

· 基础研究 ·

4-羟基壬烯醛在百草枯中毒大鼠肺组织中的表达*

谢 姝¹, 周从阳^{2△}, 李 凡¹, 汤旭惠¹

(1. 江西省人民医院急诊科, 南昌 330006; 2. 南昌大学第一附属医院急诊科, 南昌 330006)

摘要:目的 观察百草枯(PQ)中毒大鼠肺组织中 4-羟基壬烯醛(4-HNE)的表达。方法 将 48 只 SD 大鼠按随机数字表法分为 A、B 两组, 每组 24 只。B 组 PQ 灌胃(80 mg/kg)染毒建立 SD 大鼠肺损伤模型, A 组等量生理盐水灌胃。灌胃后 12、24、48、72 h 观察两组大鼠肺组织病理改变及检测肺组织中 4-HNE 表达。结果 肺组织的病理变化: A 组无明显变化; B 组肺泡毛细血管扩张, 伴弥漫性肺出血, 肺泡腔塌陷, 肺泡腔内炎性细胞浸润。4-HNE 在肺组织中的表达: B 组明显高于 A 组($P < 0.01$)。结论 PQ 中毒时 4-HNE 表达增强, 4-HNE 可能为 PQ 中毒大鼠的肺损伤主要标志之一。

关键词:百草枯; 4-羟基壬烯醛; SD 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.32.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)32-3394-02

The expression of 4-hydroxynonenal in lungs of paraquat-intoxicated rats*

Xie Shu¹, Zhou Congyang^{2△}, Li Fan¹, Tang Xuhui¹

(1. Department of Emergency, Provincial People's Hospital of Jiangxi, Nanchang, Jiangxi 330006, China;

2. Department of Emergency, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the 4-hydroxynonenal(4-HNE) expression changes in lungs of paraquat(PQ)-intoxicated rats. **Methods** Forty-eight healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: group A and group B, with 24 rats in each group. The model of lung injury was established by intragastric PQ(80 mg/kg) administration in group B, and same quantity of normal saline was administered intragastrically in group A. Pathological changes in lung tissue were observed in 12, 24, 48 and 72 hours after treatment. The pathological changes and the expression of 4-HNE in lung tissue were detected. **Results** There was no significant change in A group. The pathological changes, including alveolar capillary expansion, diffuse alveolar hemorrhage and alveolar inflammation cell infiltration, were found in lungs of rats in group B. Compared with group A, the expression of 4-HNE in lung tissue significantly increased in group B($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of 4-HNE increased in PQ intoxicated rats, 4-HNE may play an important role in rats' lung injury induced by PQ.

Key words: paraquat; 4-hydroxynonenal; SD rats

百草枯(paraquat, PQ)是一种广泛应用的高效除草剂, 口服吸收快, 对人、畜有极高的毒性^[1]。PQ 进入人体后可致多器官出现损伤, 其中毒的特征性改变是早期的急性肺损伤和晚期的肺纤维化^[2]。患者多死于呼吸衰竭, 病死率高达 85% 以上^[3]。目前认为其主要中毒机制为氧化损伤。为进一步探明其中毒机制, 本实验通过复制大鼠 PQ 急性中毒模型, 观察 PQ 中毒后肺组织中 4-羟基壬烯醛(4-HNE)的表达, 为进一步探明 PQ 中毒机制提供实验依据, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 健康成年 SD 大鼠 48 只, 体质量(220±40)g, 雌雄不限, 购自南昌大学医学院动物科学部, 标准喂养。采用随机数字表法, 分为两组: 对照组(A 组), PQ 染毒组(B 组), 每组 24 只。实验参照谢仰民等^[4]PQ 染毒法建立急性肺损伤模型。B 组 PQ 80 mg/kg 一次性灌胃染毒, A 组等量无菌生理盐水灌胃。于染毒 12、24、48、72 h 4 个时间点, 分别取 A、B 组各 6 只, 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 3 mL/kg 麻醉后腹主动脉放血处死。

