

· 综 述 ·

内质网应激在心肌缺血再灌注损伤中的作用

李青檀, 王冬梅

(白求恩国际和平医院心内科, 石家庄 050082)

【摘要】内质网应激(ERS)是细胞对内外环境变化的一种适应性反应,有助于细胞和生命个体的存活,但持续存在或过强时则最终诱发细胞凋亡。缺血/再灌注(I/R)时,钙超载及大量自由基的生成等因素诱导过度ERS导致组织损伤。缺血预处理及稳定Ca²⁺稳态可激发适当的ERS,增强细胞耐受长时间缺血刺激的能力,延缓或减轻I/R造成的组织损伤。现综述ERS在缺血再灌注损伤(IRI)中的作用,并指出ERS已成为IRI防治的新靶点。

【关键词】内质网应激; 心肌再灌注损伤

【中图分类号】 R542.2

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2012.00123

Roles of endoplasmic reticulum stress in myocardial ischemia reperfusion injury

LI Qingtan, WANG Dongmei

(Department of Cardiology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China)

【Abstract】 The endoplasmic reticulum stress (ERS) is a kind of adaptive response of cells to the alteration of internal and external environments, which contributes to the cells survival. However, it can eventually trigger cell apoptosis once ER dysfunction is severe or prolonged. ERS is intensively induced during ischemia/reperfusion by Ca²⁺ disturbance, oxidative stress, and so on. Ischemic preconditioning and Ca²⁺ homeostasis steadying can induce proper ERS, which enhances cell tolerance to prolonged ischemia stimulation, and leads to mitigation of I/R injury. This article reviewed the roles of the ERS in IRI, and proposed that ERS has become a possible target for IRI prevention and cure.

【Key words】 endoplasmic reticulum stress; reperfusion injury, myocardial

缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)是一种由于供血障碍引起的应激性疾病,血供中断后的一段时间恢复,可引起缺血组织发生较恢复前更严重的损伤。现已证实,心、脑、肺、肝、肾、胃肠道、肢体及皮肤等组织器官均存在IRI。而以心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)最为多见。内质网(endoplasmic reticulum, ER)在维持细胞内钙稳态,调节蛋白质的合成和折叠方面发挥重要作用。当细胞受到某些打击(如缺血缺氧、药物毒性等)后,ER内氧化环境被破坏,钙代谢失调,导致ER功能发生紊乱,突变蛋白质产生或蛋白质二硫键不能形成,引起未折叠蛋白或错误折叠蛋白在内质网腔内积聚以及钙稳态失衡的状态,即内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)。因此, MIRI不可避免地会产生ERS。而ERS与细胞凋亡密不可

分。研究表明, ER是细胞凋亡调节中的重要环节。ERS可以介导与线粒体相关的内源性途径和死亡受体介导的外源性途径不同的一条新的凋亡通路。ER对影响细胞内能量水平、氧化状态或钙离子浓度异常的应激极度敏感。当细胞遭到毒性药物、感染、缺血缺氧等打击时,内质网腔未折叠蛋白增多和细胞内钙离子超载,过强和持续的ERS可以通过内质网相关凋亡途径引起细胞凋亡^[1],在病毒感染、炎症、神经退行性病变、脑缺血、代谢综合征、肿瘤和药源性脏器损伤等发病过程中都存在ERS机制。探讨ERS在缺血性心肌病中的作用机制极具意义,并能指导临床用药,探寻治疗的新靶点。

