

氯磷定对小鼠全氟异丁烯中毒的防治作用

张宪成¹, 徐进², 林娟³, 邵志华², 黄春倩¹, 孙晓红¹, 张天宏¹, 赵建¹, 丁高¹

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 浙江衢化医院, 浙江 衢州 324004; 3. 烟台市市直机关医院, 山东 烟台 264000)

摘要: 目的 为了寻找全氟异丁烯 (PFIB) 致急性肺损伤的防治药物。方法 用气相色谱测定 PFIB 染毒浓度及氯磷定与 PFIB 的化学反应转化率。小鼠吸入 PFIB 染毒 24 h 后, 观察小鼠用氯磷定治疗后肺重量系数的变化, 测定小鼠肺灌洗液 (BALF) 中总蛋白含量。结果 用氯磷定预防给药组动物的肺重量系数及 BALF 中总蛋白含量显著降低, 同时, 中毒动物的存活率也明显提高。用气相色谱测定的氯磷定与 PFIB 的化学反应转化率为 64.8%, 说明 PFIB 比较容易与羟基离子结合。以上结果说明, 氯磷定可降低 PFIB 的毒性, 氯磷定对 PFIB 致急性肺损伤的防治作用很可能与它的化学亲核反应有关。结论 氯磷定抑制了 PFIB 中毒小鼠肺组织的蛋白漏出, 降低了中毒动物的肺重量系数和提高了存活率。氯磷定对 PFIB 中毒具有一定预防抗毒效果。

关键词: 全氟异丁烯; 氯磷定; 急性肺损伤; 吸入毒性

中图分类号: R563 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)05-0264-03

Effects of 2-PAM on acute lung injury induced by PFIB inhalation in mice

ZHANG Xian-cheng¹, XU Jin², LIN Juan³, SHAO Zhi-hua², HUANG Chun-qian¹, SUN Xiao-hong¹, ZHANG Tian-hong¹, ZHAO Jian¹, DING Ri-gao¹

(1. Institute of Toxicology and Pharmacology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China; 2. Zhejiang Qihua Hospital, Quzhou 324004, China; 3. The Municipal Hospital of Yantai City, Yantai 264000, China)

Abstract Objective To study the effects of 2-PAM on acute lung injury induced by perfluoroisobutylene (PFIB). **Method** PFIB concentration and its chemical transformation efficiency with 2-PAM were determined by gas chromatography, and the total protein concentration in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung wet/dry weight ratio were also determined at 24th hour after inhalation of PFIB, meanwhile, the effects of 2-PAM on mice before or after PFIB exposure were observed, too. **Result** The preventive administration of 2-PAM could greatly lower the wet/dry ratio of lung-to-body weight in mice, the survival ratio was also risen in this group, and its chemical transformation efficiency was 64.8%. It was suggested that PFIB should be easy to combine with hydroxyl ion, 2-PAM might reduce the toxicity of PFIB. Therefore, it could be considered that the good effect of 2-PAM might be related to its nucleophilic property. **Conclusion** 2-PAM could significantly suppress the leakage of protein in lung, reduce the wet/dry ratio of lung-to-body weight ratio and elevate the survival rate of PFIB inhaled in mice, thereby has a definite preventive effect on ALI caused by PFIB inhalation.

Key words: Perfluoroisobutylene (PFIB); 2-PAM; Acute lung injury (ALI); Inhalation toxicity

全氟异丁烯 (perfluoroisobutylene, PFIB) 来源于氟塑料副产物及高温裂解产物, 是一种无色无味 (高浓度稍有青草味)、其中毒很难防护和治疗的高毒性气体。PFIB 主要通过呼吸道吸入中毒, 导致肺水肿而危及生命。目前实验治疗学上, PFIB 中毒的治疗药物研究有所进展, 如 Lailey 等^[1,2] 发现, 动物 PFIB 中毒后, 体内及时补充 *N*-乙酰半胱氨酸, 将会对 PFIB 中毒性肺水肿有一定保护性抗毒效果; 赵建等^[3] 研究了盐酸四环素类药物对 PFIB 中毒的防治作用。盐酸四环素可抑制小鼠肺内中性粒细胞弹性蛋白酶的活力, 改善中毒肺水肿症状, 提高动物存活率,

呈现了预防或治疗效果。尽管如此, 这些防治措施仍离实际要求相差很大。为了寻找有效治疗药物与措施, 本实验根据 PFIB 体外化学反应原理^[4], 研究探讨了氯磷定对小鼠 PFIB 中毒的防治作用。

