基础研究 文章编号：0253-3626（2011）07-0805-04

内质网应激与氧化应激在肺纤维化中的作用及中药丹芍化纤胶囊对它的影响

谢汝佳，韩 冰，张成俊，何小飞，杨 婷，杨 勤
（贵阳医学院病理生理学教研室，贵阳 550004）

【摘 要】目的：观察内质网应激标志蛋白 GRP78 和氧化应激指标在博来霉素诱导的肺纤维化中的变化及中药丹芍化纤胶囊对它的影响。方法：选取 SD 大鼠 30 只，随机分为正常对照组（正常组）、肺纤维化模型组（模型组）和丹芍化纤胶囊治疗组（丹芍组），每组各 10 只。正常对照组气管内滴注生理盐水，模型组和丹芍组气管内一次性灌注博来霉素 5 mg/kg 诱导肺纤维化，丹芍组于造模第 2 天给予丹芍化纤胶囊混悬液灌胃 0.8 g/(kg·d)治疗，正常组及模型组则给予等量生理盐水灌胃。实验第 28 天称大鼠体重，处死各组大鼠，称肺湿重并收集肺组织，行 HE 和 Masson 染色观察肺组织病理变化；比色法检测肺组织 MDA 及 SOD 变化；采用免疫组织化学方法检测肺组织中 GRP78 蛋白的表达情况。结果：①与正常组比较，模型组大鼠肺组织中 MDA 含量及 GRP78 表达明显升高，而 SOD 酶活性则显著下降。②与模型组比较，丹芍组大鼠肺组织中 MDA 含量及 GRP78 蛋白表达明显降低，但仍较正常组高；SOD 酶活性显著回升，但未恢复正常水平。结论：丹芍化纤胶囊可在一定程度上减轻博来霉素诱导的肺泡炎症反应及肺纤维化进展，对肺纤维化具有一定的治疗作用。丹芍化纤胶囊对肺纤维化的干预机制可能与丹芍化纤胶囊提高肺组织 SOD 酶活性，对抗氧化应激以及抑制肺组织中 GRP78 的表达，减轻内质网应激反应有关。

【关键词】肺纤维化；丹芍化纤胶囊；内质网应激；氧化应激
【中国图书分类法分类号】R563.9 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-28

The effect of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and protective effect of Danshaohuaxian capsule in this model

XIE Ru-jia, HAN Bing, ZHANG Cheng-jun, HE Xiao-fei, YANG Ting, YANG Qin
(*Department of Pathophysiology, Guiyang Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and protective effect of Danshaohuaxian (DSHX) capsule in this model. *Methods*: Thirty SD rats were randomly divided into normal control group, pulmonary fibrosis model group and DSHX capsule therapeutic group. Pulmonary fibrosis model was induced by intratracheal instillation of single dose of bleomycin 5 mg/kg. DSHX capsule 0.8 g/kg was administered daily by oral in the therapeutic groups on the second day after bleomycin. All rats were killed on the 28th day. The levels of MDA and SOD, and the expression of GRP78 in pulmonary tissue were detected. *Results*: Compared with the control group, the levels of MDA and GRP78 in model group were increased, while the activity of SOD was decreased. After the treatment of DSHX capsule, the levels of MDA and GRP78 were decreased, while the activity of SOD was elevated. *Conclusion*: DSHC capsule can reduce pulmonary alveolus inflammation and pulmonary fibrosis induced by bleomycin, the mechanisms of which may be the elevation of the activity of SOD in lung tissue to alleviate oxidative stress and endoplasmic reticulum stress.

