

## · 论著 ·

## 血必净干预下百草枯中毒大鼠肺组织线粒体融合蛋白 2 及超微结构变化的研究

胡明 吴伟 宫建 李延辉

**【摘要】** 目的 探讨百草枯(PQ)中毒致肺纤维化的发生机制以及血必净在 PQ 中毒时的治疗作用。方法 72 只雄性 Wistar 大鼠按随机数字表法分为对照组、PQ 中毒组和血必净干预组 3 组, 每组 24 只。一次性灌胃 50 mg/kg PQ 染毒致肺纤维化, 对照组灌胃 1 mL 蒸馏水; 血必净组在染毒后 30 min 腹腔注射血必净注射液 4 mL/kg, 12 h 1 次; PQ 组和对照组则腹腔注射等量生理盐水; 给药周期均为 14 d。各组于染毒后 1、3、7、14 d 末次干预后 30 min 各处死 6 只大鼠, 取肺组织, 通过苏木素-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色, 光镜下观察肺组织病理学及肺纤维化改变; 透射电镜下观察肺组织超微结构变化; 采用碱水解法测定羟脯氨酸(HYP)含量; 采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测线粒体融合蛋白 2(Mfn2)的表达。**结果** ① HE 染色: PQ 组 3 d 时炎症反应最重; 7 d 时肺泡腔内渗出液逐渐机化, 由肥大的成纤维细胞分泌纤细的胶原纤维, 肺泡腔内可见到纤维化; 14 d 时成纤维细胞大量增生, 肺泡结构破坏并萎陷, 胶原沉积, 肺纤维化初步形成。血必净组各时间点肺组织病理变化较 PQ 组轻。② Masson 染色: 14 d 时血必净组肺炎、肺纤维化程度较 PQ 组减轻。③ 电镜下观察: PQ 组 14 d 时肺组织线粒体相对少, 多数发生变性、肿胀和破坏; 可见基膜卷折, 肺泡塌陷, 间质内胶原纤维增多, 纤维化明显, 且均较血必净组严重。④ HYP 含量( $\mu\text{g/g}$ ): PQ 组、血必净组 3 d 时肺组织 HYP 含量即明显高于对照组( $743.3 \pm 50.2$ 、 $718.1 \pm 34.0$  比  $665.8 \pm 6.6$ , 均  $P < 0.05$ ), 随后逐渐升高; 但血必净组 7 d、14 d 时 HYP 含量明显低于 PQ 组( $790.5 \pm 23.8$  比  $876.7 \pm 42.0$ 、 $812.9 \pm 72.3$  比  $931.3 \pm 33.0$ , 均  $P < 0.05$ )。⑤ Mfn2 表达: 对照组 Mfn2 表达量相对较低; PQ 组 Mfn2 表达量随时间延长呈应激性逐渐升高, 但升高幅度较小; 血必净组 1 d 时 Mfn2 表达(A 值)即明显高于 PQ 组( $0.731 \pm 0.035$  比  $0.618 \pm 0.029$ ,  $P < 0.05$ ), 并持续高表达, 7 d 时达峰值( $0.732 \pm 0.037$  比  $0.669 \pm 0.034$ ,  $P < 0.05$ ), 而 14 d 时明显低于 PQ 组( $0.708 \pm 0.034$  比  $0.765 \pm 0.041$ ,  $P < 0.05$ )。**结论** 血必净可减轻 PQ 中毒引起的肺部炎症反应及肺纤维化程度, 其作用机制可能为血必净调节并增加了肺组织中 Mfn2 的表达。

**【关键词】** 中毒, 百草枯; 血必净注射液; 肺纤维化; 线粒体融合蛋白 2

**The interventional effect of Xuebijing injection on expression of mitochondrial fusion protein 2 and the ultrastructure changes in lung tissues in rats with paraquat poisoning** Hu Ming\*, Wu Wei, Gong Jian, Li Yanhui. \*Department of Medicine, Beijing Shaner Hospital, Beijing 100120, China  
Corresponding author: Wu Wei, Department of Emergency, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China, Email: wuwei196010@126.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the mechanism of pulmonary fibrosis induced by paraquat (PQ), and the effect of Xuebijing injection in treatment of PQ poisoning. **Methods** Seventy-two male Wistar rats were randomly divided into control group, PQ poisoning group, and Xuebijing intervention group, with 24 rats in each group. Pulmonary fibrosis was induced by single gavage at the dosage of 50 mg/kg of PQ, while 1 mL of distilled water was given by gavage in control group. Xuebijing injection at the dosage of 4 mL/kg were given intraperitoneally at 30 minutes after exposure to PQ in Xuebijing group, and it was repeated every 12 hours; same amount of physiological saline was given intraperitoneally in PQ group and control group. The experiment lasted for 14 days. Six rats in each group were sacrificed on 1, 3, 7, 14 days, respectively, after insult, and 30 minutes after the last intervention. The lung tissues were harvested, the changes in pathology in lung tissue and the degree of pulmonary fibrosis were observed with optical microscope with hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson stain. The ultrastructure changes in lung tissues were observed with transmission electron microscopic, and the content of hydroxyproline (HYP) in the lung tissue was determined by alkaline hydrolysis. The expression of mitochondrial fusion protein 2 (Mfn2) was determined by Western Blot. **Results** ① HE staining: in PQ group, inflammation was most marked on the 3rd day. On the 7th day, exudates in the alveoli started to be organized, and hypertrophic fibroblasts were seen to secrete slim collagen fibers, and fibrosis

