

· 基础研究 ·

预混水杨酸钠对大鼠急性百草枯中毒生存率的影响

钱 洁, 朱长清, 吕利雄*

(上海交通大学医学院附属仁济医院急诊与危重病科, 上海 200127)

【摘要】目的 探讨预混水杨酸钠(NaSAL)对急性百草枯(PQ)中毒大鼠生存率及肺损伤的影响。**方法** Wistar大鼠59只随机分为正常对照组、NaSAL对照组、2组PQ组和2组PQ+NaSAL预混组。正常对照组($n=6$)采用生理盐水(NS)腹腔注射; NaSAL对照组($n=6$)予腹腔NaSAL(300mg/kg); 2组PQ组用PQ[25mg/kg($n=11$)或35mg/kg($n=12$)]腹腔注射一次性染毒; 2组预混组($n=12$): 分别一次性给予PQ(25mg/kg)和NaSAL(200mg/kg)预混溶液, 以及PQ(35mg/kg)和NaSAL(300mg/kg)预混溶液。观察各组28d生存率及肺病理学改变。**结果** PQ25mg/kg组与PQ35mg/kg组生存率分别为36%和50%, 2组预混组的生存率分别为33%和50%, PQ组与预混组各组间28d生存率差异无统计学意义($P>0.05$)。病理学研究显示PQ组急性期肺病变主要为弥漫性肺泡炎性损伤, 表现为肺泡及肺泡间隔炎性细胞浸润, 肺泡腔内出血、渗出, 后期主要表现为纤维组织增生沉积。预混组的病理学改变与PQ组相比无明显改善。**结论** 从28d生存率和病理学角度观察, 预混NaSAL对急性PQ中毒大鼠的肺损伤无保护作用。PQ和NaSAL混合后对PQ的毒性无明显影响。

【关键词】 百草枯; 水杨酸钠; 肺损伤

【中图分类号】 R595

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2013.00198

Effect of premixed sodium salicylate on survival of rats after acute paraquat intoxication

QIAN Jie, ZHU Chang-Qing, LYU Li-Xiong*

(Department of Emergency and Critical Care, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China)

【Abstract】Objective To investigate the effect of premixed sodium salicylate(NaSAL) solution on the survival and lung injury in rats after acute paraquat(PQ) intoxication. **Methods** A total of 59 Wistar rats were randomly divided into 6 groups as follows: normal control group(normal saline, $n=6$), NaSAL control group($n=6$), 2 PQ groups and 2 pre-mixed PQ + NaSAL groups. In PQ groups, rats were injected intraperitoneally with PQ of 25mg/kg ($n=11$) or 35mg/kg($n=12$), and then, with 0.9% NaCl at 2h later. Pre-mixed PQ + NaSAL groups were divided into pre-mixed 25mg/kg PQ and 200mg/kg NaSAL, ($n=12$), and pre-mixed 35mg/kg PQ and 300mg/kg NaSAL($n=12$). In NaSAL control group, rats were administered with 0.9% NaCl solution, and then dosed with 300mg/kg NaSAL at 2h later. All groups were observed daily for survival rate and poisoning symptoms over a period of at least 28d. Lung tissues were collected from rats died in the acute stage and those survived over 28d, and then observed with HE and Masson staining for pathological changes. **Results** The survival rates were 36% and 50% respectively in the 25mg/kg PQ group and 35mg/kg PQ group, and 33% and 50% respectively in the two premixed groups respectively. No significant difference was observed in the 28-day survival rates between PQ groups and pre-mixed PQ + NaSAL groups($P>0.05$). Pathological observation showed that the rats exposed to PQ showed apparent lung changes at day 4 (acute stage), including inflammatory cells infiltration into alveoli and alveolar septum, alveolar hemorrhage and effusion at the acute stage, and proliferation and accumulation of fibrotic tissues at the late stage. There was no significant difference in pathological changes between the PQ groups and pre-mixed PQ + NaSAL groups. **Conclusions** Pre-mixed PQ with NaSAL shows no significant protective effect on rat lung injury induced by PQ intoxication. A pre-mixed PQ and NaSAL solution doesn't counteract the toxic effect of PQ.

