

• 研究报告 •

糖调节蛋白 78 在缺血/再灌注损伤心肌中表达的意义

高波 李忠诚

【关键词】 糖调节蛋白 78; 缺血/再灌注损伤, 心肌; 缺血预处理

热休克蛋白 70(HSP70)是广泛存在于原核和真核生物细胞内的一种蛋白质,其基本功能为帮助新生蛋白质的正确折叠、移位、维持,以及受损蛋白质的修复、移除、降解,对肾脏等组织器官缺血/再灌注(I/R)损伤具有保护作用^[1]。糖调节蛋白 78(GRP78)也叫免疫球蛋白重链结合蛋白,因与 HSP70 家族具有高度同源性,而被认为是 HSP70 家族成员之一。GRP78 能抑制细胞毒性,对抗细胞凋亡,是维持胚胎细胞生长和潜能细胞存活的必备物质基础^[2]。GRP78 在多种组织 I/R 损伤中表达上调,对心肌细胞的存活具有重要的保护作用^[3]。目前国内关于缺血预处理(IP)对 I/R 损伤心肌中 GRP78 表达变化的影响尚未见报道,本实验旨在观察 IP 对 GRP78 表达的影响,以期对心肌 I/R 损伤的研究和临床干预性治疗提供实验依据。

1 材料与与方法

1.1 动物分组及 I/R 损伤模型建立: 雄性 SD 大鼠 56 只,体重(270±30)g,由中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供[合格证号:SCXK(津)2005-0001]。按随机数字表法将大鼠分为假手术组(8只)、I/R 组(24只)、IP 组(24只)。心肌 I/R 损伤模型的建立:水合氯醛腹腔注射麻醉动物,接动物呼吸机保持呼吸道通畅,动脉插管监测平均动脉压和心率。于左心耳下缘约 0.5 cm 处,采用结扎左冠状动脉(冠脉)前降支下部阻断血流 30 min 后放松结扎线造成再灌注以复制模型。以六导心电图肢导联的变化来判断模型是否成功,ST 段抬高大于 0.5 mV 为心肌缺血;松开后,抬高的 ST 段下降 1/2 以上、增高的 R 波振幅降低、伴有心律失常或 Q 波出现,则判断为再灌注损伤形成。IP 组于 I/R 前结扎左冠脉前降支 5 min、再灌注 5 min,反复 4 次。假手术组只穿线不结

扎冠脉。I/R 组和 IP 组按照再灌注时间又分为 0.5、2、4 h 亚组。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 免疫组化染色:取左心室前壁损伤心肌,经固定、包埋、切片、常规脱蜡至水等过程,制备免疫组化切片;柠檬酸修复液(pH 值 6.0)煮沸,GRP78 抗体(稀释度 1:100)室温过夜,二抗室温孵育 1 h,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染。GRP78 单克隆抗体 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司,原位末端标记法(TUNEL)凋亡检测及免疫组化相关抗体试剂盒购于北京中杉金桥生物有限公司。心肌细胞质呈棕黄色颗粒为阳性,在阳性表达区随机选 5 个视野,测定平均吸光度(A)值作为相对表达量。

1.2.2 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 GRP78 mRNA 表达:取左心室前壁损伤心肌,组织匀浆后,用 TRIzol 一步法提取总 RNA,逆转录为 cDNA。引物序列:GRP78 上游 5'-GTT CTT GCC GTT CAA GGT GG-3',下游 5'-TGG TAC AGT AAC AAC TGC ATG-3',扩增产物大小 181 bp。内参照 β-肌动蛋白(β-actin)上游 5'-AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT-3',下游 5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3',扩增产物大小 285 bp。PCR 扩增条件:94℃变性 3 min,94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环,72℃5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳成像分析系统检测条带积分 A 值,以目的基因与内参照积分 A 值比值表示。

1.2.3 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 GRP78 蛋白表达:取前下壁损伤心肌组织,匀浆后提取蛋白,变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转膜、封闭,加 GRP78 兔多克隆抗体(1:500),辣根过氧化物酶标记二抗,化学发光试剂增强反应,显影后,经 ABB 成像分析系统扫描,测定灰度值,并以 β-actin 标化。

1.3 统计学分析:应用 SPSS 11.0 统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)

