

缺血再灌注损伤中内质网应激介导细胞凋亡的研究进展

秦 聪 张 杰

摘 要 内质网参与蛋白折叠、脂类合成和维持钙离子稳态。打乱内质网的稳态将导致未折叠蛋白或错误折叠蛋白在内质网腔蓄积并引起内质网应激。缺血再灌注损伤由器官血流受限(缺血)和随后血流恢复(再灌注)所致,缺血再灌注损伤可发生于心血管手术、高血压和器官移植,而且器官移植不可避免发生缺血再灌注损伤。近年来研究发现内质网应激介导细胞凋亡在缺血再灌注损伤中发挥重要作用,内质网应激主要通过诱导 CAAT 区/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、活化含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 12(caspase-12)和激活 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号通路介导细胞凋亡。本文将对缺血再灌注损伤中内质网应激介导细胞凋亡做一综述。

关键词 内质网应激 缺血再灌注损伤 CHOP caspase-12 JNK

中图分类号 R691 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.09.005

细胞凋亡是细胞死亡的 3 种方式(坏死、凋亡和自噬)之一,细胞凋亡是一种程序性的细胞死亡方式,具有严格的细胞内分子调控机制^[1]。当发生缺血再灌注损伤时会延长患者的住院时间、增加患者病死率并促进急性损伤转变为慢性疾病,甚至最终演变为器官功能衰竭。在缺血再灌注损伤的再灌注阶段产生大量活性氧诱导级联反应,引发炎症、细胞死亡和器官衰竭,其中,细胞凋亡在疾病发生、发展中起重要作用^[2]。近期研究发现,在缺血再灌注损伤中内质网应激可介导细胞凋亡,当缺血时氧气和糖供应不足导致错误折叠蛋白和未折叠蛋白在内质网蓄积,触发未折叠蛋白反应,继而活化转录因子 6(ATF6)、需肌醇酶 1(IRE1)和 PKR 样内质网调节激酶(PERK),以促进未折叠蛋白降解,但是当内质网应激持续时间过长或强度过大会过度激活未折叠蛋白反应诱导细胞凋亡并加重缺血再灌注损伤。同时,再灌注阶段钙离子超载和活性氧的大量生成增加会诱发氧化应激,进一步加重未折叠蛋白反应和细胞凋亡^[3]。全面理解其病理生理过程将有利于进一步研究和发现治疗缺血再灌注损伤的有效靶点。在本文中笔者将对缺血再灌注损伤中内质网应激介导细胞凋亡进行介绍。

一、内质网应激

内质网是真核生物内膜系统的一员,是真核生物的一种细胞器,也是真核生物区别于原核生物的特征之一。Porter 和 Claude 于 1945 年首次发现内质网并将其命名,内质网主要由蛋白质和脂类构成,其中脂类占 30%~40%,蛋白质占 60%~70%。笔者通常将内质网分为两种类型,一种是粗面内质网,另一种是滑面内质网。粗面内质网的主要功能是协调合成、折叠和转运蛋白质,滑面内质网主要与脂类的合成有关。内质网调节蛋白质的稳态,监控蛋白质的合成、折叠、组装、转运到细胞外的特定部位或者细胞器,这些蛋白在内质网、高尔基体、细胞膜和溶酶体发挥调节细胞活动的作用。同时,也有一些蛋白被分泌到细胞外促进细胞之间的相互联系。

正确的蛋白折叠是细胞存活的关键,也是蛋白发挥功能和保持器官正常生理活动的关键。内质网有多种调控机制来保证分泌蛋白的正确折叠、修饰和组装。打乱内质网的稳态将导致未折叠蛋白或错误折叠蛋白在内质网腔聚集,称为内质网应激。内质网应激可激活未折叠蛋白反应,未折叠蛋白反应的激活可活化下游靶基因从而降解未折叠或错误折叠蛋白,维持内质网稳态,促进细胞存活,但是当内质网应激持续时间过长或者较为严重时,未折叠蛋白反应过度激活会诱导细胞凋亡^[4]。

二、内质网应激与缺血再灌注损伤

内质网参与蛋白折叠、脂类合成和维持钙离子的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81470923)

