

血必净对百草枯中毒所致肺纤维化过程中 Smads 信号蛋白的影响

曹丽萍¹ 孙兆瑞¹ 刘红梅¹ 林金锋¹ 邵旦兵¹ 张炜¹ 任艺¹ 陈鑫¹ 聂时南¹

【摘要】 目的:观察血必净对百草枯(PQ)所致肺纤维化过程中 Smads 蛋白的影响,初探血必净对肺纤维化的干预机制。**方法:**将 SPF 级 C57BL/6J 小鼠分为①正常对照组:予以腹腔注射等量生理盐水;②模型组(PQ 组):腹腔一次注射 18 mg/kg 剂量 PQ;③血必净干预组:腹腔一次注射 18 mg/kg 剂量 PQ;0.5 h 后小鼠尾静脉注射 50 ml/kg 血必净注射液(以后 1 次/d)。分别于第 3、7、14 天处死小鼠采集标本进行检测。苏木精-伊红染色观察肺组织病理改变;Western blot 检测肺组织 Smad2/3、p-smad2/3、Smad7 蛋白的表达;RT-PCR 检测 Smad7 mRNA 表达。**结果:**①正常组小鼠肺组织苏木精-伊红染色肺泡结构正常,肺泡及间质区域无充血或炎性细胞浸润;模型组肺泡闭塞,肺泡腔面积减少,存在片状实变区域;血必净干预 3 d 组肺组织弥漫性出血减少,有少量胶原沉积在细支气管周围;血必净干预 7 d 组肺组织充血及出血较严重,部分闭塞,肺泡壁增厚明显,可见纤维细胞增殖、胶原沉积于血管及支气管周围;血必净干预 14 d 组肺结构破坏明显,形成纤维块或纤维束,说明血必净早期干预对肺组织改善的效果明显;②模型组 Smads 信号蛋白 p-smad2/3、Smad7 表达上调,血必净干预后可不同程度地下调 p-smad2/3 高表达,增强 Smad7 的表达,血必净干预 3 d 组作用较为显著。**结论:**成功构建百草枯所致小鼠肺纤维化模型,血必净可作用于 Smads 信号转导通路正、负反馈环路中的 Smad2/3、Smad7 关键信号蛋白,早期部分抑制百草枯所致肺纤维化的进展。

【关键词】 血必净注射液;百草枯;肺纤维化;Smads 信号蛋白

doi:10.13201/j.issn.1009-5918.2015.04.010

【中图分类号】 R-33 **【文献标志码】** A

The effects of Xuebijing on Smads signaling protein expression in paraquat-induced pulmonary fibrosis

CAO Liping SUN Zhaorui LIU Hongmei LIN Jinfeng SHAO Danbing
ZHANG Wei REN Yi CHEN Xin NIE Shinan

(Department of Emergency, Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210002, China)

Corresponding author: NIE Shinan, Email: shn_nie@sina.com

Abstract Objective: To observe the effects of Xuebijing on the expression of Smads signaling protein in paraquat-induced pulmonary fibrosis and investigate the treatment of Xuebijing in pulmonary fibrosis. **Method:** We divided SPF grade of C57BL/6J mouse into five groups: The control group: intraperitoneal injection of saline solution; Model group: intraperitoneal injection of PQ 18 mg/kg; Xuebijing Intervention group: after intraperitoneal injection of PQ 18 mg/kg for 30 min, the tail intravenous injection of Xuebijing 50 mg/kg (Once a day in the future). After 3, 7, 14 days, mice were sacrificed and lung tissues were collected. Using HE staining to observe pathological changes in the lung tissue. Western blot was used to detect the expression of Smad2/3, p-smad2/3 and Smad7. Smad7 mRNA expression was detected by RT-PCR. **Result:** ① Lung tissue sections from control rats showed no evidence of inflammation, edema or epithelial damage. As expected, lung tissue sections from PQ mice showed extensive cellular thickening of interalveolar septa, interstitial edema, increased interstitial cells with a fibroblastic appearance, and alveolar space area reduction. After treatment with Xuebijing for 3 days, we found that Xuebijing could attenuate diffuse hemorrhage; injury areas and collagen deposition were dramatically reduced. In Xuebijing intervention 7 days group and 14 days group, still showed extensive cellular thickening, increased interstitial fibrosis and excessive collagen deposition. The results of HE staining indicated that Xuebijing could attenuate lung injury induced by paraquat in the early intervention phase. ② The expressions of p-smad2/3 were up-regulated in PQ