表示,采用方差分析和 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

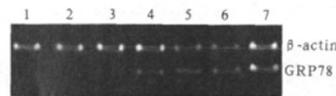
2.1 GRP78 免疫组化结果(表 1):与假手术组比较,I/R 0.5 h、2 h 组 GRP78 表达无差异;I/R 4 h 组明显升高,且明显高于 I/R 0.5 h、2 h 组(均 $P < 0.05$)。IP 0.5、2、4 h 组 GRP78 表达分别高于 I/R 0.5、2、4 h 组(均 $P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠心肌 I/R 损伤后 GRP78 免疫组化结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	GRP78(A 值)
假手术组	8	0.235±0.021
I/R 0.5 h 组	8	0.243±0.032
I/R 2 h 组	8	0.255±0.020
I/R 4 h 组	8	0.380±0.027 ^{ab}
IP 0.5 h 组	8	0.395±0.025 ^{ac}
IP 2 h 组	8	0.457±0.032 ^{ac}
IP 4 h 组	8	0.637±0.053 ^{ac}

注:I/R:缺血/再灌注,GRP78:糖调节蛋白 78,IP:缺血预处理;与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与 I/R 0.5 h 和 2 h 组比较,^b $P < 0.05$;与 I/R 相应时间点组比较,^c $P < 0.05$

2.2 GRP78 mRNA 表达结果(图 1):I/R 4 h 组及 IP 各组 GRP78 蛋白表达均高于假手术组(均 $P < 0.05$);I/R 0.5、2 h 组与假手术组比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。



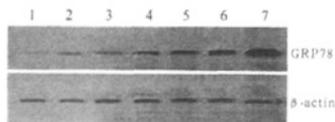
I/R:缺血/再灌注,GRP78:糖调节蛋白 78,1~7 依次为:假手术组,I/R 0.5、2、4 h 组,缺血预处理 0.5、2、4 h 组,β-actin:β-肌动蛋白
图 1 逆转录-聚合酶链反应检测各组大鼠心肌 I/R 损伤后 GRP78 mRNA 表达

2.3 GRP78 蛋白表达结果(图 2):I/R 4 h 组及 IP 各组 GRP78 蛋白表达明显高于假手术组(均 $P < 0.05$);I/R 0.5 h、2 h 组与假手术组比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.

2010.08.015

作者单位:300050 天津市天和医院心内科



I/R:缺血/再灌注,GRP78:糖调节蛋白 78, 1~7 依次为:假手术组,I/R 0.5、2、4 h 组,缺血预处理 0.5、2、4 h 组, β -actin; β -肌动蛋白
图 2 蛋白质免疫印迹法检测各组大鼠心肌 I/R 损伤后 GRP78 蛋白表达

3 讨论

心肌 I/R 可诱导多种基因表达发生改变,如 Fas 和 Bcl-2 基因的表达^[4],而这种改变是引起心肌 I/R 损伤现象的重要分子基础。目前发现与心肌 I/R 相关的基因主要有:①凋亡相关基因,典型的有 Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)、Fas、Bax、Bak 等。②转录相关因子,典型的有核转录因子- κ B(NF- κ B)、转录激活因子 6(ATF6)。③抗氧化酶,典型的有超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮合酶(NOS)、环氧化酶-2(COX-2)、髓过氧化物酶(MPO)。④生长因子,典型的有胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、低氧诱导因子-1(HIF-1)。⑤心血管活性物质,典型的有内皮素、血管紧张素。低氧、葡萄糖饥饿、自由基蓄积和钙失衡等各种刺激都可能引起内质网功能障碍,导致内质网应激,激活未折叠蛋白反应,使蛋白折叠能力提高,蛋白合成抑制,以适应应激,但是长时间过强的内质网应激则可启动细胞凋亡^[5-6]。GRP78 是内质网应激的经典标志物之一,GRP78 在生理情况下,在真核生物内质网膜上通过与新生多肽以非共价键形式短暂结合后松开,从而促进蛋白质的正确折叠和装配,并协助蛋白质跨内质网膜转运,将其转运到一定的位置。但是在各种应激条件下,细胞可以产生很多未折叠蛋白,未折叠蛋白反应可使 GRP78 大量表达,并与内质网中错误折叠或未折叠的蛋白结合,恢复蛋白质正确构象,维持内环境稳定,因此,GRP78 在应激条件下有细胞保护作用。

本研究显示,IP 早期即有 GRP78 表达上调,提示 IP 可以较早启动内质网应激反应。考虑内质网应激反应启动后,GRP78 迅速上调以发挥内质网自稳功能,细胞适应应激而存活,从而可能减轻心肌 I/R 损伤。本研究与宋小燕等^[7]研究大鼠脑 I/R 早期 GRP78 和 DNA 损

