

内质网应激蛋白 CHOP-10 在缺血缺氧诱导人主动脉内皮细胞损伤中的作用

滕林¹, 杨伟¹, 周飞¹, 姜玉蓉¹, 彭家琴¹, 曹春雨², 李松¹, 丁家望¹, 杨俊¹

(1. 三峡大学第一临床医学院心血管内科; 2. 三峡大学医学院分子生物学研究所, 湖北省宜昌市 443002)

[关键词] C/EBP 同源蛋白 10; 人主动脉内皮细胞; 内质网应激; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨人主动脉内皮细胞(HAEC)在缺血缺氧刺激下内质网应激(ERS)标志蛋白 C/EBP 同源蛋白 10(CHOP-10)的表达变化及意义,并观察阿托伐他汀对上述过程的影响。方法 将传代培养的 HAEC 分为正常对照组、缺血缺氧组、缺血缺氧+CHOP-10 基因沉默组以及缺血缺氧+阿托伐他汀组(0.1 mol/L、1.0 mol/L、10.0 mol/L),缺血缺氧+CHOP-10 基因沉默组采用 CHOP-10 shRNA 下调 CHOP-10 的基因表达;24 h 后采用 RT-PCR 法检测细胞中 CHOP-10 的基因表达,Western blot 法检测 CHOP-10、Caspase-3 和 Caspase-8 的蛋白水平;采用 ELISA 法检测细胞培养液中白细胞介素 6(IL-6)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的浓度;采用 CCK8 法测定细胞增殖活力。结果 与正常对照组相比,HAEC 在缺血缺氧损伤时 CHOP-10 表达明显升高($P<0.01$),细胞分泌炎症因子 IL-6 及 TNF- α 增加($P<0.01$),凋亡蛋白 Caspase-3 和 Caspase-8 表达增加($P<0.01$),细胞增殖活力明显下降($P<0.01$)。阿托伐他汀能呈浓度依赖性地抑制 HAEC CHOP-10 表达,而缺血缺氧+CHOP-10 基因沉默组或缺血缺氧+阿托伐他汀组,炎症介质 IL-6、TNF- α 的分泌也相应减少,细胞凋亡下降,增殖活力明显增加($P<0.01$)。结论 缺血缺氧损伤可引起血管内皮细胞发生 ERS 及炎症反应,导致细胞增殖活力下降,凋亡增加,CHOP-10 基因沉默或应用阿托伐他汀干预可减轻缺血缺氧时 ERS 及炎症反应而对血管内皮细胞产生保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Role of Endoplasmic Reticulum Stress Protein C/EBP Homologous Protein-10 in Ischemia and Hypoxia Induced Human Aortic Endothelial Cells Injury

TENG Lin¹, YANG Wei¹, ZHOU Fei¹, JIANG Yu-Rong¹, PENG Jia-Qin¹, CAO Chun-Yu², LI Song¹, DING Jia-Wang¹, and YANG Jun¹

(1. Department of Cardiology, the First College of Clinical Medical Sciences, China Three Gorges University; 2. Institute of Molecular Biology, Medical College, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

[KEY WORDS] C/EBP Homologous Protein-10; Human Aortic Endothelial Cells; Endoplasmic Reticulum Stress; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of endoplasmic reticulum stress (ERS) marker C/EBP homologous protein-10 (CHOP-10) in the human aortic endothelial cells (HAEC) under the ischemia and hypoxia stress and to study the effects of atorvastatin on the process. **Methods** The cultured HAEC were divided into normal control group, ischemia/hypoxia model group, ischemia/hypoxia plus CHOP-10 shRNA group and ischemia/hypoxia plus atorvastatin treatment group (0.1 mol/L, 1.0 mol/L, 10.0 mol/L). After 24 hours, the expression of CHOP-10 was detected by RT-PCR and the protein levels of CHOP-10, caspase-3 and caspase-8 were measured by Western blot. The levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the supernatant of cell culture medium were measured by ELISA. The CCK-8 test was used to measure cell proliferation. **Results** As compared with that of the control group, the CHOP-10 expression increased significantly in HAEC under the ischemia and hypoxia stress ($P<0.01$), the IL-6 and

