

## 白陶土联合普萘洛尔对百草枯中毒小鼠肺组织 基质金属蛋白酶-9 表达水平的影响

邱贤克<sup>1</sup> 李章平<sup>2</sup> 缪心军<sup>1</sup> 陈玉熹<sup>1</sup> 李勇<sup>1</sup> 陈之力<sup>1</sup>

(1. 温州医科大学定理临床学院, 浙江省温州市中心医院急诊科, 浙江 温州 325000;

2. 温州医科大学附属第一医院急诊科, 浙江 温州 325000)

**【摘要】** 目的 探讨白陶土联合普萘洛尔对百草枯(PQ)中毒小鼠肺组织基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的影响及肺损伤的保护作用机制。**方法** 将 54 只 ICR 小鼠按随机数字表法分为对照组、PQ 中毒模型组、治疗组, 每组 18 只。采用 100 mg/kg PQ 灌胃的方法复制 PQ 中毒模型; 制模后治疗组立即给予白陶土 48 g/kg 联合普萘洛尔 3.2 mg/kg 灌胃, 对照组灌胃等体积生理盐水。制模后 6、12、24 h 处死小鼠, 取肺组织用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 MMP-9 蛋白表达水平并观察肺组织病理学变化。**结果** 制模后 6 h 对照组、PQ 中毒模型组和治疗组 MMP-9 蛋白表达比较差异均无统计学意义(灰度值:  $0.655 \pm 0.045$ 、 $0.656 \pm 0.045$ 、 $0.641 \pm 0.036$ )。制模后 12 h、24 h PQ 中毒模型组 MMP-9 蛋白表达水平较对照组明显增多(12 h:  $0.824 \pm 0.039$  比  $0.634 \pm 0.038$ , 24 h:  $0.742 \pm 0.039$  比  $0.658 \pm 0.041$ , 均  $P < 0.05$ ), 治疗组较 PQ 中毒模型组明显降低(12 h:  $0.760 \pm 0.050$  比  $0.824 \pm 0.039$ , 24 h:  $0.686 \pm 0.041$  比  $0.742 \pm 0.039$ , 均  $P < 0.05$ )。光镜下可见: PQ 中毒模型组早期肺组织毛细血管扩张充血, 12 h 肺泡腔出现大量以中性白细胞为主的炎性细胞浸润, 可见少量红细胞渗出; 24 h 可见肺泡壁毛细血管扩张、充血, 内皮细胞肿胀, 肺内小灶状或大片状炎性细胞浸润, 以中性粒细胞为主。治疗组亦出现了肺炎性细胞、肺泡毛细血管扩张、充血, 内皮细胞肿胀等表现, 但程度较模型组明显减轻。**结论** 白陶土联合普萘洛尔干预能明显降低 PQ 急性中毒大鼠肺组织 MMP-9 的蛋白表达水平, 可能是其防治 PQ 致肺损伤的机制之一。

