

· 临床研究 ·

阿托伐他汀对急性百草枯中毒鼠肺 p38MAPK 表达及肺损伤的影响

刘明伟¹, 苏美仙², 李 岚¹, 何杰明¹

(1. 云南省昆明市延安医院呼吸二科 650051; 2. 昆明医学院第二附属医院 SICU 650101)

摘要:目的 探讨阿托伐他汀对大鼠百草枯(PQ)中毒急性肺损伤(ALI)的保护作用及其机制。方法 选择健康 SD 大鼠 60 只, 随机分为 3 组: PQ 组、阿托伐他汀组和对照组。PQ 组和阿托伐他汀组腹腔内注射 PQ, 阿托伐他汀组给予阿托伐他汀 1.5 mg/(kg·d) 灌胃治疗; 对照组注射等体积无菌生理盐水。7 d 后测支气管肺组织 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK) 的表达、核因子- κ B(NF- κ B) 活性细胞、支气管肺泡灌洗液(BALF) 中炎症细胞及血清中 MMP-9、TNF- α 和 IL-6 水平。结果 PQ 组和阿托伐他汀组支气管肺组织 p38MAPK 的表达, NF- κ B 活性细胞, 支气管 BALF 中总细胞数、中性粒细胞数、巨噬细胞数均较对照组增高($P < 0.05$), 阿托伐他汀组各指标明显低于 PQ 组($P < 0.05$)。结论 阿托伐他汀可抑制 p38MAPK 的表达, 进一步抑制 NF- κ B 及炎症细胞活性, 对 PQ 中毒大鼠 ALI 有治疗作用。

关键词:阿托伐他汀; 肺损伤; 百草枯; p38MAPK

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.25.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)25-2534-03

Protective effect of atorvastatin on paraquat-induced injury in rat pulmonary microvascular endothelial cells expression of p38MAPK in rats

Liu Mingwei¹, Su Meixian², Li Lang¹, He Jieming¹

(1. The Second Department of Respiratory Medicine, Yan'an Hospital of Kunming, Kunming Yunnan, 650051, China; 2. Surgical Intensive Care Unit, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming Yunnan, 650101, China)

Abstract: **Objective** To study the protective effect of atorvastatin on paraquat-induced injury in rats and the mechanism. **Methods** Sixty rats were enrolled and randomly divided into three groups: contrast group, paraquat group and atorvastatin group. Peritoneal paraquat injection were performed in paraquat group and atorvastatin group, while equal volume of saline was peritoneally injected in contrast group, atorvastatin group injected with paraquat 12 h, given atorvastatin 1.5 mg/(kg·d) by the injection tube. Seven days later, the expression of p38MAPK, the number of NF- κ B positive cells, inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid(BALF) and the levels of IL-6 and TNF- α in the serum were measured. **Results** The expression of p38MAPK, the number of NF- κ B positive cells, the total number of cells, neutrophilic granulocytes, macrophage in BALF and the levels of IL-6 and TNF- α in the serum were significantly increased in paraquat group and atorvastatin group($P < 0.05$). But their levels in atorvastatin group were lower than that in paraquat group($P < 0.05$). **Conclusion** In paraquat-induced acute lung injury rat models, atorvastatin can alleviate inflammatory response and lung injury, inhibit the expression of p38MAPK and activity of NF- κ B, possess potential protective effects.

