

鸡有机磷中毒迟发性神经病的模型建立及病理研究

傅真真, 张振玲, 刘毅*, 谢琳, 王蕊, 薄存香

(山东省职业卫生与职业病防治研究院, 山东 济南 250062)

摘要: 目的 用鸡建立迟发性神经病的动物模型, 观察其病理改变。方法 分为甲胺磷造模组、磷酸三甲苯酯造模组和对照组。甲胺磷造模组经口给予甲胺磷 10 mg/(kg·d), 连续给药 14 d; 磷酸三甲苯酯造模组经口给予磷酸三甲苯酯原油 1 ml/(kg·d), 连续给药 7 d; 对照组给予生理盐水, 观察中毒表现和病理学变化。结果 甲胺磷造模组的动物, 经口小剂量多次累计染毒至 5 倍 ID_{50} 以上, 60% 可出现迟发性神经病的症状; 磷酸三甲苯酯造模组的动物, 染毒后 7~10 d 全部出现典型的迟发性神经病症状; 两组有症状动物的脑、脊髓及坐骨神经均出现脱髓鞘等明显的神经损害。结论 磷酸三甲苯酯比甲胺磷更易建立实验性鸡迟发性神经病的动物模型。

关键词: 有机磷; 迟发性神经病; 动物实验模型; 病理改变

中图分类号: R595.4 R99 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2009)02-0095-03

Establishment of animal model for experiment study on delayed neuropathy by organophosphates using hens

FU Zhen-zhen ZHANG Zhen-ling LIU Yi, XIE Lin WANG Rui BO Cun-xiang
(Shandong Institute of Occupational Health and Occupational Diseases Jinan 250062 China)

Abstract: Objective To establish an experimental model of organophosphate induced delayed neuropathy (OPIDN) using hens. Methods Forty-four hens were randomly divided into three groups: methamidophos group, tricesyl phosphate (TCP) group and control group. Methamidophos [10 mg/(kg·d)] was administered by gavage for 14 days. TCP [1 ml/(kg·d)] was administered by gavage for 7 days. Control group only received equivalent volume of normal saline. Clinical manifestations and pathologic changes were observed as judgement of successful model. Results 60% of the hens in methamidophos group showed OPIDN symptoms when methamidophos dose reached 5 times of the ID_{50} , while all the hens in TCP group presented OPIDN symptoms at 7-10 th day after administration. All the symptomatic hens in the both groups were observed the obvious nervous system pathological lesions such as demyelination etc in brain, spinal cord and sciatic nerve. Conclusion Tricesyl phosphate seems more suitable than that of methamidophos for establishing the hen model of OPIDN.

Key words: Organophosphate; Delayed neuropathy; Animal experimental model; Pathologic change

有机磷诱发的迟发性神经病 (organophosphate induced delayed neuropathy, OPIDN) 是农药中毒后的严重并发症, 在急性中毒后的 1~2 周或更长时间后发病, 临床表现为从肢体远端向近端发展的感觉异常和运动障碍, 甚至导致麻痹和瘫痪。甲胺磷被认为是迟发性神经毒性较高的有机磷农药之一^[1], 使用广泛, 临床急性中毒后所致 OPIDN 发生率约为 13.5%^[2]。磷酸三甲苯酯常用作增塑剂、润滑剂、溶剂、染料中间体及油漆、药物的合成。有报道称误食含有该润滑油的面粉可导致 OPIDN 的发病^[3], 但是未见有动物模型的报道。本课题选用甲胺磷和磷酸三甲苯酯做为染毒药物, 经鸡消化道建立迟发性神经

病的动物模型, 观察 OPIDN 的周围神经与肌肉的病理和电镜变化, 为进一步研究发病机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物选用成年母鸡 (鲁禽种鸡) 44 只, 10 月龄, 体重 1.8~2.5 kg, 购自山东省农科院家禽研究所。甲胺磷由山东华阳农药化工集团提供, 纯度为 70%, 溶剂为甲醇。磷酸三甲苯酯原油购自天津某化工厂。

