doi:10.11659/jjssx.01E021063

·基础研究·

阿托伐他汀联合环孢素A对百草枯中毒大鼠肺纤维化的缓解作用

时 洁[1],刘 伟[2],周 莲[2],刘卫红[2],耿晓康[3] (1.恩施土家族苗族自治州中心医院西医部药剂科,湖北 恩施 445000;2.华润武钢总医院放射科,湖北 武汉 430080;3.恩施州中心医院妇儿医院药剂科,湖北 恩施 445000)

[摘 要] **目的** 探索阿托伐他汀联合环孢素A对百草枯中毒大鼠肺纤维化的疗效。**方法** Wistar大鼠50只随机分为5组,每组10只。对照(Control)组给予生理盐水1 mL灌胃,其余4组单次给予单剂量百草枯20 mg/kg灌胃以染毒。然后,模型(PQ)组以生理盐水1 mL灌胃;阿托伐他汀(PQ+STN)组、环孢素A(PQ+CsA)组以及联合用药(PQ+STN+CsA)组分别以阿托伐他汀20 mg/kg、环孢素A 10 mg/kg以及阿托伐他汀20 mg/kg+环孢素A 10 mg/kg灌胃,每天1次,共7 d。HE和Masson's染色观察肺组织病理学变化;测定肺湿重/干重比、羟脯氨酸含量;酶联免疫吸附实验(ELISA)检测肺组织TNF-α、IL-1β、IL-6含量;Western blot检测TGF-β、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、MMP-2、MMP-9、E-cadherin、Vimentin和α-SMA的蛋白表达;试剂盒检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)等指标。**结果** HE染色结果显示,与Control组比较,PQ组肺泡壁变厚、免疫细胞聚集、肺泡破裂;Masson's染色显示肺组织明显纤维化。与PQ组比较,PQ+STN组和PQ+CsA组均一定程度减轻肺损伤和纤维化,PQ+STN+CsA组对肺损伤和纤维化的改善最明显。与Control组比较,PQ组肺湿重/干重比升高($P<0.05$),肺羟脯氨酸含量增加($P<0.01$),TNF-α、IL-1β和IL-6升高($P<0.01$),MDA增加($P<0.01$),SOD和GSH降低($P<0.01$),纤维化标志蛋白TGF-β、Collagen Ⅰ和Collagen Ⅲ升高($P<0.01$),MMP-2、MMP-9、Vimentin和α-SMA升高($P<0.01$),E-cadherin降低($P<0.01$)。与PQ组比较,PQ+STN组、PQ+CsA组和PQ+STN+CsA组肺湿重/干重比、肺羟脯氨酸含量、TNF-α、IL-1β、IL-6、MDA、TGF-β、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、MMP-2、MMP-9、Vimentin和α-SMA降低($P<0.05$),SOD、GSH和E-cadherin升高($P<0.05$)。**结论** 阿托伐他汀联合环孢素A能更有效减轻百草枯中毒导致的肺纤维化,控制氧化应激和炎症,其机制可能与其对细胞移动能力相关蛋白的调控有关。

[关键词] 阿托伐他汀;百草枯;肺纤维化;环孢素A;基质金属蛋白酶;细胞移动

[中图分类号] R563.4;S884.9+6 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-01-15

Alleviating effect of atorvastatin combined with cyclosporine A on pulmonary fibrosis in paraquat poisoned rats

SHI Jie[1], LIU Wei[2], ZHOU Lian[2], LIU Wei-hong[2], GENG Xiao-kang[3] (1. Department of Pharmacy, Ministry of Western Medicine, Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi Hubei 445000, China; 2. Department of Radiology, China Resources WISCO General Hospital, Wuhan Hubei 430080, China; 3. Department of Pharmacy, Women and Children's Hospital of Enshi Central Hospital, Enshi Hubei 445000, China)

Abstract: Objective To investigate the curative effect of atorvastatin combined with cyclosporine A on pulmonary fibrosis in paraquat poisoned rats. **Methods** A total of 50 Wistar rats were randomly divided into 5 groups, with 10 rats in each group. The Control group was intragastrically administered with 1 mL of normal saline, and the other 4 groups were intragastrically administered with a single dose of paraquat 20 mg/kg for poisoning. Then, the model (PQ) group was intragastrically administered with 1 mL of normal saline. The atorvastatin (PQ+STN) group, the cyclosporine A (PQ+CsA) group and the combined medication (PQ+STN+CsA) group were respectively intragastrically administered with atorvastatin 20 mg/kg, cyclosporine A 10 mg/kg and atorvastatin 20 mg/kg+cyclosporine A 10 mg/kg, once a day for a total of 7 days. HE and Masson's staining were used to observe the pathological changes of lung tissues. The wet weight/dry weight ratio of lung and hydroxyproline content were measured. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the contents of TNF-α, IL-1β and IL-6 of lung tissues. Western blot was used to detect the protein expressions of TGF-β, Collagen Ⅰ, Collagen Ⅲ, MMP-2, MMP-9, E-cadherin, Vimentin and α-SMA. The kit was used to detect the indicators of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH). **Results** The results of HE staining showed that compared with the Control group, the alveolar wall of the PQ group became thicker, with the accumulation of immune cells and alveolar rupture. Masson's staining showed obvious fibrosis of lung tissues. Compared with the PQ group, the PQ+STN group and the PQ+CsA group both alleviated the lung injury and fibrosis to a certain extent, and the PQ+STN+CsA group showed the most obvious improvement on the lung injury and fibrosis. Compared with the Control group, the wet weight/dry weight ratio of lung in the PQ group was increased ($P<0.05$), the lung hydroxyproline content was increased ($P<0.01$), the TNF-α, IL-1β and IL-6 were increased ($P<0.01$), the MDA was increased ($P<0.01$), the SOD and GSH were decreased

