|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 分类号 |  | 密级 |
| U D C |  | 编号 |



硕士学位论文

**Nrf2、γ-GCS** **表达在苦参碱干预博来霉素诱导大鼠肺纤维化中的作用**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 研 究 生 姓 名 | ： | 罗卿 |
| 指导教师姓名、职称 | ： | 梁晓秋 教授 |
| 学科、专业名 称 | ： | 病理与病理生理学 |
| 研 究 方 向 | ： | 肺部疾病 |

2014 年 9 月

南华大学学位论文原创性声明

本人声明，所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得南华大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。与我共同工作的同志对本研究所作的贡献均已在论文中作了明确的说明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

作者签名： 年 月 日

南华大学学位论文版权使用授权书

本学位论文是本人在南华大学攻读 （博/硕）士学位期间在导师指导 下完成的学位论文。本论文的研究成果归南华大学所有，本论文的研究内容不得以其它单位的名义发表。本人同意南华大学有关保留、使用学位论文的规定，即： 学校有权保留学位论文，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以采用复印、缩印或其它手段保留学位论文；学校可根据国家或湖南省有关部门规定送交学位论文。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》，并按《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定享受相关权益。同意授权中国科学信息技术研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并通过网络向社会公众提供信息服务。对于涉密的学位论文，解密后适用该授权。

作者签名： 导师签名：

年 月 日 年 月

**目 录**

缩略语表 1

[中文摘要 2](#_TOC_250009)

英文摘要 4

正文 6

[前言 6](#_TOC_250008)

[材料和方法 7](#_TOC_250007)

[结果 16](#_TOC_250006)

[讨论 25](#_TOC_250005)

[结论 30](#_TOC_250004)

[参考文献 31](#_TOC_250003)

[硕士期间撰写论文 36](#_TOC_250002)

[综述 37](#_TOC_250001)

[致谢 46](#_TOC_250000)

主要缩略语

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| β-Actin | β-Actin | β-肌动蛋白 |
| A value | Absorb value | 吸光度值 |
| BLM | Bleomycin | 博来霉素 |
| cDNA | Complementary DNA | 互补脱氧核糖核酸 |
| DAB | Diamino benzidine | 二氨基联苯胺 |
| DEPC | diethylpyrocarbonate | 焦碳酸二乙酯 |
| EB | Ethiodium Bromide | 溴化乙锭 |
| EDTA | Ethylene diamineterracetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| ERK | Extracellular signal reglution kinase | 细胞外信号调节激酶 |
| γ-GCS | Gamma-glutamylcysteine synthetase | γ-谷氨酰半胱氨酸合  成酶 |
| Nrf2 | Nuclear factor –E2 related factor 2 | 红系衍生核因子相关  因子-2 |
| GSH | reduced glutathione | 还原型谷胱甘肽 |
| HE | hematoxylin-eosin | 苏木素-伊红 |
| IPF | Idiopathic pulmonary fibrosis | 特发性肺间质纤维化 |
| PBS | Phosphate buffer saline | 磷酸盐生理盐水缓冲  液 |
| PTK | Protein tyrosine kinase | 蛋白酪氨酸激酶 |
| RT-PCR | Reversetranscription-polymerase  Chain reaction | 逆转录-聚合酶链反应 |
| TGF-β | Transformin g growth factor –β | 转化生长因子-β |

**中文摘要**

目的：

研究苦参碱在博莱霉素诱导的实验性大鼠肺纤维化治疗中的作用。检测肺组织中Nrf2及γ-GCS的表达，探讨其可能的作用机制。

方法：

将120只健康雄性SD大鼠随机分为对照组（A组）、实验模型组（B组）、泼尼松组（C组）、苦参碱50mg组（D组）、苦参碱200mg组（E组）。B、C、

D、E组使用博来霉素（5mg/kg）气管注射法复制肺纤维化大鼠模型。A组及B组经胃管注入生理盐水2ml，1次/d；C组经胃管注入醋酸泼尼松0.56mg/Kg，1次/d；D组和E组分别经胃管注入苦参碱50、200mg/kg，1次/d。在给予实验药物后第7d、14d、28d每组各随机处死大鼠8只，取右上叶肺组织石蜡切片HE染色及Masson胶原染色，并计算肺泡炎及肺纤维化积分；碱水解法检测肺组织羟脯氨酸（HYP）含量；RT-PCR法检测肺组织Nrf2mRNA、γ-GCSmRNA的表达；western blot法检测肺组织γ-GCS及Nrf2蛋白的表达。

结果：

（1）实验模型组表现有程度不等的肺泡炎及明显纤维化。各治疗组肺泡炎及肺纤维化程度减轻，与模型组相比差异显著，大剂量苦参碱组其肺泡炎及肺纤维化程度减轻更显著（*P*＜0.05）。

（2）肺组织中羟脯氨酸含量：B、C、D、E组均高于A组（*P*＜0.01），

C、D、E组低于B组（*P*＜0.01）；不同时间段比较，第28d最高（*P*＜0.01）。

（3）肺组织中γ-GCS mRNA**、**Nrf2 mRNA表达：B、C、D、E组高于A组（*P*＜0.05）；C、D、E组高于B组；且表达有随时间下降趋势，以7d较高，第28d较低，但仍高于对照组（*P*＜0.01）。

（4）肺组织中γ-GCS、Nrf2蛋白表达：B、C、D、E组高于A组（*P*＜0.05）；

C、D、E组高于B组；且有随时间下降趋势，以7d较高，第28d较低，但仍高于对照组（*P*＜0.05）。

（5）肺组织中γ-GCS的表达与Nrf2的表达呈正相关。

结论：

1.苦参碱可抑制博来霉素诱导的大鼠肺纤维化；

2.苦参碱抑制肺纤维化的可能机制是：苦参碱通过调控Nrf2的表达，间接调控内源性抗氧化酶γ-GCS，从而抑制肺泡炎和肺纤维化的形成。

【关键词】 肺纤维化；红系衍生核因子相关因子 -2；γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶；苦参碱

**The affect of Nrf2 andγ-GCS expression after intervened with matrine in the bleomycin-induced- pulmonary fibrosis-rats**

**【Abstract】**

**Objective**:

By investigated the chang of the expression of Nrf2 andγ-GCS in the Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis rats after treated with Matrine. Study the effect and perhaps mechanism in the treatment of matrine in pulmonary fibrosis.

**Methods**:

120 adult male SD rats were randomly divided into control group (group A), experimental model group (group B), Prednisone Acetate group (group C), Matrine 50mg group(group D) and Matrine 200mg group(group E). Pulmonary fibrosis model was established by injected with Bleomycin by intratracheal. Detected the concentration of HYP in the lung tissue. The expression of Nrf2 andγ-GCS mRNA in lung tissue were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). The protein expressions of Nrf2 andγ-GCS were measured by Western blot.

**Results**:

(1) Except group A, the else groups performance with varying degrees of alveolitis and fibrosis. Treatment groups reduced the degree of alveolitis and pulmonary fibrosis, the difference with experimental model group was significant. The reduce of high-dose matrine group was more pronounced.

(2) The concentration of HYP was significantly higher in the else groups than group A. And it was the highest in the group B(*P*<0.01). It reached the peak at 14th (*P*<0.01).

(3) Contrast to group A, The protein expression ofγ-GCS and Nrf2 were significantly higher in the lung tissue in the else groups. Group C, D and E were higher than Group B (*P*<0.01). It reached the peak at 7th(*P*<0.01).

(4) Contrast to group A, The expression ofγ-GCS and nrf2mRNA were significantly higher in the lung tissue in the else groups. Group C, D and E were higher than Group

B (*P*<0.01). It reached the peak at 7th(*P*<0.01).

(5) They were positively correlated between the expression ofγ-GCS protein and the expression of Nrf2 protein, mRNA.

**Conclusions**:

1. Matrine inhibit pulmonary fibrosis in rats induced by bleomycin.

2. By controlling the expression of Nrf2 to indirectly control the expression ofγ-GCS. This is a possible mechanism why matrine inhibit pulmonary fibrosis in rats.

Luo Qing(Pathology and Pathophysiology)

Directed by Professer Liang Xiao-Qiu

**【Keywords】**pulmonary fibrosis; NF-E2 related factor 2;γ-glutamylcysteine synthetase; Matrine

前 言

肺纤维化是许多肺间质疾病的共同结局，发病机制尚未完全明确，临床缺乏特异的治疗药物[1]，病情一般持续性进展，最终多死于呼吸衰竭[2] 。

近年研究发现，在肺纤维化动物模型及患者，氧化应激水平明显增高，补充抗氧化物质GSH、N-乙酰半胱氨酸能减轻肺纤维化水平，提示氧化/抗氧化失衡可能在肺纤维化发病机制中发挥重要作用[3-6]，为肺纤维化的抗氧化治疗提供了理论依据。

红系衍生核因子相关因子-2（Nuclear factor–E2 related factor 2, Nrf2）是外源性有毒物质和氧化应激的感受器[7-9]，在参与细胞抗氧化应激和外源性有毒物质诱导的主要防御机制中发挥重要的作用。Nrf2主要在核内通过抗氧化反应元件调控多种抗氧化基因的表达，包括谷氨酰半胱氨酸合成酶（γ-glutamyl cysteine synthetase,γ-GCS）[10]，进而增加抗氧化物质的生成，抑制肺纤维化的发生发展。

苦参碱（Matrine）是苦豆子、苦参、广豆根等豆科槐属植物中生物碱的主要成份，属四环的喹诺里西啶（quinolizidine）物质。苦参碱具有抗纤维化、抗病毒、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗风湿、抗心律失常等作用以及对中枢神经系统的镇静、镇痛解热降温作用和强心、降压、消肿利尿、免疫及生物反应调节等作用。

前期研究发现博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化存在氧化抗氧化失衡，苦参碱能抑制肺纤维化的发生与其抗氧化能力有关。

本课题旨在研究苦参碱对博来霉素诱导的肺纤维化大鼠模型肺组织中Nrf2及γ- GCS表达的影响，探讨其在肺纤维化治疗中的作用及可能机制，为肺纤维化临床治疗方法的改进提供理论依据。

