

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.06.005

青蒿琥酯对肺纤维化大鼠热休克蛋白 47 表达的影响*

王昌明, 禤秀萍

(桂林医学院附属医院呼吸内科, 广西桂林 541001)

摘要:目的 探讨青蒿琥酯对肺纤维化大鼠热休克蛋白 47(Hsp47)表达的影响。方法 雄性 SD 大鼠 30 只,分为对照组、模型组和青蒿琥酯干预组(简称干预组)。对照组一次性气管内滴入生理盐水约 0.4 mL,模型组和干预组一次性气管内滴入博来霉素 5 mg/kg。对照组和模型组次日每天腹腔注射生理盐水 1.0 mL。干预组每天腹腔注射青蒿琥酯 10 mg/100 g。记录 0、14、28 d 大鼠的体质量。各组大鼠于第 28 天处死,计算肺系数,取肺组织进行苏木精-伊红(HE)染色、Masson 染色、羟脯氨酸检测和 Hsp47、I 型胶原 RT-PCR 和 Western blot 检测。**结果** (1)对照组大鼠体质量增长明显高于其他两组($P<0.05$)。(2)肺系数:模型组 $[(12.31\pm1.89)\text{mg/g}]>$ 干预组 $[(8.54\pm0.67)\text{mg/g}]>$ 对照组 $[(4.81\pm0.38)\text{mg/g}]$, $P<0.05$ 。(3)Ashcroft 评分:模型组 $[(5.70\pm1.09)\text{分}]>$ 对照组 $[(3.08\pm0.56)\text{分}]$,模型组 $[(5.70\pm1.09)\text{分}]>$ 干预组 $[(4.01\pm1.25)\text{分}]$, $P<0.05$;对照组和干预组差异无统计学意义($P>0.05$)。(4)羟脯氨酸含量:模型组 $(620.33\pm66.16)\mu\text{g/g}>$ 对照组 $(379.00\pm35.51)\mu\text{g/g}$,模型组 $(620.33\pm66.16)\mu\text{g/g}>$ 干预组 $(429.00\pm36.51)\mu\text{g/g}$, $P<0.05$;对照组和干预组间差异无统计意义($P>0.05$)。(5)Hsp47 mRNA:模型组高于对照组,模型组和干预组比较差异无统计意义($P>0.05$)。I 型胶原 mRNA:模型组 $>$ 干预组 $>$ 对照组($P<0.05$)。(6)Hsp47 蛋白表达水平模型组明显高于对照组和干预组。**结论** 青蒿琥酯可能通过下调 Hsp47 表达水平来抑制胶原的合成进而减轻肺纤维化。

关键词:肺纤维化;Hsp47 热休克蛋白质类;青蒿琥酯
中图分类号:R714.253 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-8348(2015)06-0732-04

The effect of artesunate on heat shock protein 47 expression in rats of pulmonary fibrosis*

Wang Changming, Xuan Xiuping

(Department of Respiratory Medicine, the Afflicted Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of artesunate on the expression of heat shock protein 47(Hsp47) in pulmonary fibrosis in rats. **Methods** Thirty SD male rats were randomly divided into control group, model group and artesunate intervention group (intervention group). Rats in control group were intrachacheally instilled with saline (0.4 mL), while rats in other two groups 5 mg/kg bleomycin. Rats in both control group and model group were intraperitoneal injected with 1 mL saline per day subsequently. And the rats in intervened group were intraperitoneal injected with 10 mg/100 g artesunate per day. The body weight of day 0, day 14 and day 28 were recorded. All the rats were sacrificed on day 28. The pulmonary coefficient and the hydroxyproline content were observed. The expression of Hsp47mRNA and Collagen I mRNA were evaluated by RT-PCR. The Hsp47 expression was also detected by Western Blot. The pathological changes were analyzed by hamatoxylin-eosin (HE) stain and Masson stain. **Results** (1)The body weight of control group grew much faster than other groups ($P<0.05$). (2)Pulmonary coefficient; model group $(12.31\pm1.89)\text{mg/g}>$ intervention group $(8.54\pm0.67)\text{mg/g}>$ control group $(4.81\pm0.38)\text{mg/g}$ ($P<0.05$). (3)Ashcroft Scores: model group $(5.70\pm1.09)>$ control group (3.08 ± 0.56) , model group $(5.70\pm1.09)>$ intervention group (4.01 ± 1.25) . There was no significant difference between control group and intervention group ($P>0.05$). (4)Hydroxyproline content: model group $(620.33\pm66.16)\mu\text{g/g}>$ control group $(379.00\pm35.51)\mu\text{g/g}$, model group $(620.33\pm66.16)\mu\text{g/g}>$ intervention group $(429.00\pm36.51)\mu\text{g/g}$ ($P<0.05$), there was no significant difference between control group and intervention group. (5)Hsp47mRNA expression: model group and intervention group $>$ control group ($P<0.05$), there was no difference between the first two groups ($P>0.05$). Collagen I mRNA: model group $>$ intervention group $>$ control group ($P<0.05$). (6)Western blot showed that Hsp47 expression of model group was the highest in all three groups. **Conclusion** These results indicate that artesunate might inhibit pulmonary fibrosis and depress Collagen I production, and it's probably a result of Hsp47 down regulation.

