

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.29.012

内质网应激相关蛋白与 CXCL12 蛋白在特发性肺纤维化中的表达及意义

金 笛¹, 何 丽², 张海锋^{3△}

(1. 湖北中医药高等专科学校内科教研室, 湖北荆州 434020; 2. 湖北省荆州市中心医院呼吸内科 434020; 3. 湖北省荆州市第二人民医院呼吸内科 434000)

[摘要] **目的** 探讨内质网应激相关蛋白及 CXCL12 在特发性肺纤维化中的表达及意义。**方法** 收集荆州市中心医院 2004~2014 年诊断为特发性肺纤维化且存有活检或手术标本的患者共 18 例, 并收集正常肺组织 20 例作为对照, 通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测内质网应激相关蛋白(GRP78、CHOP)及 CXCL12 蛋白(SDF-1)的表达, 通过逆转录 PCR(RT-PCR)检测肺组织中 GRP78 mRNA 及 CXCL12 mRNA 的表达。**结果** 与对照相比, 肺纤维化患者肺泡上皮中 GRP78、CHOP、CXCL12 蛋白表达均上调, 且 GRP78 mRNA 及 CXCL12 mRNA 也表达上调。**结论** 内质网应激相关蛋白及 CXCL12 在特发性肺纤维化的发病过程中起重要作用, 可能参与了特发性肺纤维化的发生与发展。

[关键词] 特发性肺纤维化; 内质网应激; GRP78; CHOP; CXCL12**[中图分类号]** R563.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)29-4068-03

Expression and significance of endoplasmic reticulum stress associated protein and CXCL12 protein in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis

Jin Di¹, He Li², Zhang Haifeng^{3△}

(1. Teaching and Research Division of Internal Medicine, Hubei College of Chinese Medicine, Jingzhou, Hubei 434020, China; 2. Department of Respiratory Medicine, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou, Hubei 434020, China; 3. Department of Respiratory Medicine, the Second Hospital of Jingzhou, Jingzhou, Hubei 434000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and role of endoplasmic reticulum stress associated protein and CXCL12 protein in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). **Methods** From 2004 to 2014, lung tissues from idiopathic pulmonary fibrosis patients ($n=18$) and normal persons ($n=20$, control) of Jingzhou Central Hospital, were used for detecting the expression of GRP78, CHOP and CXCL12 protein by Western blot, and used for detecting the expression of GRP78 mRNA and CXCL12 mRNA by RT-PCR. **Results** The expression of GRP78, CHOP and CXCL12 protein was up-regulated in idiopathic pulmonary fibrosis patients, also the expression of GRP78 mRNA and CXCL12 mRNA were higher in patients than normal tissue. **Conclusion** Endoplasmic reticulum stress related proteins and CXCL12 play an important role in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis, which may be involved in the occurrence and development of idiopathic pulmonary fibrosis.

[Key words] idiopathic pulmonary fibrosis; endoplasmic reticulum stress; GRP78, CHOP; CXCL12

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一组由多种病因所致的慢性肺间质纤维化疾病, 是临床中最常见的特发性间质性肺炎(idiopathic interstitial pneumonia, IIP), 组织病理学表现为普通型间质性肺炎(usual interstitial pneumonia, UIP)。其发病率随年龄的增加而明显上升, 但其发病机制仍不清楚, 且对传统治疗方法反应性差, 大多数患者中位生存时间仅为 3 年, 患者往往死于渐进性呼吸困难和呼吸衰竭^[1-3]。近年来研究显示氧化应激、基因突变、上皮间质转化、TGF- β 激活可能均参与了肺纤维化的发病过程^[4-6]。内质网是十分重要的细胞器, 和高尔基体共同参与了分泌蛋白和膜蛋白的生成、折叠和包装。当细胞对蛋白合成的需求与内质网蛋白生成能力不平衡时就会发生内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS), 当内质网功能持续紊乱, 细胞将最终启动 Caspase12 依赖的细胞凋亡程序, 最终参与疾病的发生、发展。已有研究显示其在心血管、肝脏及癌症等疾病的发生、发展过程中具有重要作用, 但 ERS 在 IPF 中的研究较少^[7]。CXCL12 是一种小分子的细胞因子, 属于 CXC 趋化因子家族, 纤维细胞

