基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1509-04

内质网应激在高脂血症大鼠心肌细胞凋亡中的作用

周 平[1],张 彬[1],翟福利[1],李法琦[1],常晓东[2],甘 华[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院老年病科,重庆 400016;2.重庆医科大学附属第一医院肾内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究内质网应激是否在高脂血症大鼠诱导心肌细胞凋亡中起作用。方法:通过建立高脂血症大鼠模型,全自动化生化仪检测血清甘油三酯(Triglycercide,TG)及胆固醇(Cholesterol,TC)水平;HE 染色观察心肌组织的病理学变化;TUNEL 法检测心肌细胞凋亡;免疫组化法及 RT-PCR 技术检测心肌细胞内质网应激(Endoplasmic reticulum stress,ERS)信号通路分子 GRP78 的表达变化。结果:喂养 12 周时模型组大鼠血清 TC、TG 含量明显高于对照组($P<0.01$);大鼠模型组较正常组心肌组织排列紊乱、边界不清、心肌纤维断裂、部分细胞核溶解消失;模型组大鼠心肌细胞凋亡率明显高于正常组($P<0.05$);大鼠心肌 GRP78mRNA 及蛋白的表达量,模型组均较对照组明显升高($P<0.05$)。结论:ERS 途径可能在高脂血症诱导心肌细胞凋亡中起到重要作用。

【关键词】高脂血症;内质网应激;心肌细胞;凋亡;

【中国图书分类法分类号】R541.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-08

Effect of endoplasmic reticulum stress on apoptosis of cardiomyocyte in hyperlipidemia rats

ZHOU Ping, et al

(*Department of Gerontology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the mechanism of effects of endoplasmic reticulum stress on apoptosis of cardiomyocyte in hyperlipidemia rats. *Methods*: Rat model of established with fatty dieting. After twelve weaks, the serum triglycerides (TG) and cholesterol (TC) were oberserved by completely automatic biochemistry meter; The pathological changes of myocardial tissue were detected by HE staining; The apoptosis of cardiomyocyte were tested by TUNEL. The expression of endoplasmic reticulum stress associated molecular glucose regulated protein 78 in myocardial tissue were tested by immunohistochemistry and RT-PCR. *Results*: The levels

作者介绍:周 平(1971-),女,讲师,硕士,
研究方向:老年心血管基础与临床研究。

通讯作者:李法琦,男,教授,E-mail:faqili_2006@yahoo.com.cn。

cancer[J]. Nat Clin Pract Oncol, 2005, 2(6): 315-324.

[2] Ren W, Duan Y, Yang Y, et al. Down-regulation of Stat3 induces apoptosis of human glioma cell: a potential method to treat brain cancer[J]. Neurol Res, 2008, 30(3): 297-301.

[3] 杨 光,裘正军,张 放,等.激活和抑制 Stat3 信号途径对胰腺癌细胞侵袭能力的影响[J].肿瘤,2009,29(7):645-649.

[4] 吴 健,王方金,何蕴韶.STAT3 特异性小干扰 RNA 表达载体的构建及其对 STAT3 表达的抑制[J].肿瘤杂志,2005,25(1):37-40.

[5] Visintin I, Feng Z, Longton G, et al. Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(4): 1065-1072.

[6] Abou-Ghazal M, Yang D S, Qiao W, et al. The incidence, correlation with tumor-infiltrating inflammation, and prognosis of phosphorylated STAT3 expression in human gliomas[J]. Clin. Cancer Res, 2008, 14(24): 8228-8235.

[7] Chen X, Lin J, Kanekura T, et al. A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of malignant melanoma[J]. Cancer Res, 2006, 66(23): 11323-11330.

[8] 李光辉,陈正堂,胡义德,等.Lentivirus 介导 RNAi 抑制人胶质瘤干细胞 STAT3 基因生物学效应观察[J].中华神经外科疾病研究杂志,2008,7(6):498-501.

[9] Klosek SK, Nakashiro K, Hara S, et al. Stat3 as a molecular target in RNA interference-based treatment of oral squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2008, 20(4): 873-878.

[10] Kunigal S, Lakka S S, Sodadasu P K, et al. Stat3-siRNA induces Fas-mediated apoptosis in vitro and in vivo in breast cancer[J]. Int J Oncol, 2009, 34(5): 1209-1220.

