

二甲基甲酰胺吸入致大鼠急性胃损伤的研究

穆进军¹, 刘越连², 刘来有¹, 安小敏³

(1. 山西医科大学第二医院, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001; 3. 山西医科大学实验中心, 山西 太原 030001)

摘要: 目的 通过动物实验探讨二甲基甲酰胺 (DMF) 对大鼠胃黏膜急性损伤的机制。方法 大鼠静式吸入不同浓度 (1 446.2 mg/m³, 3 212.3 mg/m³, 6 524.0 mg/m³) 的二甲基甲酰胺气体, 观测胃黏膜大体损伤情况、胃黏膜的病理改变及胃黏膜血流 (GMBF)、黏膜结合黏液量、谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA)、前列腺素 E₂ (PGE₂)、胃泌素 (Gas) 等指标。结果 3 个浓度组均见胃黏膜出血、糜烂等明显损伤, 黏膜结合黏液量降低; 低浓度组胃黏膜内谷胱甘肽降低, 低、中浓度组胃泌素降低 ($P < 0.05$); 光镜下各浓度组均可见黏液减少, 黏膜出血、充血明显, 黏膜紊乱。透射电镜可见颈黏液细胞与壁细胞核破裂, 核内物质溢出核外。结论 二甲基甲酰胺使胃黏膜出血糜烂, 可能是损害了颈黏液细胞, 使其分泌黏液的能力降低, 影响胃的黏液-黏膜屏障系统, 并且使胃泌素分泌减少使其营养胃黏膜的作用减弱。

关键词: 二甲基甲酰胺; 胃损伤; 结合黏液量

中图分类号: R135.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)06-0336-03

A study on gastric mucosal damage in rats caused by acute inhalation of dimethylformamide

MU Jin-jun¹, LIU Yue-lian², LIU Lai-you¹, AN Xiao-min³

(1. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Shaxi Medical University Public Health college, Taiyuan 030001, China; 3. Shaxi Medical University Center of Madical Experimentation, Taiyuan 030001, China)

Abstract: **Objective** To study mechanisms of dimethylformamide (DMF) on acute gastric mucosal damage in rats. **Method** Wistar rats were exposed to DMF vapor by static inhalation at different concentrations (1 446.2 mg/m³, 3 212.3 mg/m³ and 6 524.0 mg/m³, respectively). Pathological change in gastric mucosa was observed by gastric mucosal injury index. Gastric mucosal blood flow (GMBF), volume of gastric mucosa binding mucus secretion, and levels of glutathione (GSH), malonyldialdehyde (MDA), prostaglandin 2 (PGE₂) and gastrin were assessed. **Result** Gastric mucosal bleeding, obvious congestion and erosion, and decrease in mucus secretion could be seen under a light microscope in all groups with reduced volume of gastric mucosa binding mucus secretion. Level of GSH in group of low-dose DMF decreased and level of gastrin decreased significantly in groups of low- and medium-dose DMF ($P < 0.05$). Broken nuclei in gastric parietal cells and mucus neck cells and leak of nuclear mass could be seen under electron microscope. **Conclusion** DMF may damage mucus neck cells and parietal cells causing reduction of their mucus secretion and destruction of gastric mucosa mucus barrier system. Reduced gastrin secretion could also reduce its nutritional effect on gastric mucosa.

Key words: N-dimethylformamide; Gastric mucosal injury; Mucosa binding mucus

二甲基甲酰胺是一种广泛使用的两性有机溶剂, 工业上主要用于纤维合成、制革、制药、制鞋等行业; 属中等毒性, 是以肝脏为主要靶器官的多器官损害物质; 在中毒病例中恶心、呕吐、腹痛、食欲不振等胃肠道症状较为普遍^[1]; 胃镜检查可见黏膜充血、水肿、糜烂、散在小出血点等。为了探讨二甲基甲酰胺对胃损伤的致病原因, 我们以大鼠吸入二甲基甲酰胺气体染毒模拟实际接触情况, 观察胃的各种损伤和保护因子的变化, 以寻找二甲基甲酰胺对胃损伤的机制。

1 材料和方法

1.1 动物

成年雄性 Wistar 大鼠 180~220 g, 山西医科大学动物中心提供。

1.2 试剂

N, N-二甲基甲酰胺、中性红 (上海化工厂生产), 阿利新兰 (上海化学试剂公司), DTNB (Sigma 公司产品), 丙二醛 (MDA) 试剂盒及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 胃泌素放射免疫分析药盒、H³ 标记前列腺素 E₂ 放免药盒 (北京北方生物技术研究所), 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 动物分组及染毒

