

# 脂联素依赖 p38-MAPK 途径抑制衣霉素诱导的内质网应激致心肌细胞凋亡

付明欢, 郭佳, 肖传实, 边云飞

(山西医科大学第二医院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 衣霉素; 内质网应激; 脂联素; 心肌细胞; 细胞凋亡; p38-MAPK

[摘要] **目的** 通过原代培养 SD 大鼠的乳鼠心肌细胞建立衣霉素心肌细胞内质网应激损伤模型, 观察脂联素对心肌细胞内质网应激致细胞凋亡的作用及其机制。**方法** 采用酶消化法原代培养乳鼠心肌细胞, 倒置相差显微镜下观察细胞生长, 通过  $\alpha$ -肌动蛋白免疫荧光法对培养的心肌细胞进行鉴定。选用原代培养 3~4 天的心肌细胞, 随机分为五组: 对照组、1 mg/L 衣霉素组、1 mg/L 衣霉素 + 100 mg/L 脂联素组、1 mg/L 衣霉素 + 3  $\mu$ mol/L SB203580 组及 1 mg/L 衣霉素 + 3  $\mu$ mol/L SB203580 + 100 mg/L 脂联素组。实验终止后, 在倒置相差显微镜下观察心肌细胞形态变化, 通过流式细胞术检测心肌细胞凋亡, 用 qRT-PCR 及免疫荧光法检测内质网应激指标 GRP78 和 CHOP 的 mRNA 及蛋白表达。**结果** 与对照组相比, 给予衣霉素后, 细胞凋亡率显著增加, GRP78 和 CHOP 的 mRNA 及蛋白表达增加。脂联素预处理后给予衣霉素, 可较大幅度地逆转上述指标变化, 细胞凋亡率显著下降, GRP78 和 CHOP 的 mRNA 及蛋白表达减少; 而加用 p38-MAPK 抑制剂 SB203580 后脂联素的保护作用明显减弱, 凋亡率显著增加, GRP78 和 CHOP 的 mRNA 及蛋白表达增高, 但较单纯衣霉素处理组凋亡率低, GRP78 和 CHOP 的 mRNA 及蛋白表达也减少。**结论** 衣霉素可使 GRP78 和 CHOP 表达增强, 启动内质网应激, 导致心肌细胞凋亡, 脂联素可以通过减轻内质网应激逆转衣霉素所致的心肌细胞凋亡作用, 对心肌细胞有保护作用, 且这种保护作用部分是通过 p38-MAPK 途径实现的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Adiponectin Inhibits the Apoptosis of Cardiomyocytes Induced by Endoplasmic Reticulum Stress After Exposed to Tunicamycin Through p38-MAPK

FU Ming-Huan, GUO Jia, XIAO Chuan-Shi, and BIAN Yun-Fei

(The Department of Cardiology, The Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Tunicamycin; Endoplasmic Reticulum Stress; Adiponectin; Cardiomyocytes; Apoptosis; p38-MAPK

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effects of adiponectin (APN) on endoplasmic reticulum stress injury of the 3~4 days SD rat cardiomyocytes, which was induced by the tunicamycin and the signaling pathway of its protection. **Methods** Primary cardiomyocytes were obtained from neonatal rat and cultured by enzymatic digestion methods. The morphology of neonatal rat cardiomyocytes was studied by inverted phase contrast microscope. Its molecular markers were observed by  $\alpha$ -actin immunocytochemistry. Primary 3~4 days cells were used in experiment, and they were randomly divided into control group, 1 mg/L tunicamycin group (1 mg/L tunicamycin, 24 h), 1 mg/L tunicamycin + 100 mg/L APN group, 1 mg/L tunicamycin + 3  $\mu$ mol/L SB203580 (the inhibitor of p38-MAPK), 1 mg/L tunicamycin + 3  $\mu$ mol/L SB203580 + 100 mg/L APN group. The change of morphology of cardiomyocytes was observed by inverted phase contrast microscope. The cardiomyocytes apoptosis was detected by Annexin V-FITC / PI flow cytometry. The expressions of GRP78 and CHOP which were molecular markers of endoplasmic reticulum were detected by qRT-PCR and immu-

