

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.07.005  
文章编号: 1005-8982 (2018) 07-0023-07

## 大鼠肺纤维化和活性维生素 D<sub>3</sub> 干预后 P32 和 PKD1 的表达及作用研究

倪娜<sup>1</sup>, 刘乃国<sup>1</sup>, 高海洋<sup>2</sup>, 郑静<sup>1</sup>, 董洪亮<sup>1</sup>, 王楠<sup>1</sup>

(滨州医学院附属医院 1. 临床医学实验室, 2. 急诊 EICU, 山东 滨州 256603)

**摘要:** **目的** 探讨大鼠肺纤维化发生发展中透明质酸结合蛋白 (P32) 和蛋白激酶 D1 (PKD1) 的表达及相互作用, 以及活性维生素 D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) 干预后这 2 种因子表达的变化。**方法** 90 只清洁级雄性 SD 大鼠随机分成 3 组: 对照组、模型组和治疗组。模型组和治疗组通过气管内注射博来霉素 (BLM, 5 mg/kg) 的方法复制大鼠肺纤维化模型, 对照组经气管注射等体积的生理盐水 (500 μl/kg)。术后第 2 天, 治疗组腹腔注射 VD<sub>3</sub> (2 μg/kg), 模型组腹腔注射等量的 VD<sub>3</sub> 的溶剂 (99.9% 丙二醇和 0.1% 乙醇), 对照组腹腔注射等量的生理盐水, 各组均注射 1 次 /2 d。各组分别于术后第 14、21、28 天处死 10 只大鼠。通过检测大鼠肺组织羟脯氨酸含量来验证肺纤维化, 应用实时聚合酶链反应 (real-time PCR) 和免疫组织化学技术分别检测大鼠肺组织中 P32 和 PKD1 的表达水平。**结果** 纤维化早期 (14 d), 治疗组中 P32 和 PKD1 mRNA 和蛋白质表达量与模型组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 治疗组均高于模型组; 相关性分析发现这 2 种基因的 mRNA 和蛋白质表达量具有相关性。**结论** 在大鼠肺纤维化过程中, 活性 VD<sub>3</sub> 可能在纤维化早期促进 P32 和 PKD1 的表达, 通过 P32 和 PKD1 在线粒体内的相互作用来实现抗氧化作用, 进而抑制肺纤维化的发生发展。

**关键词:** SD 大鼠; 肺纤维化; 活性维生素 D<sub>3</sub>; 透明质酸结合蛋白 1; 蛋白激酶 D1

**中图分类号:** R563

**文献标识码:** A

## Expressions and roles of P32 and PKD1 in rats with pulmonary fibrosis and their changes after intervention by active vitamin D<sub>3</sub>

Na Ni<sup>1</sup>, Nai-guo Liu<sup>1</sup>, Hai-yang Gao<sup>2</sup>, Jing Zheng<sup>1</sup>, Hong-liang Dong<sup>1</sup>, Nan Wang<sup>1</sup>

(1. Clinical Medicine Laboratory; 2. EICU, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Shandong, Binzhou 256603, China)

**Abstract: Objective** To explore the expressions and interaction of P32 and PKD1 during the genesis and development of pulmonary fibrosis in rats, and expression variation of the two factors after the intervention of active vitamin D<sub>3</sub>. **Methods** Ninety male SD rats were randomly divided into model group, treatment group and control group (30 in each group). Bleomycin (BLM, 5 mg/kg) was injected into the trachea of rats to establish the model of pulmonary fibrosis in the model group and the treatment group, while the control group was intratracheally injected with isopyknic saline (500 μl/kg). From the next day of BLM injection, the rats of the treatment group were intraperitoneally injected with 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (2 μg/kg) every other day, while the rats of the model group and the control group were intraperitoneally injected with isopyknic VD<sub>3</sub> solvent (99.9% propylene glycol and 0.1% ethanol) and saline respectively at the same time. On the 14th, 21st and 28th day after BLM injection, 10 rats in each group were sacrificed. The pulmonary fibrosis was verified by measuring the content of hydroxyproline in the lungs of the rats. The mRNA and protein expression levels of P32 and PKD1 were detected by RT-PCR and

收稿日期: 2017-03-01

[通信作者] 刘乃国, E-mail: liunaiguo1966@163.com; Tel: 0543-3256907

immunohistochemistry respectively. **Results** At the early stage (the 14th day) of pulmonary fibrosis, the expressions of P32 and PKD1 in the treatment group were higher than those in the model group at both mRNA and protein levels ( $P < 0.05$ ). Correlation analysis showed that the expressions of these two genes had significant correlations at both mRNA and protein levels. **Conclusions** Active  $VD_3$  may promote the the expressions of P32 and PKD1 at early stage during pulmonary fibrosis in rats. Active  $VD_3$  can achieve antioxidant effect through the interaction between P32 and PKD1 in the mitochondria, thereby inhibit the development of pulmonary fibrosis.

