

不同复方软膏制剂对家兔芥子气皮肤染毒的预防作用

Preventive effect of ointment preparations on sulfur mustard-induced skin damage in rabbits

吴建华¹, 吕挺², 顾军¹, 朱明学²

(1. 第二军医大学长海医院皮肤科, 上海 200433; 2. 第二军医大学防护医学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的: 筛选预防芥子气皮肤中毒的有效药物。方法: 以家兔为动物模型, 以空白对照组和软膏基质组为对照, 从创面形态学和组织病理学变化来观察分别含有半胱氨酸、甲壳胺、烟酸、EDTA 这 4 种药物成分的软膏制剂对芥子气皮肤染毒的预防作用。结果: 从创面形态学看, 甲壳胺组、半胱氨酸组比对照组损伤面积小、恢复时间快、毛发再生早; 从病理组织学变化看, 这两组创面的表皮基底层基本完好, 真皮充血、水肿、炎细胞渗出程度相对较轻。结论: 甲壳胺和半胱氨酸对芥子气皮肤中毒有一定的保护作用, 而烟酸和 EDTA 的效果不明显。

[关键词] 芥子气; 皮肤疾病; 半胱氨酸; 甲壳胺; 烟酸; 依地酸

[中图分类号] R 827.174 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-346-03

虽然禁止化学武器国际公约已于 1994 年 4 月正式生效, 但化学武器的潜在威胁仍然存在。由于芥子气的理化性质比较稳定、穿透性强、中毒途径多、作用机制不明, 因此防治很困难。皮肤是芥子气中毒的主要途径, 又是损伤的主要靶器官, 因而皮肤的防护一直是芥子气研究的重点。随着现代医药技术的发展, 皮肤芥子气中毒的防护出现了许多新方法。家兔是芥子气皮肤中毒的常用实验模型^[1,2], 本研究即观察不同药物成分对家兔芥子气皮肤染毒的预防作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物 家兔 9 只, 购自第二军医大学实验动物中心, 体质量 1.9~2.6 kg, 平均 2.4 kg, 4 雌 5 雄。

1.2 芥子气的准备 芥子气由军事医学科学院提供, 纯度 99.6%, 比重 1.27 g/ml, 用无水乙醇作为溶剂配制浓度为 0.1 mg/ μ l 的母液。

1.3 药物配制 2% 甲壳胺软膏 (0.6 g 甲壳胺 + 30 g 软膏基质), 3% EDTA 软膏 (0.9 g EDTA + 30 g 软膏基质), 3% 半胱氨酸软膏 (0.9 g 半胱氨酸 + 30 g 软膏基质), 3% 烟酸软膏 (0.9 g 烟酸 + 30 g 软膏基质), 软膏基质主要成分为羊毛脂、凡士林、氮酮等。

1.4 用药方法 以背部皮肤作为实验区域, 先剪毛, 后剃毛 (不损伤表皮), 然后用记号笔划出边长为 1 cm 的正方形实验区, 左右两侧各取 3 个实验区, 每个实验区各涂一种药物: 2% 甲壳胺软膏、3% EDTA 软膏、3% 烟酸软膏、3% 半胱氨酸软膏、软膏基质和空白对照。先在实验区均匀涂布药物, 3 h 后染毒, 根据预实验结果, 每个实验区芥子气剂量为 0.5 mg (0.1 mg/ μ l \times 5 μ l)。

1.5 观察指标 在染毒后 6、24 h, 3、5、7、14 d 后观察家兔的活动及饮食状况, 染毒创面变化根据红斑、糜烂、渗出及毛发再生情况分别按“无、轻、中、重”以“0、1、2、3”打分。9 只家兔每个创面分别打分, 然后取均数, 进行统计学比较。取活组织做病理切片, 分别采用 H-E 染色法和弹力、胶原纤维双重组合染色法^[3]。在取活组织前先用 20% 尿素酯 (5 mg/

