

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.33.002

## 载脂蛋白 J 对缺氧/复氧诱导的乳鼠心肌细胞损伤的影响\*

李利娟<sup>1,2</sup>, 马彦卓<sup>2</sup>, 孔令锋<sup>2</sup>, 陈瑜<sup>2</sup>, 王冬梅<sup>2△</sup>

(1. 河北北方学院研究生部, 河北张家口 075000; 2. 白求恩国际和平医院心内科, 石家庄 050000)

**[摘要]** **目的** 观察载脂蛋白 J(ApoJ)对缺氧/复氧(H/R)诱导的乳鼠心肌细胞损伤的影响及其相关的信号传导通路。**方法** 用携带 ApoJ 基因的重组腺病毒感染乳鼠心肌细胞使 ApoJ 高表达。利用三气培养箱建立 H/R 模型, SOD 类似物 Mn(III)TBAP 和真核细胞翻译起始因子 2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ )去磷酸化抑制剂 Salubrinal 提前预处理, 将心肌细胞分成对照组、H/R 组、ApoJ 组、ApoJ+H/R 组、Mn(III)TBAP+H/R 组、Salubrinal+H/R 组。利用 MTT 法检测细胞的存活率; 酶联免疫吸附试验(ELISA)测定细胞乳酸脱氢酶(LDH)的漏出量、凋亡蛋白酶半胱天冬酶-3/7(caspase-3/7)及细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性; Western blot 检测 ApoJ、氧化酶 Nox2/gp91phox、内质网特异性凋亡蛋白 caspase-12、CHOP 的表达及 eIF2 $\alpha$  的磷酸化水平。**结果** ApoJ 基因重组腺病毒转染后, 心肌细胞 ApoJ 蛋白高表达。与对照组相比, H/R 组细胞存活率和 SOD 的活性明显下降, LDH 的漏出量及 caspase-3/7 的活性升高, Nox2/gp91phox、caspase-12、CHOP 蛋白的表达明显升高, eIF2 $\alpha$  的磷酸化水平升高。与 H/R 组相比, ApoJ 组、Mn(III)TBAP 组及 Salubrinal 组 LDH 的漏出量及 caspase-3/7 的活性明显降低, ApoJ 高表达使细胞存活率和 SOD 的活性显著升高, Nox2/gp91phox、caspase-12、CHOP 蛋白的表达明显下降, 而 eIF2 $\alpha$  的磷酸化水平显著升高。**结论** ApoJ 通过抗氧化应激及内质网应激的作用, 减轻 H/R 诱导的心肌细胞损伤。

**[关键词]** 载脂蛋白 J; 缺氧/复氧; 内质网应激; 氧化应激; 细胞凋亡**[中图分类号]** R331**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)33-4612-04

## Effect of apolipoprotein-J on hypoxia/reoxygenation induced myocardial cells injury in neonatal rat\*

Li Lijuan<sup>1,2</sup>, Ma Yanhuo<sup>2</sup>, Kong Lingfeng<sup>2</sup>, Chen Yu<sup>2</sup>, Wang Dongmei<sup>2△</sup>

(1. Department of Postgraduates, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China;

2. Department of Cardiology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050000, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the effects of apolipoprotein-J(ApoJ)on hypoxia/reoxygenation(H/R)induced neonatal rat ventricular cells(NRVCs)injury and its related signaling pathways. **Methods** ApoJ high expression was achieved by infection with recombinant adenovirus in NRVCs. The three gas incubator was used to establish H/R model, SOD mimetic Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin chloride and eIF2 $\alpha$  dephosphory inhibitor Salubrinal were performed the pretreatment. The NRVCs were divided into four groups; normal control group, H/R, ApoJ group, ApoJ+H/R group, Mn(III)TBAP+H/R group and Salubrinal+H/R group. The cell viability was measured by MTT assay; the leakages of LDH, the expression of SOD and caspase-3/7 activity were detected by ELISA. The protein expression levels of ApoJ, Nox2/gp91phox, caspase-12, CHOP, and the phosphorylation level of eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ )were determined by Western blot. **Results** ApoJ protein in myocardial cells was highly expressed after infection by recombinant adenovirus. Compared with the control group, the cell viability and the activity of SOD were significantly decreased, the leakages of LDH and the activity of caspase-3/7 were increased in the H/R group, the protein expression level of Nox2/gp91phox, caspase-12 and CHOP and the phosphorylation level of eIF2 $\alpha$  were increased. Compared with the H/R group, the leakages of LDH and the activity of caspase-3/7 in the ApoJ overexpression group, Mn(III)TBAP group and Salubrinal group were significantly decreased. ApoJ overexpression significantly increased the cell viability and the activity of SOD. Moreover, the protein expression level of Nox2/gp91phox, caspase-12 and CHOP were significantly decreased, while the phosphorylation level of eIF2 $\alpha$  was markedly increased. **Conclusion** ApoJ alleviates H/R induced myocardial cellular injury by antioxidative stress and endoplasmic reticulum stress.

