

# 百草枯中毒急性肺损伤的作用机制及丙酮酸乙酯干预研究

廖泳, 吴晓飞, 王芳莉, 徐波, 陆国玉, 张晓华

(蚌埠医学院第一附属医院急诊内科, 安徽 蚌埠 233040)

**摘要:**目的 探讨高迁移组蛋白 B1 (HMGB1)/Toll 样受体 4 (TLR-4) 在百草枯 (PQ) 中毒导致急性肺损伤作用机制及丙酮酸乙酯 (EP) 干预研究。方法 将 90 只 SD 大鼠均分为对照组、百草枯中毒组、丙酮酸乙酯治疗组, 建立大鼠急性百草枯中毒动物模型后, 分别于实验后的 6、12、24、48 h、3 d 每组随机处死 6 只大鼠, 检测三组大鼠肺组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、HMGB1、白细胞介素-1 (IL-1) 和 TLR-4 mRNA 变化; 并测定三组大鼠血清中丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性变化。结果 与对照组相比, PQ 中毒组和 EP 治疗组染毒后 6、12、24、48 h、3 d 各时间点, 肺组织 TNF- $\alpha$  mRNA、HMGB1 mRNA、IL-1 mRNA、TLR-4 mRNA 的表达量和丙二醛含量明显升高 (均  $P < 0.05$ ), SOD 活力降低 (均  $P < 0.05$ ); 与 PQ 中毒组相比, EP 治疗组在染毒后 12、48 h 时间点大鼠肺组织 HMGB1 mRNA、TLR-4 mRNA、IL-1 mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA 表达量及血清 MDA 含量均降低 (均  $P < 0.05$ ), 血清 SOD 活力均升高 (均  $P < 0.05$ )。结论 百草枯中毒急性肺损伤的机制主要与氧化应激、细胞膜脂质过氧化及免疫系统炎症级联放大效应有关, 丙酮酸乙酯可通过抑制该过程从而减轻急性肺损伤程度。

**关键词:** 百草枯; 高迁移组蛋白 B1; Toll 样受体 4; 丙酮酸乙酯; 急性肺损伤

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2017.04.011

## Mechanism of acute lung injury induced by paraquat poisoning and the intervention treatment of ethyl pyruvate

LIAO Yong, WU Xiaofei, WANG Fangli, XU Bo, LU Guoyu, ZHANG Xiaohua

(Department of Emergency, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233040, China)

**Abstract:** **Objective** To study the mechanism of high mobility group box-1 (HMGB1)/Toll-like receptor 4 (TLR-4) in acute lung injury induced by paraquat poisoning and the intervention treatment of ethyl pyruvate. **Methods** Ninety SD rats were equally assigned into control group, paraquat poisoning (PQ) group and ethyl pyruvate (EP) treatment group. After establishment of the animal model of acute paraquat poisoning, six rats in each group were sacrificed randomly at 6, 12, 24, 48 h and 3 d, respectively. The expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), HMGB1, interleukin-1 (IL-1) and TLR-4 mRNA in the lung tissue of three groups were observed, and malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) activity in the serum were measured. **Results** Compared with control group, the expressions of TNF- $\alpha$  mRNA, HMGB1 mRNA, IL-1 mRNA, TLR-4 mRNA and MDA contents in 6, 12, 24, 48 h and 3 d after poisoning in PQ group and EP group were significantly increased (all  $P < 0.05$ ), and the SOD activities were significantly decreased (all  $P < 0.05$ ). Compared with PQ group, the expressions of TNF- $\alpha$  mRNA, HMGB1 mRNA, IL-1 mRNA, TLR-4 mRNA and MDA contents in 24 h and 48 h after poisoning in EP group were significantly decreased (all  $P < 0.05$ ), and the SOD activities were significantly increased (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** The mechanism of acute lung injury induced by paraquat poisoning was mainly related to oxidative stress, lipid peroxidation of cell membrane and cascade amplification of inflammation reaction, and EP exerted significant protective effect in acute lung injury through inhibiting these pathways.

