

钙网蛋白在心肌组织细胞氧化应激与缺血损伤构建中的表达与应用**

李雷勇¹, 田岳凤², 袁叶², 王军², 张斌仁², 王旭²

Expression and application of calreticulin in the construction of cardiac histiocyte oxidative stress and ischemic injury

Li Lei-yong¹, Tian Yue-feng², Yuan Ye², Wang Jun², Zhang Bin-ren², Wang Xu²

文章亮点:

提示钙网蛋白过高表达可能参与缺血再灌注损伤,其可能机制为缺血再灌注应激诱导钙网蛋白过表达,则可能诱导严重的内质网应激,导致Ca²⁺调节失衡,进而激活内质网凋亡信号途径,诱导细胞损伤,加重心肌损伤。

Abstract

BACKGROUND: Calreticulin regulates many physiological and pathophysiological processes *in vivo*, such as cell apoptosis, stress and cardiovascular inflammatory response.

OBJECTIVE: To analyze the expression and application of calreticulin in ischemia-reperfusion injury.

METHODS: An online search of PubMed and CNKI databases was performed for relevant articles published from 1996 to 2010. Articles on the structure and function of calreticulin, the role of calreticulin in autoimmunization and cardiac development, the expression change of calreticulin in the ischemia-reperfusion process were included. On that basis, the expression changes of calreticulin in oxidative stress and ischemia-reperfusion injury were observed by experiment.

RESULTS AND CONCLUSION: Calreticulin plays an important role in the genesis, development and pathological changes of hearts by assisting protein folding correctly, maintaining the intracellular Ca²⁺ homeostasis as well as involving in the regulation of apoptosis, adhesion and the expression of steroid sensitive genes. Calreticulin expression in myocardial ischemia-reperfusion injury was detected by enzyme-linked immunosorbent assay, immunohistochemistry and RT-PCR using myocardial ischemia-reperfusion injury model in rats. The results indicate that calreticulin expression is increased after myocardial ischemia-reperfusion injury, and then the apoptosis signal pathway in endoplasmic reticulum is activated, leading to cell injury and aggravate the myocardial injury.

Li LY, Tian YF, Yuan Y, Wang J, Zhang BR, Wang X. Expression and application of calreticulin in the construction of cardiac histiocyte oxidative stress and ischemic injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(28): 5287-5290. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 生物体内钙网蛋白具有调节细胞凋亡、应激、心血管炎症反应等多种生理和病理生理过程的功能。

目的: 分析钙网蛋白在缺血再灌注损伤中的表达与应用。

方法: 由作者检索 1996/2010 PubMed 数据库与中国知网数据库有关钙网蛋白结构、功能及在自身免疫、心脏发育中的作用、在缺血缺氧过程中表达的变化等方面的文献后,对钙网蛋白在氧化应激与缺血损伤中的表达变化进行了实验观察。

结果与结论: 钙网蛋白通过协助蛋白质正确折叠和维持细胞内Ca²⁺稳态而参与调节细胞凋亡、黏附、类固醇敏感基因表达等,在心脏发生、发育和病理变化中发挥着重要作用。作者应用大鼠心肌缺血再灌注损伤模型,通过酶联免疫吸附试验、免疫组织化学及RT-PCR 3种不同的检测方法,观察了钙网蛋白在心肌缺血再灌注损伤中的表达,结果显示缺血再灌注损伤诱导钙网蛋白高表达,进而激活内质网凋亡信号途径,诱导细胞损伤,加重心肌损伤。

关键词: 钙网蛋白; 心肌缺血-再灌注损伤; 检测方法; 蛋白表达; 心脏

李雷勇, 田岳凤, 袁叶, 王军, 张斌仁, 王旭. 钙网蛋白在心肌组织细胞氧化应激与缺血损伤构建中的表达与应用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(28): 5287-5290. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

钙网蛋白是一种可溶性Ca²⁺结合蛋白,最初被认为是内质网/肌浆网膜蛋白,参与蛋

白加工和细胞内Ca²⁺浓度调节。近十多年的研究发现钙网蛋白有调节细胞黏附和基因表达、抑制血管生成等功能,提示钙网蛋白参与细胞很多功能,如蛋白加工、储备钙调节、抗原递呈等。近年来发现钙网蛋白与人类多种疾