[收稿日期] 2015-04-21

[修回日期] 2015-08-03

[基金项目] 湖北省宜昌市科技攻关项目(A14301-02)

[作者简介] 滕林, 博士, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化的发生机制及治疗, E-mail 为 tenglin2255@aliyun.com。杨伟, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化的病理机制, E-mail 为 yamaja@tom.com。通讯作者杨俊, 博士, 主任医师, 研究方向为冠心病的发病机制, E-mail 为 yangjun@medmail.com.cn。

TNF- α level in the supernatant of cell culture medium were significantly higher than those of the control group ($P < 0.01$). And the cells apoptosis increased and proliferation activity decreased significantly under the ischemia and hypoxia stress ($P < 0.01$). The expression of CHOP-10 can be inhibited by atorvastatin in a dose-dependent manner in HAEC under the ischemia and hypoxia stress ($P < 0.01$). Knock down CHOP-10 expression or application of atorvastatin treatment can inhibit cell apoptosis and increase proliferation activity in the cells of the ischemia/hypoxia group ($P < 0.01$). **Conclusions** These findings indicate that ischemia and hypoxia can induce ESR and inflammation in HAEC. CHOP-10 expression up-regulated by ESR can increase cell apoptosis and decrease proliferation activity. Down-regulated CHOP-10 expression or application of atorvastatin treatment can reduce ESR under the ischemia and hypoxia stress and have a protective effect on vascular endothelial cells.

目前认为,动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的形成是众多危险因子损伤内皮而引发的一系列炎症反应,内皮细胞功能障碍不仅是As形成之前的一个早期表现,在其发展过程中也起着极为重要的作用^[1]。此外,血管内皮细胞的损伤也是导致支架内再狭窄(in-stent restenosis, ISR)形成的中心环节^[2],因此,研究血管内皮损伤机制对防治As有着极为重要的临床意义。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ESR)是近年来研究的热点,其在心肌缺血-再灌注损伤及心肌肥大^[3-4]、病毒感染^[5]、肿瘤^[6]、急性肝肾损伤^[7-8]等疾病的发生发展过程中发挥着重要的作用,同样ESR也参与血管的形成和调节过程^[9]。C/EBP同源蛋白10(C/EBP homologous protein-10, CHOP-10),又称生长抑制DNA损伤基因153(growth arrest and DNA damage-inducible gene 153, GADD153),是ESR特异性的转录因子,可诱导产生DNA生长停滞性损害^[10],其表达量的高低与心肌缺血-再灌注损伤和心肌肥大的严重性密切相关^[3-4]。在As病理过程中,血管内皮细胞是否高表达CHOP-10以及是否通过ERS机制引起血管内皮损伤目前国内外尚未见报道。因此本研究拟通过建立人主动脉内皮细胞(HAEC)缺血缺氧损伤模型模拟As时血管内皮损伤变化,观察ESR标志蛋白CHOP-10的表达、炎症细胞因子白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平变化及其与细胞凋亡及增殖的关系,初步探讨ESR在As的作用,为其防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

HAEC(ATCC); CHOP-10抗体、CHOP-10 shRNA(m) Lentiviral Particles、Control shRNA(m) Lentiviral Particles、Polybrene、Caspase-3及Caspase-8(Santa Cruz公司);HRP标记二抗IgG(北京中杉金

桥生物技术有限公司);阿托伐他汀原粉(辉瑞制药有限公司);Total DNA/RNA Protein Kit(OMEGA公司);反转录第一链cDNA合成试剂盒(上海天根生物有限公司);PCR试剂盒及DNA分子量标准(Takara公司);Goldview(Biotium公司);胰蛋白酶(华美生物工程公司);胎牛血清、DMEM培养基(Gibco-BRL公司);CCK8(Dojindo公司);IL-6及TNF α ELISA试剂盒(武汉博士德生物公司)。

