

## · 研究快报 ·

## SD大鼠二甘醇中毒的肾功能变化规律特点分析

顾琳<sup>1</sup>, 黄明星<sup>1</sup>, 彭晓谋<sup>1</sup>, 高志良<sup>1</sup>, 陈规划<sup>2</sup>

(中山大学附属第三医院 1. 感染病科, 2. 肝移植科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】探讨二甘醇 (DEG) 中毒时肾功能的变化规律和腹腔途径中毒的特点。【方法】选用健康雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠, 腹腔注射 8 mL/kg 的 DEG, 于注射前和注射后第 2 天、5 天、7 天以及 14 天尾静脉采血检测血肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN) 和 CO<sub>2</sub> 结合率 (CO<sub>2</sub>CP), 收集死亡大鼠及第 7 天和 14 天处死大鼠的肾组织进行病理检查。【结果】DEG 注射后, 个别大鼠在 8 h 内出现死亡, 死亡高峰在第 5 天 (死亡率 30%), 而第 7 天后无继续死亡发生。死亡率及血生化指标的异常率分析显示, 肾损害的高峰也在第 5 天, 近 100% 大鼠出现肾损害。血 Cr、BUN 和 CO<sub>2</sub>CP 在注射后第 2 天出现明显改变, 以后逐渐恢复。血清 Cr 和 BUN 相比, 前者更敏感地反映 DEG 肾损害。肾脏病理显示死亡大鼠有急性肾小管坏死的表现。【结论】腹腔注射 DEG 途径可引起大鼠的明显的肾损害甚至死亡。早期出现的严重酸中毒和继而出现的血清 Cr 显著升高是早期发现 DEG 中毒的重要线索。Cr 和 CO<sub>2</sub>CP 随时间的变化规律及病理特点对诊治也有一定的指导意义。

关键词: 二甘醇; 肾功能; SD 大鼠

中图分类号: R595

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)05-0594-04

Regularity of Changes of Kidney Function in SD Rats after Exposure to Diethylene Glycol // GU Lin<sup>1</sup>, HUANG Ming-xing<sup>1</sup>, PENG Xiao-mou<sup>1</sup>, GAO Zhi-liang<sup>1</sup>, CHEN Gui-hua<sup>2</sup> ( 1. Department of Infection Disease; 2. Department of Liver Transplant, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China )

**Abstract:** 【Objective】To investigate the changes of the kidney function and the features of the intoxication after diethylene glycol (DEG). 【Methods】Healthy SD male rats were given DEG with the dose of 8 mL/kg body weight (intraperitoneal injection I. P.). The level of the serum Cr (Creatinine), BUN (Blood Urea Nitrogen) and CO<sub>2</sub>CP (CO<sub>2</sub> Combining Power CO<sub>2</sub>CP) were tested before and after the injection the 2<sup>nd</sup>, 5<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, and 14<sup>th</sup> day. The nephridial tissue of all the rats was taken for pathological examinations. 【Results】Some rats died at the 8<sup>h</sup> after DEG, the peak time of the death rate appeared at the 5<sup>th</sup> day (mortality was 30%), there was no new death from the 7<sup>th</sup> day. The death rate and the level of the serum Cr, BUN, CO<sub>2</sub>CP showed that the peak time of the DEG poisoning appeared also at 5<sup>th</sup> day, nearly all the rats showed the damage of kidney functions. The level of serum Cr, BUN and CO<sub>2</sub>CP changed obviously at 2<sup>nd</sup> day, but they recovered gradually. Compared with BUN, the level of serum Cr was more sensitive in reflecting the damage of renal function. 【Conclusion】The rats after DEG can cause obviously kidney function damage or even be lethal. The severity acidosis and the obviously increasing level of serum Cr may be important clues for discovering DEG toxics at the early stage. The regularity of Cr and CO<sub>2</sub>CP changing with the time after DEG and the pathologic features may be helpful to diagnose or treatment too.

Key words: diethylene glycol (DEG); kidney function; SD rat

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):594-597]

二甘醇 (diethylene glycol, DEG) 又名二乙二醇, 双(2-羟基乙基)醚, 在工业上常用作吸湿剂、助溶剂、防冻剂和软化剂<sup>[1]</sup>。上世纪 30 年代以来, 世界先后发生十余次 DEG 中毒事件<sup>[2-3]</sup>。近年来主要发生在发展中国家, 且大多是将其作为药品的配制剂而引起的药物性中毒事件。2006 年 5 月广州中山大学附属第三医院的住院患者因使用含 30% DEG 的亮菌甲素而发生了首次静脉途径的急性中毒。尽管 DEG 对人和动物的肾毒性作用相对明确, 但中毒的早期表现和常见肾损害指标的变化规律尚不清楚。为此, 本研究

以 SD (Sprague-Dawley) 大鼠为对象, 探讨 DEG 中毒时肾功能的变化规律和腹腔途径中毒的特点, 为未来 DEG 中毒的早期发现提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和仪器

