

研究论文

C/EBP 同源蛋白介导的内质网应激相关凋亡途径参与腹主动脉狭窄致大鼠心肌肥厚

张振英^{1,2}, 刘秀华^{1,*}, 孙 胜¹, 荣 飞¹, 郭晓笋^{1,2}, 胡维诚²

¹ 中国人民解放军总医院病理生理研究室, 北京 100853; ² 山东大学医学院病理生理教研室, 济南 250012

摘 要: 内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是细胞对环境改变的适应性反应, 但过度 ERS 可诱导细胞凋亡。C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)是 ERS 相关凋亡途径中重要的信号分子。本实验旨在探讨 CHOP 介导的 ERS 相关凋亡途径在大鼠腹主动脉狭窄致高血压心肌肥厚发生、发展中的作用。健康雄性 Wistar 大鼠 85 只, 随机分为模型组($n=45$)和对照组($n=40$), 模型组行腹主动脉狭窄术, 对照组仅分离腹主动脉不行狭窄术, 分别于术后 1 d、3 d、7 d、14 d、28 d 时观察各组血流动力学变化, 测定全心重/体重比(HW/BW)和左心室重/体重比(LVW/BW), RT-PCR 技术检测左心室心肌组织 ERS 相关分子葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)、钙网蛋白(calreticulin, CRT)和 CHOP mRNA 表达变化, Western blot 分析 GRP78、CRT、CHOP, 以及凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达变化。结果显示, 腹主动脉狭窄可诱导大鼠心肌肥厚, 与对照组比较, 术后 7 d 模型组大鼠血压升高, 心功能代偿性增加, HW/BW 和 LVW/BW 显著增加。模型组内质网分子伴侣 CRT mRNA 表达于术后 1 d 即发生显著上调, 较对照组增加 136% ($P<0.01$), 而蛋白在术后 7 d 开始出现显著变化, 较对照组升高 69.2% ($P<0.01$); GRP78 基因和蛋白表达均于术后 7 d 显著增加, 分别较对照组增加 20% 和 186% (均 $P<0.01$), 在此后观察期间内 CRT 和 GRP78 mRNA 和蛋白均持续高水平表达。相关分析显示左心室内压最大上升速率($+dp/dt_{max}$)分别与 CRT 蛋白表达($r=0.780$, $P<0.01$)和 GRP78 蛋白表达($r=0.694$, $P<0.01$)显著正相关。长期 ERS (14 d)可触发 CHOP 凋亡途径, 模型组大鼠心肌组织 CHOP mRNA 和蛋白表达均于术后 14 d 显著上调, 分别较对照组增加 22.2% 和 76.0% (均 $P<0.01$), 同时促凋亡蛋白 Bax 表达增加(较对照组增加 41.1%, $P<0.01$), 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低(较对照组降低 25.5%, $P<0.01$); 相关分析显示 CHOP 蛋白表达与 Bax 表达正相关($r=0.654$, $P<0.01$), 而与 Bcl-2 表达负相关($r=-0.671$, $P<0.01$)。上述结果提示腹主动脉狭窄早期即可诱导内质网分子伴侣表达变化, 触发 ERS, 长期 ERS 诱导心肌细胞凋亡, CHOP 介导的 ERS 相关凋亡途径可能参与了心肌肥厚过程, 推测心肌细胞凋亡参与了心肌肥厚及失代偿的调节, 决定肥厚心肌失代偿的进程。

关键词: 心肌肥厚; 内质网应激; 凋亡; C/EBP 同源蛋白

中图分类号: R363.2

C/EBP homologous protein-mediated endoplasmic reticulum stress-related apoptosis pathway is involved in abdominal aortic constriction-induced myocardium hypertrophy in rats

ZHANG Zhen-Ying^{1,2}, LIU Xiu-Hua^{1,*}, SUN Sheng¹, RONG Fei¹, GUO Xiao-Sun^{1,2}, HU Wei-Cheng²

¹ Department of Pathophysiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ² Department of Pathophysiology, Medical School of Shandong University, Jinan 250012, China

Abstract: Endoplasmic reticulum stress (ERS) is an adaptive process in response to circumstantial changes, but excessive and/or prolonged ERS can induce cell apoptosis. C/EBP homologous protein (CHOP) is a very important marker participating in ERS-associated cell apoptosis, while the role of the myocyte apoptosis induced by CHOP remains unclear in the development of hypertrophy.

Received 2008-07-22 Accepted 2008-12-22

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30670822) and National Basic Research Development Program of China (No. 2007CB512003).

