

调控对氧磷酶 1 基因对急性敌敌畏中毒小鼠肝氧化损伤的保护作用

郭瑞娟 陈隆望 连洁 吴斌 洪广亮 葛赞 刘瑶 邱俏檬 卢中秋

【摘要】目的 探讨调控对氧磷酶 1 (PON1) 基因对急性敌敌畏中毒小鼠肝组织氧化损伤的保护作用。

方法 实验 1: 将 12 只雄性 Balb/c 小鼠按随机数字表法分为对照组、对照绿色荧光蛋白慢病毒 (Lv-GFP) 组、重组 PON1 慢病毒 (Lv-PON1) 组 3 组, 每组 4 只。经尾静脉分别注射转染 2×10^7 TU 的 Lv-GFP 或 Lv-PON1 慢病毒, 对照组给予等量生理盐水。分别于 0、1、3、5、7、9 d 取眼底静脉血, 检测血清 PON1 活性; 转染 3 d 取肝组织, 分别用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 和蛋白免疫印迹试验 (Western Blot) 检测 PON1 mRNA 和蛋白表达。实验 2: 另将 96 只雄性 Balb/c 小鼠按随机数字表法分为对照组、敌敌畏染毒组、Lv-GFP 干预组、Lv-PON1 干预组 4 组, 每组 24 只。经尾静脉分别注射转染 Lv-GFP 或 Lv-PON1 慢病毒后 3 d, 腹腔注射敌敌畏溶液 9 mg/kg 染毒, 对照组给予等量生理盐水。各组分别于染毒后 6、12、24、48 h 麻醉处死 6 只小鼠取肝组织, RT-PCR 检测 PON1 mRNA、核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) mRNA 表达; Western Blot 检测 PON1 蛋白表达; 化学比色法检测丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 含量; 双抗夹心酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性。结果 实验 1: Lv-PON1 转染正常小鼠后, 血清 PON1 活性逐渐升高, 自 3 d 起维持在较高水平; 而对照组和 Lv-GFP 组血清 PON1 活性均处于正常低水平状态。转染 3 d 肝组织 PON1 mRNA 和蛋白表达均显著高于对照组和 Lv-GFP 组。实验 2: 与对照组相比, 敌敌畏染毒组染毒后 6 h 肝组织 PON1 mRNA 和蛋白表达、Nrf2 mRNA 表达、GSH、SOD、CAT 水平即明显降低 [PON1 mRNA (灰度值): 0.237 ± 0.075 比 0.674 ± 0.011 , PON1 蛋白 (灰度值): 0.602 ± 0.086 比 0.998 ± 0.124 , Nrf2 mRNA (灰度值): 0.089 ± 0.012 比 0.126 ± 0.010 , GSH (mg/g): 3.84 ± 0.33 比 5.52 ± 0.40 , SOD ($\mu\text{g/g}$): 0.383 ± 0.040 比 0.564 ± 0.052 , CAT (ng/g): 7.32 ± 1.28 比 12.46 ± 1.54 , 均 $P < 0.05$], MDA 含量明显升高 (nmol/g: 7.78 ± 0.41 比 2.34 ± 0.25 , $P < 0.05$); 随时间延长, PON1 mRNA 和蛋白表达、Nrf2 mRNA 表达、GSH、SOD、CAT 水平逐渐升高, MDA 含量逐渐降低, 至 24 h 时 Nrf2 mRNA 表达已升至对照组水平 (0.133 ± 0.019 比 0.126 ± 0.009 , $P > 0.05$), 48 h 时已明显高于对照组 (0.206 ± 0.028 比 0.124 ± 0.010 , $P < 0.05$)。与敌敌畏染毒组比较, Lv-PON1 干预组 6 h 时肝组织 PON1 mRNA 和蛋白表达、Nrf2 mRNA 表达、GSH、SOD、CAT 水平即明显升高 [PON1 mRNA (灰度值): 0.726 ± 0.021 比 0.237 ± 0.075 , PON1 蛋白 (灰度值): 0.739 ± 0.050 比 0.602 ± 0.086 , Nrf2 mRNA (灰度值): 0.158 ± 0.007 比 0.089 ± 0.012 , GSH (mg/g): 4.30 ± 0.22 比 3.84 ± 0.33 , SOD ($\mu\text{g/g}$): 0.454 ± 0.062 比 0.383 ± 0.040 , CAT (ng/g): 8.98 ± 1.02 比 7.32 ± 1.28 , 均 $P < 0.05$], MDA 含量即明显下降 (nmol/g: 6.56 ± 0.44 比 7.78 ± 0.41 , $P < 0.05$)。结论 调控 PON1 能够降低敌敌畏中毒小鼠肝组织 MDA 含量, 增强 SOD、CAT 活性, 升高 GSH 含量, 并可能通过启动 Nrf2 抗氧化程序增强抗氧化能力, 对急性敌敌畏中毒小鼠肝损伤发挥保护效应。