**[Key words]** ApoJ; hypoxia/reoxygenation; endoplasmic reticulum stress; oxidative stress; cell apoptosis

心肌缺血/再灌注(MI/R)损伤是心肌组织缺血一段时间后恢复血流, 反而使心肌细胞损伤加重, 表现为再灌注后缺血的心肌出现舒缩功能降低、心律失常、心肌能量代谢障碍、超微结构的变化和血管无复流等现象。心肌细胞凋亡是 MI/R 损伤心肌细胞死亡的主要方式之一。载脂蛋白 J(Apolipoprotein-J, ApoJ)又被称为凝集素, 是一种新型多功能分泌型糖蛋白, 广泛存在于人体大部分组织与体液中<sup>[1]</sup>。该蛋白参与多种

不同的病理生理过程, 如膜的再利用、精子成熟、补体防御、脂质运输、抗炎、抗细胞凋亡、组织分化和重构、神经退行性变和肿瘤的形成等<sup>[2-3]</sup>。ApoJ 是急性期反应蛋白, 正常生理状态下表达量很少, 但在应激的病理状态下表达增多, 如急性心肌梗死、动脉粥样硬化、心肌炎和氧化应激等。研究表明当心脏受到损伤时, ApoJ 通过高表达发挥抗凋亡的作用<sup>[4]</sup>。Jun 等<sup>[5]</sup>发现 ApoJ 通过 Akt 和 GSK-3 $\beta$  的激活保护 H9C2 心肌细胞对

抗由过氧化氢诱导的凋亡。本课题组前期研究发现 ApoJ 通过高表达对抗由血管紧张素 II 诱导的细胞凋亡<sup>[6]</sup>,但目前针对 ApoJ 对 H/R 诱发的心肌细胞损伤影响的研究较少见。本研究通过建立离体乳鼠心肌细胞 H/R 损伤模型模拟 MI/R,观察 ApoJ 对 MI/R 诱导的乳鼠心肌细胞损伤的影响及其相关的信号传导通路。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** SD 大鼠,雌雄不拘,1~3 d 龄,由河北医科大学实验动物中心提供。携带 ApoJ 基因的重组腺病毒购自 Invitrogen; ApoJ 抗体购自 EterLife, Birmingham; CHOP、caspase-12、Nox2/gp91phox 抗体购自 Abcam; eIF2 $\alpha$ 、p-eIF2 $\alpha$  购自 Cell Signaling Technology; GAPDH、tublin 抗体购自 Sigma; LDH、SOD、caspase-3/7 活性测定试剂盒购自 Promega 公司; PVDF 膜购自 Santa Cruz; 增强型 ECL 发光液购自 Vazyme; 胰蛋白酶、II 型胶原蛋白酶、高糖 DMEM 培养基、新生胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco; MTT、二甲基亚砷 (DMSO)、丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠 (SDS)、四甲基乙二胺 (TEMED)、过硫酸铵 (APS)、Tween-20、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 均购自美国 Sigma 公司; RIPA 裂解液、PMSF 及 BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术研究所; 其余化学试剂为国产分析纯产品。