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.06.005

基金项目: 全国临床医药研究专项基金(L2012057); 辽宁省科学技术计划项目(2013225049)

作者单位: 100102 北京善尔医院内科(胡明); 110001 辽宁沈阳, 中国医科大学急诊科(吴伟); 110016 辽宁, 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院临床药学教研室(宫建); 110016 沈阳, 辽宁省金秋医院心内科(李延辉)

通信作者: 吴伟, Email: wuwei196010@126.com

could be seen in alveoli. On the 14th day, intensive hyperplasia of fibroblasts could be observed, and the alveolar structure was destroyed and collapsed, with deposition of collagen deposited with formation of pulmonary fibrosis. At the same time, pathologic changes were milder in Xuebijing group than those in PQ group. ② Masson staining: the degree of inflammation in alveoli and pulmonary fibrosis were less marked in Xuebijing group than those of PQ group on the 14th day. ③ Under the transmission electron microscopy, it was found that the mitochondria of lung tissue cells was relatively less in number on the 14th day in PQ group, and the majority of them underwent degeneration, swelling and damage. Basement membrane became folded, alveoli were collapsed, and fibrosis was obvious. These changes were less serious in Xuebijing group. ④ Content of HYP ( $\mu\text{g/g}$ ): contents of HYP in lung tissues on the 3rd day in PQ group and Xuebijing group were significantly higher than those in control group ( $743.3 \pm 50.2$ ,  $718.1 \pm 34.0$  vs.  $665.8 \pm 6.6$ , both  $P < 0.05$ ), it then increased gradually, but the contents of HYP in Xuebijing group were significantly lower on the 7th day and 14th day than those in PQ group ( $790.5 \pm 23.8$  vs.  $876.7 \pm 42.0$ ,  $812.9 \pm 72.3$  vs.  $931.3 \pm 33.0$ , both  $P < 0.05$ ). ⑤ Expression of Mfn2: the expression of Mfn2 in control group was relatively lower. The expression of Mfn2 in PQ group was increased gradually under stress, but its rate was low. The expression of Mfn2 (A value) in Xuebijing group was significantly higher than that in PQ group on the 1st day ( $0.731 \pm 0.035$  vs.  $0.618 \pm 0.029$ ,  $P < 0.05$ ), and it was elevated steadily, reaching the peak on the 7th day ( $0.732 \pm 0.037$  vs.  $0.669 \pm 0.034$ ,  $P < 0.05$ ), but it was lower than that of PQ group on the 14th day ( $0.708 \pm 0.034$  vs.  $0.765 \pm 0.041$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Xuebijing reduces lung inflammatory reaction and pulmonary fibrosis as a result of PQ poisoning. The mechanism is that Xuebijing regulates and increases expression of Mfn2 in lung tissue.

**[Key words]** Paraquats poisoning; Xuebijing injection; Pulmonary fibrosis; Mitochondrial fusion protein 2

百草枯(PQ)中毒后大多数患者引起肺间质纤维化而导致死亡,发生肺组织纤维化的机制非常复杂,其中过氧化反应、肺泡损伤、成纤维细胞增生等均起到重要作用<sup>[1]</sup>。线粒体融合蛋白(Mfn)基因在线粒体的新陈代谢、凋亡及细胞信号转导等方面发挥着重要作用<sup>[2]</sup>,有研究表明,Mfn2参与了某些疾病的发生发展,明显抑制了血管平滑肌细胞的增殖、迁移和重塑<sup>[3]</sup>。Mfn2定位于线粒体的外膜,对线粒体融合起着重要的调节作用<sup>[4-5]</sup>。因此,Mfn2可能在PQ中毒致肺纤维化的发生发展中起到重要作用。

血必净注射液具有活血化瘀、清热解毒、菌毒并治的作用<sup>[6]</sup>;还可抑制中性粒细胞在体内集聚、过度活化,抑制“呼吸爆发”,减少氧自由基的产生<sup>[7]</sup>。本研究通过检测大鼠从PQ染毒到肺纤维化形成过程中组织Mfn2的表达,分析其与PQ中毒致肺纤维化的关系;探讨血必净注射液连续治疗对肺组织Mfn2表达的影响,以及对PQ致肺纤维化的救治效果。

## 1 材料和方法

**1.1 药品及主要试剂:**20% PQ溶液由先正达南通作物保护有限公司生产(蒸馏水稀释至10 mg/mL),避光保存;血必净注射液(500 g/L)由天津红日药业股份有限公司生产;羟脯氨酸(HYP)测试盒由南京建成生物工程研究所生产;兔抗Mfn2单克隆抗体(1:1 000)购自美国Sigma-Aldric公司;兔抗三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(1:200)购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;其他试剂由中国医科大学提供。

