP70), 电转移至硝酸纤维素膜上, 丽春红 S 染色, 剪裁下含 HSP70 抗原的宽 2 mm 的硝酸纤维素膜条, 分为 2 mm×2 mm 的小片, 加入 96 孔酶标板, PBS 清洗 30 min 后, 封闭于 37℃ 封闭液 1 h。按 1:10、1:20、1:40 稀释待检血浆, 各加入 200 μl 稀释液于酶标孔中, 记下加样顺序。37℃ 温育 2 h 或 4℃ 过夜, 使相应抗体与硝酸纤维素滤膜上 HSP70 抗原结合。200 μl PBS-0.05% Tween 20 洗涤 10 min, 重复 6 次。每孔加入 200 μl 1:500 稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG, 37℃ 温育 2 h。200 μl PBS-0.05% Tween 20 洗涤 10 min, 重复 8 次。100 μl DAB 显色液显色 5~10 min, 立即吸出显

色液, 用 PBS-0.05% Tween 20 洗涤 3 次以终止显色反应, 亮光下判断结果。阳性结果为硝酸纤维素膜的一面的中间有一条肉眼清晰可见的棕色条带, 另一面则没有或极弱。阴性则无棕色条带。

1.2.4 生化指标检测 血浆中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的浓度均采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定, 使用酶标仪 (ELX800 型, 美国产) 测得 OD 值, 分别换算成相应的酶活力单位或含量, 严格按照说明书要求操作, 质量控制符合要求。

1.2.5 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。均数间比较采用 *t* 检验, 率的比较采用  $\chi^2$  检验, 以  $\alpha = 0.05$  作为检验水准。

## 2 结果

### 2.1 人群基本特征分析

两组研究对象在年龄、工作时间、劳动强度、身体状况等方面差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性。

### 2.2 工作环境调查

保鲜冷库平均温度约为 0℃, 水产冷库平均温度约为 -20℃, 每天平均工作时间 4 h, 劳动强度中等。

### 2.3 血浆中 HSP70 抗体滴度检测结果

0℃组与 -20℃组分别与对照组相比, 其血浆 HSP70 抗体水平明显增高, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。0℃组与 -20℃组相比, HSP70 抗体水平差异无显著性 ( $P > 0.05$ ) (表 1)。

表 1 冷库组与对照组人群血浆中 HSP70 抗体滴度

组别	例数	1:10		1:20		1:40	
		例数	%	例数	%	例数	%
0℃组	53	14	26*	8	15*	1	2
-20℃组	53	11	21*	8	15*	1	2
对照组	57	3	5	1	2		

\*与对照组相比,  $P < 0.05$

### 2.4 生化指标检测结果

0℃组、-20℃组分别与对照组相比, 其血浆中 SOD 活性、GSH 含量均下降, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ); 而 MDA 含量增高 ( $P < 0.05$ )。0℃组与 -20℃组相比, 各指标差异均无显著性 (见表 2)。

表2 冷库组与对照组血浆中 SOD 活性和 GSH、MDA 浓度( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	SOD (NU/ml)	GSH (mg/L)	MDA (nmol/ml)
0℃组	53	92.67±8.85	204.13±16.57	4.38±0.11
-20℃组	53	93.02±5.65	200.92±9.85	4.35±0.08
对照组	57	104.99±7.79	237.12±13.18	4.04±0.13

0℃组、-20℃组分别与对照组相比,差异均有显著性, $P < 0.05$

### 3 讨论

在冷应激条件下,机体变化非常广泛、复杂,研究结果也很凌乱,无法整理出一个系统结论,但已有研究表明 HSPs 基因家族与冷应激有关<sup>[4]</sup>。王枫等<sup>[5]</sup>采用 mRNA 差异展示技术,分离出了正常生存环境和低温环境下的大鼠垂体差异表达基因;也有研究探讨了冷应激对免疫功能的影响及其调节因素<sup>[6]</sup>,结果显示胎盘因子能明显改善冷应激所引起的小鼠免疫功能抑制,使脾脏重量及脾脏溶血空斑形成增多, E 花环形成率及 T 淋巴细胞转化提高,并使 IL<sub>2</sub> 活性升高。但以上研究多是针对动物和培养细胞,少数人群试验也是采用的非正常生产、生活中存在的处理因素,因此对指导特定人群的预防与保护意义不大。

