DJ-1 蛋白调控乳鼠心肌细胞内质网应激反应的研究

李 怡，薛睿聪，刘 晨，董吁钢*
（中山大学附属第一医院心内科//卫生部辅助循环重点实验室，广东 广州 510080）

摘 要：【目的】探讨 DJ-1 蛋白对心肌细胞内质网应激的调控作用。【方法】在原代培养心肌细胞中采用苯肾上腺素(PE)、毒胡萝卜素(TG)诱导心肌细胞内质网应激。通过腺病毒转染过表达 DJ-1 蛋白，应用荧光定量 PCR 及 Western blotting 分别检测在 PE 及 TG 作用下，心肌细胞内质网应激标记物 GRP78 和 calreticulin 的 mRNA 及蛋白表达改变，明确 DJ-1 对心肌细胞内质网应激的作用。【结果】PE、TG 均可引起 GRP78 及 calreticulin 的 mRNA 及蛋白表达升高，提示二者均可导致心肌细胞的内质网应激反应。应用腺病毒转染在心肌细胞中过表达 DJ-1 蛋白，而过表达 DJ-1 显著下调内质网应激标记物 GRP78 及 calreticulin 的 mRNA 及蛋白表达，提示 DJ-1 可抑制 PE 及 TG 导致的心肌细胞的内质网应激反应。【结论】DJ-1 可抑制心肌细胞中 PE 及 TG 诱导的内质网应激。

关键词：内质网应激；DJ-1；苯肾上腺素；毒胡萝卜素
中图分类号：R54 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2015)06-0816-05

Modulation of Endoplasmic Reticulum Stress Mediated by DJ-1 in Neonatal Cardiomyocytes

LI Yi, XUE Rui-cong, LIU Chen, DONG Yu-gang*
(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University// Key Laboratory on Assisted Circulation, Ministry of Health, Guangzhou 510080, China)
Corresponding to: DONG Yu-gang; E-mail: dongxg@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】To study how DJ-1 modulates endoplasmic reticulum stress (ERS) in neonatal cardiomyocytes. 【Method】In neonatal cardiomyocytes, thapsigargin(TG) and phenylephrine (PE) were used to induce ERS. Overexpression of DJ-1 protein was mediated by adenovirus transfection. The mRNA and protein levels of ERS markers including GRP78 and calreticulinin cardiomyocytes under PE or TG stress were detected using Q-PCR and Western blotting. 【Results】TG and PE significantly induced the ERS markers including the mRNA and protein levels of GRP78 and calreticulin, indicating that TG and PE are the inducer of cardiac ERS. The overexpression of DJ-1 was achieved by the utilization of adenovirus. We discovered that overexpression of DJ-1 markedly reduced the mRNA and protein levels of GRP78 and calreticulin, indicating that DJ-1 is a negative modulator of ERS induced by TG and PE. 【Conclusion】DJ-1 inhibits ERS induced by TG and PE in neonatal cardiomyocytes.

Key words: endoplasmic reticulum stress; DJ-1; phenylephrine; thapsigargin
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(6): 816-820]

细胞在损伤因素作用下，蛋白质加工、运输障碍导致内质网内未折叠或错误折叠蛋白的大量累积；累积超过内质网处理能力时诱发的细胞内效应称为内质网应激[1]。内质网应激是多种心脏疾病(如心肌缺血、心肌肥厚)发生、发展的重要病理生理机制。心脏疾病过程中心肌细胞内蛋白合成、降解平衡紊乱，蛋白合成错误率显著增加诱发内质网应激反应[2]。内质网应激的持续存在可诱导心肌细胞凋亡，导致临床上心力衰竭的最终发生。因此，发现抑制心肌细胞内质网应激的靶点对临床上心力衰竭的一级预防具有重要意义。DJ-1 是 PARK7 基因编码的肽酶 C56 蛋白质家族的成员[3]，

收稿日期：2015-05-19
基金项目：国家自然科学基金青年项目(81100172)
作者简介：李怡，博士，主治医师，研究方向：心肌肥厚研究，E-mail：zsy.liyi@hotmail.com；* 董吁钢，通信作者，教授，博士生导师，研究方向：心肌肥厚研究，E-mail：dongxg@mail.sysu.edu.cn

在细胞浆中以二聚体的功能形式存在。近年发现 DJ-1 具有多种生物学功能，如抑制细胞氧化应激[4]、调节线粒体功能、调控自噬及凋亡[5]。在神经细胞的研究中发现 DJ-1 可减轻内质网应激诱导的细胞死亡[6]。但目前尚无 DJ-1 对心肌细胞内质网应激的作用的相关报道。因此本研究探讨 DJ-1 对内质网应激特异性诱导剂毒胡萝卜素(TG)及心肌肥厚诱导剂苯肾上腺素(PE)导致的心肌细胞内质网应激的调控作用。

