

## · 论著 ·

## 百草枯中毒大鼠肺纤维化与内质网应激的关系

孟潇潇 刘刊 谈玖婷 谢晖 王瑞兰

**【摘要】** 目的 探讨百草枯(PQ)中毒后大鼠发生肺纤维化与内质网应激的关系。方法 将 100 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组(10 只)和染毒组(90 只),20%PQ 溶液灌胃染毒后 2、6、12、24、48、72、96、168、336 h 处死动物取肺组织,苏木素-伊红(HE)染色和 Masson 染色观察肺组织病理学变化;免疫组化检测糖调节蛋白 78(GRP78)表达;测定肺组织丙二醛(MDA)含量;提取肺组织总蛋白,用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)和 GRP78 的蛋白表达。结果 HE 及 Masson 染色结果提示染毒组出现肺组织炎性细胞浸润和胶原纤维沉积,随中毒时间延长,肺纤维化逐渐加重。染毒后 2 h MDA 水平及  $\alpha$ -SMA、GRP78 蛋白表达均较对照组明显升高[MDA(nmol/mg): $1.38 \pm 0.18$  比  $0.85 \pm 0.05$ , $\alpha$ -SMA: $0.23 \pm 0.01$  比  $0.14 \pm 0.03$ ,GRP78: $0.72 \pm 0.02$  比  $0.37 \pm 0.06$ , $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ],随时间延长,MDA 水平及  $\alpha$ -SMA 蛋白表达逐步升高,GRP78 蛋白表达于染毒 72 h 后显著下降。结论 PQ 中毒大鼠肺内质网应激标志性蛋白 GRP78 和成纤维细胞表型标志物  $\alpha$ -SMA 均增高,提示内质网应激在 PQ 中毒引起的肺纤维化中发挥重要作用。

**【关键词】** 百草枯; 中毒; 内质网应激; 氧化应激; 肺纤维化

**The relationship of endoplasmic reticulum stress with paraquat induced lung fibrosis in rats** MENG Xiao-xiao\*, LIU Kan, TAN Jiu-ting, XIE Hui, WANG Rui-lan. \*Department of Critical Care Medicine, First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201620, China  
Corresponding author: WANG Rui-lan, Email: wangyusun@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the relationship between pulmonary fibrosis and endoplasmic reticulum stress (ERS) in rats with paraquat poisoning. **Methods** One hundred male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group ( $n=10$ ) and paraquat poisoning group ( $n=90$ ). The animals were sacrificed by exsanguination at 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 336 hours after administration with 20% paraquat solution. The paraffin sections of lung tissue were stained with hematoxylin-eosin (HE) and Masson trichrome to observe the pathological changes. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) was determined by immunohistochemistry, and malondialdehyde (MDA) of lung tissue was measured. The total protein of tissue was abstracted, and the  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and GRP78 was detected by Western blotting. **Results** HE and Masson staining demonstrated inflammatory infiltration and collagen deposition in the lung after paraquat administration with a tendency of exaggeration with time, and finally resulted in fibrosis. The expressions of MDA,  $\alpha$ -SMA and GRP78 in the lung tissue were significantly increased 2 hours after paraquat administration compared with those of control group [MDA (nmol/mg):  $1.38 \pm 0.18$  vs.  $0.85 \pm 0.05$ ,  $\alpha$ -SMA:  $0.23 \pm 0.01$  vs.  $0.14 \pm 0.03$ , GRP78:  $0.72 \pm 0.02$  vs.  $0.37 \pm 0.06$ ,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ], and the expressions of MDA and  $\alpha$ -SMA were gradually increased with time. GRP78 protein expression was decreased at 72 hours after paraquat administration. **Conclusion** The results reveal that the expressions of  $\alpha$ -SMA and GRP78 in paraquat poisoning group are up-regulated, suggesting ERS plays an important role in paraquat induced-pulmonary fibrosis.

