

卡托普利对高血压大鼠心肌内质网应激时 GRP78 和 CHOP 的表达及心肌细胞凋亡的影响

林可 赵连友* 郑强荪 黄金燕 尚福军 艾永飞 丁璐

(第四军医大学唐都医院心血管内科, 西安 710038)

摘要 探讨血管紧张素转化酶抑制剂卡托普利对高血压大鼠心肌内质网应激时葡萄糖调节蛋白78((glucose-regulated protein78, GRP78)和C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)的表达及心肌细胞凋亡的影响,用18只雄性SD大鼠随机分为Sham组($n=6$),TAC组($n=6$)和Cartopril组($n=6$)。TAC组和Cartopril组大鼠行腹主动脉缩窄术(transverse aortic constriction, TAC)建立高血压模型, Cartopril组术前一周开始给予卡托普利灌胃。术后4周用颈动脉插管法测定各组大鼠血压值,免疫组化法检测GRP78蛋白和CHOP蛋白的表达水平, TUNNEL法检测心肌细胞凋亡。结果①Cartopril组平均动脉压为(124.67 ± 6.26) mmHg, 显著低于TAC组(169.73 ± 6.58), 但高于Sham组(117.08 ± 7.92), 差异有统计学意义($P < 0.05$); TAC组平均动脉压高于Sham组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。②GRP78在Cartopril组的平均光密度值为 0.20 ± 0.02 , 显著低于TAC组(0.35 ± 0.03), 但略高于Sham组(0.16 ± 0.03), 差异有统计学意义($P < 0.05$); TAC组GRP78蛋白表达的平均高密度值高于Sham组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。③CHOP在Cartopril组表达的平均光密度值为 0.23 ± 0.03 , 显著低于TAC组(0.46 ± 0.05), 但高于Sham组(0.07 ± 0.02), 差异有统计学意义($P < 0.05$); TAC组CHOP蛋白表达的平均光密度值高于Sham组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。④Cartopril组可见少量凋亡心肌细胞(18.73 ± 0.28)%, 显著低于TAC组(31.67 ± 0.54)%, 但略高于Sham组(13.49 ± 0.12)%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); TAC组细胞凋亡率显著高于Sham组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明卡托普利能够通过降低心肌组织内质网应激反应水平, 对高血压心肌细胞有保护作用, 其作用机制可能与其降低CHOP介导的ERS凋亡反应有关。

关键词 高血压 内质网应激 GRP78 CHOP 心肌细胞 凋亡 卡托普利

中图法分类号 R972.4; **文献标志码** B

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是一种细胞层面上的应激反应,它是由于某种原因导致细胞内质网内稳态失衡,并引起生理功能发生紊乱的一种亚细胞器上的病理过程^[1]。研究表明,持续的ERS参与介导了细胞凋亡反应^[2]。业已证实,心肌细胞凋亡是高血压心肌重构的重要机制之一^[3]。因此,如何有效地降低心肌细胞凋亡、改善高血压心肌重构一直是医学界研究的热点。目前,

以卡托普利为代表的大多数血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitors, ACEI)均可有效降低高血压心肌细胞凋亡^[4]。但是卡托普利降低高血压心肌细胞凋亡是否有ERS的参与,目前仍不十分清楚。本研究通过建立高血压大鼠模型,观察ERS信号分子葡萄糖调节蛋白78((glucose-regulated protein78, GRP78)和C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)表达,以及应用卡托普利干预后其信号分子表达变化,进一步探讨卡托普利降低高血压心肌细胞凋亡的分子机制,为最终防治高血压对心脏的损害提供新的理论依据和治疗新靶点。

