

拉西地平对高温高湿应激大鼠血管平滑肌细胞 GRP78 和 CHOP 表达的影响 *

刘沙沙 赵连友[△] 胡中伟 尚福军 艾永飞 丁璐

(第四军医大学唐都医院心血管内科 陕西 西安 710038)

摘要 目的: 探讨钙离子拮抗剂拉西地平对高温高湿应激大鼠血管平滑肌细胞内质网应激相关因子葡萄糖调节蛋白 78(glucose-regulated protein of 78kD, GRP78)和 C/EBP 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白(CAAT/enhancer binding protein homologous protein, CHOP)表达的影响。方法: 将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、高温高湿组、拉西地平组, 每组 20 只。按实验时间(2w、4w、6w、8w)的不同, 各组又分为 4 个亚组, 每个亚组 5 只大鼠。用颈动脉插管法测定各组大鼠的平均动脉压(MAP); 用免疫组织化学法检测 GRP78 和 CHOP 的表达水平。结果: ①高温高湿各组的 MAP 随着实验时间的延长呈逐渐递增的趋势, 高温高湿 4w、6w、8w 亚组的 MAP 均显著高于相应的对照组和拉西地平组($P<0.05$)。②随着实验时间的延长, 高温高湿组 GRP78 表达量不断增加, 6w 达到最大值, 8w 表达减弱。高温高湿 4w、6w、8w 亚组 GRP78 表达量均高于相应对照组和拉西地平组, 有显著性差异($P<0.05$)。③高温高湿组 2w、4w、6w、8w 亚组 CHOP 表达量组间比较有显著性差异($P<0.05$)。8w 亚组表达达到最高值, 高温高湿组 6w、8w 亚组与相应对照组和拉西地平组比较有显著性差异($P<0.05$)。结论: 高温高湿应激可引起血管平滑肌细胞内质网应激反应, 导致 GRP78 表达及 CHOP 表达的不对称增加, 提示高温高湿应激可引起血管平滑肌细胞的损伤; 拉西地平可以减轻内质网应激, 逆转高温高湿应激所致的血管平滑肌细胞的损伤作用, 对血管平滑肌细胞有保护作用。

关键词 高温高湿应激; 拉西地平; 内质网应激; GRP78; CHOP; 血管平滑肌细胞

中图分类号: Q95-3, R54, R972.4 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)07-1241-05

Effects of lacidipine on expression of GRP78 and CHOP in vascular smooth muscle cells of rats in high temperature and humidity stress*

LIU Sha-Sha, ZHAO Lian-You^A, HU Zhong-Wei, SHANG Fu-Jun, AI Yong-Fei, DING Lu

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

ABSTRACT Objective: To study the effects of Lacidipine on the expression of GRP78 and CHOP in the vascular smooth muscle cells of the high temperature and humidity stress rats. **Methods:** Sixty Sprague-Dawley(SD) rats were divided randomly into three groups: control group($n=20$), high temperature and humidity group($n=20$) and Lacidipine group($n=20$). And each group included four subgroups: 2w, 4w, 6w, 8w and each subgroup had 5 rats. Mean arterial blood pressure (MAP) was measured by carotid artery intubation. The expression of GRP78 and CHOP in the vascular smooth muscle cells was detected by immunohistochemistry. **Results:** ①Mean arterial blood pressure(MAP) of 4w、6w、8w subgroups in the high temperature and humidity group increased significantly compared with that of the according control group and the according Lacidipine group ($P<0.05$). And it increased progressively during the experiment. ②Compared with that of the according control group, the expression of GRP78 in the subgroups of 4w, 6w, 8w in the high temperature and humidity group increased significantly($P<0.05$). And OD of the 6w subgroup in the model group was the highest. ③The expression of CHOP in the subgroups of 6w, 8w in the high temperature and humidity group increased significantly ($P<0.05$) compared with that of the according control group and the according Lacidipine group, and that of the 8w subgroup in the temperature and high humidity group was the highest. **Conclusions:** ERS is induced in the vascular smooth muscle cells of high temperature and humidity stress rats, which leads to the expression of GRP78 and CHOP increased in mismatch. This means that the high temperature and humidity stress may cause vascular smooth muscle cell damage. Lacidipine which can weaken endoplasmic reticulum stress, has a protective effect on vascular smooth muscle cells.