【关键词】对氧磷酶; 中毒; 敌敌畏; 肝损伤; 氧化应激

The protective effect of regulation of paraoxonase 1 gene on liver oxidative stress injury induced by dichlorvos poisoning in mice Guo Ruijuan, Chen Longwang, Lian Jie, Wu Bin, Hong Guangliang, Ge Yun, Liu Yao, Qiu Qiaomeng, Lu Zhongqiu. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Corresponding author: Lu Zhongqiu, Email: lzq640815@163.com

【Abstract】Objective To investigate the protective effect of paraoxonase 1 (PON1) gene against liver oxidative stress injury in mice due to dichlorvos poisoning. Methods Experiment 1: 12 male Balb/c mice were randomly divided into three groups, with 4 mice in each group: control group, green fluorescent protein lentivirus control

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.04.012

基金项目: 浙江省“十二五”重点学科建设计划项目 (2012-80); 浙江省中医药重点学科建设计划项目 (2012-XK-A28); 浙江省医药卫生平台骨干人才计划 (2012RCB036)

作者单位: 325000 浙江温州, 温州医科大学附属第一医院急诊医学中心

通讯作者: 卢中秋, Email: lzq640815@163.com

group (Lv-GFP group), and recombinant PON1 lentivirus group (Lv-PON1 group). 2×10^7 TU of Lv-GFP or Lv-PON1 was transfected via tail vein, while normal saline was given to those in control group. Blood was collected on 0, 1, 3, 5, 7, 9 days via fundus venous plexus for the assay of serum PON1 activity. PON1 mRNA and protein expression levels were respectively determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot on the 3rd post-lentivirus transfection day. Experiment 2: according to the random number table method, another 96 male Balb/c mice were divided into four groups of 24 mice in each control group, dichlorvos group, Lv-GFP intervention group, and Lv-PON1 intervention group. Lv-GFP or Lv-PON1 was transfected via tail vein followed by intraperitoneal injection of dichlorvos 9 mg/kg, while those in control group were given normal saline. Six mice in each group were sacrificed respectively at 6, 12, 24, 48 hours, and liver tissue was collected. PON1 mRNA and nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) mRNA expression levels were determined by RT-PCR, and PON1 protein level was determined by Western Blot. The content of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) in the liver tissue were determined by chemical colorimetry. The activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured by double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Experiment 1: after Lv-PON1 was transfected to normal mice, PON1 activity in serum gradually increased and maintained a high level on 3rd day, while that of the control group and Lv-GFP group showed a normal low level. On the 3rd post-lentivirus transfection day, PON1 mRNA and PON1 protein expressions in liver were significantly higher than those of control group and Lv-GFP group. Experiment 2: compared with control group, the mice in dichlorvos group showed significant decreases in PON1 mRNA, PON1 protein, Nrf2 mRNA as well as GSH, SOD, CAT levels at 6 hours [PON1 mRNA (gray value): 0.237 ± 0.075 vs. 0.674 ± 0.011 , PON1 protein (gray value): 0.602 ± 0.086 vs. 0.998 ± 0.124 , Nrf2 mRNA (gray value): 0.089 ± 0.012 vs. 0.126 ± 0.010 , GSH (mg/g): 3.84 ± 0.33 vs. 5.52 ± 0.40 , SOD ($\mu\text{g/g}$): 0.383 ± 0.040 vs. 0.564 ± 0.052 , CAT (ng/g): 7.32 ± 1.28 vs. 12.46 ± 1.54 , all $P < 0.05$], and remarkable increase in MDA content (nmol/g: 7.78 ± 0.41 vs. 2.34 ± 0.25 , $P < 0.05$). With the extension of time, PON1 mRNA, PON1 protein, Nrf2 mRNA and GSH, SOD, CAT levels gradually increased, MDA content gradually decreased, Nrf2 mRNA expression level had risen to the level of control group at 24 hours (0.133 ± 0.019 vs. 0.126 ± 0.009 , $P > 0.05$), and it was higher than that of the control group at 48 hours (0.206 ± 0.028 vs. 0.124 ± 0.010 , $P < 0.05$). Compared with that of the dichlorvos group, Lv-PON1 intervention group showed a significant increase in PON1 mRNA, PON1 protein, Nrf2 mRNA and GSH, SOD, CAT levels [PON1 mRNA (gray value): 0.726 ± 0.021 vs. 0.237 ± 0.075 , PON1 protein (gray value): 0.739 ± 0.050 vs. 0.602 ± 0.086 , Nrf2 mRNA (gray value): 0.158 ± 0.007 vs. 0.089 ± 0.012 , GSH (mg/g): 4.30 ± 0.22 vs. 3.84 ± 0.33 , SOD ($\mu\text{g/g}$): 0.454 ± 0.062 vs. 0.383 ± 0.040 , CAT (ng/g): 8.98 ± 1.02 vs. 7.32 ± 1.28 , all $P < 0.05$], and a decrease in MDA content (nmol/g: 6.56 ± 0.44 vs. 7.78 ± 0.41 , $P < 0.05$). **Conclusion** Regulation of PON1 gene can reduce MDA content, enhance SOD and CAT activities, increase GSH content, and it may also up-regulate Nrf2 mRNA expression to play a protective effect against oxidative stress of liver injury induced by dichlorvos poisoning.