1.2 动物模型的制备及评价指标

实验动物适应性喂养 1 周后, 将动物随机分为甲胺磷造模组 ($n=20$)、磷酸三甲苯酯造模组 ($n=20$) 和对照组 ($n=4$)。所有母鸡喂饲专用全价鸡饲料, 自由饮水, 自然照明, 室温 (22 ± 2) °C, 相对湿度 (50 ± 10) %。甲胺磷造模组经口给予甲胺磷 10 mg/(kg·d), 连续给药 14 d 可诱发受试母鸡 60% 出现典型的 OPIDN 症状。磷酸三甲苯酯造模组经口给予磷酸三甲苯酯原油 1 ml/(kg·d), 连续给药 7 d

收稿日期: 2008-09-05 修回日期: 2008-12-30

基金项目: 山东省自然科学基金 (Y2006C91)

作者简介: 傅真真 (1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 毒理学。

* 通讯作者, 研究员, 硕士研究生导师。

可诱发受试母鸡在给药结束后的 7~10 d 全部出现典型的 OPDN 症状。每日观察迟发神经毒性的症状体征, OPDN 的分级标准依照 1987 年 Robertson 的分级标准: 0 级为无体征; 1 级为步态异常; 2 级为动物长时间蹲卧但尚能站立; 3 级为完全瘫痪。对照组连续 14 d 经口给予生理盐水 1 ml/(kg·d)。

1.3 病理标本的制备

选取两造模组中临床症状明显的母鸡各 4 只, 与对照组的母鸡断头处死, 迅速取出脑、脊髓、坐骨神经和腓肠肌, 各取 1.5 cm 置于 10% 的甲醛溶液中以制备病理标本。将脑、脊髓及坐骨神经各取 0.1 cm 迅速置于 4% 戊二醛磷酸缓冲液中固定, 按照常规要求制成电镜标本。

2 结果

2.1 动物中毒表现

两造模组实验动物均不给予保护剂, 动物可度过急性期。甲胺磷造模组的母鸡于染毒后开始出现腹泻、绿色稀便、进食明显减少、精神不振, 于染毒结束后第 7 天陆续出现共济失调、站立困难、喜长时间蹲卧、肛周污秽等表现, 染毒前后体重下降 11.65%。起病从下肢开始, 逐渐发展至翅膀, 表现为驱赶上楼梯实验愈发困难, 下肢逐渐发白无力, 最终瘫痪。甲胺磷造模组达到临床 OPDN 分级标准 1 级的有 4 只, 达到 2 级的有 2 只, 达到 3 级的有 6 只。磷酸三甲苯酯造模组的母鸡于染毒后开始出现食欲差、绿色稀便、肛周污秽、肌张力下降等表现, 染毒前后体重下降 25.29%, 于染毒结束后第 7 天出现 OPDN 症状, 4 只达到 2 级, 16 只达到 3 级, 第 10 天全部无法站立, 鸡爪无力, 严重瘫痪。与对照组比较, 两造模组染毒前后体重下降差异均具有统计学意义 ($P < 0.0001$)。

2.2 光镜下病理学变化

甲胺磷及磷酸三甲苯酯造模组大脑神经元胞体缩小, 部分胞浆嗜酸性染色增强, 细胞核固缩深染, 尼氏小体减少, 胶质细胞增生明显。脊髓神经元细胞较对照组明显肿胀, 部分细胞胞浆淡染, 尼氏小体数量减少甚至消失, 胞核模糊不清。坐骨神经纤维排列整齐, 局部轴索肿胀, 结构不清, 髓鞘溶解, 施万细胞胞核较对照组明显增大。腓肠肌局部肌细胞坏死、溶解, 可见多量灶状炎细胞浸润, 以单核细胞为主, 肌细胞间可见散在炎细胞分布, 与对照组比较见纤维组织增生。

2.3 电镜观察

正常的神经组织中小胶质细胞和神经元形态正常, 髓鞘紧密, 板层清晰。甲胺磷及磷酸三甲苯酯造模组大脑中小胶质细胞出现凋亡, 核膜肿胀破裂, 线

粒体嵴减少, 胞浆有自溶现象; 神经元细胞核不规则, 核膜模糊不完整或完全消失, 常染色质减少, 呈团块状不均匀, 各细胞器数量明显减少, 内质网肿胀, 胞浆有自溶现象, 髓鞘疏松不紧密, 板层模糊不清, 可见大量空泡, 微丝稀疏 (图 1)。

