

百草枯中毒鼠肺组织中 TM-EPCR mRNA 与 IL-1 β 的表达

曲 艳, 王 晔, 郝 丽, 王 旭
(昆明市延安医院急诊医学科, 云南昆明 650051)

[摘要] **目的** 探讨 IL-1 β 与 TM、EPCR 基因在百草枯中毒鼠所致急性肺损伤中的表达. **方法** 90 只 SD 雄性大鼠分为正常对照组 (C 组 30 只)、百草枯中毒组 (PQ 组 60 只). PQ 组一次性灌胃 PQ25 mg/kg 染毒, C 组予等体积生理盐水灌胃. 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, 采用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测鼠肺组织 TM、EPCR mRNA 的表达; 采用 ELISA 方法检测血清的 IL-1 β 表达. **结果** C 组肺组织结构完整, 无炎症细胞渗出. PQ 组肺组织炎性细胞浸润明显增多, 且随时间推移肺损伤加重. C 组 TM 和 EPCR mRNA 有一定水平表达; 与 C 组相比 PQ 组鼠肺组织 TM 和 EPCR mRNA 的表达增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); PQ 组 TM 和 EPCR mRNA 的表达在 1 d 达高峰之后下降, 第 3 天基本恢复到 C 组水平. PQ 组 IL-1 β 与 TM 表达呈正相关 ($P < 0.01$); IL-1 β 与 EPCR 表达呈正相关 ($P < 0.01$). **结论** IL-1 β 与 TM、EPCR 基因介导的炎症反应参与百草枯中毒所致肺损伤.

[关键词] 百草枯; 急性肺损伤; 血栓调节蛋白; 白介素-1; 内皮细胞蛋白 C 受体

[中图分类号] R595.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 04-0013-04

Expressions of Interleukin-1 β and TM-EPCR mRNA in the Lung of Paraquat Poisoning Rats

QU Yan, WANG Ye, HAO Li, WANG Xu
(Dept. of Emergency, Kunming Yan'an Hospital, Kunming Yunnan 650051, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expressions of thrombomodulin (TM) and endothelial protein C receptor (EPCR) mRNA and IL-1 β in lung of paraquat poisoning rats. **Methods** Ninety SD male rats were randomly divided into 2 groups: normal control group (C30) and paraquat poisoning group (PQ60). The PQ group rats were given paraquat by gastric perfusion (25 mg/kg); The C group rats were given saline by gastric perfusion. Histological changes of lung tissues under light microscope were observed. And the expression of TM and EPCR mRNA in lung tissues of rats were measured by RT-PCR at different time of 6h, 12h, 1d, 3d, 5d and 7d after poisoning. The expression of IL-1 β was determined by ELISA. **Results** The relative magnitude expression of TM and EPCR mRNA in PQ (6 h), PQ (12 h), PQ (1d) and PQ (3d) subgroups were significantly higher as compared with the C group ($P < 0.05$). The content of IL-1 β in PQ group was higher than that in C group; The pathological scores of lung injury in PQ groups were significantly higher compared with C group. The expression of IL-1 β positively correlated with that of TM ($P < 0.01$), and positively correlated with that of EPCR ($P < 0.01$). **Conclusion** The aggravation of lung injury induced by paraquat in rats is related to the expression of IL-1 β and TM, EPCR mRNA in lung tissue.

[Key words] Paraquat; Acute lung injury; Interleukin-1 β ; Thrombomodulin (TM); Endothelial protein C receptor (EPCR)

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2009ZC159M)

[作者简介] 曲艳 (1964~), 女, 云南昆明市人, 医学学士, 主任医师, 主要从事急救医学、毒物中毒研究工作.

