

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.17.009

内质网应激与氧化应激在百草枯致大鼠肺纤维化中的作用*

彭礼波,董瑶瑶,张志坚[△]

(重庆市巴南区人民医院重症医学科 401320)

[摘要] 目的 探讨百草枯(PQ)中毒大鼠肺纤维化与内质网应激(ERS)的关系。方法 40只 sprague-dawley(SD)大鼠按随机数字表法分为对照组(8只)和染毒组(32只),20%PQ溶液灌胃后分别于1、7、14、21 d处死大鼠取肺组织,每个时间点处死8只。苏木素-伊红(HE)染色和 Masson 染色观察肺组织病理变化;比色法检测肺组织丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)变化;免疫组织化学法检测肺组织中糖调节蛋白78(GRP78)表达情况。结果 HE和 Masson 染色结果证实成功复制肺纤维化模型;模型组大鼠肺炎和肺纤维化程度较对照组严重。染毒后1 d肺组织MDA及GRP78蛋白表达均较对照组明显升高[MDA:(1.51±0.12) nmol/mg vs.(0.81±0.04) nmol/mg;GRP78:(14.25±6.36) vs.(3.18±1.02); $P<0.05$, $P<0.01$],GRP78蛋白表达于染毒后7 d逐渐下降。而染毒组肺组织SOD活性在各时间点均较对照组降低($P<0.05$)。结论 PQ中毒大鼠肺ERS标志蛋白GRP78明显升高,表明ERS在PQ中毒后肺纤维化中发挥一定的作用。

[关键词] 百草枯;中毒;肺纤维化;内质网;糖调节蛋白78

[中图分类号] R595.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)17-2330-03

The effect of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress on paraquat-induced pulmonary fibrosis in SD rats^{*}Peng Libo, Dong Yaoyao, Zhang Zhijian[△]

(Department of Critical Care Medical, People's Hospital of Chongqing Ba'nan District, Chongqing 401320)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between pulmonary fibrosis and endoplasmic reticulum stress (ERS) in rat with poisoning. **Methods** Forty adult healthy Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group ($n=8$) and paraquat poisoning group ($n=32$). Model of pulmonary fibrosis was established through intragastrically administering PQ with the dose of 50 mg/kg. The animals were sacrificed by exsanguination at 1, 7, 14, 21 days after administration with 20% paraquat solution. The paraffin sections of lung tissue were stained with hematoxylin-eosin (HE) and Masson trichrome to observe the pathological changes. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) was determined by immunohistochemistry, and the levels of malondialdehyde (MDA) and SOD in pulmonary tissue were detected by colorimetric method. **Results** HE staining and Masson staining of lung tissues proved that the classical model of pulmonary fibrosis was successfully constructed. The degree of alveolitis and pulmonary fibrosis in the model group was significantly more serious than that in the control group. The expressions of MDA, GRP78 in the lung tissue were significantly increased at 1 d after paraquat administration compared with those of control group [MDA: (1.51±0.12) nmol/mg vs. (0.81±0.04) nmol/mg; GRP78: (14.25±6.36) nmol/mg vs. (3.18±1.02) nmol/mg; $P<0.05$ or $P<0.01$], while the activity of SOD was decreased. GRP78 protein expression was decreased at 7 d after paraquat administration. **Conclusion** The results reveal that the expressions of GRP78 in paraquat poisoning group are up-regulated, suggesting ERS plays an important role in paraquat induced-pulmonary fibrosis.

[Key words] paraquat; poisoning; lung fibrosis; endoplasmic reticulum; Glucose regulating protein 78

研究表明,氧化应激、ATP耗竭及细胞内钙稳态失衡是百草枯(paraquat, PQ)中毒后脏器损伤的主要机制之一,也是常见的诱发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)的因素^[1-3]。适度的ERS有利于组织细胞恢复内环境稳态和维持细胞正常生理功能,但持续或过强的ERS则会导致组织细胞的损伤^[4]。PQ进入细胞后会引发强烈的氧化应激,因此认为PQ可能通过氧化应激诱导ERS而在肺纤维化形成环节中发挥一定的作用。本研究旨在探讨ERS在PQ中毒后肺纤维化形成中的作用,为PQ中毒后肺纤维化治疗提供实验依据。