【Key words】 paraquat; sodium salicylate; lung injury

This study was supported by the Cultivation Plan for Outstanding Discipline Leaders for Public Health in Shanghai (08GWD16).

Corresponding author: LYU Li-Xiong, Email: renjileo@163.com

收稿日期: 2013-03-20; 修回日期: 2013-07-05

基金项目: 上海市公共卫生优秀学科带头人培养计划 (08GWD16)

通信作者: 吕利雄, E-mail: renjileo@163.com

百草枯 (paraquat, PQ), 作为高效价廉的触杀性除草剂, 是目前全球销量最高的农药之一。根据对大鼠等动物测定的半数致死量数据, 世界卫生组织和美国环境保护署等权威机构均把PQ归为中等毒性, 然而, 经口PQ急性中毒在人类表现为剧毒性质, 误服一口20%原液即可因为多器官损害致死。经过50余年的种种努力, PQ急性中毒仍缺乏有效解毒剂, 是致死率最高的农药之一, 引起国际社会严重关切^[1,2]。

Dinis-Oliveira等^[3]利用水杨酸钠 (sodium salicylate, NaSAL) 治疗PQ急性中毒的实验给改善PQ中毒预后带来突破性希望。研究显示, PQ染毒大鼠经NaSAL处理后30d全部存活, 而对照染毒组大鼠在6d内全部死亡 ($P < 0.001$)。NaSAL治疗PQ中毒的成功, 在他们的另一项研究中又通过赖氨匹林 (一种水杨酸的衍生物) 得到重复, 30d生存率也高达100%^[4]。进一步研究NaSAL与PQ之间存在直接理化反应, 两者混合后显示有新络合物产生, 并经熔点、多种光谱分析方法证实^[5]。新近该研究团队用赖氨匹林对抗急性PQ中毒再次取得100%存活的优异结果, 并发现PQ与赖氨匹林混合后不影响PQ的除草剂活性^[6]。因此Dinis-Oliveira等推测, NaSAL与PQ之间存在的直接反应, 可能在NaSAL对抗PQ中毒中具有重要影响。

本实验旨在对这一假说进行探讨, 以研究不同剂量NaSAL和PQ预混后, 对大鼠的生存率及肺病理变化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性Wistar大鼠59只, 购自中国科学院上海实验动物中心, 标准喂养, 10~12周龄, 体质量200~300g。主要试剂为PQ (1, 1-二甲基-4, 4-联吡啶阳离子盐, 纯度99%)、NaSAL (2-羟基苯甲酸单钠盐), 购自Sigma公司。试剂以无菌生理盐水溶解稀释后用于腹腔注射。

1.2 方法

1.2.1 动物随机分组 (图1) 正常对照组 ($n = 6$): 采用无菌生理盐水腹腔注射。NaSAL对照组 ($n = 6$): NaSAL (300mg/kg) 腹腔注射。PQ 25mg/kg组 ($n = 11$): PQ (25mg/kg), 2h后予无菌生理盐水。PQ 35mg/kg组 ($n = 12$): PQ (35mg/kg), 2h后予无菌生理盐水。2个预混组 ($n = 12$) 分别为: PQ (25mg/kg) + NaSAL (200mg/kg) 混合后给药, 2h

后予无菌生理盐水, 以及PQ (35mg/kg) + NaSAL (300mg/kg), 混合后给药, 2h后予无菌生理盐水。各组PQ、NaSAL均用无菌生理盐水溶解后以1ml体积腹腔注射。

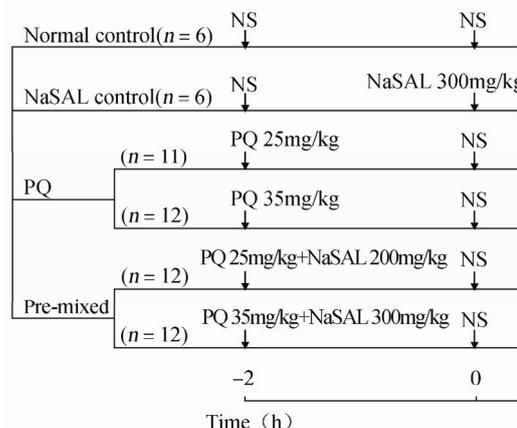


图1 实验大鼠分组给药流程图

Figure 1 Schematic representation of the administration protocols PQ: paraquat; NaSAL: sodium salicylate; NS: normal saline

