百草枯中毒大鼠 TNF-α、IL-10 的表达及大黄保护作用的研究

李广军[1] 姜银松[2] 王占青[2] 马玉英[2△] 尹彩星[2]

(1 临沂市罗庄区人民医院外一科 山东 罗庄 276017；2 石河子大学医学院 新疆 石河子 832002)

摘要 目的：观察大黄对急性百草枯中毒大鼠 TNF-α、IL-10 的干预作用，探讨其可能的作用机制。**方法：**90 只 SD 大鼠随机分为生理盐水对照组（A 组）、PQ(60 mg／kg)灌胃染毒组（B 组）、生大黄(300mg／kg·d)干预组（C 组），每组 30 只。中毒后 6h、24h、72h 分批处死存活的大鼠，并且检测大鼠血浆 TNF-α、IL-10 水平。**结果：**B 组、C 组 TNF-α、IL-10 水平在染毒后 6h 开始升高，72h 达到高峰，与 A 组相比，差异有统计学意义（P<0.05、P<0.01），在相同时间点 C 组 TNF-α 和 IL-10 的表达低于 B 组，差异均有统计学意义（P<0.01）。B 组、C 组血浆 TNF-α、IL-10 水平与中毒时间呈显著正性相关关系（r=0.849，P<0.01；r=0.790，P<0.01；r=0.0.943，P<0.01；r=0.892，P<0.01）。**结论：**大黄能够通过降低百草枯中毒大鼠体内的 TNF-α、IL-10 水平，减轻百草枯对大鼠的损伤作用。

关键词：大黄；百草枯；TNF-α；IL-10

中图分类号：Q95-3 R139.3 R595.4 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2012）04-649-03

The Study on Expression of TNF-α、IL-10 in Rats with Paraquat Intoxication and the Protection Effect of Rhubarb

LI Guang-jun[1], JIANG Yin-song[2], WANG Zhan-qing[2], MA Yu-ying[2△], Yin Cai-xing[2]

(1Shan Dong, Luo Zhuang people's hospital, Shandong, Luozhuang,276017;

2 Xin Jiang,Medical College of Shihezi University, Xinjiang, Shihezi , 832002)

ABSTRACT Objective: To evaluate the effect of rhubarb on tumor necrosis factor-a (TNF-α) and interleukin-10 (IL-10) in rats with paraquat intoxication, and investigate its mechanism. Methods: 90 healthy adult SD rats were randomly divided into Group A(control group n=30), Group B(poisoned group n=30) , Group C (rhubarb-treated group n=30) . Group B and C were treated intragastrically with PQ at 60 mg／kg, Group C given rhubarb at 300mg／kg. d, while only saline was treated intragastrically the other two groups . Live rats in each group were sacrificed at 6 hours,24 hours and 72 hours, for the determination of TNF-α, IL-10 in plasma of rats. Results: The leves of TNF-α, IL-10 increased at 6 hours after paraquat intoxication in Group B and Group C, and peaked at 72 hours later, with statistical difference from Group A (P<0.05, P<0.01) ; Compared with group B, delayed，lower increasing extent，obviously reducing tendency in group C, with statistical difference (P<0.01). As to the leves of TNF-α, IL-10and poisoning time, there were high positive correlations among them. Conclusions: Rhubarb ameliorates damage effect caused by PQ poisoning in rats by means of inhibiting the expression of TNF-α, IL-10 in turn to alleviate inflammatory reaction.

Key words: Rhubarb; Paraquat; Tumor necrosis factor-α; Interleukin-10

Chinese Library Classification: Q95-3 R139.3 R595.4 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)04-649-03

前言

百草枯(paraquat，PQ)又名克芜踪，化学名称 1，1- 二甲基-4，4- 联吡啶阳离子盐，是一种高效非选择性、接触性除草剂，对人、畜有极强毒性，中毒后可导致机体多器官功能损害，其中以肺脏病变最显著，后期多死于呼吸衰竭，然而其具体的作用机制尚不清楚，除了脂质过氧化反应，还有大量细胞因子参与全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome，SIRS)、多器官衰竭(multi-organs failure，MOF)[1]。大黄用于实热便秘、积滞腹痛、泻痢不爽、肠痈腹痛等症。现代医学研究发现其还有抗炎，抗病毒，调节免疫、止血、促进农药排出等作用[2,3]。本研究旨在通过观察大黄对染毒大鼠血浆 TNF-α、IL-10 水平的影响，探讨其治疗 PQ 中毒的机制。

