

• 实验研究 •

内质网应激在百草枯上调缺氧
诱导因子 1 α 中的作用*

黄赛¹ 孟潇潇¹ 谢晖¹ 王金凤¹ 朱勇¹ 王瑞兰¹ 陆伦根²

〔摘要〕 目的:探讨内质网应激在百草枯(PQ)上调缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)中的作用。方法:将 60 只雄性 SD 大鼠按照随机数字表法分为对照组(10 只)和染毒组(50 只),染毒组按照 50 mg/kg 的标准将 20 % 的 PQ 用生理盐水稀释到 1 ml 进行一次性灌胃,于灌胃后 2、6、12、24、48 h 处死动物取肺组织。提取肺组织总蛋白,采用 Western Blotting 检测 HIF-1 α 和内质网应激标志物 GRP78、XBP1 的表达。选择 ERS 抑制剂 4-苯基丁酸进行预处理,再施以 PQ 暴露,Western Blot 和免疫荧光检测肺组织中 GRP78 及 HIF-1 α 的表达。结果:染毒后 2 h 肺组织中 HIF-1 α 、GRP78 和 XBP1 蛋白表达均较对照组明显升高,随时间延长,逐步增高。采用 4-苯基丁酸抑制处理后,与 PQ 处理组比较,大鼠肺组织中 GRP78、HIF-1 α 表达减少。结论:PQ 进入肺组织后,可能通过诱导 ERS 上调 HIF-1 α 的表达参与肺纤维化。

〔关键词〕 百草枯;中毒;缺氧诱导因子 1 α ;内质网应激,肺纤维化
〔中图分类号〕 R-33 〔文献标志码〕 A doi:10.13201/j.issn.1009-5918.2014.12.010

The role of endoplasmic reticulum stress in paraquat-induced
hypoxia-inducible factor 1 α up-regulation

HUANG Sai¹ MENG Xiaoxiao¹ XIE Hui¹ WANG Jinfeng¹
ZHU Yong¹ WANG Ruilan¹ LU Lungen²

(¹Department of Intensive Care Medicine,First People's Hospital Affiliated Shanghai Jiao Tong University,Shanghai 201620,China;²Department of Gastroenterology,First People's Hospital Affiliated Shanghai Jiao Tong University,Shanghai 201620,China)

Corresponding author: WANG Ruilan, E-mail: wangyusun@hotmail.com; LU Lungen, E-mail: lungenlu1965@163.com

Abstract Objective: To investigate the role of endoplasmic reticulum stress in paraquat-induced hypoxia-inducible factor 1 α up-regulation. **Method:** 60 healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group ($n=10$) and paraquat poisoning group ($n=50$). The control group was treated with saline, and the paraquat poisoning group were received intragastric infusion of 20 % paraquat solution ($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Rats of paraquat poisoning group were subsequently divided into five subgroups ($n=10$) and lung tissues were collected at 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h after paraquat poisoning. HIF-1 α and endoplasmic reticulum stress markers, including GRP78, XBP1 were measured by Western Blot. After treating with an endoplasmic reticulum stress inhibitor 4-Phenybutyric acid, we then measured the expression of GRP78 and HIF-1 α by Western Blot and immunofluorescence. **Result:** HIF-1 α and endoplasmic reticulum stress markers, including GRP78, XBP1 were significantly increased at 2 h, and increased with times. Western Blot and immunofluorescence results showed that 4-Phenybutyric acid significantly decreased the levels of GRP78 and HIF-1 α . **Conclusion:** Our study demonstrated that paraquat poisoning could up regulate the HIF-1 α level via endoplasmic reticulum stress.

