

姜黄素对百草枯致肺纤维化的临床研究

任延波¹ 杨薇¹

【摘要】 目的:本实验通过监测姜黄素干预下百草枯中毒(PQP)患者血清基质金属蛋白酶9(MMP-9),血清基质金属蛋白酶抑制物(TIMP-1)及肺部影像学(肺部HRCT)的变化,研究PQP患者肺部纤维化的可能发生机制及演变过程,初步探讨姜黄素对PQP患者肺纤维化的干预作用。**方法:**收集2009-03-2011-03我科收治的PQP患者共61例(无原始肺疾病),分为非姜黄素组($n=30$)和姜黄素组($n=31$),非姜黄素组常规治疗。姜黄素组除给予常规治疗同时予姜黄素胶囊。测定患者血清中MMP-9及TIMP-1水平。同时行肺HRCT,分别比较两组内及两组间MMP-9、TIMP-1、HRCT评分的差异;统计两组患者的入院14d死亡率。**结果:**①两组组内不同时间段MMP-9、TIMP-1含量差异有统计学意义($P<0.05$),两组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。②两组间比较,姜黄素组患者各时间点HRCT评分均低于同时间非姜黄素组患者($P<0.05$),具有统计学意义。③姜黄素组患者于各时间点HRCT评分均低于同时间非姜黄素组患者($P<0.05$),纤维化程度较非姜黄素组有所减轻,差异均具有统计学意义。④两组患者的死亡率无明显差异,但姜黄素组患者生存时间明显长于非姜黄素组。**结论:**①百草枯中毒患者血清中MMP-9、TIMP-1水平升高,这表明MMP-9及TIMP-1可能参与百草枯中毒肺纤维化的启动及进展过程,与肺HRCT评分具有相关性,联合CT等其他检查手段对肺纤维化的程度及预后做出评估。采用姜黄素进行干预治疗可降低循环中MMP-9及TIMP-1水平,减轻中毒患者肺纤维化程度,延缓病情发展,延长生存时间,但不能降低患者死亡率,对预后无明显改善。

【关键词】 百草枯中毒;基质金属蛋白酶-9;姜黄素;肺纤维化

【中图分类号】 R595.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1009-5918(2012)02-0097-04

Clinical research of curcumin against paraquat induced lung fibrosis

REN Yanbo YANG Wei

(Department of ICU, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China)

Corresponding author: REN Yanbo, E-mail: r1994j@126.com

Abstract Objective: In this study, by monitoring the content of serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), serum matrix metalloproteinase inhibitor (TIMP-1) and lung imaging (lung HRCT) changes of curcumin intervention paraquat poisoning (PQP) patients, analyse analyzed the possible pulmonary fibrosis mechanism and evolutionary process in patients with PQP. Preliminary research into the intervention effects of curcumin on the pulmonary fibrosis in PQP patients. **Method:** Collected from March 2009 to March 2011 PQP patients admitted to our department a total of 61 patients (no original pulmonary disease), divided into non-curcumin group ($n=30$) and curcumin group ($n=31$), non-curcumin group are treated with conventional treatments. In addition to the conventional treatments above, curcumin group are for curcumin capsules to monitor the content of serum MMP-9 and TIMP-1 levels of the two-group patients with ELASA. Meanwhile, taking the lung HRCT of the two-group patients, Analysis of the 14 th day living conditions of these two groups, curve and depict the survival curve. **Result:** ① Compared 14 days MMP-9 levels within each group of non-curcumin group and the curcumin group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Between the two groups were statistically significant ($P<0.05$). ② Compared 14 days TIMP-1 levels within each group of non-curcumin group and the curcumin group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). ③ Compared 14 days HRCT scores within each group of non-curcumin group and the curcumin group. In curcumin at different time points the patients HRCT scores were lower than at the same time non-curcumin group patients ($P<0.05$). Fibrosis was slightly reduced compared with non-curcumin group, the differences were statistically significant. ④ Comparing the 14 th day mortality and living conditions between curcumin group of patients and non-curcumin, two groups no significant difference in mortality, but survival time of patients curcumin group significantly longer than non-curcumin group. **Conclusion:** Serum MMP-9 and serum TIMP-1 levels of PQP patients, which indicates that the MMP-9 and TIMP-1 may be involved in paraquat induced lung fibrosis and progress of the startup process. Serum MMP-9 and TIMP-1 levels and pulmonary HRCT score of patients with paraquat poisoning correlated, MMP-9 and TIMP-1 can be used as biochemical markers in clinical combining with CT examination and other means of pulmonary fibrosis and to assess the degree and the prognosis of pulmonary fibrosis early intervention treatment with curcumin on paraquat poisoning patients can re-

