

基因调控

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000155

葡萄糖调节蛋白 78 在大鼠肠缺血再灌注损伤中的表达及其意义

徐 浩, 李 洋, 王继见, 刘光艺, 顾海涛

(重庆医科大学附属第二医院胃肠外科, 重庆 400010)

【摘要】目的:观察大鼠肠缺血再灌注损伤(intestine ischemia reperfusion injury, IIRI)过程中肠黏膜的组织损伤和细胞凋亡及内质网(endoplasmic reticulum, ER)分子伴侣葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78 kD, GRP78)的表达变化,并探讨 ER 应激在肠 IIRI 中的作用及机制。**方法:**45 只雄性 SD 大鼠随机分成 9 组:缺血再灌注 0、1、3、6、12、24、48、72 h 组,以及假手术对照组,每组 5 只。实验组均用无创性动脉夹夹闭肠系膜上动脉 1 h 后实施再灌注来建立再灌注模型,假手术组仅游离肠系膜上动脉,不夹闭。然后采用 HE 染色观察肠黏膜变化, TUNEL 法检测细胞凋亡, Western blot 和 RT-PCR 检测 GRP78 表达。**结果:**缺血再灌注后,肠黏膜损伤程度及细胞凋亡指数随再灌注时间延长而增加,于再灌注 3 h 达峰值(与其他各组比较均 $P < 0.001$);再灌注后,GRP78 的表达明显增加,于 1 h 达第 1 个小高峰(与 0 h 组和 3 h 组比较 $P < 0.05$),但随再灌注时间的延长,表达量逐步减少,再灌注 12 h 后开始回升(与 6 h 组比较 $P < 0.004$),于 24 h 达峰值(与其他各组比较均 $P < 0.05$),72 h 降至对照组水平(与假手术对照组比较 $P > 0.069$)。**结论:**GRP78 在大鼠肠缺血再灌注过程中表达变化,可能与其对肠 IIRI 保护机制有关。

【关键字】葡萄糖调节蛋白 78;小肠;缺血再灌注;细胞凋亡

【中图分类号】R322.45;R656.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-10-07

Expression and significance of glucose regulated protein 78 kD in rats with intestine ischemia-reperfusion injury

Xu Hao, Li Yang, Wang Jijian, Liu Guangyi, Gu Haitao

(Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the intestinal tissue injury, epithelial cell apoptosis and changes of glucose regulated protein 78 kD (GRP78) expression in the intestine ischemia-reperfusion rats and to investigate the possible effect and mechanism of endoplasmic reticulum stress in the ischemic process. **Methods:** Forty-five SD rats were randomly divided into 9 groups: sham control group and 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 h groups after ischemia reperfusion ($n=5$). An experimental model of intestinal ischemia-reperfusion in rats was established by the occlusion of superior mesenteric artery for 1 h by small atraumatic clip and sham control animals were prepared in the same way without the occlusion of superior mesenteric artery. Intestinal tissue injury severity was tested by HE assay, apoptosis of epithelial cells was measured by TUNEL method and expression of GRP78 in intestinal tissue was detected by Western blot and RT-PCR. **Results:** HE assay and TUNEL showed that the tissue injury and apoptotic index of intestinal mucosa were gradually elevated with the increasing of reperfusion time and reached a peak at 3 h ($P < 0.01$ compared with those in the other groups). Expression of GRP78 was increased after the reperfusion, reached a first small peak at 1 h ($P < 0.05$ compared with those in 0 h and 3 h groups), but dropped down with the prolonging of reperfusion time, rose again at 12 h ($P < 0.004$ compared with those in 6 h group), reached the peak again at 24 h ($P < 0.05$ compared with those in the other groups) and fell to the level of control group ($P > 0.069$ compared with those in control group). **Conclusion:** Changes of GRP78 expression might be associated with the endogenous protective mechanisms.

【Key words】glucose regulated protein 78 kD; intestine; ischemia-reperfusion; cell apoptosis

作者介绍: 徐 浩, Email: xuhao18091986@126.com,

研究方向: 胃肠道疾病临床与基础。

通信作者: 李 洋, Email: liyang_68813@126.com。

基金项目: 重庆市卫生局科研资助项目 (编号: 2012-2-059)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000155.html>

葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78 kD,GRP78)是位于内质网(endoplasmic reticulum,ER)上的一种重要分子伴侣,又称免疫球蛋白重链结合蛋白(immunoglobulin heavy chain binding protein,Bip),属热休克蛋白 70家族的一员^[1]。众多研究发现^[2-4],其在心、脑、肝、肾等重要脏器的缺血再灌注中,起到维持 ER 的稳定、保护细胞的作用。而肠道作为缺血反应最敏感的器官之一,其缺血再灌注损伤(intestine ischemia reperfusion injury,IIRI),可能诱发全身炎症反应综合征,引起多器官功能障碍综合征和多器官衰竭^[5]。但关于 GRP78 在肠缺血再灌注中的作用研究极少,故本研究通过建立大鼠小肠缺血再灌注模型,观察肠缺血再灌注后其表达变化,并探讨其对再灌注后肠黏膜细胞凋亡的影响及机制,以期 IIRI 的临床干预性治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

TUNEL 试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司),GRP78 抗体(美国 Bioworld technology),Tubulin 内参(武汉三鹰生物技术有限公司),全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 发光化学试剂盒(碧云天生物技术研究),PCR 引物(生工),RNA 提取试剂盒(TakaRa 公司)。

1.2 实验动物分组及模型制备

SPF 清洁级雄性 SD 大鼠 45 只(购于重庆医科大学实验动物中心),体质量 250~300 g。随机分成 9 组:缺血再灌注 0、1、3、6、12、24、48、72 h 组,以及假手术对照组,每组 5 只大鼠。所有动物手术前均禁食 12 h,自由饮水,用 4%水合氯醛 1 ml/100 g 腹腔注射麻醉后开腹,暴露出肠系膜上动脉,假手术组仅单纯游离而不夹毕,缺血再灌注组以无创性动脉夹毕 60 min 造成肠缺血,缺血后松开动脉夹进行再灌注,若 10 min 内肠灌注后颜色由暗黑转为红润,表明灌注成功,则逐层缝合腹膜、腹直肌前鞘及皮肤,分别于再灌注 0、1、3、6、12、24、48、72 h 时间点活杀,取距回盲部 10 cm 处肠段约 6 cm,生理盐水充分冲洗洗净肠内容物,断成分 2 份,1 份用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,行 TUNEL 染色,另 1 份置于-80 ℃低温冰箱保存备检。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 普通光镜组织学观察 标本在 4%多聚甲醛固定 24 h 后,经梯度酒精系列脱水,常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片并进行 HE 染色,在光镜下进行组织病理学观察。肠黏膜损伤程度评分:采用 Chiu 氏评分法^[6]判断肠黏膜损伤程度:0 分为正常黏膜绒毛;1 分为绒毛顶端上皮间隙增大,毛细血管充血;2 分为上皮层与固有层中度分离;3 分为绒毛两侧亦有

大量分离伴部分绒毛顶端破损;4 分为绒毛破损伴固有层毛细血管暴露;5 分为固有层破坏、出血、溃疡;6 分为隐窝基底层损伤;7 分为肠黏膜全程坏死;8 分为肠壁全层坏死。

1.3.2 肠黏膜细胞凋亡检测 步骤按 TUNEL 试剂盒说明书进行,以胞核呈棕黄色者为阳性。400 倍高倍视野下随机取 5 个绒毛隐窝视野,计数每 100 个细胞中凋亡细胞数为凋亡指数(apoptosis index,AI),取所有视野均值为每只动物的 AI。

1.3.3 Western blot 检测 将备好的标本用细胞裂解液提取蛋白;Bradford 方法测蛋白浓度,调节蛋白浓度一致,取等量蛋白样品(30 μg),SDS-PAGE 电泳分离蛋白,湿法将蛋白条带转移至 PVDF 膜上,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭 1 h,1:1 000 稀释一抗-4 ℃孵育过夜;洗涤后 1:3 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 室温孵育 2 h;洗涤后,显色剂 ECL 曝光,显影,定影,以 Tubulin 为内参照。对结果进行吸光度扫描分析,并按公式相对灰度比值=(目的条带表达灰度值/Tubulin 表达灰度值)×100%计算出相对灰度比值。

1.3.4 RT-PCR 检测 采用 Trizol 一步法提取肠组织总 RNA,取 2 g 总 RNA 进行逆转录反应,取 2 μl 逆转录产物进行 PCR,反应体系总体积为 100 μl。 β -actin 上游引物为 5'-CCACTGGCATCGTGATGGAC-3',下游引物为 5'-GCGGA-TGTCCACGTCACACT-3',扩增的目的片段长度为 450 bp。GRP78 上游引物为 5'-TATTGAACTGTGGGAGGTGTC-3',下游引物为 5'-ATTGTTACGGTGGGCTGATTAT-3',扩增的目的片段长度为 114 bp。PCR 反应总共进行 38 个循环,94 ℃ 5 min 1 个循环(94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s)。反应完成后取 10 μl PCR 产物在琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下观察 RT-PCR 扩增产物,采用凝胶图像分析系统测定目的条带的光密度,以 β -actin 为内参,计算 GRP78 mRNA 的相对表达量(相对值=目的条带表达强度/ β -actin 表达强度 × 100%)。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行,各组数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行多组间比较,组间两两比较采用 LSD-*t* 或 Tamhane 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 普通光镜组织学观察