【Key words】 Paraoxonase; Poisoning; Dichlorvos; Liver injury; Oxidative stress

有机磷农药误服引起的中毒是临床上常见危重症,病死率达 4%~30%^[1-2]。有机磷农药进入机体后直接毒害肝脏,中毒者出现肝功能紊乱、肝功能衰竭,甚至造成死亡^[3]。有机磷农药中毒的主要机制是乙酰胆碱酯酶 (AChE) 抑制学说,但有研究证实,氧自由基大量产生在急性有机磷农药中毒导致的肝损伤中起重要作用^[4-6]。对氧磷酶 1 (PON1) 具有水解磷酸酯键的作用,近年有研究发现, PON1 还参与多种疾病中氧化应激的发生发展过程^[7-9]。本研究通过建立急性敌敌畏中毒小鼠肝损伤模型,观察小鼠中毒后肝组织氧化应激水平及核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) mRNA 表达的变化;并通过提前给予重组 PON1 慢病毒 (Lv-PON1) 干预,探讨调控 PON1 基因对急性敌敌畏中毒小鼠肝损伤的保护效应。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂:敌敌畏 (美国 Sigma 公司), 血液 PON1 有机磷酸酶活性比色法试剂盒 (上海杰美基因医药科技有限公司), 丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (上海西塘生物科技有限公司), RNA 提取试剂盒 TRIzol Reagent (美国 Invitrogen 公司), 反转录和化学发光剂 (ECL) 试剂盒 (美国 Thermo scientific 公司), RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术研究所), PON1 鼠单克隆抗体 (单抗, 美国 Abcam 公司), 重组 Lv-PON1 和对照绿色荧光蛋白慢病毒 (Lv-GFP) 委托上海吉凯基因科技有限公司合成。

1.2 实验动物及分组处理:清洁级雄性 Balb/c 小鼠

108 只,体质量 18~22 g,由温州医科大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(沪)2012-0002。

1.2.1 实验 1 (Lv-PON1 转染正常小鼠体内 PON1 活性检测及 mRNA 和蛋白表达量的验证):取 12 只小鼠,按照随机数字表法分为对照组、Lv-GFP 组、Lv-PON1 组 3 组,每组 4 只。Lv-PON1 组和 Lv-GFP 组分别经尾静脉注射 2×10^7 TU 重组 Lv-PON1 或对照 Lv-GFP 慢病毒;对照组给予等量无菌生理盐水。分别于 0、1、3、5、7、9 d 取眼底静脉血,检测血清 PON1 活性;3 d 时取肝组织检测 PON1 mRNA 和蛋白表达。

1.2.2 实验 2 (重组 Lv-PON1 对敌敌畏染毒后小鼠肝氧化损伤干预作用):取 96 只小鼠,按随机数字表法分为对照组、敌敌畏染毒组、Lv-GFP 干预组、Lv-PON1 干预组 4 组,每组 24 只。Lv-PON1 干预组、Lv-GFP 干预组分别经尾静脉注射 2×10^7 TU 重组 Lv-PON1 或对照 Lv-GFP 慢病毒;对照组和敌敌畏染毒组则给予等量无菌生理盐水。转染后 3 d, Lv-PON1 干预组、Lv-GFP 干预组和敌敌畏染毒组均腹腔注射 9 mg/kg 敌敌畏溶液;对照组注射等量无菌生理盐水。各组分别于 6、12、24、48 h 麻醉处死 6 只小鼠,取肝组织经预冷的无菌生理盐水冲洗后,一部分立即转入液氮, -80 °C 保存待测;另一部分置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,进行病理学观察。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 血清 PON1 活性测定:血标本室温静置 1 h, 4 °C 离心 15 min 取上清,严格按试剂盒说明书,采用比色法检测血清 PON1 活性。

1.3.2 肝组织 PON1、Nrf2 的 mRNA 表达测定:取肝组织,提取总 RNA,进行反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)。扩增条件:94 °C 5 min,94 °C 30 s, 57.4 °C 30 s,72 °C 30 s,72 °C 1 min,共 30 个循环。PON1 和 β -肌动蛋白(β -actin)引物均由捷瑞(上海)贸易有限公司合成,Nrf2 引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,引物序列见表 1。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像分析仪扫描电泳结果,用 Quantity one 软件分析灰度值,以待测基因与 β -actin 的灰度值比值进行统计分析。

1.3.3 肝组织 PON1 蛋白表达测定:采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot),取肝组织 100 mg,加入 RIPA 裂解液进行匀浆,BCA 法测定蛋白浓度,蛋白上样量为 60 μ g;进行电泳、转膜、封闭,加入

表 1 聚合酶链反应引物序列及各自扩增产物长度

基因	引物序列	产物长度 (bp)
PON1	上游: 5'-GTCGTGGTCCAATGTGTGTTTACT-3' 下游: 5'-ACTTTCGATGACGTGCGTG-3'	499
Nrf2	上游: 5'-ATTCTTTCAGCAGCATCCTCTC-3' 下游: 5'-ACACTTCCAGGGGCACTAATCTA-3'	404
β -actin	上游: 5'-CGTGCGTGACATCAAAGAGAA-3' 下游: 5'-GCTAGGAGCCAGACAGTAATC-3'	346

