

汉防己甲素联合维生素 E 对急性百草枯中毒的实验治疗研究

朱秋鸿, 黄金祥, 孟聪申

(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 (TET) 和维生素 E (VE) 对急性百草枯 (PQ) 中毒的治疗作用。方法 大鼠腹腔注射百草枯 15 mg/kg 染毒后, 每天灌胃 TET (30 mg/kg)、VE (45 mg/kg), 联合治疗组按上述两种药物的给药时间和剂量同时治疗; 未治疗组给等体积的生理盐水。观察每组动物的中毒表现和肺组织结构改变。结果 各组大鼠中毒症状相似; 治疗组大鼠肺损伤积分均明显低于染毒组, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$), 尤以联合治疗组为著。病理观察可见 PQ 中毒后肺泡壁充血和炎症细胞浸润, 治疗组水肿、充血、炎细胞浸润及肺纤维化减轻。结论 TET 和 VE 联合治疗可拮抗 PQ 中毒所致的肺纤维化。

关键词: 维生素 E (VE); 汉防己甲素; 百草枯 (PQ)

中图分类号: R595 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2014)05-0329-04 DOI:10.13631/j.cnki.zggyyx.2014.05.003

Experimental study on therapeutic efficacy of tetrandrine combined with Vitamin E against acute toxicity of paraquat

ZHU Qiu-hong, HUANG Jin-xiang, MENG Cong-shen

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

Abstract: **Objective** To investigate the therapeutic efficacy of tetrandrine (TET) and Vitamin E (VE) against acute poisoning by paraquat (PQ). **Methods** Paraquat was given to rats by intraperitoneally injected, the treated rats were given TET, VE or TET plus VE per day by intragastric administration, the control rats were injected intraperitoneally with same volume of saline solution, then observe the toxic manifestations and histological changes of the lungs. **Results** The results showed that the toxic manifestations were quite similar among the toxic groups, but the pathological scores of pulmonary fibrosis in treatment groups were significantly lower than those of toxic group, especially the combined therapeutic group. The pathological examination found the principal changes in lungs caused by PQ were alveolar congestion and leukocyte infiltration, while all the changes such as edema, congestion, leukocyte infiltration and pulmonary fibrosis etc. seemed alleviated. **Conclusion** The study suggested that TET combined with VE has some antagonistic effects on pulmonary damage such as fibrosis caused by acute paraquat poisoning.

Key words: Vitamin E (VE); tetrandrine (TET); paraquat (PQ)

百草枯 (paraquat, PQ) 是一种高效、广谱、污染小的有机杂环类除草剂, 中毒事件屡有发生。已有的研究表明, 百草枯有较强的氧化能力, 进入体内后能产生大量的活性氧自由基, 引起机体特别是肺组织的氧化性损伤。国内有报道, 维生素 E (VE) 有抗氧化作用^[1], 汉防己甲素 (TET) 有抗纤维化作用^[2,3], 维生素 E 联合汉防己甲素可防治肝纤维化^[4]。为探讨两者联合治疗急性百草枯中毒的疗效, 我们进行了动物实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 农药与试剂 质量浓度为 45% 的百草枯原药 (德国拜耳公司), TET (西安山川生物技术有限公司, 批号: 20060923), 维生素 E [海南养生堂保健品有限公司, 批号: 卫食健字 (2002) 第 0331 号]。

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 试验方法

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、百草枯染毒未治疗组和治疗组 (TET 治疗组、VE 治疗组、TET 与 VE 联合治疗组)。百草枯染毒未治疗组大鼠 32 只, 随机分成 4 组 (3、7、14 和 21 d 组), 每组 8 只; 治疗组大鼠 96 只, 随机分成三组 [TET 治疗组 32 只 (3、7、14 和 21 d 组)、维生素 E 治疗组 32 只 (3、7、14 和 21 d 组)、联合

收稿日期: 2014-03-06; 修回日期: 2014-05-22

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。

治疗组 32 只(3、7、14 和 21 d 组)];对照组 8 只(每批各处死 2 只)。百草枯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 1.5 mg/ml 的百草枯染毒,染毒剂量为 15 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 治疗组染毒后 6 h 灌胃给予 TET(30 mg/kg),以后每天给药 1 次,直至动物处死前 1 d;VE 治疗组染毒后 6 h 灌胃给予 VE(45 mg/kg),以后每天给药 1 次,直至动物处死前 1 d;联合治疗组按上述剂量和时间同时给予两种药物治疗;未治疗组灌胃给予等体积生理盐水。对照组腹腔注射等体积生理盐水。染毒后观察每组动物的中毒表现和肺纤维化程度。