**材料和方法**

**1****材料**

### **1.1** 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| DAB 显色试剂盒 | 武汉博士德生物工程有限公司 |
| 左旋精氨酸 | 美国 Sigma 公司 |
| 多聚赖氨酸 | 美国 Sigma 公司 |
| γ-GCS 抗体 | 美国 Santa Cruz 公司 |
| Nrf2 抗体 | 美国 Santa Cruz 公司 |
| Beta-actin 抗体 | 美国 Santa Cruz 公司 |
| 丙烯酰胺 | 上海生工生物工程有限公司 |
| N,-N,亚甲双丙烯酰胺 | 上海生工生物工程有限公司 |
| 过硫酸胺 | 上海生工生物工程有限公司 |
| EDTA | 上海生工生物工程有限公司 |
| PMSF | 上海生工生物工程有限公司 |
| DTT | 上海生工生物工程有限公司 |
| 溴酚蓝 | 上海生工生物工程有限公司 |
| 甘氨酸 | 北京华美生物工程有限公司 |
| Tris | 北京华美生物工程有限公司 |
| Western 显色 AB 液 | 美国 Santa Cruz 公司 |
| 考马斯亮蓝 | 南京建成生物工程有限公司 |
| Bradford 蛋白含量测定试剂 | 上海生工生物工程有限公司 |
| BlueRanger 预染蛋白分子量标准 | 英国纽英伦公司 |
| 羟脯氨酸试剂盒 | 南京建成生物工程公司 |

### **1.2** 主要仪器设备

|  |  |
| --- | --- |
| 5804 高速离心机 | 德国 Eppendorf 公司 |
| 去离子水纯化仪 | 德国 USF E1GA 公司 |
| YJ-875 医用净化工作台 | 苏州净化设备公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 倒置显微镜 | 日本 OLYMPUS 公司 |
| 光学显微镜 | 日本 OLYMPUS 公司 |
| Eppendorf 加样器 | 德国 Eppendorf 公司 |
| 轮转式切片机 | 德国来卡公司 |
| 组织阵列仪 | 美国 Beecher instruments 公司 |
| 组织包埋机 | 常州华利 ZMN-7803 |
| 去离子水制备机 | 德国 ELGA 公司 |
| FN202-2A 可调电热干燥箱 | 长沙仪表仪器厂 |
| 制冰机 | 上海基汇生物技术有限公司 |
| 耐高温塑料染色架 | 福州迈新生物技术开发有限公  司 |
| 微量移液器 | 德国 Eppendorf 公司 |
| HH-W21-600 恒温水浴箱 | 上海医用恒温设备厂 |
| TS-92 冷藏冰箱 | 河南新飞电器有限公司 |
| ULTRA-LOW－70℃冰箱 | 日本三洋公司 |
| SZ-93 双蒸水机 | 上海亚荣生化仪器厂 |
| 170-3935 Mini Trans-Blot Module | 美国 Bio-RAD 公司 |

### **1.3** 实验动物

清洁级健康SD雄性大鼠120只（由南华大学动物室提供）, 10周龄左右，体重200±13 g，喂养于南华大学动物室。

## **2** 方法

### **2.1** 大鼠肺纤维化模型的复制及分组

**2.1.1分组**

120只SD雄性大鼠按随机数字表法随机分成5组：对照组（A组）24只，实验模型组（B组）24只，泼尼松组（C组）24只，苦参碱50mg组（D组）24只和苦参碱200mg组（E组）24只。

**2.1.2造模**

第0d所有实验大鼠均用10%水合氯醛（3ml/kg）腹腔注射麻醉后，无菌手

术暴露气管。A组气管内注入生理盐水200μl；B、C、D、E四组气管内分别注入200μl含100μgBLM-A5（5mg/kg）的无菌生理盐水，按陈祥银等[11]报道的方法制备肺间质纤维化模型。

2.1.3给药方法

SD大鼠造模后第1d起，对照组及实验模型组经胃管注入生理盐水2ml，每天1次；泼尼松组经胃管注入醋酸泼尼松片0.56mg/kg体重（溶于2ml生理盐水），每天1次；苦参碱50mg组和苦参碱200mg组分别经胃管注入苦参碱50mg/kg体重、200mg/kg体重（溶于2ml生理盐水），每天1次。

### 2.2 标本处理

分别于气管内滴药后第7d，14d，28d处理，每批每组随机抽取8只，麻醉后：

（1）剖开腹腔，暴露腹主动脉，取腹主动脉血后处死；

（2）剖开胸腔及颈部，分离气管和肺脏，结扎后取出肺脏，洗去血渍，去除结缔组织，吸干水分；

（3）取右上叶置体积分数为100ml/l甲醛中固定1周，常规脱水、包埋、切片、脱蜡，行HE染色或Masson胶原染色后，脱水、封片、光学显微镜下观察并照相；

（4）余右肺组织置经DEPC水预处理后高温消毒的EP管中，以液氮罐迅速转移至-80℃冰箱保持。

## 3 结果获取

### 3.1 肺系数的计算

肺系数是反映肺重与体重之间关系的一个指标，计算方法为：肺系数=肺重

（mg）/体重（g）。

### 3.2 肺泡炎症、肺纤维化程度判断

右肺石蜡切片进行HE、Masson染色，在光学显微镜下观察肺组织病理学改变。参照Szapiel等[12]的方法用HE染色评定肺组织肺泡炎症程度( - ～+ + +)，

Masson染色评定肺组织纤维化程度( -～+++)。

### 3.3 羟脯氨酸含量

取右肺中叶，按羟脯氨酸测定试剂盒（EHSY西域提供）说明书进行操作，使用722光栅分光光度计测得各管光密度值，按照说明书上公式计算羟脯氨酸含量，单位采用μg/mg。

### 3.4 Nrf2和γ-GCS蛋白表达检测

3.4.1实验液的配制

1. PBS缓冲液：Nacl 8.0g, Kcl 0.20g, NaHPO4 0.20g混合后加入双蒸馏水

800ml，充分溶解，5%NaOH调节PH值为7.4，定容至100μmol/ml，高压消毒，

4℃保存。

2. 1.5mol/L Tris·Cl (pH8.8): 称Tris base 18.165g溶于50mL双蒸水中，调节

pH值至8.8，定溶至100mL，4℃保存备用。

3. 上样缓冲液：0.25%溴酚蓝0.25%二甲苯青FF 30%甘油6×缓冲液，4℃保存。

4. 1 mol/L Tris·Cl (pH6.8): 称Tris base 6.055g溶于30mL双蒸水中，调节

pH值至6.8，定溶至50mL，4℃保存备用。

5. 6%浓缩胶：1.4ml蒸馏水1.4ml+30%Acr-Bis 0.33+1M Tris 0.25+10%SDS

0.02+10%AP 0.02 +TEMED 0.002

6. 12%分离胶：0.7ml蒸馏水0.7ml+30%Acr-Bis 1.4+1M Tris 1.33+10%SDS

0.035+10%AP0.035+TEMED 0.014

7. 5×电泳buffer: 称Tris base 15.1g和甘氨酸94g溶于800mL双蒸水中，加入10％SDS 50mL，调节pH值至8.3，定溶至1000mL，常温保存。

8. 转移buffer: 称Tris base 5.8g、甘氨酸2.9g和SDS 0.37g溶于500 mL双蒸水中，加入甲醇200mL，定溶至1000mL，常温保存。

9. 10％SDS: 称SDS 10g溶于100mL双蒸水中，调节pH值至7.2，常温保存。

10. 电转液：Tris-base 3g, glycine 14.4g, 200ml甲醇/1L

11. 75%乙醇：用无水乙醇+DEPC水配，然后放-20℃保存

12. PBST: 1×PBS, Tween-20 0.01%~0.02%

13. DEPC水：吸出1ml放在1000ml双蒸水中配成1‰DEPC水，放在1000ml

容量瓶中静置4小时备用。

14. 封闭液：200ml PBST加入5%脱脂奶粉10G

15. 裂解液：Tris-Cl (pH7.4) 20mM, EDTA 1mM

3.4.2肺组织蛋白的提取

于-80℃冰箱组取出一管肺组织，将EP 管内的肺组织取出，置于处理过的

EP管内，用干净的剪刀将组织块尽量剪碎。加400μ裂解液裂（含PMSF）于

EP管进行匀浆。然后置于冰上。15分钟后再碾一会儿再置于冰上，要重复碾几次使组织尽量碾碎。裂解30 min后，即可用tip头将裂解液移至1.5ml离心管中，然后在4℃下12000rpm离心5min，取上清分装于0.5ml离心管中后加入5x蛋白上样液和DTT，混匀后，放入沸水中煮8分钟，取出冷却后放入-20℃保存。

3.4.3配胶

玻璃板洗净，用ddH2O冲洗，将与胶接触的一面向下倾斜置于干净的纸巾晾干。

于-4℃冰箱中取出6%分离胶和12%浓缩胶，室温平衡。

灌入2/3的分离胶后，先用ddH2O立即封胶，静止不动放置30MIN后，倒掉上层ddH2O。按6%浓度制作浓缩胶后，灌入玻璃板后立即插入梳子，放置0.5~1小时后，拔出梳子。随后用0.1%的SDS封胶。

3.4.4电泳

上样前将胶板下的气泡赶走。

所有蛋白样品点10ul后上样，样品两侧的泳道用等体积的1×loading buffer

上样，Marker也用1×loading buffer调整至与样品等体积。

以初始电压为80V时的电流强度进行电泳，时间15min，蛋白跑出6%浓缩胶，将电压改为120V时电泳，时间75min。

在目的蛋白泳动至距胶下缘1cm以上结束。

3.4.5转膜

电泳结束前20分钟左右戴上手套开始准备，将胶卸下，切除胶的上层胶以及分子量450以外的范围胶，剪PVDF膜，大小与胶的大小一致。转移缓冲液于器皿中，剪滤纸6张。将剪好的滤纸3张置于海面上，待排空气泡。将转移胶置于滤纸上，胶上盖PVDF膜，（PVDF膜剪去左上角标记）后在盖三层滤纸，待排空气泡后，最后盖海绵。将转移胶置于转移器皿中，灌转移液。开始转膜，电

