

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.10.018

论著·实验研究

## 促红细胞生成素对窒息新生大鼠心肌细胞 凋亡及内质网应激相关蛋白的影响

万丽佳 吴星恒

(南昌大学第一附属医院儿科, 江西 南昌 330006)

**[摘要]** 目的 研究促红细胞生成素(EPO)对窒息新生大鼠心肌细胞凋亡及内质网应激相关蛋白葡萄糖调节蛋白78(GRP78)和C/EBP同源蛋白(CHOP)的影响。方法 120只新生7日龄Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为假手术组、窒息组和EPO组,每组40只。制备新生鼠常压窒息模型;EPO组于造模后立即给予rhEPO 500 U/mL(10 mL/kg)腹腔注射,其余两组接受同剂量的生理盐水。各组在造模完成后2 h、6 h、12 h、24 h和48 h分别取8只大鼠采集心脏血及心肌组织,测定血清心肌酶肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)水平,检测心肌细胞凋亡情况及心肌组织GRP78、CHOP蛋白的表达。结果 与假手术组和EPO组相比,窒息组各时间点血清心肌酶CK和LDH升高,凋亡细胞增多,GRP78、CHOP表达上调( $P<0.01$ );上述各指标在EPO组的表达水平亦高于假手术组( $P<0.01$ );窒息后24 h心肌组织CHOP蛋白与心肌细胞凋亡指数AI呈正相关( $r=0.942$ ,  $P<0.01$ )。结论 EPO可能通过调节内质网应激相关细胞因子GRP78、CHOP,减少心肌细胞凋亡从而发挥对新生鼠缺氧缺血性心肌损伤的保护作用。[中国当代儿科杂志, 2013, 15(10): 890-895]

**[关键词]** 促红细胞生成素;窒息;心肌细胞凋亡;葡萄糖调节蛋白78;C/EBP同源蛋白;新生大鼠

## Effects of erythropoietin on cardiomyocyte apoptosis and endoplasmic reticulum stress-related proteins in neonatal rats with asphyxia

WAN Li-Jia, WU Xing-Heng. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China (Wu X-H, Email: wxh0709@163.com)

**Abstract: Objective** To study the effects of erythropoietin (EPO) on cardiomyocyte apoptosis and endoplasmic reticulum stress (ERS)-related proteins, glucose-regulated protein 78 (GRP78) and C/EBP homologous protein (CHOP), in neonatal rats with asphyxia. **Methods** A total of 120 newborn Sprague-Dawley rats (7 days old) were randomly divided into sham-operated ( $n=40$ ), asphyxia ( $n=40$ ) and EPO-treated asphyxia groups ( $n=40$ ). A neonatal rat model of normobaric asphyxia was established in the asphyxia and EPO-treated asphyxia groups. The rats in the EPO-treated asphyxia group received intraperitoneal injection of recombinant human erythropoietin (500 U/mL) immediately after the model was established, while the other two groups received the same volume of normal saline (0.9%). Heart blood and myocardial tissue samples were collected from 8 rats in each group at 2, 6, 12, 24 or 48 hours after the model was established. Serum creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) levels were measured; cardiomyocyte apoptosis was evaluated, and expression of myocardial GRP78 and CHOP was measured. **Results** Compared with the sham-operated and EPO-treated asphyxia groups, the asphyxia group had significantly increased serum CK and LDH levels, number of apoptotic cells, and expression of myocardial GRP78 and CHOP at each time point ( $P<0.01$ ), and all the indices were significantly higher in the EPO-treated asphyxia group than in the sham-operated group ( $P<0.01$ ). At 24 hours after asphyxia, the expression of myocardial CHOP was positively correlated with the myocardial apoptosis index ( $r=0.944$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusions** EPO exerts a protective effect on the myocardium of neonatal rats with hypoxic-ischemic injury by regulating ERS-related proteins GRP78 and CHOP and reducing cardiomyocyte apoptosis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(10): 890-895]

**Key words:** Erythropoietin; Asphyxia; Cardiomyocyte apoptosis; Glucose-regulated protein 78; C/EBP homologous protein; Neonatal rats