1.2.2 标本采集与制备 摘取急性期死亡大鼠的肺脏, 并用无菌生理盐水溶液即时配制3%的戊巴比妥钠对28d存活大鼠进行腹腔麻醉后摘取肺脏, 置于中性甲醛溶液固定, 制备石蜡切片, 行常规苏木精-伊红 (HE) 染色、Masson染色, 光镜下观察。

1.3 统计学处理

运用Kaplan-Meier法计算各组大鼠28d生存率, Log-rank法比较各组间生存率差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生存率比较

实验结果显示, 正常对照组和NaSAL对照组全部存活, 生存率100%, PQ25mg/kg组与PQ35mg/kg组生存率分别为36%和50%, 预混组A、预混组B的生存率分别为33%和50%, 明显低于正常对照组和NaSAL对照组 ($P < 0.001$), 但PQ组与预混组生存率差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图2)。

2.2 动物一般状况观察

PQ组、预混组大鼠给药后1d, 即出现不同程度的毛发松散、眯眼、口唇发绀、步态蹒跚、易捕捉等现象, 中毒后2~5d症状最重, 动物濒死时出现深大呼吸、点头样呼吸或呼吸频率加快, 并出现明显的全身发绀; 存活至7d以上的大鼠上述症状开始逐渐减轻。正常对照组和NaSAL对照组未见明显异常。

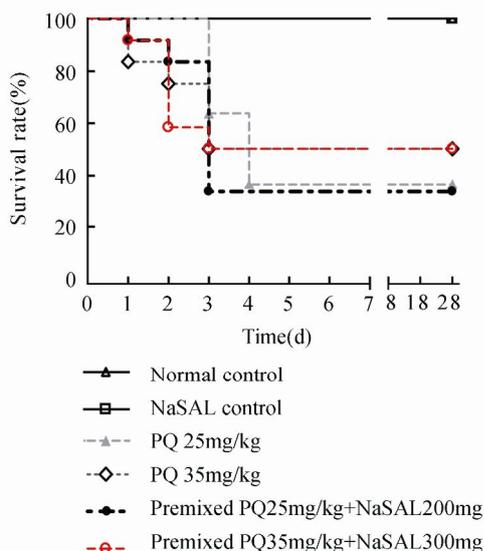


图2 各组大鼠生存率曲线
Figure 2 Survival curves of rats in different groups
PQ: paraquat; NaSAL: sodium salicylate

2.3 光镜观察

HE染色见正常对照组和NaSAL对照组大鼠的肺结构正常, 表现为肺泡壁无塌陷, 肺泡内无渗出液及细胞浸润, 无毛细血管扩张、充血等表现。PQ组急性期(第4天)病变主要为严重的肺泡炎性改变, 表现为肺间质及肺泡腔内大量炎性细胞浸润, 伴随弥漫性肺出血、肺泡腔塌陷、肺泡壁增厚。同期预混组与PQ组相比无明显病理差异。Masson染色可见, 存活PQ组的肺组织病理表现为肺泡间质增宽, 有大量绿染的胶原纤维增生沉积, 部分肺泡腔萎缩消失。预混组的肺病理切片表现类似(图略), 纤

维化程度较PQ组无明显减轻(图3)。

3 讨论

为阐明NaSAL的解毒机制, Dinis-Oliveira等^[5]想到了NaSAL与PQ有直接反应的可能性, 并注意到当NaSAL溶液与PQ溶液两者混合时, 溶液立即不可逆地明显变色, 这种反应在本实验得到重复。Dinis-Oliveira等^[5]进一步研究表明, PQ(阳离子)的吡啶环与水杨酸(阴离子)的芳香环之间发生电荷转移形成稳定的新络合物, 降低PQ离子浓度, 推测水杨酸使PQ毒性极大降低得益于此, 这种现象已在多酚类与PQ相互作用中发现。

