

依达拉奉对百草枯致大鼠肾脏氧化应激因子及 HO - 1 表达的影响

蔡旗旗 张 盛 应 眇 葛小刚 任益群 吴晓玉 杨志辉

摘要 目的 观察依达拉奉(Eda)对百草枯(PQ)急性中毒所致大鼠肾脏氧化应激因子、HO - 1 蛋白表达的影响。方法通过腹腔注射百草枯建立百草枯中毒模型,并予以依达拉奉腹腔注射进行干预,ELISA 法观察氧化应激因子的表达情况。Western blot 法监测 HO - 1 蛋白表达情况。**结果** PQ 组在 1、3 及 7 天时 CAT、SOD 水平较低,21 天时明显升高,MDA 在 1 天时表达水平较高,随后逐渐下降,21 天时有所回升($P < 0.05$);PQ + Eda 组 1 天及 3 天时 CAT、SOD 及 MDA 表达水平均较 NS 组低,7 天时均有所升高,SOD 表达呈现峰值,21 天时表达接近 NS 组($P < 0.05$)。Eda 组 CAT 及 MDA 表达较 NS 组差异无统计学意义($P > 0.05$),而 SOD 表达随时间延长逐渐升高。肾脏组织中 HO - 1 表达 Eda 组及 PQ + Eda 组较 PQ 组显著性增加($P < 0.05$)。**结论** 依达拉奉可促使肾脏组织 SOD 及 CAT 表达提高,MDA 表达降低,并可上调 HO - 1 表达,对肾脏损伤起到保护作用。

关键词 百草枯 氧化应激 肾损伤 HO - 1

中图分类号 R3 R4 R5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.01.028

Edaravone Adjustes the Expression of the Oxidative Stress Factor and HO - 1 Expression in Renal of Paraquat Poisoning Rat. Cai Qiqi,

Zhang Sheng, Ying Pan, et al. Taizhou First People's Hospital, Zhejiang 318020, China

Abstract Objective To observe the expression of oxidative stress factor and HO - 1 in renal adjusted by Edaravone of paraquat poisoning rat. **Methods** Edaravone was injected after paraquat poisoning model setting up. Then we observed the HO - 1 protein expression by Western blot in 1,3,7,21d. We observed CAT, MDA, SOD protein expression by ELISA. **Results** In PQ group, the level of CAT, SOD were low in 1,3 and 7d, then significantly increased in 21d, MDA expression was higher in 1d, then gradually decline, recovered in 21d ($P < 0.05$). In PQ + Eda group, the expression level of CAT, SOD and MDA was lower than those of NS group in 1d and 3d, and all was increased in 7d, and SOD expression present peak ($P < 0.05$). In Eda group, the expression level of CAT and MDA had no obvious difference in the NS group, and the SOD expression extended increased over time. Expression of HO - 1 was significantly increased in PQ + EDA group, and it was significantly increased than the PQ group ($P < 0.05$). **Conclusion** Edaracone can promote the expression of SOD and CAT in kidney tissue, decrease MDA expression, and raise HO - 1 expression. Eventually it can protect the renal function.

Key words Paraquat;Oxidative stress; Renal damage; HO - 1

百草枯(paraquat,PQ)作为世界范围内广泛使用的高效能除草剂,对人类及动物均具有高毒性。百草枯毒性累及全身多个脏器,肺脏及肾脏是 PQ 中毒损伤的主要靶器官,其中肾脏是百草枯中毒主要的排泄器官,肾损伤的严重程度与病死率及致残率呈正相关^[1,2]。目前百草枯中毒被认为与强氧化性有关,前期实验亦发现炎性反应及氧化应激在百草肺损伤过程中发挥了重要的作用,上调抗氧化因子表达可显著减轻相关损伤^[3~6]。而在急性中毒肾脏组织中亦可

观察到氧化应激因子表达明显升高,考虑亦存在氧化 - 抗氧化平衡失调^[7,8]。而自由基清除剂、抗氧化剂依达拉奉(edaravone,Eda)可减轻移植肾组织及心肺复苏后肾组织氧化应激损伤,提高机体抗氧化因子的表达水平^[9~11]。本研究通过建立百草枯急性中毒肾损伤模型,观察急性百草枯中毒大鼠肾损伤后氧化应激因子的变化,以及自由基清除剂和抗氧化剂依达拉奉对氧化应激因子及 HO - 1 表达的干预作用,进而探索有效治疗百草枯中毒的方法。

