

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2009)17-12-0980-05

不同浓度脂联素对心肌细胞氧化应激损伤后 GRP78及 Caspase-12表达的影响及意义

郑洁, 边云飞, 郝小燕, 杨慧宇, 肖传实

(山西医科大学第二医院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 内质网应激; 脂联素; 心肌细胞; 氧化应激; H_2O_2

[摘要] 目的 通过原代培养 SD大鼠的乳鼠心肌细胞建立 H_2O_2 心肌细胞氧化应激损伤模型, 观察脂联素对心肌细胞氧化应激所致内质网应激的保护作用。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状态, 通过 α -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, 随机分为对照组、 H_2O_2 组、 H_2O_2 + 10 mg/L 脂联素组、 H_2O_2 + 20 mg/L 脂联素组和 H_2O_2 + 30 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的变化, 采用化学比色法测定乳酸脱氢酶的释放, 通过流式细胞术来检测心肌细胞的凋亡, 用 RT-PCR 与 Western Blotting 方法检测内质网应激指标 GRP78 和 Caspase-12 的表达。结果 与对照组相比, 给予 H_2O_2 后, 细胞凋亡率显著增加 ($70.7\% \pm 6.4\%$ 比 $1.0\% \pm 0.6\%$, $P < 0.05$), LDH 释放增加 (1411.5 ± 189.7 U/L 比 353.3 ± 50.3 U/L, $P < 0.05$), 内质网伴侣蛋白 GRP78 以及 Caspase-12 在 mRNA (分别为 1.25 ± 0.50 比 0.18 ± 0.10 和 1.32 ± 0.15 比 0.26 ± 0.06) 及蛋白水平 (分别为 0.92 ± 0.50 比 0.37 ± 0.10 和 1.24 ± 0.50 比 0.51 ± 0.01) 表达增加 ($P < 0.05$), 30 mg/L 脂联素预处理后给予 H_2O_2 , 可较大程度地逆转上述指标变化, 细胞凋亡率显著下降 ($43.6\% \pm 3.8\%$), LDH 释放减少 (686.7 ± 61.1 U/L), 内质网伴侣蛋白 GRP78 以及 Caspase-12 在 mRNA (分别为 0.56 ± 0.03 和 0.83 ± 0.04) 及蛋白水平 (分别为 0.66 ± 0.03 和 0.64 ± 0.03) 表达减少 ($P < 0.05$)。结论 氧化应激使 GRP78 和 Caspase-12 表达增强, 启动内质网应激, 脂联素可以通过减轻内质网应激逆转 H_2O_2 所致的心肌细胞损伤及凋亡作用, 对心肌细胞有保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effects of Different Concentrations of Adiponectin on the Expressions of GRP78 and Caspase-12 in Cardiomyocytes After Oxidative Stress

ZHENG Jie, BIAN Yun-Fei, HAO Xiao-Yan, YANG Hu-Yu, and XIAO Chuan-Shi

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

[KEY WORDS] Endoplasmic Reticulum Stress; Adiponectin; Cardiomyocytes; Oxidative Stress; H_2O_2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of adiponectin on endoplasmic reticulum stress injury of the 3~4 days SD rat cardiomyocytes which was induced by the intervention of H_2O_2 . **Methods** Primary cardiomyocytes were obtained from neonatal rat and cultured by enzymatic digestion methods. The morphology of neonatal rat cardiomyocytes was studied by phase contrast microscope. Its molecular markers were observed by α -actin immunocytochemistry. Primary 3~4 days cells were used in experiment and they were randomly divided into control group, H_2O_2 group (200 μ mol/L H_2O_2 , 2 h), H_2O_2 + 10 mg/L APN group, H_2O_2 + 20 mg/L APN group and H_2O_2 + 30 mg/L APN group. The change of morphology of cardiomyocytes was observed by electron microscope. The content of lactate dehydrogenase (LDH) was detected by chemistry chromatometry, the cardiomyocytes apoptosis was detected by agarose gel electrophoresis levels and Annexin V-FITC/PI flow cytometry. The expressions of GRP78 and caspase-12 were detected by Western Blotting and RT-PCR. **Results** Adiponectin pretreatment significantly decreased the apoptosis rate ($43.6\% \pm 3.8\%$ vs $70.7\% \pm 6.4\%$), and the release of LDH (686.7 ± 61.1 U/L vs 1411.5 ± 189.7 U/L, $P < 0.05$). The expression of GRP78 and caspase-12 attenuated (mRNA: 0.56 ± 0.03 vs 1.25 ± 0.50 , 0.83 ± 0.04 vs 1.32 ± 0.15), (protein: 0.66 ± 0.03 vs 0.92 ± 0.50 , 0.64 ± 0.03 vs 1.24 ± 0.50). **Conclusion** Oxidative stress enhances the expressions of GRP78 and caspase-12, and makes endoplasmic reticulum stress to start. Adiponectin which can attenuate endoplasmic reticulum stress, have a protective effect on myocardial cells.