**【Key words】** Paraquat; Poisoning; Endoplasmic reticulum stress; Oxidative stress; Lung fibrosis

百草枯(PQ)是目前广泛使用的有机杂环类接触性脱叶剂及除草剂,中毒后患者病死率极高,近年来 PQ 中毒的发生率有上升趋势<sup>[1-3]</sup>。PQ 中毒后可引起肺、肝、肾、脑等多器官损害,肺脏是其主要靶器官,进入体内的 PQ 有 90% 蓄积于肺内,迅速破坏肺

实质细胞,导致肺出血、水肿,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<sup>[4-6]</sup>。而 PQ 中毒引起肺纤维化的机制仍未完全阐明,目前尚无特效解毒药物,治疗措施也很有限,患者病死率高达 50%~80%<sup>[2-4]</sup>。内质网是细胞加工蛋白质和贮存  $Ca^{2+}$  的主要场所,对应激极为敏感<sup>[7]</sup>。在低氧、葡萄糖饥饿、氧化和糖基化作用紊乱等刺激下,一些错误折叠的蛋白质或者未折叠的蛋白质会积聚于内质网中,称为内质网应激(ERS)<sup>[7-8]</sup>。ERS 的发生与氧化应激关系密切,氧化应激过程中产生大量的活性氧(ROS),通过细胞脂质过氧化、损伤 DNA 分子、调节

DOI:10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2013.06.004

基金项目:国家自然科学基金(81272071);上海市科研计划项目(10JC1413200)

作者单位:201620 上海交通大学附属第一人民医院危重病科(孟潇潇、谈玖婷、谢晖、王瑞兰);200433 上海,第二军医大学海军医学系潜水教研室(刘刊)

通信作者:王瑞兰,Email:wangyusun@hotmail.com

细胞凋亡相关基因等途径诱导凋亡;同时 ROS 也是诱发 ERS 的重要原因<sup>[9-11]</sup>。近年来大量研究表明,氧化应激与肺纤维化的发病关系密切<sup>[12-13]</sup>,由于 PQ 进入细胞后会引发强烈的氧化应激<sup>[14]</sup>,因此我们推测 PQ 可能通过氧化应激诱导 ERS 在肺纤维化的形成中发挥重要作用。本研究旨在探讨 ERS 在 PQ 中毒后引起大鼠肺纤维化中的作用,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 主要试剂:**20% PQ 溶液(英国先正达有限公司),BCA 蛋白和丙二醛(MDA)试剂盒及 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色剂(江苏碧云天生物技术研究所),糖调节蛋白 78(GRP78)抗体(Thermo,美国), $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)抗体(Abcam,美国),内参  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(Abmart,美国),羊抗兔、羊抗鼠二抗(Biomart,中国),链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

**1.2 动物分组与模型制备:**雄性 SD 大鼠 100 只,体重(250±30)g,中国科学院上海实验动物中心提供,动物合格证号:SYXK(沪)2009-0086。自由摄食、饮水 1 周后用随机数字表法分组。对照组( $n=10$ ):用生理盐水 1 ml 一次性灌胃;PQ 中毒组(染毒组, $n=90$ ):将 20% PQ 溶液按 50 mg/kg 用生理盐水稀释到 1 ml 一次性灌胃染毒,灌胃后按不同时间随机分为 9 个亚组,每组 10 只。实验中严密观察并记录动物的表现,以出现食欲下降、反应迟钝、毛发蓬松、鼠尾发绀、呼吸困难、行走不稳、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<sup>[15]</sup>。由于各染毒组都有剔除和死亡大鼠,最终每组取 5 只纳入实验。染毒组大鼠分别于灌胃后 2、6、12、24、48、72、96、168、336 h 腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,腹主动脉放血处死,取肺组织进行相应处理后检测指标;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。

## 1.3 检测指标及方法

**1.3.1 标本采集与处理:**开胸观察肺形态,夹闭右肺门,心尖插入冲洗针,剪破右心耳,冲洗左肺循环,至肺变白。取右肺下叶置于中性甲醛溶液中固定用以免疫组化检测。左肺冻存于液氮中留作 MDA 检测及蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测。

**1.3.2 肺组织 MDA 水平检测:**提取组织总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。100  $\mu$ l 蛋白样品与 200  $\mu$ l MDA 工作液混匀后,沸水浴 15 min 后,冷却至室

温,室温下 1000  $\times$  g 离心 10 min。取 200  $\mu$ l 于 96 孔板中用酶标仪在 532 nm 处测定吸光度(A)值。根据标准曲线计算 MDA 浓度,用单位质量的蛋白含量表示 MDA 含量,单位为  $\mu$ mol/mg。

