

### 3 讨论

支气管肺泡灌洗技术可直接采集支气管及肺泡内液的标本,有效地反映肺内病变,属于无创性肺内标本采样技术<sup>[2]</sup>。利用 BALF中成分的变化及其在疾病中的意义,对研究各种环境因素所致肺病具有重要的理论和实际应用价值。尤其是 BALF中一些酶类的变化可以直接反应肺组织细胞的氧化损伤情况。

本实验研究表明,小鼠 BALF中不同剂量组的 LDH ACP 和 AKP与对照组相比,含量均有所增加 ( $P < 0.05$ ),但组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。LDH是一种胞浆酶,来源于上皮细胞、中性粒细胞和肺泡巨噬细胞 (AM)。正常情况下,由于细胞的衰老死亡,细胞外液中存在一定活力的 LDH,当细胞受损伤或膜通透性增加时,LDH会大量逸至胞外,使细胞外液中 LDH活力增加,BALF中 LDH活性升高<sup>[3]</sup>。小鼠经吸入性甲醛亚慢性染毒后,BALF中 LDH活力增加,表明甲醛对肺组织细胞有损伤作用,可能是甲醛的毒性作用引起炎症反应而致膜损伤造成的。ACP是溶酶体酶,它参与肺部防御感染。实验可见,ACP活性升高,可能是因为甲醛导致肺组织炎性反应,促进了激活状态的肺泡巨噬细胞 (PAMs)、多形核中性粒细胞 (PMN) 溶酶体的释放,细胞发生溶解和死亡,使大量 ACP进入 BALF 从而反映了甲醛对肺组织的

损伤作用。AKP主要存在于肺泡 II 型上皮细胞膜上,是一种结合酶<sup>[4]</sup>。AKP活性升高,说明肺泡 II 型上皮细胞膜受到损伤,白细胞活动增加,细胞的炎症反应加剧<sup>[5]</sup>。BALF中 AKP活性升高还可能由于肺泡血管内皮细胞受损,血浆渗出而引起。同步观察肺组织病理变化,可见肺组织毛细血管出血,肺泡间隔增宽,肺泡腔内出现炎细胞浸润,尤其在高剂量染毒组,有大量炎细胞和含铁血黄素细胞出现。这表明吸入一定浓度的甲醛可以造成肺组织的细胞损伤。小鼠肺组织是否对甲醛引起的细胞损伤存在一个阈剂量,有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 施爱民,王心如.支气管肺泡灌洗液成分分析与肺毒理学研究概况 [J].中国职业医学,2000,27(2):46-47
- [2] 宋鸿鹏,周宗灿.支气管肺泡灌洗液对尘肺诊断和治疗的意义 [J].中国公共卫生,1995,11:440-442
- [3] KQdavan ti U P, Hauser R, Christiani D C, et al. Pulmonary responses to oil fly ash particles in the rat differ by virtue of their specific soluble metals [J]. Toxicol Sci 1998, 43 (2): 204
- [4] 李湘鸥,罗方妮,方企圣.臭氧对大鼠肺灌洗液某些生化指标及肺形态的影响 [J].中国公共卫生学报,1996,15(4):234-235
- [5] 阚海东,宋伟民,蒋蓉芳.室内常见气传真菌对动物肺损伤的实验研究 [J].中国公共卫生,2002,18(2):135-136

## 急性甲胺磷中毒大鼠心肌及肝细胞凋亡的研究

Study on apoptosis of myocardial and hepatic cells induced by acute methamidophos poisoning in Wistar rats

何旭,李国明,段新旺,尹林

HE Xu, LI Guoming, DUAN Xinwang, YIN Lin

(南昌大学第一附属医院急诊科,江西 南昌 330006)

**摘要:**选取健康 Wistar 大鼠 25 只,随机分为 3 组,即正常对照组、轻度和重度中毒组,采用流式细胞仪检测中毒后早期心肌和肝细胞的凋亡百分率。结果中毒组细胞早期凋亡率明显高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ),重度中毒组心肌细胞和肝细胞早期凋亡率显著高于轻度中毒组 ( $P < 0.01$ )。表明急性有机磷中毒早期即可出现实质器官细胞的损害并且与中毒严重程度密切相关,提示在急性有机磷中毒的临床救治中,早期应加强保护重要器官,防止发生多器官功能障碍综合征。