*Corresponding author: Tel: +86-10-66939763; Fax: +86-10-66936375; E-mail: xiuhualiu98@yahoo.com.cn

The present study aimed to investigate the effect of CHOP-mediated ERS-associated apoptosis on myocardial hypertrophy induced by abdominal aortic constriction in rats. Healthy male Wistar rats were randomly divided into model group ($n=45$) and control group ($n=40$). The rats in model group received abdominal aortic constriction. Hemodynamic changes, whole heart weight/body weight (HW/BW) and left ventricular weight/body weight (LVW/BW) were measured on 1 d, 3 d, 7 d, 14 d and 28 d after surgery, respectively. The mRNA expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78), calreticulin (CRT) and CHOP, which are important markers of ERS, were detected by RT-PCR, and Western blot was used to assess the protein level of GRP78, CRT, CHOP, and apoptosis-associated proteins, Bax and Bcl-2. The results obtained were as follows. Compared with control group, the blood pressure, LVW/BW, and HW/BW of rats in model group increased significantly and cardiac function enhanced compensatively on 7 d after surgery, and increased progressively during the experiment. As early as 1 d after surgery, the mRNA level of CRT in model group increased by 136% ($P<0.01$) compared with control, while the protein expression increased by 69.2% on 7 d after surgery ($P<0.01$). Both mRNA and protein expression of GRP78 increased by 20% and 186% ($P<0.01$) respectively on 7 d after surgery, and the expression sustained high level during the experiment afterwards. Correlation analysis indicated a positive correlation between $+dp/dt_{max}$ and CRT protein expression ($r=0.780$, $P<0.01$) as well as GRP78 protein expression ($r=0.694$, $P<0.01$). Prolonged ERS triggered myocyte apoptosis, as both the mRNA and protein level of CHOP in model group increased by 22.2% ($P<0.01$) and 76.0% ($P<0.01$) respectively compared with control on 7 d after hypertrophy (14 d after surgery), and meanwhile, the protein expression of pro-apoptotic Bax increased by 41.1% ($P<0.01$) and anti-apoptotic Bcl-2 protein expression decreased by 25.5% ($P<0.01$). Correlation analysis indicated a positive correlation between CHOP and Bax expression ($r=0.654$, $P<0.01$), and a negative correlation between CHOP and Bcl-2 expression ($r=-0.671$, $P<0.01$). These results suggest that abdominal aortic constriction induces a significant up-regulation in ER molecular chaperones at early stage of post-surgery, indicating that ERS response is activated in the rat heart; while prolonged ERS could lead to myocyte apoptosis, and CHOP-mediated ERS-associated apoptosis may contribute to myocardial hypertrophy. We speculate that cell apoptosis may take part in the regulation of myocardial hypertrophy and heart failure, and determine the progression of decompensated hypertrophy.

Key words: hypertrophy; endoplasmic reticulum stress; apoptosis; C/EBP homologous protein

心肌肥厚是心肌细胞对损伤因素的代偿反应。心肌肥厚失代偿可导致扩张性心肌病、心力衰竭和猝死等疾病,严重危及人类生命。阐明心肌肥厚的发病机制对于防治心肌肥厚和心力衰竭具有重要的临床意义。目前认为,心肌肥厚的发病机制涉及神经-体液系统紊乱、能量代谢障碍、氧化应激等多种因素的综合作用,而心肌细胞内钙紊乱^[1]和收缩蛋白异常^[2]则是上述多种因素致心肌肥厚的共同靶点。内质网(endoplasmic reticulum, ER),在心肌细胞内称为肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR),是调节细胞内钙稳态和膜/分泌型蛋白合成、折叠的重要细胞器,对维持心肌细胞钙和功能蛋白质稳态具有重要作用。ER对应激刺激非常敏感,多种因素如钙紊乱、蛋白合成增加、氧化应激等均可触发ER应激。适当的ER应激诱导ER分子伴侣如葡萄糖调节蛋白类(glucose-regulated proteins, GRPs)、钙网蛋白(calreticulin, CRT)等表达上调^[3],增强ER钙调节和处理未折叠蛋白的能力,具有细胞保护作用;但是,持续或严重的ER应激可触发ER凋亡信号通路,导致细胞凋亡和组织损伤^[3,4],参与心力衰竭^[5]、糖尿病性心脏病^[6]、缺血性心脏病^[7]等心血管疾病的发生、发展过程。有文献报道心肌肥

厚时ER应激分子CRT、GRP78、GRP94等表达显著上调^[5,8],提示心肌肥厚过程中出现ER应激反应,但ER应激在心肌肥厚发生、发展中的作用及其信号通路尚不清楚。C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)是含有169(人)或168(啮齿类)个氨基酸残基的分子量为29 kDa的蛋白,ER应激时CHOP在转录水平上被诱导,其过表达可导致生长停滞和细胞凋亡^[9]。研究表明CHOP介导的ER应激凋亡通路参与了心力衰竭过程中的细胞凋亡^[5],但是,在压力负荷诱导心肌肥厚过程中ER应激反应及CHOP介导的ER应激凋亡通路的变化及其作用尚待阐明。本工作在大鼠腹主动脉狭窄致高血压心肌肥厚模型上,观察ER分子伴侣CRT和GRP78在心肌肥厚发生、发展过程中的表达变化,探讨CHOP介导的ER应激凋亡途径在压力负荷致心肌肥厚发病中的作用,为阐明心肌肥厚发生机制提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 总RNA提取试剂盒(DP419)、cDNA第一链合成试剂盒(KR104)、2×Taq PCR MasterMix (KT201)、100 bp DNA Ladder (MD109)、

