

依达拉奉对急性阿维菌素中毒大鼠脑损害的保护作用及机制研究

程江华 陈琨 陈晓兵

[摘要] 目的 研究依达拉奉对急性阿维菌素中毒大鼠脑损害的保护作用及机制研究。方法 将36只雄性SD大鼠随机分为依达拉奉治疗组(治疗组)、阿维菌素中毒组(中毒组)和对照组。采用经口灌胃方式染毒制备急性阿维菌素中毒模型,染毒后给予0.9%氯化钠注射液或0.9%氯化钠注射液+依达拉奉的不同治疗,观察三组大鼠生存状况。在染毒后72 h,以0.4%戊巴比妥钠深度麻醉后,以4%多聚甲醛灌注固定后取脑,行脑组织苏木精-伊红(HE)染色及免疫组化检测三组大鼠脑组织病理变化,观察脑组织凋亡调节蛋白Bcl-2相关X蛋白(Bax)、细胞淋巴瘤/白血病-2蛋白(Bcl-2)的表达及脑神经细胞凋亡率的变化。结果 中毒组、治疗组大鼠均有病理损害;治疗组主要表现为脑神经细胞肿胀,间质水肿,血管充血,纤维紊乱,炎症细胞浸润;中毒组除上述表现外,并见多发性,局灶性神经组织破坏断裂、溶解坏死灶;对照组未见脑神经细胞形态学改变。与对照组大鼠比较,中毒组和治疗组的大鼠脑组织Bax蛋白表达增加,Bcl-2蛋白表达减少,Bax/Bcl-2比值升高,脑神经细胞凋亡率(AI)升高,差异均有统计学意义(t 分别=4.15、3.34、5.07、2.06、2.96、3.61、2.54、1.95, P 均 <0.05);与中毒组大鼠比较,治疗组大鼠脑组织Bax蛋白表达减少,脑组织Bcl-2蛋白表达增多,Bcl-2蛋白表达减少,Bax/Bcl-2比值降低,脑神经细胞AI降低,差异均有统计学意义(t 分别=3.29、4.17、2.85、2.34, P 均 <0.05)。结论 依达拉奉可减轻急性阿维菌素中毒大鼠中毒症状,明显地减轻脑组织病理损害,通过抑制Bax蛋白表达,促进Bcl-2蛋白表达增多,明显地抑制脑神经细胞凋亡,进而对急性阿维菌素中毒大鼠的脑损害起保护作用。

[关键词] 阿维菌素; 中毒; 脑损害; 细胞凋亡; 依达拉奉

Research about protective effects and mechanism of edaravone on brain injury in rats with acute avermectin poisoning CHENG Jianghua, CHEN Kun, CHEN Xiaobin. Department of General Medicine, Jinhua Central Hospital, Jinhua 321000, China

[Abstract] **Objective** To study the protective effects and mechanism of edaravone on the brain injury in rats with acute avermectin (AVM) poisoning. **Methods** Thirty-six male sprague-dawley (SD) rats were randomly divided into the edaravone treatment group (treatment group), the avermectin poisoning group (poisoning group) and the control group. Acute avermectin poisoning models were infected and produced by filling the stomach through the mouth. After exposure, the rats treated with saline or saline + edaravone respectively. The survivals of the rats in each group for 72 hours were observed. At the 72 hours after exposure, pathological changes of brain tissue of rats were detected by HE staining and immunohistochemical detection after deep narcotizing with 0.4% pentobarbital sodium and perfusing with 4% paraformaldehyde. The changes of brain nerve cell apoptosis, apoptosis regulating protein Bcl-2 and Bax expressions were analyzed. **Results** There were pathological damage in the poisoning group and the treatment group rats. The treatment group mainly character-

ized by swelling in the brain nerve cells, interstitial edema, vascular engorgement, fiber disorder and inflammatory cells infiltration. The poisoning group showed multiple, focal neural tissue damage fracture and dissolve focal necrosis besides the above performances. The control group did not find cranial nerve cell morphological changes. Compared with the control group,

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2017.01.005

基金项目:金华市市级科技计划资助项目(2011-3-036)

