文章编号:1000-5404(2009)24-2455-04

论著

JNK信号途径通过内质网应激反应介导心肌梗死后心力衰竭小鼠心肌组织的凋亡

陈 鹏[1],杨成明[1],曾春雨[1],王旭升[1],熊秀勤[2],何多芬[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]心血管内科,[2]超声诊断科,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨在心肌梗死后心力衰竭诱导的内质网应激反应中c-Jun氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)通路介导心肌细胞凋亡可能的作用及机制。**方法** 结扎小鼠左冠状动脉主干建立心肌梗死后心力衰竭(心衰)模型,32只小鼠采用随机数字法分4组:假手术组、心肌梗死后2、4、6周组,采用超声心动图观察心室扩张及心功能变化情况,Western blot检测内质网分子伴侣GRP78蛋白以及JNK蛋白及其磷酸化水平的表达。采用TUNEL法观察心肌细胞的凋亡情况。**结果** 与假手术组相比较,心肌梗死后心力衰竭的小鼠左心室扩大,心功能下降。小鼠心肌组织GRP78表达明显增高($P<0.05$),JNK蛋白表达没有明显变化,但其活化形式磷酸化JNK表达增高($P<0.05$)。TUNEL染色显示心肌梗死后心力衰竭的小鼠心肌组织凋亡明显增多($P<0.05$)。**结论** 心肌梗死后心力衰竭诱导内质网应激反应,并激活JNK信号途径促进了心肌细胞的凋亡。

关键词: 心力衰竭;c-Jun氨基末端激酶;内质网;应激;细胞凋亡
中图法分类号: R329.28;R363.21;R542.22 **文献标识码:** A

c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates cardiac myocyte apoptosis in mouse congestive heart failure after myocardial infraction *via* endoplasmic reticulum stress

CHEN Peng[1], YANG Cheng-ming[1], ZENG Chun-yu[1], WANG Xu-kai[1], XIONG Xiu-qin[2], HE Duo-fen[1] ([1]Department of Cardiology, [2]Department of Ultrasonography, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the contribution of the c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) signaling pathway to cardiac myocyte apoptosis in mouse congestive heart failure due to myocardial infraction. **Methods** The mouse heart failure model was induced by acute myocardial infarction through ligating the left coronary artery. Thirty-two health male mice were randomly divided into 4 groups: sham operated group, 2-week postoperative group, 4-week postoperative group and 6-week postoperative group. The ventricular dilatation and left ventricular function were assessed by echocardiography. The expressions of GRP78, JNK and phosphorylated JNK were assessed by Western blot assay. The cardiac myocyte apoptosis were assessed by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). **Results** Compared with the sham group, cardiac expression of endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and phosphorylated JNK were significantly up-regulated in the operation groups ($P<0.05$). The number of TUNEL positive cells were markedly increased in the operation group compared with the sham group ($P<0.05$). **Conclusion** These findings suggest that the CNK signaling pathway partly mediates cardiac myocyte apoptosis in mouse congestive heart failure due to myocardial infraction via endoplasmic reticulum stress.

Key words: heart failure; c-Jun N-terminal kinase; endoplasmic reticulum; stress; apoptosis

心力衰竭是各种严重心脏疾病共有的一个主要并发症或“最后共同通道”[1]。以前人们对心力衰竭发病机制的认识停留在血液动力学异常、神经内分泌的激活和心室重构上,近来研究发现衰竭心脏中存在心肌细胞凋亡。凋亡使工作心肌细胞绝对数量减少,而导致心肌收缩力下降,基础及临床研究均表明细胞凋

作者简介:陈 鹏,男,湖北省襄樊市人,硕士研究生,医师,主要从事心力衰竭方面的研究。E-mail:xy_cp@163.com
通信作者:杨成明,电话:(023)68757801,E-mail:yangchmi@163.com
收稿日期:2009-06-25;修回日期:2009-07-20

亡干预是防治心力衰竭的一条有效的全新途径[2]。最近 JNK 信号通路在细胞凋亡中作用机制的研究越来越受到重视,但是由于 JNK 信号途径与多种信号途径都存在交叉调控,其在凋亡过程中扮演何种角色仍不明确。本研究通过结扎小鼠左冠状动脉主干建立心肌梗死后心力衰竭(心衰)模型,探讨 JNK 信号通路在心肌梗死心衰后心肌细胞凋亡中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6 周龄健康昆明小鼠,32 只,雄性,体质量 35 ~ 40 g,购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。