1.2.2 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 Szapiel 等^[5]的方法确定肺泡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

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组大鼠肺损伤积分的比较用 *T* 检验。

2 结果

2.1 中毒表现

大鼠经腹腔染毒百草枯后 5 h 即出现呼吸急促、活动减少、步态不稳、进食减少等中毒表现。上述表现在前 3 d 最明显,3 d 后中毒表现逐渐减轻,体重开始增加;TET、VE 和联合治疗组大鼠前 3 d 的中毒症状与未治疗组基本相似。除未治疗组有 1 只大鼠死亡外,其他治疗组大鼠全部存活。

2.2 肺组织病理检查结果

2.2.1 对照组 光学显微镜下,8 只大鼠肺组织未见炎性细胞浸润,未见肺水肿和纤维组织增生。

2.2.2 未治疗组 光学显微镜下,3 d 组大鼠肺轻度水肿,肺泡腔有少量蛋白液渗出,个别大鼠肺淤血,肺间质轻度炎性细胞浸润,肺组织纤维细胞增加;7 d 组大鼠肺轻度水肿,肺间质轻度—中度炎性细胞浸润和轻度纤维组织增生;14 d 组大鼠轻度肺水肿,轻度炎性细胞浸润,支气管腔可见少量分泌物,肺轻度纤维组织增生;21 d 组大鼠肺轻度炎性细胞浸润,支气管腔可见少量分泌物,纤维组织增生轻度偏重。见图 1、图 2 (封三)。

2.2.3 TET 治疗组 光学显微镜下,3 d 组大鼠肺组织偶见肺水肿及炎性细胞浸润,支气管腔未见分泌

物,肺轻微纤维组织增生;7 d 组大鼠肺组织未见水肿和炎性细胞浸润,支气管腔未见异常分泌物,肺轻微纤维组织增生;14 d 组大鼠肺组织未见水肿,1 只大鼠肺部出现轻微炎性细胞浸润和支气管腔可见少量分泌物,肺组织轻度纤维组织增生;21 d 组大鼠未见肺水肿,1 只大鼠肺轻微炎性细胞浸润,2 只大鼠支气管内可见少量分泌物,肺组织轻度或轻微纤维组织增生。见图 1、图 2 (封三)。

2.2.4 VE 治疗组 光学显微镜下,3 d 组大鼠肺组织轻度水肿,2 只大鼠肺轻度炎性细胞浸润,支气管未见异常分泌物,3 只大鼠肺间质可见纤维组织增生;7 d 组 1 只大鼠肺组织轻度水肿,3 只有轻微炎性细胞浸润,支气管内偶见少量分泌物,肺间质轻度纤维组织增生;14 d 组大鼠肺组织未见水肿,部分动物有轻微炎性细胞浸润,1 只大鼠支气管内偶见少量分泌物,肺间质轻度—轻度纤维组织增生;21 d 组动物肺组织未见水肿,轻度炎性细胞浸润,1 只大鼠支气管内见少量分泌物,肺间质轻度—轻度纤维组织增生。见图 1、图 2 (封三)。

2.2.5 联合治疗组 光学显微镜下,3 d 组大鼠 3 只出现轻度肺水肿,5 只肺轻度或轻度偏重炎性细胞浸润,3 只支气管腔可见少量分泌物,肺间质轻度纤维组织增生;7 d 组大鼠未见肺水肿,可见轻度炎性细胞浸润,4 只大鼠支气管腔可见少量分泌物,轻度肺间质纤维组织增生;14 d 组大鼠未见肺水肿,3 只大鼠轻微炎性细胞浸润,肺间质轻度或轻微纤维组织增生;21 d 组大鼠未见肺水肿,肺轻微或轻度炎性细胞浸润,支气管未见分泌物,肺间质轻度纤维组织增生。见图 1、图 2 (封三)。