[收稿日期] 2012-01-31

[基金项目] 国家自然科学基金(81170198)

[作者简介] 付明欢, E-mail 为 fuminghuan@163.com。郭佳, 博士, 主要研究方向为冠心病基础与临床。肖传实, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 ganxibaozhongxin@sina.com。通讯作者边云飞, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 ganxibaozhongxin@sina.com。

no fluorescence technic. **Results** Compared with the control group, the apoptosis of cardiomyocytes was significantly increased and the molecular makers of endoplasmic reticulum stress GRP78 and CHOP were greatly increased after exposed to tunicamycin. APN pretreatment significantly decreased the apoptosis rate, and the expression of GRP78 and CHOP. SB203580 pretreatment decreased the protection of APN, the apoptosis was higher compared with 1 mg/L tunicamycin + 100 mg/L adponectin group and the expression of GRP78 and CHOP were increased. Compared to 1 mg/L tunicamycin group, the apoptosis was lower and the expression of GRP78 and CHOP was decreased. **Conclusion** Tunicamycin enhance the expressions of GRP78 and CHOP, and make endoplasmic reticulum stress to start which induces the apoptosis of cardiomyocytes. APN which can attenuate endoplasmic reticulum stress, have a protective effect on myocardial cells. Its protection against endoplasmic reticulum stress was partly through p38-MAPK signaling pathway.

内质网是哺乳动物细胞中一种重要的亚细胞器。膜 P 分泌性蛋白、氨基多糖、胆固醇及钙信号等的代谢均与内质网功能直接相关,如分泌性蛋白的合成与空间折叠、蛋白质糖基化修饰、蛋白质分泌等均在网内发生。目前研究发现,心肌细胞内质网功能障碍可能是心肌缺血再灌注损伤的重要原因<sup>[1,2]</sup>。脂联素 (APN) 具有增加胰岛素敏感性、抗炎、抗动脉粥样硬化、维持血管稳态等作用<sup>[3]</sup>。研究表明脂联素通过抗氧化应激所致心肌细胞的凋亡作用能够有效减轻心肌缺血再灌注损伤,减少心肌细胞死亡<sup>[4]</sup>。脂联素是否通过减轻内质网应激来减轻心肌细胞缺血再灌注损伤,目前较少有文献报道。衣霉素能阻碍内质网内新生蛋白质糖基化修饰,使内质网应激指标 GRP78 和 CHOP 等表达增加,导致内质网应激。本研究采用体外培养乳鼠心肌细胞,通过建立衣霉素诱导内质网应激模型观察脂联素对心肌细胞凋亡的影响,同时观察内质网应激指标 GRP78 和 CHOP 的 mRNA 及蛋白表达水平,以探讨脂联素是否通过减轻内质网应激来减轻心肌细胞凋亡。另外通过 p38-MAPK 的特异性抑制剂 SB203580 干预,观察脂联素作用的变化,进一步分析脂联素是否通过 p38-MAPK 信号转导途径激活内质网应激来发挥作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

由山西医科大学实验动物中心提供的健康 SD 乳鼠,1~5 天龄。脂联素、DMEM 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;Ⅱ型胶原酶、胰蛋白酶、FITC-羊抗兔Ⅱ抗、4%多聚甲醛、Triton X-100 购自 Solarbio;兔抗人  $\alpha$ -肌动蛋白及 FITC 羊抗兔二抗购自北京博奥森,Annexin V/PI 双染色试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司;PBS 缓冲液、多聚赖氨酸购自博士德生物工

程有限公司。GRP78、CHOP 兔抗大鼠多克隆抗体 [Santa Cruz 公司(北京中杉金桥生物技术有限公司分装)], FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体(北京中山生物技术有限公司), Randiance 2100 型激光扫描共聚焦显微镜(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.2 乳鼠心肌细胞的培养及鉴定