本研究表明冷库工人血浆中 HSP70 抗体水平升高,这可能是由于冷应激时损伤了细胞膜结构或功能,使细胞内 HSP70 释放入血液,从而使抗体水平相应升高。关于血浆中 HSP 抗体滴度与某些疾病的关系已有一些报道,认为其与发病机制及预后有关<sup>[7-9]</sup>。职业环境中理化因素应激可导致抗体水平增高,因此将其看作环境应激一个可能的生物标志物<sup>[8,10,11]</sup>。有趣的是,在对热引起的疾病研究中发现,最严重的病人抗体滴度最高,而在恢复过程中其滴度逐渐下降<sup>[12]</sup>。

近年研究表明,组织细胞损伤与氧自由基所致的脂质过氧化有关<sup>[3]</sup>。据 Keatinge 的研究报道<sup>[13]</sup>,处于极其寒冷和炎热地区的人群死亡率高于处于适合人群生存的气候地区人群的死亡率,且此现象在世界的各个不同地区均存在,可见气候因素对人体的影响十分明显。由此可以推测,冷库作业工人人体内 SOD 活性下降、GSH 含量减少以及 MDA 含量增多都说明了体内抗氧化能力的降低和氧化损伤的加重,正是由于生物膜受到损伤,导致其通透性增强,从而使胞内的 HSP70 释放入血液,诱发自身抗体的产生。

冷应激状态下,体温调节中枢受到刺激后引起多器官、多系统的变化。HSP70 作为有重要保护作用的

应激蛋白,其合成增多<sup>[14]</sup>。有可能是这些系统中诱导的 HSP70 作为抗原刺激机体产生抗体。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<sup>[8]</sup>。由于大多数人对细菌或病毒感染都会产生炎症反应,推测 HSP70 也能引起免疫系统的迅速反应。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,在冷应激状态下,高滴度的抗体出现也许与冷应激所致的免疫系统改变有关。因此,我们认为,冷作业工人外周血抗体的表达升高及脂质过氧化可能代表着冷敏感及细胞功能受损,其详细机制,尚需进一步的研究与探讨。

### 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] Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species [J]. Physiol Rev, 1995, 74 (1): 139-162.
- [4] 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.
- [5] 王枫,崔大祥,闫小君. 冷应激大鼠垂体差异表达基因的克隆 [J]. 第四军医大学学报, 2000, 21 (2): 257-258.
- [6] 王国贤,肖志洁,刘丹平. 胎盘因子对冷应激小鼠的免疫调节作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2001, 22 (5): 242-243.
- [7] Shingai R, Maeda T, Onishi S, et al. Autoantibody against 70 KD heat shock protein in patients with autoimmune liver diseases [J]. J Hepatol, 1995, 23: 382-390.
- [8] Wu TC, 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.
- [9] Xu Q, Kinchl S, Mayr M, et al. Association of serum antibodies to heat shock protein 65 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in a follow-up study [J]. Circulation, 1999, 100: 1169-1174.
- [10] Wu T, Tanguay RM, Wu Y, et al. Presence of antibodies to heat stress proteins and its possible significance in workers exposed to high temperature and carbon monoxide [J]. Biomed Environ Sci, 1996, 9 (4): 370-379.
- [11] Wu TC, He HZ, Tanguay RM, et al. The combined effects of high temperature and carbon monoxide on heat stress response [J]. J Tongji Med Univ, 1995, 15 (3): 178-183.
- [12] Wu T, Chen S, Xiao C, et al. Presence of antibody against the inducible Hsp71 in patients with acute heat-induced illness [J]. Cell Stress Chaperones, 2001, 6 (2): 113-120.
- [13] Keatinge MR, Donaldson GC. Heat related mortality in warm and cold regions of Europe observational study [J]. BMJ, 2000, 321: 795-800.
- [14] 周航,谷庆,张仁忠. 冷库作业工人淋巴细胞中 HSP70 水平研究 [J]. 中国工业医学杂志, 2004, 17 (3): 154-156.