Key words paraquat; poisoning; hypoxia-inducible factor 1 α ; endoplasmic reticulum stress; pulmonary fibrosis

百草枯(paraquat, PQ)是全球广泛使用的除草剂,人畜中毒后病死率极高。肺是其作用的主要靶

器官,可以引起广泛的肺间质纤维化,影响气体交换,患者最终死于缺氧^[1-2]。然而,PQ 中毒导致肺纤维化的发生机制尚不明确。缺氧诱导因子 HIF-1 是由 α 和 β 亚单位组成的异构二聚体,而 HIF-1 的生理活性主要取决于 HIF-1 α 亚基的活性和表达^[3]。HIF-1 α 通过多种途径调节人体许多组织(肝脏、肾脏、心脏等)的纤维化过程^[4],在 PQ 中

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:81272071, No:81471891)
¹上海交通大学附属第一人民医院危重病科(上海,201602)
²上海交通大学附属第一人民医院消化科
通信作者:王瑞兰, E-mail: wangyusun@hotmail.com
陆伦根, E-mail: lungenlu1965@163.com

毒中,HIF-1 α 的高表达与肺纤维化关系密切。既往研究显示,低氧是上调 HIF-1 α 的主要因素,然而笔者前期工作发现 PQ 中毒 2 h 后大鼠肺组织中 HIF-1 α 表达明显增高,而低氧则发生在中毒后 6 h^[5]。因此本研究主要探讨 PQ 上调 HIF-1 α 的可能因素,为寻找 PQ 中毒的治疗靶点提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型制备

清洁级 SD 雄性大鼠 60 只,体重(250 $\pm$ 30) g,由中科院上海实验中心提供。实验动物许可证号:SYXK(沪)2009-0086,实验地点上海市第一人民医院动物实验中心。将 60 只大鼠自由摄食饮水,在同等条件下饲养 1 周,随机分为:对照组(10 只),生理盐水 1 ml 一次性灌胃;染毒组(50 只),将 20 % 的 PQ 溶液按照 50 mg/kg 标准用生理盐水稀释到 1 ml 进行一次灌胃,灌胃后按照不同时间随机分为 5 个亚组,每组 10 只。实验中严格观察并记录动物的表现,观察指标:出现食欲下降、反应迟钝、毛发蓬松、鼠尾发绀、呼吸困难、行走不稳、不能支持体重、易捕捉等标准选择染毒组模型动物,剔除中毒症状不明显的动物^[6]。由于各染毒组均有剔除和死亡的大鼠,最终每组选择 5 只大鼠纳入实验。染毒组于 2、6、12、24、48 h 后腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)进行麻醉,腹主动脉放血处死,取肺组织进行后续指标检测。对照组大鼠做同样处理。本研究动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 主要试剂

20% 的 PQ 溶液(英国先正达有限公司),BCA 蛋白试剂盒(江苏碧云天生物技术研究),HIF-1 α 抗体(Novus,美国),GRP78 抗体(Thermo,美国),XBP1 抗体(Abcam,美国), β -actin 抗体(Abcam,美国),4-苯基丁酸(Sigma,美国),羊抗兔二抗(Biomart,中国)。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 标本采集与处理 打开胸腔,观察肺的形态,夹闭右侧肺门,用冲洗针插入心尖,剪破右心耳,冲洗左肺循环至肺变白。取左侧肺叶置于液氮中,留作 Western Blotting 检测;右侧肺叶冻存于甲醛溶液中固定用作免疫化学检测。

1.3.2 Western Blotting 方法检测肺组织中 HIF-1 α 、GRP78、XBP1 蛋白的表达 提取肺组织中总蛋白,采用 BCA 法检测蛋白的浓度。每孔加入 12 μ g 样品,采用 8% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳分离,300 mA 恒定电流进行转膜(冰上),采用 5% 的牛奶-磷酸盐吐温缓冲液(PBST)进行封闭(1 h)。一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜(HIF-1 α 的浓度为 1 : 1000,GRP78 的浓度为 1 : 1000,

XBP1 的浓度为 1 : 800);二抗室温孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次,10 min/次。采用 ECL 显影。