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No:81401583);南京军区重点课题(No:12Z32);2014 南京总医院立项课题(No:2014004)

¹ 南京军区南京总医院(南京大学医学院附属金陵医院)急救医学科(南京,210002)

曹丽萍、孙兆瑞为共同第一作者

通信作者:聂时南, E-mail: shn_nie@sina.com

group, but Xuebijing induced the expressions of p-smad2/3 decreased and promoted the expression of Smad7. Xuebijing intervention for 3 days group significantly affected the expressions of p-smad2/3 and smad7. **Conclusion:** Xuebijing could affect the expressions of key signaling protein Smad2/3, Smad7 in the positive and negative feedback loops of Smads signal transduction pathway, and it could inhibit paraquat-induced pulmonary fibrogenesis in early phase.

Key words Xuebijing injection; paraquat; pulmonary fibrosis; smads signaling protein

百草枯(paraquat, PQ)又名对草快, 化学名为 1,1'-二甲基-4,4'-联吡啶, 分子式 $C_{12}H_{14}N_2Cl_2$, 无色, 吸湿性晶体, 几乎不溶于有机溶剂, 在碱性环境中迅速水解, 中性及酸性环境中相对稳定, 属于有机杂环类触杀、灭生型高毒性除草剂, 对人畜均有很强毒性。首例报道 PQ 中毒死亡以来, 其高达 50%~80% 的病死率引起了临床的广泛关注^[1]。目前, 急性 PQ 中毒以物理治疗为主, 包括洗胃、导泻、活性炭吸附、血液净化等, 尚无特效解毒药。国内外学者致力于减轻肺纤维化的研究, 以寻求降低高病死率的突破口。

我科近年来运用血必净治疗百草枯中毒肺纤维化取得了一定的疗效, 但具体作用机制尚不明确。近年对致肺纤维化起关键作用的细胞转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的研究中, 其下游 Smads 信号蛋白被认为与纤维化关系最为密切^[2]。但 Smads 信号蛋白和 PQ 所致的肺纤维化的关系目前研究很少。在本研究中, 将利用 PQ 致小鼠肺间质纤维化模型, 分析血必净对肺纤维化过程中肺组织 Smads 信号蛋白的影响, 初探血必净干预肺纤维化的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 4~8 周龄, 体重 22~25 g, 南京大学实验动物中心提供(SCXK-苏 2008-0010)。

1.2 主要试剂和仪器

PQ 粉剂购自 Sigma 公司; 血必净注射液(天津红日药业有限公司, 批号: 08121001); 兔抗 Smad7、Smad2/3、p-smad2/3、 β -Actin 抗体(Gibco); IgG 二抗(Gibco); cDNA 双链合成试剂盒(南京联科生物); TRIZOL 试剂(南京联科生物); Western blot 显色液(密理博); 石蜡切片机(LEICA SM2010R); Western blot 凝胶成像仪(美国, BIO-RAD); 酶标分析仪(北京达山); 实时定量 PCR 循环仪等。

1.3 实验方法与分组

①正常组: 腹腔注射等量生理盐水; ②模型组(PQ 组): 按 18 mg/kg 的剂量腹腔注射 PQ; ③血必净干预 3 d、7 d、14 d 组: 腹腔一次注射 18 mg/kg 剂量 PQ; 0.5 h 后小鼠尾静脉注射 50 ml/kg 血必净注射液(以后 1 次/d)。于第 3、7、14 天断颈处死 C57BL/6J 小鼠采集标本进行检测。

1.4 观察项目

1.4.1 肺组织病理苏木精-伊红染色 光镜下观察肺泡结构完整清晰程度, 肺泡间隔增宽及充血程度, 肺泡壁厚度, 炎性细胞浸润及出血情况, 是否伴有纤维组织的沉积。

1.4.2 Smad2/3、p-smad2/3、Smad7 蛋白的表达 Western blot 法。取肺组织 200 mg, 碾碎、细胞裂解, 低温 4℃ 15 000 r/min, 离心 15 min, 提取组织蛋白。提取同等量蛋白, 经 SDS-PAGE 抗体凝胶电泳、转膜, 分别加兔抗 Smad2/3(1:200)、p-smad2/3(1:200)、Smad7(1:200)、 β -Actin(1:1 000)多克隆抗体。IgG 二抗(1:6 000)室温孵育 1 h, 洗膜、凝胶成像, 对凝胶成像图片进行分析。