1.2 观察指标 观察大鼠肺组织病理改变: 按预定时间处死大鼠, 肉眼观察大鼠肺组织, 并取左肺下叶予 10% 甲醛固定, 石蜡包埋后进行肺组织病理性观察。观察大鼠肺组织 4-HNE 表达: 按预定时间处死大鼠, 取左肺下叶予 10% 甲醛固定, 石

蜡包埋后进行免疫组化观察肺组织 4-HNE 的表达。

1.3 试剂 主要试剂为 20% PQ 水剂(上海先正达公司)。一抗: 兔抗大鼠 4-HNE 多克隆抗体(美国阿尔法诊断公司)。二抗: 聚合 HRP 标记抗兔(武汉博士德公司)。免疫组化酶底物显色剂: DAB(北京中杉金桥生物技术有限公司)。复染剂: 苏木素(珠海贝索生物技术有限公司)。

1.4 统计学处理 所有数据采用 SPSS17.0 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 χ^2 检验, 比较各组差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况 染毒 72 h 无大鼠死亡。A 组大鼠全部活动敏捷, 进食、进水正常, 呼吸正常, 毛发光洁。B 组大鼠多在染毒 1~2 h 内即出现明显的中毒表现。具体表现为进食、进水量明显减少或不进食进水, 精神差, 反应迟钝, 呼吸频率加快, 活动少, 静伏, 易捕捉, 毛发蓬松, 口唇发绀, 少数从口鼻流出血性泡沫状分泌物。并在染毒 24~72 h 表现最明显。

2.2 两组大鼠肺组织 4-HNE 表达情况 A 组大鼠不表达或微量表达。B 组大鼠在中毒后的 12 h 表达即开始增多, 48 h 达高峰, 72 h 表达仍高, 但较 48 h 下降。与 A 组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1, 封 2 图 1。

2.3 两组大鼠肺组织病理改变 A 组各时间点比较均无明显

显著差异,肉眼见肺组织回缩良好,呈均匀粉红色,胸腔未见渗液。光镜下(OLYMPUS BX40 型显微镜)见肺泡结构清晰,肺泡壁薄,肺泡腔内无炎性细胞浸润,有少许红细胞。B 组肉眼见肺组织回缩不良,体积明显增大,可见大片状出血;光镜下见染毒 12 h 后肺泡毛细血管扩张,毛细血管内皮细胞肿胀、细胞间隙增宽,血浆蛋白质沉积,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,肺泡腔内有大量炎性细胞浸润,肺泡上皮细胞退行性变,并随时间的推移而加重。见封 2 图 2。

表 1 肺组织中 4-HNE 表达变化($\bar{x} \pm s, n=24$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
A 组	7.00±1.549	7.67±1.862	7.00±1.414	7.33±1.966
B 组	203.33±21.556 [#]	418.33±43.228 [#]	908.17±46.769 [#]	801.50±47.247 [#]

[#]: $P < 0.01$, 与 A 组比较。

3 讨 论

PQ 作为一种除草剂,近年来应用广泛,随之而来的中毒事件日趋增多。PQ 中毒可导致全身多器官受损,其致病机制有多方面。研究表明 PQ 主要中毒机制是对机体氧化-还原系统的破坏和细胞内的氧化应激反应^[5]。其中核因子- κ B 在急性损伤中起一定作用^[6]。也有研究发现 PQ 中毒大鼠肾组织 Livin 蛋白及 Caspase 3 表达增加,从而推测细胞凋亡参与了 PQ 中毒后肾损伤的过程^[7]。肺是 PQ 中毒的主要靶器官,早期可发生急性肺损伤,晚期则出现肺纤维化^[8]。研究发现, PQ 进入机体后被肺泡上皮 2 型细胞、1 型细胞和气管的 Clara 细胞主动摄取到细胞内,经过还原型辅酶 II(NADPH)还原形成自由基,然后与分子氧反应生成联吡啶阳离子和超氧阴离子,后者歧化形成 H_2O_2 , 再在 Fe^{2+} 作用下形成高活性自由基如 OH^- , 从而诱导脂质过氧化反应,引起组织细胞尤其是肺组织的氧化性损伤。同时, NADPH 的大量消耗,导致机体内许多需要 NADPH 参与的生化反应无法进行,进一步加重细胞损伤^[9-10]。

