

巨噬细胞叶酸受体 β 表达对博来霉素诱导小鼠肺纤维化的影响*姚梓平, 秦慧娟, 何春辉 Δ

(新疆医科大学第一附属医院中医内科, 乌鲁木齐 830054)

[摘要] **目的** 探讨巨噬细胞的叶酸受体 β (FR β)表达对博来霉素诱导小鼠肺纤维化的影响。**方法** 将小鼠分为正常组、对照组和实验组, 每组各 6 只。对小鼠进行肺纤维化(PF)诱导, 实验组给予免疫毒素, 对照组给予对照蛋白, 正常组不做任何处理。小鼠的左肺用于组织学分析, 右肺用于羟脯氨酸分析, 检测巨噬细胞的 FR β 表达对博来霉素诱导小鼠 PF 的影响, 常规特发性肺纤维化(UIP)患者肺部巨噬细胞的 FR β 表达情况。**结果** 巨噬细胞 FR β 表达主要存在于 UIP 患者和博来霉素诱导的 PF 小鼠的肺部纤维化区域; 经鼻给予小鼠免疫毒素能够显著增加存活率($P=0.003$), 并降低博来霉素诱导的 PF 中总羟脯氨酸和纤维化水平($P=0.009, 0.014$); 免疫组化结果显示免疫毒素能降低博来霉素诱导的 PF 小鼠肺部肿瘤坏死因子(TNF)- α , 趋化因子 CCL2 和 CCL12 细胞的数量(均 $P=0.000$)。**结论** 巨噬细胞的 FR β 表达在特发性肺纤维化(IPF)中起着致病性作用, 针对表达 FR β 的巨噬细胞的靶向治疗也许是治疗 IPF 的有效方法。

[关键词] 巨噬细胞; 博来霉素; 免疫毒素类; 肺纤维化; 叶酸受体 β

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)07-0887-05

Effect of macrophage FR β expression on bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice*YAO Ziping, QIN Huijuan, HE Chunhui Δ

(Department of Traditional Chinese Internal Medicine, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumchi, Xinjiang 830054, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of macrophage FR β expression on bleomycin induced pulmonary fibrosis(PF) in mice. **Methods** The rats were divided into the normal group, control group and experimental group, 6 cases in each group. The mice were performed the PF induction. The experimental group was treated with immunotoxin, the control group was given the contrast protein and the normal group was not treated. The mouse left lung was used for histological analysis, and the right lung was used for hydroxyproline analysis. The effect of macrophage FR β expression on bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice and the pulmonary macrophage FR β expression in the patients with idiopathic pulmonary fibrosis(UIP) were detected. **Results** The macrophage FR β expression mainly existed in the patients with UIP and pulmonary fibrosis area of PF mice induced by bleomycin; the survival rate was significantly increased by giving the mice immunotoxin with nose($P=0.003$), and the level of total hydroxyproline and fibrosis of PF mice induced by bleomycin was decreased($P=0.009, 0.014$); immunohistochemistry results showed that immunotoxin could reduce the cells number of lung tumor necrosis factor(TNF)- α , chemotactic CCL2 and CCL12 cells in PF mice induced by bleomycin($P=0.000$). **Conclusion** The FR β expression of macrophages plays a pathogenic role in IPF, and the targeted therapy of FR β expression in macrophages may be an effective method for the treatment of IPF.

[Key words] macrophage; bleomycin; immunotoxins; pulmonary fibrosis; folate receptor β

特发性肺纤维化(IPF)是特发性间质性肺炎的常见形式, 该病的病理学特点表现为肺泡上皮损伤和增生、炎性细胞浸润、成纤维细胞增生、细胞外基质沉积和瘢痕形成^[1]。我国 IPF 患者人数为 50 万左右, 患病人数还在持续增加。该病的治疗效果不好, 预后差, 5 年生存率只有 30%~50%。目前 IPF 的发病机制尚不明确。巨噬细胞浸润与多种类型的肺纤维化(PF)有关^[2]。巨噬细胞能够产生趋化因子 CCL2 和 CCL12, 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和纤维化的转化生长因子(TGF- β 1), 间质巨噬细胞产生的促炎症或促纤维化细胞因子在 IPF 患者的肺中升高^[3], 说明巨噬细胞在 IPF 的发病机制中可能起到一定的作用。在动物实验中, 博来霉素常用于诱导肺损伤和纤维化来模拟研究 IPF^[4]。叶酸受体(FR)归为糖

基磷脂酰肌醇锚定糖蛋白家族, 其对叶酸和 5-甲基四氢叶酸具有高亲和力, 由于 FR α 在癌细胞中的高表达和 FR β 在活化的巨噬细胞中的高表达, 叶酸受体靶向药物常应用于癌症和自身免疫疾病的诊断和治疗^[5]。

为了研究巨噬细胞中 FR β 的表达在 IPF 发病中的作用机制, 检测了其在常规特发性肺纤维化(UIP)患者和博来霉素诱导 PF 的小鼠中肺组织内的分布, 并且求证减少巨噬细胞中 FR β 表达是否可以抑制博来霉素诱导小鼠的肺纤维化, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 患者肺组织标本与实验动物 UIP 患者的肺组织从新疆医科大学第一附属医院的 7 例 UIP 患者的肺部中获得, UIP