1 ERS介导的细胞凋亡

ER是哺乳动物细胞中一种重要的细胞器,是细胞的钙储存库,是分泌性蛋白和膜蛋白的合成、

折叠、运输以及修饰的场所,还参与固醇激素的合成及糖类和脂类代谢。ER对影响细胞内能量水平、氧化状态或钙离子浓度异常的应激极度敏感。

1.1 ERS介导的保护途径

细胞或组织发生应激后,ER通过激活未折叠蛋白反应^[2](unfolded protein response, UPR)以保护由ERS所引起的细胞损伤,从而恢复细胞功能。UPR是由一个内质网分子伴侣包括热休克蛋白家族的糖调节蛋白(binding immunoglobulin protein/glucose regulated protein78, BIP/GRP78)和3个ER应激感受蛋白所介导的,分别是UPR激活蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)、肌醇需求酶1(inositol-requiring enzyme1, IRE-1)活化转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)。IRE1、PERK、ATF6是内质网膜的3种起信号转导作用的跨膜蛋白,它们均对腔内未折叠蛋白(unfolded protein, UP)的聚集起作用。IRE1和PERK是内质网膜上的跨膜蛋白激酶,没有应激情况下,它们和BIP/GRP78形成稳定的复合物,而当蛋白错误折叠或UP增多时则促使BIP/GRP78与其解离,IRE1和PERK的寡聚化及其自身磷酸化,从而刺激下游信号的激活。ATF6是真核细胞的内质网膜上含有bZip转录因子结构域的型跨膜蛋白。当UP在ER聚集增多时,ATF6向高尔基体转位,被S1蛋白酶和S2蛋白酶切成p50 bZip转录因子到细胞核,并激活如热休克蛋白家族的糖调节蛋白(glucose-regulated protein78/94, GRP78/94)蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI) X盒结合蛋白1(X-box binding protein1, XBP1) bZip类的一种真核细胞转录调控因子CCAAT/增强子结合蛋白的同源蛋白/生长停滞及DNA损伤基因153(C/EBP homologous protein/growth arrest and DNA damage inducible gene 153, CHOP/GADD153)^[3]转录增加,导致UPR的活化。因此,UPR是一种机体对抗ERS的保护机制,通过引发ER内未折叠或错误折叠蛋白的正确折叠,以及调节细胞内钙浓度,来维持ER稳态,促使细胞功能恢复。但如果ERS严重或应激持续不缓解,则将诱导细胞凋亡^[4]。

1.2 ERS介导的凋亡途径

PERK、IRE1以及ATF6信号不仅能够启动ERS的生存途径,严重或长时间的ERS损伤了ER的功能时,这3个信号途径同样能够启动由ERS所介导的细胞凋亡途径,诱导细胞凋亡,然而它们并

不是直接地引起细胞凋亡,而是通过激活下游的凋亡信号分子,如CHOP/GADD153、C-Jun氨基末端激酶(C-Jun N-terminal kinase, JNK)含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase-12)以及凋亡调控基因家族(Bcl-2)等^[5]。

2 ERS介导的细胞凋亡参与了MIRI

缺血心肌恢复再灌注后,出现心肌舒缩功能降低、心律失常、心肌超微结构变化、能量代谢障碍等进一步损害称为MIRI。大量体内体外动物实验研究已发现心肌细胞凋亡与MIRI等心血管疾病有密切关系。Fliss等^[6]采用原位末端标记和琼脂糖凝胶电泳技术确定在缺血和缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)大鼠心肌细胞中有典型的凋亡形态改变和DNA梯形格局,认为缺血和I/R心肌均可发生细胞凋亡,且再灌注可加速不可逆转的细胞凋亡;这主要与再灌注后,细胞内ATP水平迅速恢复、胞浆和线粒体内钙超载以及自由基大量生成等因素加速了细胞凋亡的发生有关。Okada等^[7]用药物诱导的ERS导致CHOP的表达升高,Caspase-12裂解,并通过Tunel的方法观察到了凋亡细胞,从而证实ERS和凋亡在培养的心肌细胞中有相关性。Martindale等^[8]通过实验发现,当新生小鼠心肌细胞在体外经I/R处理后,ERS诱导的UPR的标志物GRP78和GRP94的水平升高,提示IRI介导了ERS。基因芯片研究显示,小鼠心肌梗死的24h内,大量ERS反应基因如GRP78, XBP1, ATF4, 赖-天冬-谷-亮氨酸的四肽序列内质网蛋白受体3被诱导^[9]; Qi等^[10]报道,离体大鼠心脏缺血35min,再灌注60min时GRP78、XBP1及p-JNK表达升高。细胞学实验表明,模拟缺血条件下(血清、葡萄糖及氧气剥夺)能激活体外培养心肌细胞的ERS反应,早期表现为促生存的GRP78、XBP1表达增加及eIF2磷酸化,晚期表现为促凋亡的CHOP和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-12(caspase-12)前体表达增加^[11]。上述研究充分证明,在缺血或I/R过程中,ERS不仅是激活的,而且在MIRI和细胞凋亡中发挥重要作用。

2.1 内质网应激分子可以作为缺血或I/R心肌损伤的标志物

ERS的早期主要是ER伴侣分子GRP78、GRP94、钙网蛋白(calreticulin, CRT)表达上调和PERK-eIF2 α 磷酸化介导的蛋白合成暂停^[12]。因此,心肌缺血早期和代偿阶段主要出现GRP78、CRT表达和PERK、eIF2 α 磷酸化的上调,表明细胞通过ERS调节自稳态失衡。而当细胞损伤严重,出现凋

亡和心力衰竭时, ERS 相关凋亡信号途径活化, 表现为 CHOP 表达上调、JNK 和 caspase-12 及其级联反应的活化^[13]。培养的乳鼠心肌细胞缺氧/复氧上调内质网应激分子 CRT、GRP78 和 CHOP 的表达并促进 caspase-12 的剪切活化^[7]。在小鼠心脏特异性表达单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 所致缺血性心肌病中, GRP78 和 PDI 表达增加^[14]。在大鼠心肌梗死模型上进一步发现, I/R 诱导 ER 分子 CRT 表达明显增多, 并出现 ERS, 与心肌损伤呈正相关^[15]。我们发现, 在急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 患者破裂斑块组织^[16]中 ER 的标志分子 C 末端赖-天冬-谷-亮氨酸的四肽序列内质网蛋白受体 3 和 CHOP 的免疫组化染色呈强阳性, 提示 ACS 患者的高风险与 ERS 有关。

