

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.09.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220321.2016.003.html\(2022-03-22\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220321.2016.003.html(2022-03-22))

## 脂肪乳通过 LPS/TLR4 通路对急性有机磷中毒肺损伤的治疗作用研究\*

李 刚, 韩楠楠, 张 可, 李恒杰

(浙江省人民医院/杭州医学院附属人民医院急诊医学科, 杭州 310014)

**[摘要]** **目的** 探讨脂肪乳对急性有机磷中毒所致肺损伤的治疗效果及脂多糖(LPS)/Toll样受体4(TLR4)通路在治疗过程中发挥的作用。**方法** 将50只大鼠随机分为A组(盐水对照组)、B组(脂肪乳对照组)、C组(标准治疗组)、D组(脂肪乳治疗组)、E组(LPS/TLR4拮抗剂组),给予90%敌敌畏(7 mg/kg)腹腔注射染毒。A组染毒后尾静脉注射生理盐水(5 mL/kg);B组染毒后尾静脉注射20%脂肪乳(5 mL/kg);C组染毒后予阿托品(10 mg/kg)和氯解磷定(40 mg/kg)肌肉注射;D组在C组的基础上尾静脉注射20%脂肪乳(5 mL/kg);E组在D组的基础上尾静脉注射LPS/TLR4拮抗剂(0.5 mg/kg)。染毒后4 h使用毛细导管眶下采血1 mL行全血胆碱酯酶检查;染毒后24 h内观察大鼠流涎、肌肉震颤等中毒表现和存活情况;染毒后24 h取肺组织,HE染色电镜下观察肺组织病理结构,利用荧光定量PCR技术检测肺组织中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)mRNA相对表达量,流式细胞术检测肺细胞悬液中LPS/TLR4表达。**结果** 敌敌畏染毒后,A组中毒症状出现较早,并且实验大鼠均出现了流涎、肌束震颤、躁动等中毒症状。染毒后24 h,A组有3只大鼠存活,B组有4只大鼠存活,C组有5只大鼠存活,D组有7只大鼠存活,而E组存活9只,仅2只大鼠出现流涎。E组存活率、胆碱酯酶活性最高,而流涎率、肌束震颤评分最低,与其他4组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。HE染色电镜下肺组织病理结果显示,D组较A、B、C3组炎症细胞浸润、红细胞渗出明显减轻,E组肺损伤最轻。染毒后24 h肺组织IL-6、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 相对表达量,B组低于A组,D组低于A、B、C3组,E组低于其他4组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。染毒后24 h肺细胞悬液中LPS/TLR4表达,B组低于A组,D组低于A、B、C3组,E组低于其他4组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** 脂肪乳可以减轻急性有机磷中毒所致肺损伤,LPS/TLR4通路在治疗过程中发挥重要作用。

**[关键词]** 脂肪乳;LPS/TLR4;急性有机磷中毒;肺损伤

**[中图法分类号]** R595.4

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2022)09-1448-05

## Therapeutical effect of lipid emulsion in lung damage induced by acute organophosphorus poisoning through LPS/TLR4 pathway\*

LI Gang, HAN Nannan, ZHANG Ke, LI Hengjie

(Department of Emergency Medicine, Zhejiang Provincial People's Hospital/Affiliated People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310014, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the therapeutical effect of lipid emulsion in lung damage induced by acute organophosphorus poisoning and its effect of LPS/TLR4 pathway in the treatment process. **Methods** Fifty Sprague-Dawley (SD) rats were random divided into the five groups: A, B, C, D and E. 90% dichlorvos (DDVP, 7 mg/kg) was intraperitoneally injected for poison contamination. The group A was given normal saline (5 mL/kg) by tail venous injection after poison contamination; 20% lipid emulsion (5 mL/kg) was given by tail intravenous injection in the group B; atropine (5 mL/kg) and pralidoxime chloride (40 mL/kg) were given by intramuscular injection in the group C; on the basis of standard treatment group, the combined use of 20% lipid emulsion (5 mL/kg) was given by tail vein injection in the group D; on the lipid emulsion treatment, the LPS/TLR4 antagonist (0.5 mg/kg) was given by tail vein injection in the group E. 1 mL