¹大连医科大学附属第一医院急诊ICU(辽宁大连,116011)
通信作者:任延波, E-mail: r1994j@126.com

duce the cycle of MMP-9 and TIMP-1 levels, reduce pulmonary fibrosis in patients with poisoning, delay the progression of the disease, prolong survival time, but can not reduce mortality, can not improve prognosis.

Key words Paraquat poisoning; MMP-9; curcumin; pulmonary fibrosis

百草枯为有机杂环类接触性除草剂,近年急性中毒患者成增多趋势。且死亡率高^[1]。大剂量中毒患者迅速造成心、肝、肾、肺等各脏器功能衰竭,是百草枯中毒患者早期死亡的主要原因^[2-3];小剂量中毒如能度过急性期,晚期多发展为肺纤维化,导致呼吸衰竭而死亡^[4]。

姜黄素(curcumin)是从中药姜黄中提取的一种酚性色素,近期的研究发现它抗纤维化作用明显^[5-6]。本实验通过监测姜黄素干预下百草枯中毒(PQP)患者血清 MMP-9, TIMP-1 及肺部影像学(肺部 HRCT)的变化,研究 PQP 患者肺部纤维化的演变过程,初步探讨姜黄素对 PQP 患者肺纤维化的干预作用。

1 对象与方法

1.1 对象

收集 2009-03-2011-03 我科收治的 PQP 患者共 61 例,所有患者均为口服百草枯中毒,服毒量为 5~100 ml,男性 38 例,女性 23 例,年龄在 18~40 岁之间。所有患者既往身体健康,中毒至入院时间 <24 h。

1.2 方法

1.2.1 分组方法 制定随机量表,患者入院时按号分组,分为姜黄素组 31 例和非姜黄素组 30 例。两组研究对象的一般资料(性别、年龄)以及服毒剂量、发病至洗胃时间、发病至开始用药时间等经统计学分析均无显著性差异(均 $P > 0.05$),具有可比性。见表 1。

1.2.2 治疗方法 常规治疗:所有病例中,中毒至入院均 <24 h,给予反复清水洗胃,25% 的硫酸镁 40~60 ml 口服导泻;行血液灌流治疗;给予激素治疗;维生素 C、E 抗氧化;以及护肝、营养心肌,维持水电解质、酸碱平衡等支持治疗;对于出现严重低氧血症,动脉血氧分压(PaO₂) <40 mmHg 的患者采用低流量吸氧,必要时行机械通气进行治疗。

姜黄素治疗方案:非姜黄素组给予常规治疗;姜黄素组除给予上述常规治疗外,同时给予姜黄素胶囊(陕西西大华特科技实业有限公司生产),一次 1000 mg,1 d 3 次,口服给药。

1.2.3 标本采集及观察指标 收集 PQP 患者入院后 1、3、5、7、14 d 清晨空腹状态下外周静脉血 5 ml,注入生化管混匀,于 4℃,3 000 r/min,离心 10 min,采用 TDL-5Z 型离心机分离血清装入 Eppendorf 管置于 -70℃ 冰箱中保存备用。用酶联免疫吸附试验法(ELISA 法)检测血清中 MMP-9 及 TIMP-1 含量。ELISA 试剂盒均购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。同时对两组患者 1、3、5、7、14 d 行肺 HRCT 检查,记录 CT 各种表现,根据 Goddard 评分标准对 CT 征象进行评分。

1.2.4 实验方法

MMP-9 及 TIMP-1 测量方法:取出酶标板,依照次序对应分别加入 100 μl 的标准品与空白微孔中;分别标记样品编号,加入 100 μl 样品与空白微孔中;在标准品和样品中加入 50 μl 的酶标记溶液;(36±2)℃ 孵育反应 60 min;洗板机清洗 5 次,每次静置 10~20 s;每孔加入底物 A、B 液各 15 min;(36±2)℃ 下避光孵育反应 15 min;每孔加入 50 μl 终止液,终止反应。读板:终止后 10 min 内,用检测波长 450 nm 读取各孔的 OD 值。