2.3 肺损伤评分

百草枯中毒引起大鼠肺损伤以肺组织纤维增生和炎性细胞浸润为主,按病变程度分轻 (+),中 (++) 和重 (+++) 划分。每个“+”为 1 分,求每只大鼠肺损伤的总积分,再计算每组大鼠肺损伤平均数 $\pm$ 标准差 (见表 1)。

表 1 各组大鼠肺损伤积分

组别	给药时间 (d)			
	3	7	14	21
对照组	0.00	0.00	0.00	0.00
未治疗组	3.92 $\pm$ 0.86	3.43 $\pm$ 0.79	3.33 $\pm$ 0.68	3.33 $\pm$ 0.60
TET 治疗组	2.58 $\pm$ 0.80*	2.42 $\pm$ 1.16*	1.00 $\pm$ 0.55**	1.00 $\pm$ 0.45**
VE 治疗组	2.10 $\pm$ 0.55*	2.40 $\pm$ 0.96*	1.60 $\pm$ 0.55**	1.25 $\pm$ 0.65**
联合治疗组	2.71 $\pm$ 1.73*	1.43 $\pm$ 0.83**	1.00 $\pm$ 0.63**	0.42 $\pm$ 0.38**

注:与未治疗组相同时间比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$ 。

3 讨论

百草枯应用 50 年来,人们对其中毒损伤临床特点已经明确^[6],主要表现为皮肤黏膜局部毒性损伤呈现浓度依赖性,全身性系统毒性损伤为剂量依赖性,且全身系统毒性表现为以肺部损伤为主的多脏器损伤。

本次的实验结果表明百草枯染毒大鼠治疗组和未治疗组的急性中毒表现基本一致。病理检查发现,未治疗组大鼠在染毒早期只出现了肺轻度水肿和肺间质轻度炎性细胞浸润,7 d 后出现了肺轻度纤维组织增生,随着时间延长肺纤维组织增生逐渐加重;TET 治疗组尽管早期也出现了肺水肿和肺轻微纤维组织增生,但随着时间延长逐渐减轻或消失;VE 治疗组大鼠早期肺组织轻度水肿,随时间增加出现了肺纤维化,整个病变过程和未治疗组基本一致;联合治疗组大鼠早期出现轻度肺水肿和肺间质轻度纤维组织增生,随着时间延长病变逐渐减轻或消失,整个病变过程和 TET 治疗组一致但程度稍轻。提示 VE 与 TET 联合应用对百草枯中毒所致的肺纤维化有一定的治疗作用。

百草枯中毒的机制研究很多,目前还没有定论,但多数研究者认为主要和两个因素有关^[7-8]:(1) 经多巴胺系统在肺内累积。百草枯经多巴胺摄取途径被肺泡上皮细胞和气管 Clara 细胞主动转运进入肺内,使肺内百草枯浓度明显增高,不停进行氧化还原反应,产生阳离子、羟自由基等为代表的活性氧,导致肺部的氧化损伤。(2) 通过炎性介质及其细胞信号传导调控的参与引起一系列细胞、分子、基因水平上的损伤;对脂质的氧化,引起脂质膜的功能受损;直接损伤 DNA,造成 DNA 的断裂,引起基因的异常表达或启动细胞凋亡途径;机体损伤后再修复等。

TET 是防己科植物汉防己的主要生物碱,已证实它不仅能抑制 T 型钙通道,亦能抑制 L 型钙通道,还具有钙调蛋白阻滞作用,可通过多个环节来阻断钙离子对肺纤维化的异常作用。大量的研究表明 TET 抗纤维化的机制可能是通过以下途径实现的:(1) 抑制胶原形成细胞的增殖;(2) 钙拮抗作用;(3) 抑制胶原纤维的合成;(4) 影响前胶原的分泌、促进胶原的降解;(5) 抑制细胞因子的致纤维化作用;

(6) 抗脂质过氧化损伤;(7) 防止瘢痕的形成^[9]。

VE 是氧离子的直接清除剂,可保护细胞免受自由基的攻击。VE 的抗氧化作用主要是与脂氧自由基或脂过氧自由基反应,向它们提供氢离子,使脂质过氧化链式反应中断^[1]。刘艳等^[10]的动物实验表明,VE 对 PQ 中毒组氧自由基的产生有抑制作用。本实验研究发现,单独 VE 的抗氧化作用有限,而与 TET 协同作用的效果比单独 VE 的治疗效果好。