Key words: atorvastatin; acute lung injury; paraquat; p38MAPK

百草枯(paraquat, PQ)属于有机杂环类除草剂, 目前在世界范围内广泛使用。它对人和动物的毒性较高, 人口服最小致死量约为 35 mg/kg。PQ 中毒可引起多脏器损害, 肺是 PQ 作用的主要靶器官, 中、重度中毒如能度过急性期, 以后则出现不可逆肺纤维化, 后期多死于肺功能衰竭。因无特效解毒药, 目前采用的常规对症处理效果极差, PQ 中毒患者总病死率为 20%~75%^[1]。全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)是 PQ 中毒的常见并发症。作为通向多器官功能不全综合征(MODS)的转折点, 及时控制 SIRS 是治疗成败的关键。而 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK) 可通过多种途径促进炎症介质的产生, 抑制 p38MAPK 的表达, 可能有助于控制 PQ 中毒患者病情的发展。本研究以 PQ 中毒大鼠为模型, 探讨阿托伐他汀对 p38MAPK 的表达的影响及其肺保护作用机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择健康 SD 大鼠 60 只(昆明医学院动物实验中心, 雌雄兼有), 体质量(300±50)g, 随机分为 3 组: PQ 组、阿托伐他汀组和对照组, 每组 20 只, 在 12 h 光照和黑暗条件

下交替饲养, 自由饮水和进食。PQ 组用 20% PQ 溶液按 35 mg/kg 腹腔内注射; 阿托伐他汀组在注射 PQ 12 h 后, 给予阿托伐他汀 1.5 mg/(kg·d) 温水灌胃, 每天 1 次。对照组注射等体积生理盐水。

1.2 药品和试剂 阿托伐他汀(商品名: 立普妥, GodeckeAG Berlin 生产, 大连辉瑞制药有限公司分装, 规格: 10 mg/片); TNF- α 和 IL-6 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司, p38MAPK 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 核因子- κ B(NF- κ B)试剂盒购自福州迈新公司, 即用型超敏 S-P 免疫组化试剂盒购自福州迈新公司, MMP-9 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 标本制备

1.3.1 经胸腔取肺组织标本 造模 7 d 取肺泡灌洗液(BALF)后处死大鼠, 经胸腔取右肺中叶, 置于 10% 中性甲醛溶液浸泡固定。固定 48 h 后, 用乙醇依次脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 4 μ m 连续切片, 分别用于苏木素-伊红(HE)和免疫组化染色。

1.3.2 BALF 炎症细胞 用 25% 乌拉坦麻醉动物后切开气

表 1 BALF 中炎症细胞含量($\bar{x} \pm s, 10^6/L$)

组别	n	细胞总数	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞
对照组	20	6.6 ± 1.5	2.1 ± 1.1	1.2 ± 0.5	2.4 ± 0.9	1.3 ± 0.6
PQ 组	20	87.4 ± 14.3*	22.9 ± 5.3*	34.6 ± 11.1*	13.2 ± 3.2*	9.7 ± 3.1*
阿托伐他汀组	20	21.3 ± 1.8*△	8.9 ± 1.2*△	5.4 ± 1.1*△	6.8 ± 1.3*△	4.4 ± 0.8*△

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; △: $P < 0.05$, 与 PQ 组比较。

管, 插入 5 mm 塑料管, 用 5 mL 生理盐水反复灌注 5 次, 纱布过滤, 记录回收量, 计数 BALF 中细胞总数、巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞等。

1.4 指标检测 采用 Image Pro Plus 图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司)进行图像分析, S-P 法测 NF- κ B 的活性, 应用抗 p65 单克隆抗体, 该抗体与 NF- κ B 亚单位 p65 区域结合, 正常情况下此结合区域被 NF- κ B 抑制蛋白(I κ B)所覆盖, 抗 p65 单克隆抗体不能与之结合, 只有当 I κ B 释放后, 才能结合, 故该抗体能够原位检测到 NF- κ B 的活化。用免疫细胞化学法检测 MMP-9, 将第 4 代 LFB 接种于载玻片上, 贴壁后, 血清饥饿使其同步化, 按照 S-P 试剂盒说明, 作细胞爬片的免疫细胞化学染色, 羊抗鼠 MMP-9-抗 1:150 稀释, DAB 显色, PBS 代替一抗作阴性对照; 采用 ELISA 检测血清中 TNF- α 和 IL-6 水平, 操作严格按试剂盒说明书进行。