**Keywords:** SD rat; pulmonary fibrosis; active vitamin  $D_3$ ; hyaluronan binding protein 1; protein kinase D1

特发性肺间质纤维化 (idiopathic pulmonary interstitial fibrosis, IPIF) 是一种以弥漫性肺泡炎和成纤维细胞病理性增生, 最终导致肺间质纤维化为特征的疾病<sup>[1]</sup>。目前病因不明, 病程进展缓慢。近年来通过大量的临床观察和实验发现氧化 / 抗氧化失衡, 在 IPIF 的发生和发展中起着重要的作用。TEIXEIRA<sup>[2]</sup> 研究发现在博来霉素诱导的大鼠肺纤维化模型中, 给予抗氧化药物 N-乙酰半胱氨酸治疗可以减轻肺纤维化程度。

PATRICK 等<sup>[3]</sup> 研究发现活性维生素  $D_3$  ( $VD_3$ ) 具有抗氧化作用, 在氧自由基诱导的生物损伤中, 可以保护细胞免受活性氧增加和氧化应激引起的细胞死亡。氧化应激会导致丝 / 苏氨酸激酶蛋白激酶 D1 (protein kinase d1, PKD1) 及其所调控的 PKD1/MnSOD 线粒体抗氧化信号通路相关分子表达升高, 进而保护细胞器和细胞免受线粒体氧化应激带来的损伤和细胞死亡<sup>[4-5]</sup>。透明质酸结合蛋白 (P32), 是一个分子量为 32 kD 的多功能蛋白<sup>[6]</sup>。STORZ<sup>[7]</sup> 报道, P32 可以与 PKD1 结合并对 PKD1 在线粒体中的定位和功能具有调节作用。P32 在肺纤维化中的作用未见报道。本研究旨在探讨 P32 蛋白和 PKD1 在肺纤维化发生中的表达及其相互作用, 以及活性  $VD_3$  在肺纤维化发生发展中是否通过 P32 蛋白和 PKD1 相关信号通路来发挥作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

雄性 SD 大鼠, 购自鲁抗医药实验动物中心, 体重 180 ~ 200 g [许可证号: SCXK(鲁) 20130001]。

活性  $VD_3$ [1,25(OH) $_2$  $VD_3$ ] (美国 Sigma 公司, 批号: #074M4028V), 博来霉素 (日本化药株式会社, 15 mg/瓶, 批号: 030201), 羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所), DNA/RNA/蛋白质提取试剂盒 (美国 OMEGA 公司, R6734-01), HiFiScript 快速去基因组 cDNA 第一链合成试剂盒 (北

京康为世纪公司, CW2582-100), 实时定量试剂盒 (瑞士罗氏公司, 06924204001), 内参基因 GAPDH 引物购自上海生物工程技术有限公司 (B661204), PCR 引物由上海生物工程技术有限公司设计合成, P32(1 : 75, sc-23885) 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司), PKC mu (phosphor Y463) (1 : 250, ab59415) 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司), 超敏二步法免疫组织化学检测试剂 (PV-9001/2)、DAB 试剂盒 (ZLI-9019) (中杉金桥公司)。

### 1.2 仪器与设备

Eppendorf 梯度 PCR 仪 (德国艾本德股份公司, mastercycler 5333), 实时定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 伯乐公司, CFX96), GeneQuant 紫外分光光度计 (美国通用电气公司, GE1300), 奥林巴斯显微照相系统 (日本奥林巴斯株式会社, BX51), 凝胶成像分析系统 (北京六一公司, WD9413C)。

### 1.3 方法

**1.3.1 动物分组与处理** 将 90 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 个组, 对照组、模型组和治疗组。模型组气管暴露后一次性注射博来霉素 (5 mg/kg)<sup>[8]</sup>, 并于术后第 2 天腹腔注射  $VD_3$  溶剂 (99.9% 丙二醇和 0.1% 乙醇, 1  $\mu$ l/g); 治疗组同模型组一样复制肺纤维化模型, 于手术后第 2 天腹腔注射活性  $VD_3$  (2  $\mu$ g/kg)<sup>[9]</sup>; 对照组暴露气管后注射灭菌生理盐水 (500  $\mu$ l/kg), 并于术后第 2 天腹腔注射生理盐水 (1  $\mu$ l/g), 各组均注射 1 次 / 2 d。各组动物分别在术后第 14、21、28 天处死取材, 每个时间点 10 只大鼠。

