

汉防己甲素联合地塞米松对急性百草枯中毒的实验治疗研究

朱秋鸿, 孟聪申, 黄金祥

(中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050)

摘要: 目的 探讨汉防己甲素 (tetrandrine, TET) 和地塞米松 (dexamethasone, DEX) 联用对急性百草枯中毒所致肺损伤的拮抗作用。方法 大鼠以百草枯 (20 mg/kg) 腹腔注射染毒后, 治疗组经口给予 TET (30 mg/kg) 或腹腔注射 DEX (3 mg/kg) 或按上述两种药物的给药时间和剂量同时治疗, 未治疗组腹腔注射生理盐水。观察每组动物的中毒表现和死亡结局。分别测定大鼠血浆丙二醛 (MDA) 含量及超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力, 并观察肺组织结构改变。结果 (1) 染毒 1 d、3 d 时, 未治疗组血浆中 MDA 含量均高于对照组 ($P < 0.05$), 1 d 时血浆中 SOD、GSH-Px 活力均明显低于对照组 ($P < 0.05$); DEX 治疗组各时间点血浆中 MDA 含量和 SOD 活力与未治疗组相似 ($P > 0.05$), 1 d 时血浆中 GSH-Px 活力高于未治疗组 ($P < 0.05$); TET 治疗组除 1 d 时的 GSH-Px 活力高于未治疗组外, 其余各时点与未治疗组基本一致 ($P > 0.05$); 联合治疗组 1 d MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活力与未治疗组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); (2) DEX 治疗组和联合治疗组的症状与未治疗组相比明显减轻, 3 d、7 d 存活率均明显高于未治疗组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。TET 治疗组大鼠前 3 d 的中毒症状与未治疗组相似, 但程度稍轻, 存活率无差异 ($P > 0.05$); (3) 各治疗组纤维组织增生积分均低于未治疗组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 尤以联合治疗组 7 d 时为著。结论 TET 和 DEX 联合治疗可拮抗急性百草枯中毒所致的肺损伤。

关键词: 汉防己甲素; 地塞米松; 百草枯; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶

中图分类号: R595.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2010)04-0243-04

Therapeutic effect of tetrandrine combined with dexamethasone on acute paraquat poisoning in rats

ZHU Qiuhong, MENG Congshen, HUANG Jinxiang

(National Institute of Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To explore the antagonistic effects of combined use of tetrandrine (TET) and dexamethasone (DEX) on lung injury induced by acute paraquat poisoning in rats. Methods 104 Wistar rats were randomly divided into experimental group (96 rats) and control group (8 rats), the experimental group was subdivided into 4 groups: non-treatment group, TET treatment group, DEX treatment group and combined treatment group, 24 rats in each group. Rats in experimental groups were intraperitoneally given 20 mg/kg Paraquat per day for 1, 3 or 7 days respectively, the control rats were only injected intraperitoneally with same volume of saline solution. Six hours later, the rats in TET treatment group were orally given 30 mg/kg of TET per day also for 1, 2 or 7 days respectively, while the rats in DEX group were given 3 mg/kg DEX intraperitoneally at 12, 24, 48 and 72 h after exposure of Paraquat. The rats in TET plus DEX group were received both therapies mentioned above. Then eight rats from each group were sacrificed at 1, 3 or 7 days after experiment, and the levels of malondialdehyde (MDA), activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in plasma of rats were determined, the histological changes in lungs were also observed at the same time. Results (1) The plasma levels of MDA at 1 d and 3 d after experiment were significantly higher, and the plasma activities of GSH-Px and SOD at 1 d after experiment were significantly lower in rats of non-treatment group than those of control group ($P < 0.05$); however, compared with those of DEX treatment group, the plasma activity of GSH-Px was significantly lowered ($P < 0.05$), but plasma level of MDA and activity of SOD in both DEX and TET treatment group and the plasma activity of GSH-Px in the TET treatment group were failed to show any significant difference, while the MDA level and SOD and GSH-Px activities at 1 d after experiment showed significant differences between combined treatment group and non-treatment group ($P < 0.05$). (2) Compared with rats in non-treatment group, the alleviated toxic manifestations as well as higher survival rates were found in DEX treatment group and combined treatment group. (3) The integral

收稿日期: 2010-03-22 修回日期: 2010-05-25

基金项目: 中国疾病预防控制中心职业卫生所青年基金项目 (06B0503)

作者简介: 朱秋鸿 (1970-), 女, 副研究员, 硕士, 研究方向: 呼吸系统疾病。

scores of pulmonary fibrosis in treatment groups were significantly lower than those in non-treatment group. Conclusions Combined use of TET and DEX showed stronger antagonistic effects on lung injury caused by acute paraquat poisoning.

