

拉西地平对内质网应激导致左室重塑的保护作用*

胡中伟 赵连友[△] 郑强荪 刘沙沙 丁璐 尚福军 艾永飞

(第四军医大学唐都医院心血管内科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:研究在高温高湿应激状态下拉西地平对葡萄糖调节蛋白(glucose-regulated protein 78,GRP78)和 C/EBP 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白(C/EBP-homologous protein,CHOP)在大鼠心肌中表达及对心室重塑的影响。**方法:**将 30 只雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为对照组、高温高湿组、拉西地平干预组,每组 10 只。喂养 6 周后颈动脉插管测定平均动脉压及心率。B 超检测左室形态结构。免疫组化法检测大鼠心肌 GRP78 及 CHOP 蛋白及表达水平。**结果:**高温高湿组的大鼠平均动脉压(MBP)、隔厚度(IVST)、左室后壁厚度(LPWT)、左室重量指数(LVWI),GRP78 及 CHOP 蛋白表达水平与对照组相比均有显著升高($p < 0.01$),拉西地平干预组能显著降低大鼠平均动脉压(MBP)、室间隔厚度(IVST)、左室重量指数(LVWI),GRP78 及 CHOP 蛋白的表达水平($p < 0.05$)。**结论:**内质网应激可能参与了高温高湿诱导的左室重构;拉西地平可能通过降低 GRP78 及 CHOP 的表达干预了 ERS 介导的心肌肥厚通路,从而改善心脏功能。

关键词:拉西地平;内质网应激;左室重塑;GRP78;CHOP;心肌细胞

中图分类号:Q95-3, R54 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-424-04

Protective effects of Lacidipine against left ventricular remodeling caused by endoplasmic reticulum stress in rats*

HU Zhong-wei, ZHAO Lian-you, ZHENG Qiang-sun, LIU Sha-sha, DING Lu, SHANG Fu-jun, AI Yong-fei

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

ABSTRACT Objective: To investigate the influence of Lacidipine on the expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78) and C/EBP-homologous protein (CHOP) in rat cardiomyocytes and the effects of it against left ventricular remodeling under the high temperature and humidity conditions. **Methods:** 30 male SD rats were randomly divided into control group, high temperature and humidity group and high temperature and humidity + Lacidipine group (0.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ per gavage, n=10). 6 weeks later, the MBP and HR were measured through carotid artery incubation, and the morphology of left ventricular was monitored by B- Ultrasound. The expression of GRP78 and CHOP in rat cardiomyocyte were examined by immunohistochemistry. **Results:** The (mean arterial pressure) MBP, (inter ventricular septal thickness)IVST,(Left ventricular thick wall thickness)LPWT, (Left entricular mass index)LVWI, as well as the expression of GRP78 and CHOP in cardiomyocyte were remarkably increased in high temperature and humidity group when compared with control group ($P < 0.01$). While Lacidipine could significantly decrease MBP, IVST, PWT, LVWI of the rats and down-regulate the expressions of GRP78 and CHOP in cardiomyocyte ($P < 0.05$). **Conclusion:** The endoplasmic reticulum stress may be involved in the left ventricular remodeling caused by high temperature and humidity. Lacidipine may exerts an protective effect on heart by inhibiting the endoplasmic reticulum stress via down-regulating the expression of GRP78 and CHOP.

Key words: Lacidipine; Endoplasmic reticulum stress;Left ventricular remodeling;Glucose-regulated protein 78; C/EBP-homologous protein;Mmyocardinl cell

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R54 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)03-424-04

前言

内质网稳态的破坏将导致大量错误或者未折叠蛋白质在内质网中的聚集,通过相应的信号通路,引起一系列的细胞反应,即内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)。近来研究表明,ERS 是由于某种原因而导致细胞内质网内稳态的失衡,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]。

大量的研究表明,ERS 在冠心病、糖尿病等疾病的发生过程中起重要作用。文献报道^[2-3]高温高湿应激对机体的损伤效应广泛,可造成机体血压升高及多脏器损伤,严重损害生命安全,但其确切机制目前尚不十分清楚。

