

· 基础研究 ·

# 热休克蛋白 70 在急性百草枯中毒大鼠肺脏中的表达

周从阳, 张志坚<sup>#</sup>, 熊华威

(南昌大学第一附属医院急诊科, 南昌 330006)

**摘要:**目的 检测百草枯(PQ)诱导急性肺损伤(ALI)中肺组织热休克蛋白 70(HSP70)的表达情况。方法 健康雄性 SD 大鼠 36 只, 随机分为对照组( $n=18$ ), ALI 组( $n=18$ )。ALI 组用 PQ 灌胃(200 mg/kg)染毒建立大鼠 ALI 模型。对照组用等量生理盐水灌胃。采用 RT-PCR 检测大鼠肺组织 HSP70 的表达, 比色法检测肺组织髓过氧化物酶(MPO)、伊文蓝(EBD), 观察肺组织病理变化。结果 ALI 组大鼠肺组织 HSP70 的表达在染毒后 12 h 明显增高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 24 h 达高峰。MPO 及 EBD 水平显著增高( $P<0.01$ )。肺组织病理检查可见 PQ 中毒后肺泡壁充血、炎性细胞浸润, 并有局灶性出血。结论 HSP70 在 PQ 中毒后的表达增多, 可能参与了 PQ 诱导的 ALI 后的组织保护作用。

**关键词:**百草枯; HSP70 热休克蛋白类; 呼吸窘迫综合征, 成人; 过氧化物酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.09.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)09-0886-02

## Expression of heat shock protein 70 in lung tissue of acute paraquat-induced rats

Zhou Congyang, Zhang Zhijian<sup>#</sup>, Xiong HuaWei

(Department of Emergency Medicine, First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**Abstract: Objective** To examine the expression of HSP70 in acute lung injury (ALI) induced by paraquat (PQ). **Methods** Thirty-six healthy male SD rats were randomly divided into two groups: control group and ALI group. PQ intragastrically poisoning at the dose of 200 mg/kg made a model of the acute lung injury in Sprague-Dawley (SD) rats. The expression of HSP70 in lung tissue was assayed by RT-PCR. Myeloperoxidase (MPO) and Evens blue dye (EBD) in lung tissues were measured by colorimetry. Pathology of lung tissue was observed. The data were handled by the analysis of variance and NK method using SPSS 12.0. **Results** Compared with control group, the expression level of HSP70 in rats of ALI group increased significantly at any time point, peaking at 24 h post poisoning ( $P<0.05$ ). The levels of MPO and EBD in ALI group significantly increased compared to controls at 24 h after PQ poisoning ( $P<0.01$ ). The pathological changes in lungs of PQ poisoned rats mainly showed congestion, leukocytes infiltration and local hemorrhage. **Conclusion** HSP70 may play a role in the protection of ALI induced by PQ.

**Key words:** paraquat; HSP70 heat-shock proteins; respiratory distress syndrome, adult; peroxidase

百草枯(paraquat, PQ)是目前使用量极大的有机杂环类非选择性触杀型、灭生性除草剂, 是致死性最高的农药<sup>[1]</sup>。肺是 PQ 中毒的主要靶器官, 早期表现为急性肺损伤(ALI), 晚期表现为肺纤维化, 呼吸衰竭是 PQ 中毒的主要死因。目前治疗主要采用白陶土早期洗胃、血流灌流、清除氧自由基、抑制炎症介质释放、激素及免疫抑制等综合措施, 但是仍然未取得好的疗效, 死亡率达到 80% 以上。热休克蛋白(heat shock protein, HSPs)是一种进化上高度保守的蛋白质, 对应激状态下的器官细胞有良好的保护作用, 许多生理、病理因素均可诱导机体产生 HSPs。其中, HSP70 与肺脏生物学关系最为密切。本实验用 PQ 复制 ALI 模型, 通过观察 PQ 中毒大鼠肺组织 HSP70 的表达情况, 探讨其与 ALI 之间的关系。

### 1 材料与与方法

**1.1 材料** 实验动物分组及模型制作, 选择 36 只健康成年雄性 SD 大鼠, 体质量( $220 \pm 40$ ) g。将动物随机分为对照组和 ALI 组, 各 18 只。实验采用 PQ 染毒法建立 ALI 模型。ALI 组 PQ(200 mg/kg)一次性灌胃染毒建立 ALI 模型, 对照组等量无菌生理盐水灌胃。于染毒后 12、24、48 h, 每个时间点两组各 6 只大鼠, 3% 的戊巴比妥(35 mg/kg)腹腔注射麻醉后腹主动脉放血处死, 取肺组织待进一步检查。