1.3.3 免疫荧光检测 取右肺下叶以甲醛溶液固定,冰冻切片,抗原修复 20 min,羊血清孵育 30 min,一抗孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜,37 $^{\circ}$ C 复温 1 h。二抗室温避光孵育 2 h,DAPI 染核 5 min,封片,显微镜下观察。

1.4 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,多组之间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),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 肺组织中 HIF-1 α 蛋白表达

Western Blotting 检测显示,大鼠染毒 2 h 后肺组织中 HIF-1 α 表达明显增高,且随着时间的延长进行性升高(见图 1)。染毒组各时间点 HIF-1 α 表达水平与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

Time Point	HIF-1 α 灰度值 (approx.)	Significance
对照组	0.13	
2 h	0.20	1)
6 h	0.28	1)
12 h	0.35	1)
24 h	0.42	2)
48 h	0.50	2)

与对照组比较,1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ 。

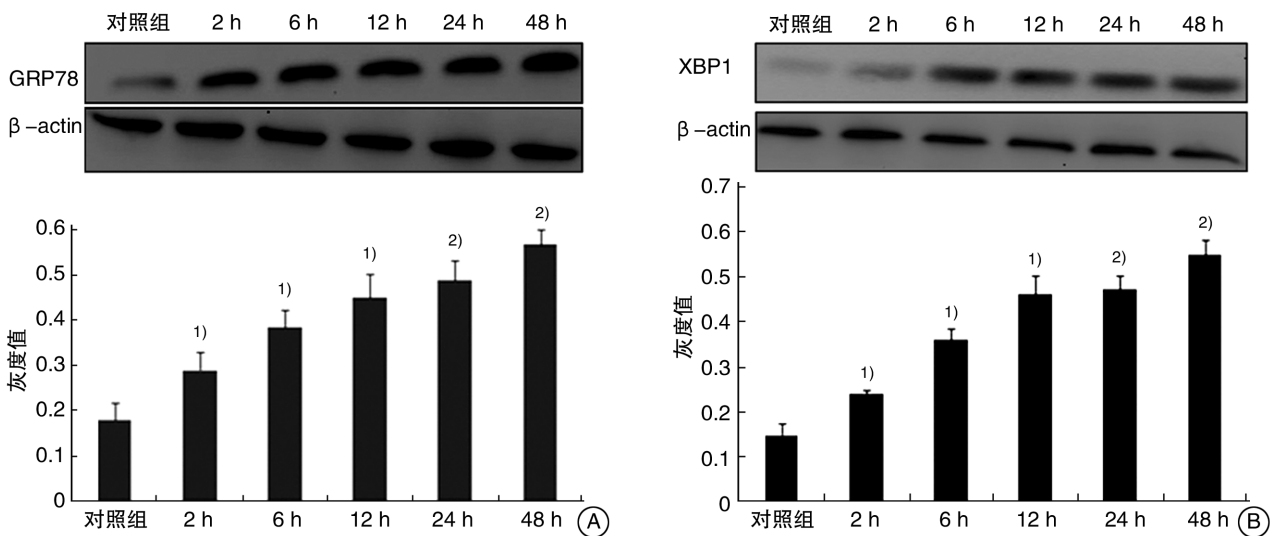
图 1 百草枯染毒后不同时间点大鼠肺组织中 HIF-1 α 蛋白表达

2.2 肺组织中 GRP78、XBP1 蛋白表达

Western Blotting 检测显示,大鼠染毒 2 h 后肺组织中 GRP78、XBP1 表达明显增高,且随着时间的延长进行性升高(见图 2)。染毒组各时间点 GRP78、XBP1 表达水平与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 4-苯基丁酸对内质网应激的影响

Western Blotting 和免疫荧光检测显示,4-苯基丁酸可以明显抑制内质网应激标志物 GRP78 的表达(见图 3),且染毒组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