Key words: pulmonary fibrosis; Hsp47 heat shock protein; artesunate

肺纤维化是一种进行性发展的以细胞外胶原过度沉积为特征的间质性肺疾病。临床上尚无有效的治疗方法。肺纤维化的病因仍未明确,共同的病理改变表现为肺泡上皮的损伤,成纤维细胞的增殖和大量的胶原沉着。

热休克蛋白 47(heat shock protein 47, Hsp47)是胶原特异性分子伴侣,存在内质网中,参与前胶原的加工、折叠、合成及分泌,起着质量监控作用,避免产生和分泌错误结构的前胶原^[1]。在肺纤维化进展过程中,纤维化的病变区域及其附近都

* 基金项目:广西自然科学基金资助项目(2011GXNSFA018220)。 作者简介:王昌明(1963—),教授,博士,主要从事肺纤维化、慢阻肺研究。

能检测到 Hsp47^[2-3]。肺纤维化中肌成纤维细胞、Ⅱ型肺泡上皮细胞、F4/80 阳性的巨噬细胞均表达 Hsp47^[4]。Hsp47 可以作为产生胶原细胞的表型标志^[5]。目前有很多研究显示通过使用 Hsp47 反义寡核苷酸探针能够明显减轻大鼠肺纤维化程度且可以降低实验动物的病死率^[6-7]，而且通过 Hsp47 条件性基因敲除的方法可以使细胞外胶原含量明显降低^[8]。抑制 Hsp47 表达可以减轻肺纤维化。Hsp47 可以作为胶原相关疾病治疗的潜在位点^[9]。

青蒿素是从菊科艾属黄花蒿茎叶中提取的一种含过氧基团的倍半萜内酯，经化学改造可生成多种衍生物，如双氢青蒿素、蒿甲醚、青蒿琥酯等。作者前期研究表明青蒿琥酯能够减少人胚肺成纤维细胞胶原的产生^[10]。但青蒿琥酯通过何种途径减少胶原的产生仍需进一步探讨。本实验将从青蒿琥酯能否通过下调 Hsp47 表达来影响胶原的产生以研究青蒿琥酯的抗纤维化机制。

1 材料与方法

1.1 试剂及配制 注射用盐酸博来霉素(1.5 万博来霉素单位/支)购于浙江海正药业股份有限公司(国药准字 H20055883,批号 120101),使用时 3 mL 生理盐水稀释,浓度为 5 mg/mL;注射用青蒿琥酯(60 mg/支)购于桂林南药股份有限公司(国药准字 H10930195,批号 LA120920),使用时 1 mL 碳酸氢钠充分溶解,再用 2 mL 生理盐水稀释,浓度为 20 mg/mL;羟脯氨酸测试盒(碱水解法)购于南京建成生物工程研究所;Hsp47 抗体购于 Abcam 公司;Trizol 试剂盒、2×TaqPCRMasterMix 均购于天根公司;逆转录试剂盒购于 TaKaRa 公司;引物由上海英俊公司合成。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 雄性 SD 大鼠 180~250 g 30 只,购于桂林医学院 SPF 实验动物中心,按抽签的方法随机分为对照组、模型组和青蒿琥酯干预组(简称干预组)。对照组 8 只,模型组 132 只,干预组 9 只。

