论著

文章编号:1000-5404(2013)09-0854-04

# GRP78和CHOP蛋白表达增加与脓毒性休克大鼠肺血管通透性改变的关系

胡 畔,李 涛,丁晓莉,刘良明 (400038 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所第二研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 研究脓毒性休克大鼠内质网应激模型中葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein78,GRP78)和C/EBP环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白(C/EBP homologous protein,CHOP)蛋白表达的变化及其与血管通透性改变的关系。**方法** 42只成年SD大鼠,雌雄各半,体质量200~220 g,随机分为3组:①假手术组;②盲肠造瘘组,按照术后时间长短盲肠造瘘组又分为术后1、2、4、6、8 h等5个亚组;③盲肠造瘘+牛磺酸组($n=6$)。用异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白注入肺组织,在术后1、2、4、6、8 h时分别取各组相应大鼠肺脏,牛磺酸干预组于术后6 h取出,生理盐水进行肺灌洗,观察其荧光物质渗透率的变化测量肺毛细血管通透性;Western blot方法测量肺血管内皮细胞GRP78和CHOP蛋白的表达并对各组进行比较。**结果** ①大鼠盲肠造瘘术后1、2、4、6、8 h后GRP78和CHOP蛋白表达均呈递增趋势[($P$(GRP78)$<0.05$; $P$(CHOP)$<0.05$],肺血管荧光物质渗透率也随着时间的延长呈直线递增的趋势($P=0.006<0.05$),盲肠造瘘组各组GRP78和CHOP蛋白的表达与肺血管荧光物质渗透率的改变呈正相关($R^2=0.785$, $P<0.05$; $R^2=0.881$, $P<0.05$);②牛磺酸处理后,6 h点肺血管荧光物质渗透率显著低于单纯盲肠造瘘术后($P=0.007<0.05$),GRP78和CHOP蛋白的表达也较盲肠造瘘组低($P=0.004<0.05$)。**结论** 脓毒性休克内质网应激参与了血管通透性增高的发生,GRP78和CHOP蛋白为重要的参与分子。

[关键词] 内质网应激;GRP78;CHOP;脓毒性休克;血管通透性

[中图法分类号] R331.32; R363.25; R631.402 [文献标志码] A

# Relationship of GRP78 and CHOP expression with pulmonary vascular permeability in rat model of endoplasmic reticulum stress during septic shock

Hu Pan, Li Tao, Ding Xiaoli, Liu Liangming (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 2, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the changes of glucose-regulated protein78 (GRP78) and C/EBP homologous protein (CHOP) in rat model of endoplasmic reticulum stress during septic shock and its relationship with pulmonary vascular permeability. **Methods** A total of 42 adult SD rats, with half females and half males weighing 200 to 220 g, were randomly divided into 3 groups, sham-operation group ($n=6$), cecal ligation and puncture (CLP) group, CLP plus taurine group (5 mL/kg taurine through intravenous injection immediately before CLP establishment, $n=6$). CLP group was further divided into 5 subgroups, in 1, 2, 4, 6 and 8 h respectively after CLP, each subgroup having 6 rats. After fluorescein isothiocyanate-labeled albumin bovine serum was injected intravenously, lung tissues of rats were taken at above time points after CLP in CLP group, and at 6 h after CLP in CLP plus taurine group. The pulmonary vascular permeability was determined by observing the permeability of fluorescein. The expression of GRP78 and CHOP in pulmonary vascular endothelial cells were determined by Western blotting. **Results** The expression of GRP78 and CHOP at protein level were also increased in a time-dependent manner after CLP ($P<0.05$). The permeability of fluorescein was in a straight line up in a time-dependent fashion after CLP as compared to sham-operation group ($P<0.05$). The expression of GRP78 and CHOP was positively correlated with the changes of vascular permeability ($R^2=0.785$, $P<0.05$; $R^2=0.881$, $P<0.05$). Taurine intervention resulted in significantly decreased permeability of fluorescein compared with CLP group ($P<0.05$), and significantly decreased expression of GRP78 and

[基金项目] 国家自然科学基金(81270400)

[通信作者] 刘良明,电话:(023)68757421,E-mail:liangmingliu@yahoo.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130314.0930.008.html(2013-03-14)

CHOP ($P < 0.05$). **Conclusion** Endoplasmic reticulum stress during septic shock participates in the increase of vascular permeability, and GRP78 and CHOP are important participating molecules.