患者的诊断参照美国胸科学会关于 IPF 标准诊断^[6]。对照的肺组织从 5 例肺癌的切除手术中获得。所有患者均签署知情同意书,此项研究也获得本院伦理委员会的批准。选取 18 只健康雄性 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,平均(19.32±2.30)g,购于新疆医科大学动物实验中心(动物合格证号编号:XJYKDX-20160317001)。

1.2 主要试剂与仪器 博来霉素(Nihon Kayaku Co,日本),小鼠抗人 FR β 单克隆抗体(mAb)(Serotec,英国),大鼠抗小鼠 FR β mAb(克隆 5)(Serotec,英国),抗原修复液(博士德生物,中国),小鼠抗人 CD68mAb(Dako Japan Co. Kyo,日本),大鼠抗小鼠 CD68mAb(Serotec,英国),兔抗小鼠 TGF- β 1 抗体(Santa Cruz Biotechnology,美国),山羊抗小鼠 CCL2 抗体(Santa Cruz Biotechnology,美国),山羊抗小鼠 CCL12 抗体(Santa Cruz Biotechnology,美国),山羊抗小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 抗体(R&D Systems,美国),dsFv 抗 FR β -PE38(免疫毒素)(博士德生物,中国),VH-PE38(博士德生物,中国),MAX-PO 二抗(博士德生物,中国),NovaRED 试剂盒(Santa Cruz Biotechnology,美国)。CCD 照相机(Nikon,日本),计算机辅助图像分析仪(Nikon,日本)。

1.3 方法 将小鼠分为正常组、对照组和实验组,每组各 6 只,小鼠中的 PF 诱导参考 GHARAE-KERMANI 等^[7]的实验方法,使用异氟烷对 6~8 周龄的雄性 C57BL/6J 小鼠进行麻醉,然后将 100 mL 溶于盐水中的博来霉素(4 U/kg)滴入小鼠的气管。博来霉素滴注第 3 天,经鼻给予小鼠 dsFv 抗 FR β -PE38(免疫毒素)(实验组)或 VH-PE38(对照蛋白)(对照组)。每只小鼠每隔 1 d 给予浓度为 0.1 mg/mL 的免疫毒素或对照蛋白 30 μ L,直到博来霉素滴注后第 19 天,并持续监测 21 d。在第 21 天,依然存活的小鼠被处死。正常组的小鼠不做任何处理。小鼠的左肺用于组织学分析,右肺用于羟脯氨酸分析。所有动物程序均符合本院动物实验伦理准则,并经本院委员会批准。

1.3.1 肺部纤维化评分 将小鼠左肺进行冰冻,切片,冷丙酮固定处理,然后依循 Masson 三色法步骤染色。每只小鼠制备至少 4 个切片,每个切片中随机选择 20 个区域,遵循盲法原则,由经验丰富的病理学家阅片评定。根据 Ashcroft 法对肺纤维化程度进行评分^[8]。

1.3.2 肺部羟脯氨酸分析 将小鼠右肺经空气干燥、称重后,在 110 $^{\circ}$ C 条件下,将其置于 6 mol/L 的 HCl 溶液中进行酸水解,时间为 16 h。将水解产物悬浮在等量的 6 mol/L NaOH 中,然后过滤,测定羟脯氨酸的浓度。

1.3.3 免疫组化染色 经过甲醛固定、石蜡包埋、脱蜡及再水化过程,制备得到人肺组织切片(5 μ m)。根据厂家的说明书,使用区分自然感染动物和接种免疫动物(DIVA)的试剂对抗原进行修复。在用 3% 脱脂乳和 10% 正常山羊血清封闭抗原后,再利用鼠抗人 CD68 单抗,或鼠抗人 FR β 单抗,或同型匹配但并不相关的单抗对切片进行免疫染色。然后用 MAX-PO 二抗和 NovaRED 试剂盒进一步染色处理。使用 0.3% H_2O_2 消除内源性过氧化物酶活性。最后经数字视像 CCD 照相机拍摄和计算机辅助图像分析仪分析后,获得图像。

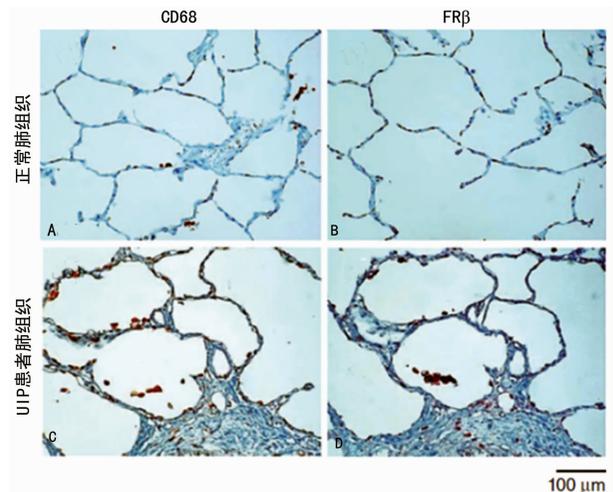
利用鼠抗 CD68、鼠抗 FR β 、抗 TGF- β 1、抗 TNF- α 、CCL2、CCL12 或同型匹配的无关抗体,对经博来霉素滴注处理或未处理小鼠的肺组织所制备的丙酮冰冻切片进行染色。然后速