2010年4月12日收到 陕西省科学技术研究发展计划项目
(2002K10—G1—23)资助

第一作者简介:林可,医师,硕士生, E-mail: soled_0@sina.com。

*通讯作者简介:赵连友,教授,主任医师,研究方向:高血压发病机制及相关疾病防治。E-mail: zhaolyfmmu@yahoo.cn。

1 材料和方法

1.1 材料

成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 18 只, 鼠龄 8 ~ 10 周, 体质量 180 ~ 220 g (第四军医大学实验动物中心提供); 卡托普利 (江苏常州制药厂); 兔抗大鼠 GRP78 多克隆抗体 (美国 Bioword 公司); 兔抗大鼠 GADD153 多克隆抗体 (美国 ACRIS 公司); 细胞凋亡检测试剂盒 I (TUNNEL) (武汉博士德公司); AP 标记羊抗兔 IgG (美国 Santacruz 公司); 浓缩型 DAB 试剂盒 (北京中杉金桥生物试剂公司); HE 染色试剂盒 (北京益利精细化学品有限公司); 光学显微镜 (BX41) (日本奥林巴斯株式会社); 显微摄像系统 (DP71) (日本奥林巴斯株式会社); 图像分析软件 (Image-Pro Plus 6.0) (美国 Media Cybernetics 公司); RM—6280 型多道智能生理记录及分析处理系统 (成都仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠腹主动脉缩窄术 (transverse aortic constriction, TAC)

致高血压模型的建立及分组将 18 只 SD 大鼠随机分为 3 组, Sham 组, TAC 组和 Cartopril 组, 每组 6 只。TAC 组和 Cartopril 组用 6% 水合氯醛 (200 ~ 300 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 使其仰卧, 固定四肢。无菌条件下于大鼠左肋弓下缘 0.5 cm、腹正中线旁 0.5 cm 处行 2.0 ~ 2.5 cm 纵切口, 逐层分离皮下组织进入腹腔, 钝性分离腹主动脉鞘, 剥离腹主动脉, 在左右肾动脉分支的下方穿入 1.0 号手术缝线, 沿血管走行方向放置针尖磨钝的 7 号注射针头与腹主动脉一起结扎, 然后抽出针头, 造成腹主动脉部分狭窄; Sham 组仅分离腹主动脉不行缩窄术。缝合伤口, 消毒, 包扎, 并注射青霉素 2 ~ 3 万单位/只, 此后每天一次连续三天。手术前 1 周开始干预, Cartopril 组给予卡托普利 (35 mg/kg, 溶于双蒸水中) 灌胃^[5], Sham 组和 TAC 组则给予等量双蒸水灌胃。每天 1 次, 持续 5 周。

1.2.2 测量血压及标本留取

所有大鼠术后 4 周, 采用颈动脉插管法测量血

压值。称大鼠质量, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液 (0.23 mL/100 g) 麻醉后, 分离右颈总动脉并插管, 以 RM—6280 多道生理记录仪记录收缩压、舒张压, 并计算平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP), $MAP = \text{舒张压} + [1/3(\text{收缩压} - \text{舒张压})]$ 。测定指标并记录后, 立即开胸取出心脏, 以预冷的 PBS 冲洗干净, 取心尖部约 2 ~ 5 mm 组织。将取下组织切去心脏冠状面最大横径, 置于 40 g/L 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 其余心肌组织立即置于液氮中, 1 h 后移置 -80℃ 冰箱中备用。

1.2.3 GRP78 和 CHOP 表达的免疫组化染色检测

留取标本切片 (片厚 5 μm), 进行免疫组化染色检测。(1) GRP78 检测的主要步骤如下: 石蜡切片常规脱蜡; 加 3% H_2O_2 处理 10 min; 在微波炉中用 0.01 mol 枸橼酸盐缓冲液 (pH6.0) 热修复组织抗原 15 min, 冷却后 PBS 洗涤 1 ~ 2 次; 滴加 5% BSA 封闭液室温 20 min 封闭后; 依次滴加 1: 100 兔抗大鼠 GRP78 抗体 (4℃ 过夜, PBS 洗涤)、生物素化羊抗兔 IgG (37℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤)、SABC (37℃ 孵育 20 min, PBS 洗涤); DAB 显色后, 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片, 显微镜观察。(2) CHOP 的检测步骤同 GRP78。(3) 图像分析: 于显微镜 ($\times 400$) 下观察心肌细胞, 胞质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。每张切片中随机各取 10 个视野, 使用 Image-pro plus6.0 软件及专用显微镜对图象进行量化分析, 通过测定每个视野下阳性物质的平均光密度 (average optical density, AOD) 值, 对大鼠心肌细胞中 GRP78、CHOP 的表达进行半定量分析。