肺 HRCT 扫描方法:患者入院 1、3、5、7、14 d,使用我院 GE Light Speed 16 层螺旋 CT 扫描患者肺部,扫描方法:患者仰卧位,双手高举过头,尽量暴露胸部使肩胛骨外展,由肺尖至肋膈窝连续吸气后屏气扫描。扫描条件:120 kV、50 mA、层厚 7.5 mm、层间距 7.5 mm;扫描范围:从肺尖至双侧肋膈角水平,记录各时间 CT 各种表现,用以行肺 HRCT 评分比较。

HRCT 图像各征象分类描述根据 Fleischner^[7]学会推荐的肺部 HRCT 术语定义,对征象累及范围采用国际上惯用的量化方法进行评分^[8-9],根据评分结果,将患者分为正常(0 分)、轻度(1~5 分)、中度(6~10 分)和重度(>10 分)4 组,后 3 组合计为纤维化组。

1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,计量资料应用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内及组间差异应用方差分析及 t 检验,计数资料以例数和百分数表示,组内及组间

表 1 两组研究对象基本临床资料比较

组别	例数	性别		年龄/岁	中毒剂量/ml	中毒至洗胃时间/h	中毒至用药时间/h
		男	女				
非姜黄素组	30	18	12	29.5±12.6	41.7±12.6	3.83±0.77	4.61±2.34
姜黄素组	31	20	11	32.3±10.2	39.7±13.8	3.23±0.67	4.45±1.08

$\bar{x} \pm s$

率的差异性比较应用 χ^2 检验,以百草枯中毒后死亡作为截尾数据。各项检验结果均以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间点非姜黄素组与姜黄素组存活例数

非姜黄素组的 30 例患者于中毒第 1、3、5、7、14 d 存活例数分别为 30 例、27 例、16 例、9 例、5 例;姜黄素组的 31 例患者于中毒第 1、3、5、7、14 d 存活例数分别为 31 例、30 例、24 例、14 例、7 例。

2.2 非姜黄素治疗组与姜黄素组患者血清 MMP-9、TIMP-1 及肺 HRCT 评分比较

组间比较:比较姜黄素组与非姜黄素组从入院 1、3、5、7、14 d 同一时间点的 MMP-9 的含量,姜黄素组患者于入院第 1、3、5、7 d 血清 MMP-9 水平均显著低于同期非姜黄组患者 ($P < 0.05$),差异均具有统计学意义。第 14 d 两组间 MMP-9 水平无明显差异 ($P > 0.05$),无统计学意义。两组 MMP-9 从入院第 1 d 即开始升高,非姜黄素组 3 d 达高峰,姜黄素组 5 d 达高峰,之后均逐渐下降。

组内比较,分别比较姜黄素组及非姜黄素组 1、3、5、7、14 d TIMP-1 含量,从入院 1、3、5、7、14 d 呈逐渐增高趋势。组间比较,比较姜黄素组与非姜黄素组从入院 1、3、5、7、14 d 同一时间点的 TIMP-1 的含量,姜黄素组患者于入院第 1、3、5、7、14 d 血清 TIMP-1 水平均显著低于同期非姜黄组治疗组患者 ($P < 0.05$),差异均具有统计学意义。

组内比较,分别比较姜黄素组及非姜黄素组 1、3、5、7、14 d 肺 HRCT 评分,除姜黄素组 3 d 和 5 d 评分比较 $P > 0.05$,无统计学意义,影像学无明显变化,其余比较均 $P < 0.05$ 具有统计学差异。影像学从入院 1、3、5、7、14 d 呈逐渐出现磨玻璃影、网格影和蜂窝影等纤维化征象,并呈加重趋势。组间比较,比较姜黄素组与非姜黄素组从入院 1、3、5、7、14

d 同一时间点肺 HRCT 评分,姜黄素组患者于各时间点 HRCT 评分均低于同时间非姜黄组患者 ($P < 0.05$),纤维化程度较非姜黄素组有所减轻,差异均具有统计学意义。结果见表 2。

2.3 姜黄素组与非姜黄素组患者死亡率比较

入院后第 14 d 非姜黄素治疗组 30 例患者死亡 25 例,病死率 83.33%,姜黄素组 31 例患者中死亡 24 例,病死率 77.42%,两组组患者入院 14 d 病死率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