拉西地平(Lacidipine)是一种新型的二氢吡啶类钙离子拮抗剂,其在平稳降压的同时可有效的保护靶器官^[4]是一种具有广阔发展前景的降压药物。对于拉西地平在应激状态下能够发

* 基金项目:军队“十一五”重要军事医学基础研究项目资助(062074)

作者简介:胡中伟(1977-),男,硕士,主治医师,研究方向:高血压发病机制,

电话:13571984542, Email: zhongwei_hu@126.com

[△]通讯作者:赵连友, Email: zhaolianyou2010119@163.com

(收稿日期:2010-11-04 接受日期:2010-11-27)

挥的作用及其可能的机制,一直未有文献报道。本研究通过建造大鼠高温高湿应激模型,观察拉西地平对左室重塑心肌肥厚的影响,并通过观察 ERS 相关因子葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 和 C/EBP 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白(CHOP)在大鼠心肌中表达水平的变化来探讨其可能机制。为拉西地平的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

成年雄性 SD 大鼠 30 只,鼠龄 8-10 周,体质量 180-220g (第四军医大学动物实验中心提供)。兔抗大鼠 GRP78 抗体(美国 Bioword 公司);碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗兔 IgG(美国 Santacruz 公司);浓缩型二氨基苯胺(DAB)试剂盒(北京中杉金桥生物试剂公司);Bx41 型光学显微镜(日本奥林巴斯株式会社);DP71 型显微摄像系统(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);仿真模拟气候舱(宁波江南仪器厂);HP Sonos 2500 超声仪(第四军医大学西京医院超声科提供);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 大鼠高温高湿模型的建立及分组 将 30 只 SD 雄性大鼠饲养一周后随机分为对照组、高温高湿组及高温高湿+拉西地平干预组。空白对照组饲养在 12h 白昼(7AM-7PM),12h 黑夜,干球温度(24±1)℃和湿度(45±5)%环境中,不给予任何刺激;高温高湿组平时饲养环境与空白对照组相同,但每天暴露于干球温度(37±1)℃、相对湿度(75±5)%范围内的仿真模拟气候舱中(第四军医大学航空航天医学系提供),刺激 4 小时;高温高湿+拉西地平干预组条件同高温高湿组,于每日 8 时-10 时给予拉西地平 0.5mg/Kg/d 灌胃。对照组及高温高湿组给予生理盐水灌胃。三组大鼠实验时间为 6 周。

1.2.2 大鼠平均动脉压(MAP)及心率(次/分)的测量 在第 6w,用颈动脉插管法测量各大组大鼠的血压值。测压前先称大鼠体重,然后以 1%戊巴比妥钠 0.4ml/100g 腹腔注射麻醉大鼠,仰卧位固定于鼠台上,颈部剪毛,从外上到内下斜行切开 1-1.5cm,分离出右侧颈总动脉,结扎颈总动脉远端,在动脉管壁上向心

做“V”型切口,插入内充 1%肝素生理盐水的测压导管到升主动脉,稳定 20 分钟后用多道生理记录仪描记心率,动脉收缩压(SBP),舒张压(DBP)和平均动脉压(MBP)MBP=[DBP+1/3(SBP-DBP)]。

1.2.3 室间隔厚度及左室后壁厚度的测定 对大鼠以 1%戊巴比妥钠 0.4ml/100g 腹腔注射麻醉,左前胸脱毛,仰卧位固定于鼠台后,频率为 7.5MHz 的探头置于大鼠胸骨左侧,取左心室长轴切面,分别测量左心室舒张末期左室,测量指标均取 6 个心动周期的平均值做为结果。超声测量依据美国超声学会制定的标准。

