

抗氧化基因核因子 E2 相关因子 2 对百草枯中毒肺损伤小鼠的保护作用

吴优 刘虹 丁颖威 卢阳 陈肖 蔡旗旗 洪广亮 赵光举 卢中秋

(温州医科大学附属第一医院急诊医学中心, 浙江 温州 325000)

【摘要】目的 通过体外构建携带抗氧化基因核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)的骨髓间充质干细胞(BMSC), 观察 Nrf2 对百草枯所致肺损伤模型小鼠的保护作用。**方法** 构建携带有 Nrf2 基因的过表达慢病毒并转染 BMSCs, 建立携带有抗氧化基因 Nrf2 的 BMSCs 体系。将 120 只清洁级 Balb/c 小鼠按随机数字表法分为正常对照组、PQ 染毒模型组、BMSCs 治疗组、携带空载基因的 BMSCs 治疗组(BMSC-Cherry 治疗组)、携带 Nrf2 基因的 BMSCs 治疗组(BMSC-Nrf2 治疗组)5 组, 每组 24 只。腹腔注射 PQ 溶液 25 mg/kg 复制小鼠 PQ 中毒肺损伤模型, 正常对照组给予等体积生理盐水; BMSC 治疗组、BMSC-Cherry 治疗组、BMSC-Nrf2 治疗组于制模后 6 h 经球后注射相应的 BMSCs 0.3 mL, 每只 1×10^6 个。制模后处死小鼠取肺组织, 用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肺组织 Nrf2 蛋白表达; 留取血液标本, 用化学比色法检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)等氧化应激指标, 用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症指标, 用原位末端标记试验(TUNEL)检测肺组织细胞凋亡情况。**结果** 与正常对照组比较, 制模后 3 d 和 21 d, PQ 染毒模型组、BMSC 治疗组、BMSC-Cherry 治疗组、BMSC-Nrf2 治疗组的 Nrf2 蛋白表达均显著升高, 且以 BMSC-Nrf2 组 21 d 升高最明显(灰度值: 3.52 ± 0.26 比 1.00 ± 0.12 , $P < 0.05$)。PQ 染毒模型组血清 MDA、IL-1 β 、TNF- α 水平均较正常对照组明显升高, SOD、GSH 均较正常对照组明显降低; 用 BMSC、BMSC-Cherry、BMSC-Nrf2 干预后, 随着时间延长, 各组 MDA、IL-1 β 和 TNF- α 水平均较 PQ 染毒模型组逐渐降低, SOD、GSH 均较 PQ 染毒模型组逐渐升高, 以 BMSC-Nrf2 组制模后 21 d 变化最显著[MDA($\mu\text{mol/L}$): 2.09 ± 0.28 比 3.11 ± 0.11 , SOD(kU/L): 23.88 ± 0.68 比 16.12 ± 0.87 , GSH($\mu\text{mol/L}$): 2.92 ± 0.21 比 2.33 ± 0.15 , IL-1 β (ng/L): 55.58 ± 4.54 比 87.23 ± 9.28 , TNF- α (ng/L): 179.25 ± 9.40 比 228.38 ± 13.30 , 均 $P < 0.05$]。与正常对照组比较, PQ 染毒模型组 TUNEL 染色阳性细胞明显增多[(45.06 ± 6.78)% 比 (3.11 ± 0.99)%]; 与 PQ 染毒模型组比较, BMSC 治疗组、BMSC-Cherry 治疗组、BMSC-Nrf2 治疗组阳性细胞明显减少[(30.34 ± 1.79)%、(26.25 ± 4.97)%、(18.00 ± 3.15)% 比 (45.06 ± 6.78)%], 且以 BMSC-Nrf2 治疗组下降最明显($P < 0.05$)。**结论** BMSCs 及携带有抗氧化基因 Nrf2 的 BMSCs 均能有效减轻 PQ 所致肺损伤, 且以 BMSCs-Nrf2 的作用更显著; 其保护作用可能与拮抗体内氧化应激和炎症因子等有关。