尽管目前还没有治疗百草枯中毒的特效药物,但我国已经颁布了《职业性急性百草枯中毒的诊断》标准^[11],为临床诊断和处理该病提供了理论依据。相信随着研究的进一步深入,将为临床救治提供新的依据。

参考文献:

- [1] 黄进,杨国宇,李宏基,等. 抗氧化剂作用机制研究进展 [J]. 自然杂志,2003,26 (2): 76.
- [2] 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.
- [3] 朱秋鸿,孟聪申,黄金祥. 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 [J]. 中国工业医学杂志. 2010,23 (4): 243-246.
- [4] 刘琛,尤大钰,姜藻,等. 维生素 E 和汉防己甲素防治肝纤维化的实验研究 [J]. 南京铁道医学院院报,1997,16 (4): 234-236.
- [5] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120: 893-899.
- [6] 杜旭芹,宋玉果. 职业性百草枯中毒研究近况 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2011,29 (1): 73-75.
- [7] Dinis-Oliveira R J, Duarte J A, Sanchez-Navarro A, et al. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment [J]. Crit Rev Toxicol, 2008, 38: 13-47.
- [8] Mohammadi-Bardbori A, Chazi-Khansari M. Alternative electron acceptors: Proposed mechanism of paraquat mitochondrial toxicity [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2008, 26: 1-5.
- [9] 曹治东,石崇荣. 粉防己碱抗纤维化机理研究进展 [J]. 中国药房,2002,13 (12): 755-756.
- [10] 刘艳,毛毅敏,王学廷. 茎叶人参皂甙和维生素 E 对百草枯所致大鼠急性肺损伤保护作用的比较研究 [J]. 中国实用医药,2009,4 (5): 3-5.
- [11] GBZ246—2013,职业性急性百草枯中毒的诊断 [S].

更正:2014 年第 27 卷第 4 期“半定量职业危害风险评估法在某市电焊行业锰危害因素评价中的应用”一文作者为章剑,施爱民,陈献文,张巧耘,周维新。

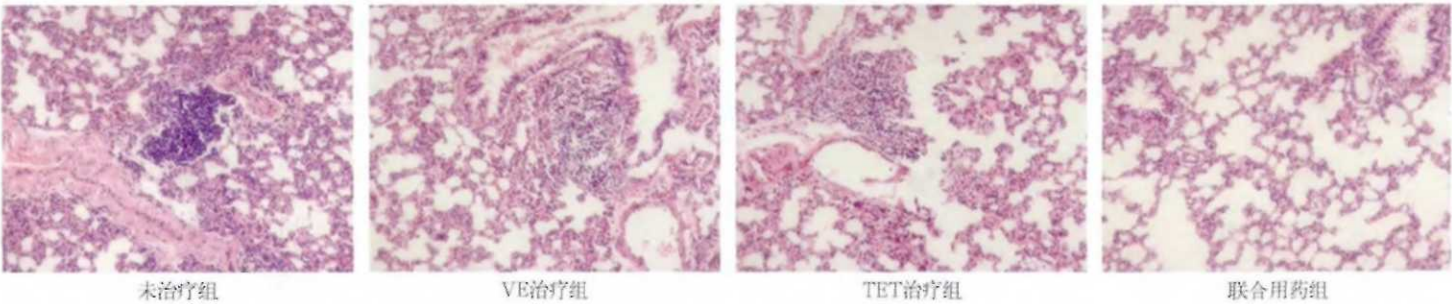


图1 各组大鼠染毒14d肺组织炎性细胞浸润情况 (HE, ×50)