【Key words】pulmonary fibrosis; danshaohuaxian capsule; endoplasmic reticulum stress; oxidative stress

作者介绍：谢汝佳（1979-），女，讲师，硕士，研究方向：肝纤维化发病机制研究。
通信作者：杨 勤，女，教授，Email：qinyang@gmc.edu.cn。
基金项目：贵州省科技攻关资助项目（编号：黔科合 SZ 字[2008]3049 号）；贵州省科技厅国际科技合作项目（编号：黔科合外 G 字[2010]7016 号）。

肺纤维化是一种常见的肺间质疾病，它以弥漫性肺泡炎和肺泡结构紊乱并最终导致肺间质纤维化为特征[1,2]。目前，肺纤维化的发病机制尚不明确，并缺乏有效的治疗手段，病死率高，故对其发病机制的研究具有理论和实际意义。有研究表明在肺纤维化早期，由于肺泡巨噬细胞、中性粒细胞在趋化因子的作用下在肺内聚集、活化可释放大量的活性氧族（Reactive oxygen species，ROS），从而引起局部的氧化应激反应。ROS 可引起肺泡上皮细胞过度凋亡，而肺泡上皮细胞的凋亡过度可引起肺组织重构导致肺纤维化的发生[3]。内质网应激（Endoplasmic reticulum stress，ERS）是指细胞内质网钙稳态失衡或蛋白质加工运输障碍、生理功能发生紊乱的一种亚细胞器的病理过程[4]。近年来研究发现，内质网应激与机体的多种疾病密切相关，如糖尿病、心血管疾病、神经系统疾病和各种类型的肝损伤等。目前关于 ERS 与肺纤维化之间关系的研究尚未见报道。对于肺纤维化的治疗，西医大多采用糖皮质激素、免疫抑制剂和细胞毒药物等，这些药物对于改善肺纤维化有一定的效果，然而长期使用其毒副作用较大。因此，近年来许多学者致力于研究中药对肺纤维化的改善作用。丹芍化纤胶囊是一种中药复方制剂，具有活血化瘀、清热、利湿等功效。本课题组前期的研究发现丹芍化纤胶囊有较好的抗肝纤维化作用[5]，对肺纤维化也有一定的防治作用[6,7]。本研究拟用博来霉素复制大鼠肺纤维化模型，观察各组大鼠肺组织中内质网应激标志性蛋白 GRP78 和氧化应激指标 SOD 及 MDA 的变化，并对丹芍化纤胶囊干预大鼠肺纤维化的可能机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

①健康清洁级 SD 大鼠由贵阳医学院实验动物中心提供；②盐酸博莱霉素购自日本化药株式会社；③HYP、MDA、SOD 及考马斯亮蓝蛋白测试盒由南京建成生物有限公司提供；④兔抗大鼠多克隆 GRP78 抗体、免疫组化 SABC 试剂盒及 DAB 显色剂均购自武汉博士德公司。

1.2 动物分组及动物模型复制

SD 大鼠 30 只，雌雄各半，体重 180~220 g，在实验室适应性喂养 1 周后，随机分为 3 组：正常对照组（正常组）、肺纤维化模型组（模型组）和丹芍化纤胶囊治疗组（丹芍组），每组各 10 只。模型组和丹芍组大鼠参照 Szapiel[8]方法复制肺纤维化模型，大鼠经 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉，颈部消毒，无菌状态下切开颈部皮肤，逐层剥离直至暴露气管，经穿刺向气管内一次性滴注博莱霉素 5 mg/kg。注射后立即直立旋转鼠板，使药物在肺内分布均匀，诱导肺纤维化。正常组予等量生理盐水气管内滴入。从造模第 2 天起，丹芍组大鼠予丹芍化纤胶囊 0.8 g/(kg·d)灌胃治疗，模型组和正常组大鼠则以等量生理盐水灌胃。所有大鼠于实验第 28 天处死。

1.3 动物标本采集及实验指标的检测方法

1.3.1 肺组织收集 将大鼠称重后，股动脉放血处死，分离气管于喉头下 1.5 cm 切断主支气管，向下剥离，取出全肺，冰生理盐水冲洗，滤纸吸干，称重，计算肺系数（肺系数=肺湿重/体重）。取左肺中叶，浸入 4%中性甲醛溶液固定 48 h后，转移到 0.1 mol/L PBS 溶液中保存，供病理形态和免疫组化检测。冰上将左肺下叶剪成约 1 cm 大小，-70℃保存，以备检测 HYP、SOD 及 MDA。

