

不同剂量甲泼尼龙对急性百草枯中毒大鼠早期肺损伤干预研究

马玉英¹ 赵文鹏² 豆周林² 王占青²

(1 石河子大学医学院第一附属医院急诊科 新疆 石河子,832008 2 石河子大学医学院 新疆 石河子 832002)

摘要 目的:探讨不同剂量的甲泼尼龙(Methylprednisolone, MPS)对急性百草枯(paraquat, PQ)中毒大鼠早期肺损伤的疗效。方法:采用腹腔注射 20%的 PQ 溶液制作大鼠急性 PQ 中毒的模型,随机均分为五组,正常对照组(A 组)、染毒组(B 组)、5mg/kg 甲泼尼龙干预组(C 组)、15mg/kg 甲泼尼龙干预组(D 组)、30mg/kg 甲泼尼龙干预组(E 组)。分三个不同时间点(24、72、168h)处死大鼠(每组每时间点 6 只)。观察各时间点大体标本、组织病理、肺系数和氧合指数。结果:光镜下肺组织病理学观察,与 B 组比较 C、D、E 组大鼠肺的病理学改变,肺泡腔内出血、渗出,炎性细胞浸润、肺泡隔炎性细胞浸润相对较轻,其中以 C、E 组减轻最为明显。在各组相同时间点肺系数:在三个时间点的值均比 B 组低($P < 0.05$),其中 E 组在 24h、72h 时间点上与 C、D 组有显著差异($P < 0.05$)。C、D、E 组与 B 组的氧合指数的比较各个时间点上均与 B 组有差异($P < 0.05$),三组之间相互无明显差异。结论:本实验结果显示甲泼尼龙对急性百草枯中毒大鼠的肺损伤具有保护作用,且 30mg/kg 甲泼尼龙组要优于 5mg/kg、15mg/kg 甲泼尼龙组。

关键词: 甲泼尼龙;百草枯;急性中毒;肺损伤

中图分类号:Q95-3 563 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)11-2103-04

Effects of Different Doses of Methylprednisolone on Early Lung Injury in Paraquat Toxic Rats

ZHAO Wen-peng¹, MA Yu-ying^{2A}, DOU Zhou-lin², WANG Zhan-qing²

(1 Xin Jiang, Medical College of Shihezi University;

2 Xin jiang, the first Affiliated Hospital Emergency Department of Medical College of Shihezi University)

ABSTRACT Objective: To study the effect of different doses of Methylprednisolone on early lung injury of rats with paraquat intoxication. **Methods:** 114 Wistar rats were randomly divided into 5 groups: normal control group (A group), intoxication group (B group), 5mg/kg Methylprednisolone group (C group), 15mg/kg Methylprednisolone group (D group) and 30mg/kg Methylprednisolone group (E group). The 22mg/kg paraquat dissolvent was injected by peritoneal injection in B, C, D, E group for once. Then sacrificing the rats in 5 groups at 3 time points (24h, 72h, 168h), describing lung tissue and observing oxygenation index and lung ratios and the lung pathological changes by light microscope. **Results:** C, D, E group compared with B group, the pathological changes of acute lung injury such as alveolar hemorrhage, exudation, inflammatory cell infiltration, alveolar septal infiltration of inflammatory cells are relatively mild. C and D Group are the lighter of pathological injury. In each group the same time in lung ratios: B group is the largest, group E in the 24h and 72h points score was the lowest ($P < 0.05$). oxygenation index: C, D, E group are increase ($P < 0.05$). **Conclusion:** 30mg/kg Methylprednisolone has protective effect on lung injury of rats with paraquat intoxication and it is better than 5mg/kg and 15mg/kg Methylprednisolone.

Key words: Methylprednisolone; Paraquat; Intoxication; Lung injury

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R563 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2103-04

前言

百草枯(Paraquat, PQ)是目前世界范围内广泛使用的有机杂环类接触性脱叶剂及除草剂,对人畜有较强毒性。PQ 中毒早期主要表现为急性肺损伤,但其诱导肺组织损伤的生化机理目前尚不完全清楚。甲泼尼龙注射液(Methylprednisolone, MPS)是一中效糖皮质激素(GC)具有强大的抗炎和细胞效应、抑制炎症介质释放、稳定细胞膜的功效。本实验探讨不同剂量甲泼尼龙对 PQ 中毒大鼠早期肺损伤的效果。