48 只大鼠随机分为两部分, 每部分随机分为高、

收稿日期: 2005-02-02; 修回日期: 2005-05-23

作者简介: 穆进军 (1950-), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事职业中毒的诊断治疗。

中、低浓度组和 1 个对照组, 每组 6 只; 低浓度组 DMF 原液 2 ml (1 446.2 mg/m³), 中浓度组 DMF 原液 3 ml (3 212.3 mg/m³), 高浓度组 DMF 原液 4.5 ml (6 524.0 mg/m³)。静式吸入染毒, 染毒柜体积 0.3 m³, 顶部装有风扇, 吸有毒物的 9 张滤纸悬挂在染毒柜空中充分挥发, 柜内空气中的 DMF 浓度用羟胺-氯化铁比色法进行动态测定。每 3 只大鼠使用一个染毒柜, 2 只柜同时应用, 每天染毒 1 次, 每次 4 h, 共染毒 5 d。第一部分动物测定胃黏膜血流和胃黏膜损伤情况。第二部分动物测定胃酸、黏膜结合黏液量、胃泌素、前列腺素、谷胱甘肽、丙二醛。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 第一部分 大鼠最后一次染毒后禁食 24 h, 禁水 1 h, 以 10% 乌拉坦腹腔注射麻醉, 剖腹, 于十二指肠距幽门 1 cm 处切 1 个直径 0.3 cm 切口, 插入直径 0.3 cm 塑料导管至幽门处作引流用, 结扎幽门, 结扎贲门, 胃黏膜血流按改良中性红清除法测定^[2]。放血处死, 取胃沿胃大弯剪开用 1% 甲醛溶液固定 1 h, 计算胃黏膜溃疡指数 (UI)。斑点糜烂计 1 分, 糜烂长度 < 1 mm 计 2 分, 1~2 mm 计 3 分, 2~3 mm 计 4 分, 3~4 mm 计 5 分, > 5 mm 分段计分; 直径 > 1 mm 者计分乘以毫米数^[3]。

1.4.2 第二部分 大鼠最后一次染毒后禁食 24 h、禁水 1 h, 10% 乌拉坦腹腔注射麻醉, 股静脉采血 2 ml 分离血清, 用放免法测胃泌素。放血处死, 剖腹取胃, 沿胃大弯剪开用 5 ml 生理盐水冲洗胃内容物, 离心以酸度计测其 pH 值。胃体部取一小块即刻液氮冷冻, 用放免法测前列腺素 E₂。另取约 0.3 g 胃体组

织 2 块, 用 0℃ 生理盐水漂洗, 滤纸吸干水分, 一块与 5% 三氯乙酸按 1:5 尽快制成匀浆, 用 Beutler 改良法测谷胱甘肽含量^[4]; 另一块与生理盐水制 10% 匀浆, 离心后测丙二醛。另取一块制光镜、电镜标本。剩余的胃组织漂洗, 滤纸吸干水分, 称重外翻放入 20 ml 阿利新蓝染液中, 孵育 2 h 后将胃取出, 取 7 ml 孵育液放入试管离心, 取上清液于 615 nm 波长比色。根据下列公式计算结合染料量: $4-4 \times \text{实测管光密度} / \text{标准管光密度} = \text{结合染料量}$ ^[3]。

1.5 统计学处理

用 SPSS 统计软件进行数据处理, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 各指标测定

低、中、高浓度组胃黏膜糜烂和出血均较明显, 胃黏膜损伤指数与对照组比均差异有显著性 ($P < 0.05$)。胃液 pH 值 3 组均降低, 仅高浓度组与对照组比较差异有显著性, 说明高浓度组胃酸分泌增加。胃黏膜血流 (GMBF) 值与对照组比较降低, 但统计学差异不显著, 不能说明 DMF 能使胃黏膜血流降低。胃壁结合黏液量 3 个浓度组均低于对照组, 且差异有非常显著性。胃体部组织谷胱甘肽含量只有低浓度组明显低于对照组且差异有显著性。胃组织中丙二醛含量均高于对照组, 但差异无显著性。血中胃泌素含量低、中浓度组明显低于对照组且差异有显著性, 而高浓度组差异无显著性。前列腺素各组稍低于对照组, 差异无显著性。丙氨酸转氨酶 (ALT) 活性, 3 个浓度组均高于对照组, 且差异有非常显著性。详见表 1。

