

百草枯急性中毒家兔肺纤维化模型建立

张斐斐 史文佩 王安

中南大学公共卫生学院 湖南 长沙 410008

摘要：目的 构建百草枯急性中毒致家兔肺纤维化模型。**方法** 以 50mg/kg 的 20% 百草枯水溶液一次灌胃构建百草枯致家兔肺间质纤维化模型。于染毒前和染毒后 1、3、7 天通过耳缘静脉采血进行 Hyp 活性测定。于染毒后 3、7、14、21 天分批处死家兔，观察肺组织外观并收集肺组织进行光镜检查。**结果** 染毒组和对照组家兔血 Hyp 活性存在组间差异，且两组间血 Hyp 活性在染毒后不同时相变化趋势不同，染毒组家兔高于对照组 ($P<0.05$)。肺组织病理检查显示，染毒组家兔染毒后 21 天出现明显的纤维化改变。**结论** 以 50mg/kg 20% 百草枯水溶液一次给予家兔灌胃能够在染毒后 3 周发生肺纤维化。

关键词：百草枯；急性毒性；肺纤维化；动物模型；家兔

百草枯(paraquat, PQ)又名“克无踪”，是一种联吡啶类、非选择性触杀型除草剂，具有高毒性，对人体健康存在严重危害，中毒死亡率通常在 60%~70%^[1]。百草枯中毒可造成急性肺损伤 (ALI) 或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)，晚期则出现肺泡内和肺间质的纤维化，患者多死于多脏器功能衰竭或呼吸衰竭^[2]。治疗上尚无特效解毒剂，主要是使用免疫抑制剂或糖皮质激素类药物，通过抑制炎症和免疫反应来延缓肺纤维化的进程，疗效较差。目前，国内外尚无理想的研究急性百草枯中毒引起的动物肺纤维化模型，现有动物模型实验时间短,不利于长期观察，且模型的稳定性也不尽如人意^[3]。本实验旨在建立急性百草枯中毒引起的兔肺纤维化模型，为进一步探讨急性百草枯中毒机制和治疗效果的研究打下基础。

1.材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康白色家兔，购于湖南省天勤生物技术有限公司（实验动物生产许可证为 SCXK（湘）2009-0012），雌雄各半，体重在 2.0~2.5kg，标准饲料，单笼饲养，明暗周期 12h 交替，自由取食和饮水，房间温度保持在 25±1℃，湿度在 50-60%。

1.1.2 主要试剂、药品与器材

20% 百草枯水溶液，国内某农药生产厂提供；8% 水合氯醛溶液购自天津市科密欧化学试剂有限公司；Hyp 测试盒（南京建成生物技术研究所以所）。

主要器材：

基金项目：中南大学米塔尔学生创新项目（编号：12MX22）

中南大学本科生自由探索计划项目（编号：2282013bks069）

通讯作者：王安，E-mail: walwry@163.com

灌胃导管、新生儿喉镜，电子天平、动物体重秤、注射器及针头、手术剪、无齿镊等。

1.2 方法

1.2.1百草枯诱导的兔肺急性纤维化模型建立

30 只家兔随机分为 4 个染毒组和 1 个对照组，每组 6 只。根据文献和预实验结果，染毒组以 50mg/kg 的 20%百草枯水溶液一次灌胃，对照组给予等体积生理盐水。分别在染毒前及染毒后第 1、3、7 天随机选 1 组染毒家兔及对照组家兔经耳缘静脉取血标本，以对二甲氨基苯甲醛比色法测定家兔血中羟脯氨酸（Hyp）含量。染毒后 3、7、14、21 天分批处死染毒组家兔，每次 6 只，对照组 6 只家兔于 21 天同期处死。取右下肺小块肺组织,置入福尔马林中固定，HE 染色行光镜检查。

1.2.2统计分析

运用SPSS 18.0软件进行统计分析，采用方差分析比较两样本间均数， $P<0.05$ ，表明差异有统计学意义。

2.结果

2.1 动物一般情况

对照组全部家兔进食、饮水正常，呼吸平稳，皮毛光泽度正常。染毒组家兔于染毒后 1~3h 出现中毒症状，表现为烦躁，反应迟钝，呆卧，精神萎靡，食欲减退，呼吸急促等，染毒后 1~5 天最明显。