体质量为 (200 ± 20) g 健康的雄性 SD 大鼠 (SPF 级) (购自南方医科大学, 许可证号为 SCXK(粤)、2006B00B); DEG 购自美国 Sigma 公司; CO<sub>2</sub> 结合力 (CO<sub>2</sub> combining power,

收稿日期: 2007-03-06

基金项目: 广东省肝脏疾病研究重点实验室专项基金 (2005B60148)

作者简介: 顾琳 (1973-), 女, 浙江湖州人, 硕士, 主管技师; 陈规划, 通讯作者, 教授, 博士生导师, E-mail: chgh1955@263.net

CO<sub>2</sub>CP) 用四川省迈克科技责任公司的试剂检测; 尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酐 (creatinine, Cr) 用日本第一化学药品株式会社的试剂检测; 生化检测仪是日本的 Hitachi 7180 和 Olympus 640。

## 1.2 方法

**1.2.1 毒性实验方法** 根据预实验的结果, 确定 DEG 的剂量为 8 mL/kg。为了观察到 2 个时间点的病理变化和多个时间段的生化指标的变化规律, 本实验设计了 2 个实验组, 处理 A 组和处理 B 组, 分组方法参考常见动物毒理实验方法<sup>[4]</sup>。即将 50 只雄性 SD 大鼠随机分组, 设空白对照组, 生理盐水对照组各 10 只, 处理组 A 和 B 各 15 只。生理盐水对照组腹腔注射生理盐水 8 mL/kg 处理 A 组及处理 B 组分别腹腔注射 DEG 8 mL/kg, 空白组不做处理。在处理前 (注射 DEG 或生理盐水) 前 24 h 和处理后 24 h, 各组大鼠尾静脉采血约 0.5 mL, A 组大鼠第 5 天采血 0.5 mL 并全部处死。B 组大鼠于第 7 天和第 14 天各采血 0.5 mL, 并于第 14 天采血后全部处死。实验过程中死亡的大鼠和处死大鼠立即解剖取大鼠肾脏于 8% 多聚甲醛固定用于病理检查。

**1.2.2 样本检测** 血清 CO<sub>2</sub>CP、BUN 和 Cr 的检测在全自

动生化仪上按说明书操作。肾组织的病理标本用 8% 多聚甲醛固定后常规石蜡包埋、切片 HE 染色, 并由两个有经验的病理医师阅片并发出病理报告。

**1.2.3 统计处理** 采用 SPSS 11.0 软件分析。不同时间处理组之间的差异用 t 检验。处理前的各类检测结果计算各指标的正常参考值的基线水平, 并根据其上下限 (95% 正常范围) 进行异常率的比较, 采用  $\chi^2$  检验进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 毒性实验结果

**2.1.1 病理结果** 处理组 A 和 B 的大鼠在 DEG 注射后 2 d 内共死亡 3 只 (10%), 5 d 内共死亡 9 只 (30%), B 组第 5 天后, 无新的大鼠出现死亡。空白对照和生理盐水对照组均无大鼠死亡。死亡大鼠的肾组织与对照组 (见图 1) 相比较, 可见其部分肾小球血管扩张充血, 系膜增厚, 囊腔狭窄; 部分肾小球囊壁层、脏层基底膜融解消失, 肾小球毛细血管内皮变性坏死; 近曲肾小管上皮弥漫性水肿变性, 散在坏死, 管腔消失; 部分肾小管基底膜融解消失, 部分肾小管管型内可见蛋白管型; 间质血管明显充血, 未见明显炎细胞浸润 (图 2, 3)。

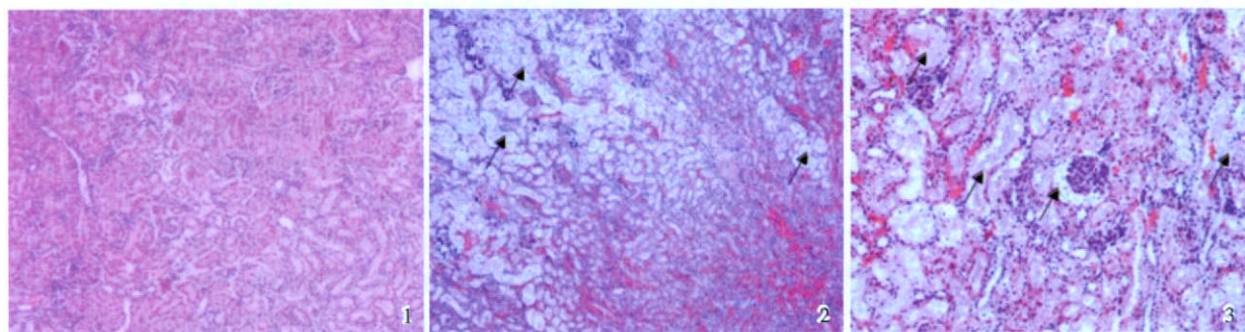


图 1 正常大鼠肾组织

图 2 DEG 中毒死亡大鼠肾组织

图 3 DEG 中毒死亡大鼠肾组织

Fig.1 Image of nephridial tissue of the rats from control group (HE  $\times$ 100)