1.2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡

按照 TUNEL 细胞原位凋亡检测试剂盒说明操作。光学显微镜下进行观察并拍照, 正常心肌细胞核呈蓝色, 凋亡阳性心肌细胞核呈棕黄色。计数时, 将 Olympus 测微网格置于目镜内, 在低倍镜下找到病变区后, 在高倍镜 ($\times 400$) 下随机选择 10 个独立视野, 每个视野下选 100 个细胞, 统计出阳性细胞的数; 将 10 个视野中的阳性细胞数相加作为 1 000 个心肌细胞中的阳性细胞的数, 计算出阳性表达细

胞的百分率。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计学软件对资料进行分析。组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 者表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 卡托普利对高血压大鼠 MAP 的影响

Cartopril 组 MAP 显著低于 TAC 组,但高于 Sham 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);TAC 组 MAP 高于 Sham 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 MAP 的变化($n = 6, \bar{x} \pm s$)	
组别	MAP(mmHg)
Sham 组	117.08 $\pm$ 7.92
TAC 组	169.73 $\pm$ 6.58 ^a
Cartopril 组	124.67 $\pm$ 6.26 ^{ab}

与 Sham 组比较,a— $P < 0.05$;与 TAC 组比较,b— $P < 0.05$

2.2 卡托普利对高血压大鼠心肌 GRP78 蛋白表达的影响

GRP78 的主要在心肌的胞浆中表达,阳性细胞胞浆内可见棕黄色颗粒。Cartopril 组 GRP78 蛋白表达的 AOD 值为 0.20 ± 0.02 ,显著低于 TAC 组(0.35 ± 0.03),但略高于 Sham 组(0.16 ± 0.03),差异有统计学意义($P < 0.05$);TAC 组 GRP78 蛋白表达的 AOD 值高于 Sham 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1,图 2。

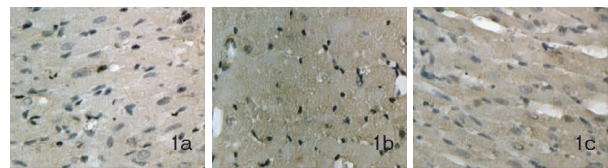


图 1 免疫组化染色法检测各组大鼠心肌 GRP78 的表达($\times 400$)

1a—Sham 组,1b—TAC 组,1c—Cartopril 组

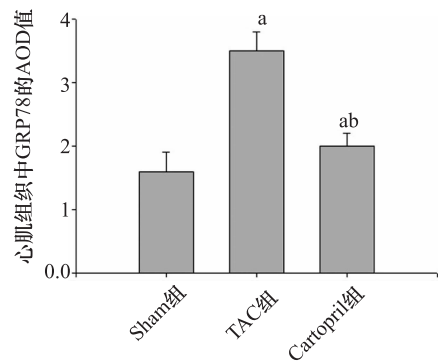


图 2 各组大鼠心肌 GRP78 表达的 AOD 值($n = 6$)
与 Sham 组比较,a— $P < 0.05$,与 TAC 组比较,b— $P < 0.05$

2.3 卡托普利对高血压大鼠心肌 CHOP 蛋白表达的影响

CHOP 的主要在心肌的胞浆中表达,阳性细胞胞浆内可见棕黄色颗粒。Cartopril 组 CHOP 蛋白表达的 AOD 值为 0.23 ± 0.03 ,显著低于 TAC 组(0.46 ± 0.05),但高于 Sham 组(0.07 ± 0.02),差异有统计学意义($P < 0.05$);TAC 组 CHOP 蛋白表达的 AOD 值高于 Sham 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3,图 4。