表 1 DMF 对胃黏膜影响的各指标测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 损伤指数 (分) | 胃酸 (pH) | 胃黏膜血流 (ml/kg·h) | 结合黏液量 (mg) | 谷胱甘肽 (μg/100mg 组织) | 丙二醛 (nmol/mg Pro) | 胃泌素 (pg/ml) | 前列腺素 E ₂ (pg/mg 湿重) | ALT (U/L) |
|------|--------------|---------------|-----------------|---------------|--------------------|-------------------|-----------------|--------------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 0 | 3.88 ± 0.63 | 7.47 ± 2.78 | 1.16 ± 0.07 | 11.03 ± 2.60 | 0.64 ± 0.45 | 68.53 ± 12.41 | 3.684 87 ± 3.025.62 | 23.09 ± 5.9 |
| 低浓度组 | 12.2 ± 8.4 * | 3.40 ± 0.50 | 6.20 ± 1.75 | 0.50 ± 0.21 * | 7.45 ± 0.86 * | 0.65 ± 0.19 | 51.90 ± 10.26 * | 3.225 49 ± 2.378.57 | 60.95 ± 1.3 [△] |
| 中浓度组 | 9.4 ± 6.0 * | 3.33 ± 0.19 | 7.31 ± 2.20 | 0.62 ± 0.11 * | 11.01 ± 1.30 | 0.70 ± 0.23 | 47.32 ± 14.70 * | 3.138 86 ± 1.229.94 | 60.58 ± 15.0 [△] |
| 高浓度组 | 13.2 ± 8.5 * | 3.06 ± 0.34 * | 6.55 ± 2.12 | 0.74 ± 0.11 * | 9.79 ± 1.70 | 0.79 ± 0.48 | 60.23 ± 14.21 | 3.639 22 ± 1.653.11 | 61.53 ± 15.2 [△] |

与对照组比较 α=0.05, *P<0.05, △P<0.01

2.2 病理改变

光镜下 DMF 吸入染毒后可见胃黏膜黏液减少, 黏膜腺体结构紊乱, 黏膜组织中血管充血明显, 出血、糜烂并有血细胞大量附着于黏膜面。电镜可见正常对照组壁细胞、颈黏液细胞、核圆, 而 DMF 各染毒组两种细胞核不规则, 呈分叶状, 有破溃, 核内容物溢出核外。

3 讨论

二甲基甲酰胺主要经过呼吸道和皮肤引起人体中毒, 进入体内的 DMF 在 P4502E1 等的作用下生成有毒的活性中间产物异氰酸甲酯, 损害机体大分子物质, 而体内的 GSH 与异氰酸甲酯作用而减毒。DMF 主要引起肝脏等消化器官的损害, 且对肾脏及免疫系统、生殖系统等也有影响。中毒性肝 (下转第 340 页)

抗中暑内毒素血症的重要机制之一。

热毒平提高巨噬细胞吞噬能力的机制,至今尚不清楚。本实验显示热毒平在阻断由 TNF- α 所诱导的巨噬细胞凋亡中扮演了重要的角色。TNF- α 是由内毒素激活巨噬细胞所释放的细胞因子^[8],它不仅参与引起发热、休克等病理过程,而且还是诱导细胞凋亡的“死亡信号”。细胞凋亡是一种不同于病理性坏死的细胞死亡形式,是细胞在一定的生理或病理条件下,受内在基因调控,通过主动的生化过程而自杀死亡的现象。它是机体删除过度增生的、机体不再需要的或已发生突变的细胞,以及清除攻击自身组织的免疫细胞,从而保持细胞处于正常的动态平衡的重要形式。但各种刺激因素引起的过度凋亡会对机体产生不利影响^[9,10]。TNF- α 能与特异性的死亡受体 TNFR1 结合,引起细胞内贮存 Ca²⁺ 释放,使细胞内游离 Ca²⁺ 浓度升高,继而激活 caspase 酶,导致细胞凋亡^[11]。凋亡细胞增多时,必然导致组织器官的功能下降和损伤。实验中西黄芪胶组、生理盐水组和高温对照组的 TNF- α 含量升高,巨噬细胞出现严重的凋亡,吞噬能力明显下降,而热毒平组的 TNF- α 的含量与正常对照组相近,巨噬细胞的凋亡率较低,吞噬能力提高,这一方面证明了 TNF- α 与巨噬细胞凋亡的关系,另一方面也说明了抗由 TNF- α 诱导的巨噬细胞凋亡是热毒平提高巨噬细胞吞噬能力的重要手段。

