

内质网应激与相关肺疾病

高楚楚 卢红艳

内质网应激是细胞的一种重要自我防御机制,而强烈持久的内质网应激可导致细胞凋亡。肺泡Ⅱ型上皮细胞含有丰富的内质网,具有发生内质网应激的条件和基础,许多肺部疾病如间质性肺疾病、慢性阻塞性肺疾病、肺癌、高氧肺损伤等的发生均与内质网应激有关。内质网应激可能是研究肺部疾病发病机制和防治措施的新靶点。

一、内质网应激概述

内质网是分泌性蛋白折叠、修饰和钙贮存的主要场所,它在维持细胞稳态中起关键作用。多种因素如氧化应激、热休克、缺血、感染等作用于细胞后均可引起内质网的内稳态失衡,导致蛋白加工/运输障碍以及钙离子摄取/释放障碍,从而引起内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)。ERS主要激活细胞内3条信号通路:即未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)、折叠蛋白超负荷反应和固醇调节级联反应。其中UPR是目前研究最为深入的ERS激活通路。哺乳动物细胞内有3种感受ERS的UPR信号元件,分别是PKR样ER调节激酶(PERK)、I型内质网跨膜蛋白激酶(IRE1)及活化转录因子6(ATF6)。在非应激状态,内质网内的伴侣分子GRP78/Bip与3者结合封闭其信号;应激时,GRP78/Bip从3种感受器元件上解离并与错折叠蛋白结合阻止其输出,导致3种感受器游离激活启动UPR。PERK激活使真核细胞翻译起始因子2(eIF2 α)磷酸化失活,使之无法进行翻译起始,从而抑制大多数蛋白质的翻译生成,阻止新生蛋白持续进入内质网。另一方面,磷酸化eIF2 α 可增加ATF4转录合成,ERS过度激活时,ATF4高表达将导致凋亡信号分子CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)表达上调,诱导细胞凋亡。IRE1活化后剪切X盒结合蛋白1(XBP1)前体mRNA使之翻译出活性XBP1,进而激活内质网应激反应元件(ER stress response ele-

ment, ERSE),上调分子伴侣转录水平,促进蛋白质正确折叠,同时促进未折叠蛋白转运至胞质内进行内质网相关蛋白降解过程^[1]。IRE1通路过度激活同样能引起细胞凋亡,一方面,通过TRAF2-ASK1-JNK途径激活JNK,诱导细胞凋亡;另一方面,直接或间接激活凋亡因子caspase-12,并进一步级联激活caspase-9及caspase-3,从而诱导细胞凋亡^[2]。ATF6与GRP78/Bip解离后转移至高尔基体,被鞘氨醇-1-磷酸(S1P)和鞘氨醇-2-磷酸(S2P)切割激活后进入细胞核启动ERSE基因表达。此外,ATF6还能与IRE-1共同作用诱导XBP1mRNA的增加,共同增强蛋白质折叠和相关蛋白降解能力^[3]。ATF6过表达亦会诱导CHOP大量转录激活,引起细胞凋亡。

二、肺泡上皮细胞ERS的生物学效应

1. ERS与肺泡上皮细胞凋亡:肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cells, AECs)的一个重要特征就是富含高度发达的内质网,以合成分泌大量肺泡表面活性蛋白(surfactant proteins, SPs),对ERS极为敏感。众多研究表明,ERS过强过久,可通过激活下游相关信号转导通路,导致AECs发生凋亡。应激条件下,内质网内Ca²⁺向胞质释放,激活钙蛋白酶,进而活化caspase家族,产生caspase级联反应。caspase-3是执行凋亡过程的最终效应子,它的活化可直接导致细胞凋亡发生,因此caspase-3的激活可作为鉴别AECs凋亡发生的一个重要标志。Xu等^[4]发现,新生鼠高氧暴露后,AECs中BiP/GRP78和caspase-3表达显著升高,提示ERS参与并介导AECs凋亡。ERS时,ATF4高表达可导致CHOP表达上调,而高表达的CHOP可通过下调抗凋亡基因Bcl-2的表达,减少细胞内谷胱甘肽量及增加活性氧产物而阻滞细胞分裂周期诱导细胞凋亡。Mulugeta等^[5,6]研究发现,BiP/GRP78、ATF-4、CHOP等ERS相关信号蛋白表达增高,参与AECs凋亡发生过程,同时认为caspase-4(人类的caspase-4和啮齿类动物的caspase-12同源性最高)起了中介信号的作用激活caspase-3,最终诱导细胞凋亡。另外,JNK通过活化Bim(Bcl-2家族中的促凋亡因子),抑制抗凋亡蛋白Bcl-2,从