脂质过氧化反应主要分解为醛基产物,后者能与体内的许多带氨基、巯基官能团的物质如蛋白质、氨基酸、磷脂、DNA、胶原纤维、弹性纤维等发生反应,降低其功能,干扰细胞的正常功能活动,损伤细胞组分而致病。醛基产物中最主要的就是 4-HNE 和丙二醛(MDA)^[11]。目前关于百草枯中毒后机体 MDA 含量变化的研究很多,有动物实验发现 PQ 染毒后大鼠血清中 MDA 含量显著高于对照组^[12]。宋爱丽^[13]救治 72 例 PQ 中毒患者发现其血清中 MDA 含量增加,以 24~48 h 最明显。有报道新生小鼠缺血缺氧后脑组织 4-HNE 表达升高^[14]。目前文献报道 4-HNE 在肺部疾病的发生发展还很少。尤其 4-HNE 在 PQ 中毒后机体损伤中的研究未见报道。4-HNE 来源于 $\omega 6$ 多不饱和脂肪酸,研究发现 9(S)氢化过氧十八碳烯酸[9(S)-HPODE]通过 3 个步骤降解形成 HNE^[15]。哺乳动物生理条件下主要通过谷胱甘肽直接和 4-HNE 反应形成复合物而排出体外。4-HNE 对机体损害与其浓度有关,100 μ mol/L 以上能导致急性的细胞毒性反应而加速细胞死亡,1~20 μ mol/L 范围内能抑制 DNA 和蛋白质的合成、激活磷脂酶 A2、抑制 c-myc 表达,而低于 0.1 μ mol/L 时,对生物体具有生理意义。故 4-HNE 含量的变化可以反映机体清除自由基和抗氧化损伤的能力。近年来有人通过用 4-HNE 刺激支气管上皮细胞发现 4-HNE 可通过激活 ERK1/2 传导途径来增强磷酸化,进而影响下游转录因子活性,产生一系列生物活性产物,引起炎性改变^[16]。还有研究发现吸烟会引起大鼠气道

上皮细胞 4-HNE 表达增加,且随吸烟时间延长而表达水平升高^[17]。于亮等^[18]研究还发现红霉素、银杏内酯 B 能减少 4-HNE 引起的支气管上皮细胞 IL-8 的合成,从而减轻炎性反应。