行双色免疫组化染色。切片用一代 mAb 染色后,继用 NovaRED 显色。将切片置入 0.1 mol/L 的 Gly-HCl 缓冲液孵育 1 min 后,以此洗脱一抗,然后使用 TBST(20 mmol/L Tris-HCl,pH 7.4,0.15 mol/L NaCl,0.1% Tween-20)洗涤。随后,依次先将切片与另一原代 mAb 孵育 1 h,然后与生物素化的二抗(Nichirei)孵育 30 min,最后与碱性磷酸酶缀合的链霉亲和素(Nichirei)孵育。二抗染色后利用 Vector Blue 显色处理。每块肺组织选取 4 个切片,应用计算机辅助图像分析仪对每个切片进行半定量分析。每个切片随机选定 10 个区域进行观察分析。通过取样界定免疫染色的颜色阈值,以此检测区分红色和蓝色,并将该阈值应用于所有的样本。

1.4 统计学处理 绘制 Kaplan-Meier 曲线,并进行广义 Wilcoxon 检验,以此评估生存率的显著性。方差分析(ANOVA)用于检验组间其他数据的差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 巨噬细胞中 FR β 表达在 UPF 患者和博来霉素诱导 PF 小鼠肺组织中的分布 检测 UPF 患者肺组织内的巨噬细胞时,发现其相对正常肺组织有更多能够表达 FR β 的间质巨噬细胞(图 1)。博来霉素气管内滴注后 3 d 的小鼠肺部可见表达 FR β 的肺泡巨噬细胞和间质巨噬细胞,而在 14 d 后两种细胞数量达到顶峰(图 2)。在博来霉素滴注后的每个观测时间点,都可以看到巨噬细胞中 FR β 表达主要集中于肺的纤维化病灶处。



A: 正常肺组织表达 CD68 巨噬细胞; B: UIP 患者肺组织表达 CD68 巨噬细胞; C: 正常肺组织表达 FR β 的巨噬细胞; D: UIP 患者肺组织表达 FR β 的巨噬细胞

图 1 巨噬细胞中 FR β 表达在 UPF 患者肺部的分布情况($\times 200$)

2.2 TGF- β 1 在巨噬细胞 FR β 表达中的表达 采用博来霉素滴注后第 7 天的小鼠肺部切片来检测巨噬细胞中 FR β 表达是否会释放 TGF- β 1,发现大多数巨噬细胞中 FR β 表达都属于表达 CD68 的巨噬细胞,许多巨噬细胞中表达 CD68 或 FR β 的同时也能表达 TGF- β 1,TGF- β 1 的表达比例在巨噬细胞的 FR β 表达中显著高于 CD68 的巨噬细胞表达(图 3)。TGF- β 1 表达多聚集于博来霉素诱导形成 PF 的小鼠肺组织的巨噬细胞的 FR β 表达中。

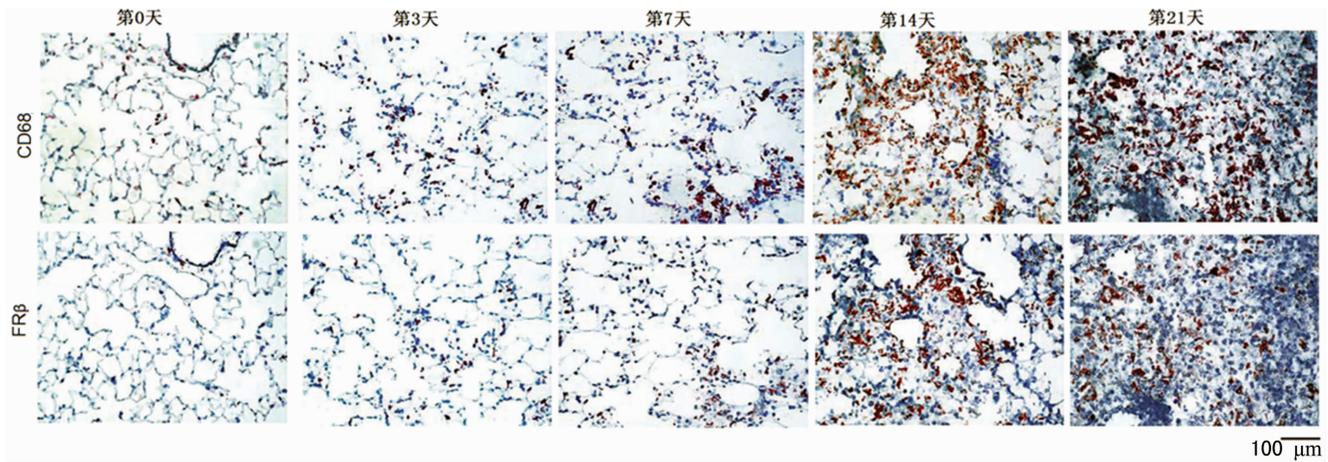


图 2 博来霉素诱导 PF 小鼠肺部巨噬细胞中 FRβ 表达随时间的变化 (×200)