电泳级琼脂糖(RT101)均购自北京天根生化科技有限公司。苯甲基磺酰氟(phenylmethan esulfonyl fluoride, PMSF)、Triton X-100、EDTA、SDS、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、DTT、Leupeptin、TEMED 均为 Sigma 公司产品, 蛋白电泳分子量(7~175 kDa)标记为 Bio-Rad 产品, 兔抗小鼠 CRT 和 GRP78 多克隆抗体购自 Stressgen 公司, 兔抗人 Bax 多克隆抗体购自 Upstate 公司, 兔抗人 Bcl-2 多克隆抗体、兔抗人 GAPDH 单克隆抗体、兔抗人 CHOP 多克隆抗体和 SC-2048 增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒购自 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔和山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 模型制备 清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 85 只, 体重(120±10) g, 购自军事医学科学院实验动物中心[许可证号: SCXK-(军) 2002-001]。按本室以往报道的方法^[9]复制大鼠腹主动脉狭窄模型: 术前禁食 12 h, 自由饮水, 2% 戊巴比妥钠(0.23 mL/100 g)肌肉注射麻醉后, 右侧卧位固定于手术台上, 分离暴露左肾动脉上方腹主动脉, 随机分为模型组($n=45$)和对照组($n=40$)。用针尖磨钝的 5.5 号注射针头与腹主动脉一起结扎, 然后小心拔出针头, 造成腹主动脉部分狭窄; 对照组仅分离腹主动脉不行狭窄术。术后正常饮食, 定时观察生长状态, 分别于术后 1 d、3 d、7 d、14 d、28 d 结束实验。

1.3 观察指标

1.3.1 血流动力学变化 在各观察时间点, 大鼠称重, 20% 乌拉坦(10 mL/kg)腹腔注射麻醉, 仰卧位固定于手术台, 常规消毒, 颈前正中切口, 分离暴露右侧颈总动脉, 行右颈总动脉插管, 经压力传感器与 SMUP-B 生物信号处理系统相连, 描记一段颈动

脉压波形后, 继续行左心室插管, 再描记一段左心室压力曲线。以 MFL Lab200 心功能软件计算平均颈动脉压(mean carotid pressure, MCP)、心率(heart rate, HR)、左心室内压最大上升速率($+dp/dt_{max}$)和左心室内压最大下降速率($-dp/dt_{max}$)。

1.3.2 全心重/体重比和左室重/体重比 上述测定结束后, 开胸取大鼠心脏, 以 4 °C 生理盐水冲洗心脏后, 冰浴条件下去掉脂肪组织, 称取全心重后, 去掉心房和右心室, 保留左心室和室间隔, 称重。计算全心重/体重比(whole heart weight/body weight, HW/BW)和左室重/体重比(left ventricular weight/body weight, LVW/BW)。并迅速留取左心室组织, -80 °C 保存备用。

1.3.3 逆转录 - 聚合酶链反应(RT-PCR) 按照试剂盒操作说明提取左心室组织总 RNA, 两步法行 RT-PCR, cDNA 第一链合成按照试剂盒操作说明, 各目的基因上下游引物(由北京三博远志生物技术公司合成)见表 1, PCR 反应体系如下: cDNA 模板 0.2 μ g, 各目的基因和 GAPDH 上下游引物 0.4 μ mol/L, 2 $\times$ Taq PCR MasterMix 12.5 μ L, 总体系 25 μ L。94 °C 变性 5 min 后进入 PCR 循环: 94 °C 变性 40 s, 54 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 32 个循环, 最后 72 °C 总延伸 10 min。取 5 μ L PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳图像采用 Image-Pro Plus 图像分析软件(Version 4.1, Media Cybernetics, LP, USA)分析平均光密度值, 以目的片段和 GAPDH 的平均光密度比值反映目的基因 mRNA 的相对水平。

1.3.4 Western blot 检测 按本室以往报道的方法^[11]提取左心室组织总蛋白, Bradford 法蛋白定量后分装、-70 °C 保存。取蛋白提取液(含蛋白 200

表 1. PCR 反应中目的片断引物
Table 1. Primer sequences used in PCR

Gene name	Primer sequences	Product length (bp)
CRT	P1: 5'-CAA GGA TAT CCG GTG TAA GGA-3'	445
	P2: 5'-CAT AGA TAT TCG CAT CGG GG-3'	
GRP78	P1: 5'-TCT GGT TGG CGG ATC TAC TC-3'	345
	P2: 5'-TCT TTT GTC AGG GGT CGT TC-3'	
CHOP	P1: 5'-AGC TGG AAG CCT GGT ATG AG-3'	256
	P2: 5'-GAC CAC TCT GTT TCC GTT TC-3'	
GAPDH	P1: 5'-TGC TGA GTA TGT CGT GGA G-3'	288
	P2: 5'-GTC TTC TGA GTG GCA GTG AT-3'	

CRT: calreticulin; GRP78: glucose-regulated protein 78; CHOP: C/EBP homologous protein.