经动物管理委员会同意,根据 Webster 等<sup>[5]</sup>方法将乳鼠浸入 75% 酒精中浸泡数秒,其后步骤在超净工作台中进行。颈椎脱臼处死,将乳鼠的头、四肢仰卧固定,眼科剪从小鼠腋下剪开胸廓暴露胸腔剪取心脏,迅速置入预冷的 PBS 液中,洗去残留红细胞。剪去心房,取心室肌组织放入另一平皿中,剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小碎块,加入 5 倍于组织体积的Ⅱ型胶原酶,将混悬液转移至一青霉素小瓶中,吹打消化 4 min 后静置,弃上清,再次加入适量Ⅱ型胶原酶,多次吹打,自然沉降,取上清。重复上述步骤 4~5 次,直至组织块完全消化。将每次所得上清移入离心管中,加等体积的含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液终止胶原酶作用,800 r/min 离心 10 min,弃上清。用 DMEM 培养基将细胞沉淀集中混匀制成细胞悬液(DMEM 培养基含 15% 胎牛血清、 $10^5$  u/L 青霉素和  $10^5$  u/L 链霉素,调整 pH 为 7.2)。差速贴壁法分离纯化心肌细胞:将细胞悬液接种于培养瓶中,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养 2 h,非心肌细胞贴壁速度较快,贴于瓶底,而心肌细胞仍处于悬浮状态。吸出细胞悬液,在其中加入 5-Brdu 至 0.1 mmol/L 以抑制非心肌细胞增殖。将细胞悬液以约  $1 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup> 的密度,接种于 6 孔板,在 37℃、95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。48 h 后更换培养基。每 2~3 天换液 1 次,使用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 3~4 天,待贴壁心肌细胞伸出伪足,连接成片,搏动好且趋于同步化后,给予干预。采用免疫荧光法,兔抗大鼠肌动蛋白一抗及 FITC 羊抗兔二抗检测胞浆  $\alpha$ -肌动蛋白对心肌细胞进行鉴定。

### 1.3 实验分组

选用原代培养至 3~4 天的 6 孔培养板中贴壁的心肌细胞总共五板,随机分为五组,每板为一组。对照组为不加干预措施的心肌细胞正常培养;1 mg/L 衣霉素组为培养液中加入终浓度为 1 mg/L 衣霉素培养 24 h;1 mg/L 衣霉素 + 100 mg/L 脂联素组为培养液中加入终浓度为 100 mg/L 脂联素与心肌细胞共同孵育 24 h,再加入终浓度 1 mg/L 衣霉素培养 24 h;1 mg/L 衣霉素 + 3  $\mu$ mol/L SB203580 组为培养液中加入终浓度为 3  $\mu$ mol/L SB203580 与心肌细胞共同孵育 30 min,再加入终浓度 1 mg/L 衣霉素培养 24 h;1 mg/L 衣霉素 + 3  $\mu$ mol/L SB203580 + 100 mg/L 脂联素组为培养液中加入终浓度为 3  $\mu$ mol/L SB203580 与心肌细胞共同孵育 30 min,然后加入终浓度为 100 mg/L 脂联素与心肌细胞共同孵育 24 h,再加入终浓度 1 mg/L 衣霉素培养 24 h。

### 1.4 流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率

采用 Annexin V-FITC /PI 双标记染色法检测心肌细胞凋亡率。原代培养乳鼠心肌细胞,使 6 孔板中待测细胞的浓度为  $0.6 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$  cells/L。用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞,800 r/min 离心 5 min,弃上清。用预冷的 PBS 冲洗细胞,轻轻震荡使细胞悬浮,800 r/min 离心 5 min,弃上清。重复上述步骤 2 次。用 PBS 重悬细胞,800 r/min 离心 5 min,弃上清,将细胞重悬于 500  $\mu$ L Binding Buffer 中,加入 10  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ L PI,轻轻混匀,避光室温反应 15 min。在 1 h 内采用流式细胞仪检测。