材料与方法

1. 实验动物、试剂与仪器:清洁级 6 ~ 7 周 Sprague - Dawley(SD)大鼠由温州医科大学实验动物中心提供(伦理学审查批准编号:wydw2015 - 0166)。

基金项目:台州市科技局基金资助项目(131KY15)

作者单位:318020 台州市第一人民医院 EICU(蔡旗旗、张盛、应盼、任益群、吴晓玉、杨志辉),外科(葛小刚)

通讯作者:杨志辉,主任医师,电子信箱:15105868586@139.com

过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)ELISA检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海西唐生物公司;HO-1抗体、 β -actin抗体(内参)购自Abcam公司。酶标仪型号:DENLEY DRAGON Wellscan MK 3购自芬兰Thermo公司;洗板(机型号:Wellwash 4 MK2)购自芬兰Thermo公司。

2. 实验动物分组及急性百草枯中毒模型建立:清洁级SD大鼠80只(雌雄各半),体重250~310g。动物试验分组:(1)生理盐水对照组(NS组):8只,给予生理盐水1ml腹腔注射,30min后再次给予等量生理盐水。(2)百草枯中毒组(PQ组):24只,给予20mg/kg百草枯原液加生理盐水至1ml腹腔注射构建百草枯中毒模型,30min后再次给予等量生理盐水,每天1次,维持7天。(3)依达拉奉治疗组(PQ+Eda组):24只,给予20mg/kg百草枯加生理盐水至1ml腹腔注射构建百草枯中毒模型后30min给予依达拉奉针5mg/kg腹腔注射,每天1次,维持7天。(4)依达拉奉对照组(Eda组):24只,正常大鼠给予生理盐水1ml后给予依达拉奉针5mg/kg腹腔注射;对PQ、PQ+Eda以及Eda组的各组大鼠于在染毒后1、3、7、21天处死,每组每时间点6只,正常对照组(NS组)直接麻醉后颈椎脱臼,留取各大鼠肾脏组织标本。取肾组织200mg,加1.8ml冰生理盐水,高速组织匀浆机制成10%的肾组织匀浆,4℃、3000×g离心10min,留取上清,-80℃低温保存待测。Elisa法测定肾

脏组织中CAT、SOD、MDA表达,Western blot法检测肾脏组织中HO-1蛋白表达情况,操作严格按照试剂盒说明书进行。每组中随机取2只大鼠肾组织学检查。肾脏组织以4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,HE染色,作光镜检查。

3. 统计学方法:应用SPSS 16.0统计软件,采用单因素方差分析比较多组数据,采用LSD-t分析组间数据,用Image J软件对Western blot法检测结果进行分析,用双因素方差分析进行分析Elisa结果。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Eda对PQ中毒大鼠肾损伤病理变化的影响: NS组及Eda组大鼠肾脏病理显示肾脏呈红棕色,包膜易于剥离,镜下组织结构清晰,未见充血、水肿及空泡(图1A、图1B);PQ组1天肾脏暗红色,充血肿胀明显,表面可见出血点及淤血,组织结构清晰度下降,肾小管上皮细胞肿胀明显,并有空泡变性,管腔狭小,间质充血明显;并有炎性细胞浸润,3及7天时无缓解趋势,21天时病理表现有好转迹象(图1C所示)。PQ+Eda组肾脏呈暗红色,组织充血肿胀,上皮细胞肿胀,管腔变窄,3天时亦无明显缓解,但总体表现均较PQ组轻,7天时肾小静脉及间质毛细血管充血有所好转,上皮仍有肿胀,少量炎性细胞浸润,21天时已明显好转(图1D)。