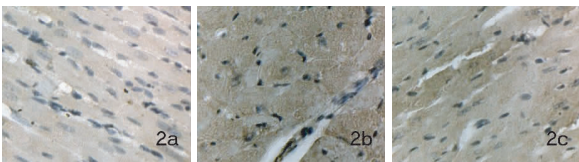


图 3 各组大鼠心肌 GRP78 表达的 AOD 值($n = 6$)
2a—Sham 组,2b—TAC 组,2c—Cartopril 组

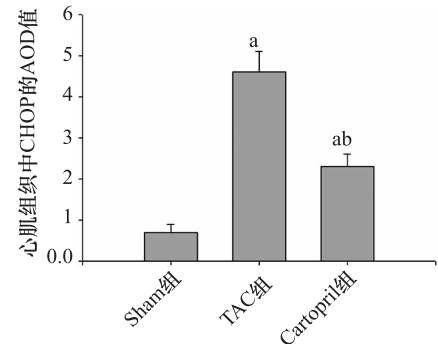


图 4 各组大鼠心肌 CHOP 表达的 AOD 值($n = 6$)
与 Sham 组比较,a— $P < 0.05$,与 TAC 组比较,b— $P < 0.05$

2.4 卡托普利对高血压大鼠心肌细胞凋亡的影响

TUNEL 标记定位于心肌细胞核,正常心肌细胞核蓝染,凋亡心肌细胞呈棕黄色,染色质凝聚、浓缩。Cartopril 组可见少量凋亡心肌细胞($18.73 \pm 0.28\%$),显著低于 TAC 组($31.67 \pm 0.54\%$),但略高于 Sham 组($13.49 \pm 0.12\%$),差异有统计学意义($P < 0.05$);TAC 组细胞凋亡率显著高于 Sham 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5,图 6。

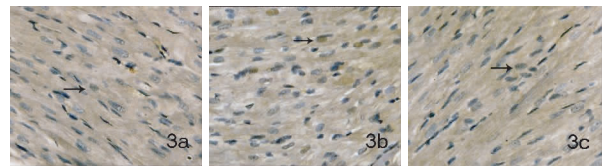


图 5 TUNEL 法检测各组大鼠心肌细胞凋亡的程度(×400)
3a—Sham 组,3b—TAC 组,3c—Cartopril 组

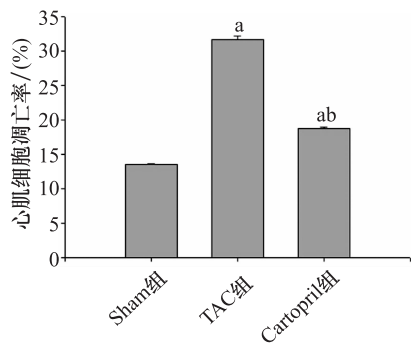


图 6 各组大鼠心肌细胞凋亡率比较($n = 6$)
与 Sham 组比较,a— $P < 0.05$,与 TAC 组比较,b— $P < 0.05$

3 讨论

现已公认,ERS 能够在细胞内介导两种不同的应激反应,分别是细胞保护性反应和细胞凋亡反应,其介导这两种反应的关键信号因子主要是 GRP78 和 CHOP。GRP78 作为 ERS 分子伴侣的重要成员,在 ERS 中起着极为重要保护性作用。研究认为,GRP78 的表达量一定程度上反应了细胞 ERS 保护性反应的水平^[6]。CHOP,也被称为生长抑制和 DNA 损伤诱导基因 153 (growth--arrest-and-DNA-damage inducible gene 153, GADD153),在正常生理

状态下表达非常低,但是在 ERS 时表达显著增加^[7]。CHOP 作为 ERS 介导细胞凋亡反应时重要的凋亡因子,它对 ER 的凋亡反应调节最为敏感,它反应了 ERS 介导的细胞凋亡反应的水平^[8]。业已证实,血管紧张素 II (Ang II) 能够引起细胞 ERS 的发生^[9]。唐家荣等还指出 Ang II 受体拮抗剂(替米沙坦)能够降低细胞 ERS 的凋亡反应水平^[10]。但是以卡托普利为代表的 ACEI 类药物对细胞 ERS 的影响,目前尚不十分清楚。本研究结果表明,卡托普利能够通过减少心肌组织内 GRP78 的表达,降低 ERS 的保护性反应;同时,卡托普利还可以通过阻止 CHOP 的表达,降低 ERS 介导的细胞凋亡反应。这提示,卡托普利有降低高血压心肌组织 ERS 反应水平的作用。