氧化应激是指机体在遭受各种有害刺激时, 体内或细胞内活性氧的产生与抗氧化之间失衡, 从而

[收稿日期] 2009-10-03

[修回日期] 2009-12-10

[作者简介] 郑洁, Email为 jiejie_324@163.com。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, Email为 ganxibaizhongxin@sina.com。通讯作者肖传实, 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, Email为 ganxibaizhongxin@sina.com。

导致组织的损伤^[1]。心肌再灌注损伤、心肌梗死及动脉硬化等病理过程中都存在着氧化应激。有研究表明,内质网应激参与了心肌缺血再灌注损伤^[2]。脂联素(adiponectin, APN)具有降低血糖、改善胰岛素抵抗、抗动脉粥样硬化斑块形成和抗炎等特性^[3]。研究表明脂联素通过抗氧化应激所致心肌细胞的损伤及凋亡作用能够有效阻止心肌发生缺血再灌注损伤,减少心肌细胞死亡^[4]。脂联素是否通过内质网应激来减轻氧化应激所致心肌细胞凋亡,目前较少有文献报道。本研究采用体外培养乳鼠心肌细胞,通过建立氧化应激模型观察脂联素对氧化应激所致心肌细胞损伤及凋亡的影响,同时观察内质网应激指标 GRP78和 Caspase-12在 mRNA 及蛋白水平的表达,以探讨脂联素是否通过内质网应激来减轻氧化应激所致心肌细胞凋亡。

1 材料和方法

1.1 主要材料

健康 SD 乳鼠,1~5 天龄,由山西医科大学实验动物中心提供。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;Ⅲ型胶原酶、胰蛋白酶、FITC-羊抗兔Ⅲ抗、4%多聚甲醛、Triton X-100 购自 Solarbio;兔抗人 α -肌动蛋白 iv 及 FITC 羊抗兔二抗购自北京博奥森,乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;膜联蛋白 V (Annexin V) / 碘化丙啶(propidium iodide, PI) (Annexin V / PI) 双染色试剂盒购自晶美生物工程有限公司;PBS 缓冲液、多聚赖氨酸购自博士德生物工程有限公司。GRP78(stressgen)、Caspase-12 兔抗鼠多克隆抗体,兔抗鼠 GAPDH 单克隆抗体 [Santa Cruz 公司(北京中杉金桥生物技术有限公司分装)]。CAT 号分别为 Str-spp-765E (GRP78)、2202 (Caspase-12) 和 TA-08 (GAPDH)。

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^[5]方法将乳鼠浸入 75% 酒精中浸泡数秒后携入超净工作台。颈椎脱臼处死。将乳鼠的头、四肢仰卧固定,眼科剪剪开胸廓,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Ⅲ型胶原酶,将混悬液转移至一青霉素小瓶中,吹打消化 5 min 后静置,弃上清(上清液内主要含红细胞、细胞碎屑

及死细胞)。再次加入适量Ⅲ型胶原酶,反复吹打,自然沉降,取上清。重复上述步骤 4~5 次,直至组织块消化完全。将每次所得上清移入离心管中,加等体积的含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液终止胶原酶作用,1 000 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 20% 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% CO₂ 培养箱中静置培养 2 h,非心肌细胞贴壁速度较快,附在瓶底,而心肌细胞仍处于悬浮状态。吸出细胞悬液,在细胞悬液中加入 5-BrdU 至 0.1 mmol/L 以抑制非心肌细胞增殖。将细胞悬液以约 1×10^6 个/cm³ 的密度,接种于 6 孔培养板,在 37℃、95% O₂ + 5% CO₂ 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 20% 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,连成片状,搏动良好并趋于同步化后,给予干预。采用免疫荧光法,兔抗人 α -肌动蛋白一抗及 FITC 羊抗兔二抗检测胞浆 α -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共五板,随机分为五组,每板为一组。对照组:不加干预措施心肌细胞正常培养;④ H₂O₂ 组:培养液中加入终浓度为 200 μ mol/L 的 H₂O₂ 培养 2 h;④ H₂O₂ + 10 mg/L 脂联素组:培养液中加入终浓度为 10 mg/L 的脂联素与心肌细胞共同孵育 18 h 再在培养液中加入终浓度为 200 μ mol/L 的 H₂O₂ 培养 2 h;H₂O₂ + 20 mg/L 脂联素组:培养液中加入终浓度为 20 mg/L 的脂联素与心肌细胞共同孵育 18 h 再在培养液中加入终浓度为 200 μ mol/L 的 H₂O₂ 培养 2 h;H₂O₂ + 30 mg/L 脂联素组:培养液中加入终浓度为 30 mg/L 的脂联素与心肌细胞共同孵育 18 h 再在培养液中加入终浓度为 200 μ mol/L 的 H₂O₂ 培养 2 h。