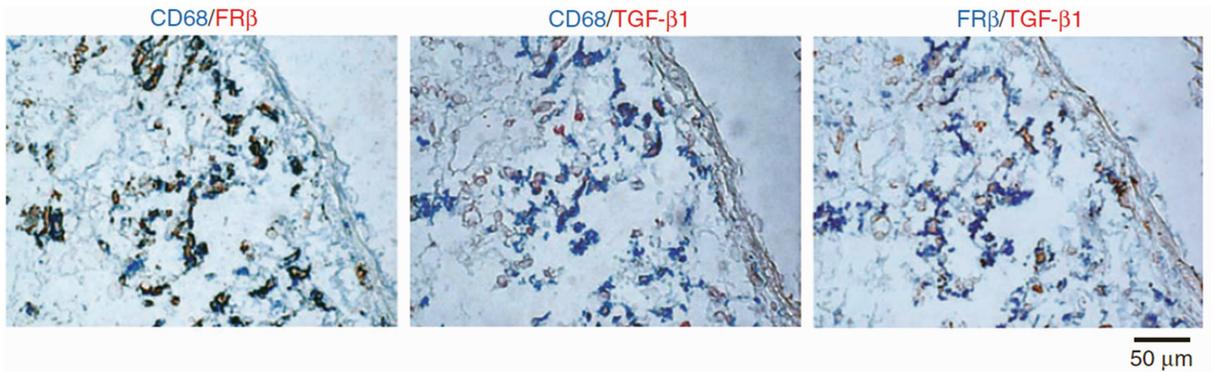
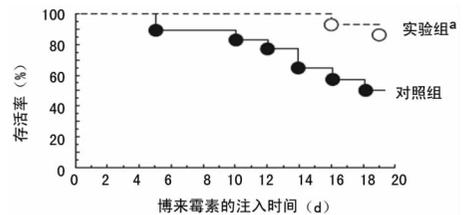


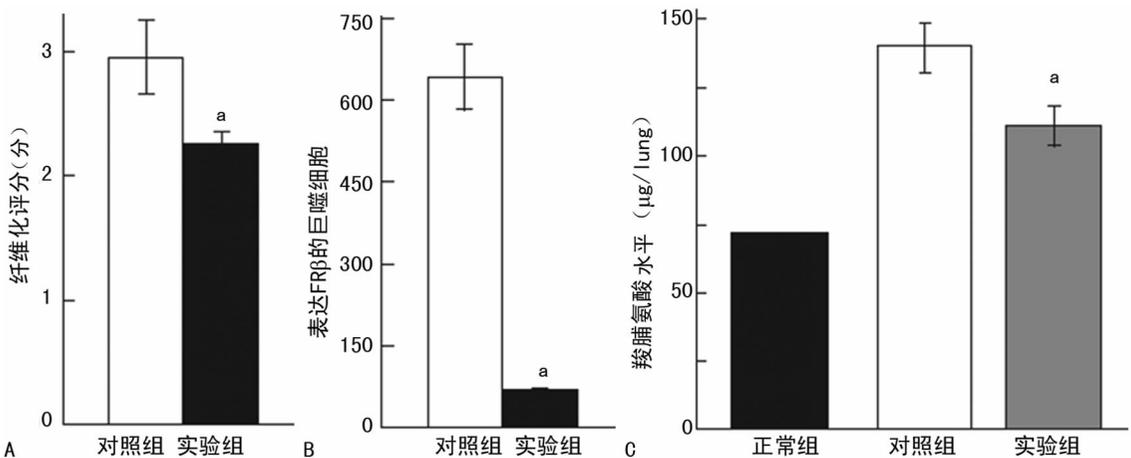
图 3 TGF-β1 在巨噬细胞的 FRβ 表达中的表达 (×400)

2.3 免疫毒素作用于 FRβ 时对博来霉素诱导形成 PF 病理过程的干预 滴注博来霉素的第 3 天到第 19 天,通过小鼠鼻内途径给予免疫毒素,与给予蛋白的对照组相比,实验组的免疫毒素能明显增加小鼠的存活率($P=0.003$)(图 4),同时也能降低小鼠肺组织的纤维化程度($P=0.014$);实验组肺组织巨噬细胞的 FRβ 表达也减少($P=0.000$),实验组肺组织羟脯氨酸的整体水平显著低于对照组($P=0.009$)(图 5)。在第 21 天,与给予蛋白的对照组相比免疫毒素能降低博来霉素诱导的 PF 小鼠肺部 TNF- α , 趋化因子 CCL2 和 CCL12 细胞的数量(均 $P=0.000$)(图 6、7)。



^a: $P < 0.05$, 与对照组相比

图 4 免疫毒素对博来霉素诱导 PF 小鼠的存活率的影响



A: 免疫毒素对博来霉素诱导 PF 小鼠的纤维化程度的影响; B: 免疫毒素对博来霉素诱导 PF 小鼠巨噬细胞的 FRβ 表达影响(相对表达量); C: 免疫毒素对博来霉素诱导 PF 小鼠羟脯氨酸水平的影响; ^a: $P < 0.05$, 与对照组相比