[收稿日期] 2013-03-22; [修回日期] 2013-04-26

[基金项目] 江西省卫生厅科技计划项目(2012A138)。

[作者简介] 万丽佳,女,硕士研究生。现工作单位:萍乡市人民医院儿科。

[通信作者] 吴星恒,主任医师,教授。

新生儿窒息的本质是缺氧,心脏对缺氧非常敏感,极易受血氧浓度影响而出现损害,其中细胞凋亡是缺氧条件下心肌细胞损伤的主要形式之一。为探讨新生儿缺氧缺血性心肌损伤过程中是否存在内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)和C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)凋亡信号转录通路及其介导的心肌细胞凋亡,以及促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)对其的保护作用,本研究利用窒息新生鼠模型,观察新生鼠窒息后心肌细胞凋亡情况及ERS相关葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78, GRP78)和ERS相关凋亡通路蛋白CHOP的表达,并进行CHOP与心肌细胞凋亡指数(apoptotic index, AI)的相关性分析,同时观察EPO对上述检测指标的影响,从而为新生儿缺氧缺血性心肌损害的发病机制及防治提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 120只健康、清洁级7日龄Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为假手术组、窒息组和EPO组,每组40只;各组再按2h、6h、12h、24h和48h共5个不同处理时间点划分亚组,每个时间点各8只。

1.1.2 药品及主要试剂 EPO购于北京四环生物制药公司,免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物技术公司,TUNEL凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物技术研究,GRP78抗体购于武汉博士德公司,CHOP抗体购于Santa Cruz公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备 参照文献<sup>[1]</sup>制备新生鼠常压窒息模型,将动物分别置于容积为55 mL的磨口瓶中(内装5g钠石灰),待动物安静后,塞紧瓶塞密闭30min,立即复氧120min。假手术组仅进行模拟常压窒息过程,不塞瓶塞、复氧;EPO组于造模后立即给予rhEPO 10 mL/kg(500 U/mL)腹腔注射,其余两组接受同剂量的生理盐水。实验结束将各组实验鼠放回鼠笼由母鼠喂养,待各时间点分批取材。

1.2.2 血清心肌酶测定 新生鼠分批在各个时间点腹腔麻醉后开胸,取心脏血0.3 mL,高速离心,取上清液于全自动生化分析仪上测定血清中肌酸激酶(creatine kinase, CK)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)浓度。

1.2.3 心肌组织病理学检查 各时间点新生鼠经心脏取血后取心肌组织,于10%中性甲醛中充分固定,常规脱水及石蜡包埋、切片、脱蜡、透明、苏木精-伊红染色、光镜下观察。

1.2.4 心肌组织GRP78及CHOP蛋白检测 每个标本取3张切片,分别用GRP78、CHOP多克隆抗体进行免疫组织化学染色,实验步骤参照试剂盒说明书,显微镜下观察GRP78以及CHOP阳性心肌细胞,采用显微照相系统,在曝光、放大倍数( $\times 400$ )、亮度等条件均一致的情况下对每张免疫组化切片随机选取5个视野采集图像,采用Image-Pro Plus6.0分析系统对切片进行图像分析,测定免疫组织化学染色的累积光密度值(OD),取其平均值进行统计分析。

### 1.2.5 TUNEL原位末端标记法检测细胞凋亡

每个标本取3张切片,按照TUNEL试剂盒操作方法检测心肌细胞凋亡,荧光显微镜下观察凋亡细胞荧光显色并采取图像,再进行DAB显色,每张切片在高倍镜( $\times 400$ )下随机选取5个不重叠视野,以细胞核中有棕色颗粒者为阳性细胞,进行计数后,按下列公式计算细胞凋亡指数(AI)=单视野凋亡阳性细胞数/单视野总细胞计数 $\times 100\%$ ,取其平均值进行统计分析。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用LSD-*t*检验;在进行CHOP、心肌细胞凋亡指数相关分析时,采用Pearson相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 窒息后新生鼠的一般表现

窒息开始后,新生鼠逐渐出现烦躁、躁动,呼吸心跳加快,继而抽搐、皮毛变灰、唇及甲床逐渐紫绀,实验近结束时动作减少,几乎不动,呼吸减慢。复氧后新生鼠逐渐恢复,但懒动、少吃。

### 2.2 各组新生鼠血清CK浓度变化

假手术组各时间点CK浓度无明显变化( $P > 0.05$ );窒息组CK浓度逐渐增加,组内各时间点两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$ ),且各时间点显著高于假手术组( $P < 0.01$ );EPO组CK浓度显著低于同时间点窒息组( $P < 0.01$ ),但仍高于假手术组( $P < 0.01$ )。见表1。