作者单位:212001 镇江,江苏大学附属医院儿科

通讯作者:卢红艳,主任医师,硕士生导师,电子信箱:lh5154@

163.com

而介导线粒体途径的细胞凋亡。胡兰等^[7]在高氧诱导的肺应激性损伤研究中发现, JNK 信号转导通路参与了高氧下 AECs 凋亡的信号转导, 发挥促细胞凋亡效应; 阻断或抑制 JNK 信号通路, 可改善肺组织病理损伤, 减少 AECs 凋亡。

2. ERS 与肺泡上皮细胞上皮-间质转化: 上皮细胞-间质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 是指完全分化的上皮细胞通过细胞表型改变从而转化成完全分化的间质细胞的过程, 通常转化为成纤维细胞与肌纤维母细胞^[8]。哺乳动物 AECs 主要由肺泡 I 型上皮细胞 (AEC I) 和肺泡 AEC II 型上皮细胞 (AEC II) 组成, 共同维持细胞的正常结构。其中 AEC II 是肺内主要干细胞, 生理条件下, 既可通过有丝分裂自我更新, 也可转分化为 AEC I 参与肺损伤后的早期修复过程; 慢性肺损伤时, 在致病因素持续作用下, AEC II 不断增殖并且向 AEC I 转分化失去调控, 进而引起细胞过度增殖肥大, 产生细胞因子、炎症趋化因子、细胞黏附分子等, 与此同时, 该过程也可伴随脂成纤维细胞向肌成纤维细胞的转分化, 进一步诱导形成肺纤维化^[9]。AEC II 具有惊人的表型可塑性, 在某些特定条件下 (例如: 损伤), AEC II 向 AEC I 转化受抑, AEC II 也可通过 EMT 过程转变成成纤维细胞和肌纤维母细胞^[10]。

目前, 对于肺泡上皮细胞-间质转化的机制尚未明确。有实验发现 TGF- β_1 能在体外诱导 AECs 向间质细胞转变, 其机制部分与 Smad 信号转导途径相关^[11]。近来, Tanjore 等^[12]用衣霉素和变异的 SP-C 诱导 AECs 发生 ERS, 显示上皮细胞标志物 E 钙黏蛋白、ZO-1 等表达量降低, 而间质标志物 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 等表达量升高, 同时通过 siRNA 转染使 Smad2 与 Src 激酶基因沉默抑制 EMT, 发现 AECs 保留其上皮表型及上皮细胞标志, 认为 Smad 和 Src 激酶可能是介导 ERS 时 EMT 的信号蛋白。Zong 等^[13]用肺上皮 A549 细胞转染突变体 SP-C ^{Δ exon4}诱导肺纤维化模型, 发现 ERS 标志物 GPP78 表达升高, 也发现类似的 EMT 标志物表达量变化, 认为 ERS 诱导了 AECs 发生 EMT, 并提示肺纤维化时, ERS 对成纤维细胞增多起重要作用, 且至少有 Src 依赖的信号途径参与了该过程。

3. ERS 与肺泡上皮细胞前炎症信号: 越来越多的证据表明 ERS 与炎症反应存在密切联系, 目前认为其分子基础主要涉及两种机制, 即核转录因子 NF- κ B 和活化细胞内蛋白激酶 JNK 的激活。ERS 时, 活化的 IRE1 可募集肿瘤坏死因子受体相关因子 2