1.4.3 Smad7 基因的表达 实时定量-PCR 法。提取 RNA; 从 GenBank 中查阅引物与探针序列; cDNA 合成与 RT-PCR; 实时检测扩增过程中的激发荧光强度变化; 定量曲线的描述。

表 1 PCR 引物合成序列

引物名称	引物序列	产物长度
β -actin	正义: 5-GCAGAAGGAGATTAC-TGCCCT-3	136 bp
	反义: 5-GCTGATCCACATCTG-CTGGAA-3	
Smad7	正义: 5-ACCCCATCACCTTAG-TCG-3	73 bp
	反义: 5-AAATCCATCGGGTAT-CTGGA-3	

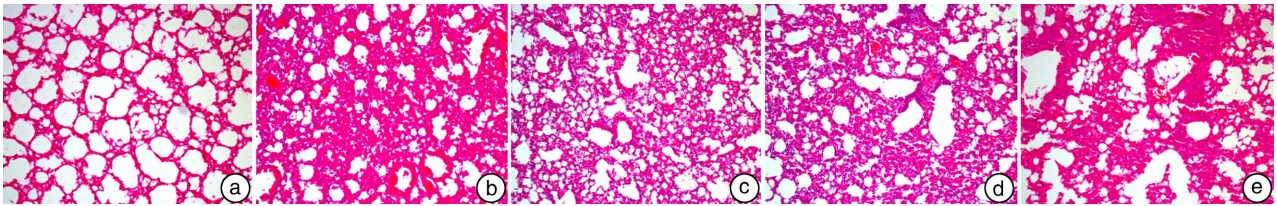
1.5 统计学处理

使用 SPSS 17.0 统计软件对所有数据进行分析; 组间比较采用单因素方差分析或 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理的改变

正常对照组小鼠肺组织苏木精-伊红染色肺泡结构清晰无异常, 肺泡、间质区域无组织充血及炎性细胞的浸润(见图 1a); 模型组存在肺泡大量闭塞, 存在片状实变区、肺泡腔有效面积明显减少(见图 1b); 血必净干预 3 d 组的肺组织弥漫性出血减少, 细支气管周围有少量胶原沉积(见图 1c); 血必净干预 7 d 组肺组织充血及出血较严重, 伴有纤维细胞的增殖、可见胶原沉积于细支气管周围(见图 1d); 血必净干预 14 d 组的肺结构破坏显著, 可见部分纤维块、纤维束(见图 1e)。



a:正常对照组;b:模型组;c:血必净 3 d 组;d:血必净 7 d 组;e:血必净 14 d 组。

图 1 各组小鼠肺组织病理苏木精-伊红染色(×200)

2.2 肺组织 Smads 信号通路相关蛋白的表达

2.2.1 Smad2/3、Smad7、p-smad2/3 蛋白的表达 各组 Smad2/3 均有少量表达;正常对照组的 psmad2/3 呈弱表达,模型组表达增加;血必净干预 3 d、7 d、14 d 组 p-smad2/3 的表达略强于正常对照组,弱于模型组;正常组的 Smad7 呈弱表达,模型组表达较正常对照组略增加,血必净干预 3 d、7 d、14 d 组的 p-smad2/3 表达强于模型组与正常组。蛋白表达灰度值统计分析后相比,各组 Smad2/3 表达的差异无统计学意义, p-smad2/3、Smad7 模型组、血必净干预组与正常对照组;血必净干预组与模型组; p-smad2/3 血必净干预 7、14 d 组与血必净干预 3 d 组; Smad7 血必净干预 14 d 组与血必净干预 3 d 组差别有统计学意义($P<0.05$) (见图 2、3)。

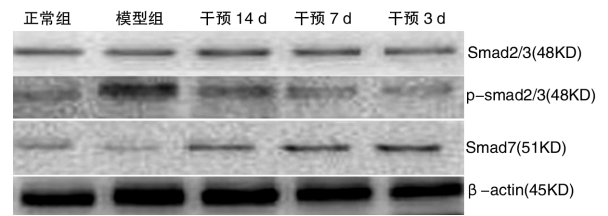
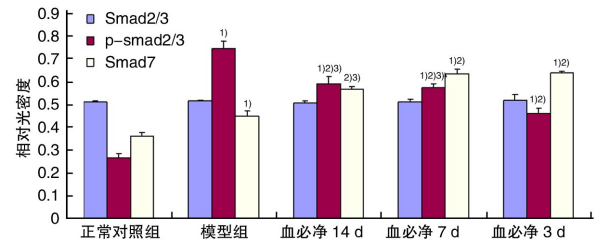