**Key words:** Paraquat; HMGB1; TLR-4; Ethyl pyruvate; Acute lung injury

百草枯 (Paraquat, PQ) 是有效的并被广泛应用的除草剂, 合理应用于消除杂草已被证明是安全的。然而, 在世界范围内, 作为一种强大的人类毒药, 其最具特征的毒性作用是迅速进展的弥漫性肺损伤, 并不可逆进展为肺纤维化, 后期多死于呼吸

衰竭。虽然各国学者对百草枯中毒的机制作了广泛深入的研究, 但至今仍未完全明了 PQ 中毒机制, 亦无有效拮抗药物, 因而 PQ 中毒病死率极高, 现有的研究表明 PQ 可造成机体一系列氧化应激反应、细胞膜脂质过氧化和免疫系统炎症级联反应。

高迁移组蛋白 B1 (High Mobility Group Box-1, HMGB1) 近年被发现为一种参与晚期炎症反应的细胞因子, 是启动炎症级联反应、放大炎症反应效应的中心分子。已有诸多研究显示 HMGB1 在 PQ

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究项目 (KJ2015B108by)

通信作者: 吴晓飞, 男, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 急重症感染、中毒救治, E-mail: Wuxiaofei@medmail.com.cn

中毒病人肺损伤中发挥重要作用。HMGB1 可与 Toll 样受体 4 (TLR-4)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 (IL-1) 等炎症因子间相互作用,促使炎症信号不断放大,造成炎症级联反应损伤。丙酮酸乙酯 (Ethyl Pyruvate, EP) 是一种有效的 HMGB1 释放抑制剂,可抑制炎症因子产生,并降低感染后期致炎因子 HMGB1 的释放,具有抗氧化效应。

本研究通过建立大鼠急性 PQ 中毒模型,观察中毒后肺组织中 HMGB1 mRNA、TLR4 mRNA、IL1 mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA 等表达量,血清中丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的变化以及 EP 干预后上述指标的变化,探究 PQ 致急性肺损伤的发生机制以及 EP 干预治疗的作用与疗效。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 清洁级 8~12 周龄 SD 雄性大鼠 90 只,体质量 200~300 g,由上海杰思捷实验动物有限公司提供,饲料由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供。PQ20% 水溶液(商品名克无踪),由先正达南通作物保护有限公司提供。SOD 测试盒及 MDA 测试盒,由南京建成生物工程研究所提供。EP 由百灵威科技有限公司提供;无液氮 RNA 样品储存液由上海捷瑞生物工程有限公司提供。RNA 抽提试剂盒由上海生工生物工程有限公司提供;反转录试剂由美国赛默飞世尔科技公司提供;定量 PCR 试剂购自 Vazyme biotech 的 Q141-02/03。

荧光实时定量 PCR 扩增仪采用德国 Roche Light Cycler 480;酶标仪采用美国伯腾仪器有限公司的 Synergy HT,分光光度计采用进口的 onedrop。

**1.2 实验动物分组与模型的建立** 将 90 只 SD 大鼠,饲养 1 周后分为对照组 30 只、PQ 中毒组 30 只、EP 治疗组 30 只。以 20% PQ 水剂稀释后  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量灌入 PQ 中毒组和 EP 治疗组大鼠胃内,建立大鼠急性 PQ 中毒模型 60 只,对照组大鼠灌胃同等容量的生理盐水。其中 EP 治疗组 30 只 SD 大鼠在 PQ 灌胃 0.5 h 后,予  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  EP 溶于乳酸钠林格液中、腹腔注射。后随机在温度  $20 \sim 26^\circ\text{C}$ ,湿度 40%~60% 的环境饲养,每天定时开箱 30 min,添加水、饲料及更换垫料。实验 6 h 后尾静脉抽血测定 PQ 浓度,并分别于实验后的 6、12、24 h、3、7 d 每组随机处死 6 只。

**1.3 标本采集** 以 10% 水合氯醛腹腔注射 ( $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 麻醉各组大鼠,剖开腹部后抽出腹主动脉血 4 mL 离心取血清,打开胸部,分离肺组织置 RNA 保存液中保存。