Key words: High temperature and humidity stress; Lacidipine; Endoplasmic reticulum stress; GRP78; CHOP; Vascular smooth muscle cell

Chinese Library Classification: Q95-3, R54, R972.4 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)07-1241-05

前言

高血压是临床常见的心血管疾病之一, 严重威胁人类的健康和生命, 其发病机制及有效治疗的研究是其热点, 但是其具

* 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: 刘沙沙(1982-) 女, 硕士, 医师, 主要研究方向: 高血压发病机制,

电话: 18992895863, Email: liushasha9133@163.com

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

(收稿日期: 2011-01-21 接受日期: 2011-02-16)

体机制还不清楚。一般认为,高血压的发病除与遗传因素密切相关外,环境因素也起着十分重要的作用。文献报道^[1-2],高温应激对生物体的损伤效应广泛,可造成机体血压升高及其多脏器损伤,严重损害生命安全。内质网应激是细胞生命活动与细胞结构、功能调节的主要机制。目前的研究表明,内质网应激参与多种生理和病理生理过程,其中包括多种心血管疾病如心力衰竭、缺血性心脏病等^[3]。拉西地平(Lacidipine,司乐平)是一种新型的二氢吡啶类钙拮抗剂(calcium-channel blocker,CCB),其在平稳降压的同时可有效地保护靶器官^[4]。但内质网应激与高血压的发生发展有何关系,拉西地平是否在高温高湿应激条件下具有心血管保护作用,目前尚不十分清楚。本课题通过建立高温高湿应激大鼠模型观察动脉血管平滑肌细胞内质网应激相关因子葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein of 78kD,GRP78)和C/EBP环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白(CAAT/enhancer binding protein homologous protein,CHOP)表达的变化,并探讨拉西地平对高温高湿应激所致血管平滑肌细胞的保护作用,旨在为高温高湿应激所致血管平滑肌细胞损害的发生机制提供理论依据,同时对其防治提供新的治疗策略。

1 材料和方法

1.1 材料

成年雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 60 只,鼠龄 8~10 周,体质量 180~220g(第四军医大学实验动物中心提供);拉西地平(哈药集团三精制药股份有限公司产品);兔抗大鼠 GRP78 多克隆抗体和兔抗大鼠 CHOP 多克隆抗体(美国 Bioworld 公司);碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗兔 IgG(美国 Santacruz 公司);SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司)。主要仪器有仿真模拟气候舱(宁波江南仪器厂),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),RM-6280 型多道智能生理记录及分析处理系统(成都仪器厂),Image-Pro Plus 6.0 计算机图像分析系统(Media Cybernetics 公司)。

1.2 方法

1.2.1 高温高湿应激模型的建立及分组 将 60 只 SD 雄性大鼠随机分为:对照组、高温高湿组和高温高湿组+拉西地平,每组 20 只。按实验时间(2w、4w、6w、8w)的不同,对照组、高温高湿组和拉西地平组又分为 4 个亚组,每个亚组 5 只大鼠。对照组大鼠饲养在 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。高温高湿组和拉西

地平组每天暴露于干球温度(37±1)℃和相对湿度(75±5)%范围内的仿真模拟气候舱中,刺激 4h(8AM-12AM),其余时间饲养环境与对照组相同。拉西地平以 0.5mg/kg/d 对拉西地平组进行灌胃;高温高湿组及对照组均以重量按比例给予相应的 NS 灌胃。实验时间为 8 周。

1.2.2 测量血压及标本留取 所有大鼠均采用颈动脉插管法测量血压值。称大鼠体重,腹腔注射 2%戊巴比妥钠溶液(0.2 mL/100 g)麻醉后,分离右颈总动脉并插管,以多道生理记录仪记录收缩压(systolic blood pressure,SBP)、舒张压(diastolic blood pressure,DBP),计算平均动脉压(mean arterial blood pressure,MAP),计算公式为 MAP= DBP +1/3(SBP-DBP)。测定指标并记录后,立即开胸分离并切取胸主动脉,长度约 1 cm,PBS 清洗,以 40 g/L 多聚甲醛固定,石蜡包埋。

