

5-羟基-1-甲基海因对百草枯中毒小鼠肾损伤的防护作用研究

高利娜 袁慧雅 曹志鹏 徐恩宇 刘俊亭

110014 辽宁沈阳, 中国医科大学法医学院

通讯作者: 刘俊亭, Email: lngao@cmu.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.12.016

【摘要】 目的 探讨5-羟基-1-甲基海因(HMH)对百草枯(PQ)中毒所致肾损伤的防护作用及机制。方法 采用随机数字表法将15只SPF级健康昆明小鼠分为生理盐水(NS)对照组、PQ中毒模型组和HMH干预组,每组5只。采用一次性灌胃30 mg/kg PQ溶液制备PQ中毒模型;NS组灌胃等量NS;HMH组于制模后立即给予100 mg/kg的HMH继续灌胃。于HMH灌胃后1 d处死各组小鼠并留取心脏血和肾脏组织备检。采用苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肾组织形态学改变;按照试剂盒说明书步骤检测肾组织丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性;采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肾组织血红素氧合酶-1(HO-1)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)蛋白表达;采用气相色谱质谱联用法(GC-TOF-MS)检测血清代谢产物,用主成分分析法(PCA)观察各组样本之间的整体分布状况,用多维分析法正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)评价模型的准确性,以重要性投影(VIP)值>1来筛选有差异的代谢物。**结果** 光镜观察显示:NS组肾小球结构清晰,肾间质及血管周围无充血、无炎性细胞浸润;PQ组部分肾小球萎缩坏死,肾小球内毛细血管充血,周围炎性细胞浸润,肾小管上皮细胞肿胀,管腔轻度狭窄,偶尔出现上皮细胞坏死脱落;HMH组肾损伤程度较PQ组明显减轻。与NS组比较,PQ组肾组织MDA含量显著增加(nmol/g: 6.70 ± 0.84 比 2.70 ± 0.43 , $P < 0.01$),SOD活性显著降低(kU/L: 33.30 ± 4.66 比 50.20 ± 3.23 , $P < 0.05$),肾组织HO-1、IL-1 β 蛋白表达水平显著增加(HO-1/ β -actin: 1.11 ± 0.12 比 0.61 ± 0.13 , IL-1 β / β -actin: 0.93 ± 0.13 比 0.32 ± 0.06 , 均 $P < 0.05$)。与PQ组比较,HMH组MDA含量显著下降(nmol/g: 5.10 ± 0.93 比 6.70 ± 0.84 , $P < 0.05$),SOD活性显著增加(kU/L: 61.00 ± 9.02 比 33.30 ± 4.66 , $P < 0.05$),HO-1蛋白表达水平显著下降(HO-1/ β -actin: 0.77 ± 0.07 比 1.11 ± 0.12 , $P < 0.05$),而IL-1 β 蛋白表达水平差异无统计学意义(IL-1 β / β -actin: 0.87 ± 0.13 比 0.93 ± 0.13 , $P > 0.05$)。代谢产物检测结果显示:与NS组比较,PQ组肌酐、甘氨酸、琥珀酸、富马酸、柠檬酸水平显著增加(VIP值分别为1.50、1.58、1.64、1.74、1.95,均 $P < 0.05$),而软脂酸、 α -生育酚和6-磷酸葡萄糖酸水平显著下降(VIP值分别为1.10、1.55、1.56,均 $P < 0.05$)。与PQ组比较,HMH组肌酐、柠檬酸水平显著下降(VIP值分别为1.50、1.86,均 $P < 0.05$),而反式4-羟基-脯氨酸、D-甘油酸、果糖-2,6-二磷酸、6-磷酸葡萄糖酸、氨基丙二酸水平显著增加(VIP值分别为1.36、1.55、1.63、1.68、1.76,均 $P < 0.05$)。**结论** HMH通过纠正三羧酸循环紊乱、脂质过氧化、能量代谢紊乱,从而防护PQ中毒致肾损伤,其机制与通过Nrf2通路调控HO-1蛋白表达有关。

【关键词】 百草枯; 中毒; 5-羟基-1-甲基海因; 代谢组学; 肾损伤

基金项目: 国家自然科学基金项目(81601644, 81671864)

Exploration about the protection mechanism of 5-hydroxy-1-methylhydantoin on paraquat poisoning model

Gao Lina, Yuan Huiya, Cao Zhipeng, Xu Enyu, Liu Junting

School of Forensic Medicine, China Medical University, Shenyang 110014, Liaoning, China