## 1.4 检验方法

**1.4.1 百草枯浓度检测** 于大鼠灌药后 6 h 用高效液相色谱法检测每只中毒 SD 大鼠尿中 PQ 浓度,淘汰没有中毒或 PQ 浓度太高大鼠。

**1.4.2 SOD 及 MDA 含量检测** 用大鼠腹主动脉血 4 mL 离心后取血清,检测 SOD 及 MDA 含量,分别采用黄嘌呤氧化酶法及硫代巴比妥酸法测定,由南京建成生物工程制品研究生提供试剂盒,全部操作按说明书进行。

**1.4.3 大鼠肺组织 HMGB1、TLR-4、IL-1、TNF- $\alpha$  的检测** HMGB1、TLR-4、IL-1、TNF- $\alpha$  的检测采用 SYBR Green I 法实时荧光定量 PCR (相对定量) 进行 mRNA 表达量分析,方法为:(1) RNA 的提取:取大鼠肺组织 50 mg,用液氮研磨成粉末,按照 RNA 抽提试剂盒说明书进行 RNA 提取,经微量分光光度计测定波长 260/280 nm 的吸光值,浓度及纯度均符合反转录要求。(2) 反转录合成 cDNA:反转录体系及实验步骤:40  $\mu\text{L}$  反转录体系,各组分如下,Random Primer ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ;总 RNA 5  $\mu\text{g}$ ;RNase free  $\text{H}_2\text{O}$ ,补足至 26  $\mu\text{L}$ ,以上组分混匀于  $65^\circ\text{C}$  水浴 5 min,后立刻置冰上 5 min。继续加以下各组分:5  $\times$  M-MLV Buffer 8  $\mu\text{L}$ ;dNTP Mixture (各 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ;M-MLV 2  $\mu\text{L}$ ;RNase Inhibitor 2  $\mu\text{L}$ ,混匀后置  $42^\circ\text{C}$  金属浴中孵育 1.5 h,得到第一链 cDNA,进行后续 qPCR 反应。(3) 荧光定量 PCR 扩增:所用引物从上海生物工程有限公司合成,以大鼠 GAPDH 为内参。引物序列如下:IL-1 (上游引物序列为 5'-AAAAATGCCTCGTGCTGTCT-3',下游引物序列为 5'-TCGTTGCTTGCTCTCTCCTTG-3'),扩增产物长度 118 bp;TLR4 (上游引物序列为 5'-GAGGACTGGGTGAGAAACGA-3',下游引物序列为 5'-AGCCTTCCT GGATGATGTTG 3'),扩增产物长度 127 bp;TNF- $\alpha$  (上游引物序列为 5'-GTAGCA AAC-CACCAAGCAGA-3',下游引物序列为 5'-TT-GAAGAGAACCTGGGACTAGA-3'),扩增产物长度 146 bp;HMGB1 (上游引物序列为 5'-AGTTC AAG-GACCCCAATGC-3',下游引物序列为 5'-TTTCTTCG-CAACATCACCAA-3'),扩增产物长度 122 bp。Real-Time PCR 反应体系及步骤:20  $\mu\text{L}$  反应体系优化方案如下,2  $\times$  SYBR Premix EX-Taq Mix 10  $\mu\text{L}$ ;QF ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.8  $\mu\text{L}$ ;QR ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.8  $\mu\text{L}$ ;cDNA 2  $\mu\text{L}$ ;RNase Free  $\text{dH}_2\text{O}$  加至 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件优化方案如下:预变性,  $95^\circ\text{C}$ , 10 min;  $95^\circ\text{C}$ , 10 s,  $60^\circ\text{C}$ , 40 s, PCR 扩增 40 cycle;  $95^\circ\text{C}$ , 1 min,  $55^\circ\text{C}$ , 30 s, 每个基因 (目的基因和内参基因) 及阴性对照

(NTC)均做3个重复,取3次测定的Ct平均值为该样本的Ct值,基因的表达采用相对定量法计算,按公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

**1.5 统计学方法** 所有数据采用SPSS18.0软件处理,各组计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, HMGB1、TLR-4、IL-1、TNF- $\alpha$ 、SOD及MDA采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 百草枯大鼠中毒表现** 大鼠PQ中毒后3 h~3 d内反应最明显,主要表现为灌药后精神萎靡,反应迟钝,呼吸困难,肢体软趴、无力,捕捉时无抵抗,不摄食,毛发凌乱、歪倒、蓬松,尾巴发绀。百草枯中毒组大鼠在灌药24 h后陆续死亡6只大鼠,丙酮酸乙酯治疗组在灌药后36 h后陆续死亡2只大鼠,对照组无大鼠死亡。