[**Key words**] endoplasmic reticulum stress; glucose-regulated protein78; C/EBP homologous protein; septic shock; vascular permeability

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81270400). Corresponding author: Liu liangming, Tel: 86-23-68757421; E-mail: liangmingliu@yahoo.com

内质网(endoplasmic reticulum, ER)是真核细胞中重要的细胞器,对细胞内外环境的改变极为敏感,氧化应激、缺血损伤、钙稳态紊乱以及正常或错误折叠蛋白质高表达均可引起其功能紊乱,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)[1]。现有研究表明,长期或过度 ER 应激会触发 ER 相关性细胞凋亡途径。已知有 3 条途径介导 ER 相关性细胞死亡:C/EBP 同源蛋白(C/EBP homology protein, CHOP)表达增加、JNK 活化和(或)caspase-12 蛋白水解酶激活[2]。以往研究表明,休克会触发血管内皮细胞的内质网应激反应[3],休克时存在血管通透性的增高[4]。ERS 除了参与细胞分化与凋亡调控之外,是否参与了休克时血管通透性的增高,目前尚少见报道。据此,本研究在脓毒性休克大鼠内质网应激模型中研究了 ERS 分子 GRP78 和 CHOP 蛋白表达的改变,以及参与休克时血管通透性增高的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

成年 SD 大鼠 42 只,雌雄各半,体质量 200~220 g,第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供。兔抗鼠 Grp78 抗体:多抗 ab21685, Abcom 公司;鼠抗鼠 Chop 抗体:单抗 ab11419, Abcom 公司;羊抗兔 IgG 抗体:多抗 ab97051, Abcom 公司;羊抗鼠 IgG2b 抗体:多抗 ab97250, Abcom 公司;牛磺酸:T0625, Sigma 公司;内切组织匀浆机:T18, IKA;荧光分光光度计:f-4500, HITACHI。

### 1.2 方法

1.2.1 脓毒性休克大鼠内质网应激模型建立及实验分组 将大鼠随机分成 3 组:①假手术组(空白组),即只进行左下腹开腹、缝合;股动脉插管监测血压。②盲肠造瘘法(cecum ligation perforation, CLP)诱导脓毒性休克组(CLP 组):大鼠术前禁食 12 h,常规麻醉(3% 戊巴比妥,1.5 mL/kg, iv.)固定四肢,在无菌条件下,开腹,找到盲肠,用锥形器进行盲肠造瘘,完成脓毒性休克大鼠模型建立,术后缝合伤口,消毒;股动脉插管监测血压(血压降低 30% 即模型成功)。③盲肠造瘘术 + 牛磺酸处理组,即术前从股静脉中以 5 mL/kg 注入牛磺酸,再进行盲肠造瘘术,术后 6 h 进行各项指标测量。按照手术后时间不同又将盲肠造瘘组随机分为 CLP1、2、4、6、8 h 5 组。

1.2.2 大鼠肺血管通透性测量 从大鼠静脉导管注入荧光素,在术后 1、2、4、6、8 h 后分别打开大鼠腹腔、胸腔,从下腔静脉缓慢注入生理盐水进行肺灌洗,待肺脏发白后,处死各组大鼠,取肺组织,擦干,称量,记录质量(kg),剪碎、碾磨,在匀浆机中匀浆,将匀好组织放入离心机中离心,离心机半径 13.5 cm, 6 000 r/min, 5433.48 × $g$ 离心 10 min,离心后,用分光光度计在波长 530 nm 处测定其 $D$(530)值。

