

不同暴露剂量急性敌草快中毒大鼠毒代动力学及胃肠损伤的实验研究

张建爽 孙艺青 高恒波 苑霖 姚冬奇 刘亮 吕宝谱 田英平

河北医科大学第二医院急诊科, 石家庄 050000

通信作者: 田英平, Email: tianyingping-jzh@163.com

【摘要】 目的 观察不同染毒剂量敌草快(DQ)中毒大鼠毒代动力学特点、胃肠道不同部位吸收特征及病理形态损害。**方法** 将96只健康雄性Wistar大鼠按随机数字表法分为对照组(6只)和低剂量(115.5 mg/kg)、中剂量(231.0 mg/kg)、高剂量(346.5 mg/kg) DQ染毒组(各剂量组30只),各剂量染毒组再随机分为染毒后15 min和1、3、12、36 h 5个亚组(各亚组6只)。各剂量染毒组均给予一次性DQ灌胃染毒;对照组给予等量生理盐水灌胃。记录大鼠的一般情况,各亚组大鼠分别选3个时间点行眼内眦采血,并于第3次取血后处死留取胃肠标本。采用超高效液相色谱-质谱联用仪测定血浆及组织中DQ浓度,绘制血药浓度-时间曲线,计算毒代动力学参数;光镜下观察肠道形态结构,测定绒毛高度和隐窝深度并计算两者比值(V/C)。**结果** 低、中、高剂量染毒组大鼠染毒后5 min即可在血浆中检测到DQ, DQ达血浆峰浓度时间(T_{max})分别为(0.85±0.22)、(0.75±0.25)、(0.25±0.00)h, 3个剂量组血浆DQ浓度随时间变化的趋势相似,但高剂量组在36 h时血浆DQ浓度又有所上升。胃肠组织DQ浓度方面,各剂量染毒组大鼠在染毒后15 min~1 h胃和各段小肠DQ浓度最高,3 h时结肠浓度最高;至染毒后36 h,低、中剂量组胃肠各部位DQ浓度已下降至较低水平;高剂量组胃肠组织(除空肠外)DQ浓度较12 h均有升高趋势,仍可检测出较高剂量的DQ〔胃、十二指肠、回肠、结肠DQ浓度分别为6 400.0(1 232.5)、4 889.0(6 070.5)、10 300.0(3 565.0)、1 835.0(202.5) mg/kg〕。光镜下观察肠道形态学和组织病理学变化显示,各剂量DQ染毒后15 min,大鼠胃、十二指肠、空肠即出现急性损伤表现,回肠和结肠在染毒后1 h出现病理损伤,12 h时胃肠损伤最重,各段小肠的绒毛高度显著降低、隐窝深度显著增大、V/C比值降至最低,至染毒后36 h损伤开始减轻;同时,随染毒剂量增加,大鼠各时间点的肠道形态学和组织病理学损伤明显加重。**结论** DQ在消化道吸收迅速,胃肠道各段均有吸收DQ可能。不同时间和剂量的DQ染毒大鼠毒代动力学具有不同特点,在时间方面,DQ染毒15 min即出现胃肠道损伤,36 h开始减轻;在剂量方面, T_{max} 随染毒剂量增加而提前,达峰时间更短。DQ对消化系统损伤与毒物暴露剂量、滞留时间等因素密切相关。

【关键词】 敌草快; 毒代动力学; 胃肠道

基金项目: 河北省自然科学基金(H2019206317)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20221018-00928

Experimental study on the toxicokinetics and gastrointestinal damage in rats poisoned with acute diquat poisoning at different exposure doses

Zhang Jianshuang, Sun Yiqing, Gao Hengbo, Yuan Lin, Yao Dongqi, Liu Liang, Lyu Baopu, Tian Yingping

Department of Emergency Medicine, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

Corresponding author: Tian Yingping, Email: tianyingping-jzh@163.com

【Abstract】 Objective To observe the toxicokinetic parameters, absorption characteristics and pathomorphological damage in different parts of the gastrointestinal tract of rats poisoned with different doses of diquat (DQ). **Methods** Ninety-six healthy male Wistar rats were randomly divided into a control group (six rats) and low (115.5 mg/kg), medium (231.0 mg/kg) and high (346.5 mg/kg) dose DQ poisoning groups (thirty rats in each dose group), and then the poisoning groups were randomly divided into 5 subgroups according to the time after exposure (15 minutes and 1, 3, 12, 36 hours; six rats in each subgroup). All rats in the exposure groups were given a single dose of DQ by gavage. Rats in the control group was given the same amount of saline by gavage. The general condition of the rats was recorded. Blood was collected from the inner canthus of the eye at 3 time points in each subgroup, and rats were sacrificed after the third blood collection to obtain gastrointestinal specimens. DQ concentrations in plasma and tissues were determined by ultra-high performance liquid chromatography and mass spectrometry (UHPLC-MS), and the toxic concentration-time curves were plotted to calculate the toxicokinetic parameters; the morphological structure of the intestine was observed under light microscopy, and the villi height and crypt depth were determined and the ratio (V/C) was calculated. **Results** DQ was detected in the plasma of the rats in the low, medium and high dose groups 5 minutes after exposure. The time to maximum plasma concentration (T_{max}) was (0.85±0.22), (0.75±0.25) and (0.25±0.00) hours, respectively. The trend of plasma DQ concentration over time was similar in the three dose groups, but the plasma DQ concentration