作者单位:321000 浙江金华,金华市中心医院全科医学科(程江华),重症医学科(陈琨);徐州医科大学附属连云港医院急诊科(陈晓兵)

通讯作者:陈琨, Email: 13957970707@sina.com

the Bax proteins in brain tissue of poisoning group and treatment group were significantly increased, Bcl-2 protein expressions were significantly decreased, Bax/Bcl-2 ratio were significantly increased, the brain cells apoptosis rate (AI) were significantly increased ($t=4.15, 3.34, 5.07, 2.06, 2.96, 3.61, 2.54, 1.95, P<0.05$). But compared with the rats in the poisoning group, the expression of Bax protein of treatment group was significantly decreased in brain tissue, the expression of Bcl-2 protein was significantly increased, Bax/Bcl-2 ratio was significantly decreased, the nerve cells AI was significantly decreased ($t=3.29, 4.17, 2.85, 2.34, P<0.05$). **Conclusion** Edaravone could reduce the poisoning symptoms of the rats with AVM poisoning and significantly reduce pathological damage by inhibiting the expression of Bax protein. It promotes the expression of Bcl-2 protein through inhibiting Bax protein, significantly inhibit the apoptosis of nerve cells and protects brain that damage of abamectin acute poisoning.

[Key words] avermectin; poisoning; brain damage; apoptosis; edaravone

阿维菌素是一种新型生物农药,被广泛用于畜牧业中,具有高效、广谱、害虫不容易产生抗性等优点,其制剂种类繁多^[1]。随着阿维菌素的广泛应用,临床上阿维菌素中毒者越来越常见。由于阿维菌素没有特效解毒药物,给临床救治带来一定困难。目前,研究表明阿维菌素的毒性作用主要影响神经系统,具体机制尚不明确^[2-4]。依达拉奉注射液是一种自由基清除剂,具有脑保护作用。依达拉奉可清除自由基,抑制脂质过氧化,从而抑制脑细胞、血管内皮细胞、神经细胞的氧化损伤,广泛用于治疗急性脑血管病,如脑梗死等^[5]。依达拉奉是否对阿维菌素脑损害起保护作用?尤其对脑神经细胞凋亡的影响,目前尚未见报道。本次实验建立急性阿维菌素中毒大鼠模型,研究依达拉奉对阿维菌素所致的脑损害是否有保护作用及其机制。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2015年3月至2015年12月在徐州医科大学急诊医学实验室完成本次动物实验。选择雄性SD级大鼠36只,体重180~220 g,由徐州医科大学实验动物中心提供,实验方案经徐州医科大学伦理委员会批准。实验前饲养3 d以适应实验室环境,实验动物房温度控制在20℃~22℃,湿度为40%~60%,大鼠可自由饮水和进食。大鼠随机分为:依达拉奉治疗组(治疗组)、阿维菌素中毒组(中毒组)和对照组,每组12只大鼠。三组实验大鼠一般资料等比较,差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作和取材 将治疗组和中毒组大鼠给予阿维菌素(由江苏省辉丰农化股份有限公司生产)10 mg/kg经口灌胃染毒,染毒后30 min;治疗组予依达拉奉(由南京先声东元制药有限公司生产)0.5 mg/kg腹腔注射,每12小时一次;同时间点,中毒组给予等容积的0.9%氯化钠注射液。对照组

不予染毒,仅给予与阿维菌素等容积的0.9%氯化钠注射液灌胃及腹腔注射。三组大鼠均观察72 h后,0.4%戊巴比妥钠深度麻醉后仰卧固定,剪开胸壁暴露心脏,在心尖处剪开心脏,经升主动脉插管快速灌入0.9%氯化钠注射液150~200 ml(速度为15 ml/min)冲洗脉管系统,然后用4℃的4%多聚甲醛溶液400~500 ml,先快后慢灌注,注毕取脑,后固定2 h,再移入30%蔗糖溶液中至脑组织沉淀。取大脑皮质制备脑组织石蜡包块,置于4℃冰箱保存。