(TRAF2) 形成 IRE1-TRAF2 复合体, 一方面可进一步结合并激活 JNK, 进而磷酸化激活转录因子激活蛋白 1 (activator protein 1, AP1), 诱导前炎症因子的基因表达^[14]; 另一方面可招募 I κ B 并使其降解释放出 NF- κ B, NF- κ B 离开膜表面进入细胞核内直接调控细胞活动, 可诱导 TNF- α 等炎症介质释放^[15]。PERK 通路激活也可导致 NF- κ B 的活化, 由于 I κ B 的半衰期显著小于 NF- κ B, ERS 活化的 PERK-eIF2 α 介导的翻译抑制作用增加了 NF- κ B/I κ B 的比值, 释放了“多余”的 NF- κ B 入核, 从而启动前炎症因子的基因转录^[16]。内质网蛋白质折叠负荷超过自身处理能力时, 发生 ERS 引起 UPR, 由各信号通路直接启动炎症反应。Maguire 等发现, 通过肺上皮 A549 细胞转染 SP-C 突变体可引起多种 UPR 相关基因表达上调, 活化 JNK/AP-1 信号, 并增加 IL-8 等前炎症细胞因子的分泌, 说明 SP-C 突变后错折叠可诱导 ERS 促进上皮细胞前炎症信号。

三、ERS 相关肺疾病

1. 间质性肺疾病: 间质性肺疾病 (interstitial lung disease, ILD) 是一组表现为不同程度的肺泡炎和间质发生纤维化病变的肺功能紊乱疾病, 包括特发性肺纤维化 (IPF)、间质性肺炎等。研究提示 ERS 可能在肺纤维化时肺组织上皮修复机制中起关键作用。Horowitz 等发现, IPF 患者肺匀浆和 AECs 中的 ERS 介导者 ATF-6、ATF-4 等以及凋亡介导者 CHOP 的蛋白水平、活化的 XBP-1 转录水平明显增高, 并在肺中检测到 CHOP 下游的应激关键促凋亡分子 Bax 低聚物和应激凋亡标志物 caspase-3 的活性剪切体的存在。因此, 在散发的 IPF 患者的 AEC II 中, 严重的 ERS 反应可能是该细胞类型发生凋亡和纤维化的基础。进一步研究提示 SP-B 和 SP-C 缺陷与 ILD 的发生发展关系密切, 儿童及成人 ILD 患者的发病多数与 SP-C 编码基因发生突变有关, SP-C ^{Δ exon4} 点突变进而引起 SP-C 错折叠蛋白蓄积于内质网可启动 ERS 级联反应, 激活 UPR, 同时应激凋亡标志物 caspase-12 和 caspase-4 表达增加。

2. 慢性阻塞性肺疾病: 慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 的发病机制尚未明确, 目前公认吸烟是 COPD 最重要的致病因素。ERS 诱导 AECs 凋亡机制可能参与了 COPD 发病的病理生理过程。香烟烟雾中的氧化性物质可引起肺细胞发生 ERS, 过度 ERS 则诱导肺细胞发生凋亡, 从而促进 COPD 的发生发展。Kelsen 等通过蛋白质组学研究发现慢性吸烟者肺内 GRP78、钙网蛋白、蛋白质

二硫键异构酶等 ERS 及 UPR 相关标志蛋白表达上调,提示 COPD 患者肺内确实存在 ERS。Tagawa 等发现吸烟可引起小鼠肺内 Bip 和 CHOP 表达上调,认为存在 ERS 相关细胞凋亡。在吸烟诱导的 COPD 大鼠模型,肺泡上皮细胞内质网应激相关蛋白 GRP78 及凋亡基因 caspase - 12 表达增加,提示吸烟诱导的 COPD 中,肺泡上皮细胞发生了内质网应激诱导性凋亡。这些结果提示 ERS 确实能影响 COPD 的发生发展。

