

百草枯中毒大鼠肾脏病理变化及 caspase3 的表达

张志坚¹, 周从阳², 罗雅娟², 彭礼波¹, 肖娟¹

(1 重庆市巴南区人民医院 ICU 重庆 401320 2 南昌大学第一附属医院急诊科, 江西 南昌 330006)

摘要: 目的 观察急性百草枯 (PQ) 中毒大鼠肾脏病理变化和肾脏 caspase3 的表达, 探讨 PQ 中毒肾损伤病理生理机制。方法 36 只健康 SD 大鼠随机分为对照组和染毒组, 染毒组合予 80 mg/kg PQ 一次性灌胃染毒建立急性中毒模型, 对照组等量生理盐水灌胃。分别观察 24、48、72 h 肾组织病理学变化, 同时采用免疫组织化学法观察 caspase3 蛋白表达。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间单因素方差分析, 结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果 对照组肾组织结构清晰, 染毒组肾组织结构清晰度明显下降, 染毒 24 h 可见充血、水肿等病理变化, 随时间延长而加重; 肾小球亦可受累。对照组 caspase3 蛋白多不表达; 染毒组染毒 24 h 在皮质部肾小管上皮细胞的胞膜及胞浆中 caspase3 蛋白呈阳性表达, 免疫组织化学评分 (IHS) 升高, 与对照组各时间点比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 caspase3 蛋白高表达提示其可能参与 PQ 中毒肾损伤病理生理过程。

关键词: 百草枯; 肾损伤; caspase3 蛋白表达; 病理变化

中图分类号: R139.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2011)03-0179-03

Pathologic changes and expression of caspase3 in kidneys of Paraquat poisoned rats

ZHANG Zhijian*, ZHOU Congyang LUO Yajuan PENG Libo XIAO Juan

(*: Department of ICU Banan District People's Hospital Chongqing 401320 China)

Abstract: Objective To observe the pathological change and the expression of caspase3 in the kidneys of Paraquat poisoned rats for exploring the mechanism of renal damage caused by paraquat. Methods Thirty six Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into two groups, i.e. the control group and the Paraquat group. Rats in the Paraquat group were administered intragastrically with 80 mg/kg Paraquat and rats in the control group were only treated with normal saline. They examined the histopathological changes in kidney meanwhile the caspase3 expression in kidney was also detected by immunohistochemistry (HC) at 24, 48 and 72 h after administration, respectively. Results In Paraquat poisoned rats, obvious renal tubule lesions including cellular swelling, tubular stenosis, mesenchymal congestion were observed. Pathologic changes gradually aggravated until the end of the study, glomerules might also be involved. Compared with the control group, expression of caspase3 in the kidneys of Paraquat poisoned rats was obviously increased at all the time points ($P < 0.05$). Conclusions The results suggested that caspase3 might be involved in the pathogenesis of renal damage caused by paraquat.

Key words: paraquat poisoning; renal injury; caspase3 expression; pathological changes

百草枯中毒可导致以肺损伤为主的多器官功能受损, 死亡率较高, 但治疗上无特效方法。目前有关 PQ 中毒所致肺损伤已进行大量的基础及临床研究, 作为 PQ 中毒后的主要排泄器官肾脏, 目前研究尚少。细胞凋亡是 PQ 中毒后肺损伤的主要机制之一^[1], 本实验拟通过观察 PQ 中毒大鼠肾组织凋亡相关蛋白 caspase3 表达的变化, 探讨细胞凋亡在 PQ 中毒后肾损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康清洁级 SD 大鼠 36 只, 雌雄各半 (南昌大学医学院动物科学部提供), 体重 220 ~ 260 g, 采用标准颗粒饲料及标准饮用水按常规饲养。

1.2 试剂与仪器

20% 百草枯溶液购于先正达 (中国) 投资有限公司, 10 倍稀释后备用; 兔抗大鼠 caspase3 多克隆抗体、山羊抗兔 SP 多克隆抗体 S-P 免疫组化染色试剂盒由北京博奥森生物技术有限公司提供。

1.3 动物分组与处理

将所有实验动物随机分为对照组和染毒组。对照组生理盐水 1 ml, 染毒组 PQ 稀释液 80 mg/kg 一次性灌胃, 于染毒后 24、48、72 h 各取 6 只大鼠, 3% 的戊巴比妥 (35 mg/kg) 腹腔注射麻醉后腹主动脉放血处死。

