·基础研究·

衣霉素诱导大鼠心肌细胞内质网应激凋亡模型的构建 *

沈明志 刘佳妮 翟雅莉 赵 萌 丁铭格 王 博 岳 劲 王晓明

(第四军医大学西京医院老年病科 陕西 西安 710032)

摘要 目的：通过衣霉素诱导内质网应激建立新生大鼠心肌细胞凋亡模型。**方法：**不同浓度、不同时间的衣霉素作用于原代培养乳鼠心肌细胞，通过 MTT 实验和流式细胞术测定心肌细胞的存活率和凋亡率，Western blot 检测内质网应激蛋白 GRP78，CHOP 表达水平。**结果：**①与阴性对照组相比，衣霉素具有损伤心肌细胞的作用，并呈现剂量与时间依赖关系（$P<0.05$，n=12）。②通过流式细胞术判断心肌细胞死亡的性质，当衣霉素浓度为 100ng/ml，作用 72h 时，心肌细胞存活率和凋亡率分别为 57.4± 3.2%（n=12），25.9± 5.8%（n=3）。提示衣霉素损伤细胞的形式主要为凋亡性死亡。③内质网应激蛋白 GRP78 和 CHOP 表达于 6h 开始增加，24h 达到峰值，随后呈下降趋势。**结论：**应用衣霉素成功诱导 SD 乳鼠心肌细胞内质网应激凋亡模型，衣霉素的最佳诱导浓度为 100ng/ml，作用时间为 72h。

关键词：衣霉素；内质网应激；凋亡；GRP78；CHOP

中图分类号：Q95-3 R54 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2011)05-801-04

Construction of Neonatal Rat Cardiomyocyte Apoptosis Model by Tunicamycin- Induced Endoplasmic Reticulum Stress*

SHEN Ming-zhi, LIU Jia-ni, ZHAI Ya-li, ZHAO Meng, DING Ming-ge, WANG Bo, YUE Jin, WANG Xiao-ming

(Department of Geriatrics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To establish endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic model by tunicamycin induced on cultured neonatal rat cardiomyocytes. Methods: Neonatal rat cardiomyocytes in primary culture were exposed to tunicamycin with different concentrations and action times. MTT assay and flow cytometry analysis were applied to detect cardiomyocyte viability and apoptosis rate. Western blot was used to examine the expression of GRP78 and CHOP. Results: ① Compared with the negative control, tunicamycin resulted in cardiomyocyte injury, which was time and concentration-dependent ($P<0.05$, n=12). ② The treatment of tunicamycin produced 57.4± 3.2 %(n=12) of cellular viability and 25.9± 5.8%(n=3) of apoptotic population in cardiomyocytes by flow cytometry. ③ The levels of GRP78 and CHOP upregulated at 6 h, respectively. After tunicamycin treatment for 24h, the upregulation of GRP78 and CHOP reached the maximum. Conclusions: Tunicamycin-induced apoptotic model in cultured neonatal rat cardiomyocytes were successfully constructed The optimal concentration and action time of tunicamycin treatment was 100ng/ml, 72h, respectively.