1.2.3 GRP78 和 CHOP 蛋白的表达 取不同时相点各组大鼠肺组织,提取总蛋白,以 Breadford 法测量蛋白质含量,计算上样量后,进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)并转膜。滴加封闭液封闭 2 h 后,分别滴加 1∶1 000 兔抗大鼠 GRP78 抗体及 1∶200 鼠抗大鼠 CHOP 抗体,置 4 ℃ 过夜,用洗涤液洗膜;然后滴加 1∶800 AP 标记的羊抗兔 IgG,羊抗鼠 IgG2b 抗体,置室温摇动并洗膜,曝光,显影,扫描后进行灰度分析。将扫描后所得各组 GRP78、CHOP 蛋白灰度值进行比较。

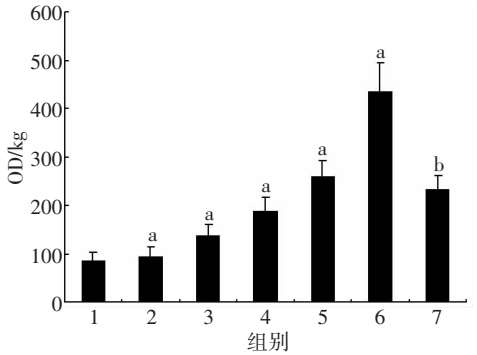
### 1.3 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,由 SPSS 13.0 统计软件包完成数据分析,数值变量资料数据先经正态分布检验,符合正态分布数据的两组均数间比较采用小样本 $t$ 检验,线性增长趋势采用一元线性方程,不符合正态分布的数值变量资料经数学变换处理后再行方差分析或 $t$ 检验。数据相关性采用相关性分析。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠肺血管通透性的变化

术后 1 h,各组反应肺血管通透性的荧光渗透率即发生改变[OD = (91.693 ± 0.849)]。随着术后时间的延长,盲肠造瘘术组后肺血管荧光物质渗透率随着 CLP 时间的延长呈线性递增关系($P < 0.05$, $R^2 = 0.932$),加入牛磺酸干预后,荧光物质渗透率降低(图 1)。



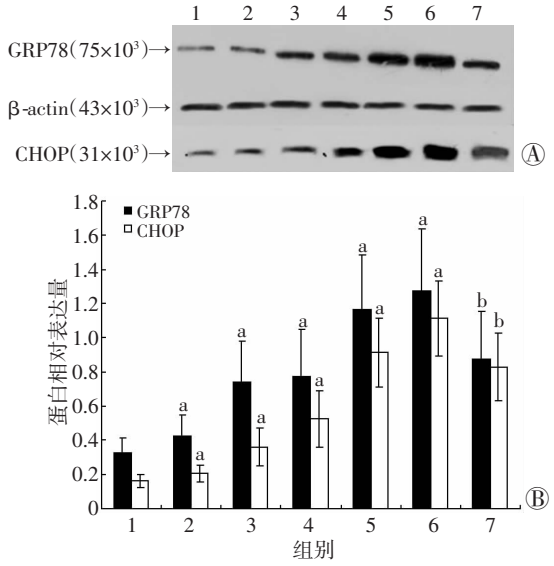

1:空白组;2:CLP 1 h 组;3:CLP 2 h 组;4:CLP 4 h 组;5:CLP 6 h 组;6:CLP 8 h 组;7:CLP 6 h + 牛磺酸处理组

a: $P < 0.05$, 与空白组比较; b: $P < 0.05$, 与 CLP 8 h 组比较

**图 1 脓毒性休克大鼠不同时间点肺血管通透性改变及牛磺酸的作用** ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

### 2.2 各组大鼠肺组织中 GRP78 蛋白的表达

CLP 术后 1 h，盲肠造瘘组 GRP78 蛋白与 β-actin 蛋白的相对灰度值为(0.362 ± 0.107)，随着术后时间的延长，盲肠造瘘组 GRP78 蛋白表达呈持续上升趋势($P < 0.05$)(图 2)，用牛磺酸干预后，GRP78 蛋白的表达较单纯 CLP 处理后表达显著下调($P < 0.05$)。