假手术对照组肠黏膜正常,显示规则的绒毛;再灌注 0、1 h 组大部分肠黏膜绒毛上皮层与固有层中重度分离,伴绒毛顶端破损,毛细血管充血明显,腺体排列紊乱,部分腺体受损;再灌注 3、6 h 组肠黏膜绒毛上皮成块脱落,固有层破坏、出血、溃疡,腺体破坏严重;再灌注 12、24 h 组组织显著水肿,肠黏膜绒毛不规则再生,绒毛上皮细胞呈立方状,毛细血管淤血,部分腺体亦轻度受损;再灌注 48、72 h 组小肠黏膜基本接近正常。病理组织损伤评分于 3 h 最高(与 6 h 组比较 $P=0.000$)。见图 1 及表 1。

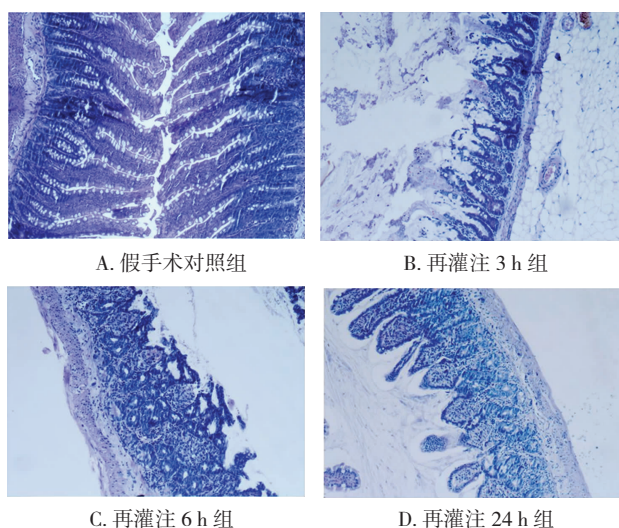


图 1 4 组肠黏膜 HE 染色 (200 ×)

Fig.1 HE staining of intestinal mucosa in four groups (200 ×)

表 1 小肠缺血再灌注不同时间组织损伤评分、上皮细胞 AI 及 GRP78 表达灰度比值

Tab.1 Changes of histologic injure grade, AI and expression of GRP78 in intestine during reperfusion

分组	组织损伤 评分	AI (%)	蛋白相对表 达量 (%)	mRNA 相对表 达量 (%)
0 h	2.20 ± 0.42	24.84 ± 6.65	18.09 ± 1.42	85.33 ± 1.53
1 h	3.10 ± 0.32	34.88 ± 6.10	22.63 ± 1.70	91.67 ± 2.52
3 h	5.70 ± 0.48 ^a	51.68 ± 8.38 ^a	15.57 ± 0.59	88.33 ± 1.53
6 h	4.10 ± 0.32	42.32 ± 4.89	9.93 ± 2.45	85.00 ± 2.00
12 h	2.80 ± 0.42	28.04 ± 5.58	19.97 ± 1.03	91.33 ± 2.52
24 h	1.90 ± 0.32	16.92 ± 4.01	25.76 ± 1.96 ^a	98.00 ± 2.00 ^a
48 h	1.20 ± 0.42	12.48 ± 2.38	13.16 ± 1.13	93.67 ± 4.51
72 h	0.00 ± 0.00	8.24 ± 2.69	6.74 ± 0.28	81.67 ± 2.08
对照组	0.00 ± 0.00	8.04 ± 2.59	9.00 ± 1.00	84.00 ± 2.00
F 值	291.516	225.961	61.649	15.885
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