可表达细胞因子受体 CXCR4 和 CCR2, CXCL12 是 CXCR4 的配体, 通过配体结合可以募集纤维细胞并参与纤维化的进程^[8]。本研究收集临床及病理诊断为 IPF 的患者标本, 观察肺组织中 ERS 相关蛋白及 CXCL12 的表达情况, 探讨其在 IPF 中的作用及可能的机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1) 样本获得: 收集荆州市中心医院病理科 2004~2014 年档案中由临床及病理学诊断为 IPF 的病例 18 例(IPF 组), 并收集正常肺组织 20 例作为对照组。诊断结果采用单盲法, 由两名高级职称病理医师进行复核, 实验材料安全可靠。(2) 试剂和仪器: GRP78 及 CXCL12 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, CHOP 抗体购自 Santa Cruz 公司; 与一抗相对应的二抗购自北京中杉金桥生物技术股份有限公司。石蜡组织蛋白提取试剂盒购自上海信裕生物科技有限公司, ECL 显色试剂盒购自 GE 公司, mRNA 提取及逆转录扩增采用试剂盒购自 Invitrogen Life Technology 公司。其余采用试剂均为国产分析纯产品并按相应配方规范配制。紫外分光光

度计及梯度 PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司,电泳仪及电泳槽购自美国 Bio-Rad 公司,凝胶成像系统购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 方法

1.2.1 组织总蛋白制备 复诊筛选后病例石蜡包埋组织按 7 μm 厚切取 10 张石蜡切片,置于 1.5 mL EP 管内;加入 1.2 mL 二甲苯脱蜡 3 次,用 1.2 mL 无水乙醇清洗 3 次,弃去上层液体后开盖置于 37 °C 温箱内干燥 20 min。用超声波匀浆器在冰浴中间歇匀浆至离心管中混合液无明显沉淀。按石蜡组织蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白并测定浓度。

1.2.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 按测定浓度取 50 μg 蛋白通过 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(恒定电压 100 V),将蛋白质电转移至硝酸纤维膜上(恒定电流 200 mA,120 min)。一抗为兔抗 GRP78 多克隆抗体、兔抗 CHOP 多克隆抗体、兔抗 CXCL12 多克隆抗体;二抗为 HRP-羊抗兔抗体,ECL 试剂盒显色。内参为 GAPDH。

1.2.3 RNA 提取^[9] 所用实验玻璃器皿常规清洗浸泡后,置于 180 °C 烤箱中烘烤 8 h,塑料制品置于 0.1%DEPC 溶液中浸泡 12 h 后高压消毒(121 °C,30 min)以去除 RNA 酶干扰。切片用 0.1% DEPC 溶液充分清洁,取用 0.1% DEPC 溶液浸泡的一次性刀片,按 5 μm 厚切取 10 张石蜡切片,置于 RNA 酶灭活后的 1.5 mL EP 管内;加入 1.2 mL 二甲苯脱蜡 3 次,每次离心(9 000 r/min,10 min)后均弃去上层液体,用 1.2 mL 无水乙醇清洗 3 次(离心 9 000 r/min,10 min),弃去上层液体后开盖置于 37 °C 温箱内干燥 20 min。加入组织裂解液 250 μL 混匀,加入蛋白酶 K(终浓度 300 mg/L),置于 58 °C 水浴摇床中消化。消化后的组织在 95 °C 水浴中灭活蛋白酶 K(10 min)。组织处理完成后,按照试剂盒说明提取总 RNA。

1.2.4 RNA 浓度测定及逆转录扩增 紫外分光光度计测定 RNA 浓度,取 1 μg 总 RNA 进行逆转录 PCR(RT-PCR),以 GAPDH 作为内对照,逆转录过程按试剂盒说明进行。引物序列如下,GRP78 正义链 5'-AAG GTG AAC GAC CCC TAA CAA A-3',反义链 5'-GTC ACT CGG AGA ATA CCA TTA ACA TCT-3';CXCL12 正义链 5'-CAC CAT TGA GAG GTC GGA AG-3',反义链 5'-AAT GAG ACC CGT CTT TGC AG-3';GAPDH 正义链 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3',反义链 5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3'。产物进行 2%琼脂糖电泳,溴化乙锭染色后置于凝胶成像分析系统内观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行数据处理和分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GRP78、CHOP 表达 与对照组相比,IPF 组患者肺纤维化区域表达内质网应激蛋白相关蛋白 CHOP、GRP78 表达上调,二者差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.2 CXCL12 表达 与正常肺组织相比,特发性纤维化患者中肺泡上皮 CXCL12 蛋白表达明显上调,二者差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.3 GRP78 mRNA 及 CXCL12 mRNA 表达 与对照组相比,IPF 组区域 GRP78 mRNA 及 CXCL12 mRNA 表达增加,