1.2 HAEC的培养与传代

将HAEC转至培养瓶,吸弃原培养液,加入3 mL的PBS洗涤2次,后加入0.25%胰蛋白酶400 L,37℃孵育消化3~5 min,将培养瓶置于倒置显微镜下观察,看到细胞变圆、漂浮且细胞间隙增大后,加入含10%胎牛血清DMEM培养液5 mL终止消化。用移液器反复轻轻吹打细胞,制成单细胞悬液,转移至15 mL无菌离心管中。1000 r/min离心5 min,弃上清。加入6 mL细胞培养液,吹打混匀。按1:3的比例分装至新的培养瓶中,补加适量的培养液至总体积约为5 mL。将培养瓶放入37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养,每天观察细胞培养液情况,待细胞生长至铺满约80%瓶底,接近融合状态时用0.25%胰蛋白酶消化进行传代,每日显微镜下观察细胞生长情况,取3~6代细胞用于实验。

1.3 缺血缺氧模型的复制及分组

实验分组如下:(1)正常对照组:细胞正常条件培养24 h(37℃、95%O₂、5%CO₂);(2)缺血缺氧组:细胞去血清培养,置于细胞缺氧培养箱内培养24 h(93%N₂、2%O₂、5%CO₂,培养液氧分压为53 mm-Hg);(3)缺血缺氧+CHOP-10基因沉默组:采用CHOP-10 shRNA转染HAEC后细胞去血清培养,置于细胞缺氧培养箱内培养24 h;(4)缺血缺氧+阿托伐他汀组:细胞去血清培养,加入不同浓度的阿托伐他汀(0.1、1.0、10 mol/L)后,置于细胞缺氧培养箱内培养24 h。

1.4 RT-PCR检测CHOP-10 mRNA的表达

培养HAEC消化后,用Trizol试剂抽提总RNA,

取总 RNA 5 L, 在 20 L 逆转录体系中合成 cDNA, 以 5 L cDNA 为模板加入靶基因上下游引物, 在 50 L 体系中进行 PCR 扩增。CHOP-10 引物序列如下: 上游引物 5'-CTTGGCTGACTGAGGAGGAG-3', 下游引物 5'-TCTGGGAAAGGTGGGTAGTG-3'; β -actin 上游引物 5'-GGCATCCTCACCCTGAAGTA-3', 下游引物 5'-TAATGTCACGCACGATTTC-3'。

1.5 ELISA 法检测细胞培养液中 IL-6 及 TNF- α 的表达

按照试剂盒说明书操作, 试剂盒平衡至室温, 配置工作液, 加入 100 L 标准品、血清于反应板孔中, 温育 120 min, 洗涤 5 次; 每孔加入 50 L $1 \times$ Biotin, 温育 60 min, 洗涤 5 次; 每孔加入 100 L $1 \times$ HRP, 温育 60 min, 再洗涤 5 次; 每孔加入 100 L 的底物工作液, 暗处温育 5 min; 每孔加入 50 L 终止液, 492 nm 处读 OD 值; 以 OD 值为纵坐标, 以标准品浓度为横坐标, 绘制标准曲线; 根据 OD 值在标准曲线上查出相应的浓度。

1.6 Western blot 法检测 HAEC 中 CHOP-10、Caspase-3 及 Caspase-8 的蛋白表达

培养的 HAEC 加入蛋白裂解液及 PMSF, 冰上放置 40 min, 4°C 下 12000 r/min 离心 40 min, 取上清。以 BSA 为标准, 用 Bradford 法对上清进行蛋白定量。取 20 g 蛋白样品, 10% SDS-PAGE 电泳, 100 V 转移 1 h 至硝酸纤维素薄膜, 放入封闭液中 37°C 封闭 1 h; 一抗 4°C 过夜。反复洗膜后, 将膜与碱性磷酸酶 (AP) 标记的抗 IgG 抗体孵育, 室温轻摇 1 h, 洗膜后, 用 Western blot 印迹观察, 用图像分析测定各带吸光度 (A) 值作定量分析。