注: PON1 为对氧磷酶 1, Nrf2 为核转录因子 E2 相关因子 2, β -actin 为 β -肌动蛋白

鼠 PON1 单抗(1:500)、兔抗鼠三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体(1:5 000),4 °C 孵育过夜,含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(TBST)洗膜 3 次,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠抗体(1:5 000)、HRP 标记山羊抗兔抗体(1:5 000),孵育 1 h,洗膜,ECL 显影、曝光,结果用凝胶成像分析系统显示,用 Quantity one 软件分析灰度值,以待测蛋白与 GAPDH 的灰度值比值进行统计分析。

1.3.4 肝组织 MDA、GSH 含量及 SOD、CAT 活性测定:制备 10% 肝组织匀浆,BCA 法测定蛋白浓度,按照试剂盒说明书,采用化学比色法检测肝组织匀浆 MDA、GSH 含量,双抗夹心 ELISA 法检测肝组织匀浆 SOD、CAT 活性。

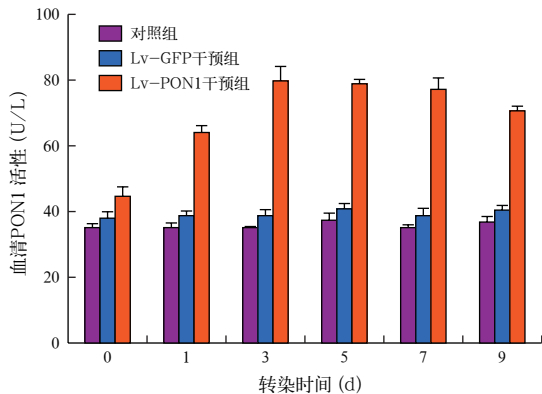
1.4 统计学方法:用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较用单因素方差分析和 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Lv-PON1 转染对正常小鼠血清 PON1 活性及肝组织 PON1 mRNA 和蛋白表达的影响(图 1~2): Lv-PON1 转染正常小鼠后,血清 PON1 活性逐渐升高,自 3 d 起维持在较高水平;而对照组和 Lv-GFP 组各时间点血清 PON1 活性均处于正常低水平状态(图 1)。RT-PCR 和 Western Blot 结果均提示: Lv-PON1 转染小鼠 3 d 时,肝组织 PON1 mRNA 和蛋白表达均显著高于对照组和 Lv-GFP 组(图 2)。

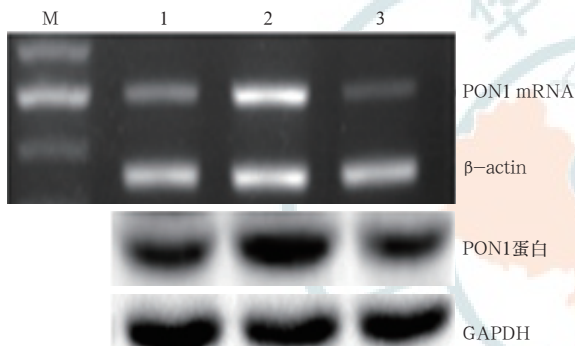
2.2 Lv-PON1 对敌敌畏染毒小鼠肝氧化损伤的干预作用

2.2.1 肝组织 PON1 mRNA 表达(图 3;表 2):对照组肝组织有一定量的 PON1 mRNA 表达。敌敌畏染毒组和 Lv-GFP 干预组肝组织 PON1 mRNA 表达均随时间延长呈逐渐升高趋势,但各时间点 PON1 mRNA 表达均较对照组明显降低(均 $P < 0.05$),且两组间差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。与相应时



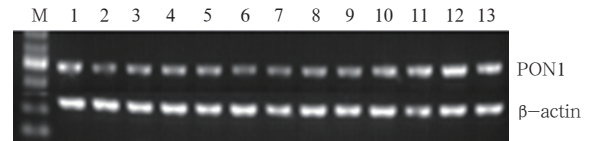
注: Lv-PON1 为重组对氧磷酶 1 (PON1) 慢病毒,
Lv-GFP 为对照绿色荧光蛋白慢病毒

图 1 Lv-PON1 转染正常小鼠各时间点
血清 PON1 活性的变化



M 为 Marker, 1 为对照组, 2 为重组对氧磷酶 1 慢病毒
(Lv-PON1) 组, 3 为对照绿色荧光蛋白慢病毒 (Lv-GFP) 组,
β-actin 为 β-肌动蛋白, GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶

图 2 Lv-PON1 转染正常小鼠后 3 d 肝组织
PON1 mRNA (上) 和蛋白 (下) 表达



M 为 Marker, 1 为对照组, 2~5 为敌敌畏染毒组 6、12、24、48 h,
6~9 为对照绿色荧光蛋白慢病毒 (Lv-GFP) 干预组 6、12、
24、48 h, 10~13 为 Lv-PON1 干预组 6、12、24、48 h,
β-actin 为 β-肌动蛋白

图 3 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测重组对氧磷酶 1
慢病毒 (Lv-PON1) 干预对敌敌畏染毒小鼠各时间点
肝组织 PON1 mRNA 表达的影响