μg)进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE, 8% 分离胶), 将电泳分离后的蛋白质电转移至硝酸纤维素膜上, 经封闭洗脱后分别加入 CRT (1:1 000)、GRP78 (1:1 000)、CHOP (1:200)、Bax (1:200)和 Bcl-2 (1:200)等多克隆抗体室温孵育 4 h, 洗膜后以相应的二抗室温孵育 1 h, 并以 GAPDH (1:200)单克隆抗体同上操作, 作为上样对照。抗原-抗体复合物用 ECL 法显示, 暗室 X 光胶片曝光, 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= 平均光密度值×面积), 以靶蛋白 IOD 值/GAPDH IOD 值的比值反映靶蛋白相对水平。

1.4 数据处理 采用 SPSS13.0 统计软件对实验数据进行分析, 实验数据采用 mean±SD 表示, 采用随机设计的两样本 *t* 检验进行模型组和对照组比较。多组间比较应用单因素方差分析(one way ANOVA), 组间比较应用 *q* 检验。采用 Bivariate Correlations 过程分析两变量相关性, *P*<0.05 时认为有统计学差异。

2 结果

2.1 腹主动脉狭窄诱导大鼠心肌组织肥厚

2.1.1 一般情况

术后对照组大鼠状态较好, 体重稳定增加, 无感染和死亡。模型组大鼠状态较差, 体重增加缓慢, 因感染或肠缺血等原因死亡 3 只。最后获得对照组大鼠 40 只, 模型组大鼠 42 只。腹主动脉狭窄可引起血压显著升高, 模型组大鼠血压在术后 7 d 开始显著上升, 术后 7 d、14 d、28 d 分别较对

照组增加 19%、23% 和 31% (均为 *P*<0.05, 表 2), 表明持续存在高血压。各组大鼠心率没有显著变化。

2.1.2 心功能变化

实验各组数据见表 2。术后反映心肌收缩/舒张功能的 $\pm dp/dt_{max}$ 持续升高, 其中舒张功能变化早于收缩功能变化, 表现为 $-dp/dt_{max}$ 在术后 3 d 显著上升(较对照组增加 21%, *P*<0.05), 而 $+dp/dt_{max}$ 的显著变化出现于术后 14 d (较对照组增加 20%, *P*<0.05), 此后均维持在高水平; 其中 $+dp/dt_{max}$ 随时间进行性增加, 术后 28 d 较术后 14 d 增加 13% (*P*<0.05), 提示腹主动脉狭窄术后本实验观察期间内大鼠心功能处于代偿期, 未出现明显失代偿性心力衰竭。

2.1.3 HW/BW 和 LVW/BW 变化

腹主动脉狭窄后 7 d 心肌组织显著肥厚, 模型组 HW/BW 于术后 7 d 开始明显升高, 并持续至实验结束, 术后 7 d、14 d 和 28 d HW/BW 分别较对照组高 29%、26% 和 24% (均为 *P*<0.05)。反映左心肥厚的 LVW/BW 于术后 7 d 开始升高, 与对照组比较, 术后 7 d、14 d 和 28 d 模型组 LVW/BW 分别高 32%、33% 和 31% (均为 *P*<0.05), 提示大鼠腹主动脉狭窄后出现以左心室肥厚为主的心肌肥厚(表 2)。

2.2 腹主动脉狭窄后心肌组织 ER 应激分子的变化

2.2.1 CRT 表达变化

分别采用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测大鼠心肌组织 CRT mRNA 和蛋白表达变化。以 GAPDH 作为内参, 对照组 CRT mRNA 和蛋白表达无显著

表 2. 腹主动脉狭窄后大鼠心功能、HW/BW 和 LVW/BW 变化

Table 2. The hemodynamic changes and HW/BW, LVW/BW after transverse aortic constriction in Wistar rats

	1 d		3 d		7 d		14 d		28 d	
	Control	Model	Control	Model	Control	Model	Control	Model	Control	Model
MCP (mmHg)	110.13±4.38	119.29±11.74	118.27±11.66	129.09±13.94	120.44±9.06	143.43±7.80*	116.31±3.84	143.50±13.43*	109.06±13.47	143.22±9.39*
HR (beats/min)	433.23±16.71	436.55±29.10	427.50±26.27	411.49±15.60	421.97±18.13	435.63±21.32	417.17±16.06	441.19±30.06	399.12±20.45	411.18±21.89
$+dp/dt_{max}$ (mmHg/s)	902.04±90.14	964.17±64.67	1009.74±91.96	1049.69±152.46	1006.73±156.27	1066.97±192.52	1031.38±173.31	1239.06±99.72*	1169.69±205.73	1402.05±152.09**
$-dp/dt_{max}$ (mmHg/s)	764.74±43.00	829.92±90.53	839.70±87.26	1017.61±111.73*	844.50±101.98	1035.51±141.87*	790.72±90.66	1044.72±135.17*	911.54±150.25	1091.55±112.14*
HW/BW (mg/g)	3.20±0.13	3.36±0.17	3.21±0.19	3.38±0.24	2.97±0.19	3.84±0.63*	3.00±0.12	3.78±0.28*	2.53±0.09	3.15±0.22*
LVW/BW (mg/g)	2.48±0.11	2.56±0.12	2.50±0.15	2.64±0.22	2.39±0.19	3.15±0.49*	2.30±0.06	3.05±0.24*	1.95±0.08	2.56±0.19*