1　材料与方法

1.1　动　物

出生 1~2 d 的 SD 乳鼠(SPF 级)由中山大学动物中心提供。

1.2　试　剂

DMEM/F12 培养基、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS)购自 HyClone 公司；0.25%胰蛋白酶、I 型胶原酶购自 Gibco 公司；毒胡萝卜素(TG)购自 Sigma-Aldrich 公司；苯肾上腺素(PE)购自 Tokyo Chemical Industry；DJ-1 抗体（兔抗)、GRP78（兔抗)、calreticulin(CRT，兔抗)、GAPDH(兔抗)购自 Cell Signaling Technology 公司；Trizol 购自 Life Technologies。

1.3　原代乳鼠心肌细胞培养、转染及心肌细胞肥厚模型构建

取 1 ~ 2 d 的 SD 乳鼠，75%乙醇消毒后剪开胸腔去除心脏，去除心房，将心室剪成 1 mm × 1 mm 组织团块，用 0.125%胰酶初步消化后，用 0.05%胶原酶于 37 ℃水浴箱中水平摇动消化约 2 h。收集上清，用 D-Hanks 液清洗并吹散剩余组织团块直至细胞团块消失。离心并收集细胞，加入含 10%FBS 培养基，置于 37 ℃、体积分数为 5%CO_2 培养箱中贴壁 60 min 去除非心肌细胞后在 6 孔板中以 0.8×10^6 个/孔继续培养 36 h。待细胞融合且搏动一致时进行腺病毒转染。

腺病毒载体的构建及合成由北京诺赛基因公司协助合成，应用 Ad-DJ-1-GFP 对 DJ-1 进行过表达，Ad-GFP 作为对照。根据本课题组既往研究结果选取过表达倍数为 2.1 倍的感染滴度（MOI=3)进行实验[7]。用含 1%FBS 培养基稀释病毒液并转染心肌细胞 6 h 后，换无血清培养基饥饿 24 h，加入 3 μmol/L TG 并培养 24 h 诱导心肌细胞内质网应激反应[8]；根据国际上受广泛认可的心肌细胞肥厚模型构建的经典方法，本研究延续本课题组既往发表的相关研究方法，通过 50 μmol/L 的 PE 培养 24 h 诱导心肌细胞肥厚[9-10]。

1.4　Q-PCR

Trizol法提取细胞及动物组织总 RNA，应用分光光度计测定浓度后采用 M-MLV 逆转录扩增为 cDNA，总体系 20 μL。荧光定量 PCR(Q-PCR)通过 SYBR Green I 体系在 Roche LightCycler 480 仪器上进行，反应参数为 95 度预变性 5 min；95 ℃ 10 s，60 ℃ 10 s，72 ℃ 20 s 共 45 个循环。引物序列：大鼠 GRP78，5′-TGGACGGTTACCGGCGGAAA-3′(forward)、5′-TAGTCACAGCCAGTATCGAGCGCG-3′(reverse)；大鼠 calreticulin，5′-AACATCATGTTTGGTC-3′(forward)、5′-AGCACGTTCTTGCCCTT-3′(reverse)；大鼠 GAPDH，5′-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3′（forward）、5′-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3′(reverse)。

1.5　Western blotting

组织及细胞蛋白浓度应用 BCA 法测定。Western blotting 步骤按照 Li 等[10]报道的方法进行。图像分析应用 Quantity One 软件进行定量分析。

1.6　统计学分析

实验数据均以均数 ± 标准差（mean ± SD)表示，应用 two-way ANOVA 进行统计学分析，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