作者单位:430060 武汉大学人民医院泌尿外科

通讯作者:张杰,教授、博士生导师,电子信箱:zhangjiwehu666@

163.com

稳态,打乱这种稳态将引起内质网应激。内质网应激可以被多种因素引发如缺血再灌注损伤、胰岛素抵抗和酒精性脂肪肝等。缺血再灌注损伤是由器官血流中断和随后的血流灌注恢复导致,常见于心肌梗死、缺血性脑卒中、急性肾损伤、创伤、循环停止、镰状细胞病、睡眠呼吸暂停、心脏手术、高血压和器官移植,而且器官移植会不可避免的发生缺血再灌注损伤,临床工作中肝移植和肾脏移植经常发生缺血再灌注损伤^[5]。肾缺血再灌注损伤是临床上导致急性肾损伤的主要原因之一,当患者进行器官移植、心脏或动脉手术、肾脏肿瘤切除时常常引发缺血性急性肾损伤^[6]。近几年的研究表明内质网应激参与肝脏、肾脏的缺血再灌注损伤,是影响肝脏、肾脏移植预后效果的主要因素之一^[7,8]。体内和体外的研究发现,肾缺血再灌注损伤发生后,在肾小管上皮细胞内会诱发内质网应激^[9]。而且,许多研究数据表明内质网应激也参与心脏、脑、肺、肠和视网膜的缺血再灌注损伤^[10]。当大鼠心肌发生缺血再灌注损伤时,葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、CHOP、活化的caspase-12表达增加,促进细胞凋亡,体外实验研究发现当心肌细胞发生缺氧/复氧损伤时也会诱导内质网应激并上调相关蛋白的表达^[11]。

三、缺血再灌注损伤中内质网应激介导细胞凋亡

缺血再灌注损伤机制较为复杂,涉及多种病理生理学改变,其具体机制尚不完全清楚,因此,目前临床上没有应对缺血再灌注损伤的有效办法,研究发现其机制主要包括氧化应激、炎症反应、自身免疫反应、细胞死亡(包括坏死、凋亡和自噬)、补体形成和纤维化等。近几年研究表明,内质网应激在缺血再灌注损伤中起到重要的作用,缺血再灌注损伤中内质网应激主要通过以下3个途径介导细胞凋亡:诱导CHOP、活化caspase-12和激活JNK信号通路,下面将对这3条信号通路进行介绍。

1. CHOP信号通路:C/EBP同源蛋白(CHOP)是一种转录因子,与凋亡相关并且在内质网应激介导的疾病中起重要作用。长时间的未折叠蛋白反应会诱导细胞凋亡,主要通过活化PERK-真核细胞翻译起始因子2 α (eIF2 α)-活化转录因子4(ATF4)-CHOP信号通路,当内质网稳态被打乱引发内质网应激,内质网应激触发未折叠蛋白反应,未折叠蛋白反应激活PERK使其发生自身磷酸化,磷酸化的PERK使eIF2 α 磷酸化,磷酸化的eIF2 α 使其下游蛋白ATF4表达增高,ATF4激活CHOP,CHOP表达增高可

诱导细胞凋亡。研究表明内质网应激反应会导致CHOP信号通路活化,增加肾缺血再灌注损伤时肾小管上皮细胞凋亡^[12]。肾缺血再灌注损伤时CHOP主要在肾脏的外髓部位表达增高,研究者通过比较野生型小鼠和CHOP基因敲除小鼠发现,在肾缺血再灌注损伤模型中敲除CHOP基因可明显减轻肾小管上皮细胞凋亡^[13-15]。同时体外研究发现,利用小干扰RNA抑制CHOP基因表达可显著减少大鼠肾小管上皮细胞株NRK-52E在缺氧/复氧时的细胞凋亡数量^[16]。

体内和体外实验研究表明,CHOP信号通路在心肌细胞缺血再灌注损伤中也发挥重要作用,敲除CHOP基因可减轻心肌缺血再灌注损伤,明显减轻心肌细胞凋亡和炎症反应^[17]。相反,当活化CHOP信号通路时会导致心肌细胞凋亡数量增加^[18-20]。研究者发现抑制小鼠的CHOP信号通路可以减轻内质网应激和缺血再灌注损伤,通过研究发现小鼠缺血再灌注损伤组再灌注3h后CHOP表达开始增高,24h达到高峰,48h开始下降^[21]。近期也有研究发现,在小鼠视网膜缺血再灌注损伤中CHOP参与内质网应激介导的视网膜神经节细胞凋亡,与野生型小鼠相比,CHOP基因敲除组小鼠缺血再灌注损伤后视网膜神经节细胞密度较高^[22]。