### 1.5 逆转录实时荧光定量聚合酶链反应检测 GRP78 和 CHOP 的 mRNA 表达

应用生工生物工程有限公司出产的 UNIQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA,分别取 2  $\mu$ L RNA 进行定量,取相等量的各组 RNA,用 RNase-free 水将总体积调至 10  $\mu$ L,之后加入其它反应试剂,在总体积为 20  $\mu$ L 的反应体系中逆转录合成 cDNA,取 2  $\mu$ L cDNA 于 20  $\mu$ L 反应体系中进行 PCR 扩增。GRP78 引物上游为 5'-CTG GGT ACA TTT GAT CTG ACT GG-3',下游为 5'-GCA TCC TGG TGG CTT TCC AGC CAT TC-3',总长度为 345 bp;CHOP 引物上游为 5'-AGC AGA GGT CAC AAG CAC CT-3',下游为 5'-CTG CTC CTT CTC CTT CAT GC-3',总长度为 166 bp; $\beta$ -actin 引物上游为 5'-CTA CAA TGA GCT GCG TGT GGC-3',下游为 5'-CAG GTC CAG ACG CAG GAT GGC-3',总长度为 270 bp。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,

60 $^{\circ}$ C 退火 31 s,进行 40 个循环。计算出其相对浓度,各组间进行比较。

### 1.6 免疫荧光法测定 GRP78 和 CHOP 的蛋白表达

原代培养乳鼠心肌细胞,先以差速贴壁法去除非心肌细胞,再以台盼兰染色计数活细胞,用 20% 牛血清培养基调整心肌细胞至  $5 \times 10^8$  cells/L,接种于 12 孔板(每孔内置有多聚耐氨酸处理过的盖玻片以便细胞爬片),每孔 1.5 mL。各组分别处理后 24 h,PBS 冲洗 3 次,将盖玻片取出,用 4% 多聚甲醛固定 30 min;PBS 冲洗 3 次后,用含 0.1% TritonX-100 的 4% 甲醇孵育 20 min;之后用 10% 正常山羊血清室温封闭 30 min;分别加入第一抗体,即 GRP78、CHOP 兔抗鼠多克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 清洗 3 次,再加入 1:50 FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体,室温作用 1 h,PBS 冲洗 3 次后,90% 甘油封片。将待测样品置于激光扫描共聚焦显微细胞仪下,分别选用 10 倍和 100 倍物镜(目镜为 10 倍),HQ590-70 发射滤片确定 HeNe 激光器激发光波长为 543 nm,使用 LaserSharp 2000 程序(Bio-Rad CA USA),预扫描后选定最佳细胞扫描参数,固定参数下扫描细胞照片并保存,采用软件 Laser sharp 2000 进行数据测量。

### 1.7 统计学方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 乳鼠心肌细胞的鉴定

倒置相差显微镜下可见原代培养的乳鼠心肌细胞成簇生长,有伪足,折光性强,且搏动明显。细胞形态呈多样化,如圆形、梭形及锥形等;荧光倒置显微镜下可见细胞呈扁平多角形,心肌细胞胞浆  $\alpha$ -肌动蛋白阳性表达(绿色荧光),而非心肌细胞胞浆无阳性表达(图 1)。

### 2.2 心肌细胞凋亡率

对照组细胞集中在 B3 区,在 B4 区和 B2 区内无分布或分布甚少,细胞凋亡率极低;1 mg/L 衣霉素组出现大量细胞凋亡,且主要为早期凋亡,细胞凋亡率与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。加用脂联素后,细胞凋亡率明显减少。而加用 SB203580 后,细胞凋亡率与 1 mg/L 衣霉素组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。1 mg/L 衣霉素 + 3  $\mu$ mol/L SB203580 + 100 mg/L 脂联素组细胞凋亡率介于 1 mg/L 衣霉素组和 1 mg/L 衣霉素 + 100 mg/L 脂联素组之间(表 1 和图 2)。