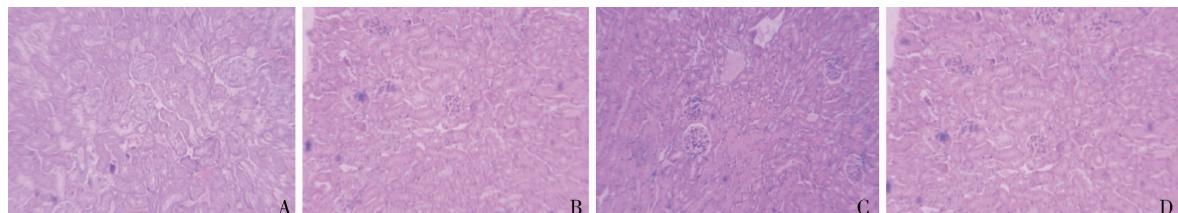


图1 Eda对PQ中毒大鼠肾脏组织病理的影响(HE, ×200)

A. NS组; B. Eda组; C. PQ组; D. PQ+Eda组

2. Eda对百草枯中毒大鼠肾脏氧化应激因子表达的影响:根据Elisa检测结果所示:PQ组在1、3及7天时CAT、SOD水平较低,21天时明显升高,MDA在1天时表达水平较高,随后逐渐下降,21天时有所回升($P<0.05$);PQ+Eda组1天、3天时CAT、SOD及MDA表达水平均较NS组低,7天时均有所升高,SOD表达呈现峰值,21天时表达趋于稳定,接近正常水平($P<0.05$)。Eda组CAT及MDA表达较NS组无明显差异,而SOD表达随时间延长逐渐升高(表1)。

Weatern blot法检测结果显示肾脏组织中HO-1表达Eda组表达量最高,PQ+Eda组次之,PQ组表达最低,但均较NS组表达量高;随着时间的推移,HO-1表达量均逐渐下降,7、21天PQ组与NS组无明显差异,而Eda组表达量仍高(图2)。

讨 论

百草枯作为广泛应用于控制阔叶植物的农药,起作用快,通过植被细胞内的电子转移系统阻断光合作用过程,导致活性氧在细胞内积累引起细胞死亡。目前认为百草枯中毒致病机制在于其极强的氧化性,

表1 Eda对PQ中毒大鼠肾脏氧化应激因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CAT (U/mg)	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)
正常对照组(NS组)	54.37 ± 5.80	1.14 ± 0.32	65.17 ± 20.30
百草枯中毒组(PQ组)			
1天	20.96 ± 7.21 *	1.49 ± 0.25 *	27.17 ± 8.88 *
3天	36.82 ± 4.34	1.41 ± 0.22	76.56 ± 18.76
7天	38.28 ± 4.94 *	1.08 ± 0.23	63.53 ± 20.61
21天	70.93 ± 10.91 *	1.64 ± 0.49 *	127.39 ± 42.76 *
依达拉奉治疗组(PQ+Eda组)			
1天	38.27 ± 4.13 * #	0.75 ± 0.27 * #	54.91 ± 8.92 #
3天	51.60 ± 7.96 #	0.77 ± 0.16 * #	58.74 ± 12.98
7天	56.10 ± 12.01 #	1.03 ± 0.32	191.13 ± 49.69 * #
21天	54.74 ± 7.68 #	1.48 ± 0.31	176.09 ± 55.33 * #
依达拉奉对照组(Eda组)			
1天	53.28 ± 15.54 #	1.10 ± 0.18 #	74.68 ± 10.28 #
3天	48.22 ± 11.12 #	1.13 ± 0.29	75.03 ± 10.76
7天	51.91 ± 8.80 #	1.18 ± 0.17	136.26 ± 32.00 * #
21天	55.33 ± 6.45 #	0.70 ± 0.11 * #	180.86 ± 40.29 * #