1.2.2 动物模型复制 乙醚吸入麻醉后将大鼠仰卧固定于试验台上,颈前部脱毛后用碘伏消毒,剪开皮肤后逐层钝性分离暴露气管。用 1 mL 的注射器注射约 0.4 mL 生理盐水(对照组)或 5 mg/kg 博来霉素(模型组和干预组),在气管软骨环间刺入,稍微往气管软骨环方向进针注入液体,立即将动物直立,左右摇晃,尽量使液体在肺内分布均匀。逐层缝合颈部肌肉和皮肤。对照组和模型组次日每天注射生理盐水 1.0 mL。干预组次日每天注射青蒿琥酯 10 mg/100 g,观察每组大鼠的体质质量变化,各组大鼠于第 28 天处死。

1.2.3 实验动物取材 10%水合氯醛 0.3 mL/100 g 腹腔注射麻醉后,开胸暴露气管后沿气管进行钝性分离,取出肺脏,用预冷的 DEPC 清洗,尽量洗净血丝后,用滤纸吸干,称取全肺湿质量,计算肺系数。取右肺组织用冻存管装好后置于液氮中转至-80℃冰箱中冻存,其中右上肺用于羟脯氨酸测定,其余用于分子生物学检测。取左肺置于 10% 甲醛中固定 24 h 后,用于 HE 染色、Masson 染色。

1.2.4 Hsp47、I 型胶原 mRNA 检测 按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。按逆转录试剂盒进行逆转录。Hsp47 上游引物序列 5'-AGA ACC AAG GCA GAC TTA TCG C-3',下游引物序列 5'-CCG TAG ATG TCC TGG TCA AAG-3',产物大小为 121 bp。I 型胶原上游引物序列 5'-GGC TTC AAA GGC ATT CGA GGA C-3',下游引物序列 5'-GCT CCG ACA CGC

CCT CTC TC-3',产物大小为 158 bp。选 GAPDH 为内参照,上游引物序列 5'-GTG CTG AGT ATG TCG TGG AG -3',下游引物序列 5'-ACC AGT GGAT GCA GGG AT-3',引物大小为 365 bp。逆转录的条件为:第一步 42℃,2 min。第二步 37℃,15 min;85℃,5 s,4℃保存。PCR 的条件为 94℃3 min;94℃30 s,55℃30 s,72℃1 min,循环 30 次;72℃5 min,4℃保存。

1.2.5 Hsp47 Western blot 检测 提取肺组织总蛋白,测定总蛋白含量,根据蛋白浓度使每孔蛋白上样体积为 12 μL,蛋白量 30 μg。行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳,电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗 4℃摇床孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入二抗室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入发光液后暗室曝光。内参选用 GAPDH,一抗室温孵育 1.5 h,二抗 1.0 h,其余反应条件和步骤与 Hsp47 相同。

1.3 观察指标 (1)大鼠一般状态观察,观察大鼠毛发、精神、活动、食欲、有无啰音、体质量变化,观察大鼠病死率。(2)肺脏大体观察,计算肺系数,称取湿肺质量,肺系数=肺质量(mg)/体质量(g)。(3)羟脯氨酸测定,取右上肺组织解冻后严格按照说明书操作。(4)病理形态学观察,10%福尔马林固定后,制备蜡块,进行 HE 染色和 Masson 染色。光镜下观察 HE 染色、Masson 染色。评价纤维化程度,采用 Ashcroft 评分标准^[17]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间均数间比较采用单因素方差分析或非参数分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状态的改变 对照组毛发光滑,呼吸平稳,活动度正常,食欲尚可,多数无啰音,少数术后 1~2 d 内有啰音。模型组和青蒿琥酯干预组进食显著减少,毛发蓬松无光泽,呼吸急促,腹式呼吸明显,精神萎靡,活动少,常闭眼蜷缩,啰音非常明显且术后持续时间较长,有部分模型组大鼠第 14 天仍可闻及明显啰音。术后饲养过程中,模型组有 7 只大鼠死亡,干预组有 3 只大鼠死亡,对照组无死亡。对照组大鼠的体质量逐渐上升,少数术后 2~3 d 体质量下降,之后上升。模型组和干预组体质量减轻明显,术后第 6 天左右降至最低,最后逐渐缓慢上升。第 28 天时对照组体质量显著高于模型组和干预组,而模型组和干预组差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠术后体质量变化($\bar{x} \pm s$,g)			
组别	0 d	14 d	28 d
对照组	210.00±16.89	257.00±26.08	326.13±44.13
模型组	219.86±26.39	209.00±54.82	250.29±73.63 ^a
干预组	217.33±8.29	212.50±43.81	274.33±32.68 ^a