**1.3.3 Western blotting 方法测定肺组织  $\alpha$ -SMA、GRP78 蛋白表达:**提取组织总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。每个加样孔加入 12  $\mu$ g 样品,经 8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离胶后,恒流(300 mA)冰上转膜 1 h,5%牛奶-磷酸盐吐温缓冲液(PBST)封闭 1 h,分别加一抗 4  $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜(其中  $\alpha$ -SMA 浓度为 1:100,GRP78 为 1:1000),PBST 洗膜 3 次  $\times$  10 min;二抗常温孵育 2 h(浓度为 1:1000);PBST 洗膜 3 次  $\times$  10 min,免疫荧光化学发光法(ECL)显影。

**1.3.4 组织病理学观察:**取右肺下叶以中性甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片,常规方法行苏木素-伊红(HE)染色、Masson 染色、免疫组化,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。计量资料用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,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, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 肺组织 MDA 水平变化(表 1):**染毒组 MDA 含量随时间进展逐渐增加,各时间点均明显高于对照组(均  $P < 0.05$ )。

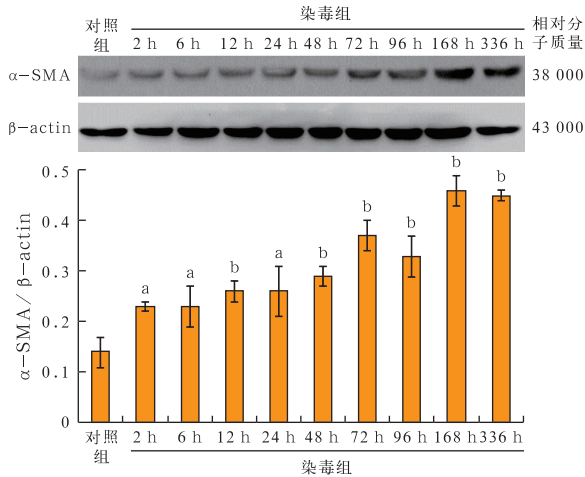
表 1 百草枯染毒后不同时间点大鼠肺组织内 MDA 及  $\alpha$ -SMA、GRP78 蛋白表达的变化比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 动物数 | MDA(nmol/mg)                 | $\alpha$ -SMA/ $\beta$ -actin | GRP78/ $\beta$ -actin        |
|-----------|-----|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 对照组       | 10  | 0.85 $\pm$ 0.05              | 0.14 $\pm$ 0.03               | 0.37 $\pm$ 0.06              |
| 染毒组 2 h   | 5   | 1.38 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup> | 0.23 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>  | 0.72 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> |
| 染毒组 6 h   | 5   | 1.69 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup> | 0.23 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>  | 0.94 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup> |
| 染毒组 12 h  | 5   | 1.85 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup> | 0.26 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>  | 1.08 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup> |
| 染毒组 24 h  | 5   | 1.98 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup> | 0.26 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>  | 1.16 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup> |
| 染毒组 48 h  | 5   | 1.95 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup> | 0.29 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>  | 1.15 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup> |
| 染毒组 72 h  | 5   | 1.92 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup> | 0.37 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>  | 1.04 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup> |
| 染毒组 96 h  | 5   | 2.00 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup> | 0.33 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>  | 0.40 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> |
| 染毒组 168 h | 5   | 2.09 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup> | 0.46 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>  | 0.20 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> |
| 染毒组 336 h | 5   | 2.13 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup> | 0.45 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>  | 0.24 $\pm$ 0.07              |

注:MDA:丙二醛, $\alpha$ -SMA: $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白,GRP78:糖调节蛋白 78, $\beta$ -actin: $\beta$ -肌动蛋白;与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$