MCP, mean carotid pressure; HR, heart rate; HW/BW, whole heart weight/body weight; LVW/BW, left ventricular weight/body weight. mean±SD. *n*=8. **P*<0.05 compared with control group; ***P*<0.05 compared with Model-14 d group.

差异(资料未显示)。与对照组比较,模型组 CRT mRNA 表达在腹主动脉狭窄术后早期即出现明显变化,其表达于术后 1 d 显著上升,较对照组增加 136% ($P<0.01$),此后维持在高表达水平。与 mRNA 表达相比,CRT 蛋白表达相对滞后,术后 7 d CRT 蛋白表达开始明显升高,较对照组增加 69.2% ($P<0.01$),并且在实验期间持续高水平表达(图 1)。

2.2.2 GRP78 表达变化

腹主动脉狭窄可诱导大鼠心肌组织 ER 分子伴侣 GRP78 表达显著改变,与心肌肥厚发生时间一致,模型组心肌组织 GRP78 mRNA 和蛋白表达均于术后 7 d 显著升高,分别较对照组增加 20% 和 186% (均 $P<0.01$),此后均维持在高表达水平(图 1)。

2.3 腹主动脉狭窄后 ER 应激相关凋亡途径的变化

2.3.1 CHOP 表达变化

采用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测了 ER 应激相关凋亡蛋白 CHOP 的表达变化(图 2),发现腹主动脉狭窄后心肌肥厚过程中 CHOP 凋亡信号通路被

显著激活,模型组心肌组织 CHOP 表达于心肌肥厚后 1 周即术后 14 d 显著改变,mRNA 和蛋白水平分别较对照组增加 22.2% 和 76.0% (均 $P<0.01$),术后 28 d 仍较对照组显著升高($P<0.01$)。

2.3.2 Bax 和 Bcl-2 表达变化

采用 Bax 和 Bcl-2 特异性抗体进行 Western blot 检测,以 GAPDH 校准后的蛋白条带 IOD 值反映心肌组织 Bax 和 Bcl-2 的表达变化(图 2B)。结果显示,与 CHOP 表达改变时间一致,模型组心肌组织 Bax 和 Bcl-2 的表达在心肌肥厚后 1 周即术后 14 d 显著改变,促凋亡蛋白 Bax 表达在术后 14 d 显著上调,术后 14 d 和 28 d 分别较对照组增加 41.1% 和 46.9% (均 $P<0.01$);同时抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降,在术后 14 d 和 28 d 分别较对照组降低 25.5% 和 28.9% (均 $P<0.01$)。

2.4 相关性分析

相关性分析显示反映心脏收缩功能的 $+dp/dt_{\max}$ 分别与 CRT 蛋白表达($r = 0.780$, $P<0.01$)和 GRP78 蛋白表达($r = 0.694$, $P<0.01$)显著正相关,同时 ER 凋亡相关分子 CHOP 蛋白表达与 Bax 蛋白表达显著正