1.4 caspase3 蛋白表达检测

采用免疫组织化学链霉亲和素生物素标记法 (SABC) 进行染色。镜下以细胞膜和胞浆中出现棕黄色着色颗粒为阳性标记观察 caspase3 蛋白表达。每个标本切 5 张片子, 每张于镜下随机选取 5 个完整且不重叠的高倍视野。采用免疫组织化学评分

收稿日期: 2010-08-16 修回日期: 2010-09-29

作者简介: 张志坚 (1979-), 男, 急诊医学硕士研究生, 主要从事急性中毒的基础与临床研究。

(HS) 标准分析: A为阳性细胞数分级, <1%记为 0 1% ~记为 1 10% ~记为 2 50% ~记为 3 80% ~记为 4 B为阳性细胞显色强度分级, 0为阴性, 1为弱阳性, 2为阳性, 3为强阳性; HS=A×B

1.5 肾脏组织学检查

取少量肾组织, 10%甲醛固定, 石蜡包埋切片, HE染色后用显微镜观察肾组织损伤情况。

1.6 统计分析

实验数据采用 SPSS3.0 统计软件分析, 数据均以均数 ±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析和两样本均数 检验, 比较各组差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PQ中毒大鼠肾组织病理学观察

对照组大鼠肾脏呈红棕色, 切面皮髓质有明显境界, 光镜下肾脏组织结构清晰, 未见明显充血、水肿及空泡变性。染毒组 12 h可见肾脏外观轻度水肿, 包膜紧张, 呈暗紫色, 随时间延长, 充血、肿胀加重, 表面有出血点, 有的可见大片瘀血。切面皮髓质境界模糊。镜下 12 h可见肾小球毛细血管瘀血, 肾小管上皮细胞肿胀, 间质少量炎细胞浸润; 随时间延长, 肾小球毛细血管瘀血、肾小管上皮细胞肿胀逐渐加重, 有的出现散在或片状坏死, 细胞界限不清, 管腔变狭窄或闭锁, 可见蛋白管型, 间质水肿, 炎细胞浸润; 甚至肾小球囊内可见嗜伊红染色的絮状物和红细胞, 肾小管内亦可见嗜伊红染色的均质管型或红细胞管型。见图 1 (封三)。

2.2 caspase-3蛋白表达的比较

对照组 caspase-3蛋白少数在肾小球上皮细胞弱表达。染毒后 24 h在肾小球上皮细胞、肾小管上皮细胞胞膜及胞浆 caspase-3蛋白呈阳性表达, 并随时间推移逐渐增强, 各时间点与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 2 (封三)。

表 1 各组大鼠肾组织 caspase-3蛋白免疫组织化学评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
对照组	6	0.96 ± 0.13	0.99 ± 0.14	0.98 ± 0.10
染毒组	6	6.43 ± 0.28*	7.33 ± 1.30*	8.21 ± 1.65*

注: 与对照组相比, * $P < 0.01$

3 讨论

有研究发现^[3], PQ中毒大鼠早期肾组织中 PQ含量甚至比肺脏还高, 而且在中毒后 21 d肺脏 PQ已消失时还能检测出。另有研究证实 PQ中毒后肾损伤程度是判断 PQ中毒预后的重要因素^[3,4]。本研究肾

脏病理切片显示染毒组近曲小管上皮细胞肿胀、变性、坏死, 间质充血水肿, 随时间延长损伤呈加重趋势, 这和以往研究结果相似^[5]。

Takayan等^[6]证实 PQ可以导致 DNA毁损, 阻止细胞从 G₁期进入 S期, 引起细胞凋亡。Conza等^[7]将小脑颗粒细胞置于低浓度 PQ中培养, 结果发现线粒体上细胞色素 C含量明显减少, 而水解蛋白酶和 caspase-3活性增加, DNA裂解片段增加, 细胞凋亡增强。脂质过氧化是引起细胞凋亡的重要原因之一, 这与 PQ能引起细胞内 Ca²⁺增加和谷胱甘肽耗尽有关系^[8]。另有研究表明活性氧分子 (reactive oxygen species, ROS) 还可以上调一系列与凋亡相关的基因表达 (Bcl-2, Bax等), 使细胞色素 C释放并激活 caspase-3表达, 最终导致细胞凋亡的发生^[11]。而 PQ中毒后一方面可以通过氧化还原反应形成 ROS产生一系列的细胞毒现象, 并抑制线粒体复合物 I 的活性使线粒体发生功能障碍; 另一方面, PQ的氧化还原反应还可以导致线粒体内膜上的脂质发生过氧化从而使其损伤, 间接引起细胞凋亡的发生^[9]。