Corresponding author: Liu Junting, Email: lngao@cmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of 5-hydroxy-1-methylhydantoin (HMH) on kidney injury induced by paraquat (PQ). **Methods** Fifteen SPF healthy Kunming mice were randomly divided into normal saline (NS) control group, PQ poisoning model group and HMH intervention group, with 5 mice in each group. PQ poisoning model was challenged by one-time gavage of 30 mg/kg PQ solution. The NS group received the same amount of NS by gavage. The HMH group was given 100 mg/kg of HMH immediately after the model was made and continued to be gavaged. Mice in each group were sacrificed 1 day after HMH gavage and heart blood and renal tissue were harvested for examination. The morphological changes of renal tissue were observed under light microscope by hematoxylin-eosin (HE) staining. The content of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in renal tissue were detected according to the instructions of the kit. The expression of heme oxygenase-1 (HO-1) and interleukin-1 β (IL-1 β) in renal tissues were detected by Western Blot. The serum metabolites were detected by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF-MS), the overall distribution of each sample was observed by principal component analysis (PCA), the accuracy of the model was evaluated by multidimensional analysis orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), and the difference metabolites were screened by variable importance in the projection (VIP) value > 1.

Results Light microscopic observation showed that: glomerular structure in NS group was clear, there was no hyperemia and inflammatory cell infiltration in renal interstitium and blood vessels. In PQ group, some glomeruli atrophy and necrosis, capillary congestion in glomeruli, infiltration of inflammatory cells around glomeruli, swelling of renal tubular epithelial cells, slight stenosis of lumen, and occasional necrosis and exfoliation of epithelial cells occurred. The degree of kidney injury in HMH group was significantly less than that in PQ group. Compared with the NS group, the content of MDA in the PQ group was significantly increased (nmol/g: 6.70 ± 0.84 vs. 2.70 ± 0.43 , $P < 0.01$) and the activity of SOD was significantly decreased (kU/L: 33.30 ± 4.66 vs. 50.20 ± 3.23 , $P < 0.05$), the protein expression of HO-1 and IL-1 β were significantly increased (HO-1/ β -actin: 1.11 ± 0.12 vs. 0.61 ± 0.13 , IL-1 β / β -actin: 0.93 ± 0.13 vs. 0.32 ± 0.06 , both $P < 0.05$). Compared with the PQ group, the content of MDA in the HMH group was significantly decreased (nmol/g: 5.10 ± 0.93 vs. 6.70 ± 0.84 , $P < 0.05$) and the activity of SOD was significantly increased (kU/L: 61.00 ± 9.02 vs. 33.30 ± 4.66 , $P < 0.05$), the protein expression of HO-1 was significantly decreased (HO-1/ β -actin: 0.77 ± 0.07 vs. 1.11 ± 0.12 , $P < 0.05$), however, there was no significant difference in the protein expression of IL-1 β (IL-1 β / β -actin: 0.87 ± 0.13 vs. 0.93 ± 0.13 , $P > 0.05$). Metabolite detection results showed that: compared with NS group, the levels of creatinine, glycine, succinic acid, fumaric acid and citric acid were significantly increased in the PQ group (VIP value was 1.50, 1.58, 1.64, 1.74 and 1.95 respectively, all $P < 0.05$), while the levels of palmitic acid, α -tocopherol and 6-phosphogluconic acid were significantly decreased (VIP value was 1.10, 1.55 and 1.56 respectively, all $P < 0.05$). Compared with the PQ group, the levels of creatinine and citric acid were significantly decreased in the HMH group (VIP value was 1.50 and 1.86, both $P < 0.05$), while trans-4-hydroxy-proline, D-glyceric acid, 2, 6-fructose phosphate, 6-phosphate gluconic acid and aminomalonic acid were significantly increased (VIP value was 1.36, 1.55, 1.63, 1.68 and 1.76 respectively, all $P < 0.05$). **Conclusions** HMH protects kidney injury caused by PQ poisoning by correcting tricarboxylic acids cycle disturbance, lipid peroxidation and energy metabolism disturbance, and its mechanism is related to the regulation of HO-1 protein expression through Nrf2 pathway.

【Key words】 Paraquat; Poisoning; 5-hydroxy-1-methylhydantoin; Metabolomics; Kidney injury

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81601644, 81671864)

百草枯(PQ)具有极强的毒性,一旦中毒能引起多器官损伤^[1-2]。肾脏是PQ中毒后受累最早的器官,PQ中毒死亡患者早期多并发肾损伤。PQ中毒主要机制是氧化损伤,干扰脂质代谢、能量代谢。可以进行体外抗氧化药物治疗PQ中毒,如使用维生素B、维生素C和维生素E等^[3-5]。5-羟基-1-甲基海因(HMH)是一种来自体内可消除羟基自由基、抗氧化作用的物质。有研究表明,PQ中毒导致肾脏受损,体内肌酐增加,肌酐可以在肌酐脱氨酶作用下产生1-甲基海因^[6],而1-甲基海因可在酶作用下继续代谢生成HMH,其具有很好的清除羟基自由基的能力^[6-8]。本实验从代谢组学、抗氧化指标[超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、血红素氧合酶-1(HO-1)、致炎因子[白细胞介素-1 β (IL-1 β)]及组织形态学方面,探讨HMH对PQ中毒致肾损伤的防护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物: SPF级健康昆明小鼠15只,体重(45 ± 5)g,由辽宁长生生物有限公司提供[动物合格证号:SYXK(辽)2013-0007],饲养温度为(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,自由进水,普通饲料喂养。

