

· 论 著 ·

血必净对急性百草枯中毒鼠肺 NF- κ B 活性及肺损伤保护的影响

刘明伟, 林 昕, 张明谦, 曲 艳, 卜向东
(云南省昆明市延安医院急诊科 650051)

摘要:目的 探讨血必净注射液对大鼠百草枯(PQ)中毒急性肺损伤(ALD)的保护作用及其机制。方法 SD大鼠 60 只,随机分为对照组、百草枯组和血必净组,每组 30 只。百草枯组和血必净组大鼠腹腔内注射百草枯,对照组注射等体积无菌生理盐水,血必净组同时给予血必净治疗。3d 后测支气管肺组织 NF- κ B 活性细胞、支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎症细胞、中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)活性和肺叶湿/干重比。结果 百草枯组和血必净组支气管肺组织 NF- κ B 活性细胞、支气管肺泡灌洗液中总细胞数、中性粒细胞数、巨噬细胞数、BALF-NE 和肺叶湿/干重比均较对照组增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),血必净组各指标明显低于百草枯组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 血必净可抑制 NF- κ B 及炎性细胞活性,对百草枯中毒大鼠急性肺损伤有治疗作用。

关键词:血必净;肺损伤;百草枯;NF- κ B

中图分类号:R365.595;R979.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)01-0037-03

Protective effect of Xuebijing injection on paraquat-induced injury in rat pulmonary microvascular endothelial cells activation of NF- κ B in rats

LIU Ming-wei, LIN Xin, Zhang Ming-qian, et al.

(Department of Emergency, Kunming Yan'an Hospital, Kunming, Yunnan 650051, China)

Abstract: Objective To investigate the activity of NF- κ B of Xuebijing injection in lung tissue of acute paraquat poisoned rats. **Methods** Sixty rats were enrolled and randomly divided into three groups: control group, paraquat group and Xuebijing group. Peritoneal paraquat injection were performed in paraquat group and Xuebijing group, while equal volume of normal saline was peritoneally injected in control group. Three days later, the number of NF- κ B positive cells, inflammatory cells, neutrophil elastase (NE) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and the extravascular lung water volume were measured. **Results** The number of NF- κ B positive cells, total cells, neutrophilic granulocytes, macrophage and NE in BALF and the extravascular lung water volume were significantly increased in paraquat group and Xuebijing group ($P < 0.05$). But their levels were lower in Xuebijing group than in paraquat group ($P < 0.05$). **Conclusion** In paraquat-induced acute lung injury rat models, Xuebijing can alleviate inflammatory response and lung injury, inhibit activity of NF- κ B and possess potential protective effects.

Key words: Xuebijing; acute lung injury; paraquat; NF- κ B

百草枯(paraquat, PQ, 又名对草快)是一种非选择性、接触性除草剂,口服中毒后除引起消化道糜烂、出血外,还能损害多个重要脏器,以肺中浓度较高,可导致呼吸困难、急性肺水肿、进行性肺纤维化等临床表现,因无特效解毒药,目前采用的常规对症治疗效果极差,百草枯中毒患者总病死率为 20%~75%^[1],口服病死率更高达 60%~87.8%,且存活人群中绝大多数患者存在肺间质纤维化,预后恶劣^[2]。全身炎症反应综合征(MODS)的转折点,而核因子- κ B(NF- κ B)是核内炎症递质基因转录的开关^[3],阻断 NF- κ B 的激活可能是治疗成败的关键。而应用血必净抑制 NF- κ B 的活化,可能有助于减轻百草枯中毒鼠的肺损伤。

1 材料与方

1.1 实验动物 SD 大鼠 60 只,雌雄不限,体重(300±50)g,购自昆明医学院动物实验中心。

1.2 主要药品和试剂 血必净(天津红日药业有限责任公司生产);20%百草枯农药(先正达南通作物保护有限公司生产)。核因子- κ B 试剂盒(福州迈新公司生产),即用型超敏 S-P 免疫组化试剂盒(福州迈新公司生产)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组 将上述大鼠随机编号分成 3 个组(对照组、百草枯中毒组、血必净组),每组 20 只。

1.3.2 模型制作、干预措施及处理方法 选择健康 SD 大鼠 60 只,雌雄兼有,随机分为对照组、百草枯组和血必净组,每组 20 只,在 12h 光照和黑暗循环条件下饲养,自由饮水和进食。百草枯组用 20%百草枯溶液按 35mg/kg 腹腔内注射;血必净组在注射百草枯 12h 腹腔注射 2.5g/kg 血必净注射液,每日 1 次,共 3 次;对照组注射等体积生理盐水。造模 3d 后取灌洗液后处死大鼠,经胸腔取肺组织标本。