作者简介:马玉英 硕士研究生导师 教授 Email:jznkmyy@sina.com

赵文鹏(1982-) 男 医学硕士 研究方向 危重病学

(收稿日期 2010-11-30 接受日期 2010-12-31)

1 材料与方法

1.1 材料

健康成年 Wistar 大鼠 114 只(购自新疆乌鲁木齐市疾病预防控制中心动物科),雌雄各半,标准喂养,体重 200~250g。主要试剂为 20%百草枯水剂(江苏南通先正达农药公司)。甲泼尼龙注射液(Pfizer Manufacturing Belgium NV),40mg/支,10%甲醛溶液(石河子大学医学院病理科提供),肝素钠注射液(江苏万邦生化医药 2ml:12500u),光学显微镜、电子天平等。

1.2 方法

2.2.1 百草枯中毒模型建立及动物分组 根据支巧明,孙海晨^[1]等建立的肺损伤动物模型为依据,采用 wistar 大鼠 114 只随机

分组,将大鼠分为五组。除外实验过程中意外死亡的,共有 90 只大鼠纳入:正常对照组(A 组)18 只、染毒组(B 组)18 只及 5mg/kg 甲泼尼龙组(C 组) 18 只、15mg/kg 甲泼尼龙组(D 组)18 只、30mg/kg 甲泼尼龙组(E 组)。给予 PQ22mg/kg 腹腔注射,一次性染毒,甲泼尼龙干预组从染毒后 2h 开始,分别于腹腔内注射甲泼尼龙注射液 5mg/kg、15mg/kg 和 30mg/kg,1 次/d,中毒组及正常对照组大鼠用等体积无菌生理盐水腹腔内注射,1 次/d,至处死前。

1.2.2 观察大鼠活动、精神、进饮食水情况

1.2.3 标本制备 大鼠分别于中毒后 24h、72h、168h 分批处死,每组每个时间点各 6 只,大鼠首先称体重,麻醉后打开腹腔由腹主动脉取血测氧分压,再打开胸腔立即取出肺脏,右肺下叶用 10%的甲醛溶液固定以备做病理切片,左肺称湿重,计算左肺/体重,即肺系数。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件。实验资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据先行进行方差齐性检验,采用单因素方差分析,两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 描述大鼠活动、精神、进饮食水情况

A 组大鼠在 168h 内动作轻快,精神好,对刺激反应灵敏,毛色光洁,进食水正常,大小便未见异常。B 组大鼠染毒后 2h

即出现四肢无力,走路不稳,偶有颤抖,呼吸加快,进食水差。第 72h 活动少,对刺激反应差,易捕捉,脱毛明显,未进食,呼吸急促,眼、鼻处有血性分泌物。第 168h 活动增加,对刺激反应一般,精神好转,进食水尚可。C、D、E 三组在 24,72,168 小时的一般情况介于 A 组和 B 组之间,以 C、D 组大鼠的中毒症状较轻。

2.2 描述各组大鼠肺组织病理学变化

A 组大鼠肺组织呈粉红色,色泽光亮,质地柔软。B 组大鼠第 24h 肺组织轻度肿胀,质地较软,边缘可见散在的出血点。第 72h 天呈肺组织明显肿胀,质地中等,呈肝样变暗红色,可见边界清晰的大片淤血。第 168h 肺组织水肿明显减轻,质地较软,色泽较 A 组暗,可见小块状肉样变。与 B 组相比,C、D、E 三组在三个时间点上中毒情况轻,如肺组织色泽稍浅,水肿、肺淤血稍轻。C、E 组第 168h 未见明显的肉样变。

2.3 各组大鼠肺组织光镜下病理变化结果

各组大鼠肺组织第 72h 时的病理变化 图 a A 组大鼠肺泡结构完整,肺泡腔及间质无渗出;图 b B 组大鼠肺泡腔出血,大量红细胞渗出以及单核、巨噬细胞浸润,肺实变;图 c C 组肺出血及炎细胞渗出明显减轻,肺泡间隔厚度减小;图 d D 组肺泡内可见大量红细胞渗出,炎症细胞浸润较 B 组少;图 e E 组有少量红细胞和炎性细胞渗出,肺泡通气好转。(图片均为 HE×100)。