**2.2 肺组织中TNF- $\alpha$  mRNA表达量** 与对照组比较,PQ中毒组和EP治疗组肺组织在染毒后6、12、24、48 h及3 d各时间点,TNF- $\alpha$  mRNA的表达量均明显升高(均 $P < 0.05$ );与PQ中毒组比较,EP治疗组在染毒后12 h及48 h时间点TNF- $\alpha$  mRNA

的表达量明显下降(均 $P < 0.05$ ),见表1。

**2.3 肺组织中HMGB1 mRNA表达量** 与对照组比较,PQ中毒组和EP治疗组肺组织在染毒后6、12、24、48 h及3 d时间点,HMGB1 mRNA的表达量均明显升高(均为 $P < 0.05$ );与PQ中毒组比较,EP治疗组在染毒后12 h及48 h时间点,HMGB1 mRNA的表达量明显下降(均为 $P < 0.05$ ),见表2。

**2.4 肺组织中IL-1 mRNA表达量** 与对照组比较,PQ中毒组和EP治疗组肺组织在染毒后6、12、24、48 h及3 d时间点,IL-1 mRNA的表达量均明显升高(均 $P < 0.05$ );与PQ中毒组比较,EP治疗组在染毒后12 h及48 h时间点,IL-1 mRNA的表达量明显下降(均 $P < 0.05$ ),见表3。

**2.5 肺组织中TLR-4 mRNA表达量** 与对照组比较,PQ中毒组和EP治疗组肺组织在染毒后6、12、24、48 h及3 d时间点,TLR-4 mRNA的表达量均明显升高(均 $P < 0.05$ );与PQ中毒组比较,EP治疗组在染毒后12 h及48 h时间点,TLR-4 mRNA的表达量明显下降(均 $P < 0.05$ ),见表4。

表1 不同时间点大鼠肺组织TNF- $\alpha$  mRNA表达量的比较/ $\bar{x} \pm s$

| 组别    | 鼠数/只 | 6 h                          | 12 h                          | 24 h                         | 48 h                          | 3 d                          |
|-------|------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 对照组   | 30   | 0.99 $\pm$ 0.05              | 1.06 $\pm$ 0.08               | 1.03 $\pm$ 0.09              | 1.02 $\pm$ 0.06               | 1.07 $\pm$ 0.10              |
| PQ中毒组 | 30   | 1.36 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup> | 2.41 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>  | 1.64 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup> | 1.50 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>  | —                            |
| EP治疗组 | 30   | 1.65 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup> | 1.49 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup> | 1.84 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup> | 1.26 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup> | 3.58 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup> |
| F值    |      | 18.036                       | 50.119                        | 44.996                       | 16.236                        | 825.647                      |
| P值    |      | <0.001                       | <0.001                        | <0.001                       | <0.001                        | <0.001                       |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与PQ中毒组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表2 不同时间点大鼠肺组织中HMGB1 mRNA表达量的比较/ $\bar{x} \pm s$

| 组别    | 鼠数/只 | 6 h                          | 12 h                          | 24 h                         | 48 h                          | 3 d                          |
|-------|------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 对照组   | 30   | 1.08 $\pm$ 0.07              | 1.09 $\pm$ 0.09               | 1.03 $\pm$ 0.05              | 1.09 $\pm$ 0.06               | 1.14 $\pm$ 0.11              |
| PQ中毒组 | 30   | 1.43 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup> | 1.72 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>  | 1.85 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup> | 1.91 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>  | —                            |
| EP治疗组 | 30   | 1.62 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup> | 1.41 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup> | 2.12 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup> | 1.43 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup> | 2.29 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup> |
| F值    |      | 17.860                       | 17.540                        | 19.390                       | 81.083                        | 101.719                      |
| P值    |      | <0.001                       | <0.001                        | <0.001                       | <0.001                        | <0.001                       |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与PQ中毒组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表3 不同时间点大鼠肺组织IL-1 mRNA表达量的比较/ $\bar{x} \pm s$

| 组别    | 鼠数/只 | 6 h                          | 12 h                          | 24 h                         | 48 h                          | 3 d                          |
|-------|------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 对照组   | 30   | 1.11 $\pm$ 0.08              | 1.07 $\pm$ 0.07               | 1.04 $\pm$ 0.04              | 1.06 $\pm$ 0.06               | 1.02 $\pm$ 0.02              |
| PQ中毒组 | 30   | 6.41 $\pm$ 2.77 <sup>a</sup> | 9.66 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>   | 7.31 $\pm$ 1.32 <sup>a</sup> | 3.77 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>  | —                            |
| EP治疗组 | 30   | 8.28 $\pm$ 2.00 <sup>a</sup> | 5.41 $\pm$ 1.06 <sup>ab</sup> | 8.72 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup> | 2.99 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup> | 9.22 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup> |
| F值    |      | 21.230                       | 171.679                       | 119.041                      | 55.092                        | 5 141.260                    |
| P值    |      | <0.001                       | <0.001                        | <0.001                       | <0.001                        | <0.001                       |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与PQ中毒组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