[通讯作者] 王晔. E-mail:wangye206@126.com

百草枯 (paraquat, PQ) 是广泛使用的除草剂, 进入人体后对全身多个器官造成损害, 因肺组织对其有主动摄取和蓄积作用, 故 PQ 中毒以急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 表现最为突出^[1]。目前 PQ 诱导急性肺损伤的机制尚未完全清楚, 且无特效解毒剂, 探讨其中毒机制为研究热点之一。IL-1 β 由多种细胞产生的一种多肽, 具有广泛生物学活性, 在炎症反应和细胞凋亡等方面起重要作用。血栓调节蛋白-活化蛋白 C-内皮细胞蛋白 C 受体 (TM-APC-EPCR) 系统具有抗凝血、抗炎的特性, 并认为其将成为判断疾病预后的指标及炎症治疗进程中的新靶点^[2]。本实验观察 PQ 中毒鼠肺组织中 IL-1 β 与 TM、EPCR mRNA 的表达情况, 以了解其在 ALI 发病中的作用, 为 PQ 中毒提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

清洁级 SD 雄性大鼠 90 只, 体重 200~250 g, 昆明医科大学实验动物中心提供。质量分数为 20% 的百草枯溶液 (山东三元工贸有限公司), 实验前将质量分数为 20% 的 PQ 稀释为 1%。IL-1 β 试剂盒 (大连宝生物); RNA 提取试剂 Trizol Reagent (美国 Invitrogen 公司), RT-PCR 试剂盒 (美国 Promega 公司), TM、EPCR 及 β -actin 引物合成 (美国 Promega 公司)。

1.2 实验动物分组及标本采集

90 只 SD 雄性鼠随机分成 2 组: 百草枯染毒组 (PQ 组), 60 只给予质量分数为 1% 的 PQ (25 mg/kg) 一次性灌胃染毒造模; 正常对照组 (C 组), 30 只给予相应体积的生理盐水灌胃造模。PQ 组于染毒后 6 h、12 h、1 d、3 d、5 d 及 7 d 时以质量分数为 10% 的水合氯醛麻醉处死 10 只。C 组鼠于相同时间点处死 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 $^{\circ}$ C 冻存。

1.3 采用 ELISA 方法测定血浆 IL-1 β 的水平和肺组织 HE 染色

分别在实验开始后第 6 h、12 h、1 d、3 d、5 d 及 7 d 处理大鼠, 首先取静脉血离心, 将血清置 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 待测 IL-1 β , 操作严格按照说明书进行。肺组织取材后, 常规石蜡切片, HE 染色。

1.4 TM 和 EPCR 的检测

按照操作说明进行, 提取肺组织总 RNA, 进行 RT-PCR。TM 上游引物 5'-AGGGACACTGGA-

CTCGGGAAGT-3' 下游引物 5'-AGGAATAAGAGC-CTGG-CACATCA-3'; EPCR 上游引物 5'-AAGCC-TGCACATGCTCCAGAT-3' 下游引物 5'-GCACTTC-CATTCACAGCCACAT-3'; Beta-actin 上游引物 5'-CACTGCCGCATCCTCTTCTC-3' 下游引物 5'-CTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3' 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 (TM 51 $^{\circ}$ C, EPCR 54 $^{\circ}$ C, β -actin 与目的基因相同) 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ 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。

1.5 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, 方差不齐时采用秩和检验, 相关性分析采用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 C 组大鼠的肺组织结构

完整, 无炎症细胞渗出。PQ 组肺间隔增厚, 肺泡壁断裂, 大量中性粒细胞等炎症细胞浸润, 且随时间的延长炎性细胞浸润增多, 肺组织损伤程度加重。

2.2 血清 IL-1 β 水平

PQ 组血清 IL-1 β 水平较 C 组显著增加 ($P < 0.01$), 见表 1。

2.3 鼠肺组织 TM 和 EPCR mRNA 表达

PQ 组 TM 和 EPCR mRNA 水平在 1 d 达高峰之后下降, 第 3 天基本恢复到 C 组水平, 与 C 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1~3。

2.4 IL-1 β TM 和 EPCR 表达的相关性经 Pearson 法直线相关分析发现

PQ 组 IL-1 β 表达与 TM 灰度值间呈正相关 ($P < 0.01$); IL-1 β 表达与 EPCR 灰度值间呈正相关 ($P < 0.01$)。

3 讨论

目前百草枯所致急性肺损伤机制尚不十分清楚, 认为其可通过多种途径、多种机制损伤肺组织。研究认为氧化应激、炎症反应、凝血和细胞凋亡等均参与了 PQ 致肺损伤^[3]。

表 1 各组鼠肺组织中 IL-1 β 、TM mRNA 和 EPCR mRNA 的动态表达 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 Comparison of IL-1 β , TM mRNA and EPCR mRNA between two groups at different time points ($\bar{x} \pm s$)