心肌细胞凋亡是高血压所致心肌肥厚的重要机制之一^[11]。因此,如何降低甚至消除心肌细胞凋亡一直是研究的热点。除了已知的死亡受体活化(外源性途径)和线粒体损伤途径(内源性途径)两条经典的细胞凋亡途径外,ERS 介导的细胞凋亡反应是近年才发现的一条新的凋亡途径^[12]。目前,针对降低 ERS 介导的心肌细胞凋亡的药物比较少。比较明确的是,CHOP/GADD153 反义寡核苷酸和血管紧张素 II 受体拮抗剂具有降低 ERS 介导的心肌细胞凋亡的作用^[13]。本研究发现,卡托普利能够降低高血压所致心肌细胞凋亡,同时它还能够降低 CHOP 参与诱导的 ERS 细胞凋亡反应,这提示卡托普利具有降低高血压心肌细胞 ERS 介导的细胞凋亡反应的作用,其作用机制可能与其抑制 CHOP 蛋白表达有关。

综上所述,不难看出卡托普利能够通过降低心肌组织 ERS 水平,减少高血压心肌细胞凋亡,从而对心肌细胞起保护作用,作用机制可能与其抑制 ERS 凋亡信号分子 CHOP 的表达有关。

参 考 文 献

1 Schreder M. Endoplasmic reticulum stress responses. Cell Mol Life Sci,2008;65: 862—894
2 Boya P,Cohen L,Zamzami N,et al. Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization.

- Cell Death and Differentiation,2002;9: 465—467
- 3 曾朝荣,陈维永,刘臻瑜. 高血压与左心室肥厚. 中国心血管杂志,2002;7: 54—56
- 4 段宗明,魏 瑾,牛小麟. 卡托普利长期干预对自发性高血压大鼠左室肥厚及 c-myc 基因表达的影响. 心脏杂志,2005;17: 16—17
- 5 吴自强,祝善俊,祝之明. 卡托普利对高盐饮食复合冷应激诱导的大鼠心肌肥厚的影响. 实用医学杂志,2002;18: 1023—1025
- 6 Rutkowski D T,Kaufman R J. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. Trends in Biochemical Sciences,2007;32: 469—476
- 7 WooK J,Lee T J,Lee S H,*et al.* Elevated gadd53/chop expression during resveratrol - induced apoptosis in human colon cancer cells. Biochemical Pharmacology,2007;73: 68—76
- 8 Zinszner H. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. Genes & development,1998;12,982—995
- 9 邹晓静,杨 乐,姚尚龙. CHOP/GADD153 在血管紧张素 II 诱导心肌细胞凋亡中的表达及作用. 中国病理生理杂志;2007;23: 2132—2136
- 10 唐家荣,晏小妮,周昌清,等. 替米沙坦对腹主动脉缩窄大鼠内质网应激相关的心肌细胞凋亡的影响. 中华心血管杂志,2008;36: 838—842
- 11 赵士超,韩跃刚,吴淑伦,等. 缬沙坦与苯那普利对高血压患者心肌纤维化及左室肥大逆转作用的对比研究. 实用诊断与治疗杂志,2006;20: 90—92
- 12 Sundar R S,Srinivasan V,Balasubramanyam M. Endoplasmic reticulum (ER) stress & diabetes. Indian J Med Res, 2007; 125: 411—424
- 13 Hu P,Han Z,Couvillon A D,*et al.* Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death. J Biol Chem, 2004; 279: 49420—49429

Effects of Cartopril on Expression of GRP78 and CHOP in Endoplasmic Reticulum Stress of Rat Heart after A or Tic Constriction and Cardiac Myocyte Apoptosis