[基金项目] 武汉市卫计委2019年科研项目(S201912040082)

[通信作者] 耿晓康,E-mail:531357940@qq.com

($P<0.01$), the fibrotic marker proteins TGF-β, Collagen Ⅰ and Collagen Ⅲ were increased ($P<0.01$), the MMP-2, MMP-9, Vimentin and α-SMA were increased ($P<0.01$), and the E-cadherin was decreased ($P<0.01$). Compared with the PQ group, the wet weight/dry weight ratio of lung, the lung hydroxyproline content, TNF-α, IL-1β, IL-6, MDA, TGF-β, Collagen Ⅰ, Collagen Ⅲ, MMP-2, MMP-9, Vimentin and α-SMA in the PQ + STN group, the PQ + CsA group and the PQ + STN + CsA group were decreased ($P<0.05$), while the SOD, GSH and E-cadherin were increased ($P<0.05$). **Conclusion** Atorvastatin combined with cyclosporine A can effectively reduce pulmonary fibrosis caused by paraquat poisoning, and control the oxidative stress and inflammation. The mechanism may be related to the regulation of proteins related to cell mobility.

Keywords: atorvastatin; paraquat; pulmonary fibrosis; cyclosporine A; matrix metalloproteinase; cell mobility

百草枯(1,1'-二甲基-4,4'-联吡啶二氯化物)是一种非选择性接触性除草剂,对人类有剧毒,中毒后死亡率极高。肺是百草枯中毒的主要靶器官,肺损伤引起的呼吸衰竭是最常见的死亡原因[1]。患者往往同时出现肺泡破裂导致的肺气肿和纤维化导致的肺不张,而使用呼吸机会加重病情[2]。

细胞外基质的组成和力学性质在肺纤维化的发展过程中发生了显著改变,可诱导肺纤维化和肺不张[3]。肺纤维化和肺不张可能是百草枯中毒后机体维持肺泡结构完整的机制之一。当前并没有针对百草枯中毒的特效药,只能做一些血液净化和对症治疗[4]。主流的抗炎和抗氧化药物对百草枯中毒疗效有限[5],因此,寻找百草枯中毒的新机制是其治疗的突破口。有研究认为,百草枯中毒会导致肺泡细胞的上皮—间质转化样细胞反应,以避免细胞死亡[6]。此外,百草枯中毒还可导致紧密连接的关键蛋白ZO-1等丢失[7]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是一类主要的细胞外基质降解酶,百草枯中毒后,MMP也被诱导表达[8]。肺泡细胞的上皮—间质转化的激活、ZO-1等丢失和MMP的诱导可能与炎症相互促进[9],共同导致了肺泡结构的不稳定性。抑制这种细胞外基质不稳定性的改变,抑制炎症,打破相互促进的循环,可能有利于百草枯中毒的治疗。阿托伐他汀具有抑制MMP活性,改善百草枯所致肺损伤的作用[8]。免疫抑制剂环孢素A通过调节炎症反应和MMP,可减轻移植中的气道重塑和纤维化[9],也能抑制百草枯导致的肺纤维化[10]。本研究通过探索阿托伐他汀联合环孢素A对百草枯中毒大鼠细胞外基质改变和炎症及肺纤维化的疗效,以期为临床治疗百草枯中毒提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

20%百草枯溶液(批号:SNA8F03206)购自江苏南通的先正达南通农作物保护有限公司;阿托伐他汀(批号:H20133127,乐普医药);环孢素A(批号:H10960122,中美华东制药);羟脯氨酸含量检测试剂盒(批号:AKAM017C,北京盒子生工);Masson's染色试剂盒(批号:1.00485,Sigma,美国);苏木精/伊红(HE,批号:C0105S)、TNF-α(批号:PT516)、IL-1β(批号:PI303)、IL-6(批号:PI328)、酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒、SOD(批号:S0086)、MDA(批号:S0131S)、GSH试剂盒(批号:S0073)、RIPA裂解液(批号:P0013C)、BCA蛋白定量试剂盒(批号:P0012)均购自上海碧云天;TGF-β(批号:3709)、Collagen Ⅰ(批号:91144)、E-cadherin(批号:14472)、Vimentin(批号:5741)、α-SMA(批号:19245)、β-actin(批号:4970)和山羊抗兔(批号:7074)均购自美国CST;MMP-9(批号:ab228402)、MMP-2(批号:ab92536)、Collagen Ⅲ(批号:ab6310)购自英国Abcam公司。

