

ductive stress and human disease [J]. *Appl Toxicol*, 2011, 31 (2): 951-970.

[3] Najukas M F, Anderson B, Ahsan H, et al. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem [J]. *Environ Health Perspect*, 2013, 121 (3): 295-302.

[4] Seno H, Oshima M, Ishikawa T O, et al. Cyclooxygenase 2 and prostaglandin E (2) receptor EP (2)-dependent angiogenesis in APC (Delta716) mouse intestinal polyps [J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (2): 506-511.

[5] Arnold L L, Cano M, St John M, et al. Effects of dietary dimethylarsinic acid on the urine and urothelium of rats [J]. *Carcinogenesis*, 1999, 10: 2171-2179.

[6] Kudo Y, Takata T, Ysui W, et al. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor P27 is an indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancer*, 1998, 83 (2): 2447-2455.

[7] Jares P, Fernandez P L, Campo E, et al. PRAD-1/cyclinD1 gene amplification correlates with messenger RNA over expression and tumor progression in human laryngeal carcinomas [J]. *Cancer Res*, 1994, 54 (17): 4813-4817.

[8] Hara S, Kondo Y, Matsuzawa I, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human bladder and renal cell carcinoma [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2002, 507: 123-126.

[9] Gurocak S, Sozen S, Erdem O, et al. Relation between cyclooxygenase-2 expression and clinicopathologic parameters with patient prognosis in transitional cell carcinoma of the bladder [J]. *Urol Int*, 2006, 76: 51-56.

Prxs 蛋白在矽尘致肺纤维化中的作用

Role of protein Prxs in pulmonary fibrosis caused by silica dust

张志敏, 张艳淑, 关维俊, 孟春燕, 姚林

(河北联合大学公共卫生学院, 河北 唐山 063000)

摘要: 采用 Western blot 方法检测不同剂量矽尘染毒 28 d 大鼠肺组织中 Prxs I 和 Prxs VI 蛋白的表达水平, 同时用试剂盒检测肺组织中抗氧化酶活性并进行肺组织病理观察。结果显示随着矽尘染毒剂量增加, H₂O₂ 及羟脯氨酸 (HYP) 的含量逐渐增加, CAT 及 GSH-Px 的活性逐渐降低。Prxs I 和 Prxs VI 蛋白含量随着染尘剂量的增加有不同程度的降低。结果表明 Prxs 蛋白可能参与矽尘暴露导致的肺纤维化。

关键词: 矽肺; 硫氧还原蛋白过氧化物酶 (Prxs); 肺纤维化; 氧化损伤

中图分类号: R135.2 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2014)05-0362-03

DOI:10.13631/j.cnki.zggyyx.2014.05.017

氧化抗氧化平衡失调是目前矽尘致肺组织纤维化的机制之一^[1]。游离 SiO₂ 粉尘可损伤肺巨噬细胞, 产生大量的活性氧 (ROS), 主要包括 O₂⁻、H₂O₂、OH⁻; 体内的抗氧化酶主要有过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、硫氧还原蛋白过氧化物酶 (peroxiredoxins, Prxs) 等。Prxs 蛋白^[2,3]是新近发现的一类过氧化物酶, 属于抗氧化蛋白超家族, Prxs 蛋白不仅参与自由基的清除, 还参与细胞的增殖分化及细胞信号转导^[4]、保护自由基敏感蛋白、增强 NK 细胞的活性^[5,6]。哺乳动物中 Prxs 家族包括 6 个成员, Prxs I 蛋白在多种组织中表达, 在氧化应激及某些恶性肿瘤细胞中表达显著增高^[7]; Prxs VI 在肺脏中表达最高, 其基因高表达可减

少转基因小鼠腹膜巨噬细胞中的 H₂O₂ 的生成^[8]。本课题拟探讨 Prxs I 和 Prxs VI 在矽肺发病中的作用, 进一步弄清矽尘致肺纤维化的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 32 只, 体重 180~220 g, 北京维通利华实验动物有限公司提供 [合格证号: SCXK (京) 2006-0009], 根据体重随机分成 4 组, 即对照组、染尘组 (12.5 mg/ml 低剂量组、25 mg/ml 中剂量组、50 mg/ml 高剂量组), 每组 8 只。采用非暴露式气管内注入法染尘, 对照组大鼠经气管注入无菌生理盐水 1 ml, 染尘组大鼠分别经气管注入 12.5 mg/ml、25 mg/ml 和 50 mg/ml 二氧化硅混悬液 1 ml, 28 d 后处死大鼠取材。