2. caspase-12信号通路:caspase-12位于内质网的胞质侧,在内质网应激介导的细胞凋亡中发挥重要的作用。研究者发现,小鼠敲除caspase-12基因可抑制内质网应激介导的细胞凋亡,提示caspase-12参与内质网应激介导的细胞凋亡过程^[23]。caspase-12与其caspases类似需要被裂解才能被激活从而发挥促凋亡作用^[24]。体内和体外研究发现,当发生心肌缺血再灌注损伤时,活化的caspase-12表达量显著增加,心肌细胞凋亡程度与活化的caspase-12表达量呈正相关,活化的caspase-12过表达发挥促凋亡作用^[25]。当大鼠肾小管上皮细胞NRK-52E发生缺氧/复氧损伤后caspase-12 mRNA和蛋白表达均增高。有研究发现钙蛋白酶位于caspase-12上游,钙蛋白酶可激活caspase-12,使其裂解为35kDa的低分子片段,然后活化的caspase-12激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶9(caspase-9)使其裂解,活化的caspase-9进而激活caspase-3使其裂解活化,活化的caspase-3可直接诱导细胞凋亡,这是一种不依赖线粒体的细胞凋亡途径。caspase-12可以被裂解为35kDa的低分子片段,在缺血再灌注损伤模型中导入35kDa低分子片段

可促进细胞凋亡。

然而,人类缺乏 caspase - 12, 研究发现 caspase - 4 在人类内质网应激介导的细胞凋亡中起到同样作用。caspase - 4 可以介导人类细胞的内质网应激并参与细胞凋亡过程。Caspase - 12 基因敲除小鼠可以缓解内质网应激介导的细胞凋亡,同样的结论在 caspase - 12/4 基因敲除的细胞实验也得到证实,caspase - 12/4 将来可能会成为治疗缺血再灌注损伤中内质网应激介导细胞凋亡的有效靶点。

3. JNK 信号通路:在 C57BL/6J 小鼠模型和大鼠肾小管上皮细胞(NRK - 52E)细胞模型研究发现,肾缺血再灌注损伤中磷酸化的 JNK 表达增高,JNK 磷酸化增加可以促进肾小管上皮细胞凋亡。研究发现急性脑缺血再灌注损伤时也会激活 JNK,通过抑制 JNK 可缓解神经功能障碍并提高神经元细胞的存活率。大量研究表明需肌醇酶 1 α (IRE1 α) - 肿瘤坏死因子相关因子 2 (TRAF2) - 细胞凋亡信号调节激酶 1 (ASK1) - JNK 信号通路在内质网应激介导细胞凋亡中发挥重要作用,未折叠蛋白反应激活 IRE1,活化的 IRE1 α 募集 TRAF2, 然后与 ASK1 形成 IRE1 α - TRAF2 - ASK1 复合物,然后激活 JNK 诱导细胞凋亡,细胞凋亡信号调节激酶 1 (ASK1)位于 JNK 信号通路的上游,体内和体外研究发现,当脑发生缺血再灌注损伤时 ASK1 可被激活。研究发现,在脑缺血再灌注模型中抑制 ASK1 的表达可以明显减少神经细胞凋亡数量。也有研究发现,在体内和体外心肌缺血再灌注损伤模型中 JNK 磷酸化显著增高,提示 JNK 磷酸化参与心肌缺血再灌注损伤。ASK1 和 JNK 抑制可减轻内质网应激介导的细胞凋亡,可能会成为治疗缺血再灌注损伤的有效手段。

四、展 望

在缺血再灌注损伤中,大量的未折叠蛋白或错误折叠蛋白在内质网腔蓄积引起内质网应激,从而触发未折叠蛋白反应,当损伤较轻时,未折叠蛋白反应激活下游靶基因帮助未折叠蛋白或错误折叠蛋白正确折叠或使其降解以维持内质网的稳态从而使细胞免受伤害;当内质网应激强度过大或持续时间过长则会诱导细胞凋亡,引起级联反应并加重对组织或器官的损伤。近年来研究发现,内质网应激介导细胞凋亡主要是通过诱导 CHOP、活化 caspase - 12 和激活 JNK 信号通路来实现的,细胞和动物实验研究表明敲除 CHOP 基因、caspase - 12 基因或者抑制 JNK 信号通路均可减轻缺血再灌注损伤中的细胞凋亡,抑制这 3