1.2 抗体和试剂

GRP78、α 肌动蛋白(α-actin)抗体为兔抗小鼠多克隆抗体,购自美国 Santa Cruz 公司、JNK 及磷酸化-JNK 抗体为兔抗小鼠多克隆抗体,均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。二抗为羊抗兔多克隆抗体,购自美国 Santa Cruz 公司。TUNEL 试剂盒购自美国 Roche 公司。

1.3 动物模型建立及实验分组

参考向平等[3]方法,结扎小鼠左冠状动脉主干造成心肌梗死模型。采用随机数字法分为假手术组和梗死组,造模成功后梗死组又分为术后饲养 2、4、6 周组。假手术组手术丝线仅穿过左冠状动脉主干而不结扎冠状动脉外,其余操作均与梗死组动物相同。术后室内饲养,规律照明,自由进食及饮水。

1.4 超声心动图检查

超声心动图检测小鼠心肌梗死后心力衰竭的心功能改变具有操作简单、方便等优点,并且其检测结果与血流动力学检测结果具有很好的相关性,可准确反映左心室功能的改变。

到达饲养终点时间点后,对所有存活小鼠进行超声心动图检查。采用 ACUSON sequoia512 超声显像仪,探头频率 14 MHz,于胸骨旁二维短轴平乳头肌水平采集左心室图像,同时在二维引导下获得 M 型超声心动图记录超过 10 个心动周期以上;获得 M 型心动图测量左心室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic dimension, LVEDD)、左心室收缩末期内径(left ventricular end-systolic dimension, LVESD)、左心室收缩期前壁厚度(anterior wall of thickness of systole, Aws)、左心室舒张期前壁厚度(anterior wall of thickness of diastole, Awd)、左心室收缩期后壁厚度(posterior wall of thickness of systole, Pws)、左心室舒张期后壁厚度(posterior wall of thickness of diastole, Pwd)、心率(heart rate, HR)、射血分数(ejection fraction, EF)、左心室短轴缩短率(fractional shortening, FS)按公式计算:FS(%) = [(LVEDD - LVESD)/LVEDD] × 100%。

1.5 标本获取与检测

断颈法处死小鼠后,取小鼠心脏,滤纸吸干,分别称取左心室(left ventricular weight, LVW)(包括室间隔)、右心室(right ventricular weight, RVW)(不包括室间隔)质量,计算左心室质量/体质量(LVW/BW)和右心室质量/体质量(RVW/BW)比值,分别代表左心室心肌肥厚指数和右心室心肌肥厚指数。取左心室非梗死区心肌分成数块立即至 -70 ℃冰箱保存。再称取肺组织质量,计算肺质量/体质量比值(LUNGW/BW),反映肺充血程度。

1.6 心肌病理形态学检查

取小鼠左心室梗死部位心肌,用 4 ℃磷酸盐缓冲溶液冲洗干净后 4% 多聚甲醛溶液固定。组织固定 48 h 后常规脱水、石蜡包埋,4 μm 间断连续切片、HE 染色,光镜下观察。

1.7 蛋白质免疫印迹分析

取 30 mg 心肌组织经过匀浆、裂解、超声破碎、高速离心后,取上清,采用考马斯亮蓝法在 Bio-Rad 分光光度仪上测定蛋白浓度,分装后 -20 ℃保存,供免疫印迹用。

取等量(含蛋白 50 μg)上述蛋白提取液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE,10% 分离胶),采用半干转法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,室温封闭 4 h(封闭液:含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液)、洗脱后分别加入 GRP78 一抗(1∶400 稀释)、JNK 一抗(1∶1 000 稀释)、磷酸化-JNK 一抗(1∶1 000 稀释)后 4 ℃ 过夜,洗膜后以相应的二抗室温孵育 1 h,显色采用化学发光法,暗室 X 线胶片曝光。为避免免疫印迹实验中标本蛋白量不同造成的影响,上述受体的免疫印迹结果用 α 肌动蛋白(α-actin)进行校正。采用 Image-Pro Plus 图像分析软件分析蛋白条带的积分光密度值(integrated optical density, IOD),IOD = 平均光密度值 × 面积,以靶蛋白 IOD 值/α-actin IOD 值的比值反映靶蛋白相对表达水平。

1.8 心肌细胞凋亡测定

取左室前壁中间段心肌组织,制备石蜡切片。以末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)法按试剂盒说明进行心肌组织切片细胞凋亡的原位检测。光镜下观察正常心肌细胞核呈蓝绿色染色,而凋亡细胞核呈深浅不一的棕褐色染色。每张切片于凋亡细胞分布区域随机选取 10 个高倍视野,计算出平均每 100 个细胞中的凋亡细胞数,以百分数(%)表示凋亡指数(apoptotic index, AI)。