1.2 主要实验试剂

二氧化硅粉尘购自 Sigma, CAT、H₂O₂、GSH-Px (谷胱甘肽过氧化物酶) 和 HYP (羟脯氨酸) 试剂盒均购自南京建成生物技术有限公司, Prxs I 和 Prxs VI 的一抗购自 Santa cruz Blotechnology, Prxs I 和 Prxs VI 的二抗以及 β-actin 抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 肺组织中 Prxs I 和 Prxs VI 检测

采用质量分数为 12% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 进行电泳, Western blot 定量检测 Prxs I 和 Prxs VI 蛋白的表达水平。Prxs I 和 Prxs VI 的一抗稀释浓度均为 1:500, 二抗稀释浓度为 1:1000, 采用 Fluor Chem HD2 凝胶成像系统采集图像并获得各蛋白条带灰度值。以 Prxs I 和 Prxs VI 的灰度值与各自的内参蛋白 (β-actin) 的灰度值之比, 计算其相对表达水平。

1.4 肺组织中抗氧化酶活性和 HYP、H₂O₂ 含量检测

用试剂盒检测肺组织中 CAT、GSH-Px 的活性以及 HYP、

收稿日期: 2013-12-18; 修回日期: 2014-03-10
 基金项目: 河北省应用基础研究项目 (编号: 11966120D); 河北省科技支撑项目 (编号: 02976194D)
 作者简介: 张志敏 (1987-), 女, 硕士在读, 研究方向: 分子毒理学。
 通讯作者: 姚林, E-mail: yaolin766@163.com。

H₂O₂ 的含量，具体方法按试剂盒说明书操作。

1.5 肺组织病理学观察

按照常规病理学方法对大鼠的右肺中叶进行固定、脱水、石蜡包埋，制作病理切片，行 HE 染色。

1.6 统计学处理

实验数据均采用均数 ± 标准差表示 ($\bar{x} \pm s$)，多组之间样本均数比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验， $P < 0.05$ ，差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量染尘对肺组织中 H₂O₂ 的含量及抗氧化酶活性的影响

由表 1 可见，高、中剂量组与对照组相比，H₂O₂ 含量升高 36.30%、28.73%，CAT 活性降低 35.36%、21.39%，GSH-Px 活性降低 39.69%、16.24%；高剂量组比低、中剂量组 GSH-Px 活性降低 33.71%、27.99%；差异均有统计学意义， $P < 0.05$ 。

表 1 不同剂量染尘对肺组织中 H₂O₂ 的含量及抗氧化酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	H ₂ O ₂ (mmol/g prot)	CAT(U/mg pro)	GSH-Px(U/mg pro)
对照组	4.49 ± 0.71	33.06 ± 5.19	184.45 ± 26.99
低剂量染尘组	5.09 ± 0.79	29.67 ± 3.62	167.83 ± 22.01
中剂量染尘组	5.78 ± 0.60 ^a	25.99 ± 2.72 ^a	154.50 ± 19.16 ^a
高剂量染尘组	6.12 ± 0.85 ^{ab}	21.37 ± 3.79 ^{abc}	111.25 ± 16.34 ^{abc}

注：a，与对照组比较， $P < 0.05$ ；b，与低剂量组比较， $P < 0.05$ ；c，与中剂量组比较， $P < 0.05$ 。

2.2 不同剂量染尘后肺组织中 HYP 的表达变化

高、中量组比对照组 HYP 含量升高 38.46%、33.08%；高剂量组比低剂量组 HYP 含量升高 31.71%，差异均有统计学意义， $P < 0.05$ ；HYP 的表达含量与矽尘染毒剂量呈正相关 ($r = 0.882, P = 0.028$)，见图 1。

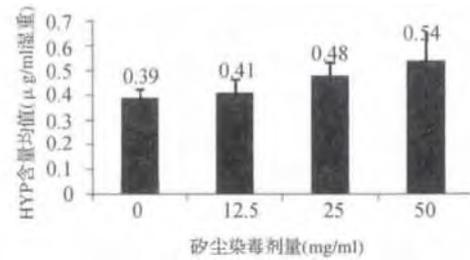


图 1 不同剂量染尘对肺组织中 HYP 含量的影响

2.3 不同剂量染尘对 Prxs I 和 Prxs VI 蛋白表达的影响

定量分析显示，与对照组比较，3 个染尘组 Prxs I 蛋白含量下降了 12.0%、15.0% 和 30.0%，高剂量组与低、中剂量组比较 Prxs I 蛋白含量降低 20.45%、17.65%，高剂量组与对照组比较 Prxs VI 蛋白含量降低了 18.0%，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；染尘组之间，随着染尘剂量的增加肺组织中 Prxs VI 蛋白含量也有逐渐降低的趋势，但差异无统计学意义。见表 2。