压120 mA时间115min。

3.4.6封闭及杂交

封闭将膜从电转槽中取出，去离子水稍加漂洗，再用丽春红染色（2%乙酸，

0.5%丽春红的水溶液）观察蛋白条带，最后用去离子水将丽春红洗脱后封闭。结合一抗将PCDF放入放入已经做好的防弊口袋中，再加入如含一抗的释

稀液（不要留下气泡），室温下摇床3-4h。

洗涤一抗孵育结束后，用TTBS漂洗膜后在浸洗三次，每次15-20min。结合二抗含二抗的封闭液滴加于摇床的塑料膜上，将Western膜从封闭液

中取出，滤纸贴角稍吸干，正面朝下贴在二抗上（注意不要留下气泡），室温下轻摇孵育2小时。在反应体系外面罩一湿润平皿以防止液体过多蒸发。

洗涤二抗孵育结束后，用TTBS漂洗膜后在浸洗三次，每次15-20min。

3.4.7发光鉴定

根据HRP-ECL发光法进行操作：

将A、B发光液按比例稀释混合。膜用去离子水稍加漂洗，滤纸贴角吸干，反贴法覆于A、B混合液滴上，熄灯至可见淡绿色荧光条带（5min左右）后滤纸贴角吸干，置于保鲜膜内固定于片盒中，迅速盖上胶片，关闭胶盒，根据所见荧光强度曝光。取出胶片立即完全浸入显影液中1-2min，清水漂洗一下后放在定影液中至底片完全定影，清水冲净晾干，标定Marker。

3.4.8结果判断

蛋白相对表达强度的计算用薄层扫描仪（日本产，型号CS-930）对已显影的X光片进行扫描，用AlphaImager2200软件测定印迹区带的灰度值。以β-actin为内参照，统计数据以供分析。

蛋白表达强度=样品中目的蛋白灰度值/相应β-actin的灰度值。

### 3.5 Nrf2mRNA和γ-GCSmRNA表达检测

3.5.1肺组织mRNA的提取

整个过程需在冰上操作。

于-80℃冰箱组取出1管肺组织。

将EP管内的肺组织取出，置于处理过的EP管内。

用干净的剪刀将组织块尽量剪碎。加1ml Trizol液于EP管进行匀浆。颠倒

混匀10下后，室温放置5分钟。

加入氯仿0.2ml，混匀后室温放置5分钟。离心机调至4℃12000转。

离心15分钟后，使用400ul枪将上层水转至另外一个1.5mlEP管中，加等体积异丙醇400ul，室温混匀十分钟。

离心机调至4℃12000转。离心10分钟后.弃上清在室温干燥5分钟。然后将[RNA](http://www.5ibio.com/html/RNA/index.html)溶于水中-20℃冰箱冻存。

3.5.2琼脂糖凝胶的配制：

1.0%: 1.0g琼脂糖加入100ml电泳缓冲液中，微波炉中火30秒至沸腾，熔化的琼脂物冷却至60℃时加入10mg/ml溴化乙锭2.5μl，充分混匀，将温热的凝胶倒入已置好梳子的胶膜中，在室温下放置30-45min后进行电泳。

1.5%：步骤同上，将琼脂糖的量改为1.5g。

3.5.3 RT-PCR一步法

引物的合成由上海生工生物技术有限公司提供，引物序列、退火温度、产物长度、循环数见表1。

表1 各组靶基因引物序列、碱基数、退火温度和循环数

| 目标  基因 | 引物序列 (5'－3') | 产物长度  (bp) | 退火温度  (ºC) |
| --- | --- | --- | --- |
| 上游 | ATGATAGAACACGGGAGG |  |  |
| γ-GCS |  | 420 | 54.5 |
| 下游 | CAAATACCACATAGGCAG | A |  |
| 上游 | CCATTTACGGAGACCCAC |  |  |
| Nrf2 |  | 353 | 54 |
| 下游 | GGATTCACGCATAGGAGC |  |  |
| 上游 | CCTAAGGCCAACCGTGAA |  |  |
| β-actin |  | 635 | 55 |
| 下游 | CTAGGAGCCAGGGCAGTAATC | |  |

①将RNA引物，Dntp mix,10XRT-PCR Buffer, RNase-free ddH2O和5XRT-PCR enhancer放入离心机，后置于冰浴上。

②在冰浴下进行此操作

|  |  |
| --- | --- |
| 反应成分 | 体积/反应 |
| 10XPT-PCR Buffer | 5ul |
| DNTP Mixture(10Mm each) | 2ul |
| 5XRT-PCR enhancer | 10ul |
| RNasin(40u/ul) | 0.5ul |
| Hotmaster Taq polymerase(2.5U/ul) | 2.5ul |
| Quant RTase(for one stop) | 0.5ul |
| 上游特异性引物（10uM） | 3ul |
| 下游特异性引物（10uM） | 3ul |
| 肺组织 RNA | 2ul |
| RNasr-free ddH2O | 21.5ul |
| 总体系 | 50ul |

③启动PCR仪器直到温度上升至50℃时，将反应罐放入PCR仪器中。

④设置PCR反应条件

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 步骤 | 反应 | 时间 | 温度 |
| 1 | 反转录反应 | 30min | 50oC |
| 2 | RCR 初始变性 | 2min | 94oC |
| 3 | 变性 | 1min | 94oC |
| 4 | 退火 | 1min | γ-GCS 54.5oC |
|  |  |  | Nrf2 54oC |
|  |  |  | β-actin 55oC |
| 5 | 延伸 | 2min | 65oC |
| 6 | 从 3-5 步进行 35 个循环 | |  |
| 7 | 最终延伸 | 10min | 65oC |

3.5.4电泳

将10μl PCR产物，加已点在纸上的溴酸兰，反复吸打混匀后进行电泳，电流为

10mA，电源100V，电泳30分钟，紫外灯下观察。

3.5.5结果判断

电泳条带采用UVP型凝胶图像分析系统做积分吸光度测定和分析，以各组的基因与内内对照基因吸光度的比值来比较待测定的mRNA表达差异

mRNA表达强度=样品中目的mRNA吸光度密度值/相应β-actin mRNA的吸光度值。

## 4 统计学分析

计量资料采用均数±标准差表示（*x*±s）表示，用SPSS13.0统计软件进行统计分析，计量资料行方差齐性检验后，多组样本比较采用单因素方差分析，LSD法行两两比较；各指标间行直线相关性分析，*P*＜0.05认为差异有统计学意义。

结果

## 1 SD大鼠肺纤维化模型肺部的病理学变化

### 1.1 肺系数

正常对照组的肺系数，各时间段无明显变化。造模后，模型组肺系数明显增高，第14天达最高峰，各实验组在各时间段均较对照组增高，差异具有统计学意义（*P*＜0.05）；与实验模型组比较，泼尼松组及苦参碱50mg组均能降低肺系数（*P*＜0.05），且苦参碱200mg组更能降低肺系数（*P*＜0.01）（见表1）。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 表 1 各组大鼠不 | 时间点肺系数比较（ | *x* | ±s ，n=8） |
| 分组 | 7d | 14d |  | 28d |
| 对照组 | 10.80±0.65 | 11.16±0.85 |  | 10.94±0.81 |
| 实验模型组 | 14.16±1.48 a | 14.98±1.03 a |  | 13.94±1.14 a |
| 泼尼松组 | 13.08±0.92 ab | 13.76±0.66 ab |  | 12.86±0.96 ab |
| 苦参碱 50mg 组 | 13.0±0.66 ab | 13.58±1.16 ab |  | 13.1±0.73 ab |
| 苦参碱200mg 组 | 12.85±0.74 ac | 13.28±0.94 ac |  | 12. 03±0.86 ac |

同

注：a *P*＜0.05 与对照组比较；b*P*＜0.05, c*P*＜0.01与实验模型组比较。

### 1.2 肺组织病理学改变

光镜观察见图1，正常对照组：肺内结构清晰，无水肿及纤维化表现，少数大鼠肺组织可见轻度炎细胞浸润。实验模型组：各时期均表现有程度不等的肺泡炎，其中以14d最重，肺泡腔及肺间质内有大量炎性细胞浸润，以巨噬细胞、淋巴细胞浸润为主，肺组织明显充血、水肿，肺泡间隔增宽；造模各组7d未见明显纤维化表现，而于14d开始发生纤维化，28d呈中、重度肺纤维化改变，肺泡结构破坏或消失，少量炎症细胞浸润，肺组织以胶原沉积、肺纤维化改变为主

（见图1-2）。各治疗组肺泡炎及肺纤维化程度减轻，与模型组相比差异显著，而大剂量苦参碱组其肺泡炎及肺纤维化程度减轻更显著（*P*＜0.05）。各组大鼠肺泡炎分级见表2，纤维化分级见表3。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 7d | 14d | 28d |
| 对照组 |  |  |  |
| 实验模型组 |  |  |  |
| 泼尼松组 |  |  |  |
| 苦 参 碱50mg 组 |  |  |  |
| 苦参碱  200mg  组 |  |  |  |
|  | 图 1 右肺上叶组织 HE 染色×400 | |  |

|  |  |
| --- | --- |
| 对照组 | 模型对照组 |
| 泼尼松组 | 苦参碱 50mg 组 |
| 苦参碱 200mg 组 |  |

图2 各组大鼠肺组织28d Masson染色结果×40

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 表 2 各 | 组大鼠不同时间 | 肺泡炎评分比较（ | *x* | ±s ，n=8） |
| 分组 | 7d | 14d |  | 28d |
| 对照组 | 0.75±0.32 | 0.66±0.38 |  | 0.76±0.26 |
| 实验模型组 | 2.59±0.50 a | 3.02±0.76 a |  | 2.32±0.46 a |
| 泼尼松组 | 2.27±0.56 ab | 2.46±0.62 ab |  | 2.33±0.48 ab |
| 苦参碱 50mg 组 | 2.26±0.49 ab | 2.51±0.72 ab |  | 2.30±0.52 ab |
| 苦参碱200mg 组 | 2.18±0.54 ab | 2.39±0.59 ab |  | 2.15±0.60 ab |

点

注：a *P*＜0.05与对照组比较；b *P*＜0.05与实验模型组比较。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 表 3 各 | 组大鼠不同时间点 | 肺纤维化评分比较( | *x* | ±s ，n=8） |
| 分组 | 7d | 14d |  | 28d |
| 对照组 | 0.85±0.32 | 0.93±0.52 |  | 0.91±0.44 |
| 实验模型组 | 0.94±0.41 a | 1.63±0 .72 a |  | 2.89±0.61 a |
| 泼尼松组 | 0.74±0.38 ab | 1.50±0.57 ab |  | 1.91±0.52 ab |
| 苦参碱 50mg 组 | 0.80±0.46 ab | 1.47±0.63 ab |  | 1.87±0.48 ab |
| 苦参碱200mg 组 | 0.79±0.38 ab | 1.38±0.46 ab |  | 1.80±0.57 ab |