Key words: tetrandrine, dexamethasone, paraquat, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px)

百草枯 (Paraquat, PQ) 化学名称 1,1-二(4-联吡啶), 属有机杂环类接触性脱叶剂和除草剂。急性中毒病死率很高, 国外报道病死率为 40% ~ 50%^[1], 而国内个别报道高达 80% 以上。PQ 中毒的机制目前还不明了, 可能因为 PQ 进入体内后生成大量活性氧自由基, 从而引起组织尤其是肺组织的氧化性损害^[2~5]。国内外报道地塞米松 (dexamethasone, DEX) 有抗氧化性损伤的作用; 而汉防己甲素 (tetrandrine, TET) 有抗肺纤维化作用^[6]。为探讨两者联合治疗急性 PQ 中毒的疗效, 我们对 PQ 中毒动物模型进行了实验治疗研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 农药与试剂 质量分数为 45% 的 PQ 原药 (德国拜耳公司), TET (西安山川生物技术有限公司, 批号: 20060923), DEX (天津金耀氨基酸有限公司, 批号: 200611121), 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、丙二醛 (MDA) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.1.2 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 180 ~ 220 g (维通利华实验动物技术有限公司)。实验前在清洁级动物房 [温度 (21 ± 1) °C, 湿度 (50 ± 10)%] 常规饲养 5 d 以适应环境。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与处理 将健康雄性 Wistar 大鼠 (已禁食 12 h) 随机分成对照组、未治疗组和治疗组 (TET 治疗组、DEX 治疗组和 TET 与 DEX 联合治疗组)。未治疗组 24 只, 随机分成 3 组 (1、3 和 7 d 组), 每组 8 只; 治疗组 72 只, 随机分成 3 组: TET 治疗组、DEX 治疗组、联合治疗组, 每组 24 只, 各组又分为 1、3 和 7 d 组, 每组各 8 只; 对照组 8 只 (1、3 d 各处死 3 只, 7 d 处死 2 只)。PQ 染毒治疗和未治疗组均腹腔一次性注射用生理盐水稀释成浓度为 2.0 mg/ml 的 PQ 染毒, 染毒剂量为 20 mg/kg, 注射体积为 10 ml/kg。对照组腹腔注射等体积的生理盐水。TET 治疗组在染毒后 6 h 经口给予 TET (30 mg/kg), 以后每天给药 1 次, 直至动物处死前 1 天; DEX 治疗组在染毒后 1、12、24、48、72 h 腹腔注射 DEX (3 mg/kg); 联合治疗组按上述剂量和时间同时

给予两种药物治疗; 未治疗组经口给予等体积的生理盐水。对照组腹腔注射等体积的生理盐水。染毒后观察每组动物的中毒表现和肺纤维化的程度, 并测定血浆中 MDA 含量及 SOD、GSH-Px 活力。

1.2.2 大鼠血浆 MDA 含量及 SOD、GSH-Px 活力的测定 PQ 染毒治疗与未治疗组大鼠分别在染毒后 1、3、7 d 时腹腔注射戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 对照组大鼠在相同时间点采用相同方法麻醉, 分离下腔静脉采血, 肝素抗凝后离心分离血浆。测定方法严格按 MDA、SOD 和 GSH-Px 测定试剂盒说明进行。

1.2.3 病理取材 分离肺脏称湿重, 生理盐水清洗后取左肺用体积分数为 10% 的甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片, HE 和 Masson 三色法染色, 光学显微镜下观察。根据 Szapiec 等^[7]的方法确定肺炎和肺纤维化的程度。纤维化评分: +, 肺间质纤维组织增生 < 25% (1 分); ++, 肺间质纤维组织增生 25% ~ 50% (2 分); +++, 肺间质纤维组织增生 > 50% (3 分)。

1.3 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组大鼠血浆中的 MDA 含量及 SOD、GSH-Px 活力比较用方差分析和 Student Newman-Keuls 法。