### 1.2 方法

**1.2.1 肺组织病理检测** 同取左肺下叶, 多聚甲醛浸泡固定, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜下观察。

**1.2.2 肺血管通透性检查** 通过肺组织伊文蓝(EBD)含量反映肺血管通透性大小。两组大鼠于造模后 24 h 时间点测肺血管通透性, 活杀前 1 h 尾静脉注射浓度为 5 mg/mL 的 EBD 200  $\mu$ L, 1 h 后开胸, 向右心室缓慢注射 PBS 10 mL, 同取左肺上叶, 称重, 60  $^{\circ}$ C 烘干 24 h, 然后置于 60  $^{\circ}$ C 甲酰胺 3 mL 中 36 h 提取 EBD, 分光光度法(波长 620 nm)定量分析。

**1.2.3 肺组织髓过氧化物酶(MPO)测定** MPO 试剂盒购于南京建成生物工程研究所, 同取左肺中叶按试剂盒说明书进行 MPO 活性水平检测。MPO 可以反映多核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMNs)浸润激活程度。

**1.2.4 RT-PCR 检测肺组织 HSP70** 同取右肺上叶行 HSP70 mRNA 表达的测定, 按 TRNzol 试剂说明书提取组织总 RNA。逆转录引物由天根生化科技(北京)有限公司合成。HSP70 基因上游引物 5'-AAC GTG CTG CGG ATC ATC AA-3', 下游引物 5'-CTG GAT GGA CGT GTA GAA GT-3'。 $\beta$ -action 上游 5'-TCA GGT CAC TAT CGG CAA T-3', 下游 5'-AAA GAA AGG GTG TAA AAC GCA-3'。取 5  $\mu$ L PCR

<sup>#</sup> 现在重庆市巴南区人民医院神经科工作(邮编 401320)。

产物以 2% 琼脂糖电泳检测,用凝胶图像分析仪扫描图像,以 Band Scan 软件进行电泳条带半定量分析,计算目的基因产物与  $\beta$ -action 产物的吸光度积分比值作为目的基因的表达水平。

**1.3 统计学处理** 所有数据采用 SPSS12.0 统计软件分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析和两样本均数  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 肺组织病理变化** 对照组各时间点均无明显差别,肉眼见肺组织回缩良好,呈均匀粉红色,胸腔未见渗出液。光镜下肺泡结构清晰,肺泡壁薄,肺泡腔内无炎性细胞浸润,偶有少许红细胞。ALI 组肉眼见肺组织回缩不良,体积明显增大,可见点片状出血点。光镜下见染毒 12 h 后肺泡毛细血管扩张,气管和血管周围不同程度水肿,伴弥漫性肺出血,肺泡腔塌陷,部分有透明膜形成,肺泡腔内有游离的大量的多形白细胞浸润。并随时间的推移而加重。

**2.2 肺组织 MPO 及 EBD 水平** ALI 组 24 h 后肺组织 MPO 及 EBD 水平高于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),见表 1。

**表 1 两组大鼠 24 h 肺组织 MPO 及 EBD 变化**

组别	MPO(U/g)	EBD[g/(mL·g)]
对照组	7.69±0.89	4.25±0.39
ALI 组	51.30±5.10*	30.20±2.70*

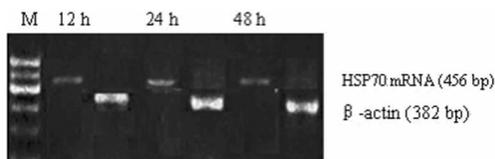
\*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

**2.3 肺组织中 HSP70 表达** 对照组各时间点肺组织 HSP70 少量表达,各亚组间表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与对照组相比,ALI 组各时间点 HSP70 表达均增加 ( $P < 0.05$ ),见表 2,图 1、2。

**表 2 两组不同时间点 HSP70 mRNA 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )**

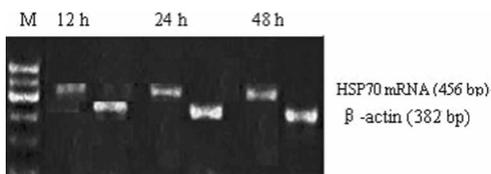
时间点(h)	对照组	ALI 组
12	0.292 8±0.035 2	0.387 2±0.016 2*
24	0.286 2±0.040 3	0.592 6±0.042 6**
48	0.266 3±0.038 7	0.412 5±0.034 1**