注：a *P*＜0.05与对照组比较；b *P*＜0.05与实验模型组比较。

## 2 羟脯氨酸含量

与对照组比较，模型组、泼尼松、苦参碱50mg组及苦参碱200mg组7d、

14d、28d时大鼠肺组织中HYP含量升高（*P*<0.05）,以28d时肺组织中HYP含量为最高。泼尼松、苦参碱50mg组及苦参碱200mg组较实验模型组低（*P*<0.01），其中苦参碱200mg组含量似较泼尼松组及苦参碱50mg组低，但差异无统计学意义，结果见表4。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 表 4 各组大 | 肺组织中肺组织 | 羟脯氨酸含量（*μ*g/mg， | *x* ±s ，n=8） |
| 分组 | 7d | 14d | 28d |
| 对照组 | 1.072±0.094 | 1.095±0.125 | 1.108±0.103 |
| 实验模型组 | 1.429±0.183 a | 2.458±0.241 a | 2.984±0.615 a |
| 泼尼松组 | 1.114±0.108 ab | 1.639±0.595 ab | 2.042±0.594 ab |
| 苦参碱 50mg 组 | 1.375±0.165 ab | 2.176±0.354 ab | 2.613±0.514 ab |
| 苦参碱 200mg 组 | 1.151±0.192 ab | 1.741±0.739 ab | 1.937±0.749 ab |

鼠

注：a *P*＜0.05与对照组比较；b *P*＜0.01与实验模型组比较；

## 3 肺组织中γ-GCSmRNA、Nrf2mRNA的表达

肺组织中γ-GCS mRNA**、**Nrf2 mRNA表达相对值各组间比较，在7d、14d、

28d三个时间段，B、C、D、E组γ-GCS mRNA、Nrf2 mRNA表达均高于A 组

（*P*＜0.05）；其中C、D、E组高于B组（*P*＜0.05）。

各组肺组织中γ-GCS mRNA、Nrf2 mRNA表达相对值，各组内不同时间段间比较，A组在不同时间段比较，无显著性差异；B、C、D、E组γ-GCS mRNA、

Nrf2mRNA表达以7d较高，28d较低，但仍高于对照组，有随时间下降趋势（见表5、6，图3、4、5）。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 表 5 肺组 | 织中 γ-GCS mRN | A 表达组间比较( | *x* | ±s ，n=8） |
| 分组 | 7d | 14d |  | 28d |
| 对照组（A 组） | 0.640±0. 060 | 0.642±0.073 |  | 0.626±0.048 |
| 实验模型组（B 组） | 1.304±0.128 a | 1.130±0.127 a |  | 0.819±0.137 a |
| 泼尼松组（C 组） | 1.454±0.133 ab | 1.331±0. 105 ab |  | 0.965±0.105 ab |
| 苦参碱 50mg 组（D 组） | 1.468±0.136 ab | 1.330±0.095 ab |  | 1.012±0.140 ab |
| 苦参碱200mg 组（E 组） | 1.520±0.119 ab | 1.351±0.140 ab |  | 0.994±0.146 ab |

注：a *P*＜0.05与对照组比较；b *P*＜0.05与实验模型组比较。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 表 6 肺组 | 织中 Nrf2mRNA | 表达组间比较( | *x* | ±s ，n=8） |
| 分组 | 7d | 14d |  | 28d |
| 对照组（A 组） | 0.589±0.054 | 0.610±0.032 |  | 0.599±0.056 |
| 实验模型组（B 组） | 1.311±0.089 a | 1.154±0.113 a |  | 1.007±0.065 a |
| 泼尼松组（C 组） | 1.515±0.086 ab | 1.357±0.119 ab |  | 1.190±0.082 ab |
| 苦参碱 50mg 组（D 组） | 1.433±0.109 ab | 1.337±0.110 ab |  | 1.190±0.076 ab |
| 苦参碱 200mg 组（E 组） | 1.521±0.101 ab | 1.402±0.148 ab |  | 1.179±0.113 ab |

注：a *P*＜0.05与对照组比较；b *P*＜0.05与实验模型组比较。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| M 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| β-Actin 635bp | | | | |
| γ-GCS  420bp | | | | |
| Nrf2 353bp | | | | |
| 图 3 Nrf2、γ-GCSmRNA 在各组肺组织中的表达（RT-PCR，7d）  M: Marker ；1. 对照组；2. 实验模型组；3.泼尼松组；4.苦参碱 50mg 组；  5.苦参碱 200mg 组。 | | | | |



|  |
| --- |
|  |
| 图 4 Nrf2mRNA 各组内时间段间比较 |

|  |
| --- |
|  |
| 图 5 γ-GCSmRNA 各组内时间段间比较 |

## 4 肺组织中γ-GCS、Nrf2蛋白的表达

肺组织中γ-GCS**、**Nrf2蛋白表达相对值，各组间比较，在7d、14d、28d三个时间段，B、C、D、E组肺组织中γ-GCS、Nrf2蛋白表达均高于A组（*P*＜0.05）；其中C、D、E组高于B组（*P*＜0.05）

各组肺组织中γ-GCS、Nrf2表达相对值，各组内不同时间段间比较，A组在不同时间段比较，无显著性差异；B、C、D、E组γ-GCS、Nrf2表达以7d较高，

28d较低，但仍高于对照组，有随时间下降趋势（表7、8, 图6、7、8）。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 表 7 肺组织 | 中 γ-GCS 蛋白表 | 达组间比较（ x ±s | ，n=8） |
| 分组 | 7d | 14d | 28d |
| 对照组（A 组） | 0.445±0.055 | 0.435±0.079 | 0.432±0.050 |
| 实验模型组（B 组） | 1.230±0.085 a | 1.057±0.101 a | 0.975±0.121 a |
| 泼尼松组（C 组） | 1.393±0.101 ab | 1.119±0.102 ab | 1.066±0.104 ab |
| 苦参碱 50mg 组（D 组） | 1.400±0.114 ab | 1.247±0.174 ab | 1.120±0.118 ab |
| 苦参碱 200mg 组（E 组） | 1.356±0.147 ab | 1.230±0.092 ab | 1.150±0.115 ab |

注：a *P*＜0.05与对照组比较；b *P*＜0.05与实验模型组比较；

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 表 8 各组肺 | 组织 Nrf2 蛋白表 | 达组间比较（ x ±s | ，n=8） |
| 分组 | 7d | 14d | 28d |
| 对照组（A 组） | 1.213±0.131 | 1.165±0.072 | 1.184±0.096 |
| 实验模型组（B 组） | 1.855±0.068 a | 1.619±0.115 a | 1.452±0.132 a |
| 泼尼松组（C 组） | 1.985±0.176 ab | 1.828±0.127 ab | 1.601±0.119 ab |
| 苦参碱 50mg 组（D 组） | 1.994±0.096 ab | 1.832±0.115 ab | 1.614±0.108 ab |
| 苦参碱 200mg 组（E 组） | 1.988±0.141 ab | 1.823±0.117 ab | 1.582±0.123 ab |

注：a *P*＜0.05与对照组比较；b*P*＜0.05与实验模型组比较。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| β-Actin (42KD) |  | | | | |
| γ-GCS  （73KD） |  | | | | |
| Nrf2 (57KD) |  | | | | |
| 图 6 Nrf2、γ-GCS 蛋白在各组肺组织中的表达（WB 法，28d）  1. 实验模型组；2. 对照组；3.泼尼松组；4.苦参碱 50mg 组；5.苦参碱  200mg 组。 | | | | | |

|  |
| --- |
|  |
| 图 7 Nrf2 蛋白表达各组内时间段间比较 |

|  |
| --- |
|  |
| 图 8 γ-GCS 蛋白表达各组内时间段间比较 |

## 5 Nrf2表达与γ-GCS表达相关性分析

Nrf2蛋白表达与γ-GCS蛋白表达呈正相关，*r*为0.769（*P*＜0.05）（表9）。表9 Nrf2蛋白表达与γ-GCS蛋白表达相关性分析

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  | VAR00001 | VAR00002 |
| VAR00001 | Pearson Correlation | 1 | .769(\*\*) |
|  | Sig. (2-tailed) | . | .000 |
|  | N | 120 | 120 |
| VAR00002 | Pearson Correlation | .769(\*\*) | 1 |
|  | Sig. (2-tailed) | .000 | . |
|  | N | 120 | 120 |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

讨论

1肺纤维化大鼠肺组织病理学评价

虽然引起肺纤维化的病因多种多样，但其病理过程、病理特征都极其相似，表现为肺组织的炎性损伤、组织结构破坏以及随后肺间质细胞积聚的组织修复过程；病理特点为肺泡上皮的损伤和成纤维细胞增殖，细胞外基质过度沉积，肺间质的广泛纤维化。

博莱霉素是从轮生链球菌中提取出的一组多肽类抗肿瘤抗生素，大量临床和动物实验均已证明其可引起肺纤维化，虽然博来霉素诱导的肺纤维化与机体的特发性肺纤维化在许多方面存在不同[13]，但是，在肺泡上皮损伤、炎性细胞渗出、成纤维细胞增生、活化及胶原沉积等生理学和病理组织学与人类纤维化肺部疾病相似[14]，被视为诱导肺纤维化实验模型的经典方法，现被广泛用于肺纤维化动物实验[15]。机制为博莱霉素在氧分子和亚铁离子存在下，可产生ROS，引起脂质过氧化，导致细胞损伤，引起肺纤维化。在本实验中，使用博来霉素气管注射法复制肺纤维化大鼠模型，造模后7d时以肺泡炎为主要表现，出现大量炎性细胞浸润，肺泡间隔增厚，成纤维细胞开始增多；14d时肺泡炎仍较重，纤维组织进一步增加；而28d时肺泡炎症较前减轻，主要表现为肺纤维化程度加重，部分肺泡腔消失，为大量胶原纤维、成纤维细胞、淋巴细胞所占据，符合肺纤维化的病理过程及特点，说明肺纤维化模型复制成功。C组、D组、E组炎症反应及纤维化程度低于B组，说明泼尼松和苦参碱能减轻博来霉素所致的大鼠肺纤维化；而E组肺泡炎及肺纤维化评分低于C、D组，但差异无统计学意义，提示苦参碱的抗氧化、抗纤维化作用可能具有剂量依赖性，但仍需进一步研究。