\* 基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2020KY441)。 作者简介:李刚(1985—),副主任医师,硕士,主要从事中毒、急危重症方面的研究。

blood was collected under the orbit by capillary tube for detecting the whole blood cholinesterase (CHE) at 4 hours after DDVP poisoning. The poisoning manifestations such as salivation and muscle tremor, and survival situation were observed within 24 h after poisoning. The lung tissues were taken after 24 h of poisoning for observing the lung tissues pathological structure by HE staining. The fluorogenic quantitative PCR was applied to detect the relative expression levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B in lung tissue. The flow cytometry was applied to detect the expression level of LPS/TLR4 in lung cell suspension. **Results** After DDVP poisoning, the poisoning symptoms in the group A appeared earlier, such as muscular tremor, salivation and restlessness. After DDVP poisoning, only 3 mice in the group A survived, which had 4 mice in the group B, 5 mice in the group D, 7 mice in the group D, and 9 mice in the group E, only 2 mice had salvation. Compared with the group A, B, C and D, the survival rate and cholinesterase activity in the group E were the highest, while the salivation rate and the intensity of muscular tremor were the lowest, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The pathological structure of lung tissues under the HE staining electron microscope showed that compared with the group A, B and C, the infiltration of inflammatory cells and exudation of red blood cells in the group D were obviously lessened, while which in the group E were the lightest. The relative expression levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B in lung tissue at 24 h after DDVP poisoning in the group B was lower those in the group A, the group D was lower than the group A, B and C, the group E was the lowest among 5 groups, and the differences were statistically significant ( $P < 0.01$ ). The expression of lung cell suspension LPS/TLR4 at 24 h after DDVP poisoning in the group B was lower than that in the group A, the group D was lower than the group A, B and C, the group E was lower than the group A, B, C and D, and the differences were statistically significant ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The lipid emulsion can relieve the lung injury caused acute organophosphorus poisoning and the LPS/TLR4 pathway plays an important role in the course of the treatment.

**[Key words]** lipid emulsion; LPS/TLR4; acute organophosphorus poisoning; lung injury

急性有机磷中毒 (acute organophosphorus poisoning, AOPP) 是我国最常见的急性农药中毒之一, 其造成的急性呼吸衰竭是致死的重要因素<sup>[1]</sup>。AOPP 患者临床救治包括使用阿托品、胆碱酯酶复能剂, 辅以洗胃、血液灌流等综合治疗<sup>[2-3]</sup>。然而经上述治疗, 患者仍可出现急性肺损伤表现, 导致治疗较为棘手。本团队前期的研究及其他研究结果显示, 脂肪乳与阿托品、解磷定联合应用, 可以减轻 AOPP 症状, 降低病死率, 加快胆碱酯酶恢复, 减轻 AOPP 导致的肺损伤<sup>[4-6]</sup>。但是当时的实验未明确脂肪乳对 AOPP 肺损伤治疗作用的具体机制。近年来有文献<sup>[7]</sup>报道, AOPP 发生后, 脂多糖 (LPS)/Toll 样受体 4 (TLR4) 表达明显升高, 同时 NF- $\kappa$ B 蛋白在各组织中表达也明显增加, 并且 LPS/TLR4 升高和降低与炎症细胞因子是一致的, 并且, 给予治疗干预后, LPS/TLR4、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (IL-6)、NF- $\kappa$ B 均有下降。本研究旨在前期实验结果的基础上, 进一步探讨 LPS/TLR4 通路在脂肪乳对 AOPP 大鼠肺损伤治疗过程中的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和试剂

健康成年封闭 Sprague-Dawley 大鼠 50 只, 雌雄

各半, 体重 ( $280 \pm 20$ ) g [动物使用许可证号 SCXK (沪) 2017-0012; 合格证号 20170012005541], 由上海吉辉实验动物有限公司提供。90% 敌敌畏 (批号: 20200813001, 荆州安道麦股份有限公司), 20% 脂肪乳 (批号: 80PF033, 费森尤斯卡比华瑞制药有限公司), 阿托品注射液 (批号: 1811161, 天津金耀制药), 氯解磷定 [批号: 19032701, 开封制药 (集团) 有限公司]。LPS/TLR4 拮抗剂 (批号: 66229, 美国 Med Chem Express 有限公司)

### 1.2 动物饲养条件和饲料

饮用水为灭菌二级超纯水, 饮用水质量符合中华人民共和国国家标准《生活饮用水卫生标准》(GB5749-2006) 的规定。实验动物房使用许可证号 SYXK (浙) 2015-0008, 饲养环境: 温度  $20 \sim 25$  °C, 相对湿度  $40\% \sim 70\%$ 。在动物房环境中适应 2 周。维持饲料由江苏省协同医药生物工程有限责任公司提供, 执行标准 GB14924.3-2010《实验动物配合饲料营养成分》。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 模型制备