1.3.2 肺组织病理学检查 4 %多聚甲醛固定后的肺组织石蜡包埋，常规组织切片，HE 和 Masson 染色，观察肺组织的病理变化。参照 Szapiel 等[8]方法确定肺泡炎和肺纤维化程度的分级。各组大鼠的肺泡炎和肺纤维化程度用平均秩次表示。平均秩次的计算方法是先将所有样本数据分别从小到大排序，再将所有数据统一由小到大编秩。相同数据在同一组里，按顺序编秩。相同数据在不同组里，取平均秩。然后将各组样本的秩次分别相加得秩和，用秩和除以各组的样本例数得平均秩次。

1.3.3 肺组织羟脯氨酸（HYP）、SOD 活性及 MDA 含量测定 按照试剂盒说明书进行检测。

1.3.4 肺组织免疫组织化学检测 切片常规脱蜡水化，3% H_2O_2 处理，微波修复抗原，加封闭液后，滴加兔抗大鼠GRP78多克隆抗体（工作浓度为 1:50），4℃过夜。次日加生物素化羊抗兔 IgG，在 37℃孵育 30 min，加 SABC 工作液，DAB 显色，苏木素复染。阴性对照以 PBS 缓冲液代替一抗。每个样本随机抽取 5 个高倍镜下视野，以胞浆黄染的细胞作为 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%。

1.4 统计学处理

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，用 SPSS 统计软件 11.0 版进行组间方差分析，计数资料用 *Ridit* 分析，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 正常组、模型组及丹芍组大鼠肺系数的比较

模型组大鼠肺系数与正常组比较明显升高（$P<0.01$）；丹芍组与模型组比较肺系数下降，差异有统计学意义（$P<0.05$），但仍未恢复正常水平，见表 1。

表 1 各组大鼠肺系数变化（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	肺系数(mg/g)
正常组	10	5.97 ± 0.36
模型组	10	10.17 ± 1.12▲
丹芍组	10	7.77 ± 1.94★

注：▲，$P<0.01$，与正常组比较；★，$P<0.05$，与模型组比较

2.2 正常组、模型组及丹芍组大鼠肺组织病理学变化

正常组大鼠双肺呈粉红色，表面光滑，弹性好；模型组大鼠双肺苍白，表面可见出血点和坏死灶，质地较硬，弹性差；丹芍组大鼠肺组织较模型组颜色稍红，弹性较模型组软，肺表面出血点、坏死灶较少。光镜下观察，正常组大鼠肺组织结构清晰，肺泡腔内未见炎性细胞，肺泡间隔正常，无炎症细胞

浸润及纤维组织增生的表现；模型组大鼠肺组织均有不同程度的肺泡炎症改变，肺泡腔及肺间质内可见大量炎性细胞浸润，肺间质成纤维细胞大量增生，多数肺泡腔变窄、结构破坏，有的甚至被纤维组织取代，呈条索样分布；丹芍组大鼠肺组织中可见少许炎症细胞浸润，肺泡有部分破坏，肺泡隔增厚程度较模型组轻。各组大鼠肺组织肺泡炎及肺纤维化程度分级见表 2、3 和图 1。

表 2 各组大鼠肺泡炎程度等级比较

组别	n	肺泡炎程度				平均秩次
		0	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	
正常组	10	10	0	0	0	6
模型组	10	0	1	7	2	23.45▲
丹芍组	10	1	5	4	0	17.05★

注：▲，$P<0.01$，与正常组比较；★，$P<0.05$，与模型组比较

表 3 各组大鼠肺组织纤维化程度比较

组别	n	肺纤维化程度				平均秩次
		0	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	
正常组	10	10	0	0	0	5.5
模型组	10	0	0	3	7	22.8▲
丹芍组	10	0	2	5	3	18.2★

