血红素加氧酶-1 在大鼠矽肺纤维化中的作用机制

李侠, 李淑珉, 高娟，陈晓文

山东省职业卫生与职业病防治研究院 山东省医学科学院 山东 济南 250002

Comment [A]: 请按专家审稿意见和正文中批注和修订进行修改。请严格按本刊格式行文，请将修改处务必以其它颜色字体凸显，并保持原文批注修改。修改后通过系统回传。

Comment [A]: 一个单位？还是两个？请与英文翻译写法一致（山东省职防院隶属于山东省医学科学院，要求我们这样写）。

摘要：目的 观察血红素加氧酶-1 在大鼠矽肺纤维化中的作用机制。**方法** Wistar 大鼠 60 只，随机分为 4 组，分别为对照组（A 组）和染尘模型组（B 组）、B 组+HO-1 抑制剂组（C 组）、B 组+HO-1 诱导剂组（D 组）。采用气管暴露法滴注二氧化硅悬液制造大鼠矽肺模型。建模 28 天后 HE 染色观察各组肺组织病理结构，Western blot 检测各组肺组织 HO-1 蛋白含量，荧光定量 PCR 检测各组肺组织 HO-1mRNA 的表达。**结果** 对照组中 HO-1 蛋白表达明显低于其他各组（P＜0.05），抑制剂 C 组较 B 组 HO-1 蛋白表达明显降低，而诱导剂 D 组较 B 组 HO-1 蛋白表达量明显升高（P＜0.05）。RT-PCR 检测 A、B、C、D 组 HO-1 mRNA 相对表达量分别为 1、2.25±0.38、1.81±0.74、7.75±0.56， 抑制剂 C 组较 B 组表达明显降低，而诱导剂 D 组较 B 组表达显著升高（P＜0.05）。**结论** HO-1 参与了大鼠矽肺纤维化的形成过程，通过对其干预可以改变大鼠矽肺纤维化的程度，可为矽肺纤维化的诊断与治疗提供新途径。

关键词 血红素加氧酶-1;矽肺;肺纤维化;大鼠;锌原卟啉;钴原卟啉

The mechanism of HO-1 on Silicosis fibrosis in rats

Abstract: objective To observe the mechanism of heme oxygenase-1 on Silicosis fibrosis in rats. **Methods** 60 Wistar rats were randomly divided as follows: the

基金项目：山东省自然科学基金项目（ZR2011HL035）
作者简介：李侠，女，1965- ，医学硕士，硕士研究生导师，副主任医师，研究方向：尘肺病的早期诊断与治疗
通讯作者：李侠， E-mail:doctormary2@163.com，Tel：15169186656

control group (A) , silicon dioxide group (group B), group B + HO-1 inhibitor zinc protoporphyrin group (Group C) and group B + HO-1 inducer cobalt protoporphyrin group (group D). Instill silica suspension by using the method of tracheal exposure to duplicate the rats model with silicosis. After manufacturing the model for 28 days, observe the lung tissue pathological structures by using the HE staining, detect the HO-1 protein content and HO-1mRNA in the lung tissues of rats by using the Western blot analysis and the Expression quantitative PCR. **Results** The expression of HO-1 in normal control group was significantly lower than that of other groups（P＜0.05）. The expression of HO-1 in C group was significantly lower than that of B group, and its expression in D group was significantly higher than that of B group（P＜0.05）. Detected by RT-PCR, the relative expression levels of HO-1 mRNA in four groups respectively were 1,2.25 ± 0.38,1.81 ± 0.74 and 7.75 ± 0.56. The levels of HO-1mRNA in C group were significantly lower than B group and its levels in D group were significantly higher than B group（P＜0.05）. **Conclusion** HO-1 participates in the formation process of silicosis fibrosis in rats. The extent of silicosis fibrosis in rats can be changed by the intervention of HO-1. And it can provide a new approach for the diagnosis and treatment of silicosis fibrosis

Key words: Heme Oxygenase-1; silicosis; pulmonary fibrosis; rats; ZnPP；CoPP

中图分类号：R135　　文献标识码：A

矽肺是由于长期吸入游离二氧化硅（SiO_2）粉尘所引起的以肺组织弥漫性纤维化为主的全身性疾病[1]。近年来寻找筛选新的生物靶点，从而有效延缓甚

至抑制矽肺纤维化的进展成为一个研究热点。

血红素加氧酶 1（heme Oxygenase-1,HO-1）是人类和哺乳动物组织中广泛存在的一种氧化应激酶，最早认为是催化血红素的起始酶和限速酶[2]。HO-1 及其催化产物在体内具有抗炎、抗氧化、调节细胞凋亡等重要生理作用[3,4]。本实验通过建立大鼠矽肺模型并给予不同的干预措施，观察不同组别 HO-1 对大鼠矽肺纤维化的影响，探讨 HO-1 在矽肺发病中可能的作用机制，以期为矽肺的靶向治疗提供新的思路。