本实验通过 PQ 一次性灌胃大鼠,成功复制了 PQ 中毒大鼠肺损伤模型,观察到与对照组相比, PQ 染毒组大鼠肺组织 4-HNE 表达明显增强,12 h 即开始,48 h 达高峰,表明 PQ 中毒引起肺损伤的同时可诱导 4-HNE 的表达增强。关于有效减轻 4-HNE 引起的机体损伤的治疗措施目前报道较少,仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Serr A, Domingos F, Prat MM. Paraquat intoxication[J]. Acta Med Port, 2003, 16(1): 25-32.
- [2] 吕文, 王海石, 常秀丽, 等. 山东某省级医院 174 例急性百草枯中毒患者特征分析[J]. 环境与职业医学, 2011, 28(9): 539-542.
- [3] 张瑞萍, 邱泽武. 循证医学在中毒领域中的应用[J]. 中国急救医学, 2004, 24(11): 829-830.
- [4] 谢仰民, 陈韩秋, 陈穗, 等. 大鼠急性呼吸窘迫综合征动物模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2002, 10(40): 243-245.
- [5] Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Sanchez-Navarro A, et al. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment[J]. Crit Rev Toxicol, 2008, 38(1): 13-71.
- [6] 周从阳, 张志坚, 罗雅娟, 等. 乌司他丁对百草枯染毒大鼠肺组织热休克蛋白 70 及 NF- κ B 的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2011, 29(4): 280-283.
- [7] 张志坚, 周从阳, 罗雅娟, 等. 百草枯中毒大鼠肾组织 Livin 蛋白及 Caspase3 的表达及干预[J]. 中华急诊医学杂志, 2011, 20(7): 717-721.
- [8] 冯亚宾, 崔朝勃. 百草枯中毒的肺部损害[J]. 临床肺科杂志, 2006, 11(5): 638.
- [9] Suntres ZE. Role of antioxidants in paraquat toxicity[J]. Toxicology, 2002, 180(1): 65-77.
- [10] Li S, Crooks PA, WEI X, et al. Toxicity of dipyridyl compounds and related compounds[J]. Crit Rev Toxicol, 2004, 34(5): 447-460.
- [11] Yang Y, Sharmal R, Sharmal A, et al. Lipid peroxidation and cell cycle signaling; 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling[J]. Acta Biochim Pol, 2003, 50(2): 319-336.
- [12] 郭宪立, 佟飞, 田英平, 等. 褪黑素对急性百草枯中毒大鼠的治疗效果[J]. 中华急诊医学杂志, 2008, 17(9): 948-951.
- [13] 宋爱丽. 百草枯中毒患者血清淀粉酶及氧化损伤水平的动态变化及其临床意义[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(24): 3036.
- [14] 徐发林, 朱长莲, 王小阳, 等. XIAP 过度表达对新生小鼠缺血缺氧后脑组织硝基酪氨酸和 4-羟基壬烯醛表达的影响[J]. 临床儿科杂志, 2006, 24(9): 765-769.
- [15] Schneider C, Tallman KA, Porter NA, et al. Two distinct pathways of formation of 4-hydroxynonenal mechanisms of nonenzymatic transformation of the (下转第 3414 页)

可以导致孕妇体质量与其他季节相比增加得更快。孕妇偏爱吃柑橘、橙、冬枣等富含维生素 C 的水果,胎儿出生巨大儿比例增高^[3],与本研究结果一致。因此,妊娠期食用水果不能过于盲目。本研究发现,孕妇豆类及豆制品、鱼虾海鲜摄入量少,可能与南方地区海产品价格过高及饮食习惯不同有关。杂粮蔬菜摄入不足减少了 B 族维生素及纤维素的摄入,易导致妊娠期肥胖和便秘。

谷类、肉蛋类食物孕中、晚期偏高,导致孕中、晚期能量蛋白质、脂肪、碳水化合物、钙的摄入量过多。本研究结果除铁元素外,其余营养素均远远高出推荐量。这与本调查对象大多为城市居民、文化程度较高,重视蛋白质及钙的摄入,过度补充钙剂有关。苏宜香等^[4]报道,高膳食钙可降低骨吸收,在孕末期以牛奶合并碳酸钙的方式补钙,可增加腰椎骨密度,补钙疗效可靠。过度膳食补钙不能有效缓解骨质脱钙症状。妊娠期健康教育工作者必须提供科学的补钙方法。

孕妇于妊娠早期 3 个月体质量增加最少。孕晚期 3 个月孕妇体质量增加缓慢。第 6~7 月是体质量增加最快的时期。孕中期 3 个月孕妇体质量增加与新生儿出生体质量最为密切。本研究结果与文献^[5-8]一致。妊娠期不同孕周膳食摄入量及能量、营养素摄入量与妊娠期体质量增加呈正相关。本研究妊娠期平均体质量增加 17.6 kg,与国内外报道健康妇女妊娠期体质量增加应控制在 16 kg 左右的结果相比明显增加^[9-15]。可能与本调查组孕妇能量摄入远超过推荐量有关。影响妊娠期体质量增加的因素较为复杂,如年龄、孕前 BMI、生活方式、孕妇体力活动、产检及心理因素等,本文仅从妊娠期营养摄入方面进行研究。其他因素有待与同行进一步探讨。

参考文献:

[1] 中国营养学会. 中国居民膳食指南[M]. 拉萨:西藏人民出版社,2008:358.