伤诱导转录 3 蛋白(GADD153)表达增高的结果有一致性。Hayashi 等^[8]推测在缺血等应激时,细胞受刺激后 GRP78 呈高表达,从而延长在各种不利因素刺激下的细胞耐受时间窗。应激后 GRP78 和真核转录起始因子 α 2 激酶 3(PERK)、肌醇需求蛋白 1(IRE1)分离,并使这些酶激活磷酸化,诱导 GRP78 大量生成,从而结合激活的 PERK 和 IRE1,进而使内质网的应激反应减弱直至停止,内质网功能恢复。这与本实验中 IP 组 GRP78 早期表达增高是一致的,是细胞早期的一种应对急性损伤的保护性机制。除了这种急性缺血损伤引起 GRP78 早期表达增高情况外,Novosyadlyy 等^[9]在研究中发现 IGF-1 激活折叠蛋白反应,并诱导细胞 GRP78 表达,从而引发细胞保护作用。Shao 等^[10]在研究中发现,锂盐可以使 GRP78 mRNA 和蛋白表达水平上调,从而阻断了内质网应激反应的发生。

综上所述,本结果表明,IP 提前诱导了心肌细胞内质网应激反应,前期以 GRP78 表达上调为主,细胞进行自我保护,可能对细胞最终转归具有重要作用,从而防止心肌细胞 I/R 损伤,但其具体机制尚待进一步研究。既然由 GRP78 介导的内质网应激机制与心肌 IP 有关,那么,以此为靶点,通过干预内质网应激相关因子的表达,可能对心肌梗死的治疗具有潜在意义。

参考文献

[1] 李锐,李润秋,张曦.热休克蛋白 70 在大鼠肾缺血/再灌注损伤中的表达及血必净注射液干预作用的研究.中国中西医结合急救杂志,2008,15:293-295.
[2] Luo S, Mao C, Lee B, et al. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. Mol Cell Biol, 2006,

26:5688-5697.

[3] Shintani K, Ishida K, Nakajima M, Uemura K, et al. Ischemic preconditioning protects cardiomyocytes against ischemic injury by inducing GRP78. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345:1600-1605.
[4] 冯全洲,李天德,王兆霞,等.钙离子拮抗剂对大鼠心肌梗死后心肌细胞凋亡的影响.中国危重病急救医学,2004, 16:133-136.
[5] Paschen W, Mengesdorf T. Cellular abnormalities linked to endoplasmic reticulum dysfunction in cerebrovascular disease: therapeutic potential. Pharmacol Ther, 2005, 108:362-375.
[6] Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, et al. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. EMBO Rep, 2006, 7:880-885.
[7] 宋小燕,赵永波,周晓琳,等.大鼠脑缺血/再灌注后 GRP78 和 GADD153 的表达变化研究.中风与神经疾病杂志, 2008, 25:139-141.
[8] Hayashi T, Saito A, Okuno S, et al. Induction of GRP78 by ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and prevents delayed neuronal cell death. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23:949-961.
[9] Novosyadlyy R, Kurshan N, Lann D, et al. Insulin-like growth factor-1 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of the adaptive capacity of endoplasmic reticulum. Cell Death Differ, 2008, 15: 1304-1317.
[10] Shao L, Sun X, Xu L, et al. Mood stabilizing drug lithium increases expression of endoplasmic reticulum stress proteins in primary cultured rat cerebral cortical cells. Life Sci, 2006, 78:1317-1323.

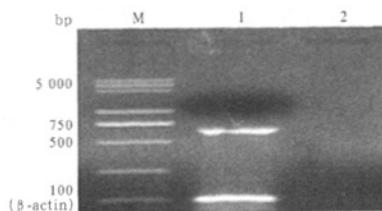
(收稿日期:2010-02-20)

(本文编辑:李银平)

更正

由于校对失误,本刊 2010 年 6 期崔晓光的文章《肺表面活性物质相关蛋白 C 真核表达载体的构建及体外表达》中图 2 电泳条带位置错误,特此更正(见右图),并向作者致歉!

(本刊编辑部)



SP-C:肺表面活性物质相关蛋白,C,M:Marker, 1:扩增产物 SP-C,2:阴性对照, β -actin; β -肌动蛋白

图 2 人正常肺组织 SP-C 基因的逆转录-聚合酶链反应产物