A：Western blot 检测 GRP78 和 CHOP 蛋白的表达；B：GRP78 和 CHOP 蛋白定量分析($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

1：空白组；2：CLP 1 h 组；3：CLP 2 h 组；4：CLP 4 h 组；5：CLP 6 h 组；6：CLP 8 h 组；7：CLP 6 h + 牛磺酸处理组；GRP78：glucose-regulated protein78 葡萄糖调节蛋白 78；CHOP：C/EBP homologous protein，C/EBP 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白；a：$P < 0.05$，与同系列空白组比较；b：$P < 0.05$，与同系列 CLP 8 h 组比较

**图 2 脓毒性休克各组大鼠不同时间点 CHOP 蛋白表达及牛磺酸的作用**

### 2.3 各组大鼠肺组织中 CHOP 蛋白的表达

CLP 术后 1 h，盲肠造瘘组 CHOP 蛋白的相对灰度值为(0.176 ± 0.024)，随着术后时间的延长，盲肠造瘘组 CHOP 蛋白表达呈持续上升趋势($P < 0.05$)(图 2)。用牛磺酸干预后，CHOP 蛋白的表达较单纯 CLP 处理后表达显著下调($P < 0.05$)。

### 2.4 各组大鼠血管通透性变化与 GRP78 和 CHOP 蛋白表达的相关性

盲肠造瘘组随着时间延长，各组反应血管通透性的荧光物质渗透率指标与 GRP78 蛋白表达含量呈显著正相关($R^2 = 0.785$, $P < 0.05$)，与 CHOP 蛋白表达含量亦呈显著正相关($R^2 = 0.881$, $P < 0.05$)。

## 3 讨论

血管通透性是指血液成分通过微血管壁透出到血管外的能力，它是衡量不同脏器、组织、细胞和血液进行物质交换能力的重要指标。血管通透性增高涉及休克、炎症、烧伤、免疫、肿瘤转移等一系列病理过程的发生和发展，甚至是晚期休克患者死亡的主要原因之一，尤其是脓毒性休克晚期，会发生明显的血管通透性增高[5]。但是，目前关于休克时血管通透性改变的发生机制一直未能充分阐明。休克后血管通透性升高现有的机制主要包括：内皮细胞连接及其相关蛋白的改变引起血管通透性增高；第二信使-蛋白激酶介导的信号通路改变引起内皮细胞屏障的破坏导致血管通透性的升高；小 G 蛋白介导的信号通路引起细胞骨架的重组，从而导致血管通透性的变化等。内质网应激(endoplasmic reticulum stress，ERS)为机体对细胞内外环境改变而引起的内质网功能紊乱，从而引起机体平衡紊乱的状态[6]。机体休克会触发内质网应激。未折叠或错误折叠的蛋白质在内质网中聚集促使细胞做出适应性反应，包括上调位于内质网的各种酶和分子伴侣，抑制蛋白质合成，启动 ERS 相关基因转录，即未折叠蛋白反应(unfolded protein response，UPR)。ERS 触发 UPR 以维持 ER 的稳态。UPR 既是细胞抵抗应激的保护机制，也是应激损伤细胞的重要机制[4]。UPR 最初是一种适应性反应，但如果不及时消除，能导致细胞凋亡。现有研究表明，ERS 分子主要参与细胞的分化与凋亡途径。长期或过度 ERS 会触发 ER 相关性细胞凋亡途径。以往研究表明，休克时会触发血管内皮细胞的内质网应激反应，休克还会导致血管通透性的增高。那么 ERS 分子除了参与细胞分化与凋亡之外，是否参与了休克时血管通透性的增高，目前尚少见报道。在 ERS 分子参与细胞分化与凋亡途径中，ERS 早期主要是糖调节蛋白 78(glucose-regulated proteins 78，GRP78)、GRP94、剪切型 X 盒结合蛋白-1(X box protein-1，XBP-1)、钙网蛋白等表达上调[7]。GRP78 作为 UPR 最主要调控子和 ERS 发生的标志性分子，参与了细胞的分化。