百草枯是双吡啶盐类除草剂,成人口服致死量仅为 1~3 g^[10-11],无特效解毒剂,百草枯毒素吸入血后迅速分布于各个脏器,对各个脏器均造成损伤,肺部损害尤其突出。姜黄素具有抗氧化、抗纤维化、抗肿瘤、抗炎、清除自由基、抗微生物等多方面药理作用。是以保护正常细胞免受各种不良因素的损伤为基础来发挥作用的^[12]。

关于百草枯致肺纤维化的机制尚未完全阐明,提出的理论主要包括脂质过氧化损伤、DNA 损伤、细胞因子网络、酶失衡等。早期的上皮细胞基底膜的断裂,晚期细胞外基质沉积是肺纤维化发生过程中的关键事件^[13]。肺内的细胞外基质成分 (ECM) 主要是由 III、IV 胶原、糖蛋白和蛋白聚糖组成。在生理情况下,肺组织内 ECM 处于不断合成与降解的动态平衡状态,病理情况下,ECM 合成增加和 (或) 降解减少而致转换失衡,将引起 ECM 过度积聚,导致肺纤维化。降解 ECM 的酶系中以 MMPs/TIMPs 最为重要。其中主要的是 MMP-9,又称明胶酶 B,它以酶原形式分泌,被激活后形成 IV 型胶原酶,能够降解许多细胞外基质 (ECM) 成分,进而破坏细胞外基质及基底膜。目前实验研究显示,MMP-9 早期水平增加,参与了上皮细胞基底膜的降解,此时虽然 TIMP-1 也有所升高,但不足

表 2 非姜黄素组与姜黄素组患者血清 MMP-9、TIMP-1 及肺 HRCT 评分比较

组别	例数	MMP9/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	TIMP-1/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	HRCT 评分	$\bar{x} \pm s$
非姜黄素组					
1 d	30	272.03 ± 20.19	309.03 ± 15.48	2.07 ± 1.34	
3 d	27	382.37 ± 16.28	404.26 ± 14.63	6.70 ± 2.35	
5 d	16	347.50 ± 14.25	527.38 ± 24.24	8.94 ± 4.10	
7 d	9	304.56 ± 7.25	624.44 ± 15.65	11.38 ± 4.75	
14 d	5	117.40 ± 5.32	1125.80 ± 123.61	16.20 ± 6.65	
姜黄素组					
1 d	31	219.26 ± 25.11 ¹⁾	153.48 ± 18.84 ¹⁾	0.84 ± 1.04 ¹⁾	
3 d	30	298.87 ± 17.48 ¹⁾	223.03 ± 13.44 ¹⁾	2.83 ± 2.26 ¹⁾	
5 d	24	327.38 ± 16.60 ¹⁾	328.68 ± 16.98 ¹⁾	4.29 ± 3.80 ¹⁾	
7 d	14	121.86 ± 6.15 ¹⁾	446.21 ± 13.45 ¹⁾	9.14 ± 1.46 ¹⁾	
14 d	7	118.71 ± 1.50	734.00 ± 7.98 ¹⁾	10.43 ± 1.71 ¹⁾	

与非姜黄素组间同时间段比较,¹⁾ $P < 0.05$

以拮抗 MMP-9 的升高,晚期随着 IL-1、TNF- α 、TGF- α/β 、 γ -IFN 等上调因子的分泌减少,MMP-9 来源的改变及 TIMP-1 抑制因子分泌的增加等多因素影响,MMP-9 活性逐渐减低,TIMP-1 上升,引起 MMP-9/TIMP-1 比例失衡,减少 ECM 的降解,逐渐发展为 ECM 的积聚和沉积,进而发展为肺纤维化。

目前体外研究表明,姜黄素可抑制肺泡炎性细胞的前炎症细胞因子 IFN- γ 、IL- β 1 和 IL-8 的产生^[14]。李银生等^[15]研究了姜黄素对博莱霉素诱导肺纤维化大鼠胶原沉积及 TGF- β 1 表达的影响,结果显示姜黄素可抑制肺纤维化大鼠肺组织的胶原沉积,在延缓肺纤维化形成中起重要作用,其作用机制可能是通过抑制 TGF- β 1 的表达来实现。因而姜黄素可能通过抑制 IFN- γ 、TGF- β 1、IL- β 1 和 IL-8 等炎症介质的表达,干扰细胞因子间的网络联系,从而影响 MMP-9、TIMP-1 水平,减少 ECM 沉积,减轻肺纤维化程度。本研究显示姜黄素可减轻中毒患者肺纤维化程度,延长生存时间,但不能降低患者死亡率,对预后无明显改善。