**【关键词】** 百草枯; 中毒; 白陶土; 普萘洛尔; 基质金属蛋白酶-9; 急性肺损伤

**The effect of Kaolin and propranolol on expression level of matrix metalloproteinase-9 in lung of paraquat intoxicated mice** Qiu Xianke\*, Li Zhangping, Miao Xinjun, Chen Yuxi, Li Yong, Chen Zhili. \*Dingli College of Wenzhou Medical University; Department of Emergency, Wenzhou Central Hospital in Zhejiang Province, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Corresponding author: Li Zhangping, Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China, Email: wzlizhangping@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of Kaolin combined with propranolol on matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in lungs of paraquat (PQ) intoxicated mice and the mechanism of protection for lung injury. **Methods** Fifty-four ICR mice were randomly divided into three groups, 18 mice in each group: namely control group, PQ intoxicated group and treatment group. The PQ intoxicated model was replicated by intra-gastric administration (ig) of PQ 100 mg/kg; after intoxication, 48 g/kg Kaolin combined with 3.2 mg/kg propranolol intra-gastric administration was immediately given to the treatment group, while in the control group, the same volume of normal saline ig was applied. All the mice were sacrificed at 6, 12 and 24 hours after disposal, and the lung was harvested to test the protein expression level of MMP-9 by Western Blot, and the lung tissue pathological changes were observed. **Results** There was no statistical significance in the protein expression levels of MMP-9 among the control group, PQ intoxicated group and treatment group at 6 hours after disposal (grey value:  $0.655 \pm 0.045$ ,  $0.656 \pm 0.045$ ,  $0.641 \pm 0.036$ ). The protein expression levels of MMP-9 in PQ intoxicated group were increased significantly compared with those in the control group at 12 hours and 24 hours after disposal (12 hours:  $0.824 \pm 0.039$  vs.  $0.634 \pm 0.038$ , 24 hours:  $0.742 \pm 0.039$  vs.  $0.658 \pm 0.041$ , both  $P < 0.05$ ), while the levels of treatment group were significantly lower than those in the intoxicated group (12 hours:  $0.760 \pm 0.050$  vs.  $0.824 \pm 0.039$ , 24 hours:  $0.686 \pm 0.041$  vs.  $0.742 \pm 0.039$ , both  $P < 0.05$ ). In PQ intoxicated group, early capillary dilation and congestion in lung tissue, a large number of inflammatory cells infiltration with mainly neutrophils in alveolar cavity and a small number of red blood cells exudation were seen at 12 hours; at 24 hours, capillary dilation at alveolar walls, congestion, swelling of endothelial cells, small flakes or large patches of inflammatory cell infiltration with mainly neutrophils in lungs were found. In the treatment group, the lung inflammatory cells infiltration, alveolar capillary dilatation, congestion, swelling of the endothelial cells, etc were also visible, but the degree of severity was significantly milder than those in the intoxicated group. **Conclusion** The interference of Kaolin

combined with propranolol can significantly decrease the protein expression level of MMP-9 in lung tissue of acute paraquat poisoned mice that is possibly one of the mechanisms for prevention and treatment of lung injury in paraquat poisoning.

**【Key words】** Paraquat; Poisoning; Kaolin; Propranolol; Matrix metalloproteinase-9; Acute lung injury

百草枯(PQ)是一种有机杂环类接触性脱叶剂及除草剂,其除草效果好,接触土壤后迅速失活,故在土壤中无残留,是目前世界范围内应用极为广泛的一种除草剂。由于PQ的特殊物理特性,其误服及自杀性口服后病死率极高,是急诊科救治的重点<sup>[1]</sup>,且目前尚无特效的解毒剂,可以造成肺、肝、肾、脑等多个系统损伤<sup>[2]</sup>,临床对症治疗效果甚差,国内外综合报道中毒病死率为20%~80%<sup>[3-4]</sup>。百草枯主要在肺内蓄积,其在肺中的浓度是血液中的10~90倍<sup>[5]</sup>,由此引起百草枯中毒的特征性改变——迟发型肺纤维化是大多数患者的死亡原因。近年来,基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在PQ致肺损伤中的作用正逐渐引起重视。Lagente等<sup>[6]</sup>研究显示,MMP-9在肺组织持续高水平的表达,导致细胞外基质(ECM)持续积聚和沉积,并成为最终发展为肺纤维化的重要启动因子。

有学者指出:早期阻断PQ在胃肠道的吸收是治疗PQ中毒的关键<sup>[7]</sup>;用白陶土灌胃治疗PQ中毒患者有一定的疗效<sup>[8]</sup>;普萘洛尔可与肺组织内的PQ竞争性拮抗,使PQ得以从肺组织中尤其是肺泡上皮细胞中释放出来,减轻肺损害,可用于PQ中毒的辅助治疗<sup>[9]</sup>。白陶土联合普萘洛尔对PQ中毒的疗效并未见相关研究报道,本研究通过建立PQ中毒大鼠模型,用白陶土联合普萘洛尔对其进行干预,观察肺组织病理学改变及MMP-9浓度的变化,探讨白陶土联合普萘洛尔治疗PQ中毒的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与主要材料:**选择SPF级雄性ICR小鼠,体质量18~20g,由上海实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(沪):2010-0002。PQ购自美国Sigma公司,纯度99%(货号36541);MMP-9兔多克隆抗体(多抗,货号ab38898)由英国Abcam公司提供;二喹啉甲酸法(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液(强)由中国碧云天生物公司提供。