3. 肺癌:ERS 可能在肺癌发生发展过程中起关键作用, Kim 等发现 ERS 标志蛋白 GRP78、CHOP 和自噬蛋白 Beclin - 1 在肺癌中的激活现象与临床病理因素以及患者存活情况有关,鉴于 GRP78、CHOP 和 Beclin - 1 可能在肺部肿瘤发生发展过程中起重要作用,认为这些蛋白可成为非小细胞型肺癌患者病情转归的一项新预后指标。Dehydrocostuslactone (DHE) 是一种倍半萜烯内酯,它可通过 ERS 介导的细胞凋亡对非小细胞型肺癌发挥抑制作用,这主要依赖 DHE 作用后可引起一系列 ERS 标志物的上调,包括胞质钙水平的上调、IRE - 1 及 CHOP/GADD153 的增高、PERK 的磷酸化、XBP - 1 mRNA 的拼接、caspase - 4 的激活等。对人肺癌 A549 细胞的研究证实 astersaponin 1 同样可使 ERS 经典标志物表达上调,包括 GRP78、GRP94、CHOP、caspase - 4 和 JNK 等,进而介导肿瘤细胞发生凋亡,这为肺癌治疗提供新思路和相关依据。

4. 高氧肺损伤:长期吸入高浓度氧可引起急慢性肺损伤,研究发现,氧化应激过程中产生的大量 ROS 是引起内质网中蛋白质错折叠和 ERS 诱发凋亡的一个重要原因,提示持续性高氧暴露引起的氧化应激可导致 ERS,导致肺损伤。肺损伤包括肺泡结构破坏、通透性增高及纤维化病变,由于 AEC II 是肺损伤时的关键修复细胞,ERS 介导的 AEC II 存活及凋亡变化可能参与高氧肺损伤的发展和转归。Jennifer 等发现高氧导致 ERS 引起细胞凋亡并不依赖于 BiP,但能够使细胞对错折叠蛋白的毒性敏感,并产生大量 ROS,该过程可增强 UPR,说明高氧在肺疾病治疗中引起肺损伤的过程可能与 ERS 相关。虽然诸多实验表明高氧并不激活 UPR 感受器 IRE1、PERK、ATF6,但肺损伤的发生与 ERS 诱导细胞凋亡通路密切相关。Xu 等研究发现 ERp57 的过表达促进 AECs 凋亡,而敲除 ERp57 则可通过抑制 caspase - 3 通路及上调 BiP/GRP78 表达从而减少高氧暴露引起的细胞凋亡。有研究发现在高氧诱导的肺损伤中,JNK 信号转导通路被激活,并参与了高氧下 AEC II 凋亡的信

号转导,发挥促炎症和细胞凋亡效应;阻断或抑制 JNK 信号通路,可减少高氧暴露下肺组织的炎性渗出及 AEC II 凋亡,对高氧肺损伤可能起保护作用^[7]。支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是发生于早产儿长期应用高浓度氧和机械通气后的一种以肺部出现炎症和纤维化为主要特征的慢性肺损伤疾病,因此阐明 ERS 与高氧肺损伤的关系,可能对防治 BPD 发生具有重要指导意义。

四、ERS 与肺部疾病治疗

由于 ERS 参与了一系列肺部相关疾病的发生发展过程,以 ERS 为靶向的药物研发具有广阔的应用前景。通过药物如牛磺酸、丹芍化纤胶囊等下调 ERS 发生标志物如 GRP78、XBP - 1、ATF4 及 ERS 相关凋亡蛋白家族成员 CHOP、JNK、Bcl - 2 等基因的表达,可减轻 ERS 反应并调控细胞凋亡,抑制肺部炎症及肺纤维化,减轻肺损伤。干扰 UPR 激活或改变内质网伴侣蛋白 GRP78/Bip 表达水平,可阻遏在体肿瘤生长,为肺癌的治疗提供新思路,例如 astersaponin 1 可通过上调 ERS 标志分子 GRP78、CHOP、caspase - 4 和 JNK 的表达从而发挥对肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用,提示其可能会成为治疗肺癌的一种新型药物。另外,ERS 的发生与错折叠蛋白的聚集密切相关,暗示通过合理应用蛋白酶体激动剂有利于促进 AECs 内错折叠蛋白 SP - C 的降解,减少其分泌合成,有可能成为治疗肺部疾病的一个潜在途径。