条信号通路可以减轻缺血再灌注损伤。尽管我们在研究缺血再灌注损伤中内质网应激介导细胞凋亡取得了重大突破,但因其调控网络复杂,仍有一些精细的调节机制尚不完全清楚,有待进一步探究加以明确,相信在不久的将来我们可以发现治疗缺血在灌注损伤的有效靶点,研发出安全有效的药物来防治缺血再灌注损伤,为器官移植和心血管手术患者带来福音。

参考文献

- 1 Zhang T, Zhang Y, Cui M, *et al.* CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia - and oxidative stress - induced myocardial necroptosis [J]. *Nat Med*, 2016, 22(2):175 - 182
- 2 Arai S, Kitada K, Yamazaki T, *et al.* Apoptosis inhibitor of macrophage protein enhances intraluminal debris clearance and ameliorates acute kidney injury in mice[J]. *Nat Med*, 2016, 22(2):183 - 193
- 3 Lin CL. Attenuation of endoplasmic reticulum stress as a treatment strategy against ischemia/reperfusion injury [J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(12):1930 - 1931
- 4 Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease [J]. *Nature*, 2016, 529(7586):326 - 335
- 5 Pegues MA, McWilliams IL, Szalai AJ. C - reactive protein exacerbates renal ischemia - reperfusion injury: are myeloid - derived suppressor cells to blame? [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 311(1):176 - 181
- 6 Rabadi M, Kim M, D'Agati V, *et al.* Peptidyl arginine deiminase - 4 - deficient mice are protected against kidney and liver injury after renal ischemia and reperfusion [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 311(2):437 - 449
- 7 Zhou H, Zhu J, Yue S, *et al.* The dichotomy of endoplasmic reticulum stress response in liver ischemia - reperfusion injury [J]. *Transplantation*, 2016, 100(2):365 - 372
- 8 Hodeify R, Megyesi J, Tarcasfalvi A, *et al.* Gender differences control the susceptibility to ER stress - induced acute kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 304(7):875 - 882
- 9 Lhotak S, Sood S, Brimble E, *et al.* ER stress contributes to renal proximal tubule injury by increasing SREBP - 2 - mediated lipid accumulation and apoptotic cell death [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303(2):266 - 278
- 10 Hu R, Chen ZF, Yan J, *et al.* Endoplasmic reticulum stress of neutrophils is required for ischemia/reperfusion - induced acute lung injury [J]. *J Immunol*, 2015, 195(10):4802 - 4809
- 11 Fang SJ, Li PY, Wang CM, *et al.* Inhibition of endoplasmic reticulum stress by neuregulin - 1 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Peptides*, 2016, 12(15):99 - 105
- 12 Cunard R. Endoplasmic reticulum stress in the diabetic kidney, the good, the bad and the ugly[J]. *J Clin Med*, 2015, 4(4):715 - 740
- 13 Noh MR, Kim JI, Han SJ, *et al.* C/EBP homologous protein (CHOP) gene deficiency attenuates renal ischemia/reperfusion injury in mice[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(9):1895 - 1901

(下转第 20 页)