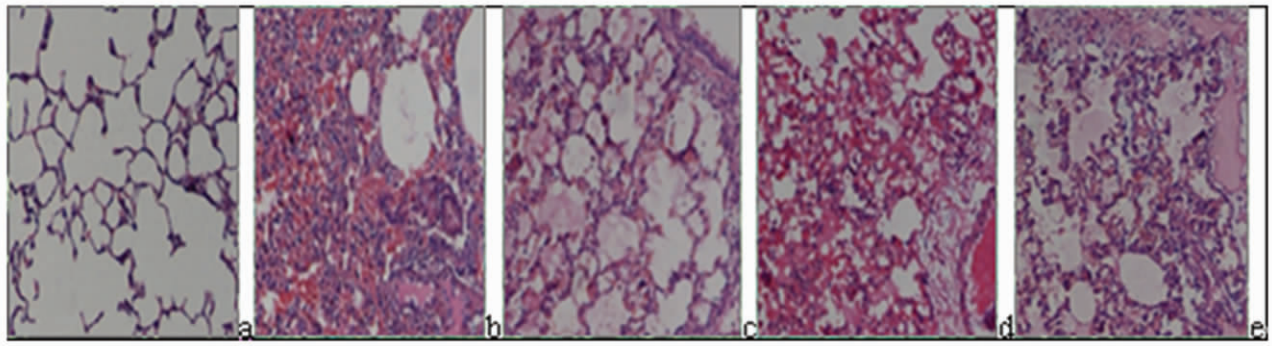


图 a A 组大鼠肺泡结构完整,肺泡腔及间质无渗出;图 b B 组大鼠肺泡腔出血,大量红细胞渗出以及单核、巨噬细胞浸润,肺实变;图 c C 组肺出血及炎细胞渗出明显减轻,肺泡间隔厚度减小;图 d D 组肺泡内可见大量红细胞渗出,炎症细胞浸润较 B 组少;图 e E 组有少量红细胞和炎性细胞渗出,肺泡通气好转。(图片均为 HE×100)

Fig.a: A group,The pulmonary alveolus structure is complete,the pulmonary alveolus cavity and the mesenchymal have not seeped out. Fig.b: B group have obvious pulmonary alveolus cavity internal hemorrhage, and have the massive inflammatory cellulars seep out. Fig.c: C group of pulmonary alveolus hemorrhage and inflammatory cellular exudation reduction and the interval thickness of pulmonary alveolus cavity is reduced. Fig.d: D group have obvious pulmonary alveolus cavity internal hemorrhage, and have the massive inflammatory cellulars seep out.but it is less damage than B group. Fig.e: E group have little pulmonary alveolus cavity internal hemorrhage, and have the spot of inflammatory cellulars to seep out. the ventilation of pulmonary alveolus cavity is improved.(HE×100)

2.4 肺系数

肺系数比较(见表 1):在各相同时间点比较肺系数,与 B 组相比较,C、D、E 三组在 3 个时间点上均较高,在治疗组中相互比较时,其中 E 组在 24h、72h 时均与 C、D 组有差别,D 组和 C 组之间无明显差别,而在 168h 时三组之间无明显差别。以上

差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 氧合指数的比较(见表 2)

各相同时间点比较氧合指数,与 B 组相比较,C、D、E 三组在 3 个时间点上与 B 组均有明显差异,C、D、E 三组相互比较无明显差异。以上差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 不同组别的肺系数(%)比较
Table1 Different groups of Lung coefficient

Group	n	24h	72h	168h
A group	18	0.265± 0.043	0.284± 0.016	0.274± 0.035
B group	18	0.443± 0.036 ¹	0.709± 0.029 ¹	0.402± 0.014 ¹
C group	18	0.396± 0.014 ¹²³	0.639± 0.029 ¹²³	0.357± 0.013 ¹²
D group	18	0.407± 0.013 ¹²³	0.658± 0.023 ¹²³	0.369± 0.015 ¹²
E group	18	0.361± 0.010 ¹²	0.611± 0.006 ¹²	0.350± 0.009 ¹²

Note: 1 P<005 ,Compaired with A group 2P<0.05,Compaired with B group 3P<0.05 ,Compaired with C group