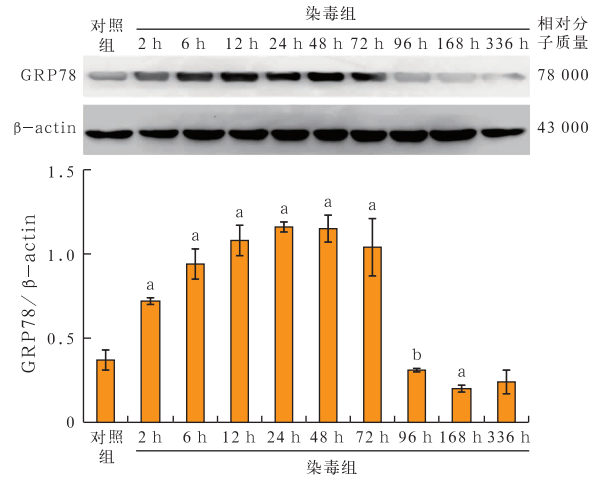
**2.2 肺组织  $\alpha$ -SMA 蛋白表达(表 1;图 1):**Western blotting 检测结果显示,染毒后 2 h 大鼠肺组织  $\alpha$ -SMA 表达明显升高,且随着时间的延长进行性升高。染毒组各时间点  $\alpha$ -SMA 表达水平与对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。





注:α-SMA:α-平滑肌肌动蛋白,β-actin:β-肌动蛋白;  
与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$

图 1 百草枯染毒后不同时间点大鼠肺组织 α-SMA 蛋白表达



注:GRP78:糖调节蛋白 78,β-actin:β-肌动蛋白;  
与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 2 百草枯染毒后不同时间点大鼠肺组织 GRP78 蛋白表达

**2.3 肺组织 GRP78 蛋白表达 (表 1; 图 2):** Western blotting 检测结果显示, 染毒后 2 h 染毒组大鼠肺组织 GRP78 表达明显升高, 72 h 后开始降低。染毒组 2 ~ 168 h GRP78 表达水平与对照组比较差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ )。

**2.4 肺组织病理学结果**

**2.4.1 肺组织 HE 染色 (图 3):** 对照组肺组织结构完整; 染毒组肺组织中出现炎性细胞浸润, 肺泡壁断裂, 严重时出现弥漫性肺出血, 甚至结构消失。

**2.4.2 肺组织 Masson 染色 (图 4):** 对照组肺泡结构正常; 染毒组可见被染成蓝色的胶原纤维, 胞质和红细胞呈红色, 胞核呈蓝褐色, 随着时间延长, 蓝染的胶原纤维增多。

**2.4.3 肺组织免疫组化 GRP78 表达 (图 5):** 显微镜下观察肺组织细胞核蓝染, 棕色颗粒为 GPR78 蛋白。对照组肺组织中仅有少量细胞胞质被染成浅黄色; 染毒组肺组织细胞 GRP78 阳性表达呈棕黄色, 较对照组染色增强。