(上接第 337 页) 损害与出血性胃肠炎同为二甲基甲酰胺中毒时的诊断标准^[3],表现为恶心、呕吐、腹胀、腹痛,内窥镜可见胃及十二指肠黏膜充血、水肿、糜烂,伴出血点。本实验各染毒组 ALT 活性明显增高说明肝损害明确。病理观察表明吸入高浓度 DMF 气体确可引起胃黏膜充血、出血、糜烂等病变,胃黏膜损害程度随染毒剂量增加而趋于严重。不同浓度染毒组均有胃黏膜黏液减少,黏液层变薄,黏膜紊乱,黏膜层血管高度扩张、充血明显。值得注意的是电镜观测到壁细胞和颈黏液细胞的细胞核均有破裂现象,核内容物溢出核外,颈黏液细胞核破裂使细胞的结构功能受损,分泌的黏液量减少,胃黏膜的黏液-碳酸氢盐屏障破坏,发生出血、糜烂,此可能为 DMF 导致胃黏膜损害的重要原因之一。胃泌素水平的减低,导致胃黏膜的营养作用障碍,可能加重 DMF 对胃的损害^[9]。低浓度组谷胱甘肽低于对照组且差异有显著性,而中、高浓度组呈减少趋势,但差

异无显著性,这与其他实验所证明的 DMF 的摄入量越多毒性出现的时间就越晚一致^[7]。本实验尚无法判定 DMF 对胃黏膜血流、前列腺素及氧化损伤的影响,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 邓文龙,徐嘉红,王文烈,等.热毒平的抗内毒素作用研究[J].中药药理与临床,1995,11(2):13-15.
- [2] 李文,罗炳德,杨光,等.热毒平抗中暑内毒素血症的作用研究[J].中国工业医学杂志,2005,18(1):44-46.
- [3] 张顺财.内毒素基础与临床[M].北京:科学出版社,2003.194-196.
- [4] 梁再赋,李铁皮,赵慕丽,等.肺疾患肺泡巨噬细胞功能的变化[J].中国医科大学学报,1995,24(1):12-13.
- [5] 罗炳德,闫文生,万为人,等.实验性中暑兔血浆内毒素与血液学指标的变化[J].中国煤炭工业医学杂志,1999,2(4):386.
- [6] 李泽,罗炳德,闫艳.抗内毒素措施应用于中暑防治的展望[J].中国公共卫生,2000,16(8):753.
- [7] 朱国标,李素华,丛桦.高温及游泳对腹腔巨噬细胞的影响[J].西南国防医药,1994,(3):141-142.
- [8] 张顺财.内毒素基础与临床[M].北京:科学出版社,2003.76-78.
- [9] Ucker DS. Death by suicide: One way to go in mammalian cellular development [J]. New Biol, 1991, (3): 102-103.
- [10] Walker PR, Simith C, Youdale YJL, et al. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induced apoptosis in thymocytes [J]. Cancer Res, 1991, (51): 1076-1078.
- [11] 张顺财.内毒素基础与临床[M].北京:科学出版社,2003.79.

异无显著性,这与其他实验所证明的 DMF 的摄入量越多毒性出现的时间就越晚一致^[7]。本实验尚无法判定 DMF 对胃黏膜血流、前列腺素及氧化损伤的影响,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 杨水莲,周薇颖,江朝强,等.职业性二甲基甲酰胺中毒的临床分析[J].中国工业医学杂志,2000,13(4):212-214.
- [2] 彭贵祖.改良中性红清除法应用于大鼠胃黏膜血流测定[J].江西医药,2002,37(21):10-12.
- [3] 张瑞,郭文栋.内源性一氧化氮预防大鼠乙醇性胃黏膜损伤的研究[J].中国病理生理杂志,1999,15(11):1038-1040.
- [4] 赵旭东,魏东芝,万群,等.谷胱甘肽的简便测定法[J].药物分析杂志,2000,20:14-37.
- [5] GBZ85—2002.职业性急性二甲基甲酰胺中毒诊断标准·附录 A [S].
- [6] 邵淑丽,刘庆华,徐兴军.胃黏膜保护机制的研究[J].齐齐哈尔大学学报,1998,14(3):89-91.
- [7] 郭风华,穆进军,姚女琳.二甲基甲酰胺急性肝损伤与肝脏谷胱甘肽的关系[J].中华劳动卫生职业病杂志,2001,19(6):424-426.