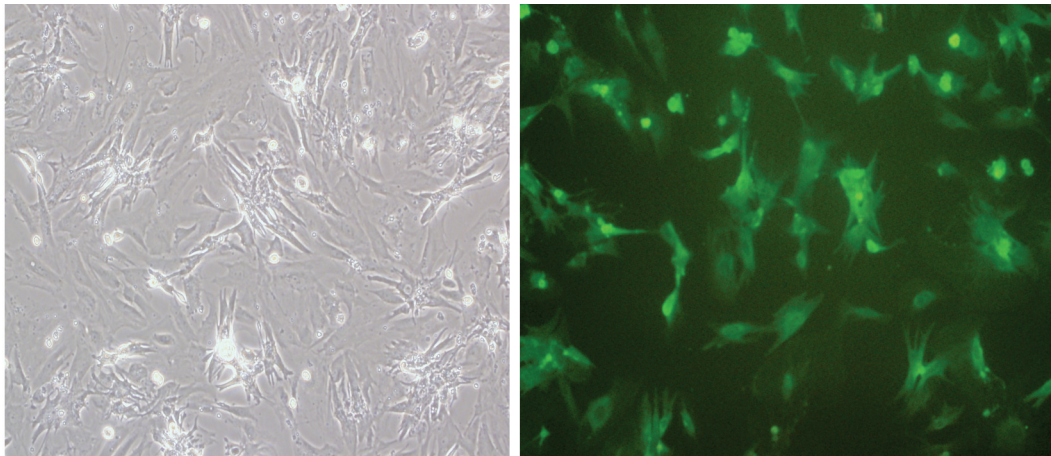


图 1. 倒置相差显微镜下观察乳鼠心肌细胞生长(左, ×200)及 α-肌动蛋白免疫荧光染色对心肌细胞的鉴定(右, ×200)

Figure 1. Detect the morphology of neonatal rat cardiomyocytes by inverted phase contrast microscope( left, ×200) and observe its molecular markers by α-actin immunocytochemistry( right, ×200)

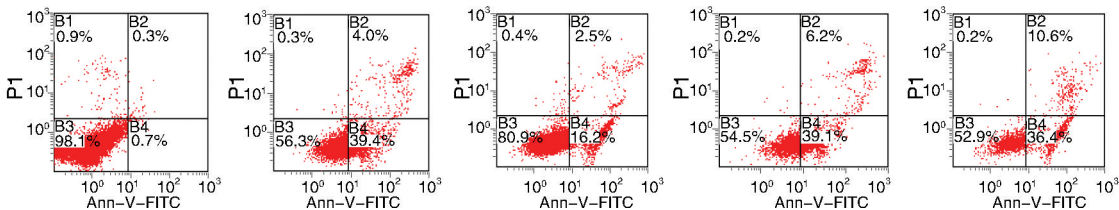


图 2. 流式细胞术检测心肌细胞凋亡率 从左到右依次为对照组、1 mg/L 衣霉素组、1 mg/L 衣霉素 + 100 mg/L 脂联素组、1 mg/L 衣霉素 + 3 μmol/L SB203580 组、1 mg/L 衣霉素 + 3 μmol/L SB203580 + 100 mg/L 脂联素组。

Figure 2. The cardiomyocytes apoptosis detected by Annexin V-FITC/PI flow cytometry

表 1. 心肌细胞凋亡率( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

分 组	细胞凋亡率
对照组	1.1% ± 0.8%
1 mg/L 衣霉素组	43.5% ± 5.3% <sup>a</sup>
1 mg/L 衣霉素 + 100 mg/L 脂联素组	18.2% ± 2.3% <sup>ab</sup>
1 mg/L 衣霉素 + 3 μmol/L SB203580 组	43.9% ± 5.0% <sup>ab</sup>
1 mg/L 衣霉素 + 3 μmol/L SB203580 + 100 mg/L 脂联素组	38.7% ± 6.3% <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , 与 1 mg/L 衣霉素组相比。