**2.6 血清中 MDA 含量** 与对照组比较,PQ 中毒组和 EP 治疗组在染毒后 6、12、24、48 h 及 3 d 时间点,血清中 MDA 的含量均明显升高(均  $P < 0.05$ );与 PQ 中毒组比较,EP 治疗组在染毒后 12 h 及 48 h 时间点,MDA 的含量明显下降(均为  $P < 0.05$ ),见表 5。

**2.7 血清中 SOD 活性水平** 与对照组比较,PQ 中毒组和 EP 治疗组在染毒后 6、12、24、48 h 及 3 d 时间点,血清中 SOD 的活性均明显降低(均  $P < 0.05$ );与 PQ 中毒组比较,EP 治疗组在染毒后 12 h 及 48 h 时间点,血清中 SOD 的活性明显上升(均  $P < 0.05$ ),见表 6。

### 3 讨论

目前 PQ 中毒无特效解毒药物,病死率极高。PQ 中毒后对各个组织器官均可造成不同程度的损害,其中最严重的是对肺脏的毒性损害。其对肺的毒性作用表现为急性肺水肿、肺充血、急性呼吸窘迫综合征等,并进一步发展为肺纤维化,最终多因呼吸衰竭死亡<sup>[1-2]</sup>。目前认为氧化应激、脂质过氧化反应及免疫炎症级联反应在 PQ 中毒所致的肺纤维化进展中起着重要作用。

PQ 通过肺泡 II 型上皮细胞的聚胺转运体选择性的在肺内浓聚<sup>[3-4]</sup>。氧化应激反应是百草枯中毒致肺纤维化的主要起始机制之一,PQ 进入肺组织后被还原成分子基团  $PQ^+$ , $PQ^+$  被氧化形成超氧阴离子,通过 SOD 的歧化作用转化为过氧化氢,最终过氧化氢可通过各种作用破坏正常的肺组织<sup>[5]</sup>。氧化应激过程中产生的活性氧类可与细胞膜的多不饱和脂肪酸发生反应,最终生成脂质过氧化物,脂质过氧化物将破坏肺组织细胞膜结构<sup>[4]</sup>。氧化应激水平的客观指标包括抗氧化产物与活性氧产物之间比例,SOD 是体内清除自由基的重要抗氧化酶,其含量高低反映了机体清除自由基和抗脂质过氧化的能力;MDA 是常见的脂质过氧化的最终产物,可反映体内脂质氧化所产生的活性氧水平<sup>[6]</sup>。本研究显示与对照组比较,PQ 中毒组大鼠在染毒后各个时间点,肺组织 SOD 活力降低,MDA 含量升高。这表明大鼠发生急性百草枯中毒时,肺组织抗氧化的 SOD 活性下降,氧化应激反应较明显,产生的氧自由基增多,进而脂质过氧化反应剧烈,生成的 MDA 含量增加,MDA 与 SOD 比值失衡,最终使氧化应激反应产物攻击肺组织细胞膜导致肺损伤。

表 4 不同时间点大鼠肺组织 TLR-4 mRNA 表达量的比较/ $\bar{x} \pm s$

| 组别     | 鼠数/只 | 6 h                      | 12 h                      | 24 h                     | 48 h                      | 3 d                      |
|--------|------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 对照组    | 30   | 1.05 ± 0.04              | 1.02 ± 0.02               | 1.06 ± 0.04              | 1.00 ± 0.02               | 1.03 ± 0.03              |
| PQ 中毒组 | 30   | 1.26 ± 0.14 <sup>a</sup> | 1.63 ± 0.15 <sup>a</sup>  | 1.66 ± 0.24 <sup>a</sup> | 1.52 ± 0.19 <sup>a</sup>  | —                        |
| EP 治疗组 | 30   | 1.34 ± 0.07 <sup>a</sup> | 1.31 ± 0.06 <sup>ab</sup> | 1.87 ± 0.16 <sup>a</sup> | 1.26 ± 0.12 <sup>ab</sup> | 1.69 ± 0.24 <sup>a</sup> |
| F 值    |      | 15.272                   | 62.115                    | 38.024                   | 23.578                    | 49.261                   |
| P 值    |      | <0.001                   | <0.001                    | <0.001                   | <0.001                    | <0.001                   |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 PQ 中毒组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表 5 不同时间点大鼠血清中 MDA 活性的比较/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}, \bar{x} \pm s)$

