参元丹对缺血再灌注心肌细胞内质网应激相关因子 GRP78、CHOP 表达的影响

佟　彤[1]　刘红旭[1]　尚菊菊[1]　杨志海[2]　邢文龙[1]　李　享[1]
（1 首都医科大学附属北京中医医院，北京，100010；2 首都医科大学，北京，100069）

摘要　目的：观察参元丹对缺血再灌注心肌细胞内质网应激相关因子 Grp78、CHOP 表达的影响。方法：离体培养新出生 1～3 d 大鼠心肌细胞，并分为正常组、模型组、参元丹组及空白血清组。应用三气培养箱制造缺血（2 h）/再灌注（4 h）模型。采用 RT-PCR 法测定内质网应激相关因子 GRP-78、CHOP 因子的表达。结果：模型组细胞内 Grp78、CHOP 表达均明显上升（$P<0.01$）。与模型组比较 10% 参元丹组中，Grp78（$P<0.01$）及 CHOP（$P<0.05$）均有明显下降，10% 空白血清组 Grp78、CHOP 较模型组无明显变化。结论：参元丹可以通过减轻内质网应激减少心肌细胞的凋亡，保护心肌细胞。

关键词　参元丹；内质网应激；缺血再灌注损伤

Effects of Shen Yuan Dan on Grp78 and CHOP Expression in Ischemia-reperfusion Myocardium Cell

Tong Tong[1], Liu Hongxu[1], Shang Juju[1], Yang Zhihai[2], Xing Wenlong[1], Li Xiang[1]
(1 *Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine affiliated to Capital Medical University*, *Beijing* 100010, *China*;
2 *Capital Medical University*, *Beijing* 100069, *China*)

Abstract　**Objective**: To observe the effect of Shen Yuan Dan (SYD) on Grp78 and CHOP expression in ischemia-reperfusion myocardium cells. **Methods**: To culture cardiomyocytes from newborn rats, and then divided them into normal group, model group, SYD group and blank serum group. Ischemia (2 h) / reperfusion (4 h) model was established by tri-gas incubator. Real-time polymerase chain reaction (PCR) were used to detect the Grp78 and CHOP gene expression levels. **Results**: The Grp78, CHOP expression levels in model group were significantly increased ($P<0.01$). Compared with model group, Grp78 and CHOP were significantly decreased in 10% SYD group ($P<0.05$). Levels of Grp78 and CHOP has no obvious change between 10% blank serum group and model group. **Conclusion**: SYD can reduce endoplasmic reticulum stress in myocardial cell apoptosis and protect myocardial cells.

Key Words　SYD; Endoplasmic reticulum stress; Ischemia-reperfusion injury
中图分类号：R256.22　　**文献标识码**：A　　**doi**：10.3969/j.issn.1673－7202.2016.03.009

心肌缺血再灌注损伤（Ischemia/Reperfusion Injury）是介入技术广泛应用以后带来的新难题，也是目前医学亟待解决的重要问题。有研究显示，内质网应激（Endoplasmic Reticulum Stress，ERS）是缺血再灌注损伤的原因之一。参元丹（又名参元益气活血胶囊）是由我科刘红旭教授研发，既往研究显示其可以减轻大鼠心梗面积，抑制缺氧复氧心肌细胞自噬，减少氧化应激损伤等作用[1-3]。本实验将通过参元丹含药血清对缺血再灌注心肌细胞进行干预，观察其对 ERS 相关因子 GRP78 及 CHOP 表达的影响。

1　材料和方法

1.1　动物　Wistar 大鼠 40 只（雄性），新出生 1～3 d Wistar 大鼠，雌雄不限，体质量不限，均购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2　药物　参元丹由北京中医医院药剂科提供（批准文号：京药制字 Z20053327），按照临床等效剂量换算，用蒸馏水配置成 0.048 g/mL，灌胃给药，1 mL/100 g，药物浓度为 0.48 g/kg。

1.3　试剂　Ⅱ型胶原酶，Sigma；胰蛋白酶，Ameresco；DMEM/F12 混合培养基，Hyclone；胎牛血清（FBS），Gibco（特级）；PBS 平衡盐溶液，Sigma；5-溴脱氧尿嘧啶（Brd-u），Sigma；Trizol，Sigma；TransStart Top Green qPCR SuperMix、TransScript ® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 均来自

基金项目：北京市科学技术委员会十病十药课题（编号：Z141100002214010）；北京市教委科技发展计划面上项目（编号：KM201310025027）；国家自然科学基金项目（编号：81273741）；首都中医药研究专项（编号：13ZY12）
作者简介：佟彤（1986—），女，医学硕士，主治医师
通信作者：尚菊菊，主任医师，博士，研究方向：中西医结合防治心血管疾病基础与临床研究，E-mail：1823042511@qq.com，邮政编码：100010，Tel：（010）52176633