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。



M:PCR 标准参照物;12,24,48 h:各时间点的电泳条带

**图 1 对照组各时间点 HSP70 表达**



M:PCR 标准参照物;12,24,48 h:各时间点的电泳条带

**图 2 ALI 组各时间点 HSP70 表达**

**3 讨 论**

PQ 中毒是临床上常见的农药中毒之一,由于无特效解毒剂,死亡率一直居高不下。肺脏是 PQ 中毒的主要靶器官。目前认为 PQ 中毒诱导 ALI 的机制主要与氧化应激、炎症介质的释放、凝血及细胞凋亡等方面有关<sup>[2]</sup>。PQ 中毒后早期的肺泡炎症是引起 ALI 的中心环节,并参与了启动进行性肺纤维化的进程<sup>[3]</sup>。而 PMNs 是肺损伤过程的效应细胞之一,MPO 活力能有效反映机体 PMNs 浸润激活程度。当 PMNs 被激活后,释放多种炎症介质及细胞因子,如 IL- $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 、 $\beta_2$  整合素、L-selection、E-selection、P-selection 等。引起肺毛细血管内皮细胞损伤,通透性增加及其他病理生理变化,最终导致 ALI 的发生。刘建辉等<sup>[4]</sup>研究表明,腹腔注射 PQ 后会引发大鼠支气管肺泡灌洗液中 PMNs 数量显著增加,肺组织 HE 染色也发现 PMNs 大量浸润。本实验结果提示也表明 PQ 致 ALI 大鼠肺组织 EBD 及 MPO 明显增高,肺毛细血管通透性和肺内 PMNs 浸润及活性均明显增强。

近年研究认为 HSPs 是一种应激蛋白,也是一种内源性保护物质。具有抗炎、抗凋亡、抗增生等效应,是机体抗氧化性损伤和产生适应性变化的重要环节,是自我保护、应对各种应激而启动的保护机制之一<sup>[5]</sup>。根据其相对分子质量大小可以分为 HSP90、HSP70、HSP60、HSP40 和小相对分子质量 HSP,其中 HSP70 为最保守、最主要的一类,也是目前研究最多,了解最深的一类。正常状态下机体呈低水平表达,在病理状态下可被显著诱导。HSP70 对多种原因引起的肺损伤的保护效应已经被众多研究证实。Weiss 等<sup>[6]</sup>发现在盲肠结扎双穿孔法诱发大鼠脓毒症模型后,将猪 HSP70 的 cDNA 转染大鼠,使肺大量表达 HSP70,可以显著减轻 ALI 所致的肺间质水肿,减少蛋白渗出和中性粒细胞的聚集。热应激或药物等方式诱导 HSP70 的表达,也能对高氧、机械通气、脂多糖(LPS)等原因导致的肺损伤有保护作用<sup>[7-10]</sup>。大量研究表明 PQ 中毒后肺损伤与机体氧化-还原系统被破坏及大量炎症介质释放有关。尤在春等<sup>[11]</sup>从临床病例上也观察到 PQ 中毒患者机体氧化/抗氧化系统的失衡。刘明伟等<sup>[12]</sup>研究显示,PQ 中毒大鼠肺组织 NF- $\kappa$ B 活性细胞及多种炎性细胞活性明显增强,NF- $\kappa$ B 作为炎症介质释放的重要始动因子在其中起了相当重要的作用。而 HSP 则可以抑制 NF- $\kappa$ B 活性,进而减少各种炎症介质的产生对机体起到保护作用。本实验结果显示,正常大鼠肺组织 HSP70 表达低;而 PQ 中毒后大鼠肺组织 HSP70 表达明显增加,表明 PQ 作为一种刺激因素能引起机体的应激反应。HSP70 在 PQ 中毒肺组织中高表达提示,其可能参与了 PQ 中毒肺损伤后组织保护作用。但具体机制还需要进一步研究。

**参考文献:**

[1] Bertolote JM, Fleichmann A. Deaths from pesticide poisoning a global respons[J]. Respir Care, 2005, 50(9): 383-385.  
 [2] Fernandes AF, Zhou J, Zhang X, et al. Oxidative inactivation of the proteasome in RPE: a potential link between oxidative stress and upregulation of IL-8[J]. J Biol Chem, 2008, 283(30): 20745-20753.  
 [3] American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatmet. International (下转第 890 页)