注：▲，$P<0.01$，与正常组比较；★，$P<0.05$，与模型组比较

2.3 正常组、模型组及丹芍组大鼠肺组织 HYP、SOD 及 MDA 含量的测定

各组大鼠肺组织 HYP、SOD 及 MDA 含量的测定结果见表 4。由表 4 可见：模型组大鼠肺组织 HYP 含量明显高于正常组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。丹芍组与模型组相比，肺组织 HYP 含量下降，差异有统计学意义（$P<0.05$）；模型组大鼠肺组织 SOD 含量比正常组明显降低（$P<0.01$），而 MDA 含量明显升高（$P<0.01$）。丹芍组与模型组相比，肺组织 SOD 含量明显回升（$P<0.05$），但仍低于正常组，而 MDA 含量明显降低（$P<0.01$）。

表 4 各组大鼠肺组织 HYP、SOD 及 MDA 含量的结果（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	HYP(ng/mg)	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)
正常组	10	648.40 ± 55.04	52.11 ± 3.73	0.805 ± 0.022
模型组	10	1105.10 ± 115.57▲	35.67 ± 3.80▲	1.116 ± 0.095▲
丹芍组	10	812.80 ± 62.67★	44.42 ± 2.18★	0.959 ± 0.149★

注：▲，$P<0.01$，与正常组比较；★，$P<0.05$，与模型组比较

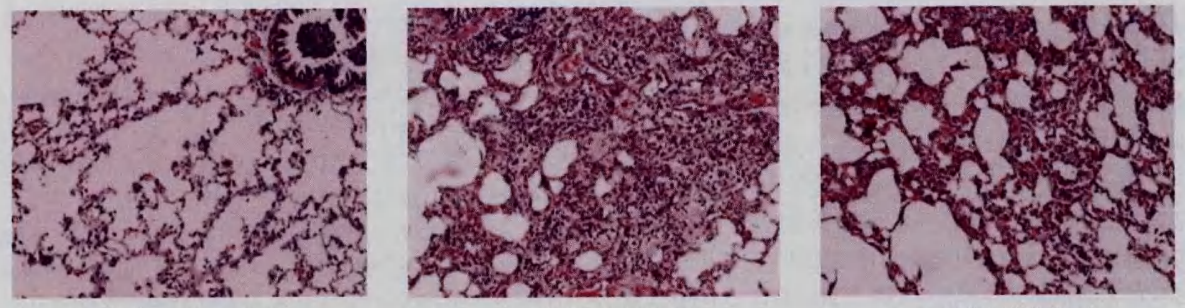
2.4 免疫组化检测肺组织中 GRP78 蛋白表达情况

免疫组化染色显示：正常对照组大鼠肺组织中仅有少数细胞胞浆被染成浅黄色，而模型组大鼠肺组织细胞的 GRP78 阳性表达呈棕黄色，较对照组染色增强，阳性表达主要位于支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞的胞浆内；丹芍组大鼠肺组织的阳性表达较模型组减少。各组大鼠肺组织中 GRP78 表达情况见表 5，图 2。

表 5 免疫组化 SABC 法检测大鼠肺组织中 GRP78 蛋白表达结果（$\bar{x}\pm s$）

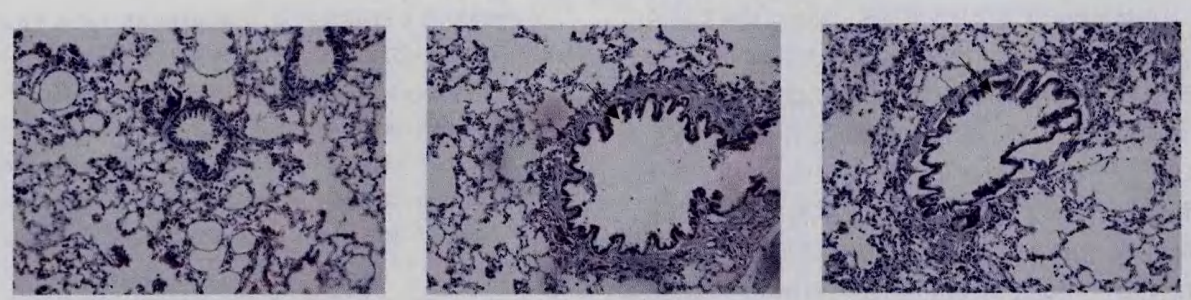
组别	n	GRP78阳性细胞百分率(%)
正常组	6	0.19 ± 0.08
模型组	6	0.46 ± 0.12▲
丹芍组	6	0.24 ± 0.05◆