于北京全式金生物技术有限公司。

2 方法

2.1 原代心肌细胞培养 将出生 1 ~ 3 d 的 Wistar 大鼠固定于泡沫板上,75% 乙醇常规消毒乳鼠胸腹部皮肤。超净台内沿乳鼠第 3、4 肋间打开胸腔,取出心脏,至于盛有预冷 PBS 培养皿中。剪掉大血管等非心肌组织,反复清洗 4 次,将心脏在冰上剪成 1 mm^3 大小的组织块,加入胰酶、胶原酶混合消化液(1∶1),于 37 ℃消化,消化完毕后轻轻吹打组织块,重复消化步骤,收集除第 1 次以外的细胞悬液至 15 mL 离心管中,加入等量的含胎牛血清的 DMEM/F12 培养液终止消化,4 ℃、800 r/min 离心 10 min,弃去上清,轻柔吹打成单细胞悬液。过 200 目筛网,差速贴壁分离法纯化心肌细胞(90 min)。加入 Brd-U 抑制成纤维细胞生长,以 5×10^5 密度种 12 孔板。细胞于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度环境培养,48 h 换液后开始正式实验。

2.2 含药血清的制备 将 40 只 Wistar 大鼠随机分为含药血清组和空白血清组,每组 20 只。含药血清组给予浓度为 0.48 g/kg 参元丹溶液,空白组予等量生理盐水,连续给药 5 d,2 次/d,末次给药后 1 h 对大鼠进行腹腔麻醉,腹主动脉取血,静置 2 h 后,3 000 r/min 离心 10 min,无菌条件下分离血清,将 2 组血清分别合并混匀,56 ℃,30 min 灭活,4 mL 分装,-80 ℃保存备用。

2.3 细胞分组 1)正常培养组:心肌细胞不做任何处理,按正常条件培养。2)模型组:缺氧、缺糖 2 h,氧气饱和的含胎牛血清 DMEM/F12 培养液再灌注 4 h。3)10% 空白血清对照组(10% 对照组):缺氧、缺糖 2 h,10% 空白血清再灌注 4 h。4)10% 参元丹含药血清后处理组(10% 参元丹组):缺氧、缺糖 2 h,10% 参元丹含药血清再灌注 4 h。

2.4 缺血再灌注模型制备 缺氧前将培养液换成无糖 Earle's 液,将心肌细胞置入含有 95% N_2 和 5% CO_2 混合气的 37 ℃缺氧箱中,缺氧 2 h(缺血模型),之后将培养液换为空气饱和的含血清 DMEM/F12 培养液,置于 5% CO_2 培养箱中继续培养 4 h,此为复氧(再灌注)。

2.5 RT-PCR 测定 使用 Primer5.0 设计目的基因,GRP78 引物序列上游为:5'-CTGGACTGAATGTCATGAGG-3';下游为:5'-TATCCAGGCCATATGCAATAG-3';预计扩增片段长度为 66bp。CHOP 引物序列上游为:5'-TCCCAAAGCCCTCGCTCTCCA-3';下游为:5'-GCTGCGCAC-TGACCACTCTGTT-3';预计扩增片段长度为 111bp。GAPDH 引物序列上游为:5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3',下游为:5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3',预计扩增片段长度为 87bp。PCR 反应条件:95 ℃ 3 min,95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 40 个循环。

2.6 数据统计 数据采用 SPSS 15.0 统计软件包进行分析。结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 student-Newman-KeulsTest 法进行组间差异性比较。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 参元丹对缺血/再灌注心肌细胞 Grp78 mRNA 表达的影响 经过缺氧、缺糖(缺血模型)2 h 及复氧(再灌注)4 h 后,模型组心肌细胞 Grp78 mRNA 表达明显增加,为正常组的 169%($P < 0.01$)。10% 参元丹组细胞 GRP78 mRNA 含量降至正常组的 130%($P < 0.01$)。10% 空白血清组 Grp78 表达为正常组的 160%,与模型组无统计学意义。