图 2 百草枯染毒后不同时间点大鼠肺组织中 GRP78、XBP1 蛋白表达

2.4 4-苯基丁酸对 HIF-1 α 表达的影响

Western Blotting 和免疫荧光检测显示, 4-苯基丁酸可以明显抑制 HIF-1 α 的表达 (见图 4), 与染毒组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

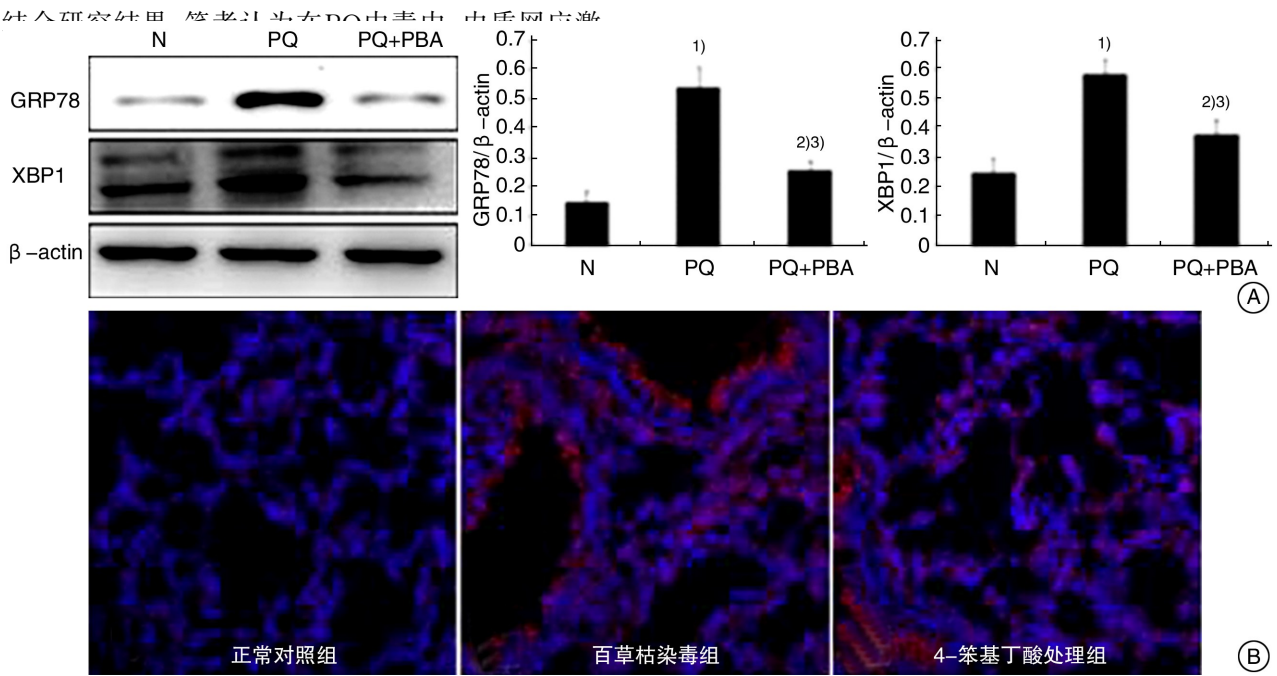
百草枯(paraquat, PQ)是全球广泛使用的除草剂, 人畜中毒后病死率极高。肺是其作用的主要靶器官, PQ 中毒后迅速蓄积于肺内, 肺内 PQ 浓度是血浆中的 6~10 倍, PQ 可以迅速破坏肺的实质细胞, 引起肺出血、水肿, 最终引起肺纤维化, 患者最终死于肺纤维化。到目前为止, PQ 中毒没有特殊解毒药物, 治疗措施有限, 患者病死率高达 50%~80%^[7]。因此深入探讨 PQ 中毒导致肺纤维化的发生机制具有重要的意义。