五、展 望

随着实验的深入,ERS 与阿尔茨海默病、糖尿病、心血管疾病等发病机制的关系已日渐明朗,但现今对 ERS 参与肺部疾病病理生理过程的研究仍非常少。目前认为,ERS 作为一把双刃剑,可介导 AECs 的适应性存活与凋亡,对肺部疾病的发生发展起重要作用,但其具体机制尚未阐明,这些空白将吸引更多的科研人员致力于该领域的研究,为相关肺疾病的临床治疗提供科学依据。如探讨 SP - C 异常与 ERS 发生的关系,研究 SP - C 突变后错折叠对 AECs 增殖、分化及凋亡的影响,并从 UPR 及影响 UPS 活性角度阐明其损伤机制,都将进一步深化对相关肺疾病发病分子机制的认识并为其治疗提供明确的分子靶标。

参考文献

- 1 林琳,周俊英. 内质网应激与酒精性肝病[J]. 国际内科学杂志, 2009, 36(9): 532 - 535
- 2 Glembofski CC. Endoplasmic reticulum stress in the heart[J]. Circ Res, 2007, 101(10): 975 - 984
- 3 王晨东,白洁. 内质网应激与帕金森病[J]. 生命科学, 2010, 22(4): 326 - 330

(下转第 155 页)

差异,并通过血压和波形来评估动态改变,自动校准血管顺应性和阻力。SV 和 SVV 每 20s 监测 1 次,为临床提供了即时的信息。研究结果显示 SVV 的诊断阈值为 9.8%,灵敏度为 91.7%,特异度为 83.3%(表 2),与文献报道结果一致^[3~5]。PPV 由 Philips Intellivue MP70 自动化分析采集获得,对预测冠脉搭桥患者开胸前的液体治疗有很大的价值,其阈值范围是 10%~12%,但 Derichard 等报道称 PPV 预测阈值范围为 13%对指导患者的容量治疗依然有很高的敏感度,而本研究的 PPV 诊断阈值结果为 11.8%,灵敏度为 86.7%,特异度为 85.3%,与文献研究结果基本一致,但与 Derichard 等结果相差较大,可能原因是病例选择差异造成^[6,7]。理论上,SV 的变化会引起脉压相应的改变,因为液体治疗的终点是增加心排出量和提升血压以满足机体的代谢需要和避免缺氧;SVV 和 PPV 相关分析发现两者之间有一定的关联性($y = 0.9646x - 7.4719$),相关系数为 0.95,这提示 SVV 和 PPV 均可用于评价感染性休克患者对液体治疗的反应,但两者是否具有同等的价值需要进一步研究证实(图 1)。

值得指出的是血管活性药物对 SVV 和 PPV 也有明显的影响,研究中 38 例使用去甲肾上腺素维持血压,平均用量为 $0.27 \pm 0.18 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{min})$,但用量在研究期间并没有调整,以排除血管活性药物带来的干扰^[8]。同时,存在心律失常、自主呼吸、机械通气潮气量 $< 8 \text{ml}/\text{kg}$ 、左心衰和开胸条件下均不适宜对 SVV 和