表 1 新生鼠血清 CK 浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ , U/L)

| 组别    | 例数 | 2 h                     | 6 h                        | 12 h                       | 24 h                       | 48 h                       | F 值      | P 值    |
|-------|----|-------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------|--------|
| 假手术组  | 8  | 677 ± 39                | 676 ± 35                   | 676 ± 33                   | 680 ± 38                   | 671 ± 35                   | 0.059    | 0.993  |
| 窒息组   | 8  | 1071 ± 32 <sup>a</sup>  | 1372 ± 32 <sup>a,c</sup>   | 1778 ± 32 <sup>a,d</sup>   | 2072 ± 26 <sup>a,e</sup>   | 2274 ± 30 <sup>a,f</sup>   | 2100.213 | <0.001 |
| EPO 组 | 8  | 818 ± 34 <sup>a,b</sup> | 1076 ± 31 <sup>a,b,c</sup> | 1375 ± 32 <sup>a,b,d</sup> | 1585 ± 37 <sup>a,b,e</sup> | 1814 ± 39 <sup>a,b,f</sup> | 1042.510 | <0.001 |
| F 值   |    | 258.630                 | 917.131                    | 2419.558                   | 3448.493                   | 4436.010                   |          |        |
| P 值   |    | <0.001                  | <0.001                     | <0.001                     | <0.001                     | <0.001                     |          |        |

a: 与假手术组相比,  $P<0.01$ ; b: 与窒息组相比,  $P<0.01$ ; c: 与 2 h 组相比,  $P<0.01$ ; d: 与 6 h 组相比,  $P<0.01$ ; e: 与 12 h 组相比,  $P<0.01$ ; f: 与 24 h 组相比,  $P<0.01$

### 2.3 各组新生鼠血清 LDH 浓度变化

假手术组各时间点 LDH 浓度无明显变化 ( $P>0.05$ ); 窒息组 LDH 浓度逐渐增加, 组内各时间点两两比较差异均有统计学意义 (均

$P<0.01$ ), 且各时间点显著高于假手术组 ( $P<0.01$ ); EPO 组 LDH 浓度显著低于同时间点窒息组 ( $P<0.01$ ), 但仍高于假手术组 ( $P<0.01$ )。见表 2。

表 2 新生鼠血清 LDH 浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ , U/L)

| 组别    | 例数 | 2 h                     | 6 h                       | 12 h                       | 24 h                       | 48 h                       | F 值      | P 值    |
|-------|----|-------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------|--------|
| 假手术组  | 8  | 532 ± 42                | 532 ± 38                  | 524 ± 45                   | 530 ± 42                   | 522 ± 41                   | 0.103    | 0.981  |
| 窒息组   | 8  | 868 ± 36 <sup>a</sup>   | 1084 ± 29 <sup>a,c</sup>  | 1374 ± 38 <sup>a,d</sup>   | 1559 ± 34 <sup>a,e</sup>   | 1871 ± 37 <sup>a,f</sup>   | 1022.100 | <0.001 |
| EPO 组 | 8  | 689 ± 37 <sup>a,b</sup> | 887 ± 34 <sup>a,b,c</sup> | 1036 ± 25 <sup>a,b,d</sup> | 1203 ± 29 <sup>a,b,e</sup> | 1394 ± 54 <sup>a,b,f</sup> | 428.365  | <0.001 |
| F 值   |    | 154.092                 | 539.285                   | 1075.618                   | 1766.302                   | 1878.162                   |          |        |
| P 值   |    | <0.001                  | <0.001                    | <0.001                     | <0.001                     | <0.001                     |          |        |

a: 与假手术组相比,  $P<0.01$ ; b: 与窒息组相比,  $P<0.01$ ; c: 与 2 h 组相比,  $P<0.01$ ; d: 与 6 h 组相比,  $P<0.01$ ; e: 与 12 h 组相比,  $P<0.01$ ; f: 与 24 h 组相比,  $P<0.01$