2.2 血清 Hyp 活性测定

染毒组和对照组家兔血Hyp活性测定结果见表1。根据重复测量资料的方差分析结果，染毒组和对照组家兔Hyp活性存在组间差异（ $P<0.05$ ），且两组间家兔Hyp活性在染毒后不同时间相变化趋势不同，染毒组家兔Hyp活性高于对照组（ $P<0.05$ ）。

表 1 家兔血 Hyp（ $\mu\text{g/ml}$ ）含量的变化（ $\bar{x} \pm \text{SD}$ ， $n=6$ ）

组别	实验前	染毒 1d	染毒后 3d	染毒后 7d
对照组	780.00 \pm 39.197	793.33 \pm 30.625	760.00 \pm 16.743	766.67 \pm 22.257
染毒组	763.33 \pm 48.040	866.67 \pm 84.499#	1320.00 \pm 220.695#	1733.33 \pm 115.492#

注：# $P<0.05$

2.3 病理形态学检查

2.3.1 肉眼观察

家兔染毒第 3 天，肺体积大致正常，局部有充血；第 7 天肺充血加重，肺体积变大，局部有明显的出血点或淤血；第 14 天肺局部灰白粗糙，充血减轻；第 21 天肺脏灰白区域扩大，质硬。对照组肺脏呈粉红色，质软。

2.3.2 光镜观察

光镜下模型组家兔肺损伤随染毒时间延长而逐渐加重。染毒3天后局部肺组织有充血，肺泡内可见中性粒细胞及成纤维细胞轻度增多；7天时肺泡内炎症细胞增多，可见中性粒细胞，巨噬细胞，成纤维细胞增生，肺间隔有纤维组织增生，间质增厚（图1）；第14天肺组织纤维化程度较前加重，部分肺泡腔内充满胶原纤维及炎症细胞，间质持续增厚；第21天时肺实质有较大范围纤维增生，明显形成纤维化（图2）。对照组无上述病理改变（图3）。

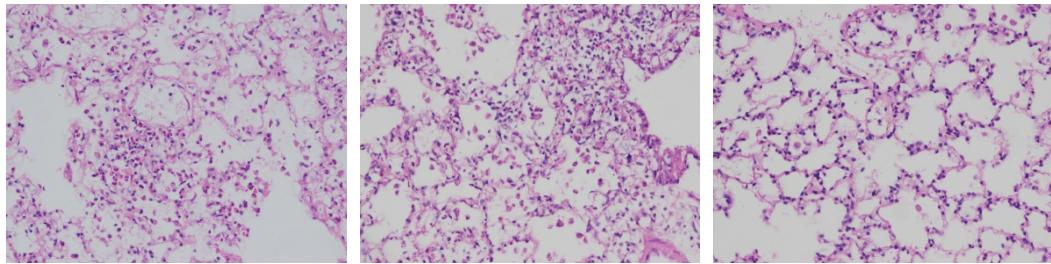


图1. 染毒7d组（HE ×100） 图2. 染毒21d组（HE ×100） 图3. 对照组（HE ×100）

3.讨论

百草枯中毒的靶器官主要是肺脏^[4]，其原因可能是由于肺组织有主动摄取和蓄积百草枯的作用，Hoet等^[5]认为这种蓄积作用与肺内聚胺类的物质摄取系统有关。百草枯中毒早期可造成急性肺损伤或急性呼吸窘迫综合征（ARDS），晚期则出现肺泡内和肺间质的纤维化。百草枯致肺纤维化的发病机理包括：①产生大量自由基，导致氧化应激、脂质过氧化损伤，引起组织细胞尤其是肺组织的氧化性损伤^[6-7]；②刺激神经、内分泌和免疫系统释放大量的炎症递质和细胞因子，参与肺组织损伤和最终的纤维化^[8-9]；③细胞内以及线粒体内钙稳态的失衡^[7,10-12]；④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^[13]。此外，胶原酶和基质金属蛋白酶抑制物(TIMPs)之间的不平衡、异常的细胞外基质调节、肺血管内皮细胞含有的血管紧张素转化酶活力下降也可能跟肺纤维化有关^[6]。