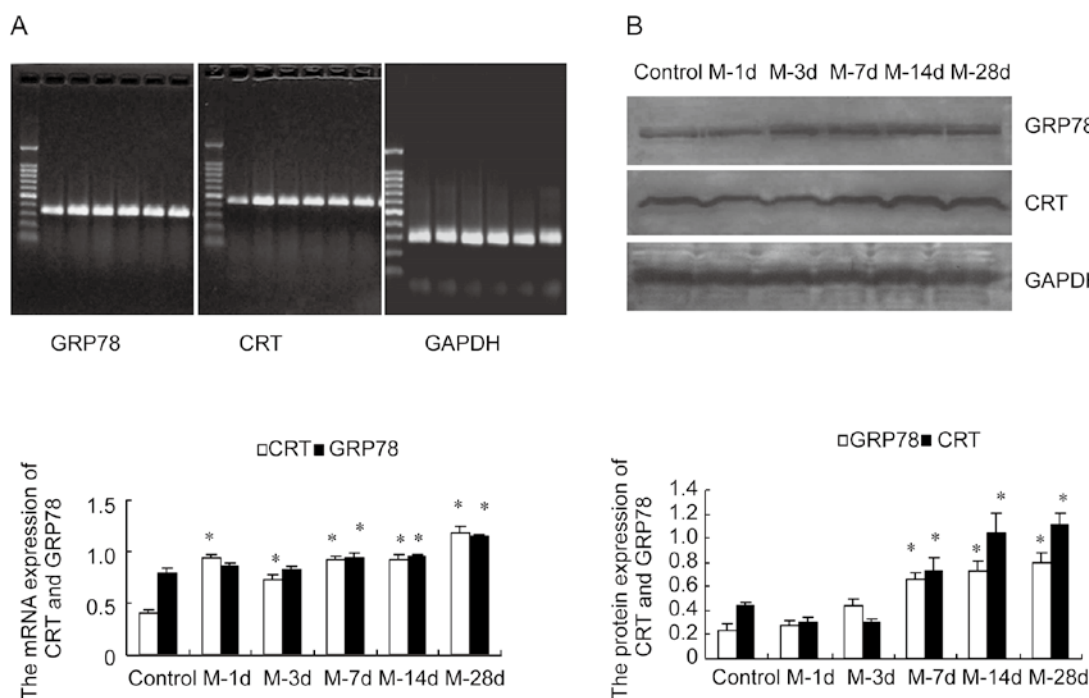


图 1. 腹主动脉狭窄后大鼠心肌组织 CRT 和 GRP78 表达变化

Fig. 1. Expressions of CRT and GRP78 in rat myocardium tissue after abdominal aortic constriction. A: The mRNA levels of CRT and GRP78 normalized against GAPDH levels. B: The protein expression of CRT and GRP78 normalized against GAPDH levels. M-1d, M-3d, M-7d, M-14d, M-28d: model group at 1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 28 d, respectively. Mean $\pm$ SD. $n=6$. * $P<0.01$ compared with control group.

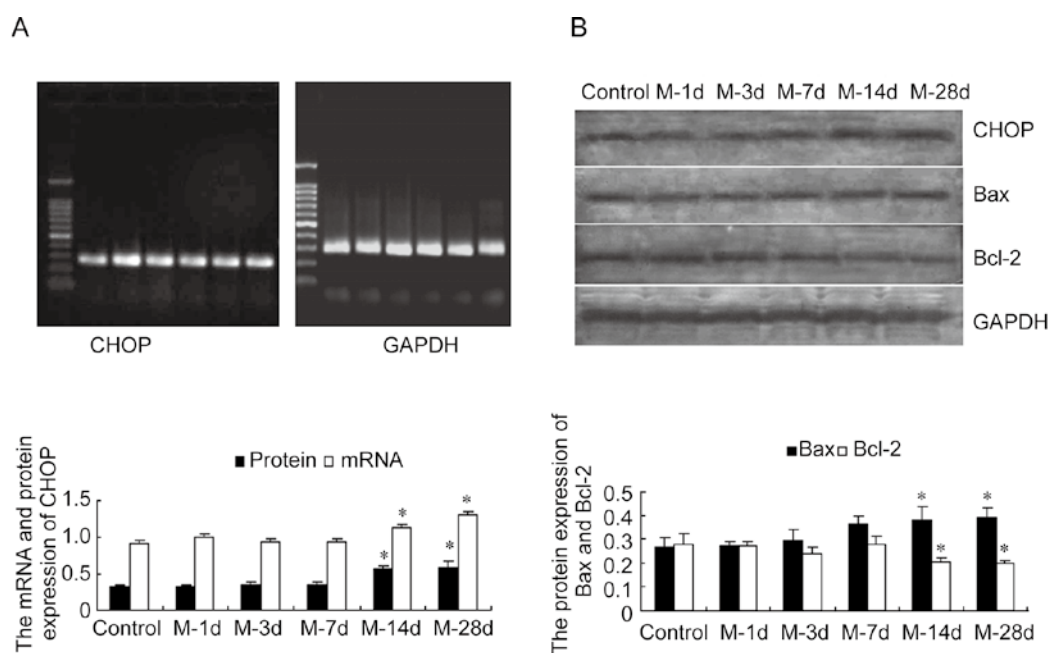


图 2. 腹主动脉狭窄后大鼠心肌组织 CHOP、Bax 和 Bcl-2 表达变化

Fig. 2. Expression changes of CHOP, Bax and Bcl-2 in cardiac muscle tissue after abdominal aortic constriction. A: The mRNA and protein expression of CHOP normalized against GAPDH levels in myocardium. B: The protein expression of Bax and Bcl-2 normalized against GAPDH levels in myocardium. M-1d, M-3d, M-7d, M-14d, M-28d: model group at 1 d, 1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 28 d, respectively. Mean $\pm$ SD. $n=6$. * $P<0.01$ compared with control group.