1.2.3 主动脉血管平滑肌细胞 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:石蜡切片常规脱蜡至水;加 3% H₂O₂ 处理 10 分钟;在微波炉中用 0.01M 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)热修复组织抗原 15 分钟,冷却后 PBS 洗涤 1-2 次;滴加 5%BSA 封闭液室温 20 分钟封闭后;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 分钟,PBS 洗涤)、SABC(37℃孵育 20 分钟,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:于显微镜下观察血管平滑肌中层组织,每张切片中随机各取 3 个视野,测定每个视野下阳性物质的平均光密度(OD)值,并利用 Image-pro plus6.0 医学图像分析系统对大鼠主动脉中层 GRP78、CHOP 的光密度参数进行定量分析。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计学软件对资料进行分析。各组数据间显著性检验用多个样本均数比较及两两比较(ANOVA), $P < 0.05$ 者表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 拉西地平对高温高湿应激后大鼠血压的影响

对照组 0W、2W、4W、6W、8W 各亚组的 MAP 比较无显著性差异($P > 0.05$),高温高湿组及拉西地平组 2W、4W、6W、8W 各亚组的 MAP 均高于相应的对照组,其中高温高湿组较为显著($P < 0.05$)。随着实验时间的延长高温高湿组及拉西地平组的 MAP 均呈递增的趋势。见表 1

表 1 各组 MAP 的比较 ($n=5, \bar{x} \pm s, \text{mmHg}$)
Table1 Comparison of MAP of each group ($n=5, \bar{x} \pm s, \text{mmHg}$)

Time	control group	high temperature and humidity group	Lacidipine group
0W	122.65± 9.84	123.73± 9.52	122.33± 9.42
2W	126.65± 9.96	132.28± 8.63a	127.83± 8.59
4W	123.65± 8.86	148.56± 9.06 a	136.92± 9.38a
6W	125.65± 9.87	152.37± 8.36 a	140.03± 8.87 a
8W	123.65± 9.36	156.46± 9.11 a	144.69± 9.29 a

注:与对照组比较 $\alpha P < 0.05$

Note:Compared with control group, $\alpha P < 0.05$

2.2 拉西地平对高温高湿应激大鼠主动脉血管平滑肌细胞 GRP78 表达的影响

高温高湿应激后大鼠血管平滑肌组织中 GRP78 的表达主要定位于血管平滑肌细胞的胞浆中。高温高湿组 2W、4W、6W、8W 各亚组 OD 值分别为 0.48 ± 0.02 、 0.6 ± 0.03 、 0.82 ± 0.04 、 0.58 ± 0.03 ，组间比较均有显著性差异 ($P < 0.05$)；拉西地平组

2W、4W、6W、8W 各亚组 OD 值分别为 0.46 ± 0.02 、 0.55 ± 0.03 、 0.64 ± 0.03 、 0.51 ± 0.03 ，组间比较有差异 ($P < 0.05$)，高温高湿组 2W 亚组 OD 值高于相应拉西地平组，但无统计学意义 ($P > 0.05$)，高温高湿组 4W、6W、8W 亚组与相应拉西地平组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$)，6W 表达达到最高值，8W 表达减弱，但高于 2W 亚组 ($P < 0.05$)。见图 1 图 2。

