

# 四氢吡咯二硫代氨基甲酯联合应用盐酸四环素 对抗全氟异丁烯吸入性急性肺损伤

赵建, 丁高, 阮金秀, 张宪成, 孙晓红, 黄春倩, 杜先林

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要:** 目的 观察四氢吡咯二硫代氨基甲酯 (pyrrolidine dithiocarbamate PDTC) 与盐酸四环素 (tetracycline hydrochloride Tet) 联用和单用对抗全氟异丁烯 (perfluoroisobutylene PFIB) 吸入性急性肺损伤的效果差异, 为进一步提高疗效, 尽可能从多环节干预策略上提供组方依据。方法 采用小鼠动态吸入 PFIB 全身暴露染毒装置对实验小鼠进行染毒, 观察了 PDTC 与 Tet 联用对 PFIB 染毒小鼠的存活率、肺系数以及支气管肺灌洗液中蛋白含量的变化情况。结果 PDTC 预防和 Tet 治疗单独应用以及二者联用均可以显著性降低各项肺系数、减少支气管肺灌洗液中蛋白质的含量以及 PFIB 染毒小鼠的死亡率, 尤以二者联用效果为佳。结论 对 PFIB 吸入性肺损伤 PDTC 具有预防性保护作用, 盐酸四环素具有预防性保护和早期治疗作用, 两者联用可以取得较好的疗效。

**关键词:** 全氟异丁烯 (PFIB); 急性肺损伤; 四氢吡咯二硫代氨基甲酯 (PDTC); 盐酸四环素 (Tet)

**中图分类号:** R563 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2007)06-0370-03

Effects of pyrrolidine dithiocarbamate and tetracycline hydrochloride on acute lung injury induced by perfluoroisobutylene inhalation in mice

ZHAO Jian DING Gao RUAN Jin-xiu ZHANG Xian-cheng SUN Xiaohong HUANG Chun-qian DU Xian-lin  
(Institute of Pharmacology and Toxicology Academy of Military Medical Sciences Beijing 100850 China)

**Abstract** Objective To investigate the effect of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) with or without tetracycline hydrochloride (Tet) on acute lung injury (ALI) induced by perfluoroisobutylene inhalation in mice. Method The ICR mice were exposed to gaseous PFIB in a whole-body exposure system and the survival rate, lung coefficient and protein content of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in PFIB-inhaled mice were studied. Result Pretreatment with PDTC or combining Tet treatment treatment with Tet all could significantly reduce wet/dry ratio of lung, lung/body ratio and protein content in BALF. The combined application of PDTC and Tet showed a better effect on lung injury by PFIB inhalation. Conclusion Pretreatment of PDTC has preventive effect on ALI caused by PFIB inhalation. Tet also has good effect on treatment of PFIB induced ALI, and the effect seems better in combined application of PDTC and Tet.

**Key words:** Perfluoroisobutylene; Acute lung injury; Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC); Tetracycline hydrochloride (Tet)

根据我们前期的研究结果, 即 PFIB 吸入染毒所诱发的 NF- $\kappa$ B 活化以及下游致炎细胞因子的高水平表达在趋化、募集中性粒细胞局部肺组织内聚集和扣押过程中发挥着重要作用, 肺组织内积聚和扣押的中性粒细胞激活后主要通过释放弹性蛋白酶造成组织结构的破坏<sup>[1~4, 6]</sup>。同时, 初步的药物防治探索研究的结果表明, NF- $\kappa$ B 的抑制剂 PDTC 对 PFIB 吸入性肺损伤有预防性保护作用, 具有基质金属蛋白酶抑制活性的药物盐酸四环素对 PFIB 吸入性肺损伤具有预防和保护作用<sup>[2~4]</sup>。鉴于急性肺损伤是一个错综复杂的过度炎症性反应, 针对单一环节的药物作用存在其局限性, 我们拟考虑观察针对不同环节的药物联合应用

的效果, 为进一步研究防治 PFIB 吸入性肺损伤复方提供依据。因此本文选用 NF- $\kappa$ B 抑制剂 PDTC 和具有蛋白酶抑制作用的盐酸四环素进行联合用药的探索性实验研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