图 2 各组小鼠肺组织 Smads 信号蛋白的表达



与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$;与血必净 14 d 比较,³⁾ $P<0.05$ 。

图 3 各组小鼠肺组织 Smads 信号蛋白表达灰度值

2.2.2 Smad7 基因的表达 与正常对照组比较,模型组的 Smad7 基因表达量略有增强($P<0.05$);血必净干预组的表达高于模型组,以血必净干预 3 d 组变化最为显著,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$) (见表 2)。

表 2 各组小鼠肺组织 Smad7 mRNA 实时 PCR $2^{-\Delta Ct}$ 值
 $n=6, \bar{x} \pm s$

组别	Smad7 mRNA
正常对照组	1.01±0.03
模型组	1.09±0.02 ¹⁾
血必净 3 d 组	2.30±0.23 ¹⁾²⁾
血必净 7 d 组	1.18±0.12 ¹⁾²⁾³⁾
血必净 14 d 组	1.12±0.08 ¹⁾³⁾

与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$;与血必净 3 d 组比较,³⁾ $P<0.05$ 。

3 讨论

有研究报道依达拉奉^[3]、乌司他汀^[4]可减轻 PQ 引起的组织过氧化损伤,认为通过调节抑制某些炎性因子分泌来达到减轻肺纤维化的目的,但目前尚未有定论。Li 等^[5]发现普萘洛尔在肺组织可以阻抑 PQ 对肺组织的损害。Song 等^[6]通过动物实验研究表明,赖诺普利通过降低大鼠肺组织中羟脯氨酸含量来发挥其抗纤维化的作用。

在祖国传统医学领域,目前关于银杏叶、黄芩苷^[7]、贯叶连翘提取物^[8]、姜黄素^[9]等中药或中药成分防治 PQ 中毒的国内报道逐渐增多,寻求中医药治疗 PQ 中毒已成为研究热点。此外李晓岚等^[10]发现血必净注射液可以减少血小板聚集,减少炎性渗出,促进炎症吸收;其认为血必净联合 HP 治疗早期的急性 PQ 中毒可以更加有效保护 PQ 对重要脏器的损害,降低 PQ 中毒的病死亡率。

血必净注射液是由红花、当归、川芎、赤芍、鱼腥草、丹参等提取而成的中药注射剂,目前临床上大多运用于急危重症如全身炎症反应征等的治疗,具有溃散毒邪、疏通经络、活血化瘀的作用,其有效成分为红花黄色素 A、丹参素、阿魏酸、芍药苷、川芎嗪等。研究认为红花黄色素 A 有利于降低毛细血管通透性,还能使组织增加耐缺氧的能力;阿魏酸、川芎嗪能有效清除氧自由基及抗氧化,对组织纤维化有一定的防治作用;丹参素可拮抗内毒素、抗氧化及清除氧自由基;芍药苷能够调节血栓素 A2/前列环素 I2 的平衡。有学者实验研究得出血必净具有强效拮抗内毒素的作用,其机制是通过诱

导单核-巨噬细胞产生内源性炎性介质失控性释放的作用,从而清除氧自由基、降低毛细血管通透性,抑制细胞外基质的沉积,从而改善组织纤维化程度,抑制纤维化发展^[11-12]。

TGF-β1 是公认的致纤维化因子,而在 TGF-β1 调控的多种信号转导通路中,尤以 TGF-β1/Smads 信号转导通路最为重要,目前研究认为 Smad2/3 磷酸化是 TGF-β1/Smads 通路被激活的标志,而 Smad7 是其负反馈环路的信号蛋白,可通过竞争性的结合 TGF-β I II 受体,阻抑 Smad-2/3 的磷酸化,进而减轻或阻抑组织、器官纤维化的发生^[13-14]。p-smad2/3 表达的多少是 TGF-β1/Smads 通路被激活程度的标志。从本研究来看,正常组肺组织 p-Smad2/3、Smad7 表达均相对弱,而模型组表达增高,提示 TGF-β1/Smads 信号转导通路在正常的肺组织处于非激活状态,百草枯可使肺组织 TGF-β1/Smads 信号激活,Smad2/3 被活化为 p-Smad2/3。不同时间段血必净干预后,肺组织 p-Smad2/3 的表达亦有减弱,提示血必净在一定程度上可抑制 Smad2/3 的磷酸化。