组 别	时间点	n	TM mRNA	EPCR mRNA	IL-1 β ($\mu\text{g/mL}$)
C 组	6 h	10	0.89 \pm 0.01	0.94 \pm 0.02	6.25 \pm 1.43
	1 d	10	0.85 \pm 0.03	0.96 \pm 0.01	6.51 \pm 1.30
	3 d	10	0.90 \pm 0.02	0.91 \pm 0.02	6.84 \pm 1.52
PQ 组	6 h	10	1.27 \pm 0.21 $^{\Delta}$	1.18 \pm 0.15 $^{\Delta}$	9.92 \pm 2.12 $^{\Delta}$
	12 h	10	1.51 \pm 0.28 $^{\Delta}$	1.35 \pm 0.25 $^{\Delta}$	11.86 \pm 2.64 $^{\Delta}$
	1 d	10	1.72 \pm 0.36 $^{\Delta}$	1.67 \pm 0.32 $^{\Delta}$	13.57 \pm 2.95 $^{\Delta}$
	3 d	10	1.05 \pm 0.16 $^{\Delta}$	1.17 \pm 0.13 $^{\Delta}$	15.93 \pm 3.23 $^{\Delta}$
	5 d	10	0.91 \pm 0.01	0.97 \pm 0.01	12.46 \pm 2.58 $^{\Delta}$
	7 d	10	0.85 \pm 0.04	0.95 \pm 0.02	8.86 \pm 1.24

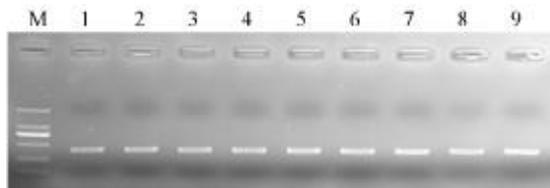
与 C 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$.



图 1 各组不同时间点 EPCR mRNA 表达水平

Fig. 1 Expression of EPCR mRNA at different time points in two groups

M:maker; 1、2、3、4、5、6:PQ 组 6 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d 的表达; C 组为 6 h、1 d、3 d.

图 2 各组不同时间点 β -actin mRNA 表达水平Fig. 2 Expression of β -actin mRNA at different time points in two groups

M:maker; 1、2、3、4、5、6:PQ 组 6、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d 的表达; C 组为 6 h、1 d、3 d.

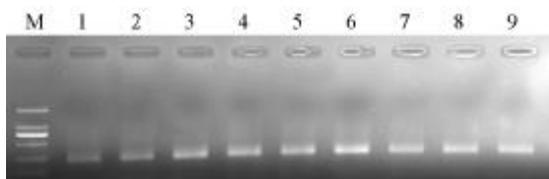


图 3 不同时间点各组 TM mRNA 表达水平

Fig. 3 Expression of TM mRNA at different time points in two groups

M:maker; 1、2、3、4、5、6:PQ 组 6 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d 的表达; C 组为 6 h、1 d、3 d.

IL-1 β 为常见的一种炎症因子, 作用于内皮细胞后可引起内皮细胞结构功能障碍, 内皮细胞损害与多器官功能障碍综合征发生发展有关^[4]. Barbieri SS 等^[5]研究表明 IL-1 β 可通过 VE-cadherin 途径增加内皮细胞通透性, 损害内皮细胞完整性. 张明逸等^[6]研究表明 IL-1 β 可明显抑制在人脐静脉内皮细胞 (ECV304) 上 EPCR 的表达, 从而进一步影响 ECV304 细胞功能和结构.