1.2.2 脑神经组织Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax); 细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma/leukemia-2 gene, Bcl-2)检测 切片常规脱蜡后,抗原热修复,滴加3% H₂O₂去离子水,室温孵育10 min,磷酸盐缓冲液(phosphate balanced solution, PBS)冲洗3 min×3次,正常山羊血清工作液(SP-9002的试剂A)37℃孵育30 min,吸干勿洗,分别滴加小鼠抗大鼠Bax、Bcl-2单克隆抗体(抗体稀释比均为1:100),4℃孵育过夜,PBS冲洗3 min×3次,生物素标记山羊抗小鼠Ig G(SP-9002的试剂B)、37℃孵育10 min,PBS冲洗3 min×3次,辣根酶标记链霉卵白素(SP-9002的试剂C)、37℃下孵育10 min,PBS冲洗3 min×3次,二氨基联苯胺显色,苏木素复染,脱色,透明,中性树胶封固。显微镜观察结果,细胞浆细胞膜染色为棕黄色或棕褐色颗粒的为Bax或Bcl-2阳性细胞。PBS代替一抗作阴性对照。每张切片随即选取5个视野,运用Image-Pro plus 6.0图像分析软件计算积分光密度(integral optical density, IOD)。

1.2.3 脑神经细胞凋亡的检测 石蜡包埋组织切片,连续作3 μm厚切片。切片常规脱蜡后,0.1 mol/L枸橼酸盐缓冲液浸润,750W微波照射3 min,自然冷却,PBS冲洗5 min×3次,3% H₂O₂去离子水室温孵育10 min,PBS冲洗3 min×3次,Tunel混合液50 μl

(酶液:标记液=1:9)37℃孵育60 min, PBS冲洗5 min × 3次, 原位细胞凋亡检测试剂盒转化剂50 μl 37℃孵育30 min, PBS冲洗3 min × 3次, 二氨基联苯胺显色, 苏木素复染, 脱色, 透明, 中性树脂封固。显微镜观察结果, 凋亡的细胞核呈棕黄色或棕褐色, 细胞核形态呈碎点状, 不规则, 大小不一致。每张切片计数5个高倍镜视野中的凋亡阳性细胞核数/总细胞核数, 取其平均值为神经细胞凋亡指数(apoptotic index, AI)。

1.3 统计学方法 采用SPSS 16.0版本统计学软件包。计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料组间比较采用 χ^2 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组大鼠中毒症状 中毒组大鼠染毒后均出现明显兴奋症状, 表现为多动, 烦躁, 互相厮打, 至染毒后24 h, 兴奋症状逐渐减轻消失, 48 h表现出一定的抑制症状, 如闭目静卧, 四肢无力, 站立不稳等, 72 h表现大部分大鼠活动自如, 饮食正常, 少数大鼠喜静卧, 活动时步态不协调。治疗组的症状表现不明显。对照组未有中毒症状。

2.2 三组大鼠心肌组织病理学变化见封三图1

由封三图1可见, 苏木精-伊红病理学结果显示: 中毒组、治疗组均有病理损害; 治疗组主要表现为脑神经细胞肿胀, 间质水肿, 血管充血, 纤维紊乱, 炎症细胞浸润; 中毒组除上述表现外, 并见多发性, 局灶性神经组织破坏断裂、溶解坏死灶; 对照组未见脑神经细胞形态学改变。

2.3 三组大鼠脑神经细胞凋亡比较见封三图2

由封三图2可见, 采用Tunel法观察大鼠脑神经细胞凋亡情况, 细胞核染成棕褐色为凋亡细胞, 对照组可见少许凋亡细胞, 中毒组及治疗组凋亡细胞明显增多。进一步计算三组大鼠脑神经细胞的AI显示: 对照组仅有少许凋亡细胞, AI为(1.03 ± 0.41)%, 中毒组、治疗组AI分别为(9.38 ± 0.93)%和(7.29 ± 0.47)%。三组大鼠脑神经细胞AI的比较, 差异有统计学意义($F=184.03, P < 0.05$), 且中毒组和治疗组大鼠脑神经细胞AI均明显高于对照组, 差异均有统计学意义(t 分别=2.06、1.95, P 均 < 0.05), 治疗组大鼠脑神经细胞AI低于中毒组, 差异有统计学意义($t=2.34, P < 0.05$)。