与NS组比较, * $P < 0.05$; 与PQ组比较, # $P < 0.05$

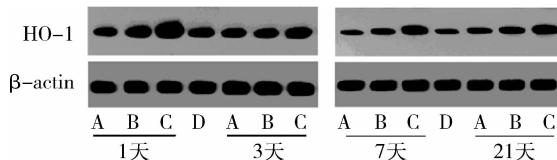


图2 依达拉奉注射液对急性百草枯中毒大鼠HO-1表达的影响

A. PQ组; B. PQ+Eda组; C. Eda组; D. NS组

打破细胞内氧化-抗氧化平衡,并启动炎性反应及免疫反应,释放多种炎性介质,影响多个信号通路表达,进一步破坏组织结构^[12~15]。百草枯在肾脏中含量高、持续时间长,损伤出现早^[16,17]。目前认为肾损伤与氧化应激、炎性因子及细胞因子的网络激活、血流动力学改变等均相关^[18,19]。研究人员发现在中毒早期,肾组织内的HO-1表达可迅速增加,以起到平衡氧化应激,减少细胞损伤的作用^[20,21]。而依达拉奉作为新型低分子氧自由基清除剂,可有效阻止氧自由基接到的蛋白质及核酸破坏,抑制黄嘌呤氧化酶及次黄嘌呤氧化酶活性,抑制血管内皮及组织细胞损伤,可能上调HO-1和NRF-2蛋白表达,参与Keap1-NRF2/ARE通路,保护急性CO中毒后脑损伤,还可降低复苏后大鼠Scr水平,减少肾小管上皮细胞凋亡,保护肾功能^[22~25]。因此笔者通过对百草枯中毒大鼠使用依达拉奉,通过其抗氧化作用,进而减轻百草枯对大鼠肾脏的氧化应激损害。

本实验笔者通过对大鼠腹腔百草枯建立肾损伤模型,发现急性中毒大鼠在肾脏组织中CAT及SOD

表达降低,MDA表达明显升高,呈现氧化-抗氧化失衡,提示氧化应激参与了百草枯肾损伤过程,导致SOD的消耗及MDA的积聚,而依达拉奉可促使肾脏组织SOD及CAT表达提高,调整组织的氧化-抗氧化平衡,进而起到抗氧化作用。此外笔者还观察到连续使用依达拉奉针,可持续提高SOD表达,考虑存在蓄积效应。在百草枯中毒肾组织中,HO-1蛋白表达增高,这与既往的研究相似,为应答氧化应激,保护组织功能作用。而依达拉奉针可在使用后诱导调控大鼠肾脏组织表达HO-1增加,从而对百草枯中毒致强氧化反应起到减轻损伤及保护作用。但是由于实验条件限制,本研究未对依达拉奉针调节HO-1蛋白表达的具体通路,以及延长依达拉奉针使用时间是否对治疗更为有效未进行探索。

本实验结果显示依达拉奉针可减轻百草枯急性中毒大鼠肾脏损伤程度,其作用机制包括直接提高抗氧化因子表达,清除百草枯所致ROS,并通过激活组织内HO-1表达发挥对肾脏的保护作用,可在一定程度上改善肾脏功能,缓解百草枯中毒病情。

参考文献

- Mohamed F, Endre Z, Jayamanne S, et al. Mechanisms underlying early rapid increases in creatinine in paraquat poisoning [J]. PLoS One, 2015, 10(3):e122357
- 刘芙蓉,李大伟,张天敏.诱导型一氧化氮合酶和血红素氧合酶-1在百草枯中毒大鼠肾脏中的表达[J].中国综合临床,2009,25(8):793-796
- Hong GL, Liu JM, Zhao GJ, et al. The reversal of paraquat-induced mitochondria-mediated apoptosis by cycloartenyl ferulate, the