increased again at 36 hours in the high dose group. In terms of DQ concentration in gastrointestinal tissues, the highest concentrations of DQ were found in the stomach and small intestine from 15 minutes to 1 hour and in the colon at 3 hours. By 36 hours after poisoning, the concentrations of DQ in all parts of the stomach and intestine in the low and medium dose groups had decreased to lower levels. Gastrointestinal tissue (except jejunum) DQ concentrations in the high dose group tended to increase from 12 hours. Higher doses of DQ were still detectable [gastric, duodenal, ileal and colonic DQ concentrations of 6 400.0 (1 232.5), 4 889.0 (6 070.5), 10 300.0 (3 565.0) and 1 835.0 (202.5) mg/kg respectively]. Light microscopic observation of morphological and histopathological changes in the intestine shows that acute damage to the stomach, duodenum and jejunum of rats was observed 15 minutes after each dose of DQ, pathological lesions were observed in the ileum and colon 1 hour after exposure, the most severe gastrointestinal injury occurred at 12 hours, significant reduction in villi height, significant increase in crypt depth and lowest V/C ratio in all segments of the small intestine, damage begins to diminish by 36-hour post-intoxication. At the same time, morphological and histopathological damage to the intestine of rats at all time points increased significantly with increasing doses of the toxin. **Conclusions** The absorption of DQ in the digestive tract is rapid, and all segments of the gastrointestinal tract may absorb DQ. The toxicokinetics of DQ-tainted rats at different times and doses have different characteristics. In terms of timing, gastrointestinal damage was seen at 15 minutes after DQ, and began to diminish at 36 hours. In terms of dose, T_{max} was advanced with the increase of dose and the peak time was shorter. The damage to the digestive system of DQ is closely related to the dose and retention time of the poison exposure.

【Key words】 Diquat; Toxicokinetics; Gastrointestinal tract

Fund program: Hebei Province Natural Science Foundation of China (H2019206317)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20221018-00928

敌草快(diquat, DQ)为氧化还原型联吡啶类除草剂,尽管世界卫生组织(World Health Organization, WHO)将其和百草枯(paraquat, PQ)一起归类为中等毒性农药,急性DQ中毒患者预后并未因此而改善,对DQ的毒性分级理应商榷^[1-2]。急性DQ中毒以胃肠道症状为突出表现,特别是可发生麻痹性肠梗阻导致预后不良^[3]。口服DQ后,可首先导致胃肠黏膜弥漫性损害,但具体损害机制的相关研究较少;口服DQ绝大部分经粪便排泄,很少部分经胃肠黏膜吸收,具体吸收部位与损伤关系鲜见报道。本课题组为模拟临床常见中毒途径,通过灌胃染毒建立急性DQ中毒大鼠模型,了解不同剂量下的毒代动力学变化,观察DQ在大鼠胃肠道中的吸收特点及其对胃肠道病理和形态结构的影响,为采取合理的临床消化道去污措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与模型制备: SPF级成年健康雄性Wistar大鼠96只,体质量180~240 g,购于北京斯贝福生物技术有限公司〔动物合格证号:SCXK(京)2019-0010〕。按随机数字表法分为对照组及低剂量(115.5 mg/kg)、中剂量(231.0 mg/kg)、高剂量(346.5 mg/kg)DQ染毒组,各染毒组再随机分为染毒后15 min和1、3、12、36 h 5个亚组(A、B、C、D、E组),每组6只。所有实验动物染毒前12 h禁食(不禁水),按0.01 mL/g DQ给予一次性灌胃染毒;对照组给予等量生理盐水灌胃。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,并

经医院科研伦理委员会审批(伦理号:2022-AE199)。

1.2 血浆及组织标本采集与预处理: 各组大鼠分别选3个时间点于眼眶内采血,其中A组在给药前及给药后5 min和15 min取血,B组在给药后30 min、45 min和1 h取血,C组在给药后1.5、2、3 h取血,D组在给药后4、8、12 h取血,E组在给药后20、24、36 h取血。每次采血0.5~1.0 mL,置于肝素预处理的小离心管中混匀,离心取上清液,于-80℃保存待测。第3次取血后处死各组大鼠,迅速剖取胃部下1/2和距幽门口5~10 cm处的十二指肠、中段部位的空肠组织、距离回盲连接处5~10 cm的回肠及直肠上方10~15 cm的结肠,洗净后用4%多聚甲醛固定。另取对应部位的胃肠组织洗净吸干水分后剪碎,称取50 mg制备组织匀浆,离心取上清液于-80℃中保存待测。

1.3 DQ浓度及毒代动力学参数检测: 取上清液100 μL加入10 μL内标(乙基紫精二溴化物标准品,1 μg/mL)和300 μL乙腈,涡旋1 min,离心取上清液,经0.22 μm有机微孔滤过膜过滤后测定。液相色谱条件为PC HILIC S5色谱柱(5 μm, 2 mm×150 mm),柱温35℃,体积流量0.3 mL/min。流动相A相为20 mmol甲酸铵水溶液(含0.1%甲酸),B相为乙腈。洗脱梯度程序:0~0.1 min,70% B相;0.1~2.0 min,70%~30% B相;2.0~6.0 min,30% B相;6.0~6.1 min,30%~70% B相;6.1~10.0 min,70% B相。进样量3 μL。质谱条件为电喷雾电离正离子模式,电喷雾电离源对分析物进行电离,气

帘气体 30 kPa, 离子喷射电压为 5 500 V, 离子源温度为 550 °C, 离子源气体 1 为 55 psi, 离子源气体 2 为 60 psi。采用多反应检测模式进行监测。计算 DQ 达血浆峰浓度时间 (time to maximum plasma concentration, Tmax)、血浆峰浓度 (maximum plasma concentration, Cmax)、消除半衰期 (half-life, t_{1/2})、曲线下面积 (area under the curve, AUC)、平均滞留时间 (mean residence time, MRT)、表观分布容积 (apparent volume of distribution, Vd/F)、清除率 (clearance rate, CL/F) 等毒代动力学参数。

1.4 胃肠组织病理学及肠道形态结构观察: 从固定液中取出胃肠道组织, 常规脱水、石蜡包埋切片, 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色。光镜下观察并拍照, 用 Image J 软件测定绒毛高度 (绒毛顶端至隐窝开口处的垂直距离)、隐窝深度 (隐窝开口至隐窝基底部的垂直距离), 并计算绒毛高度/隐窝深度比值 (villus length/crypt depth, V/C)。