Key words: Tunicamycin; Endoplasmic reticulum stress; Apoptosis; GRP78; CHOP

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

Article ID: 1673-6273 (2011) 05-801-04

前言

心肌细胞凋亡与心律失常、高血压、动脉粥样硬化、急性冠脉综合症、心肌缺血再灌注损伤、心肌病、心肌炎、先天性心脏病、心力衰竭[1]等心血管疾病密切相关。死亡受体途径和线粒体途径是心肌细胞凋亡的两种主要方式。内质网应激(endoplasmic reticulum stress，ERS)在心血管疾病导致的心肌细胞凋亡过程中发挥了重要作用，成为近期研究的热点[2-4]。内质网(endoplasmic reticulum，ER)是真核细胞内重要的细胞器，主要参与膜蛋白和分泌蛋白修饰和折叠[5]。内质网对外界环境较敏感，各种应激所导致的代谢异常、蛋白质糖基化抑制、二硫键形成障碍等均可引起错误折叠和未折叠蛋白在内质网腔内聚集，破坏内质网稳态，引发内质网应激(ERS)[6]。应激发生后，内质网通过上调分子伴侣 GRP78 表达、抑制蛋白质合成、加速错误折叠和未折叠蛋白质降解等方式缓解 ERS。然而持续或 / 和较严重的 ERS 则触发凋亡信号，诱导 CHOP、caspase-12、JNK 等促凋亡因子的表达及活化，导致细胞凋亡[7]。尽管已有衣霉素通过内质网应激诱导细胞凋亡的报道[8]，但目前尚缺乏构建心肌细胞凋亡的模型。为此，本研究应用衣霉素对心肌细胞进行干预，通过 MTT 实验检测细胞存活率、流式细胞术检测细胞凋亡率和

* 基金项目：国家自然科学基金项目资助(30770847)

作者简介：沈明志(1981-)，男，硕士研究生，主要从事心血管疾病的基础与临床研究。

Email：shenmingzhi1981@163.com

△通讯作者：王晓明，教授，硕士导师，主要从事心血管疾病的基础与临床研究。Email：xmwang@fmmu.edu.cn

(收稿日期：2010-12-10 接受日期：2010-12-31)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Western blot 观察伴侣分子 GRP78 和 CHOP 的表达，为进一步探讨内质网应激诱导心肌细胞凋亡性相关疾病的机制提供了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

Sprague Dawley (SD) 大鼠 1 日龄乳鼠由第四军医大学实验动物中心提供，高糖 DMEM 培养基(Gibico)，胎牛血清(Gibico)，Ⅰ型胶原酶(Sigma)，MTT(Sigma)，DMSO(Sigma)，衣霉素(Sigma)，胰蛋白酶(Sigma)，5-Brdu(Sigma)，Anti-GRP78(bioworld)，Anti-GADD153/CHOP (Santa Cruz)，β-actin (博士德)，Annexin Ⅴ/PI 凋亡试剂盒(BD)，BCA 蛋白定量试剂盒(Pierce)。

1.2 原代培养新生大鼠心肌细胞

取 1 日龄新生 SD 仔鼠，在 70%酒精中浸泡数秒，用眼科弯剪沿剑突偏左侧下剪，取出心脏，冰 PBS 清洗 3 次，剔除新房及大血管，转入同位素瓶，用眼科直剪将其剪成 1mm^3 组织块，1mg/ml 的胶原酶分 5 次消化，每次 5-7min。收集除第一次消化的细胞悬液，加入含血清的 DMEM 培养基终止消化，1000r/min 离心 5min，弃上清。重悬细胞，用滴管吹打至单细胞悬液，经 200 目筛网过滤后接种于培养瓶，差速贴壁 1h。取细胞悬液，加入 100umol/l 的 Brdu，24h 后换液。通过倒置显微镜观察细胞形态及搏动，α-actin 细胞荧光鉴定心肌细胞纯度达 90%以上时进行实验。

1.3 衣霉素诱导凋亡模型制备

未处理的心肌细胞作为对照组，应用 25ng/ml，50ng/ml，100ng/ml，200ng/ml，500ng/ml 衣霉素作用心肌细胞，分别在 0h，24h，48h，72，96h 进行各项指标检测。

1.4 MTT 法检测心肌细胞存活率

心肌细胞按照 5× 10^5/ml 的浓度接种于 96 孔板，每孔 100ul，经无血清培养液处理后，随机分组，每组设 12 个副孔：①对照组，②衣霉素组(25ng/ml，50ng/ml，100ng/ml，500ng/ml)。分别刺激 0h，24h，48h，72h，96h 后每孔加入 MTT 溶液 10ul (5mg/ml)，37℃继续孵育 4h，吸弃孔内上清液，加入 150ulDMSO，选择 570nm 波长，振荡 10min，检测各孔吸光度 A 值 (A 值与活细胞数成正比)，以只加 DMSO 的孔测得的值为本底 A 值，计算细胞存活率。细胞存活率 = (实验组 A 值 - 本底 A 值) / (对照组 A 值 - 本底 A 值) × 100%，实验至少重复 3 次。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率