1.2 动物实验

Wistar大鼠50只,体质量180~220 g,6周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。每笼3只喂养于SPF动物房,环境条件:22 ℃,光照12 h/黑暗12 h,常规饮食,自由摄食和饮水,实验前习惯1周。随机分为对照(Control)组、模型(PQ)组、阿托伐他汀(PQ + STN)组、环孢素A(PQ + CsA)组、联合用药(PQ + STN + CsA)组,每组10只。Control组给予生理盐水1 mL灌胃,其余4组单次给予单剂量百草枯20 mg/kg灌胃以染毒。然后,PQ组以生理盐水1 mL灌胃,PQ + STN组、PQ + CsA组以及PQ + STN + CsA组分别以阿托伐他汀20 mg/kg[11]、环孢素A 10 mg/kg[12]以及阿托伐他汀20 mg/kg + 环孢素A 10 mg/kg灌胃,每天1次。给药7 d后,腹膜内注射3%戊巴比妥钠600 μL,麻醉后立即处死。收集心内血液约4 mL,以5 000 r/min离心5 min后将血清储存于-70 ℃。将每只大鼠的左肺放在冷冻的移液管中,于-70 ℃下保存,用以检测组织蛋白表达。

1.3 肺湿重/干重比、羟脯氨酸含量测定及组织染色

滤纸充分吸干右上肺水分,测量湿重,充分干燥后测量干重,计算湿重/干重比。右后肺叶剪去部分组织调整重量至大致相等,剪碎,加6 mol/L盐酸(1 g组

织:100 mL 盐酸),120 ℃孵育 12 h,滤掉杂质。取 1 mL滤液,氢氧化钠调整 pH 值于 6.5 ~ 7.0,加 1 mL 氯胺酮溶液(50 mmol/L)室温孵育 20 min,1 mL 二甲基苯甲醛溶液(200 mL/L)60 ℃孵育 20 min,采用多功能酶标仪(型号 Varioskan LUX,赛默飞,上海)测量 550 nm处吸光度值,以标准品浓度与吸光度值的标准曲线计算样品羟脯氨酸含量。

将大鼠右副肺叶浸入 10% 的多聚甲醛缓冲液中固定后包埋在石蜡中。随后将肺叶分离并矢状切成 5 μm厚的切片,进行 HE 和 Masson's 染色。通过光学显微镜检查切片,并评估肺组织损伤和纤维化。染色的每个样本至少观察来自不同部位的 6 片。

1.4 ELISA 检测肺组织 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 含量

肺组织在液氮研磨,加少许生理盐水获得匀浆,10 000 r/min离心 15 min,取上清,用 BCA 试剂盒测量蛋白浓度并配平。使用 ELISA 试剂盒按说明书测定肺组织中的 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 含量。

1.5 Western blot 检测 TGF-β、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、MMP-2、MMP-9、E-cadherin、Vimentin 和 α-SMA等细胞移动能力相关蛋白的表达

肺组织加入 RIPA 裂解液在冰上研磨,10 000 r/min 离心 15 min,取上清。BCA 试剂盒测量蛋白浓度并配平,加入上样缓冲液,100 ℃加热 10 min。在 10% SDS-PAGE 胶上按一般要求电泳后,转移至甲醇浸没过的 PVDF 膜。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭 1 h,一抗孵育过夜,二抗孵育 1 h,前后均用 TBST 清洗 3 次。膜上滴加 ECL 显色液,在高灵敏发光成像仪中拍照。条带用 Image J 半定量。

1.6 肺组织 SOD、MDA 和还原型 GSH 测定

取 1.5 所得平衡后的溶液,根据说明书测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)和谷胱甘肽(glutathione,GSH)的含量。

1.7 统计学方法

定量和半定量数据用 GraphPad Prism 6.0 软件统计并作图。数据均采取双侧单因素方差分析(*ANOVA*)和 *Tukey's* 多重比较分析差异,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状况

PQ 组大鼠百草枯染毒后次日开始出现嗜睡,进食饮水减少,呼吸急促,口周、鼠尾及脚趾发绀,呼吸困难等症状;其他组大鼠在百草枯染毒 3 d 后开始出现以上症状,但相对较轻。未发现死亡及其他不适。

2.2 肺组织损伤和纤维化

HE 染色结果显示,与 Control 组比较,PQ 组肺泡壁变厚、免疫细胞聚集、肺泡破裂;Masson's 染色显示肺组织明显纤维化。与 PQ 组比较,PQ + STN 组、PQ + CsA 组和 PQ + STN + CsA 组均可一定程度抑制百草枯导致的肺泡壁变厚、炎性细胞浸润和肺泡破裂等肺损伤的表现(图 1a),减轻肺纤维化(图 1b),其中 PQ + STN + CsA 组与 PQ 组的差异最显著。与 Control 组比较,PQ 组肺湿重/干重比升高($P<0.05$)、肺羟脯氨酸含量增加($P<0.01$)。与 PQ 组比较,PQ + STN 组、PQ + CsA 组和 PQ + STN + CsA 组大鼠肺湿重/干重比及肺羟脯氨酸含量均降低($P<0.05$),见图 1c、d。说明阿托伐他汀和环孢素 A 能减轻百草枯染毒大鼠的肺纤维化,且两药共用效果更佳。

2.3 肺部炎症因子

与 Control 组比较,PQ 组 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 升高($P<0.01$)。与 PQ 组比较,PQ + STN 组、PQ + CsA 组和 PQ + STN + CsA 组均能降低百草枯诱导的 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 表达,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。说明阿托伐他汀和环孢素 A 均能减轻百草枯诱导的肺部炎症。