**1.2 原代心肌细胞培养** 参照文献<sup>[7]</sup>的方法并结合实际改进。在无菌条件下用眼科剪取出心脏置于预先盛有 AD 液的无菌平皿内。去除心房和大血管,剪成 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 左右大小的碎块,加入含有 0.06% 胰酶和 0.025% 的 II 型胶原酶的 AD 液中,37 $^{\circ}$ C 水浴振荡箱反复消化直至组织块完全消化为止。将含有血清的细胞离心 (1 500 r/min, 5 min) 后弃上清液,加入适量的完全培养液 (含高糖 DMEM, 10% 的胎牛血清, 1% 青链霉素) 重悬心肌细胞,接种至 100 cm<sup>2</sup> 培养皿。37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 1.5 h 以纯化心肌细胞 (差速贴壁法), 然后平均接种于 60 cm<sup>2</sup> 的培养皿中。调整细胞密度后,按 5 $\times$ 10<sup>5</sup>/mL 接种至 24 孔板, 每组 6 孔, 共 6 个复组, 4 $\times$ 10<sup>4</sup>/mL 接种至 96 孔板, 每组 6 孔, 共 6 个复组。

**1.3 ApoJ 的转染** 去除完全培养液, 用高糖 DMEM 冲洗细胞 2 次, 以 1:200 的浓度将携带 ApoJ 基因的腺病毒加入高糖 DMEM (加病毒时关风机) 混匀, ApoJ 转染组加入适量腺病毒和高糖 DMEM 的混匀液, 未携带 ApoJ 基因的腺病毒作为对照组。37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 4~6 h 后更换为完全培养液, 转染 36~48 h 后提取细胞蛋白进行 Western blot 检测。

**1.4 心肌细胞缺氧/复氧模型的建立及分组** 用纯氮 (N<sub>2</sub>) 以 1 L/min 的流速充分饱和和不含胎牛血清的 DMEM 培养基, 30 min 后换液并置于缺氧培养箱中, 同样以 1 L/min 的流速通入含 95% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的混合气体, 缺氧培养 4 h 后更换正常培养基放回正常含 95% 空气和 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中复氧培养 12 h, 构建乳鼠原代心肌细胞缺氧/复氧模型。实验分组: 对照组 (在正常含 95% 空气和 5% CO<sub>2</sub> 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养)、H/R 组 (按上述操作给予缺氧/复氧处理)、ApoJ 组 (用携带 ApoJ 基因的重组腺病毒感染乳鼠心肌细胞使 ApoJ 高表达, 在正常含 95% 空气和 5% CO<sub>2</sub> 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养)、ApoJ+H/R 组 (用携带 ApoJ 基因的重组腺病毒感染乳鼠心肌细胞使 ApoJ 高表达, 然后给予缺氧/复氧处理)、Mn (III) TBAP+H/R 组 [Mn (III) TBAP 提前预处理 1 h 后再给予缺氧/复氧干预], Salubrinal+H/R 组 (Salubrinal 提前预处理 1 h 后再给予缺氧/复氧干预)。

**1.5 MTT 检测细胞的存活率** 取生长状态良好的乳鼠原代

心肌细胞接种于 96 孔板中, 并按照分组分别处理各组细胞, 培养结束后在各孔加入 20  $\mu$ L 的 MTT 溶液 (5 mg/mL), 在摇床上作用 1 min, 摇匀, 在 37 $^{\circ}$ C 下继续正常培养 4 h 后, 弃上清液后各孔加入 150  $\mu$ L 的 DMSO, 加样器吹打均匀 (勿出气泡) 后在酶标仪上检测 570 nm 处各孔的吸光度值, 每组设置 6 个复孔。

**1.6 ELISA 法测定细胞中乳酸脱氢酶 (LDH) 的漏出量、细胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及 caspase-3/7 的活性** 取生长状态良好的乳鼠原代心肌细胞接种于 24 孔板中, 并按照分组分别处理各组细胞, 培养结束后收集各组细胞上清液, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 按照检测试剂盒的说明步骤, 检测各组心肌细胞上清液中 LDH 的分泌量。同时用 PBS 冲洗贴壁的细胞 2 遍, 加入胰酶 (0.25%) 消化 3~5 min, 显微镜下观察消化程度, 加入完全培养液终止消化, 将上述液体 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, PBS 清洗 1 遍后用少量的 PBS 重悬细胞, 利用超声裂解细胞膜 (40~60 W, 30 s, 间隔 10 s, 重复 2 次), 显微镜下观察细胞已裂解, 5 000 r/min 离心 15 min 后取上清液, 按照检测试剂盒的说明步骤, 检测各组心肌细胞内 SOD、caspase-3/7 的活性。