**1.2 动物分组及处置:**雄性Wistar大鼠72只,体质量180~220 g,购自中国医科大学附属第二医院实

验动物中心,动物合格证号:SCXK(辽)2003-0009。按随机数字表法分为对照组、PQ组、血必净干预组,每组再分为1、3、7、14 d亚组,每组6只。PQ组一次性灌胃50 mg/kg PQ染毒;对照组灌胃1 mL蒸馏水。血必净组于灌胃30 min后腹腔注射血必净注射液4 mL/kg,12 h 1次;PQ组和对照组腹腔注射等量生理盐水。均给药14 d,每日观察大鼠活动情况。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

**1.3 检测指标及方法:**于末次给药干预后30 min用水合氯醛腹腔注射麻醉各组大鼠,开胸取双侧肺组织,观察样本颜色、质地,有无出血及梗死灶。

**1.3.1 肺组织病理学观察:**取右肺上叶组织,4%多聚甲醛固定,经脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋、连续切片,行苏木素-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色,光镜下观察。

**1.3.2 肺组织超微结构观察:**取右肺中叶组织,戊二醛固定,经磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗、锇酸后固定、乙醇和丙酮梯度脱水、环氧树脂渗透包埋,超薄切片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅染色,透射电镜下观察。

**1.3.3 HYP含量及Mfn2表达测定:**取右肺下叶和左肺叶于液氮固定,-80℃冰箱保存,采用碱水解法测定肺组织HYP含量,测取各管吸光度(A)值。蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肺组织Mfn2表达,操作按试剂盒说明书进行,以目的条带与内参条带的A值比值表示Mfn2的相对表达量。

**1.4 统计学分析:**实验数据采用SPSS 12.0软件进行统计处理,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组肺组织 HYP 含量(表 1):**与对照组相比, PQ 组和血必净组染毒 3、7、14 d HYP 含量均明显增高(均  $P < 0.05$ );但血必净组 7 d、14 d HYP 含量均较 PQ 组降低(均  $P < 0.05$ )。

**表 1 血必净注射液对 PQ 中毒大鼠染毒后各时间点肺组织羟脯氨酸(HYP)含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	动物数 (只)	HYP 含量( $\mu\text{g/g}$ )			
		1 d	3 d	7 d	14 d
对照组	6	622.2 ± 37.8	665.8 ± 6.6	696.4 ± 47.7	736.3 ± 47.1
PQ 组	6	666.4 ± 18.6	743.3 ± 50.2 <sup>a</sup>	876.7 ± 42.0 <sup>a</sup>	931.3 ± 33.0 <sup>a</sup>
血必净组	6	666.2 ± 65.0	718.1 ± 34.0 <sup>ab</sup>	790.5 ± 23.8 <sup>ab</sup>	812.9 ± 72.3 <sup>ab</sup>
F 值		1.957	7.559	31.793	20.349
P 值		0.176	0.005	<0.001	<0.001

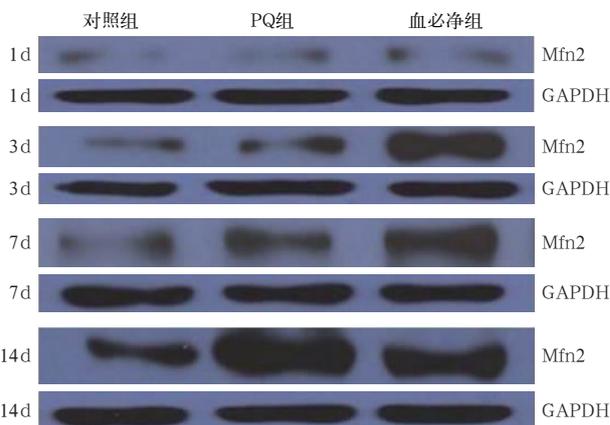
注:PQ 为百草枯;与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 PQ 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

**2.2 各组肺组织 Mfn2 表达(表 2;图 1):**PQ 组和血必净组染毒后各时间点 Mfn2 表达量均明显高于对照组(均  $P < 0.05$ )。血必净组 1 d 时 Mfn2 表达量即明显高于 PQ 组,并持续高表达至 7 d 达峰值,14 d 时明显低于 PQ 组(均  $P < 0.05$ )。

**表 2 血必净注射液对 PQ 中毒大鼠染毒后各时间点肺组织 Mfn2 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	动物数 (只)	Mfn2(A 值)			
		1 d	3 d	7 d	14 d
对照组	6	0.552 ± 0.029	0.567 ± 0.028	0.608 ± 0.030	0.629 ± 0.031
PQ 组	6	0.618 ± 0.029 <sup>a</sup>	0.648 ± 0.033 <sup>a</sup>	0.669 ± 0.034 <sup>a</sup>	0.765 ± 0.041 <sup>a</sup>
血必净组	6	0.731 ± 0.035 <sup>ab</sup>	0.730 ± 0.038 <sup>ab</sup>	0.732 ± 0.037 <sup>ab</sup>	0.708 ± 0.034 <sup>ab</sup>
F 值		77.929	84.200	55.975	109.193
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:PQ 为百草枯,Mfn2 为线粒体融合蛋白 2;与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 PQ 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