1.7 CCK-8 检测细胞活力

培养的 HAEC 制备成细胞悬液, 在 96 孔板中接种细胞悬液 (200 L/孔, 5×10^3 /孔), 每孔 5 个复孔。分为正常对照组、缺血缺氧组、缺血缺氧+CHOP-10 shRNA 组及缺血缺氧+阿托伐他汀组, 根据不同的条件培养 24 h, 吸去孔内上清液, 每孔加入 100 μL CCK-8 溶液, 将培养板放在培养箱内 37°C 孵育 2 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值 (OD)。

1.8 CHOP-10 shRNA 基因表达沉默

第 1 天: 细胞种 6 孔板, 每孔 2 mL 完全培养基过夜培养, 细胞汇合度达 50%; 第 2 天: 去掉孔内旧的培养液, 每孔加入 2 mL polybrene/完全培养基混合液。冰上溶解 lentiviral particles, 轻混, 每孔加入 30 L 混匀, 细胞培养过夜; 第 3 天: 去除孔内培养基, 每孔加入 2 mL 完全培养基 (不含 polybrene), 细胞培养过夜; 第 4 天: 为了保证稳定的克隆表达

shRNA, 细胞 1:3 传代, 继续在完全培养基中培养 24 h; 第 5~6 天: 运用嘌呤霉素筛选稳定的克隆表达 shRNA 的细胞, 去除未转染的细胞。去除培养基, 加入含有嘌呤霉素的培养基, 继续培养, 鉴定及后续实验。

1.9 统计学处理

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS10.0 软件做统计学分析, 组间数据比较采用方差分析及相关分析, 均数间两两比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺血缺氧诱导的 HAEC 内 CHOP-10 的表达变化

正常对照组 HAEC 内 CHOP-10 mRNA 表达较少, 缺血缺氧组 CHOP-10 mRNA 表达较正常对照组明显增多 (图 1)。Western blot 结果也显示, 正常对照组 CHOP-10 蛋白很少, 缺血缺氧的情况下 HAEC 内 CHOP-10 蛋白的水平明显增多 ($P < 0.01$) (图 2), 该结果与 CHOP-10 mRNA 表达基本一致。阿托伐他汀可呈剂量依赖性地抑制缺血缺氧诱导的 HAEC 中 CHOP-10 蛋白表达。0.1 mol/L 阿托伐他汀组 CHOP-10 蛋白浓度与缺血缺氧组比较轻度下降, 但无统计学意义 ($P > 0.05$); 而 1.0 mol/L 和 10.0 mol/L 阿托伐他汀组 CHOP-10 的蛋白水平均较缺血缺氧组明显减少 ($P < 0.01$; 图 2)。

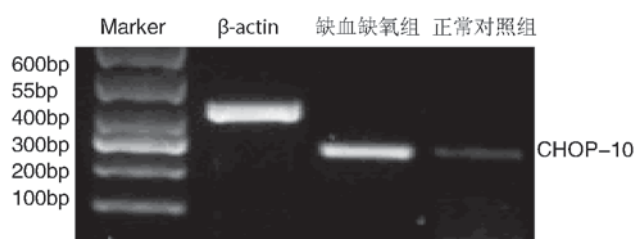


图 1. 缺血缺氧诱导的人主动脉内皮细胞 CHOP-10 的 mRNA 表达变化

Figure 1. mRNA expression of CHOP-10 in HAEC induced by ischemia and hypoxia

2.2 CHOP-10 对缺血缺氧诱导的 HAEC TNF- α 及 IL-6 水平的影响

正常对照组细胞培养液 TNF- α 和 IL-6 水平很低, 缺血缺氧组细胞培养液中 TNF- α 和 IL-6 的分泌量较正常对照组明显增多 ($P < 0.01$); CHOP-10 基因沉默可明显减少缺血缺氧诱导的 HAEC 分泌

TNF- α 和 IL-6 的水平 ($P<0.01$); 同样, 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀可明显抑制缺血缺氧诱导的 HAEC 分泌 TNF- α 和 IL-6 的水平 ($P<0.01$; 表 1)。