**1.3.2 HYP 的含量测定** 将肺组织在液氮中捣成粉末, 按 100 mg 粉末加入 1 ml 生理盐水的比例制备组织匀浆, 用碱水解法按说明书测定肺组织 HYP 浓度。

**1.3.3 实时聚合酶链反应 (real-time PCR) 检测肺组织中 PKD1 和 P32 mRNA 表达** 按照试剂盒说明书提取大鼠的总 RNA, 并进行逆转录。以 GAPDH 作为内参基因, 用实时聚合酶链反应 (real-time

polymerase chain reaction, real-time PCR) 检测各组大鼠肺组织中 P32 和 PKD1 mRNA 的表达, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行相对定量。反应体系为 20  $\mu$ l。扩增反应条件: 95  $^{\circ}$ C 10 min; 变性 95  $^{\circ}$ C 15 s、退火 60  $^{\circ}$ C 20 s、延伸 72  $^{\circ}$ C 10 s, 39 个循环。引物见表 1, 扩增曲线及熔解曲线见图 1。

**1.3.4 免疫组织化学法检测肺组织中 P32 和 PKD1 蛋白表达水平** 取各组肺组织, 经多聚甲醛固定、脱水、透明处理后, 进行石蜡包埋。切片厚度为 4  $\mu$ m, 常规脱蜡至水, 抗原修复, 去除内源性过氧化酶, 37  $^{\circ}$ C 封闭 30 min。滴加一抗, 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 洗涤。按照试剂盒说明书滴加相应二抗, 洗涤。DAB 显色, 洗涤, 苏木素复染。酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光镜下进行组织观察分析。以细胞内出现明显的棕黄色颗粒或斑块为阳性表达。

**1.3.5 图像分析** 每例标本每个指标选取 3 ~ 5 个无重叠的阳性表达视野 ( $\times 200$ ), 利用 MotiC Med 6.0 彩

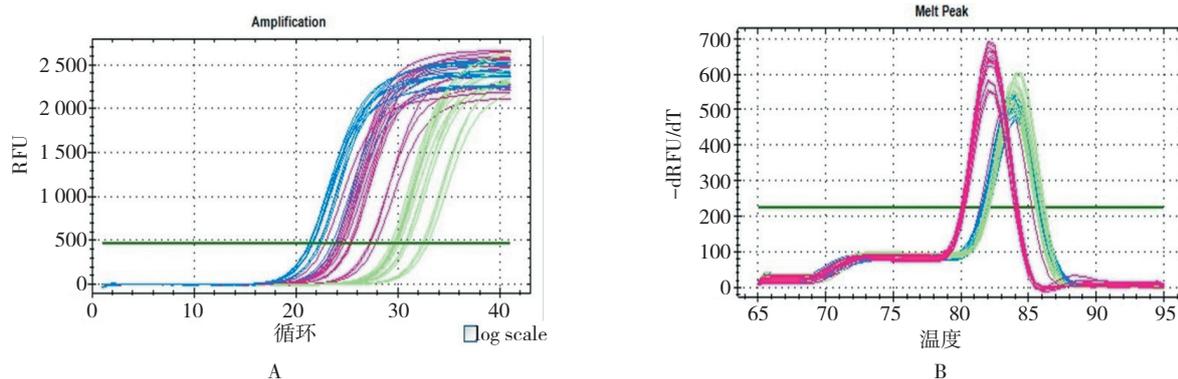
表 1 引物序列

目的基因	引物序列 (5' ~ 3')	基因长度 /bp
<b>P32</b>		
正向	GGACGAGATCGGACACGAAG	131
反向	AGTGTATCCACCCCTCGGT	
<b>PKD1</b>		
正向	GGACACTGAGATGGCTTTGG	184
反向	GCGGTATGTTGTTGCTCGTA	

色医学图文分析系统进行图像分析, 测定各目的蛋白阳性目标的平均光密度值, 量化实验结果, 从而对目标蛋白表达进行半定量分析。

## 1.4 统计学方法

本研究所得实验数据均采用 SPSS16.0 软件处理, 采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用重复测量设计的方差分析及单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 相关性分析采用 Spearman 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。