将 50 只大鼠随机 (数字随机法) 分为 A 组 (盐水对照组)、B 组 (脂肪乳对照组)、C 组 (标准治疗组)、D

组(脂肪乳治疗组)、E组(LPS/TLR4拮抗剂组)5组,每组10只,5组大鼠均给予90%敌敌畏7 mg/kg腹腔注射染毒(药物剂量是使用该厂家药物预实验确定,确保符合急性重度有机磷中毒且染毒后不会立刻全部死亡)。各组染毒后立即给予不同药物治疗,A组染毒后尾静脉注射生理盐水(5 mL/kg);B组染毒后尾静脉注射20%脂肪乳(5 mL/kg);C组染毒后立即予阿托品(10 mg/kg)和氯解磷定(40 mg/kg)肌肉注射;D组在C组的基础上联合应用20%脂肪乳(5 mL/kg)尾静脉注射。E组在D组的基础上应用LPS/TLR4拮抗剂(0.5 mg/kg)尾静脉注射。观察24 h内各组大鼠流涎发生率,统计肌束震颤评分,评分标准:无肌束震颤为0分;口周肌肉出现肌束震颤而其他肌肉偶见肌束震颤为1分;腹肌、后肢肌多处出现肌束震颤为2分;腹肌、后肢肌频繁出现多发性肌束震颤为3分。记录各组大鼠24 h存活率。

### 1.3.2 标本采集、HE染色、荧光定量PCR及流式细胞术检测

染毒后4 h使用毛细导管眶下采血1 mL,用HITACHI7170全自动生化仪测定全血胆碱酯酶活性。染毒24 h后取各组大鼠予腹腔注射5%水合氯醛6 mL/kg麻醉后,立即打开胸腔,无菌条件下分离并取出肺脏,4%甲醛溶液中固定5 d,然后修块、脱水、浸蜡、包埋、切片、HE染色,镜下观察标本的结构。利用荧光定量PCR技术检测肺组织中IL-6、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B mRNA相对表达量。制备肺细胞悬液,流式细胞术检测肺细胞悬液中LPS/TLR4表达。

### 1.4 统计学处理

应用SPSS 22.0统计软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;单因素多水平比较采用One Way ANOVA(单因素方差分析);两样本均数间比较采用 $t$ 检验;计数资料以百分率表示,两样本率的比较采用 $\chi^2$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠中毒表现和存活情况比较

敌敌畏染毒后,A组和B组中毒症状出现较早,A组大鼠均出现了流涎、肌束震颤、躁动、站立不稳等中毒症状。染毒后24 h内A组只有3只大鼠存活,B组只有4只存活。C组、D组、E组上述症状出现较晚,呼吸困难、肌束震颤、流涎较A组、B组轻。D组与A组、B组、C组3组相比较,存活率明显升高、流涎率明显降低、肌束震颤评分最低、全血胆碱酯酶活性明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。E组大鼠存活率达90%,而流涎率只有20%,和其余4组比较,存活率、全血胆碱酯酶活性最高,而流涎率、肌束震颤评分最低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1。

### 2.2 各组大鼠肺组织病理学改变

A组肺泡间隔增宽伴水肿及组织间充血,炎症细胞浸润,血管周围疏松水肿、渗出;B组可见肺泡间隔增宽及组织间充血,并见炎症细胞浸润;C组肺泡间隔略增宽,可见少量炎症细胞浸润及红细胞渗出;D组可见少量炎症细胞浸润及红细胞渗出;E组肺泡间隔略增宽,可见少量炎症细胞浸润及红细胞渗出,见图1。

### 2.3 各组大鼠肺组织IL-6、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B表达量

B组与A组比较,大鼠肺组织IL-6、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  mRNA相对表达量显著降低( $P < 0.01$ );C组与A组比较,大鼠肺组织IL-6、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  mRNA相对表达量显著降低( $P < 0.01$ );D组与C组比较,大鼠肺组织IL-6、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  mRNA相对表达量显著降低( $P < 0.01$ );IL-6、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  mRNA相对表达量显著降低( $P < 0.01$ ),见图2。