1.3.3 标本的采集与制备 造模 3d 取肺泡灌洗液(BALF)后处死大鼠,经胸腔取右肺中叶,置于 10%中性福尔马林溶液浸泡固定。固定 48h 后,酒精依次脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,4 μ m 连续切片,分别用苏木素-伊红(HE)和免疫组化染色。

1.3.4 BALF 炎症细胞和 NE 活性检测 25%乌拉坦麻醉动物后切开气管,插入 5mm 塑料管,用 5mL 生理盐水反复灌洗 5 次,纱布过滤,记录回收量,计数肺泡灌洗液(BALF)中细胞总数、巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞。取上清液,-20 $^{\circ}$ C 冻存,测定 NE 活性。

1.3.5 免疫组化结果判定 S-P 法测 NF- κ B 的活性,应用抗 p65 单克隆抗体,该抗体与 NF- κ B 亚单位 p65 区域结合,正常

情况下此结合区域被 NF- κ B 抑制蛋白 I κ B 所覆盖,抗 p65 单克隆抗体不能与之结合,只有当 I κ B 释放后,才能结合,故该抗体能够原位检测到 NF- κ B 的活化。

1.3.6 肺组织干/湿重比 测定取右肺上叶,剔除多余结缔组织,拭干表面血液,用天平精确称量其重量即为湿重,放入 80℃ 烤箱烘烤 48h 后,再次称量其重量即为干重,确定肺湿/干重比。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计软件处理数据 NF- κ B 阳性细胞率和干湿重比例进行数据统计,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析和两样本均数 t 检验比较各组差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织 NF- κ B/P65 阳性细胞率 百草枯中毒组肺组织阳性细胞与对照组相比明显增多,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);血必净组与百草枯中毒组相比阳性细胞明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠肺组织 NF- κ B 阳性细胞率比较 (n)

组别	n	肺组织 NF- κ B 阳性细胞率			
		阴性	1%~29%	30%~69%	70%~100%
对照组	20	18	2	0	0
百草枯中毒组	20	0	0	4	16
血必净组	20	0	3	10	7

2.2 肺组织病理检查 百草枯中毒组:肺充血明显,左、右肺均变钝圆,体积变大,局部有明显的出血点或淤血。出现局灶性肺实变,肺间质及肺泡腔内大量炎性细胞浸润,伴弥漫性肺出血;部分肺间隔明显断裂出现典型的肺大泡表现。血必净

组:肺体积稍增大,淡粉红色,切面无明显血性渗液渗出。光镜下:轻度肺水肿,病变以肺间质水肿充血为主,肺间质充血、水肿和中性粒细胞浸润较百草枯中毒组明显减轻,见图 1。

2.3 肺组织 NF- κ B/P65 阳性细胞的图像分析及右肺上叶干/湿重比 采用美国 Media Cy bematics 公司生产的 Image Pro Plus 图像分析软件分析可见:百草枯中毒组肺组织阳性单位最大,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),血必净组与百草枯中毒组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组相比,百草枯组湿/干重比明显增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而血必净治疗组虽较对照组升高,但仍明显低于百草枯组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 肺组织 NF- κ B/p65 阳性细胞阳性单位 (Pu) 及湿/干重比比较

组别	n	肺阳性单位	湿/干重比
对照组	20	31.16 \pm 4.75	4.87 \pm 0.16
百草枯中毒组	20	70.52 \pm 5.63	5.83 \pm 0.18
血必净组	20	42.77 \pm 7.39	5.24 \pm 0.26

2.4 灌洗液中炎症细胞含量 百草枯组和血必净组支气管肺泡灌洗液中炎症细胞含量(炎症细胞总数、巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞)明显高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而百草枯组则明显高于血必净组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)活性在对照组活性极低,血必净组和百草枯组活性显著增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),但血必净组活性明显低于百草枯组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3。

表 3 灌洗液中炎症细胞含量及 NE 活性 ($\bar{x} \pm s, 10^6/L$)

