

百草枯中毒鼠肺组织损伤及血红素氧合酶-1的表达

王南, 马恒, 王晔, 李婧, 端木, 宁杰
(昆明市延安医院急救医学科, 云南昆明 650051)

[摘要] **目的** 探讨急性百草枯中毒鼠肺组织病理损伤及肺组织中血红素氧合酶-1 (hemeoxygenase-1, HO-1) 的表达. **方法** 将 150 只 SD 雄性大鼠分为正常对照组 (C 组 30) 只、百草枯 (PQ 组) 中毒组 (60) 只及三七皂甙 (PNS 组) 保护组 (60) 只. PQ 组和 PNS 组给草枯 25 mg/kg 一次性灌胃染毒, C 组给积生理盐水灌胃. PNS 组给 PNS 50 mg/kg 阴茎静脉注射, 每日给药 1 次直至处死; PQ 组和 C 组在相同时间点给等体积生理盐水. 观察各组大鼠在中毒后 6 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d 肺组织病理改变, 采用 RT-PCR 法测定鼠肺组织 HO-1 mRNA 表达, Western blot 分析肺组织 HO-1 蛋白表达. **结果** C 组肺组织结构基本完整, PQ 组损伤程度严重, 炎性细胞浸润明显增多, PNS 组肺损伤程度较轻. C 组 HO-1 mRNA 和蛋白绝大多数标本有弱表达; PQ 组与 PNS 组相比 HO-1 mRNA 和蛋白表达增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); PQ 组 HO-1 mRNA 和蛋白表达在 1d 达高峰之后下降, 第 3 天基本恢复到对照组水平; PNS 组 6 h、12 h、1 d 及 3 d 高于百草枯中毒组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). **结论** 三七皂甙可增加百草枯中毒鼠肺组织中 HO-1 的表达, 减轻百草枯中毒所致急性肺损伤.

[关键词] 百草枯; 三七皂甙; 急性肺损伤; 血红素氧合酶-1

[中图分类号] R595.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 08-0030-04

Expressions of HO-1 in the Lung of Paraquat Poisoning Rats

WANG Nan, MA Heng, WANG Ye, LI Jing, DUAN Mu, Ning-jie

(Dept. of Emergency Medicine, Yan'an Hospital of Kunming, Kunming Yunnan 650051, China)

[Abstract] **Objective** To observe the histological changes of lung tissues after poisoned by paraquat, and explore the expressions of hemeoxygenase-1 (HO-1) in lung of paraquat poisoning rats. **Methods** One hundred and fifty SD male rats were randomly divided into 3 groups: normal control group (C) 30 rats, paraquat poisoning group (PQ) 60 rats and drug intervention group (PNS) 60 rats. The PQ and PNS group rats were given paraquat by gastric perfusion (25 mg/kg); The C group rats were given saline by gastric perfusion. The rats in PNS group were protected by intravenous injections of penis with PNS (50 mg/kg) 15 min before exposure of paraquat, once a day until killed. The PQ and C group rats were given saline. Histological changes of lung tissues under light microscope were observed. The expression of HO-1 mRNA in lung tissues of rats were measured by RT-PCR and The HO-1 protein was evaluated by western blot at different time of 6 h, 12 h, 1 d, 3 d and 7d after poisoning. **Results** The degree of lung injury in PQ group was higher than that in C group. But in PNS group the degree of lung injury was lighter. The relative magnitude expression of HO-1 mRNA and HO-1 protein in group C were weak or no. The relative magnitude expression of HO-1 mRNA and HO-1 protein in PNS (6 h), PNS (12h), PNS (1d) and PNS (3d) subgroups were significantly higher as compared with the PQ group ($P < 0.05$). **Conclusions** PNS can effectively improve the expression of HO-1 protein and mRNA in lung tissue and reduce the pathological changes of lung tissue in rats with paraquat poisoning.

[Key words] Paraquat; PNS; Acute lung injury; Hemeoxygenase-1

[作者简介] 王南 (1964~), 女, 云南昆明市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事老年医学、毒物中毒工作.

[通讯作者] 王晔. E-mail: wangye206@126.com

百草枯 (paraquat, PQ) 是一种有机杂环类接触性脱叶剂及除草剂, 对人类的毒性很高, 进入人体后对全身多个器官造成不同程度的损害, 因肺组织对其有主动摄取和蓄积作用, 接受电子经细胞色素还原酶、线粒体还原酶等催化下产生了 H_2O_2 、 O_2 、 OH^- 等自由基, 造成肺泡 I、II 型上皮细胞的损伤, 引起肿胀、变性、坏死, 抑制肺泡表面活性物质的形成, 肺组织损伤最为严重, 目前无特效解毒剂^[4]. 本实验旨在观察百草枯中毒鼠肺组织损伤的特点, HO-1 的表达以及三七皂甙的作用.