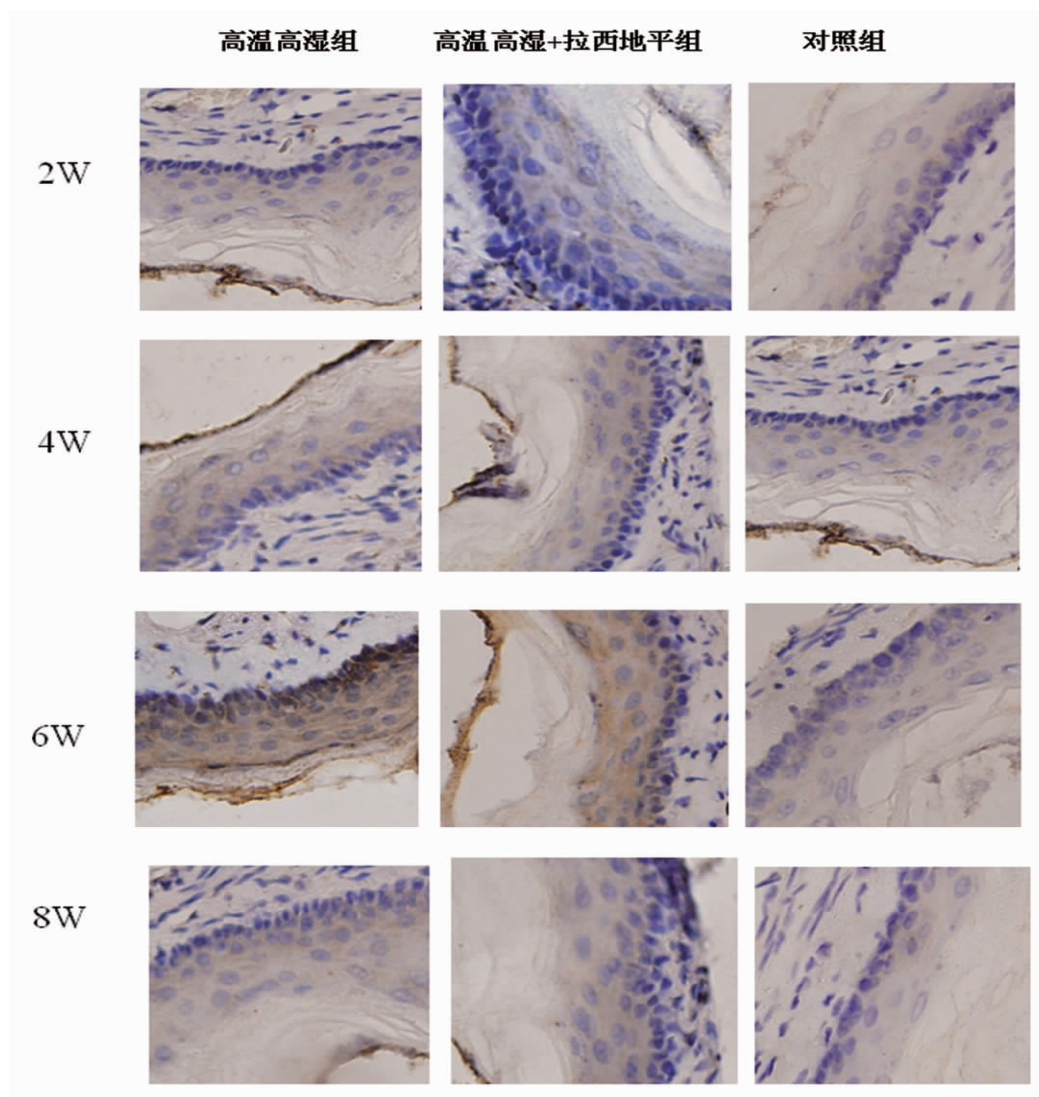


图 1 各组大鼠血管平滑肌细胞 GRP78 表达的免疫组化染色法检测($\times 400$)

Fig.1 The expression of GRP78 in vascular smooth muscle cells of each group by immunohistochemistry ($\times 400$)

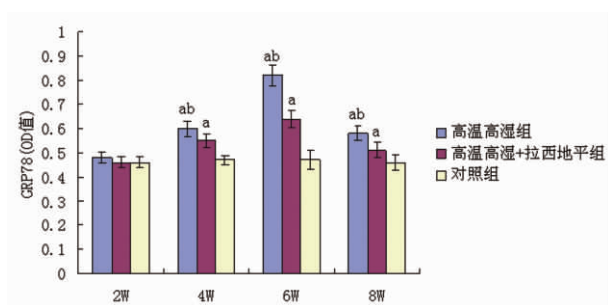


图 2 各组大鼠主动脉血管平滑肌细胞 GRP78 表达的定量分析($n=5$)
注：与对照组比较 $aP < 0.05$ ，与高温高湿 + 拉西地平组比较 $bP < 0.05$ 。
Fig.2 The quantitative analysis of GRP78 expression of vascular smooth muscle cells in each group($n=5$)

Note: Compared with control group, $aP < 0.05$; Compared with the high temperature and humidity and Lacidipine group, $bP < 0.05$

2.3 拉西地平对高温高湿应激大鼠主动脉血管平滑肌细胞 CHOP 表达的影响

高温高湿应激后大鼠血管平滑肌组织中 CHOP 的表达主要定位于血管平滑肌细胞的胞浆中。高温高湿组 2W、4W、6W、8W 各亚组 OD 值分别为 0.39 ± 0.02 、 0.46 ± 0.02 、 0.54 ± 0.03 、 0.61 ± 0.02 ，组间比较均有显著性差异 ($P < 0.05$)；拉西地平组 2W、4W、6W、8W 各亚组 OD 值分别为 0.38 ± 0.01 、 0.41 ± 0.02 、 0.48 ± 0.03 、 0.52 ± 0.02 ，组间比较有差异 ($P < 0.05$)，高温高湿组 2W 亚组 OD 值高于相应拉西地平组，但无统计学意义 ($P > 0.05$)，高温高湿组 4W、6W、8W 亚组与相应拉西地平组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$)，随着实验时间的延长，8W 亚组达到最高值。见图 3 图 4。