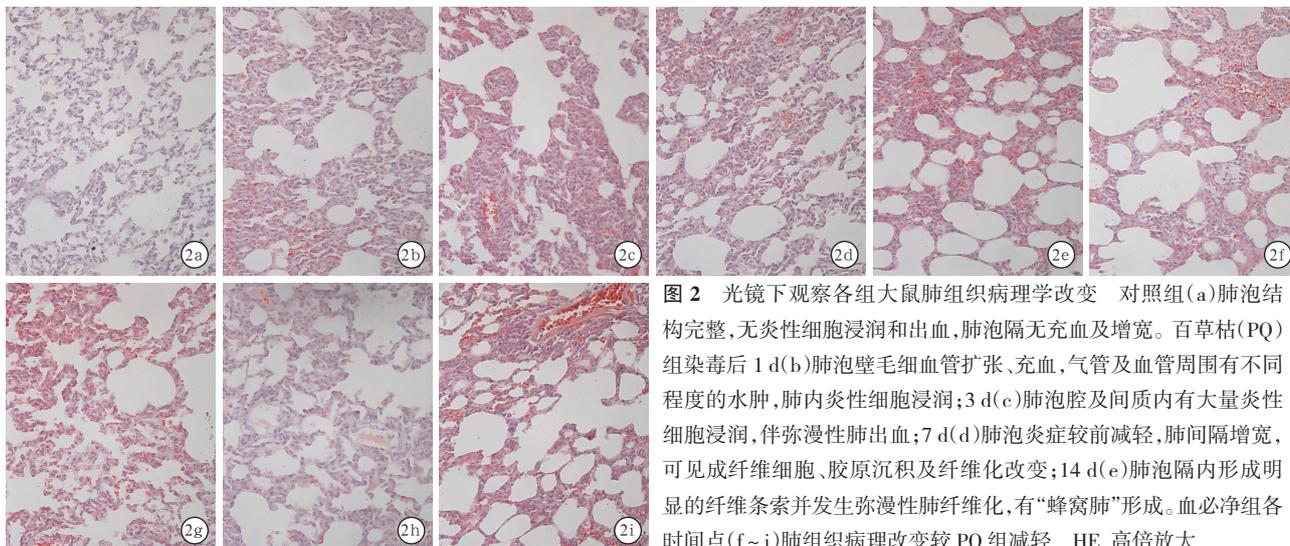


PQ 为百草枯,Mfn2 为线粒体融合蛋白 2, GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶  
**图 1 蛋白质免疫印迹试验检测各组大鼠 PQ 染毒后各时间点肺组织 Mfn2 的表达**

### 2.3 各组大鼠肺组织病理学观察

**2.3.1 大体观察:**对照组大鼠双肺呈粉红色,表面光滑,柔软,弹性良好,各时间点间无明显区别。PQ 组大鼠 1 d 时肺组织色红、充血、肿胀、弹性差,肺叶可见弥漫性出血点或大块充血梗死灶;3 d 时肺组织色暗红,质硬,亦可见弥漫性出血或梗死灶,可见灶状瘀斑;7 d 时双肺肿胀减轻,色泽晦暗,可见散在出血点;14 d 时双肺体积缩小,可见局部凹凸不平的苍白灶、陈旧性出血点。血必净组各时间点肉眼变化与 PQ 组接近,但程度较轻。

**2.3.2 HE 染色(图 2):**对照组可见肺泡结构清晰完整,肺泡壁薄,无炎性细胞浸润和出血,肺泡隔无充血及增宽。PQ 组染毒后肺部炎症逐渐加重,伴弥漫性肺出血;7 d 肺泡结构破坏明显;14 d 肺纤维化程度加重。血必净组各时间点肺组织病理变化与 PQ 组相似,但程度较轻。



**图 2 光镜下观察各组大鼠肺组织病理学改变** 对照组(a)肺泡结构完整,无炎性细胞浸润和出血,肺泡隔无充血及增宽。百草枯(PQ)组染毒后 1 d(b)肺泡壁毛细血管扩张、充血,气管及血管周围有不同程度的水肿,肺内炎性细胞浸润;3 d(c)肺泡腔及间质内有大量炎性细胞浸润,伴弥漫性肺出血;7 d(d)肺泡炎症较前减轻,肺间隔增宽,可见成纤维细胞、胶原沉积及纤维化改变;14 d(e)肺泡隔内形成明显的纤维条索并发生弥漫性肺纤维化,有“蜂窝肺”形成。血必净组各时间点(f~i)肺组织病理改变较 PQ 组减轻 HE 高倍放大

**2.3.3 Masson 染色(图 3):**对照组在支气管周围及肺泡间隔可见蓝染胶原纤维。PQ 组 1 d、3 d 胶原沉积不明显,7 d 时肺间质中成纤维细胞大量增生,胶原纤维呈带状分布;14 d 时肺泡壁围绕蓝染胶原纤维,且较血必净组分布广泛。Masson 染色可见到蓝染胶原纤维主要分布于支气管周围、血管壁周围,炎症浸润区及肺泡隔。