然而, 本研究的初步结果并不支持这种推断。PQ与NaSAL预混合后并不降低PQ对大鼠的急性毒性。结果显示PQ与NaSAL预混合后28d生存率及肺病理损伤与PQ组无明显差异, 提示本组剂量配比预混后, 两者的直接化学反应并没有削弱PQ的毒性作用。

根据目前对PQ中毒的救治现状, 水杨酸对PQ急性毒性在硬终点生存率上显著改善的报道显然值得进一步探索。结合本研究结果, 有以下方面值得进一步探讨。

剂量与配比问题: Dinis-Oliveira等^[3]在8周龄Wistar大鼠以PQ25mg/kg腹腔注射染毒, 2h后腹腔注射NaSAL200mg/kg干预, 对照组6只大鼠第6天即全部死亡, 水杨酸钠组30d仍全部存活。稍后Dinis-Oliveira等^[4]又在8周龄Wistar大鼠以PQ125mg/kg经胃染毒, 2h后经腹腔分别给与赖氨匹林100, 200和400mg/kg治

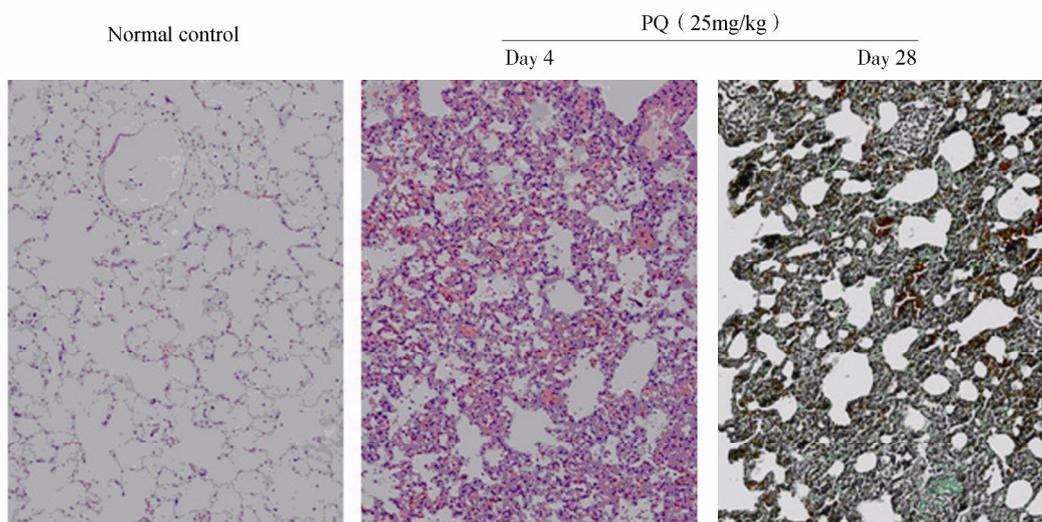


图3 光镜下正常大鼠及PQ组(25mg/kg)大鼠肺组织病理学改变

Figure 3 Histopathological changes of lungs in normal control and PQ (25mg/kg) groups

On day 4: interstitial and alveolar infiltration of inflammatory cell, widespread pulmonary hemorrhage, alveolar collapse and the enlargement of alveolar walls (hematoxylin-eosin $\times 200$); on day 28: widened lung interstitial tissue, extensive fibrotic proliferation and deposition of collagen dyed green, obliteration of alveolar architecture (Masson $\times 200$). The histological appearance in the pre-mixed PQ+NaSAL groups is similar to that in PQ groups

