维普资讯 http://www.cqvip.com



论 著 文章编号:0253-3626(2008)06-0704-04

# 内质网应激联合线粒体在宫内窘迫胎鼠脑神经细胞凋亡中的作用研究

卢 敏,张 华,漆洪波,张建华

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨内质网和线粒体在胎鼠缺血缺氧再灌注损伤脑神经细胞凋亡中的联合作用。方法:制备宫内窘迫模型,将其随机分为正常组、缺血再灌注组。以 Western blot 技术检测葡萄糖调节蛋白 78(Glucose regulated protein 78,GRP78),半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)-9、caspase-12,细胞色素 -c(Cytochrome C)蛋白表达水平。结果:缺血再灌注组各时间点 GRP78 蛋白表达水平均高于正常组,于再灌注 3h 时达高峰,随再灌注时间延长,蛋白表达逐渐减低。缺血再灌注组各时间点 caspase-9、caspase-12 蛋白表达水平均高于正常组,均于再灌注 12h 达高峰。缺血再灌注组胞浆 cytoron C 蛋白表达水平在各个时间点均高于正常组,并于再灌注 12h 达峰值。结论:内质网和线粒体在宫内窘迫胎鼠脑神经细胞凋亡的发生过程中具有协同作用。

【关键词】宫内窘迫;凋亡;内质网;线粒体

【中国图书分类法分类号】R714 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-20

# Study of unification of endoplasmic reticulum and mitochondrium in fetal rat cerebral neuron apoptosis induced by intrauterine distress

*LU Min, et al*

(*Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluae the unification of endoplasmic reticulum and mitochondrium in fetal rat cerebral neuron apoptosis induced by intrauterine distress. *Methods*: Fetal rat intrauterine distress model was established. The samples were randomly divided into normal group and ischemia-reperfusion group (IR). Expression of GRP78, caspase-9, caspase-12, and cytoron C protein were detected by western blot technique. *Results*: The expression of GRP78 on corresponding time in IR group was significantly higher than that in normal group. And it reached the maximum at 3h of reperfusion. The expression of GRP78 reduced step by step as reperfusion time extended. The expression of caspase-9 and caspase-12 at corresponding time in IR group were significantly higher than those in normal group. Their expression increased rapidly and reached the maximum at 12h of reperfusion. The expression of cytoron C in kytoplasm at corresponding time in IR group was significantly higher than that in normal group and reached the maximum at 12h of reperfusion. *Conclusion*: The synergistic effect of endoplasmic reticulum and mitochondrium plays an important role in fetal rat cerebral neuron apoptosis induced by intrauterine distress.

【Key words】 Intrauterine distress; Apoptosis; Endoplasmic reticulum; Mitochondrium

缺血、缺氧等因素可引起内质网应激,同时也可导致线粒体 cytochrome C 的胞浆释放,进而激活 caspase 级联反应,最终导致细胞凋亡。在细胞凋亡的过程中内质网通路与线粒体通路相互关联,相互促进[1]。GRP78 是内质网中含量最丰富的分子伴侣,是内质网应激(Emdoplasmic reticulum stress, ERS)发生的标志物。本研究采用胎鼠宫内窘迫模型模拟胎儿窘迫所致全身性缺血缺氧病理过程,探讨内质网和线粒体在脑神经细胞凋亡中的联合作用。

作者介绍:卢 敏(1981- ),女,硕士,
研究方向:胎儿宫内窘迫的治疗。

通讯作者:张 华,女,副主任医师,E-mail:h2844@sohu.com。

基金项目:重庆市自然科学基金(2004-5480);
重庆市卫生局科研基金资助项目(05-2-189)。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

维普资讯 http://www.cqvip.com



孕 17d SD 大鼠(清洁级)共 50 只,体重为 300 ~ 320g(由重庆医科大学试验动物中心提供)。将其随机分为正常组(Nor,$n$=10),缺血再灌注组(I/R,$n$=40)。正常组不行任何手术,孕 17d 剖出胎鼠,采集标本。缺血再灌注组(I/R)分为宫内窘迫再灌注 3h、6h、12h、24h(每个时间点各 10 只)。

1.2 宫内窘迫模型制作方法

参照 Tanaka 等[1]方法,将符合试验要求的孕鼠以 3.5%水合氯醛(1ml/100g)腹腔注射麻醉,取仰卧位,常规消毒铺巾,取下腹正中切口进腹。用 2 个无损伤性微小动脉夹分别靠内侧钳夹一侧子宫血管 15min,造成子宫胎盘循环障碍致宫内窘迫。钳夹过程中以温生理盐水纱布,保持子宫温度稳定在 37℃左右。15min 后取下动脉夹恢复血供,造成宫内窘迫再灌注损伤模型,并逐层关腹。将再灌注损伤模型于相应时间点剖出胎鼠。