1.5 统计学分析: 采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计学处理。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 3 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Bonferroni 检验; 不符合正态分布的计量资料以中位数 (四分位数间距) [M(Q_R)] 表示, 组间比较采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验, 有显著性差异者经 Bonferroni 调整法改变检验水准后, 使用 Wilcoxon 秩和检验进行两两比较。血药浓度测量结果采用 Phoenix 软件进行数据处理, 用非房室模型的统计矩法计算毒代动力学参数, 绘制毒物浓度-时间曲线。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠染毒后的基本情况: 对照组进食进水正常, 呼吸平稳, 大便性状正常; 各染毒组在染毒后逐渐出现倦怠、进食进水减少、呼吸浅快、大便不成形等症状, 以 24 h 时症状最为明显, 随后逐渐减轻。

2.2 毒代动力学参数 (图 1; 表 1): 各剂量染毒组

大鼠染毒后 5 min 即可在血浆中检测到 DQ, 达峰值后血浆 DQ 浓度迅速降低, 3 组大鼠血浆 DQ 浓度随时间变化的趋势相似, 但高剂量组血浆浓度在 36 h 时又有上升趋势。毒代动力学参数显示, 随染毒剂量增加, Tmax 提前, 体内毒物的总负荷量增大, 高剂量组 Tmax 和 AUC 与其他两组比较差异均有统计学意义 (均 P < 0.05), 但 3 组间 Vd/F 和 CL/F 差异无统计学意义 (均 P > 0.05)。

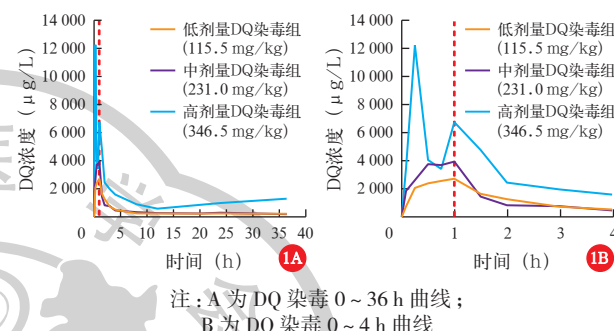


图 1 不同剂量敌草快 (DQ) 染毒组大鼠染毒后平均血药浓度-时间曲线

2.3 胃肠组织中 DQ 含量 (图 2; 表 2): 各剂量染毒组大鼠胃 DQ 浓度均在染毒后 15 min ~ 1 h 达最高, 十二指肠、空肠 DQ 浓度在染毒后 15 min 达最高, 回肠 DQ 浓度在染毒后 1 h 达最高, 结肠 DQ 浓度在染毒后 3 h 达最高, 随后逐渐降低。至染毒后 36 h, 低、中剂量组胃肠各部位 DQ 浓度已降至较低水平; 而高剂量组胃肠组织 (除空肠外) DQ 浓度较 12 h 时有升高趋势, 仍可检测出较高剂量 DQ。

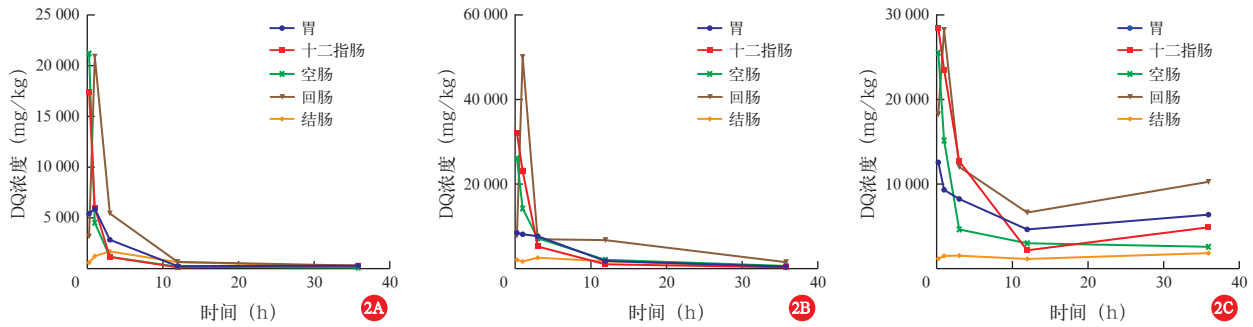
2.4 肠道形态结构及胃肠组织病理学观察

2.4.1 小肠肠道结构 (表 3): 各剂量染毒组大鼠的肠绒毛高度在染毒后 1 h 和 3 h 较 15 min 时下降, 12 h 降至最低, 至 36 h 开始回升; 隐窝深度在 15 min 至 3 h 时变化趋势不明显, 12 h 显著增高, 36 h 开始回落; V/C 比值变化趋势为 1 h 和 3 h 较 15 min 时下降, 12 h 降至最低, 至 36 h 开始回升。不同剂量染毒组之间未见明显差异。

表 1 不同剂量敌草快 (DQ) 染毒组大鼠毒代动力学参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	Cmax (μg/L)	Tmax (h)	t _{1/2} (h)	AUC 0~t (μg·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	AUC 0~∞ (μg·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	MRT 0~t (h)	Vd/F (L/kg)	CL/F (L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹)
低剂量 DQ 染毒组	30	3 030 ± 469	0.85 ± 0.22	13.8 ± 1.6	14 000 ± 1 430	16 800 ± 1 480	12.0 ± 0.6	138.0 ± 22.7	6.93 ± 0.60
中剂量 DQ 染毒组	30	4 440 ± 623	0.75 ± 0.25	16.3 ± 8.6	15 700 ± 1 260	19 800 ± 4 500	11.3 ± 1.4	260.0 ± 80.5	12.20 ± 2.74
高剂量 DQ 染毒组	30	12 300 ± 1 840	0.25 ± 0.00 ^{ab}	17.5 ± 5.6	46 400 ± 8 240 ^{ab}	63 300 ± 17 800	14.9 ± 2.4	129.0 ± 15.3	5.52 ± 1.71