1.9 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 动物死亡率

手术过程中假手术组小鼠无死亡;2 周组小鼠死亡 2 只,死亡原因系术中左心损伤出血;4 周组小鼠死亡 1 只,死亡原因系术后急性心衰;6 周组小鼠死亡 1 只,死亡原因系术后急性心衰。死亡率为 12.5%。

2.2 模型的鉴定

与假手术组相比,梗死组小鼠在结扎冠状动脉后可观察到支配区域心肌颜色变白,局部心肌运动减弱及左心耳涨满。关胸后心电图检测 2 个以上肢体导联或胸导联上出现 ST 上抬或弓背抬高。各梗死组在行超声心动图检查同时行心电图检查,可见相应导联呈 QS 型。

梗死组小鼠在术后 2 周即可出现呼吸加快,纳差,活动减少。取心脏标本时可见心室前壁心肌组织呈灰白色,假手术组心肌组织无明显改变。与假手术组相比,梗死组术后 2 周即出

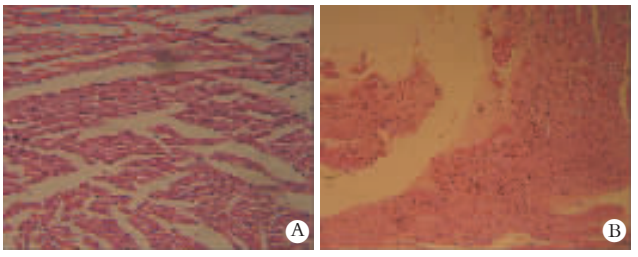
现 LUNGW/BW 显著升高($P<0.05$),4~6 周进一步增高($P<0.05$)。提示肺充血程度严重。梗死组心室重塑指标 LVW/BW 和 RVW/BW 比值与假手术相比未见明显差异($P>0.05$),说明梗死组小鼠心肌梗死后出现心力衰竭,但尚未出现心室重塑的改变。见表 1。

表 1　各组间小鼠心室重塑及肺充血指标($mg/g, \bar{x}\pm s$)

组别	n	LVW/BW	RVW/BW	LUNGW/BW
假手术组	8	1.57±0.20	0.56±0.18	2.40±0.18
梗死组　2 周	7	1.61±0.12	0.59±0.21	3.26±0.17[a]
4 周	7	1.59±0.22	0.61±0.19	3.82±0.11[a]
6 周	6	1.60±0.17	0.58±0.11	4.51±0.24[a]

a: $P<0.05$,与假手术组比较

心肌病理形态学观察可见:假手术组心肌组织 HE 染色未见异常,而梗死组可见大片梗死区域,并被肉芽组织替代伴大量成纤维细胞增生。见图 1。



A:假手术组; B:梗死组

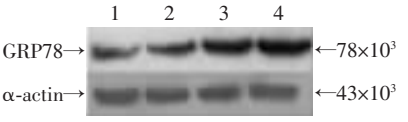
图 1　各组心肌梗死后心力衰竭小鼠心肌细胞病理学观察(HE×200)

2.3　左心功能的变化

超声心动图结果显示:与假手术组相比,梗死组术后 2 周即出现 LVEDD、LVESD 增高,4~6 周进一步增高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。Awd 2 周即开始下降,4~6 周进一步降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);心率(HR)2 周即开始增快,4~6 周进一步增快,差异具有统计学意义($P<0.05$);EF 和 FS 2 周即出现下降,4~6 周进一步降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.4　内质网分子伴侣 GRP78 蛋白的表达

与假手术组相比,梗死 2 周组的 GRP78 表达上调了 123%($P<0.05$);4 周组的 GRP78 表达上调了 163%($P<0.05$),6 周组的 GRP78 上调了 184%($P<0.05$)($n=7$)。见图 2。

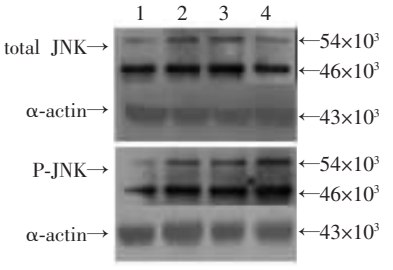


1:假手术组; 2-4:梗死后 2、4、6 周组

图 2　各组小鼠各时相点心肌梗死后心衰 GRP78 蛋白的表达

2.5　磷酸化 JNK 蛋白的表达

与假手术组相比,JNK 蛋白的表达没有明显变化,但其活化形式磷酸化 JNK 表达明显上调。2 周组与假手术组相比,磷酸化 JNK 表达上调 420%($P<0.05$),4 周组与假手术组相比,磷酸化 JNK 表达上调 620%($P<0.05$),6 周组与假手术组相比,磷酸化 JNK 表达上调 701%($P<0.05$)($n=6$)。见图 3。