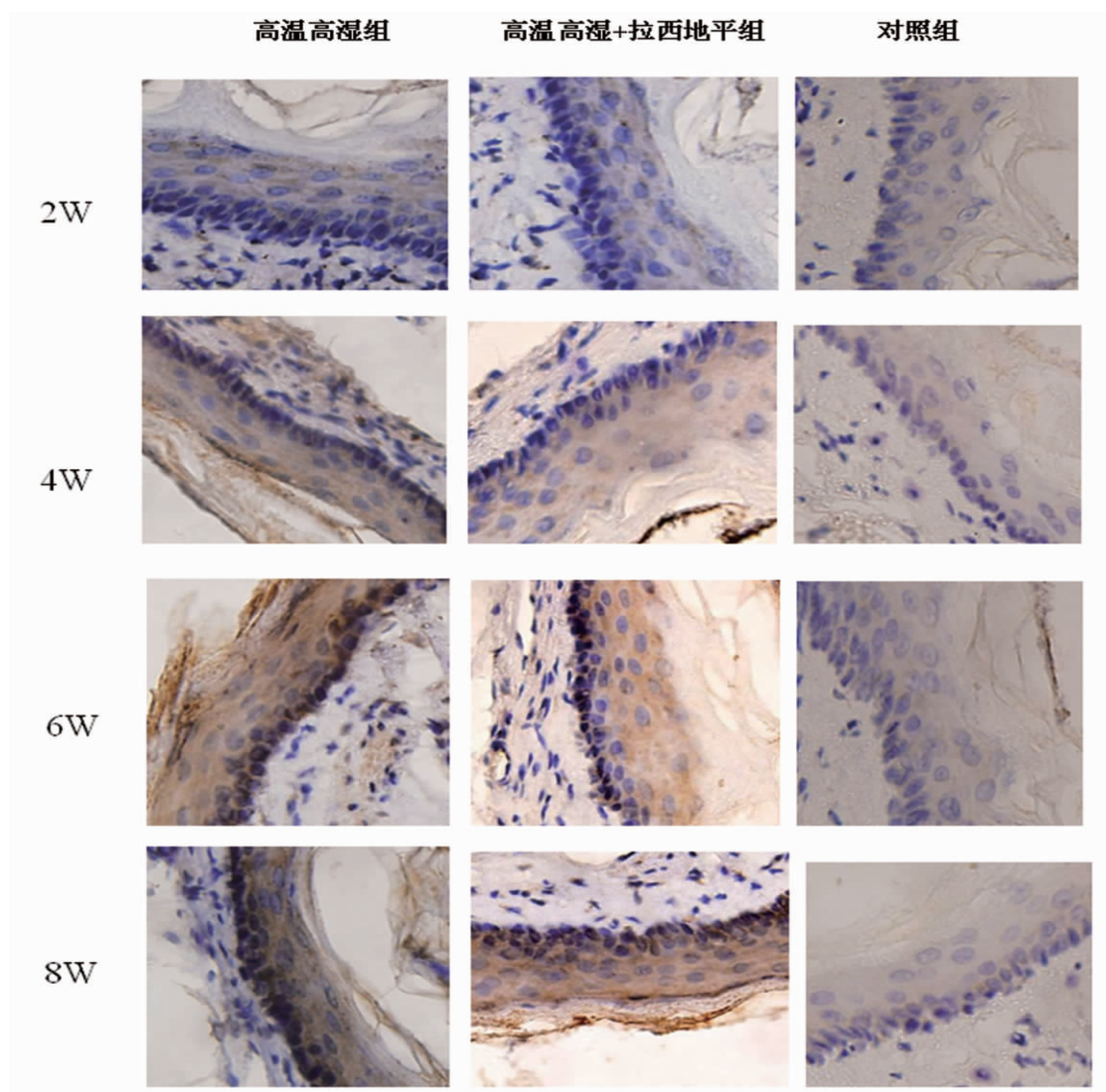


图3 各组大鼠血管平滑肌细胞 CHOP 表达的免疫组化染色法检测($\times 400$)