1.2.4 左室重量指数(LVWI)的测定 将大鼠平均动脉压测完成后,迅速开胸取出心脏,预冷 PBS 缓冲液洗涤数次,剪去周围大血管,滤纸吸干,称全心质量(BW)。之后沿房室交界处剪去心房及右室游离壁,保留左心室和室间隔,滤纸吸干后称重(LVW)。计算左室重量指数(LVWI=LVW/BW,单位 g/Kg)。将称重后的左心室,放入冷冻管中立即投入液氮中,用于免疫组化标本。

1.2.5 心肌组织中 GRP78 及 CHOP 表达的免疫组化染色检测 切片常规脱蜡至水。微波修复抗原,分别加入 1:100 稀释的兔抗大鼠 GRP78 抗体及 1:100 稀释的兔抗大鼠 CHOP 抗体后,放入 4℃湿盒过夜。PBS 冲洗后分别加入羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶,作用 30 min。DAB 显色,复染后封片。

1.3 统计学处理

统计学处理所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 SPSS13.0 软件包进行统计学处理。多组均数间比较用单因素方差分析(ANOVA),2 组均数间比较采用 LSD-t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $p < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 高温高湿应激对大鼠 MBP 及心率的影响

高温高湿应激 6 周后,高温高湿组和拉西地平干预组的 MBP 与对照组比较有差异,其中高温高湿组差异非常显著($p < 0.01$);高温高湿组与拉西地平干预组比较拉西地平干预组的 MBP 低于高温高湿组,有统计学差异($p < 0.05$)。高温高湿组和拉西地平干预组的心率与对照组比较无统计学差异,见表 1。

表 1 高温高湿应激对大鼠 MBP 及心率的影响 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

Table.1 High temperature humidity stress on rat MBP and heart rate influence (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	MBP(mmHg)	heart rate(1/MIN)
对照组 (controls group)	108.65± 9.84	388± 11
高温高湿组 (high temperature and humidity)	148.92± 9.38 ^{bc}	393± 14
拉西地平干预组 (Lacidipine intervention group)	129.65± 9.84 ^a	399± 12

与对照组比较,^a $p < 0.05$,^b $p < 0.01$;与拉西地平干预组比较^c $p < 0.05$

V.S. controls,^a $p < 0.05$,^b $p < 0.01$; V.S Lacidipine intervention group^c $p < 0.05$

2.2 高温高湿应激对大鼠室间隔厚度(IVST)、左室后壁厚度(LPWT)及左室重量指数(LVWI)的影响

高温高湿应激 6 周后,高温高湿组和拉西地平干预组与对

照组比较,IVST 及 PWT 均有差异,其中高温高湿组差异更显著($p < 0.01$)。高温高湿组与拉西地平干预组比较拉西地平干预组的 IVST 及 PWT 均低于高温高湿组有统计学差异($p < 0.05$)。

高温高湿组和拉西地平干预组的 LVWI 均高于对照组,但无统计学差异($p>0.05$)。见表 2。

2.3 大鼠心肌中 GRP78 表达的免疫组化法检测

高温高湿应激大鼠心肌的 GRP78 的表达主要定位于心肌细胞的胞浆中,染色呈棕黄色。半定量分析(用 OD 值表示)显

示,高温高湿组和拉西地平干预组均高于对照组,其中高温高湿组差异更显著($p<0.01$);高温高湿组与拉西地平干预组比较,拉西地平干预组低于高温高湿组的表达,有统计学差异($p<0.05$),见图 1-1,1-2。

表 2 高温高湿应激对大鼠 IVST、LPWT 及 LVWI 的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)
Table.2 High temperature humidity stress on IVST, LPWT and LVWI influence($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别 (group)	IVST (mm)	PWT (mm)	LVWI (g/Kg)
对照组 (controls group)	1.87± 0.14	1.94± 0.09	2.06± 0.14
高温高湿组 (high temperature and humidity)	2.42± 0.15 ^{bc}	2.55± 0.10 ^{bc}	2.18± 0.15
拉西地平干预组 (Lacidipine intervention group)	2.13± 0.14 ^a	2.21± 0.08 ^a	2.11± 0.15