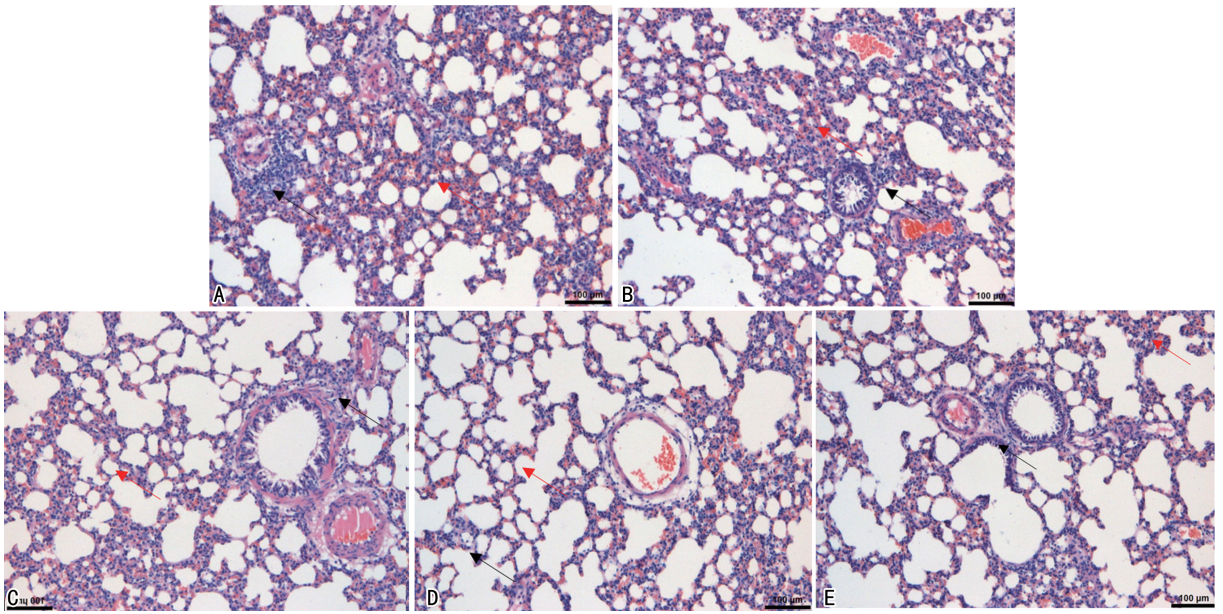
### 2.4 各组大鼠肺细胞悬液中LPS/TLR4表达

与A组比较,B组肺细胞内LPS/TLR4表达明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );D组的LPS/TLR4表达不但较A组、B组明显下降,而且和C组比较,下降也较为明显,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );E组和其余4组比较,LPS/TLR4表达均明显降低,差异有统计学意义,见图3。

表1 各组大鼠存活率、流涎率及肌束震颤评分、CHE比较

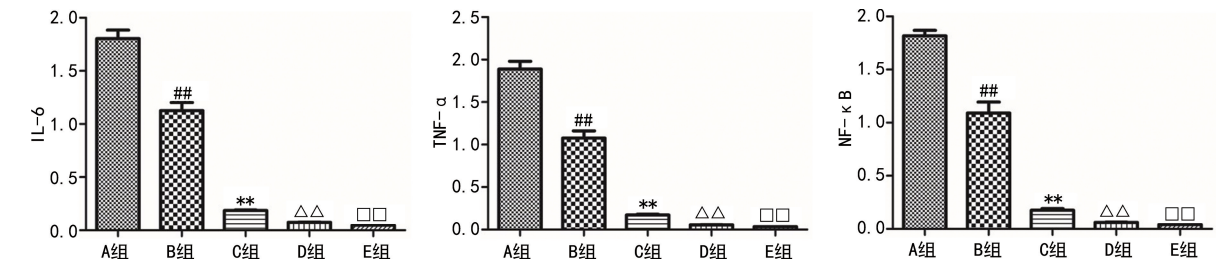
组别	n	存活率(%)	流涎率(%)	肌束震颤评分( $\bar{x} \pm s$ ,分)	CHE( $\bar{x} \pm s$ ,U/mL)
A组	10	30	100	2.90 $\pm$ 0.30	137.40 $\pm$ 73.67
B组	10	40	90	2.61 $\pm$ 0.49	306.30 $\pm$ 66.01
C组	10	50 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>	2.03 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	441.70 $\pm$ 174.37 <sup>a</sup>
D组	10	70 <sup>abc</sup>	50 <sup>abc</sup>	1.39 $\pm$ 0.49 <sup>abc</sup>	536.21 $\pm$ 229.38 <sup>abc</sup>
E组	10	90 <sup>abcd</sup>	20 <sup>abcd</sup>	0.71 $\pm$ 0.64 <sup>abcd</sup>	652.20 $\pm$ 186.82 <sup>abcd</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与A组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与B组比较;<sup>c</sup>: $P < 0.05$ ,与C组比较;<sup>d</sup>: $P < 0.05$ ,与D组比较。