2.4 肺氧化应激反应

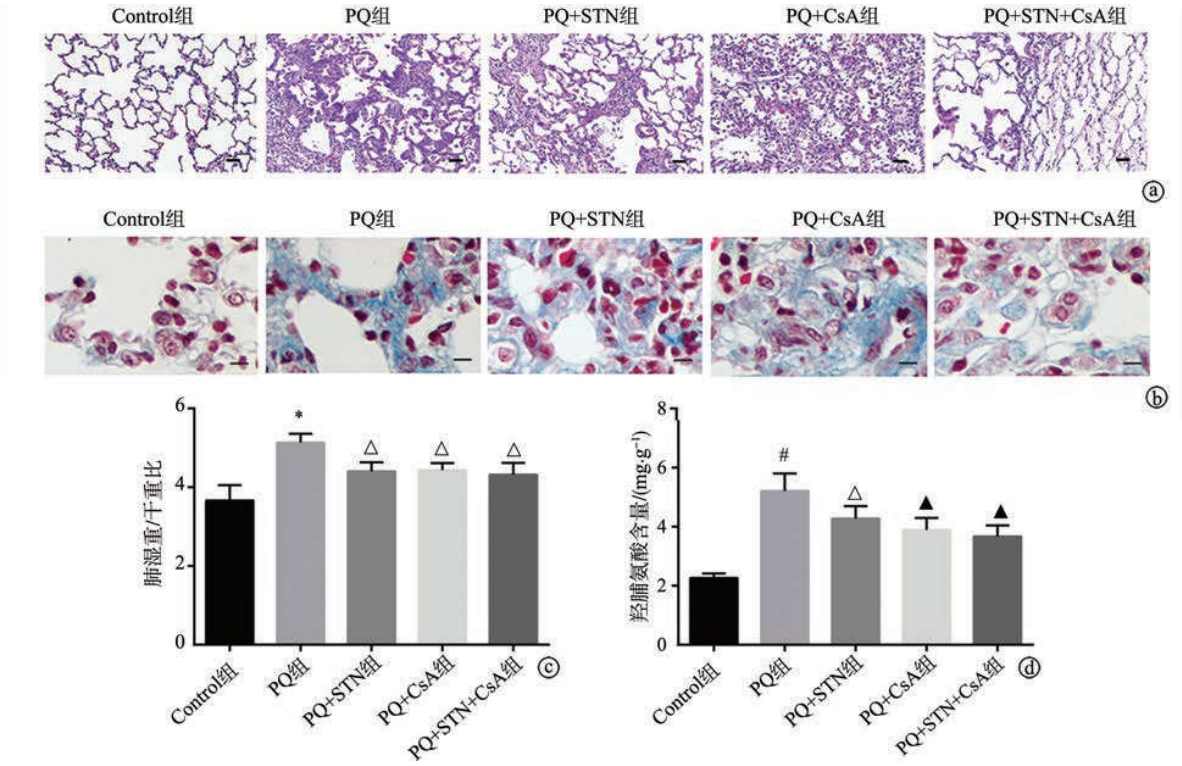
与 Control 组比较,PQ 组 MDA 增加($P<0.01$),SOD 和 GSH 降低($P<0.01$)。与 PQ 组比较,PQ + STN 组、PQ + CsA 组和 PQ + STN + CsA 组均能增加百草枯诱导的 SOD 和 GSH,降低 MDA,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3。说明阿托伐他汀和环孢素 A 均能减轻百草枯诱导的氧化应激反应。

2.5 肺纤维化标志物

与 Control 组比较,PQ 组 TGF-β、Collagen Ⅰ 和 Collagen Ⅲ升高($P<0.01$)。与 PQ 组比较,PQ + STN 组、PQ + CsA 组和 PQ + STN + CsA 组均能降低百草枯诱导的 TGF-β、Collagen Ⅰ 和 Collagen Ⅲ表达,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。表明阿托伐他汀和环孢素 A 可抑制百草枯诱导的肺纤维化。

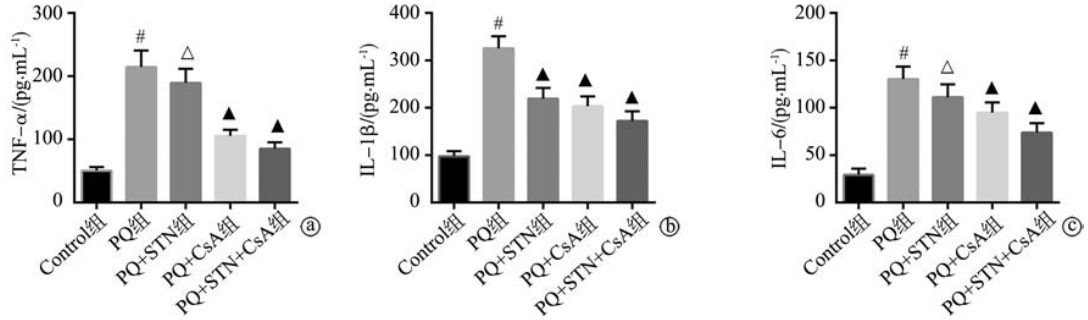
2.6 肺细胞移动性标志蛋白表达

与 Control 组比较,PQ 组 MMP-2、MMP-9、Vimentin 和 α-SMA 升高($P<0.01$),E-cadherin 降低($P<0.01$)。与 PQ 组比较,PQ + STN 组、PQ + CsA 组和 PQ + STN + CsA 组 MMP-2 和 MMP-9 表达明显降低($P<0.05$),见图 5a ~ c。与 PQ 组比较,PQ + STN 组、PQ + CsA 组和 PQ + STN + CsA 组不同程度抑制 Vimentin 和 α-SMA 表达,激活 E-cadherin 表达,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 5a、d ~ f。表明联合用药能有效抑制细胞移动性标志蛋白的高表达。