表 2 不同组别的氧合指数比较
Table 2 Different groups of oxygenation index

Group	n	24h	72h	168h
A group	18	426.98 ± 11.92	421.43 ± 13.72	424.60 ± 20.30
B group	18	246.03 ± 14.021	211.11 ± 22.671	287.30 ± 19.671
C group	18	273.81 ± 10.3212	249.21 ± 24.5912	318.25 ± 20.0712
D group	18	264.29 ± 18.7512	236.51 ± 17.9912	314.29 ± 19.9812
E group	18	276.19 ± 16.5012	253.97 ± 18.2412	323.02 ± 13.2712

Note: 1 P<0.05,Compaired with A group 2P<0.05,Compaired with B group 3P<0.05 ,Compaired with E group

3 讨论

目前 PQ 急性中毒的具体机制尚未完全阐明 ,可引起机体多脏器功能受损,以肺损伤尤最为严重,早期主要表现为急性肺水肿、出血、炎性细胞的浸润。普遍认为 PQ 在体内诱导大量的氧自由基产生 造成氧化和抗氧化的失衡最终发展到脂质过氧化损伤 ,造成组织细胞的死亡 ,以及诱发过度的炎症反应导致脏器的损伤。Gregory 等^[2]在动物实验中发现肺组织和支气管肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子 -a(TNF-a)升高。Dinis-Oliveira 等^[3]实验发现 PQ 中毒后大鼠肺组织核因子 -κ B (NF-κ B) 表达增多。但现阶段对于 PQ 急性中毒主要集中于抗氧化和抗炎等综合治疗 ,尚无特效解毒药。

急性 PQ 中毒肺损伤造成的急性呼吸窘迫综合症是患者致死的主要因素 ,积极控制早期肺组织炎症的发展 ,有利于提高患者的生存率^[4]。糖皮质激素具有很强大的抗炎、免疫抑制作用 ,能抑制多种原因造成的炎症反应 ,减少炎性因子的释放和抑制炎性细胞的活性 稳定溶酶体膜以及增加机体的应激能力等。尽管糖皮质激素有强大的抗炎作用^[5],但临床上应用糖皮质激素治疗急性肺损伤(ALI)仍然存在很多争议^[6-7]。张锡刚等^[8]观察早期大剂量甲泼尼龙联合环孢素 A 冲击治疗可改善 PQ 中毒患者的预后。而 steinberg 等^[9]报道早期应用小剂量甲泼尼龙可降低促炎因子水平。另有研究证明小剂量氢化可的松治疗大肠埃希菌所致的肺内源性 ALI 模型大鼠 ,可以降低 BALF 中 IL-8、TNF-Q 的水平 ,并对 BALF 中抑炎介质 IL-10 有一定上调作用^[10]。也有研究显示^[11]在 ALI 发病过程中应用糖皮质激素无益于病情的控制。故此糖皮质激素的剂量与时机选择是一个令人困惑的问题。

本实验从光镜下病理改变、肺系数以及氧合指数的变化可以看出 C、D、E 组与 B 组比较 ,C、D、E 三组在三个指标上均要优于 B 组 ,其中在大鼠的病理改变上 C、E 组表现的更为明显 ,肺水肿、肺出血、炎性渗出较轻 ,在肺系数的变化上 E 组更具有优势 ,而氧合指数方面则三组没有明显的差异。说明不同剂量的甲泼尼龙对急性 PQ 中毒的干预存在差异 ,较大剂量和较小剂量的甲泼尼龙的效果要优于中间剂量。但较大剂量稍好于较小剂量。近年来研究表明 糖皮质激素对机体有双向调节作用 ,主要表现在抗炎和促炎方面。巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)作为一种重要的调节因子参与炎症反应的过程 ,MIF 的减少可以使一些由炎症介质诱发的白细胞和内皮细胞作用减弱^[12] ,人体血液中糖皮质激素含量的增加可以促进 MIF 的释放 ,而当糖皮质激素浓度进一步升高时则抑制 MIF 释放^[13]。有研究显示 ,血液中糖皮质激素与 MIF 含量之间的相互关系不是简单的正相关或负相关 ,而是呈 " 钟形 " 曲线^[14]。这可以解释在实验过程中为什么中间剂量的甲泼尼龙的效果稍差。此外不同剂量的甲泼尼龙导致疗效的不同也可能与机体组织细胞的糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR)的活性有关。大量研究已经表明 GC 通过 GR 对多种信号通路的多种效应发挥作用。据报道^[15]机体内 GR 的激活亦能通过抑制 NF-KB、AP-1 等多种转录活性蛋白从而抑制其下游炎症效应细胞的产生。而外源性的不同剂量的糖皮质激素又是怎么通过调节 GR 的数量和活性达到治疗效果的 ? 其具体机制还不太明确 ,将有待进一步研究。