疗, 30d生存率染毒对照组为40%, 赖氨匹林100mg/kg治疗组为60%, 赖氨匹林200mg/kg治疗组为100%, 赖氨匹林400mg/kg治疗组为20%, 初步提示赖氨匹林200mg/kg治疗最佳, 赖氨匹林400mg/kg治疗组反而有加重现象。Dinis-Oliveira等^[5]发现每一PQ离子可与1个、2个或4个水杨酸盐离子结合, 分别呈黄、桔黄或红色改变, 不同的配比混合对毒性的影响有待研究。在探索PQ与赖氨匹林混合的新剂型时, 以PQ 125mg/kg经胃染毒, 分别混以配比1:0.5, 1:1和1:2克分子浓度的赖氨匹林, 发现以1:2配比(赖氨匹林316mg/kg)组生存率100%, 而1:1配比组也有加重现象^[6]。问题在于传统功效上400mg赖氨匹林等于222mg乙酰水杨酸(阿司匹林), 这3项实验的矛盾结果说明水杨酸合适剂量尚不清楚。本研究中水杨酸钠200mg/kg和300mg/kg均未见明显效果, 俞爱青^[7]用水杨酸钠120mg/kg腹腔干预PQ 80mg/kg经胃染毒, 生存率也未见改善。宜按染毒途径分层, 分剂量细化设计方案, 扩大每组样本量, 探索水杨酸的最佳剂量及给药方式。

PQ急性毒性判定问题: PQ的急性毒性存在独特的特点, 传统或最新的LD₅₀测定方法均不适合PQ急性毒性的判定^[1,8,9]。一是PQ有两期毒性, 二是动物种属间以及同一种属不同个体间对PQ毒性反应差异极大, 经典的LD₅₀或生存率测定方法使用小样本动物可能严重影响结果判别。Dinis-Oliveira等^[3]在8周龄雌Wistar大鼠以PQ25mg/kg腹腔注射染毒, 染毒对照组6只大鼠第6天即全部死亡, 而本组10周雄性Wistar大鼠以PQ25mg/kg或35mg/kg腹腔注射染毒, 第6天死亡率仅36%和50%, 28d终点死亡率与Dinis-Oliveira等结果自然也有不同。必须有足够样本量及足够时间的观测才能消除此种干扰。本组研究尚发现, 经典的动物人道终点处理方法也不适合PQ急性毒性测定, 如许多动物虽然体质量明显下降(>20%)或暂时丧失活动能力, 但能挺住而顺利存活^[10]。

解毒机制问题: PQ的中毒机制尚不清楚。目前自由基和氧化压力学说最为接受, 但针对此通路所进行的各种干预均无明显临床疗效。水杨酸具备抗氧化、抗炎和抗栓作用, Dinis-Oliveira等^[3,11]实验中也观察到, Wistar大鼠NaSAL治疗组与氧化应激水平相关的一些指标, 如丙二醛较PQ组低, 核因子-κB活性较PQ组弱, 抑制PQ导致的肺组织凋亡。Huang等^[12]对SD大鼠经胃管PQ50mg/kg染毒后, 2h后经腹腔注射200mg/kg赖氨匹林治疗, 血清与肺组织中丙二醛水平减少, 超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化

物酶和过氧化氢酶等水平增加。但因为有类似功能药物并未有同样治疗效果, 显然不能单以此解释Dinis-Oliveira等^[3,4]实验中水杨酸类在治疗急性PQ中毒的对生存率显著提高的作用机制, 也难解释本研究组织病理上未见明显改善的结果。

水杨酸已应用百年, 阿司匹林成为医药史上3大经典药物之一, 但水杨酸的作用复杂性可能远超我们目前的认识^[13]。近年来发现, 水杨酸作为一种酚类激素, 普遍存在于植物王国中, 是植物面对病原入侵而启动系统获得性抗性的关键信号分子, 也是植物面对热、冷、紫外线等应激时的保护调节剂^[14]。已有研究表明, 同时给予水杨酸能够明显降低PQ对植物的毒性, 起效无须时间间隔, 效果优于提前给药, 再次提示两者直接在解毒中的重要性。而提前24h以上给药仍有解毒活性, 说明水杨酸降低PQ对植物的毒性尚有其他途径。每个水杨酸可与2个羟自由基结合形成2, 3-或2, 5-二氢苯甲酸, 不仅直接中和羟自由基浓度, 2, 3-二氢苯甲酸也是强力的铁螯合剂, 从而阻断芬顿反应停止羟自由基进一步产生。对水杨酸干预PQ急性毒性研究或许有助于对生命现象和水杨酸功能的新认识。