1.2 药品及主要试剂:百草枯标准物质(纯度99.7%,上海麦克林公司生化科技有限公司,批号:C10123324)。山羊抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG、小鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(中杉金

桥生物科技公司)、增强化学荧光法(ECL)发光液、BCA蛋白定量试剂盒、IL-1 β 兔抗小鼠单克隆抗体、HO-1兔多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)、MDA、SOD试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 动物分组及模型制备:采用随机数字表法将15只昆明小鼠分成生理盐水(NS)对照组、PQ中毒模型组、HMH干预组,每组5只。采用一次性灌胃30 mg/kg PQ制备PQ中毒动物模型;NS组灌胃等量NS。HMH组于制模后立即给予100 mg/kg的HMH继续灌胃。观察各组小鼠一般情况,并于灌胃后1 d处死全部小鼠留取标本,本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,由中国医科大学实验动物中心进行伦理审批(审批号:2018072)。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 肾组织形态学观察:腹腔注射10%水合氯醛0.03 mL/kg麻醉动物,4%多聚甲醛固定左肾48 h,脱水、浸蜡、包埋、切片,行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肾组织形态学改变。

1.4.2 肾组织MDA含量及SOD活性测定:冰浴状态下剖腹取右肾,去除肾被膜,切取肾皮质制备匀浆,按试剂盒说明书步骤测定肾皮质中MDA含量及SOD活性。

1.4.3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肾组织IL-1 β 、HO-1蛋白表达:取 -80°C 冰箱保存的肾组织,加入到含蛋白酶抑制剂的裂解液中组织

匀浆, 4℃下 12000 r/min(离心半径 9.35 cm)离心 5 min, 取上清, 于 -80℃保存备用。BCA 法测定蛋白浓度, 加入 5× 十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液混匀, 蛋白上样量为每泳道 30 μg, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离蛋白后, 湿转法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜, 用含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(TBST)洗涤 3 次, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h; 加入一抗(1:1000)4℃孵育过夜, TBST 洗涤 10 min ×3 次, 加入二抗(1:3000)室温孵育 2 h, TBST 洗涤 10 min ×3 次。移入 Tanon-5500 凝胶成像系统, 以目的蛋白与内参 β-actin 的灰度值比值作为目的蛋白表达量。

1.4.4 气相色谱质谱联用法检测血清代谢产物: 处死动物后, 制备血清并置于 -80℃冰箱冻存。采用硅烷衍生化方法测定血清中代谢产物, 其中采用的硅烷化衍生化试剂是 N, O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA, 含 1% 三甲基氯硅烷)。

仪器条件: Agilent7890 GC-TOF-MS(美国安捷伦科技公司), 色谱柱 DB-5MS(30 m × 250 μm × 0.25 μm), 程序升温: 初始温度 50℃保持 1 min, 以 20℃/min 的升温速率升至 310℃, 保持 6 min。进样口温度 280℃, 传输线温度 280℃, 离子源温度 250℃, 电离电压 70 eV, 质量范围 50~500 amu, 氦气流速为 1 mL/min, 分流进样。

1.5 统计学分析: 使用 ChromaTOF 软件(V 4.3x, LECO)对质谱数据进行峰提取、基线矫正、解卷积、峰积分、峰对齐等分析^[9]。对物质定性工作中, 使用 LECO-Fiehn Rtx 5 数据库, 包括质谱匹配及保留时间指数匹配。采用主成分分析(PCA)观察各组样本之间的整体分布状况。采用多维分析方法正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)法评价模型的准确性, 以重要性投影(VIP)值 >1 来筛选差异代谢物。应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 总体比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验。以双侧 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物基本情况: NS 组小鼠食欲、呼吸正常, 精神状况良好, 行动灵活。PQ 组小鼠多在染毒后 2 h 内出现中毒症状, 表现为倦怠、烦躁、进食进水量不同程度减少, 口鼻见血性分泌物, 毛发蓬松, 动作迟缓易捕捉。HMH 组小鼠在给药 12 h 后出现中毒症状, 表现为倦怠、动作迟缓, 口鼻未见血性分泌物。