间点敌敌畏染毒组比较, Lv-PON1 干预组各时间点
PON1 mRNA 表达均明显升高 (均 $P < 0.05$)。

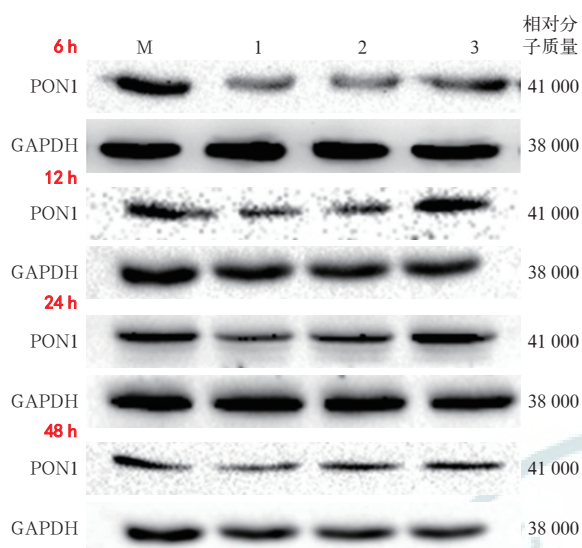
2.2.2 肝组织 PON1 蛋白表达 (表 2; 图 4): 敌敌畏染毒组和 Lv-GFP 干预组肝组织 PON1 蛋白表达均随时间延长逐渐升高, 但各时间点 PON1 蛋白表达均明显低于对照组 (均 $P < 0.05$)。与相应时间点敌敌畏染毒组比较, Lv-PON1 干预组各时间点肝组织 PON1 蛋白表达明显升高 (均 $P < 0.05$)。

2.2.3 肝组织 Nrf2 mRNA 表达 (表 2; 图 5): 对照组肝组织有一定量的 Nrf2 mRNA 表达。敌敌畏染毒组和 Lv-GFP 干预组 6 h、12 h 肝组织 Nrf2 mRNA 表达均较对照组明显降低 (均 $P < 0.05$), 随后呈逐渐升高趋势, 至 48 h 时 Nrf2 mRNA 表达已明显高于对照组 (均 $P < 0.05$)。Lv-PON1 干预组肝组织 Nrf2 mRNA 表达逐渐升高, 各时间点均明显高于敌敌畏染毒组 (均 $P < 0.05$)。

表 2 Lv-PON1 干预对敌敌畏染毒小鼠各时间点肝组织 PON1 mRNA 和蛋白表达、Nrf2 mRNA 表达
及 MDA、GSH 含量和 SOD、CAT 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