总之, 鉴于目前急性PQ中毒的救治困境, 根据水杨酸对PQ急性毒性在生存率上有显著提高的初步结果等多项研究提示, 以及对水杨酸功能的新发现结果, 对以上问题针对性设计新方案, 或许将对PQ中毒救治带来突破性进展。

【参考文献】

- [1] 吕利雄, 陈怡, 归茜, 等. 急性百草枯中毒: 挑战与对策[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2009, 27(4): 47-49.
- [2] Gawarammana IB, Buckley NA. Medical management of paraquat ingestion[J]. Br J Clin Pharmacol, 2011, 72(5): 745-757.
- [3] Dinis-Oliveira RJ, Sousa C, Remião F, *et al.* Full survival of paraquat-exposed rats after treatment with sodium salicylate[J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42(7): 1017-1028.
- [4] Dinis-Oliveira RJ, Pontes H, Bastos ML, *et al.* An effective antidote for paraquat poisonings: the treatment with lysine acetylsalicylate[J]. Toxicology, 2009, 255(3): 187-193.
- [5] Dinis-Oliveira RJ, de Pinho PG, Ferreira AC, *et al.* Reactivity of paraquat with sodium salicylate: formation of stable complexes[J]. Toxicology, 2008, 249(2-3): 130-139.
- [6] Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, Guilhermino L, *et al.*

- New formulation of paraquat with lysine acetylsalicylate with low mammalian toxicity and effective herbicidal activity[J]. *Pest Manag Sci*, 2013, 69(4): 553-558.
- [7] 俞爱青. 水杨酸钠对百草枯所致大鼠肺损伤的干预研究[D]. 上海: 复旦大学公共卫生学院, 2009.
- [8] OECD (2001) Test Guideline 423. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method [EB/OL]. http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html, 2011-07-07/2012-01-23.
- [9] World Health Organization. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009 [EB/OL]. http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard/en/, 2011-07-05/2012-02-01.
- [10] OECD (2001) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation[EB/OL]. http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html, 2011-07-07/2012-01-20.
- [11] Dinis-Oliveira RJ, Sousa C, Remião F, *et al.* Sodium salicylate prevents paraquat-induced apoptosis in the rat lung[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(1): 48-61.
- [12] Huang WD, Wang JZ, Lu YQ, *et al.* Lysine acetylsalicylate ameliorates lung injury in rats acutely exposed to paraquat[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(16): 2496-2501.
- [13] Hawley SA, Fullerton MD, Ross FA, *et al.* The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase[J]. *Science*, 2012, 336(6083): 918-922.
- [14] Rivas-San Vicente M, Plasencia J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development[J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(10): 3321-3338.

(编辑: 周宇红)

· 消 息 ·

《老年心脏病学》(第三版) 优惠销售

由我国老年医学开拓者、老年心脏病学奠基人王士雯院士, 和解放军306医院钱方毅教授、首都医科大学附属北京安贞医院周玉杰教授主编、人民卫生出版社出版的《老年心脏病学》(第三版) 已与2012年10月正式发行。

《老年心脏病学》于1987年问世, 1998年发行第二版。该书是我国第一部老年心脏病学专著, 出版后受到广大临床医师和读者的好评与欢迎, 曾获国家优秀图书奖。该书第三版的编写邀请了我国百余位著名心血管病专家参与, 经过多年的努力, 在第二版的基础上, 内容扩展为11篇, 104章, 约260万字, 既吸收了国外老年心脏病学的新进展, 也有我国自己的创新性内容, 是一部具有中国特色的老年心脏病学大型精品著作。

《老年心脏病学》第三版具有以下特点: 全书突出“老年”, 紧密围绕老年人心脏病学的特点; 体现了循证医学在指导老年心脏病诊断治疗中的重要作用; 理论联系实际, 内容新颖, 充分反映了国内外各领域的新进展与新观点, 具有很强的可读性和指导性。

为答谢广大读者对《中华老年多器官疾病杂志》的关心和厚爱, 现对本刊作者和读者实行图书定价8.5折的优惠政策。有意者请联系本刊编辑部订购。

联系人: 富 然

电话: 010-66936756

E-mail: zhlnhdq@mode301.cn