1.3 Western blot

提取胎鼠脑组织胞浆蛋白及内质网蛋白,以 Bradford 法行蛋白定量,SDS-PAGE 凝胶电泳后,电转膜,分别加入 caspase-9 多克隆抗体(StressGen)、caspase-12 多克隆抗体(AnaSpec)、GRP78 多克隆抗体(StressGen)、cytochrome C 多克隆抗体(Cell Signal)、Calreticulin 多克隆抗体(StressGen)、Actin(Santa Cruz),辣根酶标记二抗,DAB 显色。膜晾干后放入美国 Bio-Rad 公司的图像摄取系统,照相、保存,以 Quantity One 图像分析系统(美国 Bio-Rad 公司产品)进行条带光密度分析,计算目的蛋白与内参蛋白的光密度积分的比例,作为目的蛋白的表达水平。

1.4 统计学处理

所有数据资料中计量资料匀以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,组间差异采用方差分析、两组间均数比较采用 $t$ 检验,$P < 0.05$ 为差异有显著性。采用 SPSS11.5 软件进行统计学处理。

## 2 结 果

### 2.1 GRP78 蛋白表达水平的变化

正常组 GRP78 蛋白表达水平最低;I/R 组各时间点 GRP78 蛋白表达水平均高于正常组,差异有显著性($P < 0.05$)。其中再灌注 3h 时达高峰,随再灌注

表 1 各组不同时间点 GRP78 蛋白表达水平的变化($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | $I_{0min}R_{0h}$ | $I_{15min}R_{3h}$ | $I_{15min}R_{6h}$ | $I_{15min}R_{12h}$ | $I_{15min}R_{24h}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Nor | 0.012 ± 0.003 | – | – | – | – |
| I/R | – | 0.092 ± 0.008* | 0.078 ± 0.006* | 0.054 ± 0.009* | 0.038 ± 0.007* |

与正常组比较,*$P < 0.05$

表 2 各组不同时间点 caspase-9 蛋白表达水平的变化($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | $I_{0min}R_{0h}$ | $I_{15min}R_{3h}$ | $I_{15min}R_{6h}$ | $I_{15min}R_{12h}$ | $I_{15min}R_{24h}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Nor | 0.004 ± 0.003 | – | – | – | – |
| I/R | – | 0.042 ± 0.003* | 0.086 ± 0.007* | 0.142 ± 0.006* | 0.112 ± 0.009* |

与正常组比较,*$P < 0.05$

表 3 各组不同时间点 caspase-12 蛋白表达水平的变化($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | $I_{0min}R_{0h}$ | $I_{15min}R_{3h}$ | $I_{15min}R_{6h}$ | $I_{15min}R_{12h}$ | $I_{15min}R_{24h}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Nor | 0.006 ± 0.002 | – | – | – | – |
| I/R | – | 0.076 ± 0.006* | 0.113 ± 0.010* | 0.125 ± 0.005* | 0.057 ± 0.008* |