**1.7 Western blot 法检测 ApoJ、CHOP、caspase-12、Nox2/gp91phox、eIF2 $\alpha$ 、p-eIF2 $\alpha$  蛋白表达** 分别取各组心肌细胞, 提取蛋白, 用 BCA 法测定各组样本蛋白质浓度, 样本经凝胶电泳、转膜、封闭、加入一抗 (ApoJ、CHOP、caspase-12、Nox2/gp91phox、eIF2 $\alpha$ 、p-eIF2 $\alpha$ ) 和二抗, 用 GBOX 成像, 灰度值用 Image J 软件分析。

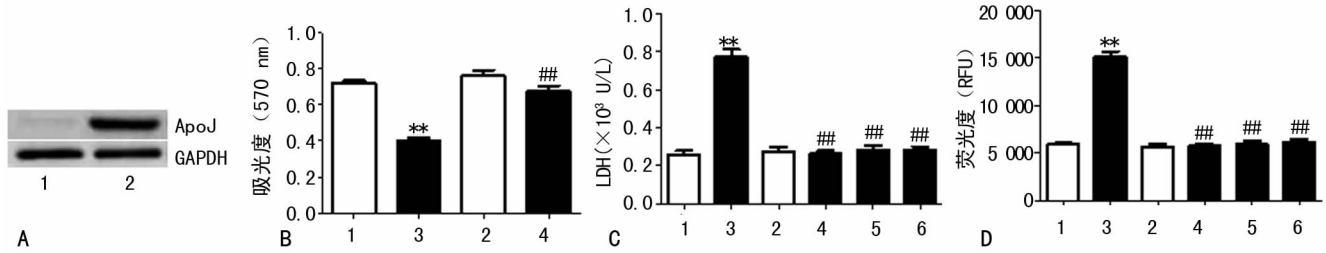
**1.8 统计学处理** 采用 SPSS14.0 统计软件进行分析, 计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示, 两样本均数比较采用 *t* 检验, 多个样本均数比较采用单因素方差分析。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 ApoJ 对细胞存活率、细胞损伤及凋亡的影响** 用携带 ApoJ 基因的腺病毒感染乳鼠心肌细胞, ApoJ 的表达明显升高, 见图 1A, 表明 ApoJ 高表达模型建立成功。与对照组相比, H/R 损伤后心肌细胞存活率明显下降; 与 H/R 组对比, ApoJ 高表达可使心肌细胞存活率明显升高 ( $P<0.05$ ), 见图 1B。与对照组相比, H/R 损伤后, 心肌细胞上清液 LDH 的漏出量及 caspase-3/7 的活性显著升高 ( $P<0.05$ ); 与 H/R 组对比, ApoJ 高表达、Mn (III) TBAP 和 Salubrinal 可使细胞上清液 LDH 的漏出量及 caspase-3/7 的活性明显下降 ( $P<0.05$ ), 见图 1C 和 1D。

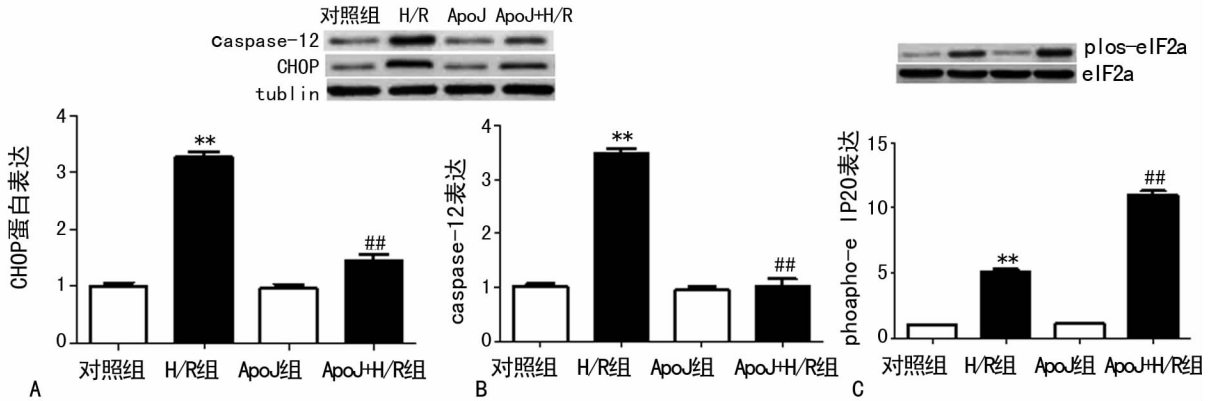
**2.2 ApoJ 通过 PERK-eIF2 $\alpha$  通路抑制 H/R 损伤诱导的内质网应激** 与对照组相比较, H/R 损伤后心肌细胞内质网应激相关凋亡蛋白 caspase-12 和 CHOP 的表达明显升高 ( $P<0.05$ ), 高表达 ApoJ 后, 与 H/R 组对比, ApoJ+H/R 组心肌细胞凋亡蛋白 caspase-12 和 CHOP 的表达显著下降 ( $P<0.05$ ) 见图 2A 和 2B。与对照组相比较, H/R 损伤后心肌细胞 eIF2 $\alpha$  的磷酸化水平升高 ( $P<0.05$ ), 高表达 ApoJ 后, 与 H/R 组对比, ApoJ+H/R 组心肌细胞 eIF2 $\alpha$  的磷酸化水平进一步升高 ( $P<0.05$ ), 见图 2C。