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组; E: E 组。黑色箭头: 炎症细胞浸润; 红色箭头: 出血。

图 1 各组大鼠 HE 染色肺组织病理学改变



<sup>##</sup>:  $P < 0.01$ , 与 A 组比较; <sup>\*\*</sup>:  $P < 0.01$ , 与 A 组比较; <sup>△△</sup>:  $P < 0.01$ , 与 C 组比较; <sup>□□</sup>:  $P < 0.01$ , 与 D 组比较。

图 2 各组大鼠肺组织 IL-6、TNF-α、NF-κB mRNA 相对表达量

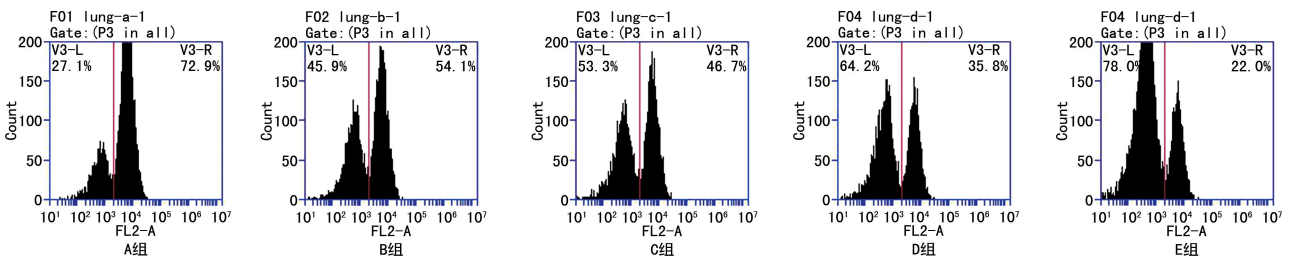


图 3 大鼠肺细胞中 LPS/TLR4 表达

### 3 讨 论

肺脏是 AOPP 较为常见的损伤部位,急性呼吸衰竭是 AOPP 导致患者死亡较为常见的原因<sup>[8]</sup>。相关研究<sup>[9-10]</sup>认为,急性呼吸衰竭的产生主要是由于乙酰胆碱大量积聚引起突触后神经肌肉接头功能障碍,其又分为中毒型肺水肿型、呼吸中枢衰竭型、解毒剂过量型及中间综合征型。临床治疗过程中除使用阿托品、解磷定治疗外,对 AOPP 所致急性肺损伤无明确有效的治疗药物。本实验结果显示,脂肪乳治疗组与盐水对照组、脂肪乳对照组、标准治疗组比较,大鼠的中毒症状明显减轻、存活率升高、全血胆碱酯酶活性升高、肺组织病理改变明显减轻,和前期研究<sup>[4]</sup>结果

一致。从肺组织 HE 染色镜下病理结构改变的角度,再一次验证了脂肪乳对 AOPP 所致肺损伤的治疗作用。

TLR4 跨膜蛋白是 TOLL 受体家族的成员之一<sup>[11-12]</sup>,LPS 脂多糖在应激及炎症反应过程中均可升高。LPS/TLR4 通路激活会导致细胞内 NF-κB 信号传递和生成炎症细胞因子,如 TNF-α 和 IL-6,这些因子在对外界刺激反应的识别和组织损伤过程中起到重要的作用<sup>[13]</sup>。LPS 发生改变后组织中的 TLR4、NF-κB 及血液和组织中的 TNF-α、IL-6 的表达均会改变<sup>[14]</sup>。本实验结果显示,各组大鼠给予敌敌畏染毒后,肺组织 LPS/TLR4 明显升高,同时 NF-κB 蛋白表

达也明显增加,并且 LPS/TLR4 的升降与炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平是一致的;给予阿托品、解磷定标准治疗干预后,LPS/TLR4、TNF- $\alpha$ 、IL-6、NF- $\kappa$ B 均有下降,并且下降程度和盐水对照组比较差异有统计学意义,同样与中毒症状及肺组织损伤程度呈相关。说明 AOPP 在发病和治疗过程中 LPS/TLR4 通路起到了重要作用,该实验结果与文献[4]报道一致。