A: 3 种基因的扩增曲线; B: 3 种基因的熔解曲线; 蓝色曲线代表 GAPDH, 绿色曲线代表 PKD1, 红色曲线代表 P32

图 1 基因 P32、PKD1 及 GAPDH 的扩增及熔解曲线

## 2 结果

### 2.1 HYP 含量

3 组 HYP 在不同时间点上的含量进行重复测量设计的方差分析, 结果显示, 不同组别之间 HYP 含量有差别 ( $F = 234.23, P = 0.000$ ), 不同时间点 HYP 含量之间有差别 ( $F = 9.912, P = 0.003$ ), 变化趋势有差别 ( $F = 2.935, P = 0.042$ )。见表 2 和图 2。

3 组在不同时间点的 HYP 含量采用 LSD-*t* 检验进行两两比较, 结果显示, 模型组和治疗组在各时间点的 HYP 含量均比其相应时间点对照组的 HYP 含量升高 ( $P < 0.05$ ); 治疗组在各时间点的 HYP 含量与相应时间点的模型组相比都降低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.2 P32 和 PKD1 mRNA 表达

对照组、模型组和治疗组在不同时间点的 P32 和 PKD1 mRNA 表达量进行单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检测, 结果显示, 第 14 天, 这 2 种细胞因子在模型组和治疗组中的表达与对照组比较均降低, 而治疗组中的表达高于模型组中的表达, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。第 21 天, 模型组和治疗组中这两种细胞因子的表达与对照组比较均升高, 治疗组中 P32 mRNA 的表达量比模型组中升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而 PKD1 mRNA 的表达量在治疗组和模型组中差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。第 28 天, 这 2 种细胞因子的表达在模型组和治疗组高于

表 2 不同时间点 3 组大鼠肺组织中 HYP 的含量比较 ( $n=10, \bar{x} \pm s, \mu\text{g/g}$ )

组别	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照组	481 ± 102	452 ± 127	475 ± 129
模型组	832 ± 137 <sup>1)</sup>	1 025 ± 74 <sup>1)</sup>	1 182 ± 75 <sup>1)</sup>
治疗组	650 ± 70 <sup>1)2)</sup>	820 ± 128 <sup>1)2)</sup>	858 ± 85 <sup>1)2)</sup>

注: 1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与模型组比较,  $P < 0.05$

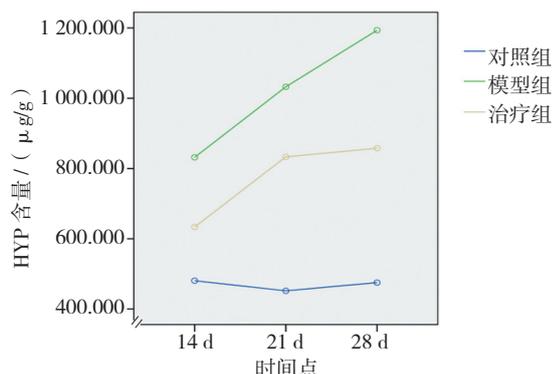
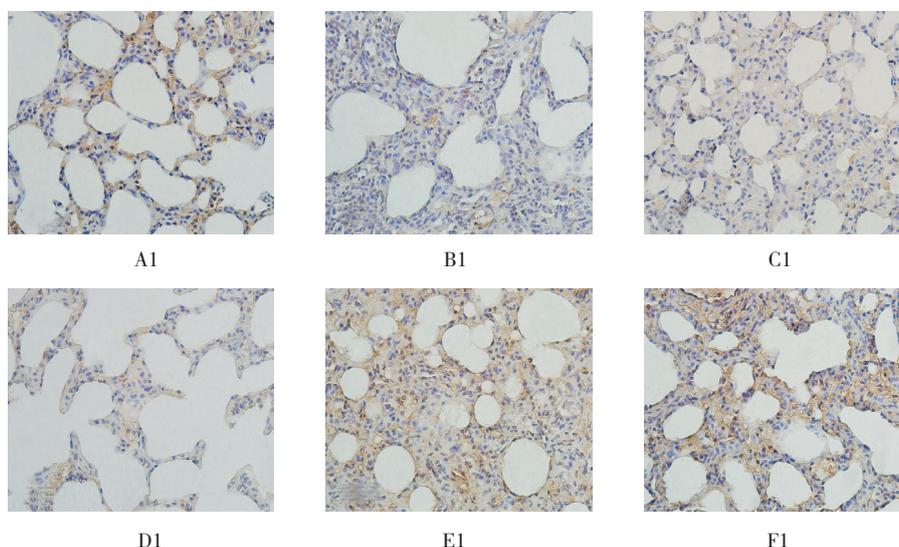