1、材料与方法

1.1 **材料** 清洁级 SD 大鼠 60 只（山东省医科院动物实验中心），体重 180～220 克，雌雄不拘，适应性饲养 1 周后，随机分成四组：生理盐水对照组（A 组）、二氧化硅组（B 组）、二氧化硅+锌原卟啉组（C 组）、二氧化硅+钴原卟啉组（D 组）。SiO_2 结晶型标准品（＞95%的颗粒直径小于 5μm）、HO-1 抑制剂锌原卟啉（zinc protoporphyrin, ZnPP）、HO-1 诱导剂钴原卟啉（cobalt protoporphyrin, CoPP）（sigma 公司，美国）；兔抗大鼠 HO-1、β-actin 多克隆抗体（Santa Cruz 公司，美国）；哺乳动物蛋白& RNA 提取试剂盒、SYBR 一步法荧光定量 PCR 试剂盒（Takara 公司，日本）。

1.2 **方法**

1.2.1 **矽肺模型建立** 预先用生理盐水配制 40mg/ml SiO_2 粉尘悬液，高温高压灭菌备用。0.4%戊巴比妥静脉麻醉 B 组大鼠，仰卧位固定，颈部消毒，暴露气管，将 1ml 矽尘混悬液缓慢注入气管，然后立即将动物直立并旋转，使液体在左右两肺均匀分布。同法 A 组大鼠气管内注入 1ml 灭菌生理盐水。在 B 组造模后同时给药 ZnPP 12.5mg/Kg，CoPP 5mg/Kg，采用腹腔隔日注射的方式，

连续 4 周。建模 28 天后处死大鼠，取出肺组织做相关检测。

1.2.2 HE 染色 取出肺组织用 10%甲醛液固定，常规脱水石蜡包埋。HE 染色显示正常肺组织结构大部遭到破坏，结节主要由吞噬矽尘颗粒的泡沫细胞、成纤维细胞以及上皮样细胞组成，则表明模型成功。

1.2.3 western blot 检测 取 100mg 肺组织加入 1ml 裂解液，电动匀浆，冰上反应 30min 后收集蛋白。BCA 法常规测定蛋白浓度，等量蛋白样品行 SDS-PAGE 凝胶电泳，电转至聚偏氟乙烯膜，50g/L 牛血清白蛋白封闭 1 h，分别加入适宜浓度抗体 HO-1（1：1000）、β-actin（1:8000），4℃孵育过夜，TBST 洗涤（15 min×3 次），加入山羊抗小鼠辣根过氧化物酶标记 IgG（1：5000），37℃孵育 1 h，TBST 洗涤（15 min×3 次），ECL 显影，常规压片、照相。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测 取 100mg 肺组织加入 1ml Trizol，电动匀浆，冰上反应 30min 后转移到 1.5ml 无菌无酶 EP 管中。按照哺乳动物蛋白＆ RNA 提取试剂盒说明书提取各组总 RNA 并逆转录为 cDNA；采用 SYBR 一步法荧光定量 PCR 试剂盒定量分析 HO-1 的表达，以 GAPDH 基因作为内参，标准化反应体系。反应条件：95℃预变性 3min，95℃变性 20s，60℃退火 30s，72℃延伸 20s，35 个循环。引物序列：HO-1 正义 5’-CTCGCATGAACACTCTGGAGAT-3’，反义 5’-TGTGAGGGACTCTGGTCTTTGT-3’；GAPDH 正义 5’-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3’，反义 5’-GAATGGGAGTTGCTGTTGAAGT-3’。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

2、统计学分析 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析。数据以均数±标准差（$\bar{x}$±S）表示，用 Levene 法行方差齐性检验，组间比较采用单因素方差分析，

两两比较采用 Bonferroni 法；检验水准 α=0.05。

3、结果

3.1 HE 染色 A 组肺组织结构基本正常，炎症反应轻微，支气管周围淋巴细胞反应性增生。B 组见部分肺泡结构尚存，间隔增宽，肺间质炎性细胞浸润，以淋巴细胞和巨噬细胞为主，有矽结节形成。C 组病变较 B 组进一步加重，可见肺泡结构破坏消失，矽结节多且大，几乎占满整个肺叶，并且出现融合现象。D 组病变较 B 组有所改善，多数肺泡结构存在，巨噬细胞在肺泡腔内聚集，腔内可见肉芽肿结节，矽结节少且小。见图 1。