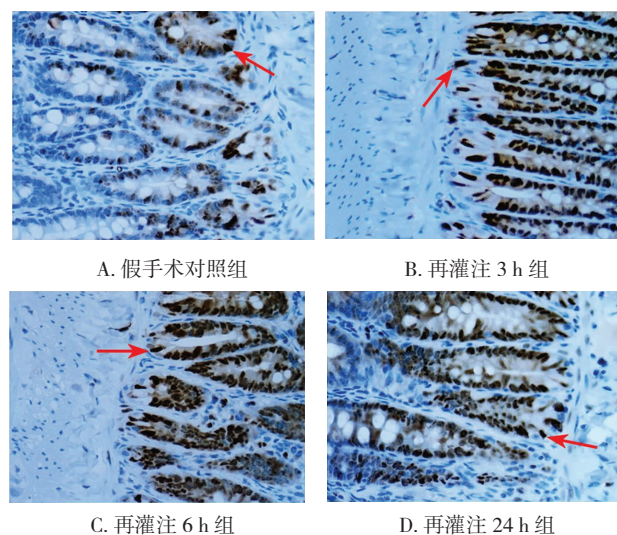
注:a,该组与其他组间比较差异均有统计学意义

2.2 肠黏膜细胞凋亡检测

假手术对照组小肠黏膜绒毛隐窝可见少数凋亡细胞;再灌注 0、1、3、6 h 组肠黏膜绒毛及隐窝上皮细胞凋亡逐渐增多,于 3 h 达峰值(与 6 h 组比较 $P=0.04$);再灌注 12、24、48、72 h 组肠黏膜绒毛及隐窝上皮细胞凋亡逐步减少,于 72 h 接近假手术组。见图 2 表 1。

2.3 Western blot 检测结果

各组 GRP78 蛋白表达情况见图 3 及表 1。其显示假手术组 GRP78 蛋白表达条带较弱,缺血再灌注后,GRP78 的表达明显增加,于 1 h 达第 1 个小高峰(与 0 h 组相比 $P=0.02$),但随着再灌注时间的延长,表达量逐步减少,再灌注 12 h 后开始回升,于 24 h 达峰值(与 1 h 组比较 $P=0.021$),72 h 降至对照组水平。



红色箭头所示为 TUNEL 检测阳性凋亡细胞

图 2 4 组 TUNEL 检测 (400 ×)

Fig.2 TUNEL staining of four groups (400 ×)

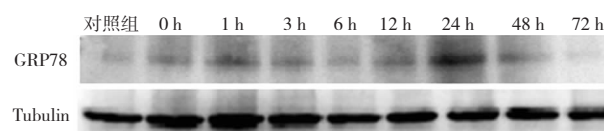


图 3 GRP78 蛋白在大鼠肠 IIRI 中时相性表达

Fig.3 Expression of GRP78 protein in intestine during reperfusion

2.4 RT-PCR 检测结果

各组 GRP78 mRNA 表达情况见图 4 及表 1。其表达情况基本与 GRP78 蛋白表达趋势基本一致。

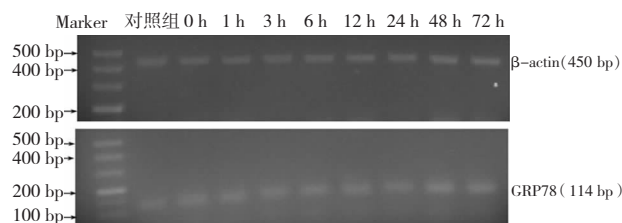


图 4 GRP78 mRNA 在大鼠肠 IIRI 中时相性表达

Fig.4 Expression of GRP78 mRNA in intestine during reperfusion

3 讨论

ER 是真核细胞中重要细胞器,主要参与 Ca^{2+} 调节和生物大分子的合成加工等。当某种原因导致细胞 ER 稳态失衡、生理功能发生紊乱时即出现 ER 应激,如营养物质缺乏、缺氧、氧化应激、毒性物质(如重金属)等。而 GRP78 被认为是 ER 应激反应的标志性分子^[1],起到维护 ER 内环境稳定作用,其生

理情况下,呈基础表达水平,与 ER 上 3 种跨膜蛋白 PERK(PKR-like ER kinase)、IRE1(inositol requiring enzyme 1)和 ATF6(activating transcription factor 6)的腔内端结合,ER 应激出现时,GRP78 将会与这 3 种蛋白解离,而去与未折叠或错误折叠蛋白结合,以协助其正确折叠,但如果应激状态持续存在,这 3 种被活化的跨膜蛋白可以激活 Gadd153 和 Caspase-12 等促凋亡因子表达^[7]。大量研究已证实^[8-9],上调 GRP78 表达能减少 ER 应激所致的组织损伤和细胞凋亡,相反抑制其表达加重了组织损伤及细胞凋亡。肠缺血再灌注在临床工作中也非常常见,严重的创伤、失血及肝脏或者小肠移植术等均可导致。但是 ER 应激在肠 IIRI 中的作用报道极少。故本实验通过构建大鼠 IIRI 模型,观察缺血再灌注后 GRP78 表达的变化规律,并探讨其对再灌注后 ER 应激所致细胞凋亡的影响及机制,为 IIRI 临床干预性治疗提供一定的理论依。