与正常组比较,*$P < 0.05$

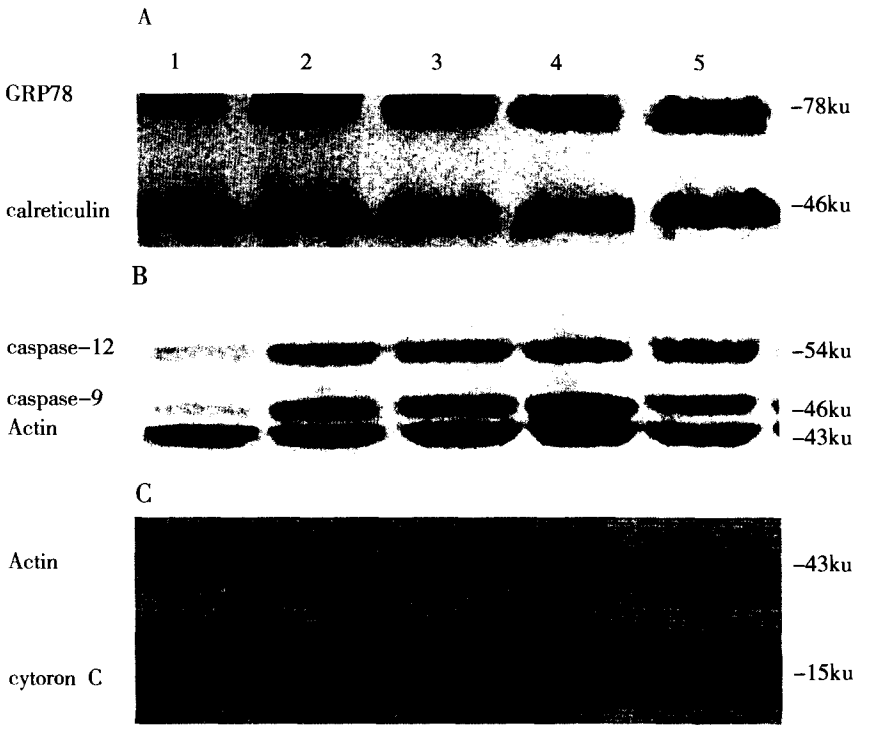
表 4 各组不同时间点 胞浆 cytochrome-C 蛋白表达水平的变化($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | $I_{0min}R_{0h}$ | $I_{15min}R_{3h}$ | $I_{15min}R_{6h}$ | $I_{15min}R_{12h}$ | $I_{15min}R_{24h}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Nor | 0.012 ± 0.005 | – | – | – | – |
| I/R | – | 0.040 ± 0.006* | 0.076 ± 0.009* | 0.108 ± 0.005* | 0.089 ± 0.008* |

与正常组比较,*$P < 0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com






1. 正常组；2、3、4、5. 缺血再灌注 3h、6h、12h、24h

**图 1 Western blotting 检测 GRP78、caspase-9、caspase-12、cytochrome C 的蛋白表达**

时间延长，蛋白表达逐渐减低(见图 -1A，表 1)。

2.2 caspase-9、caspase-12 蛋白表达水平的变化

正常组 caspase-9、caspase-12 蛋白表达最低。I/R 组各时间点二者表达水平均高于正常组，差异有显著性($P < 0.05$)。再灌注时间越长，二者表达水平增加幅度越大，均于再灌注 12h 达高峰，其中 caspase-9 的上升幅度较大，caspase-12 的上升幅度相对较平缓(见图 -1B，表 2、3)。

2.3 胞浆 cytochrome C 蛋白表达水平的变化

正常组胞浆 cytochrome C 蛋白表达水平最低；I/R 组胞浆 cytochrome C 蛋白表达水平在各个时间点均高于正常组，差异有显著性($P < 0.05$)，并于再灌注 12h 达峰值(见图 -1C，表 4)。

## 3 讨 论

细胞凋亡是生物学和医学领域的一大热门研究课题。越来越多的研究表明，在脑缺血性损伤中凋亡起着重要作用。而有关凋亡的起源问题，既往认为线粒体在凋亡发生过程中起核心作用。线粒体起源的死亡信号，即 cytochrome C 的胞浆释放，导致 caspase-9 自发激活，活化的 caspases-9 继续激活下游 caspases-3，引发死亡蛋白酶 caspase 级联反应，导致细胞凋亡。

近来研究结果证明，内质网在控制细胞命运中具有更重要的作用。缺血、缺氧、$Ca^{2+}$ 平衡失调等都可引发 ERS，一定程度的 ERS 对细胞有保护作用，而应激过强或时间过长则对机体细胞产生损伤作用甚至诱发细胞凋亡。有研究表明，内质网可通过 caspase-12 单独诱导细胞凋亡反应，但很多其他重要凋亡机制需与线粒体共同作用[1]。内质网和线粒体在多种细胞的细胞质内均有广泛分布。高分辨率显微镜下可见，多数线粒体和内质网间存在紧密接触点[3,4]，这种紧密联系是功能上相互作用的基础。内质网应激刺激线粒体非特异性的通透性转运孔道(Permeability transition pore，PTP)敏感性增加，促进 PTP 的开放，PTP 的开放可增加线粒体外膜的通透性，促进 cytochrome C 释放，活化 caspase-9，导致细胞凋亡[5,6]。据 Jimbo 等[7]的报道认为，内质网应激活化 caspase-8，分裂 Bid 成为 tBid，Bid 蛋白是凋亡蛋白 Bcl-2 家族的亚族成员，tBid 的 C- 末端易位到线粒体膜上，激活 Bax 或 Bak，促进 Bax 和 Bak 寡聚化，形成跨膜通道，增加线粒体外膜的通透性，允许 cytochrome C 释放。Tomas 等报道，磷酸分运蛋