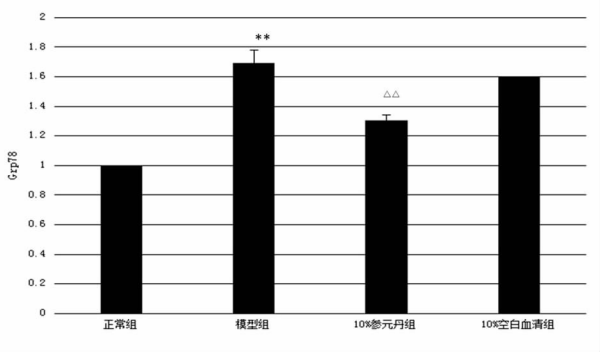

图 1 参元丹对缺血/再灌注心肌细胞 Grp78 mRNA 表达的影响

注:** 与正常组相比 $P < 0.01$;△△ 与模型组相比 $P < 0.01$。

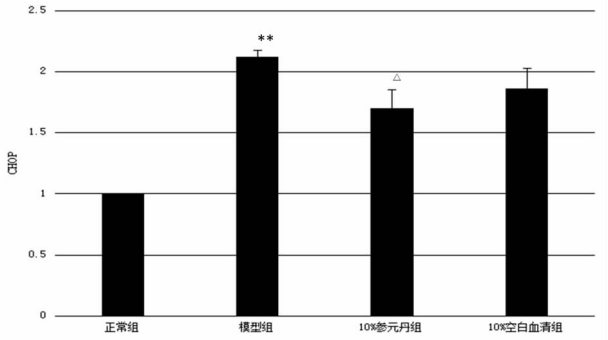

图 2 参元丹对缺血/再灌注心肌细胞 CHOP mRNA 表达的影响

注:** 与正常组相比 $P < 0.01$;△ 与模型组相比 $P < 0.05$。

3.2 参元丹对缺血/再灌注心肌细胞 CHOP mRNA 表达的影响 缺血/再灌注模型组心肌细胞 CHOP

mRNA 表达显著增加，是正常组的 212%（$P < 0.01$）。10% 参元丹组细胞 CHOP mRNA 含量为正常组的 170%（$P < 0.05$）。10% 空白血清组 CHOP 表达为正常组的 186%，与模型组无统计学意义。

4　讨论

内质网（Endoplasmic Reticulum，ER）存在于除哺乳动物成熟的红细胞外的各种真核细胞中，是重要的细胞器之一，其主要的功能是参与蛋白质的折叠、加工、分泌及调节 Ca^{2+} 储存、转运。在细胞内外部环境改变下，内质网功能紊乱而引起了 ERS。ERS 激活细胞内三条通路，即未折叠蛋白反应（Unfolded Protein Response，UPR）、内质网超负荷反应（Endoplasmic Reticulum Overload Response，EOR）和固醇调节级联反应[4]。

大量的未折叠蛋白及错误蛋白的蓄积启动了 UPR，细胞内葡萄糖调节蛋白 78（Grp78）为对蛋白质进行重新折叠而与跨膜蛋白 ATF6、IRE1、PERK 解离，导致了 ATF6、IRE1 和 PERK 分别激活，通路分别激活了下游的凋亡因子（如 bcl-2、caspase-12、CHOP 等），导致细胞凋亡。Grp78 表达上调是内质网应激的标志之一。EOR 是内质网应激的另一种表现形式，由正确折叠蛋白在内质网过度蓄积激活 NF-κB 而引起。固醇调节元件结合蛋白（SREBP）是肝内调节固醇代谢的重要蛋白，当 ERS 时因内质网膜表面合成胆固醇被消耗可以启动 SREBP 而调控脂质代谢。实验表明，心肌细胞的缺血缺氧条件可引起内质网应激并最终导致心肌细胞的凋亡[5]。

参元丹是首都医科大学附属北京中医医院刘红旭教授研制，由黄芪、党参、玄参、丹参、地龙、土鳖虫、水蛭、延胡索等组成。方中重用黄芪为君药，补气扶正。党参性平，味甘补中益气，与丹参活血祛瘀共为臣药，《血证论》中云：瘀血在经络脏腑之间，被气火煎熬，则为干血，盖系干血，使气化隔绝，非寻常行血之品所能治也，故用诸虫啮血之物，以消蚀干血，且力求破血而不伤正。故方选地龙、土鳖虫、水蛭三种虫类药物活血逐瘀，且加用玄参育阴软坚，地龙行经通络，延胡索行气活血，是佐使之药。全方扶正益气与破血逐瘀同用，共奏益气养阴、破血逐瘀、通络止痛之功效。具有很好的临床疗效。在本实验中，缺血/再灌注模型组细胞内 Grp78、CHOP 的表达均明显上升，提示细胞内质网应激启动，可通过 CHOP 的过表达诱发细胞凋亡。在 10% 参元丹组中，Grp78 及 CHOP 的表达较模型组均有明显下降，而此现象在 10% 空白血清组没有出现，提示了参元丹可以通过减轻内质网应激减少心肌细胞的凋亡，保护心肌细胞。

参考文献

[1] 尚菊菊，李爱勇，杨洪志，等. 参元丹药理预适应对大鼠缺血再灌注心肌梗死面积、蛋白激酶 C 及热休克蛋白 70 的影响[J]. 中华中医药杂志，2011，26(8)：78-81.

[2] 解欣然，张蕾，尚菊菊，等. 参元丹含药血清对缺氧复氧心肌细胞自噬的影响[J]. 中华中医药杂志，2012，27(3)：49-52.

[3] 刘红旭，李爱勇，解欣然，等. 参元丹后处理对心肌缺血/再灌注大鼠血清 MDA、SOD 水平的影响[J]. 微循环学杂志，2011，23(1)：5，8，11-12，15.

[4] 张国中，刘增长. 内质网应激与心肌缺血再灌注损伤[J]. 实用临床医药杂志，2015，19(7)：178-180.

[5] 马青变，高炜，郭艳红，等. 缺氧复氧诱导大鼠心肌细胞内质网应激反应[J]. 北京大学学报：医学版，2005，37(4)：52-54.

（2016－02－24 收稿　责任编辑：洪志强）