**2.3.4 电镜下观察肺组织超微结构(图 4):**对照组肺组织超微结构正常清晰。PQ 组肺组织超微结构破坏严重,14 d 肺纤维化明显。血必净组肺组织超微结构改变相对较轻。

**3 讨论**

PQ 可经皮肤、呼吸道及消化道进入人体,对全身多个器官产生不同程度的损伤。肺泡细胞对 PQ 有主动摄取和蓄积的作用,使毒物在体内存留时间较长,因而肺受损最为严重<sup>[8]</sup>。研究发现细胞凋亡参与了 PQ 所致急性肺损伤(ALI)及肺纤维化的形成,而 PQ 中毒导致 ALI 及肺纤维化的主要发病机制是氧化应激和 II 型肺泡上皮细胞凋亡,线粒体是凋亡

的决定性环节,也是细胞内氧化应激的源头<sup>[9]</sup>。在原代培养的大鼠 II 型肺泡上皮细胞实验中,PQ 中毒可导致 II 型肺泡上皮细胞成活率明显下降<sup>[10]</sup>。PQ 通过氧化损伤、钙稳态失衡及线粒体损伤诱导肺泡上皮细胞和肺血管内皮细胞凋亡,并通过死亡受体活化途径、线粒体途径、内质网应激途径调控细胞凋亡相关基因的表达<sup>[11]</sup>。此外,PQ 通过激活核转录因子,抑制多形核中性粒细胞(PMN)凋亡,延长 PMN 生存时间,造成炎症因子大量释放,导致组织细胞损伤<sup>[9]</sup>;同时有实验表明,在二室弥散装置体外培养的人脐静脉内皮细胞,可随 PQ 中毒时间延长,单层血管内皮细胞屏障通透率升高,环磷酸腺苷(cAMP)浓度降低<sup>[12]</sup>;在 PQ 中毒早期,血清转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、血小板源性生长因子(PDGF)、胰岛素样生长因子 1(IGF-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-10(IL-10)明显升高<sup>[13]</sup>;PQ 对血小板内皮细胞黏附分子-1 的抑制也是肺损伤发生发展的重要因素之一<sup>[14]</sup>;PQ 中毒时 X 线胸片表现为肺纹理增粗、紊乱,甚至出现片状渗出性阴影、胸腔积

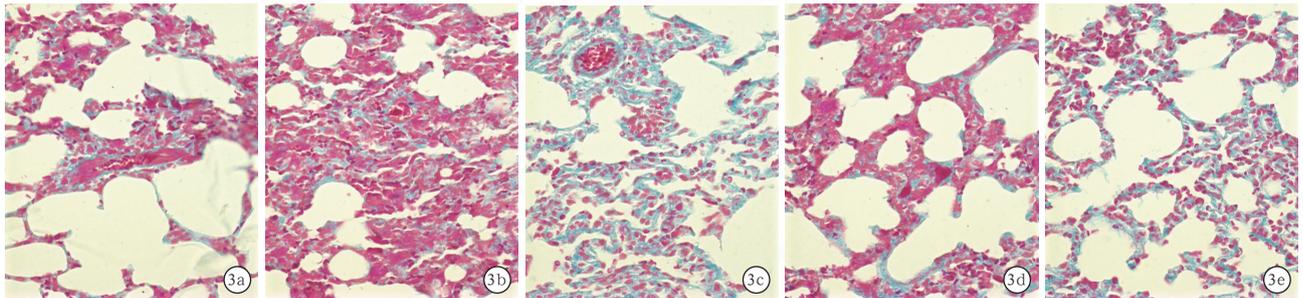


图 3 光镜下观察各组大鼠肺纤维化改变 对照组(a)支气管周围及肺泡间隔可见蓝染胶原纤维;百草枯(PQ)组染毒后 3 d(b)胶原沉积不明显,14 d 时(c)肺泡壁、肺泡隔围绕蓝染胶原纤维;血必净组染毒后 3 d(d)、14 d(e)时较 PQ 组有所减轻 Masson 染色 高倍放大