Tet 纯度 99%, 购自 Sigma; PDTC 纯度 99%, 购自 Sigma; PFIB 纯度 98%, 上海有机氟材料研究所提供。

### 1.2 方法与分组

ICR 小鼠, 无特异性病原菌 (SPF) 级, 雄性, 体重 18~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物实验前先适应性喂养 2~3 d, 自由饮食饮水。小鼠动态吸入 PFIB 全身暴露染毒装置及 PFIB 染毒浓度的测定方法详见文献 [5]。

收稿日期: 2007-08-01

作者简介: 赵建 (1975-) 男, 医学博士, 助理研究员, 主要从事化学源性肺损伤研究。

采用随机数字表法进行分组。随机分为 HDTC (120 mg/kg i.p. 染毒前 30 min) 预防组、Tet (40 mg/kg i.p. 染毒后 1 h) 治疗组、HDTC预防 + Tet 治疗组以及生理盐水对照组 (NS组)。

### 1.3 观测指标

(1) 小鼠肺系数测定: 肺组织取材及肺系数测定参照文献 [5] 所述方法进行。(2) PFIB染毒小鼠存活率的改变: 参照以前的研究结果, PFIB小鼠的  $LC_{50}$  为  $800 \text{ mg}/(\text{min} \cdot \text{m}^3)$ , 故选择小鼠中毒浓度为  $175 \text{ mg}/\text{m}^3$ , 中毒时间为 5 min, 观察染毒后 72 h 内 HDTC预防、Tet 治疗以及二者联用对 PFIB染毒小鼠存活率的影响。

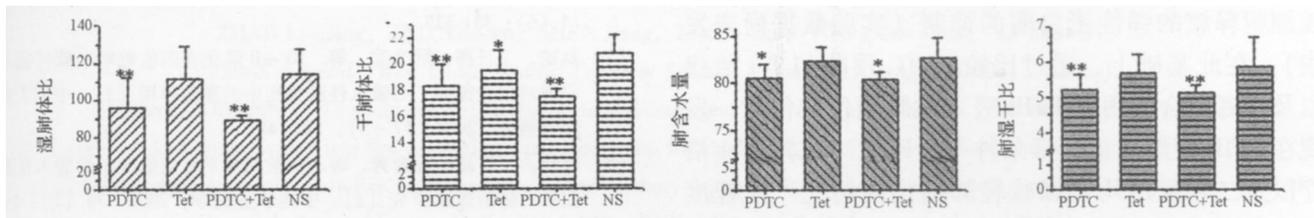
### 1.4 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。肺系数采用方差分析, 组间两两比较采用 Dunnett 检验, 存活率采用 Kaplan-Meier 生存分析。显著性水准为  $<0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 PDIC预防、Tet 治疗及联合用药对 PFIB染毒小鼠肺损伤的对抗作用

PDIC预防、Tet 治疗以及二者联用均可以显著降低染毒小鼠的肺系数, 且 HDTC和 Tet 联用减轻 PFIB吸入性肺损伤的程度最大 (图 1)。虽然 HDTC 预防和 Tet 治疗联用具有比单用 PDIC预防或 Tet 治疗效果更好的趋势, 但是,  $2 \times 2$  析因实验分析并没有发现 PDIC预防和 Tet 治疗具有交互作用。



与 NS组相比, \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

图 1 PDIC预防、Tet 治疗及联合用药对 PFIB染毒小鼠肺损伤的作用 (n=12)

### 2.2 PDIC预防、Tet 治疗及联合用药对 PFIB染毒小鼠存活率的影响

由图 2可以看出, 截至染毒后 18 h 中毒对照组小鼠的存活率为 27.8%, HDTC预防组的存活率为 66.7%, Tet 治疗组的存活率为 55.6%, HDTC预防 + Tet 治疗组的存活率为 77.8%。至染毒后 24 h PDIC预防组和 Tet 治疗组的存活率均降至 50%, 此时中毒对照组的存活率为 27.8%, 而 PDIC预防 + Tet 治疗组的存活率为 72.2%。至染毒后 48 h HDTC预防组和 Tet 治疗组的存活率均降至 38.9%, 此时中毒对照组的存活率为 22.2%, 而 PDIC预防 + Tet 治疗组的存活率为 61.1%。由此可见 PDIC预防和 Tet 治疗联用可较 PDIC和 Tet 单用具有显著提高 PFIB中毒小鼠存活率的作用。同时, 根据各处理组的生存秩和得分 (sum scores) 可以看出, NS对照组  $<$  Tet 治疗组  $<$  HDTC预防组  $<$  PDIC预防 + Tet 治疗组 (见图 3)。