1.4 乳酸脱氢酶的测定

培养皿中的细胞按上述各组处理,终止实验后,收集培养细胞的上清液,采用 LDH 试剂盒(按试剂盒说明操作)测定各组 LDH 的活性。

1.5 流式细胞仪检测心肌细胞的凋亡率

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 $0.5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 个/L。取 1 mL 细胞,1 000 r/min,4℃离心 10 min 弃上清。加

入 1 mL 冷的 PBS, 轻轻震荡使细胞悬浮, 1 000 r/min, 4℃离心 10 min, 弃上清。重复上述步骤 3、4 两次。然后用 0.25% 胰蛋白酶消化, 再用 PBS 洗涤。将细胞重悬于 200 μ L Binding Buffer 中, 加入 10 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min 或 4℃反应 30 min。加入 300 μ L Binding Buffer, 在 1 h 内流式细胞仪检测。

1.6 逆转录聚合酶链反应检测 GRP78 和 Caspase-12 的 mRNA 表达

应用 TRIZOL Reagent 提取各处理组细胞总 RNA, 分别取 3 μ L RNA 在 10 μ L 反应体系中逆转录合成 cDNA, 取 10 μ L cDNA 于 50 μ L 反应体系中进行 PCR 扩增。引物序列 GRP78 上游为 5'-CTGGGTACA TTTGA TCTGACTGG-3', 下游为 5'-GCATCC TGG TGG CTT TCC AGC CAT TC-3', 扩增片长 345 bp。Caspase-12 上游为 5'-GAA GGA ATC TGT GGG GTG AA-3', 下游为 5'-TCC CTT TGC TTG TGG ATA CC-3', 扩增片长 181 bp。 β -actin 上游为 5'-CTA CAA TGA GCT GCG TGT GGC-3', 下游为 5'-CAG GTC CAG ACG CAG GAT GGC-3', 扩增片长 270 bp。PCR 反应条件为 94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 56℃退火 20 s, 72℃延伸 30 s, 进行 35 个循环。PCR 产物 10 μ L, 经琼脂糖凝胶电泳分离。用 ImageMaster TotalLab 生物学软件分析条带的吸光度值, 与内参 β -actin 条带的吸光度值相比来校正, 各组间进行比较。

1.7 Western Blotting 测定 GRP78 和 Caspase-12 的蛋白表达

提取各组细胞中的蛋白, 用 Bradford 法测蛋白浓度。取 100 μ g 样品蛋白, 放沸水振荡水浴 1 min 变性, 5% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 转移至硝酸纤维膜 (PVDF 膜, Millipore Corporation), 5% 小牛血清白蛋白封闭后依次加入兔抗鼠 GRP78 抗体 (1: 200)、兔抗鼠 Caspase-12 抗体 (1: 200) 和兔抗鼠 GAPDH 抗体 (1: 200) 浸泡滤膜, 4℃过夜, 洗涤后加入碱磷酶标记的羊抗兔 IgG (1: 3000), 洗膜后 ECL 化学发光试剂检测。定量分析采用分子生物学图像分析系统测定各目的条带积分灰度值, 所测结果为扣除背景的积分光密度。

1.8 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据分析采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳鼠心肌细胞的培养与鉴定

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, 伸出伪足, 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, 心肌细胞胞浆呈阳性表达 (绿色荧光), 而非心肌细胞胞浆无阳性表达 (图 1)。