表 2 不同剂量染尘 Prxs I 和 Prxs VI 蛋白相对水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	Prxs I	Prxs VI
对照组	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.19
低剂量染尘组	0.88 ± 0.097	0.96 ± 0.12
中剂量染尘组	0.85 ± 0.093 ^a	0.90 ± 0.11
高剂量染尘组	0.70 ± 0.12 ^{abc}	0.82 ± 0.058 ^{ab}

注：a，与对照组比较， $P < 0.05$ ；b，与低剂量组比较， $P < 0.05$ ；c，与中剂量组比较， $P < 0.05$ 。

2.4 不同剂量染尘后肺组织病理学变化

染尘 28 d 的病理结果显示，对照组肺组织结构清晰，壁薄，肺泡内未见细胞炎性浸润；低剂量组有少量的巨噬细胞和中性粒细胞炎性浸润；中剂量组肺泡间隔水肿增厚明显，肺泡腔和肺间质中大量炎症细胞浸润，巨噬细胞增多；高剂量组出现了细胞性结节，肺泡间隔增厚。见图 2。

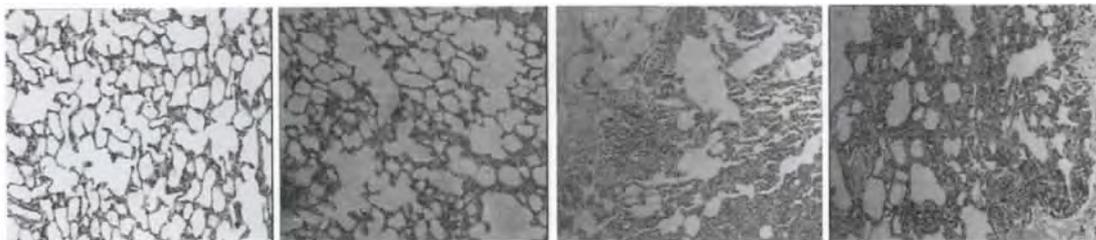


图 2 不同剂量组肺组织病理学变化 (HE, ×100)

3 讨论

本研究显示随着染尘剂量增加，肺组织中 H₂O₂ 及 HYP 的含量逐渐增加，CAT 及 GSH-Px 的活性逐渐降低；同时 Prxs I 和 Prxs VI 蛋白表达下降。

CAT 能有效地清除 H₂O₂，在早期作用较明显；GSH-Px 主要清除过氧化脂质 (ROOH)，切断 ROOH 引起的连锁反应，防止细胞破坏。本实验结果表明，25 mg/ml 染尘即可引起大

鼠肺组织中 H₂O₂ 表达含量增加，同时 CAT 和 GSH-Px 活性明显下降；25 mg/ml 染尘亦使大鼠肺组织中 Prxs I 蛋白表达也降低，而 Prxs VI 表达下降是在 50 mg/ml 染尘 28d 后，提示矽尘染毒在不同程度上影响了 Prxs 蛋白的表达。

体内清除 H₂O₂ 的抗氧化酶主要有 CAT、GSH-Px 和 Prxs，后者与 H₂O₂ 的亲合力要比前两者高^[9]。其含有高度保守的具有氧化还原活性的一 Cys，可将 H₂O₂ 还原为 H₂O 后，烷化为

乙醇而清出细胞^[10-12]。本实验结果显示,矽尘染毒后 Prxs I 蛋白从低剂量组开始表达便明显下降,Prxs VI 蛋白的表达减低在高剂量组更为显著,提示 Prxs 蛋白也可能参与了矽尘所致的肺纤维化。Lee 的研究^[13]亦显示矽尘能使人肺泡 II 型上皮细胞系 A549 细胞和 Rat2 细胞中 Prxs I、Prxs III 的表达下降,与本文的研究结果一致。

参考文献:

[1] Zeidler P, Hubbs A, Battelli L, et al. Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis [J]. J Toxicol Environ Health A, 2004, 67 (13): 1001-1026.

[2] 谢美荣,王章进,林翠英,等. 硫氧还原蛋白过氧化物酶 VI 在小鼠卵巢、输卵管和子宫中的分布 [J]. 解剖学研究, 2008, 30 (6): 405-406.

[3] Kim S U, Hwang C N, Sun H N, et al. Peroxiredoxin I is an indicator of microglia activation and protects against hydrogen peroxide mediated micro glial death [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31 (5): 820-825.

[4] Lee Y M, Park S H, Shin D I, et al. Oxidative modification of peroxiredoxin is associated with drug-induced apoptotic signaling in experimental models of Parkinson disease [J]. Biol Chem, 2008, 283 (15): 9986-9998.