1 材料与方

1.1 主要试剂 20%百草枯溶液由上海先正达公司提供;丙

二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及考马斯亮蓝试剂盒购于南京建成生物工程研究所。兔抗大鼠多克隆葡萄糖调节蛋白78(glucose regulating protein 78, GRP78)抗体、免疫组织化学SABC试剂盒及DAB显色剂均购于武汉博士德公司。

1.2 百草枯诱导肺损伤模型的建立及动物分组 40只清洁级sprague-dawley(SD)大鼠,体质量(220±40)g,雌雄各半。将实验动物按随机数字表法分组。对照组($n=8$):给予生理盐水1 mL一次性灌胃;PQ染毒组($n=32$):将20%PQ溶液按50 mg/kg用生理盐水稀释,给予1 mL一次性灌胃建立中毒模

* 基金项目:重庆市卫生局科研项目(2012-2-419)。作者简介:彭礼波(1971-),主治医师,本科,主要从事危重症基础与临床研究。

[△] 通讯作者, Tel: 13648385397; E-mail: zjz19790208@yeah.net。

型,灌胃后按不同时间分为 4 个亚组,每组 8 只大鼠。染毒组分别于灌胃后 1、7、14、21 d 腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,腹主动脉放血处死,取肺组织进行相应处理后备用;对照组于 21 d 作同样处理。

1.3 肺组织标本采集 按预定时间点处死动物。分离主支气管并向下剥离后取出全肺,无菌生理盐水冲洗,滤纸吸干。取右肺中叶 10% 中性甲醛溶液固定 48 h 后转移至 0.1 mol/L PBS 溶液中保存,待行肺组织病理学形态及免疫组织化学检测。左肺中叶取下后 -80 °C 保存,待测 SOD 及 MDA。

1.4 肺组织 GRP78 蛋白免疫组织化学检测 常规切片脱蜡水化,3% H₂O₂ 处理,微波修复抗原,滴加兔抗大鼠 GRP78 多克隆抗体(浓度 5%),4 °C 过夜后加生物素化羊抗兔 IgG,在 37 °C 孵育 30 min,加 SABC 工作液,DAB 显色,苏木素染色。阴性对照以 PBS 缓冲液代替一抗。每个样本随机抽取 5 个视野高倍镜下观察,以细胞质黄染的细胞作为 GRP78 阳性表达的细胞,计算出阳性表达细胞占细胞总数的百分比。阳性细胞百分率=(阳性细胞数/细胞总数)×100%。

1.5 肺组织 MDA 水平及 SOD 活性检测 肺组织 MDA 水平及 SOD 活性测定按试剂盒说明书采用比色法进行检测。

1.6 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差法,两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺组织 MDA 水平及 SOD 活性变化 与对照组比较,染毒组 MDA 水平随时间推移逐渐增加,各时间点均明显高于对照组(均 $P < 0.05$)。而 SOD 活性较对照组明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

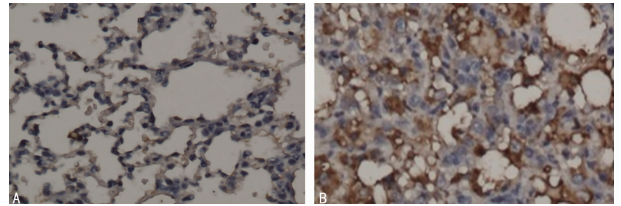
2.2 肺组织 GRP78 蛋白免疫组织化学结果及半定量分析 与对照组比较,染毒组 1 d 肺组织 GRP78 表达量明显增加($P < 0.01$)。染毒后 7 d 达高峰,14 d 明显下降,21 d 时与对照

组无统计学差异($P > 0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 不同时间点大鼠肺组织内 MDA、SOD 及 GRP78 蛋白表达变化比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)	GRP78
对照组	0.81±0.04	95.52±10.12	3.18±1.02
染毒组 1 d	1.51±0.12 ^a	78.14±9.52 ^a	14.25±6.36 ^b
染毒组 7 d	2.03±0.19 ^b	65.22±7.28 ^b	12.78±6.01 ^b
染毒组 14 d	2.99±0.22 ^b	41.85±5.11 ^b	6.85±4.23 ^a
染毒组 21 d	3.81±0.28 ^b	30.81±3.02 ^b	4.46±0.99