且二者均差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

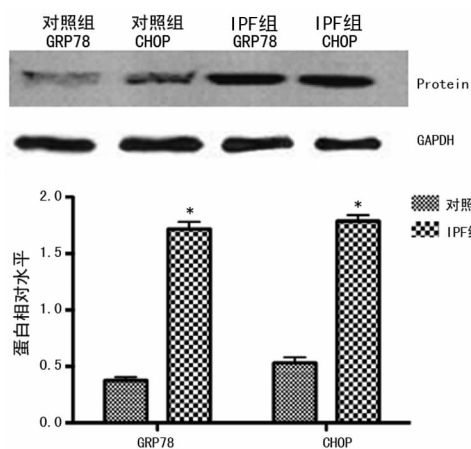


图 1 内质网应激相关蛋白表达

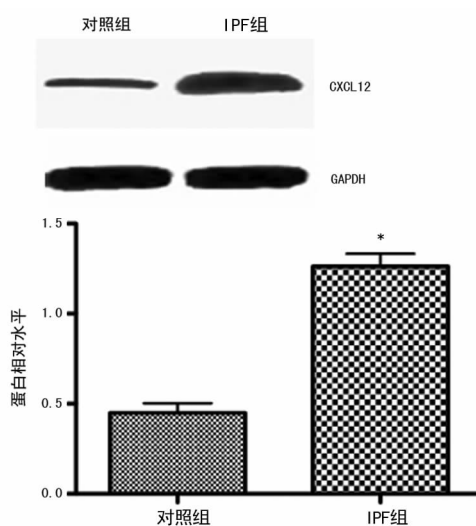


图 2 CXCL12 蛋白表达

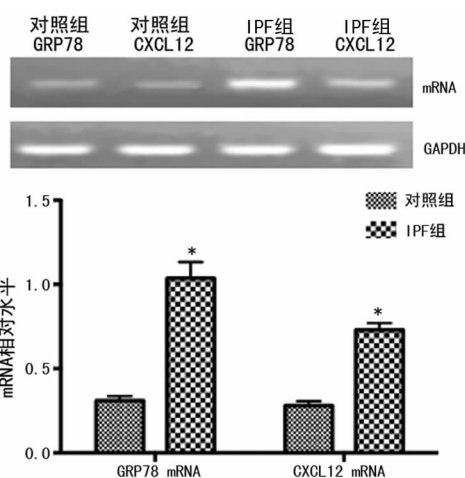


图 3 GRP78 mRNA 及 CXCL12 mRNA 表达

3 讨 论

IPF 是以肺泡上皮损伤、成纤维细胞灶形成、细胞外基质聚集为病理特征的一组肺间质性疾病。其发病机制尚不清楚,可能与感染、药物、理化刺激、自身免疫性疾病有诱因有关。IPF 目前没有特异性的治疗方法,预后很差。近年的研究显示,IPF 患者病灶区域肺泡上皮的内质网应激反应增强。内质

网应激启动的凋亡途径是一种新的细胞凋亡途径,这一点也和 IPF 发病假说中上皮细胞/间质细胞假说相互印证^[10]。本研究结果也发现,与对照组相比,IPF 患者病灶区域肺泡上皮内质网应激相关蛋白 CHOP 及 GRP78 表达明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。这也提示了内质网应激在 IPF 发病过程中发挥了相应的作用。

在 IPF 发病过程,纤维细胞起到了较为重要的作用,纤维细胞可以直接产生细胞外基质(如 I 型胶原和 III 型胶原),可以分化为纤维母细胞和肌纤维母细胞,可以产生促胶原沉积的细胞因子,这些均参与了纤维化的发病过程。在 IPF 患者的血液循环及肺实质内中可以发现纤维细胞。血液循环中纤维细胞的数量和患者的预后呈相关性。在纤维细胞募集过程中,肺泡上皮细胞可能起到了关键作用。纤维细胞表面表达细胞因子受体 CXCR4,而 CXCL12 作为 CXCR4 的配体可以参与纤维细胞的募集^[11]。以往的研究主要集中在内质网应激诱导细胞凋亡、造成组织损伤,促进肺纤维化发病这一方面。本研究探讨了内质网应激相关蛋白表达上调时 CXCL12 的表达情况,结果显示,与对照组相比,IPF 组病灶内肺泡上皮 CXCL12 表达明显上调,这一结果显示肺泡上皮细胞可能通过 CXCR4/CXCL12 轴募集纤维细胞参与特发性肺纤维化的发病过程。