^a: $P < 0.05$,与对照组比较。

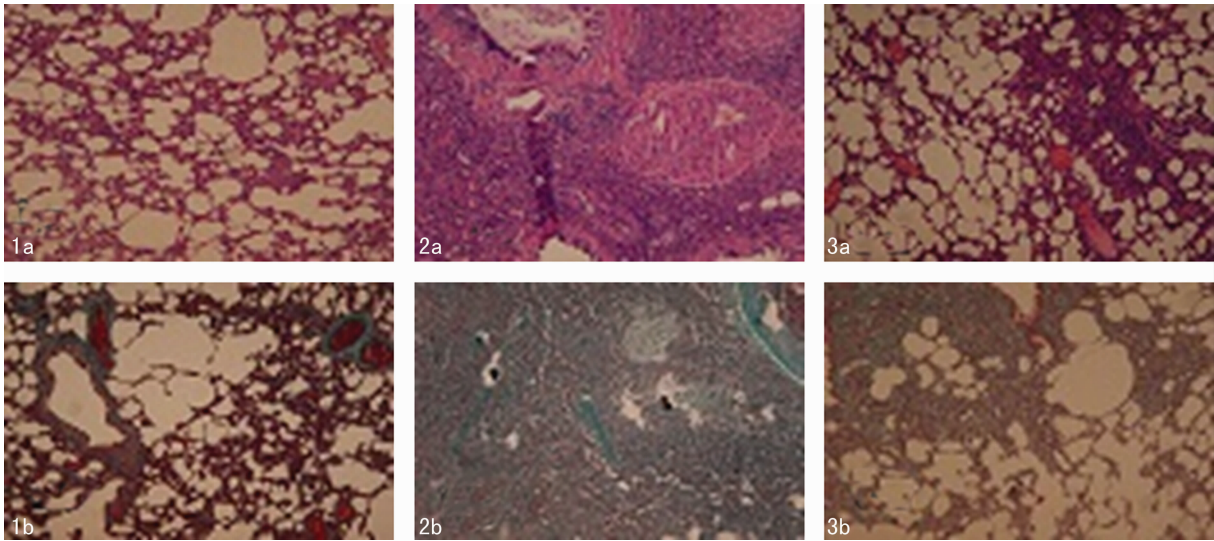
表 2 各组大鼠肺系数、羟脯氨酸含量和 Ashcroft 评分($\bar{x} \pm s$)			
组别	肺系数(mg/g)	羟脯氨酸(μg/g)	Ashcroft 评分(分)
对照组	4.81±0.38	379.00±35.51	3.08±0.56
模型组	12.31±1.89 ^a	620.33±66.16 ^a	5.70±1.09 ^a
干预组	8.54±0.67 ^{ab}	429.00±36.51 ^b	4.01±1.25 ^b

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较。

2.2 各组肺脏大体外观、大鼠肺系数、羟脯氨酸含量 肺脏大体观:对照组肺脏较光滑,质地均匀,呈粉红色。模型组和干预组肺脏体积增大,颜色灰暗,表面凹凸不平,可见灰白色结节甚至肺大泡。肺系数:模型组>干预组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。羟脯氨酸含量:模型组>对照组($P<0.05$),模型组>干预组($P<0.05$),对照组和干预组差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

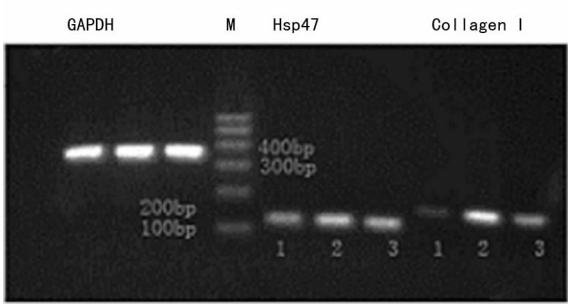
2.3 病理形态学观察 HE 染色可见对照组肺泡结构较完

整,肺泡壁轻微增厚,少量点灶状纤维化灶,炎症细胞浸润不明显。模型组肺泡结构破坏明显,可见大片的实变区域,大量炎症细胞浸润,可见较多均质淡染的纤维条索。干预组肺泡结构破坏较模型组轻,实变区域较少,可见炎细胞浸润,纤维条索灶较少,见图 1。Masson 染色可见模型组肺组织胶原表达量(蓝色区域)明显比对照组和干预组高,见图 1。Ashcroft 评分模型组>对照组($P<0.05$),模型组>干预组($P<0.05$),对照组和干预组差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。