【关键词】 百草枯中毒; 肺损伤; 骨髓间充质干细胞; 抗氧化基因核因子 E2 相关因子 2

The protective effect of anti-oxidant gene nuclear factor erythroid 2-related factor 2 on paraquat induced lung injury in mice Wu You, Liu Hong, Ding Yingwei, Lu Yang, Chen Xiao, Cai Qiqi, Hong Guangliang, Zhao Guangju, 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 We constructed bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) bringing anti-oxidant gene nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), in vitro to explore the protective effect of Nrf2 on lung injury induced by paraquat (PQ) in mice. **Methods** Lentiviral vector carrying Nrf2 gene was built and transfected into BMSCs, creating the cell line of BMSCs with antioxidant gene Nrf2. A total of clean 120 Balb/c mice were randomly divided into five groups: normal control group, PQ poisoning model group, BMSCs therapy group, BMSCs-Cherry (carrying no load of gene) therapy group, BMSCs-Nrf2 therapy group, 24 mice in each group. 20% PQ solution (25 mg/kg) was injected intraperitoneally to establish PQ poisoning model and the same volume of normal saline (NS) was given to normal control group. After modeling for 6 hours in BMSC, BMSC-Cherry and BMSC-Nrf2 groups, 0.3 mL corresponding BMSCs was injected into a retro-bulbar vein, respectively, each mouse 1×10^6 unit. The mice were killed after cell treatment and the lung tissues were taken from each group and the protein expression of Nrf2 in lung tissue was detected by Western Blot. After blood samples were taken, the activity of superoxide dismutase (SOD) and the levels of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), etc. oxygenation stress indexes were detected by chemical colorimetry, the

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.01.010

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(LZ12H26001); 浙江省医药卫生平台研究计划重点项目(2012ZDA034); 浙江省医学创新学科建设项目(11-CX26); 浙江省中医药重点学科计划(2012-XK-A28); 浙江省“十二五”重点学科建设项目(2012-207)

通讯作者: 卢中秋, Email: lzq640815@163.com

interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) etc. inflammatory indexes were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the apoptosis of lung tissues was observed by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL). **Results** Compared with normal control group, the Nrf2 protein expressions on 3 days and 21 days after modeling in PQ poisoning model, BMSC, BMSC-Cherry and BMSC-Nrf2 groups were significantly increased, and in the BMSC-Nrf2 therapy group after molding for 21 days, the elevation of Nrf2 protein expression was mostly obvious (gray value: 3.52 ± 0.26 vs. 1.00 ± 0.12 , $P < 0.05$). The levels of serum MDA, IL-1 β and TNF- α of PQ poisoning model group showed significantly elevated, while the levels of SOD and GSH were markedly reduced. After BMSC, BMSC-Cherry and BMSC-Nrf2 treatment, with the time prolongation, compared with the PQ poisoning model group, the levels of MDA, IL-1 β and TNF- α of each group were gradually decreased, while the levels of GSH and SOD were gradually increased, and after modeling for 21 days the above changes in BMSC-Nrf2 group showed mostly obvious [MDA ($\mu\text{mol/L}$): 2.09 ± 0.28 vs. 3.11 ± 0.11 , SOD (kU/L): 23.88 ± 0.68 vs. 16.12 ± 0.87 , GSH ($\mu\text{mol/L}$): 2.92 ± 0.21 vs. 2.33 ± 0.15 , IL-1 β (ng/L): 55.58 ± 4.54 vs. 87.23 ± 9.28 , TNF- α (ng/L): 179.25 ± 9.40 vs. 228.38 ± 13.30 , all $P < 0.05$]. Compared with normal control group, the positive TUNEL staining cells were visibly increased in PQ poisoning model group [$(45.06 \pm 6.78)\%$ vs. $(3.11 \pm 0.99)\%$, $P < 0.05$]; compared with PQ poisoning model group, the positive cells were remarkably decreased in BMSC, BMSC-Cherry and BMSC-Nrf2 treatment groups [$(30.34 \pm 1.79)\%$, $(26.25 \pm 4.97)\%$, $(18.00 \pm 3.15)\%$ vs. $45.06 \pm 6.78\%$, all $P < 0.05$], and in the BMSC-Nrf2 group, the percentage of positive cells was the lowest among the 3 treatment groups(all $P < 0.05$). **Conclusions** BMSCs and BMSCs carrying antioxidant gene Nrf2 can effectively attenuate the lung injury caused by PQ, and the latter is more effective than the former. The protective effect may be related to body anti-oxidative stress, inflammation, anti-inflammatory factors and so on.