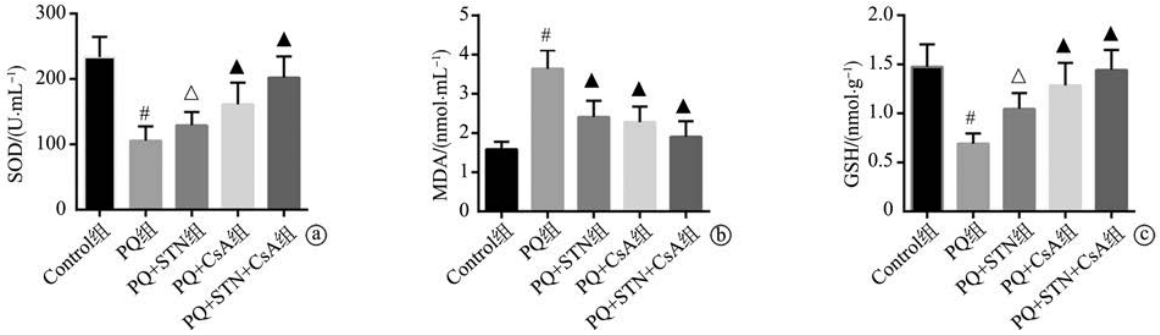
a:肺组织 HE 染色(×40);b:肺组织 Masson's 染色(×400);c:右上肺湿重/干重比;d:右后肺叶羟脯氨酸含量　*:与 Control 组比较,$P<0.05$,#:与 Control 组比较,$P<0.01$;△:与 PQ 组比较,$P<0.05$;▲:与 PQ 组比较,$P<0.01$

图 1　肺组织损伤和纤维化



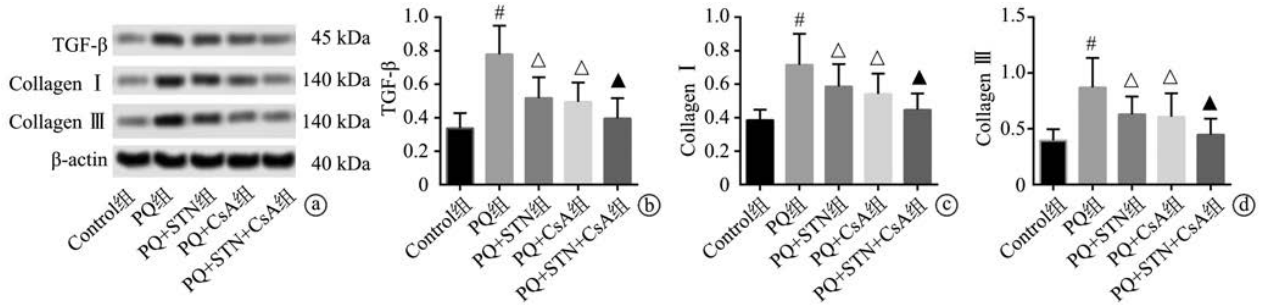
a:肺组织 TNF-α 表达量;b:肺组织 IL-1β 表达量;c:肺组织 IL-6 表达量　#:与 Control 组比较,$P<0.01$;△:与 PQ 组比较,$P<0.05$;▲:与 PQ 组比较,$P<0.01$

图 2　肺部炎症因子



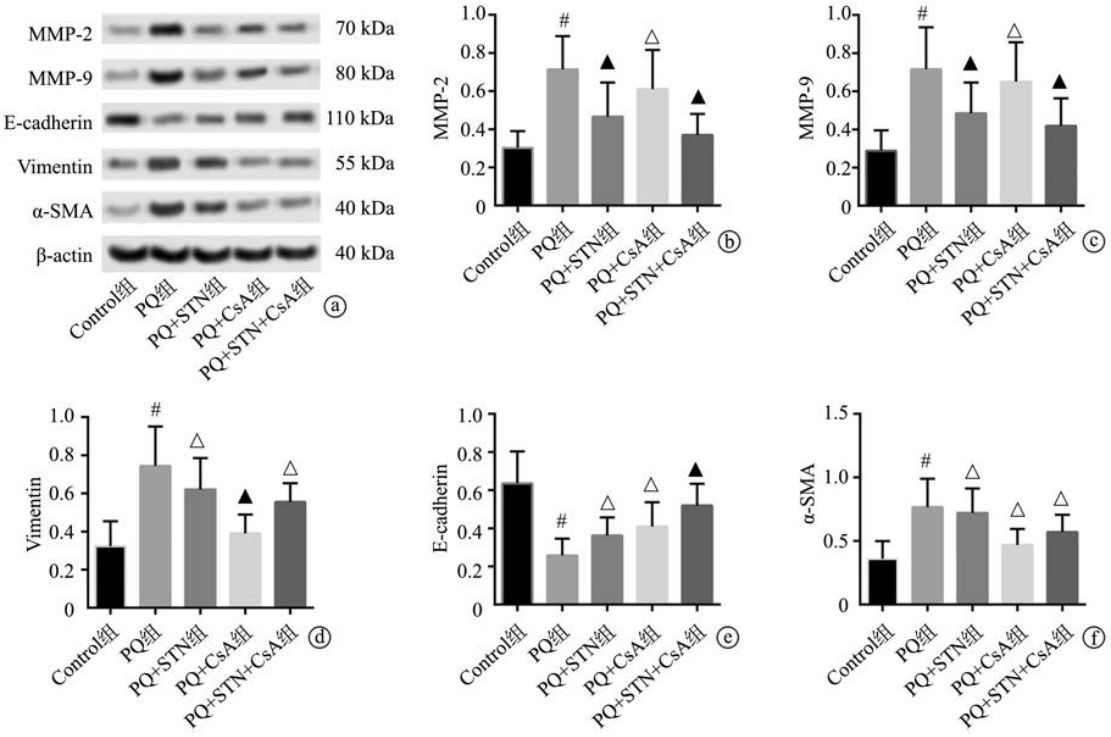
a:肺组织 SOD 含量;b:肺组织 MDA 含量;c:肺组织 GSH 含量　#:与 Control 组比较,$P<0.01$;△:与 PQ 组比较,$P<0.05$;▲:与 PQ 组比较,$P<0.01$