羟脯氨酸(Hydroxyproline, Hyp)是胶原蛋白所特有的氨基酸，约占其氨基酸总量的13%，其水平高低可直接反映肺成纤维细胞合成胶原的能力。研究表明，急性肺损伤早期即有纤维增生的迹象^[14-16]。本实验发现染毒组和对照组血Hyp活性存在组间差异，染毒组Hyp活性高于染毒组（ $P<0.05$ ），说明PQ中毒导致肺纤维化的发生。这与肺组织病理表现相一致，家兔在3周时肺纤维化已经明显，初步得到了预期效果，为进一步探讨急性百草枯中毒机制和治疗效果的研究打下基础。

【参考文献】

[1]Seok SJ,Gil HW,Jeong DS,et al.Paraquat intoxication in subjects who attempt suicide:why they chose paraquat[J].Korean J Intern Med,2009,3(24);247-251.

- [2]Satomi Y,Sakaguehi K,Kasaham Y,et al.Novel and extensive aspects of paraquat - induced pulmonary fibrogenesis:comparative and timecourse microarray analyses in fibrogenic and non—fibrogenic rats[J].J Toxicol Sci,2007,32(5):529-553.
- [3]李新甫,汪建新.急性肺损伤动物模型研究进展.国外医学呼吸系统分册[J],2005,25(7): 506-508.
- [4]李 丽,刁其峰,朱 勇,等.复方丹参注射液治疗百草枯中毒致肺损害临床效果研究[J].实用预防医学,2009, 16(3):818-819.
- [5]Hoet PH, Lewis CP, Demedts M, et al. Putrescine and paraquat uptake in human lung slices and isolated type II pneumocytes[J]. Biochem Pharmacol,1994,48(3):517-524.
- [6]任慧琴,王梅,乔着意.百草枯急性中毒的机制及治疗进展[J].西南国防医药,2012,6(22):686-687.
- [7]黄卫东,王杰赞.急性百草枯中毒肺损伤机制及治疗的研究进展[J].中华危重症医学杂志, 2010,3(5):292-296.
- [8]刘峰,菅向东,尚波,等.急性百草枯中毒肺损伤机制及治疗研究进展[J],毒理学杂志, 2011,10(25):381-382.
- [9]尹彩星,马玉英.急性百草枯中毒临床研究现状[J].新医学,2011,10(42):698-700.
- [10]赵文鹏,马玉英.急性百草枯中毒致肺损伤机制的研究进展[J].新医学,2010,4(41):275-277.
- [11]吴丽红,李艳辉.百草枯中毒发病机制的研究进展[J].中华急诊医学杂志,2007,16(5):554-555.
- [12]Dinis Oliveira RJ,Duarte JA,S6nehez Navarro A,et al.Paraquat poisonings mechanisms of lung toxicity,clinical features,and treatment[J].Crit Rev Toxicol,2008,38(1):13-71.
- [13]龙勇,曾俊峰,江乾,等.急性百草枯中毒致肺损伤的发病机制及治疗[J].医护论坛, 2011,11(8):171-172.
- [14]刘田.Ang-(1-7)对急性肺损伤早期肺纤维化作用的实验研究[D].硕士学位论文,东南大学, 2010.1-49.
- [15]张娟.葛根素抗百草枯诱导大鼠肺纤维化的实验研究[D].硕士学位论文, 山东省医学科学院,2009.1-68.
- [16]汪友平,李艳丽,赖荣德,等.血必净对大鼠急性肺损伤的干预效应研究[J].中国急救医学. 2011,31(11):1003-1006.

附:

第一作者简介

张斐斐（1990-），女，山东济宁人，汉族，本科，主要研究方向为药物毒理

通讯作者简介

王安，E-mail: walwry@163.com