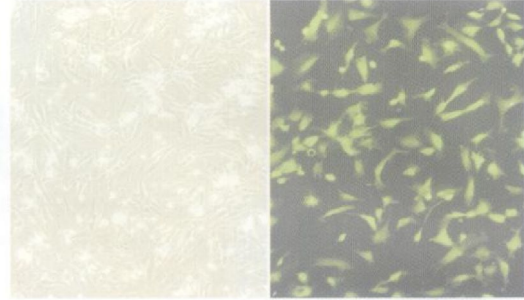


图 1 倒置相差显微镜下观察乳鼠心肌细胞生长 (左, $\times 100$) 及 α -肌动蛋白免疫荧光染色对心肌细胞的鉴定 (右, $\times 100$)

2.2 心肌细胞培养液中乳酸脱氢酶释放量

H_2O_2 组心肌细胞 LDH 释放量较对照组有所增加 ($P < 0.05$), 给予不同浓度脂联素预处理后 LDH 的含量明显降低 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.3 流式细胞术检测心肌细胞凋亡率

用 Annexin V-FITC/PI 对心肌细胞进行双标记染色, 发现对照组细胞集中在 B3 区, 在 B4 区和 B2 区内无分布或分布甚少, 凋亡率极低; H_2O_2 组出现大量凋亡细胞, 并有部分坏死细胞, 其凋亡率与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 不同浓度脂联素处理后, 可见 B2、B4 区细胞分布明显减少, 细胞凋亡率均较 H_2O_2 组明显减少 (表 1 和图 2)。

表 1 心肌细胞培养液中乳酸脱氢酶释放量和心肌细胞凋亡率

分 组	LDH 含量 (U/L)	凋亡率
对照组	353.3 \pm 50.3	1.0% \pm 0.6%
H_2O_2 组	1411.5 \pm 189.7 ^a	70.7% \pm 6.4% ^a
H_2O_2 + 10 mg/L 脂联素组	1144.7 \pm 138.5 ^{ab}	61.8% \pm 4.4% ^{ab}
H_2O_2 + 20 mg/L 脂联素组	914.3 \pm 103.1 ^{ab}	55.3% \pm 3.9% ^{ab}
H_2O_2 + 30 mg/L 脂联素组	686.7 \pm 61.1 ^{ab}	43.6% \pm 3.8% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$ 与 H_2O_2 组相比。

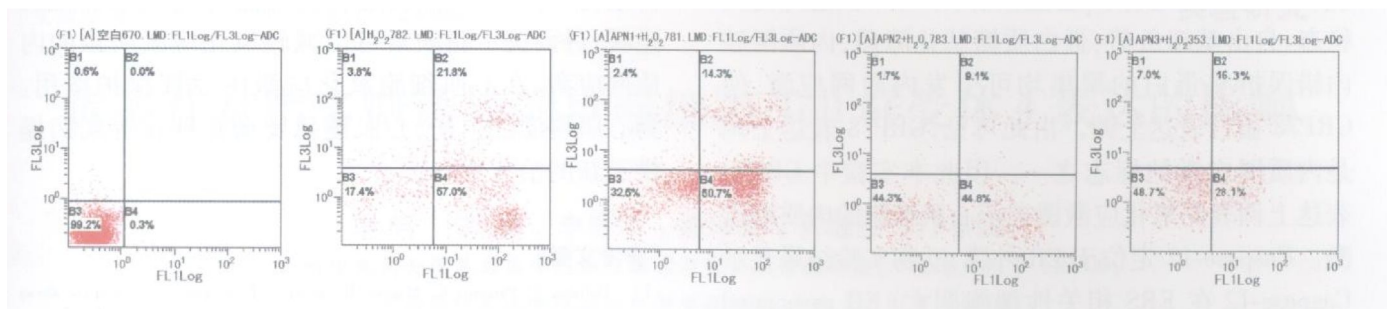


图 2 流式细胞术检测心肌细胞凋亡率 从左到右依次为对照组、H₂O₂ 组、H₂O₂ + 10 mg/L 脂联素组、H₂O₂ + 20 mg/L 脂联素组和 H₂O₂ + 30 mg/L 脂联素组。

2.4 内质网应激指标 GRP78和 Caspase-12的 mRNA 表达

与对照组相比, H₂O₂ 组 GRP78 和 Caspase-12 的 mRNA 表达均明显增加 ($P < 0.05$), 不同浓度脂联素处理后 GRP78 及 Caspase-12 的 mRNA 表达均比 H₂O₂ 组明显降低 ($P < 0.05$, 表 2 和图 3)。

