

急性百草枯中毒时细胞信号通路变化的研究进展

刘 瑶

摘 要 百草枯是一种广泛使用于农业的有机杂环类除草剂,对人体毒性极大,致死率高且无特效解毒剂。中毒患者早期多死于器官衰竭,后期主要死亡原因为进行性且不可逆转的肺纤维化所导致的呼吸衰竭。目前百草枯中毒机制与治疗方案已得到广泛研究。现就百草枯对主要细胞信号通路的影响做一综述。

关键词 百草枯 细胞信号通路

中图分类号 R595

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.09.052

百草枯(paraquat, PQ)又名克无踪、对草快、一扫光等,化学名 1,1-二甲基-4,4-联吡啶阳离子盐,是农业生产中广泛应用的一种有机杂环类接触性脱叶除草剂,制剂虽为中等毒性,但对人体毒性极大,至今无一特效解毒剂,直接接触、吸入、误服或自服均可造成急性中毒,其中口服中毒患者病死率高达 60%~70%^[1]。急性 PQ 中毒后可引起皮肤、肺、肝、肾、心、神经等多器官系统不同程度的损伤,作用靶器官为肺,后期主要死亡原因为进行性且不可逆转的肺纤维化所导致的呼吸衰竭,这可能与 PQ 中毒时产生的氧化损伤、肺泡损伤、细胞活化和细胞因子网络激活、结缔组织重建等有关^[2]。

一、急性 PQ 中毒时 NF- κ B 通路变化

核因子 κ B(NF- κ B)是一类氧化应激敏感型核转录因子,几乎存在于所有细胞中,作为调控细胞因子网络的共同通路与枢纽型环节,活化后不仅能够引发机体的免疫与炎症反应,同时还可诱导与纤维化密切相关的细胞因子释放,进而导致后期组织纤维化^[3,4]。Sun 等^[5]通过对急性 PQ 中毒诱导的大鼠肺损伤研究后发现,NF- κ B 在中毒后的各时间点持续增高,与肺部病理变化趋势相一致。时晔等^[6]通过观察急性 PQ 中毒大鼠肾组织中 TNF- α 及 NF- κ B 表达后发现,PQ 中毒后大鼠肾组织中 TNF- α 表达于染毒后 12h 逐渐增高,高剂量染毒组明显高于低剂量染毒组;NF- κ B 在对照组基本不表达,低剂量染毒组中 12h 表达与对照组无明显差异,随时间延长呈明显升高趋势;高剂量染毒组则于 12h 表达即升高,与各时间点对照组及低剂量染毒组比较差异均有统

计学意义,且与肾组织的病理损伤程度基本一致,推测 NF- κ B 调控炎症因子 TNF- α 参与肾组织炎症损害过程。刘会芳等^[7]通过研究急性 PQ 中毒大鼠肝组织中 NF- κ B、一氧化氮(NO)及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达变化发现,染毒初期肝组织中 NO 浓度和 iNOS 活性增高即与 NF- κ B 激活呈同步趋势,且与肝组织病理变化一致,推断 PQ 可诱导早期 NF- κ B 通路激活,活化后使 iNOS 基因转录过度表达并产生大量细胞毒性物质 NO,在 PQ 所致肝损伤中起重要作用。

二、急性 PQ 中毒时 p38 通路与 JNK 通路变化

p38 和 JNK 均为丝裂活化蛋白激酶(MAPKs)的亚族,利用其的 MAPK 通路分别由其命名,如利用 p38 的 MAPK 通路被称为 p38 通路。p38 主要由炎症反应产生的多种炎症细胞因子所激活,p38 通路在炎症疾病的发生、发展过程中发挥了重要的作用,参与介导细胞的应激、免疫及生长、分裂、增殖、凋亡等多个过程;JNK 是细胞转导各种应激原诱导所产生的信号的关键分子,JNK 通路可由环境应激、生长因子、细胞因子等多种因素激活,短暂的 JNK 通路激活可促进细胞生长增殖,长期的 JNK 通路则能加速细胞凋亡,当细胞缺失 JNK 时,凋亡速度显著下降^[8,9]。