TM-APC-EPCR 作为最先感受机体内环境变化的抗凝系统, 在血栓形成、创伤愈合、凝血-抗凝血及炎症反应等方面中发挥多种生理功能. TM 为跨膜蛋白分布于血管内皮细胞表面, 特别在人肺、肾及胎盘中分布甚广. EPCR 是一类普遍表达于各类内皮细胞上的膜蛋白, 具有抗凝抗炎等作用, 是内皮细胞保持结构功能完整的分子基础之一. 当凝血系统激活时, 凝血酶原活化成凝血酶, TM-凝血酶形成复合物而启动蛋白 C 系统, 活化蛋白 C (APC) 可灭活凝血因子 Va 和 VIIIa, 从而产生抗凝作用. 内皮细胞表面的 EPCR 可使蛋白 C 活化水平极大增强, 阻止血栓进一步形成. EPCR 与 APC 结合后也可激活蛋白酶激活受体 (PAR-1), 同时激活磷酸鞘氨醇受体 1 (S1P) 及鞘氨醇激酶 1 (SK1) 信号通路来发挥抗炎保护内皮细胞的作用. 研究发现^[7]EPCR-APC 有抑制败血症动物模型体内炎症因子的增加、抑制白细胞趋化和粘附、减少内皮细胞凋亡、帮助维持内皮细胞屏障功能. 另有研究表明^[8], 凝血酶-TM 复合物可抑制补体 C3 和 C5 作用、抑制缓激肽的产生及 TNF- α 和 IL-1 β 的释放从而产生抗炎作用.

结果表明, 百草枯中毒所致急性肺损伤模型中 IL-1 β 、TM 及 EPCR 均有表达, 这与大多数研究结果一致. C 组肺组织 TM mRNA、EPCR mRNA 有一定水平的表达; PQ 组 TM mRNA、EPCR mRNA

表达增强,第 1 天达高峰之后下降,第 3 天基本恢复到 C 组水平;相应时间点的肺组织病理损伤加重。IL-1 β 表达与 TM 呈正相关;IL-1 β 表达与 EPCR 呈正相关。可能的机制其一 PQ 氧自由基损伤肺组织表现为肺毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤,造成弥漫性肺间质和肺泡水肿,同时外源性凝血因子组织因子被激活及启动炎症反^[9]。另外 PQ 中毒时,核结合因子 $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) 与核启动子区域的结合增强,启动应激反应蛋白合成^[10]。

实验提示 TM-EPCR 系统及 IL-1 β 均参与 PQ 所致肺损伤过程,且二者相互影响。两系统的焦点之一为 APC,在目前 PQ 中毒所致肺损伤无特效治疗的环境下,笔者是否可以设想以 APC 为药物治疗该病。这将成为课题组下一步研究方向,如果取得阳性结论将为,将为临床治疗 PQ 中毒提供依据。

[参考文献]

- [1] 李敬,王岚,王璞. 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] MOSNIER L O, GRIFFIN J H. Protein C anticoagulant activity in relation to anti-inflammatory and anti-apoptotic activities[J]. Front Biosci, 2006, 11(16): 2 381 - 2 399.
- [3] FEMANDES A F, ZHOU J, ZHANG X, et al. Oxidative in-activation of the proteasome in retinal pigment epithelial cell: A potential link between oxidative stress and upregulation of IL-8 [J]. J Biol Chem, 2008, 28 (3): 20 745 - 20 753.
- [4] 丁梦杰, 张明智. 外周 T 细胞淋巴瘤治疗进展[J]. 中国实用医刊, 2010, 37(9): 58 - 60.
- [5] RILEY K. FDA approves first drug for treatment of peripheral T-cell Lymphoma [J]. Mol Cell Pharmacol, 2009, 1 (4): 230-232.
- [6] 张明逸, 卢国元. IL-1 β 对人脐静脉内皮细胞蛋白 C 受体表达的影响[J]. 中国血液流变学杂志, 2013, 23(1): 24 - 26.
- [7] OBRIEN L A, GUPTA A, GRINNELL B W. Activated protein C and sepsis [J]. Frontiers in Bioscience, 2006, 11 (1): 676 - 698.
- [8] MYLES T, NISHIMURA T, YUN T H, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, a potential regulator of vascular inflammation [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (51): 51 059 - 51 067.
- [9] 卢中秋, 贺晓艳, 洪广亮. 《百草枯中毒大鼠肺组织血栓调节蛋白和内皮细胞蛋白 C 受体表达的变化及二巯丙磺钠的作用》[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2009, 8 (27): 453 - 456.
- [10] ISHIDA Y, TAKAYASU T, KIMURA A, et al. Gene expression of cytokines and growth factors in the lung after paraquat administration in mice [J]. Leg Med, 2006, 8 (12): 102 - 109.

(2014-02-16 收稿)