组别	n	细胞总数	巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	NE($\times 10^{-3}$ u/L)
对照组	20	6.6 \pm 1.5	2.1 \pm 1.1	1.2 \pm 0.5	2.4 \pm 0.9	1.3 \pm 0.6	0.46 \pm 0.21
百草枯组	20	85.4 \pm 23.3	23.8 \pm 11.3	35.3 \pm 11.1	14.2 \pm 3.2	9.7 \pm 3.1	18.35 \pm 1.57
血必净组	20	19.3 \pm 1.8	6.2 \pm 1.2	2.4 \pm 1.1	6.2 \pm 1.5	3.8 \pm 0.7	10.17 \pm 2.35

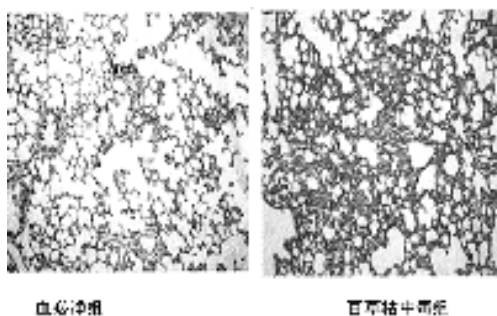


图 1 百草枯中毒组及血必净中毒组肺组织病理检查光镜下比较

3 讨论

百草枯作为除草剂在我国农村广泛应用。皮肤接触、呼吸道吸入、误服等均可造成百草枯中毒。百草枯中毒可引起多器官损害,而肺脏是百草枯中毒后主要损害的靶器官,中毒后肺

组织中的百草枯浓度是血浆浓度的 10~90 倍。根据百草枯摄入量不同,引发不同的临床症状和结局。人类大剂量地摄入百草枯 ($> 30\text{mg/kg}$),引起肺出血、水肿,低氧血症和肺泡间质大量炎症细胞浸润,多脏器功能衰竭,继而死亡。百草枯中毒常引起全身炎症反应综合征,进而可造成多脏器功能衰竭,以急性肺损伤最为明显。已证明,全身炎症反应综合征是各种致病因素触发机体产生过度炎症的一种临床过程,包括多种炎性介质的大量释放,导致抗炎反应与致炎反应系统失衡,若过度炎症反应继续恶化^[4],可导致急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、多器官障碍综合征等。而在百草枯中毒弥漫性肺损伤的病理变化过程研究中已经发现,在中毒后 1~7d 为弥漫性炎症反应阶段,肺毛细血管和小静脉内皮细胞、肺泡 I 型和 II 型上皮细胞受损,表现为肺水肿、出血、炎症细胞浸润;水肿消减后进入后期增生阶段,逐渐出现修复机化改变(7~14d)以及明显纤维疤痕形成(21~45d)。因此该实验选择中毒后第 3 天测定各炎性指标。

Ortiz 等^[5]提出细胞因子网络的概念,但此假说尚待进一步完善。研究表明,百草枯中毒大鼠 NF- κ B 显著升高^[6],与本研究一致。现已证明,NF- κ B 通过参与多种细胞因子基因的转录而对这一调控网络产生复杂的影响。激活的 NF- κ B 可增强 TNF- α 、IL-1 等众多细胞因子的转录,使炎症细胞合成炎症因子的时间和数量得以增高^[3]。因此,NF- κ B 是核内炎性递质基因转录的开关,通过阻断 NF- κ B 的激活,可能有助于抑制百草枯中毒患者病情的发生与发展。从表 1、2 中可以看出血必净可抑制百草枯中毒大鼠肺的 NF- κ B 活性,血必净组肺组织 NF- κ B 阳性细胞率、阳性细胞阳性单位均较百草枯中毒组显著减少,从而减少炎症介质的产生,减轻炎症介质对肺的损伤。