参照试剂盒说明书进行实验。100ng/ml 衣霉素与心肌细胞共同培养 0h，24h，48h，72h，96h 后，0.25%胰酶消化细胞，每组收集约 1× 10^6 个细胞，用冰 PBS 洗涤 2 次，70%乙醇固定，4℃过夜，Annexin V/PI 染色，经流式细胞仪检测，分析细胞凋亡情况。结果判断：左下象限为正常细胞，右下象限为早期凋亡细胞，右上象限为晚期凋亡细胞，左上象限为死细胞。

1.6 Western blot 检测内质网应激蛋白的表达

收集各时间点蛋白样品，12%SDS-PAGE，85V 电泳 30min 后将电压调制 125V，待溴酚蓝跑出胶板时停止电泳。100V、2h 将蛋白样品转移至 NC 膜上，5%脱脂奶粉室温封闭 1h。加入稀释后的 GRP78 (1∶1000)，CHOP (1∶500)，β-actin (1∶1000)，4℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次，每次 5min。加入荧光二抗 (1∶15000)，室温孵育 1h。TBST 洗膜 3 次，每次 5min，经 Odessy 红外成像系统扫描。应用 Image J 软件半定量分析条带灰度，相对表达量以各样本与 β-actin 条带灰度比值计算。

1.7 统计学分析

实验数据均以均值± 标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示。采用 SPSS 10.0 统计软件，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 衣霉素对心肌细胞存活率的影响

MTT 结果显示 (图 1)：与对照组相比，应用不同浓度衣霉素作用心肌细胞，细胞存活率呈现明显剂量和时间依赖性 ($P<0.05$，n=12)。当衣霉素浓度为 100ng/ml、作用 72h 时，心肌细胞存活率为 57.4± 3.2% (n=12)。

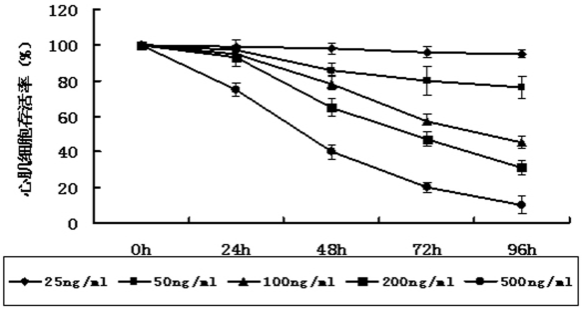

图 1 衣霉素对心肌细胞存活率的影响。

Fig. 1 The viability of cardiomyocytes induced by tunicamycin.

2.2 衣霉素对心肌细胞凋亡率的影响

流式细胞仪检测显示 (图 2)：正常对照组心肌细胞状态良好，凋亡率为 2.1%。100ng/ml 衣霉素处理心肌细胞于 24h、48h、72h 和 96h 各时间点所致心肌细胞凋亡率分别为 7.6%，25.9%，36.5%和 34.7%，较对照组高 ($p<0.05$)，坏死率分别为 0.5%，10.4%，19%，27.5%，呈逐渐增加趋势，呈现明显时间依赖性。48h 组有明显的细胞凋亡的发生 ($p<0.05$)，72h 凋亡细胞达到峰值，而后坏死细胞增多，与对照组相比有统计学差异 ($P<0.05$)。

2.3 衣霉素对心肌细胞 GRP78 蛋白表达水平的影响

为了验证衣霉素是通过 ERS 途径诱导的心肌细胞凋亡，本研究通过 Western blot 的方法检测内质网分子伴侣 GRP78。与对照组相比，100ng/ml 衣霉素组 GRP78 蛋白表达水平在 12h 时明显升高，24h 达峰值，48h 明显下降，72h 降至正常水平 (详见图 3)。