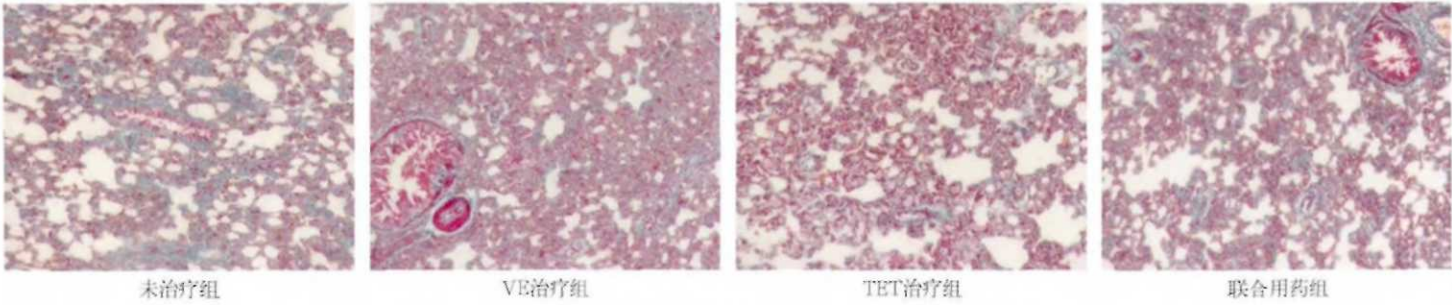


图2 各组大鼠染毒14d肺组织增生情况 (Masson, ×50)

三氯乙烯及其代谢产物的豚鼠皮肤致敏作用研究 (正文见332~334页)



图1 各组豚鼠皮肤致敏表现

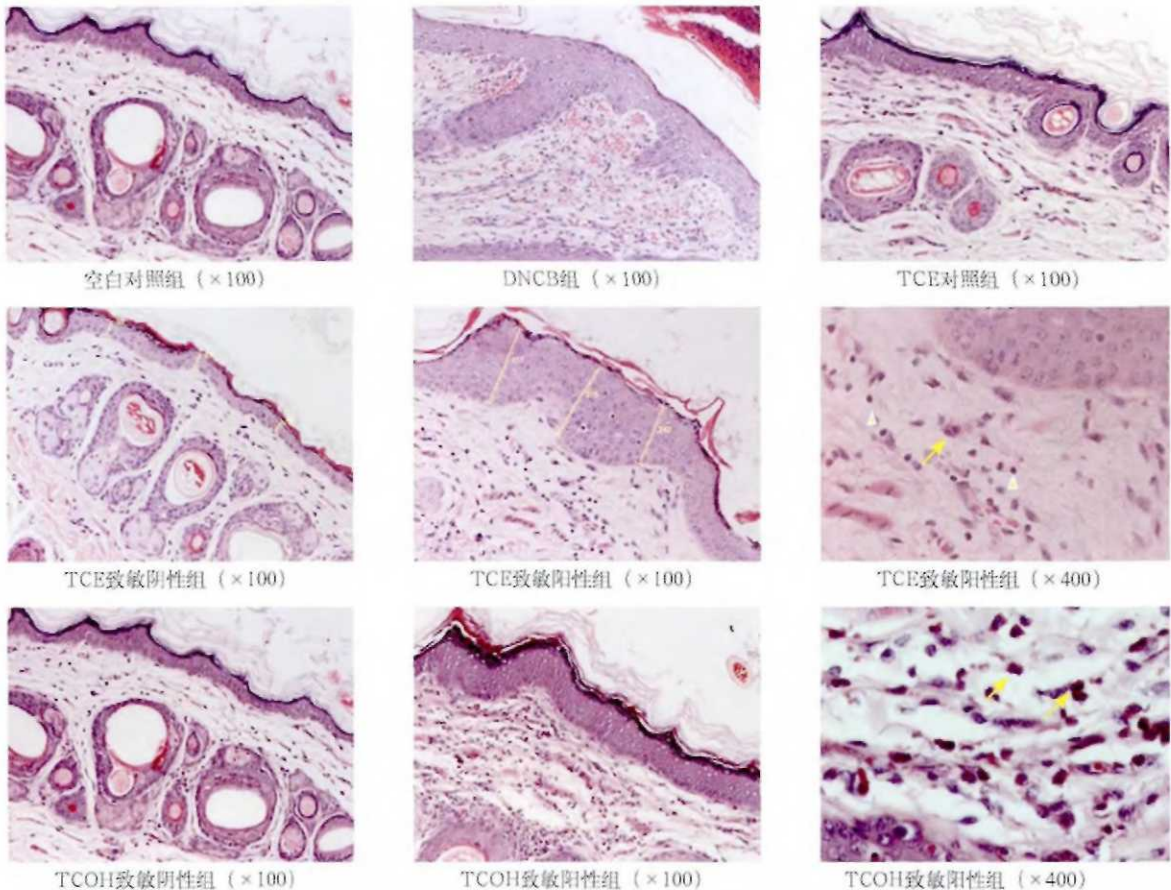


图2 各组豚鼠皮肤病理学改变 (HE染色)