### 2.4 心肌组织病理学检查

假手术组新生鼠心肌细胞排列整齐而紧密, 染色清晰, 结构完整, 细胞核致密清晰可见, 呈圆形或卵圆形, 显蓝色。窒息组心肌细胞排列紊

乱, 细胞核不规则, 呈浓缩状, 心肌间质充血水肿, 有炎性细胞浸润。EPO 组心肌细胞排列紊乱、间质充血水肿及炎性细胞浸润均比窒息组减轻。见图 1。

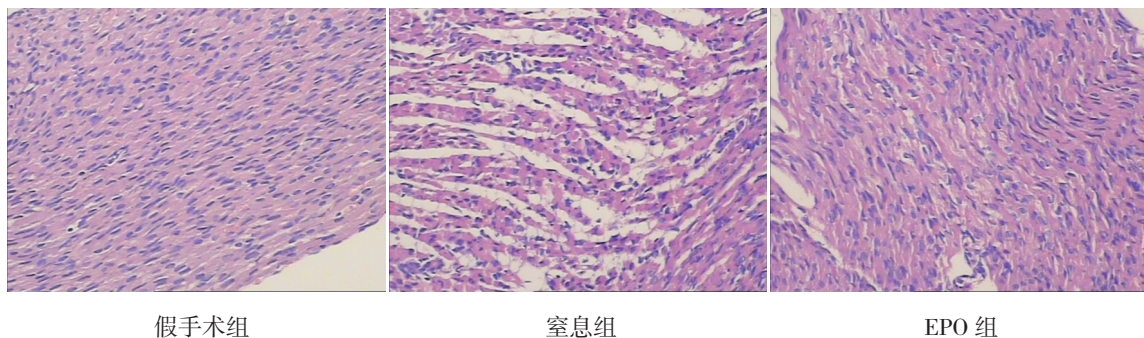


图 1 各组新生鼠心肌组织病理改变 (苏木精-伊红染色,  $\times 200$ ) 假手术组新生鼠心肌细胞排列整齐而紧密, 染色清晰, 结构完整, 细胞核致密清晰可见; 窒息组心肌细胞排列紊乱, 间质充血水肿, 有明显炎性细胞浸润, 以嗜中性粒细胞为主, 显示较典型心肌损伤改变; EPO 组上述改变较窒息组减轻。

### 2.5 新生鼠心肌细胞凋亡的表达变化

2.5.1 心肌细胞凋亡定性分析 假手术组仅见少量生理性凋亡细胞荧光显色; 窒息组凋亡细胞明显增多; EPO 组凋亡细胞较窒息组减少, 但仍多于假手术组。见图 2。

2.5.2 心肌细胞凋亡定量分析 假手术组各时

间点 AI 值无明显变化 ( $P>0.05$ ); 窒息组 AI 值逐渐增加, 组内各时间点两两比较差异均有统计学意义 (均  $P<0.01$ ), 且各时间点显著高于假手术组 ( $P<0.01$ ); EPO 组 AI 值显著低于同时间点窒息组 ( $P<0.01$ ), 但仍高于假手术组 ( $P<0.01$ )。见表 3、图 3。

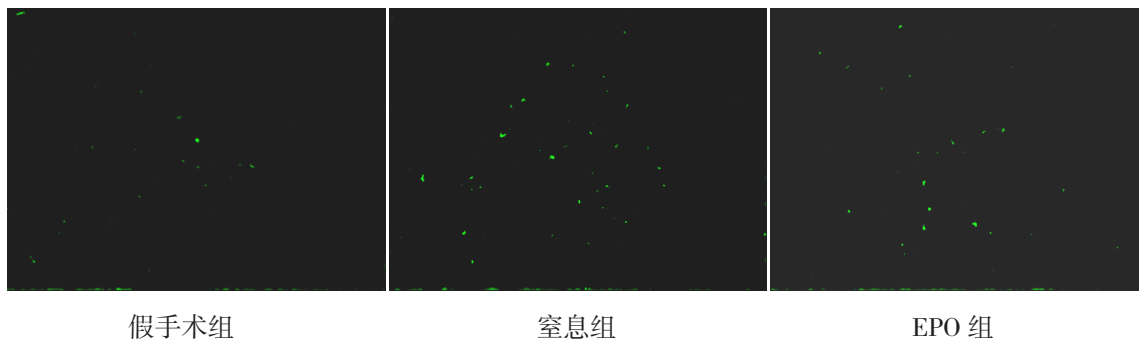


图 2 各组新生鼠心肌细胞凋亡荧光显色 (TUNEL 法,  $\times 200$ ) 假手术组仅见少量凋亡细胞; 窒息组可见大量凋亡细胞; EPO 组凋亡细胞较窒息组减少, 但仍多于假手术组。荧光显微镜下观察到凋亡心肌细胞显绿色荧光。