甲胺磷及磷酸三甲苯酯造模组脊髓中神经元细胞细胞器减少, 内质网扩张, 糖原颗粒堆积且不均匀, 树突结构不完整, 轴索不规则, 髓鞘呈严重的气泡样改变, 多处板层疏松、破裂甚至崩解 (图 2)。

甲胺磷及磷酸三甲苯酯造模组坐骨神经的髓鞘管样改变明显且模糊不清, 多处板层松散、破裂甚至崩解。

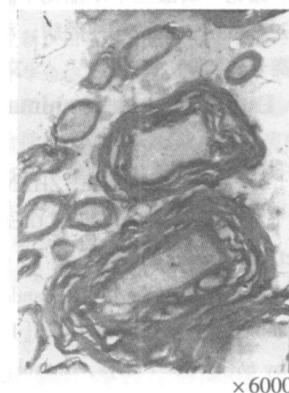


图 1 甲胺磷组大脑神经元髓鞘改变

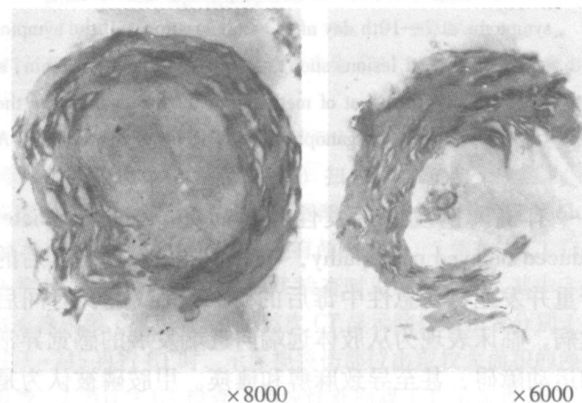


图 2 甲胺磷组脊髓神经元髓鞘改变

3 讨论

磷酸三甲苯酯有 3 种异构体, 分别为间位、对位和邻位, 间位和对位异构体实际无毒, 邻位异构体 (TOCP) 具有迟发性神经毒作用, 是迟发性神经毒作用模型的阳性对照物。习惯上, 商品磷酸三甲苯酯的毒性以 TOCP 的浓度为依据, 有报道称误食含有 TOCP 润滑油的面粉可导致 OPDN。本实验中磷酸三甲苯酯造模组的动物, 染毒后急性症状轻, 进食尚可, 连续 7 d 给予原油 1 ml/(kg·d), 停药后 7~10 d 全部出现典型的 OPDN 症状。因此, 尽管该润滑

油中的 TOCP 含量极低,但还是存在食入即可致发病的危险,在生产销售和使用环节中应当引起足够的重视。甲胺磷属高毒有机磷杀虫剂,母鸡急性经口中毒 LD_{50} 为 25 mg/kg。甲胺磷造模的成功率一直很低,赵秀兰等^[4]研究发现,经口给药导致成年近交系琅琊母鸡 96 h 死亡;经皮下给予大剂量 (200~250 mg/kg) 甲胺磷导致全部罗曼母鸡死于急性中毒,中剂量多次 (100~150、50、50 mg/kg) 可诱发少数出现较轻症状,小剂量 30 mg/(kg·d) 连续 15 d 经皮下给予可诱发 31.4% 的海兰母鸡出现典型的 OPDN。杨琳等^[5]发现,依据上述方法在染毒结束后给药部位呈现皮肤坏死,试验鸡还是在 7 d 内死亡,通过口服和皮下两种染毒途径在京白母鸡上建立迟发性神经毒性模型甚为困难。由此看来,甲胺磷造模成功率较低,而且动物品系对造模有一定的影响。有研究报道,外消旋甲胺磷的中毒剂量大于 8 倍 LD_{50} 且无保护剂时才可导致 OPDN,而右旋异构体的中毒剂量在 5~7 倍 LD_{50} 就可诱发^[6]。因此,除了动物品系的不同,立体化学结构和纯度等其他因素也会影响甲胺磷的毒性,这使得甲胺磷的神经毒性机制可能要比 TOCP 复杂。本实验甲胺磷造模采用体型较大的成年鲁禽种鸡,体重在 2 kg 左右,若一次经口给药剂量高于 20 mg/kg,动物在 36 h 内便死于急性中毒,阿托品抢救无效;若一次经口给药剂量高于 15 mg/kg 连续给药至 3 倍 LD_{50} ,动物即死于急性中毒,无法抢救;经口小剂量 [10 mg/(kg·d)] 多次累计染毒