Fig.3 The expression of CHOP in vascular smooth muscle cells of each group by immunohistochemistry ($\times 400$)

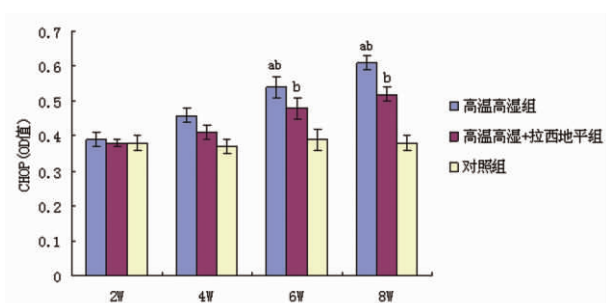


图4 各组大鼠主动脉血管平滑肌细胞 CHOP 表达的定量分析(n=5)

注:与对照组比较, $bP < 0.05$;与高温高湿+拉西地平组比较, $aP < 0.05$

Fig.4 The quantitative analysis of CHOP expression of vascular smooth muscle cells in each group(n=5)

Note: Compared with control group, $bP < 0.05$; Compared with the high temperature and humidity and Lacidipine group, $aP < 0.05$

3 讨论

高血压严重危害人类的健康,其发病机制极其复杂。目前认为,心脏、血管结构和功能的变化、神经体液调节机制的异常、遗传因素及应激刺激等均参与高血压的发生与发展。业已^[5-6]

证明,高温应激和间断、反复冷应激均可以引起大鼠 MAP 的升高和心血管功能异常,但高温高湿应激对血压有何影响目前尚不十分明确。本研究结果表明,在高温高湿应激条件下,可以引起大鼠 MAP 的升高。高温高湿组大鼠 MAP 在 2w 是开始升高,随着时间的延长 MAP 呈不断升高的趋势,说明高温高湿可以引起大鼠血压的升高,并与应激时间有关,拉西地平组血压均显著低于相应的高温高湿组,但高于对照组,说明拉西地平可以降低高温高湿应激引起的血压升高,但是不能完全抵消高温高湿对血压的影响,但具体机制尚不清楚。

内质网应激(endoplasmicreticulumstress, ERS)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^[7]。研究表明内质网应激反应是细胞的一种自我保护机制,以恢复内质网稳态,维持生存。但是过强或者长时间的內质网应激反应可以引起细胞的损害,甚至凋亡。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,在维持内质网蛋白质合成及正确折叠和细胞钙稳态方面起重要作用^[8]。GRP78 的表达在一定程度上可反应 ERS 的启动和稳态调节能力^[9]。本研究结果显示,高温高湿组各亚组 GRP78 的表达上调,明显高于对

照组,表明高温高湿的刺激可以引起血管平滑肌细胞的 ERS 稳态调节反应。高温高湿 2w 亚组 GRP78 即有表达,说明在高温高湿应激的初期,即有 ERS 稳态调节反应。高温高湿组 6w 亚组 GRP78 表达达最高值,8w 亚组开始下降。这表明在初期随着应激刺激的持续,ERS 稳态调节反应不断增强,保护性因子 GRP78 表达不断增加,从而保护血管平滑肌细胞,在后期,应激刺激的持续存在使保护性因子过度消耗,ERS 稳态调节反应减弱,保护作用下降。这也进一步说明 GRP78 的稳态调节作用是有一定限度的。

CHOP 也是 ERS 得标志蛋白^[10-12]。在正常情况下,CHOP 主要存在于细胞质中,含量很低。在细胞处于应激状态下,CHOP 的表达量大大增加并聚集在细胞核内^[13]。过量表达的 CHOP 能促进细胞凋亡^[14]。本研究结果显示,高温高湿组 4w 亚组 CHOP 开始表达增加,并呈递增趋势,8w 达最大值,提示高温高湿刺激引起的应激因子的持续存在,使 ERS 稳态调节反应时间过长或者过重,从而引起 CHOP 的超表达,进而激活 ERS 介导的细胞损害。

业已证实,血管紧张素 (AngII)能够引起细胞 ERS 的发生^[15],AngII 受体拮抗剂(替米沙坦)能够降低细胞 ERS 的凋亡反应水平^[16]。但是以拉西地平为代表的 CCB 类药物对血管平滑肌细胞 ERS 的影响,目前尚不十分清楚。本研究结果显示,拉西地平组各亚组 GRP78 的表达明显低于相应高温高湿组,说明拉西地平能够通过减少血管平滑肌细胞内 GRP78 的表达,降低 ERS 反应。高温高湿 6w、8w 各亚组 CHOP 表达均明显高于相应的拉西地平组,表明拉西地平可以减弱 ERS 稳态调节反应强度,提示拉西地平对高温高湿引起的血管平滑肌细胞的损害有一定的保护作用。