**关键词:**甲胺磷中毒;细胞凋亡;流式细胞仪

**中图分类号:** R595.4 **文献标识码:** B

**文章编号:** 1002-221X(2007)06-0405-02

近年一些研究表明,有机磷中毒 (AOPP) 存在细胞凋亡现象,提示有机磷中毒所致的呼吸肌麻痹可能与膈肌细胞凋

亡有关<sup>[1]</sup>,神经元细胞凋亡在中毒后迟发性神经病的发病机制中起重要的作用<sup>[2]</sup>。急性有机磷中毒后实质器官是否出现细胞凋亡现象,目前尚未见报道。为此,我们建立了急性甲胺磷中毒动物模型,对染毒大鼠的心脏和肝脏进行细胞凋亡检测,为今后临床抗凋亡治疗提供相关的实验依据。

#### 1 材料与与方法

##### 1.1 材料

30%甲胺磷乳油 (湖北沙隆股份有限公司提供),FACS Calbu 型流式细胞仪 (美国 BECTON DICKINSON 公司)。

##### 1.2 动物分组

健康 Wistar 大鼠 25 只 (由南昌大学医学院实验动物研究中心提供),雌雄兼并,体重 200~240 g 随机分为 3 组,正常对照组 5 只,轻度中毒组和重度中毒组各 10 只。中毒组分别按 10 mg/kg、40 mg/kg 给予甲胺磷皮下注射染毒,对照组给予 2 ml 生理盐水皮下注射。

##### 1.3 标本采集

对照组注射生理盐水 8 min 后断头处死取心脏和肝脏组织;轻度中毒组染毒后出现流泪、肌无力、行走不稳、肌颤,8 min 后取心脏和肝脏组织;重度中毒组染毒后均迅速死亡,

收稿日期:2007-03-01;修回日期:2007-06-01

基金项目:江西省卫生厅科技计划基金资助项目 (043032)

作者简介:何旭 (1963-),女,主任医师,副教授,硕士生导师,研究方向:急性中毒和危重病救治。

立即取出心脏和肝脏组织。

### 1.4 流式细胞仪检测

取心脏和肝脏组织各 100 mg 分别置于两个培养皿中, 洗去组织块表面的淤积血块, 用眼科剪将其剪碎, 加 2 ml 磷酸盐缓冲液 (PBS) 过滤, 反复吹打后放置数分钟, 经 300 目尼龙网过滤置试管中, 调整单细胞悬液主细胞数为  $1 \times 10^6 / \text{ml}$  从而制备心肌细胞和肝细胞单细胞悬液, 分别取心肌细胞和肝细胞单细胞悬液  $100 \mu\text{l}$  ( $1 \times 10^6 / \text{ml}$ ) 置入专用试管中, 先加入  $5 \mu\text{l}$  Annexin V 和  $10 \mu\text{l}$  PI, 再立即加入  $100 \mu\text{l}$  Buffer 工作液混匀, 放  $4^\circ\text{C}$  冰箱反应 30 min, 然后加  $400 \mu\text{l}$  Buffer 工作液, 最后上机检测心肌细胞和肝细胞的早期凋亡百分率。

### 1.5 统计学分析

所得数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件包进行  $\chi^2$  检验分析。

## 2 结果

表 1 可见, 中毒后心肌和肝细胞早期细胞凋亡率明显升高, 且重度中毒与轻度中毒比较有明显差异 ( $P < 0.01$ )。图 1、2 显示, 重度中毒组心肌和肝细胞早期即出现大量凋亡。

表 1 染毒组及对对照组心肌细胞、肝细胞早期凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s$ ) %

分组	n	心肌细胞	肝细胞
对照组	5	1.71 $\pm$ 0.11	0.39 $\pm$ 0.05
轻度中毒组	10	13.71 $\pm$ 2.27*	5.76 $\pm$ 1.10*
重度中毒组	10	46.26 $\pm$ 4.08* $\Delta$	55.80 $\pm$ 9.81* $\Delta$

与对照组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与轻度中毒组比较,  $\Delta P < 0.01$

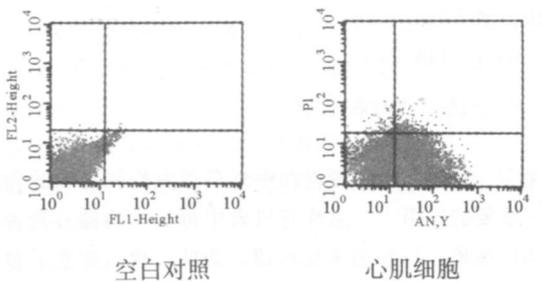


图 1 重度中毒心肌细胞流式细胞仪散点图

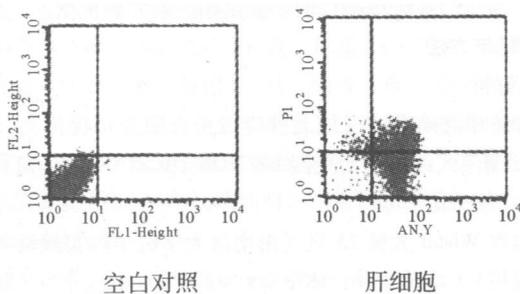


图 2 重度中毒肝细胞流式细胞仪散点图

## 3 讨论

细胞凋亡又称程序性细胞死亡, 由一些特殊信号刺激细胞内在固有的死亡程序所诱发的细胞主动死亡现象, 是机体细胞代谢过程中保持自身稳态的一种生物现象。其机制目前证实是由多种因子参与的一系列化学连锁反应, 许多因素可诱导凋亡或抑制凋亡, 导致疾病的发生。