【Key words】 Paraquat intoxication; Lung injury; Bone marrow mesenchymal stem cell; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

百草枯(PQ)是目前世界范围内广泛使用的有机杂环类接触性脱叶剂和除草剂。PQ中毒后,肺脏是其损伤的主要靶器官,可导致百草枯肺,是PQ中毒患者的主要死亡原因^[1-2]。氧化/抗氧化失衡在PQ肺损伤中起着非常重要的作用^[3]。核因子E2相关因子2(Nrf2)属于Cap "n" Collar家族的转录因子,在哺乳动物的细胞中广泛表达,通过控制抗氧化反应元件(ARE)调节细胞解毒酶和抗氧化蛋白表达,使机体免受氧化、过氧化刺激^[4]。有研究显示,Nrf2基因缺失裸鼠失去了对博莱霉素、低氧所致肺炎性反应及肺纤维化的抵抗力^[5],影响着Nrf2活性的Nrf2基因启动子多态性,与严重创伤患者急性肺损伤(ALI)的发生密切相关^[6]。

近年来越来越多的研究专注于采用细胞植入治疗ALI,应用最多最广泛的是对干细胞的研究,间充质干细胞(MSCs)是来源于发育早期中胚层的具有高度自我更新能力和多向分化潜能的干细胞。MSCs低表达主要组织相容性复合体-I(MHC-I)分子,且不表达MHC-II及任何共刺激分子,即使在分化为其他细胞后仍然如此,因而不激活同种异体的T细胞,使其免于免疫系统的清除^[7-8]。近年来有越来越多关于MSCs治疗ALI的研究^[9-11],但其机制尚未被揭开。因此,本实验拟建立携带抗氧化基因Nrf2的骨髓间充质干细胞(BMSCs)体系,观察其对PQ中毒肺损伤的治疗作用,为进一步拓宽PQ治疗学研究提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料:选择雄性清洁级Balb/c小鼠120只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格证号:SCXK(沪)2012-0002,体质量18~22 g。Balb/c小鼠BMSCs、DMEM培养基(苏州赛业生物科技有限公司);Nrf2基因过表达慢病毒(上海吉凯基因化学技术有限公司);质量分数为20%的PQ溶液(500 g/L,天津施普乐农药技术发展有限公司);胎牛血清、0.25%胰酶(美国Gibco公司);抗Nrf2抗体(美国CST公司);抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG(巴傲得生物科技有限公司);核蛋白提取试剂盒(碧云天生物技术研究所);原位末端缺刻标记试验(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)化学比色检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。

1.2 BMSCs培养与转染:复苏正常冻存的BMSCs,37℃、5%二氧化碳(CO₂)培养箱中培养,24 h后观察细胞状况并更换新鲜DMEM培养液。当细胞融合80%以上时,用0.25%胰酶消化并接种到培养瓶中继续培养。当细胞生长状态稳定时用于实验。将BMSCs单细胞悬液 4×10^5 个/mL接种在6孔培养板中,培养24 h后更换为无血清培养液,以感染复

数(MOI)为 20 加入空载体慢病毒(LV-Cherry)或携带 Nrf2 基因慢病毒(LV-Nrf2)40 μL 共培养 12 h 后更换新鲜培养基,常规培养,72 h 后荧光显微镜下观察绿色荧光表达情况,得出细胞转染效率。转染后的 BMSCs 用于后续实验。

1.3 实验分组及模型复制:将 Balb/c 小鼠按随机数字表法分正常对照组、PQ 染毒模型组、BMSC 治疗组、携带空载基因的 BMSC 治疗组(BMSC-Cherry 治疗组)、携带 Nrf2 基因的 BMSC 治疗组(BMSC-Nrf2 治疗组),每组 24 只。采用右侧腹腔注射 20% PQ 溶液 0.4 mL(中毒剂量为 25 mg/kg)制备小鼠 PQ 染毒模型;正常对照组小鼠腹腔注射 0.4 mL 生理盐水。染毒 6 h 后 BMSC 治疗组经球后注射 BMSCs 0.3 mL, 1×10^6 个/只, BMSC-Cherry 组注射 BMSCs-Cherry 0.3 mL, 1×10^6 个/只, BMSC-Nrf2 组注射 BMSCs-Nrf2 0.3 mL, 1×10^6 个/只,共 21 d。

1.4 伦理学:本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.5 检测指标和方法

1.5.1 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 Nrf2 表达:染毒后 3、21 d 各组分别处死 6 只小鼠,分离左侧肺组织,用核蛋白提取裂解缓冲液 A、B 提取核蛋白,用 BCA 比色法测定核蛋白浓度, -80°C 保存备检。取 30 μg 核蛋白上样进行凝胶电泳,依次转膜、含 5% 脱脂乳三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水吐温(TBST)缓冲液封闭、加一抗(抗 Nrf2 抗体或抗 β -actin 抗体)4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜、TBST 缓冲液洗涤、

加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 孵育 2 h,化学发光法(ECL)显色,用灰度值表示蛋白质的表达水平。

1.5.2 细胞因子含量测定:染毒后 3、7、14、21 d 收集小鼠血清,用 ELISA 检测 IL-1 β 、TNF- α 水平,用比色法测定 MDA、GSH 和 SOD 含量。