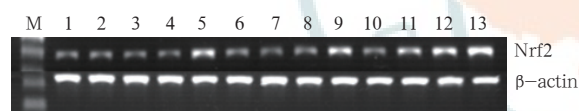
组别	动物数 (只)	PON1 mRNA (灰度值)	PON1 蛋白 (灰度值)	Nrf2 mRNA (灰度值)	MDA (nmol/g)	GSH (mg/g)	SOD (μg/g)	CAT (ng/g)
对照 6 h 组	6	0.674 ± 0.011	0.998 ± 0.124	0.126 ± 0.010	2.34 ± 0.25	5.52 ± 0.40	0.564 ± 0.052	12.46 ± 1.54
对照 12 h 组	6	0.667 ± 0.014	1.033 ± 0.081	0.123 ± 0.008	2.53 ± 0.23	5.33 ± 0.65	0.565 ± 0.061	13.00 ± 1.51
对照 24 h 组	6	0.666 ± 0.013	1.102 ± 0.028	0.126 ± 0.009	2.28 ± 0.22	5.36 ± 0.52	0.570 ± 0.052	13.16 ± 1.24
对照 48 h 组	6	0.673 ± 0.016	1.082 ± 0.045	0.124 ± 0.010	2.37 ± 0.19	5.27 ± 0.66	0.555 ± 0.059	12.68 ± 1.39
敌敌畏染毒 6 h 组	6	0.237 ± 0.075 ^a	0.602 ± 0.086 ^a	0.089 ± 0.012 ^a	7.78 ± 0.41 ^a	3.84 ± 0.33 ^a	0.383 ± 0.040 ^a	7.32 ± 1.28 ^a
敌敌畏染毒 12 h 组	6	0.355 ± 0.147 ^a	0.708 ± 0.043 ^a	0.095 ± 0.009 ^a	6.32 ± 0.28 ^a	4.21 ± 0.49 ^a	0.453 ± 0.061 ^a	8.41 ± 1.16 ^a
敌敌畏染毒 24 h 组	6	0.478 ± 0.033 ^a	0.876 ± 0.018 ^a	0.133 ± 0.019	4.89 ± 0.22 ^a	4.63 ± 0.49 ^a	0.516 ± 0.036 ^a	9.28 ± 1.15 ^a
敌敌畏染毒 48 h 组	6	0.555 ± 0.776 ^a	0.921 ± 0.022 ^a	0.206 ± 0.028 ^a	3.52 ± 0.44 ^a	5.09 ± 0.56	0.529 ± 0.042	11.10 ± 1.25
Lv-GFP 干预 6 h 组	6	0.211 ± 0.112 ^a	0.596 ± 0.093 ^a	0.093 ± 0.007 ^a	7.62 ± 0.27 ^a	3.72 ± 0.40 ^a	0.373 ± 0.057 ^a	7.44 ± 1.19 ^a
Lv-GFP 干预 12 h 组	6	0.373 ± 0.034 ^a	0.739 ± 0.050 ^a	0.098 ± 0.004 ^a	6.45 ± 0.41 ^a	4.32 ± 0.51 ^a	0.435 ± 0.054 ^a	8.34 ± 1.07 ^a
Lv-GFP 干预 24 h 组	6	0.487 ± 0.154 ^a	0.866 ± 0.019 ^a	0.129 ± 0.010	4.86 ± 0.38 ^a	4.74 ± 0.47 ^a	0.505 ± 0.039 ^a	9.46 ± 1.12 ^a
Lv-GFP 干预 48 h 组	6	0.520 ± 0.059 ^a	0.918 ± 0.032 ^a	0.207 ± 0.027 ^a	3.65 ± 0.44 ^a	5.03 ± 0.58	0.526 ± 0.034	11.55 ± 1.14
Lv-PON1 干预 6 h 组	6	0.726 ± 0.021 ^{ab}	0.739 ± 0.050 ^{ab}	0.158 ± 0.007 ^{ab}	6.56 ± 0.44 ^{ab}	4.30 ± 0.22 ^{ab}	0.454 ± 0.062 ^{ab}	8.98 ± 1.02 ^{ab}
Lv-PON1 干预 12 h 组	6	0.809 ± 0.065 ^{ab}	0.849 ± 0.047 ^{ab}	0.235 ± 0.019 ^{ab}	4.69 ± 0.35 ^{ab}	4.98 ± 0.37 ^b	0.534 ± 0.040 ^b	9.93 ± 1.14 ^{ab}
Lv-PON1 干预 24 h 组	6	0.900 ± 0.005 ^{ab}	0.973 ± 0.047 ^{ab}	0.322 ± 0.028 ^{ab}	3.76 ± 0.24 ^{ab}	5.54 ± 0.43 ^b	0.567 ± 0.038 ^b	11.33 ± 1.50 ^{ab}
Lv-PON1 干预 48 h 组	6	0.969 ± 0.053 ^{ab}	1.229 ± 0.041 ^{ab}	0.370 ± 0.028 ^{ab}	2.87 ± 0.30 ^{ab}	5.82 ± 0.49 ^b	0.638 ± 0.072 ^{ab}	12.55 ± 1.52

注: Lv-PON1 为重组对氧磷酶 1 (PON1) 慢病毒, Nrf2 为核转录因子 E2 相关因子 2, MDA 为丙二醛, GSH 为谷胱甘肽, SOD 为超氧化物歧化酶, CAT 为过氧化氢酶, Lv-GFP 为对照绿色荧光蛋白慢病毒; 与对照组同期比较, ^a $P < 0.05$; 与敌敌畏染毒组同期比较, ^b $P < 0.05$



GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶, M 为 Marker, 1 为对照组, 2 为敌敌畏染毒组, 3 为对照绿色荧光蛋白慢病毒 (Lv-GFP) 干预组, 4 为 Lv-PON1 干预组

图 4 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测重组对氧磷酶 1 慢病毒 (Lv-PON1) 干预对敌敌畏染毒小鼠各时间点肝组织 PON1 蛋白表达的影响



M 为 Marker, β -actin 为 β -肌动蛋白, 1 为对照组, 2~5 为敌敌畏染毒组 6、12、24、48 h, 6~9 为对照绿色荧光蛋白慢病毒 (Lv-GFP) 干预组 6、12、24、48 h, 10~13 为 Lv-PON1 干预组 6、12、24、48 h

图 5 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测重组对氧磷酶 1 慢病毒 (Lv-PON1) 干预对敌敌畏染毒小鼠各时间点肝组织核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) mRNA 表达的影响

2.4 肝组织 MDA、GSH 含量及 SOD、CAT 活性 (表 2):与对照组比较,敌敌畏染毒组和 Lv-GFP 干预组各时间点肝组织 MDA 含量均明显升高, GSH 含量及 SOD、CAT 活性在 6、12、24 h 均明显降低 (均 $P < 0.05$)。与相应时间点敌敌畏染毒组比较, Lv-PON1 干预组各时间点肝组织 MDA 含量均明显降低, GSH 含量和 SOD 活性均明显升高, 6、12、24 h CAT 活性亦明显升高 (均 $P < 0.05$)。

3 讨论

正常情况下,体内氧化/抗氧化系统处于一种动态平衡状态。敌敌畏中毒可引发机体内活性氧 (ROS) 大量释放,产生过多的氧自由基导致机体发生脂质过氧化,而造成体内氧化/抗氧化系统失衡。MDA 水平与体内脂质过氧化的严重程度呈正相关,即 MDA 水平越高,体内脂质过氧化越严重^[10]。GSH 为重要的抗氧化剂和自由基清除剂,它能够保