研究认为 Smad7 是 TGF-β1/Smads 信号转导通路的负反馈环路的重要信号蛋白,可竞争性地阻止 Smad-2/3 的磷酸化。不难看出模型组 p-Smad2/3 表达上调,同时 Smad7 的表达相应上调,但上调不及 p-Smad2/3 明显,笔者认为同等条件下 p-Smad2/3、Smad7 蛋白表达的失调,可能是导致组织纤维化发生的原因之一,Schiffer 等^[15]的研究结果亦是认为如此。不同时间段血必净干预后,在下调 p-Smad2/3 表达的同时,Smad7 的表达亦增强,血必净干预 3 d 作用更为显著,提示血必净还有上调 Smad7 的作用,从而反竞争性地阻止 Smad-2/3 的磷酸化,早期用药效果更明显。

综上所述,本实验研究证实了一次性腹腔注射 PQ 能够成功构建肺纤维化模型,其作用机制可能与 Smads 信号转导通路的激活有关,而血必净很可能通过作用于 Smads 信号转导通路正、负反馈环路中的 Smad7、Smad2/3 信号蛋白,早期部分阻抑 PQ 所致肺纤维化的进展。

参考文献

[1] Sujin S, Kim Y H, Gil H W, et al. The time between paraquat ingestion and a negative dithioniteurine test in an independent risk factor for death and organ failure in acute paraquat intoxication[J]. J Korean Med Sci, 2012, 27: 993-998.

[2] Zhao Y, Geverd D A. Regulation of Smad3 expression in bleomy-cin-induced pulmonary fibrosis: a negative feedback loop of TGF-beta signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 294: 319-323.

[3] 支巧明, 孙海晨, 钱晓明, 等. 依达拉奉对百草枯中毒大鼠肺损伤的保护作用[J]. 医学研究生学报, 2010, 23(10): 1033-1037.

[4] Mitra S, Chakrabarti N, Bhattacharyya A. Differential regional expression patterns of α-synuclein, TNF-α, and IL-1β; and variable status of dopaminergic neurotoxicity in mouse brain after Paraquat treatment. [J] J Neuroinflammation, 2011, 8: 163-163.

[5] Li Q, Peng X, Yang H, et al. Deficiency of multidrug and toxin extrusion 1 enhances renal accumulation of paraquat and deteriorates kidney injury in mice[J]. Mol Pharm, 2011, 8: 2476-2483.

[6] Song C, Kanthasamy A, Jin H, et al. Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration[J]. Neurotoxicology, 2011, 32: 586-595.

[7] 聂时南. 百草枯中毒及预后影响因素分析[J]. 医学研究生学报, 2009, 2(10): 1009-1011.

[8] 魏薇, 何庆. 贯叶连翘提取物对百草枯所致的急性肺微血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 四川大学学报(医学版), 2006, 37(3): 434-437.

[9] 张伟, 孙海晨, 邵旦兵, 等. 急性百草枯中毒的临床分型与预后分析[J]. 中华急诊医学杂志, 2010, 1(4): 357-360.

[10] 李晓岚, 高景利, 王爱田. 早期血必净联合血液灌流治疗急性百草枯中毒的疗效观察[J]. 中国急救医学, 2008, 28(5): 745-747.

[11] 李铁刚, 张嵘. 血必净治疗百草枯中毒的病例分析[J]. 实用药物与临床, 2007, 10(3): 159-160.

[12] 马俊清, 路伟, 黄杨, 等. 血必净注射液对百草枯刺激的大鼠肺微血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国急救医学, 2008, 28(9): 808-812.

[13] Li J H, Zhu H J, Huang X R, et al. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13: 1464-1472.

[14] Torada Y, Hanada S, Nakao A, et al. Gene transfer of Smad7 using electroporation of adenovirus prevents renal fibrosis in post obstructed kidney[J]. Kidney Int, 2002, 61: 94-98.

[15] Schiffer M, Bitzer M, Roberts I S, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7[J]. J Clin Invest, 2001, 108: 807-816.

(收稿日期: 2015-01-13)