2.2 肾组织形态学观察(图 1): 镜下观察, NS 组肾组织结构正常, 无炎性细胞浸润。PQ 组部分肾小球萎缩坏死, 肾小球内毛细血管充血, 周围炎性细胞浸润, 肾小管上皮细胞肿胀, 管腔轻度狭窄, 偶尔出现上皮细胞坏死脱落。HMH 组肾组织形态学改变较 PQ 组明显减轻, 但仍有不同程度充血、水肿及炎性细胞浸润。

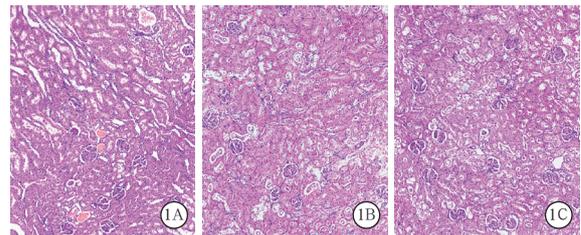


图 1 光镜下观察各组小鼠肾组织形态学改变 生理盐水对照组(NS 组, A)肾组织结构清晰, 肾小球分布及结构正常, 未见充血、水肿、“玻璃样”变性等改变, 无炎性细胞浸润; 肾小管结构完整, 肾小管上皮细胞清晰, 未见管型等特异性改变。百草枯中毒模型组(PQ 组, B)肾小球数量减少, 残存肾小球肿胀、毛细血管高度充血, 间质小血管管腔高度扩张淤血, 偶见间质出血及肾小球萎缩、坏死, 肾小管上皮细胞肿胀等改变。5-羟基-1-甲基海因干预组(HMH 组, C)肾小球肿胀, 肾小球毛细血管及间质小血管充血, 但组织形态学改变明显轻于 PQ 组 HE 染色 中倍放大

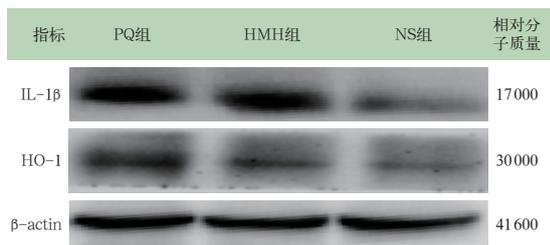
2.3 肾组织 MDA 含量及 SOD 活性(表 1): 与 NS 组比较, PQ 组 MDA 含量显著升高, SOD 活性显著降低(均 $P < 0.05$), 表明 PQ 诱发了小鼠的氧化损伤。与 PQ 组比较, HMH 组 MDA 含量显著降低, SOD 活性显著升高(均 $P < 0.05$), 表明 HMH 可通过抑制 PQ 诱发的氧化损伤, 减轻 PQ 导致的肾损伤。

表 1 各组小鼠肾组织 MDA 含量、SOD 活性及 IL-1β、HO-1 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	动物数(只)	MDA (nmol/g)	SOD(kU/L)
NS 组	5	2.70 ± 0.43	50.20 ± 3.23
PQ 组	5	6.70 ± 0.84 ^a	33.30 ± 4.66 ^a
HMH 组	5	5.10 ± 0.93 ^{ab}	61.00 ± 9.02 ^{ab}
组别	动物数(只)	IL-1β/β-actin	HO-1/β-actin
NS 组	5	0.32 ± 0.06	0.61 ± 0.13
PQ 组	5	0.93 ± 0.13 ^a	1.11 ± 0.12 ^a
HMH 组	5	0.87 ± 0.13 ^a	0.77 ± 0.07 ^{ab}

注: NS 为生理盐水对照组, PQ 组为百草枯中毒模型组, HMH 组为 5-羟基-1-甲基海因干预组; MDA 为丙二醛, SOD 为超氧化物歧化酶, IL-1β 为白细胞介素-1β, β-actin 为 β-肌动蛋白, HO-1 为血红素氧合酶-1; 与 NS 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 PQ 组比较, ^b $P < 0.01$

2.4 肾组织 IL-1β、HO-1 蛋白表达(表 1; 图 2): PQ 组和 HMH 组 IL-1β 蛋白表达水平均较 NS 组显著增加(均 $P < 0.05$), 但 HMH 组与 PQ 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。PQ 组 HO-1 蛋白表达水平较 NS 组显著升高($P < 0.05$), 说明 PQ 中毒激

发 Nrf2/HO-1 通路,导致 HO-1 蛋白表达水平增加。而 HMH 组 HO-1 蛋白表达水平较 PQ 组显著降低 ($P<0.05$),但仍显著高于 NS 组 ($P<0.05$)。



PQ 组为百草枯中毒模型组, HMH 组为 5-羟基-1-甲基海因干预组, NS 组为生理盐水对照组; IL-1 β 为白细胞介素-1 β , HO-1 为血红素氧合酶-1, β -actin 为 β -肌动蛋白