2 结果

2.1 中毒表现和存活率

大鼠经腹腔染毒 PQ 3 h 后即出现呼吸急促、活动减少、发绀、竖毛、头颤、后肢伸展、松弛、步态不稳、进食减少、泪腺分泌增加等中毒表现。上述表现在前 3 天最明显, 3 天后中毒表现逐渐减轻, 体重开始增加; TET 治疗组大鼠前 3 天的中毒症状与未治疗组基本相似, 但程度稍轻, 存活率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); DEX 治疗组和联合治疗组的症状与未治疗组相比明显减轻, 3 d ~ 7 d 存活率与未治疗组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 大鼠血浆 MDA 含量的变化

PQ 染毒后 1、3 d 时未治疗组血浆 MDA 含量明显升高, 7 d 后开始恢复, 3、7 d 存活率明显低于对照组 ($P < 0.05$); DEX 治疗组血浆 MDA 含量的变化趋势和未治疗组基本一致; TET 治疗组血浆 MDA 含量在染毒后升高, 与未治疗组相近 ($P > 0.05$); 联

合治疗组 1 d 血浆 MDA 含量明显低于未治疗组 ($P<0.05$)。

2.3 大鼠血浆 SOD 活力变化

未治疗组 1 d 时血浆 SOD 活力明显降低 ($P<0.05$)，7 d 时基本恢复正常；DEX 治疗组血浆 SOD 活力变化趋势和未治疗组一致；TET 治疗组血浆 SOD 活力变化也有类似表现；联合治疗组 1 d 时血浆 SOD

活力明显高于未治疗组 ($P<0.05$)。

2.4 大鼠血浆 GSH-Px 活力的变化

PQ 染毒后 1 d 未治疗组血浆 GSH-Px 活力明显下降 ($P<0.05$)，3 d 后开始恢复；DEX 治疗组、TET 治疗组和联合治疗组 GSH-Px 水平在各时间点均与对照组相近 ($P>0.05$)，上述指标结果见表 1。

表 1 各组大鼠不同时段血浆中各项指标测定结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	时间 (d)	鼠数	MDA (nmol/ml)	SOD (U/ml)	GSH-Px (U/0.1ml)	存活率 (%)
对照组		8	2.13±0.56	255.80±17.71	2593.17±146.74	100
未治疗组	1	8	4.48±0.50 [*]	121.95±61.58 [*]	1853.47±395.42 [*]	75.0
	3	8	4.07±0.96 [*]	183.26±52.82	2161.73±325.49	37.5 ^{**}
	7	8	3.24±1.49	211.70±42.20	2691.25±289.06	25.0 ^{**}
DEX 治疗组	1	8	4.26±0.91	113.13±26.07	2464.25±210.55 [#]	100
	3	8	4.46±0.87	174.93±53.40	2464.35±32.937	87.5 [#]
	7	8	3.21±0.79	201.95±44.04	2411.43±97.98	75.0 [#]
TET 治疗组	1	8	4.14±0.82	142.50±26.80	2605.02±322.99 [#]	75.0
	3	8	3.04±0.87	204.53±56.91	2597.39±228.94	50.0
	7	8	2.49±0.58	261.41±30.35	2624.06±56.65	50.0
联合治疗组	1	8	3.37±0.28 [#]	164.17±77.87 [#]	2596.22±24.02 [#]	100
	3	8	3.51±0.20	228.66±32.79	2592.44±26.70	87.5 [#]
	7	8	2.26±1.17	244.29±15.97	2646.24±97.92	87.5 [#]

注：与对照组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ ；与未治疗组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

2.5 肺组织病理检查结果

光学显微镜下，未治疗 1 d 组大鼠肺轻度水肿，肺间质轻度炎性细胞浸润，3 d 组肺间质轻度~中度炎性细胞浸润和轻度纤维组织增生，7 d 组中度炎性细胞浸润，小支气管黏膜轻度增生，2 只大鼠肺严重纤维组织增生；DEX 治疗 1 d 组偶见肺轻度炎性细胞浸润，3 d 组肺组织轻微水肿、轻度炎性细胞浸润，7 d 组肺组织轻微水肿和炎性细胞浸润、肺间质轻度~轻度纤维组织增生；TET 治疗组 1 d 时肺轻微或轻度炎性细胞浸润，3 d 组肺组织轻度水肿和炎性细胞浸润，7 d 组肺组织轻度水肿、轻度炎性细胞浸润、肺组织轻~中度纤维组织增生；联合治疗组，1 d 时未见水肿和炎性细胞浸润，3 d 组轻度炎性细胞浸润、轻度纤维组织增生，7 d 肺间质轻度~轻度炎性细胞浸润、肺间质轻~中度纤维组织增生（见封三图 1）。各治疗组纤维组织增生积分均低于未治疗组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$ ，见表 2)。