本实验发现,无论是脂肪乳对照组和盐水对照组比较,还是脂肪乳治疗组和标准治疗组比较,只要加入脂肪乳治疗,该组实验大鼠肺组织 IL-6、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 表达量均明显下降,同时,肺细胞悬液中 LPS/TLR4 表达同步下降。众所周知,脂肪乳具有结合 LPS 的特性,进而可抑制巨噬细胞的激活。脂肪乳中的磷脂和高密度脂蛋白,在体内和体外结合 LPS 并可起到中和作用,LPS 诱导的细胞因子反应会减弱。研究<sup>[12]</sup>表明,脂肪乳与 LPS 作用后,LPS 即失去了结合能力,从而抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的释放。脂肪乳可以抑制 LPS/TLR4,从而使 TNF- $\alpha$ 、IL-6 释放减少,TLR4 与 LPS 拮抗剂结合,几乎完全可以抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6 释放。本实验结果显示,LPS/TLR4 阻断组肺细胞悬液中 LPS/TLR4 表达、IL-6、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 中 mRNA 相对表达量与其他 4 组相比是最低的。同时在实验中还可以发现,LPS/TLR4 阻断组 AOPP 症状最轻、存活率最高、胆碱酯酶活性最高、肺组织病理改变最接近于正常大鼠肺组织。

本实验证明,脂肪乳可以减轻 AOPP 所致肺损伤;LPS/TLR4 通路在治疗 AOPP 所致肺损伤的过程中发挥了重要作用。

## 参考文献

- [1] 张铨成. 急性早期急性重症有机磷农药中毒致呼吸衰竭应用呼吸机治疗的效果分析[J]. 中外医学研究杂志,2020,5(13):121-123.
- [2] 崔晓磊,高恒波,田英平. 急性有机磷农药中毒的诊断与鉴别诊断——《急性有机磷农药中毒诊治临床专家共识 2016》解读[J]. 河北医科大学学报,2019,36(8):869-871.
- [3] 唐春艳,张凤英. 96 例有机磷中毒的急救措施及护理对策[J]. 中国卫生标准管理,2016,7(1):197-198.
- [4] 李刚,其其格,孙建波,等. 脂肪乳对急性有机磷中毒大鼠肺损伤的疗效分析[J]. 中华急诊医学杂志,2012,21(9):976-980.
- [5] 许江涛,蔡昭和. 静脉输注脂肪乳配合常规治疗对重度急性有机磷中毒所致的心肌损伤的效果观察[J]. 临床合理用药,2017,10(12):78-79.
- [6] 桑珍珍,郭晋平. 脂肪乳对重度急性有机磷中毒所致心肌损伤疗效分析[J]. 中国急救医学,2018,35(10):916-919.
- [7] FEI H, JUN W, YAO L, et al. Xuebijing injection induces anti-inflammatory-like effects and downregulates the expression of TLR4 and NF- $\kappa$ B in lung injury caused by dichlorvos poisoning[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 10(6):1404-1411.
- [8] 蔡卫东,向镜芬,潘带好. 急性早期应用呼吸机抢救急性重症有机磷农药中毒致呼吸衰竭的临床疗效[J]. 中国现代医生,2020,12(6):94-96.
- [9] 雷习群,单南冰. 重症急性有机磷农药中毒机械通气患者呼吸机相关肺炎危险因素 logistic 分析[J]. 临床肺科杂志,2018,23(1):53-56.
- [10] MUHAMMET M C, AYSE A, RECEP D, et al. Protective effects of intralipid and caffeic acid phenethyl ester on nephrotoxicity caused by dichlorvos in rats [J]. J Anal Methods Chem,2015,2015:491406.
- [11] VAURE C, LIU Y. A comparative review of toll-like receptor4 expression and functionality in different animal species[J]. Front Immunol, 2014,5(96):3-6.
- [12] GABRIEL B, DAVID D, HANS S, et al. Krill oil-in-water emulsion protects against lipopolysaccharide-induced proinflammatory activation of macrophages in vitro[J]. Mar Drug, 2017,15(3):74.
- [13] 李华,徐鹏,王黎. 大黄素对急性有机磷农药中毒致肺损伤大鼠组织 Nrf-2/ARE 信号通路的影响[J]. 临床肺科杂志,2020,25(5):680-684.
- [14] SUN X J, LI X Q, WANG X L, et al. Sevoflurane inhibits nuclear factor- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharide-induced acute inflammatory lung injury via toll-like receptor 4 signaling[J]. PLoS One,2015,10(4):122-129.