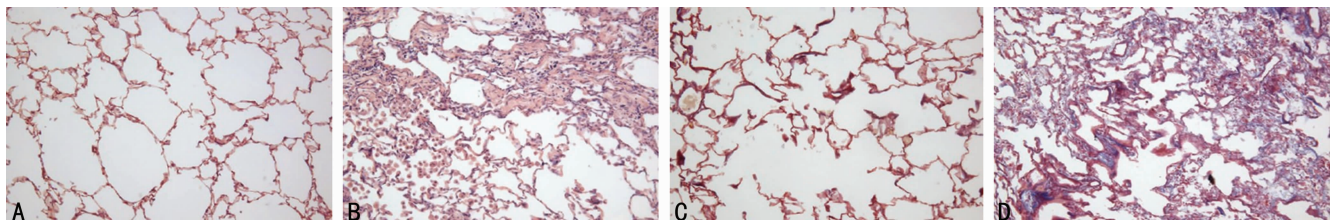
^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与对照组比较。



A: 对照组 21 d; B: 染毒组 7 d。

图 1 两组大鼠肺组织 GRP78 表达情况 (免疫组织化学×400)

2.3 肺组织形态学变色 HE 染色光镜下对照组肺泡结构清晰,肺泡壁薄,肺泡间隔正常,肺泡腔内无炎性细胞浸润。染毒组 21 d 肺组织内出现炎性细胞浸润,肺泡壁断裂,严重时出现弥漫性肺出血。见图 2A、B。Masson 染色见对照组肺泡结构正常,染毒组 21 d 可见蓝染的胶原纤维,随时间延长,蓝染胶原纤维逐渐增多。见图 2C、D。



A: 对照组 21 d(HE); B: 染毒组 21 d(HE); C: 对照组 21 d(Masson) D: 染毒组 21 d(Masson)。

图 2 肺组织病理切片(×200)

3 讨 论

大量基础研究表明氧化应激是肺纤维化的重要发病机制之一,特别在 PQ 中毒中该机制占有更加重要的作用,因此减轻 PQ 中毒后氧化应激、纠正机体氧化-抗氧化失衡可明显减轻肺纤维化程度^[5-8]。SOD 是机体内最主要的氧自由基清除酶,测定其活力可反应机体自由基清除能力;MDA 则是脂质过氧化产物,测定其含量可反映机体组织细胞氧化损伤的程度,对上述指标的联合检测能评价组织细胞的氧化应激水平。本研究中发现,染毒组大鼠肺组织 MDA 较对照组明显升高,而 SOD 则明显降低,病理切片提示肺组织受损程度随时间推移逐渐加重,说明氧化应激在 PQ 中毒肺损伤中占重要地位。

内质网是哺乳动物细胞重要的 Ca²⁺ 贮存器,也是蛋白质合成与翻译后修饰、多肽链正确折叠与装配、参与脂质代谢和类固醇激素合成的重要场所。研究发现,多种因素可导致内质网稳态破坏。而内质网能通过减少蛋白质翻译、分子伴侣以及相关蛋白表达上调,增加未折叠蛋白质降解等途径力图使内质网恢复稳态,这些变化统称 ERS^[9-10]。GRP78 是广泛分布于内质网的分子伴侣,其主要功能是协助蛋白质的折叠、装配及运输。当应激因素导致 ERS 发生后,GRP78 合成显著增加,因此又称其为 ERS 发生的标志性蛋白^[11]。越来越多的研究表明 ERS 参与了很多中毒相关性疾病的发生发展,如有机磷农药、重金属、乙醇及某些药物等^[12-15]。近年研究表明氧化应