3 讨论

PQ 进入体内后可引起多器官损害。肺脏是 PQ 作用的主要靶器官，中毒后肺组织的 PQ 浓度是血浆浓度的 10~90 倍；肺损害的主要特征是在中毒早期

表 2 各组大鼠不同时段病理检查结果

组别	时间 (d)	鼠数 (只)	肺纤维组织增生积分
对照组		8	0.88±0.64
未治疗组	1	8	1.50±1.00
	3	8	2.17±1.04 [#]
	7	8	6.50±0.58 [#]
DEX 治疗组	1	8	0.50±0.71
	3	8	0.50±0.71 [*]
	7	8	1.44±0.56 ^{**}
TET 治疗组	1	8	0.60±0.42
	3	8	0.60±0.42 [*]
	7	8	3.31±0.53 [*]
联合治疗组	1	8	0.20±0.45 [*]
	3	8	0.20±0.45 ^{**}
	7	8	0.30±0.90 ^{**}

注：与对照组比较，[#] $P<0.01$ ；与未治疗组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

出现肺水肿，晚期出现不可逆的肺纤维化。临床上，PQ 急性中毒患者有相当一部分死于早期的肺水肿，如能在早期有效控制肺水肿，将延长存活时间，有辅助提高治愈率。

本实验中，PQ 染毒未治疗组在染毒后 3 h 出现了呼吸急促、活动减少、后肢伸展、松弛、步态不稳、头颤、进食减少等急性中毒表现。TET 治疗组前 3 天的中毒症状与未治疗组相似，但程度稍轻。DEX

治疗组和联合治疗组的症状与未治疗组相比明显减轻, 3、7 d存活率均明显高于未治疗组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明 DEX和 TET联用可显著提高 PQ染毒大鼠的存活率。病理检查发现, 未治疗组大鼠染毒 1 d时出现轻度肺水肿, 3 d时出现轻度纤维组织增生, 并随时间的推移逐渐加重; DEX治疗组 1 d时未见肺水肿, 3 d后出现轻微肺水肿和轻微纤维组织增生; TET治疗组 1 d时未见肺水肿和纤维组织增生, 3 d出现轻度肺水肿和轻度纤维组织增生, 随时间延长而有所加重; 联合治疗组, 1 d时未见肺水肿和纤维组织增生, 3 d时仅个别大鼠出现肺水肿和轻度纤维组织增生。提示 TET对肺纤维化虽有一定的治疗作用, 但对早期出现的肺水肿没有明显的治疗作用。两种药物联合治疗, 既可预防和减轻急性中毒早期出现的肺水肿, 又可拮抗后期出现的肺间质纤维化。

各实验组的病理检查结果表明, DEX治疗组、TET治疗组和联合治疗组的肺纤维组织增生积分均明显低于未治疗组。而且联合治疗组各时间的肺纤维组织增生积分均低于其他治疗组。说明两种药物联合治疗对肺纤维组织增生的拮抗作用好于单一药物。

实验研究结果显示, 未治疗组大鼠 1、3 d时血浆 MDA浓度升高, 1 d时 SOD和 GSH-Px活力明显降低; DEX治疗组各时间点血浆中 MDA含量和 SOD活力与未治疗组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 1 d时血浆中 GSH-Px活力与未治疗组比较, 差异有统计学意义; TET治疗组各时点血浆中 MDA含量、SOD和 GSH-Px活力与未治疗组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而联合治疗组 1 d MDA含量、SOD和 GSH-Px活力与未治疗组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明 DEX可在一定程度上拮抗急性

百草枯中毒大鼠血浆 GSH-Px活力的下降, 但对 MDA含量和 SOD活力变化的影响不明显, 而 DEX和 TET联用则对自由基损伤的观察指标 MDA、SOD和 GSH-Px均有一定的影响, 对抗 PQ的氧化损伤作用明显增强。

本实验研究表明, TET虽然可以拮抗肺间质纤维组织增生, 但对中毒早期出现的肺水肿无明显的治疗作用, 而 DEX是公认的治疗肺水肿药物, 所以两者联合应用有协同作用。迄今尚无治疗 PQ中毒的特效药物, 深入研究药物联合治疗 PQ急性中毒的作用, 可能将发现对 PQ中毒较好的治疗手段。