至 5 倍 LD_{50} 以上,60% 可出现 OPDN 的典型症状,染毒后急性症状表现重,但是不给予保护剂,仍可度过急性期。甲胺磷造模组的母鸡产卵基本未受染毒的影响,而磷酸三甲苯酯造模组的母鸡自染毒后不再产卵,与陈志强等研究一致^[7],也提示甲胺磷与 TOCP 的毒性机制不同。实验结果表明甲胺磷建立迟发性神经毒动物模型的方法成立,为进一步的发病机制研究提供依据。

参考文献:

- [1] 何凤生. 我国杀虫剂中毒防治研究的进展和展望 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 19 (4): 241-242.
- [2] 孙东红, 薛寿征, 周宏东, 等. 甲胺磷经口中毒者后遗迟发性多发性神经病变的调查研究 [J]. 劳动医学, 1994, 21 (2): 15-19.
- [3] 杨家琳, 李慧展, 牛青盟. 三邻甲苯磷酸酯暴发中毒四年的临床观察 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 19 (3): 212-214.
- [4] 赵秀兰, 韩晓英, 于丽华, 等. 甲胺磷诱发母鸡迟发性神经毒性模型研究 [J]. 山东大学学报 (医学版), 2004, 42 (4): 398-400.
- [5] 杨琳, 刘杰, 李薇, 等. 甲胺磷诱发母鸡迟发性神经毒性模型 [J]. 动物学杂志, 2005, 40 (4): 12-16.
- [6] Johnson M K, Vilanova E, Read D J. Anomalous biochemical responses in tests of the delayed neuropathic potential of methamidophos (9-s-diethyl phosphorothioamidate), its resolved isomers and of some higher alkyl homologues [J]. Arch Toxicol, 1991, 65 (8): 618-624.
- [7] 陈志强, 伍一军, 谢遵逸. 有机磷酸酯类化合物对蛋鸡生产性能的影响 [J]. 动物学集刊, 1995, 12: 71-74.

老年住院矽肺患者呼吸道感染病原菌分析

赵丽娟

(沈阳市第九人民医院, 辽宁 沈阳 110024)

矽肺患者多为老年人,存在慢性肺部基础疾病。现对本院 2003 年~2005 年 8 月 80 例痰细菌培养阳性的矽肺患者进行回顾性分析,结果如下。

1 对象与方法

1.1 对象

80 例均为本院尘肺科住院患者。其中男 66 例,女 14 例。年龄 50~80 岁,平均 70 岁。住院时间 8~26 个月,平均 16 个月。其中反复咳嗽咳痰者 50 例。I 期矽肺 64 例 (80%), II 期 12 例 (15%), III 期 4 例 (5%), 各期矽肺合并肺结核者 20 例。

1.2 方法

选择有呼吸道感染症状的患者 80 例,嘱其晨起后用生理

盐水漱口,从呼吸道深部咳出痰液培养。

2 结果与分析

经痰细菌培养,检出菌标 68 株,其中革兰阴性杆菌 48 株,占 70.6%,革兰阳性球菌 12 株,占 17.6%,白色念珠菌 8 株,占 11.8%。检出致病菌 15 种,依次为大肠埃希菌 15 例,肺炎球菌 11 例,肺炎克雷伯杆菌 10 例,铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌各 6 例,阴沟肠杆菌 3 例。

本组病例痰细菌培养结果显示,老年矽肺患者呼吸道感染致病菌以革兰阴性杆菌为主,因矽肺患者长期住院,多有长期服用抗生素史,使口咽部细菌的检出率和分泌物中的含量明显增加,增加了吸入带菌分泌物诱发肺炎的危险性。同时,革兰阴性杆菌可在雾化液中繁殖到相当浓度,增加了应用吸入治疗设备患者肺内感染的危险性。因此,重复应用雾化器、湿化器时应进行严格的消毒与灭菌。

近年来,随着大量新合成的抗菌药物的广泛使用,细菌耐药菌株不断增多,细菌谱发生变化,给临床抗菌治疗带来困难。药敏实验显示,革兰阴性杆菌对喹诺酮类及氨基甙类抗菌药物敏感。但在使用时,应注意监测致病菌耐药性及二重感染情况,及时调整治疗方案。