缺氧诱导因子 HIF-1 是由 α 和 β 亚单位组成的异构二聚体, 而 HIF-1 的生理活性主要取决于 HIF-1 α 亚基的活性和表达。HIF-1 α 通过多种途径调节人体许多组织 (肝脏、肾脏、心脏) 的纤维化过程^[8-9], 研究表明, 敲除 HIF-1 α 基因后可以明显减轻小鼠肝纤维化的程度^[10]。在 PQ 中毒中, HIF-1 α 的高表达与肺纤维化关系密切, 因此研究 HIF-1 α 的发生机制具有重要的意义^[5, 11]。既往研究显示, 低氧是上调 HIF-1 α 的主要因素, 其调节主要是发生在转录后的调节, 通过羟基化、泛素化、乙酰化及磷酸化等使 HIF-1 α 可以稳定表达与活化。然而笔者发现 PQ 中毒 2 h 后大鼠肺组织中 HIF-1 α 表达明显增高, 而低氧则发生在中毒后 6 h。因此, 笔者推测在 PQ 中毒中, HIF-1 α 的上调并不是通过缺氧诱导的。近年来的研究表明在常氧条件下, HIF-1 也可以被激活, 并参与炎症反应

的调节^[12-13]。

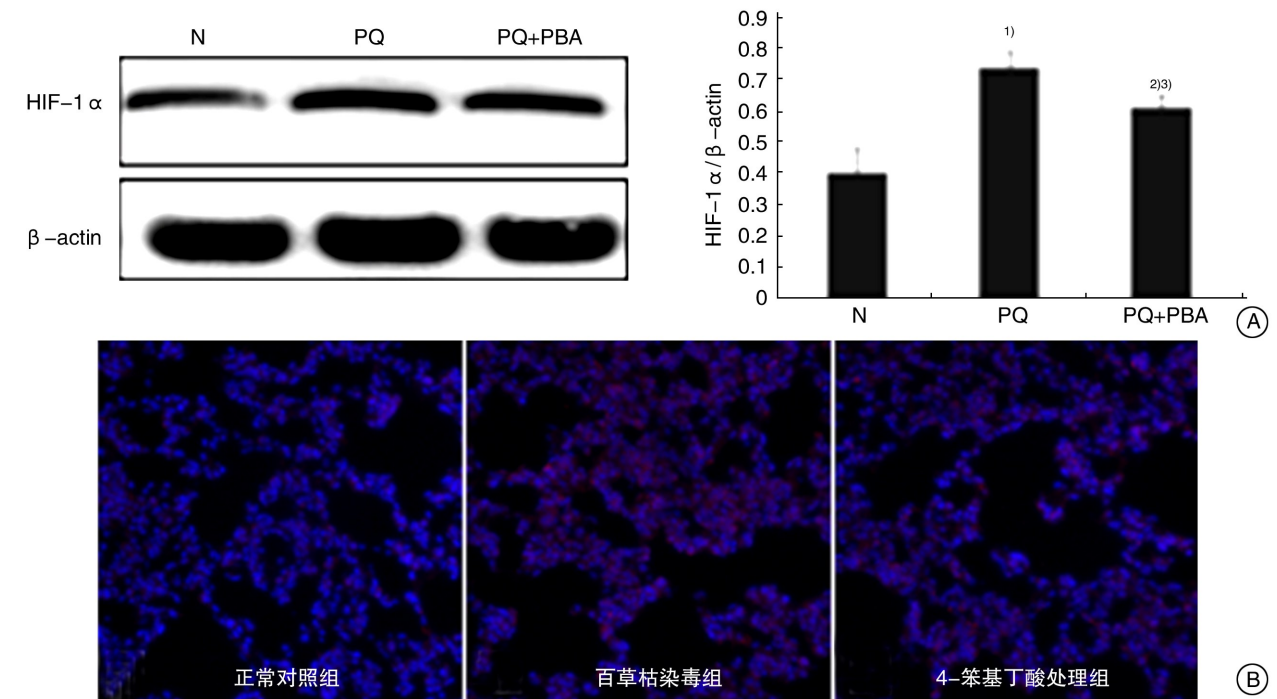
目前研究显示内质网应激与机体多种疾病的发生密切相关, 如神经系统变性疾病、糖尿病、病毒感染性疾病等, 近年来发现内质网应激与化学毒物对机体毒性损伤的发生发展密切相关^[14-16]。低浓度的 PQ 刺激可以引起肺泡上皮细胞发生内质网应激, 表现为分子伴侣 GRP78、GRP94 增加^[17-18], 同时在笔者的实验中也证实了 PQ 中毒可以引起大鼠肺组织发生内质网应激。Chen 等^[19]研究发现, 在三阴乳腺癌 (TNBC) 中, XBP1 通过装配一个含低氧诱导因子 1 α (HIF1- α) 的转录复合物, 借助 RNA 聚合酶 II 招募来调节 HIF1- α 靶标的表达, 促进 TNBC 的发生发展, 而笔者前期研究发现 HIF-1 α 在 PQ 致肺纤维化中发挥重要的作用。同样, 在 LPS 诱导的肺炎中, 抑制内质网应激后可以通过调控 HIF-1 α 信号通路减轻肺炎的程度^[20]。但是内质网应激在 PQ 上调 HIF-1 α 的表达中的作用尚未见报道。