2 Nrf2、γ-GCS的表达与肺纤维化

氧化/抗氧化失衡在肺纤维化发病机制中发挥重要作用。正常情况下，肺部可产生不少氧自由基（oxygen free radical, OFR），但由于肺部含有超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）和谷胱甘肽转移酶等OFR清除酶或清除剂，能及时清除多余的OFR，不致对肺组织产生损害。一旦机体遭受感染、创伤、中毒、休克等因素的作用，OFR产生大大增多，而相应酶的功能相对降低或活性受抑，或其它非酶抗氧化物质减少，导致

平衡失调，OFR相对或绝对过剩，攻击周围组织、细胞。

OFR可能通过以下几种途径导致肺纤维化：

（1）脂质过氧化损伤：氧自由基可直接与脂类反应，夺取一个氢原子形成脂基团，在有氧情况下引发脂质过氧化连锁反应，产生过氧基和脂质过氧化物。脂质过氧化导致脂肪酸链断裂，影响膜的流动性，增加膜的通透性，灭活膜受体及相关酶类从而影响膜功能；它还可以增加花生四烯酸代谢合成物，如血栓素、前列腺素E、白三烯C4而参与炎症过程。

（2）蛋白质损伤：氧自由基与蛋白质中的甲硫氨酸、半胱氨酸、酪氨酸等残基直接发生反应，破坏蛋白质一级结构，使蛋白质功能受损和酶失活，引起肺结构改变。

（3）DNA损伤：超氧阴离子及过氧化氢与NDA链中糖-磷酸盐反应，使

DNA链断裂，并将双螺旋中的碱基暴露，直接损伤肺组织的DNA最终导致细胞死亡。

（4）改变信号传导通路：自由基除直接损伤组织结构和生物大分子外，还以第二信使的作用参与细胞信号转导机制的调节，可直接或间接造成各种促纤维化因子产生、刺激成纤维细胞的分裂增殖，造成细胞外基质的生成和降解失衡，导致肺纤维化的发生和发展。

研究发现博来霉素诱导的肺纤维化大鼠模型体内OFR产生大大增多，提高内源性抗氧化酶的表达，补充抗氧化物质能抑制肺纤维化的进展[16]。体内抗氧化机制有利于宿主减轻氧化应激性损伤[17]，抗氧化系统功能下降和氧化剂的增多是肺纤维化发病中的重要机制[18-21]。内源性抗氧化酶，转录和表达水平反应了机体的抗氧化能力[22-25]。

γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶（γ-glutamylcysteine synthetase, γ-GCS）作为一种非常重要的抗氧化酶，是谷胱甘肽（glutathione, GSH）合成反应的限速酶。GSH可起到抗氧化、抑制炎症发展、降低气道高反应性、调节免疫、抑制气道重塑等作用[26, 27]。而γ-GCS表达与GSH水平高度相关，γ-GCS表达能够代表宿主体内抗氧化能力[22, 23]。

Nrf2（NF-E2 related factor 2）属CNC转录因子家族成员，是外源性有毒物质和氧化应激的感受器，在参与细胞抗氧化应激和外源性有毒物质诱导的主要防

御机制中发挥重要的作用。国外研究发现，在Nrf2基因敲除的大鼠，与Nrf2基因正常组对照组比较，造模后其肺纤维化程度更明显，而内源性抗氧化酶及抗氧化物质水平显著减低，提示Nrf2能通过调控内源性抗氧化酶的表达而发挥氧化及纤维化作用。

Nrf2主要通过抗氧化反应元件调控多种抗氧化基因的表达，进而增加抗氧化物质的生成，抑制肺纤维化的发生发展。Nrf2大部分在胞浆中与Keap1蛋白

[28-30(]

Kelch-like ECH-associated protein 1，Keap1）结合形成异二聚体方式存在。

当暴露于氧化应激[31]和亲电子物质时，氧化应激产物亲电子物质和ROS与Keap1连接区的半胱氨酸巯基反应，C273和C288半胱氨酸残基参与依赖Keap1的Nrf2泛素化，能使Nrf2与Keap1解离，引起Keap1的构象变化，Keap1从Keap1- Nrf2的复合物中解离出来后[32]，通过细胞外信号通道途径蛋白激酶C（Protein Kinase

C，PKC）、磷脂酰肌醇(-3)激酶（phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K）和/或丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPk）途径，致使Nrf2磷酸化[33]，Nrf2从Keap1-Nrf2的复合物中解离而转位到核内[34-38]调节ARE活性[39-42]. 在核内调控诱导包括谷氨酰半胱氨酸合成酶（γ-glutamyl cysteine synthetase, γ-GCS），苯醌还原酶（quinone reductase, NQO1)，谷胱甘肽S-转移酶( glutathione S-transferase, GST), UDP-葡萄糖苷酸转移酶（UDP-

glucuronosyltransferases，UGT)，环氧化物水解酶（epoxide hydrolase）, 血红素加氧酶-1等抗氧化酶的表达[43, 44]。

本试验研究结果显示，在博来霉素诱导的肺纤维化模型中，Nrf2及γ-GCS在模型组表达较空白组增高，模型组Nrf2及γ-GCS的变化趋势为第7d最高，其后逐步回落，28d表达最低峰，但仍高于空白对照组。干预组的变化趋势与模型组变化一致，但干预组Nrf2及γ-GCS的表达明显高于模型组和空白对照组。主要机制可能为，大鼠气管内注入博来霉素后，7d处于炎症及氧化应激高峰期，氧化应激产物亲电子物质和ROS达高峰，与Nrf2-Keap1异二聚体Keap1连接区的半胱氨酸巯基反应能力强，诱导更高水平Nrf2的表达，以产生下游γ-GCS等抗氧化物质来对抗炎症反应，从而保护机体免受损伤。而7d后，随着博来霉素致氧自由基生成能力的下降，以及内源性抗氧化物质的产生增加，氧化应激产物亲电子物质和ROS渐减少，与Nrf2-Keap1异二聚体Keap1连接区的半胱氨酸巯

基反应能力下降，Nrf-2表达水平回落；在28d时，肺纤维化已经基本形成，此时肺组织内氧化应激产物亲电子物质和ROS进一步减少，但仍较正常时高，同时表现为Nrf-2表达水平回落，但仍高于正常；可以通过Nrf-2表达水平的上调，调控以γ-GCS为代表的多种内源性抗氧化酶的表达，而对抗氧化损伤。干预组

Nrf2及γ-GCS表达趋势与模型组变化趋势一致，但其表达明显高于空白对照组和模型组。表明苦参碱可通过提高抗氧化转录因子Nrf2及其靶基因之一的γ-GCS表达从而保护肺组织，减轻肺纤维化程度，但具体途径不明。

3细胞外基质与肺纤维化

肺组织的细胞外基质与肺纤维化关系最为密切[45, 46]。致病因素首先造成肺组织损伤，诱发肺泡上皮正常重构失败，成纤维母细胞和肌成纤维细胞持续增殖，细胞外基质成分过度沉积，最后导致肺结构破坏，而发生呼吸衰竭[47]。细胞外基质与炎症也有密切关系[48]。因此研究细胞外基质形成对于认识肺纤维化形成对于肺纤维化的发病机制及防治具有重要意义。

肺组织ECM主要包括胶原、弹性蛋白、粘连糖蛋白和蛋白多糖等，占整个肺干重的25%，其中60%～70%为胶原，这些成分相互混合交织，使肺间质组织成为一个整体并具有一定的硬度和韧性，藉以完成相应的生理功能[49, 50]。肺内有5种胶原成分，即Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ型胶原，在纤维化肺组织内，沉积的主要是

Ⅰ、Ⅲ型胶原。而胶原蛋白是由3条不同或相同的肽链构成的三螺旋结构，富含脯氨酸、羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸。羟脯氨酸(HYP)是机体胶原蛋白的主要成分之一，为胶原蛋白所特有，可作为衡量胶原组织代谢的重要指标。肺纤维化时，肺组织内胶原纤维量增加，因此测定肺组织羟脯氨酸含量可以反映肺组织胶原蛋白及细胞外基质的含量，以此作为肺纤维化的指标，可以判断纤维化程度。许多中药复方、单味药及单味药提取物均可降低肺纤维化动物模型及肺纤维化病人HYP的含量，减轻肺纤维化。

4苦参碱抗肺纤维化的作用机制

目前对肺纤维化的治疗仅限于非特异性抗炎、免疫抑制剂及糖皮质激素等，疗效尚不理想且副作用多。人们热衷于寻找新的抗纤维化药物在肺纤维化早期进行干预，改善疾病的预后。因此，寻找更安全、有效的药物治疗该病是目前研究的热点。

苦参碱（Matrine）是苦豆子、苦参、广豆根等豆科槐属植物中生物碱的主要成份，属四环的喹诺里西啶生物。它的化学分子式为C15H24N2O ，分子量为

248.36，是苦参型生物碱的主要活性成分。近年来对苦参碱的药理和临床研究中，发现其具有抗纤维化、抗病毒、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗风湿、抗心律失常等作用以及对中枢神经系统的镇静、镇痛解热降温作用和强心、降压、消肿利尿、免疫及生物反应调节作用等[51, 52]，其中研究尤为较多的是其抗炎以及抗成纤维细胞增殖作用。

有研究显示，苦参碱对多种急性渗出性炎症有明显的对抗作用，且与氢化可的松作用相似，不同之处在于苦参碱对慢性炎症无明显对抗作用，其抗炎作用与垂体-肾上腺素系统无关，而是具有非甾体类抗炎药的特性，并对红细胞膜有一定的稳定作用。另一项研究指出，苦参碱也能有效对抗眼部炎症，但它并不显著抑制PG的产生及白细胞趋向性，说明它可能是一个弱的抗炎药，或者代表一类抑制炎症但不影响花生四烯链的全新抗炎药。研究表明，苦参碱与氢化可的松相似，肌肉注射都能明显对抗巴豆油诱发小鼠和大鼠耳壳炎症，长期给药时其作用随剂量增加而增加；在分析苦参碱抗炎作用机理时发现，它对垂体-肾上腺系统无明显影响。

本实验研究表明在应用博来霉素后肺组织中HYP明显升高，表明胶原合成大于分解，细胞外基质成分上调。肺纤维化大鼠予以苦参碱后，HYP的含量可以明显降低，其中高剂量组效果较为明显，与模型组相比(*p*<0.01)，因而提示苦参碱通过影响细胞外基质的合成而治疗肺纤维化是其防治肺纤维化的机制之一。

本研究发现予以苦参碱干预后，肺组织中Nrf2、γ-GCSmRNA及蛋白表达较造模对照组显著增高，γ-GCS的表达与Nrf2呈正相关，体外研究发现γ-GCS的表达受Nrf2调控，提示苦参碱能通过促进内源性抗氧化酶的表达发挥抗氧化、抗纤维化作用；而通过诱导Nrf2的表达，进而调控内源性抗氧化酶表达，可能是苦参碱抗氧化、抗纤维化的作用机制之一，但具体苦参碱是通过什么途径诱导

Nrf2的表达，目前仍不清楚，需要进一步研究。

结论

1.苦参碱可抑制博来霉素诱导的大鼠肺纤维化；

2.苦参碱抑制肺纤维化的可能机制是：苦参碱通过调控Nrf2的表达，间接调控内源性抗氧化酶γ-GCS，从而抑制肺泡炎和肺纤维化的形成。

参考文献

[1] Stern JB, Herv Mal, Groussard O, et al. Prognosis of patients with advanced idiopathic pulmonary requiring mechanical ventilation for acute respiratory failure[J]. Chest, 2001, 120: 213-219.