激是 ERS 的重要诱因,ROS 是触发 ERS 介导凋亡通路的上游因子。本研究结果表明染毒组大鼠肺组织中 ERS 标志性蛋白 GRP78 表达显著增加,随时间延长而逐渐增加。结果表明 PQ 中毒导致肺纤维化中除了氧化应激作用外,还有 ERS 参与,其机制可能是 PQ 进入细胞后激活 ROS 级联反应,机体释放大量的 ROS,从而诱发 ERS 发生。但其具体机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Klass O, Fischer UM, Antonyan A, et al. Pneumocyte apoptosis induction during cardiopulmonary bypass: effective prevention by radical scavenging using n-acetylcysteine[J]. *J Invest Surg*, 2007, 20(6): 349-356.
- [2] 马涛, 韩璐, 胡文全. 内质网应激凋亡信号途径在脓毒症脾淋巴细胞凋亡中的作用研究[J]. *中国危重病急救医学*, 2009, 21(1): 48-50, 后插二.
- [3] 曹钰, 董玉龙, 姚尧, 等. 急性百草枯中毒所致急性肺损伤机制研究[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2005, 4(4): 303-305.
- [4] Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2656-2664.
- [5] Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Sánchez-Navarro A, et al. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2008, 38(1): 13-71.
- [6] Li SG, Crooks PA, Wei SC, et al. Toxicity of dipyridyl compounds and related compounds[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2004, 34(5): 447-460.
- [7] 周从阳, 谢妹, 罗雅娟, 等. 百草枯中毒大鼠肺组织中的 4-羟壬烯醛表达和乌司他丁的影响[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2012, 30(6): 457-459.
- [8] 贺晓艳, 赵光举, 卢中秋, 等. 急性百草枯中毒大鼠氧化应激水平及二巯丙磺钠的作用[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2009, 27(8): 476-479.
- [9] Zhang CB, Wang GH, Zheng Z, et al. Endoplasmic reticulum-tethered transcription factor cAMP responsive element-binding protein, hepatocyte specific, regulates hepatic lipogenesis, fatty acid oxidation, and lipolysis upon metabolic stress in mice[J]. *Hepatology*, 2012, 55(4): 1070-1082.
- [10] Satoh T, Abiru N, Kobayashi M, et al. CHOP deletion does not impact the development of diabetes but suppresses the early production of insulin autoantibody in the NOD mouse[J]. *Apoptosis*, 2011, 16(4): 438-448.
- [11] Inokuchi Y, Nakajima Y, Shimazawa M, et al. Effect of an inducer of Bip, a molecular chaperone, on endoplasmic reticulum(ER) stress-induced retinal cell death[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(1): 334-344.
- [12] 刘承芸, 李薇, 伍一军. 敌百虫诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的研究[J]. *毒理学杂志*, 2005, 19(3): 280-280.
- [13] Tamm C, Sabri F, Ceccatelli S. Mitochondrial-mediated apoptosis in neural stem cells exposed to manganese[J]. *Toxicological Sciences*, 2008, 101(2): 310-320.
- [14] 张勤丽, 王芳, 石樱桃, 等. 脂质过氧化损伤及内质网应激在铝致神经细胞凋亡中的作用机制[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2008, 26(3): 143-146, 封 3.
- [15] 李婷钰, 王苹, 杜波, 等. 卡那霉素对离体培养大鼠耳蜗毛细胞损害的实验研究[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(1): 56-58.

(收稿日期: 2014-11-10 修回日期: 2015-03-11)

(上接第 2329 页)

- [5] Zhou SM, Jung BC, Tan AY, et al. Spontaneous stellate ganglion nerve activity and ventricular arrhythmia in a canine model of sudden death[J]. *Heart Rhythm*, 2008, 5(1): 131-139.
- [6] Yu L, Scheriag BJ, Li S, et al. Low level vago-sympathetic nerve stimulation inhibits atrial fibrillation inducibility: direct evidence by neural recordings from intrinsic cardiac ganglia[J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2011, 22(4): 455-463.
- [7] Jayachandran JV, Sih HJ, Winkle W, et al. Atrial fibrillation produced by prolonged rapid atrial pacing is associated with heterogeneous changes in atrial sympathetic innervation[J]. *Circulation*, 2000, 101(10): 1185-1191.
- [8] Mitchell SJ, Merry AF, Frampton CA, et al. Cerebral protection by lidocaine during cardiac operations: a follow-up study[J]. *Annals of Thoracic Surgery*, 2009, 87(3): 820-825.
- [9] 赵福平, 王鹏飞, 孟俊鹏. 利多卡因对缺血再灌注离体大鼠心脏 Bcl-2 与 Caspase-3 表达的影响[J]. *中国现代药物应用*, 2010, 4(9): 33-34.
- [10] Chahine M, Chen LQ, Barchi RL, et al. Lidocaine block of human heart sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes[J]. *J Mol Cardiol* 1994, 24: 1231.
- [11] 栾霁冬, 韦南, 刘金秀, 等. 硬膜外阻滞预防急性心肌梗死后心电图紊乱的对比研究[J]. *黑龙江医学*, 2001, 25(11): 818.
- [12] Hurst JW. Thoughts about the abnormalities in the electrocardiogram of patients with acute myocardial infarction with emphasis on a more accurate method of interpreting ST segment displacement: Part II [J]. *Clin Cardiol*, 2007, 30(9): 443-449.

(收稿日期: 2014-11-15 修回日期: 2015-02-26)