PPV 进行监测和采集。因此,本研究结果并不适用于此类患者。总之,SVV 和 PPV 能有效预测感染性休克患者容量治疗状态,有很高的预测和指导价值。

参考文献

- 1 Boyd JH, Forbes J, Nakada TA, *et al.* Fluid resuscitation in septic shock: a positive fluid balance and elevated central venous pressure are associated with increased mortality[J]. Crit Care Med, 2011, 39(2): 259-265
- 2 Powner DJ, Miller ER, Levine RL. CVP and PAoP measurements are discordant during fluid therapy after traumatic brain injury[J]. J Intensive Care Med, 2005, 20(1): 28-33
- 3 Nduka OO, Parrillo JE. The pathophysiology of septic shock[J]. Crit Care Nurs Clin North Am, 2011, 23(1): 41-66
- 4 Wyffels PA, Sergeant P, Wouters PF. The value of pulse pressure and stroke volume variation as predictors of fluid responsiveness during open chest surgery[J]. Anaesthesia, 2010, 65(7): 704-709
- 5 柳炳华,王月兰,时鹏才,等. 每搏输出量变异度监测非体外循环冠脉旁路移植术患者血容量变化的准确性[J]. 中华麻醉学杂志, 2011, 31(10): 1228-1230
- 6 Lahner D, Kabon B, Marschalek C, *et al.* Evaluation of stroke volume variation obtained by arterial pulse contour analysis to predict fluid responsiveness intraoperatively[J]. Br J Anaesth, 2009, 103(3): 346-351
- 7 Lorsomradee S, Lorsomradee S, Cromheecke S, *et al.* Uncalibrated arterial pulse contour analysis versus continuous thermodilution technique: effects of alterations in arterial waveform[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2007, 21(5): 636-643
- 8 陆正荷,钟泰迪,陈益君,等. 每搏变异指导胃肠道手术病人容量治疗的效果[J]. 中华麻醉学杂志, 2010, 30(5): 632-634

(收稿:2012-02-01)

(修回:2012-04-18)

(上接第 198 页)

- 4 Xu D, Perez RE, Rezaiekhailigh MH, *et al.* Knockdown of ERp57 increases BiP/GRP78 induction and protects against hyperoxia and tunicamycin-induced apoptosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 297(1): 44-51
- 5 Mulugeta S, Maguire JA, Newitt JL, *et al.* Misfolded BRICHOS SP-C mutant proteins induce apoptosis via caspase-4- and cytochrome c-related mechanisms[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293(3): 720-729
- 6 Egger L, Schneider J, Rheme C, *et al.* Serine proteases mediate apoptosis-like cell death and phagocytosis under caspase-inhibiting conditions[J]. Cell Death Differ, 2003, 10(10): 1188-1203
- 7 胡兰,许峰. c2Jun 氨基末端激酶信号转导通路在高体积分数氧肺损伤大鼠中的作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(6): 394-397
- 8 Zavadi J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions[J]. Oncogene, 2005, 24(37): 5764-5774
- 9 Torday JS, Torres E, Rehan VK. The role of fibroblast transdifferentiation in lung epithelial cell proliferation, differentiation, and repair in vitro[J]. Pediatr Pathol Mol Med, 2003, 22(3): 189-207
- 10 黄振杰,郑金旭,汤艳,等. 肺泡上皮细胞间质转化及其信号转导

途径在肺纤维化中的作用. 临床肺科杂志, 2011, 16(6): 823-826

- 11 徐国萍,徐璟达,李海霞,等. TGF- β_1 诱导的肺泡 II 型上皮细胞向间质细胞转变[J]. 复旦学报:医学版, 2007, 34(2): 223-227
- 12 Tanjore H, Cheng DS, Degryse AL, *et al.* Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress[J]. J Biol Chem, 2011, 286(35): 30972-30980
- 13 Zhong Q, Zhou B, Ann DK, *et al.* Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells: effects of misfolded surfactant protein[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 45(3): 498-509
- 14 Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases[J]. Cell, 2000, 103(2): 239-252
- 15 Hu P, Han Z, Couvillon AD, *et al.* Autocrine tumor necrosis factor α links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(8): 3071-3084
- 16 严君,胡卓伟. 内质网应激偶联炎症反应与慢性病发病机制[J]. 生理科学进展, 2011, 41(4): 261-266

(收稿:2012-04-30)

(修回:2012-05-10)