在 ERS 分子参与细胞分化与凋亡途径中，ERS 相关因子 GRP78 作为内质网稳态的感受器，是启动 ERS 和内质网稳态调节的关键因子之一。GRP78 的表达在一定程度上可反映 ERS 的启动和稳态调节能力[8]。CHOP 蛋白是 ERS 诱导产生的凋亡信号分子，它在细胞增殖分化和死亡中起重要的作用[9]，同时其也是 ERS 细胞凋亡反应的直接结果[10]。目前国内外各项研究中对于这两种蛋白均有报道，如 GRP78 蛋白和 CHOP 的表达差异已在高血压大鼠心肌细胞凋亡过程中观察到[11]。在结直肠癌细胞中 GRP78 蛋白的高表达能调节细胞分化和凋亡[12]。离体与在体实验结果显示，抑制 CHOP 表达可以减轻缺血和再灌注引起的细胞凋亡，延缓肥大心肌转向心衰。牛磺酸作为同型半胱氨酸代谢的终末产物之一，具有维持细胞内外

渗透压平衡,稳定细胞膜,维持钙离子稳态,抗脂质过氧化损伤,调节血管活性物质合成释放等多种生物学效应。有研究者使用牛磺酸饲养肥胖糖尿病鼠后,发现其高血糖、胰岛素敏感性和脂肪肝得到改善[13]。牛磺酸具有稳定蛋白构象,提高内质网对蛋白折叠处理能力和促进突变蛋白转运的功能,因而能提高改善内质网应激。因此,本研究在脓毒性休克大鼠内质网应激模型上监测 GRP78 和 CHOP 蛋白表达的改变及其与血管通透性改变的关系得出,随着 CLP 时间的延长,内质网应激分子 GRP78 和 CHOP 的表达呈递增趋势,且与肺血管通透性增高呈正相关,应用内质网应激抑制剂牛磺酸干预后,改善内质网应激,GRP78 和 CHOP 蛋白表达较单纯 CLP 降低,血管通透性也降低。结果表明内质网应激在脓毒性休克血管通透性增高起重要作用,但具体机制尚需进一步阐明。

目前针对休克血管通透性改变的防治措施,主要围绕其引起血管通透性增高的诱发因素及发生机制进行。降低血管通透性的方法主要有以下几种:一是减少炎症因素的发生,降低炎性反应,Hamamoto 等[14]通过对小鼠模型的研究发现磷酸二酯酶-4(PDE-4)对抑制 ECC 后的 CD11b、TNF-α、弹性蛋白酶的上升均具有明显作用。Schroth 等[15]通过随机对照双盲试验,采用高渗-高张溶液(HHS)对患有房室缺的患儿行开心修补术后的动脉压,静脉压,心指数,肺血管外液体指数,心脏收缩容积,体循环阻力等多个指标进行术前及术后各时间段的对照,发现 HHS 能够增加患儿术后的心肌收缩力,减少体内儿茶酚胺的含量,同时 HHS 能够降低体循环血管阻力,减轻血管的渗透性,改善微循环,二是抑制上述引起血管通透性增高的发生机制,明佳等[16]研究发现 Cx43 可能参与了 LPS 诱导的血管通透性的调节;二者呈负相关关系;Aosasa 等[17]揭示 UTI 通过抑制单核细胞内蛋白激酶 C(PKC)及核转录因子-κB(NF-κB)信号转导通路来直接抑制 TNF-α 的翻译和分泌。TNF-α 可刺激单核巨噬细胞产生 IL-1、IL-2、IL-6 和 IL-8 等炎细胞因子,并可因"级联放大"作用引起组织损伤。本研究发现,牛磺酸可以通过下调 GRP78 和 CHOP 蛋白表达降低 CLP 后肺血管通透性升高。研究结果初步明确了内质网应激相关分子 GRP78 和 CHOP 蛋白参与了休克血管通透性的发生,牛磺酸有一定的保护作用,为休克防治研究提供潜在靶点和防治措施,但具体机制需要深入研究。