本治疗方案仅以本院临床药物治疗为基础,采用药物经济学方法拟出的最佳给药方案,可为临床合理用药和治疗提供参照依据,但具体应用中,应结合临床实际,灵活掌握运用。

#### 参考文献:

- [1] 孔晓东. 药物经济学:概念,方法和应用[J]. 国外医学药学分册,1994,21(1):13-18.
- [2] 夏国俊. 抗菌药物临床应用指导原则[M]. 北京:中国中医药出版社,2004:1.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会. 社区获得性肺炎诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志,2006,29(10):651-655.
- [4] 胡善联,刘宏波. 枸橼酸铋钾、克拉霉素和替硝唑治疗消化性溃疡的药物经济学评价[J]. 中国新药与临床杂志,2002,21(7):397-399.
- [5] 何志高,张玲,周东. 药物经济学国外研究现状及国内运用中存在的问题[J]. 中国药房,2001,12(12):708-710
- [6] 张青,党廷海. 成本-效果分析在 3 种肺癌化疗方案中的应用[J]. 中国药房,2000,11(1):23-24.
- [7] 吕建平,张耀泉,区梅芳,等. 中、西药 2 种方案治疗精索静脉曲张不育症的成本-效果分析[J]. 中国药房,2005,16(6):436-438.
- [8] Bodey GP, Pan T. Mezlocillin; in vitro studies of a new broad-spectrum penicillin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1977, 11(1): 74-79.
- [9] 毛洪奎. 新的半合成青霉素-美洛西林[J]. 上海医药, 1990, 11(2): 17-19.

- [10] 王太岑. 美洛西林钠的药理和临床[J]. 国外医药抗生素分册,1989,10(6):431-436.
- [11] Campoli-Richards DM, Brogden RN. Sulbactam/ampicillin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties, and therapeutic use[J]. Drugs, 1987, 33(6): 577-609.
- [12] Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39(6): 1211-1233.
- [13] Manncke K, Springsklee M, Heizmann WR, et al. Sulbactam in combination with mezlocillin, piperacillin or cefotaxime. Clinical and bacteriological results in the treatment of severe bacterial infections[J]. Med Klin, 1991, 86(9): 454-460.
- [14] Piddock LJ, Jin YF, Turner HL. Activity of 13  $\beta$ -lactam agents combined with BRL 42715 against  $\beta$ -lactamase producing gram-negative bacteria compared to combinations with clavulanic acid, tazobactam and sulbactam[J]. J Antimicrob Chemother, 1993, 31(1): 89-103.
- [15] Mohanty S, Singhal R, Sood S, et al. Comparative in vitro activity of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against gram negative bacteria [J]. Indian J Med Res, 2005, 122(5): 425-428.

(收稿日期:2010-09-12 修回日期:2010-11-24)

(上接第 887 页)

- consensus statement. American Thoracic Society (ATS) [J]. Eur Respir Crit Care Med, 2000, 161 Suppl 1: 646-664.
- [4] 刘建辉,孙志平,马玉腾,等. 百草枯中毒大鼠急性肺损伤时 NF- $\kappa$ B 抑制剂对中性粒细胞凋亡的影响[J]. 陕西医学杂志, 2009, 38(3): 282-284.
  - [5] Wheeler DS, Wong HR. Heat shock response and acute lung injury[J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42(1): 1-14.
  - [6] Weiss YG, Maloyan A, Tazelaar J, et al. Adenoviral transfer of HSP-70 into pulmonary epithelium ameliorates experimental acute respiratory distress syndrome[J]. J Clin Invest, 2002, 110(6): 801-806.
  - [7] singleton KD, Wischmeyer PE. Glutamine's protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 292(5): 1839-1845.

- [8] 洗乐武,李奇林,谢可兵. 谷氨酰胺对呼吸机所致肺损伤中 HSP70 表达的影响[J]. 中国急救医学, 2008, 28(8): 731-733.
- [9] 金杭,于东云,由田. 大黄对急性肺损伤热休克蛋白 70 表达的影响[J]. 中国急救医学, 2007, 27(9): 827-829.
- [10] 鄢友娥,赵永岐,费锦学,等. 大鼠热损伤时急性生理改变及热休克蛋白 70 的表达[J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(4): 287-290.
- [11] 尤再春,史忠,阮艳君,等. 依达拉奉对百草枯中毒致急性肺损伤预防及治疗作用研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(22): 2517-2519.
- [12] 刘明伟,林听,张明谦,等. 血必净对急性百草枯中毒鼠肺 NF- $\kappa$ B 活性及肺保护的影响[J]. 重庆医学, 2010, 39(1): 37-39.

(收稿日期:2010-09-10 修回日期:2010-09-25)

**《重庆医学》——中文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!**