机体在遭受各种严重损伤后可引起全身炎症反应综合征,是导致急性肺损伤发生的重要原因。研究表明,血必净注射液具有对抗细菌毒素、降低内毒素水平、拮抗炎症介质和改善人体免疫功能的保护性作用相结合的双重药理作用,与抗生素联用有显著提高多器官功能障碍综合征(MODS)患者存活率的作用^[7]。大量临床资料证实血必净注射液对脓毒症、脓毒性休克、MODS 具有减轻组织损伤,调节细胞因子平衡,从而提高存活率^[7];具有对抗内毒素及与发病有关的多种炎症介质的作用,能拮抗 TNF- α 、内毒素、IL-6 的释放,增强单核细胞人白细胞 DR 抗原(HLA-DR)表达,促进免疫功能恢复^[8]。王静恩等^[9]研究显示,早期给予血必净注射液治疗后,治疗组 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-10 水平从 3d 起即有所下降,尤以 5d 时明显下降,APACHE II 评分治疗组也较对照组下降明显,最终治疗组脓毒症、MODS 发生率和病死率也均较对照组低。研究还表明,血必净注射液可抑制百草枯中毒血清转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)水平,减少纤维母细胞迁移、活化,抑制胶原蛋白产生,保护肺组织结构,可以更有效地抑制肺纤维化、肺实变^[10]。同时可降低内毒素肺损伤大鼠血浆中肝细胞生长因子(HGF)、角细胞生长因子(KGF)的异常升高,减轻肺脏的炎症反应,发挥对肺组织的保护作用^[11]。其肺保护作用可能与抗炎作用及抑制 NF- κ B 活性有关。从病理检查及表 2、3 可看出,血必净注射液还可抑制百草枯中毒大鼠中性粒细胞弹性蛋白酶活性及炎性细胞在肺内聚集,对百草枯中毒所致的肺损伤具有保护作用,与文献报道一致^[12]。不同浓度的血必净均能不同程度抑制炎性因子的活性,并呈剂量依赖关系,以高剂量的血必净作用最为明显^[13]。本组大鼠均选用大剂量血必净腹腔内注射。

目前,百草枯中毒仍无特效治疗,研究发现,即使是轻微肺损伤仍可引起百草枯中毒患者在较长时间内的限制性肺功能损伤,最终导致不可逆的肺间质纤维化,而一旦出现肺间质纤维化,患者预后极差,目前尚无确切有效的救治手段^[14]。血必净可抑制 NF- κ B 在大鼠肺组织中的激活,进一步减轻炎症介质对急性百草枯中毒所致的急性肺损伤起到治疗作用,能有效阻止急性百草枯中毒的病情进程,减轻肺组织的病理损害。

参考文献:

[1] Jineco R, Tinoco R, Parsonnet J, et al. Paraquat poisoning

in Southern Mexico: A report of 25 cases[J]. Arch Environ Health, 1993, 48(2): 78.

[2] Mohammadi-Karakani A, Ghazi-Khansari M, Sotoudeh M. Lisinopril ameliorates paraquat-induced lung fibrosis [J]. Clin Chim Acta, 2006, 367(9): 170.

[3] 师阳, 李彬, 常乐. 核因子- κ B 激活在急性重症胰腺炎发病中的作用[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2008, 22(5): 348.

[4] Levels JH, Lemaire LC, Van den Ende AE, et al. Lipid composition and lipopolysaccharide binding capacity of lipoproteins in plasma and lymph of patients with systemic inflammatory response syndrome and multiple organ failure[J]. Crit Care Med, 2003, 31(6): 1647.

[5] Ortiz LA, Lasky J, Hamilton RF, et al. Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin-induced lung injury in mice[J]. Exp Lung Res, 1998, 24(6): 721.

[6] 佟飞, 田英平, 石汉文, 等. 急性百草枯中毒大鼠肺组织核因子- κ B 及诱导型一氧化氮合酶表达变化的研究[J]. 中国急救医学, 2006, 26(7): 520.

[7] 陈齐红, 郑瑞强, 林华, 等. 血必净注射液治疗脓毒性休克的前瞻性随机对照研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(6): 364.

[8] 张畔, 曹书华, 崔克亮, 等. 血必净对多脏器功能障碍综合征单核细胞 HLA-DR 表达影响的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9(1): 21.

[9] 王静恩, 蔡金芳, 王志华, 等. 血必净注射液对多发性创伤患者早期的治疗作用及对预后的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(5): 276.

[10] 王英, 邱泽武, 彭瑞云, 等. 血必净注射液联合地塞米松防治大鼠百草枯中毒慢性肺损伤的作用研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(5): 282.

[11] 吴允孚, 陈刚, 席与斌. 血必净注射液对内毒素性肺损伤治疗作用的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 5(3): 181.

[12] 马俊清, 路伟, 黄杨, 等. 血必净注射液对百草枯刺激的大鼠肺微血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国急救医学, 2008, 28(9): 808.

[13] 张政伟, 管向东, 阮艳君, 等. 血必净注射液治疗急性百草枯中毒的实验[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(2): 105.

[14] 尤再春, 史忠, 高全杰, 等. 依达拉奉对百草枯中毒致急性肺损伤预防及治疗作用研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(22): 2517.

(收稿日期: 2009-04-30 修回日期: 2009-07-27)