- important role of Nrf2 pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319: 2845 – 2855
- 4 贺晓艳,孙琦,李忠旺,等.急性百草枯中毒大鼠肺组织炎症因子表达的变化及意义[J].中华劳动卫生职业病杂志,2009,27(3):149 – 152
- 5 Cai Q, Lu Z, Hong G, et al. Recombinant adenovirus Ad – RUNrf2 reduces paraquat – induced A549 injury [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2012, 31: 1102 – 1112
- 6 Hong GL, Cai QQ, Tan JP, et al. Mifepristone – inducible recombinant adenovirus attenuates paraquat – induced lung injury in rats. [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2015, 34(1):32 – 43
- 7 田英平,刘芙蓉,佟飞,等.百草枯中毒大鼠的肾损伤病理变化和血红素氧合酶-1的表达[J].中华劳动卫生职业病杂志,2009,27(8):468 – 471
- 8 Tomita M, Okuyama T, Katsuyama H, et al. Parquat – induced gene-expression in rat kidney[J]. *Arch Toxicol*, 2006, 80(10):687 – 693
- 9 沈建明,叶婷婷,王黎萍.依达拉奉对心肺复苏后大鼠肾损伤的保护作用及其机制[J].中华实验外科杂志,2009,26(6):787 – 789
- 10 樊游掌,谢建军,苏怀庆,等.依达拉奉对大鼠移植肾缺血再灌注损伤急性期的影响及作用[J].中国临床医学,2010,17(1):98 – 100
- 11 尹琳,邱晓峰,常素杰,等.依达拉奉对大鼠脑血肿周围组织丙二醛热休克蛋白-70及Bcl-2基因表达影响的研究[J].中国实用内科杂志,2007,27(8):585 – 587
- 12 Dinis – Oliveira RJ, Sousa C, Remião F, et al. Sodium salicylate prevents paraquat – induced apoptosis in the rat lung[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007;43 (1):48 – 61
- 13 刘瑶.急性百草枯中毒时细胞信号通路变化的研究进展[J].医学研究杂志,2015,44(9):181 – 183,151
- 14 杨琛,马涛,刘志.急性百草枯中毒大鼠肾损伤的研究[J].中华劳动卫生职业病杂志,2015,33(05):370 – 374
- 15 江民礼,吕利雄.EGCG对百草枯致小鼠急性肺损伤的保护作用[J].2013,42(9):47 – 51
- 16 支绍册,吴冬,李玲文,等.血液灌流对急性百草枯中毒兔肾组织炎损伤的影响[J].中华劳动卫生职业病杂志,2015,33 (9):658 – 662
- 17 赵波,菅向东,张忠臣,等.百草枯染毒大鼠组织中毒物含量与脏器损伤的关系[J].中华劳动卫生职业病杂志,2010,28 (3):220 – 223
- 18 刘丹,吴斌,卢中秋.急性百草枯中毒肾损伤机制及治疗进展[J].2015,44(4):167 – 169
- 19 Gu SY, Yeh TY, Lin SY, et al. Unfractionated bone marrow cells attenuate paraquat – induced glomerular injury and acute renal failure by modulating the inflammatory response [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23287
- 20 田英平,刘芙蓉,佟飞,等.百草枯中毒大鼠的肾损伤病理变化和血红素氧合酶-1的表达[J].中华劳动卫生职业病杂志,2009,27(8):468 – 471
- 21 Tomita M, Okuyama T, Katsuyama H, et al. Parquat – induced gene-expression in rat kidney[J]. *Arch Toxicol*, 2006, 80 (10) :687 – 693
- 22 Masuda T, Shimazawa M, Takata S, et al. Edaravone is a free radical scavenger that protects against laser – induced choroidal neovascularization in mice and common marmosets[J]. *Exp Eye Res*, 2016, 146: 196 – 205
- 23 Apaydin M, Erbas O, Taskiran D. Protection by edaravone, a radical scavenger, against manganese – induced neurotoxicity in rats[J]. *J Biochem Mol Tox Sicol*, 2016, 30(5):217 – 223
- 24 李琴,毕明俊,康海等.依达拉奉对急性一氧化碳中毒大鼠脑组织超微结构及抗氧化因子表达的影响[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2015, 22(5):341 – 346
- 25 Liu L, Song Y, Zhao M, Yi Z, et al. Protective effects of edaravone, a free radical scavenger, on lipopolysaccharide – induced acute kidney injury in a rat model of sepsis[J]. *Int Urol Nephrol*, 2015, 47(10): 1745 – 1752

(收稿日期:2016-05-16)

(修回日期:2016-06-01)

PGE₁ 及特利加压素对抗利尿性腹腔积液的影响

刘远志 李 鹏 张月宁 丁惠国 张世斌

摘要 目的 探究前列腺素E₁联合特利加压素对肝硬化难治性腹腔积液患者肾功能、血流动力学、心率等相关指标的影响。**方法** 将50例肝硬化难治性腹腔积液分为两组,联合治疗组25例,应用前列腺素E₁联合特利加压素;对照组25例,只用前列腺素E₁。特利加压素1mg,每8h1次,静脉注射。前列腺素E₁10μg,每天1次,静脉注射。比较两组患者尿量、腹围、血肌酐等指标变化。**结果** 治疗前两组患者体重、性别、白蛋白等基本信息比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。两组患者治疗后较治疗前BUN与SCr均明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),且治疗后,联合治疗组SCr明显低于对照组,差异有统计学意义($t = -2.199$; $P = 0.033$)。两组患者治疗后较治疗前腹腔积液减少、尿量增多,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后与对照组相比,