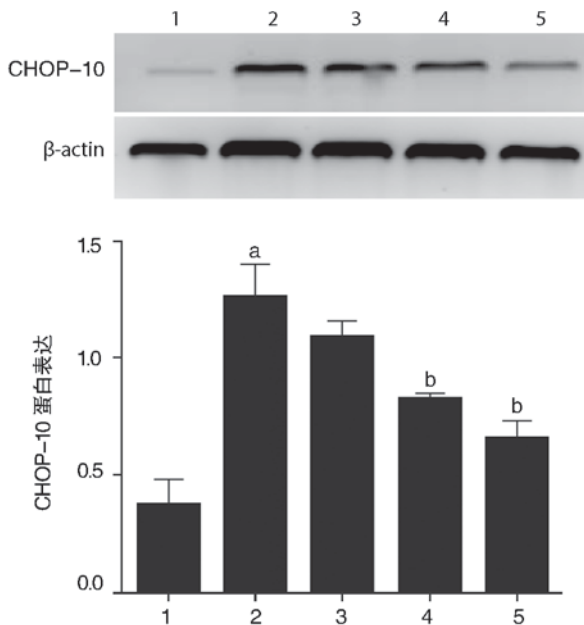


图 2. 缺血缺氧诱导的人主动脉内皮细胞 CHOP-10 的蛋白表达变化 1 为正常对照组, 2 为缺血缺氧组, 3 为缺血缺氧 + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组, 4 为缺血缺氧 + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组, 5 为缺血缺氧 + 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组。a 为 $P<0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与缺血缺氧 + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组比较。

Figure 2. Protein expression of CHOP-10 in HAEC induced by ischemia and hypoxia

表 1. 各组细胞外液 TNF- α 和 IL-6 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g/L}$)

Table 1. Comparison of TNF- α and IL-6 concentration in the supernatant of cell culture medium in different groups ($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g/L}$)

分 组	TNF- α	IL-6
正常对照组	14.87 \pm 4.14	15.91 \pm 5.3
缺血缺氧组	35.15 \pm 2.95 ^a	40.56 \pm 3.44 ^a
缺血缺氧+CHOP-10 基因沉默组	23.50 \pm 1.67 ^{ab}	26.38 \pm 4.21 ^{ab}
缺血缺氧+阿托伐他汀组	22.26 \pm 2.86 ^{ab}	23.56 \pm 3.63 ^{ab}

a 为 $P<0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与缺血缺氧组比较。

2.3 CHOP-10 对缺血缺氧诱导的 HAEC 凋亡蛋白的影响

Western blot 结果显示, 正常对照组 HAEC 可见少量的 Caspase-3 和 Caspase-8 表达, 缺血缺氧组 Caspase-3 和 Caspase-8 表达较正常对照组明显增多。与缺血缺氧组比较, CHOP-10 基因沉默可明显降低缺血缺氧诱导的细胞 Caspase-3 和 Caspase-8 的

表达。同样应用 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀干预后, Caspase-3 和 Caspase-8 的蛋白水平均较缺血缺氧组明显减少 ($P<0.01$; 图 3 和表 2)。

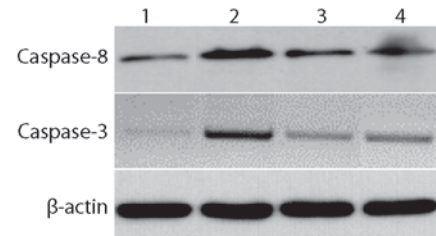


图 3. Western blot 检测各组凋亡蛋白 Caspase-3 和 Caspase-8 表达 1 为正常对照组, 2 为缺血缺氧组, 3 为缺血缺氧 + CHOP-10 基因沉默组, 4 为缺血缺氧 + 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组。

Figure 3. The protein expression of caspase-3 and caspase-8 were detected by Western blot in different groups

表 2. 各组凋亡蛋白 Caspase-3 和 Caspase-8 表达相对值的比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2. Comparison of the relative expression of caspase-3 and caspase-8 in different groups ($\bar{x}\pm s$)