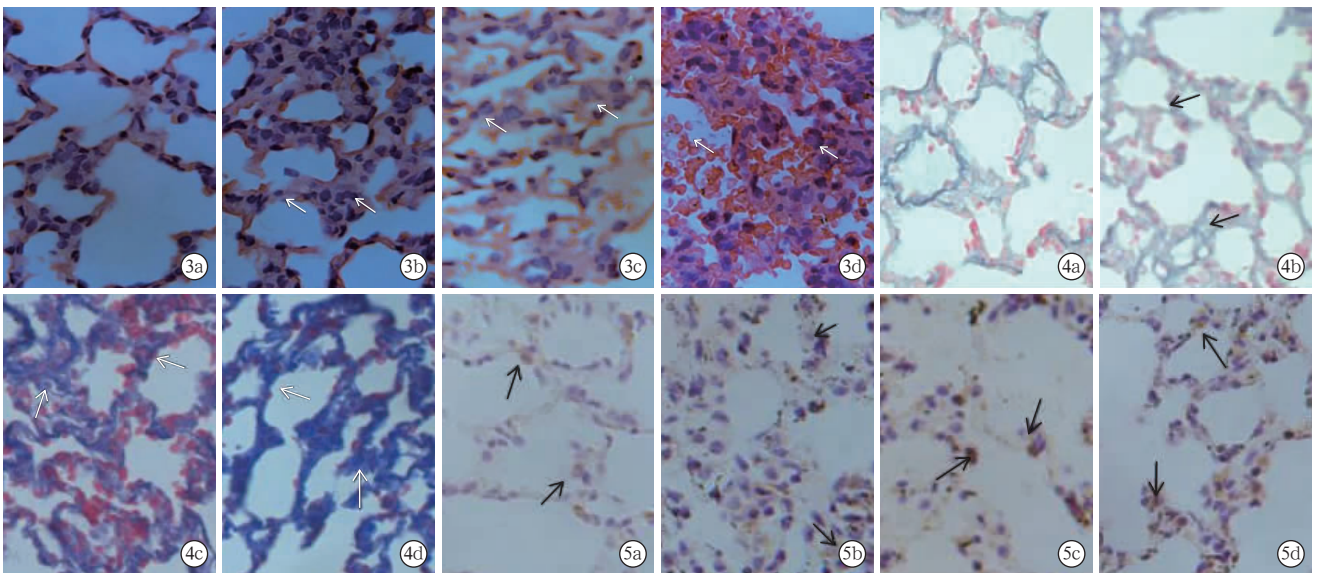


图 3 光镜下观察百草枯染毒后大鼠肺组织病理学改变 对照组(a)肺泡结构正常;染毒后 6 h(b)肺泡壁断裂,炎性细胞浸润(箭头所示);染毒后 48 h(c)炎性细胞浸润(箭头所示),肺泡腔内混有红细胞;染毒后 168 h(d)炎性细胞浸润(箭头所示),弥漫性肺出血 HE 高倍放大  
图 4 光镜下观察百草枯染毒后大鼠肺组织病理学改变 对照组(a)肺泡结构完整;染毒后 6 h(b)胶原沉积(箭头所示);染毒后 48 h(c)大量胶原沉积,胶原纤维(箭头所示)增多;染毒后 168 h(d)蓝染胶原纤维(箭头所示)进一步增多 Masson 高倍放大  
图 5 显微镜下观察百草枯染毒后大鼠肺组织糖调节蛋白 78(GRP78)表达 对照组(a)少量细胞胞质被染成浅黄色(箭头所示);染毒后 6 h(b)、48 h(c)、168 h(d)大量细胞胞质被染成棕黄色(箭头所示),随时间延长,染色加深 免疫组化 高倍放大

### 3 讨 论

MDA 是脂质过氧化的产物,测定 MDA 含量可反映机体内脂质过氧化程度,间接反映组织细胞氧化损伤的程度<sup>[16]</sup>。本实验结果显示,染毒组大鼠肺组织内 MDA 含量较对照组明显增高,这一现象提示 PQ 中毒可导致大鼠肺脏发生脂质过氧化损伤,引起氧化应激反应。有研究认为,在纤维化疾病中,活化的成纤维细胞/肌纤维母细胞通过表达分泌到张力纤维中的  $\alpha$ -SMA 蛋白来产生收缩力<sup>[17-18]</sup>。本实验的 HE 染色结果显示,染毒组大鼠肺组织中出现大量炎性细胞浸润、肺泡间隔断裂、肺泡腔内充满大量红细胞;Masson 染色可见肺组织大量散在蓝染的胶原纤维,与  $\alpha$ -SMA 的变化一致,提示 PQ 中毒后大鼠肺组织发生纤维化,同时肺组织病理损害结果与 MDA 变化一致,推测 PQ 中毒后肺纤维化的发生与氧化应激有关。PQ 进入肺泡上皮细胞后发生氧化还原循环,激活 ROS 级联反应,造成氧化应激,产生细胞毒性效应。有研究表明,ROS 可以引起局部的氧化应激,导致肺泡上皮细胞过度凋亡,造成肺组织结构破坏,最终产生肺纤维化<sup>[19-20]</sup>。

近年研究证实,氧化应激是 ERS 的重要诱因,ERS 可促进内质网处理内质网内错误折叠或未折叠的蛋白质,从而有利于维持细胞的正常功能<sup>[10]</sup>。但是,持久或过度的应激将损伤内质网功能,从而诱发细胞凋亡。ROS 是触发 ERS 介导凋亡通路的上游因子,在多种药物诱导的 ERS 过程中起着介导和调节作用<sup>[21]</sup>。GRP78 是内质网内表达最多的伴侣蛋白,协助新合成蛋白质的正确折叠、促进内质网稳态的恢复、增强细胞适应和抵抗应激的能力,是 ERS 发生的标志性分子<sup>[22]</sup>。本实验发现,染毒组大鼠肺组织中 ERS 的标志蛋白 GRP78 表达显著增加,并随时间的延长而逐渐增加。这些结果表明,在 PQ 引起肺纤维化过程中除了有氧化应激的作用外,还有 ERS 的参与,其机制可能是 PQ 进入肺泡后发生氧化还原循环,激活 ROS 级联反应,产生大量的 ROS,从而诱发了 ERS 的发生。