张志坚等^[10]通过反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白免疫印记实验(Western blot)法对 PQ 中毒大鼠肺组织 JNK 的 mRNA 及蛋白表达实验研究发现,PQ 中毒后大鼠肺组织中 JNK 及磷酸化 JNK(p-JNK)表达明显增高,肺泡损伤程度明显增加,给与沙苑子总黄酮后 JNK 及 p-JNK 表达明显下降,肺泡病变程度减轻,差异有统计学意义。陈娇等^[11]研究发现,正常大鼠肺组织中仅有少量 p38 及磷酸化 p38(p-p38)表达,而急性 PQ 中毒组大鼠肺组织中 p38

及 p-p38 表达明显增加,肺泡灌洗液及肺组织中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 及 SOD 较对照组均明显增高,给予 p38MAPK 抑制剂 SB203580 后上述指标均显著下降,肺组织病理变化程度减轻,推测抑制 p38MAPK 通路可能与进一步抑制炎症介质释放密切相关。Lee 等^[12]通过研究 PQ 在果蝇模型中产生的氧化应激效应时发现,PQ 诱导后激活 JNK 信号通路,在果蝇大脑中有 Jafracl (与果蝇同源的人类过氧化氢酶 II) 表达,其作为 JNK/FOXO 信号转导通路的下游效应因子可以提高神经元的氧化应激耐受性并可以延长寿命。c-Jun 是 JNK 通路的下游底物^[8]。吴伟等^[13]通过观察 PQ 中毒大鼠肺组织中 c-Jun 基因表达的变化及姜黄素干预治疗后发现,染毒 1、3、7 天中毒组和治疗组 c-Jun 表达均显著增加,第 3、7 天治疗组 c-Jun 表达值较中毒组低,但差异无统计学意义,提示姜黄素对 PQ 中毒鼠肺组织中 c-Jun 表达无明显抑制,即姜黄素缓解 PQ 中毒大鼠症状、减轻肺纤维化程度的原因可能是通过抑制肺组织中 TGF- β 1 的表达而非通过抑制 JNK/c-Jun 通路来实现的。

三、急性 PQ 中毒时 TGF- β /Smads 通路变化

急性 PQ 中毒造成多器官系统损害,急性肺损伤与后期肺纤维化导致的呼吸衰竭是死亡的主要原因,肺纤维化以大量胶原蛋白和细胞外基质过度沉积,肺间质细胞增生为主要表现。转化生长因子 β (TGF- β) 是引起细胞纤维化最重要的因子之一,由多种组织细胞合成,通过结合受体将细胞外信号转导入细胞核内来影响细胞增殖、分化、凋亡等,进而调控细胞周期^[14]。在 TGF- β /Smads 信号转导通路中,胞质蛋白 Smads 是参与传递并调节 TGF- β 下游信号分子的关键成员之一,其按结构功能分为受体调节型 Smad (主要为 Smad2、3)、通用型 Smad (主要为 Smad4) 及抑制型 Smad (主要为 Smad6、7) 3 个亚型,其中 Smad2、3 是 TGF- β 1 的直接底物,直接参与大部分 TGF- β 信号转导,是肺纤维化形成的必要条件,Smad7 则主要通过阻止受体调节型 Smads 磷酸化和(或)干扰通用型 Smads/受体调节型 Smads 复合物的形成来阻断信号转导^[15]。通过基因沉默或 RNA 干扰技术抑制 Smad3 表达或通过提高 Smad7 表达均可削弱 TGF- β 信号转导,明显减轻肺纤维化发展程度^[16]。