本实验结果可以看出甲泼尼龙对急性百草枯中毒早期肺损伤有明显的抑制效果 ,其中较大和较小剂量甲泼尼龙在肺组织病理改变中的作用要优于一般剂量 ,而在减轻肺水肿方面较

大剂量的甲泼尼龙效果显著,在改变氧合方面三者之间无明显差异。鉴于本实验为动物实验,样本量较少,与临床应用尚有差距。有待大样本、高质量的动物实验研究进一步证实。

参考文献(References)

- [1] 支巧明,孙海晨,钱晓明,等.百草枯中毒致大鼠肺损伤病理模型的实验研究[J].医学研究生学报,2008,21(2):134-136
Zhi Qiao-ming, Sun Hai-chen, Qian Xiao-ming, et al. Experimental study on the pathological rat model of paraquat-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis[J]. Journal of Medical Postgraduates, 2008,21(2):134-136
- [2] Gregory S Whitehead, Keith A Grasman, Edgar C Kimmel. Lung function and airway inflammation in rats following exposure to combustion products of carbon-graphite/epoxy composite material: comparison to a rodent model of acute lung injury [J]. Toxicology, 2003, 183(1-3):175-197
- [3] Dnis-Oliveira RJ, Sousa C, RemiÃoF, et al. Full survival of paraquat-exposed rats after treatment with sodium salicylate [J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42(7):1017-1028
- [4] Saeed Afzali MD, Mahmoud Gholyaf MD. The Effectiveness of Combined Treatment with Methylprednisolone and Cyclophosphamide in Oral Paraquat Poisoning[J]. Arch Iranian Med, 2008,11(4):387-391
- [5] Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs[J]. N Eng J Med, 2005, 353(16):1711-1723
- [6] Balk R A. Steroids for Septic Shock [J]. Chest, 2003,123(5Supp1):490s-499s
- [7] Sessler C N. Steroids for Septic Shock[J]. Chest, 2003, 123(5 Supp1):482s-489s
- [8] 张锡刚,汤雪萍,李光,等.早期大剂量甲泼尼龙联合环孢素A冲击治疗对口服百草枯中毒患者预后的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2007,32(12):1296-1298
- [9] Zhang Xi-gang, Tang Xue-ping, Li Guang, et al. Effects of early pulse therapy with large dose of methylprednisolone associated with cyclosporine A on the prognosis of patients with paraquat poisoning[J]. Med J Chin PLA, 2007,32(12):1296-1298
- [9] Steinberg KP, Hudson LD, Goodman RB, et al. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome[J]. N Eng J Med, 2006,354(16):1671-1684
- [10] 李红日,宋国维,甘小庄等.小剂量糖皮质激素对大鼠肺内源性急性肺损伤的保护作用[J].中国小儿急救医学,2008,15(3):261-264
Li Hongri, Song Guowei, Gan Xiaozhuang, et al. Effects of low doses of glucocorticoid on acute lung injury in rats[J]. Chinese pediatric emergency medicine, 2008,15(3):261-264
- [11] Meduri GU, Headley AS, Golden EM, et al. Effect of prolonged methylprednisolone therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial [J]. JAMA, 1998, 280(2):159-165
- [12] Julia L. Gregory, Eric F. Morand, Sonja J. McKeown, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces Macrophage Recruitment via CC Chemokine Ligand 2 [J]. The Journal of Immunology, 2006, 177:8072-8079
- [13] 李鑫,杨蕊,臧强,等.糖皮质激素的药理作用机制研究进展[J].国际药学研究杂志,2009,36(1):27-30
Li Xin, Yang Rui, Zang Qiang, Hu Yong-xiu. Pharmacological actions of glucocorticoids: progress in mechanisms[J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2009, 36(1):27-30
- [14] Petrovsky N, Soeha L, Silva D, et al. Macrophage migration inhibitory factor exhibits a pronounced circadian rhythm relevant to its role as a glucocorticoid counter-regulator [J]. Immunol Cell Biol, 2003, 81(2):137-143
- [15] Czock D, Keller F, Rasche FM, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids [J]. Clin Pharm, 2005, 44(1):61-98