图 3　肺氧化应激反应



a:Western blot 检测 3 种蛋白的表达;b:TGF-β 相对表达量;c:Collagen Ⅰ相对表达量;d:Collagen Ⅲ相对表达量 #:与 Control 组比较,$P<0.01$;△:与 PQ 组比较,$P<0.05$;▲:与 PQ 组比较,$P<0.01$

图 4 肺纤维化标志物



a:细胞移动性相关蛋白的表达;b:MMP-2 相对表达量;c:MMP-9 相对表达量;d:Vimentin 相对表达量;e:E-cadherin 相对表达量;f:α-SMA相对表达量 #:与 Control 组比较,$P<0.01$;△:与 PQ 组比较,$P<0.05$;▲:与 PQ 组比较,$P<0.01$

图 5 肺细胞移动性标志蛋白表达

3 讨论

肺纤维化导致肺不张和呼吸衰竭是百草枯中毒患者最致命的病理状况[13],而当前尚无有效应对措施,病情稍重患者病死率接近 100%[2]。在以往的研究中,阿托伐他汀和环孢素 A 等药物均表现出对百草枯中毒患者肺纤维化的防治作用[11-12]。阿托伐他汀与环孢素 A 均可不同程度减轻百草枯诱导的肺组织损伤和纤维化,减轻氧化应激反应,降低纤维化与细胞移动性标志蛋白的表达,且阿托伐他汀联合环孢素 A 具有更好的疗效。本研究联用阿托伐他汀与环孢素 A,尝试抑制细胞外基质不稳定性的改变及炎症,以打破炎症与细胞外基质不稳定性的相互促进,治疗百草枯中毒大鼠。

当前认为百草枯的毒理机制主要是诱导线粒体产生大量活性氧物质(reactive oxygen specie,ROS),诱导细胞凋亡[4,14]。百草枯与肺泡细胞吸收的天然多胺具有结构相似性,因此百草枯会浓缩在Ⅰ型和Ⅱ型肺泡细胞中,导致肺中百草枯的浓度比血浆中高 10 ~ 20 倍,引起氧化还原循环并产生大量的活性氧[3]。一些能够降低 ROS 的疗法往往也能延缓病程。如在大鼠中,阿司匹林可以改善线粒体动力学,减少 ROS 生

成,进而降低百草枯的毒性[15]。而在临床上,自由基清除药物依达拉奉虽然能有效延缓病程,但是并不能改变疾病转归[3],可见单纯的抗氧化难以发挥足够的疗效。本研究发现,阿托伐他汀和环孢素 A 均能降低 MDA,升高 SOD 和 GSH,提示其能一定程度抑制 ROS 产生,且二者共同作用后效果更明显。考虑到阿托伐他汀和环孢素 A 并不具有直接的抗氧化能力,其抑制 ROS 的效果可能是通过对病程的抑制间接产生的。

ROS 导致炎症反应并与其相互促进,进而加重病情[4]。百草枯能激活炎性免疫细胞,分泌炎症因子,促进炎症反应,增加细胞外基质的不稳定性。因此免疫缺陷的大鼠百草枯中毒的症状相对较轻[16]。对于百草枯中毒所致炎症,免疫抑制可能是较好抗炎的选择[17]。环孢素 A 是一种较为常用的免疫抑制剂,以往研究显示其能抑制百草枯中毒导致的炎症反应[10]。本研究结果也表明环孢素 A 可以抑制百草枯导致的炎症反应,同时阿托伐他汀也能一定程度抑制百草枯诱导的炎症因子 TNF-α、IL-1 β和 IL-6 表达,二者共用效果更明显。