| 组别     | 鼠数/只 | 6 h                       | 12 h                       | 24 h                      | 48 h                       | 3 d                       |
|--------|------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 对照组    | 30   | 12.44 ± 2.21              | 11.40 ± 1.32               | 12.17 ± 2.23              | 11.44 ± 1.44               | 12.02 ± 2.91              |
| PQ 中毒组 | 30   | 20.09 ± 1.01 <sup>a</sup> | 17.46 ± 2.39 <sup>a</sup>  | 25.47 ± 2.77 <sup>a</sup> | 18.81 ± 2.97 <sup>a</sup>  | —                         |
| EP 治疗组 | 30   | 20.53 ± 1.33 <sup>a</sup> | 14.35 ± 0.83 <sup>ab</sup> | 28.14 ± 1.85 <sup>a</sup> | 15.41 ± 1.52 <sup>ab</sup> | 17.03 ± 1.17 <sup>a</sup> |
| F 值    |      | 48.342                    | 20.298                     | 82.028                    | 18.512                     | 10.377                    |
| P 值    |      | <0.001                    | <0.001                     | <0.001                    | <0.001                     | <0.001                    |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 PQ 中毒组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表 6 不同时间点大鼠血清中 SOD 活性的比较/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}, \bar{x} \pm s)$

| 组别     | 鼠数/只 | 6 h                         | 12 h                         | 24 h                        | 48 h                         | 3 d                         |
|--------|------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 对照组    | 30   | 378.10 ± 11.43              | 372.00 ± 11.81               | 368.77 ± 9.21               | 373.34 ± 11.27               | 371.30 ± 10.85              |
| PQ 中毒组 | 30   | 348.47 ± 12.47 <sup>a</sup> | 267.38 ± 16.55 <sup>a</sup>  | 263.08 ± 17.17 <sup>a</sup> | 317.79 ± 16.61 <sup>a</sup>  | —                           |
| EP 治疗组 | 30   | 326.30 ± 26.78 <sup>a</sup> | 333.07 ± 18.30 <sup>ab</sup> | 257.69 ± 11.72 <sup>a</sup> | 343.66 ± 18.25 <sup>ab</sup> | 239.88 ± 13.77 <sup>a</sup> |
| F 值    |      | 12.117                      | 67.27                        | 136.669                     | 18.901                       | 286.513                     |
| P 值    |      | 0.001                       | <0.001                       | <0.001                      | <0.001                       | <0.001                      |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 PQ 中毒组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

HMGB1 是一组真核生物普遍存在的、高度保守的、非组蛋白构成的核蛋白。它能激活炎性细胞炎症部位聚集,促进炎性细胞分泌大量炎性因子,造成组织损伤。HMGB1 作为晚期炎症因子,分泌释放时间明显晚于 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等其他促炎因子。HMGB1 在 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等早期促炎因子刺激下,由单核/巨噬细胞可释放;而 HMGB1 的释放又可刺激 TNF- $\alpha$  和 IL-1 的分泌。HMGB1 与 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等炎性因子间的相互作用,可促使炎性信号不断放大,造成炎性级联反应,损伤机体组织<sup>[7]</sup>。本研究显示与对照组比较,PQ 中毒组大鼠在染毒后各个时间点,肺组织 HMGB1 mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA 以及 IL-1 mRNA 的表达量均明显升高,表明 HMGB1、TNF- $\alpha$  以及 IL-1 参与了 PQ 中毒急性肺损伤的免疫炎性级联反应过程。