[2] Blivet S, Philit F, Sab JM, et al. Outcome of patients with idiopathic pulmonary fibrosis admitted to the ICU for respiratory failure[J]. Chest, 2001, 120: 209-212.

[3] Walters DM, Cho HY, Kleeberger SR. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for nrf2[J]. Antioxid Redox Signal, 2008, 10(2): 321-332.

[4] Liu R, Ahmed KM, Nantajit D, et al. Therapeutic effects of alpha-lipoic acid on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Int J Mol Med, 2007, 19(6): 865-873.

[5] Lisa G, Wood, Dominic A, et al. Oxidative Stress in Cystic Fibrosis: Dietary and Metabolic Factors[J]. Am. Coll. Nutr, 2001, 20: 157 - 165.

[6] Demedts M, Behr J, Buhl R, et al. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. N Engl J Med, 2005, 353(21): 2229-2242.

[7] 张秀峰. 核因子相关因子2 的调控与支气管哮喘. 国际呼吸杂志, 2007, 27(11): 818-821.

[8] Vuokko L, Kinnula, Cheryl L, et al. Oxidative Stress in Pulmonary Fibrosis: A Possible Role for Redox Modulatory Therapy[J]. Am. J. Respir. Crit. Care Med, 2005, 172: 417 - 422.

[9] Cho HY, Reddy SP, Yamamoto M, et al. The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis[J]. FASEB J 2004, 18: 1258–1260.

[10] Dhakshinamoorthy S, Jain AK, Bloom DA, et al. Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE) - mediated NAD(P) H: quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants[J]. Biol Chem, 2005, 280(17): 16891–16900.

[11] 陈祥银, 严仪昭, 曾卫东, 等. 丹参川芎嗪及糖皮质激素对肺纤维化保护作

用的实验观察.中华结核和呼吸杂志, 1987, 10: 152-154.

[12] Pacht ER, DeMichele SJ, Nelson JL, et al. Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants reduces alveolar inflammatory mediators and protein influx in patients with acute respiratory distress syndrome[J]. Crit Care Med, 2003; 31(2): 491-500.

[13] Chua F, Gauldie J, Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: searching for model answers[J]. AmJ Respir Cell Mol Biol, 2005, 33(1): 9–13. 6891-16900.

[14] Gong P, Hu B, Stewart D, et al. Cobalt induces heme oxygenase-1 expression by a hypoxia-inducible factor2 independent mechanism in Chinese hamster ovary cells regulation by Nrf2 and MafG transcription factors [J ]. Biol Chem, 2001, 276(29): 27018 - 27025.

[15] Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, et al. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis[J]. Int J Exp Path, 2002, 83(3): 111-119.

[16] Nelson JL, DeMichele SJ, Pacht ER, et al. Effect of enteralfeeding with eicosapentaenoic acid, gammalinolenic acid, and antioxidants on antioxidant status in patients with acutere spiratory distress syndrome[J]. PEN J Parenter Enteral Nut r, 2003, 27 (2): 982104.

[17] Guo RF, Ward PA. Role of oxidants in lung injury during sepsis[J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(11): 1991-2002

[18] Tim D. Oury, Kailas Thakker, Margaret Menache, et, al. Attenuation of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis by a Catalytic Antioxidant Metalloporphyrin[J]. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol, 2001, 25: 164.

[19] LAtzori, F Chua, S E Dunsmore, et al. Attenuation of bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice using the heme oxygenase inhibitor Zn- deuteroporphyrin IX-2, 4-bisethylene glycol[J]. Thorax, 2004, 59: 217 - 223.

[20] Yuben Moodley, Daniel Atienza, Ursula Manuelpillai, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Reduce Fibrosis of Bleomycin-Induced Lung Injury[J]. Am. J. Pathol., 2009, 175: 303 - 313.

[21] Hidekata Yasuoka, Zhihong Zhou, Joseph M, et al. Insulin-Like Growth Factor-

Binding Protein-5 Induces Pulmonary Fibrosis and Triggers Mononuclear Cellular Infiltration[J]. Am. J. Pathol., 2006,169: 1633 - 1642.

[22] 朱运福, 戴爱国, 胡瑞成. 丝裂原活化蛋白激酶与核因子E-2相关因子调节 γ谷氨酰半胱氨酸合成酶在豚鼠支气管哮喘中的作用. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(10): 709-711.

[23] 曹守冬, 戴爱国, 易光辉, et al. 支气管哮喘豚鼠肺内γ谷氨酰半胱氨酸合成酶重链表达调控和泼尼松对其的影响. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(4). 277.

[24] 林书典, 戴爱国, 徐平. 慢性阻塞性肺疾病患者γ 谷氨酰半胱氨酸合成酶活性及表达的变化. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(2): 97-101.

[25] Reddy NM, Kleeberger SR, Cho HY, et al. Deficiency in Nrf2-GSH signaling impairs type II cell growth and enhances sensitivity to oxidants[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 37(1): 3-8

[26] 朱运福, 戴爱国, 胡瑞成. 谷胱甘肽与支气管哮喘. 国外医学呼吸系统分册, 2005, 25(9): 679-681.

[27] 江刚, 戴爱国, 胡瑞成. 香烟烟雾对大鼠气道上皮细胞γ 谷氨酰半胱氨酸合成酶表达的调控作用. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(9): 710-712.

[28] Yamamoto T, Suzuki T, Kobayashi A, et al. Physiological Significance of Reactive Cysteine Residues of Keap1 in Determining Nrf2 Activity[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(8): 2758-70.

[29] Kobayashi M, Itoh K, Suzuki T, et al. Identification of the interactive interface and phylogenic conservation of the Nrf2-Keap1 system[J]. Genes Cells, 2002, 7(8): 807-820.

[30] Rachakonda G, Xiong Y, Sekhar KR, et al. Covalent Modification at Cys151 Dissociates the Electrophile Sensor Keap1 from the Ubiquitin Ligase CUL3[J]. Chem Res Toxicol, 2008, 21(3): 705-10.

[31] Pi J, Zhang Q, Woods CG, et al. Activation of Nrf2-mediated oxidative stress response in macrophages by hypochlorous acid[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 226(3): 236-243.

[32] Buckley BJ, Li S, Whorton AR. Keap1 modification and nuclear accumulation in

Response to S-nitrosocysteine[J]. Free Radic Biol Med, 2008, 44(4): 692-698.

[33] Apopa PL, He X, Ma Q. Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells[J]. Biochem Mol Toxicol, 2008, 22(1): 63-76.

[34] Yueh MF, Tukey RH. Nrf2-Keap1 signaling pathway regulates human UGT1A1 expression in vitro and in transgenic UGT1 mice[J]. Biol Chem, 2007, 282(12): 8749-8758.

[35] Yates MS, Kensler TW. Chemopreventive promise of targeting the Nrf2 pathway[J]. Drug News Perspect, 2007, 20(2): 109-117.

[36] Theodore M, Kawai Y, Yang J, et al. Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2[J]. Biol Chem, 2008, 283(14): 8984-94.

[37] Cho JM, Manandhar S, Lee HR, et al. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: Implication to cancer cell resistance[J]. Cancer Lett, 2008, 260(1-2): 96-108.

[38] Walters DM, Cho HY, Kleeberger SR. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for nrf2[J]. Antioxid Redox Signal, 2008, 10(2): 321-332.

[39] 申严, 戴爱国. 丝裂原活化蛋白激酶与γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶在大鼠慢性阻塞性肺疾病中的表达. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(4): 276-277.

[40] Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription[J]. Biol Chem, 2002, 277(45): 42769-42774.

[41] Yamasaki C, Tashiro S, Nishito Y, et al. Dynamic cytoplasmic anchoring of the transcription factor Bach1 by intracellular hyaluronic acid binding protein IHABP[J]. Bio chem (Tokyo), 2005, 137(3): 287-296

[42] Purdom-Dickinson SE, Sheveleva EV, Sun H, et al. Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants[J]. Mol Pharmacol, 2007, 72(4): 1074-1081.

[43] Dhakshinamoorthy S, Jain AK, Bloom DA, et al. Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE) - mediated NAD(P) H: quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants[J]. Biol Chem, 2005, 280(17): 16891-16900.

[44] Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, et al. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray[J]. Cancer Res, 2002, 62(18): 5196-5203.

[45] Nagao T, Nagai S, Hiramoto Y. et at. Serial evaluation of high-resolution computed tomorgraphy findings in patients with idiopathic pulmonary dibrosis in usual interstitial pneumonia[J]. Respiration. 2002, 69(5): 413

[46] Donald N, Cook. David M, Brass. et al. A Matrix for New Ideas in Pulmonary Fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol. 2002, 27: 122.

[47] White E S, Lazar M H, Thannickal V J. pathogenetic mechanisms in usual inter stitialpneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis[J]. J Pathol. 2003, 201(3): 343.

[48] Piguet P F. Inflammation in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Crn Care Med. 2003, 167(7): 1037.

[49] Nagao T, Nagai S, HiramotoY. et al. Serial evaluation of high-resolution computed tomograpby findings in patients with idiopathic pulmonary fibrosis in usual interstitial pneumonia[J]. Respirabon. 2002, 69(5): 413.

[50] Donald N, Cook. David M, Brass, et al. A Matrix for New Ideas in Pulmonar. Fibrosis[J] J Respir Cell Alol Bio1. 2002, 27: 122.

[51] Yang Li, Baohua Wang, Chenghui Zhou, et al. Matrine induces apoptosis in angiotensin II-stimulated hyperplasia of cardiac fibroblasts: effects on Bcl-2/Bax expression and caspase-3 activation[J]. FASEB J, 2007; 21: A973.