相关($r = 0.654$, $P<0.01$), 而与 Bcl-2 蛋白表达显著负相关($r = -0.671$, $P<0.01$)。

3 讨论

心肌肥厚是常见的心血管病理过程, 阐明心肌肥厚的发病机制对于防治心肌肥厚和心力衰竭具有重要的临床意义。本工作在大鼠腹主动脉狭窄致高血压心肌肥厚模型上证实, 术后 7 d 模型组大鼠血压显著升高, 而且在术后 14 d 和 28 d, 反映心肌收缩功能的 $+dp/dt_{max}$ 进行性增加; 心肌组织于术后 7 d 显著肥厚, 反映左心肥厚的 LVW/BW 较对照组明显升高, 提示腹主动脉狭窄导致高血压和明显的左室肥厚, 心脏收缩功能增强。这与 Akki 等在腹主动脉狭窄致高血压模型上观察到的心肌肥厚结果一致^[12]。本实验显示, 模型组大鼠 $-dp/dt_{max}$ 在术后 3 d 显著上升, 明显早于术后 14 d 开始出现的 $+dp/dt_{max}$ 的变化, 提示腹主动脉狭窄致心脏压力负荷升高后, 心脏舒张功能的变化早于收缩功能的改变, 心脏舒张功能在术后早期即受到明显影响, 参与了心肌肥大的发展。

心肌肥厚的发病机制尚未完全阐明, 研究发现

心肌肥厚时存在 ER 应激^[5,8]。ER 应激造成钙稳态失衡和功能蛋白质形成异常, 通常表现为 CRT 和 GRP78 等 ER 应激分子表达上调^[13-15]。CRT 是 ER 驻留的钙结合蛋白, 在细胞钙稳态调节中具有重要作用, 并与 GRP78 一起作为分子伴侣, 调节蛋白合成、折叠^[16]。本研究在腹主动脉狭窄导致高血压心肌肥厚模型上证实, 术后 1 d 心肌组织内 CRT 的 mRNA 表达显著上调, 7 d 时 CRT 和 GRP78 蛋白表达均上调, 并持续至实验结束, 提示心肌肥厚过程中存在 ER 应激反应, 与文献报道一致^[5]。特别是本实验证实, 在腹主动脉狭窄术后 1 d 就出现心肌 ER 应激分子表达的改变, 表明 ER 应激反应出现于大鼠血流动力学变化的早期, 早于心肌肥厚的发生, 提示 ER 应激反应可能是压力负荷升高致心肌肥厚的重要发病学因素。此外相关分析显示大鼠心脏功能分别与 ER 应激分子 CRT 和 GRP78 蛋白表达显著正相关, 提示与钙稳态调节有关的 CRT 和与蛋白质折叠有关的 GRP78 等 ER 应激分子可能参与了压力过负荷致心肌肥厚时心功能的代偿。结合实验结果和文献资料, 我们认为 ER 应激时 CRT 和 GRP78 可能通过发挥分子伴侣功能减轻 ER 内错误折叠蛋白

积累,同时CRT可能通过调节ER Ca^{2+} 释放和摄取通道(如激活 InsP_3 受体或抑制SERCA活性等^[17]),引起ER Ca^{2+} 外流增加,使胞浆 Ca^{2+} 浓度升高,从而心肌细胞收缩功能增强,同时舒张功能下降。随着实验时间延长,过度ER应激导致CRT表达持续升高,细胞内 Ca^{2+} 浓度进一步增加,导致观察期间心肌收缩功能进一步增强。

ER应激是细胞对刺激的适应性反应,但持续和严重的ER应激可触发ER凋亡信号通路,导致细胞凋亡和组织损伤^[3,4];ER应激在心肌肥厚发生、发展中的信号途径尚不清楚,CHOP又称为生长停滞及DNA损伤基因(growth arrest and DNA damage inducible gene 153, GADD153),作为CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs)的一员被首次识别。CHOP通过直接调节核内靶基因,增加细胞对ER应激介导凋亡的敏感性^[18]。CHOP^{-/-}细胞可抵抗ER应激诱导的细胞凋亡^[19],而CHOP过表达则促进细胞凋亡^[20]。本实验在腹主动脉狭窄致高血压心肌肥厚模型上发现,心肌肥厚后1周即术后14 d CHOP mRNA和蛋白表达显著增加,持续至术后28 d实验结束时;由于ER应激分子CRT表达于术后1 d即发生显著改变,至术后14 d CHOP表达显著增加,提示长期ER应激触发细胞凋亡途径,CHOP介导的ER应激相关凋亡途径参与了心肌肥厚过程,而Okada等^[5]在小鼠主动脉狭窄致心肌肥厚中未观察到CHOP表达的改变,可能与动物种属、狭窄部位和狭窄程度差异有关。

近年来研究发现,CHOP介导的凋亡信号与线粒体凋亡途径有密切联系。Bcl-2家族蛋白主要分布在细胞浆内或线粒体上,在细胞凋亡调节中有重要作用。近来研究发现它们也存在于ER膜上^[21]。Bax是Bcl-2家族的促凋亡成员,而Bcl-2则具有抑制凋亡的作用,它们在机体各组织广泛表达。研究发现,CHOP过表达导致Bcl-2表达降低,并且导致Bax从胞浆内向线粒体内易位^[22],Bcl-2过表达和Bax基因敲除均可抑制CHOP诱导的细胞凋亡^[23,24]。因此,作为死亡途径的整合器和放大器,CHOP介导的死亡信号最终转移到线粒体,Bax可能作为ER应激介导凋亡的“执行者”行使功能^[25]。本研究中发现Bax蛋白在术后14 d显著增加,而Bcl-2蛋白在术后14 d明显降低,而且在观察期间内动态分析结果表明CHOP蛋白表达与Bax表达正相关,而与Bcl-2表达负相关,提示CHOP过表达可能通过