百草枯中毒后,会诱导上皮—间质转化样细胞反应,从而阻止肺上皮细胞凋亡[6],此外,百草枯中毒还会导致紧密连接破坏[7],MMP 表达增加[8]。分析其原因可能是细胞移动性增加,导致肺泡结构不稳定而致。肺纤维化可能是这种细胞外基质改变造成的肺泡破裂倾向的某种负反馈调节机制导致。一方面,TGF-β 常镶嵌于细胞外基质,在细胞外基质受损时释放,激活炎症,是诱导肺纤维化的重要调节蛋白[5];Collagen Ⅰ和 Collagen Ⅲ往往存在于皮肤等组织中,在肺组织中较少。纤维化发生时,肺部 Collagen Ⅰ和 Collagen Ⅲ会异常沉积[18],TGF-β、Collagen Ⅰ和 Collagen Ⅲ在肺中的表达提示肺细胞外基质改变。百草枯升高了 TGF-β、Collagen Ⅰ和 Collagen Ⅲ的表达,而阿托伐他汀联合环孢素 A 能有效降低其表达。另一方面,MMP-2 和 MMP-9 是调控细胞外基质降解以及细胞移动性的关键酶,二者可被多种百草枯中毒的解救药物抑制[8]。本研究发现阿托伐他汀可抑制 MMP-2 和 MMP-9,使细胞外基质更为稳定,能降低肺泡破裂的可能性,减弱纤维化相关病理进程;炎症的过度激活本身也会导致 MMP 激活及细胞外基质降解,导致肺纤维化,这可能是脂多糖之类的致炎因子诱导肺纤维化的机制[19]。抑制 MMP 也能减少炎症的过度激活,进而延缓病情。上述研究与本研究共同表明,抑制肺泡破裂倾向进而抑制纤维化,可能是阿托伐他汀联合环孢素 A 发挥药效的关键机制。

综上,阿托伐他汀联合环孢素 A 可从多角度降低百草枯中毒所致肺纤维化程度,其作用机制包括抑制炎症、氧化应激和降低细胞移动性。本研究的不足之处在于,环孢素 A 是典型的肝药酶抑制剂,会延长阿托伐他汀体内清除的周期[20],因此,阿托伐他汀的剂量难于把握,本研究仅仅给出一个免疫抑制剂和他汀类联用可能更有利于治疗肺纤维化的提示,具体何种药物组合以及剂量效果更佳更安全,有待大量研究进一步证实。

[参考文献]

[1] 赵 义,田质光,许 铁,等. 急性百草枯中毒肺损伤 CT 表现及其转归情况[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2020,38(2):140 - 144. doi:10.3760/cma.j.issn.1001 - 9391.2020.02.014.

[2] Khazraei S, Marashi SM, Sanaei-Zadeh H. Ventilator settings and outcome of respiratory failure in paraquat-induced pulmonary injury[J]. Sci Rep,2019,9(1):16541. doi:10.1038/s41598 - 019 - 52939 - 3.

[3] Thenappan T, Chan SY, Weir EK. Role of extracellular matrix in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2018,315(5):H1322 - H1331. doi:10.1152/ajpheart.00136.2018.

[4] Sukumar CA, Shanbhag V, Shastry AB. Paraquat:the poison potion[J]. Indian J Crit Care Med,2019,23(Suppl 4):S263 - S266. doi:10.5005/jp - journals - 10071 - 23306.

[5] 李辞茹. 百草枯中毒致肺纤维化临床治疗及分子机制研究进展[J]. 医学研究生学报,2020,33(3):322 - 326. doi:10.16571/j.cnki.1008 - 8199.2020.03.020.

[6] Yamada A, Aki T, Unuma K, et al. Paraquat induces epithelial-mesenchymal transition-like cellular response resulting in fibrogenesis and the prevention of apoptosis in human pulmonary epithelial cells[J]. PLoS One,2015,10(3):e0120192. doi:10.1371/journal.pone.0120192.

[7] 刘艳琴,史红阳,邓文静,等. 百草枯对人肺泡上皮屏障的影响及机制研究[J]. 国际呼吸杂志,2018,38(23):1787 - 1791. doi:10.3760/cma.j.issn.1673 - 436X.2018.23.006.

[8] 高 娟,韩 茹,任丽萍. 阿托伐他汀钙对百草枯致肺纤维化大鼠 MMP-9 及 TIMP-1 表达的影响[J]. 中国辐射卫生,2016,25(6):742 - 745. doi:10.13491/j.cnki.issn.1004 - 714x.2016.06.036.

[9] Sato M, Hwang DM, Guan Z, et al. Regression of allograft airway fibrosis:the role of MMP-dependent tissue remodeling in obliterative bronchiolitis after lung transplantation[J]. Am J Pathol,2011,179(3):1287 - 1300. doi:10.1016/j.ajpath.2011.05.032.

[10] Liu K, Zhan Z, Gao W, et al. Cyclosporine attenuates Paraquat-induced mitophagy and pulmonary fibrosis[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol,2020,42(2):138 - 146. doi:10.1080/08923973.2020.1729176.

[11] 高 娟,李春红. 阿托伐他汀对百草枯中毒损伤肺组织 MMP-9 及 TIMP-1 表达的调控[J]. 职业卫生与应急救援,2015,33(6):394 - 397. doi:10.16369/j.oher.issn.1007 - 1326.2015.06.002.

[12] 刘开翔,占志朋,谢席胜,等. 环孢素 A 对百草枯中毒大鼠线粒体自噬导致的肺纤维化作用研究[J]. 西部医学,2017,29(2):179 - 182. doi:10.3969/j.issn.1672 - 3511.2017.02.007.