注：▲，$P<0.01$，与正常组比较；◆，$P<0.01$，与模型组比较



A. 正常组大鼠肺组织　B. 模型组大鼠肺组织　C. 丹芍组大鼠肺组织

图 1 HE 染色显示各组大鼠肺组织病理学改变（HE ×200）



A. 正常组大鼠肺组织 GRP78 表达　B. 模型组大鼠肺组织 GRP78 表达　C. 丹芍组大鼠肺组织 GRP78 表达

注：图中箭头所指处为 GRP78 在支气管上皮细胞的阳性表达

图 2 免疫组化 SABC 法显示各组大鼠肺组织 GRP78 的表达（SABC ×400）

3 讨 论

肺纤维化是一种导致呼吸功能严重障碍的纤维化疾病，其病理特征为成纤维细胞大量增生及细胞外基质的过度沉积[9]。在肺纤维化过程中几乎都要经历肺泡炎阶段，此时肺泡巨噬细胞及中性粒细胞在下呼吸道聚集，并释放大量的 ROS（包括过氧化氢、羟自由基、超氧阴离子），从而引起局部的氧化应激反应。目前的研究表明，ROS 可引起肺泡上皮细胞过度凋亡，导致肺组织结构的破坏，最终产生肺纤维化[3]。SOD 是体内清除氧自由基的主要酶，具有超强的抗氧化作用[10]，其活力的测定可间接反映机体清除自由基的能力。MDA 为脂质过氧化的产物，测定 MDA 含量可反映机体内组织脂质过氧化程度，间接反映组织细胞氧化损伤的程度[11]。因此 SOD 和 MDA 通常联合应用评价细胞的氧化应激水平。

ERS 是指蛋白质折叠异常、内质网内钙流失或超载、蛋白质糖基化形成障碍等导致内质网生理功能发生紊乱的一种亚细胞器病理过程[12]。ERS 可促进内质网对蓄积在网腔内的错误折叠或未折叠蛋白质进行处理，从而有利于维持细胞的正常功能并使之存活。但是，当 ERS 水平超过细胞自身修复能力时，就会激活内质网细胞凋亡途径而导致细胞损伤[13]。GRP78，即葡萄糖调节蛋白 78，是广泛分布于内质网的分子伴侣，主要作用是协助蛋白质的折叠、装配和运输。在 ERS 条件下，GRP78 的合成会显著增加，故 GRP78 可以作为 ERS 发生的标志[14,15]。