表 3 各组各时间点心肌 AI 值的比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 组别    | 例数 | 2 h                 | 6 h                    | 12 h                   | 24 h                 | 48 h                   | F 值      | P 值    |
|-------|----|---------------------|------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------|--------|
| 假手术组  | 8  | $5.0 \pm 0.7$       | $4.7 \pm 0.6$          | $5.2 \pm 0.7$          | $4.7 \pm 0.5$        | $4.7 \pm 0.6$          | 0.987    | 0.427  |
| 窒息组   | 8  | $12.8 \pm 0.6^a$    | $16.0 \pm 0.3^{a,c}$   | $20.2 \pm 0.5^{a,d}$   | $24.8 \pm 0.5^{a,e}$ | $28.1 \pm 0.5^{a,f}$   | 1252.380 | <0.001 |
| EPO 组 | 8  | $9.1 \pm 0.4^{a,b}$ | $11.2 \pm 0.4^{a,b,c}$ | $13.8 \pm 0.5^{a,b,d}$ | $17.1 \pm 0.4^{b,e}$ | $19.4 \pm 0.7^{a,b,f}$ | 605.869  | <0.001 |
| F 值   |    | 377.979             | 1207.465               | 1340.109               | 3736.138             | 3104.148               |          |        |
| P 值   |    | <0.001              | <0.001                 | <0.001                 | <0.001               | <0.001                 |          |        |

a: 与假手术组相比,  $P<0.01$ ; b: 与窒息组相比,  $P<0.01$ ; c: 与 2 h 组相比,  $P<0.01$ ; d: 与 6 h 组相比,  $P<0.01$ ; e: 与 12 h 组相比,  $P<0.01$ ; f: 与 24 h 组相比,  $P<0.01$

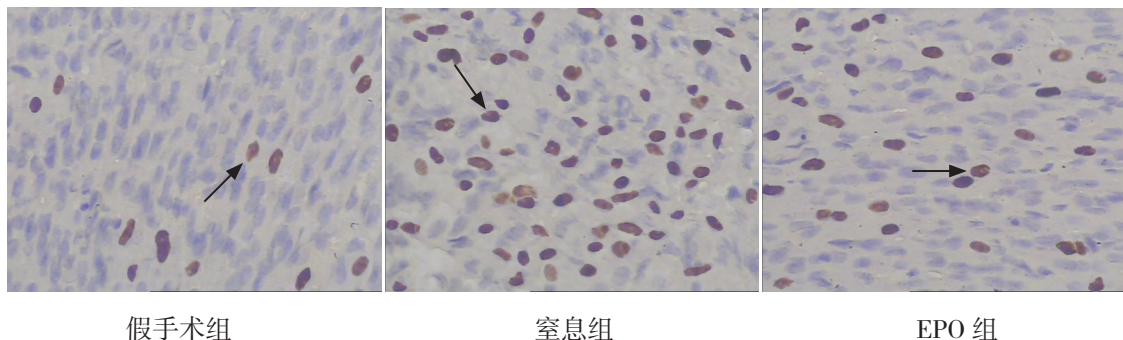


图 3 各组新生鼠心肌细胞凋亡 DAB 显色 (TUNEL 法,  $\times 400$ ) 假手术组可见少许凋亡细胞, 窒息组凋亡细胞较假手术组明显增多, EPO 组凋亡细胞较窒息组减少, 但仍多于假手术组。图中凋亡细胞呈棕色 (箭头所示)。

## 2.6 新生鼠心肌组织 GRP78 的表达变化

假手术组各时间点 GRP78 表达无明显变化 ( $P>0.05$ ); 与假手术组比较, 窒息组、EPO 组各时间点 GRP78 蛋白表达均显著升高 ( $P<0.01$ ),

2 h 开始升高, 12 h 达高峰, 48 h 仍高于假手术组; 与窒息组比较, EPO 组各时间点 GRP78 蛋白表达均显著下降 ( $P<0.01$ )。见表 4、图 4。