kg) 沿耳缘静脉全身麻醉。

1.6 统计学处理 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用方差分析和 *F* 检验。

2 结果

2.1 一般状况 每只家兔的染毒剂量为 3 mg, 没有出现全身吸收中毒症状, 活动、反应、饮食、进水情况良好。

2.2 创面形态学变化 染毒后 6 h, 各组染毒创面表现为红斑, 差异不明显。染毒后 24 h 内, 所有实验区都出现红斑、水肿, 范围不超过标记线。染毒后 3 d, 空白对照组、软膏基质组、烟酸组、EDTA 组 (前 4 组) 创面均出现糜烂和少量渗出, 并有块状出血, 尤以空白对照组最为严重; 甲壳胺组和半胱氨酸组 (后 2 组) 创面有小的糜烂, 但干燥无渗液。染毒后 5 d, 前 4 组糜烂有加重, 兔毛再生稀少; 后 2 组皮损较干燥, 兔毛再生较密。染毒后 7 d, 所有皮损均无感染, 前 4 组的创面潮湿; 而后 2 组干燥结痂, 损害范围小于前 4 组。染毒后 2 周, 前 4 组毛发稀少, 痂皮较大; 后 2 组毛发浓密, 只留有小痂, 并有脱落迹象。根据损害评分结果和统计学处理, 染毒后 24 h 红斑水肿期及染毒后 14 d 创面愈合期, 各组损害比较差别无统计学意义; 而在染毒后 3 d、5 d、7 d, 软膏基质组、烟酸组和 EDTA 组与空白对照组比较损害差别无统计学意义, 甲壳胺组和半胱氨酸组与空白对照组及软膏基质组比较损害差别均有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.3 组织病理学变化 染毒创面的病理切片除 H-E 染色之外, 还加做了胶原纤维、弹力纤维双重组合特殊染色。切片显示组织病理变化与创面损伤评分结果相平行, 即在染毒后 24 h 各组皮肤都表现为表皮浅层剥脱, 真皮充血水肿, 伴有炎细胞浸润; 在染毒后 3 d、5 d、7 d, 空白对照组、软膏基质

[基金项目] 全军医药卫生科研基金指令性课题 (96L037, 01L054). Supported by Mandatory Medical Science Research Foundation of PLA (96L037, 01L054)

[作者简介] 吴建华, 博士, 副教授. E-mail: wujh@sh163.net

组、烟酸组和 EDTA 组的病理变化接近, 表现为表皮全层坏死, 胶原肿胀, 弹力纤维断裂, 分布紊乱, 细胞凝固坏死等, 而甲壳胺组和半胱氨酸组表现为创面表浅伴部分基层细胞开始增生, 表皮下轻度水肿, 深部胶原肿胀变性较轻, 可见残存

毛囊, 炎细胞浸润轻; 在染毒后 14 d, 各组创面基本愈合, 病理表现为毛囊增生扩张, 基底膜增厚, 细胞形态接近正常, 胶原纤维增多明显, 弹力纤维区域性增多。

表 1 不同时间染毒创面损害的评分比较

(n=9, $\bar{x} \pm s$)

组别	染毒后的时间				
	24 h	3 d	5 d	7 d	14 d
空白对照组	2.89±0.13*	10.11±0.25	11.00±0.12	8.00±0.34	2.22±0.16
软膏基质组	2.78±0.71	10.22±0.36	11.11±0.64	7.89±0.89	2.33±0.23
烟酸组	2.78±0.52	9.89±0.52	10.11±0.71	7.56±0.16	2.11±0.25
EDTA 组	2.67±0.52	9.89±0.43	10.11±0.35	7.67±0.74	2.00±0.34
甲壳胺组	2.67±0.63	8.89±0.24*	5.56±0.16*	4.00±0.24*	1.11±0.09
半胱氨酸组	2.67±0.52	8.78±0.24*	5.33±0.35*	4.22±0.63*	1.22±0.10

* P<0.05 与空白对照组和软膏基质组比较

3 讨论

皮肤是芥子气中毒的主要途径和损伤的重要部位, 芥子气对皮肤的损伤作用主要是由于它对 DNA 烷化作用的结果^[4,5]。最近十多年有关芥子气皮肤起疱作用的生化假说一直是研究的热点, 即 DNA 烷化损伤后, 诱导修复和细胞凋亡, 从而激活多聚(ADP-核糖)聚合酶(染色体酶), 该酶利用 NAD⁺ 为基质合成多聚 ADP-核糖, 因而大量消耗细胞 NAD⁺, 细胞 NAD⁺ 含量降低抑制了糖酵解, 并使磷酸己糖旁路活化, 导致蛋白酶释放, 最终发生皮肤炎症、起疱等病理改变^[6]。