注: Cmax 为血浆峰浓度, Tmax 为 DQ 达血浆峰浓度时间, t_{1/2} 为消除半衰期, AUC 0~t 为时间从 0 到所选择的最后一个时间点时的血药浓度-时间曲线下面积, AUC 0~∞ 为时间从 0 到无穷大时的血药浓度-时间曲线下面积, MRT 0~t 为时间从 0 到所选择的最后一个时间点时的平均滞留时间, Vd/F 为表观分布容积, CL/F 为清除率; 与低剂量 DQ 染毒组比较, ^aP < 0.05; 与中剂量 DQ 染毒组比较, ^bP < 0.05



注：A 为低剂量 (115.5 mg/kg) DQ 染毒组, B 为中剂量 (231.0 mg/kg) DQ 染毒组, C 为高剂量 (346.5 mg/kg) DQ 染毒组

图 2 不同剂量敌草快 (DQ) 染毒组大鼠染毒后各时间点胃肠组织中 DQ 浓度变化趋势

表 2 不同剂量敌草快 (DQ) 染毒组大鼠染毒后各时间点胃肠组织中 DQ 浓度比较 [M(Q_R)]

组别	染毒后 动物数		胃肠组织中 DQ 浓度 (mg/kg)					H 值	P 值
	时间	(只)	胃	十二指肠	空肠	回肠	结肠		
低剂量 DQ 染毒组	15 min	6	5 460.0 (3 950.0)	17 490.0 (13 445.0)	21 350.0 (4 360.0)	3 175.0 (8 920.0)	597.5 (305.5)	20.228	0.000
	1 h	6	5 940.0 (4 352.5)	6 020.0 (10 343.0)	4 550.0 (9 505.0)	21 060.0 (26 390.0)	1 245.0 (1 101.2)	11.591	0.021
	3 h	6	2 855.0 (2 175.0)	1 135.0 (2 221.0)	1 167.0 (1 044.5)	5 480.0 (4 585.0)	1 700.0 (562.5)	7.412	0.116
	12 h	6	241.5 (44.2)	129.7 (107.8)	183.0 (73.0)	662.0 (179.0)	640.5 (240.7)	21.191	0.000
	36 h	6	297.0 (262.2)	292.0 (215.0)	115.1 (143.6)	285.0 (362.9)	197.5 (138.5)	4.710	0.318
中剂量 DQ 染毒组	15 min	6	8 550.0 (1 535.0)	32 200.0 (6 000.0)	26 200.0 (1 700.0)	7 890.0 (16 535.0)	2 165.0 (617.5)	24.753	0.000
	1 h	6	8 195.0 (2 080.0)	23 200.0 (10 705.0)	14 320.0 (11 090.0)	50 200.0 (12 950.0)	1 740.0 (710.0)	24.430	0.000
	3 h	6	7 750.0 (1 240.0)	5 320.0 (11 925.0)	7 230.0 (6 065.0)	7 010.0 (5 855.0)	2 630.0 (1 745.0)	9.849	0.043
	12 h	6	1 853.0 (109.0)	1 099.0 (1 463.5)	2 140.0 (1 560.0)	6 830.0 (10 026.5)	1 820.0 (205.0)	4.471	0.346
	36 h	6	538.0 (473.5)	364.0 (408.5)	693.0 (1 231.5)	1 601.0 (508.5)	390.0 (254.0)	10.288	0.036
高剂量 DQ 染毒组	15 min	6	12 600.0 (1 625.0)	28 500.0 (7 850.0)	25 600.0 (700.0)	18 300.0 (3 420.0)	1 180.0 (75.0)	20.503	0.000
	1 h	6	9 350.0 (2 085.0)	23 600.0 (2 350.0)	15 180.0 (6 025.0)	28 300.0 (14 850.0)	1 505.0 (667.5)	21.733	0.000
	3 h	6	8 250.0 (3 155.0)	12 730.0 (16 710.0)	4 660.0 (12 275.0)	12 060.0 (7 890.0)	1 540.0 (532.5)	14.060	0.007
	12 h	6	4 660.0 (5 310.0)	2 194.0 (1 486.5)	3 010.0 (1 729.0)	6 650.0 (6 040.0)	1 160.0 (360.0)	14.155	0.007
	36 h	6	6 400.0 (1 232.5)	4 889.0 (6 070.5)	2 590.0 (841.0)	10 300.0 (3 565.0)	1 835.0 (202.5)	14.606	0.006
H 值			71.894	73.023	77.294	61.866	56.055		
P 值			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		