表 4 各组各时间点心肌组织 GRP78 蛋白 IOD 值的比较 ( $\bar{x} \pm s, \times 10^3$ )

| 组别    | 例数 | 2 h                  | 6 h                    | 12 h                   | 24 h                   | 48 h                   | F 值      | P 值    |
|-------|----|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------|--------|
| 假手术组  | 8  | $4.3 \pm 1.2$        | $4.5 \pm 1.3$          | $4.8 \pm 1.3$          | $4.3 \pm 1.4$          | $4.8 \pm 1.6$          | 0.338    | 0.851  |
| 窒息组   | 8  | $38.8 \pm 2.5^a$     | $70.4 \pm 2.1^{a,c}$   | $107.5 \pm 1.4^{a,d}$  | $81.4 \pm 2.0^{a,e}$   | $61.8 \pm 2.8^{a,f}$   | 1063.975 | <0.001 |
| EPO 组 | 8  | $25.8 \pm 1.5^{a,b}$ | $30.6 \pm 4.3^{a,b,c}$ | $45.9 \pm 1.7^{a,b,d}$ | $41.0 \pm 1.6^{a,b,e}$ | $37.2 \pm 1.7^{a,b,f}$ | 89.214   | <0.001 |
| F 值   |    | 733.198              | 1080.172               | 10098.117              | 4359.950               | 1501.077               |          |        |
| P 值   |    | <0.001               | <0.001                 | <0.001                 | <0.001                 | <0.001                 |          |        |

a: 与假手术组相比,  $P<0.01$ ; b: 与窒息组相比,  $P<0.01$ ; c: 与 2 h 组相比,  $P<0.01$ ; d: 与 6 h 组相比,  $P<0.01$ ; e: 与 12 h 组相比,  $P<0.01$ ; f: 与 24 h 组相比,  $P<0.01$

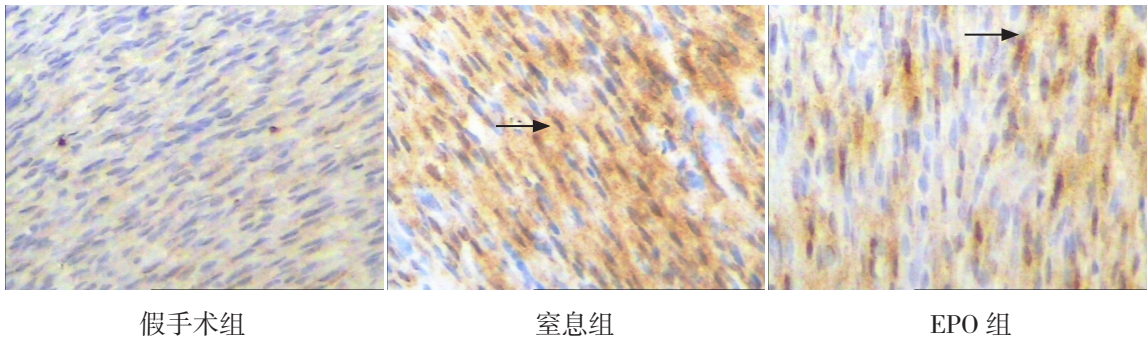


图 4 各组新生鼠心肌组织 GRP78 蛋白表达 (免疫组化, ×400) 假手术组未见明显棕黄色产物, 窒息组胞浆或胞核大量表达棕黄色产物, EPO 组免疫反应阳性产物较窒息组明显减少。GRP78 蛋白免疫反应阳性产物呈棕黄色(箭头所示), 主要表达在胞浆或胞核。

2.7 新生鼠心肌组织 CHOP 的表达变化

假手术组各时间点 CHOP 表达无明显变化 ( $P>0.05$ )。与假手术组比较, 窒息组、EPO 组各时间点 CHOP 蛋白表达均显著升高 ( $P<0.01$ ), 2 h 开始升高, 24 h 达高峰, 48 h 仍高于假手术组。

与窒息组比较, EPO 组各时间点 CHOP 蛋白表达均显著下降 ( $P<0.01$ )。见表 5、图 5。

2.8 心肌组织 CHOP 表达与 AI 的相关性分析

窒息 24 h 心肌组织 CHOP 表达与 AI 呈正相关 ( $r=0.942$ ,  $P<0.01$ )。见图 6。

表 5 各组各时间点心肌组织 CHOP 蛋白 IOD 值的比较 ( $\bar{x} \pm s, \times 10^3$ )