2.3 GRP78 和 CHOP 的 mRNA 表达

与对照组相比, 1 mg/L 衣霉素组 GRP78 和 CHOP 的 mRNA 表达明显增加( $P < 0.05$ ), 加用脂联素后, 其表达量明显减少。而加用 SB203580 后, GRP78 和 CHOP 的 mRNA 表达量与 1 mg/L 衣霉素组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。1 mg/L 衣霉素 + 3 μmol/L SB203580 + 100 mg/L 脂联素组 GRP78 和 CHOP 的 mRNA 表达量介于 1 mg/L 衣霉素组和 1 mg/L 衣霉素 + 100 mg/L 脂联素组之间(表 2 和图 3)。

2.4 心肌细胞 GRP78 和 CHOP 的蛋白表达

各组核染色亮度存在明显差异, 而胞浆染色与对照组相比, 1 mg/L 衣霉素组 GRP78 和 CHOP 染色亮度明显增高, 蛋白表达明显增加; 加用脂联素后, 其表达量明显减少。而加用 SB203580 后, GRP78 的蛋白表达量与 1 mg/L 衣霉素组无明显差异。1 mg/L 衣霉素 + 3 μmol/L SB203580 + 100 mg/L 脂联素组其表达量介于 1 mg/L 衣霉素组和 1 mg/L 衣霉素 + 100 mg/L 脂联素组之间(图 3 和 4)。

表 2. 各组心肌细胞 GRP78 和 CHOP 的 mRNA 表达

Table 2. The mRNA expression of GRP78 and CHOP of each group

分 组	GRP78 mRNA	CHOP mRNA
对照组	1	1
1 mg/L 衣霉素组	2.10 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.42 ± 0.05 <sup>a</sup>
1 mg/L 衣霉素 + 100 mg/L 脂联素组	1.23 ± 0.05 <sup>ab</sup>	1.76 ± 0.08 <sup>ab</sup>
1 mg/L 衣霉素 + 3 μmol/L SB203580 组	2.08 ± 0.07 <sup>ab</sup>	2.41 ± 0.03 <sup>ab</sup>
1mg/L 衣霉素 + 3 μmol/L SB203580 + 100 mg/L 脂联素组	1.78 ± 0.10 <sup>ab</sup>	2.11 ± 0.05 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , 与 1 mg/L 衣霉素组相比。

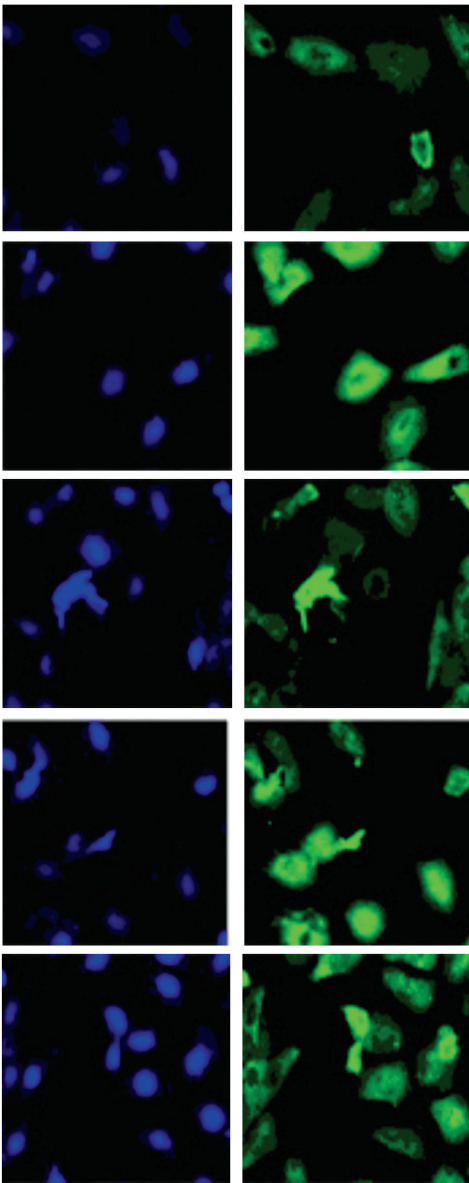


图 3. 免疫荧光法检测 GRP78 的蛋白表达 左图为核染色, 右图为胞浆染色。从上至下分别为对照组、1 mg/L 衣霉素组、1 mg/L 衣霉素 + 100 mg/L 脂联素组、1 mg/L 衣霉素 + 3 μmol/L SB203580 组、1 mg/L 衣霉素 + 3 μmol/L SB203580 + 100 mg/L 脂联素组。