分 组	Caspase-8	Caspase-3
正常对照组	0.43 \pm 0.08	0.12 \pm 0.02
缺血缺氧组	1.19 \pm 0.10 ^a	1.44 \pm 0.17 ^a
缺血缺氧+CHOP-10 基因沉默组	0.73 \pm 0.11 ^{ab}	0.52 \pm 0.09 ^{ab}
缺血缺氧+阿托伐他汀组	0.63 \pm 0.10 ^{ab}	0.77 \pm 0.14 ^{ab}

a 为 $P<0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与缺血缺氧组比较。

2.4 CHOP-10 对缺血缺氧诱导的 HAEC 增殖活力的影响

与正常对照组相比, 在缺血缺氧的诱导下, HAEC 增殖活力明显降低, 差异有显著性 ($P<0.01$), 而 CHOP-10 基因沉默可明显增加缺血缺氧诱导的细胞增殖活力 ($P<0.01$), 应用 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀干预后也可明显增加细胞的增殖活力 ($P<0.01$; 表 3)。

表 3. CHOP-10 对缺血缺氧诱导的人主动脉内皮细胞增殖活力的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3. Role of CHOP-10 in cell activity in HAEC induced by ischemia and hypoxia ($\bar{x}\pm s$)

分 组	细胞活力
正常对照组	1.62 \pm 0.02
缺血缺氧组	0.39 \pm 0.06 ^a
缺血缺氧+CHOP-10 基因沉默组	0.92 \pm 0.08 ^{ab}
缺血缺氧+阿托伐他汀组	1.06 \pm 0.09 ^{ab}

a 为 $P<0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与缺血缺氧组比较。

3 讨 论

内皮细胞损伤等所导致的分泌功能失调和平滑肌细胞的异常增殖而引起的血管腔狭窄和痉挛是 As 等多种血管疾病发生发展的共同病理基础^[11]。内皮细胞损伤破坏了血管收缩和舒张调节平衡,导致其渗透性增加,血小板聚集,白细胞粘连及炎性细胞因子的分泌增加等,加剧了 As 病变^[12]。缺血缺氧是导致血管内皮功能异常的重要因素,它产生的活性氧使内皮细胞发生功能障碍,影响血管壁细胞的生长和凋亡^[13]。另外,缺血缺氧可抑制内源性舒张因子一氧化氮的生成,引起内皮素 1、血栓素 A2、氧自由基或前列环素 H2 的释放,从而产生致炎性、致血栓性、致血管收缩性和致细胞增殖性等一系列致 As 病理改变^[14]。因此,研究 As 时血管内皮损伤的机制,保持血管内皮的结构与功能的完整性,对内皮细胞的多环节、多靶点保护成为近年来研究的热点。

ESR 是细胞的一种自我保护机制,作为一种亚细胞器上的应激,能够在细胞层面上反应多种疾病的病理过程^[15]。适度的应激通过激活未折叠的蛋白反应,暂时抑制蛋白质的合成,促进蛋白正确折叠,恢复内质网稳态,维持细胞的活力;但是过强或者过长时间的应激则导致细胞凋亡。越来越多的研究表明,未折叠蛋白反应和炎症中的信号通路通过各种机制相互关联,这些机制包括产生活性氧簇(ROS),激活 NF- κ B 和 c-Jun 氨基末端激酶(JNK),从而导致细胞内质网钙渗漏和自由基相互促进而引发炎症^[16]。在 IRE1 α 基因敲除的小鼠胚胎成纤维细胞中,ERS 诱导的 NF- κ B 激活和炎症因子 TNF- α 的产生明显减少^[17]。CHOP-10/GADD153 是 CCAAT 增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer-binding proteins, C/EBP)家族成员之一,是参与调控细胞周期和细胞凋亡的一种转录因子,作为重要的 ESR 反应调控蛋白,CHOP-10 在介导多种细胞应答机制如细胞分化和增殖、免疫应答和炎症反应中发挥了重要的作用^[18-19]。在生理条件下,CHOP-10 在组织和细胞内的表达很低,但在传感和效应蛋白包括 IRE1、ATF6 和 PERK 等的调控下,CHOP-10 迅速被激活并且表达量出现上调^[20]。最近研究发现,缺血和缺氧也能够通过低氧诱导因子(HIF-1 α)上调 CHOP-10 的 mRNA 和蛋白表达^[21]。Tajiri 等^[22]人发现在缺血诱导的小鼠神经元凋亡过程中存在 CHOP-10 的显著上调,但 CHOP-10 基因缺陷小鼠在