[52] Guanghua Gao, Francis C. P. Law. Physiologically Based Pharmacokinetics of Matrine in the Rat after Oral Administration of Pure Chemical and ACAPHA[J]. Drug Metab. Dispos, 2009, 37: 884 - 891.

硕士期间撰写论文

1．苦参碱对肺纤维化大鼠肺组织病理变化的影响. 航空航天医 药

2010.11:1961-1963

2．内源性抗氧化酶在肺纤维化发病中的作用. 国际内科学杂志， （已投稿）

3．血红素加氧酶-1在肺纤维化发病中的作用的调控与支气管哮喘..临床肺科杂志（已投稿）

4. 支气管哮喘豚鼠肺组织中蛋白酪氨酸激酶JAK1及白细胞介素-4的表达实用医学杂志2008.08 第一作者

**综述**

**氧化应激及Nrf2在肺纤维化中的作用**

罗卿综述梁晓秋审校

**摘要：**肺纤维化是许多肺间质疾病的共同结局，发病机制尚未完全明确，氧化/抗氧化失衡是重要机制之一。纠正氧化/抗氧化失衡能缓解肺纤维化程度；氧化应激感受器红系衍生核因子相关因子-2能通过调节体内抗氧化物质的生成，而改善肺纤维化。

关键词：肺纤维化； 氧化应激； 氧自由基； Nrf2

肺纤维化（pulmonary fibrosis, PF）是许多肺间质疾病的共同结局，发病机制尚未完全明确，临床缺乏特异的治疗药物[1]。既往一直认为PF是一种炎性疾病，治疗以糖皮质激素和细胞毒类药物为主，但疗效甚微，PF确诊后平均存活期为2年，5年生存率为30%一50%[2]。近年研究发现，在肺纤维化动物模型及患者，氧化应激水平明显增高，补充抗氧化物质GSH、N-乙酰半胱氨酸能减轻肺纤维化水平，提示氧化/抗氧化失衡可能在肺纤维化发病机制中发挥重要作用

[3-6]，为肺纤维化的抗氧化治疗提供了理论依据。

红系衍生核因子相关因子-2（Nuclear factor–E2 related factor 2, Nrf2）是外源性有毒物质和氧化应激的感受器[7-9]，在参与细胞抗氧化应激和外源性有毒物质诱导的主要防御机制中发挥重要的作用。Nrf2主要在核内通过抗氧化反应元件调控多种抗氧化基因的表达，包括谷氨酰半胱氨酸合成酶（γ-glutamyl cysteine synthetase,γ-GCS）[10]，进而增加抗氧化物质的生成，抑制肺纤维化的发生发展。

本文试就氧化/抗氧化失衡及Nrf2在肺纤维化发病中的作用做一综述。

1氧化/抗氧化失衡与肺纤维化

正常情况下，肺部可产生不少氧自由基（oxygen f ree radical, OFR），但由于肺部含有超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）和谷胱甘肽转移酶等OFR清除酶或清除剂，能及时清除多余的OFR ，氧化物质与抗氧化物质处于动态平衡，不致对肺组织产生损害。

**1.1常见氧化物质**

肺组织暴露在较高的氧分压环境下，外源性氧化剂和空气污染物增加氧化剂的产生并激活炎症细胞产生自由基。自由基是指外层轨道上有未配对电子的原子、分子离子或基团。由氧衍生的自由基称为氧自由基（oxyge free radicals, OFR），占人体内总自由基的95%以上，对人体造成直接或间接伤害的也主要是氧自由基，氧自由基通常包括超氧离子自由基（02-）、羟自由基（-OH）和过氧化氢（H2O2）。其中以羟自由基（-OH）损伤力最强。

**（1）羟基自由基**

羟基自由基（又称氢氧自由基，可表示为-OH、HO- 、-HO 或OH），是已知氧化性最强和毒性最大的氧自由基，其氧化性比高锰酸钾和重铬酸钾还强，它几乎可以和所有细胞成分发生反应，对机体危害极大；但它的作用半径小，仅能和它的邻近分子反应。

**（2）超氧化物阴离子自由基**

超氧化物阴离子自由基（Superoxide Anion Radical），或简称为超氧化物自由基（Superoxide radical），它是生物体生成的第一个氧自由基，是所有氧自由基的前身，H2O 2能与另一分子的超氧化物阴离子自由基在铁离子或铁的复合物催化下，生成氧化性更强的羟基自由基。还可作用于其周围的生物大分子，发生连锁反应，使自由基反应蔓延下去，产生许多其它自由基，如脂类自由基、脂类过氧自由基、嘧啶自由基、嘌呤自由基等，因此它具有特别重要的意义。02-的毒性是机体发生氧中毒的主要原因，由它引起的损伤主要表现在使核酸链断裂、多糖解聚和不饱和脂肪酸过氧化，进而造成膜损伤、线粒体氧化磷酸化作用的改变及其他一系列的变化。

**（3）NO自由基**

NO自由基也是倍受关注的自由基之一，NO自由基具有多方面的重要作用。NO是内皮细胞松弛因子，能够松弛血管平滑肌，防止血小板凝聚，是神经传导的逆信使，在学习和记忆过程中发挥着重要作用；研究表明白细胞，特别是巨噬细胞在吞噬异物或受到外界刺激时，不但产生活性氧自由基，同时还释放大量NO自由基来杀伤入侵的微生物和肿瘤细胞；NO也可损伤正常细胞，在心肌和脑组织缺血再灌注损伤过程中起着重要作用。

**（4）过氧化氢（H2O2）**

过氧化氢（H2O2），即人们熟知的双氧水。H2O2可穿透大部分细胞膜，因此比超氧阴离子自由基（不能穿透细胞膜）具有更强的细胞毒性，穿透细胞膜后可与细胞内的铁发生反应生成羟基自由基。

**（5）单线态氧（1O2）**

单线态氧((1O2)是氧气的激发态，虽不是自由基，但由于没有自旋限制，因而具有极强的反应性。

**（6）脂质过氧化物（Lipid Peroxide, LPO）**

LPO指脂类中的不饱和脂肪酸与自由基发生的过氧化过程中生成烷氧自由基（RO-）、过氧自由基（ROO-）、有机氢过氧化物（ROOH）和激发态羰基（RO\*）等产物的总称。

**（7）除此以外，还有烷氧基（RO-）、烷过氧基（ROO-）等。**

**1.2常见抗氧化物质**

能够与自由基结合，并消除自由基活性的物质称“抗氧化剂”，这其中包括一些人体必须的营养物质，如维生素A、C及E等，另外一些不是人体必备的物质，如生物类黄酮和花色素等；大体可以分为7类：

（1）小分子量的抗氧化剂（如谷胱甘肽，维生素，尿酸）；

（2）粘蛋白；

（3）金属结合蛋白（转铁蛋白，乳铁蛋白，金属硫蛋白等）

（4）超氧化物歧化酶SODs:例如：线粒体锰超氧化物歧化酶（歧化酶），细胞内铜锌超氧化物歧化酶（超氧化物歧化酶），与细胞外超氧化物歧化酶

（ECSOD）；

（5）一组分解过氧化氢酶（许多谷胱甘肽相关酶和过氧化氢）；

（6）解毒酶系统（例如：谷胱甘肽- S -转移酶）；

（7）其他监管巯基氧化还原蛋白（如硫, peroxiredoxin系统和glutaredoxins）。

**1.3氧化损伤机制**

一旦机体遭受感染、创伤、中毒、休克等因素的作用，OFR产生大大增多，而相应酶的功能相对降低或活性受抑，或其它非酶抗氧化物质减少，导致平衡失

调，OFR相对或绝对过剩，攻击周围组织、细胞。OFR可能通过以下几种途径导致肺纤维化：（1）脂质过氧化损伤：氧自由基可直接与脂类反应，夺取一个氢原子形成脂基团，在有氧情况下引发脂质过氧化连锁反应，产生过氧基和脂质过氧化物。脂质过氧化导致脂肪酸链断裂，影响膜的流动性，增加膜的通透性，灭活膜受体及相关酶类从而影响膜功能；它还可以增加花生四烯酸代谢合成物，如血栓素、前列腺素E、白三烯C4而参与炎症过程。（2）蛋白质损伤：氧自由基与蛋白质中的甲硫氨酸、半胱氨酸、酪氨酸等残基直接发生反应，破坏蛋白质一级结构，使蛋白质功能受损和酶失活，引起肺结构改变；（3）DNA损伤：超氧阴离子及过氧化氢与NDA链中糖-磷酸盐反应，使DNA链断裂，并将双螺旋中的碱基暴露，直接损伤肺组织的DNA最终导致细胞死亡。（4）改变信号传导通路：自由基除直接损伤组织结构和生物大分子外，还以第二信使的作用参与细胞信号转导机制的调节，可直接或间接造成各种促纤维化因子产生、刺激成纤维细胞的分裂增殖，造成细胞外基质的生成和降解失衡，导致肺纤维化的发生和发展。

**1.5 氧化/抗氧化失衡与肺纤维化**

1987年cantin[3]等首次发表了关于肺纤维化中氧化应激的研究报告，结果证实特发性肺纤维化（IPF）患者的支气管肺泡中炎性细胞释放H2O2能力明显增加，并且在支气管肺泡灌洗液（BALF）中检测到髓过氧化物酶（MPO）水平的升高。这个研究结果提示在IPF中存在氧化应激和呼吸爆发，因而促使许多学者开始探索肺纤维化患者体内的氧化损伤。此后clement[4]等、struaszJ[5]等均发现了类似现象。在肺纤维化动物模型中，氧化应激水平明显增高，血浆中抗氧化物明显减少，提示氧化/抗氧化失衡可能在肺纤维化发病机制中发挥重要作用[6-8].