[5] 傅春玲,霍艳英,胡迎春,等. Pten 基因敲除对过氧化物酶家族表达和活性氧水平的影响 [J]. 军事医学科学院院刊, 2007, 31

(3): 201-203.

[6] 胡永欣. 不同低氧暴露对人红细胞硫氧还蛋白过氧化物酶 Peroxiredoxin II 的影响 [J]. 广州体育学院学报, 2012, 32 (3): 84-85.

[7] 颜晟. 人抗氧化蛋白 Peroxiredoxin 1 和 2 的表达、纯化及功能研究 [D]. 华南理工大学硕士学位论文, 2012.

[8] Wang X, Phelan S A, Forsman-Semb K. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (27): 25179-25190.

[9] 杨柳,米黎,霍艳英. Peroxiredoxin 在 H₂O₂ 介导的信号通路中的作用 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26 (5): 417-419.

[10] Park K J, Kim Y J, Kim J, et al. Protective effects of peroxiredoxin on hydrogen peroxide induced oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes [J]. Korean Circ J, 2012, 42 (1): 23-32.

[11] Srinivasa K, Kim N R, Kim J, et al. Characterization of a putative thioredoxin peroxidase Prx I of candida albicans [J]. Mol Cells, 2012, 33 (3): 301-307.

[12] Lee D H, Lim B S, Lee Y K, et al. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines [J]. Cell Biol Toxicol, 2006, 22 (1): 39-46.

[13] Lee H L, Kim Y S, Park J H, et al. Selectively decreased expression of peroxiredoxins induced by silica in pulmonary epithelial cells [J]. Korean J Intern Med, 2009, 24 (3): 220-226.

铝对小鼠的毒性及中药对其干预的实验研究

Experimental study on toxicity of alminum and its intervention by traditional Chinese Medicine in mice

何胜, 杨海龙, 黄炳臣, 韦凤整, 蓝晓惠, 吴艳, 张仲将, 张树球, 梁伟江

(右江民族医学院重金属与氟砷毒物研究实验室, 广西 百色 533000)

摘要: 将 60 只昆明种小鼠分为对照组、模型组、治疗 1 组、治疗 2 组。用氯化铝建立模型, 用两种剂型的中药口服液对治疗组灌胃, 水迷宫测定记忆功能。实验结束, 测定小鼠脑铝含量、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性和血清胆固醇含量, 并做脑组织病理学检查。结果表明, 铝染毒小鼠大脑铝含量明显升高, 海马和皮质神经细胞受损, 导致大脑的 AChE 活力等改变, 中药治疗组有一定改善。

关键词: 铝; 海马; 乙酰胆碱酯酶; 中药

中图分类号: R332 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2014)05-0364-03

DOI:10.13631/j.cnki.zggyyx.2014.05.018

重金属 (如铅、汞等) 是全球环境污染最主要的污染物之一, 其对人体的损害已不容置疑, 而且较为剧烈。铝为金

属元素, 过去长时间被视为无毒, 仅在近年来才被认为有一定毒性, 虽其毒性程度不如铅、汞等元素, 但被怀疑与痴呆症发病有关。李海、李韬等^[1-2]曾用铝来复制中毒模型, 探讨铝毒性引起大脑形态与功能变化及中药治疗效果, 但尚未找到大脑铝含量升高与其形态、特别是与记忆功能关系密切的海马部位变化的直接证据。为此, 本文仍以氯化铝复制毒性模型, 时间从 3 个月延长至 5 个月, 采用水迷宫方法测定中药治疗前后小鼠的记忆功能变化; 实验结束时, 测定对比各组大脑铝含量、AChE 等生化指标变化, 并观察大脑海马和皮质形态变化, 通过综合对比分析探讨铝的中毒作用机制和评价中药治疗效果。

1 试剂与方法

1.1 试剂

氯化铝、乙酸、硝酸、高铁氰化钾、氰化钾、磷酸氢二钾、Triton-100, 国产分析纯。AChE 试剂盒、总胆固醇 (TC)、尿素试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验动物及分组

选用昆明种小鼠 60 只, 右江民族医学院动物实验室提供 (动物实验许可证: SYXK 桂 2011-0010, 动物生产许可证号:

收稿日期: 2013-09-23; 修回日期: 2013-12-16
基金项目: 广西自然科学基金 (桂科自 0991282、桂科自 0499013)

作者简介: 何胜 (1962—), 男, 讲师, 研究方向: 环境毒理学及其解毒作用。

通讯作者: 杨海龙, E-mail: sqzhang224@163.com。