此外,内质网应激相关蛋白和 CXCL12 共同表达上调也提示内质网应激可能刺激了趋化因子的表达,进一步促进肺纤维化的发生、发展。有研究显示,内质网应激可以促进乳腺癌 MCF-7 细胞 CCL5 表达上调,增加肿瘤细胞的运动、侵袭和转移能力,但具体机制尚不清楚^[12]。通过 RT-PCR 检测肺组织中 GRP78 mRNA 及 CXCL12 mRNA 的表达结果显示,肺纤维化区域 GRP78 mRNA 及 CXCL12 mRNA 表达增高,这说明 GRP78、CXCL12 蛋白的表达提高,同时编码该蛋白的 mRNA 也升高,可能是由于 GRP78、CXCL12 的转录活性被激活所致。

参考文献

- [1] Wolters PJ, Collard HR, Jones KD. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2014(9): 157-179.
- [2] Noble PW, Barkauskas CE, Jiang D. Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8):

2756-2762.

- [3] Loomis-King H, Flaherty KR, Moore BB. Pathogenesis, current treatments and future directions for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13(3):377-385.
- [4] 芮炜玮,易祥华. 转化生长因子 β 及相关细胞因子在 PF 中的作用[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2010, 31(3): 133-136.
- [5] Kliment CR. Oxidative stress alters syndecan-1 distribution in lungs with pulmonary fibrosis[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(6):3537-3544.
- [6] Veerappan A, O'Connor NJ, Brazin J, et al. Mast cells: a pivotal role in pulmonary fibrosis[J]. *DNA Cell Biol*, 2013, 32(4):206-218.
- [7] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation[J]. *Science*. 2011, 334(6059):1081-1086.
- [8] Andersson-Sjöland A, de Alba CG, Nihlberg K, et al. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(10):2129-2140.
- [9] 孟青,杨文秀,胡军,等. 石蜡包埋组织中 RNA 提取方法的改进和完善[J]. *贵阳医学院学报*, 2005, 30(3): 241-243.
- [10] Korfei M, Ruppert C, Mahavadi P, et al. Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 15(8):838-846.
- [11] Li Y, Jiang D, Liang J, et al. Severe lung fibrosis requires an invasive fibroblast phenotype regulated by hyaluronan and CD44[J]. *J Exp Med*, 2011(208):1459-1471.
- [12] 范威,潘翠萍,张懿敏,等. 内质网应激对乳腺癌 MCF-7 细胞 CCL5 表达的影响[J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(4): 385-388.

(收稿日期:2016-02-20 修回日期:2016-04-08)

(上接第 4067 页)

- [8] Supale S, Li N, Brun T, et al. Mitochondrial dysfunction in pancreatic β cells[J]. *Trends Endocrin Met*, 2012, 23(9): 477-487.
- [9] Sukumar P, Viswambharan H, Imrie H. Nox2 NADPH oxidase has a critical role in insulin resistance-related endothelial cell dysfunction[J]. *Diabetes*, 2013(62): 2130-2134.
- [10] Thallas-Bonke V, Jha JC, Gray SP, et al. Nox-4 deletion reduces oxidative stress and injury by PKC- α -associated mechanisms in diabetic nephropathy[J]. *Physiol Rep*, 2014, 2(11):e12192-12197.
- [11] Jay CJ, Stephen PG, David B, et al. Genetic targeting or pharmacologic inhibition of NADPH oxidase Nox4 provides renoprotection in Long-Term diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014(25):1237-1254.

- [12] Yu P, Han W, Villar VA, et al. Villar, Unique role of NADPH oxidase 5 in oxidative stress in human renal proximal tubule cells[J]. *Redox Biol*, 2014(2): 570-579.
- [13] Sedeek M, Nasrallah R, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013(24):1512-1518.
- [14] Eid AA, Gorin Y, Fagg BM, et al. Mechanisms of podocyte injury in diabetes: role of cytochrome P450 and NADPH oxidases[J]. *Diabetes*, 2009, 58(5):1201-1211.
- [15] Liu GC, Fang F, Zhou J, et al. Deletion of p47phox attenuates the progression of diabetic nephropathy and reduces the severity of diabetes in the Akita mouse[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(9):2522-2532.

(收稿日期:2016-02-18 修回日期:2016-04-06)