图 2 各组在不同时间点 HYP 含量变化

表 3 P32 和 PKD1 mRNA 表达水平比较 ( $2^{-\Delta\Delta CT}, n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	P32			PKD1		
	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
模型组	0.144 ± 0.055 <sup>1)</sup>	1.922 ± 0.175 <sup>1)</sup>	1.301 ± 0.132 <sup>1)</sup>	0.266 ± 0.043 <sup>2)</sup>	2.347 ± 0.411 <sup>1)</sup>	1.248 ± 0.580
治疗组	0.461 ± 0.004 <sup>1)2)</sup>	2.796 ± 0.409 <sup>1)2)</sup>	1.434 ± 0.112 <sup>1)3)</sup>	0.526 ± 0.047 <sup>1)2)</sup>	2.569 ± 0.235 <sup>1)3)</sup>	1.329 ± 0.096
F 值	169.648	12.212	5.005	129.043	25.558	1.773
P 值	0.000	0.001	0.023	0.000	0.000	0.206

注: 1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与模型组比较,  $P > 0.05$

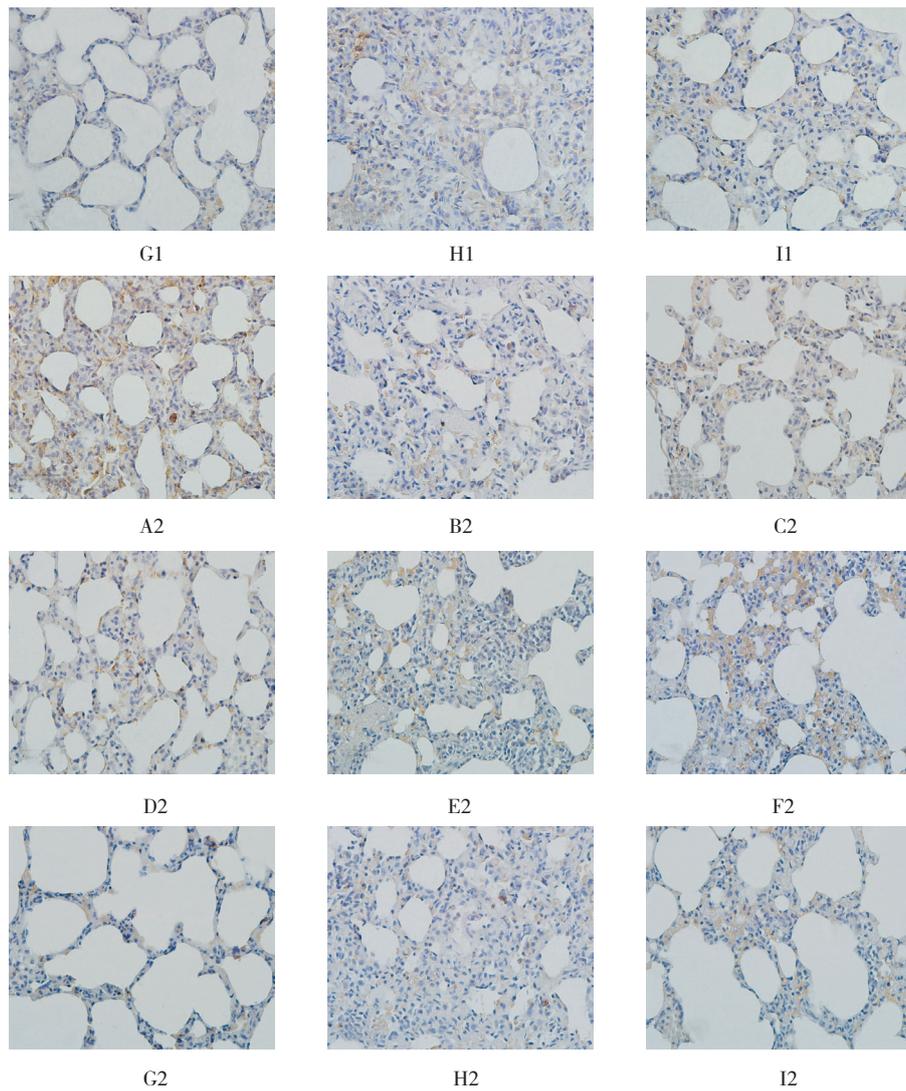


对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而治疗组中的表达虽然高于模型组, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。 (见表 3)。相关性分析发现, P32 和 PKD1 的 mRNA 表达量之间具有相关性 ( $r = 0.861, P < 0.05$ )。

