

文章编号:1004-7220(2013)02-0160-04

# 百草枯对人胚肺成纤维细胞增殖及黏弹性影响

谢永鹏<sup>1</sup>, 张楠<sup>2</sup>, 王国辉<sup>3</sup>(1. 徐州医学院附属连云港医院 ICU 科, 江苏 连云港 222002; 2. 吉林大学第一医院 急诊科, 长春 130021;  
3. 潍坊医学院 药学与生物科学学院, 山东 潍坊 261053)

**摘要:** **目的** 研究百草枯对人胚肺成纤维细胞(MRC-5)增殖及黏弹性影响,探讨百草枯中毒初期对肺细胞损伤及后续肺纤维化的发病机制。**方法** 用含不同浓度百草枯(0、100、200 mg/L)的 MEM 培养基处理生长状态良好的 MRC-5 细胞 12 h,换正常 MEM 培养基继续培养 24 h 后收集细胞,一部分细胞通过流式细胞仪检测细胞周期确定细胞的增殖情况,另一部分通过微管吸吮技术检测细胞的黏弹性。**结果** 经过不同浓度百草枯处理后,细胞的增殖指数较对照组明显降低( $P < 0.05$ ),且百草枯浓度越大,细胞的增殖指数越低。经过百草枯处理后 MRC-5 细胞的黏弹性各项参数均明显小于正常组 MRC-5 细胞( $P < 0.05$ );其中 100 或 200 mg/L 百草枯处理组,MRC-5 细胞的黏弹性要小于 50 mg/L 百草枯处理组( $P < 0.05$ );而 100 与 200 mg/L 百草枯处理组之间,MRC-5 细胞的黏弹性无明显差异( $P > 0.05$ )。**结论** 百草枯中毒初期人胚肺成纤维细胞受到损伤,增殖指数下降,细胞黏弹性降低,中毒后的代偿性修复是导致肺纤维化的重要原因,为临床治疗提供新的思路。

**关键词:** 肺成纤维细胞;百草枯;细胞增殖;黏弹性;肺纤维化

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

## Effects of paraquat on proliferation and viscoelasticity of human embryonic lung fibroblasts

XIE Yong-peng<sup>1</sup>, ZHANG Nan<sup>2</sup>, WANG Guo-hui<sup>3</sup> (1. ICU Department, the Affiliated Lianyungang Hospital of Xuzhou Medical College, Lianyungang 222002, Jiangsu, China; 2. Emergency Department, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China; 3. College of Pharmacy and Biological Science, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong, China)

**Abstract:** **Objective** To study effects of paraquat on proliferation and viscoelasticity of human embryonic lung fibroblasts (MRC-5), and to discuss mechanism of MRC-5 damage at initial stage and pulmonary fibrosis later after paraquat intoxication. **Methods** MRC-5 cells were treated by culture medium with different concentration of paraquat (50, 100, 200 mg/L, respectively) for 12 hours, when the paraquat culture medium was replaced by normal culture medium. At 48th hours, MRC-5 cells were collected, examined and analyzed by flow cytometry for indicating the proliferation, and micropipette aspiration technique was used to investigate viscoelasticity of the cells. **Results** After treated by paraquat with different concentration, proliferation index (PI) of MRC-5 cells were significantly reduced, as compared with the control group ( $P < 0.05$ ), and PI was reduced with the increase of paraquat concentration; viscoelastic parameters of MRC-5 cells were significantly decreased as compared with the normal cells ( $P < 0.05$ ); viscoelastic parameters of MRC-5 cells in 100 mg/L group and 200 mg/L group were smaller than those in 50 mg/L group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference between 100 mg/L group and 200 mg/L group ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** MRC-5 cells were damaged at initial stage of paraquat intoxication, with PI and viscoelastic parameters reducing. Decompensated repair after paraquat intoxication is an important reason leading to pulmonary fibrosis, which provides a new thought in clinical treatment.

**Key words:** Lung fibroblasts; Paraquat; Cell proliferation; Viscoelasticity; Pulmonary fibrosis

收稿日期:2012-05-15; 修回日期:2012-06-18

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20100138)。

通信作者:王国辉, 讲师, E-mail: wangguohui1983@163.com。

百草枯是目前广泛使用的除草剂,对人体毒性极大。百草枯中毒后对人体可造成心、肺、肾、肝、脑等器官的损伤,其中最主要的是肺损伤。超大剂量百草枯中毒患者可在短期内死于多器官功能衰竭,中、重度中毒早期主要表现为急性肺损伤;如不能度过该期,以后则出现不可逆肺泡及肺间质纤维化,最终死于呼吸功能衰竭。尽管国内外学者开展了大量的实验研究,但百草枯诱导组织损伤的机理到目前为止尚不完全清楚。本文主要通过实验研究百草枯中毒早期肺成纤维细胞增殖及黏弹性的变化,在细胞水平探讨百草枯中毒初期对肺细胞的损伤及后续肺纤维化的发病机制,为百草枯中毒的早期治疗提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养与处理