图 5 免疫毒素对博来霉素诱导 PF 小鼠的纤维化程度、巨噬细胞的 FRβ 表达及羟脯氨酸水平的影响

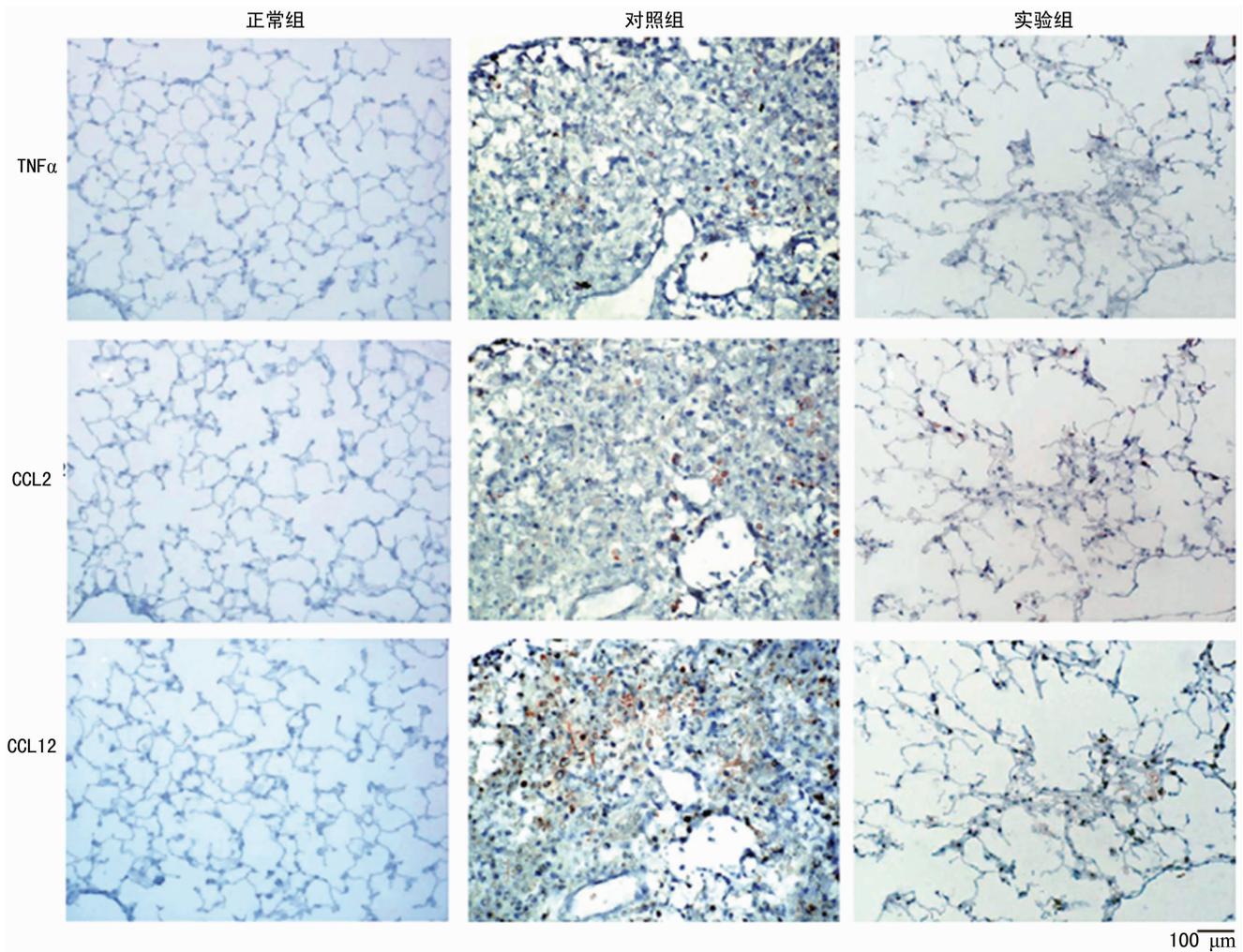
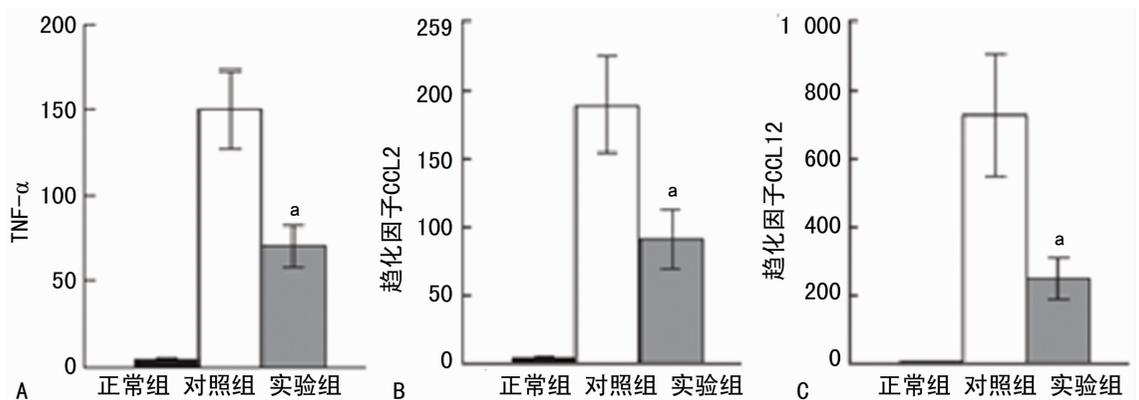