**1.2 动物模型的复制及药物干预:**将54只ICR小鼠按照随机数字表法分为PQ中毒模型组、治疗组和对照组,每组每个时间点6只。入组前12h禁食,PQ中毒模型组和治疗组小鼠给予PQ 100 mg/kg灌胃,治疗组在PQ灌胃后以白陶土 48 g/kg联合普萘洛尔 3.2 mg/kg灌胃;对照组给予等体积生理盐水

灌胃。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

**1.3 检测指标及方法:**制模后6、12、24h将存活小鼠处死,用10%水合氯醛深度麻醉,分离肺组织备用。剪取左上肺,部分左上肺用10%中性甲醛水溶液浸泡固定,进行苏木素-伊红(HE)染色;其余肺组织制成匀浆,进行MMP-9水平的检测。

**1.3.1 用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测小鼠肺组织匀浆MMP-9的蛋白表达:**将小鼠肺组织粉碎研磨成匀浆,加入含苯甲基磺酰氟(PMSF)的RIPA蛋白裂解液,冰上裂解30min,收集上清液。BCA法检测蛋白浓度。准备等量的上述蛋白,加入5×上样缓冲液,100℃煮沸变性后上样进行聚丙烯酰胺(PAGE)凝胶电泳,电泳结束后,采用湿式转移法将凝胶中的蛋白转移至硝酸纤维素膜上。10%脱脂牛奶常温封闭1.5h;再加入一抗稀释液稀释的MMP-9兔多抗及内参照抗体于4℃下作用16h;用含吐温20的磷酸盐缓冲液(TBST)漂洗10min,3次;加入相应的辣根过氧化物酶标记二抗,室温下1h;TBST漂洗10min,3次;用化学发光法(ECL)进行检测,X线片盒中暗室曝光,凝胶成像系统扫描成像。以β-肌动蛋白(β-actin)内参照的吸光度为基准,校正各自蛋白的积分吸光度值,按公式(MMP-9表达相对值=MMP-9表达强度/β-actin表达强度)求得相对灰度值。

**1.3.2 肺组织病理学变化:**取小鼠左肺上叶用4%多聚甲醛水溶液固定,包埋,切片,常规HE染色,光镜下观察肺组织病理学改变。

**1.4 统计学方法:**使用SPSS 16.0对数据进行分析,计量数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两样本比较数据符合正态分布者采用t检验,非正态分布者采用非参数统计,Mann-Whitney检验或Kruskal-Wallis检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠肺组织匀浆中MMP-9蛋白表达水平的变化(表1;图1):**制模后6h,3组MMP-9蛋白表达水平比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ );制模后12h、24hPQ中毒模型组MMP-9表达水平即较对照组同期明显升高;治疗组较PQ中毒模型组明显降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。

表 1 3 组小鼠不同时间点肺组织 MMP-9 蛋白表达水平变化比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	MMP-9 蛋白表达 (灰度值)		
		制模后 6 h	制模后 12 h	制模后 24 h
对照组	6	0.655 ± 0.045	0.634 ± 0.038	0.658 ± 0.041
PQ 中毒模型组	6	0.656 ± 0.045	0.824 ± 0.039 <sup>a</sup>	0.742 ± 0.039 <sup>a</sup>
治疗组	6	0.641 ± 0.036	0.760 ± 0.050 <sup>b</sup>	0.686 ± 0.041 <sup>b</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 PQ 中毒模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