人胚肺成纤维细胞(MRC-5),购于中国科学院上海细胞库。用完全培养基(10%胎牛血清+MEM培养基)于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下,CO<sub>2</sub>孵箱内常规培养MRC-5细胞。待MRC-5细胞生长至对数生长期,分别换用不同浓度百草枯(50、100、200 mg/L)培养基处理12 h,然后换完全培养基继续培养24 h,收集MRC-5细胞进行细胞周期检测与细胞黏弹性检测。

### 1.2 细胞形态学观察

用倒置显微镜对百草枯处理前后的MRC-5细胞进行形态学观察并采集图像。

### 1.3 细胞增殖检测

收集百草枯处理后MRC-5细胞,以1 000 r/min离心5 min,用磷酸盐缓冲液洗涤2次后,加入到浓度为70%的预冷乙醇中,于4℃环境中固定过夜;再经磷酸盐缓冲液洗涤及离心5 min后,去上清,加碘化丙啶(100 mg/L)、RNA酶(100 mg/L)各10 μL,磷酸盐缓冲液40 μL,避光30 min后,采用流式细胞仪分析细胞增殖周期。

根据流式细胞仪的分析数据计算细胞的增殖指数(proliferation index, PI):

$$PI = \frac{S + (G_2/M)}{(G_0/G_1) + S + (G_2/M)} \times 100\%$$

式中: $G_0/G_1$ 表示处于DNA复制前期的细胞数量; $S$ 表示处于DNA复制期的细胞数量; $G_2/M$ 表示处于DNA复制后期以及细胞分裂期的细胞数量。

### 1.4 微管吸吮实验与细胞黏弹性计算

收集各组细胞,制成细胞悬液,利用微管吸吮技术测量MRC-5细胞的黏弹性。将细胞悬液注入细胞小室,控制室温在25℃,利用微操作器把微管推进小室,然后在一定负压下,控制负压在343~441 Pa,观察并记录细胞的吸入微管的过程,得到吸入长度随时间变化的曲线<sup>[1-2]</sup>。

采用标准线性固体黏弹性理论模型描述MRC-5细胞的黏弹性特性<sup>[3]</sup>,根据细胞吸入微管长度随时间变化曲线的拟合数据和标准线性固体黏弹性理论模型计算细胞的黏弹性参数。

### 1.5 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两样本均数 $t$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 形态学观察

经过百草枯处理后MRC-5细胞的形态及细胞数量发生变化(见图1)。正常MRC-5细胞呈梭形,细胞边缘清晰,细胞数量多;经含50 mg/L百草枯培养基处理后,细胞的形态无明显变化,细胞数量减少,可见少量坏死细胞;经含100 mg/L百草枯培养基处理后,大量细胞的形态发生变化,呈圆型或不规则形,细胞数量明显减少,出现大量坏死细胞;经含200 mg/L百草枯培养基处理后,细胞形态不规则,细胞存活数量较少。

### 2.2 增殖活性检测结果

根据流式细胞仪对细胞增殖周期的分析可知处于细胞分裂期的MRC-5细胞随百草枯浓度的增加而减少。根据流式细胞仪分析的细胞周期数据,计算各组MRC-5细胞的增殖指数(PI)( $n = 5$ )分别为:正常组:(51.27 ± 4.14)%;50 mg/L组:(43.85 ± 3.55)%;100 mg/L组:(36.67 ± 3.27)%;200 mg/L组:(19.47 ± 3.86)%。结果表明,正常组MRC-5细胞的增殖活性较高,而经过百草枯处理后,MRC-5细胞增殖活性明显降低,且百草枯浓度越大,细胞的增殖活性越低( $P < 0.05$ ,见图2)。

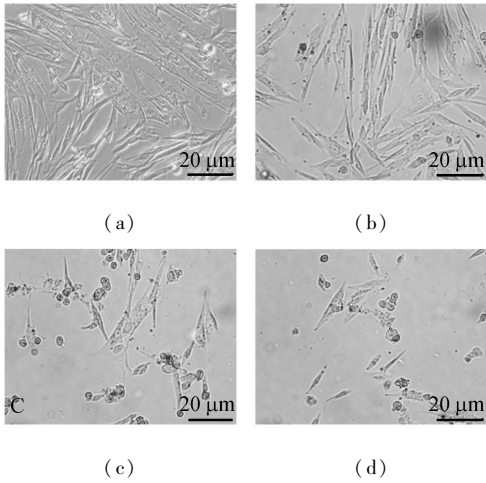


图1 百草枯处理前后 MRC-5 细胞显微图片 (a)正常 MRC-5 细胞, (b)50 mg/L 百草枯培养基处理后, (c)100 mg/L 百草枯培养基处理后, (d)200 mg/L 百草枯培养基处理后