1:对照组;2:模型组;3:干预组;a:HE 染色($\times 100$);b:Masson 染色($\times 100$)。

图 1 各组大鼠肺组织病理形态学观察

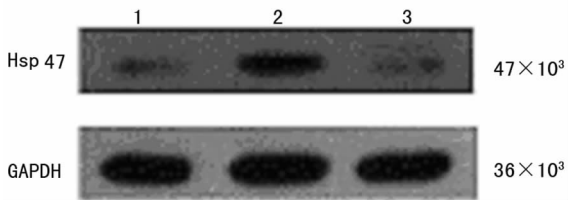


M:marker;1:对照组;2:模型组;3:干预组。

图 2 青蒿琥酯对 Hsp47、I 型胶原 mRNA 表达的影响

表 3	各组 Hsp47 和 I 型胶原 mRNA 相对表达量($\bar{x}\pm s$)	
组别	Hsp47	I 型胶原
对照组	0.38 $\pm$ 0.97	0.27 $\pm$ 0.06
模型组	0.66 $\pm$ 0.29 ^a	0.87 $\pm$ 0.09 ^a
干预组	0.63 $\pm$ 0.58 ^a	0.63 $\pm$ 0.08 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较。



1:对照组;2:模型组;3:干预组。

图 3 青蒿琥酯对 Hsp47 蛋白表达的影响

2.4 RT-PCR 检测 Hsp47mRNA、I 型胶原 mRNA 的表达情况 模型组>干预组>对照组($P<0.05$),但 Hsp47 mRNA 干预组和模型组差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2,表 3。

2.5 Western blot 检测 Hsp47 蛋白表达水平 模型组>对照组,模型组>干预组,见图 3。

3 讨 论

细胞外大量胶原沉着是肺纤维化的重要病理学特征,本研究通过复制大鼠肺纤维化模型,观察青蒿琥酯对胶原特异性分子伴侣 Hsp47 表达的影响,探讨青蒿琥酯抑制胶原产生与 Hsp47 的关系,为青蒿琥酯治疗和预防肺纤维化提供理论依据。

羟脯氨酸在胶原中含量占 13.4%,弹性蛋白中含量极少,其他蛋白均无,测定羟脯氨酸含量可以间接反映胶原含量。肺系数早期增加是由于炎性渗出,毛细血管充血等改变引起的。炎症逐渐消退,胶原沉积是引起晚期肺系数增大的主要原因^[11]。炎症反应向纤维化转变的时期大概是造模后第 9 天左右^[12]。根据本次造模时间可以认为肺系数可以作为反映肺纤维化严重程度的指标之一。本研究结果显示青蒿琥酯能够显著减少肺纤维化形成过程中羟脯氨酸含量和降低肺系数,这与 Ashcroft 评分和 I 型胶原 mRNA 的结果相一致,即青蒿琥酯能够减少胶原的含量,减轻纤维化。这与作者前期“青蒿琥酯能抑制人胚肺成纤维细胞胶原产生的发现”^[10]相吻合。

Hsp47 是胶原特异性分子伴侣,对胶原的合成、分泌起着重要作用。Western blot 的结果表明博来霉素能够诱导 Hsp47 表达增加,青蒿琥酯干预能够显著降低该蛋白水平。这与胶原的变化趋势相同。所以作者推论青蒿琥酯能够抑制肺纤维化中 Hsp47 的表达进而减少胶原含量,减轻肺纤维化。

本研究发现青蒿琥酯对 Hsp47 mRNA 的表达影响并不十分明显,但却能显著降低该蛋白的表达。所以作者推测青蒿琥酯可能在转录后水平影响 Hsp47 的表达,具体作用于哪个环节仍需进一步研究。

综上所述,青蒿琥酯能够通过抑制 Hsp47 表达来下调 I 型胶原表达水平,减轻肺纤维化。这为临床上治疗肺纤维化提供一定的参考。

参考文献:

- [1] 汤艳,郑金旭. HSP47 在肺纤维化中的作用机制[J]. 山东医药,2010,50(49):117-118.
- [2] Kakugawa T,Mukae H, Hayashi T, et al. Pirfenidone attenuates expression of HSP47 in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Eur Respir J,2004,24(1): 57-65.
- [3] Nakayama S,Mukae H,Sakamoto N,et al. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF- β 1-stimulated human lung fibroblasts [J]. Life Sciences,2008,82(3/4): 210-217.
- [4] Kakugawa T,Mukae H,Hishikawa Y,et al. Localization of HSP47 mRNA in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Virchows Arch,2010,456(3):309-315.
- [5] Taguchi T,Nazneen A,Al-Shihri AA,et al. Heat shock protein47: a novel biomarker of phenotypically altered Collagen-Producing cells[J]. Acta Histochem Cytochem, 2011,44(2):35-41.
- [6] Hagiwara S,Iwasaka H,Matsumoto S,et al. Antisense ol-

igonucleotide inhibition of heat shock protein (HSP) 47 improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. Respir Res,2007,8:37.