黄敏等^[17]对大鼠进行 PQ 染毒、对照及干预研究后发现,TGF- β 1 水平随染毒时间逐渐升高,14 天达

高峰后略有下降但仍维持在较高水平,免疫组化显示 14 天后肺组织炎症改变减轻,纤维增生明显,TGF- β 1 增高程度与肺纤维化程度呈正相关,提示 TGF- β 1 早期可能作为炎症因子发挥促炎作用,而后期则可能通过选择性诱导激活下游致纤维化因子促进肺纤维化进展。Chen 等^[18]通过测定 PQ 中毒大鼠肺成纤维细胞 Smad7 及 TGF- β 1 mRNA 表达及观察肺组织病理变化后发现,PQ 中毒后大鼠肺组织 TGF- β 1 mRNA 表达明显增高,Smad7 表达降低,成纤维细胞增殖且胶原生成能力增强,肺纤维化明显;DHA 干预组通过 PQ 染毒前 7 天开始干预并持续治疗 35 天后发现,较 PQ 染毒组 TGF- β 1 mRNA 表达明显减少,Smad7 表达显著增强,肺组织纤维化明显减轻,推测 DHA 可能通过上调肺纤维化负向调节因子 Smad7 表达抑制 TGF- β /Smads 信号转导通路并减少 TGF- β 1 表达,最终抑制肺成纤维细胞增殖降低肺纤维化,对 PQ 所致的肺损伤起到预防性保护作用。韩枫等^[19]利用免疫印迹技术结果显示 PQ 中毒大鼠肺组织中 TGF- β 、Smad3 蛋白表达显著增高,肺组织炎症浸润并纤维化明显,给予吡非尼酮干预后测定指标及肺纤维化程度均显著降低。

四、急性 PQ 中毒时 cAMP/PKA 通路变化

cAMP/PKA 通路是经典的 G 蛋白受体偶联第二信使调节的信号转导通路之一,通过激活 cAMP 依赖的 PKA 调节细胞功能、介导多种神经递质及其他信号分子,起着快速跨膜传递和放大信号的作用,是重要的机体细胞功能调节机制之一。任金鹏等^[20]通过建立 PQ 染毒诱导的小鼠帕金森病模型,采用液闪测定技术测定小鼠纹状体区 cAMP 调节的磷酸化蛋白 (DARPP-32) 磷酸化程度发现,观察时间内小鼠纹状体区 DARPP-32 水平较对照组差异无统计学意义,而 DARPP-32 磷酸化程度显著降低,同时小鼠纹状体区多巴胺受体 D1 表达亦明显减少,推测 PQ 可能通过 cAMP/PKA 通路减弱体内 DARPP-32 磷酸化程度,进而调节多巴胺 D1 受体信号转导。杜宇等^[21]体外培养人脐静脉内皮细胞并研究发现,红霉素可明显降低 PQ 中毒所致的内皮细胞通透性,红霉素干预组细胞内 cAMP 浓度明显高于染毒组,提示红霉素可能通过提高内皮细胞 cAMP 浓度使细胞通透性降低来改善 PQ 中毒受损的血管内皮屏障功能。这与以往的研究结果是一致的^[22]。

五、急性 PQ 中毒时 Wnt 通路变化

Wnt 信号通路即由 Wnt 基因调控的信号转导途

径,Wnt 基因编码的 Wnt 蛋白通过分泌作用与细胞膜上的受体结合并激活细胞内信号转导通路,调节靶基因表达,是调控细胞生长发育、组织稳定、平衡能量代谢及维持干细胞功能的关键途径之一。 β -catenin 是经典 Wnt 通路的关键分子,Wnt 通路被激活后抑制了胞质中 β -catenin 的正常磷酸化及降解,导致胞质中 β -catenin 水平升高并转移到胞核中,与基因特异性转录因子结合后引起靶基因的转录,最终产生相应的特定生物学效应。窦婷婷等^[23]经体外培养并诱导分化人胚胎神经干细胞,观察不同浓度 PQ 对细胞活力的影响及测定不同时间点 Wnt 通路关键分子 β -catenin 的表达情况后发现,高剂量 PQ 染毒处理后 24h 细胞增殖即出现明显抑制,该组在各观测时间点 β -catenin mRNA 表达均明显低于各低剂量对照组,由此推测 PQ 可通过抑制 Wnt 信号通路中关键分子 β -catenin 的表达,对人类神经干细胞的分化过程产生重要的影响。Tao 等^[24]通过观察慢性氧化诱导损伤肝细胞特异性敲除 β -catenin 小鼠及体外染毒 PQ 的小鼠 AML12 肝细胞后发现,与野生型小鼠相比,肝细胞特异性敲除 β -catenin 小鼠肝脏血清转氨酶明显升高,组织病理学程度明显加重,细胞凋亡亦明显加速。具有 β -catenin 的小鼠 AML12 肝细胞受损程度明显小于 β -catenin 缺失的小鼠 AML12 肝细胞,细胞增殖明显高于后者,凋亡明显减少,推测 Wnt/ β -catenin 信号通路对肝脏急慢性氧化损伤均有保护作用。