Fig.1 Morphology figures of MRC-5 cells before and after paraquat treatment (a) Normal MRC-5 cells, (b) MRC-5 cells treated by 50 mg/L paraquat, (c) MRC-5 cells treated by 100 mg/L paraquat, (d) MRC-5 cells treated by 200 mg/L paraquat

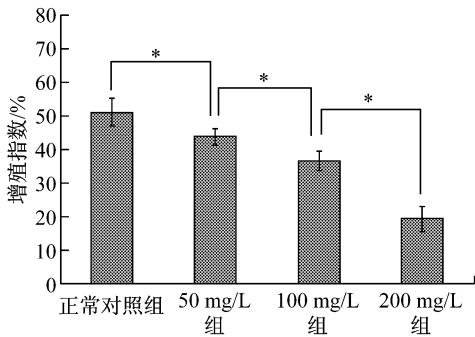


图2 不同组细胞增殖指数比较 (\*  $P < 0.05$ )

Fig.2 Comparison of proliferation index for each group

### 2.3 细胞黏弹性检测结果

对 MRC-5 细胞进行微管吸吮的测试实验后,得到细胞在一定负压作用下吸入长度随时间变化的曲线(见图3)。MRC-5 细胞首先发生瞬时弹性响应,

表1 各组细胞黏弹性参数

Tab.1 Viscoelastic parameters of MRC-5 cells for each group

组别	$n$	瞬间模量, $E_0$ /kPa	平衡模量, $E_\infty$ /kPa	表观黏性, $\mu$ /kPa·s
正常组	36	0.9218 ± 0.1227	0.4677 ± 0.1024	3.3748 ± 0.7243
50 mg/L 组	28	0.5905 ± 0.1348 *	0.3209 ± 0.1079 *	2.5739 ± 0.6163 *
100 mg/L 组	30	0.3815 ± 0.1122 **	0.2574 ± 0.1177 **	1.6239 ± 0.6185 **
200 mg/L 组	29	0.3579 ± 0.1383 **	0.2429 ± 0.1058 **	1.5739 ± 0.6803 **

注: \*  $P < 0.05$ , 与正常组比较; \*\*  $P < 0.05$ , 100 或 200 mg/L 组与 50 mg/L 组比较

变形较快,随后变形率减小,最终达到稳定态。根据得到的曲线结合标准线性固体黏弹性理论模型计算得到各组细胞的黏弹性参数  $E_0$ 、 $E_\infty$  和  $\mu$  值(见表1)。

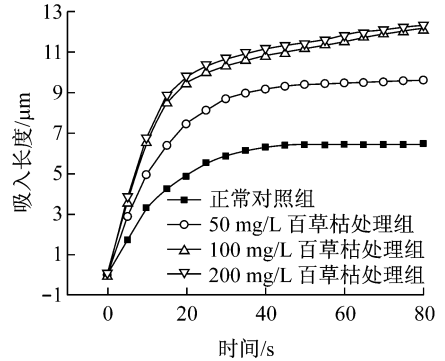


图3 343 Pa 负压下细胞吸入长度随时间变化曲线

Fig.3 Time-aspirated length curve under constant negative pressure of 343 Pa

经过统计学分析,经过百草枯处理各组 MRC-5 细胞的黏弹性各项参数均明显小于正常组 MRC-5 细胞( $P < 0.05$ ),即经过百草枯处理后 MRC-5 细胞生物力学特性降低,变得较“软”,容易发生变形。100 或 200 mg/L 百草枯处理组 MRC-5 细胞的黏弹性要小于 50 mg/L 百草枯处理组( $P < 0.05$ ),而 100 或 200 mg/L 百草枯处理组之间细胞的黏弹性无明显差异( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

百草枯中毒致肺纤维化是临床常见的中毒性肺纤维化。口服急性中毒后经消化道进入机体的百草枯主要聚集于肺部,引起以肺出血、肺水肿等为特征的肺损伤,炎症细胞渗出和浸润逐渐减少,肺成纤维细胞和胶原纤维增生,肺泡壁增厚;后期气腔(肺泡、肺泡管、细支气管)变形,扩张成囊状,进行性地

发展为不可逆的肺纤维化<sup>[4]</sup>。肺纤维化是百草枯中毒后导致呼吸衰竭死亡的重要原因,调查发现即使是百草枯中毒经抢救后存活者也大多存在肺间质纤维化,导致愈后不佳<sup>[5-6]</sup>。因此,对于百草枯中毒致肺纤维化的治疗越早越好。