2.4 衣霉素诱导前后心肌细胞 CHOP 蛋白表达水平的比较

为进一步验证衣霉素是否激活了 ERS 信号通路，本研究同时检测了内质网特异性促凋亡蛋白 CHOP 的表达水平。结果表明 (图 4)，100ng/ml 衣霉素应用前后心肌细胞 CHOP 表达水平存在差异 ($P<0.05$)。衣霉素处理 6h 时 CHOP 开始缓慢升高，24h 达峰值，之后缓慢下降。

3 讨论

随着人们生活水平的提高和运动量的减低，在全球范围内心血管疾病的病死率仅次于肿瘤的病死率，严重危害人们的健

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

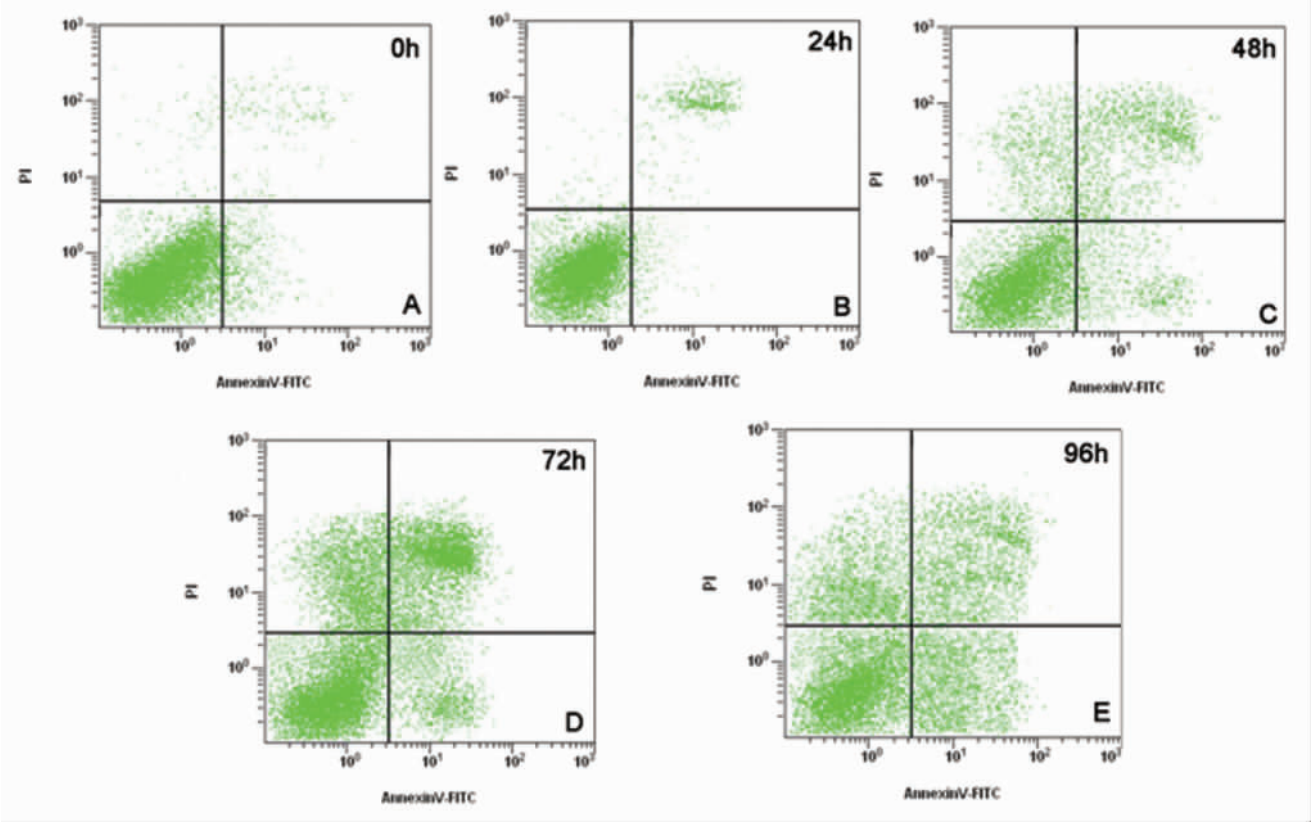

图 2 心肌细胞凋亡率与衣霉素作用时间的关系

Fig. 2 The apoptosis of cardiomyocytes induced by tunicamycin

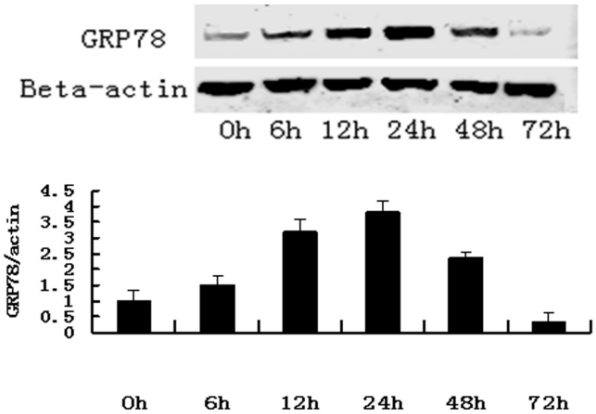

图 3 衣霉素对心肌细胞 GRP78 蛋白表达水平的影响

Fig. 3 The levels of GRP78 of cardiomyocytes induced by tunicamycin.

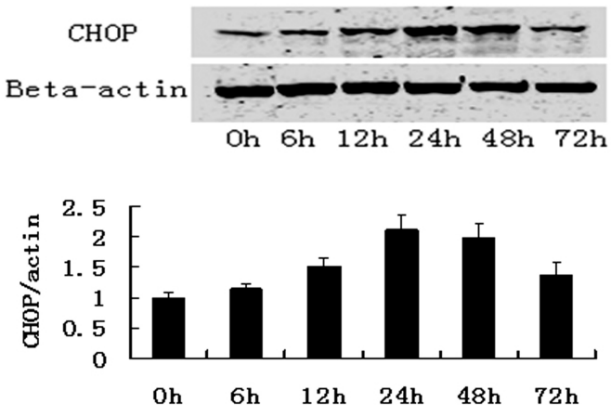

图 4 衣霉素诱导前后心肌细胞内 CHOP 蛋白表达水平的比较