1:假手术组; 2-4:梗死后 2、4、6 周组

图 3　各时相点心肌梗死后心衰 JNK 蛋白及磷酸化 JNK 蛋白的表达

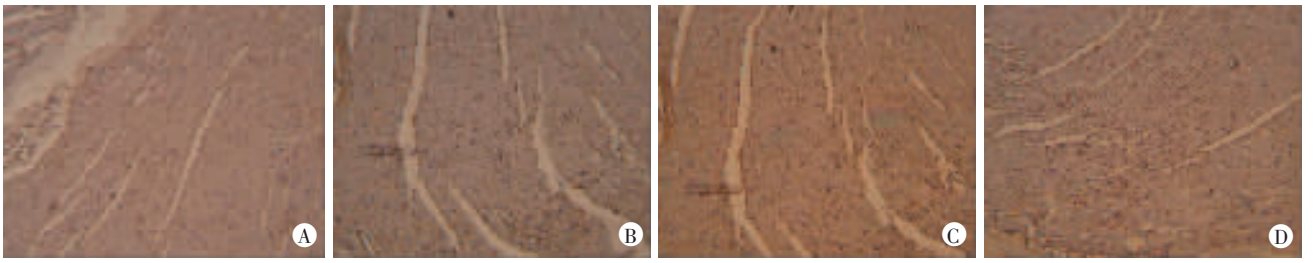
2.6　心肌梗死后心衰小鼠心肌细胞的凋亡

TUNEL 染色结果见图 4。假手术组的凋亡指数为(3.15±0.25)%,梗死 2 周组的凋亡指数为(5.50±0.33)%,为假手术组的 1.75 倍($P<0.05$)。梗死 4 周组的凋亡指数为(7.61±0.29)%,为假手术组的 2.42 倍($P<0.05$)。梗死 6 周组的凋亡指数为(9.10±0.42)%,为假手术组的 2.89 倍。

表 2　各组间小鼠超声心动图检查结果($\bar{x}\pm s$)

组别	n	LVEDD (mm)	LVESD (mm)	Aws (mm)	Awd (mm)	Pws (mm)	Pwd (mm)	FS(%)	HR(次/min)	EF(%)
假手术组	8	1.97±0.17	3.23±0.13	1.40±0.08	0.76±0.05	1.35±0.18	0.85±0.15	49.12±2.23	336±14	87.51±5.26
梗死组　2 周	7	3.79±0.16[a]	5.46±0.12[a]	0.96±0.07[a]	0.87±0.09	1.32±0.22	0.82±0.10	32.50±4.97[a]	406±14[a]	78.36±4.36[a]
4 周	7	4.29±0.19[a]	5.92±0.10[a]	0.82±0.10[a]	0.75±0.05	1.71±0.15	0.92±0.05	21.14±1.34[a]	430±16[a]	69.12±3.65[a]
6 周	6	4.47±0.21[a]	6.24±0.16[a]	0.80±0.14[a]	0.76±0.05	1.50±0.20	0.84±0.06	18.42±1.51[a]	443±9[a]	60.22±4.78[a]

a: $P<0.05$,与假手术组比较



A:假手术组;B: 梗死 2 周组;C: 梗死 4 周组;D: 梗死 6 周组

图 4　各时相点心肌梗死后心力衰竭小鼠心肌细胞凋亡观察　(TUNEL×200)

3 讨论

JNK 为丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)家族中的重要成员,业已证实 JNK 信号通路是导致细胞凋亡的重要信号通路[4]。近年来,随着对内质网应激反应(endoplasmic reticulum stress response,ERSR)研究的深入,发现 JNK 信号通路可以通过内质网应激反应介导的细胞凋亡。