2.2 ERS 有望成为 MIRI 防治的新靶点

作为应激时细胞的最初反应和细胞内其他亚细胞器反应的共同通路, 适度的 ERS 是一种进化上高度保守的细胞保护机制, 有助于细胞自稳态的调节。调控 ERS 将从整合调控细胞应激的角度为 I/R 后心肌重塑的防治提供新思路^[17]。具有多种心血管保护作用的活性肽通过抑制 ERS 反应减轻 I/R 性心肌损伤^[18]。离体与在体实验结果显示, 抑制 CHOP 表达可以减轻缺血和再灌注引起的细胞凋亡, 延缓肥大心肌转向衰竭^[19]。一磷酸腺苷激活的蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) 的活化与 eIF2 磷酸化有关, 药物激活 AMPK 可降低心肌细胞 ERS 反应, 减轻细胞缺氧损伤^[20]。Der13 基因编码内质网内错误折叠蛋白的降解 (ER-associated degradation, ERAD) 机制中的重要成分, 过表达 Der13 能增强 ERAD, 保护心肌细胞免于模拟缺血诱导的细胞死亡^[21]。抑制脯氨酰羟化酶能显著降低缺血后心脏 CHOP 的表达, 诱导再灌注心脏 ATF4、GRP78 和 α 甘露糖苷酶样 ER 降解增强蛋白表达, 减轻缺血后心肌损伤^[22]。在小鼠的心脏中过表达活化的 ATF6, 能够降低心脏 IRI, 增强心室泵功能^[8]。缺血预处理和后处理这两种内源性心脏保护现象均可以减轻长期缺血和 (或) 再灌注引起的严重 ERS, 并减轻细胞损伤^[15]。

3 钙稳态失衡与 ERS

研究表明, I/R 时心肌肌质网膜上钙泵 [sarco (endo) plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA] 及

Ca^{2+} 释放通道蛋白基因转录及翻译水平明显下调^[23], 心肌钙调蛋白依赖性激酶、蛋白激酶 A 对 SERCA, 受磷蛋白的磷酸化作用明显降低^[24], 影响 ER 膜上 SERCA 及 Ca^{2+} 通道的功能状态, 最终造成细胞内钙超载。ERS 发生后, 通过上调内质网钙结合蛋白如 CRT, 进而调节 SERCA 和细胞浆内钙调神经磷酸酶活性、肌质网三磷酸肌醇通道的 Ca^{2+} 释放和细胞膜 L 型 Ca^{2+} 通道 Ca^{2+} 内流等作用, 调节细胞 Ca^{2+} 稳态。Zhang 等利用培养的心肌细胞系 H9c2 以衣霉素预处理诱导 ERS, 发现 H9c2、GRP78 mRNA 水平和蛋白水平均升高, 在长时间的 ATP 耗竭和氧化应激诱导 I/R 损伤下, 衣霉素预处理组心肌细胞较对照组乳酸脱氢酶释放水平明显降低, 更进一步研究发现, 当用咖啡因和内质网钙泵抑制剂处理心肌细胞时, 预处理组向胞浆释放的 Ca^{2+} 水平明显高于对照组, 表明内质网有更高的 Ca^{2+} 储存。氧化应激前后预处理组细胞质的 Ca^{2+} 水平维持较对照组稳定。以上结果显示, 预先诱发 ERS 可通过改善再灌注损伤时钙超载保护心肌细胞免受致命的损伤^[25]。

钙激活中性蛋白酶 (calpain) 是一族钙离子依赖性的、水解半胱氨酸的蛋白酶。有研究显示内质网钙失衡诱导 ERS 发生时, 激活 calpain, 降解细胞骨架、膜蛋白以及各种激酶以及转录因子, 最终诱导细胞死亡。在许多疾病中都发现了 calpain 活性的异常, 如神经损害性疾病、缺血与外伤性脑损伤、癌症、肌营养不良、白内障、脑卒中及糖尿病。它还与脑、心脏及肾的缺血性损伤的细胞凋亡机制有关。因此可通过钙蛋白酶抑制剂抑制细胞凋亡。已有研究发现, calpain 抑制剂可以明显抑制大鼠 I/R 诱导的心肌细胞凋亡; 降低癌症的病变程度, 改善和提高正常组织的功能; 预防心脏、脑、肝及肾细胞的缺血性细胞凋亡。但迄今为止, 对于 calpain 及抑制剂在心肌 I/R 的研究极少。