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

SD 雄性大鼠 150 只, 体重 (220 ± 30) g, 昆明医科大学实验动物中心提供. 1% 的百草枯溶液 (山东三元工贸有限公司), PNS 注射液 (昆明制药厂). RNA 提取试剂 Trizol Reagent (美国 Invitrogen 公司), HO-1 及 β -actin 引物合成 (美国 Promega 公司), RT-PCR 试剂盒 (美国 Promega 公司). 兔抗大鼠 HO-1 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗及 DAB 显色试剂盒 (大连宝生物).

1.2 实验动物分组及标本采集

SD 雄性鼠 150 只随机分成 3 组: 百草枯组 (PQ 组)、三七皂苷组 (PNS 组) 各 60 只, 给予 1% 的 PQ (25 mg/kg) 一次性灌胃染毒造模; 正常对照组 (C 组) 30 只, 给予等体积的生理盐水灌胃造模. PNS 组每天给 PNS 50 mg/kg 阴茎静脉注射直至处死前, PQ 组、C 组在相同时间点等体积生理盐水干预. PQ 组、PNS 组于 6 h、12 h、1 d、3 d、5 d 及 7 d 分别处死 10 只. C 组于相同时间处处死 5 只. 取鼠右肺相同部位 HE 染色病理观察, 余肺组织冷生理盐水冲洗后 -70°C 冻存.

1.3 HO-1 mRNA 的表达 采用 RT-PCR 方法

提取肺组织总 RNA, 进行 RT-PCR. HO-1 上游引物 5'-AGCGAAACAAGCAGAACCCA-3' 下游引物 5'-GCCACCAGCAGCTCAGGATG-3'; β -actin 上游引物 5'-CACTGCCGCATCCTCTTCCTC-3' 下游引物 5'-CTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3' 扩增条件: 94°C 预变性 3 min, 1 个循环; 94°C 变性 30 s, 退火 (HO-1 52°C , β -actin 54°C) 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min, 1 个循环. 取 PCR 产物在质量分数为 1.5% 的琼脂糖

凝胶上电泳, 用凝胶图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司 ImagePro Plus) 分析结果. 以目的因子 / β -actin 的比值表示目的因子的相对表达水平.

1.4 HO-1 蛋白表达 采用 western blot 方法

肺组织称重、剪碎, 加入组织裂解液予 4°C 下匀浆, 离心取上清, 蛋白定量后取 $50 \mu\text{g}$ 样品蛋白电泳再转人硝酸纤维素膜. 应用 3% 脱脂奶粉室温封闭硝酸纤维素膜 1 h, 加入 1:100 稀释的兔抗大鼠血红素氧合酶-1 多克隆抗体, 4°C 密封 12 h, TPBS 振荡洗膜后, 应用辣根过氧化物酶标记的二抗及 DAB 显色试剂盒进行检测, 以出现棕黄色条带为阳性.

1.5 统计学处理

采用 SPSS 统计软件, 计量资料以表示, 方差齐时采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 肺组织损伤

C 组鼠的肺组织结构完整, 无炎症细胞渗出. PQ 组有大量炎症细胞浸润, 且随着时间的延长炎性细胞增多, 肺组织损伤加重. PNS 组与 PQ 组有相似的病理表现, 但相应时间点肺组织损伤程度减轻, 见图 1~3.

2.2 肺组织 HO-1 mRNA 和蛋白表达

PQ 组于第 1 天表达最强, 至第 3 天仅有少量表达; PNS 组表达在 6 h、12 h、1 d 及 3 d 高于 PQ 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). C 组个别标本不表达, 绝大多数标本可有少量表达, 见表 1 及图 4、图 5.