3.2 Western blot 检测 HO-1 蛋白表达 本实验中，B、C、D 组分别与对照组比较， HO-1 蛋白表达明显高于对照组（$P<0.01$）；在加入 HO-1 抑制剂 ZnPP 后，C 组 HO-1 蛋白表达量较 B 组明显降低（P＜0.01）；而 D 组加入 HO-1 诱导剂 CoPP 后，蛋白表达量明显高于其他各组（P＜0.01）。

组别	n	**HO-1**
对照组 A 组	5	0.17＋0.04
二氧化硅组 B 组	5	1.78±0.47
二氧化硅+锌原卟啉组 C 组	5	1.31±0.24
二氧化硅+钴原卟啉组 D 组	5	2.91±0.57

3.3 荧光定量 PCR 检测 HO-1 mRNA 表达 实时荧光定量 PCR 检测各组 HO-1mRNA 表达显示，二氧化硅刺激后 HO-1 mRNA 表达较对照组增高；用 HO-1 抑制剂和刺激剂干预后，HO-1 mRNA 表达发生变化，其中 C 组较 B 组表达降低，但仍高于对照组，而 D 组表达明显高于其他各组（P＜0.05）。

组别	n	HO-1 mRNA
对照组 A 组	5	1
二氧化硅组 B 组	5	2.25±0.38
二氧化硅+锌原卟啉组 C 组	5	1.81±0.74*

二氧化硅+钴原卟啉组 D 组	5	7.75±0.56*
F		3.792
P		0.048

4、讨论

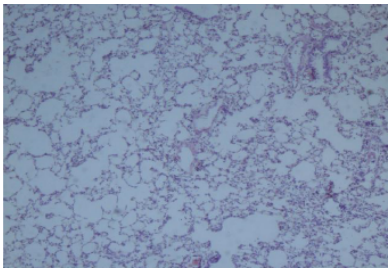
矽肺纤维化的损伤机制较为复杂，至少包括肺组织炎性损伤、结构破坏及伴随的过度修复等过程，而且这种纤维化的进程一旦发生很难逆转，因此至今临床上对于矽肺尚无明确有效的治疗方法[5]。

血红素加氧酶又被称为热克蛋白 32，是目前发现的生物体内最易被诱导的抗氧化酶[6]。HO-1 一般在体内呈现低表达，但在重金属、低氧、炎症等氧化应激诱导下可使表达显著增高[7]。在正常肝脏组织中，HO-1 主要存在于 Kupffer 细胞中，而当处于应激状态时，HO-1 在肝间质细胞和实质细胞中（如星状细胞、Kupffer 细胞、肝窦内皮细胞等）均可检测到高水平表达，从而广泛参与肝脏的多种病理生理过程[8]。而在肺组织中，Jin 等[9]则报道指出 HO-1 在由博莱霉素引起的肺纤维化早期就已表达显著增高。ZnPP 是 HO-1 的有效抑制剂，可以抑制 HO-1 的表达和活化，CoPP 是 HO-1 的诱导剂，可以诱导 HO-1 的表达。在本实验中我们也观察到，在 SiO_2 刺激下 B 组 HO-1 无论在蛋白水平还是 mRNA 水平表达均比对照组明显升高，ZnPP 干预组 HO-1 蛋白和 mRNA 水平表达均较 B 组降低，CoPP 诱导后 HO-1 蛋白和 mRNA 水平表达均明显增高。其可能的机制：①SiO_2 刺激的矽肺纤维化产生导致了体内组织的缺氧环境，从而诱导 HO-1 表达增高；②SiO_2 激活了肺泡内巨噬细胞的 ROS 系统，使得局部 ROS 增多，从而上调了 HO-1 的转录和表达；③局部炎性因子的分泌增加也可增加 HO-1 的表达。由此可见在矽肺纤维化的过程中 HO-1 扮演了重要的角色。

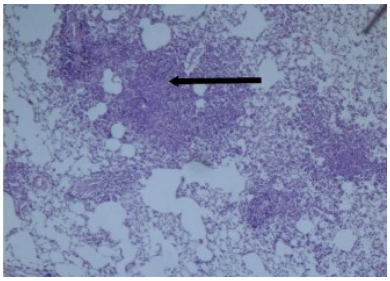
有研究报道[10]，在慢性肝病及肝纤维化病程中，HO-1 的表达增加或许为肝脏的一种自我保护机制。此外在肾脏组织中，Kie 等[11]发现 HO-1 基因缺陷的