图 6 免疫毒素对博来霉素诱导的 PF 小鼠肺部 TNF- α 、趋化因子 CCL2 和 CCL12 细胞的表达 ($\times 200$)



A: TNF- α 的细胞数量; B: 趋化因子 CCL2 的细胞数量; C: 趋化因子 CCL12 的细胞数量; ^a: $P < 0.05$, 与对照组相比

图 7 免疫毒素对博来霉素诱导的 PF 小鼠肺部 TNF- α 、趋化因子 CCL2 和 CCL12 细胞数量的影响 (相对表达量)

3 讨论

本研究中发现,与正常肺组织相比,UIP 患者的肺组织中可以观察到大量能表达 FR β 的间质巨噬细胞和肺泡巨噬细胞。正常组织的巨噬细胞中 FR β 表达很有限,巨噬细胞的 FR β 表达主要存在于博来霉素诱导形成 PF 的纤维化病灶中。随着 PF 的进展,博来霉素诱导小鼠肺组织中巨噬细胞的 FR β 表达数目逐渐增加。表达 FR β 的巨噬细胞在 PF 肺部中首次出现,小鼠经鼻内滴注免疫毒素,能够减少肺内羟脯氨酸的含量以及减轻肺纤维化的程度,从而增加了博来霉素诱导实验鼠

的存活率。

由巨噬细胞释放的 TGF- β 1 被认为可作用于局部的成纤维细胞^[9]。本研究中发现,在博来霉素诱导形成 PF 的早期,巨噬细胞的 FR β 表达会释放 TGF- β 1,这表明这些细胞可能直接参与小鼠 PF 的发病过程。在第 14 天用免疫毒素也未能提高 PF 小鼠的存活率,这可能与其它细胞产生 TGF- β 1 相关。研究结果表明,表达 FR β 的巨噬细胞产生的 TGF- β 1 可能主要作用于博来霉素诱导 PF 发病过程的初始阶段。

由巨噬细胞和上皮细胞产生的 CCL2、CCL12 和 CCL3 趋

化因子已确定为促纤维化介质^[10]。CCR2(CCL2 和 CCL12 的受体)或 CCR5(CCL3 的受体)的缺乏能抑制纤维化的发展^[11]。白细胞介素(IL)-13 已被证明有助于 PF 的发展,其可能通过诱导 CCL2、CCL3 而实现^[12-13]。本研究发现,经鼻给予免疫毒素可减少促纤维化细胞因子 TNF- α 、CCL2 和 CCL12 的细胞数量,降低博来霉素诱导 PF 中巨噬细胞的 FR β 表达,可减少由炎症巨噬细胞所释放的各种促纤维化细胞因子。因此,靶向消除巨噬细胞的 FR β 表达将比靶向消除个体巨噬细胞所释放的促纤维化细胞因子更有效。

有研究表明,使用抗 CD11b 或抗 CD11a 的 mAb 能够对博来霉素诱导小鼠形成的 PF 起到抑制作用^[14]。然而,这些治疗可能会抑制先天免疫,因为 CD11a、CD11b 位于单核细胞和驻留型巨噬细胞。有研究表明,使用 CD11b 的单克隆抗体治疗,会加重大肠杆菌肺炎小鼠的病情^[15]。与表达 CD11b 或 CD11a 的细胞相反,正常组织的巨噬细胞中 FR β 表达是有限制的。因此,通过 FR β 靶向清除炎症巨噬细胞对于治疗 IPF 患者是非常理想的治疗办法,同时该治疗方式也不会影响单核细胞和驻留型巨噬细胞的正常功能。随着免疫核糖核酸酶(imRNase)的发现,且其中的毒素部分和免疫球蛋白片段分别被人类核糖核酸酶和人源化免疫球蛋白替代后^[16],作用于 FR β 的免疫毒素的毒性和免疫原性这一缺陷也将被克服。一旦免疫 RNA 酶中的 RNase 部分被内化,其将发挥 RNA 降解活性,从而导致靶细胞的死亡。由于正常组织不表达或低水平表达叶酸受体,而大多数叶酸受体对 FR α 比对 FR β 具有更高的结合亲和力,因此也可使用叶酸拮抗剂^[17]。IPF 具有异质性特征,其表现为在正常表现的肺部中交替出现外周纤维化、间质炎症和蜂窝状态改变的区域。这些炎症成分主要由巨噬细胞、淋巴细胞、浆细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞组成^[18]。在诊断 IPF 时,若不行肺部穿刺活检,则很难确定激活的巨噬细胞的分布。由于放射性叶酸靶向药物与叶酸受体结合其集中于激活的巨噬细胞^[19]。因此通过 FolateScan 对表达 FR 细胞的图像化^[20],将有助于预测最佳治疗时机和监测靶向治疗巨噬细胞的 FR β 表达对 IPF 患者的疗效。