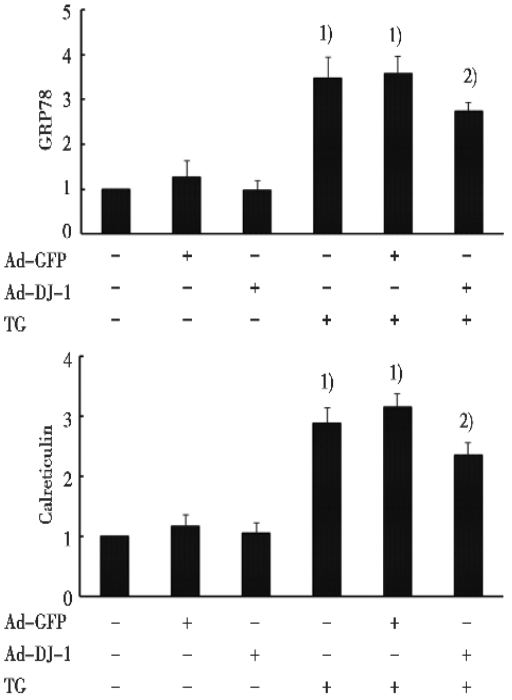
2　结　果

2.1　腺病毒过表达 DJ-1 对 TG 作用下的内质网应激标记物 mRNA 水平的影响

内质网应激特异性诱导剂 TG 作用于心肌细胞 24 h 后，提取总 RNA 并进行 Q-PCR 检测内质网应激标记物 GRP78、calreticulin 的 mRNA 水平。如图 1 所示，TG 明显增加 GRP78 及 calreticulin 转录水平；腺病毒过表达 DJ-1 可显著下调上述内质网应激标记物水平。

2.2　腺病毒过表达 DJ-1 对 PE 作用下的内质网应激标记物 mRNA 水平的影响

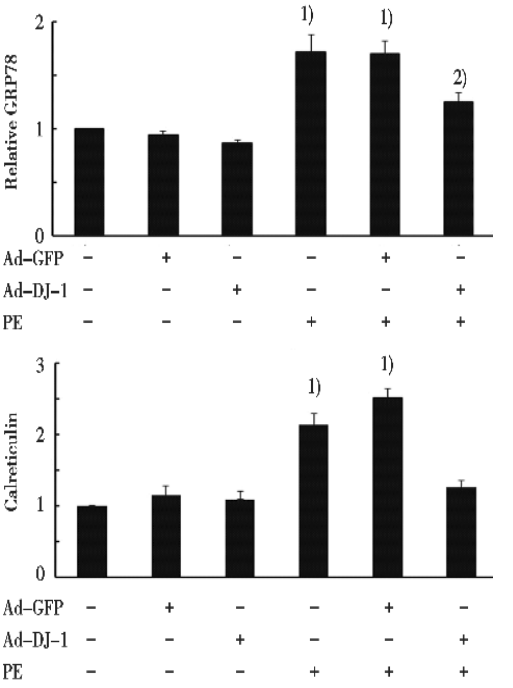
PE 作用于心肌细胞 24 h 后，提取总 RNA 并进行 Q-PCR 检测内质网应激标记物 GRP78、calreticulin 的 mRNA 水平。如图 2 所示，PE 显著增加 GRP78 及 calreticulin 的 mRNA 表达。与 Ad-



1)$P < 0.05$ vs corresponding control without TG, 2)$P < 0.05$ vs Ad-GFP+TG

图 1 过表达 DJ-1 对 TG 作用下的内质网应激标记物 mRNA 水平的影响

Fig.1 The effect of DJ-1 overxpression on ERS mRNA markers in the presence of TG



1)$P < 0.05$ vs corresponding control without PE, 2)$P < 0.05$ vs Ad-GFP+PE

图 2 过表达 DJ-1 对 PE 作用下的内质网应激标记物 mRNA 水平的影响

Fig.2 The effect of DJ-1 overxpression on ERS mRNA markers in the presence of PE

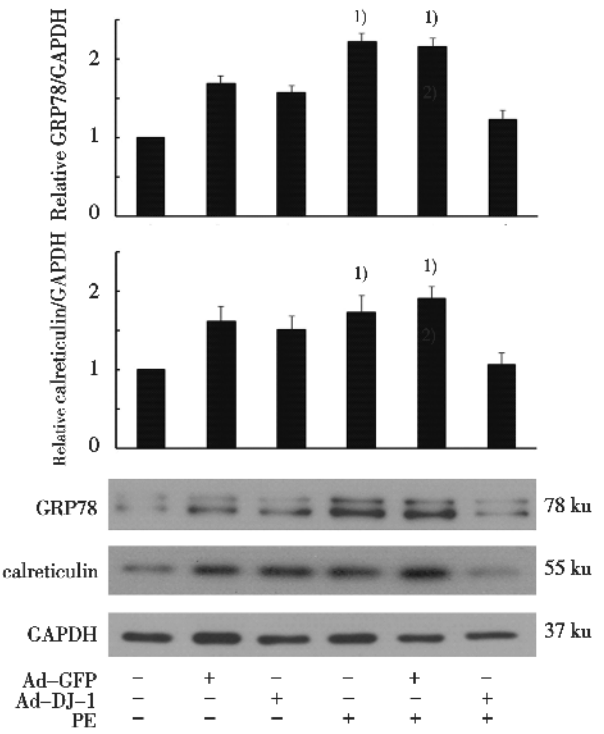
GFP相比,DJ-1 过表达对上述标记物基础表达无明显影响;但在 PE 刺激下,DJ-1 过表达可明显下调 GRP78 及 calreticulin(图 2)的转录水平。