六、急性 PQ 中毒时 hedgehog 通路变化

hedgehog 家族蛋白是一组分泌性细胞内信号分子,hedgehog 信号通路由 HH 信号蛋白、Ptc、Smo 特异性受体、Gli 蛋白及下游靶基因组成,在调控干细胞分化、维持干细胞自我更新中发挥重要作用。研究表明,Sonic hedgehog(SHH)信号通路参与并显著影响肺部结构形成和发育过程。周媛媛等通过观察 PQ 中毒后大鼠肺组织病理变化及 Smo、Gli1 蛋白表达水平发现,PQ 染毒组大鼠肺组织结构破坏,大量胶原及成纤维细胞增生,病理改变明显,Smo 及 Gli1 蛋白表达亦明显高于正常对照组,且 Smo 及 Gli1 蛋白表达呈正相关,推测 PQ 可能通过激活 SHH 通路上调 Smo 及 Gli1 蛋白表达,大量转录因子 Gli1 进入胞核并激活下游靶基因表达,最终导致肺纤维化过程的发生与发展。

综上所述,虽然目前急性 PQ 中毒机制已得到广泛研究,但仍不能完全明确,其中有多条信号通路参与 PQ 急性脏器损伤过程,且各通路之间存在相互联

系的网络型关系,若能进一步明确 PQ 诱导的细胞损伤时相关的细胞信号通路变化及其作用,那么对应的抑制剂就能为 PQ 中毒提供全新的治疗方法。

参考文献

- Gil HW, Hong JR, Jang SH, *et al.* Diagnostic and therapeutic approach for acute paraquat intoxication[J]. J Korean Med Sci, 2014, 29(11): 1441-1449
- 杨家进. 百草枯急性中毒机制及治疗进展[J]. 临床医学, 2011, 31(12): 113-115
- Wong ET, Tergaonkar V. Roles of NF- κ B in health and disease: mechanisms and therapeutic potential[J]. Clinical Science, 2009, 116(6): 451-465
- Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines [J]. Semin Immunol, 2014, 26(3): 253-266
- Sun Y, Zhang J, Yan Y, *et al.* The protective effect of C-phycocyanin on paraquat-induced acute lung injury in rats[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2011, 32(2): 168-174
- 时晔, 樊英华, 尚亮, 等. 核因子- κ B 在急性百草枯中毒大鼠肾脏中的表达及其意义[J]. 陕西医学杂志, 2013, 42(7): 780-783
- 刘会芳, 魏芳, 赵燕燕, 等. 生脉注射液对百草枯中毒大鼠肝组织核因子- κ B 以及诱导型一氧化氮合酶表达的影响[J]. 医学研究与教育, 2010, 27(3): 12-15
- 查锡良. 生物化学: [M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 375-375
- Darling NJ, Cook SJ. The role of MAPK signaling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(10): 2150-2163
- 张志坚, 董瑶瑶, 李晓萍, 等. 沙苑子总黄酮通过抑制内质网应激和 JNK 通路过度活化减轻百草枯中毒大鼠肺损伤[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(6): 383-387
- 陈娇, 钱晓明, 任艺, 等. p38MAPK 在百草枯中毒致大鼠急性肺损伤中的作用研究[J]. 中国急救医学, 2014, 34(2): 183-186
- Lee KS, Kanae LA, Koichi Iijima, *et al.* JNK/FOXO-mediated neuronal expression of fly homologue of peroxiredoxin II reduces oxidative stress and extends life span[J]. J. Biol. Chem, 2009, 284(43): 29454-29461
- 吴伟, 刘莹, 胡明, 等. 百草枯中毒大鼠肺 TGF- β 1 和 c-Jun 的表达及姜黄素的干预作用[J]. 中国医科大学学报, 2011, 40(1): 12-16
- Bauge C, Girard N, Lhuissier E, *et al.* Regulation and role of TGF- β signaling pathway in aging and osteoarthritis joints[J]. Aging Dis, 2013, 5(6): 394-405
- 曹慧芬, 王庆文. 转化生长因子- β 及其 Smad 信号转导的研究进展[J]. 中国药物与临床, 2010, 10(1): 1145-1147
- 秦静, 赵铭山, 李君. 丹参素干预对肺纤维化大鼠 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(5): 937-940, 946
- 黄敏, 杨惠芳, 李宏辉, 等. 百草枯中毒致肺纤维化大鼠细胞因子表达及四氢吡咯二硫代氨基甲酸酯的干预作用[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2012, 11(5): 452-458