2.4 大鼠脑组织Bax、Bcl-2蛋白表达及Bax/Bcl-2蛋白比值比较表1

表1 大鼠脑神经细胞Bax、Bcl-2蛋白表达及Bax/Bcl-2比值

组别	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2
治疗组	23.11 ± 2.67*#	26.73 ± 2.94*#	0.93 ± 0.16*#
中毒组	29.53 ± 3.37*	16.53 ± 3.53*	1.73 ± 0.17*
对照组	14.28 ± 2.36	32.93 ± 4.71	0.44 ± 0.12

注: *与对照组比较, $P < 0.05$; #与中毒组比较, $P < 0.05$ 。

由表1可见, 三组大鼠脑神经细胞Bax、Bcl-2蛋白表达及Bax/Bcl-2比值, 差异均有统计学意义(F 分别=96.41、69.16、107.92, P 均 < 0.05)。与对照组大鼠比较, 中毒组和治疗组的大鼠脑组织Bax蛋白表达增加, Bcl-2蛋白表达减少, Bax/Bcl-2比值升高, 差异均有统计学意义(t 分别=4.15、3.34、5.07、2.96、3.61、2.54, P 均 < 0.05); 与中毒组大鼠比较, 治疗组大鼠脑组织Bax蛋白表达减少, 脑组织Bcl-2蛋白表达增多, Bcl-2蛋白表达减少, Bax/Bcl-2比值降低, 差异均有统计学意义(t 分别=3.29、4.17、2.85, P 均 < 0.05)。

3 讨论

阿维菌素是一种新型生物农药, 具有广谱、高效、低残留和使用安全等特点, 而且对环境无污染。随着阿维菌素在农业上被广泛应用。临床上阿维菌素中毒患者的临床治疗存在很多困难。有研究表明, 阿维菌素中毒可诱导脑细胞凋亡而影响神经系统的正常功能^[2-4], 临床上可出现兴奋症状, 表现为多动, 烦躁等, 亦可出现昏迷, 呼吸抑制等^[1]。其神经毒性具体作用方式和作用特点, 以及作用机制的研究未进一步阐明。如能早认识阿维菌素中毒机制、早期采取保护脑神经的治疗, 可以预防或减轻其对脑神经的损害。依达拉奉注射液是一种自由基清除剂, 具有脑保护作用。依达拉奉可清除自由基, 抑制脂质过氧化, 从而减轻组织损害, 抑制细胞凋亡, 广泛用于治疗急性脑血管病, 如脑梗死等^[5]。本次研究显示, 阿维菌素染毒后0.5~1.5 h, 大鼠出现兴奋症状, 如烦躁多动, 厮打, 至染毒后24 h, 兴奋症状逐渐减轻, 48 h后出现一定的抑制症状, 如站立不稳, 闭目静卧等。治疗组大鼠早期中毒症状同中毒组, 但染毒后24 h兴奋症状基本消失, 48 h后基本可以自由活动, 无明显精神抑制症状。急性阿维菌素中毒后大鼠脑组织存在明显的病理改变, 为其功能障碍提供了病理、生理基础: 肌纤维紊乱、间质水肿及炎症、血管充血、局灶性溶解坏死等, 可导致神经功能障碍。然而, 依达拉奉治疗后, 大鼠脑组织病理损

害明显减轻,可能与其清除自由基,抑制脂质过氧化等有关。

细胞凋亡不仅是多细胞体的生命正常过程,也是机体受外源物质侵害时的一种病理性防御反应^[6]。Bax和Bcl-2是一对正负细胞凋亡调节基因,Bax/Bcl-2蛋白的比值决定了细胞接受刺激信号后的存亡,比值下降可以抑制线粒体通透性转换孔开放,减少细胞色素C等物质释放激活caspase级联而引发的凋亡,反之亦然^[7]。本次研究结果显示,急性阿维菌素中毒大鼠脑神经细胞存在明显的凋亡,脑组织中的Bax蛋白的表达增多,而Bcl-2蛋白表达则减少。推测通过上调Bax/Bcl-2蛋白比值,促脑神经细胞发生凋亡可能是阿维菌素中毒引起脑组织损害的重要机制之一。与中毒组相比,治疗组大鼠脑神经细胞凋亡明显减少(P 均 <0.05),表明抑制脑神经细胞凋亡是依达拉奉减轻脑组织损害的重要机制之一。