本实验中采用目前国内外临床广泛应用的 HRCT 监测肺部体征。两组患者的 HRCT 评分分别行各时间点两两比较,姜黄素组患者肺纤维化程度显著轻于非姜黄治疗组差异,具有统计学意义。以上结果均说明姜黄素有改善 PQP 肺部损伤,延缓肺纤维化程度的作用。说明姜黄素可以降低患者 MMP-9 及 TIMP-1 水平,由此减轻纤维化程度。支持上述研究的结果。

总之,目前百草枯中毒死亡率高,姜黄素因其毒性低,安全性高,药理作用广泛,具有良好的抗氧化,抗纤维化的作用。受到了国内外学者的关注。本实验也与许多研究一致,得出了姜黄素可以降低 PQP 患者循环中 MMP-9、TIMP-1 水平,干扰 ECM 沉积,降低肺纤维化程度的结果。但姜黄素对肺纤维化启动及发展过程中的细胞因子网络的具体干预机制目前还未阐述清楚,还需进一步深入的研究。

参考文献

[1] HWANG K Y, LEE E Y, HONG S Y. Paraquat intoxication in Korea[J]. Arch Environ Health, 2002, 57 (2): 162-166.
 [2] YAMAMOTO I, SAITO T, HARUNARI N, et al. Correlating the severity of paraquat poisoning with

specific hemodynamic and oxygen metabolism variables[J]. Crit Care Med, 2000, 28: 1877-1883.
 [3] KOO J R, KIM J C, YOON J W, et al. Failure of continuous venovenous hemofiltration to prevent death in paraquat poisoning[J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39: 55-59.
 [4] HONG SAEYONG, YANG JONGOH, LEE EUNYOUNG, et al. Effects of N-acetyl-L-cysteine and glutathione on antioxidant status of human serum and 3 T3 fibro-blasts[J]. J Korea Med Sci, 2003, 18: 649-654.
 [5] PUNITHAVATHI D, VENKATESAN N, BABU M. Curcumin inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Br J Pharmacol, 2000, 131: 169-172.
 [6] PUNITHAVATHI D, VENKATESAN N, BABU M. Protective effects of curcumin against amiodarone-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Br J Pharmacol, 2003, 139: 1342-1350.
 [7] KOJIMA S, MIYAZAKI Y, HONDA T, et al. Protective effects of dextran sulfate and polyvinyl sulfate against acute toxicity of paraquat in mice[J]. Toxicology, 1991, 69: 93-99.
 [8] 陈惜遂, 刘元生, 郭光华, 等. 血浆置换术成功救治百草枯中毒的护理技术分析[J]. 山西护理杂志, 1999, 13: 172-173.
 [9] KOO J R, KIM J C, YOON J W, et al. Failure of continuous venovenous hemofiltration to prevent death in paraquat poisoning[J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39: 55-59.
 [10] 陈世铭, 高连永, 主编. 急性中毒的诊断与救治[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996: 179-179.
 [11] 崔岩, 张新超, 许峰, 等. 群体口服农药急性中毒的救治. 临床急诊杂志[J], 2011(12): 27-29.
 [12] 顾军, 韩香, 顾欣, 等. 姜黄素的基础药理作用[J]. 天津药学, 2000, 12(2): 5-6.
 [13] LASKY J A, ORTIZ L A. Antifibrotic therapy for the treatment of pulmonary fibrosis[J]. Am J Med Sci, 2001, 322: 213-221.
 [14] LITERAT A, SU F, NORWIEKI M, et al. Regulation of pro-inflammatory cyto-kine expression by curcumin in hyaline membrane disease[J]. Life Sci, 2001, 70: 253-267.
 [15] 李银生, 牛建昭, 王继峰, 等. 姜黄素对肺纤维化大鼠肺组织胶原沉积及转化生长因子 β 1 表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(1): 55-57.

(收稿日期: 2011-11-06)