¹Laboratory Department, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China; ²School of Acupuncture and Moxibustion, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China

Li Lei-yong, Associate chief technician, Laboratory Department, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Corresponding author: Tian Yue-feng, Professor, School of Acupuncture and Moxibustion, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China tyfsx@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30873240*; the Natural Science Foundation of Shanxi Province, No. 2010011056-1*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.28.032

Received: 2011-09-21
Accepted: 2011-10-24

¹山西医科大学第二医院检验科, 山西省太原市 030001; ²山西中医学院针灸推拿学院, 山西省太原市 030024

李雷勇, 男, 1963年生, 江苏省徐州市人, 汉族, 1987年山西大学毕业, 副主任技师, 主要从事生化及分子生物学检测技术的研究。

通讯作者: 田岳凤, 教授, 山西中医学院针灸推拿学院, 山西省太原市 030024
tyfsx@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344 (2012)28-05287-04

收稿日期: 2011-09-21
修回日期: 2011-10-24
(20110824006/GW · LX)

病的发生、发展和预后密切相关。本文通过对钙网蛋白检测方法的介绍, 并将其应用于缺血再灌注损伤的实验检测中, 观察了钙网蛋白的不同检测方法在再灌注损伤中的表达与应用。

1 资料和方法

1.1 资料来源 由作者检索 1996/2010 PubMed 数据库及中国知网数据库中文检索词为“钙网蛋白”, 英文检索词为“calreticulin”, 检索文献量总计 95 篇。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准: ①文章所述内容需与钙网蛋白结构、功能及在自身免疫、心脏发育中的作用及在缺血缺氧过程中表达的变化等方面的研究密切相关。②同一领域选择近期发表或在权威杂志上发表的文章。

排除标准: 重复性研究。

1.3 数据提取 计算机初检得到 95 篇文献, 阅读标题和摘要进行初筛, 排除因研究目的与本文无关及内容重复的研究 88 篇, 共保留其中的 7 篇作为实验研究的依据。

2 结果

2.1 钙网蛋白的作用 钙是细胞内重要的第二信使, 细胞内钙浓度的变化影响细胞很多功能, 包括分泌、肌肉的收缩和舒张、细胞运动、蛋白合成修饰折叠、基因表达等。钙网蛋白是内质网中主要的 Ca^{2+} 结合分子伴侣, 具有调控细胞钙稳态、蛋白质合成与修饰等作用, 在生物体内钙网蛋白具有调节细胞凋亡、应激、心血管炎症反应等多种生理和病理生理过程的功能。

钙网蛋白在心脏发育、心肌肥大、缺血再灌注和血管生成等过程中的作用是心血管领域的研究热点问题之一^[1]。已经证实钙网蛋白过度表达的非洲蟾蜍卵母细胞中, Ca^{2+} 内流减少, 1, 4, 5 - 三磷酸肌醇介导的内质网 Ca^{2+} 浓度下降作用被削弱, 细胞内储存 Ca^{2+} 增加, 且钙网蛋白能通过内质网/内质网 Ca^{2+} -ATPase 的 N-糖基化位点, 影响内质

网重吸收 Ca^{2+} , 调节 Ca^{2+} 储备^[2]。研究表明钙网蛋白是细胞“ Ca^{2+} 缓冲剂”。

细胞钙稳态是影响心脏发育的重要因素, 而作为调节细胞钙稳态的主要亚细胞器-肌浆网, 特别是其中的钙结合蛋白在心脏发育调节中具有重要作用。钙网蛋白属于心脏胚胎基因家族, 在心脏发育过程中基因转录活化、蛋白表达升高, 但出生后钙网蛋白基因表达迅速下调, 钙网蛋白这种与心脏发生、发育密切相关的动态变化过程提示其可能参与心脏发育过程调节。钙网蛋白可能通过细胞钙依赖信号途径调节心脏胚胎和出生后发育过程。

2.2 钙网蛋白的表达 近年来发现, 钙网蛋白在组织细胞氧化应激和缺血(氧)损伤中具有重要作用, 小鼠胰岛素瘤 MIN6 细胞过表达钙网蛋白可增加内质网 Ca^{2+} 含量, 并减轻一氧化氮诱导的细胞凋亡^[3]。Ihara 等^[4]研究钙网蛋白过表达对于氧化应激时 SERCA2a 的影响, 发现在 H_2O_2 刺激下, 过表达钙网蛋白的 H9c2 细胞 SERCA2a 活性和微粒体 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 摄取抑制, 提示过表达钙网蛋白增加氧化应激时细胞内 SERCA2a 的失活和降解, 通过影响细胞钙稳态参与氧化应激损伤。