也有研究认为芥子气的毒性 with 亲电子应激(ES)或氧化应激(OS)以及巯基水平包括谷胱甘肽(GT)的耗竭有关。GT 是机体对抗 ES 和 OS 的主要防御机制之一^[5]。在正常情况下, 机体可通过 GT 去除反应性氧自由基(ROS), 当 GT 耗竭后, ROS 就转变为有毒氧化物从而诱导细胞受损。它和细胞膜磷脂反应形成脂质过氧化物可导致细胞膜功能、膜流动性、膜完整性丧失, 最终导致细胞死亡。另外在细胞里, 许多蛋白质的巯基都影响细胞功能, 其中最关键的是维持细胞 Ca²⁺ 自稳态的酶。当巯基水平如 GT 耗竭后, 就使这些酶受损, 导致维持细胞骨架和结构完整性的微丝蛋白的崩解, 并且通过激活核酸内切酶、蛋白酶或磷脂酶诱导细胞凋亡或坏死^[5]。

根据这些中毒机制假说, 本实验选用了烟酸、半胱氨酸、EDTA 作为实验药物来观察它们对芥子气的防护作用, 它们分别是 NAD⁺ 水平稳定剂、巯基水平稳定剂、Ca²⁺ 水平稳定剂。培养细胞的离体实验研究已证明这些药物对于芥子气中毒损伤具有一定的防护作用^[7]。另外, 我们还选用了甲壳胺作为筛选药物之一。业已证实医用甲壳胺具有广谱的抑菌作用及促进上皮细胞生长作用。

从创面形态学看, 甲壳胺组和半胱氨酸组比对照组损伤面积小、恢复时间快、毛发再生早。从病理组织学变化看, 甲壳胺组和半胱氨酸组表皮基层基本完好, 真皮充血、水肿、炎细胞渗出程度相对较轻, 胶原纤维和弹力纤维双重组合特殊染色也提示结缔组织损伤相对较轻, 而恢复较快, 说明这两种药物对芥子气的皮肤损伤有一定的防护作用。而烟酸组和 EDTA

组与对照组相比无明显差别, 染毒后 3~5 d 表皮全层及真皮浅层组织, 包括部分毛囊上皮呈现明显坏死, 细胞核碎裂严重, 胶原组织凝固坏死, 提示烟酸和 EDTA 保护作用不明显。2 周后机体自我修复, 创面被覆新生表皮, 细胞形态趋于正常。

同一时期的组织活检取自同一家兔, 而同一药物的不同观察阶段组织活检取自不同家兔, 因此同一药物的不同时期的病理结构稍有差异。甲壳胺可能通过其生物屏障作用, 对芥子气起到一定的阻隔, 从而减轻芥子气对皮肤的损害; 而且它的广谱抑菌作用和促上皮细胞增殖作用也可能对创面愈合有一定的促进作用。另外, 药物的经皮吸收能力也能影响药效发挥, 半胱氨酸可能比烟酸和 EDTA 更易穿透皮肤, 从而给机体提供巯基, 抵抗芥子气引起的 ES 和 OS 而达到一定的防护作用。如果这些药物经皮吸收能力相同, 那么也可能说明维持皮肤细胞的 NAD⁺ 水平和 Ca²⁺ 水平并不能有效地防护芥子气损伤。由于实验条件的限制, 本研究只观察了实验动物创面的早期愈合过程, 并只是一个初步观察结果, 因此这还需要大量的后期实验来证实。

[参考文献]

- [1] Chauhan RS, Murthy LV, Arora U, et al. Structural changes induced by sulfur mustard in rabbit skin[J]. J Appl Toxicol, 1996, 16:491-495.
- [2] Tanaka F, Dannenberg AM Jr, Higuchi K, et al. Chemotactic factors released in culture by intact developing and healing skin lesions produced in rabbits by the irritant sulfur mustard[J]. Inflammation, 1997, 21:251-267.
- [3] 龚志锦, 阮静, 陶文照. 显示弹力、胶原纤维的双重组合染色法[J]. 动物学杂志, 1993, 28:29-30.
- [4] Smith KJ, Hurst CG, Moeller RB, et al. Sulfur mustard: Its continuing threat as a chemical warfare agent, the cutaneous lesions induced, progress in understanding the mechanism of action, long term health effects, and new development for protection and therapy[J]. J Am Acad Dermatol, 1995, 32:765-776.
- [5] Smith KJ. The prevention and treatment of cutaneous injury secondary to chemical warfare agents[J]. Dermatol Clin, 1999,

- 17:41-60.
- [6] Balai-Mood M, Hefazi M. The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulphur mustard poisoning[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2005, 19:297-315.
- [7] Cowan FM, Broomfield CA, Smith WJ. Inhibition of sulfur mustard-increased protease activity by niacinamide, N-acetyl-L-cysteine or dexamethasone[J]. *Cell Biol Toxicol*, 1992, 8:129-138.
- [收稿日期] 2005-08-26 [修回日期] 2006-01-11
- [本文编辑] 孙岩