Fig. 4 The levels of CHOP of cardiomyocytes induced by tunicamycin.

康[9]。在中国，心血管疾病还在继续大范围的蔓延，所以治疗心血管疾病刻不容缓。作为终末分化细胞，心肌细胞凋亡在几乎所有心血管疾病发生发展过程中都扮演着重要的角色[10]。以往的研究主要集中在死亡受体途径和线粒体途径诱导的心肌细胞凋亡[3]。近十年研究发现在心肌缺血、心肌缺血再灌注损伤、高血压、高血脂、动脉粥样硬化、冠心病、心肌肥厚、心力衰竭[3,11-13]等发病过程中都伴随着内质网微环境的改变，蛋白质的折叠，钙离子的稳态等都受到影响，这启动了 ERS 信号，并最终导致了细胞凋亡。由此可见，研究内质网应激诱导的心肌细胞凋亡是非常重要的。

文献报道[14]衣霉素可以阻碍内质网内新生蛋白质的糖基化过程，使新生蛋白质不能够正确折叠从而堆积在内质网中诱发 ERS。本实验应用衣霉素诱导体外培养的 SD 乳鼠心肌细胞，成功诱导了心肌细胞凋亡的模型。通过应用 MTT 法检测心肌细胞的存活率，该方法可以快速筛选出衣霉素用药浓度和作用时间，不足之处是其不能判定细胞是因为坏死还是凋亡而死亡，而流式细胞仪是通过检测细胞 DNA 变化而对凋亡细胞进行定量分析的方法，它具有灵敏、快速、准确、结果客观且重复性好的特点，是定量分析凋亡细胞的首选。通过 MTT 实验和流式细胞计数发现，100ng/ml 衣霉素处理 72h，心肌细胞的存活率和凋亡率分别为 57.4± 3.2%，25.9± 5.8%，以此浓度和时间建立的心肌细胞模型比较适合后续的实验研究。