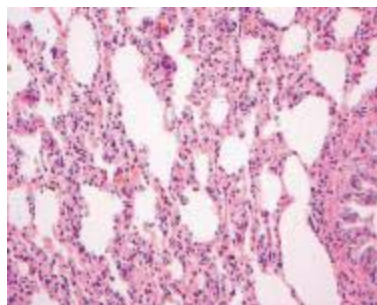


图 1 PQ 组 (HE $\times 200$)

Fig. 1 HE staining of rat lung in PQ group (HE $\times 200$)

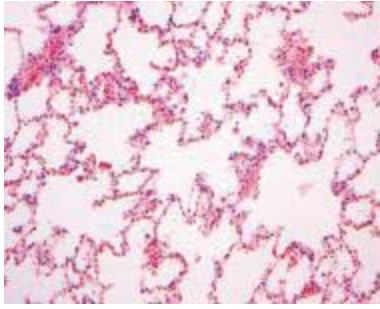


图 2 C 组 (HE × 200)

Fig. 2 HE staining of rat lung in C group (HE × 200)

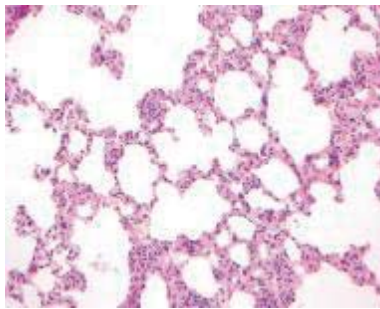


图 3 PNS 组 (HE × 200)

Fig. 3 HE staining of rat lung in PQ group

表 1 各组鼠肺组织 HO-1 mRNA 和蛋白的动态表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Expression of HO-1 mRNA and protein in three groups at different time points ($\bar{x} \pm s$)

组 别	时间点	n	HO-1mRNA	HO-1 蛋白
C 组	6 h	10	0.85 ± 0.04	0.65 ± 0.03
	1 d	10	0.81 ± 0.03	0.64 ± 0.01
	3 d	10	0.80 ± 0.02	0.59 ± 0.03
PQ 组	6 h	10	0.92 ± 0.15 [#]	0.91 ± 0.22 [#]
	12 h	10	1.28 ± 0.20 [#]	1.14 ± 0.30 [#]
	1 d	10	1.53 ± 0.28 [#]	1.72 ± 0.61 [#]
	3 d	10	0.93 ± 0.02	1.02 ± 0.25 [#]
	5 d	10	0.83 ± 0.04	0.85 ± 0.12 [#]
PNS 组	7 d	10	0.86 ± 0.01	0.64 ± 0.02
	6 h	10	0.99 ± 0.11 ^{#△}	1.06 ± 0.15 ^{#△}
	12 h	10	1.56 ± 0.26 ^{#△}	1.93 ± 0.26 ^{#△}
	1 d	10	1.95 ± 0.33 ^{#△}	2.15 ± 0.38 ^{#△}
	3 d	10	1.07 ± 0.17 ^{#△}	1.43 ± 0.22 ^{#△}
	5 d	10	0.94 ± 0.04	0.95 ± 0.08 ^{#△}
	7 d	10	0.88 ± 0.03	0.76 ± 0.05

与 C 组比较, [#] $P < 0.05$; PNS 组与 PQ 组比较, [△] $P < 0.05$.

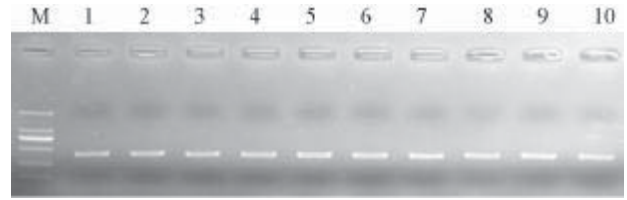


图 4 β-actin mRNA 表达水平

Fig. 4 Expression of β-actin mRNA at different time points in two groups

M:maker PQ 组 6 h、12 h、1 d、3 d、5 d 的表达;

1~5:PNS 组 6、12 h、1 d、3 d、5 d 的表达; 6~10:图 4.

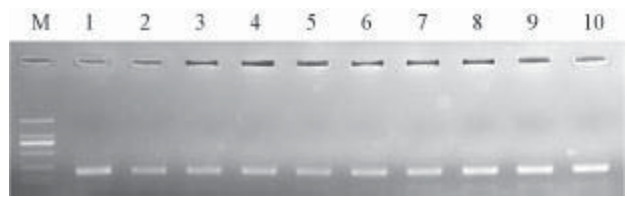


图 5 HO-1 mRNA 表达水平

Fig 5 Expression of HO-1 mRNA at different time points

M:maker PQ 组 6 h、12 h、1 d、3 d、5 d 的表达;

1~5:PNS 组 6、12 h、1 d、3 d、5 d 的表达; 6~10: 图 5.