参考文献:

- [1] Hwang K Y, Lee E Y, Hong S Y. Paraquat intoxication in Korea [J]. Arch Environ Health 2002 57 (2): 162-167.
- [2] Fukushima T, Tanaka K, Lin H, et al. Changes in the fatty acid composition and hydroxyproline content in rat lung in relation to collagen synthesis after paraquat administration [J]. J Med Sci 2003 49 (1): 33-43.
- [3] Adachi J, Ishii K, Tomita M, et al. Consecutive administration of paraquat to rats induces enhanced cholesterol peroxidation and lung injury [J]. Arch Toxicol 2003 77 (6): 353-357.
- [4] Adachi J, Tomita M, Yamakawa S, et al. 72-Hydroperoxycholesterol as a marker of oxidative stress in rat kidney induced by paraquat [J]. Free Radic Res 2000 33 (3): 321-327.
- [5] Ishii K, Adachi J, Tomita M, et al. Oxysterols as indices of oxidative stress in man after paraquat ingestion [J]. Free Radic Res 2002 36 (2): 163-168.
- [6] 朱秋鸿, 黄金祥, 孟聪申, 等. 汉防己甲素对急性百草枯中毒致肺损伤的实验治疗研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2008 26 (10): 583-587.
- [7] Szapczi S V, Elson N A, Fulmer JD, et al. Bleomycin induced interstitial pulmonary disease in the nude athymic mouse [J]. Am Rev Respir Dis 1979 120: 893-899.

欢迎订阅《中国工业医学杂志》

主管单位: 中华人民共和国卫生部 主办单位: 中华预防医学会 沈阳市劳动卫生职业病研究所

本刊主要内容: 职业病、工作相关疾病、劳动卫生基础研究和实验研究的科研论著、综述、讲座、调查报道, 职业病及职业因素所致疾病、生活中毒、农药中毒、药物中毒的预防、急救、诊断、治疗、护理的临床病例报道、经验总结等。

本刊主要栏目: 论著、专题交流、临床实践、调查报告、综述、讲座、专家论坛、病例报告、监测与检验、劳动卫生管理、卫生评价、尘毒防治等。

订阅方式: 邮发代号 8-215 全国各地邮局均可订阅。本刊为双月刊, 每期定价 6.00元, 全年定价 36.00元 (含邮费)。2011年征订工作现已开始, 订阅者可随时与本刊编辑部联系。款到即寄发票。本刊现存少量过刊期刊, 需要者也可随时联系订阅。

邮局汇款

收款人: 中国工业医学杂志编辑部

地址: 沈阳市铁西区南十一西路 18号 (邮编: 110024)

电话: 024-25731414

银行汇款

账户: 中国工业医学杂志编辑部

开户行: 交通银行沈阳分行铁西办事处 (邮编: 110021)