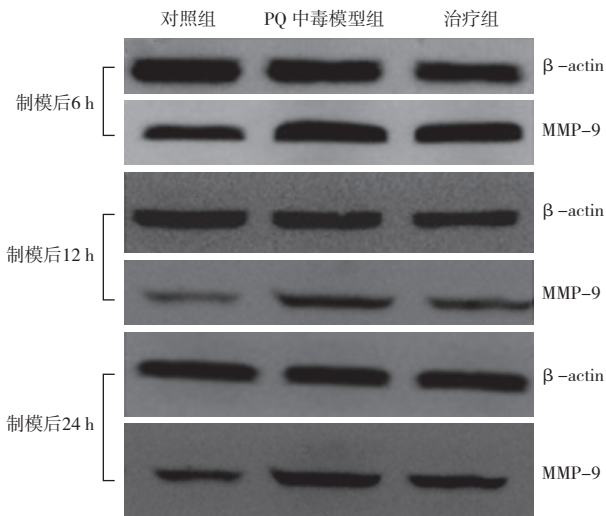
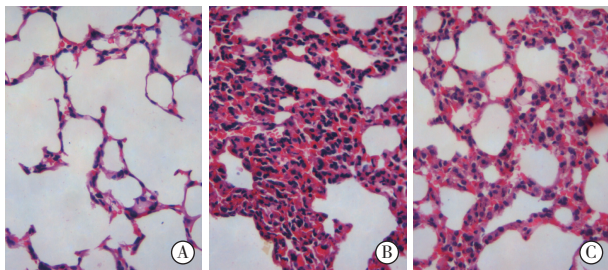


图 1 Western Blot 检测各组小鼠不同时间点肺组织 MMP-9 蛋白表达水平

2.2 各组小鼠制模后 24 h 肺组织病理学的改变 (图 2): 对照组各时间点均显示小肺泡结构清晰, 肺泡壁薄, 肺泡隔无增宽及充血, 无炎性细胞浸润及出血现象。PQ 中毒模型组小鼠 6 h 就出现肺泡毛细血管扩张, 内皮细胞肿胀; 12 h 肺泡腔出现大量以中性粒细胞为主的炎性细胞浸润, 可见少量红细胞渗出; 24 h 可见肺泡壁内皮细胞肿胀, 毛细血管充血、扩张, 肺内可见以中性粒细胞为主的小灶状或大片状炎性细胞浸润。治疗组亦出现了肺间质炎性细胞浸润, 肺泡壁内皮细胞肿胀以及肺泡毛细血管充血、扩张等表现, 但程度明显减轻。



A: 对照组; B: PQ 中毒模型组; C: 治疗组

图 2 制模后 24 h 各组小鼠肺组织病理学改变 (HE 染色 低倍放大)

### 3 讨论

PQ 经皮肤、呼吸道、消化道吸收入人体后, 广泛分布于全身各组织器官, 由于 PQ 具有与二胺、多胺及二胺二硫脲胺类似的结构, 在细胞膜上可与聚胺类物质竞争而被细胞摄取, 而肺脏内存在多胺摄取系统, 导致 PQ 在肺脏内高度浓聚。PQ 致肺损伤、肺纤维化的机制极其复杂, 至今尚未完全明确, 可能与早期致炎因子的增加、过氧化物酶和超氧化物歧化酶 (SOD) 的生成减少、肺局部纤维组织的增生、线粒体的功能障碍及氧自由基的产生增多密切相关, 启动和加速了细胞凋亡<sup>[10-12]</sup>。

中、重度 PQ 中毒早期表现以肺急性炎症为主, 后期出现不可逆肺间质纤维化<sup>[13]</sup>。O'Connor 等<sup>[14]</sup>认为在肺纤维化形成过程中, MMP-9 参与了早期损伤阶段的细胞外基质 (ECM) 和基底膜降解, 在后期的修复阶段对肺组织结构重塑中也起重要的调节作用。在早期急性肺损伤阶段, 肺组织内 MMP-9 活化明显增加, 肺间质成纤维细胞通过表达 MMP-9 参与肺泡基底膜的损伤, 从而参与启动肺纤维化, 后期随着炎症逐渐消退, 炎性细胞因子如白细胞介素-1 (IL-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、TGF- $\alpha/\beta$ 、 $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 等分泌失衡, 细胞因子、生长因子间存在着复杂的调控网络作用, 尤其是 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的过度表达, 导致 MMP-9 活性下降, 基质降解减少, ECM 过度增生, 最终导致基质异常沉积, 进展为晚期肺纤维化。