综上所述,人和 PF 实验动物肺部的炎症巨噬细胞均可表达 FR β 。选择性降低巨噬细胞的 FR β 表达能显著抑制博来霉素诱导 PF 的病理过程,因此也意味着靶向治疗表达 FR β 的巨噬细胞可能会为 IPF 的治疗带来希望。

参考文献

- [1] WILSON M S, WYNN T A. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation[J]. *Mucosal Immunol*, 2009, 2(2): 103-121.
- [2] QU Y, ZHANG G, JI Y, et al. Protective role of gambogic acid in experimental pulmonary fibrosis in vitro and in vivo[J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(4): 350-358.
- [3] HOMOLKA J, ZIEGENHAGEN M W, GAEDE K I, et al. Systemic immune cell activation in a subgroup of patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Respiration*, 2003, 70(3): 262-269.
- [4] LI X W, LI X H, DU J, et al. Calcitonin gene-related peptide down-regulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(12): 1315-1324.
- [5] DELLA-LONGA S, ARCOVITO A. Intermediate states in the binding process of folic acid to folate receptor α : insights by molecular dynamics and metadynamics[J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2015, 29(1): 23-35.
- [6] American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society(ATS), and the European Respiratory Society(ERS)[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161(2 Pt 1): 646-664.
- [7] GHARAEI-KERMANI M, ULLENBRUCH M, PHAN S H. Animal models of pulmonary fibrosis[J]. *Methods Mol Med*, 2005, 117: 251-259.
- [8] ASHCROFT T, SIMPSON J M, TIMBRELL V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale[J]. *J Clin Pathol*, 1988, 41(4): 467-470.
- [9] ZHANG Y, WANG J, LI H, et al. Hydrogen sulfide suppresses transforming growth factor- β 1-induced differentiation of human cardiac fibroblasts into myofibroblasts[J]. *Sci China Life Sci*, 2015, 58(11): 1126-1134.
- [10] WU X, GUAN Y, YAN J, et al. ShenKang injection suppresses kidney fibrosis and oxidative stress via transforming growth factor- β /Smad3 signalling pathway in vivo and in vitro[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 67(8): 1054-1065.
- [11] MOORE B B, KOLODSICK J E, THANNICKAL V J, et al. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury[J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(3): 675-684.
- [12] MURRAY L A, ZHANG H, OAK S R, et al. Targeting interleukin-13 with tralokinumab attenuates lung fibrosis and epithelial damage in a humanized SCID idiopathic pulmonary fibrosis model[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50(5): 985-994.
- [13] DING M, SHENG H, SHEN W, et al. Association of the SNP rs1800925(C/T) in the interleukin-13 gene promoter with pulmonary function in Chinese Han patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(3): 905-909.
- [14] SKURIKHIN E G, KHMELEVSKAYA E S, ERMAKOVA N N, et al. Effect of spiperone on mesenchymal multipotent stromal and hemopoietic stem cells under conditions of pulmonary fibrosis[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2014, 157(1): 132-137.
- [15] BELPERIO J A, DY M, BURDICK M D, et al. Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27(4): 419-427.
- [16] PULIDO D, MOUSSAOUI M, NOGUES M V, et al. Towards the rational design of antimicrobial proteins: single point mutations can switch on bactericidal and agglutinating activities on the RNase A superfamily lineage[J]. *FEBS J*, 2013, 280(22): 5841-5852. (下转第 895 页)

ROS 能够增强细胞氧化应激,促进炎症介质释放、低密度脂蛋白氧化,破坏凝血功能平衡等。据报道,氧化应激在内皮功能障碍发生机制中起着重要作用^[15]。ROS 的内源性衍生物主要由线粒体产生,当 ROS 过量时可造成广泛性氧化损伤,导致细胞功能丧失,甚至凋亡。ROS 是细胞内信号传递者,在引起细胞凋亡中起重要作用。本研究采用 DCFH-DA 活性氧检测试剂盒进行细胞内 ROS 定量检测。通过流式细胞仪检测 DCF 的荧光强度就能知道细胞内 ROS 的水平。本研究证实, Hcy 能够诱导 ROS 产生,引起内皮细胞功能障碍,是早期血管出现动脉粥样硬化的关键。HSP27 被作为细胞保护者,已有研究证实它能够通过多个作用靶点发挥抗氧化应激和抗细胞凋亡的作用:(1)稳定线粒体膜功能;(2)改善细胞呼吸,减少 ROS 生成;(3)提高细胞内还原能力;(4)激活 Mt,促进细胞生存。LIN 等^[16]为进一步研究 HSP27 在 Hcy 处理过的内皮细胞中的表达情况,通过质粒构建了 HSP27 高表达的内皮细胞系,证实了而 HSP27 表达增加能够抑制 Hcy 引起的内皮细胞损伤和凋亡。由此可见,减少内源性 ROS 产生,稳定线粒体膜电位,是 HSP27 对抗 Hcy 引起的内皮损伤的重要机制之一。