| 组别    | 例数 | 2 h                       | 6 h                         | 12 h                        | 24 h                        | 48 h                        | F 值      | P 值    |
|-------|----|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------|--------|
| 假手术组  | 8  | 5.5 ± 1.2                 | 6.3 ± 1.3                   | 4.9 ± 1.6                   | 5.9 ± 0.9                   | 5.4 ± 1.3                   | 1.410    | 0.251  |
| 窒息组   | 8  | 56.1 ± 1.4 <sup>a</sup>   | 82.4 ± 1.4 <sup>a,c</sup>   | 105.7 ± 1.2 <sup>a,d</sup>  | 126.4 ± 1.5 <sup>a,e</sup>  | 92.5 ± 1.1 <sup>a,f</sup>   | 3136.426 | <0.001 |
| EPO 组 | 8  | 27.4 ± 1.3 <sup>a,b</sup> | 42.8 ± 1.4 <sup>a,b,c</sup> | 57.3 ± 1.4 <sup>a,b,d</sup> | 66.0 ± 3.7 <sup>a,b,e</sup> | 52.8 ± 1.2 <sup>a,b,f</sup> | 415.987  | <0.001 |
| F 值   |    | 2912.268                  | 5794.125                    | 10663.627                   | 5205.761                    | 10569.204                   |          |        |
| P 值   |    | <0.001                    | <0.001                      | <0.001                      | <0.001                      | <0.001                      |          |        |

a: 与假手术组相比,  $P<0.01$ ; b: 与窒息组相比,  $P<0.01$ ; c: 与 2 h 组相比,  $P<0.01$ ; d: 与 6 h 组相比,  $P<0.01$ ; e: 与 12 h 组相比,  $P<0.01$ ; f: 与 24 h 组相比,  $P<0.01$

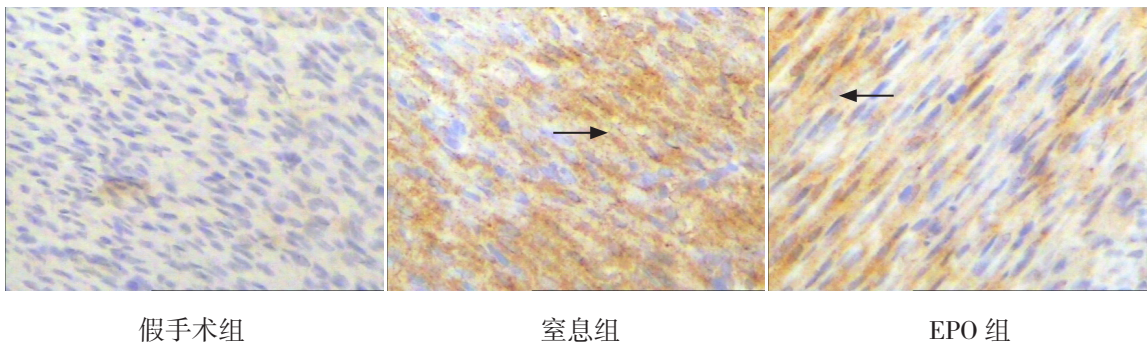


图 5 各组新生鼠心肌组织 CHOP 蛋白表达 (免疫组化, ×400) 假手术组未见明显棕黄色产物, 窒息组胞浆或胞核大量表达棕黄色产物, EPO 组免疫反应阳性产物较窒息组明显减少。CHOP 蛋白免疫反应阳性产物呈棕黄色(箭头所示), 主要表达在胞浆或胞核。

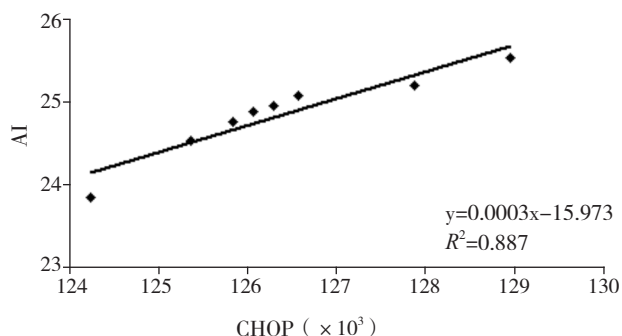


图6 窒息24 h心肌组织CHOP蛋白表达与AI相关分析散点图

### 3 讨论

近年来研究表明,缺氧导致细胞损害的主要方式是通过诱导细胞凋亡,即心肌细胞凋亡是缺氧条件下心肌细胞损伤的主要形式之一<sup>[2]</sup>。本实验证实新生鼠常压模型制备成功,窒息后心肌细胞凋亡增加,明确新生鼠缺氧缺血性心肌损伤过程中存在心肌细胞凋亡。