近年来一些研究已证实中毒过程中存在脏器实质细胞的凋亡, 如毒鼠强、醋氨酚和氟化钠中毒<sup>[3-5]</sup>等。国外研究表明, 在低剂量对氧磷中毒鼠模型中发现有典型细胞凋亡的特征<sup>[6]</sup>。国内研究表明, 急性有机磷农药中毒并发多器官功能障碍综合征患者 T 淋巴细胞大量凋亡, 造成患者细胞免疫功能低下或紊乱<sup>[7]</sup>。多器官功能障碍综合征患者外周血单个核细胞亦存在细胞凋亡增加的情况<sup>[8]</sup>。以往在 AOPP 对心脏的毒性研究中提出, 血清肌钙蛋白 I (CTnI) 可作为 AOPP 引起心肌损害的早期诊断标志<sup>[9]</sup>。肝功能损伤表现为 AST、ALT、LDH 增高和黄疸, 而从细胞凋亡的角度研究 AOPP 对心脏和肝脏实质细胞的影响尚未见报道。本研究采用 Annexin V/PI 双染流式细胞技术研究急性甲胺磷中毒大鼠早期心肌细胞和肝细胞凋亡情况, 结果显示, 重度中毒时心肌细胞和肝细胞早期即出现大量的凋亡, 且细胞凋亡率明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。说明甲胺磷中毒可引起心肌细胞和肝细胞早期凋亡, 且重度中毒导致的细胞凋亡更显著。有机磷中毒患者由于组织缺氧破坏机体正常的氧化还原的动态平衡, 使体内形成严重的氧化应激和自由基损伤, 由于大量自由基和活性氧的产生, 对重要器官组织进行攻击, 形成化学性的中毒炎症反应<sup>[10]</sup>, 其炎症细胞释放出细胞因子 (如 TNF、IL-6、IL-8), 激活促凋亡基因, 引起组织器官细胞的凋亡。通过本项研究提示在急性有机磷中毒的临床救治中, 应在早期加强保护重要器官的功能, 防止多器官功能障碍综合征的发生。

### 参考文献:

- [1] 田英平, 苏建玲, 霍书花, 等. 急性甲胺磷中毒膈肌细胞凋亡的研究 [J]. 中华内科杂志, 2004, 43 (11): 865-866
- [2] 王英鹏, 宋俊峰, 饶志仁, 等. 三磷酸甲酯中毒致母鸡脊髓神经元凋亡的研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004, 22 (1): 19-21
- [3] 程亦斌, 刘宁国, 张建华, 等. 毒鼠强中毒的细胞凋亡研究 [J]. 法医学杂志, 2002, 18 (3): 137-143
- [4] 朱万琴, 顾伟, 董昕. 醋氨酚中毒致肝细胞凋亡 [J]. 中华急诊医学杂志, 2003, 12 (6): 397-399.
- [5] 井玲, 石俊, 任立群, 等. 氟中毒大鼠肝细胞凋亡研究 [J]. 中华地方病学杂志, 1999, 18 (2): 84-86
- [6] Salth A M, Vijayarath Y C, Fernandez Cabezedo M et al. Influence of paraoxon (POX) and parathion (PAT) on apoptosis: a possible mechanism for toxicity in low-dose exposure [J]. J Appl Toxicol 2003, 23 (1): 23-29
- [7] 高越, 何建如, 陈小青, 等. 急性有机磷农药中毒并发多器官功能障碍综合征患者 T 淋巴细胞亚群的研究 [J]. 中国工业医学杂志, 2003, 16 (1): 6-8
- [8] 梁艳冰, 陈娟, 马中富, 等. 多器官功能障碍综合征患者外周血单个核细胞凋亡的研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18 (2): 101-104.
- [9] 朱耀华, 江莲, 王珂, 等. 血清肌钙蛋白 I 诊断有机磷农药心脏毒性的中毒价值 [J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12 (7): 423-424
- [10] Zhou J F, Xu G B, Fang W J. Relationship between acute organo-phosphorus pesticide poisoning and damages induced by free radicals [J]. Biomed Environ Sci 2002, 15 (2): 177-186