### 2.3 P32 和 PKD1 的免疫组织化学实验结果

免疫组织化学实验结果显示, 细胞因子 PKD1 和 P32 在各组肺组织中的表达分布一致, 都是主要在肺泡上皮细胞、肺泡巨噬细胞、支气管上皮细胞、纤维化肺泡隔中表达较高, 在成纤维细胞和肌成纤维细胞中无明显表达。见图 3。

实验第 14、21、28 天, 对检测的 2 个基因的蛋白表达量, 进行重复测量设计的方差分析, 结果显示, 不同时间点之间 P32 和 PKD1 的蛋白表达量有差别 ( $F = 18.826$  和  $45.047$ , 均  $P = 0.000$ ); 不同组之间 P32 和 PKD1 的蛋白表达量有差别 ( $F = 4.002$  和  $8.532$ ,  $P = 0.049$  和  $0.006$ ); 变化趋势有差别 ( $F = 4.440$  和  $4.970$ ,  $P = 0.009$  和  $0.005$ ), 见图 4、5。



A1、D1、G1: 对照组 P32 在第 14、21 和 28 天的表达; B1、E1、H1: 模型组 P32 在第 14、21 和 28 天的表达; C1、F1、I1: 治疗组 P32 在第 14、21 和 28 天的表达; A2、D2、G2: 对照组 PKD1 在第 14、21 和 28 天的表达; B2、E2、H2: 模型组 PKD1 在第 14、21 和 28 天的表达; C2、F2、I2: 治疗组 PKD1 在第 14、21 和 28 天的表达

图 3 P32 (A1 ~ I1) 和 PKD1 (A2 ~ I2) 在大鼠肺组织中的表达 (DAB 显色, 200 μm)

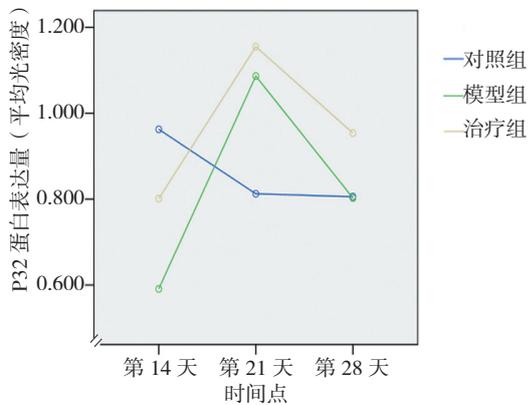


图 4 各组不同时间点 P32 蛋白表达量变化

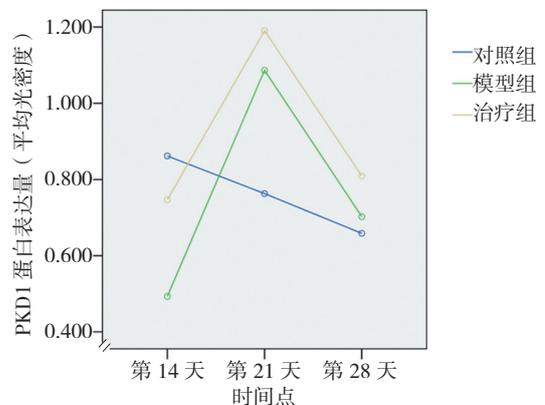


图 5 各组不同时间点 PKD1 蛋白表达量变化

各组在不同时间点的 P32 和 PKD1 蛋白表达量比较, 采用 LSD-*t* 法, 结果显示, 第 14 天, 2 种细胞因子在模型组和治疗组中的蛋白表达量均比对照组降低, 治疗组的蛋白表达量均比模型组升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。第 21 天, 模型组和治疗组中这 2 种细胞因子的蛋白表达量与对照组比较均升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 治疗组中这 2 种细胞因子的蛋白表达量虽然高于模型组, 但是差异无统计学意义

( $P > 0.05$ )。第 28 天, 这 2 种细胞因子的蛋白表达, 治疗组均高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但是模型组与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 治疗组中这 2 种细胞因子的蛋白表达量虽然略高于模型组, 但是差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (见表 4)。2 种细胞因子蛋白表达的总趋势与 mRNA 表达情况基本一致。相关性分析发现, P32 和 PKD1 的蛋白表达量之间具有相关性 ( $r = 0.859, P < 0.05$ )。