Bcl-2和Bax凋亡途径介导细胞凋亡,由凋亡引起的心肌细胞丧失进一步促进心肌代偿性肥厚发展,成为ER应激参与腹主动脉狭窄致高血压心肌肥厚发生、发展的重要细胞信号途径。

本研究发现腹主动脉狭窄早期即可诱导ER分子伴侣表达变化,触发ER应激,长期ER应激诱导心肌细胞凋亡,CHOP介导的ER应激相关凋亡途径可能参与了心肌肥厚过程。ER应激通过影响心肌细胞肥厚和细胞凋亡之间的平衡,决定肥厚心肌的代偿或失代偿状态。CRT和GRP78可能有利于心肌细胞的代偿性肥厚过程,而CHOP途径则可能通过启动心肌细胞凋亡而启动心肌的失代偿过程,该部分研究正在进行。

参考文献

- 1 Frey N, McKinsey TA, Olson EN. Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med* 2000; 6 (11): 1221-1227.
- 2 Van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a micro-RNA. *Science* 2007; 316(5824): 575-579.
- 3 Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcription and translational controls. *Gene Dev* 1999; 13(10): 1211-1233.
- 4 Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 2002; 110(10): 1383-1388.
- 5 Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, Hirata A, Fujita M, Nagamachi Y, Nakatani T, Yutani C, Ozawa K, Ogawa S, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* 2004; 110 (6): 705-712.
- 6 Li Z, Zhang T, Dai H, Liu G, Wang H, Sun Y, Zhang Y, Ge Z. Endoplasmic reticulum stress is involved in myocardial apoptosis of streptozocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol* 2008; 196(3): 565-572.
- 7 Azfer A, Niu J, Rogers LM, Adamski FM, Kolattukudy PE. Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(3): H1411-H1420.
- 8 Brostrom MA, Mourad F, Brostrom CO. Regulated expression of GRP78 during vasopressin-induced hypertrophy of heart-derived myocytes. *J Cell Biochem* 2001; 83(2): 204-217.
- 9 Ajiri S, Oyadomari S, Yano S, Morioka M, Gotoh T, Hamada JI, Ushio Y, Mori M. Ischemia-induced neuronal cell death is

- mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ* 2004; 11(4): 403-415.
- 10 Wang YZ (王彦珍), Sun S, Cai LR, Liu FY, Liu XH. Improvement of cardiac hypertrophy model induced by abdominal aortic coarctation in rats. *Acad J PLA Postgrad Med Sch (军医进修学院学报)* 2004; 25(3): 231-232 (Chinese, English abstract).
- 11 Xu FF (徐菲菲), Liu XH, Cai LR. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in the prevention of cardiomyocyte injury induced by hypoxic preconditioning. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2004; 56 (5): 609-614 (Chinese, English abstract).
- 12 Akki A, Smith K, Seymour AM. Compensated cardiac hypertrophy is characterised by a decline in palmitate oxidation. *Mol Cell Biochem* 2008; 311(1-2): 215-224.
- 13 Lee KH, Lee N, Lim S, Jung H, Ko YG, Park HY, Jang Y, Lee H, Hwang KC. Calreticulin inhibits the MEK1,2-ERK1,2 pathway in alpha 1-adrenergic receptor/Gh-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiomyocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 84(1): 101-107.
- 14 Xu FF (徐菲菲), Liu XH, Zhu XM. Calreticulin upregulation induced by hypoxic preconditioning relieves oxidative stress injury in rat cardiomyocytes. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2008; 60(1): 29-37 (Chinese, English abstract).
- 15 Liu XH (刘秀华). Endoplasmic reticulum stress and myocardial hypertrophy. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2009; 61(1): 9-14 (Chinese, English abstract).
- 16 Liu H, Bowes RC 3rd, van de Water B, Sillence C, Nagelkerke JF, Stevens JL. Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca²⁺ disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272 (35): 21751-21759.
- 17 John LM, Lechleiter JD, Camacho P. Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J Cell Biol* 1998; 142(4): 963-973.
- 18 Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004; 11(4): 381-389.
- 19 Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 1998; 12(7): 982-995.
- 20 Friedman AD. GADD153/CHOP, a DNA damage-inducible protein, reduced CAAT/enhancer binding protein activities and increased apoptosis in 32D c13 myeloid cells. *Cancer Res* 1996; 56(14): 3250-3256.
- 21 Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* 2003; 162(1): 59-69.
- 22 McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 2001; 21(4): 1249-1259.
- 23 Nieto-Miguel T, Fonteriz RI, Vay L, Gajate C, López-Hernández S, Mollinedo F. Endoplasmic reticulum stress in the proapoptotic action of edelfosine in solid tumor cells. *Cancer Res* 2007; 67(21): 10368-10378.
- 24 Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ* 2004; 11(4): 390-402.
- 25 Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292(5517): 727-730.