2.3 腺病毒过表达 DJ-1 对 PE 作用下的内质网应激标记物蛋白水平的影响

PE 作用 24 小时诱导心肌细胞肥厚后,提取细胞蛋白并应用 Western blotting 对 GRP78、calreticulin 的蛋白表达水平进行检测。如图 2 所示,PE 对 GRP78 及 calreticulin 的蛋白表达诱导作用明显。DJ-1 过表达可明显下调 PE 诱导的 GRP78 及 calreticulin(图 3)的蛋白表达。结合 2.1 及 2.2 部分结果,表明 DJ-1 蛋白过表达可抑制内质网应激特异性诱导剂 TG 及心肌肥厚诱导剂 PE 导致的心肌细胞内质网应激反应。

3 讨 论

内质网应激是多种心血管疾病[11-12]的共同病理生理改变,在心肌梗死、心肌缺氧缺血、心肌肥厚及心力衰竭等病理状态下,内质网内蛋白折叠稳态失衡,未折叠、错误折叠、突变蛋白聚集累积,即内质网应激反应。细胞可通过代偿性增加蛋白折叠或降解未折叠、错误折叠蛋白减轻内质网应激程度;而严重的长期的内质网应激反应最终导致细胞代偿反应无效,进而激活内质网相关凋亡机制[2, 13]。心肌细胞大量凋亡及坏死导致心脏疤痕性增生、心肌收缩力及顺应性严重下降,最终导致心力衰竭的发生[2]。因此,内质网应激是各种心血管疾病转为心力衰竭的主要转折点,抑制过强及持续的内质网应激可延缓心力衰竭的临床转化。在内质网应激反应中,GRP78 作为定位于内质网的伴侣蛋白,可率先感知过多错误折叠蛋白的累积,其 mRNA 及蛋白表达量被迅速诱导,进而参与内质网应激反应下游通路的诱导[14]。Calreticulin,即钙网蛋白,是内质网中主要的钙结合蛋白,其在内质网应激反应中被迅速诱导,并介导 ERS 相关的细胞凋亡的发生发展[15]。因此 GRP78 及calreticulin 是反映内质网应激程度的重



1) $P < 0.05$ vs corresponding control without PE, 2) $P < 0.05$ vs Ad-GFP+PE

图 3　过表达 DJ-1 对 PE 作用下的内质网应激标记物蛋白水平的影响

Fig.3　The effect of DJ-1 overexpression on ERS protein markers in the presence of PE

要指标，两者在转录水平及翻译水平的增高提示内质网应激反应的激活。PE 是一种经典的心肌肥厚刺激药物，在 PE 作用下，心肌细胞面积、心肌肥厚分子标志物显著增加[16]；本研究发现，在 PE 诱导的心肌肥厚过程中，内质网应激反应已随之被激活，提示内质网应激反应是参与心肌肥厚发生、发展的重要作用机制，对内质网应激的干预可对心肌肥厚的进展进行调控。

DJ-1 是近年发现的多功能蛋白，其在人体组织广泛且丰富表达，DJ-1 在进化过程中高度保守，对氧化应激、凋亡等细胞生物学行为具有广泛的调控作用。目前尚无在心肌细胞中 DJ-1 对内质网应激的调控作用研究，但有研究发现 DJ-1 可缓解内质网应激诱导的细胞凋亡，因此本课题组推断 DJ-1 可能对内质网应激有抑制作用。本研究在体外试验中探讨 DJ-1 在心肌细胞中对药物诱导内质网应激的调节作用。本研究发现，在内质网应激特异性诱导剂 TG 的作用下，内质网应激分子标记物 GRP78 及 calreticulin 表达显著增加，且心肌细胞过表达 DJ-1 可显著下调内质网应激反应。PE 作为心肌细胞肥厚的诱导剂，亦可导致心肌细胞内质网应激分子标记物转录水平及翻译水平的增加；心肌细胞过表达 DJ-1 可减轻 PE 导致的内质网应激反应。我们的试验证实了 DJ-1 基因过表达可显著抑制 TG 及 PE 导致的病理状态下心肌细胞的内质网应激反应。既往研究表明，DJ-1 蛋白缺失导致内质网应激反应过度激活，进而诱发细胞死亡[6]；DJ-1 可能通过其独特的分子伴侣作用，抑制某些蛋白过度堆积，进而发挥其对内质网应激反应的抑制作用[17]。在本研究结果中，DJ-1 不仅显著地抑制了 TG 诱导的内质网应激反应，其对 PE 诱导的心肌肥厚过程中的内质网应激反应亦有明显的负性调控作用。因此，DJ-1 是心肌肥厚过程中内质网应激作用的可调控分子。在心血管疾病危险因素作用下，早期适当的内质网应激反应可启动折叠蛋白反应(UPR)进而维持内质网内部稳态[18-19]；但持续存在的内质网应激反应可导致胞内钙离子稳态失衡、氧化应激反应增加及细胞凋亡启动[20]，进而加速心衰的发生、发展。鉴于内质网应激与冠心病、心肌肥厚、心力衰竭等心血管疾病的密切关系，结合本试验结果，DJ-1 可能是抑制过强、持续的内质网应激反应的重要靶点，对心血管疾病病死率的降低有重要临床意义。