钙网蛋白是心肌肌浆网主要的胚胎型 Ca^{2+} 结合蛋白, 在心肌细胞分化中下调, 出生后逐渐被集钙蛋白所替代。钙网蛋白主要分布于间质纤维细胞中, 在肥心脏钙网蛋白表达上调、位于心肌细胞浆的核周边, 并伴有肌浆网/内质网钙 ATP 酶蛋白水平下调, 而集钙蛋白表达无变化, 提示心肌组织内钙网蛋白的上调与重新分布可能通过影响 SERCA 活性而降低肥心脏的收缩功能。研究发现, 心肌梗死前 24 h 进行缺氧预处理的大鼠在心肌梗死后 14 d 和 28 d 钙网蛋白表达降至基础水平, 而此时钙网蛋白高表达的心肌梗死组织心脏舒缩功能明显低于同时时间点钙网蛋白低表达的缺氧预处理组, 提示心肌缺血后期钙网蛋白持续高表达加重梗死后心肌肥大引起的心功能下降。乳鼠心肌细胞 HPC 24 h 后胞内钙网蛋白表达增加, 并减轻后续缺血再灌注所引起的心肌细胞凋亡, 心肌梗死前 24 h 进行缺血预处理的大鼠梗死边缘区心肌组织钙网蛋白表达上调, 与梗死后心功能呈正相关, 与梗死面积呈负相关, 提

示钙网蛋白是心肌缺血早期重要的保护因子^[5-6]。

预处理作为内源性保护现象,可减轻缺血再灌注时心肌细胞损伤。远程预处理通过下调钙网蛋白高表达减轻在体大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤。研究相关分析显示,SD 大鼠心肌缺血再灌注模型钙网蛋白表达量与 $+dp/dt_{\max}$ 呈负相关,与cTnT、MDA呈正相关^[7]。提示钙网蛋白过高表达可能参与缺血再灌注损伤,其可能机制为缺血再灌注应激诱导钙网蛋白过表达,则可能诱导严重的内质网应激,导致 Ca^{2+} 调节失衡,进而激活内质网凋亡信号途径,诱导细胞损伤,加重心肌损伤。

2.3 钙网蛋白的检测方法

酶联免疫吸附试验(ELISA):双抗夹心ELISA测定血清中蛋白的含量,标记试剂比较稳定,且无放射性的危害。实验结束后腹腔静脉取血约5 mL,3 000 r/min,离心10 min,移液枪头吸取血清约1 mL置于Eppendorf离心管中待测,测定标本中钙网蛋白水平。

ELISA测定操作简便,是目前临床免疫学检验常用技术之一,它的操作模式涉及样本收集保存、试剂准备、加样、温育、洗涤、显色、比色、结果判定与报告8个步骤,其中任何一个步骤操作不当,都会影响测定的结果,诸如标本的采集、保存;试剂的准备、加样的技术、孵育温度及时间的控制、洗涤反应板的方式等发生的一系列问题,均有可能对实验结果产生很大的影响。只有避免了这些因素才能保证实验结果的准确性和可靠性。

免疫组织化学:免疫组织化学通过化学反应使标记抗体的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质),对其进行定位、定性及定量的研究。

手术片取左心室结扎部位下方的心肌组织,大小10 mm×7 mm×3 mm,约200 mg,生理盐水冲洗,秤质量,取约100 mg甲醛固定,常规石蜡包埋制片,切片厚度5 μ m,石蜡切片行免疫组织化学染色。

作者在免疫组织化学标本固定中选用体积分数4%中性甲醛,固定时间不超过24 h。脱水从低体积分数乙醇开始,逐渐过渡到无水乙醇,且体积分数差愈小愈好,可减少细胞收缩,保持细胞原形,避免乙醇体积分数骤升而引起的细胞形态改变。透明剂选择为二甲苯,透明在常温1 h内完成,二甲苯加温或时间过长易使组织变脆变硬,不易制片。不同的抗体适合不同抗原修复方法,抗原修复的好坏直接影响着免疫组化检测结果的可靠性。作者对切片进行微波炉高温修复。修复液为pH值6.0的柠檬酸缓冲液,避免pH值不当导致组织脱片。合适的免疫组织化学缓冲液的pH值可有效减少