**2.3 ApoJ 抑制 H/R 诱导的氧化应激** 与对照组相比较, H/R 损伤后心肌细胞 SOD 的活性明显下降, Nox2/gp91phox 的表达明显升高 ( $P<0.05$ ), ApoJ 高表达后, 与 H/R 组对比, ApoJ+H/R 组心肌细胞 SOD 的活性明显升高, Nox2/gp91phox 的表达明显下降 ( $P<0.05$ ), 见图 3。



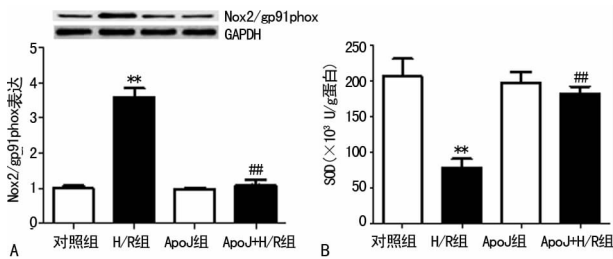
A: 通过 Western blot 的方法观察 ApoJ 重组腺病毒感染的心肌细胞 ApoJ 的表达。B: 通过 MTT 检测细胞的活力。C: 通过检测培养液中心肌细胞 LDH 的漏出量来确定心肌细胞的损伤程度。D: 通过检测 caspase-3/7 的活性明确 H/R 诱导的心肌细胞凋亡。\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较, #:  $P < 0.05$ , 与 H/R 组比较; 1: 对照组; 2: Apo J 组; 3: H/R 组; 4: Apo J + H/R 组; 5: Mn(III)TBAP + H/R 组; 6: Sajubriani + H/R 组。

图 1 高表达 ApoJ 减轻 H/R 诱导的心肌细胞损伤



A, B: Western blot 检测 caspase-12 和 CHOP 的表达。C: Western blot 检测 eIF2 $\alpha$  的磷酸化水平。\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.05$ , 与 H/R 组比较。

图 2 ApoJ 通过 PERK-eIF2 $\alpha$  通路抑制 H/R 损伤诱导的内质网应激



A: Western blot 检测心肌细胞 Nox2/gp91phox 蛋白的表达。B: 通过 SOD 试剂盒检测心肌细胞 SOD 的活性。\*:  $P < 0.05$  与对照组比较, #:  $P < 0.05$  与 H/R 组比较。

图 3 ApoJ 抑制 H/R 诱导的氧化应激

### 3 讨论

目前急性心肌梗死仍是全世界死亡和致残的主要原因之一。尽早开通梗死相关血管,恢复血流可以减少梗死面积、改善临床结果。然而,无论是溶栓或经皮冠状动脉成形术(PCI)治疗,MI/R 损伤都是无法回避的问题及难以克服的治疗难点,因此如何减轻 MI/R 损伤一直是研究热点。