图2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组小鼠肾组织 IL-1 β 、HO-1 蛋白表达

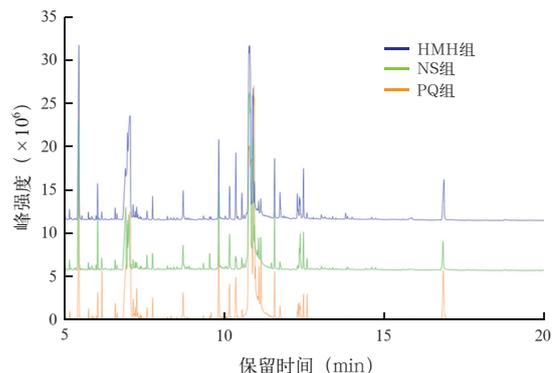
2.5 代谢组学

2.5.1 代谢图谱: 经 GC-TOF-MS 分析得到样品的总离子流(TIC),图3显示, NS 组与 PQ 组间、PQ 组与 HMH 组间代谢产物有明显差异。进一步统计学分析 3 组小鼠血清 GC-MS 谱, PCA 分析显示(图4), 组间小鼠血清代谢谱出现明显差异。考虑到干扰因素对非药物作用可能的影响,进一步进行组间分离, 确立关键差异代谢物,应用 OPLS-DA 法分析血清代谢全谱(表2): PQ 组与 NS 组 OPLS-DA 分析显示, PQ 模型主成分 $R^2Y=0.995$ (R^2Y 表示模型累计解释度),说明 PQ 模型具有较高的稳定性; HMH 组与 PQ 组间 OPLS-DA 分析显示, HMH 治疗模型主成分 $R^2Y=0.948$,说明 HMH 治疗模型具有较高的稳定性。

2.5.2 差异代谢物(表3~4): 相比 NS 组, PQ 中毒可导致肌酐升高,干扰三羧酸循环,导致柠檬酸、琥珀酸、富马酸增加;同时,甘氨酸增加,干扰氨基酸的代谢;另外,软脂酸、 α -生育酚和 6-磷酸葡萄糖酸减少。

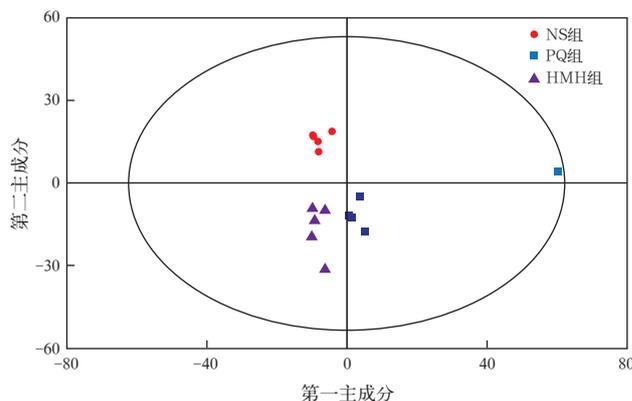
与 PQ 组比较, HMH 组肌酐、柠檬酸含量显著降低,说明 HMH 纠正了 PQ 中毒所致的柠檬酸、肌

酐含量升高;但 HMH 组关于糖代谢的一些代谢产物却比 PQ 组显著升高,如 6-磷酸葡萄糖酸、果糖-2,6-二磷酸和 D-甘油酸等;此外,氨基丙二酸及反式 4-羟基-脯氨酸这些氨基酸含量增加显著。



注: NS 组为生理盐水对照组, PQ 组为百草枯中毒模型组, HMH 组为 5-羟基-1-甲基海因干预组

图3 各组小鼠部分血清样品的总离子流色谱图



注: NS 组为生理盐水对照组, PQ 组为百草枯中毒模型组, HMH 组为 5-羟基-1-甲基海因干预组

图4 主成分分析(PCA)各组小鼠血清样本的整体分布

样本	R^2X	R^2Y	Q^2
HMH 组与 PQ 组	0.557	0.981	0.548
PQ 组与 NS 组	0.518	0.995	0.690

注: OPLS-DA 为正交偏最小二乘法-判别分析; HMH 组为 5-羟基-1-甲基海因干预组, PQ 组为百草枯中毒模型组, NS 组为生理盐水对照组; R^2X 代表模型对 X 变量的累计解释度, R^2Y 代表模型对 Y 变量的累计解释度, Q^2 代表模型的可预测性