综上所述,HSP27 通过影响 NO 表达和调节细胞内 ROS 水平保护 Hcy 诱导的受损伤的内皮细胞,这些作用提示 HSP27 可能是预防和治疗动脉粥样硬化的新靶点。

参考文献

- [1] 孙永辉,位庚,贾振华,等. 同型半胱氨酸对大鼠心肌微血管内皮细胞线粒体功能的影响及通心络的保护作用[J]. 中国老年学,2017,37(18):1-6.
- [2] PELIKANT-MALECKA I, SIELICKA A, KANIEWSKA E, et al. Endothelial toxicity of unusual nucleotide metabolites[J]. *Pharmacol Rep*, 2015, 67(4): 818-822.
- [3] 朱琳,王彦军,俞天虹,等. 红景天苷通过抑制内质网应激减少高同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞损伤[J]. 中国动脉硬化杂志,2015,23(1):5-10.
- [4] 俞天虹,朱琳,赵蓉,等. 腺苷酸蛋白激酶活化在红景天苷抑制同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞内质网应激中的作用[J]. 中华中医药学刊,2017,16(10):2558-2562.
- [5] LEE S W, CHO J M, CHO H J, et al. Expression levels of heat shock protein 27 and cellular FLICE-like inhibitory protein in prostate cancer correlate with Gleason score sum and pathologic stage[J]. *Korean J Urol*, 2015, 56(7):

505-514.

- [6] MARTÍNEZ-LAORDEN E, ALMELA P, MILANÉS MV, et al. Expression of heat shock protein 27 and troponin T and troponin I after naloxone-precipitated morphine withdrawal [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 766(21): 142-150.
- [7] 纪昕,岳晓乐,赵丹丹,等. 同型半胱氨酸与动脉粥样硬化患者血管内皮细胞损伤相关性[J]. 标记免疫分析与临床,2017,24(1):73-76.
- [8] 季政,郭航远,池菊芳,等. 同型半胱氨酸对大鼠血管内皮细胞 MMP-2 表达的影响和黄酒、红葡萄酒的逆转效应及其机制[J]. 西安交通大学学报(医学版),2013,34(3): 313-319.
- [9] 韩磊,王玮瑶,于洪泉,等. 内质网应激途径介导同型半胱氨酸致血管内皮细胞凋亡的研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志,2014,31(1):92-94.
- [10] 位庚,刘红利,李红蓉,等. 通心络对同型半胱氨酸诱导大鼠心肌微血管内皮细胞损伤的干预作用及氧化应激机制研究[J]. 中国循环杂志,2016,31(9):908-912.
- [11] AJITH T A. Homocysteine in ocular diseases [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 450(2): 316-321.
- [12] 郝宝顺,刘雪莲,刘勇,等. 瑞舒伐他汀对同型半胱氨酸损伤人脐静脉内皮细胞血管细胞间黏附分子-1 表达的影响 [J]. 广东医学,2015,36(11):1646-1648.
- [13] 陈洪娜,唐文照,闫志晖,等. Diplacone 对同型半胱氨酸致血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志,2017,25(7):666-670.
- [14] 杨绍兵,蔡庆,王凯,等. 不同浓度同型半胱氨酸对内皮细胞 TRPV1 蛋白表达的影响 [J]. 宁夏医科大学学报,2017,39(4):399-402.
- [15] 庞柳英,陈英,王宁,等. 芪参益气滴丸对原发性高血压并高同型半胱氨酸血症患者基质金属蛋白酶 9 及血管内皮细胞功能的影响 [J]. 实用心脑血管病杂志,2017,16(5):153-155.
- [16] LIN A C, LIAO C W, LIN S W, et al. Canine heat shock protein 27 promotes proliferation, migration, and doxorubicin resistance in the canine cell line DTK-F [J]. *Vet J*, 2015, 205(2): 254-262.

(收稿日期:2017-06-26 修回日期:2017-09-06)

(上接第 891 页)

- [17] YANG T Y, CHANG G C, HSU S L, et al. Effect of folic acid and vitamin B12 on pemetrexed antifolate chemotherapy in nutrient lung cancer cells [J]. *Biomed Res Int*, 2013 (2013): 389046.
- [18] FARBER S, FARBER S. Some observations on the effect of folic acid antagonists on acute leukemia and other forms of incurable cancer. *Blood*. 1949;4(2):160-167 [J]. *Blood*, 2016, 127(3): 271.
- [19] GUARIENTO A H, FURTADO K S, DE CONTI A, et

al. Transcriptomic responses provide a new mechanistic basis for the chemopreventive effects of folic acid and tributyrin in rat liver carcinogenesis [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(1): 7-18.

- [20] MATTESON E L, LOWE V J, PRENDERGAST F G, et al. Assessment of disease activity in rheumatoid arthritis using a novel folate targeted radiopharmaceutical Folatecan [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2009, 27(2): 253-259.

(收稿日期:2017-06-21 修回日期:2017-08-29)