综上所述,依达拉奉通过调节Bax、Bcl-2蛋白的表达水平,明显地减少阿维菌素中毒后大鼠的脑神经细胞凋亡,减轻脑组织损害;依达拉奉能明显减轻阿维菌素的毒性作用,提早恢复大鼠阿维菌素中毒后的中毒症状。依达拉奉具有对急性阿维菌素中毒大鼠脑组织损害的保护作用为临床阿维菌素患者的治疗提供了用药的理论依据,其作用机制

等需要进一步研究。

参考文献

- 1 李婷,龙虎,温海林,等. 农药阿维菌素毒理学机制及中毒治疗[J]. 医学综述,2010,16(10):1554-1556.
- 2 任锐,李本长,郑晶,等. 阿维菌素对大鼠小脑神经代谢酶影响[J]. 中国公共卫生,2009,25(5):624-628.
- 3 周良生,李术,朱蓓蕾,等. 阿维菌素亚急性中毒致鸽子脑组织细胞凋亡的研究[J]. 东北农业大学学报,2009,40(2):75-78.
- 4 Abigail M,Pratibha D,Jayne M,et al. Characterization of multidrug transporter-mediated efflux of avermectins in human and mouse neuroblastoma cell lines[J]. Toxicol Lett, 2015,235(3): 189-198.
- 5 晏廷念, 谢多英. 依达拉奉注射液治疗急性脑梗死的临床疗效及对自由基含量的影响[J]. 实用心脑血管病杂志,2008,16(4):31-34
- 6 尹学来,刘冬,李克刚,等. 消癥汤对膀胱肿瘤T24细胞凋亡及相关蛋白Slit2、Bim、Bad的影响[J]. 中医杂志,2016,57(10): 870-873.
- 7 Aikawa R,Komuro I,Yamazaki T,et al. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through src and ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats[J]. J Clin Invest,1997,100(7): 1813-1821.

(收稿日期 2016-10-18)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第16页)

- 5 Garrido M,Tereshchenko Y,Zhevtsova Z,et al. Glutathione depletion and overproduction both initiate degeneration of nigral dopaminergic neurons[J]. Acta Neuropathol,2011,121(4):475-485.
- 6 Zhu TG,Wang XX,Luo WF,et al. Protective effects of urate against 6-OHDA-induced cell injury in PC12 cells through antioxidant action[J]. Neurosci Lett,2012,506(2): 175-179.
- 7 Sun CC,Luo FF,Wei L,et al. Association of serum uric acid levels with the progression of Parkinson's disease in Chinese patients[J]. Chin Med J,2012,125(4):583-587.
- 8 Smeyne M,Smeyne RJ. Glutathione metabolism and Parkinson's disease[J]. Free Radic Biol Med,2013,62(1):13-25.
- 9 Moccia M,Picillo M,Erro R,et al. Presence and progression of non-motor symptoms in relation to uric acid in de novo Parkinson's disease[J]. Eur J Neurol,2015,22(1):93-98.
- 10 Khan AA,Quinn TJ,Hewitt J,et al. Serum uric acid level and association with cognitive impairment and dementia: systematic review and meta-analysis[J]. Age(Dordr),2016,38(1):16.
- 11 Gonzalez-Aramburu I,Sanchez-Juan P,Sierra M,et al. Serum uric acid and risk of dementia in Parkinson's disease[J]. Parkinsonism Relat Disord,2014,20(6):637-639.
- 12 Torres LL,Quaglio NB,de Souza GT,et al. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis,2011,26(1): 59-68.

(收稿日期 2016-11-27)

(本文编辑 蔡华波)