天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶家族 (Caspase) 是细胞凋亡中主要的执行者, 其中 caspase-3为细胞凋亡过程中的关键酶。当 caspase-3被激活, 生成活化的 caspase-3 (P17) 和 P12亚基, 对细胞凋亡的发生和调节发挥重要作用。诱导细胞凋亡实质上都是通过 caspase蛋白的次序激活而实现的, 大多数触发细胞凋亡的因素最终均需通过 caspase-3介导的多种信号传导途径^[10], 因此, caspase-3的激活可以看作是细胞凋亡的标志^[11]。本实验结果显示 PQ染毒组中 caspase-3蛋白表达随时间推移较正常对照组逐渐增强, 因此, 推测 PQ中毒后肾脏损伤与细胞凋亡有一定的关系。

参考文献:

- [1] Dinis-Oliveira R J, Sousa C, Remião F, et al. Effects of sodium selenite in the paraquat induced apoptotic events in rat lungs [J]. Free Radical Biol Med. 2007; 43 (1): 48-61.
- [2] 赵波, 曹向东, 张忠臣, 等. 百草枯染毒大鼠组织中中毒物含量与脏器损伤的关系 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2010; 28 (3): 220-223.
- [3] 刘芙蓉, 石汉文, 扈琳, 等. 肾损伤对百草枯中毒患者预后影响的分析 [J]. 临床荟萃, 2008; 23 (2): 119-121.
- [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): 542-544.
- [5] 田英平, 刘芙蓉, 佟飞, 等. 百草枯中毒大鼠的肾损伤病理变化和血红素氧合酶-1的表达 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2009; 27 (8): 468-471.

(下转第 195页)

fibroblast in culture [J]. *Sci Total Environ* 2001 270 (10): 135-139

[12] 袁志明, 陈光谨. 大鼠肺纤维化过程中肺巨噬细胞释放白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 的观察 [J]. *天津医药*, 1999 27 (12): 742-743.

[13] Zhai R, Liu G, Ge X, et al. Serum levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), and their soluble receptors in coal workers' pneumoconiosis [J]. *Respir Med* 2002 96 (10): 829-834.

[14] Valliyathan V, Goins M, Lapp L N, et al. Changes in bronchoalveolar lavage indices associated with radiographic classification in coal miners [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 162 (3): 958-965

[15] Prior C, Knight R A, Herold M, et al. Pulmonary sarcoidosis: Patterns of cytokine release in vitro [J]. *Eur Respir J* 1996 9: 47-53.

[16] 李庆, 李廷, 祁新兰. 煤工尘肺患者血清 TNF α 、sIL-2R、IL-6 和 IL-8 检测的意义 [J]. *中国工业医学杂志*, 2006 19 (1): 11-12

[17] Pantelidis P, Southcott A M, Black C M, et al. Up-regulation of IL-8 secretion by alveolar macrophages from patients with fibrosing alveolitis: a subpopulation analysis [J]. *Clin Exp Immunol* 1997 108 (1): 95-104.

[18] Car B D, Meloni F, Luise M, et al. Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 1994 149 (3): 655-659.

[19] 邵长周, 陈小东, 蔡映云. 细胞因子在肺纤维化形成中的作用 [J]. *国外医学内科分册*, 2001 8 (11): 484-486

[20] 吴寿岭, 张玉梅, 杨俊芬, 等. 煤工尘肺患者血清白细胞介素-8、-13 和 -18 水平的变化 [J]. *中国职业医学*, 2010 37 (5): 389-392

[21] Kolls J K, Kanaly S T, Ramsay A J. Interleukin-17: an emerging role in lung inflammation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003 28 (1): 9-11

[22] Shen N, He B, Wang J, et al. Significance of anti-interleukin-17 antibodies to airway inflammation in cigarettes smoke induced COPD in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 2009 179 A2955

[23] Molet S, Hamid Q, Davoine F, et al. IL-17 is increased in asthma airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2001 108 (3): 430-438

[24] 吴静, 徐建, 张映铭, 等. 矽肺患者血清 IL-17 检测的临床意义 [J]. *放射免疫学杂志*, 2009 22 (6): 623-625.

[25] Escotte S, Tabary O, Dusser D, et al. Fluticasone reduces IL-6 and IL-8 production of cystic fibrosis bronchial epithelial cells via KK-beta kinase pathway [J]. *Eur Respir J* 2003 21 (4): 574-581

[26] Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces NF-gamma production by T cells [J]. *Nature* 1995 378 (6552): 88-91.