表3 PQ 组与 NS 组小鼠血清中差异代谢产物

序号	英文名	中文名	属别	趋势	VIP 值	P 值
1	creatine	肌酐	carboxylic acids and derivatives	↑	1.50	0.025
2	citric acid	柠檬酸	carboxylic acids and derivatives	↑	1.95	0.006
3	succinic acid	琥珀酸	carboxylic acids and derivatives	↑	1.64	0.014
4	fumaric acid	富马酸	carboxylic acids and derivatives	↑	1.74	0.003
5	alpha-Tocopherol	α -生育酚	prenol lipids	↓	1.55	0.016
6	glycine	甘氨酸	carboxylic acids and derivatives	↑	1.58	0.002
7	6-phosphogluconic acid	6-磷酸葡萄糖酸	organoxygen compounds	↓	1.56	0.023
8	palmitoleic acid	软脂酸	fatty acyls	↓	1.10	0.036

注: PQ 组为百草枯中毒模型组, NS 组为生理盐水对照组, VIP 为重要性投影值

表 4 HMH 组与 PQ 组小鼠血清中差异代谢产物

序号	英文名	中文名	属别	趋势	VIP 值	P 值
1	creatine	肌酐	carboxylic acids and derivatives	↓	1.50	0.025
2	citric acid	柠檬酸	carboxylic acids and derivatives	↓	1.86	0.026
3	D-Glyceric acid	D-甘油酸	carbohydrates and carbohydrate conjugates	↑	1.55	0.029
4	Aminomalonic acid	氨基丙二酸	carboxylic acids and derivatives	↑	1.76	0.045
5	trans-4-hydroxy-L-proline	反式 4-羟基-脯氨酸	carboxylic acids and derivatives	↑	1.36	0.008
6	6-phosphogluconic acid	6-磷酸葡萄糖酸	carbohydrates and carbohydrate conjugates	↑	1.68	0.004
7	Fructose 2, 6-biphosphate	果糖-2, 6-二磷酸	carbohydrates and carbohydrate conjugates	↑	1.63	0.023

注: HMH 组为 5-羟基-1-甲基海因干预组, PQ 组为百草枯中毒模型组, VIP 为重要性投影值

3 讨论

PQ 进入机体参与体内的氧化还原反应, 经过还原型辅酶 II (NADPH) 的单电子传递生成 PQ²⁺, NADPH 被大量消耗, 激发磷酸戊糖代谢途径, 导致该途径相关产物如 6-磷酸葡萄糖酸减少, 并且生成大量的自由基, 自由基再与氧反应生成超氧阴离子(O²⁻), 并在 SOD 作用下生成过氧化氢, 再通过 Fenton 反应快速生成羟自由基(-OH), 引起脂质过氧化等链锁反应, 生成更多自由基, 耗尽 NADPH 等体内还原物质^[10], 引发脂质过氧化, 损伤细胞膜、线粒体膜等生物膜和功能蛋白质及 DNA 结构^[11-12]。PQ 进入体内通过氧化机制激活中性粒细胞等炎症细胞, 释放 IL-1β、IL-6、IL-8 和肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 等炎症因子, 从而加重机体损伤^[13-14]。研究显示 PQ 中毒能激活 Nrf2-抗氧化反应元件(ARE) 信号通路: Nrf2 在正常细胞中较少表达, 但在 PQ 损害下 Nrf2 蛋白表达明显增加, 表明 Nrf2 表达增加与 PQ 激活体内氧化应激系统有关^[11, 15-16]。Nrf2 蛋白还可以调控下游抗氧化蛋白, 如过氧化氢酶(CAT)、HO-1, 以调控炎症因子和氧化损伤。但是 HO-1 过度表达将产生过多的 Fe²⁺ 和一氧化碳, 可能在一定条件下加大细胞氧化应激压力, 引发细胞功能紊乱, 表明 Nrf2-ARE 信号通路是维护体内氧化还原平衡的关键因素^[17]。本实验中 HMH 通过抗氧化作用来防护 PQ 中毒所致的肾损伤, SOD 活性较 PQ 组显著升高, 而 MDA 含量较 PQ 组显著降低。由 HMH 组 HO-1 蛋白表达水平较 NS 组升高, 推测 HMH 通过激活 Nrf2-ARE 通路, 增加了 HO-1 蛋白的表达水平。

本研究中代谢组学结果显示, PQ 中毒可使肌酐升高、脂质过氧化, 干扰三羧酸循环、氨基酸代谢等损害机体。相比 NS 组, PQ 中毒组软脂酸、α-生育酚和 6-磷酸葡萄糖酸减少, 其中 6-磷酸葡萄糖酸是磷酸戊糖代谢途径(PPP)的中间产物, 在 PPP 途径中可产生大量的 NADPH^[16]。因 PQ 中毒产生超氧

化物和过氧化氢消耗大量 NADPH, 故推测 PQ 中毒可激活 PPP 途径。PQ 组软脂酸及 α-生育酚较 NS 组明显降低, 这与文献报道的 α-生育酚与自由基的消除有关系相一致^[18], PQ 中毒产生的超氧自由基消耗了软脂酸和 α-生育酚。PQ 几乎以原型从尿液排出, 由于 PQ 中毒导致肺、肾、肝损伤, 使得肌酐清除率明显降低, PQ 不能及时排出体外, 导致损伤加剧和 PQ 中毒患者预后不良^[6]。