表 3 各组大鼠灌胃后各时间点小肠形态结构比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	染毒后 动物数		十二指肠			空肠			回肠		
	时间	(只)	绒毛高度 (μm)	隐窝深度 (μm)	V/C 比值	绒毛高度 (μm)	隐窝深度 (μm)	V/C 比值	绒毛高度 (μm)	隐窝深度 (μm)	V/C 比值
对照组		6	746.94 ± 87.74	336.86 ± 37.54	2.26 ± 0.45	515.88 ± 142.06	222.36 ± 87.72	2.46 ± 0.51	461.68 ± 52.67	277.80 ± 73.51	1.75 ± 0.41
低剂量 DQ 染毒组	15 min	6	536.27 ± 65.86	265.58 ± 24.86	2.03 ± 0.29	390.67 ± 68.38	140.96 ± 29.58	2.86 ± 0.64	343.51 ± 57.98	171.00 ± 35.92	2.11 ± 0.62
	1 h	6	436.13 ± 94.02	230.23 ± 48.17	2.02 ± 0.76	319.38 ± 80.79	172.99 ± 26.29	1.90 ± 0.63	268.43 ± 62.61	152.59 ± 33.33	1.77 ± 0.29
	3 h	6	429.76 ± 86.14	217.10 ± 31.88	2.02 ± 0.57	355.16 ± 96.55	188.72 ± 45.54	2.04 ± 0.86	287.93 ± 69.82	160.99 ± 25.44	1.81 ± 0.43
	12 h	6	398.92 ± 119.66	238.50 ± 77.47	1.77 ± 0.57	307.31 ± 69.40	210.60 ± 35.91	1.53 ± 0.55	260.31 ± 78.15	185.75 ± 58.17	1.43 ± 0.31
	36 h	6	492.05 ± 107.10	190.67 ± 31.35	2.61 ± 0.56	390.99 ± 62.31	171.11 ± 13.93	2.28 ± 0.26	374.52 ± 101.88	154.36 ± 44.70	2.49 ± 0.58
中剂量 DQ 染毒组	15 min	6	459.73 ± 79.21	165.77 ± 28.84	2.82 ± 0.61	360.01 ± 84.67	176.79 ± 48.74	2.22 ± 0.89	280.17 ± 52.47	141.30 ± 46.23	2.14 ± 0.64
	1 h	6	392.33 ± 94.35	192.06 ± 31.17	2.04 ± 0.39	362.60 ± 53.02	184.92 ± 48.45	2.07 ± 0.53	252.89 ± 48.06	151.60 ± 27.44	1.71 ± 0.42
	3 h	6	390.12 ± 67.43	207.55 ± 37.87	1.96 ± 0.57	348.14 ± 55.49	177.10 ± 86.60	2.11 ± 0.70	258.90 ± 43.23	145.54 ± 38.39	1.85 ± 0.39
	12 h	6	374.10 ± 92.44	245.44 ± 46.50	1.54 ± 0.34	349.69 ± 63.07	235.37 ± 39.28	1.52 ± 0.37	196.99 ± 45.19	152.54 ± 29.44	1.31 ± 0.31
	36 h	6	472.96 ± 125.23	223.92 ± 67.31	2.20 ± 0.58	413.06 ± 20.87	170.30 ± 13.57	2.44 ± 0.23	321.77 ± 34.54	147.23 ± 27.05	2.29 ± 0.68
高剂量 DQ 染毒组	15 min	6	432.36 ± 70.04	185.93 ± 49.87	2.42 ± 0.50	378.04 ± 74.19	132.12 ± 19.91	2.95 ± 0.81	262.07 ± 28.16	116.98 ± 40.32	2.41 ± 0.63
	1 h	6	339.63 ± 50.30	199.31 ± 42.19	1.77 ± 0.41	359.85 ± 55.13	139.73 ± 26.48	2.64 ± 0.52	228.37 ± 58.19	164.25 ± 21.02	1.40 ± 0.35
	3 h	6	386.50 ± 113.70	184.16 ± 37.82	2.12 ± 0.55	322.44 ± 100.69	169.79 ± 28.48	1.93 ± 0.61	253.01 ± 50.76	169.38 ± 28.24	1.55 ± 0.46
	12 h	6	361.96 ± 88.22	228.97 ± 81.08	1.67 ± 0.41	286.07 ± 59.93	190.42 ± 31.49	1.54 ± 0.43	214.64 ± 40.94	170.22 ± 19.39	1.26 ± 0.18
	36 h	6	388.84 ± 98.33	205.57 ± 34.79	1.91 ± 0.41	319.62 ± 86.70	196.62 ± 58.28	1.70 ± 0.54	258.96 ± 35.99	163.79 ± 42.11	1.63 ± 0.28
H 值			97.269	103.565	56.779	53.088	66.816	70.457	91.060	47.699	72.008
P 值			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：DQ 为敌草快, V/C 为绒毛高度 / 隐窝深度比值