Demedts[9]等研究发现在强的松加硫唑嘌呤的基础上加用大剂量抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸比单纯标准治疗方案更能够保存特发性肺间质纤维化患者的肺活量和

DLco。提示氧化应激在肺纤维化发病机制中占有重要地位，抗氧化治疗在肺纤维化的治疗研究中具有广阔前景。

氧化/抗氧化失衡在肺纤维化发病机制中发挥重要作用。研究发现博来霉素诱导的肺纤维化大鼠模型体内OFR产生大大增多，提高内源性抗氧化酶的表达，补充抗氧化物质能抑制肺纤维化的进展[10-15]。体内抗氧化机制有利于宿主减轻氧化应激性损伤[16]，抗氧化系统功能下降和氧化剂的增多是肺纤维化发病中的重

要机制[17-20]。研究发现Nrf2能调控多种内源性抗氧化酶的表达。

**2 Nrf2**

**2.1 Nrf2简介**

红系衍生核因子相关因子-2（NF-E2 related factor 2, Nrf2）是外源性有毒物质和氧化应激的感受器[ 21-23]，在参与细胞抗氧化应激和外源性有毒物质诱导的主要防御机制中发挥重要的作用。

Nrf2是亮氨酸拉链转录蛋白，可以通过活化ARE而启动多种抗氧化反应和解毒基因。氧化应激通过抑制E3泛素化连接酶的活化激活Nrf2，结果上调了

Nrf2的表达水平并且激活了依赖Nrf2基因的转录。Kelch样ECH结合蛋白 1

（Kelch-like ECH associating protein 1, Keap 1）是Nrf2的重要受体，Keap 1中的核输出序列（nuclear export sequence, NES）是终止Nrf2的抗氧化反应元件（ARE）的必须部分，生理状态下, Nrf2与Keap 1相结合，处于被抑制状态；当受到氧化应激信号刺激后，Nrf2迅速与Keap 1解耦连，与小Maf蛋白形成异二聚物，而增加抗氧化反应元件（ARE）介导的靶基因表达[24, 25]，从而调控许多抗氧化基因的表达，包括苯鲲还原酶1（NQO1），谷胱甘肽-S-转移酶（GST），谷氨酰半胱氨酸合成酶（γ-glutamyl cysteine synthetase,γ-GCS），UDP-葡萄糖苷酸转移酶

（UDP-glucuronosyltransferases, UGT），环氧化物水解酶（epoxide hydrolase）等[26]。内皮细胞中的Nrf-2可以通过oxPAPC诱导谷氨酸半胱氨酸连接酶的修饰亚单位（glutamate2cysteine ligase modifier subunit, GCLM）和NAD（P）H氧化还原酶21的生成[27]。由此可对抗促氧化剂的氧化作用。Nrf2也可促进亚铁血红素的分解，亚铁血红素分解可以消耗氧自由基，其分解产物铁蛋白、胆红素等物质在氧化应激中也起细胞保护的作用。

**2.2 Nrf2与肺纤维化**

Nrf2与多种纤维化疾病相关。相关研究表明Nrf2缺乏可导致抗氧化酶的减少，造成小鼠模型对多种肺病易感。在实验中，缺少Nrf2可以使肺上皮细胞增殖不良，并且对氧化剂所造成的细胞死亡更加敏感。缺乏Nrf2所造成的病理改变可由补充谷胱甘肽（glutathione, GSH）所对抗。同时补充GSH也可以抑制Nrf2缺乏所造成的炎症因子的基因表达[28] 。Nrf2保护肺免受纤维化的机制可能是通

过提高细胞内的抗氧化能力实现的。Nrf2缺失可以使ARE敏感的抗氧化酶水平下调，也可以增加博来霉素所引起肺纤维化的严重程度[29, 30] 。

3展望

氧化应激在肺纤维化发生发展过程中发挥重要作用，纠正氧化/抗氧化失衡能减轻肺纤维化；研究肺纤维化时氧化应激发生的机制，以及研究抗氧化失衡的调节途径，可以为纤维化的治疗提供新的理论依据，提供更有效的治疗手段。

Nrf2，作为重要的氧化应激感受器，预计在肺纤维化的防治中，发挥至关重要的作用。

参考文献

[1] Antoniou KM, Pataka A, Bouros D, et al. Pathogenetic pathways and novel pharmaco therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2007, 20(5): 453-461.

[2] American Thoracic Society. ATS/ERS intemational consensus Classification of idiopathic interstitical Pneumonias[J]. Am J Respir Crit Care Med. 2002 165(2): 277-304.

[3] AM Cantin, R Boileau, and R Begin Increased procollagen III aminoterminal peptide-related antigens and fibroblast growth signals in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am Rev Respir Dis, 1988, 137(3): 572-8.

[4] A Clement, K Chadelat, J Masliah, et al. A controlled study of oxygen metabolite release by alveolar macrophages from children with interstitial lung disease[J]. Am Rev Respir Dis, 1987, 136(6): 1424-8.

[5] J Strausz, J Muller-Quernheim, H Steppling, et al. Oxygen radical production by alveolar inflammatory cells in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am Rev Respir Dis, 1990, 141(1): 124-8.

[6] Walters DM, Cho HY, Kleeberger SR. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: apotential role for nrf2[J]. Antioxid Redox Signal, 2008, 10(2): 321-332.

[7] Liu R, Ahmed KM, Nantajit D, et al. Therapeutic effects of alpha-lipoic acid on

Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Int J Mol Med, 2007, 19(6): 865-873.

[8] Lisa G. Wood, Dominic A. et al. Oxidative Stress in Cystic Fibrosis: Dietary and Metabolic Factors[J]. Am. Coll. Nutr. 2001; 20: 157 - 165.

[9] Demedts M, Behr J, Buhl R, et al. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. N Engl J Med, 2005, 353(21): 2229-2242

[10] Dhakshinamoorthy S, Jain AK, Bloom DA, et al. Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE) - mediated NAD(P) H: quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants[J]. Biol Chem, 2005, 280(17): 16891–16900.

[11] Pacht ER, DeMichele SJ, Nelson JL, et al. Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants reduces alveolar inflammatory mediators and protein influx in patients with acute respiratory distress syndrome [J]. Crit Care Med, 2003, 31(2): 491-500.

[12] Szapiel S V, Els on N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin2induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J ]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120 (4): 8932899.

[13] Chua F, Gauldie J, Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: searching for model answers [J]. AmJ Respir Cell Mol Biol, 2005, 33(1): 9–13. 6891-16900.

[14] Gong P, Hu B, Stewart D, et al. Cobalt induces heme oxygenase21 expression by a hypoxia-inducible factor2 independent mechanism in Chinese hamster ovary cells regulation by Nrf2 and MafG transcription factors [J]. Biol Chem, 2001, 276(29): 27018 - 27025.

[15] Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, et al． Time course of bleomycin-inducedlung fibrosis[J]. Int J Exp Path, 2002, 83(3): 111-119.

[16] Nelson JL, DeMichele SJ, Pacht ER, et al. Effect of enteralfeeding wit h eicosapentaenoic acid, gamma2linolenic acid, andantioxidant s on antioxidant status in patient s with acuterespiratory distress syndrome[J]. PEN J Parenter Enteral Nut r, 2003, 27 (2): 982104.

[17] Guo RF, Ward PA. Role of oxidants in lung injury during sepsis[J]. Antioxid

Redox Signal, 2007, 9(11): 1991-2002

[18] Tim D. Oury, Kailas Thakker, Margaret Menache, et, al. Attenuation of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis by a Catalytic Antioxidant Metalloporphyrin[J]. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol, 2001, 25: 164.

[19] LAtzori, F Chua, S E Dunsmore, et al. Attenuation of bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice using the hemeoxygenase inhibitor Zn- deuteroporphyrin IX-2, 4-bisethylene glycol[J]. Thorax, 2004, 59: 217 - 223.

[20] Yuben Moodley, Daniel Atienza, Ursula Manuelpillai, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Reduce Fibrosis of Bleomycin-Induced Lung Injury[J]. Am. J. Pathol., 2009, 175: 303 - 313.

[21] 曹守冬, 戴爱国, 易光辉, et al. 支气管哮喘豚鼠肺内γ谷氨酰半胱氨酸合成

酶重链表达调控和泼尼松对其的影响. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(4).

277.

[22] Vuokko L. Kinnula, Cheryl L, et al. Oxidative Stress in Pulmonary Fibrosis A Possible Role for Redox Modulatory Therapy[J]. Am. J. Respir. Crit. Care Med, 2005, 172: 417- 422.

[23] Cho HY, Reddy SP, Yamamoto M, et al. The transcription Factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis[J]. FASEB J 2004, 18: 1258–1260.

[24] Tomita M, Okuyama T, Katsuyama H, et al. Gene expression in rat lungs during early response to paraquat-induced oxidative stress[J]. Int J Mol Med, 2006, 17(1): 37-44.

[25] Theodore M, Kawai Y, Yang J, et al. Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2[J]. Biol Chem, 2008, 283(14): 8984-8994.

[26] Dhakshinamoorthy S, Jain AK, Bloom DA, et al. Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE) - mediated NAD(P) H: quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants[J]. Biol Chem, 2005, 280(17): 16891-16900.

[27] J yrkkanen HK, Kansanen E, Inkala M, et al. Nrf2 regulates antioxidant gene expression evoked by oxidized phospholipids in endot helial cells and murine

Arteries in vivo[J]. Circ Res, 2008, 103 (1): e1 - 9.

[28] Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, et al. Functional polymorphisms in t he t ranscription factor NRF-2 in humans increase the risk of acute lung injury[J]. FA SEB J, 2007, 21 (9): 2237 - 2246.

[29] Hye2Youn Cho, Sekhar P M Reddy, Masayuki Yamamoto, et al. The transcription factor NRF2 protect s against pulmonary fibrosis[J]. FASEB J, 2004, 18 (11): 1258 - 1260.

[30] Yueh MF, Tukey RH. Nrf2-Keap1 signaling pathway regulates human UGT1A1 expression in vitro and in transgenic UGT1 mice[J]. Biol Chem, 2007, 282(12): 8749-8758

致**谢**

本论文是在导师梁晓秋教授的悉心指导下完成的。导师渊博的专业知识，严谨的治学态度，精益求精的工作作风，诲人不倦的高尚师德，严以律己、宽以待人的崇高风范，朴实无华、平易近人的人格魅力对我影响深远。不仅使我树立了远大的学术目标、掌握了基本的研究方法，还使我明白了许多待人接物与为人处世的道理。本论文从选题到完成，每一步都是在导师的指导下完成的，倾注了导师大量的心血。在此，谨向导师表示崇高的敬意和衷心的感谢！

感谢南华大学病理学教研室和附二医院呼吸内科全体老师对我学习、工作及科研给予的大力支持和帮助。

在此，我还要特别感谢我的父母及家人对我的关爱、理解和支持，使我顺利完成三年的学习。

深深感谢每一位曾经帮助和关心过我的老师、同学、朋友，我衷心地祝福你们健康、幸福、快乐！