1.5 p38MAPK 免疫组化染色检查 对肺组织切片行 p38MAPK 免疫组化染色检查, 参照免疫组化染色试剂盒及 p38MAPK 单克隆抗体说明书进行, 以 PBS 代替一抗作阴性对照。每只大鼠选 1 张切片在 400 倍的光镜下随机选取 5 个视野下表达清晰的血管内皮, 由 2 名病理科医师盲法观察, 采用麦克奥迪数码医学分析系统对免疫组化图像进行分析, 测定这 5 个视野的血管内皮细胞胞质灰度值, 取均值。因灰度值的大小与 p38MAPK 阳性着色的深浅成反比, 故采用灰度值的倒数来作为该细胞片 p38MAPK 的表达值。取 2 人观察值的均数。

1.6 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素多组间比较采用 One-Way ANOVA 方差分析和 SNK-q 检验, 采用 Spearman 等进行相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BALF 中炎症细胞含量, IL-6、TNF- α 的变化, 肺组织 NF- κ B/P65 阳性细胞及 p38MAPK 的表达 见表 1~3。

表 2 各组 IL-6、TNF- α 、MMP-9 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6(ng/L)	TNF- α (ng/L)	MMP-9
对照组	20	92.54 ± 10.72	0.47 ± 0.08	11.95 ± 2.19
PQ 组	20	226.71 ± 41.91*	1.21 ± 0.23*	34.25 ± 4.97*
阿托伐他汀组	20	149.55 ± 26.74*△	0.63 ± 0.18*△	20.36 ± 2.76*△

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; △: $P < 0.05$, 与 PQ 组比较。

表 3 肺组织 NF- κ B/P65 阳性细胞及 p38MAPK 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NF- κ B/P65 阳性单位	p38MAPK 表达
对照组	20	32.15 ± 4.78	1.957 ± 0.46
PQ 组	20	71.56 ± 5.63*	3.914 ± 0.58*
阿托伐他汀组	20	44.37 ± 7.39*△	2.640 ± 0.53*△

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; △: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 肺组织病理检查结果 对照组肺组织未见明显异常; PQ 组: 肺充血明显, 左、右肺均变钝圆, 体积变大, 局部有明显的出血点或淤血。出现局灶性肺实变, 肺间质及肺泡腔内大量炎症

细胞浸润, 伴弥漫性肺出血; 部分肺间隔明显断裂出现典型的肺大泡表现。阿托伐他汀组肺体积稍增大, 呈淡粉红色, 切面无明显血性渗液渗出, 光镜下见轻度肺水肿, 病变以肺间质水肿、充血为主, 肺间质充血、水肿和中性粒细胞浸润较 PQ 组明显减轻(插图 I 图 1)。

3 讨 论

PQ 作为除草剂在我国农村广泛应用。皮肤接触、呼吸道吸入、误服等均可造成 PQ 中毒。PQ 中毒可引起多器官损害, 而肺脏是 PQ 中毒后主要损害的靶器官。PQ 中毒常引起 SIRS, 进而可造成多脏器功能衰竭, 而以急性肺损伤(ALI)最为明显。有研究证明, SIRS 可导致 ALI、急性呼吸窘迫综合征、MODS 等, 全身炎症反应在 PQ 中毒的发展中起重要作用[2]。从本研究结果显示, PQ 组炎症介质及肺内炎症细胞增多, 肺组织损伤也较明显。

有研究表明, p38MAPK 作为 MAPK 家族的成员, 其信号传导通路在炎症反应性疾病的发生和发展中具有重要调控作用[3-5]。p38 的激活主要见于炎症反应[6]。在 PQ 中毒早期有多种促炎性细胞因子, 如 H₂O₂、TGF- β 1、TNF- α 、IL-1 等均可激活 p38 通路[7]。而 p38MAPK 通路参与肺内多形核白细胞(PMN)穿越血管内皮屏障, 在肺组织内聚集、活化的全过程, 促进炎症反应的发生[8]。其可与 NF- κ B 通路在下游聚合[9], 调控单核/巨噬细胞、中性粒细胞、内皮细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 及黏附分子的表达, 进一步放大炎症反应[9]。还可诱导控制结缔组织重塑的酶类(如 MMPs)的表达[10], 促进肺纤维化形成。总之, p38MAPK 通路可使促炎性细胞因子不断产生, 导致级联“瀑布”效应, 在 ALI 的发生和发展过程中发挥重要作用。本研究结果显示, PQ 组 p38MAPK 表达增加, NF- κ B 的活化增强, 炎症细胞在肺组织内聚集增加, 炎症介质及 MMP-9 也增加。因此, 抑制 p38MAPK 表达的增加, 可减少炎症介质的产生, 对 PQ 中毒肺损伤可能有保护作用。