PQ 中毒可引起细胞强烈的氧化应激反应<sup>[17]</sup>,而氧化应激过程中产生的大量 ROS 是引起内质网中蛋白折叠错误和 ERS 诱发凋亡的主要原因。因此我们推测,PQ 可能通过 ROS 引起细胞发生 ERS,从而在 PQ 导致的肺纤维化中发挥重要作用。ERS 在 PQ 中毒引起肺纤维化中的作用及其分子机制尚需进一步研究,其结果必将为寻找以 ERS 为靶点的 PQ 中毒的治疗措施提供理论和实验依据。

### 参考文献

- [1] Lin JL, Lin-Tan DT, Chen KH, et al. Improved survival in severe paraquat poisoning with repeated pulse therapy of cyclophosphamide and steroids. *Intensive Care Med*, 2011, 37: 1006-1013.
- [2] Vale JA, Meredith TJ, Buckley BM. Paraquat poisoning: clinical features and immediate general management. *Hum Toxicol*, 1987, 6: 41-47.
- [3] 于丽琴, 郑学勤. 盐酸戊乙奎醚序贯阿托品救治重度急性有机磷农药中毒的临床研究. *中国危重病急救医学*, 2012, 24: 349-351.
- [4] Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Sánchez-Navarro A, et al. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. *Crit Rev Toxicol*, 2008, 38: 13-71.
- [5] 杨丽君, 何庆. 以循证医学方法为百草枯中毒制定治疗方案. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 581-584.
- [6] 杜宇, 何庆. 红霉素经环磷酸腺苷途径改善百草枯处理的血管内皮细胞通透性机制研究. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 668-671.
- [7] Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2007, 50: 752-763.
- [8] 马涛, 韩璐, 胡文全. 内质网应激凋亡信号途径在脓毒症脾淋巴细胞凋亡中的作用研究. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 48-50.
- [9] Bonifacino JS, Weissman AM. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998, 14: 19-57.
- [10] Malhotra JD, Miao H, Zhang K, et al. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 18525-18530.
- [11] Tanjore H, Cheng DS, Degryse AL, et al. Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 2011, 286: 30972-30980.
- [12] Mastruzzo C, Crimi N, Vancheri C. Role of oxidative stress in pulmonary fibrosis. *Monaldi Arch Chest Dis*, 2002, 57: 173-176.
- [13] Gaudie J, Jordana M, Cox G. Cytokines and pulmonary fibrosis. *Thorax*, 1993, 48: 931-935.
- [14] Dicker E, Cederbaum AI. NADH-dependent generation of reactive oxygen species by microsomes in the presence of iron and redox cycling agents. *Biochem Pharmacol*, 1991, 42: 529-535.
- [15] Lee SK, Ameno K, In SW, et al. Levels of paraquat in fatal intoxications. *Int J Legal Med*, 1999, 112: 198-200.
- [16] 翟声平, 柴文成, 任美华. Fas/FasL 与氧自由基在肺纤维化大鼠细胞凋亡中的作用研究. *中国全科医学*, 2007, 10: 711-713.
- [17] Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, et al. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol*, 1986, 103: 2787-2796.
- [18] Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14: 538-546.
- [19] 狄敏, 李莉, 兰超, 等. 乌司他丁对兔急性百草枯中毒心肌的保护作用. *中国危重病急救医学*, 2012, 24: 342-345.
- [20] Cantin AM, Boileau R, Bégin R. Increased procollagen III aminoterminal peptide-related antigens and fibroblast growth signals in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis*, 1988, 137: 572-578.
- [21] Yokouchi M, Hiramoto N, Hayakawa K, et al. Involvement of selective reactive oxygen species upstream of proapoptotic branches of unfolded protein response. *J Biol Chem*, 2008, 283: 4252-4260.
- [22] Wei J, Hendershot LM. Characterization of the nucleotide binding properties and ATPase activity of recombinant hamster BiP purified from bacteria. *J Biol Chem*, 1995, 270: 26670-26676.

(收稿日期: 2012-12-17) (本文编辑: 李银平)