1 材料和方法

1.1 材料

ICR 小鼠, 18~22 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司。PFIB, 98%, 上海有机材料研究所; 氯磷定, 军事医学科学院毒物药物研究所提供; 考马斯亮蓝 (comassie blue), 美国 Amersco 公司分装; 考马斯亮蓝溶液: 称取 100 mg 考马斯亮蓝 G-250, 溶于 50 ml 95%乙醇, 加入 100 ml 磷酸, 加蒸馏水至总体积 1 L, 用新华滤纸过滤, 置冰箱 (4℃左右) 备用; 牛血清白蛋白 (BSA), 上海丽珠东风生物技术公司,

收稿日期: 2006-03-20; 修回日期: 2006-05-22

作者简介: 张宪成 (1952-), 男, 高级实验师。

BSA 标准溶液 0.5 mg/ml; 氯化钠, 0.15mmol/L. Autosystem XL 气相色谱仪, 检测器 FID, 美国 Perkin Elmer 公司; 高速冷冻离心机 Universal-16 型, 德国 Hettucg 公司; 分光光度计 UV-160A 型, 日本岛津株式会社; 动物染毒系统及染毒实施方法详见文献[5].

1.2 方法

1.2.1 PFIB 与氯磷定体外化学反应转化率测定
在 50 ml 反应器内, 分别加入 0、0.1、1.0 和 10 mg/ml 氯磷定 5 ml, 再加入 PFIB 0.2 μg/ml 20 ml, 上下充分振摇 5 min (180~200 次/min). 然后取反应器内的气体样品, 进行色谱分析. 在 PFIB 定量曲线上求出反应前后反应器内剩余 PFIB. PFIB 转化率 (%) = (PFIB_{反应前} - PFIB_{反应后}) / PFIB_{反应前} × 100

1.2.2 动物染毒和肺重量系数测定 用自制的吸入染毒装置对动物实施动态吸入 PFIB 全身暴露染毒, PFIB 染毒浓度 (0.135 ± 0.005) mg/L, 动物吸入染毒 5 min, 用气相色谱检测 PFIB 染毒浓度.

将小鼠分为染毒对照组、药物预防组 (动物染毒前 15 min 腹腔给药预防)、药物治疗组 (染毒后 1 h 给药治疗) 和药物对照组. 动物随机分组, 每组 12 只, 染毒前 24 h 禁食不禁水. 于染毒 24 h 后, 将动物腹主动脉放血处死, 取肺组织, 测定肺重量系数 (湿肺体比, 干肺体比, 肺湿干比和肺含水率). 另设实验组, 观察动物 72 h 内存活率^[2].

1.2.3 小鼠肺灌洗液 (BALF) 中总蛋白含量测定
试管中分别加入 BSA 标准溶液 0、5、10、15、20、40、60、80 和 100 μl, 用氯化钠溶液补充至 100 μl. 分别加考马斯亮蓝溶液 5 ml, 混匀, 室内放置 2 min. 然后在分光光度计波长 595 nm 处测定光密度值, 绘制标准曲线.

动物染毒 24 h 后, 腹主动脉放血处死, 打开胸腔, 分离出气管, 用 0.6 ml 生理盐水作肺灌洗液, 重复 3 次, 每次灌洗的 BALF 在肺内停留 5 s, 搜集合并 BALF. 取 0.5 ml 搜集的 BALF, 加入到塑料离心管中, 离心机上 (4℃) 离心 10 min (1 500 r/min). 取离心的 BALF 20 μl, 加 1.5 mmol/L 生理盐水 80 μl, 混合均匀, 其他同标准曲线的操作方法. 测定光密度值, 在标准曲线上求出 BALF 中总蛋白含量.

肺重量系数和蛋白含量实验数据, 以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 Dunch 检验, 单因素方差分析, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义. 存活率用 χ^2 检验, 显著水平 $P < 0.05$.