目前, 肺组织的病理改变如早期炎症损伤及晚期肺纤维化是 PQ 中毒的主要死亡原因, 与早期死亡显著相关<sup>[15]</sup>。Fairshter 等<sup>[16]</sup>在 1976 年就已经提出对 PQ 中毒要进行综合治疗, 包括用漂白土、硫酸镁、普萘洛尔、血液净化、利尿、低氧、抗氧化等。但迄今未找到特效解毒剂, 目前治疗以减少毒物吸收、促进体内毒物清除、防治肺损伤和对症支持为主<sup>[17]</sup>。毒物代谢动力学是 PQ 中毒链的最初环节, 如能在此阶段有效清除毒物, 或阻断 PQ 的跨膜转运与蓄积, 则有可能切断中毒效应链<sup>[18]</sup>。

本实验通过建立 PQ 中毒动物模型观察到, 中毒小鼠肺泡腔出现大量以中性粒细胞为主的炎性细胞浸润, 肺泡壁毛细血管扩张、充血, 内皮细胞肿胀, 白陶土联合普萘洛尔治疗组小鼠上述病变减轻; PQ 中毒模型组小鼠肺组织 MMP-9 蛋白表达水平明显升高, 治疗组制模后 12 h、24 h MMP-9 蛋白表达水平较 PQ 中毒模型组明显下降。说明早期使用白陶土联合普萘洛尔治疗 PQ 中毒小鼠, 能显著降低肺

组织 MMP-9 蛋白表达水平,减轻肺间质纤维化进展,可以作为一种行之有效的治疗方案,在临床上进一步推广及研究。

### 参考文献

- [1] Eddleston M. Patterns and problems of deliberate self-poisoning in the developing world [J]. QJM, 2000, 93 (11): 715-731.
- [2] 马国英,林世敏.急性百草枯中毒的诊疗方案探讨[J].中国中西医结合急救杂志,2012,19(6):339.
- [3] Hwang KY, Lee EY, Hong SY. Paraquat intoxication in Korea [J]. Arch Environ Health, 2002, 57(2): 162-166.
- [4] 蒋桂华,于凯江,刘文华.早期多次血液灌流对百草枯中毒患者预后的影响[J].中华危重病急救医学,2014,26(6):440-441.
- [5] 韩继媛,程志强.浅谈百草枯中毒发病机制的研究现状[J].临床急诊杂志,2010,11(2):65-67.
- [6] Lagente V, Manoury B, Nenau S, et al. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling [J]. Braz J Med Biol Res, 2005, 38 (10): 1521-1530.
- [7] 王金柱,兰超,李莉,等.176例急性百草枯中毒患者预后危险因素分析[J].中国中西医结合急救杂志,2013,20(4):240-243.
- [8] 陈希妍,胡莹莹,石金河.泥浆水、白陶土救治急性百草枯中毒疗效观察[J].山东医药,2010,50(11):102-103.
- [9] 杨志前.百草枯中毒的急救与预后分析[J].国际医药卫生导报,2006,12(17):39-40.
- [10] Castello PR, Drechsel DA, Patel M. Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain [J]. J Biol Chem, 2007, 282 (19): 14186-14193.
- [11] Gray JP, Heck DE, Mishin V, et al. Paraquat increases cyanide-insensitive respiration in murine lung epithelial cells by activating an NAD(P)H: paraquat oxidoreductase; identification of the enzyme as thioredoxin reductase [J]. J Biol Chem, 2007, 282 (11): 7939-7949.
- [12] 邓念强,唐鸣秋,阮雪玲.百草枯中毒与肺损害 11 例[J].新医学,2001,32(7):413-414.
- [13] 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,2010,41(4):275-277.
- [14] O'Connor CM, FitzGerald MX. Matrix metalloproteinases and lung disease [J]. Thorax, 1994, 49(6): 602-609.
- [15] 孟潇潇,刘刊,谈玖婷,等.百草枯中毒大鼠肺纤维化与内质网应激的关系[J].中华危重病急救医学,2013,25(6):331-334.
- [16] Fairshier RD, Rosen SM, Smith WR, et al. Paraquat poisoning: new aspects of therapy [J]. Q J Med, 1976, 45 (180): 551-565.
- [17] 张文武.急性百草枯中毒的国内诊治进展[J].中华危重病急救医学,2015,27(4):242-243.
- [18] 卢中秋.急性百草枯中毒的救治:任重道远[J].中华危重病急救医学,2015,27(4):241-241.