[11] Fan Y, Zhang Y L, Wu Y, et al. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 expression by RNA interference suppresses invasion through inducing anoikis in human colon cancer cells[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(3): 428-434.

[12] 汪光蓉,张国元,杨 健,等.小干扰 RNA(siRNA)对小鼠乙型肝炎病毒复制和表达影响的实验研究[J].中国现代医学杂志,2008,18(2):157-160.

[13] Song E, Lee S K, Wang J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis[J]. Nat Med, 2003, 9(3): 347-351.

[14] Fuchs U, Borkhardt A. The application of siRNA technology to cancer biology discovery[J]. Adv Cancer Res, 2007, 96: 75-102.

(责任编辑:关蕴良)

of TC and TG in blood sera of control group did not change after 12 weeks, while TC and TG in model group significantly increased along with the te mporal prolongation compared with those in control group ($P<0.01$). The expression of GRP78 mRNA and protein in myocardiocyte of rats in model group significantly increased with those in control group ($P<0.05$). Enhanced expression of GRP78 could be induced by fatty diet. *Couclusion*: The hyperlipidemia maybe can induce myocardiocyte apoptosis through endoplasmic reticulum pathways.
[Key words] Hyperlipidemia; Endoplasmic reticulum stress; Cardiomycyte; Apoptosis

近年研究发现，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，其功能紊乱时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)。研究表明，ERS 参与动脉粥样硬化、心肌缺血再灌注损伤、心力衰竭等病理生理过程[1-3]。研究发现，高脂血症可诱发和加重心肌缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡[4]，ERS 作为细胞凋亡的新机制，在心肌肥厚合并心力衰竭的心肌细胞凋亡中起重要作用[5]，推测 ERS 也可能是高脂血症导致心肌细胞凋亡的重要机制。本实验建立高脂血症大鼠模型，观察心肌细胞凋亡和 ERS 信号通路分子－葡萄糖调节蛋白(Glucose regulated protein，GRP)78 的表达，探讨 ERS 在高脂血症大鼠诱导的心肌细胞凋亡中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型建立

清洁级雄性 Wistar 大鼠 16 只，4 周龄，体重 200~250 g。动物及普通饲料由第三军医大学大坪医院试验动物中心提供。适应性饲养 1 周后，分为对照组(n=8)、高脂血症模型组(n=8)。对照组给予基础饲料，高脂血症模型组给予高脂饲料(2%胆固醇、10%猪油、0.5%胆盐、5%蛋黄、0.2%的丙硫氧嘧啶、82.3%基础饲料)。

1.2 主要试剂

兔抗大鼠 GRP78 抗体(美国 Santa Cruz 公司)，SABC 免疫组化试剂盒、TUNEL 试剂盒(武汉博士德)，RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)；其余为国产分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 血清胆固醇(Triglycercide TC)、甘油三酯(Cholesterol，TG)测定 在饲养 12 周时，分别取各组大鼠的尾静脉血，用全自动化生化仪检测血清中 TC、TG 含量。

1.3.2 心肌组织的病理学检测 确定模型成功后，用断髓法处死动物，消毒大鼠胸部，用灭菌手术器械打开胸腔，迅速取出心脏，沿室间隔分离左心室，沿左心室最宽处垂直于长轴留取的心肌组织一部分置于 4%多聚甲醛固定，经脱水、石蜡包埋、切片(4 μm)后，行 HE 染色，光学显微镜下观察心肌组织的病理学改变。

1.3.3 心肌细胞凋亡检测 按照 TUNEL 试剂盒说明书进行操作。光镜下正常心肌细胞核呈蓝色，凋亡心肌细胞核呈棕黄色。每一切片选取 5 个视野，在 200 倍高倍镜下，计算阳性细胞数，并计算心肌细胞凋亡指数(Cardiocytes apoptosis index，CAI)。CAI =(阳性细胞数目/计数细胞总数)×100%。

1.3.4 免疫组化检测心肌 GRP78 蛋白质的表达 切片常规脱蜡至水，微波修复抗原，加入 1:1 000 稀释的兔抗大鼠 GRP78 抗体，4℃过夜。PBS 冲洗后分别加入羊抗兔 IgG-辣根过氧化酶，作用 30 min。DAB 显色，复染后封片。细胞浆着棕黄色者为阳性表达细胞，细胞浆无棕色或与背景色一致者为阴性。