作者简介：李广军（1976-），男，副主任医师，研究方向：创伤与急救，Tel:13054905599;E-mail：961397068@qq.com

△通讯作者：马玉英，硕士研究生导师，教授，主任医师，E-mail：jznkmyy@sina.com

(收稿日期：2011-07-23 接受日期：2011-08-18)

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级健康成年 SD 大鼠 90 只，购自新疆乌鲁木齐市疾病防治和控制中心动物科，产品批号 SCXK（新）2003-0002 雌、雄各半，重量 200-250 g。生大黄粉购于三九医药股份有限公司(免煎剂型)，用前 15 min 温等渗盐水冲泡、配制浓度为 0.1g／ml，摇匀后备用。主要试剂为 20%百草枯水剂(江苏南通先正达农药公司)，TNF-α、IL-10 试剂盒均为美国 R&D 公司产品进口分装，上海森雄科技实业有限公司提供；LG16-W 型台式高速离心机(北京医用离心机厂)，梅特勒·托利多 AX-205DeLta Range 电子天平(瑞士梅特勒公司)。

1.2 方法

将大鼠按随机数字表法分为正常对照组 (A 组，30 只)、染

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

毒组(B 组,30 只)及大黄组(C 组,30 只),各组再按随机原则分为 6h、24 h 和 72h3 个亚组,每个亚组 10 只大鼠。B、C 组给予一次性 PQ (60 mg / kg) 溶液 lml 灌胃染毒,A 组同时给予 lml 生理盐水灌胃。C 组大鼠染毒后 30min 给予大黄 300mg / kg 灌胃干预,每天一次至处死,A 组和 B 组同时用等量等渗盐水灌胃。分别在中毒后 6、24、72 h 观察大鼠变化,各组动物均于观察结束后下腔静脉取血约 3 ml,静置 20 min,3000 r / min 离心 5 min 后取血清,采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清 TNF-α、IL-10 水平,按说明书规程操作。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件处理数据。实验资料均数± 标准差表示,采用单因素方差分析,两两比较用 q 检验,组间多重比较采用 LSD 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。相关性分析用 Spearman 等级相关分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的一般情况

B 组于染毒后 30min～2h 即可出现明显的中毒表现,并且逐渐加重。主要有进食、进水量明显减少,毛色干涩,静伏少动,蜷缩弓背,目光呆滞,对刺激反应迟钝,粪便量少且干,尿量减少。染毒后 24h 嘴角、鼻孔、眼角有血性分泌物,并且出现呼吸困难,48h 嘴角出血明显增多,72h 后有所减少。C 组进食、进水量较染毒组多,体重减轻不明显,精神尚可,活动较多,肌力下降不明显,大鼠粪便湿量多,尿量多,呼吸困难症状轻,出血时间延迟并且较轻。A 组饮食、精神、呼吸及毛色均正常。B 组大鼠 24h 死亡一只,72h 死亡两只,C 组 72h 死亡一只,A 对照组无自然死亡。解剖中肉眼所见:与 C 组相比,B 组肠胀气明显,蠕动少,含 PQ 粪便滞留时间长。

2.2 血浆 TNF-α 水平变化

大鼠染毒后,B 组和 C 组 TNF- 水平明显高于 A 组。中毒后 6hB 组 TNF- 水平开始升高,24h 达到较高水平,72h 时大鼠血浆 TNF-α 水平达到高峰,在同一时间点,B 组与 A 组相比,差异均有统计学意义 (P<0.01)。C 组 TNF- α 水平在染毒后 6h 也升高,中毒后 24h 同样达到较高水平,72h 时大鼠血浆 TNF-α 水平达到高峰,在中毒后 24h、72h 与 A 组相比,差异均有统计学意义 (P<0.01)。在同时间点 B 组与 C 组相比,TNF-α 水平上升幅度较小,水平低,差异有统计学意义 (P<0.01)。

2.3 血浆 IL-10 水平变化 (表 1)