双侧颈总动脉闭塞后并未出现显著的神经元凋亡。更重要的是,以大鼠胚胎心肌细胞 H9c2 为模型,缺氧显著增强了 CHOP-10 的表达水平,与此一致的是,瞬时转染 siRNA-CHOP-10 后则抑制了 H9c2 细胞的凋亡^[23]。

本研究发现在正常条件下,HAEC 中仅见极少的 CHOP-10 表达,在缺血缺氧刺激后细胞内 CHOP-10 基因表达及蛋白表达均明显增加。进一步研究发现,随着 CHOP-10 的高表达,HAEC 分泌炎症介质 TNF- α 、IL-6 的水平也相应增加,而采用基因沉默技术下调 CHOP-10 的表达后,伴随着细胞因子的释放减少。由于 Caspase-3 和 Caspase-8 是多种凋亡途径的共同下游效应部分,也是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路^[24],因此本实验中采用 Caspase-3 和 Caspase-8 作为凋亡指标。研究中我们发现,在缺血缺氧的刺激下,随着 CHOP-10 水平的升高,HAEC 增殖活力明显降低,细胞凋亡明显增多,而 CHOP-10 基因沉默后可明显减少缺血缺氧诱导的细胞凋亡数目,促进细胞活力。研究表明缺血缺氧损伤可引起血管内皮细胞发生 ESR 及炎症反应,通过上调 ESR 蛋白 CHOP-10 的表达,抑制细胞的增殖活力,促进细胞凋亡。

他汀类药物除了可降低血浆中及组织内总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平,还有其他非调脂作用如改善血管内皮功能、抑制炎症介质的释放及血小板的聚集、稳定动脉粥样硬化斑块、抗氧化应激、抗有丝分裂、抑制细胞增殖以及免疫调节等多效性,目前被认为是治疗冠心病及预防冠状动脉成形术后再狭窄的理想药物^[25]。近来的实验室及临床研究发现,不同的他汀均可保护血管内皮及防治 PCI 术后再狭窄,这提示他汀类药物的类效应而非药物特异性^[26-27]。但他汀类药物保护血管内皮的机制以及是否通过影响 ESR 来产生血管内皮保护作用目前尚无定论。本研究首次检测了在缺血缺氧条件下阿托伐他汀对 HAEC 中 CHOP-10 表达的影响。结果证实,阿托伐他汀呈剂量依赖性明显减少 HAEC 在缺血缺氧诱导下的 CHOP-10 蛋白水平,降低细胞炎性细胞因子 IL-6 及 TNF- α 的分泌,减轻炎症反应,增加细胞活力,减少细胞凋亡,实验结果提示阿托伐他汀在缺血缺氧条件下对 HAEC 的保护可能部分是通过抑制 CHOP-10 的表达来实现的,说明其可能通过减轻细胞 ESR 及炎症反应而对血管内皮细胞产生保护作用。

综上所述,我们推测在缺血缺氧的情况下,通过上调 CHOP-10 表达,血管内皮细胞 ESR 被激活,

引起大量炎症因子的释放,导致细胞增殖活力下降,细胞凋亡增多。ESR 可能是 As 血管内皮损伤发生的重要机制;而应用他汀类药物可通过调节 ESR 及炎症反应水平起到保护血管内皮细胞的作用,当然其具体的作用机制有待更深一步研究。

[参考文献]