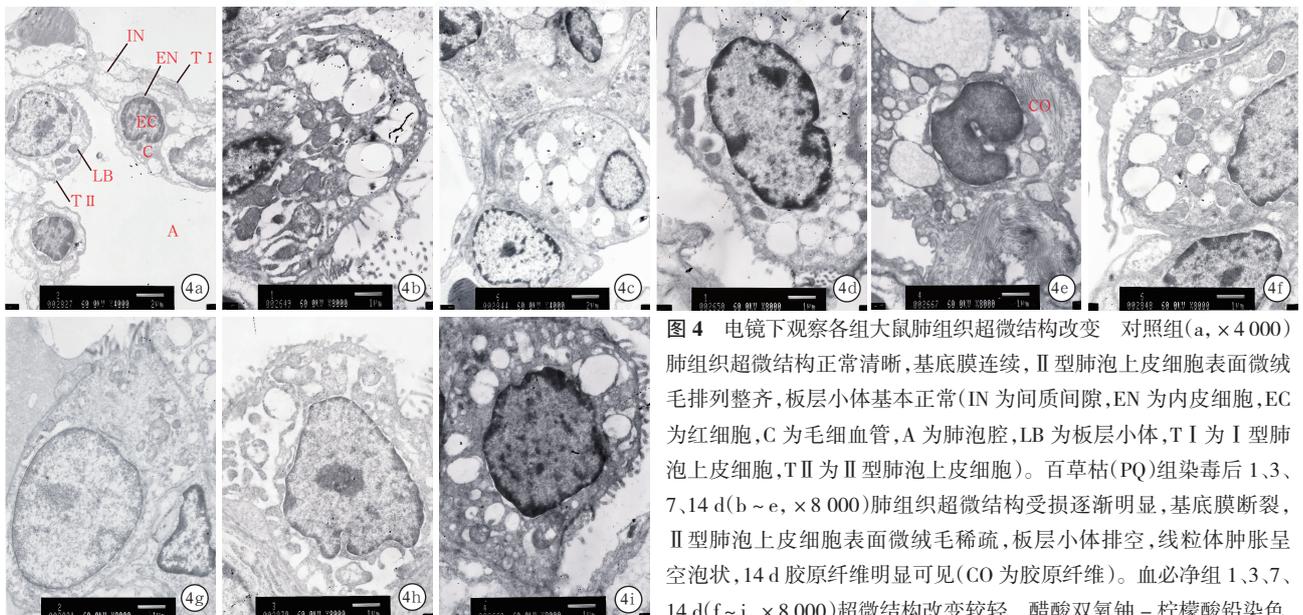


图 4 电镜下观察各组大鼠肺组织超微结构改变 对照组(a,  $\times 4000$ )肺组织超微结构正常清晰,基底膜连续,II 型肺泡上皮细胞表面微绒毛排列整齐,板层小体基本正常(IN 为间质间隙,EN 为内皮细胞,EC 为红细胞,C 为毛细血管,A 为肺泡腔,LB 为板层小体,T I 为 I 型肺泡上皮细胞,T II 为 II 型肺泡上皮细胞)。百草枯(PQ)组染毒后 1、3、7、14 d(b~e,  $\times 8000$ )肺组织超微结构受损逐渐明显,基底膜断裂,II 型肺泡上皮细胞表面微绒毛稀疏,板层小体排空,线粒体肿胀呈空泡状,14 d 胶原纤维明显可见(CO 为胶原纤维)。血必净组 1、3、7、14 d(f~i,  $\times 8000$ )超微结构改变较轻 醋酸双氧铀-柠檬酸铅染色

液等<sup>[15]</sup>。随访 PQ 中毒患者发现,轻微肺损伤仍可引起 PQ 中毒患者长时间限制性的肺功能受损,最终出现不可逆的肺间质纤维化,患者预后极差<sup>[16]</sup>。而肺泡毛细血管屏障基底膜完整性的破坏作为肺纤维化形成的“不可逆点”,导致肺组织纤维化<sup>[17]</sup>。在本研究中,PQ 中毒大鼠早期肺组织表现为肺泡炎,随病情进展,肺泡壁结构被破坏,肺间质中成纤维细胞数量及其产生的胶原纤维增多,后期发展为弥漫性肺间质纤维化。有研究表明急性 PQ 中毒肺组织细胞外基质(ECM)合成增强,肺损伤后期最为明显<sup>[18]</sup>。肌成纤维细胞被认为是肺组织发生纤维化阶段关键的效应细胞,ECM 成分胶原含量增加,且因不发生凋亡而持续存在,从而限制了肺功能<sup>[19]</sup>。肌成纤维细胞合成胶原的能力强,使 ECM 异常沉积,其收缩性和分泌的多种炎症介质可使肺顺应性下降并加重损伤肺泡上皮<sup>[20]</sup>。在肺纤维化时主要是 I、III 型胶原增多,肺顺应性随之减弱<sup>[21]</sup>。

线粒体是细胞的“动力工厂”,在凋亡信号的诱导下,线粒体会发生显著的结构和功能变化,包括线粒体膜电位丢失,电子传递链改变,细胞内氧化还原状态变化,以及释放促凋亡蛋白等<sup>[22]</sup>;而线粒体膜通透性改变、过氧化氢酶失活等因素都会促进线粒体的自噬<sup>[23]</sup>。

Mfn2 定位于线粒体的外膜上,由 757 个氨基酸组成,是参与线粒体功能调节的一类高度保守的蛋白质<sup>[24]</sup>,对血管增殖紊乱和其他过度增殖性疾病的发病及治疗具有重要的意义<sup>[25]</sup>。在孵育的人类细胞中,Mfn2 过表达使正常、分散的线粒体在细胞核周围簇集,而当线粒体活性增加或线粒体细胞间信息转导受到干扰时可引起 Mfn2 过表达<sup>[26]</sup>。Pich 等<sup>[27]</sup>研究表明,当 Mfn2 表达加强后,线粒体膜电位和葡萄糖氧化功能增加,线粒体的活性增加;而当 Mfn2 表达受到抑制后,丙酮酸、葡萄糖及脂肪酸的氧化受到抑制,线粒体膜电位下降。考虑 Mfn2 高表达可维持线粒体自身和细胞的正常结构和功能。本研究结果显示,Mfn2 过表达与肺纤维化的增殖抑制呈正相关,在血必净治疗 PQ 中毒 1 d 时 Mfn2 含量已明显增多,这种增多效应一直持续到治疗后期;而在 PQ 组 Mfn2 含量也有升高,但升高幅度不如血必净组,考虑 Mfn2 的升高对 PQ 中毒肺纤维化为一种保护机制。有研究表明,在细胞周期的静止期 Mfn2 表达量明显高于增殖期<sup>[28]</sup>;另有研究发现,Mfn2 能抑制血管内膜增生和血管平滑肌细胞增殖,并能抑制其他多种细胞的增殖<sup>[29]</sup>。结合本研究,提示血必净抑制