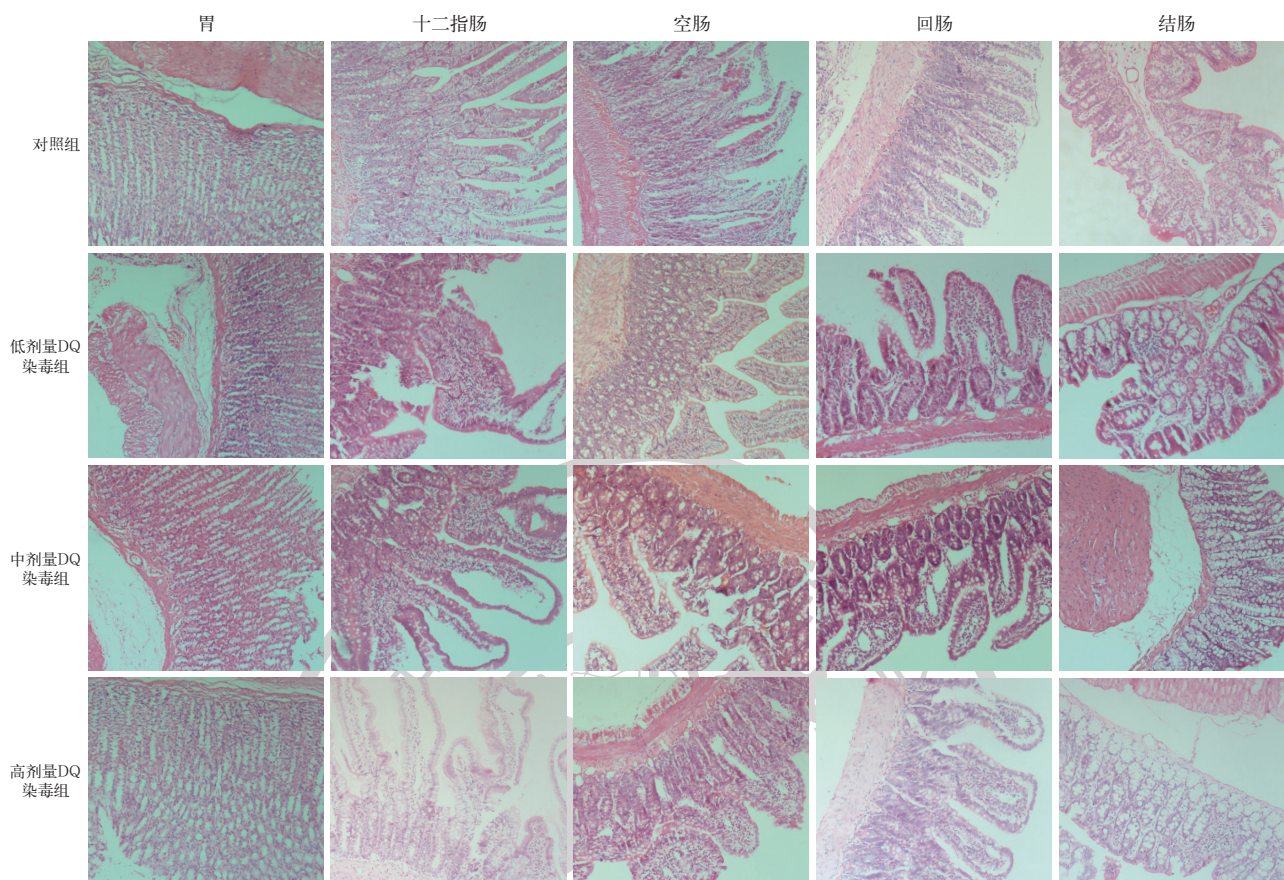


图3 光镜下观察不同剂量敌草快(DQ)染毒组大鼠胃肠组织病理学改变 对照组胃肠道组织黏膜结构和腺体完整;低剂量(115.5 mg/kg)DQ染毒组胃肠道病理损伤在染毒后12 h最为严重,表现为黏膜上皮细胞明显水肿,绒毛脱落;中剂量(231.0 mg/kg)DQ染毒组可见大量炎症细胞浸润,腺体崩解,黏膜层与固有层明显分离;高剂量(346.5 mg/kg)DQ染毒组胃肠道腺体崩解,肠道黏膜层与固有层明显分离 苏木素-伊红(HE)染色 中倍放大

2.4.2 胃肠病理学变化(图3):对照组无明显改变。3个剂量染毒组胃、十二指肠、空肠均在染毒后15 min即开始出现病理反应,随后组织损伤逐渐严重,至12 h损伤最为严重;回肠、结肠病理损伤在染毒后1~12 h逐渐加重,可见绒毛脱落、黏膜糜烂、肠腺肿胀等,36 h有所缓解。随染毒剂量增加,各时间点的病理损伤加重。

3 讨论

DQ与PQ均属于联吡啶类除草剂,两者中毒的临床表现相似,但口服DQ中毒的消化道症状(如消化道溃疡、恶心、呕吐、腹泻等)更为突出,严重者可出现麻痹性肠梗阻^[4-5]。麻痹性肠梗阻是患者死亡的重要独立危险因素。胃肠道是DQ中毒的主要靶器官之一,但是关于DQ引起胃肠道损伤的机制研究鲜有报道,了解不同剂量下的毒代动力学特点、胃肠道吸收情况及病理表现,可为临床救治提供理论依据和合适对策。

毒代动力学利用药代动力学原理,定量研究毒物进入生物体内的吸收、分布、代谢、排泄过程,了

解毒物在机体内的分布及其靶器官,从而为临床治疗提供理论参考。本研究应用液相色谱-质谱联用技术进行检测,其敏感度高、选择性好、简便快速,能实现定性和定量分析,是较为可靠的一种检测方法^[6-7]。本课题组前期研究了以115.5 mg/kg剂量给予大鼠DQ灌胃染毒时的毒代动力学特点^[8],基于此,参考DQ临床中毒分级标准^[9-11],结合临床DQ中毒现状,拟定不同染毒剂量梯度,分别为115.5 mg/kg〔1/2半数致死量(median lethal dose, LD₅₀)〕、231.0 mg/kg (LD₅₀)和346.5 mg/kg (3/2 LD₅₀),旨在探讨不同暴露剂量下DQ灌胃染毒大鼠一般情况、毒代动力学及胃肠道吸收部位与形态学损伤的差异特征。结果显示,各剂量染毒组在染毒早期即可出现明显的消化道症状,血浆DQ浓度随时间变化的趋势相似,但毒代动力学参数有所差异。各剂量染毒组在染毒后5 min血浆中即可检测到DQ,表明DQ在大鼠消化道吸收非常迅速。早期研究显示,胃和小肠是毒物吸收的主要器官,DQ可以通过细胞膜,由于其亲水性质,主要通过扩散经胃肠道黏膜吸收,在较小的

程度上,也可以通过离子泵主动运输^[12]。给予灌胃染毒后,大鼠胃肠道黏膜直接化学性损伤,胃肠道屏障遭到破坏,使DQ吸收加快。本研究结果也显示,高剂量染毒组血浆DQ达峰时间明显提前,随着染毒剂量增加,峰浓度增高,AUC增大,体内毒物的总负荷量增大,说明消化道暴露剂量越大,形态学损伤越重,毒物的吸收越快,临床救治时清除毒物更有时间紧迫性和挑战性。DQ在体内有明显的蓄积趋势,但染毒剂量与体内DQ含量并非简单线性关系,高剂量组不仅平均滞留时间和半衰期高于其余两组,在36h时血浆浓度又有明显上升趋势。尽管有学者认为PQ在体内代谢呈时间依赖型的“二室模型”^[13],更多学者倾向于“三室模型”^[14-15],关于DQ体内过程的房室模型鲜见文献报道,本实验显示,大剂量DQ进入体内后,快速进入血液,并向组织中分布,随后可能存在二次分布,36h时血浆DQ浓度升高,可能为组织或细胞中的毒物扩散到血液所致,由此可见,大剂量中毒时,DQ的体内代谢并非简单的“一室模型”或“二室模型”,而是存在“反跳”,具体机制有待进一步研究。 V_d/F 指当毒物在体内达动态平衡后,体内药量与血药浓度之比,即理论上毒物在体内分布的情况。 V_d/F 值越大,表明毒物分布越广,排泄越慢,在体内存留时间越长,毒物越难通过任何血液净化方式有效清除, $V_d/F < 1 \text{ L/kg}$ 的毒物适合血液净化,一般认为此时毒物在血液中的含量高于在组织中的含量^[16-17]。 CL/F 指单位时间内多少毫升血浆中的毒物被清除。本研究结果显示,3个剂量染毒组大鼠似乎不适合血液净化,但毕竟人与大鼠间存在种属差异,而人的 V_d/F 尚不清楚,但临床专家们对于DQ中毒通常推荐进行血液净化^[11]。中剂量染毒组 V_d/F 和 CL/F 明显高于其余两组,可能因为一定的毒物暴露剂量激发了机体的代偿潜力,具体机制有待探讨。总之,大鼠不同暴露剂量DQ中毒毒代动力学存在差异,临床DQ中毒患者血液净化的效果仍存在争议^[18-20],进行血液净化时应掌握指征,如何使血液净化达到最佳效果同时又避免资源浪费需结合人体毒代动力学进行探讨。