分析以上结果可以发现, PFIB染毒对照组生存率下降最快, PDIC预防组和 Tet 治疗组的生存率下降次之, PDIC预防 + Tet 治疗组生存率下降最为缓慢, 而且动物死亡多发生在染毒后 24 h 以内, 由此可见, HDTC预防 + Tet 治疗组联合效果最好。

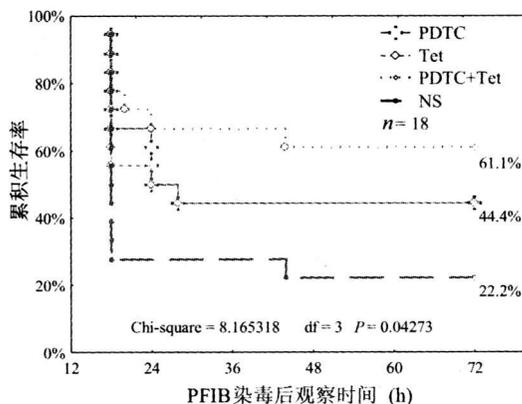


图 2 各处理组的累积生存率分析 (Kaplan-Meier 分析)

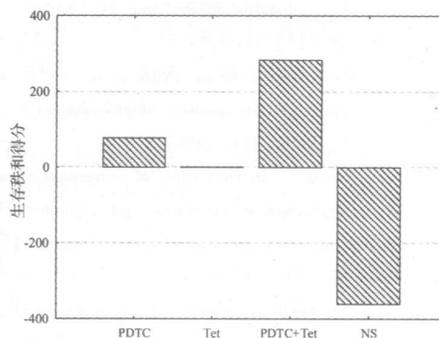


图 3 每组生存秩和的直方图分析 (n=18)

### 3 讨论

已有的研究表明, PFIB吸入性急性肺损伤与其他因素如缺血再灌注、脂多糖、油酸等所诱发的急性肺损伤相似, 即亦存在着 NF-κB激活、致炎细胞因子(如 IL-1β、IL-8、TNFα等)的过度表达、肺内中性粒细胞的聚集和扣押, 以及中性细胞分泌蛋白分解酶(主要是弹性蛋白酶)水平的显著升高等诸多环节<sup>[1, 3, 4, 6]</sup>。而且我们前期的药物干预探索研究表明 PDTC通过抑制 NF-κB活化对 PFIB吸入性肺损伤具有预防性保护作用<sup>[2, 3]</sup>, 盐酸四环素对 PFIB吸入性肺损伤具有一定的预防性保护和治疗作用<sup>[4]</sup>。盐酸四环素对抗 PFIB吸入性肺损伤的作用可能源于其对 PFIB吸入性肺损伤中肺组织局部聚集和扣押的中性粒细胞释放的弹性蛋白酶的抑制(实验数据尚未发表)。在此基础上, 通过比较 PDTC预防和 Te<sup>e</sup>治疗以及二者联合应用对 PFIB吸入性肺损伤的作用, 发现在 PFIB较低剂量染毒条件下, PDTC预防、Te<sup>e</sup>治疗以及二者联用均可以减轻肺损伤的病变严重程度(图 1), 联合应用的防治效果较好, 但是方差分析的结果表明二者之间并不存在交互作用; 在 PFIB较高剂量条件下, PDTC预防和 Te<sup>e</sup>治疗联合应用对抗 PFIB染毒小鼠死亡显著优于单独应用 PDTC预防和 Te<sup>e</sup>治疗。从而说明针对不同作用靶标的药物联合应用的效果优于单独使用, 也进一步佐证了 PFIB吸入