(转第 151 页)

显露,有利于松动胆囊颈部嵌顿的结石,可以留取少量胆汁行细菌培养,指导术后抗感染治疗等^[7]。胆囊减压常选择用电凝钩直接切开在胆囊底部,用吸引器吸尽胆汁。在减压的过程中,要及时将脓性胆汁吸尽,尽量避免胆汁向下腹部或者左侧腹部扩散。

胆囊颈部结石嵌顿常常导致胆囊颈部和 Calot 三角区炎症明显,并且嵌顿结石常常将胆囊颈部胆囊壁向肝总管方向挤压,使得 Calot 三角内解剖结构不清,导致手术难度明显增加。而对于胆囊颈部和 Calot 三角的处理是手术成功与否的关键所在。笔者的经验是术中需要根据胆囊颈部嵌顿结石的大小、嵌顿的具体部位和 Calot 三角局部的具体情况采用不同的手术方法。当 Calot 三角结构解剖清楚时,采用电凝钩和分离钳分离打开前后浆膜,分离出胆囊管和胆囊动脉,尽量明确显露“三管一壶腹”关系(胆囊管、肝总管、胆总管和胆囊壶腹),分别将胆囊管和胆囊动脉用钛夹或者 Hemolock 夹闭后剪断。当 Calot 三角结构解剖不清楚时,尤其是病程超过 1 周或者近期反复发作急性胆囊炎的患者,Calot 三角常呈冷冻样粘连,用电凝钩和吸引器配合分离胆囊三角。用吸引器头部进行钝性分离往往非常有效,吸引器头部可以同时钝性分离和吸引,常常更加容易找到间隙。用此种方法常常可以分离出胆囊管和胆囊动脉。(3)如果 Calot 三角水肿严重,上述方法均不能解剖分离出胆囊管和胆囊动脉时,采用逆行胆囊切除的方法。自胆囊底部开始用电凝钩进行分离,游离至胆囊颈部时,尽量紧贴胆囊壶腹部分离,直至显露胆囊管。(4)当胆囊颈部结石导致胆囊颈部压迫肝总管,可能存在 Mirizzi 综合征时,强行分离胆囊颈部往往容易导致胆管损伤。笔者从胆囊底部完全劈开胆囊,取净胆囊内结石。在确保不损伤胆管的前提下,尽可能切除胆囊体部和底部的胆囊壁,行胆囊大部分切除术,