[13] 邵 雪,陈江华. 急性百草枯中毒导致肺纤维化的发生机制及治疗进展[J]. 浙江大学学报(医学版),2014,43(6):717 - 727. doi:10.3785/j.issn.1008 - 9292.2014.11.013.

doi:10.11659/jjssx.06E021014

·基础研究·

右美托咪啶减轻急性肺损伤的机制研究

李 洁[1],何凤娟[2],范国华[1] (1.武汉大学人民医院胸外科,湖北 武汉 430061;2.武汉大学人民医院乳甲外科,湖北 武汉 430061)

[摘 要] **目的** 探讨右美托咪啶(Dex)对小鼠急性肺损伤(ALI)的影响及潜在作用机制。**方法** 将32只C57BL/6雄性小鼠随机分为空白对照组(Sham组)、右美托咪啶组(Dex组)、脂多糖组(LPS组)和药物干预组(LPS+Dex组)。LPS组和LPS+Dex组小鼠通过腹腔注射LPS(10 mg/kg)构建小鼠ALI模型,Dex组及LPS+Dex组小鼠腹腔注射Dex(40 μg/kg),Sham组和LPS组注射等剂量生理盐水。LPS注射12 h后,采用HE染色比较各组小鼠肺损伤状况;qRT-PCR检测各组小鼠肺组织中促炎性细胞因子IL-1β、TNF-α、IL-6和MCP-1 mRNA的表达;Western blot检测各组小鼠肺组织中GPX4、COX2和转录因子红系2相关因子2(Nrf2)蛋白的表达。**结果** 与Sham组相比,LPS组小鼠肺损伤评分明显升高($P<0.05$),促炎性细胞因子IL-1β、TNF-α、IL-6和MCP-1 mRNA表达水平均明显升高($P<0.05$),肺组织铁死亡标志物GPX4蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),COX2蛋白表达水平则明显升高($P<0.05$),肺组织中Nrf2蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。与LPS组相比,LPS+Dex组小鼠肺损伤评分明显降低($P<0.05$),IL-1β、TNF-α、IL-6和MCP-1 mRNA表达水平明显降低($P<0.05$),GPX4的蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),COX2蛋白表达水平则明显降低($P<0.05$),Nrf2的蛋白表达水平也明显升高($P<0.05$)。**结论** Dex可能通过激活Nrf2抑制小鼠肺组织铁死亡,进而发挥肺保护作用。

[关键词] 右美托咪啶;急性肺损伤;Nrf2;铁死亡

[中图分类号] R614 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-06-03

Mechanism of dexmedetomidine in alleviating acute lung injury

LI Jie[1],HE Feng-juan[2],FAN Guo-hua[1] (1.Department of Thoracic Surgery,People's Hospital of Wuhan University,Wuhan Hubei 430061,China;2.Department of Breast and Thyroid Surgery,People's Hospital of Wuhan University,Wuhan Hubei 430061,China)

Abstract:Objective To investigate the effect of dexmedetomidine (Dex) on acute lung injury (ALI) in mice and its potential mechanism. **Methods** A total of 32 C57BL/6 male mice were randomly divided into the blank control group (Sham group),the dexmedetomidine group (Dex group),the lipopolysaccharides (LPS group) and the drug intervention group (LPS+Dex group). The mice of the LPS group and the LPS+Dex group were injected intraperitoneally with LPS (10 mg/kg) to establish the mouse ALI model. The mice of the Dex group and the LPS+Dex group were injected intraperitoneally with Dex (40 μg/kg),and the Sham group and the LPS group were injected with equal doses of normal saline. After 12 hours of LPS injection,HE staining was used to compare the lung injury status of mice in each group; qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines including IL-1β,TNF-α,IL-6 and MCP-1 in the lung tissue

[基金项目] 湖北省自然科学基金(2020cfb609)

[通信作者] 何凤娟,E-mail:375062813@qq.com

[14] Reczek CR,Birsoy K,Kong H,et al. A CRISPR screen identifies a pathway required for paraquat-induced cell death[J]. Nat Chem Biol,2017,13(12):1274-1279. doi:10.1038/nchembio.2499.

[15] Marashi SM,Hosseini SF,Hosseinzadeh M,et al. Ameliorative role of aspirin in paraquat-induced lung toxicity via mitochondrial mechanisms [J]. J Biochem Mol Toxicol,2019,33(9):e22370. doi:10.1002/jbt.22370.

[16] Wu Q,Xu Q,Jian X,et al. A new sight for paraquat poisoning from immunology[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol,2018,40(4):269-272. doi:10.1080/08923973.2018.1490319.

[17] Xu YG,Lu YQ. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of immunosuppressive pulse therapy in the treatment of paraquat poisoning[J]. J Zhejiang Univ Sci B,2019,20(7):588-597. doi:10.1631/jzus.B1800640.

[18] El-Mohandes EM,Moustafa AM,Khalaf HA,et al. The role of mast cells and macrophages in amiodarone induced pulmonary fibrosis and the possible attenuating role of atorvastatin[J]. Biotech Histochem,2017,92(7):467-480. doi:10.1080/10520295.2017.1350750.

[19] Takahagi A,Sato M,Chen-Yoshikawa TF,et al. LPS-induced airway-centered inflammation leading to BOS-like airway remodeling distinct from RAS-like fibrosis in rat lung transplantation[J]. Transplantation,2020,104(6):1150-1158. doi:10.1097/tp.0000000000003097.

[20] Neuvonen PJ,Niemi M,Backman JT. Drug interactions with lipid-lowering drugs:mechanisms and Sclinical relevance[J]. Clin Pharmacol Ther,2006,80(6):565-581. doi:10.1016/j.clpt.2006.09.003.

(编辑:贺绍梅)