[27] 马靖, 何冰, 李楠, 等. 白细胞介素-18 在肺纤维化大鼠肺组织中的表达 [J]. *北京大学学报*, 2002 34 (4): 376-383.

[28] Nakatani Okuda A, Ueda H, Kashiwaura S, et al. Protection against bleomycin-induced lung injury by IL-18 in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005 289 (2): L280-287.

[29] 吴俊艳, 袁宝军, 邹吉敏, 等. 矽肺患者血清 MCP-1 和 IL-18 水平的变化及意义 [J]. *中国工业医学杂志*, 2009 22 (6): 454-455

[30] Yang Y J, Shen Y, Chen S H, et al. Role of interleukin 18 in acute lung inflammation induced by glutathione reperfusion [J]. *World J Gastroenterol* 2005 11 (29): 4524-4529

[31] Antoniou K M, Alexandrakis M G, Sfiridakis K, et al. The cytokine pattern (IL-12 and IL-18) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) before and after treatment with interferon gamma-1b (IFN- γ -1b) or colchicine in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF/UIP) [J]. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2004 21 (2): 105-110

[32] 王冬梅, 袁宝军, 邹吉敏, 等. 尘肺患者血清和全肺灌洗液中 IL-12 水平的测定分析 [J]. *中国工业医学杂志*, 2007 20 (6): 385-386

[33] Huaux F, Arras M, Tomasi D, et al. A profibrotic function of IL-12 p40 in experimental pulmonary fibrosis [J]. *J Immunol* 2002 169 (5): 2653-2661.

[34] 袁宝军, 丁秀荣, 刘志忠, 等. 矽肺患者血清白细胞介素-12 和 γ 干扰素水平变化 [J]. *中国职业医学*, 2006 33 (2): 111-113

[35] 袁宝军, 王冬梅, 邹吉敏, 等. I 期尘肺患者血清白细胞介素-12、白细胞介素 12p70、白细胞介素 10 和白细胞介素 18 含量的变化 [J]. *临床荟萃*, 2007 20 (18): 1300-1303

(上接第 180 页)

[6] Takeyama N, Tanaka T, Yabuki T, et al. The involvement of p53 in paraquat induced apoptosis in human lung epithelial like cells [J]. *Int J Toxicol* 2004 23 (1): 33-40

[7] Gonzalez-Polo R A, Rodriguez-Martin A, Moran J M, et al. Paraquat induced apoptotic cell death in cerebellar granule cells. *Brain Res* 2004 1011 (2): 170-176

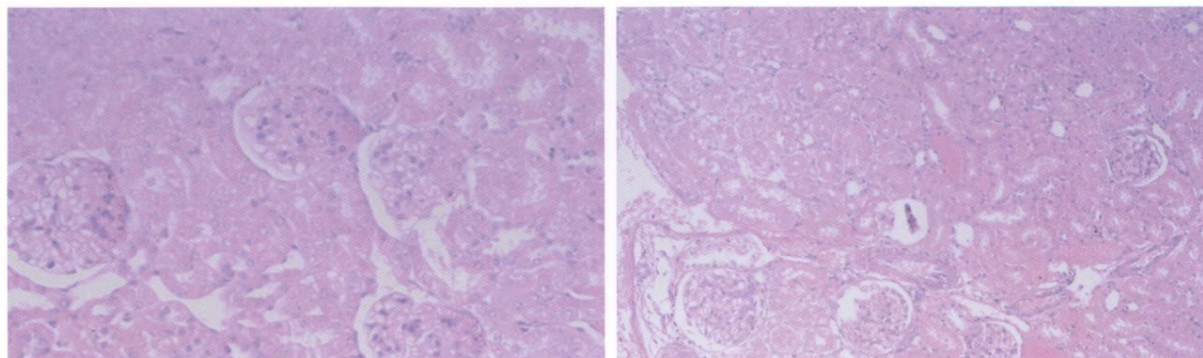
[8] Chen H M, Chen J C, Ng C J. Melatonin reduces pancreatic prosta-glandin production and protects against caerulein-induced pancreatitis in rats [J]. *J Pineal Res* 2006 40 (1): 34-39

[9] A M, Ghani B, Bardaji M, Ghazi-Khansari A. Alternative electron acceptors: Proposed mechanism of paraquat mitochondrial toxicity [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2008 26 (1): 1-5

[10] Padanilam B J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003 284 (3): F608-617