3 讨论

百草枯 (PQ) 是常见的有机杂环类接触性除草剂。百草枯具有多系统毒性。对肺脏亲和力最强。通过在肺组织中聚集、产生大量的氧自由基、炎症介质造成机体一系列应激反应、对线粒体的毒性作用、破坏细胞内钙稳态系统、诱导细胞凋亡等机制造成急性肺损伤^[2]。

血红素氧合酶 (hemeoxygenase, HO) 是哺乳动物组织细胞微粒体的一种蛋白酶, 催化血红素产生胆绿素、一氧化碳和亚铁, 包括 HO-1、HO-2 和 HO-3 三种同工酶。其中 HO-1 又称诱导型 HO-1, 广泛分布于全身组织, 尤其是单核细胞、巨噬细胞系统的微粒体中, 以肺、肾等细胞中活性最高, 是近年倍受重视的细胞内源性抗氧化酶^[3]。氧化应激损伤是多种原因引起的肺损伤的重要发病机制, 实验证明 HO-1 在肺氧化应激性损伤时被大量诱导、活性增高, 并证实了 HO-1 的诱导不论在整体抑或离体实验中均有保护作用^[4]。研究表明^[5] HO-1 抑制炎性细胞因子和化学因子分泌主要是通过一氧化碳 (CO) 的作用实现的, 低浓度的 CO 能选择性抑制由脂多糖 (LPS) 介导的前炎症因子, 如 IL-1、TNF-α 巨噬细胞炎症蛋白和增加由 LPS 介导的抗炎因子白细胞介素 10 (IL-10) 表达,

这种作用不仅通过 cGMP 或 NO 途径实现, 而且还与有丝分裂素激活的蛋白激酶 (MAPK) 途径发挥抗炎作用。

Otterbein 等^[6]也发现在培养的大鼠成纤维细胞中加入 HO-1 诱导剂可抑制由 TNF- α 引起的细胞凋亡, 而用 HO-1 抑制剂可抑制 HO-1 的抗凋亡作用。

实验结果表明, PQ 组有大量炎症细胞浸润, 肺泡结构及肺部毛细血管严重破坏, 且随着时间的延长肺组织损伤加重。PNS 组相应时间点肺组织损伤程度减轻。PNS 组染毒 6 h 后 HO-1 mRNA 和蛋白表达较 PQ 组明显增强, 1 天达高峰, 之后缓慢下降, 第 7 天时仍有少量表达。百草枯中毒引起急性肺损伤, PNS 组肺损伤减轻提示 PNS 对 PQ 所致肺损伤有保护作用。其可能的机制为 PNS 增加 HO-1 的表达, 其代谢产物的抗氧化应激可能对百草枯所致急性肺损伤有保护作用。但是 PNS 是通过何种途径增加 HO-1 的表达及其具体作用机制有待进一步研究, 这可能为今后治疗百草枯中毒提供新的思维。

[参考文献]

- [1] 李敬, 王岚. 川芎嗪治疗百草枯中毒急性肺损伤的疗效分析[J]. 河北医药, 2011, 33(15): 2 269 - 2 270.
- [2] 张志坚. 百草枯中毒急性肺损伤的治疗进展[J]. 江西医药, 2009, 44(10): 1 023 - 1 025.
- [3] RYTER S W, ALAM J, CHOI A M. Hemeoxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications[J]. *Physiol Rev*, 2006, 86(2): 583 - 650.
- [4] TAKAHASHI, MORITAKA, AKAGI R, et al. Hemeoxygenase-1: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries[J]. *Curr Med Chem*, 2004, 11(12): 1 545 - 1 561.
- [5] RYTER S W, MORSE D, CHOI A M. Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36(2): 175 - 182.
- [6] PETRACHE I, OTTERBEIN LE, ALAM J, et al. Hemeoxygenase-1 inhibits TNF- α induced apoptosis in cultured fibroblast [J]. *Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 278(2): 312 - 319.

(2014-04-19 收稿)

征稿启事

为进一步支持和推动昆明医科大学学科建设的发展, 使《昆明医科大学学报》的学术质量得到进一步的提升, 《昆明医科大学学报》编辑部决定自 2012 年 1 月 1 日起, 国家自然科学基金资助课题的综述可以在学报正刊发表, 另外对国家自然科学基金资助课题、云南省自然科学基金资助课题及昆明医科大学“十二五”省级、校级重点学科立项建设的研究论文, 给予优先刊登及优稿优酬的奖励机制。欢迎广大科研教学人员、硕士及博士研究生踊跃投稿。网上投稿 <http://kmykdx.cnjournals.cn>, 电话: 0871 - 65936489, 0871 - 65393133。

昆明医科大学学报编辑部
2014 年 1 月 1 日