账号: 211111203012015204308

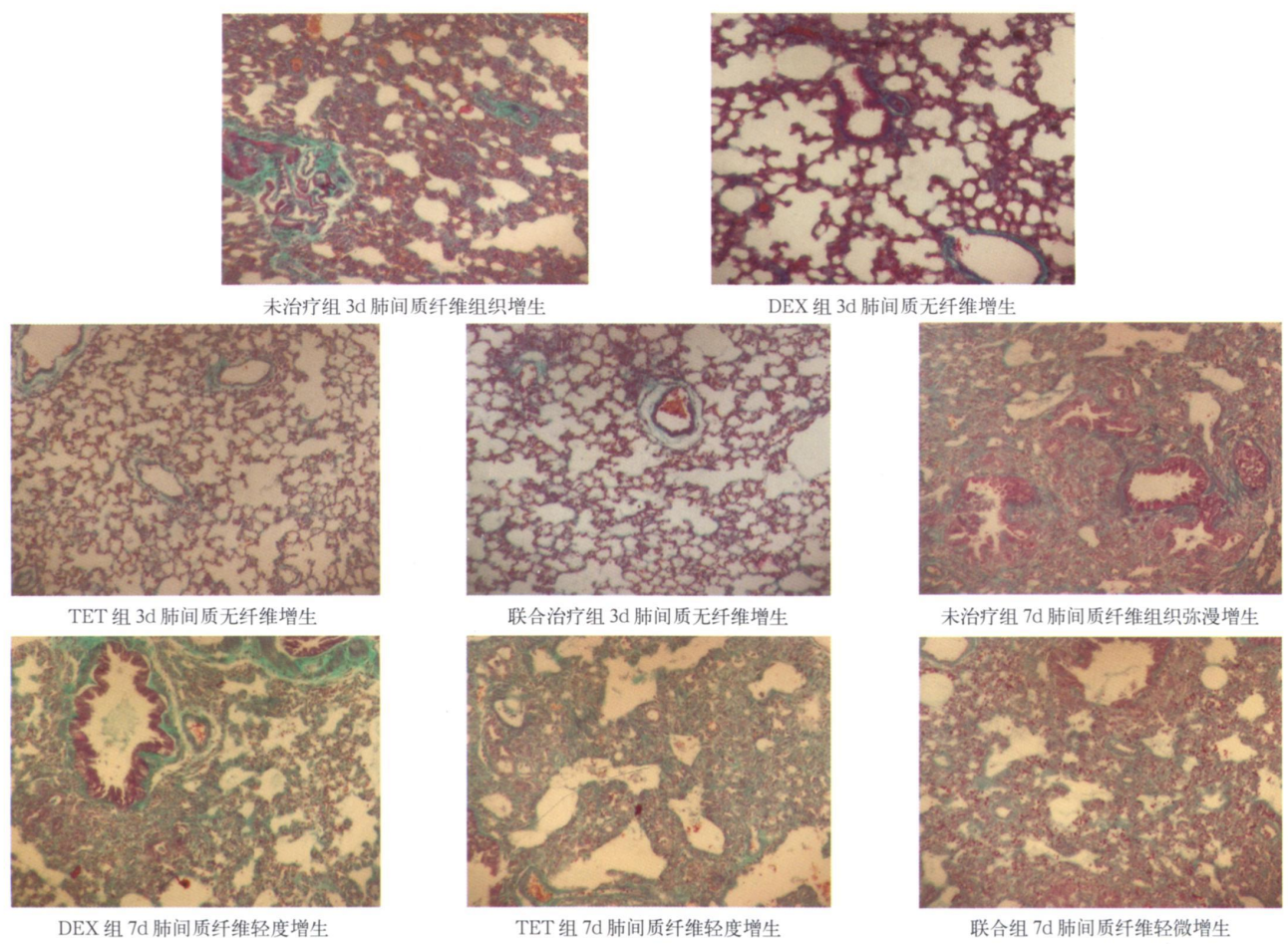


图1 百草枯染毒大鼠肺泡间质纤维组织病理变化(Masson, 50 ×)

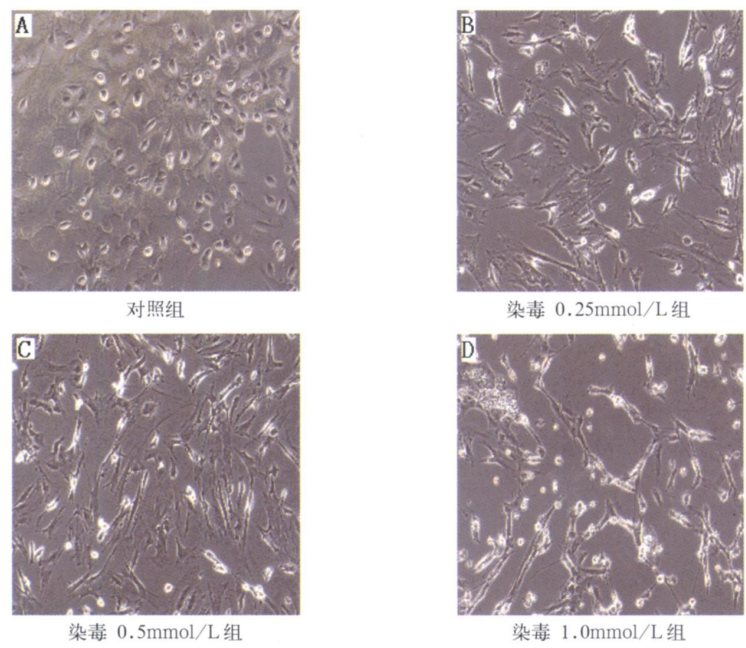


图1 LaCl₃ 染毒 24h 后细胞形态学观察(100 ×)