分子伴侣 GRP78 与凋亡促进因子 CHOP 在 ERS 时有比较高的表达，因此在 ERS 时起着非常重要的作用，被看作是

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ERS 的标志。实验过程中，我们观察到 GRP78 和 CHOP 都有不同程度的升高，说明应用衣霉素成功诱导了 ERS 的模型。

文献报道[15]，在内质网应激的早期阶段，ERS 通过上调分子伴侣 GRP78 促进蛋白折叠，试图恢复内质网的功能，当 ERS 较严重和 / 或持续时间较长时，内质网启动了促凋亡信号，从而诱导了细胞凋亡，而 CHOP 是此信号途径的重要成员之一。本实验的结果显示，ERS 过程中 GRP78 和 CHOP 的表达模式不尽相同。随着衣霉素作用时间的延长，GRP78 表达水平是先升高后降低。100ng/ml 衣霉素处理 6h，GRP78 表达水平即可上调，24h 达峰值，而后迅速下降，而 CHOP 表达水平在 6h 开始轻微升高，在 24h 达到高峰，但随后下降比较缓慢，并且持续时间较长。这提示我们，在 ERS 情况下具有保护作用的分子伴侣 GRP78 升高的速度比较快，但同时下降的也较快，而具有诱导凋亡作用的 CHOP 上升速度较慢，同时下降的速度也较慢。

总之，本实验证明衣霉素可以通过激活内质网应激途径诱导心肌细胞凋亡，为进一步阐明心肌细胞凋亡的分子机制以及制定治疗策略提供了有效的模型基础。

参考文献(References)

[1] Wernig F, Xu Q. Mechanical stress-induced apoptosis in the cardiovascular system[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2002, 78(2-3):105-137

[2] Groenendyk J, Michalak M. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis[J]. Acta Biochim Pol, 2005,52(2):381-395

[3] Glembotski CC. Endoplasmic reticulum stress in the heart[J]. Circ Res, 2007, 101(10):975-984

[4] Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, et al. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways[J]. Oncogene,2003,22 (53):8608-8618

[5] Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response[J]. Physiology (Bethesda), 2007,22:193-201

[6] Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases[J]. FEBS Lett, 2007, 581(19):3641-3651

[7] Zhao L, Ackerman SL. Endoplasmic reticulum stress in health and disease[J]. Curr Opin Cell Biol, 2006,18(4):444-452

[8] Han C, Nam MK, Park HJ, et al. Tunicamycin-induced ER stress upregulates the expression of mitochondrial HtrA2 and promotes apoptosis through the cytosolic release of HtrA2 [J]. J Microbiol Biotechnol,2008, 18(6):1197-1202

[9] Silverberg DS, Wexler D, Iaina A, et al. The interaction between heart failure and other heart diseases, renal failure, and anemia [J]. Semin Nephrol,2006, 26(4):296-306

[10] Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease[J]. Apoptosis,2009,14(4):536-548

[11] Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, et al. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis[J]. Circulation, 2004,110(6):705-712

[12] Teng X, Qi YF, Tang CS. Endoplasmic reticulum stress and heart diseases[J]. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan, 2009, 40(2):106-110

[13] Azfer A, Niu J, Rogers LM, et al. Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006,291(3):H1411-1420

[14] Tanaka M, Yamazaki M, Chiba K. Neuroprotective action of genipin on tunicamycin-induced cytotoxicity in neuro2a cells [J]. Biol Pharm Bull, 2009,32(7):1220-1223

[15] Lin JH, Li H, Yasumura D, et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response [J]. Science, 2007,318(5852) 944-949

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net