1.3.5 RT-PCR 检测心肌 GRP78 mRNA 的表达 基因 GRP78 引物序列的上游引物为 5'-AGTGGTGGCCACTAATGGAG-3'，下游引物为 5'-CATGGTAGAGCGGAACAGGT-3'，预计扩增的产物长度为 289 bp。β-actin 上游引物为 5'-AGTGGTGGCACTAATGGAG-3'，下游引物为 5'-TCTTTTGTCAGGGGTCGTTC-3'，预计扩增的产物长度 696 bp。PCR 反应条件为：94℃ 3 min，94℃ 40 s，55℃ 40 s，72℃ 1 min，35 个循环，结束前 72℃延伸 10 min。

1.4 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 软件分析处理。

2 结果

2.1 血清血脂水平的变化

喂养 12 周后，与普通饲料喂养的正常对照组比较，高脂饲料喂养的高脂血症组大鼠血清 TC 和 TG 水平均显著增高，其差异均有统计学意义($P<0.01$)；从而确立模型建立成功。

表 1 各组大鼠血清 TC、TG 水平 (n=8，$\bar{x} \pm s$，mmol/L)

组别	TC	TG
正常对照组	1.79 ± 0.08	0.42 ± 0.04
高脂血症组	8.28 ± 0.67[a]	1.14 ± 0.10[b]

a、b：$P<0.01$，与正常对照组比较

2.2 心肌组织病理学的改变

用光镜观察心肌组织，正常对照组心肌细胞排列规则、心肌细胞边界清晰、细胞核完整；高脂血症组心肌细胞排列紊乱、边界不清、心肌纤维断裂、部分细胞核溶解消失。见图 1。

2.3 心肌组织凋亡细胞的变化

凋亡的心肌细胞核内分布有棕褐色颗粒，体积等于或小于正常细胞核。正常对照组偶见心肌细胞凋亡，心肌细胞 CAI 为 2.6% ± 0.25%，高脂血症组心肌细胞 CAI 为 38.37% ± 0.65%，显著高于正常对照组($P<0.05$)。见表 2、图 2。

2.4 心肌组织 GRP78 蛋白表达的变化

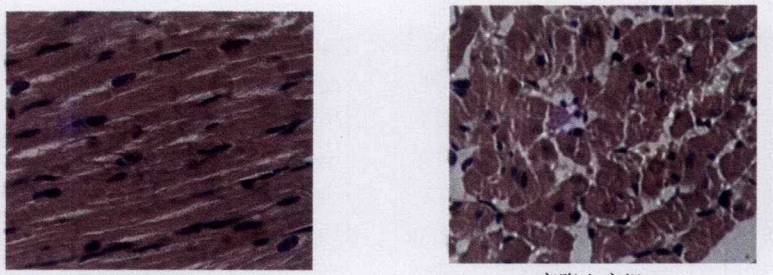
免疫组化结果显示，正常对照组心肌组织 GRP78 蛋白有微量表达；高脂血症组 GRP78 蛋白呈强阳性表达，胞浆内充满棕黄色颗粒，其表达量明显高于正常对照组（$P<0.05$）。见图 3、表 3。