阿托伐他汀是羟甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂。有大量研究证实, 阿托伐他汀能通过降低胆固醇水平及循环中 C 反应蛋白(CRP)的水平来降低心血管的风险度[11-12]。它还具有抗炎和免疫调节活性, 能抑制免疫祖细胞的黏附与迁移, 抑制主要组织相容性抗原(MHC)的表达, 减少 TNF- α 的水平, 直接抑制 T 淋巴细胞的分化[13], 还可通过减少巨噬细胞、中性粒细胞等炎症细胞的组织浸润等途径来发挥抗炎和调节免疫活性作用[14-15]。阿托伐他汀(0.50~1.25 mg/kg)可以减弱正常血脂大鼠凝血酶诱导的白细胞滚动、黏附和迁移, 增加氧化亚氮(NO), 减少内皮型 P-选择素的表达[14]。本研究结果显示, 阿托伐他汀具有抑制 p38MAPK 的表达, 进一步抑制 TNF- α 、IL-6 等炎症介质 NF- κ B 的活化, 炎症细胞在肺内聚集, 使 PQ 中毒大鼠肺组织损伤明显减轻; 其还能抑制 MMP-9 的生成, 阻止肺纤维化的发生与发展[16]。病理检查结果显示, PQ 中毒大鼠肺间质及肺泡腔内大量炎症细胞浸润, 伴弥漫性肺出血, 而应用阿托伐他汀治疗的大鼠仅出现轻度肺水肿, 病变以肺间质水肿、充血为主, 炎症细胞在肺内

浸润较 PQ 中毒鼠明显减轻。因此,阿托伐他汀可能通过抑制 p38MAPK 的激活对 PQ 中毒大鼠肺损伤具有保护作用^[17-18]。

目前,PQ 中毒尚无确切有效的救治手段。有研究发现,即使轻微肺损伤仍可引起 PQ 中毒患者在较长时间内的限制性肺功能损伤,最终导致不可逆的肺间质纤维化,患者预后极差^[19]。阿托伐他汀可抑制 p38MAPK 的表达,进一步减少炎症介质及基质金属蛋白酶的表达。对急性 PQ 中毒所致的 ALI 及肺纤维化起到治疗作用,能有效阻止急性 PQ 中毒的病情进程,减轻肺组织的病理损害,有望用于 PQ 中毒的治疗。

参考文献:

- [1] 邓朝霞,熊建琼,何盛琴,等. 血液灌流对百草枯中毒患者肺气体交换及血浆百草枯浓度的影响[J]. 重庆医学, 2009,38(20):2530-2531.
- [2] Mohammadi-Karakani A, Ghazi-Khansari M, Sotoudeh M. Lisinopril ameliorates paraquat-induced lung fibrosis[J]. Clin ChimActa, 2006,367(9):170-174.
- [3] Torres M. Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling[J]. Front Biosci, 2003,8(1):d369-391.
- [4] Raman M, Cobb MH. MAP kinase modules: many roads home[J]. Curr Biol, 2003,13(22):R886-888.
- [5] Yoshida K, Kuwano K, Hagimoto N, et al. MAP kinase activation and apoptosis in lung tissues from patients with idiopathic Pulmonary fibrosis[J]. J Pathol, 2002,198(3):388-396.
- [6] Kuldo JM, Wastra J, Asgeirsdottir SA, et al. Differential effects of NF-kappaB and P38MAPK inhibitors and combinations thereof on TNF-alpha and IL-1beta-induced proinflammatory status of endothelial cells in vitro[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005,289(5):C1229-1239.
- [7] Ishida Y, Takayasu T, Kimura A, et al. Gene expression of cytokines and growth factors in the lungs after Paraquat administration in mice[J]. Leg Med(Tokyo), 2006,8(2):102-109.
- [8] Nick JA, Young SK, Brown KK, et al. Role of p38 mitogen-activated Protein kinase in murine model of Pulmonary inflammation[J]. J Immunol, 2000,164(4):2151-2159.
- [9] Hershko DD, Robb BW, Wray CJ, et al. Super induction of IL-6 by eye loheximide is associated with mRNA stabilization and sustained activation of P38mapkinase and NF-kappaB in cultured caco-2 cells[J]. J Cell Biochem, 2004,