1.5.3 TUNEL 检测细胞凋亡情况:PQ 染毒模型组制模后 7 d 分离小鼠右侧肺组织,常规冰冻切片。采用细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡情况,操作按试剂盒说明书进行,细胞凋亡率=凋亡细胞数/计数细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.6 统计学分析:使用 SPSS 19.0 统计软件处理数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织 Nrf2 蛋白表达情况(表 1;图 1):与正常对照组比较, PQ 染毒模型组制模后 3、21 d, Nrf2 表达均增高(均 $P < 0.05$); BMSC 治疗组、BMSC-Cherry 治疗组、BMSC-Nrf2 治疗组制模后 3、21 d Nrf2 表达较 PQ 染毒模型组明显升高,且以 BMSC-Nrf2 治疗组升高更为显著(均 $P < 0.05$)。

2.2 肺组织细胞凋亡情况(表 1;图 2):与正常对照组比较, PQ 染毒模型组、BMSC 治疗组、BMSC-Cherry 治疗组、BMSC-Nrf2 治疗组阳性细胞明显增多, BMSC 治疗组、BMSC-Cherry 治疗组、BMSC-Nrf2 治疗组阳性细胞较 PQ 染毒模型组明显减少,且以 BMSC-Nrf2 治疗组下降最为明显(均 $P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠肺组织 Nrf2、细胞凋亡情况及血清 MDA、SOD、GSH 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺组织 Nrf2 (灰度值)		细胞凋亡阳性 百分比 (%)	血 MDA (μmol/L)			
		制模后 3 d	制模后 21 d		制模后 3 d	制模后 7 d	制模后 14 d	制模后 21 d
正常对照组	24	1.00±0.12	1.00±0.12	3.11±0.99	0.98±0.18	0.97±0.28	0.89±0.15	0.95±0.17
PQ 染毒模型组	24	1.52±0.11 ^a	1.73±0.22 ^a	45.06±6.78 ^a	5.11±0.18 ^a	4.57±0.19 ^a	4.03±0.28 ^a	3.11±0.11 ^a
BMSC 治疗组	24	2.23±0.21 ^b	2.58±0.37 ^b	30.34±1.79 ^b	4.54±0.15 ^b	4.05±0.25 ^b	3.02±0.18 ^b	3.03±0.17
BMSC-Cherry 治疗组	24	2.84±0.21 ^b	2.51±0.22 ^b	26.25±4.97 ^b	4.55±0.15 ^b	3.96±0.14 ^b	2.94±0.17 ^b	3.08±0.21
BMSC-Nrf2 治疗组	24	3.11±0.28 ^{bc}	3.52±0.26 ^{bc}	18.00±3.15 ^{bc}	3.45±0.11 ^{bc}	2.67±0.22 ^{bc}	2.26±0.21 ^{bc}	2.09±0.28 ^{bc}

组别	动物数 (只)	血 SOD (kU/L)				血 GSH (μmol/L)			
		制模后 3 d	制模后 7 d	制模后 14 d	制模后 21 d	制模后 3 d	制模后 7 d	制模后 14 d	制模后 21 d
正常对照组	24	25.25±0.88	24.11±1.11	25.13±1.45	26.09±1.32	3.36±0.13	3.42±0.15	3.38±0.24	3.35±0.13
PQ 染毒模型组	24	10.31±1.15 ^a	11.19±1.04 ^a	13.27±2.19 ^a	16.12±0.87 ^a	1.08±0.17 ^a	1.67±0.11 ^a	2.09±0.19 ^a	2.33±0.15 ^a
BMSC 治疗组	24	13.01±0.88 ^b	14.29±1.21 ^b	15.58±0.92 ^b	19.22±0.85 ^b	1.39±0.19 ^b	1.94±0.23 ^b	2.37±0.18 ^b	2.56±0.18 ^b
BMSC-Cherry 治疗组	24	13.15±0.72 ^b	14.11±1.23 ^b	16.67±0.88 ^b	18.96±2.21 ^b	1.35±0.16 ^b	2.02±0.09 ^b	2.54±0.15 ^b	2.59±0.13 ^b
BMSC-Nrf2 治疗组	24	16.65±0.78 ^{bc}	17.57±0.99 ^{bc}	19.53±0.89 ^{bc}	23.88±0.68 ^{bc}	1.93±0.13 ^{bc}	2.32±0.19 ^{bc}	2.64±0.14 ^{bc}	2.92±0.21 ^{bc}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与 PQ 染毒模型组比较,^b $P < 0.05$;与 BMSC 治疗组比较,^c $P < 0.05$