本课题组前期研究显示,DQ在大鼠体内分布广泛,几乎分布至各个器官,其中肠道组织中DQ浓度最高,且分布时间较长^[8]。本研究在匀浆制作前已彻底清洗了胃肠内容物及组织中和表面的血液,胃肠组织所测DQ应考虑为吸收过程中的残留,即胃肠道对于DQ的吸收。DQ口服后首先与胃肠黏

膜接触,主要通过弥散被动吸收,少量通过阳离子泵主动转运进入胃肠组织细胞^[12]。本研究显示,各剂量染毒组大鼠均表现为,在染毒后15min至1h胃和各段小肠DQ浓度最高,在3h时结肠DQ浓度最高;不同暴露剂量显示,高剂量染毒组在36h时消化道各段(除空肠外)均有再次抬高趋势,与血浆DQ浓度变化相似,空肠的例外情况原因不详,而中、低剂量染毒组没有类似趋势。既往研究显示,消化道暴露DQ后主要吸收部位在胃和小肠上部^[21],结合DQ的理化特性、吸收机制和胃肠黏膜组织结构,消化道各段似乎均有吸收可能,该研究提示结肠在各个暴露剂量时均可吸收。DQ带正电荷,易溶于水,在脂质中的溶解度很低,导致胃肠黏膜吸收不良,一般认为,DQ消化道吸收率 $< 10\%$,大部分(90%~95%)DQ在24h内以原型经粪便排泄^[11,22]。DQ导致胃肠功能障碍,严重者出现麻痹性肠梗阻,在胃肠道存留时间会大大超过24h,并无胃肠组织吸收“饱和”的证据,持续胃肠黏膜接触DQ,其吸收可能超过既往认为的“阈值”,尤其高剂量暴露,胃肠黏膜屏障的破坏,消化道内DQ可能成为血液毒物持续吸收的“源泉”,临床似乎有必要早期行全胃肠灌洗,彻底清除消化道内的DQ,甚至灌肠,也适用于高剂量消化道摄入患者。是否如PQ高浓度富集于肺和骨骼肌组织,胃肠黏膜组织为DQ的“贮存库”及与血液中DQ的关系,尚需深入研究。口服DQ是急性DQ严重中毒的主要原因,消化道黏膜首先接触DQ造成损伤。本课题组前期观察也发现,部分DQ中毒患者腹部CT可见小肠和结肠出现不同程度积气积液、肠壁水肿、肠管扩张等^[2]。Tanen等^[23]报道了1例患者在摄入200mL DQ稀释液后,次日出现进行性吞咽困难,行胃镜检查可见食管和胃呈现一级、二级不同程度烧伤。Valiante等^[24]对1例摄入少量DQ患者进行内窥镜检查,显示严重的全食管炎和出血性胃炎,1个月后进行第2次内窥镜检查显示病变已完全愈合,而十二指肠未见明显损害,暴露剂量可能是影响胃肠损伤范围的主要因素。DQ相较PQ有更高的氧化还原电位,不仅通过氧化应激和脂质过氧化导致广泛的细胞和组织损伤,胃肠道损伤更为明显,可能与其较强的直接化学性损伤和黏膜腐蚀作用有关。小肠是营养物质吸收和转运的主要场所,其组织结构学特点为物质吸收创造了良好的条件,小肠绒毛高度与隐窝深度是小肠吸收面积和成熟肠细胞数量的结构

基础, V/C 比值综合反映了小肠的功能状态, V/C 比值下降表明消化吸收功能下降^[25]。本实验中,各剂量 DQ 染毒后 15 min 即可在胃、十二指肠、空肠中出现急性损伤表现,回肠和结肠在染毒后 1 h 出现病理损伤,12 h 胃肠损伤最重,表现为胃黏膜上皮细胞明显水肿,出血、坏死,肠道绒毛脱落,大量炎症细胞浸润等,各段小肠的绒毛高度显著降低、隐窝深度显著增大, V/C 比值降至最低,至染毒后 36 h 损伤开始减轻,随染毒剂量增加,各时间点的病理损伤明显加重,但本研究未观察染毒 36 h 之后的损伤变化规律。考虑到急性 DQ 中毒胃肠道损伤的广泛性,尤其大剂量中毒,常规消化道去污措施的益处和风险尚待评估。与胃肠组织 DQ 浓度相比,病理损伤形态变化明显滞后于组织浓度高峰,临床急性 DQ 中毒救治似乎存在“时间窗”。