为了验证这一假设, 笔者选择内质网应激抑制剂 4-苯基丁酸 (4-PBA) 进行干预, 抑制 PQ 引起内质网应激的程度, 检测 HIF-1 α 的变化。4-PBA 是一种分子伴侣, 可以抑制内质网应激, 使错误或未折叠蛋白进行正确的折叠^[21]。笔者研究证实, 4-PBA 可以抑制 PQ 引起内质网应激的程度, 同时可以抑制 HIF-1 α 的产生。内质网应激作为一种亚细胞水平上的保护措施, 早期通过诱导未折叠蛋白反应, 保护细胞不致发生死亡, 但是却引起细胞表型的变化, 表现为上皮细胞去分化, 失去细胞极性及上皮细胞标志, 而间质细胞标志表达增加, 并获得迁移能力, 即 EMT, 但是其具体机制不清楚^[22]。



与 N 组比较，¹⁾ $P<0.01$ ，²⁾ $P<0.05$ ；与 PQ 组比较，³⁾ $P<0.05$ 。

A: Western Blotting 检测结果; B: 免疫荧光检测结果。
图 3 4-苯基丁酸对 GRP78、XBP1 表达的影响



与 N 组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ ；与 PQ 组比较，³⁾ $P<0.05$ 。

A: Western Blotting 检测结果; B: 免疫荧光检测结果。
图 4 4-苯基丁酸对 HIF-1α 表达的影响

可能通过上调 HIF-1α 的表达参与肺纤维化中，但是其具体机制需要进一步探讨。这可能有利于对于早期针对 HIF-1α 上游靶点进行治疗，可能减轻

EMT 的发生,进而有利于 PQ 中毒致肺纤维化的救治。

参考文献

[1] LEE E Y,HWANG K Y,YANG J O,et al. Predictors of survival after acute paraquat poisoning[J]. Toxicol Ind Health,2002,18:201—206.

[2] DINIS-OLIVEIRA R J,DUARTE J A,SANCHEZ-NAVARRO A, et al. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity,clinical features,and treatment [J]. Critl Rev Toxicol,2008,38:13—71.

[3] LEE J W,BAE S H,JEONG J W,et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha:its protein stability and biological functions[J]. Exp Mol Med,2004,36:1—12.

[4] GORDON S,TAYLOR P R. Monocyte and macrophage heterogeneity[J]. Nat Rev Immunol ,2005,5:953—964.