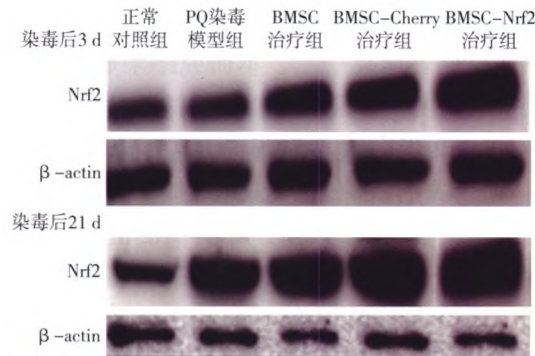


图 1 小鼠染毒 3 d 和 21 d 肺组织 Nrf2 蛋白表达

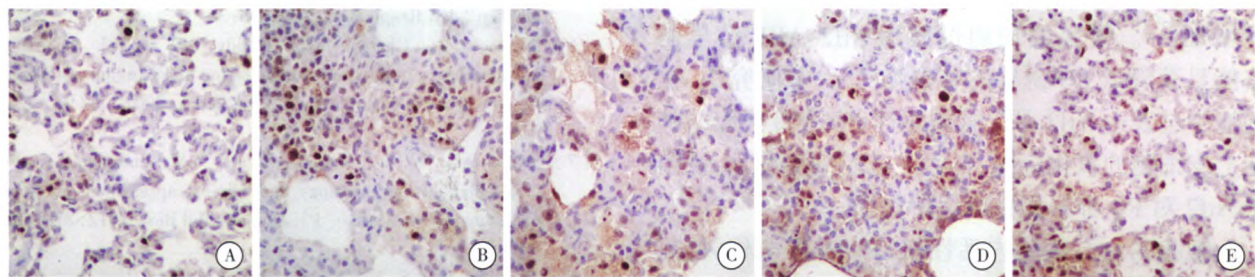
2.3 血清 MDA、SOD 和 GSH 含量(表 1):与正常对照组比较,制模后 3、7 d PQ 染毒模型组 MDA 含量明显升高,而 SOD 和 GSH 水平均显著降低(均 $P < 0.05$)。随着中毒时间的延长,染毒后 14、21 d PQ 组 MDA 水平逐渐降低, SOD 和 GSH 水平则逐渐升高。BMSC 治疗组、BMSC-Cherry 治疗组、BMSC-Nrf2 治疗组 MDA 水平均较 PQ 染毒模型组明显下降,以 BMSC-Nrf2 治疗组下降最为显著; GSH、SOD 水平较 PQ 染毒模型组显著上升,以 BMSC-Nrf2 治疗组升高最为显著(均 $P < 0.05$)。

2.4 血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平(表 2):与正常对照组小鼠比较,制模后 3 d PQ 染毒模型组 IL-1 β 和 TNF- α 水平就明显升高,随着时间延长,制模后 7、14、21 d IL-1 β 和 TNF- α 水平逐渐下降,但仍高于正常对照组(均 $P < 0.05$); BMSC 治疗组、

BMSC-Cherry 治疗组、BMSC-Nrf2 治疗组 IL-1 β 及 TNF- α 水平均较 PQ 染毒模型组明显下降,以 BMSCs-Nrf2 治疗组下降最为显著(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

急性 PQ 中毒肺损伤的发病机制尚未阐明,目前主要理论之一即氧自由基损伤^[12-13]。PQ 被肺泡上皮细胞摄入后,使还原型辅酶(NADPH)氧化,产生大量氧自由基,然后启动级联反应,使细胞多不饱和脂肪酸氧化变性,诱导脂质过氧化物产生,最终导致细胞过氧化损伤^[14]。本课题组前期研究发现,体外使用具有抗氧化作用的姜黄素可明显减弱 PQ 诱导的 A549 细胞损害,提示氧化应激是 PQ 损伤的重要机制^[15-16]。SOD 和 GSH 具有清除氧自由基和抗脂质过氧化作用,能减轻组织细胞损害,其含量高低反映了机体清除自由基和抗脂质过氧化的能力。MDA 反映了机体遭受氧化损害的程度^[13, 17],其含量越高,证明机体受自由基攻击后诱导大量脂质过氧化及细胞损伤越严重。PQ 进入肺泡细胞后经过氧化还原反应产生大量氧自由基,使机体处于氧化应激状态,消耗大量 SOD 及产生大量 MDA,诱导脂质过氧化反应等致肺损伤^[18],这与本研究的结果是一致的。高利娜等^[19]证实,5-羟基-1-甲基海因(HMH)能提高机体抗氧化和清除羟自由基的能力,使 MDA 含量明显降低, SOD 活性明显增强, GSH 含量明显升高,改善了 PQ 中毒造成的肾损伤。