综上所述，本研究首次证实 DJ-1 可显著抑制 TG 及 PE 诱导的心肌细胞内质网应激，为临床药理学研发预防心力衰竭的药物提供作用靶点及理论依据。

参考文献

[1] Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7(12): 1013-1030.

[2] Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, et al. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyteapoptosis [J]. Circulation, 2004, 110(6): 705-712.

[3] Bandopadhyay R, Kingsbury AE, Cookson MR, et al. The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease[J]. Brain, 2004, 127(Pt 2): 420-430.

[4] Taira T, Saito Y, Niki T, et al. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death [J]. EMBO Rep, 2004, 5(2): 213-218.

[5] Thomas KJ, McCoy MK, Blackinton J, et al. DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy [J]. Hum Mol Genet, 2011, 20(1): 40-50.

[6] Yokota T, Sugawara K, Ito K, et al. Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition [J].Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312(4): 1342-1348.

[7] 刘晨, 薛睿聪, 马虹, 等. DJ-1蛋白在去氧肾上腺素诱导的心肌细胞肥厚中的作用[J]. 岭南心血管病杂志, 2014, 20(5): 640-643.
Liu C, Xue RC, Ma H, et al. Role of DJ-1 in phenylephrine-induced cardiomyocytehypertrophy [J]. South China Journal of Cardiovascular Diseases, 2014, 20(5): 640-643.

[8] Fennewald SM, Kantara C, Sastry SK, et al. Laminin interactions with head and neck cancer cells under low fluid shear conditions lead to integrin activation and binding [J]. J Biol Chem, 2012, 287(25): 21058-21066.

[9] Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, et al. Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro: Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1 [J]. J Biol Chem, 2005, 280(28): 26339-26348.

[10] Li Y, Chen C, Yao F, et al. AMPK inhibits cardiac hypertrophy by promoting autophagy via mTORC1 [J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 558: 79-86.

[11] Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease[J]. Circ Res, 2010, 107(9): 1071-1082.

[12] Doroudgar S, Thuerauf DJ, Marcinko MC, et al. Ischemia activates the ATF6 branch of the endoplasmic reticulum stress response[J]. J Biol Chem, 2009, 284(43): 29735-29745.

[13] Brostrom MA, Mourad F, Brostrom CO. Regulated expression of GRP78 during vasopressin-induced hypertrophy of heart-derived myocytes [J]. J Cell Biochem, 2001, 83(2): 204-217.

[14] Arisa H, Eric C. Redox signaling loops in the unfolded protein response[J]. Cell Signal, 2012, 24(8): 1548-1555.

[15] Ní Fhlathartaigh M, McMahon J, Reynolds R, et al. Calreticulin and other components of endoplasmic reticulum stress in rat and human inflammatory demyelination[J]. Acta Neuropathol Commun, 2013, 1(1): 37.

[16] Taylor JM, Rovin JD, Parsons JT. A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes[J]. J Biol Chem, 2000, 275(25): 19250-19257.

[17] Wang Z, Zhang Y, Zhang S, et al. DJ-1 can inhibit microtubule associated protein 1 B formed aggregates [J]. Mol Neurodegener, 2011, 6: 38.

[18] Suyama K, Watanabe M, Sakabe K, et al. Over expression of GRP78 protects glial cells from endoplasmic reticulum stress[J]. NeurosciLett, 2011, 504(3): 271-276.

[19] 刘秀华. 内质网应激与心肌肥大 [J]. 生理学报, 2009, 61(1): 9-14.
Liu XH. Endoplasmic reticulum stress and myocardial hypertrophy[J]. Acta Physiologica Sinica, 2009, 61(1): 9-14.

[20] Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, et al. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress [J]. Front Cell Neurosci, 2014, 8: 213.

(编辑 刘清海)