表 4 P32 和 PKD1 的蛋白表达情况 (平均光密度,  $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别	P32			PKD1		
	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照组	0.955 ± 0.040	0.812 ± 0.039	0.783 ± 0.048	0.836 ± 0.038	0.763 ± 0.026	0.659 ± 0.039
模型组	0.591 ± 0.026 <sup>1)</sup>	1.086 ± 0.017 <sup>1)</sup>	0.824 ± 0.050 <sup>2)</sup>	0.493 ± 0.036 <sup>1)</sup>	1.087 ± 0.028 <sup>1)</sup>	0.722 ± 0.038 <sup>2)</sup>
治疗组	0.801 ± 0.044 <sup>1)3)</sup>	1.156 ± 0.131 <sup>1)4)</sup>	0.946 ± 0.023 <sup>1)4)</sup>	0.701 ± 0.034 <sup>1)3)</sup>	1.191 ± 0.079 <sup>1)4)</sup>	0.808 ± 0.022 <sup>1)4)</sup>

注: 1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与对照组比较,  $P > 0.05$ ; 3) 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; 4) 与模型组比较,  $P > 0.05$

### 3 讨论

HYP 含量检测是评价肺纤维化程度的金标准。本研究结果显示各组肺组织 HYP 含量, 在不同时间点模型组均高于对照组, 且随建模时间延长而逐渐增高; 治疗组均低于相应时间点的模型组。这说明本研究选用气管内注射博来霉素的方法成功复制了大鼠肺纤维化模型, 活性  $VD_3$  对肺纤维化的发生、发展有一定的缓解作用。

PKD1 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶, PKD1 被证实是一种线粒体氧化压力感受器及抗氧化酶表达的调节器<sup>[10]</sup>。PKD1 可以把线粒体中 ROS 水平升高的信号从线粒体传递到细胞核, 诱导线粒体体内 MnSOD 的表达以保护细胞器和细胞免受氧化应激介导的损伤和细胞死亡<sup>[4,10-11]</sup>。有文献报道<sup>[12]</sup>, PKD1 能被氧自由基调节, 低浓度的氧化剂使酶活化, 而高浓度的氧化剂则使酶灭活。本研究结果显示, 在纤维发生早期 (第 14 天), 模型组和治疗组中 PKD1 细胞因子无论从转录水平还是从蛋白质水平, 其表达均比其在对照组中降低。这可能是在肺纤维化早期, 博来霉素在体内活化产生大量的活性氧, 抑制了 PKD1 的表达。然而第 14 天治疗组中 2 种细胞因子的表达量又高于模型组, 说明活性  $VD_3$  能够上调 PKD1 的表达, 提高 PKD1 抗氧化的能力, 保护线粒体免受活性氧的损害。

在第 21 天, 模型组和治疗组中 PKD1 的 mRNA 和蛋白表达均高于第 14 天的表达, 这可能是随着疾

病发展, 活性氧水平下降, 解除了对 PKD1 的抑制作用, 导致 PKD1 被激活上调; 治疗组中 PKD1 的表达量虽然略高于模型组, 但差异无统计学意义, 说明活性  $VD_3$  在第 21 天对 PKD1 表达的上调作用并不明显。第 28 天, 模型组、治疗组中 PKD1 的表达量与其相应的第 21 天时的表达量相比, 均降低, 而治疗组中的表达量虽然略高于模型组, 但差异无统计学意义。这可能是 28 d 时氧化/抗氧化趋于平衡, 线粒体氧化应激减弱, PKD1 介导的抗氧化作用减弱。提示线粒体氧化应激及 PKD1 介导的抗氧化通路可能在大鼠肺纤维化前期 (21 天前) 发挥重要作用。活性  $VD_3$  在肺纤维化早期 (21 天前) 能够促进 PKD1 及其介导的抗氧化通路相关分子的表达, 具有一定的抗氧化作用。

P32 蛋白是一个分子量为 32KD 的多功能酸性蛋白, 以环形三聚体的形态主要存在于细胞的线粒体基质中<sup>[13]</sup>。P32 蛋白可以与蛋白激酶 C (PKC) 的所有亚型相结合并增强 PKC 的活性, 可能是 PKC 定位和功能的调节因子<sup>[7]</sup>。PKC  $\delta$  为 PKC 家族的一个亚型, 是 PKD1 的一种上游激酶, P32 可以与 PKC  $\delta$  紧密结合, 进而调控 PKD1 参与许多重要的细胞内信号转导通路<sup>[14-15]</sup>。STORZ 等<sup>[7]</sup> 在 B 细胞系 SKW6.4 中证实了 P32 能够与 PKD1 在线粒体膜上结合。本研究发现, 在博来霉素诱导的大鼠肺纤维化过程中, P32 mRNA 和蛋白的表达总趋势与 PKD1 相似。在第 14 天时, 无论 mRNA 水平还是蛋白水平, 治疗组的表达量均高