A 为正常对照组; B 为 PQ 染毒模型组; C 为 BMSC 治疗组; D 为 BMSCs-Cherry 治疗组; E 为 BMSCs-Nrf2 治疗组

图 2 各组小鼠染毒 3 d 后肺组织细胞凋亡情况(TUNEL 中倍放大)

表 2 各组小鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	IL-1 β (ng/L)				TNF- α (ng/L)			
		制模后 3 d	制模后 7 d	制模后 14 d	制模后 21 d	制模后 3 d	制模后 7 d	制模后 14 d	制模后 21 d
正常对照组	24	33.87 $\pm$ 7.10	34.23 $\pm$ 5.80	35.21 $\pm$ 6.50	34.76 $\pm$ 4.40	112.24 $\pm$ 12.10	118.12 $\pm$ 9.40	120.33 $\pm$ 13.50	125.14 $\pm$ 14.30
PQ 染毒模型组	24	120.97 $\pm$ 9.07 ^a	106.82 $\pm$ 6.34 ^a	94.11 $\pm$ 10.08 ^a	87.23 $\pm$ 9.28 ^a	304.78 $\pm$ 6.90 ^a	288.45 $\pm$ 14.90 ^a	259.55 $\pm$ 10.10 ^a	228.38 $\pm$ 13.30 ^a
BMSC 治疗组	24	108.10 $\pm$ 5.88 ^b	92.33 $\pm$ 8.32 ^b	80.06 $\pm$ 7.55 ^b	63.84 $\pm$ 8.17 ^b	274.62 $\pm$ 8.90 ^b	252.51 $\pm$ 15.40 ^b	233.25 $\pm$ 10.80 ^b	214.25 $\pm$ 6.30 ^b
BMSC-Cherry 治疗组	24	105.07 $\pm$ 8.42 ^b	93.19 $\pm$ 9.08 ^b	78.18 $\pm$ 5.21 ^b	62.33 $\pm$ 7.94 ^b	279.26 $\pm$ 7.90 ^b	253.13 $\pm$ 7.07 ^b	235.29 $\pm$ 13.59 ^b	207.75 $\pm$ 10.00 ^b
BMSC-Nrf2 治疗组	24	94.00 $\pm$ 7.94 ^{bc}	80.47 $\pm$ 6.11 ^{bc}	69.49 $\pm$ 8.79 ^{bc}	55.58 $\pm$ 4.54 ^{bc}	230.63 $\pm$ 11.50 ^{bc}	210.13 $\pm$ 12.50 ^{bc}	201.77 $\pm$ 16.10 ^{bc}	179.25 $\pm$ 9.40 ^{bc}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与 PQ 染毒模型组比较,^b $P < 0.05$;与 BMSC 治疗组比较,^c $P < 0.05$

除了氧化损伤外,急性 PQ 中毒肺损伤的另一个重要因素是大量炎性物质的释放。PQ 引起的氧化损伤导致了肺泡上皮细胞和血管内皮细胞受损,有利于炎性细胞及炎性因子的渗出^[20-21]。在 PQ 中毒形成的肺损伤模型中,肺组织、支气管肺泡灌洗液(BLAF)、血清 TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子均明显升高,说明炎性因子失控性释放加速了组织器官的损伤^[3]。TNF- α 和 IL-1 β 含量反映了机体内早期炎症水平,主要由激活的肺泡巨噬细胞产生,一方面促进炎性细胞的浸润,另一方面促进其他炎性介质或细胞因子的表达和分泌,加重肺组织损伤^[13, 22]。抑制肺组织中核转录因子- κ B(NF- κ B)、TNF- α 等表达,可以有效地改善肺组织炎症病理改变^[23]。用地塞米松和姜黄素等具有抗炎的药物干预后,均可减轻 PQ 所致的大鼠肺损伤,减少纤维母细胞迁移、活化,抑制胶原蛋白产生,保护肺组织结构,可以更有效地抑制肺纤维化、肺实变^[24-25]。本研究观察到,在小鼠 PQ 染毒后的 3 d 内血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平均显著升高,而且在小鼠染毒后 7 d 仍保持较高水平,说明炎症反应的持续加重。