综上所述,本研究观察到高温高湿应激作为一种刺激因素可以引起血管平滑肌细胞的内质网应激以及内质网应激标志性蛋白 GRP78 及 CHOP 表达的不对称性增强,进而引起血管平滑肌细胞的损害和血压的升高。在高温高湿应激大鼠用拉西地平干预后,GRP78 和 CHOP 表达均下降,ERS 稳态调节反应强度减弱,提示其对高温高湿应激大鼠血管平滑肌细胞主要起保护作用。此研究结果为高温高湿应激性血管平滑肌细胞的损害机制及其防治提供了理论依据。

参考文献(References)

- [1] Finnoff JT. Environmental effects on brain function [J]. Curr Sports Med Rep, 2008,7(1):28-32
- [2] Zhang HJ, Doctrow SR, Xu L, et al. Redox modulation of the liver with chronic antioxidant enzyme mimetic treatment prevents age-related oxidative damage associated with environmental stress [J]. FASEB J, 2004,18(13):1547-1549
- [3] Glembotski CC. Endoplasmic Reticulum Stress in the Heart [J]. Circ Res, 2007,101:975~984
- [4] Cantarella G, Lempereur L, Presta M, et al. Nerve growth factor-En-

- dothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo [J]. FASEB J, 2002,16(10):1307-1309
- [5] 侯小玲,赵连友,薛玉生等.高温应激对大鼠心肌血管紧张素的影响及其与心肌 p22phox 表达的关系 [J]. 心脏杂志,2009,21(3):304-308
Hou Xiao-ling, Zhao Lian-you, Xue Yu-sheng, et al. Effect of heat stress on angiotensin expression in rat myocardium and its relationship to p22phox [J]. Chin Heart J, 2009,21(3):304-308
- [6] 于长青,祝之明,王利娟等.冷应激高血压大鼠血管舒缩功能的研究 [J]. 高血压杂志,2002,10(2):163-165
Yu Chang-qing, Zhu zhi-ming, Wang Lijuan, et al. Vascular Function in Cold Stress Induced Hypertensive Rats [J]. Chinese Journal of Hypertension, 2002,10(2):163-165
- [7] Schroder M. Endoplasmic reticulum stress responses [J]. Cell Mol Life Sci, 2008,65(6):862-894
- [8] Lee AS. The glucose regulated protein: stress induction and clinical applications [J]. Trends in Biochemical Sci, 2001,26:504-501
- [9] Rutkowski DT, Kaufman RJ. That which does not kill me make me stronger: adapting to chronic ER stress [J]. Trends in biochemical sciences, 2007,32(10):469-476
- [10] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress [J]. Cell Death Differ, 2004,11(4):381-389
- [11] Zinszner H, M Kuroda, X Wang, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum [J]. Genes Dev, 1998,12(12):982-995
- [12] Araki E, S Oyadomari, M Mori. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus [J]. Exp Biol Med, 2003,228(8):1213-1217
- [13] Ron D, Habener JF. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription [J]. Genes Dev, 1992,6(3):39-53
- [14] McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by downregulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state [J]. Mol Cell Biol, 2001,21(4):1249-59
- [15] 邹晓静,杨乐,姚尚龙. CHOP / GADD153 在血管紧张素诱导心肌细胞凋亡中的表达及作用 [J]. 中国病理生理杂志,2007,23(11):2132-2136
Zhou Xiaojing, Yang Le, Yao Shanglong, et al. Effect of CHOP / GADD153 on cardiomyocyte apoptosis induced by angiotensin II in vitro [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2007,23(11):2132-2136
- [16] 唐家荣,晏小妮,周昌清,等.替米沙坦对腹主动脉狭窄大鼠内质网应激相关的心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中华心血管杂志,2008,36:838-842
Tang Jiarong, Yan Xiaoni, Zhou Changqing, et al. Effects of telmisartan on endoplasmic reticulum stress induced cardiomyocyte apoptosis in abdominal aortic banded rat [J]. Chin J Cardiol, 2008,36:838-842