于模型组。第21天, mRNA水平治疗组的表达量高于模型组, 差异有统计学意义, 蛋白水平治疗组的表达量虽然高于模型组, 但差异无统计学意义。第28天, 治疗组和模型组之间 mRNA和蛋白水平表达量差异无统计学意义。相关性分析发现, 无论是 mRNA 还是蛋白水平, P32和PKD1的表达均具有相关性, 且免疫组织化学结果显示两者的表达分布一致, 说明P32可能与PKD1在线粒体内结合, PKD1被线粒体氧化应激激活, 通过调节PKD1介导的线粒体-核抗氧化通路来缓解线粒体的氧化压力。本研究表明活性VD<sub>3</sub>在早期(14天)可以增加P32和PKD1的表达量, 说明活性VD<sub>3</sub>可能在肺纤维化早期促进P32和PKD1的表达, 通过P32和PKD1相互作用来实现抗氧化作用, 进而影响肺纤维化的发生发展。

#### 参 考 文 献:

- [1] 钟长军. 氧化应激在特发性肺纤维化中的作用及其机制研究进展[J]. 安徽医学, 2012, 33(2): 245-247.
- [2] TEIXEIRA K C. Attenuation of bleomycin-induced lung injury and oxidative stress by N-acetylcysteine plus deferoxamine[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2008, 21(2): 309-316.
- [3] PATRICK B K, CHRISTINE M, VICTORIA E K, et al. Antioxidants and doxorubicin supplementation to modulate CD14 expression and oxidative stress induced by vitamin D3 and seocalcitol in HL60 cells[J]. Oncology Reports, 2007, 18: 1513-1519.
- [4] PETER S. Mitochondrial ROS - radical detoxification, mediated by protein kinase D[J]. Trends in Cell Biology, 2006, 17(1): 13-18.
- [5] PETER S, HEIKE D, ALEX T. Protein kinase D mediates detoxification from mitochondrial reactive mitochondrion-to-nucleus signaling and oxygen species[J]. Mol. Cell. Biol, 2005, 25(19): 8520-8530.
- [6] SOLTYS B J, KANG D, GUPTA R S. Localization of P32 protein in mitochondria and at specific extramitochondrial locations in normal tissues[J]. Histochem Cell Biol, 2000, 114(3): 245-255.
- [7] STORZ P. Protein kinase C[micro] is regulated by the multifunctional chaperon protein p32[J]. J Biol Chem, 2000, 275(32): 24601-24607.
- [8] 李月红, 张春来, 王艳, 等. 骨髓间充质干细胞对肺纤维化大鼠肺组织中 Th1/Th2 平衡的调节作用[J]. 解剖学杂志, 2014, 37(1): 10-14.
- [9] 张宗梅, 顾盼, 易祥华, 等. 骨化三醇对博来霉素诱导的小鼠肺纤维化的影响[J]. 中华结核和呼吸病杂志, 2013, 36(11): 814-820.
- [10] CATHERINE F, COWELL, HEIKE D, et al. Mitochondrial diacylglycerol initiates protein-kinase-D1-mediated ROS signaling[J]. Journal of Cell Science, 2009, 122(7): 919-927.
- [11] SUKHDEV S, JOEL N, CARL D, et al. Bortner Mitochondrial DNA-depleted A549 cells are resistant to bleomycin[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 303: L413-L424.
- [12] ZHANG T Z, PHILIP S, URSULA B, et al. PKD1 protein is involved in reactive oxygen species-mediated mitochondrial depolarization in cooperation with protein kinase C  $\delta$  (PKC  $\delta$ )\*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(16): 10472-10485.
- [13] PARAMITA S, ANINDYA R C, SHUBHRA D, et al. Autophagic vacuolation induced by excess ROS generation in HABP1/p32/gC1qR overexpressing fibroblasts and its reversal by polymeric hyaluronan[J]. 2013, PLoS One 8(10): 1-18.
- [14] MARTHA R F, ERIKA R H. p32 (gC1qBP) Is a general protein kinase C (PKC) -binding protein[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(7): 5247-5255.
- [15] FOGAL V, RICHARDSON A D, KARMALI P P, et al. Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(6): 1303-1318.

(张蕾 编辑)