给予缺氧/复氧处理后心肌细胞的存活率明显下降,LDH 的漏出量明显升高,表明 H/R 模型构建成功。ApoJ 基因重组腺病毒转染组 ApoJ 蛋白的表达明显升高,表明 ApoJ 高表达模型构建成功。心肌细胞 LDH 漏出量变化是反映心肌坏死的重要指标。caspase 是细胞死亡的关键性中介,而 caspase-3 是公认的细胞凋亡执行者。本试验测定了心肌细胞的存活率、LDH 的漏出量和 caspase-3/7 的活性,结果显示 H/R 损伤导致心肌细胞的存活率明显下降,LDH 漏出量和 caspase-3/7 活性升高,ApoJ 高表达可显著升高心肌细胞的存活率,降低 LDH 漏出量和 caspase-3/7 活性。表明 ApoJ 可减轻 H/R 诱导的心肌细胞损伤。

既往研究表明,心肌缺血再灌注损伤可促进活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)过度生成,产生强烈的氧化应激,进一步加重心脏病及其并发症的发生、发展<sup>[8-9]</sup>。在 I/R 心肌中 NADPH 氧化酶是最重要的超氧化物酶,Nox2/gp91phox 是 NADPH 氧化酶的关键组成部分。SOD 是机体内抗氧化系统的重要组成部分,通过清除自由基而发挥细胞保护作用,SOD 活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力。Jun 等<sup>[5]</sup>研究表明 ApoJ 能减轻 I/R 损伤诱导的氧化应激。本研究发现 H/R 损伤使 Nox2/gp91phox 的表达明显增高,SOD 活性显著下降,而 ApoJ 高表达可显著降低 Nox2/gp91phox 的表达,使心肌细胞 SOD 活性增加。以上结果表明,ApoJ 可减少超氧化物的过量产生,减轻 H/R 损伤诱导的氧化应激。

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是细胞的内源性自我保护性机制,有利于恢复细胞内环境稳态和维持生存,但过强的或长时间的 ERS 反应可以引起细胞的凋亡<sup>[10]</sup>。既往研究已证实,由 H/R 损伤诱导的过度 ERS 可通过下游的凋亡信号分子 CHOP、caspase-12 或 JNK 途径激活凋亡机制,进而激活下游的 caspase-3 等引起细胞凋亡,甚至导致细胞死亡,且 caspase-12 是内质网应激凋亡通路的特异性蛋白<sup>[11-14]</sup>。本研究发现 H/R 损伤导致心肌细胞 caspase-12、CHOP 的表达明显升高,而 ApoJ 高表达可降低 caspase-12、CHOP 的表达,表明 ApoJ 可通过减轻内质网应激来减少 MI/R 损伤诱导的细胞凋亡。H/R 损伤后,内质网应激通过诱导未折叠蛋白反应(UPR)试图恢复细胞稳态保护细胞,PERK 途径是 UPR 保护性机制中重要的信号通路。PERK 通路激活后,真核细胞翻译起始因子 2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ )发生磷酸化,使细胞内的大多数 mRNA 的翻译下降,增强内质网对蛋白的折叠功能,阻止错误折叠或未折叠蛋白的进一步聚集,促进内质网稳态的恢复<sup>[15-16]</sup>。Zhu 等<sup>[17]</sup>研究表明 eIF2 $\alpha$  的磷酸化水平升高可使大脑缺氧/复

氧造成的运动神经元损伤降至最低。本实验结果证实 H/R 损伤后 eIF2 $\alpha$  的磷酸化水平升高以减少未折叠蛋白及错误蛋白的合成, ApoJ 高表达后 eIF2 $\alpha$  的磷酸化水平进一步升高使此保护作用增强, 提示 ApoJ 是通过 PERK/ eIF2 $\alpha$  通路来减轻心肌细胞内质网应激反应。

Salubrinal 是一种由细胞合成的, 诱导 eIF2 $\alpha$  磷酸化和抑制其去磷酸化的选择性抑制物, 能通过抑制 eIF-2 $\alpha$  去磷酸化和 JNK 磷酸化, 减轻 ERS 和细胞凋亡。Mn(III)TBAP 是 SOD 的类似物、ROS 的清道夫, 可通过减少 ROS 而减轻内质网应激。本研究发现, H/R 损伤导致 LDH 漏出量和 caspase-3/7 活性明显升高, ApoJ 高表达、Mn(III)TBAP、Salubrinal 可显著降低心肌细胞 LDH 的漏出量和 caspase-3/7 活性。表明抑制 H/R 损伤诱导的氧化应激和内质网应激可减轻细胞损伤和凋亡。以上这些结果为 ApoJ 减轻 H/R 损伤诱导的心肌损伤提供了直接证据。

综上所述, ApoJ 通过抗氧化应激和抗内质网应激减轻 H/R 引起的心肌细胞损伤。

### 参考文献

[1] Wilson MR, Easterbrook SB. Clusterin is a secreted mammalian chaperone[J]. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25(3): 95-98.