[2] 易礼兰,蒋建国,邓开玉. 影响新生儿体质量的相关因素研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2007,15(2):68-69.

[3] Mthews F, Yudkin P, Neil A. Influence of maternal nutrition on outcome of pregnancy: prospective cohort study [J]. *BMJ*, 1999, 319(7206):339-343.

[4] 苏宜香,邱玲,张瑞东. 口服碳酸钙制剂对孕妇骨密度的影响[J]. 中国临床营养学杂志,2000,8(2):1682-1683.

[5] Devader SR, Neeley HL, Myles TD, et al. Evaluation of gestational weight gain guidelines for women with normal pre-pregnancy body mass index [J]. *Obstet Gynecol*,

2007,110(4):745-751.

[6] 王燕,胡传来,张勤,等. 孕前体质量、妊娠期增重对新生儿出生体质量的影响[J]. 中国妇幼保健,2011,26(12):1806-1808.

[7] 马玲,丁桂凤,刘薇,等. 乌鲁木齐市维吾尔族和汉族妇女妊娠期增重与新生儿出生体质量的关系[J]. 中国妇幼保健,2011,26(4):498-500.

[8] Tsai IH, Chen CP, Sun FJ, et al. Associations of the pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain with pregnancy outcomes in Taiwanese women [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2012, 21(1):82-87.

[9] 章小维,周敏,渠川琰. 妊娠期膳食结构的变化及对妊娠结局的影响[J]. 中国优生与遗传杂志,2008,16(1):60-62.

[10] Persson M, Pasupathy D, Hanson U, et al. Pre-pregnancy body mass index and the risk of adverse outcome in type 1 diabetic pregnancies: a population-based cohort study [J]. *BMJ Open*, 2012, 2(1):e601.

[11] Torloni MR, Fortunato SJ, Betran AP, et al. Ethnic disparity in spontaneous preterm birth and maternal pre-pregnancy body mass index [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 285(4):959-966.

[12] Singh J, Huang CC, Driggers RW, et al. The impact of pre-pregnancy body mass index on the risk of gestational diabetes [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2012, 25(1):5-10.

[13] Heude B, Thiebaugeorges O, Goua V, et al. Pre-pregnancy body mass index and weight gain during pregnancy: relations with gestational diabetes and hypertension, and birth outcomes [J]. *Matern Child Health J*, 2012, 16(2):355-363.

[14] Liu X, Du J, Wang G, et al. Effect of pre-pregnancy body mass index on adverse pregnancy outcome in north of China [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2011, 283(1):65-70.

[15] Park JH, Lee BE, Park HS, et al. Association between pre-pregnancy body mass index and socioeconomic status and impact on pregnancy outcomes in Korea [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2011, 37(2):138-145.

(收稿日期:2012-05-10 修回日期:2012-09-03)

(上接第 3395 页)

9-and 13-hydroperoxides of linoleic acid to 4-hydroxyalk-enals [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(24):20831-20838.

[16] 于亮,王梅,袁军,等. 氧化应激对支气管上皮细胞丝裂原活化蛋白激酶信号传导通路的影响[J]. 泰山医学院学报,2011,32(6):404-406.

[17] 郭虹霞,许建英. 不同吸烟时间大鼠气道上皮细胞 4-羟基

壬烯醛和转化生长因子 $\beta 1$ 表达的研究 [J]. 中华哮喘杂志:电子版,2011,5(3):177-180.

[18] 于亮,冉丕鑫. 红霉素对 4-羟基壬烯醛引起的支气管上皮细胞白细胞介素-8 和谷氨酰半胱氨酸合成酶变化的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志,2009,32(2):939-1001.

(收稿日期:2012-03-29 修回日期:2012-07-21)