护蛋白分子中的巯基避免氧化,清除体内的超氧阴离子和其他自由基,还可以保护细胞膜的完整性。SOD 和 CAT 是参与抗氧化反应的重要酶类,其中 SOD 可催化超氧阴离子使其转化为 H_2O_2 ,而 CAT 能够催化 H_2O_2 进一步分解。所以,生物体内 GSH 的含量及 SOD、CAT 的活性都可以反映机体清除自由基、抵抗氧化损伤的能力。本研究结果显示,敌敌畏染毒后早期肝组织 MDA 含量明显升高,并随时间延长呈逐渐下降趋势,但依然高于正常水平;而染毒后 GSH、SOD、CAT 均处于明显的降低状态。表明氧化损伤确实参与了急性敌敌畏中毒的肝损伤过程,并且在急性敌敌畏中毒早期更为明显。

Nrf2 是细胞抵抗氧化应激损伤的关键调节因子。当机体受到外源性或内源性 ROS 信号攻击时, Nrf2 与抗氧化反应元件 (ARE) 结合,激活 Nrf2-ARE 通路,启动下游靶基因的转录,调节众多抗氧化物水平,如血红素氧合酶-1 (HO-1)、醌氧化还原酶-1 (NQO-1)、SOD、CAT、GSH 等^[11-12]。大量研究显示,体内 Nrf2 水平与肝脏损伤密切相关^[13-14]。已有文献报道,与野生型小鼠相比, Nrf2 基因缺失小鼠肝脏更易受到各种氧化物质和亲电子试剂的攻击^[15]。此外,本研究结果显示,敌敌畏染毒后小鼠肝组织 Nrf2 mRNA 表达在染毒早期有所降低,但随时间延长 Nrf2 mRNA 表达逐渐升高,48 h 甚至高于正常水平,说明敌敌畏染毒可能诱导 Nrf2 抗氧化程序缓慢激活来抵抗敌敌畏中毒导致的肝脏氧化损伤。此外, Lv-PON1 干预后各时间点肝组织 Nrf2 mRNA 表达均明显高于敌敌畏染毒组,说明调控 PON1 可上调 Nrf2 mRNA 表达,通过激活 Nrf2 信号通路,增强机体抗氧化能力。因此,在敌敌畏染毒早期提高肝组织细胞 Nrf2 mRNA 水平,可能是对抗敌敌畏染毒诱导的肝脏氧化损伤的关键措施。

PON1 属于钙依赖性糖蛋白,主要由肝脏合成并分泌至全身各组织,其中以肝脏和血液中活性最高^[16]。PON1 对有机磷化合物具有特有的解毒作用,能够减轻有机磷中毒后体内 AChE 的抑制水平,目前已被广泛证实。近年研究发现, PON1 与高密度脂蛋白 (HDL) 结合后通过清除 ROS 以避免低密度脂蛋白 (LDL) 被氧化。研究表明,急性有机磷中毒可导致血清 PON1 活性下降,但与此同时,体内 MDA 含量升高, SOD、CAT 活性下降^[17-20]。有文献证明,重组人 PON1 基因在载脂蛋白 E 敲除小鼠体内过表达,可使小鼠体内 MDA 水平降低^[21]。本研

究中, Lv-PON1 干预后 MDA 水平降低, GSH 含量及 SOD、CAT 活性升高;同时肝组织 Nrf2 mRNA 表达水平明显高于敌敌畏中毒组,提示调控 PON1 基因可能通过上调肝组织 Nrf2 mRNA 表达,激活 Nrf2 信号通路,增强机体抗氧化能力,对敌敌畏中毒引起的肝损伤有一定的保护作用。