本文从细胞水平研究了百草枯中毒初期对肺成纤维细胞的影响,发现在百草枯处理后,初期由于百草枯的毒性作用导致肺成纤维细胞增殖指数随剂量依赖性地降低,并有部分成纤维细胞死亡;而在形成肺纤维化的过程中,肺成纤维细胞会异常增生,说明肺成纤维细胞会在百草枯排出体外后,由于细胞数量的减少而发生代偿性增殖。因此,在中毒初期调节肺成纤维细胞的增殖可能是一个有效控制肺纤维化发生的途径。细胞表面结构及细胞骨架的结构会影响细胞的生物力学特性<sup>[7-8]</sup>。在中毒初期,由于百草枯的毒性作用引起细胞的形态结构发生变化,细胞自身的生物力学特性降低,容易发生变形,说明肺成纤维细胞的细胞表面结构及细胞骨架的结构发生改变,在移除百草枯的作用之后,细胞自身进行修复,分泌大量胞外基质,形成大量纤维,最终导致肺纤维化。

肺是一个不断进行呼吸运动的活动器官,呼吸运动引起的肺部变形会使肺成纤维细胞处于一个动态的力学环境中。力学刺激会影响成纤维细胞的增殖及细胞因子表达<sup>[9-10]</sup>,因此,在肺纤维化的过程中力学刺激可能起着重要的作用。另外,一些细胞因子(如 TGF- $\beta$ )以及酶类(如 MMPs),异常表达也伴随整个肺纤维化的过程<sup>[11]</sup>。本文仅对百草枯中毒初期肺成纤维细胞增殖及生物力学特性的影响进行初步研究,有关百草枯中毒后导致肺纤维化的过程中肺成纤维细胞增殖、肺成纤维细胞生物力学特性变化(如细胞骨架的组成与结构的变化等)与细胞因子之间的调控关系,以及力学刺激在肺纤维化发病过程中的作用等方面的进一步研究,可以从新的角度理解肺纤维化的发病机制,为寻找有效的、新的治疗方案奠定基础。

## 参考文献:

- [1] 陈维毅,王超英,张全有,等. 实验性近视眼巩膜成纤维细胞黏弹性研究[J]. 医用生物力学, 2007, 22(1): 26-29.  
Chen WY, Wang CY, Zhang QY, et al. Viscoelastic properties of scleral fibroblasts in experimental myopia [J]. J Med Biomech, 2007, 22(1): 26-29.
- [2] 田海霞,王超英,陈维毅,等. 利用后巩膜加固术治疗家兔近视眼后成纤维细胞生物力学性能变化[J]. 医用生物力学, 2010, 25(3): 190-194.  
Tian HX, Wang CY, Chen WY, et al. Biomechanical properties of fibroblasts after posterior scleral reinforcement treatment for rabbit experimental myopia [J]. J Med Biomech, 2010, 25(3): 190-194.
- [3] Zhang QY, Wang XH, Wei XC, et al. Characterization of viscoelastic properties of normal and osteoarthritic chondrocytes in experimental rabbit model [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2008, 16(7): 837-840.
- [4] Yamashita M, Yamashita M, Ando Y. A long-term follow-up of lung function in survivors of paraquat poisoning [J]. Hum Exp Toxicol, 2000, 19(2): 99-103.
- [5] Onyon LJ, Volans GN. The epidemiology and prevention of paraquat poisoning. [J]. Hum Toxicol, 1987, 6(1): 19-29.
- [6] 姜楠,周志俊. 百草枯致肺纤维化机制的研究进展[J]. 职业卫生与应急救援, 2006, 24(4): 180-182.
- [7] Ingber DE. Cellular tensegrity I: Cell structure and hierarchical systems biology [J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 7): 1157-1173.
- [8] Stamenović D. Effects of cytoskeletal prestress on cell rheological behavior [J]. Acta Biomaterialia, 2005, 1(3): 255-262.
- [9] 王国辉,陈维毅,谢永芳. 力学刺激对巩膜成纤维细胞增殖活性及 CTGF 表达的影响[J]. 医用生物力学, 2010, 25(3): 186-189.  
Wang GH, Chen WY, Xie YF. Effects of mechanical stimulation on proliferation activity and CTGF expression of sclera fibroblasts [J]. J Med Biomech, 2010, 25(3): 186-189.
- [10] Wang GH, Xie YP, Shi D, et al. The effects of mechanical stimulation on proliferation and CTGF expression of human lung fibroblast [C]// Proceedings of the 4th International Conference on Biomedical Engineering and Informatics. Shanghai, China: [s. n.], 2011: 1554-1557.
- [11] 陈海峰,段国兴. 肺纤维化发病机制研究进展[J]. 预防医学情报杂志, 2004, 20(4): 386-388.