非特异性染色。实验流程采用pH值7.4的PBS进行清洗,染色片背景干净清亮。显色在镜下控制,能有效避免背景着色。并在大鼠心肌组织的免疫组织化学中设了阳性及阴性对照,确保了结果的准确性。免疫组织化学的实验结果以灰度值表示,灰度值越低,表达越高。

RT-PCR:RT-PCR是将RNA的反转录(RT)和cDNA的聚合酶链式反应(PCR)相结合,该技术灵敏且用途广泛,可检测细胞中基因表达水平。

RT-PCR两步法测定心肌组织钙网蛋白含量。按照Trizol试剂盒说明提取总RNA后,用RT-PCR试剂反转录合成cDNA第一链,参照RT-PCR试剂盒说明进行反转录反应,再进行PCR扩增,扩增条件:94 $^{\circ}$ C 20 min,58 $^{\circ}$ C 20 min,72 $^{\circ}$ C 20 min共32个循环。钙网蛋白:cDNA PCR产物为197 bp,上游引物序列(5'-3'):GAA TGG AAG CCA CGT CAAAT,下游引物序列(5'-3'):GCA TAG GCC TCA TCA TTG GT; GAPDH(3-磷酸甘油醛脱氢酶):cDNA PCR产物为307 bp,上游引物序列(5'-3'):TGA ACG GGA AGC TCA CTG G,下游引物序列(5'-3'):TCC ACC ACC CTG TTG CTG GA。

经过PCR反应后,取扩增产物10 μ L,1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色,凝胶成像系统成像。

从组织提取总RNA要注意在整个RNA提取过程中都必须在低温下或冰上进行,提取所得的RNA应立即贮存在-80 $^{\circ}$ C冰箱或液氮中保存。总RNA的纯度和完整性关系到后面的cDNA合成及PCR扩增。因此,所提的总RNA要求纯度高,完整性好并达到一定的浓度。在RNA实验中,分离得到全长的RNA是最关键的因素,RNA酶的污染是实验失败的主要原因。在实验中,既要严格控制外源性RNA酶的污染,又要最大限度地抑制内源性的RNA酶。

PCR扩增反应是酶促反应,遵循酶促动力学原理,开始的循环内扩增产物呈指数累积,产物与模板呈线性关系。选择合适的循环数不仅能使扩增产物在琼脂糖凝胶上清晰可见和定量,也可使扩增反应在到达平台期前的线性范围内进行。为避免平台效应的影响,合适的循环数是PCR半定量方法的关键因素之一。一般来说,可以先分别做25,28,30,32及34个循环,当看到条带逐渐变亮后,作者选用中间亮度做为最后循环数32,就是根据目的基因的表达强弱确定的最佳循环次数。

2.4 实验观察

实验动物及分组:选用清洁级Wistar大鼠20只,

体质量 250~300 g, 雌雄各半, 由山西医科大学动物中心提供, 许可证号: SCXK(晋)2009-0001。随机分为假手术组、缺血-再灌注模型组, 每组 10 只。

制备缺血-再灌注损伤模型: 动物称质量, 10% 乌拉坦(1 mg/kg)行腹腔注射麻醉后, 气管切开连接动物呼吸机, 术前描记 II 导联心电图。在胸部左侧三四肋间或心脏搏动较明显的处剪开皮肤, 钝性分离各层肌肉, 露出肋骨。在第 3, 4 根肋骨下用止血钳将肌肉分离开, 钳住并剪断第 4 肋骨, 开胸器放入切口处, 暴露心脏, 打开心包膜, 轻提心耳翻转心脏, 暴露冠状动脉, 在冠状动脉左前降支根部用无创性小圆针穿零号医用缝合线, 心电图监测, 穿线处置一硅胶管后, 与左前降支一并结扎, 以左室前壁发绀并向外膨胀及心电图 S-T 段抬高为标志。