残余胆囊壁电凝破坏。自胆囊颈部腔内明确胆囊管开口位置,用可吸收线缝合从胆囊腔内关闭胆囊管开口。

当胆囊颈部结石嵌顿导致急性胆囊炎反复发作,胆囊三角常呈“冷冻样”或者“肝胝体样”粘连,或者结石将胆囊颈部挤压肝总管,形成 Mirizzi 综合征,或者存在肝外胆管变异,或者出血腹腔镜下不容易控制的出血时,应该果断中转开腹手术^[4]。手术医师应该时刻牢记确保患者手术安全,而不能为了盲目追求降低中转开腹率。本组患者中 4 例中转开腹手术,1 例因为肝门部出血,3 例因为胆囊三角呈冷冻样粘连,不能分开。全部患者术后恢复顺利。

因此,随着腹腔镜手术经验的增加和技术的提高,胆囊颈部结石嵌顿已不是腹腔镜手术的禁忌证。术中应该根据颈部嵌顿结石和 Calot 三角的具体情况,灵活运用不同的手术策略和方法。在充分和患者及家属沟通病情的前提下,腹腔镜胆囊切除术治疗胆囊颈部结石嵌顿是安全可行的方法。

参考文献

- 1 所广军,刘养洲,徐安安,等. 胆囊颈部结石嵌顿无或伴急性胆囊炎的免钛夹腹腔镜胆囊切除术[J]. 中国微创外科杂志,2011,11(8):694-696
- 2 陈敏政,蒋国勤. 腹腔镜胆囊切除术在急性胆囊炎嵌顿治疗中的应用[J]. 中国现代普通外科进展,2011,14(12):977-978
- 3 秦鸣放,吴瑜,王庆,等. 腹腔镜治疗胆囊颈部结石临床体会[J]. 中华腔镜外科杂志:电子版,2010,3(1):98-101
- 4 于爱军,赵洪涛,赵鲁文,等. 急性胆囊炎腹腔镜手术即刻中转开腹原因分析[J]. 医学研究杂志,2012,41(4):173-174
- 5 Hadad SM,Vaidya JS,Baker L,et al. Delay from symptom onset increases the conversion rate in laparoscopic cholecystectomy for acute calculus cholecystitis[J]. World J Surg,2007,31(6):1298-1303
- 6 陈永基,蔡永利. 腹腔镜胆囊切除术治疗胆囊颈部结石嵌顿伴胆囊积液的临床研究[J]. 中国内镜杂志,2010,16(7):722-724
- 7 吴伟梁,何志勇. 胆囊颈、管结石嵌顿的腹腔镜胆囊切除术[J]. 中国微创外科杂志,2011,11(11):1044-1045
(收稿日期:2014-12-16)
(修回日期:2015-01-15)
- 18 Chen J,Zeng T,Zhao X,et al. Docosahexaenoic acid (DHA) ameliorates paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats possibly through upregulation of Smad7 and SnoN[J]. Food Chem Toxicol,2013,57:330-337
- 19 韩枫,凌心. 吡非尼酮对百草枯诱导的大鼠急性肺损伤保护作用研究[J]. 药学与临床研究,2014,22(2):101-104
- 20 任金鹏,任惠民,蒋雨平,等. 百草枯对小鼠纹状体多巴胺 D1 受体信号转导的影响[J]. 中国临床神经科学,2004,12(3):226-229
- 21 杜宇,何庆. 红霉素经 cAMP 途径改善百草枯处理内皮细胞通透性机制的实验研究[J]. 现代预防医学,2011,38(1):137-139
- 22 Liu F,Verin AD,Borbiev T,et al. Role of cAMP-dependent protein kinase A activity in endothelial cell cytoskeleton rearrangement[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2011,280(6):L1309-L1317
- 23 窦婷婷,常秀丽,吕文,等. 百草枯对人胚胎神经干细胞分化过程中 Wnt 通路分子表达的影响[J]. 环境与职业医学,2013,30(6):411-415
- 24 Tao GZ,Lehwald N,Jang KY,et al. Wnt/ β -catenin signaling protects mouse liver against oxidative stress-induced apoptosis through the inhibition of forkhead transcription factor FoxO3[J]. J Biol Chem,2013,288(24):17214-17224
(收稿日期:2015-01-04)
(修回日期:2015-01-09)

(上接第 183 页)