转录因子 Nrf2 是细胞内重要的抗氧化分子,通过激活并与抗氧化反应元件结合,转录表达抗氧化酶及 II 相解毒酶^[26],增强细胞对外界有害环境的抵御能力,被认为是抗氧化治疗的重要靶分子。本课题组前期的研究结果也证实,在敲除 Nrf2 基因情况下,PQ 致人肾小管上皮细胞(HK-2)损伤的程度明显增加^[27]。研究发现通过激活 Nrf2-ARE 信号通路能显著降低 PQ 诱导的肺损伤^[28]。本研究中,在肺泡中过表达 Nrf2 可以减弱急性 PQ 中毒引起的肺泡上皮细胞的氧化应激、炎症反应及细胞凋亡,说明了 Nrf2 对 PQ 肺损伤具有保护作用。

细胞凋亡与细胞内活性氧(ROS)密切相关,正常情况下细胞内 ROS 维持在稳定的范围内,当细胞内 ROS 超出了细胞清除的临界值时就会引起细胞凋亡^[29]。研究发现,ROS 抑制剂能明显降低细胞凋亡^[30]。Nrf2 是细胞清除 ROS、维持胞内氧化状态平衡的重要因素,上调 Nrf2 表达,降低了细胞内 ROS 水平,减少了细胞的凋亡^[31-32]。本研究也证实,携带 Nrf2 基因的 BMSCs 治疗组细胞凋亡率较 PQ 染毒模型组明显降低。

随着近年来 BMSCs 研究的不断进展,已有研究证实,BMSCs 可被募集到肺损伤部位,分化并修复肺泡上皮细胞,增加表面活性物质分泌,减轻炎症反应,具有治疗 ALI 的巨大潜力^[16, 33]。研究表明,

BMSCs 的植入使 PQ 中毒大鼠肺损伤明显下降,大鼠存活率显著增高^[9, 29]。本研究结果显示,将携带 Nrf2 基因的 BMSCs 通过静脉注射植入后,小鼠肺组织中的 Nrf2 蛋白表达量显著增高,验证了 BMSCs 具有“归巢”的特性,大大减弱了 PQ 中毒诱导的氧化应激和炎症反应,并且 BMSC-Nrf2 治疗组的保护作用明显优于 BMSC 治疗组。但尚无直接研究结果表明二者在保护肺损伤方面存在协同作用。因为 Nrf2 和 BMSCs 作用机制不同,所以本实验中的联合优化效果仍然可能是二者单独作用的结果,因此,尚有待进一步验证和分析。

综上所述,BMSCs 及携带有抗氧化基因 Nrf2 的 BMSCs 能有效减轻 PQ 所致肺损伤,并且携带有抗氧化基因 Nrf2 的 BMSCs 比 BMSCs 作用更显著,其保护作用可能与体内抗氧化应激、抗炎因子等有关。

参考文献

- [1] 余海放,何庆. 百草枯中毒与全身炎症反应及 NF- κ B 的关系[J]. 华西医学,2008,(23)1: 179-180.
- [2] 卢中秋,贺晓艳. 百草枯急性中毒的诊治进展[J]. 中国全科医学,2009,12(20): 1878-1881.
- [3] Whitehead GS, Grasman KA, Kimmel EC. Lung function and airway inflammation in rats following exposure to combustion products of carbon-graphite/epoxy composite material: comparison to a rodent model of acute lung injury [J]. Toxicology, 2003, 183, (1-3): 175-197.
- [4] Giudice A, Montella M. Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention [J]. Bioessays, 2006, 28(2): 169-181.
- [5] Kikuchi N, Ishii Y, Morishima Y, et al. Nrf2 protects against pulmonary fibrosis by regulating the lung oxidant level and Th1/Th2 balance [J]. Respir Res, 2010, 11: 31.
- [6] Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, et al. Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury [J]. FASEB J, 2007, 21(9): 2237-2246.
- [7] Camassola M, de Macedo Braga LM, Chagastelles PC, et al. Methodology, biology and clinical applications of human mesenchymal stem cells [J]. Methods Mol Biol, 2012, 879: 491-504.
- [8] Meirelles Lda S, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells [J]. Front Biosci, 2009, 14: 4281-4298.
- [9] 黄杨,尹文,刘健,等. 骨髓间充质干细胞对急性百草枯中毒肺损伤的保护作用[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(5): 751-754.
- [10] Bustos ML, Huleihel L, Meyer EM, et al. Activation of human mesenchymal stem cells impacts their therapeutic abilities in lung injury by increasing interleukin (IL)-10 and IL-1RN levels [J]. Stem Cells Transl Med., 2013, 2(11): 884-895.
- [11] Luan Y, Ding W, Ju ZY, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against lung injury in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(3): 1945-1950.
- [12] 邱俏檬,刘瑶,宋芹,等. 血液灌流对急性百草枯中毒兔氧化应激和基质金属蛋白酶及其抑制物的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2012, 30(2): 89-96.
- [13] 张拥军,高红梅,侯云生. 百草枯及其所致氧化应激的研究进