ER 钙稳态失衡是 ERS 的一个早期事件, 若能及早稳定 ER 钙水平, 就可能抑制和消除 UPR。calpain 可能是这些疾病的一个理想的治疗靶点, 因此, 对于 calpain 及其抑制剂的深入研究对疾病的治疗具有重要意义。

4 结 语

I/R 本身是个多因素协同作用过程, ERS 在其中所起的作用已有了较为广泛的研究, 它与 IRI 诱导的细胞凋亡之间的联系也已经在很多实验中得到证

实。但是对于 ER 介导的 MIRI 细胞凋亡途径还需要大量的研究来阐明其具体的机制。如何通过阻断 ER 凋亡通路中不同的信号调控因子和凋亡执行因子来减少细胞功能丧失,很可能成为将来治疗相关疾病的新途径。对于 MIRI 所发生的细胞凋亡的研究还有大量工作去做,必须从分子机制上进行深入研究,这或许会开辟解决心血管疾病治疗的新思路。

【参考文献】

- [1] 祝筱梅, 刘秀华. 内质网应激与缺血再灌注损伤及其防护[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(2): 177-180.
- [2] Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease[J]. J Clin Invest, 2002, 110(10): 1389-1398.
- [3] Wang Y, Shen J, A renzana N, *et al.* Activation of ATF6 and ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response[J]. J Biol Chem, 2000, 275(35): 27013-27020.
- [4] Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(3): 363-373.
- [5] Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, *et al.* Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. EMBO Rep, 2006, 7(9): 880-885.
- [6] Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium[J]. Circ Res, 1996, 79(5): 949-956.
- [7] 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.
- [8] Martindale JJ, Fernandez R, Thuerauf D, *et al.* Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6[J]. Circ Res, 2006, 98(9): 1186-1193.
- [9] Harpster MH, Bandyopadhyay S, Thomas DP, *et al.* Earliest changes in the left ventricular transcriptome postmyocardial infarction[J]. Mamm Genome, 2006, 17(7): 701-715.
- [10] Qi X, Vallentin A, Churchill E, *et al.* deltaPKC participates in the endoplasmic reticulum stress-induced response in cultured cardiac myocytes and ischemic heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 43(4): 420-428.
- [11] Szegezdi E, Duffy A, Omahoney ME, *et al.* ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 349(4): 1406-1411.
- [12] 滕旭, 齐永芬, 唐朝枢. 内质网应激与心脏疾病[J]. 生理科学进展, 2009, 40(2): 106-109.
- [13] 刘秀华, 唐朝枢. 重视心血管疾病中的内质网应激机制——从细胞应激的基本反应到临床防治的思考[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(32): 2233-2234.
- [14] Niu J, Azfer A, Rogers LM, *et al.* Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy[J]. Cardiovasc Res, 2007, 73(3): 549-559.
- [15] 刘秀华. 缺血后处理内源性心脏保护的研究进展[J]. 生理学报, 2007, 59(5): 628-634.
- [16] Liu X, Xu F, Fu Y, *et al.* Calreticulin induces delayed cardioprotection through mitogen-activated protein kinases[J]. Proteomics, 2006, 6(13): 3792-3800.
- [17] Harding HP, Novoa I, Zhang Y, *et al.* Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells[J]. Mol Cell, 2000, 6(5): 1099-1108.
- [18] 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): 1109-1116.
- [19] 刘秀华. 内质网应激与心肌肥大[J]. 生理学报, 2009, 61(1): 9-14.
- [20] Terai K, Hiramoto Y, Masaki M, *et al.* AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress gene[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(21): 9554-9575.
- [21] Belmont PJ, Chen WJ, San Pedro MN, *et al.* Roles for endoplasmic reticulum-associated degradation and the novel endoplasmic reticulum stress response gene Derlin-3 in the ischemic heart[J]. Circ Res, 2010, 106(2): 307-316.
- [22] Natarajan R, Sslloum FN, Fisher BJ, *et al.* Prolyl hydroxylase inhibition attenuates post-ischemic cardiac injury via induction of endoplasmic reticulum stress genes[J]. Vascul Pharmacol, 2009, 51(2-3): 110-118.
- [23] Temsah RM, Kawabata K, Chapman D, *et al.* Preconditioning prevents alterations in cardiac SR gene expression due to ischemia-reperfusion[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282(4): H1461-H1466.
- [24] Neticadan T, Temsah R, Osada M, *et al.* Status of Ca²⁺/calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion[J]. Am J Physiol, 1999, 277(3 Pt 1): C384-C391.
- [25] Zhang PL, Lun M, Teng J, *et al.* Preinduced molecular chaperones in the endoplasmic reticulum protect cardiomyocytes from lethal injury[J]. Ann Clin Lab Sci, 2004, 34(4): 449-457.

(编辑: 周宇红)