- [1] Zaina S, Lund G. Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins-epigenetics and oxidation in atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2014, 25(3): 235-236.
- [2] Linden F, Domschke G, Erbel C, et al. Inflammatory therapeutic targets in coronary atherosclerosis-from molecular biology to clinical application[J]. *Frontiers in Physiol*, 2014, 5: 455.
- [3] Cheng WP, Wang BW, Shyu KG. Regulation of GADD153 induced by mechanical stress in cardiomyocytes [J]. *Eur J Clin Invest*, 2009, 39(11): 960-971.
- [4] Lee MJ, Kwak YK, You KR, et al. Involvement of GADD153 and cardiac ankyrin repeat protein in cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Exp Mol Med*, 2009, 41(4): 243-252.
- [5] Liao Y, Fung TS, Huang M, et al. Upregulation of CHOP/GADD153 during coronavirus infectious bronchitis virus infection modulates apoptosis by restricting activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway [J]. *J Virol*, 2013, 87(14): 8124-134.
- [6] Komatsu S, Miyazawa K, Moriya S, et al. Clarithromycin enhances bortezomib-induced cytotoxicity via endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP (GADD153) induction and autophagy in breast cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(4): 1029-039.
- [7] Carlisle RE, Brimble E, Werner KE, et al. 4-Phenylbutyrate inhibits tunicamycin-induced acute kidney injury via CHOP/GADD153 repression[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84663.
- [8] Rao J, Zhang C, Wang P, et al. C/EBP homologous protein (CHOP) contributes to hepatocyte death via the promotion of ERO1 α signalling in acute liver failure[J]. *Biochem J*, 2015, 466(2): 369-378.
- [9] Igase M, Okura T, Nakamura M, et al. Role of GADD153 (growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153) in vascular smooth muscle cell apoptosis[J]. *Clin Sci*, 2001, 100(3): 275-281.
- [10] Xu X, Liu T, Zhang A, et al. Reactive oxygen species-triggered trophoblast apoptosis is initiated by endoplasmic reticulum stress via activation of caspase-12, CHOP, and the JNK pathway in *Toxoplasma gondii* infection in mice[J]. *Inf Immun*, 2015, 83(4): 1735.
- [11] Phinikaridou A, Andia ME, Shah AM, et al. Advances in molecular imaging of atherosclerosis and myocardial infarction: shedding new light on in vivo cardiovascular biology[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(12): H1397-410.
- [12] Current World Literature. Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2013, 24(5): 444-448.
- [13] Kurtoglu Gumusel H, Catakoglu AB, Yildirimturk O, et al. Relationship between endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors and the extent and severity of coronary artery disease[J]. *Turk Kardiyol Dern Ars*, 2014, 42(5): 435-443.
- [14] Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2010, 7(2): 77-86.
- [15] Sun Y, Zhang T, Li L, et al. Induction of apoptosis by hypertension via endoplasmic reticulum stress[J]. *Kid Blood Press Res*, 2015, 40(1): 41-51.
- [16] Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, et al. ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression[J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18(10): 589-598.
- [17] Hu P, Han Z, Couvillon AD, et al. Autocrine tumor necrosis factor α links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(8): 3071-084.
- [18] Li Y, Guo Y, Tang J, et al. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2015, 47(2): 146-147.
- [19] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4): 381-389.
- [20] Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(9): 663-674.
- [21] Yang X, Du T, Wang X, et al. IDH1, a CHOP and C/EBP β -responsive gene under ER stress, sensitizes human melanoma cells to hypoxia-induced apoptosis[J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(2): 201-210.
- [22] Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, et al. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4): 403-415.
- [23] Han XJ, Chae JK, Lee MJ, et al. Involvement of GADD153 and cardiac ankyrin repeat protein in hypoxia-induced apoptosis of H9c2 cells[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(24): 23122-129.
- [24] Zhao Y, Lei M, Wang Z, et al. TCR-induced, PKC- θ -mediated NF- κ B activation is regulated by a caspase-8-caspase-9-caspase-3 cascade[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 526-531.
- [25] Opie LH. Present status of statin therapy[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2015, 25(3): 216-225.
- [26] Martin SS, Blaha MJ, Blankstein R, et al. Dyslipidemia, coronary artery calcium, and incident atherosclerotic cardiovascular disease: implications for statin therapy from the multi-ethnic study of atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2014, 129(1): 77-86.
- [27] Navarese EP, Kowalewski M, Andreotti F, et al. Meta-analysis of time-related benefits of statin therapy in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention [J]. *Am J Cardiol*, 2014, 113(10): 1753-764.

(此文编辑 许雪梅)