与对照组比较,^a $p<0.05$,^b $p<0.01$;与拉西地平干预组比较,^c $p<0.05$ 。
V.S. controls,^a $p<0.05$,^b $p<0.01$; V.S Lacidipine intervention group ^c $p<0.05$ 。

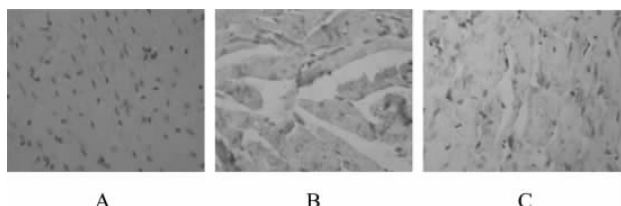


图 1-1 各组大鼠心肌 GRP78 的免疫组化染色法检测($\times 400$)

A: 对照组; B: 高温高湿组; C: 拉西地平干预组

Fig.1-1 Rat myocardial GRP78 immunohistochemical staining in Each group($\times 400$)

A: The control group; B: High temperature humidity group; C: Lacidipine intervention group

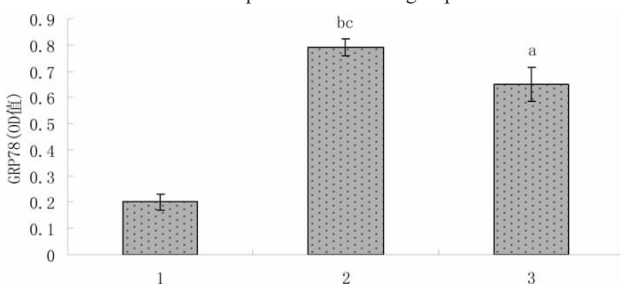


图 1-2 各组大鼠心肌 GRP78 表达的半定量分析

1: 对照组; 2: 高温高湿组; 3: 拉西地平干预组

与对照组比较,^a $p<0.05$,^b $p<0.01$;与拉西地平干预组比较,^c $p<0.05$; $n=10, \bar{x} \pm s$

Fig.1-2 Semi-quantitative analysis on the expression of Rat myocardial GRP78.

1: The control group; 2: High temperature humidity group; 3: Lacidipine with intervention group

V.S. controls,^a $p<0.05$,^b $p<0.01$; V.S Lacidipine intervention group ^c $p<0.05$ 。 ^c $p<0.05$; $n=10, \bar{x} \pm s$

2.4 大鼠心肌中 CHOP 表达的免疫组化法检测

高温高湿应激大鼠心肌的 CHOP 的表达主要定位于心肌细胞的胞浆中,染色呈棕黄色。半定量分析显示,高温高湿组和

拉西地平干预组均高于对照组,有显著差异($p<0.01$);高温高湿组与拉西地平干预组比较,拉西地平干预组低于高温高湿组的表达($p<0.05$)。见图 2-1,1-2。

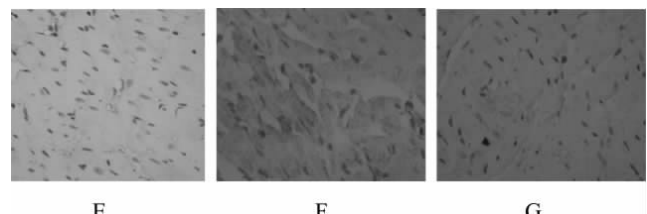


图 2-1 各组大鼠心肌 CHOP 的免疫组化染色法检测($\times 400$)

E: 对照组; F: 高温高湿组; G: 拉西地平干预组

Fig.2-1 Rat myocardial CHOP immunohistochemical staining in each group($\times 400$)

E: The control group; F: High temperature humidity group; G: Lacidipine with intervention group