维普资讯 http://www.cqvip.com



白 2(Phosphoacidic cluster sorting protein2,PACS-2)是一种多功能分类蛋白,控制内质网 - 线粒体轴及其介导的细胞稳定性和凋亡,它可以使完整长度的Bid 蛋白质易位到线粒体,并且在线粒体膜上活化形成 tBid,引起 cytochrome C 释放。

ERS 反应涉及很多细胞因子或蛋白质,它们在内质网应激反应最终导致细胞死亡还是存活的过程中,发挥着重要作用,常见的与内质网应激反应有关的因子有 GRP、caspase 等。葡萄糖调节蛋白(GRPs)是一类高度保守的应激蛋白,许多应激条件都可以诱导其表达上调。分子量为 78ku 的GRP78,或免疫球蛋白重链结合蛋白(Bip),是葡萄糖调节蛋白家族的主要成员,主要分布在内质网腔中,研究表明 GRP78 表达的上调是内质网应激的标志[8]。正常细胞通过增加编码 GRP78、GRP94 等的基因转录,促进蛋白质的正确折叠,减少错误折叠蛋白质的数量,最终减轻内质网应激反应。

我们的研究结果发现,GRP78 在正常胎鼠脑组织有少量表达,在缺血再灌注时,表达水平明显增加。证实宫内窘迫所导致的胎鼠缺血缺氧性脑损伤引发了脑神经细胞内质网应激。cytochrome C 在正常胎鼠脑神经细胞胞浆中仅有极少量的表达;在缺血再灌注损伤后,cytochrome C 表达水平明显增加,并于再灌注 12h 达高峰,落后于 GRP78 表达的高峰期,推测内质网应激可能刺激线粒体释放 cytochrome C。caspase-9、caspase-12 在正常胎鼠脑组织仅有微弱的表达,在宫内窘迫再灌注损伤后,表达水平显著增加,均于再灌注 12h 达高峰。而 caspase-9 表达上调幅度较 caspase-12 高,持续时间长,caspase-12 表达上调时间先于 caspase-9。这提示,caspase-9 的表达除了受 caspase-12 表达的影响,还受 cytochrome C 的调控,即内质网介导的细胞凋亡通路同线粒体引发的凋亡通路有关联。实验结果还表明,GRP78 在再灌注 3h 达高峰后表达逐渐下降,而与凋亡相关的 cytochrome C、caspase-9、caspase-12 均于再灌注 12h 达高峰,提示缺血再灌注损伤早期内质网应激对细胞有一定的保护作用,但随着损伤时间的延长,对细胞具有保护作用的 GRP78 表达失代偿,过度的应激反应使细胞损伤加重。

GRP78、cytochrome C 和 caspase-9,caspase-12 4 种蛋白的表达变化规律表明内质网和线粒体在宫内窘迫胎鼠脑组织损伤中具有协同作用。为研究胎儿宫内窘迫所致神经细胞凋亡的发生、发展机制提供了新的思路。

## 参 考 文 献

[1] Mouw G,Zechel JL,Gamboa J,et al. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase,after permanent focal ischemia in rat[J]. Neuroreport,2003;14(2):183-186.

[2] Tanaka M,Natori M,Ishimoto H,et al. Experimental growth retardation produced by transient period of uteroplacental ischemia in pregnant Sprague-Dawley rats[J]. Am J Obstet&Gynecol,1994;171(5):1231-1234.

[3] Mannella CA,Buttle K,Rath BK,et al. Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum[J]. Biofactors,1998;8(3-4):225-228.

[4] Rizzuto R,Pinton P,Carrington W,et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial $Ca^{2+}$ responses[J].Science,1998;280(5370):1763-1766.

[5] Walter L,Hajnoczky G. Mitochondria and endoplasmic reticulum: the lethal interorga-nelle cross-talk[J]. J Bioenerg Biomembr,2005;37(3):191-206.

[6] Boehning D,Patterson RL,Sedaghat L,et al. Cytochrome c binds to inositol(1,4,5) trisphosphate receptors,amplifying calcium-dependent apoptosis[J]. Nat Cell Biol,2003;5(12):1051-1061.

[7] Jimbo A,Fujita E,Kouroku Y,et al. ER stress induces caspase-8 activation,stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation[J]. Exp Cell Res,2003;283(2):156-166.

[8] Blagosklonny MV. Cell death beyond apoptosis[J]. Leukemia,2000;14(8):1502-1508.

(责任编辑:冉明会)