内质网是真核细胞中蛋白质翻译合成和细胞内钙离子的储存场所。当葡萄糖或营养物质缺乏、脂质过度负荷、病毒感染、药物、毒素和分泌蛋白合成增加等均可打破内质网的稳态,出现错误折叠与未折叠蛋白在腔内聚集以及 Ca^{2+} 平衡紊乱的状态,称为内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)。为了减轻内质网应激,真核细胞激活一系列自身保护机制,称为内质网应激反应[5]。内质网应激可诱导内质网分子伴侣 GRP78(glucose-regulated protein 78)和 GRP94(glucose-regulated protein 94)及蛋白二硫键异构酶(protein disulfide isomerase,PDI)等分子伴侣的表达,这些分子伴侣通过帮助未折叠蛋白折叠或促进错误折叠蛋白正确折叠来减轻内质网应激反应。因此,GRP78 表达上调是内质网应激的标志之一[6]。本研究表明,结扎左冠状动脉 2 周后即可出现心力衰竭,伴随着 GRP78 的表达明显上调,至 6 周达最高峰,说明在心肌梗死后心力衰竭诱导了持续加重的内质网应激。

研究已证实,持续或过强的内质网应激反应可以通过 JNK 信号通路介导细胞的凋亡[7]。但目前有关 JNK 信号通路在心力衰竭中细胞凋亡中的研究很少。Okada 等[8]通过对主动脉缩窄诱发的大鼠压力负荷过重心衰模型进行研究发现,在该模型中存在持续的内质网应激,而且可能对心肌细胞凋亡起到了促进作用,但是未发现 JNK 信号途径参与心肌细胞的凋亡。同样 Jang 等[9]证明阿霉素诱导的心衰模型中存在着持续的内质网应激反应,但 JNK 信号途径并未参与心肌细胞的凋亡。本研究表明,心肌梗死后心力衰竭可诱导持续的内质网应激反应,磷酸化 JNK 的表达上调和心肌细胞的凋亡增多,说明在心肌梗死后心力衰竭的模型中,内质网应激反应通过 JNK 信号途径介导心肌细胞的凋亡。与主动脉缩窄诱发的大鼠压力负荷过重心衰模型和药物诱导的心衰模型不同的是,结扎小鼠左冠状动脉主干致心力衰竭模型可较好的模拟心肌缺血性心力衰竭。该模型伴有心脏局部神经内分泌活动的持续激活,心肌代偿肥大,心室重构等过程的改变,符合心力衰竭由代偿至失代偿的动态演变过程。

本研究结果与内质网应激在急性心肌缺血再灌注中的研究结果相一致。Ferrandi 等[10]在心肌缺血再灌注模型中发现,JNK 信号通路参与了心肌缺血再灌注后心肌细胞的凋亡,并且通过抑制 JNK 信号通路可明显减轻心肌细胞的凋亡和心肌梗死面积。Liu 等[11]也发现通过减轻内质网应激可以减轻心肌缺血再灌注模型中磷酸化 JNK 的表达和细胞的凋亡。但是本研究仍存在以下问题:为什么在其他心衰模型中内质网应激反应未激活 JNK 信号通路? 与结扎左冠状动脉后左心衰竭不同,结扎右冠状动脉致右心衰竭存在不同的病理生理学改变,那其是否会存在内质网应激反应,JNK 信号通路是否被激活? 以上问题尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Hodges P. Heart failure: epidemiologic update[J]. Crit Care Nurs Q, 2009, 32(1): 24 - 32.

[2] Masri C, Chandrashekhar Y. Apoptosis: a potentially reversible, metastable state of the heart[J]. Heart Fail Rev, 2008, 13(2): 175 - 179.

[3] 向 平, 宋银子, 陈 沅, 等. 提高大鼠心肌梗死模型成功率及存活率的研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(4): 329 - 332.

[4] Okuno S, Saito A, Hayashi T, *et al*. The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia[J]. J Neurosci, 2004, 24(36): 7879 - 7887.

[5] Schroder M. Endoplasmic reticulum stress responses[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(6): 862 - 894.

[6] Glembotski C C. Endoplasmic reticulum stress in the heart[J]. Circ Res, 2007, 101(10): 975 - 984.

[7] Zhang C, Kawauchi J, Adachi M T, *et al*. Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(3): 718 - 724.

[8] Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, *et al*. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis[J]. Circulation, 2004, 110(6): 705 - 712.

[9] Jang Y M, Kendaiah S, Drew B, *et al*. Doxorubicin treatment *in vivo* activates caspase-12 mediated cardiac apoptosis in both male and female rats[J]. FEBS Lett, 2004, 577(3): 483 - 490.

[10] Ferrandi C, Ballerio R, Gaillard P, *et al*. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and infarct size after myocardial ischemia and reperfusion in anaesthetized rats[J]. Br J Pharmacol, 2004, 142(6): 953 - 960.

[11] Liu X H, Zhang Z Y, Sun S, *et al*. Ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia/reperfusion injury through attenuating endoplasmic reticulum stress[J]. Shock, 2008, 30(4): 422 - 427.

(编辑 王小宾)