细胞过度增殖的作用早期即开始显现;但肺纤维化随 PQ 毒性不可逆进展,机体通过免疫机制减少炎症转为进一步抑制细胞过度增殖的表现逐渐明显;而在血必净干预下,肺组织早期炎症得到控制,但伴随纤维化形成,Mfn2 蛋白合成量在实验末期减少,考虑与细胞增殖能力逐渐减弱有关。因 Mfn2 广泛存在于肺组织中,本研究结合 Mfn2 对肺纤维化的抑制作用,认为 PQ 中毒致肺纤维化发生的可能机制有:① 线粒体通过融合的方式使其在病理条件下具有较完整的功能。② 过表达的 Mfn2 可减少 Bcl-2 表达,使 Bax 表达增多并激活天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9 (caspase-9),从而促进细胞凋亡<sup>[30]</sup>。③ Mfn2 通过抑制 Ras-Raf- 细胞外信号调节激酶(ERK)- 丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)途径,抑制 MAPK 活化,从而有效阻遏细胞周期、抑制细胞增殖,促进细胞凋亡<sup>[31-32]</sup>。

血必净具有降低毛细血管通透性、清除氧自由基、保护血管内皮细胞、减轻 ALI、调节免疫和抑制血栓形成的作用<sup>[33]</sup>。有实验表明,血必净可减轻肺栓塞兔肺组织炎性浸润程度,减小梗死面积<sup>[34]</sup>。血必净注射液可通过提高机体抗氧化能力,抑制脂质过氧化反应,减少器官功能衰竭,对急性 PQ 中毒有一定治疗作用<sup>[35]</sup>。本研究通过血必净治疗 PQ 中毒大鼠的实验研究表明,血必净可以抑制肺纤维化的发生发展,这与前期的研究结果<sup>[36]</sup>一致。

#### 4 结 论

Mfn2 在 PQ 中毒致肺纤维化时呈高表达;血必净治疗 PQ 中毒,Mfn2 表达显著增多,胶原蛋白沉积程度减轻,超微结构中线粒体肿胀、破裂较少,肺部炎症反应和肺纤维化程度较轻。

#### 参考文献

- [1] Ranieri M, Brajkovic S, Riboldi G, et al. Mitochondrial fusion proteins and human diseases [J]. *Neurol Res Int*, 2013, 2013: 293893.
- [2] Chen KH, Guo X, Ma D, et al. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6 (9): 872-883.
- [3] Neuspil M, Zunino R, Gangaraju S, et al. Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(26): 25060-25070.
- [4] Bach D, Pich S, Soriano FX, et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 17190-17197.
- [5] Bach D, Naon D, Pich S, et al. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 [J]. *Diabetes*, 2005, 54(9): 2685-2693.