Figure 3. The protein expressions of GRP78 detected by immunofluorescence technic

3 讨 论

内质网在多肽的合成以及翻译后修饰折叠成细胞内或分泌性功能蛋白过程中起着至关重要的作用,当由于某种原因导致细胞内质网稳态失衡,产生过量错误折叠蛋白时即会发生内质网应激<sup>[6]</sup>。研究表明内质网应激反应是细胞的一种自我保护性机制,以恢复内质网稳态,但是过强的或长时间的內质网应激反应可以引起细胞凋亡。越来越多的

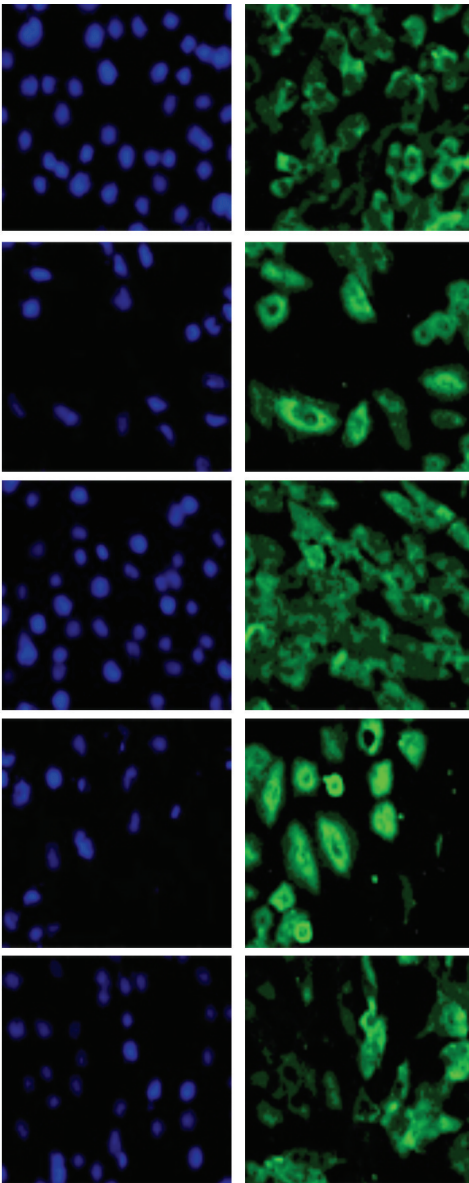


图 4. 免疫荧光法检测 CHOP 的蛋白表达 左图为核染色, 右图为胞浆染色。从上至下分别为对照组、1 mg/L 衣霉素组、1 mg/L 衣霉素 + 100 mg/L 脂联素组、1 mg/L 衣霉素 + 3 μmol/L SB203580 组、1 mg/L 衣霉素 + 3 μmol/L SB203580 + 100 mg/L 脂联素组。

Figure 4. The protein expressions of CHOP detected by immunofluorescence technic

的研究证实,内质网应激在许多遗传性或代谢性疾病的发生中起重要作用,如神经变性性疾病、进行性精神异常、糖尿病、感染和炎症性疾病和癌症等<sup>[7,8]</sup>。葡萄糖调节蛋白 78/免疫球蛋白结合蛋白 (GRP78/BIP)对维持内质稳态起着重要的作用,是内质网应激的标志之一<sup>[9]</sup>。因此本研究中 GRP78 表达上调表明衣霉素诱导了心肌细胞的内质网应激,且其 mRNA 和蛋白的表达量可表明内质网应激的程度。内质网应激所致的细胞凋亡与 CHOP 也密