**参考文献:**

[1] Pagliassotti M J. Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Annu Rev Nutr, 2012, 32: 17-33.

[2] Ribeiro C M, Boucher R C. Role of endoplasmic reticulum stress in cystic fibrosis-related airway inflammatory responses[J]. Proc Am Thorac Soc, 2010, 7(6): 387-394.

[3] Sari F R, Watanabe K, Widyantoro B, *et al*. Sex differences play a role in cardiac endoplasmic reticulum stress (ERS) and ERS-initiated apoptosis induced by pressure overload and thapsigargin[J]. Cardiovasc Pathol, 2011, 20(5): 281-290.

[4] Kontra J M. Evidence-based management of severe sepsis and septic shock[J]. J Lancaster General Hosp, 2006, 1(2): 39-46.

[5] Bates D O. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability[J]. Cardiovasc Res, 2010, 87(2): 262-271.

[6] Qin W, Xu L, Zhang X, *et al*. Endoplasmic reticulum stress in murine liver and kidney exposed to microcystin-LR[J]. Toxicon, 2010, 56(8): 1334-1341.

[7] Bernard G R, Vincent J L, Laterre P F, *et al*. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis[J]. N Engl J Med, 2001, 344(10): 699-709.

[8] Li C, Harada A, Oh Y. IGFBP-3 sensitizes antiestrogen-resistant breast cancer cells through interaction with GRP78[J]. Cancer Lett, 2012, 325(2): 200-206.

[9] Chen C M, Wu C T, Chiang C K, *et al*. C/EBP homologous protein (CHOP) deficiency aggravates hippocampal cell apoptosis and impairs memory performance[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40801.

[10] Groenendyk J, Sreenivasaiah P K, Kim-do H, *et al*. Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart[J]. Circ Res, 2010, 107(10): 1185-1197.

[11] 林可, 赵连友, 黄金燕, 等. 高血压大鼠心肌内质网应激时 GRP78 和 CHOP 的表达及其与心肌细胞凋亡的关系[J]. 心脏杂志, 2010, 22(6): 828-832, 845.

[12] Boden G, Duan X, Homko C, *et al*. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals[J]. Diabetes, 2008, 57(9): 2438-2444.

[13] Kaufman R J, Back SH, Song B, *et al*. The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in β-cells [J]. Diabetes Obes Metab, 2010, 12(Suppl 2): 99-107.

[14] Hamamoto M, Suga M, Takahashi Y, *et al*. Suppressive effect of phosphodiesterase type 4 inhibition on systemic inflammatory responses after cardiopulmonary bypass [J]. J Artif Organs, 2006, 9(3): 144-148.

[15] Schroth M, Plank C, Meissner U, *et al*. Hypertonic-hyperoncotic solutions improve cardiac function in children after open-heart surgery [J]. Pediatrics, 2006, 118(1): e76-e84.

[16] 明佳, 袁侨英, 周艳, 等. 体外 LPS 诱导血管内皮细胞通透性改变及其与连接蛋白 43 的关系[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(24): 2582-2585.

[17] Aosasa S, Ono S, Mochizuki H, *et al*. Mechanism of the inhibitory effect of protease inhibitor on tumor necrosis factor alpha production of monocytes[J]. Shock, 2001, 15(2): 101-105.

(**收稿**:2012-10-17;**修回**:2013-01-07)

(编辑 栾 嘉)