综上,胃肠道是急性 DQ 中毒重要靶器官,大鼠不同剂量 DQ 暴露其毒代动力学具有不同特点,消化道吸收迅速,血浆浓度达峰时间随染毒剂量增加而提前,达峰时间更短,胃肠道各段均有吸收 DQ 可能, DQ 对消化道损伤与毒物剂量及滞留时间等因素密切相关,相关研究对临床完善急性 DQ 中毒消化道去污方案有参考意义。但本研究未能深入观察组织损伤修复规律,也未涉及 DQ 所致胃肠损伤的具体机制及保护策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] World Health Organization. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, 2019 edition [EB/OL]. (2020-05-01) [2022-10-01]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240005662>.
- [2] 孟娜,孙艺青,刘亮,等.急性敌草快中毒 86 例临床分析[J].中华危重病急救医学, 2022, 34 (3): 301-305. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220128-00105.
- [3] Vanholder R, Colardyn F, De Reuck J, et al. Diquat intoxication: report of two cases and review of the literature [J]. Am J Med, 1981, 70 (6): 1267-1271. DOI: 10.1016/0002-9343(81)90836-6.
- [4] Powell D, Pond SM, Allen TB, et al. Hemoperfusion in a child who ingested diquat and died from pontine infarction and hemorrhage [J]. J Toxicol Clin Toxicol, 1983, 20 (5): 405-420. DOI: 10.3109/15563658308990609.
- [5] Mahieu P, Bonduelle Y, Bernard A, et al. Acute diquat intoxication. Interest of its repeated determination in urine and the evaluation of renal proximal tubule integrity [J]. J Toxicol Clin Toxicol, 1984, 22 (4): 363-369. DOI: 10.3109/15563658408992567.
- [6] 杨一红,刘洪波,李彩侠,等. 28 份包装标注为敌草快成分的除草剂检测分析[J].实用检验医师杂志, 2021, 13 (1): 38-41. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2021.01.013.
- [7] 苗娜,张占英,刘纪松.高效液相色谱-串联质谱法测定人血清中万古霉素的浓度[J].实用检验医师杂志, 2019, 11 (4): 231-233. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.04.012.
- [8] 郑拓康,孙艺青,高恒波,等.敌草快在大鼠体内毒代动力学与组织分布研究[J].中华急诊医学杂志, 2020, 29 (11): 1396-1402. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2020.11.004.
- [9] Jones GM, Vale JA. Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of diquat poisoning: a review [J]. J Toxicol Clin Toxicol, 2000, 38 (2): 123-128. DOI: 10.1081/elt-100100926.
- [10] Saeed SA, Wilks MF, Coupe M. Acute diquat poisoning with intracerebral bleeding [J]. Postgrad Med J, 2001, 77 (907): 329-332. DOI: 10.1136/pmj.77.907.329.
- [11] 急性敌草快中毒诊断与治疗专家共识组.急性敌草快中毒诊断与治疗专家共识[J].中华急诊医学杂志, 2020, 29 (10): 1282-1289. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2020.10.002.
- [12] Magalhães N, Carvalho F, Dinis-Oliveira RJ. Human and experimental toxicology of diquat poisoning: toxicokinetics, mechanisms of toxicity, clinical features, and treatment [J]. Hum Exp Toxicol, 2018, 37 (11): 1131-1160. DOI: 10.1177/0960327118765330.
- [13] Pond SM, Rivory LP, Hampson EC, et al. Kinetics of toxic doses of paraquat and the effects of hemoperfusion in the dog [J]. J Toxicol Clin Toxicol, 1993, 31 (2): 229-246. DOI: 10.3109/15563659309000391.
- [14] Murray RE, Gibson JE. A comparative study of paraquat intoxication in rats, guinea pigs and monkeys [J]. Exp Mol Pathol, 1972, 17 (3): 317-325. DOI: 10.1016/0014-4800(72)90044-5.
- [15] 黄昌保,田若辰,白丽娜,等.百草枯在大鼠体内的毒物代谢动力学研究[J].中华急诊医学杂志, 2019, 28 (12): 1517-1519. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.12.011.
- [16] 中国医师协会急诊医师分会,中国毒理学会中毒与救治专业委员会.急性中毒诊断与治疗中国专家共识[J].中华危重病急救医学, 2016, 28 (11): 966. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.11.003.
- [17] 张劲松,乔莉.急性中毒血液净化的现状和再认识[J].中华急诊医学杂志, 2015, 24 (4): 356-359. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.04.003.
- [18] Okonek S, Hofmann A, Henningsen B. Efficacy of gut lavage, hemodialysis, and hemoperfusion in the therapy of paraquat or diquat intoxication [J]. Arch Toxicol, 1976, 36 (1): 43-51. DOI: 10.1007/BF00277562.
- [19] Okonek S, Hofmann A. On the question of extracorporeal hemodialysis in diquat intoxication [J]. Arch Toxicol, 1975, 33 (3): 251-257. DOI: 10.1007/BF00311277.
- [20] Hantson P, Wallemacq P, Mahieu P. A case of fatal diquat poisoning: toxicokinetic data and autopsy findings [J]. J Toxicol Clin Toxicol, 2000, 38 (2): 149-152. DOI: 10.1081/elt-100100930.
- [21] Crabtree HC, Lock EA, Rose MS. Effects of diquat on the gastrointestinal tract of rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1977, 41 (3): 585-595. DOI: 10.1016/s0041-008x(77)80012-4.
- [22] Daniel JW, Gage JC. Absorption and excretion of diquat and paraquat in rats [J]. Br J Ind Med, 1966, 23 (2): 133-136. DOI: 10.1136/oem.23.2.133.
- [23] Tanen DA, Curry SC, Laney RF. Renal failure and corrosive airway and gastrointestinal injury after ingestion of diluted diquat solution [J]. Ann Emerg Med, 1999, 34 (4 Pt 1): 542-545. DOI: 10.1016/s0196-0644(99)80059-6.
- [24] Valiante F, Farinati F, Dal Santo P, et al. Upper gastrointestinal injury caused by diquat [J]. Gastrointest Endosc, 1992, 38 (2): 204. DOI: 10.1016/s0016-5107(92)70404-0.
- [25] Han XY, Ma YF, Lyu MY, et al. Chitosan-zinc chelate improves intestinal structure and mucosal function and decreases apoptosis in ileal mucosal epithelial cells in weaned pigs [J]. Br J Nutr, 2014, 111 (8): 1405-1411. DOI: 10.1017/S0007114513004042.

(收稿日期: 2022-10-18)

关于经过广告审批后的广告中存在不规范医学名词术语未予更改的声明

依照广告审批的相关规定,按照广告厂家的要求,本刊刊登的新活素及血必净广告图片和内容均按照广告审查批准文件的原件刊出,故广告内容中“适应症”“禁忌症”未按标准医学名词术语修改为“适应证”“禁忌证”,“其它”未修改为“其他”,“成份”未修改为“成分”,时间单位仍用汉字表示,剂量单位“ml”未修改为“mL”。特此声明!