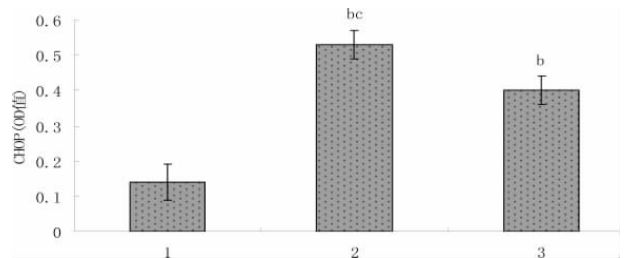


图 2-2 各组大鼠心肌 CHOP 表达的半定量分析

1: 对照组; 2: 高温高湿组; 3: 拉西地平干预组

与对照组比较,^a $p<0.05$,^b $p<0.01$;与拉西地平干预组比较,^c $p<0.05$; $n=10, \bar{x} \pm s$

Fig.2-2 Semi-quantitative analysis on the expression of Rat myocardial CHOP.

1: The control group; 2: High temperature humidity group; 3: Lacidipine with intervention group

V.S. controls,^a $p<0.05$,^b $p<0.01$; V.S Lacidipine intervention group ^c $p<0.05$ 。 ^c $p<0.05$; $n=10, \bar{x} \pm s$ 。

3 讨论

研究发现,ERS作为一种亚细胞器上的应激,能够在细胞层面上反应多种疾病的病理过程^[5]。如参与动脉粥样硬化,心肌肥厚,左室重构,心衰等发病的病理生理过程。ERS相关因子GRP78作为内质网稳态的感受器是启动ERS和内质网稳态调节的关键因子之一^[6]。GRP78的表达在一定程度上可反映ERS的启动和稳态调节功能。CHOP蛋白是ERS诱导产生的凋亡分子,其在细胞生长停止和细胞死亡中起重要作用^[7]。本实验通过建造大鼠高温高湿应激模型,引起高血压,左室功能降低等心脏功能改变,观察到有ERS的发生。拉西地平可以降低ERS相关因子GRP78蛋白及促凋亡编码基因CHOP蛋白的过度表达。

Brostrom等利用精氨酸加压素诱导的心肌细胞株—H9c2细胞肥大的模型发现,实验结果还显示,GRP78的合成增加并不是由于翻译的上调导致的胞内钙离子也参与压力超负荷心肌肥厚的形成,其机制可能是胞内钙离子浓度的升高可以作为胞内第二信使导致早期反应基因C-los表达,从而导致心肌肥大的启动^[8]最近研究证实,ERS是一条新的细胞凋亡信号传导通路^[9]。其可能的机制如下,caspase-12的活化途径。Caspase-12作为凋亡起始因子发挥了关键作用。Caspase-12敲除实验证实细胞能抵抗ERS诱导的凋亡。Caspase-12位于内质网的胞浆面,以前体形式存在,仅特异地被内质网信号通路水解活化。内质网Ca²⁺的异常及未折叠蛋白的增多均可激活caspase-12,其最终导致细胞凋亡的过程如上所述。有研究显示内质网Ca²⁺失衡时,激活Ca²⁺蛋白酶。活化的Ca²⁺蛋白酶切割内质网膜上的caspase-12,产生活性caspase-12片段,最终启动caspase级联反应。ERS也可引起细胞质内caspase-7移位到内质网表面,在caspase-7存在的条件下,位于内质网上的caspase-12可被ERS激活而引发细胞凋亡。但Xie等研究发现caspase-12的活化与caspase-7的进程一致,认为caspase-12活化的主要机制不是caspase-7的活化,而是与细胞Ca²⁺平衡失调有关。ERS时,IRE1、PERK和ATF6的活化均对促凋亡编码基因CHOP产生诱导,促使CHOP的激活。正常情况下,CHOP表达十分低,在ERS反应时,其表达显著增加,从而诱导细胞凋亡^[10]。

钙离子则作为胞内第二信使参与引起心肌肥大的各种信息的传递,能有效地逆转高血压左心室肥厚^[11-12],使IVsT、PwT、LVMI等指标明显改善。其机制可能为,阻止钙离子流入血管平滑肌细胞内,扩张冠状动脉,改善心肌氧供,改善心脏高负荷及缺血缺氧;持续阻断心肌细胞钙离子内流,阻滞血管紧张素I作用,逆转左室肥厚;也可能与其增加钠盐排泄抵消了肾上腺素能活性有关。还有研究发现^[13]拉西地平通过阻断钙离子内流减弱ERS的强度表现在GRP78和CHOP表达减弱。