切相关,故其也可作为内质网应激的标志<sup>[10]</sup>。脂联素是 20 世纪 90 年代中期由美国和日本 4 个独立的实验小组从不同的角度相继在动物及人类脂肪细胞中发现的一种主要由脂肪细胞分泌的蛋白质。1999 年 Arita 等将其命名为脂联素。脂联素可以调节体内能量平衡、糖脂代谢、抗炎症、抗动脉粥样硬化和抗纤维化等,是一种具有广泛生物效应的细胞因子。大量研究发现,脂联素可减轻心肌缺血再灌注损伤<sup>[11,12]</sup>。Motoshima 等<sup>[13]</sup>发现,心肌缺血再灌注后,脂联素基因敲除小鼠与野生型小鼠相比,心肌细胞凋亡率明显增高,心肌梗死面积显著增大。而腺病毒介导的脂联素补给可逆转上述改变。但是脂联素是否通过减轻内质网应激反应来减轻心肌细胞凋亡,目前文献报道较少。衣霉素能阻碍内质网内新生蛋白质糖基化修饰,诱导内质网应激。本研究中发现,衣霉素处理 24 h 后,内质网应激标志物 GRP78 和 CHOP 的 mRNA、蛋白表达都显著增加,表明衣霉素诱导心肌细胞产生了内质网应激,且细胞凋亡率与对照组相比明显增高,说明衣霉素诱导的内质网应激导致了心肌细胞凋亡。加入脂联素预处理后,其凋亡和内质网应激标志物的表达都明显减少,说明脂联素对心肌细胞凋亡有保护作用,且这种保护作用是通过减轻内质网应激实现的。1 mg/L 衣霉素 + 3 μmol/L SB203580 + 100 mg/L 脂联素组凋亡率及内质网应激标志物的表达介于 1 mg/L 衣霉素组和 1 mg/L 衣霉素 + 100 mg/L 脂联素组之间,即 SB203580 消除了部分脂联素的保护作用,说明脂联素对衣霉素诱导的内质网应激致心肌细胞凋亡的保护作用,部分是通过 p38-MAPK 途径实现的。

[参考文献]

[1] Mouw G. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat [J]. *Neuroreport*, 2003, 14: 183-186.

[2] Zhang GG, Teng X, Liu Y, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress by ghrelin protects against ischemia/reperfusion injury in rat heart[J]. *Peptides*, 2009, 30 (6): 1

109-116.

[3] Pandzić J, Jakšić V. Adipocytokines as mediators of metabolic role of adipose tissue[J]. *Acta Med Croatica*, 2010, 64 (4): 253-262.

[4] Ohashi K, Kihara S, Ouchi N, et al. Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension [J]. *Hypertension*, 2006, 47: 1 108-116.

[5] Webster KA, Discker DJ, Bishopric NH. Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268 (22): 16 852-858.

[6] McGuckin MA, Eri RD, Das I, et al. ER stress and the unfolded protein response in intestinal inflammation [J]. *Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 298: G820-G832.

[7] Deng L, Adachi T, Kitayama K, et al. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase3-dependent pathway [J]. *Virology*, 2008, 82: 10 375-385.

[8] Hosoi T, Ozawa K. Endoplasmic reticulum stress in disease: mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010, 118: 19-29.

[9] Chen JC, Wu ML, Huang KC, et al. HMG-CoA reductase inhibitors activate the unfolded protein response and induce cytoprotective GRP78 expression [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 80: 138-150.

[10] Guan D, Xu Y, Yang M, et al. N-acetyl cysteine and penicillamine induce apoptosis via the ER stress response-signaling pathway [J]. *Mol Carcinog*, 2010, 49 (1): 68-74.

[11] Tao L, Gao E, Jiao X, et al. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrosative stress [J]. *Circulation*, 2007, 115: 1 408-416.

[12] 李震霄, 邹洪梅. 应激促进动脉粥样硬化机制研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (8): 702-705.

[13] Motoshima H, Wu X, Mahadev K, et al. Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances NOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315: 264-271.

(此文编辑 文玉珊)