2.5 心肌组织 GRP78 mRNA 表达的变化

与正常对照组比较，高脂血症组 GRP78 mRNA 的表达明显增高，具有显著统计学差异（$P<0.05$）。见图 4、表 3。

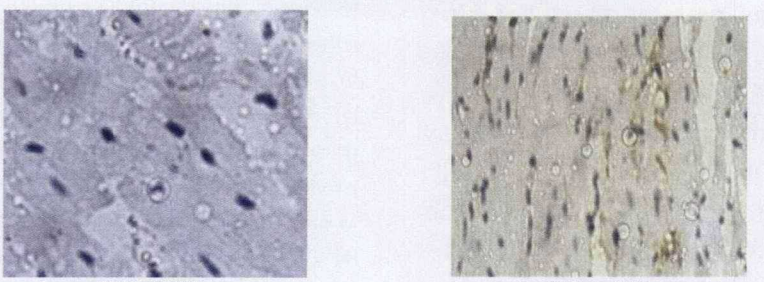
3 讨 论

高脂血症是一常见的心血管疾病，系人体脂代谢失调所致，是构成动脉粥样硬化的重要因素，也是公认的高血压、冠心病和脑血管意外的主要危险因素之一，严重地危害人类的



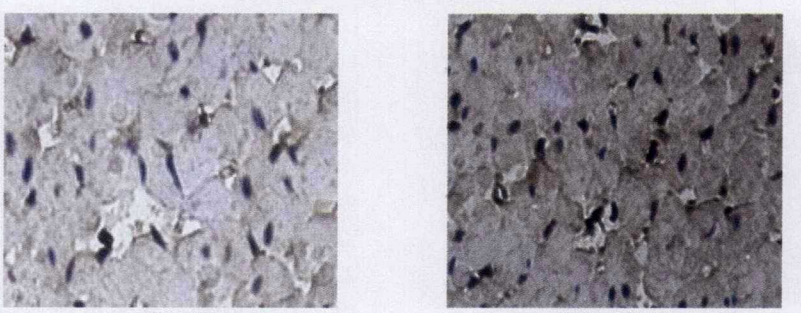
正常对照组　　高脂血症组

图 1　12 周时各组大鼠心肌病理改变（HE×400）



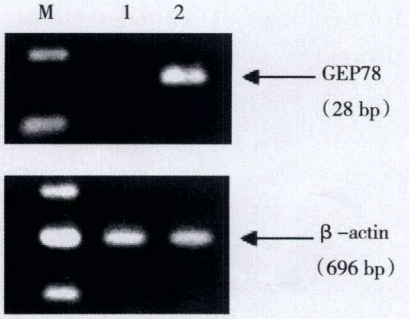
正常对照组　　高脂血症组

图 2　TUNEL 法检测各组大鼠心肌细胞凋亡的严重程度（DAB ×200）



正常对照组　　高脂血症组

图 3　SABC 法检测各组大鼠心肌组织 GRP78 的表达水平（×400）



1. 正常对照组；2. 高脂血症组

图 4　RT-PCR 检测各组大鼠心肌组织 GRP78 的表达水平

表 2　各组大鼠心肌细胞的凋亡指数[CAI=(阳性细胞数目/计数细胞总数)×100%]

组别	CAI
正常对照组	2.6% ± 0.25%
高脂血症组	38.37% ± 0.65%[a]

a：$P<0.05$，与正常对照组比较

表 3　大鼠心肌组织 GRP78 蛋白及 GRP78 mRNA 表达（$n=8, \bar{x} \pm s$）

组别	GRP78 蛋白（平均光密度值）	GRP78 mRNA
正常对照组	0.05 ± 0.01	0.21 ± 0.03
高脂血症组	0.23 ± 0.03[a]	0.78 ± 0.12[a]

a：$P<0.05$，与正常对照组比较

生命和健康。高脂血症可以激活内皮细胞、单核细胞等多种炎症细胞，从而引起心肌细胞的功能障碍，还可以产生脂质过氧化反应，产生大量的自由基，从而损伤心肌细胞[6]。我们通过喂养法建立高脂血症大鼠模型中发现，在喂养 12 周后血清 TC、TG 较正常对照组明显增高($P<0.01$)及心肌细胞的凋亡($P<0.05$)，其次高脂血症可以引起心肌组织的结构紊乱，降低了心肌细胞对脂质因子的耐受性。