综上所述,不难看出高温高湿应激可诱导心肌组织发生ERS。高温高湿应激可使代表ERS及ERS启动的主要因子GRP78蛋白在心肌中超表达。也可以诱导代表凋亡因子的CHOP蛋白在心肌中超表达。而拉西地平可以使高温高湿条件下的GRP78及CHOP蛋白表达的减少。说明ERS可能参与了高温高湿诱导的左室重构;拉西地平可能是通过降低GRP78

及CHOP的表达干预了ERS介导的心肌肥厚通路,从而改善心脏功能。但在其过程中具体是什么途径尚不明确,有待于进一步研究。

参考文献(References)

- [1] 侯小玲,赵连友,薛玉生,等. 高温应激对大鼠心肌血管紧张素Ⅱ的影响及其与心肌p22phox表达的关系[J]. 高血压杂志,2009,21(3):304-308
Hou Xiao Lin, Zhao Lian You, Xue Yu Sheng, et al. Effect of heat stress on angiotensin 11 expression in rat myocardium and its relationship to p22 phox [J]. Heart Journal, 2009, 21(3):304-308
- [2] 何丽华,张金良,张颖,等. 高温对大鼠血压及血管活性物质的影响[J]. 北京大学学报(医学版),2005,37(4):448-449
He Li-hua, Zhang Jin-liang, Zhang Yin, et al. High temperature on rat blood and blood vessels of active material influence [J]. Journal of Peking University(Health Sciences), 2005,37(4):448-449
- [3] Finnoff JT. Environmental effects on brain function[J]. Cur, Sports MedRep, 2008, 7(1):28-32
- [4] Park JK, Fiebeler A, Muller DN, et al. Lacidipine inhibits adhesion molecule and oxidase expression independent of blood pressure reduction in angiotension-induced vascular injury[J]. Hypertension, 2002, 39(2 pt 2):685-689
- [5] Schreder M. Endoplasmic reticulum stress responses [J]. Cell Mol Life Sci, 2008,65(6):826-894
- [6] Rutkowski DT, Kaufman RJ. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER Stress [J]. Trends Biochemical Sciences, 2007,32(10):469-476
- [7] Oyadamaru S, Mori M. roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress [J]. Cell Death Differ, 2004,11(4):381-389
- [8] Molkenstin JD, Lu JR, Antes CL, et al. A calcineurin dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy, Cell, 1998,93(2):225-228
- [9] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N. Caspase-12 mediates ER specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-13 [J]. Nature, 2000,403(6765):98-103
- [10] Ji C, Mehrian-Shai R, Chan C et al. Role of CHOP in hepatic apoptosis in the murine model of intragastric ethanol feeding[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2005,29(8):1496-1503
- [11] 李文广,杨俊芬,屠洪,等. 钙离子拮抗剂在老年人慢性心功能不全中的应用[J]. 吉林医学,2005,26(2):154
Li Wen-guang, Yang Jun-feng, Tu Hong, et al. Calcium antagonists in the elder chronic cardiac insufficiency of application [J]. Jilin medical, 2005,26(2):154
- [12] 李继敏,胡大一. 慢性心房颤动心室率控制的研究现状[J]. 中国心血管病研究杂志,2004,2(3):164
Li Ji-ming, Hu Da-yi. Chronic atrial fibrillation ventricular rate control research status[J]. Cardiovascular disease of China research Journal, 2004,2(3):164
- [13] Peter Pyrko, Adel Kardosh, Yen-Ting Liu, et al. Calcium-activated endoplasmic reticulum stress as a major component of tumor cell death induced by 2,5-dimethyl-celecoxib, a non-coxib analogue of celecoxib[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2007,6(4):1262-1275