染毒后 6h,B 组、C 组与 A 组比较,差异均有统计学意义 (P<0.01、P<0.01) B 组水平高于 C 组,差异有统计学意义 (P<0.05)。染毒后 24h,B 组、C 组与 A 组比较,差异均有统计学意义 (P<0.01、P<0.01) B 组水平高于 C 组,差异有统计学意义 (P<0.01)。染毒后 72h,B 组、C 组水平明显高于 A 组,差异均有统计学意义 (P<0.01、P<0.01),B 组与 C 组相比,差异有统计学意义 (P<0.01)。

2.4 血浆 TNF-α、IL-10 与中毒时间相关性分析 (表 2)

B 组、C 组血浆 TNF-α、IL-10 水平随着中毒时间的延长而呈明显增加的趋势。B 组、C 组血浆 TNF- α 水平与中毒时间呈正性相关,(r=0.849,P<0.01 ;r=0.790,P<0.01)。B 组、C 组血浆 IL-10 水平与中毒时间呈显著正性相关关系。(r=0.0.943,P<0.01 ;r=0.892,P<0.01)。

表 1 大鼠血浆 TNF-α 和 IL-10 的表达水平

Table 1 The levels of TNF-α and IL-10 of rat plasma

Group	TNF-α	IL-10
A group		
6h group	24.2856± 3.7893	19.4660± 2.1491
24h group	20.8720± 4.0211	20.2210± 3.6194
72h group	21.1863± 4.9991	21.5610± 2.5188
B group		
6h group	37.2192± 7.89181 23	25.6751± 3.020923
24h group	41.9494± 7.5287 2	41.5941± 1.023123
72h group	78.3962± 8.0816 23	112.2908± 5.695123
C group		
6h group	29.0406± 3.2056 1	22.6681± 1.07262
24h group	37.2725± 3.6882 2	34.8520± 1.97822
72h group	41.3479± 3.08352	55.4640± 4.05572

Note:1P<0.05,compared with A group:2 P<0.01, compared with A group: 3 P<0.01, B group compared with C group

表 2 B Group and C Group 大鼠中毒时间和大鼠的 NF-α、IL-10 表达的 Spearman 等级相关分析

Table2 Spearman correlation analysis of TNF-α, IL-10 and poisoning time in B Group and C Group

Group	TNF-α	IL-10
B group		
Correlation coefficient	0.849	0.943
Prob	0.000	0.000
C group		
Correlation coefficient	0.797	0.892
Prob	0.000	0.000

3 讨论

机体 PQ 中毒后主要表现为消化道的糜烂出血以及肺、肝、肾等脏器的功能障碍。肺组织是 PQ 中毒的主要靶器官,其病理变化是肺泡充血、水肿、炎性细胞浸润和间质纤维化[4] 影像学特征为毛玻璃样变,Lee 等[5]报道当毛玻璃样变面积大于等于肺总面积的 40%时,患者死亡率为 100%。王伟等用微型 CT 观察 PQ 染毒大鼠,发现与对照组相比,中毒大鼠肺纤维化明显,并且中下肺叶的外周部位纤维化最严重[6]。TNF-α 是一种由活化单核、巨噬细胞产生、作用广泛的细胞因子,是 PQ 中毒导致急性炎症反应的始动因子和枢纽因子,是检测百草枯损伤的重要的指标。IL-10 是一种主要由 TH2 细胞产生的酸性蛋白,是细胞因子合成抑制因子,对机体具有保护性作用。目前 PQ 中毒的治疗措施主要包括洗胃、导泻、血液净化、抗自由基、抗炎、免疫抑制剂[7,8]、抗纤维化药物等,但这些方法未得到满意的治疗效果。糖皮质的使用还存在较多争议,马玉英研究显示甲泼尼龙对急性 PQ 中毒大鼠具有保护作用,而且较大剂量甲泼尼龙的作用优于较小剂量[9]。大黄性苦寒,具有导泻、祛瘀、解毒等功效,在临床上得到广泛应用[10,11,12]。

在本实验中,B 组大鼠中毒后 30min 逐渐出现 进食、进水量减少,蜷缩弓背,目光呆滞,粪便量少且干,尿量减少,嘴角、鼻孔、眼角有血性分泌物,呼吸困难等变化,72h 可见两只大鼠