小鼠更容易发生肾小管上皮细胞转分化，从而导致肾脏纤维化的发生。Wang 等[12]则报道指出 HO-1 的代谢产物之一 CO，即使在较低浓度下也可通过 MKK3 信号传导途径抑制梗阻性肾病所致的肾纤维化进程。同样本实验结果显示在加入 HO-1 诱导剂 CoPP 刺激后，大鼠矽肺模型中，纤维化的病变程度较 B 组明显减轻，肺组织切片 HE 染色显示多数肺泡组织结构存在，且其中的矽结节小且少；而 HO-1 抑制剂 ZnPP 刺激后，则结果刚好相反，纤维化病变程度明显加重。由此可见 HO-1 在矽肺肺组织的纤维化发展过程也同样起到了保护作用，但这种抗纤维化的作用机制还有待进一步研究。

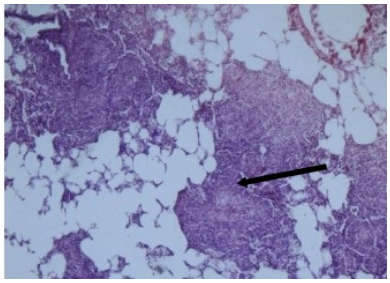
综上所述，HO-1 可通过抗氧化应激等多种机制有效抑制肺组织的纤维化进程，从而减轻矽肺纤维化的病变程度，阻断或增强相应基因的表达可为临床治疗和早期预防矽肺纤维化提供新靶点。



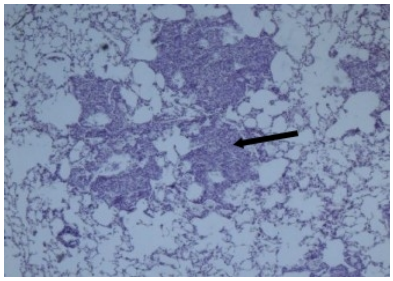
A 组正常肺组织



B 组肺组织矽结节形成



C 组矽结节融合



D 组矽性纤维化

图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色

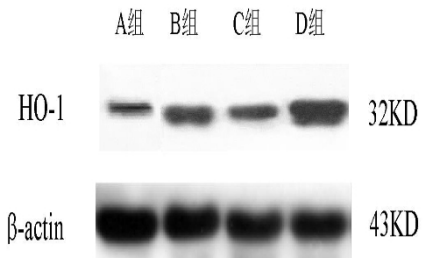


图 2 各组 HO-1 及 β-actin 蛋白表达

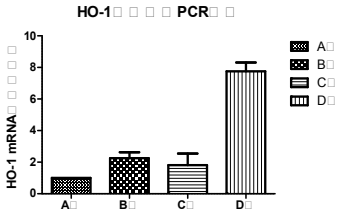


图 3 HO-1 mRNA 表达

4 参考文献

[1]Leung CC,Yu IT,Chen W. Silicosis[J]. The Lancet, 2012, 379: 2008-2018.

[2]Barbagallo I,Galvano F,Frigiola A, et al. Potential therapeutic effects of natural heme oxygenase-1 inducers in cardiovascular diseases[J]. Antioxidants & redox signaling, 2013, 18: 507-521.

[3]Ollinger R,Pratschke J. Role of heme oxygenase-1 in transplantation[J]. Transplant international, 2010, 23 : 1071-1081.

[4]Neubauer JA,Sunderram J. Heme oxygenase-1 and chronic hypoxia[J]. Respiratory physiology & neurobiology, 2012, 184 : 178-185.

[5]Santos C,Norte A,Fradinho F, et al. Silicosis - brief review and experience of a pulmonology ward[J]. Revista portuguesa de pneumologia, 2010, 16: 99-115.

[6]Su ZY,Shu L,Khor TO, et al. A perspective on dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: oxidative stress, nrf2, and epigenomics[J]. Topics in current chemistry, 2013, 329: 133-162.

[7]Haines DD,Lekli I,Teissier P, et al. Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders[J]. Acta physiologica, 2012, 204: 487-501.

[8]Origassa CS,Camara NO. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 and heme degradation derived end products in liver injury[J]. World journal of hepatology, 2013, 5: 541-549.

[9]Jin C,Zhou D,Lv F. Beneficial effects of early (but not late) intervention of heme oxygenase-1 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. Respiratory physiology & neurobiology, 2011, 175: 239-246.

[10]Wang QM,Du JL,Duan ZJ, et al. Inhibiting heme oxygenase-1 attenuates rat liver fibrosis by removing iron accumulation[J]. World journal of gastroenterology, 2013, 19: 2921-2934.

[11]Kie JH,Kapturczak MH,Traylor A,et al. Heme oxygenase-1 deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2008, 19: 1681-1691.

[12]Wang L,Lee JY,Kwak JH, et al. Protective effects of low-dose carbon monoxide against renal fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction[J]. American journal of physiology. Renal physiology, 2007, 294: 508-517.