在本实验中,Western blot 和 RT-PCR 结果显示,假手术对照组 GRP78 呈低水平表达,但缺血再灌注后,GRP78 表达即开始增加,于 1 h 达第 1 个小高峰,但随着再灌注时间的延长,表达量逐步减少,再灌注 12 h 后开始回升,于 24 h 达峰值,72 h 降至对照组水平。其再灌注过程中出现 2 个峰值,第 1 个峰值于 1 h 出现,是再灌注早期,这个早期的峰值估计与其参与的未折叠蛋白反应来对抗再灌注损伤功能有关,但随后其表达又下降,这有可能是再灌注损伤的持续存在与加重,而 ER 的未折叠蛋白反应无法对抗凋亡,转而成为细胞凋亡作好准备。同时,本研究发现 GRP78 于再灌注 24 h 达第 2 个高峰。同样的,Bilecova-Rabajdova 等^[10]在大鼠肠缺血灌注的研究中发现 GRP78 表达于再灌注 24 h 达峰值,他们认为这种出现于再灌注晚期阶段的峰值参与了肠黏膜的再生与修复。本研究非常赞同这个观点,因为本研究也发现此时组织的损伤与上皮细胞的凋亡均处于低水平,且 HE 染色切片显示肠绒毛不规则再生,绒毛上皮呈立方状。猜测这可能是 ER 功能的恢复,通过未折叠蛋白反应修复组织损伤。另外,本研究发现组织再灌注损伤最严重时 AI 达峰值,这同样证实了细胞凋亡才是肠缺血再灌注肠黏膜上皮细胞损伤的主要原因^[11]。Pritchard 和 Watson^[12]研

究发现肠黏膜细胞凋亡主要发生在再灌注的 1~6 h 之间。本研究也支持这一结论。

总而言之,GRP78 可能在缺血再灌注的肠组织起到了保护作用。在今后研究中将进一步探讨通过添加干扰因素上调 GRP78 表达减轻 ER 应激所致的肠组织损伤,以期对肠 IIRI 的临床治疗提供新的方法。

参 考 文 献

- [1] Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response[J]. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 739-789.
- [2] Prachasilchai W, Sonoda H, Yokota-Ikeda, et al. A protective role of unfolded protein response in mouse ischemic acute kidney injury[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 592(1-3): 138-145.
- [3] Pan YX, Ren AJ, Zheng J, et al. Delayed cytoprotection induced by hypoxic preconditioning in cultured neonatal rat cardiomyocytes; role of GRP78[J]. *Life Sci*, 2007, 81(13): 1042-1049.
- [4] Hayashi T, Saito A, Okuno S, et al. Induction of GRP78 by ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and prevents delayed neuronal cell death[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(8): 949-961.
- [5] Li Y, Chen Y, Zhang J, et al. Protective effect of glutamine-enriched early enteral nutrition on intestinal mucosal barrier injury after liver transplantation in rats[J]. *Am J Surg*, 2010, 199(1): 35-42.
- [6] Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states I and II. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal[J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4): 478-483.
- [7] Wiseman RL, Haynes CM, Ron D. SnapShot: the unfolded protein response[J]. *Cell*, 2010, 140(4): 590-590.
- [8] Morimoto N, Oida Y, Shimazawa M, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress after middle cerebral artery occlusion in mice[J]. *Neuroscience*, 2007, 147(4): 957-967.
- [9] Sugawara S, Takeda K, Lee A, et al. Suppression of stress protein GRP78 induction in tumor B/C10ME eliminates resistance to cell mediated cytotoxicity[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(24): 6001-6005.
- [10] Bilecova-Rabajdova M, Urban P, Maslankova J, et al. Analysis of changes in pro(Gadd153) and anti apoptotic(Grp78) gene expression after ischemic-reperfusion injury of the small intestine[J]. *Prague Med Rep*, 2010, 111(4): 249-256.
- [11] Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, et al. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium[J]. *Gut*, 1998, 42(4): 530-537.
- [12] Pritchard DM, Watson AJ. Apoptosis and gastrointestinal pharmacology[J]. *Pharmacol Ther*, 1996, 72(2): 149-169.

(责任编辑:冉明会)