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

死亡。PQ 口服中毒后直接导致消化道糜烂、溃疡、出血、胃肠动力学障碍，造成不可逆转的肺纤维化和急性肾小管坏死，引起急性肺、肾功能障碍。因而中毒大鼠的消化、呼吸、泌尿系统出现上述症状。我们在不同时间点检测大鼠血浆 TNF-α、IL-10 水平，可以看到 B 组大鼠的 TNF-α、IL-10 水平显著高于 A 组（P<0.05 或 P<0.01），进一步还发现 TNF-α、IL-10 水平与大鼠中毒时间呈高度相关，这与王伯良的报道一致[13]。这表明 TNF-α 在 PQ 中毒中起了重要作用。其作用机制为：激活 NF-kB 并与其他细胞因子构成复杂的细胞因子网络，引发一系列的链式反应，加重肺组织炎症甚至引起系统系炎症反应综合征；激活中性粒细胞，单核巨噬细胞，肺泡内皮细胞，并使其聚集、表达相应的受配体，诱导中性粒细胞在组织间隙内释放大量的活性氧及弹性蛋白酶产生，细胞膜受损后导致细胞 Ca^{2+} 超载，抑制线粒体呼吸功能；导致细胞的通透性增加，细胞膜损伤，产生氧自由基，加重 PQ 所引起的脂质过氧反应；下调内皮细胞血栓调理素表达，激活凝血系统促进微循环淤血和血栓形成；促进肺成纤维细胞有丝分裂，引发肺纤维化；Dubaybo 等研究发现 TNF-α 可能通过激活两个单独的信号转导途径：磷酸酶和 G 蛋白而介导细胞增生[14]。在本实验中 IL-10 的升高说明机体在遭遇损伤的同时也启动了抗炎机制，IL-10 可通过下列途径发挥保护作用①抑制单核巨噬细胞、T 细胞和 NK 细胞的活性，同时抑制这些细胞合成和释放炎性细胞因子，②IL-10 还能减少 TNF-amRNA 的表达，这种抑制作用与调节蛋白激酶 c(PKc)的活性有关。③抑制 NOS 的合成与释放，减少 NO 产生使部分炎症细胞不能得到有效的活化和趋化，从而减轻炎症反应。

C 组大鼠 TNF-α 的水平中毒后比 A 组有所升高（P<0.01），但比 B 组却明显降低（P<0.01），而且 C 组大鼠的中毒症状明显轻于 B 组。这显示了大黄能抑制 PQ 对大鼠的损伤。大黄对大鼠的保护作用可能与以下几个方面有关①大黄具有显著的导泻作用，促进胃肠蠕动，减少毒物吸收，同时大黄酸和大黄素有明显利尿作用，对吸收入血的毒物起排泄作用。张随玉[15]临床研究显示使用大黄对 PQ 中毒患者进行血液灌流，能降低患者 MOF 的发生率，减轻肺损伤②大黄保护肠道黏膜、促进内毒素排出、减少细菌及毒素移动位、抗炎抑菌③保护肺泡上皮和血管内皮，增加中毒患者和大鼠 SOD 的活性，清除氧自由基，减少炎性因子生成[16]。

本实验显示大黄能减轻 PQ 中毒大鼠的一般情况，还能降低血浆炎症因子的表达，为临床上使用大黄治疗 PQ 中毒提供了依据，但是由于样本量尚小，观测指标不系统，不能更加全面的探讨大黄治疗 PQ 中毒的机制，若能同时监测大黄对 PQ 中毒机体的血浆浓度、靶器官的病理变化、脂质过氧化水平、以及炎症因子表达的影响，将更为科学。

参 考 文 献（References）

[1] Dinis-Oliveim RJ, Duarte JA, Sdnchez-Navarro A, et al. Paraquat poisonings: Mechanisms of lung toxicity,clinical features,and treatment [J].Crit Rev Toxicol,2008,38(1):13-71

[2] 刘芙蓉,佟 飞,田英平,等. 大黄对百草枯中毒大鼠急性肺损伤保护作用的研究 [J]. 医学研究生学报,2008,21 (9) :924-928
Liu Fu-rong, Tong Fei, Tian Ying-ping, et al. Rhubard alleviates acute lung injury caused by paraquart [J]. Journal of Medical Postgraduates, 2008,21 (9) :924-928

[3] Cai DP, Dai W, Chen YP, et a1. Effect and mechanism of rhubarb on fibrinolysis in secondary damaged central nerve system of rats with acute hemorrhagic stroke[J]. Zhong Xi Yi, Jie He Za Zhi,2005,25(1):t 38-41