2 结果

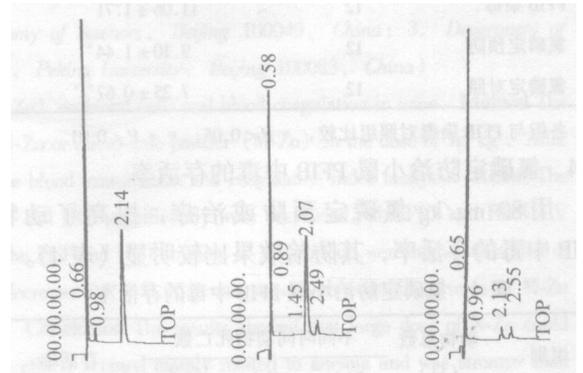
2.1 氯磷定与 PFIB 体外化学反应转化率

实验选择氯磷定作为 PFIB 的化学反应亲核剂, 用气相色谱测定反应器内氯磷定与 PFIB 反应后剩余 PFIB 浓度, 并计算出氯磷定与 PFIB 的体外化学反应转化率 (表 1).

表 1 氯磷定和 PFIB 体外化学反应的转化率

氯磷定 (mg/ml)	n	剩余 PFIB (mg/ml)	PFIB 转化率 (%)	
PFIB 标准样	0	5	0.183 6 ± 0.010 8	—
反应前对照	10	5	0.183 8 ± 0.006 1	—
反应 A	0.1	3	0.107 8 ± 0.006 5	41.35
反应 B	1.0	3	0.073 8 ± 0.006 9	59.85
反应 C	10	3	0.064 7 ± 0.007 0	64.80

PFIB 原形的气相色谱保留时间为 2 min, 氯磷定与 PFIB 反应前, PFIB 浓度变化不大, 反应介质中仅出现少量 PFIB 分解产物 ($t = 2.5$ min). PFIB 与氯磷定反应后, 大部分 PFIB 原形转化后消失 (图 1). 本实验条件下 PFIB 与氯磷定的化学反应最大转化率为 64.8%. 以 PFIB 体外化学反应为基础, 拟进一步观察氯磷定对 PFIB 染毒动物肺水肿的预防和治疗作用.



PFIB 标准 氯磷定和 PFIB 反应前 氯磷定和 PFIB 反应后
PFIB 保留时间: 2 min; 反应后产物: 2.5 min

图 1 氯磷定和 PFIB 化学反应前后的气相色谱图

2.2 氯磷定对 PFIB 染毒小鼠肺重量系数的改善作用
小鼠 PFIB 染毒前后分别用氯磷定预防或治疗 (腹腔给药), 中毒后 24 h 活杀动物取肺测定肺重量系数.

氯磷定药物对照组中的肺重量系数均无明显变化, 说明它对仅给氯磷定对照组动物的肺重量系数无影响. PFIB 染毒对照组小鼠肺部严重充血, 肺支气管充满泡状分泌液体, 肺重量系数显著升高, 呈现严重肺水肿症状. 用氯磷定给药预防或治疗后, 染毒小鼠的肺体比下降, 随氯磷定剂量升高, 肺重量系数的改善作用明显. 用氯磷定 20 mg/kg 预防, 肺重量系数有所降低, 已呈现改善效果. 氯磷定 80 mg/kg 预防和治疗小鼠 PFIB 中毒的肺重量系数都有显著的改善, 其预防给药组比治疗给药组的防治效果明显 (表 2).

表 2 氯磷定防治小鼠 PFIB 中毒的肺重量系数变化 (n=12)

组别	湿肺体比		干肺体比		肺湿干比	
	20 mg/kg	80 mg/kg	20 mg/kg	80 mg/kg	20 mg/kg	80 mg/kg
PFIB 染毒	98.72±13.34	98.41±18.90	19.50±1.69	18.18±1.79	5.05±0.48	5.36±0.60
氯磷定预防	88.74±9.09	80.27±4.53**	18.21±1.25*	16.60±0.74**	4.87±0.27	4.83±0.12**
氯磷定治疗	92.83±10.23	85.21±6.22*	18.67±1.83	17.23±1.03*	4.97±0.25	4.94±0.21*
氯磷定对照	64.34±7.03**	68.34±3.96**	14.37±1.42**	15.20±0.91**	4.54±0.095**	4.50±0.09**

各组与 PFIB 染毒对照组比较, *P<0.05, **P<0.01

2.3 氯磷定对 PFIB 中毒小鼠 BALF 中蛋白含量的影响

小鼠 PFIB 染毒后 24 h 肺内总蛋白含量升高, 证明肺毛细血管通透性增强, 肺组织蛋白严重渗出。当用 60 mg/kg 氯磷定预防性给药后, 动物肺灌洗液中蛋白含量明显降低, 与中毒对照组比较差异有统计学意义 (表 3)。由此看出, 氯磷定可抑制 PFIB 中毒引起的肺组织的蛋白渗出。说明氯磷定对小鼠 PFIB 中毒具有一定预防效果。