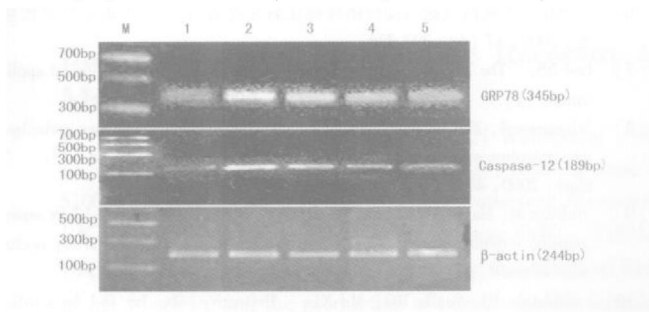


图 3 RT-PCR 检测 GRP78 和 Caspase-12 的 mRNA 表达 M 为 Marker 1 为对照组, 2 为 H₂O₂ 组, 3 为 H₂O₂ + 10 mg/L 脂联素组, 4 为 H₂O₂ + 20 mg/L 脂联素组, 5 为 H₂O₂ + 30 mg/L 脂联素组。

2.5 心肌细胞中 GRP78 和 Caspase-12 的蛋白表达

与对照组相比, H₂O₂ 组 GRP78 及 Caspase-12 蛋白表达均明显增加 ($P < 0.05$), 不同浓度脂联素处理后 GRP78 及 Caspase-12 的蛋白表达与 H₂O₂ 组比均明显降低 ($P < 0.05$, 表 2 和图 4)。

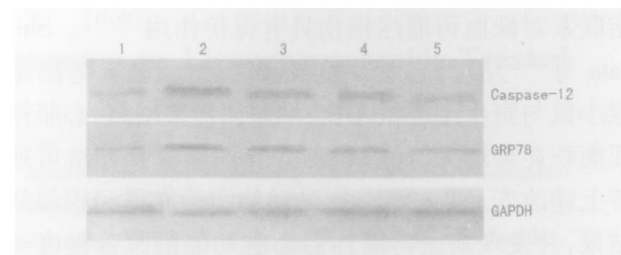


图 4 Western Blotting 检测 GRP78 和 Caspase-12 的蛋白表达 1 为对照组, 2 为 H₂O₂ 组, 3 为 H₂O₂ + 10 mg/L 脂联素组, 4 为 H₂O₂ + 20 mg/L 脂联素组, 5 为 H₂O₂ + 30 mg/L 脂联素组。

表 2 GRP78 和 Caspase-12 的 mRNA 和蛋白表达水平

分组	GRP78		Caspase-12	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
对照组	0.18 ± 0.10	0.37 ± 0.10	0.26 ± 0.06	0.51 ± 0.01
H ₂ O ₂ 组	1.25 ± 0.50 ^a	0.92 ± 0.50 ^a	1.32 ± 0.15 ^a	1.24 ± 0.50 ^a
H ₂ O ₂ + 10 mg/L 脂联素组	1.14 ± 0.04 ^{ab}	0.83 ± 0.04 ^{ab}	1.21 ± 0.04 ^{ab}	0.92 ± 0.04 ^{ab}
H ₂ O ₂ + 20 mg/L 脂联素组	0.95 ± 0.03 ^{ab}	0.73 ± 0.03 ^{ab}	1.05 ± 0.05 ^{ab}	0.73 ± 0.03 ^{ab}
H ₂ O ₂ + 30 mg/L 脂联素组	0.56 ± 0.03 ^{ab}	0.66 ± 0.03 ^{ab}	0.83 ± 0.04 ^{ab}	0.64 ± 0.03 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$ 与 H₂O₂ 组相比。

3 讨论

内质网应激是指由于某种原因导致细胞内质网内稳态失衡、生理功能发生紊乱的一种亚细胞器的病理过程。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, 维持生存。但是过强的或长时间的内质网应激反应可以引起细胞

凋亡。越来越多的研究证实, 内质网应激在许多疾病的发生中起重要作用, 如糖尿病、阿兹海默症、帕金森病、病毒性疾病和癌症等。

葡萄糖调节蛋白 78 / 免疫球蛋白结合蛋白 (glucose-regulated protein 78 / binding immunoglobulin protein, GRP78/BIP) 与内质网应激的调控机制有关^[6]。GRP78 在维持内质网蛋白质合成及正确折

叠和细胞钙稳态方面起重要作用^[7]。细胞内钙失稳态、自由基超负荷、蛋白质糖基化障碍、内质网腔内错误折叠蛋白的聚集均可引发内质网应激,使GRP78蛋白表达上调。由此可见,GRP78表达上调是内质网应激的标志之一。因此本实验中GRP78表达上调表明氧化应激诱导了心肌细胞的内质网应激。Caspase-12定位于ER外膜,动物实验结果显示Caspase-12在ERS相关性细胞凋亡(ER associated death ERAD)中发挥关键作用^[8],Shibata等^[9]报道大脑中动脉腔内栓塞1h再灌注后,Caspase-12的合成活化及定位与死亡的神经细胞一致。