LIN Ke,ZHAO Lian-you*,ZHENG Qiang-sun Huang Jin-yan,SHANG Fu-jun,AI Yong-fei,DING Lu

(Department of Cardiology,Tangdu Hospital,Fourth Military Medical University,Xi'an 710038,P. R,China)

[Abstract] To study Effects of Cartopril on expression of GRP78 and CHOP in endoplasmic reticulum stress of rat heart after aortic constriction and cardiac myocyte apoptosis,the rats which received abdominal transverse aortic constriction (TAC) were used as experiment models. Carotid artery cannulation was used to measure the blood pressures. Western blot and immunohistochemistry was used to assess the protein level of GRP78 and CHOP. TUNNEL was used to detect the cardiac myocyte apoptosis. All methods were applied to identify: (1) the effect of Cartopril on the expressions of GRP78 and CHOP protein; (2) the effect of Cartopril on cardiac myocyte apoptosis. The results are: (1) The mean arterial pressure of rats in Cartopril group was (124.67 ± 6.26) mmHg,significantly lower than the rats in TAC group [(169.73 ± 6.58) mmHg],but higher than the rats in Sham group[(117.08 ± 7.92) mmHg],the deviation was statistically significant ($P < 0.05$). (2) The mean optical density of GRP78 in the rats in Cartopril group was 0.20 ± 0.02,significantly lower than the rats in TAC group (0.35 ± 0.03),but slightly higher than the rats in Sham group (0.16 ± 0.03),the deviation was statistically significant ($P < 0.05$). (3) The mean optical density of CHOP in the rats in Cartopril group was (0.23 ± 0.03),significantly lower than the rats in TAC group (0.46 ± 0.05),but slightly higher than the rats in Sham group (0.07 ± 0.02),the deviation was statistically significant ($P < 0.05$). (4) Cartopril group showed a small amount of apoptosis in cardiac myocytes (18.73 ± 0.28)%,significantly lower than the TAC group (31.67 ± 0.54)%,but slightly higher than the

Sham group (13.49 ± 0.12)%, the deviation was statistically significant ($P < 0.05$); the incidence of cardiac myocyte apoptosis in TAC group was significantly higher than the ones in Sham group, and the deviation was statistically significant ($P < 0.05$). It is Concluded that Captopril can have a protective effect of myocardial cell in hypertension, through decreasing the level of ERS. The mechanism might be related to CHOP – induced ERS apoptosis.

[**Key words**] hypertension endoplasmic reticulum stress GRP78 CHOP myocardial cell apoptosis cartopril.

(上接第 4138 页)

Construction and Expression of the Recombinant BCG Expressing Derp2-PEB1 Fusion Protein in Form of Lipoprotein

SHAO Cheng, SHI Jie-ran, GUO Xiao-ya, HU Lin-jie¹, HOU Mei-na¹

(Respiratory Medicine Department of Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, P. R. China)

[**Abstract**] To construct the recombinant BCG, on which was able to express house dust mite antigen Der p2 and *C. jejuni* PEB1 in form of lipoprotein for oral asthma vaccine, the pCW-Der p2-PEB1-rBCG, the pCW-Der p2 and pUC-PEB1 plasmid DNA were amplified and recombinant plasmid pCW-Der p2-PEB1 was synthesized. The recombinant plasmid was transferred into competent BCG, after that rBCG positive bacterium strains were selected by hygromycin resistance screening. Target gene was detected in positive rBCG by specific amplification using PCR. rBCG was checked by indirect immunofluorescence with anti-Der p2 monoclonal antibody and antiserum against mouse PEB1. It is resulted that successfully amplified Der p2 and peb1 gene, constructed recombinant plasmid pCW-Der p2-PEB1 and transferred the plasmid into BCG, which is confirmed by indirect immunofluorescence. It is concluded that recombinant BCG pCW-Der p2-PEB1-rBCG Expressing Der p2-PEB1 Fusion Protein on its surface is successfully constructed and this product may provide basis for the further research of genetic engineering vaccine.

[**Key words**] PEB1 house dust mite antigen Der p2 recombinant BCG