表 3 氯磷定防治小鼠 PFIB 中毒 BALF 中总蛋白含量 mg/kg

组别	n	BALF 中总蛋白含量
PFIB 染毒	12	11.06±1.71
氯磷定预防	12	9.10±1.44*
氯磷定对照	12	7.25±0.67**

各组与 PFIB 染毒对照组比较, *P<0.05, **P<0.01

2.4 氯磷定防治小鼠 PFIB 中毒的存活率

用 80 mg/kg 氯磷定预防或治疗, 提高了动物 PFIB 中毒的存活率, 其防治效果比较明显 (表 4)。

表 4 氯磷定防治小鼠 PFIB 中毒的存活率

组别	动物总数 (只)	不同时间动物死亡数			存活率
		24 h	48 h	72 h	
氯磷定预防	12	1	0	0	11/12**
氯磷定治疗	12	2	2	0	8/12*
PFIB 染毒	12	6	4	0	2/12

各组与 PFIB 染毒对照组比较, *P<0.05, **P<0.01

3 讨论

PFIB 吸入性肺损伤与肺内巯基蛋白的消耗有关。Lailey 实验证明, 动物 PFIB 中毒以后, 肺内将消耗大量半胱氨酸活性物质, 体内补充胱氨酸、乙酰半胱氨酸会减轻肺水肿程度, 提高动物存活率^[1]。因此, 体内补充乙酰半胱氨酸对 PFIB 中毒具有一定保护性作用。蛋白质的巯基系敏感的特征官能团, 具有亲核性。它与 PFIB 作用后降低了肺内的这些活性物质, 破坏了蛋白质结构, 损伤蛋白质分子, 从而影响肺内细胞的代谢功能。此外, 由于 PFIB 分子上的碳全部被氟原子取代, 使 PFIB 容易与亲核物质结合。PFIB

分子系脂肪烯烃, 具有较好的脂溶性。它的这些化学性质将影响着它的某些中毒作用特点。PFIB 经呼吸道吸入中毒后, 直接造成肺化学损伤, 可能是 PFIB 与肺内活性物质结合, 这些活性物质包括含巯基、羟基、氨基和羧基等的氨基酸。PFIB 与这些活性物质结合的速度以及结合程度与该中毒性肺水肿发展速度和中毒程度相关。因此 PFIB 的化学反应有可能与它的某些毒性作用有关。

氯磷定是用于有机磷农药中毒的重活化剂, 未见该药用于治疗 PFIB 中毒或治疗其他肺水肿的报道。本实验结果说明, 氯磷定对小鼠 PFIB 中毒具有一定防治效果, 及时预防或早期治疗效果比较明显。目前作用机制尚不清楚。根据 PFIB 体外化学反应, 氯磷定抗毒作用有可能与 PFIB 的化学亲核反应有关。PFIB 分子上的氟具有强吸电子性, 易与亲核剂发生化学反应, 氯磷定的胍基解离后, 胍基离子则是适合的亲核剂之一。氯磷定的药效主要表现在早期给药预防, 其作用是否与胍类化合物竞争性地与肺内活性物质结合有关, 有待进一步研究。

4 小结

氯磷定对小鼠 PFIB 中毒具有一定防治效果, 预防效果大于治疗效果。早期及时用氯磷定预防不但降低了中毒小鼠的肺重量系数, 也显著降低了小鼠肺内总蛋白含量, 抑制了肺内蛋白的渗出, 提高了动物存活率。

参考文献:

- [1] Lailey AF. Oral N-acetylcysteine protects against perfluoroisobutylene toxicity in rats [J]. Hum Exp Toxicol, 1997, 16: 212-216.
- [2] Lailey AF, Hill L, Lawton IW, et al. Protection by cysteine esters against chemically induced pulmonary edema [J]. Biochem Pharmacol, 1991, 42: 47-52.
- [3] 赵建, 丁日高, 阮金秀, 等. 盐酸四环素对全氟异丁烯吸入性肺损伤的治疗效果研究 [J]. 中国职业医学, 2005, 32(1): 14-17.
- [4] 张完成. 全氟异丁烯的理化性质侦检防护 [J]. 国外医学军事医学分册, 1995, 12(3): 113-118.
- [5] Wang HM, Ding RG, Ruan JX, et al. Perfluoroisobutylene-induced acute lung injury and mortality are heralded by neutrophil sequestration and accumulation [J]. Occup Health, 2001, 43(6): 331-338.