血糖作为机体代谢状态的重要指标, 在炎症反应时出现升高, 相关研究指出急性 PQ 中毒患者可出现应激性高血糖, 其发生与胰岛素抵抗有关^[19]。高血糖损害中性粒细胞功能, 诱导细胞凋亡; 并且降低机体的免疫力, 易导致各种感染, 影响伤口愈合, 增加急性 PQ 中毒患者的病死率^[20], 总之, 机体血糖水平高低和急性 PQ 中毒患者病情预后存在密切关系。本实验中通过对 PQ 组代谢组学研究显示, PQ 确实影响到机体葡萄糖的代谢途径; 此外对 HMH 干预组代谢组学研究也显示, HMH 同样对机体葡萄糖的代谢有影响, 主要表现为 6-磷酸葡萄糖酸和果糖-2, 6-二磷酸的增加。有文献证明, 缺氧条件下细胞更依赖于 PPP 途径^[21]产生三磷酸腺苷(ATP)。PPP 包括两个分支, 即氧化分支和非氧化分支。氧化分支生成 NADPH、6-磷酸葡萄糖、6-磷酸葡萄糖酸及 5-磷酸核酮糖。非氧化分支 5-磷酸核酮糖生成转变成 5-磷酸核糖或 5-磷酸木酮糖, 5-磷酸核糖的意义在于 DNA 分子的从头合成, 而 5-磷酸木酮糖除了在 PPP 中作为产物出现, 还可以提高果糖-2, 6-二磷酸的水平, 后者是 6-磷酸果糖激酶-1 的变构激活剂, 6-磷酸果糖激酶-1 活性升高可提高糖的酵解。本研究显示, HMH 组较 PQ 组肌酐、柠檬酸水平降低, 部分纠正了 PQ 中毒导致的柠檬酸水平异常; 此外, HMH 组 6-磷酸葡萄糖酸、果糖-2, 6-二磷酸等含量较 PQ 组增加, 二者是 PPP 的中间产物。所以推测 HMH 纠正了 PQ 导致的三

羧酸循环、糖代谢途径等,以减轻PQ中毒导致的氧化损伤。

综上,本研究显示,HHM可通过抗氧化作用防护PQ中毒致肾损伤,并且代谢组学结果显示,HHM在一定程度上可以通过纠正PQ中毒致三羧酸循环和能量代谢紊乱来防护PQ中毒导致的损伤。但本实验设计存在一定局限性,需进一步实验验证HHM是否通过激活Nrf2-ARE通路以及对TNF- α 等炎症因子的调控来实现PQ中毒致肾损伤的防护机制;并且需要进一步增加样本量和不同治疗浓度,以防止在实验中动物死亡和便于获取更全面的代谢组学信息。