[2] Jeong S, Ledee DR, Gordon GM, et al. Interaction of clusterin and matrix metalloproteinase-9 and its implication for epithelial homeostasis and inflammation[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(5): 2028-2039.

[3] Chaiwatanasirikul KA, Sala A. The tumour-suppressive function of CLU is explained by its localisation and interaction with HSP60[J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2(4): e219.

[4] Li Y, Sagar MB, Wassler M, et al. Apolipoprotein-J prevention of fetal cardiac myoblast apoptosis induced by ethanol[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357(1): 157-161.

[5] Jun HO, Kim DH, Lee SW, et al. Clusterin protects H9c2 cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis via Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway[J]. *Exp Mol Med*, 2011, 43(1): 53-61.

[6] Ma Y, Kong L, Nan K, et al. Apolipoprotein-J prevents angiotensin II-induced apoptosis in neonatal rat ventricular cells[J]. *Lipids Health Dis*, 2015(14): 114.

[7] 庞勇军, 孙莉, 谢文娟, 等. 新生大鼠心肌细胞分离、纯化及培养方法的改进[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2011, 4(4): 520-523.

[8] Ji L, Fu F, Zhang L, et al. Insulin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via reducing oxidative/nitrative stress[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298(4): E871-E880.

[9] Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70(2): 181-190.

[10] Schröder M, Sutcliffe L. Consequences of stress in the secretory pathway: The ER stress response and its role in the metabolic syndrome[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 648: 43-62.

[11] Groenendyk J, Sreenivasaiah PK, Kim do H, et al. Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart[J]. *Circ Res*, 2010, 107(10): 1185-1197.

[12] 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.

[13] Ron D, Walter P. Signal interaction in the endoplasmic reticulum unfolded protein response[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7): 519-529.

[14] Higa A, Chevet E. Redox signaling loops in the unfolded protein response[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(8): 1548-1555.

[15] Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(2): 89-102.

[16] Belaidi E, Decorps J, Augeul L, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to heart protection induced by cyclophilin D inhibition[J]. *Basic Res Cardiol*, 2013, 108(4): 363.

[17] Zhu Y, Fenik P, Zhan G, et al. Eif-2 $\alpha$  protects brainstem motoneurons in a murine model of sleep apnea[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(9): 2168-2178.

(收稿日期: 2016-05-18 修回日期: 2016-07-13)

(上接第 4611 页)

[9] Akgun M, Meral M, Onbas O, et al. Comparison of clinical characteristics and outcomes of patients with COPD exacerbation with or without venous thromboembolism; *Respiration* 2006; 73: 428-33[J]. *Respirat Med*, 2006, 2(3): 103.

[10] Tillie-Leblond I, Marquette CH, Perez T, et al. Pulmonary embolism in patients with unexplained exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease; Prevalence and risk factors[J]. *Ann Intern Med*, 2006, 144(6): 390-396.

[11] Querol-Ribelles JM, Tenias JM, Grau E, et al. Plasma d-dimer levels correlate with outcomes in patients with community-acquired pneumonia[J]. *Chest*, 2004, 126(4): 1087-1092.

[12] 阎昱升, 胡成平. 重症肺炎患者的机械通气脱机的影响因

素[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2015, 40(1): 107-111.

[13] Fimognari FL, Scarlata S, Conte ME, et al. Mechanisms of atherothrombosis in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2008, 3(1): 89-96.

[14] Kunter E, Ilvan A, Ozmen N, et al. Effect of corticosteroids on hemostasis and pulmonary arterial pressure during chronic obstructive pulmonary disease exacerbation[J]. *Respiration*, 2008, 75(2): 145-154.

[15] Fruchter O, Yigla M, Kramer MR. D-dimer as a prognostic biomarker for mortality in chronic obstructive pulmonary disease exacerbation[J]. *American J Med Sci*, 2015, 349(1): 29-35.

(收稿日期: 2016-02-19 修回日期: 2016-06-07)