在炎性免疫反应中,TLR4 是 HMGB1 介导细胞因子释放所必需的。HMGB1 与释放的 TLR4 结合后,引起 NF- $\kappa$ B 抑制酶信号小体的激活与活化,释放 NF- $\kappa$ B 核转录因子活化蛋白,激活细胞释放大量炎性细胞因子<sup>[8-9]</sup>。本研究中与对照组比较,PQ 中毒组大鼠在染毒后各个时间点,肺组织 TLR-4 mRNA 的表达量均明显升高,表明 TLR-4 亦参与了 PQ 中毒急性肺损伤的免疫炎性级联反应过程。

近年来发现,EP 是一种有效的 HMGB1 释放抑制剂,其作用包括:抑制炎症早期单核巨噬细胞分泌细胞因子 IL-1、IL-6、IL-8 及 TNF- $\alpha$ ,并减少感染后期炎性细胞因子 HMGB1 释放,降低炎性反应中 NF- $\kappa$ B 活性,显著的抗氧化效应<sup>[10-12]</sup>。本研究发现,EP 治疗组大鼠在中毒后 12 h、48 h 时间点,肺组织 HMGB1 mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA、TLR-4 mRNA 以及 IL-1 mRNA 的表达量及血清 MDA 含量低于中毒组,而 SOD 活性高于中毒组;中毒组大鼠在中毒后 3 d 时间点因中毒死亡较多无法测量上述相关数据,而 EP 治疗组大鼠在中毒后 3 d 时间点尚有 4 只大鼠存活。本研究中 EP 治疗组大鼠在中毒后 6 h 及 24 h 时间点上数据不理想可能与 EP 给药时间、剂量及给药方式有关。本研究提示 EP 能通过降低 PQ 中毒大鼠肺组织氧化应激及脂质过氧化水平,抑制 HMGB1 mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA、TLR-4 mRNA

以及 IL-1 mRNA 的表达,进一步控制中毒后肺组织氧化应激反应、免疫炎性级联反应从而减轻急性肺损伤程度,但其给药时间、剂量及给药方式尚需进一步试验研究以明确。

## 参考文献

- [1] JIAN XD, LI M, ZHANG YJ, et al. Role of growth factors in acute lung injury induced by paraquat in a rat model[J]. Hum Exp Toxicol, 2011, 30(6):460-469.
- [2] NING Q, JIAN XD, LIU J, et al. Experimental therapy of penicillidine hydrochloride on paraquat-induced acute lung injury[J]. Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, 2010, 28(9):667-670.
- [3] RIAHI B, RAFATPANAH H, MAHMOUDI M, et al. Immunotoxicity of paraquat after subacute exposure to mice[J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(6):1627-1631.
- [4] QIAN J, YE Y, LV L, et al. FTY720 attenuates paraquat-induced lung injury in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 21(2):426-431.
- [5] CHENG ZQ. Edaravone attenuates paraquat-induced lung injury by inhibiting oxidative stress in human type II alveolar epithelial cells[J]. World Journal of Emergency Medicine, 2012, 3(1):55.
- [6] 孟潇潇, 刘刊, 谈玖婷, 等. 百草枯中毒大鼠肺纤维化与内质网应激的关系[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(6):331-334.
- [7] 奉有才, 邓耀良, 陶芝伟, 等. 高迁移率族蛋白 B1 对磷酸钙诱导巨噬细胞释放炎症因子的协同作用[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(33):5317-5322.
- [8] 王福财, 谢勇. HMGB1/TLR 信号通路在 H. pylori 感染中作用的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(32):3526-3531.
- [9] 黄鹏, 吴河水. 重症胰腺炎大鼠肝损伤 HMGB1/TLR4 mRNA 的表达[J]. 疑难病杂志, 2012, 11(11):854-856.
- [10] 邓楠, 杨光伟, 李小刚. 丙酮酸乙酯对脑出血大鼠血清肿瘤坏死因子  $\alpha$  和白介素 6 水平的影响[J]. 实用心脑血管病杂志, 2015, 23(2):49-52.
- [11] ALGIERI F, RODRIGUEZ-NOGALES A, GARRIDO-MESA J, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of calcium pyruvate in the TNBS model of rat colitis: Comparison with ethyl pyruvate[J]. Biochem Pharmacol, 2016, 103:53-63.
- [12] SHIN JH, KIM ID, KIM SW, et al. Ethyl pyruvate inhibits HMGB1 phosphorylation and release by chelating calcium[J]. Mol Med, 2015, 20:649-657.

(收稿日期:2016-08-30, 修回日期:2016-12-19)