死亡受体活化(外源性)和线粒体损伤(内源性)途径是细胞内两条经典的凋亡途径,近年来研究显示内质网通路是一条新的细胞凋亡途径<sup>[3]</sup>。该途径的核心内容是内质网应激,其标志性蛋白为GRP78,又名免疫球蛋白重链结合蛋白(Bip),GRP78/Bip的功能很多,作为一种内质网驻留蛋白,参与蛋白质的折叠和转运,它也是内质网上的一种应激蛋白,在低糖、低氧、低Ca<sup>2+</sup>等应激状态下大量表达以维持内质网的稳定,保护细胞<sup>[4]</sup>。因此GRP78在应激条件下对细胞起保护作用。本研究结果显示,新生鼠窒息后心肌组织GRP78表达增加,从而明确新生鼠缺氧缺血性心肌损伤过程中存在ERS的激活,而GRP78表达增加于12 h达高峰,之后开始下降,但48 h时仍高于假手术组。

若应激时间延长、程度加重,错误折叠或未折叠蛋白大量积累,内质网未能将其及时清除,则通过激活下游凋亡信号分子caspase-12、GADD153/CHOP、ASK1/JNK启动ERS相关的凋亡信号通路,诱导细胞凋亡<sup>[5]</sup>。本实验显示,窒息后CHOP蛋白表达增加,于24 h达高峰,48 h仍高于假手术组,与心肌细胞AI值呈正相关,明确ERS引起的CHOP凋亡信号通路介导心肌细胞凋亡。

EPO及其受体(EPOR)广泛分布于人类多种组织和器官,是一个重要细胞保护剂,具有潜在的多组织细胞保护作用<sup>[6]</sup>,尤其是对神经系统和心血管系统的保护作用研究较多<sup>[7-8]</sup>。EPO除通过

调节红细胞生成,增加组织氧供以外,还可通过抗凋亡、抗炎、抗氧化、促进新生血管生成等作用保护心脏<sup>[9]</sup>。目前认为EPO组织细胞保护作用机制可能与多种信号通路(如:JAK2、STAT3、PI3K/Akt、MAPK、PKC等)的活化有关<sup>[10-11]</sup>。本研究结果显示,EPO治疗组较窒息组血清心肌酶下降,心肌病理损伤减轻,心肌细胞凋亡减少,同一时间点GRP78及CHOP表达下调,表明EPO对窒息新生鼠缺氧缺血性心肌损伤有保护作用,其机制可能与抑制核转录因子CHOP的过表达从而抑制内质网应激引起的心肌细胞凋亡有关。而EPO是否通过抑制ERS的其他下游凋亡信号通路核转录因子(如caspase-12和JNK)发挥细胞保护作用,仍需进一步研究证实。

### [参 考 文 献]

- [1] 王彩霞,徐淑珍,姜长青,初建芳,赵炜. 基质金属蛋白酶活性与新生鼠窒息后心肌损害的相关性研究[J]. 中国新生儿杂志, 2006, 21(3): 152-154.
- [2] Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease[J]. Apoptosis, 2009, 14(4): 536-548.
- [3] Zhang K, Kaufman RJ. Identification and characterization of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in vivo[J]. Methods Enzymol, 2008, 442: 395-419.
- [4] Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress[J]. Methods, 2005, 35(4): 373-381.
- [5] Faitova J, Krekac D, Hrstka R, Vojtesek B. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis[J]. Cell Mol Biol Lett, 2006, 11(4): 488-505.
- [6] Chateauvieux S, Grigorakaki C, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82(10): 1291-1303.
- [7] Kumral A, Tuzun F, Oner MG, Genc S, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin in neonatal brain protection: the past, the present and the future[J]. Brain Dev, 2011, 33(8): 632-643.
- [8] Ruirok WP, de Boer RA, Westenbrink BD, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH. Erythropoietin in cardiac disease: new features of an old drug[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 585(2-3): 270-277.
- [9] Lu MJ, Chen YS, Huang HS, Ma MC. Erythropoietin alleviates post-ischemic injury of rat hearts by attenuating nitrosative stress[J]. Life Sci, 2012, 90(19-20): 776-784.
- [10] Kretz A, Happold CJ, Marticke JK, Isenmann S. Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation[J]. Mol Cell Neurosci, 2005, 29(4): 569-579.
- [11] Tang Z, Sun X, Huo G, Xie Y, Shi Q, Chen S, et al. Protective effects of erythropoietin on astrocytic swelling after oxygen-glucose deprivation and reoxygenation: mediation through AQP4 expression and MAPK pathway[J]. Neuropharmacology, 2013, 67: 8-15.

(本文编辑:周勇)