性肺损伤发生发展过程中的多环节性和复杂性。本文的实验结果一方面提示我们, 在进行 PFIB吸入性肺损伤治疗过程中, 联合应用针对 PFIB吸入性肺损伤的不同发病致损伤环节的药物将会取得比较好的疗效; 另一方面也激励着我们去深入研究并进一步阐明 PFIB吸入性肺损伤发生发展的过程, 为研究 PFIB吸入性肺损伤的防治复方奠定坚实的基础。

### 参考文献:

[1] Wang H M, Ding R G, Ruan J X, et al. Perfluorooisobutylene induced acute lung injury and mortality are heralded by neutrophil sequestration and accumulation [J]. J Occu Health, 2001, 43 (6): 331-338.

[2] 赵建, 丁日高, 张宪成, 等. 四氢吡咯二硫代氨基甲酸酯对全氟异丁烯吸入性肺损伤的防治效果 [J]. 中国工业医学杂志, 2001, 14 (6): 331-335.

[3] 赵建, 丁日高, 阮金秀, 等. NFκB活化在四氢吡咯二硫代氨基甲酸酯对抗全氟异丁烯吸入性肺损伤中的预防作用 [J]. 中国工业医学杂志, 2004, 17 (3): 145-148.

[4] 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防治效果研究 [J]. 中国职业医学, 2005, 32 (1): 14-17.

[5] 张宪成, 王文珠, 彭双清, 等. 不同吸附剂对 PFIB防护性能的实验研究 [J]. 中国工业医学杂志, 1999, 12 (3): 136-138.

[6] Lehnert B E, Athuleta D, Behr M J, et al. Lung injury after acute inhalation of perfluorooisobutylene: exposure concentration response relationships [J]. Inhal Toxicol, 1993, 5: 1-32.

(上接第 369页)

[5] 刘莉, 徐兆发, 贾克, 等. 谷胱甘肽与 α 硫辛酸对锰致大鼠神经元凋亡影响 [J]. Chin Public Health, 2006, 22 (10): 1239-1240.

[6] Zafarullah M, Li W Q, Sylvester J, et al. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions [J]. Cell Mol Life Sci, 2003, 60 (1): 6-20.

[7] Zhang S, Fu J, Zhou Z. In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain [J]. Toxicol In Vitro, 2004, 18 (1): 71-77.

[8] Koen A L, Goodman M. Aconitase hydrolase isoforms: subcellular location, tissue distribution and possible subunit structure [J]. Biochim Biophys Acta, 1969, 191: 698-701.

[9] Zhang S, Fu J, Zhou Z. In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain [J]. Toxicol In Vitro, 2004, 18 (1): 71-77.

[10] Emsau R K, Grunwald R, Lemaster J J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat liver mitochondria: spectral and metabolic properties [J]. Biochim Biophys Acta, 1986, 850: 436-448.

[11] Lowy O H, Rosenbrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent [J]. Biol Chem, 1951, 193: 265.

[12] Yang S H, Chien C M, Lu M C, et al. Cardiotoxin III induces apoptosis in K562 cells through a mitochondria mediated pathway [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2005, 32 (7): 515-520.

[13] Wei Zhenq, Sean Rep, Joseph H Graziano. Manganese inhibits mitochondrial aconitase: a mechanism of manganese neurotoxicity [J]. Brain Research, 1998, 799: 334-342.

[14] Gerald S Shade. Mitochondrial DNA aconitase: wraps it up [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2005, 30(6): 294-296.

[15] Jezek P, Hlavata L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell tissues and organism [J]. Biochem Cell Biol, 2005, 37 (12): 2478-2503.

[16] Lucken-Ardjmande, Martinou J C. Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization [J]. Cell Sci, 2005, 118 (3): 472-483.

[17] Haeblerlein S L. Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell death [J]. Neurochem Res, 2004, 29 (3): 521-530.

[18] 李毅敏, 赵树仪. N-乙酰半胱氨酸的研究进展 [J]. 天津药学, 2003, 15 (2): 50-53.