- 展[J]. 临床误诊误治, 2014, 27(2): 112-115.
- [14] 阮艳君, 菅向东, 郭广冉. 急性百草枯中毒发病机制及治疗的研究进展[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2009, 27(2): 114-116.
- [15] 韩文文, 吴冬, 刘虹, 等. 姜黄素对急性百草枯中毒大鼠肝脏氧化损伤的干预[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2014, 32(5): 352-356.
- [16] 韩文文, 支绍册, 赵倩, 等. 姜黄素对急性百草枯中毒大鼠肝损伤中炎症反应的影响和机制[J]. 中国急救医学, 2015, 35(1): 62-67.
- [17] Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Sánchez-Navarro A, et al. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment [J]. Crit Rev Toxicol, 2008, 38(1): 13-71.
- [18] 刘刚, 宋冬梅, 江宇, 等. 血红素氧合酶-1 在急性百草枯中毒小鼠肺组织中的表达及意义[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(4): 280-284.
- [19] 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.
- [20] Chen M, Luo C, Penalva R, et al. Paraquat-induced retinal degeneration is exaggerated in CX3CR1-deficient mice and is associated with increased retinal inflammation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(1): 682-690.
- [21] 余海放, 裴虎. 百草枯中毒后 NF- κ B 及其下游产物变化的研究[J]. 四川大学学报, 2010, 41(2): 276-279.
- [22] 贺晓艳, 赵光举, 卢中秋, 等. 急性百草枯中毒大鼠氧化应激水平及二巯丙磺钠的作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2009, 27(8): 476-479.
- [23] 曹玉芳, 李景辉, 欧宗兴, 等. 二烯丙基硫化物可下调百草枯中毒大鼠肺组织核转录因子- κ B 蛋白及肿瘤坏死因子- α mRNA 表达[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(4): 274-279.
- [24] 王英, 邱泽武, 彭瑞云, 等. 血必净注射液联合地塞米松防治大鼠百草枯中毒慢性肺损伤的作用研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(5): 282-285.
- [25] 于森森, 吴伟. 姜黄素与地塞米松对百草枯中毒大鼠肺组织损伤治疗作用的对比研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(5): 299-301.
- [26] Giudice A, Arra C, Turco MC. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents [J]. Methods Mol Biol, 2010, 647: 37-74.
- [27] 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(18): 2845-2855.
- [28] 卢晗, 常子娟, 韩文文, 等. 姜黄素活化 Nrf2-ARE 通路对百草枯诱导 II 型肺泡细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2014, 32(1): 44-49.
- [29] 张雁敏, 邱泽武, 刘广贤. 骨髓间充质干细胞治疗大鼠百草枯中毒急性肺损伤的作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2011, 20(1): 39-43.
- [30] 余兴蓉, 洪广亮, 谭佳平, 等. 乌司他丁对百草枯诱导 HK-2 细胞损伤的保护作用及机制[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2015, 33(7): 501-506.
- [31] 周立田, 王汉东, 金伟, 等. Nrf2 在脑外伤后细胞钙离子稳态及凋亡中的作用[J]. 医学研究生学报, 2010, 23(5): 470-473.
- [32] Gao F, Fish BL, Szabo A, et al. Short-term treatment with a SOD/catalase mimetic, EUK-207, mitigates pneumonitis and fibrosis after single-dose total-body or whole-thoracic irradiation [J]. Radiat Res, 2012, 178(5): 468-480.
- [33] Yang H, Wen Y, Bin J, et al. Protection of bone marrow mesenchymal stem cells from acute lung injury induced by paraquat poisoning [J]. Clin Toxicol, 2011, 49(4): 298-302.

(收稿日期: 2015-10-29)

(本文编辑: 邱美仙 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 κ 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、《中国中西医结合急救杂志》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。

- 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。
- 征文要求:** 论文请按照《中华危重病急救医学》杂志、《中国中西医结合急救杂志》稿约的要求撰写,从《中华危重病急救医学》杂志、《中国中西医结合急救杂志》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)。
- 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 20000 元; ② 二等奖 3 名,奖励科研经费 10000 元; ③ 三等奖 20 名,奖励科研经费 5000 元; ④ 优秀论文奖 200 名,奖励全年《中华危重病急救医学》杂志、《中国中西医结合急救杂志》。
- 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、《中国中西医结合急救杂志》编辑部,审核合格后刊出。
- 诺扬咨询电话及联系地址:** 电话: 0518-81221706,联系人: 关洪月。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: luckygui@163.com。