假手术组: 冠状动脉左前降支根部穿线后, 心电图监测, 记录 100 min 内心电图 S-T 段变化, 静脉取血, 摘取心脏。

缺血-再灌注模型组: 冠状动脉左前降支根部穿线后, 心电图监测, 结扎左前降支 40 min, 松扎, 再灌注 60 min 后, 静脉取血, 摘取心脏。

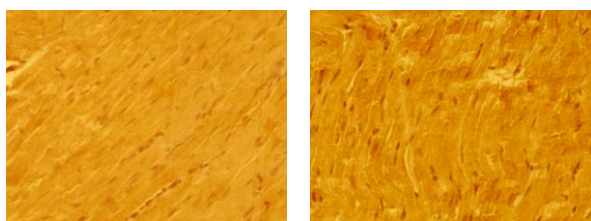
采用酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫组织化学及 RT-PCR 方法检测两组心肌组织钙网蛋白表达。

实验结果: 见表 1, 图 1。

表 1 两组血清钙网蛋白含量、心肌组织钙网蛋白灰度值及钙网蛋白 mRNA 表达率的比较 (x±s)

组别	钙网蛋白含量(μg/L)	钙网蛋白灰度值	钙网蛋白 mRNA
假手术组	161.789±25.164	193.962±10.262	0.560±0.095
缺血-再灌注模型组	172.696±14.979 ^a	184.887±8.3239 ^a	0.735±0.123 ^b

与假手术组比较, ^aP < 0.05, ^bP < 0.01



a: 假手术组

b: 缺血-再灌注模型组

图 1 大鼠心肌组织钙网蛋白阳性表达比较(免疫组织化学染色, ×40)

缺血-再灌注模型组血清钙网蛋白含量、心肌组织钙网蛋白表达与假手术组比较差异有显著性意义(P < 0.05)。在染色过程中, 个别标本有脱落现象, 每组按 8 只大鼠进行统计。心肌细胞中钙网蛋白的表

达呈棕黄(褐)色。假手术组黄褐色的表达几乎看不到, 说明在正常情况下, 钙网蛋白呈低表达状态。缺血-再灌注模型组出现明显的黄褐色表达, 灰度值降低, 阳性表达率明显增高, 与假手术组比较差异有显著性意义(P < 0.05)。假手术组大鼠心肌组织钙网蛋白 mRNA 的表达率很低, 与缺血-再灌注模型组比较, 差异有显著性意义(P < 0.01)。

3 种测定方法均显示: 缺血-再灌注损伤时钙网蛋白的表达均明显增强, 这与国内外报道再灌注损伤诱导钙网蛋白的高表达相一致。3 种测试方法中以 RT-PCR 法较为敏感。

3 小结

钙网蛋白通过协助蛋白质正确折叠和维持细胞内 Ca²⁺稳态而参与调节细胞凋亡、黏附、类固醇敏感基因表达等, 在心脏的发生、发育和病理变化中发挥着重要作用, 本文通过对钙网蛋白检测方法的研究及在心肌缺血再灌注损伤中表达的观察, 分析钙网蛋白在此过程中的变化, 为临床心血管疾病的防治提供思路和方法。

4 参考文献

- [1] 刘秀华. 钙网蛋白与心血管疾病[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006,26(5):440-443.
- [2] Wen X, Frank JL, Mary RW, et al. CRT Modulates Capacitative Ca²⁺ Influx by Controlling the Extent of Inositol 1,4,5-Trisphosphate-induced Ca²⁺ Store Depletion. Biol Chem. 2000;275(4): 36676-36682.
- [3] Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, et al. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(19):10845-10850.
- [4] Ihara Y, Urata Y, Goto S, et al. Role of calreticulin in the sensitivity of myocardial H9c2 cells to oxidative stress caused by hydrogen peroxide. Am J Physiol Cell Physiol. 2006;290(1): C208-C221.
- [5] Liu X H, Xu X F, Fu Y, et al. Calreticulin induces delayed cardioprotection through mitogen-activated protein kinases. Proteomics. 2006;6(13):3792-3800.
- [6] 徐菲菲, 刘秀华, 张振英, 等. 低氧后处理诱导钙网蛋白表达上调的心肌保护机制[J]. 生理学报, 2009, 65(1):35-42.
- [7] 陈光献, 唐白云, 梁孟亚, 等. 远程预处理通过下调钙网蛋白高表达减轻在体大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(8):1469-1473.

基金声明: 国家自然科学基金资助项目 (30873240); 山西省自然基金项目 (2010011056-1)。