(收稿日期:2015-07-23)

(本文编辑:李银平)

## • 读者 • 作者 • 编者 •

### 本刊对文后参考文献著录格式的要求

《中国中西医结合急救杂志》参考文献的著录格式,基本参照 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》执行。采用顺序编码制著录,依照文献在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字标出,并将序号置于方括号中,排列于文后。尽量避免引用摘要作为参考文献。引用文献(包括文字和表达的原意)务必请作者与原文核对无误。日文汉字请按日文规定书写,勿与汉字及简化字混淆。同一文献作者不超过 3 人全部著录;超过 3 人可以只著录前 3 人,后依文种加表示“等”的文字(如西文加“et al”,日文加“他”)。作者姓名一律姓氏在前,名字在后,外国人的名字采用首字母缩写形式,缩写名后不加缩写点;不同作者姓名之间用“,”隔开,不用“和”、“and”等连词。引用日期、获取和访问途径为联机文献必须著录的项目。书籍出版项中的出版地(者)有多个时,只著录第一出版地(者)。出版项中的期刊名称,中文期刊用全称;外文期刊名称用缩写,以 Index Medicus 中的格式为准。每条参考文献均须著录起止页码。著录格式示例如下。

- 1 期刊著录格式:主要责任者.题名[文献类型标志].刊名,年,卷(期):起页-止页.
- 2 图书著录格式:主要责任者.题名[文献类型标志].版本项(第 1 版不著录).出版地:出版者,出版年:引文起页-止页.
- 3 会议论文汇编(集)著录格式:主要责任者.题名[文献类型标志].出版地:出版者,出版年:引文起页-止页.
- 4 析出文献著录格式:析出文献主要责任者.析出文献题名[文献类型标志]//专著、会议文献主要责任者.专著、会议题名.版本(第 1 版不著录).出版地:出版者,出版年:析出文献起页-止页.
- 5 学位论文著录格式:论文作者.题名[文献类型标志].学位授予单位所在城市:学位授予或论文出版单位,年份.
- 6 专利文献著录格式:专利申请者或所有者.专利题名:专利国别,专利号[文献类型标志].公告日期或公开日期.获取和访问路径.
- 7 标准(包括国际标准、国家标准、行业标准等)著录格式:主要责任者.标准编号 标准名称[文献类型标志].出版地:出版者,出版年.注:标准编号与标准名称之间留 1 个汉字的空隙.
- 8 报纸文章著录格式:主要责任者.题名[文献类型标志].报纸名,出版日期(版次).获取和访问路径.
- 9 电子文献著录格式:主要责任者.题名[文献类型标志/文献载体标志,是必选著录项目].出版地:出版者,出版年(更新或修改日期)[引用日期].获取和访问途径.
- 10 待发表材料:对于已明确被杂志接受的待发表文献,可以标明期刊及年代,其后标注:待发表,或 In press.
- 11 以电子版优先发表的文献著录格式:Kurth T, Gaziano JM, Cook NR. Unreported financial disclosures in a study of migraine and cardiovascular disease [J/OL]. JAMA, 2006, 296; E1 [2006-09-08]. <http://jama.ama-assn.org/cgi/data/296/3/283/DC1/1> [published online ahead of print July 18, 2006].