- [7] Hagiwara S,Iwasaka H,Matsumoto S,et al. An antisense oligonucleotide to HSP47 inhibits paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Toxicology,2007,236(3):199-207.
- [8] Ishida Y,Kubota H,Yamamoto A,et al. Type I Collagen in Hsp47-null Cells Is Aggregated in Endoplasmic Reticulum and deficient in N-Propeptide Processing and Fibrillogenesis [J]. Mol Biol Cell,2006,17(5):2346-2355.
- [9] Yagi-Utsumi M,Yoshikawa S,Yamaguchi Y,et al. NMR and mutational identification of the Collagen-Binding site of the chaperone Hsp47 [J]. PLoS One, 2012, 7 (9): e45930.
- [10] 王昌明,张孝飞,吕倩,等. 青蒿琥酯对人胚肺成纤维细胞系 HFL-I 细胞胶原合成的影响及机制[J]. 山东医药, 2010,50(27):13-14.
- [11] 张伟,姜良铎,张晓梅,等. 肺纤方对博来霉素致肺间质纤维化大鼠肺系数与肺组织病理的影响[J]. 北京中医药大学学报,2008,31(8):544-548,579.
- [12] Chen L, Wang T, Wang X, et al. Blockade of advanced glycation end product formation attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Respir Res,2009,10:55.

(收稿日期:2014-08-21 修回日期:2014-09-27)

(上接第 731 页)

- cell transplantation in experimental glaucoma[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2010,51(4):2051-2059.
- [7] Johnson TV,Martin KR. Development and characterization of an adult retinal explant organotypic tissue culture system as an in vitro intraocular stem cell transplantation model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2008,49(8):3503-3512.
- [8] Ghosh AK,Quaggin SE,Vaughan DE. Molecular basis of organ fibrosis: potential therapeutic approaches[J]. Exp Biol Med,2013,238(5):461-481.
- [9] Braunger BM,Pielmeier S,Demmer C,et al. TGF- β signaling protects retinal neurons from programmed cell death during the development of the mammalian eye[J]. J Neurosci,2013,33(35):14246-14258.
- [10] Meng XM,Chung AC,Lan HY. Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases[J]. Clin Sci,2013,124(4):243-254.
- [11] Lan HY,Chung AC. TGF- β /Smad signaling in kidney disease[J]. Semin Nephrol,2012,32(3):236-243.
- [12] Zhang R,Huang H,Cao P,et al. Sma-and Mad-related protein 7(Smad7) is required for embryonic eye development in the mouse [J]. J Biol Chem, 2013, 288 (15): 10275-10285.

- [13] Bhaskaran M,Kolliputi N,Wang Y,et al. Trans-differentiation of alveolar epithelial type II cells to type I cells involves autocrine signaling by transforming growth factorbeta 1 through the Smad pathway[J]. J Bio Chem, 2007,282(15):3968-3976.
- [14] Rojas J,Fernandez I,Pastor JC,et al. A genetic case-control study confirms the implication of SMAD7 and TNF locus in the development of proliferative vitreoretinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2013,54(3):1665-1678.
- [15] Su Y,Yang CY,Li Z,et al. Smad7 siRNA inhibit expression of extracellular matrix in trabecular meshwork cells treated with TGF- β 2 [J]. Mol Vis, 2012, 18 (12): 1881-1884.
- [16] Fuchshofer R,Stephan DA,Russell P,et al. Gene expression profiling of TGFbeta2-and/or BMP7-treated trabecular meshwork cells: Identification of Smad7 as a critical inhibitor of TGF-beta2 signaling[J]. Exp Eye Res,2009, 88(6):1020-1032.
- [17] Sumioka T,Ikeda K,Okada Y,et al. Inhibitory effect of blocking TGF-beta/Smad signal on injury-induced fibrosis of corneal endothelium [J]. Mol Vis, 2008, 14 (7): 2272-2281.

(收稿日期:2014-10-10 修回日期:2014-12-15)