参考文献

- [1] 胡海霞,吴扬,臧秀贤,等.不同方式血液灌流对百草枯中毒患者血中毒物清除的研究[J].中华急诊医学杂志,2016,25(4):499-502. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.04.021.
Hu HX, Wu Y, Zang XX, et al. Study of different ways of hemoperfusion on the removal of poison in the blood of patients with paraquat poisoning [J]. Chin J Emerg Med, 2016, 25 (4): 499-502. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.04.021.
- [2] 王维展,李敬,朱保月,等.百草枯解毒组方联合持续血液灌流治疗对APP患者的疗效及Presepsin的临床价值[J].中华危重病急救医学,2017,29(11):967-972. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.11.002.
Wang WZ, Li J, Zhu BY, et al. Curative effect of paraquat detoxification recipe combined with continuous hemoperfusion in the treatment of patients with APP and clinical value of Presepsin [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (11): 967-972. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.11.002.
- [3] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1004-583X.2006.02.039.
Chen H, Shi HW, Tian YP. Advances in research on lung injury caused by paraquat poisoning [J]. Clin Focus, 2006, 21 (2): 146-148. DOI: 10.3969/j.issn.1004-583X.2006.02.039.
- [4] 田英平,苏建玲,高恒波,等.113例百草枯中毒救治体会[J].中国急救医学,2006,26(7):542-543. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2006.07.023.
Tian YP, Su JL, Gao HB, et al. Experience in the treatment of 113 cases of paraquat poisoning [J]. Chin J Crit Care Med, 2006, 26 (7): 542-543. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2006.07.023.
- [5] Awadalla EA. Efficacy of vitamin C against liver and kidney damage induced by paraquat toxicity [J]. Exp Toxicol Pathol, 2012, 64 (5): 431-434. DOI: 10.1016/j.etp.2010.10.009.
- [6] 高利娜,杨爽,刘俊亭,等.5-羟基-1-甲基海因对百草枯所致大鼠肾毒性防护作用的实验研究[J].中华危重病急救医学,2015,27(4):246-249. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.04.004.
Gao LN, Yang S, Liu JT, et al. Preventive effects of 5-hydroxy-1-methylhydantoin on paraquat-induced nephrotoxicity in rat [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (4): 246-249. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.04.004.
- [7] Ienaga K, Park CH, Yokozawa T. Protective effect of an intrinsic antioxidant, HHM (5-hydroxy-1-methylhydantoin; NZ-419), against cellular damage of kidney tubules [J]. Exp Toxicol Pathol, 2013, 65 (5): 559-566. DOI: 10.1016/j.etp.2012.05.001.
- [8] Ienaga K, Yokozawa T. Creatinine and HHM (5-hydroxy-1-methylhydantoin, NZ-419) as intrinsic hydroxyl radical scavengers [J]. Drug Discov Ther, 2011, 5 (4): 162-175.
- [9] Kind T, Wohlgemuth G, Lee DY, et al. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2009, 81 (24): 10038-10048. DOI: 10.1021/ac901952d.
- [10] Suntutres ZE. Exploring the potential benefit of natural product extracts in paraquat toxicity [J]. Fitoterapia, 2018, 131: 160-167. DOI: 10.1016/j.fitote.2018.10.026.
- [11] Narasimhan M, Riar AK, Rathinam ML, et al. Hydrogen peroxide responsive miR153 targets Nrf2/ARE cytoprotection in paraquat induced dopaminergic neurotoxicity [J]. Toxicol Lett, 2014, 228 (3): 179-191. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.05.020.
- [12] 曹俊,文航华,黄涵程,等.Nrf2-ARE信号通路在百草枯中毒中的研究进展[J].临床急诊杂志,2016,17(9):731-734.
Cao J, Wen HH, Huang HC, et al. Research progress of Nrf2-ARE signaling pathway in mechanism of paraquat poisoning [J]. J Clin Emerg, 2016, 17 (9): 731-734.
- [13] Koo JR, Kim JC, Yoon JW, et al. Failure of continuous venovenous hemofiltration to prevent death in paraquat poisoning [J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39 (1): 55-59. DOI: 10.1053/ajkd.2002.29880.
- [14] 孙百胜,何跃忠.百草枯中毒机制及临床治疗进展[J].中华危重病急救医学,2017,29(11):1043-1046. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.11.018.
Sun BS, He YZ. Paraquat poisoning mechanism and its clinical treatment progress [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (11): 1043-1046. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.11.018.
- [15] 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. DOI: 10.1177/0960327114532381.
- [16] 王瑜,周满红,陆元兰,等.5-氨基水杨酸通过Nrf2-ARE信号通路对百草枯中毒大鼠肾脏起保护作用[J].中华危重病急救医学,2017,29(11):961-966. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.11.001.
Wang Y, Zhou MH, Lu YL, et al. Protective effect of 5-aminosalicylic acid on the kidney of paraquat poisoning rats by Nrf2-ARE signal pathway [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (11): 961-966. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.11.001.
- [17] Song W, Su H, Song S, et al. Over-expression of heme oxygenase-1 promotes oxidative mitochondrial damage in rat astroglia [J]. J Cell Physiol, 2006, 206 (3): 655-663. DOI: 10.1002/jep.20509.
- [18] 黄进,杨国宇,李宏基,等.抗氧化剂作用机制研究进展[J].自然杂志,2004,26(2):74-78. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9608.2004.02.003.
Huang J, Yang GY, Li HJ, et al. Progress in mechanism studies of antioxidants [J]. Chin J Nature, 2004, 26 (2): 74-78. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9608.2004.02.003.
- [19] 张秀文.大剂量糖皮质激素治疗急性百草枯中毒后的葡萄糖增高现象[J].中国误诊学杂志,2005,5(13):2429-2430. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6647.2005.13.017.
Zhang XW. The phenomenon of increased glucose after high dose glucocorticoid treatment for acute paraquat poisoning [J]. Chin J Misdiagn, 2005, 5 (13): 2429-2430. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6647.2005.13.017.
- [20] 武小娟,李彦国,孟舰,等.早期血糖和离子水平对急性百草枯中毒患者的预后评估[J].现代预防医学,2018,45(1):109-112.
Wu XJ, Li YG, Meng J, et al. Prognostic evaluation of early glucose and ion levels in patients with acute paraquat poisoning [J]. Modern Prevent Med, 2018, 45 (1): 109-112.
- [21] Chen X, Qian Y, Wu S. The Warburg effect: evolving interpretations of an established concept [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 79: 253-263. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.027.

(收稿日期:2018-10-30)