- tes[J]. Trends Endocrinol Metab, 2014, 25(12): 620 – 627
- 16 Kato J, Kamiya H, Himeno T, *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate impaired wound healing through enhancing keratinocyte functions in diabetic foot ulcerations on the plantar skin of rats[J]. J Diabetes Complications, 2014, 28(5): 588 – 595
 - 17 Han, YF, Sun TJ, Han YQ, *et al.* Clinical perspectives on mesenchymal stem cells promoting wound healing in diabetes mellitus patients by inducing autophagy[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(14): 2666 – 2670
 - 18 Zhao K, Hao H, Liu J, *et al.* Bone marrow – derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic high glucose – induced beta – cell injury through modulation of autophagy[J]. Cell Death Dis, 2015, 6(9): e1885
 - 19 Liu GY, Jiang XX, Zhu X, *et al.* ROS activates JNK – mediated autophagy to counteract apoptosis in mouse mesenchymal stem cells in vitro[J]. Acta Pharmacol Sinica, 2015, 36(12): 1473 – 1479
 - 20 Meng Y, Ji J, Tan W, *et al.* Involvement of autophagy in the procedure of endoplasmic reticulum stress introduced apoptosis in bone marrow mesenchymal stem cells from nonobese diabetic mice[J]. Cell Biochem Funct, 2016, 34(1): 25 – 33
 - 21 Han Z, Jing Y, Xia Y, *et al.* Mesenchymal stem cells contribute to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma cells in inflammatory environment by inducing autophagy[J]. Cell Biosci, 2014, 4(1): 1
 - 22 Shree N, Bhonde RR, Conditioned media from adipose tissue derived mesenchymal stem cells reverse insulin resistance in cellular models [J]. J Cell Biochem, 2017, 118(8): 2037 – 2043
 - 23 Yuan Y, Shi M, Li L, *et al.* Mesenchymal stem cells – conditioned media ameliorates diabetic endothelial dysfunction by improving mitochondrial bioenergetics via the Sirt1/AMPK/PGC – 1alpha pathway [J]. Clin Sci (Lond), 2016, 130(23): 2181 – 2198
 - 24 Li M, Zhao Y, Hao H, *et al.* Mesenchymal stem cell – conditioned medium improves the proliferation and migration of keratinocytes in a diabetes – like microenvironment [J]. Int J Low Extrem Wounds, 2015, 14(1): 73 – 86
 - 25 Kyoung JE, Zhang Q, Sun YB, *et al.* Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid – derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF – beta/SMAD2 and PI₃K/Akt pathways[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(1): 605 – 628
 - 26 Sugimoto MA, Vago JP, Teixeira MM, *et al.* Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance[J]. Immunol Res, 2016, 2016(5): 8239258
 - 27 Dong Y, Li G, Luo TH, *et al.* Absence of evidence for the association of single nucleotide polymorphisms in Annexin A1 gene with type 2 diabetes in Chinese [J]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2004, 21(5): 508 – 511
 - 28 Rackham CL, Vargas AE, Hawkes RG, *et al.* Annexin A1 is a key modulator of mesenchymal stromal cell – mediated improvements in islet function[J]. Diabetes, 2016, 65(1): 129 – 139

(收稿日期: 2016 – 12 – 16)

(修回日期: 2016 – 12 – 28)

(上接第 16 页)

- 14 Dong B, Zhou H, Han C, *et al.* Ischemia/reperfusion – induced CHOP expression promotes apoptosis and impairs renal function recovery: the role of acidosis and GPR4 [J]. PLoS One, 2014, 9(10): 110944 – 110951
- 15 Chen BL, Sheu ML, Tsai KS, *et al.* CCAAT – enhancer – binding protein homologous protein deficiency attenuates oxidative stress and renal ischemia – reperfusion injury [J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 23(15): 1233 – 1245
- 16 Yang JR, Yao FH, Zhang JG, *et al.* Ischemia – reperfusion induces renal tubule pyroptosis via the CHOP – caspase – 11 pathway[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306(1): 75 – 84
- 17 Miyazaki Y, Kaikita K, Endo M, *et al.* C/EBP homologous protein deficiency attenuates myocardial reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis and inflammation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(5): 1124 – 1132
- 18 Chen L, Chen M, Du J, *et al.* Hyperglycemia attenuates remifentanyl postconditioning – induced cardioprotection against hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 cardiomyoblasts [J]. J Surg Res, 2016, 203(2): 483 – 490
- 19 Yu H, Zhang H, Zhao W, *et al.* Gypenoside protects against myocardial ischemia – Reperfusion Injury by Inhibiting cardiomyocytes Apoptosis via inhibition of CHOP pathway and activation of PI₃K/Akt pathway In vivo and in vitro [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(1): 123 – 136
- 20 Gao Y, Jia P, Shu W, *et al.* The protective effect of lycopene on hypoxia/reoxygenation – induced endoplasmic reticulum stress in H9C2 cardiomyocytes [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 774(15): 71 – 79
- 21 Ding L, Ba XH. Role of ornithine decarboxylase/polyamine pathway in focal cerebral ischemia – reperfusion injury and its mechanism in rats [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20624 – 20630
- 22 Nashine S, Liu Y, Kim BJ, *et al.* Role of C/EBP homologous protein in retinal ganglion cell death after ischemia/reperfusion injury [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 56(1): 221 – 231
- 23 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
- 24 Tong Q, Wu L, Jiang T, *et al.* Inhibition of endoplasmic reticulum stress – activated IRE1alpha – TRAF2 – caspase – 12 apoptotic pathway is involved in the neuroprotective effects of telmisartan in the rotenone rat model of Parkinson's disease [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 776(10): 106 – 115
- 25 Takatori O, Usui S, Okajima M, *et al.* Sodium 4 – phenylbutyrate attenuates myocardial reperfusion injury by reducing the unfolded protein response [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2016, 14(11): 558 – 565

(收稿日期: 2016 – 12 – 17)

(修回日期: 2017 – 01 – 02)