[4] Ana Cristina Rodrigues Lacerda, Maria da Gloria Rodrigues-Machado, Polyana Leite Mendes,et al. Paraquat-induced pulmonary fibrosis increases exercise metabolic cost, reducing aerobic performance in rats [J].Toxicol.sci,2009,34(6):671-679

[5] Hae-Sung Lee, Hyo-Wook Gil, Jong-Oh Yang, et al. The Area of Ground Glass Opacities of the Lungs as a Predictive Factor in Acute Paraquat Intoxication [J]. Korean Med Sci, 2009, 24(4): 636-640

[6] Wei Wang, Zu-jun,Song, Hong Ding, et al. Imaging in detecting sites of pulmonary fibrosis induced by paraquat[J]. World journal of Emergency Medicine,2011, 2(1):45-49

[7] Lin JL,Lin-Tan DT,Chen KH,eta1.Repeated pulse of methylprednisolone and cyclophosphamide with continuous dexamethasone therapy for patients with severe paraquat poisoning [J].Crit Care Med, 2006,34(2):368-373

[8] Descatha A,Megarbane B,Garcia V,etal. Delayed immunosuppressive treatment in life-threatening paraquat ingestion: A case report [J]. J Med Toxicol,2009,5(2):76-79

[9] 马玉英,赵文鹏,豆周林等.不同剂量甲波尼龙对急性百草枯中毒大鼠早期肺损伤干预研究[J].现代医学进展,2011,11 (11) :2103-2106
Ma Yu-ying,ZhaoWen-peng, Dou Zhou-lin. Effects of Different Doses of Methylprednisolone on Early Lung Injury in Paraquat Toxic Rats [J]. Progress in Modern Biomedicine,2011,11 (11) :2103-2106

[10] Xiaoyan Cui, Yueling Wang, Norihiro Kokudo, et a1.Traditional Chinese medicine and related active compounds against hepatitis B virus infection[J]. BioScience Trends, 2010,4(2): 39-47

[11] Myung Sun LEE,Cheon Bae SOHN.Anti-diabetic Properties of Chrysophanol and Its Glucoside from Rhubarb Rhizome [J].Bi0l Pharm BulI,2008,31(11) :2154-2157

[12] Tran Minh NGOC, Tran Manh IfONG, Phuong Thien THUONG, et a1. Inhibition of Human Low Density Lipoprotein and High Density Lipoprotein Oxidation by 01igostilbenes from Rhubarb [J]. Biol Pharm, Bull, 2008, 31(9):1809-1812

[13] 王伯良,涂艳阳,仲月霞等.急性百草枯细胞中毒不同时间段大鼠肺、肾组织及血浆 TNF- 、IL-10 变化[J]. 山西医科大学学报,2011, 42 (5) : 375-377
Wang Bo-liang,Tu Yan-yang,Zhong Yue-xia.Changes of TNF- 、IL-10 leves in plasma,lung and kidney of poisoned rats induced by paraquat at different time[J].Jounal of Shanxi Med Univ,2011,42 (5) :375-377

[14] Dubaybo BA. Role of tumor necrosis factor-alpha in regulating fibrotic Lung repair [J]. Res Comun Mol Pathol Pharmacol,1998, 101 (1): 69-83

[15] 张随玉. 思密达及大黄联合血液灌流防治百草枯中毒后多器官功能障碍综合征的临床观察 [J]. 中国中西医结合急救杂志,2002,9 (5) : 305-306
Zhang Sui-yu. Clnical observation of smecta,rhubarb and hemoperfusion on preventing and treating multiple organ dysfunction syndrome after paraquat poisoning [J]. China's integrated traditional Chinese and western medicine in emergency magazine, 2002, 9 (5) : 305-306

[16] 宋明东,肖桂林.大黄对急性氧化乐果中毒大鼠血浆胆碱酯酶和超氧化物歧化酶影响的实验研究 [J]. 中国医师杂志, 2009, 11 (4) : 485-487
Song Ming-dong,Xiao Gui-lin. Experimental study On effects of Rhubarb treatment On the ChE and SOD in rats with acute omethoate poisoning[J]. Journal of Chinese Physician, 2009, 11 (4) : 485-487

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net