91(5):951-961.

- [10] Ahmed S, Wang N, Hafeez BB, et al. Punica granatum extract inhibits IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappa B in human chondrocytes in vitro[J]. J Nutr, 2005,135(9):2096-2102.
- [11] Krauth MT, Majlesi Y, Sonneck K, et al. Effects of various statins on Cytokine-dependent growth and IgE-dependent release of histamine in human mast cells[J]. Allergy, 2006,61(3):281-288.
- [12] 李靖,何照国. 阿托伐他汀对 60 例不稳定心绞痛患者血清 hs-CRP、MMP-9、ET-1 水平影响的研究[J]. 重庆医学, 2010,39(4):444-445.
- [13] Paintlia AS, Paintlia MK, Singh I, et al. Immunomodulatory effect of combination therapy with lovastatin and 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D ribofuranoside alleviates neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Am J Pathol, 2006,169(3):1012-1025.
- [14] Sonza-Cesta DC, Figueiredo-Lopes L, Alves-Filho JC, et al. Protective effects of atorvastatin in rat models of acute pulmonary embolism: involvement of matrix metalloproteinase-9[J]. Crit Care Med, 2007,35(1):239-245.
- [15] 杜林林,王朝晖. 阿托伐他汀对兔动脉粥样硬化中 NF-kB/IkB 和炎症因子表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2005,21(11):1392.
- [16] 杜晓冬,周毅武,何斌,等. 急性百草枯中毒大鼠肺间质成纤维细胞中 MMP-9 表达的研究[J]. 四川大学学报:医学版, 2008,39(2):250-252.
- [17] Sans M, Danese S, Motte C, et al. Enhanced recruitment of CX3CR1+ T cells by mucosal endothelial cell-derived fractalkine in inflammatory bowel disease[J]. Gastroenterology, 2007,132(1):139-153.
- [18] Dodeller F, Schulze-Koops H. The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells[J]. Arthritis Res Ther, 2006,8(2):205-216.
- [19] 尤再春,史忠,高全杰,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.

(收稿日期:2011-04-18 修回日期:2011-05-14)

(上接第 2533 页)

- Neurol Neurochir Pol, 2002,36(2):329-336.
- [12] Montesinos MC, Desai A, Delano D, et al. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68[J]. Arthritis Rheum, 2003,48(1):240-247.
 - [13] Mabley J, Soriano F, Pacher P, et al. The adenosine A3 receptor agonist, N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyluronamide, is protective in two murine models of

colitis[J]. Eur J Pharmacol, 2003,466(3):323-329.

- [14] Dowdall JF, Winter FDC, Bouchier-Hayes DJ. Inosine modulates gut barrier dysfunction and end organ damage in a model of ischemia-reperfusion injury[J]. J Surg Res, 2002,108(1):61-68.
- [15] 孙卫亚. CM 对脑梗死患者保护作用与细胞因子关系的临床研究[J]. 神经疾病与精神卫生, 2007,7(3):185.

(收稿日期:2011-04-09 修回日期:2011-05-22)