脂联素(adiponectin, APN)是近年来发现的一种主要由脂肪细胞分泌的蛋白质。作为一种胰岛素增敏激素,脂联素可促进骨骼肌细胞的脂肪酸氧化和葡萄糖摄取,抑制肝脏的糖生成,改善胰岛素抵抗,因而具有降低血糖、改善胰岛素抵抗、抗动脉粥样硬化斑块形成和抗炎等特性^[3]。大量研究发现,脂联素对缺血再灌注损伤具有保护作用^[10-11]。Shibata等^[12]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,细胞凋亡率增高,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。Tao等^[11-13]的动物实验亦得到相似的结果,并发现缺血再灌注后心脏功能的改善程度与脂联素的预处理剂量呈正相关。但是脂联素是否通过减轻内质网应激反应来减轻细胞凋亡,目前文献报道较少。

H₂O₂是一类活性氧簇(ROS),它不仅能直接氧化细胞膜上的脂质和蛋白,而且能够自由穿过细胞膜,再灌注过程中产生大量的ROS是心肌缺血再灌注损伤的重要原因,且与动脉粥样硬化发生密切相关^[14]。Motoshina等^[15]证实脂联素可明显抑制颈动脉内皮细胞氧自由基的释放,以及消除氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的氧自由基产物的产生。还有研究^[16]表明脂联素可抑制高糖诱导的血管内皮细胞氧自由基的产生。

在我们的研究中发现脂联素可以减轻H₂O₂氧化应激引起的心肌细胞内质网应激的损伤和凋亡。我们的研究结果显示H₂O₂组LDH的释放量明显增加,内质网应激指标GRP-78和Caspase-12的mRNA及蛋白表达水平显著增强,而脂联素预处理18h后

再进行H₂O₂处理,上述改变均能得到较大程度的逆转,进而提示脂联素可以减轻氧化应激所致的内质网应激,在心肌细胞氧化应激中发挥保护作用。为心肌再灌注损伤、心肌梗死及动脉硬化等疾病提供了新的治疗方向。

[参考文献]

- [1] Delbosc S, Paizanis E, Magous R, et al. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance: the fructose-fed rat [J]. *Atherosclerosis* 2005; **179** (1): 43-49.
- [2] Zhang GC, 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.
- [3] Maeda N, Shimamura I, Kishida K, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30 [J]. *Nat Med* 2002; **8**: 731-737.
- [4] Ohashi K, Kihara S, Ouchi N, et al. Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension [J]. *Hypertension* 2006; **47**: 1108-1116.
- [5] Webster KA, Dickler DJ, Bishopric NH. Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem* 1993; **268** (22): 16852-858.
- [6] 王旭. 内质网应激与动脉粥样硬化研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; **17** (4): 323-326.
- [7] Lee AS. The glucose regulated protein: stress induction and clinical applications [J]. *Trends in Biochemical Sci* 2001; **26**: 504-601.
- [8] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta [J]. *Nature* 2000; **403** (6765): 98-103.
- [9] Shibata M, Hattori H, Sasaki T, et al. Activation of caspase-12 by endoplasmic reticulum stress induced by transient middle cerebral artery occlusion in mice [J]. *Neuroscience* 2003; **118** (2): 491-499.
- [10] Goldstein BJ, Scalia RG, Ma XL. Protective vascular and myocardial effects of adiponectin [J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2009; **6** (1): 27-35.
- [11] Gonon AT, Widgren U, Bulhak A, et al. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via AMP-activated protein kinase, Akt, and nitric oxide [J]. *Cardiovasc Res* 2008; **78** (1): 116-122.
- [12] Shibata R, Sato K, Pimentel DR, et al. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms [J]. *Nat Med* 2005; **11**: 1096-103.
- [13] Tao L, Gao E, Jiao X, et al. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitritative stress [J]. *Circulation* 2007; **115**: 1408-416.
- [14] 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.
- [15] Motoshina H, Wu X, Mahadev K, et al. Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **315**: 264-271.
- [16] Oedraogo R, Wu X, Xu SQ, et al. Adiponectin suppression of high glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway [J]. *Diabetes* 2006; **55**: 1840-846.

(此文编辑 许雪梅)