参考文献

- [1] Eddleston M, Phillips MR. Self poisoning with pesticides [J]. BMJ, 2004, 328 (7430): 42-44.
- [2] Kır MZ, Öztürk G, Güler M, et al. Pesticide poisoning cases in Ankara and nearby cities in Turkey: an 11-year retrospective analysis [J]. J Forensic Leg Med, 2013, 20 (4): 274-277.
- [3] 王希英, 张国林. 急性有机磷农药中毒患者肝功能的变化及其临床意义[J]. 中华危重病急救医学, 1999, 11 (5): 288.
- [4] Lu L, Wang X, Lang L, et al. Protective effect of reduced glutathione on the liver injury induced by acute omethoate poisoning [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2010, 30 (3): 279-283.
- [5] Mohineesh, Raj J, Rajvanshi AC, et al. Effect of acute exposure of triazophos on oxidative stress and histopathological alterations in liver, kidney and brain of Wistar rats [J]. Indian J Exp Biol, 2014, 52 (8): 814-819.
- [6] 冯保健, 冯燕, 罗旭峰. 川芎嗪对有机磷农药中毒心肺复苏后急性脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12 (2): 94-96.
- [7] Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus [J]. Atherosclerosis, 1991, 86 (2-3): 193-199.
- [8] Alonso-Navarro H, Jimenez-Jimenez FJ, Garcia-Martin E, et al. Genomic and pharmacogenomic biomarkers of Parkinson's disease [J]. Curr Drug Metab, 2014, 15 (2): 129-181.
- [9] Menini T, Gugliucci A. Paraoxonase 1 in neurological disorders [J]. Redox Rep, 2014, 19 (2): 49-58.
- [10] Surajudeen YA, Sheu RK, Ayokulehin KM, et al. Oxidative stress indices in Nigerian pesticide applicators and farmers occupationally exposed to organophosphate pesticides [J]. Int J Appl Basic Med Res, 2014, 4 (Suppl 1): S37-40.
- [11] 邱俏檬, 葛赞, 孙未, 等. 血必净注射液对硫化氢急性中毒大鼠肺组织氧化应激的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19 (3): 144-148.
- [12] Kulkarni SR, Donepudi AC, Xu J, et al. Fasting induces nuclear factor E2-related factor 2 and ATP-binding Cassette transporters via protein kinase A and Sirtuin-1 in mouse and human [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20 (1): 15-30.
- [13] Aleksunes LM, Manautou JE. Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35 (4): 459-473.
- [14] Okawa H, Motohashi H, Kobayashi A, et al. Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 339 (1): 79-88.
- [15] Klaassen CD, Reisman SA. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 244 (1): 57-65.
- [16] Furlong CE, Cole TB, Jarvik GP, et al. Pharmacogenomic considerations of the paraoxonase polymorphisms [J]. Pharmacogenomics, 2002, 3 (3): 341-348.
- [17] Łukaszewicz-Hussain A. Paraoxonase activity and lipid peroxides concentration in serum of rats subchronically intoxicated with chlorpyrifos—organophosphate insecticide [J]. Med Pr, 2012, 63 (5): 559-564.
- [18] Zhang JW, Lv GC, Zhao Y. The significance of the measurement of serum xanthine oxidase and oxidation markers in patients with acute organophosphorus pesticide poisoning [J]. J Int Med Res, 2010, 38 (2): 458-465.
- [19] 张娟文, 吕国才, 金玉琴, 等. 急性有机磷中毒患者血清中对氧磷脂酶活性的变化[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2007, 25 (10): 610-611.
- [20] 张娟文, 吕国才, 金玉琴. 血清黄嘌呤氧化酶联合脂质过氧化指标检测对急性有机磷中毒的意义[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2008, 26 (4): 239-240.
- [21] Zhang C, Peng W, Wang M, et al. Studies on protective effects of human paraoxonases 1 and 3 on atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice [J]. Gene Ther, 2010, 17 (5): 626-633.

(收稿日期: 2015-03-10)

(本文编辑: 李银平)

• 学术活动预告 •

“诺扬 ICU” 有奖征文通知

诺扬(酒石酸布托啡诺注射液)是由江苏恒瑞医药股份有限公司研发、生产,由江苏新晨医药有限公司负责销售的新型阿片类镇痛药物,是全新的阿片受体激动-拮抗剂,不仅可激动 K 受体产生镇痛作用,还对 μ 受体有弱拮抗作用,可有效治疗和缓解各类中、重度疼痛。

疼痛作为第五大生命体征,是 ICU 患者主诉之一,选择合适的镇痛药无疑能够改善 ICU 患者的临床预后。为了推动诺扬(酒石酸布托啡诺注射液,混合型阿片受体激动拮抗剂)在 ICU 的合理应用,《中华危重病急救医学》杂志编委会与江苏新晨医药有限公司将于 2015 年 2 月至 2016 年 2 月联合举办第二届全国“诺扬 ICU”有奖征文活动,现将有关事项通知如下。

- 1 征文内容: ① ICU 诺扬的实验研究; ② ICU 诺扬临床应用的病例分享; ③ ICU 诺扬应用的临床总结。
- 2 征文要求: 论文请按照《中华危重病急救医学》杂志稿约的要求撰写,从《中华危重病急救医学》杂志网站 (<http://www.cccm-em120.com>) 上查看投稿须知,一律寄打印稿并附单位介绍信及稿件电子版 (Word 文档)。来稿恕不退还,请自留底稿。来稿请寄: 江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号恒瑞行政中心 7 楼 706 室 (邮编: 222047), 江苏新晨医药有限公司收 (注明“诺扬 ICU”有奖征文)。征文截稿日期: 2016 年 2 月 29 日 (以邮戳为准)。
- 3 评奖及奖励办法: 由组委会组织有关专家,按照“公平、公正、公开”的原则,评出以下奖项: ① 一等奖 1 名,奖励科研经费 20 000 元; ② 二等奖 3 名,奖励科研经费 10 000 元; ③ 三等奖 20 名,奖励科研经费 5 000 元; ④ 优秀论文奖 200 名,奖励全年《中华危重病急救医学》杂志。
- 4 论文刊出办法: 所有投稿论文将汇编成册,部分获奖论文将推荐给《中华危重病急救医学》杂志编辑部,审核合格后刊出。
- 5 诺扬咨询电话及联系地址: 电话: 0518-5692211, 联系人: 谢志前。地址: 江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号恒瑞行政中心 7 楼 706 室 江苏新晨医药有限公司; Email: xiezhiqian@singch.com。