心肌细胞凋亡存在于心血管系统的许多生理和病理变化过程中，是导致多种心血管疾病发生的重要细胞学基础。机体内存在着促细胞凋亡和抗细胞凋亡信号转导通路，彼此之间存在着复杂的调控网络。ERS 是由某种原因使内质网生理功能发生紊乱的一种亚细胞器病理过程，可促进内质网对蓄积在网腔内的错误折叠或未折叠蛋白质的处理，从而有利于维持细胞的正常功能并使之存活，但长时间的 ERS 可引起细胞凋亡[7]。GRP78 又称免疫球蛋白结合蛋白(Bip)，是热休克蛋白 70 家族的成员之一，存在于细胞质内质网膜上，是 ERS 的标志蛋白。由 ERS 诱发的细胞凋亡有 3 种细胞信号途径：①CHOP/GADD153 基因激活转录途径；②JNK 激活途径；③内质网特有的半胱氨酸蛋白酶 caspase-12 激活途径。研究发现，在腹主动脉缩窄术后大鼠心肌细胞的凋亡及 ERS 信号分子 GRP78、CHOP 蛋白表达明显高于假手术组[8]；Zhao H 等[9]在腹主动脉结扎(TAC 模型)引起心肌重构过程中，ERS 信号分子 GRP78、GRP94、CHOP/GADD 153 的表达增多，Zhang GG 等[10]通过离体心脏行离体灌注(Langendorff 氏法)建立大鼠心肌再灌注损伤的模型发现，心肌细胞凋亡明显增加，GRP78、CHOP 蛋白、caspase-12 蛋白明显增加。这些试验都证实 ERS 参与心肌细胞凋亡及心肌重构。我们在试验中发现，高脂血症组心肌组织排列紊乱，心肌细胞的 GRP78 mRNA 表达上调($P<0.05$)，心肌细胞的凋亡率明显增加($P<0.05$)，说明高脂血症诱导了 ERS 相关的凋亡信号通路，这与文献报道基本上是一致的。

为了避免葡萄糖或营养物质缺乏、病毒感染、药物、毒素和分泌蛋白合成增加等原因导致 ERS 的出现，我们严格设置对照组(无上述因素干扰)中发现只有极少量的内质网应激被激活，在高脂血症组大鼠 ERS 被大量激活(GRP78 信号分子表达增高)，推测高脂血症诱导 ERS 信号通路的激活，而其他学者研究亦表明，ERS 后启动固醇调节级联反应，与其脂质代谢密切相关[11]。脂质代谢分子是否在 ERS 激活中起主要的中介作用，是激活何种 ERS 凋亡信号通路，还有待于进一步研究。因此本文研究发现高脂血症可以诱导心肌细胞凋亡，可能与激活 ERS 途径相关，具体的信号分子调节网络机制，还有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] Lim W S, Timmins J M, Seimon T A, et al. Signal transducer and activator of transcription-1 is critical for apoptosis in macrophages subjected to endoplasmic reticulum stress in vitro and in advanced atherosclerotic lesions in vivo[J]. Circulation, 2008, 117(7): 940-951.

[2] Kanda K, Matsuda T, Oka T. Mechanical stress induced cellular orientation and phenotypic modulation of 3-D cultured smooth muscle cells[J]. ASAIO J, 1993, 39(3): M686-M690.

[3] Sun Y, Liu G, Song T, et al. Upregulation of GRP78 and caspase-12 in diastolic failing heart[J]. Acta Biochim Pol, 2008, 55(3): 511-516.

[4] Wang T D, Chen W J, Su S S, et al. Increased cardiomyocyte apoptosis following ischemia and reperfusion in diet-induced hypercholesterolemia: relation to Bcl-2 and Bax proteins and caspase-3 activity[J]. Lipids, 2002, 37(4): 385-394.

[5] 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.

[6] Kaminski K A, Bonda T A, Korecki J, et al. Oxidative stress and neutrophil activation-the two keystones of ischemia/reperfusion injury[J]. Int J Cardiol, 2002, 86(1): 41-59.

[7] Xu C, Bailly-Maitre B, Reed J C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2656-2664.

[8] 唐家荣，晏小妮，周昌清，等. 替米沙坦对主动脉缩窄大鼠内质网应激相关的心肌细胞凋亡的影响[J]. 中华心血管病杂志，2008，36(9)：838-842.

[9] Zhao H, Liao Y, Minamino T, et al. Inhibition of cardiac remodeling by pravastatin is associated with amelioration of endoplasmic reticulum stress[J]. Hypertens Res, 2008, 31(10): 1977-1987.

[10] Zhang G G, Teng X, Liu Y, et al. Inhibition of endoplasm reticulum stress by ghrelin protects against ischemia/reperfusion injury in rat heart [J]. Peptides, 2009, 30(6): 1109-1116.

[11] Pahl H L. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus[J]. Physiol Rev, 1999, 79(3): 683-701.

(责任编辑：冉明会)