- [6] 姚小青,张韻慧,孙长海,等. 血必净口服泡腾片对内毒素损伤大鼠器官的保护作用 [J]. 中国危重病急救医学, 2012, 24(6): 357-359.
- [7] 陈慧,石汉文,田英平. 百草枯中毒致肺损伤的研究进展[J]. 临床荟萃, 2006, 21(2): 146-148.
- [8] Tomita M, Okuyama T, Hidaka K. Changes in mRNAs of inducible nitric oxide synthase and interleukin-1 beta in the liver, kidney and lung tissues of rats acutely exposed to paraquat [J]. Leg Med (Tokyo), 1999, 1(3): 127-134.
- [9] 白雪,盛英杰. 百草枯对肺组织细胞凋亡的影响[J]. 医学综述, 2014, 20(1): 90-92.
- [10] 马俊清,白倩蕾,余厚友,等. 血必净注射液对百草枯刺激培养大鼠肺泡 II 型上皮细胞的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(1): 52-55.
- [11] 孟潇潇,刘刊,谈玖婷,等. 百草枯中毒大鼠肺纤维化与内质网应激的关系[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(6): 331-334.
- [12] 杜宇,何庆. 红霉素经环磷酸腺苷途径改善百草枯处理的血管内皮细胞通透性机制研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2009, 21(11): 668-671.
- [13] 孔庆福,张华,王丽,等. 急性百草枯中毒早期器官损害与细胞因子的变化 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17(3): 159-162.
- [14] 高渝峰,胡春林,史晶,等. 兔急性百草枯中毒后血小板内皮细胞黏附分子-1 水平对肺损伤的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23(10): 585-587.
- [15] 张丽波,杨巍,李忠凯. 百草枯急性中毒致肺损伤的 X 线和 CT 表现分析[J]. CT 理论与应用研究, 2005, 14(2): 34-37.
- [16] Yamashita M, Yamashita M, Ando Y. A long-term follow-up of lung function in survivors of paraquat poisoning [J]. Hum Exp Toxicol, 2000, 19(2): 99-103.
- [17] 王辉,陈雪芬,魏路清. 肺纤维化发病机制新进展[J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2013, 22(1): 69-73.
- [18] 丛鲁红,何庆. 氯沙坦对急性百草枯中毒大鼠肺损伤干预及对 MMP-2 和 MMP-9 的表达影响[D]. 四川:四川大学, 2005.
- [19] Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis [J]. Chest, 2002, 122(6 Suppl): 286S-289S.
- [20] 杨雪梅,王兴胜,崔社怀. 肌成纤维细胞在肺纤维化中的来源和作用[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(1): 54-58.
- [21] Zuo F, Kaminski N, Eugui E, et al. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(9): 6292-6297.
- [22] 刘丽君,彭建新,洪华珠,等. 线粒体在细胞凋亡中的变化与作用[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(2): 117-120.
- [23] 李清华,肖福英. 线粒体自噬最新研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2012, 35(1): 10-14, 20.
- [24] 董文岳,张景华,李玉凤. 线粒体、Mfn2 与肿瘤及细胞周期关系的研究[J]. 医学信息, 2014, 27(7): 521.
- [25] 董丽华,韩梅,温进坤. 细胞增殖抑制基因 HSG/Mfn2[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(1): 17-21.
- [26] Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(11): 870-879.
- [27] Pich S, Bach D, Briones P, et al. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system [J]. Hum Mol Genet, 2005, 14(11): 1405-1415.
- [28] 靳国青,周炜,黄晴,等. 血管平滑肌细胞不同细胞周期中 Mfn2 的表达变化[J]. 广东医学, 2010, 31(9): 1081-1083.
- [29] Chen KH, Guo X, Ma D, et al. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders [J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(9): 872-883.
- [30] 李俐,王剑明,陈光慧,等. Mfn2 基因对大鼠血管平滑肌细胞凋亡的促进作用及其机制 [J]. 华中科技大学学报(医学版) 2007, 36(1): 57-59, 70.
- [31] Chen G, Liu N, Zhou A, et al. The role of hypertension-related gene in aortic vascular smooth muscle cells from mice and rats [J]. Chin Med J (Engl), 2001, 114(8): 833-836.
- [32] Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin [J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 5): 867-874.
- [33] 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.
- [34] 陈立,李兰,吕波,等. 血必净注射液对急性肺栓塞兔 B 型脑钠肽水平的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20(6): 345-348.
- [35] 王煜,赵敏. 血必净注射液对急性百草枯中毒患者的多器官保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2011, 18(5): 296-298.
- [36] 张政伟,菅向东,阮艳君,等. 血必净注射液治疗急性百草枯中毒的实验[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(2): 105-108.

(收稿日期:2013-11-29)

(本文编辑:李银平)

## · 科研新闻速递 ·

### 危重病对肠道吸收葡萄糖能力的影响

对危重病患者提供有效的肠内营养至关重要。正常情况下,小肠对葡萄糖的吸收主要依靠钠离子依赖性葡萄糖转移体 1 和葡萄糖转运体 2,它们均受小肠甜味受体的调节。最近澳大利亚研究人员进行了一项临床观察性研究及一项动物实验研究,旨在评价危重病对肠道葡萄糖吸收的影响及葡萄糖转移体 1、葡萄糖转运体 2 和甜味受体的表达变化。临床研究对象为 12 例重症患者及 12 例健康志愿者,研究人员在 30 min 内向受试者十二指肠注入 30 g 葡萄糖和 3 g 3-O-甲基葡萄糖。分别在注入葡萄糖前后通过内镜留取十二指肠黏膜标本,动物实验将 16 周龄小鼠分为实验组( $n=16$ )和对照组( $n=8$ ),通过盲肠结扎穿孔术建立危重病小鼠模型,于术后 5 d 向十二指肠注入 100 mg 葡萄糖和 10 mg 3-O-甲基葡萄糖并留取十二指肠黏膜标本。采用定量聚合酶链反应(PCR)检测葡萄糖转移体 1、葡萄糖转运体 2 和甜味受体的基因转录水平,同时检测血中 3-O-甲基葡萄糖浓度以评估葡萄糖的吸收情况。结果发现,重症患者葡萄糖的吸收能力仅为健康者的 1/3( $P=0.002$ ),动物实验结果也相似( $P=0.004$ )。与健康者比较,重症患者葡萄糖转移体 1、葡萄糖转运体 2 和甜味受体的 mRNA 表达分别下降了 49%( $P<0.001$ )、50%( $P=0.009$ )和 85%( $P=0.007$ );而实验组小鼠葡萄糖转移体 1、葡萄糖转运体 2 和甜味受体的 mRNA 表达则较对照组分别下降了 55%( $P<0.001$ )、50%( $P=0.002$ )和 69%( $P=0.004$ )。因此,研究人员据此得出结论:危重病会降低肠道对葡萄糖的吸收能力,这可能是由于葡萄糖转移体 1、葡萄糖转运体 2 和甜味受体的转录受到了抑制。

罗红敏,编译自《Crit Care Med》, 2014, 42(1): 57-65