[11] Xu J, Wei C, Xu C, et al. Rifampin protects PC12 cells against MPP+ induced apoptosis and inhibits the expression of an alpha-Synuclein multimer [J]. *Brain Res* 2007 1139: 220-225

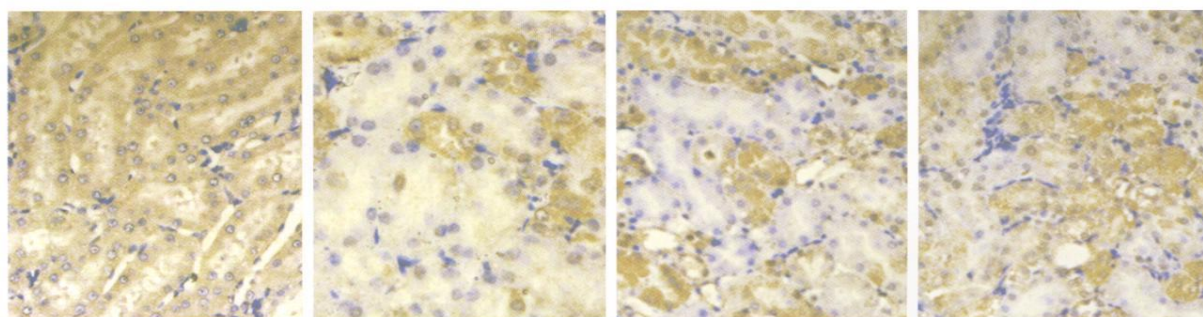
百草枯中毒大鼠肾脏病理变化及 caspase-3 的表达(正文见 179~180 页)



对照组

PQ组

图1 百草枯中毒大鼠肾脏病理变化(48 h) (HE, × 200)



对照组

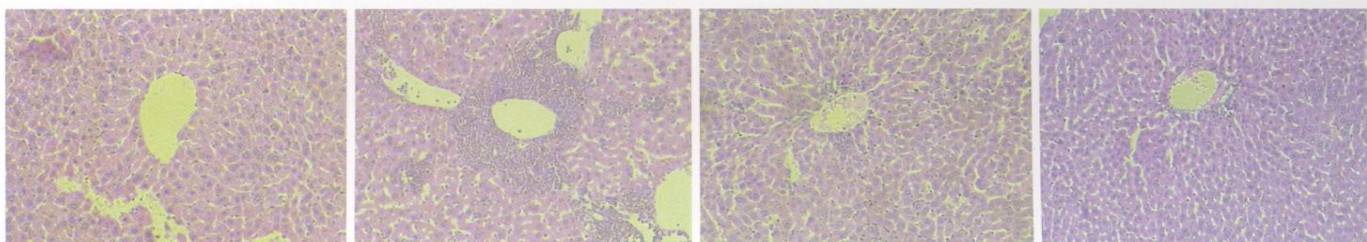
PQ 24 h组

PQ 48 h组

PQ 72 h组

图2 百草枯中毒大鼠 caspase-3 表达情况(SP, × 400)

不同粒径纳米硒化镉对小鼠肝肾功能的毒性比较 (正文见 202~203 页)



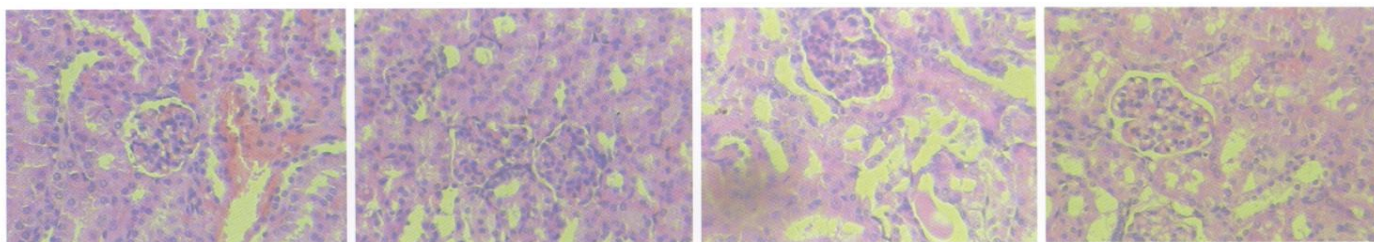
对照组 (× 200)

CdSe I组 (× 100)

CdSe II组 (× 100)

CdSe III组 (× 100)

图1 小鼠肝脏病理组织学变化



对照组

CdSe I组

CdSe II组

CdSe III组

图2 小鼠肾脏病理组织学变化 (× 200)