在我们的实验中发现，模型组大鼠肺组织出现不同程度的肺泡炎症变化，肺泡间隔增厚，肺泡腔破坏，Masson 染色见大量散在绿染的胶原纤维。另外，模型组大鼠肺系数、肺组织中羟脯氨酸（HYP）水平（反应胶原代谢情况）较正常组明显增加，这些结果说明肺纤维化动物模型的复制是成功的。同时，我们还观察到模型组大鼠肺组织匀浆中 SOD 活性较正常组显著降低，MDA 含量明显升高，这一变化趋势与肺组织的病理损害是一致的，这表明氧化应激可能是博来霉素诱发肺纤维化的发病机制之一。而丹芍组大鼠肺系数及 HYP 含量较模型组有所降低，肺泡炎及肺纤维化程度也有所改善，同时肺组织匀浆中 SOD 活性较模型组回升，MDA 含量显著下降，这些结果提示丹芍化纤胶囊可增加肺组织抗氧化酶的活性，降低氧化应激对肺组织的损害。近年来的研究证实，氧化应激是 ERS 的重要诱因，这主要是因为活性氧可使内质网（Endoplasmic reticulum，ER）腔内蛋白质被氧化修饰并滞留于 ER 腔内，从而使蛋白质合成受到抑制，当 ER 腔内非折叠蛋白积聚时，就会诱发 ERS[16]。在我们的实验中发现模型组大鼠肺组织中 ERS 标志蛋白 GRP78 表达显著增加，经丹芍化纤胶囊治疗后，肺组织中 GRP78 的表达明显减少。这些结果表明在肺纤维化过程中除了有氧化应激的作用外还有 ERS 的参与，其机制可能是在肺纤维化的过程中，由于肺泡巨噬细胞和中性粒细胞的激活释放大量 ROS，活性氧的大量释放诱发了 ERS 的发生。而丹芍化纤胶囊干预肺纤维化的机制可能与其提高肺组织 SOD 酶活性，对抗氧化应激并减轻内质网应激反应有关。

参 考 文 献

[1] Eferl R, Hasselblatt P, Rath M, et al. Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1[J]. PNAS(USA), 2008, 105: 10525-10530.

[2] Matsuyama W, Watanabe M, Shirahama Y, et al. Discoidin domain receptor 1 contributes to the survival of lung fibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Pathol, 2006, 168: 866-877.

[3] 李今朝，李艳杰，李振华，等. 实验性肺纤维化细胞凋亡及 Fas/FasL 基因变化[J]. 中华结核和呼吸杂志，2005，28(3)：184-187.

[4] 温 韬，张海燕，卢 静，等. 内质网应激在四氯化碳致大鼠急性肝损伤中的作用探讨[J]. 胃肠病学和肝病学杂志，2008，17(10)：786-789.

[5] 杨 婷，谢汝佳，罗新华，等. 丹芍化纤胶囊对肝纤维化大鼠肝脏 Smads 分子表达的影响[J]. 中国病理生理杂志，2010，26(9)：1807-1812.

[6] 张 崇，韦小瑜，吴亚芸，等. 丹芍化纤胶囊抗博莱霉素所致大鼠肺纤维化的实验研究[J]. 中华中医药杂志，2006，21(11)：686-688.

[7] 陈应强，吴亚云，穆 茂，等. 丹芍化纤胶囊对博来霉素肺纤维化大鼠肺组织结缔组织生长因子表达的影响[J]. 时珍国医国药，2009，20(2)：454-455.

[8] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4): 893-899.

[9] Chua F, Gauldie J, Laurent G J. Pulmonary fibrosis: searching for model answers[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 33: 9-13.

[10] 张海燕，温 韬，丁淑芹，等. 内质网及氧化应激在大鼠慢性肝损伤中的变化[J]. 肝脏，2009，14(1)：23-26.

[11] 翟声平，柴文戍，任美华. Fas/FasL 与氧自由基在肺纤维化大鼠细胞凋亡中的作用研究[J]. 中国全科医学，2007，10(9)：711-713.

[12] 汤 青，刘树民，王加志，等. 黄药子及黄药子配伍当归对大鼠肝组织 grp78 和 bad 基因表达的影响[J]. 药物不良反应杂志，2010，12(2)：91-95.

[13] 代荣阳，严冬梅，段春燕，等. 阻断 MEK/ERK 上调内质网应激条件下 CHOP 和 p53 表达[J]. 泸州医学院学报，2009，32(5)：461-464.

[14] Xu C, Bailly Maitre B, Reed J C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2656-2664.

[15] 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.

[16] 闵 敏，陈东风. 内质网应激与非酒精性脂肪性肝病[J]. 国际消化病杂志，2008，28(6)：458-460.

（责任编辑：冉明会）