[5] XIE H,TAN J T,WANG R L,et al. Expression and significance of HIF-1 α in pulmonary fibrosis induced by paraquat[J]. Exp Biol Med (Maywood),2013,238:1062—1068.

[6] LEE S K,AMENO K,IN S W,et al. Levels of paraquat in fatal intoxications[J]. Int J Legal Med,1999,112:198—200.

[7] ROSE M S,SMITH L L,WYATT I. Evidence for energy-dependent accumulation of paraquat into rat lung [J]. Nature,252:314—315.

[8] HIGGINS D F,KIMURA K,BERNHARDT W M,et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. J Clin Invest,2007,117:3810—3820.

[9] WEI H,BEDJA D,KOITABASHI N,et al. Endothelial expression of hypoxia-inducible factor 1 protects the murine heart and aorta from pressure overload by suppression of TGF-beta signaling[J]. Proc Natl Acad Sci (USA) 2012,109:E841—850.

[10] MOON J O,WELCH T P,GONZALEZ F J,et al. Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1 alpha-deficient mice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2009,296:G582—585.

[11] 徐榕,王瑞兰,吴欣,等. 百草枯中毒大鼠肺组织缺氧诱导因子-1 α 的表达变化[J]. 2011,20(9):945—950.

[12] ELTZSCHIG H K,CARMELIET P. Hypoxia and inflammation[J]. N Engl J Med 2011,364:656—665.

[13] PATEL J, LANDERS K, MORTIMER R H, et al. Regulation of hypoxia inducible factors (HIF) in hypoxia and normoxia during placental development[J]. Placenta,2010,31:951—957.

[14] SALMINEN A,KAUPPINEN A,SUURONEN T,et al. ER stress in Alzheimer's disease:a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology [J]. J Neuroinflammation,2009,6:41—41.

[15] BÂNHEGYI G,MARGITTAI E,SZARKA A,et al. Crosstalk and barriers between the electron carriers of the endoplasmic reticulum[J]. Antioxid Redox Signal,2012,16:772—780.

[16] BAEK H A,KIM D S,PARK H S,et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in myofibroblastic differentiation of lung fibroblasts[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2012,46:731—739.

[17] CHEN Y W,YANG Y T,HUNG D Z,et al. Paraquat induces lung alveolar epithelial cell apoptosis via Nrf-2-regulated mitochondrial dysfunction and ER stress [J]. Arch Toxicol,2012,86:1547—1558.

[18] GAWARAMMANA I B,BUCKLEY N A. Medical management of paraquat ingestion[J]. Br J Clin Pharmacol,2011,72:745—757.

[19] CHEN X,LLIOPOULOS D,ZHANG Q,et al. XBP-1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway[J]. Nature,2014,508:103—107.

[20] KIM H J,JEONG J S,KIM S R,et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates lipopolysaccharide-induced lung inflammation through modulation of NF-Kb/HIF-1 α signaling pathway[J]. Sci Rep,2013,1142:1—10.

[21] PERLMUTTER D H. Chemical chaperones: a pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking[J]. Perdiatr Res ,2002,52:832—836.

[22] ANJOE H,CHENG D S,DEGRYSE A L, et al. Alveolar epithelial cells undergo epithelial to mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress[J]. J Biol Chem,2011,286:30972—30980.

(收稿日期:2014-08-15)

“黏”与“粘”的使用规范

“黏”与“粘”在使用中容易混淆,是常有的事。根据第 5 版的《现代汉语规范词典》的注解,这 2 个字是有区别的。这 2 个字不仅读音不同、字形不同,用法也有差异。《现代汉语规范词典》中将“粘”标为动词,“黏”标为形容词。表示动作,用“黏”的东西使物体连接起来,应选择“粘”,如粘信封、粘连、粘附;像糨糊或胶水等所具有的、能使一个物体附着在另一物体上的性质,用“黏”,如黏附分子,这胶水很黏,麦芽糖黏在一块儿了。