Fig.2 Image of the nephridial tissue from the dead rats after DEG poisoning (HE  $\times$ 100)

Fig.3 Image of the nephridial tissue from the dead rats after DEG poisoning (HE  $\times$ 400)

实验组大鼠肾组织在光学显微镜下可见不同程度的毒性损害, 我们根据肾组织损害的范围分成由轻到重分成四级, 分级标准为, 'I 级' 平均一个视野内约 25% 肾组织出现急性肾小管坏死的病变; 'II 级' 平均一个视野内约 50% 的肾组织出现肾小管坏死的病变; 'III 级' 平均一个视野内约 75% 的肾组织出现肾小管出现坏死的病变; 'IV' 平均一个视野内几乎全部肾组织的出现急性肾小管坏死的病变。处理 A 组第 5 天处死的大鼠中, 18% 的大鼠肾脏病理分级为 I 级, 共有 45% 的大鼠病理改变达到 II 级以上。第 14 天处死的 B 组大鼠中, 20% 的大鼠病理改变达到 I 级, 而无大鼠的肾脏损伤达到 II 级以上。(表 1)

**2.1.2 血生化结果** 对照组的 Cr、BUN 和 CO<sub>2</sub>CP 结果在不同时间观测点之间没有显著差别, 且与处理组的 DEG 注射前的结果也无显著差异。处理组存活大鼠的生化结果分析见表 2 和 3。血生化结果的定量分析显示 DEG 注射后

表 1 各组大鼠 DEG 注射后的肾脏病理分级

Table 1 Kidney pathologic classification of the rats in each group after DEG by intraperitoneal injection

Groups	Kidney pathologic classification			
	I	II	III	IV
A	18%(2/11)	18%(2/11)	0	27% (3/11)
B	20%(2/10)	0	0	0

The criterion of Kidney pathologic classification as follow: Class I, about 25% of one visual field in average occur acute renal tubular necrosis disease; Class II, about 50% of one visual field in average occur acute renal tubular necrosis disease; Class III, about 75% of one visual field in average occur acute renal tubular necrosis disease; Class IV, about 100% of one visual field in average occur acute renal tubular necrosis disease.

2 d 的 Cr、BUN 和 CO<sub>2</sub>CP 均有显著改变 (表 2), 并在观察的 14 d 内均逐渐恢复, 且表现为 CO<sub>2</sub>CP 恢复最快, 其次

BUN, 最后是 Cr。此外, CO<sub>2</sub>CP 在第 7~14 天仍显著升高。为了进行各生化指标异常率的分析, 本研究首先根据 50 只大鼠处理前血清的检测结果, 计算出 Cr、BUN 和 CO<sub>2</sub>CP 的均值和标准差分别为 (24.78 ± 3.29) mol/L、(7.55 ± 1.73) mmol/L 和 (17.58 ± 2.71) mmol/L, 再计算正常参考值 (95% 正常范围) 的结果为: Cr 正常上限为 30.2 mmol/L, BUN 正常上限为 10.4 mmol/L 和 CO<sub>2</sub>CP 正常下限为 13.1 mmol/L。以这些正常参考值为依据的定性分析结果见表 3。Cr、BUN 和 CO<sub>2</sub>CP 的最高异常率分别发生在 DEG 注射后的第 5 天、第 5 天和第 2 天。

表 2 处理组存活大鼠的血生化结果的定量分析

Table 2 Quantitative analysis of the blood biochemical results in the survival rats from treated groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Time	Cr ( $\mu$ mol/L)	BUN(mmol/L)	CO <sub>2</sub> CP(mmol/L)
Before DEG (n=30)	25 ± 3	7.7 ± 1.7	17.3 ± 3.2
After DEG 2 d(n=27)	156 ± 232	27.2 ± 4.6	11.6 ± 6.7
After DEG 5 d(n=11)	53 ± 45	19.2 ± 8.7	20.2 ± 6.2
After DEG 7 d(n=10)	35 ± 8	8.4 ± 1.6	19.1 ± 2.7
After DEG 14 d(n=10)	31 ± 5	8.3 ± 1.2	22.0 ± 1.9
F	3.24	4.26	11.38
P	0.003	0.003	0.000

表 3 处理组存活大鼠血生化结果的定性分析

Table 3 Qualitative analysis of the blood biochemical results in the survival rats from treated groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Time	Cr (%)	BUN (%)	CO <sub>2</sub> CP (%)
Before DEG (n=30)	3(10.0)	1(3.3)	3 (10.0)
After DEG 2 d(n=27)	21(77.8)	12 (44.4)	17 (62.9)
After DEG 5 d(n=11)	11(100.0)	9 (81.8)	2 (18.2)
After DEG 7 d(n=10)	6(60.0)	2 (20.0)	0 (0.0)
After DEG 14 d(n=10)	4(40.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
$\chi^2$	39.308	33.199	31.292
P	0.003	0.000	0.000

2.1.3 肾功能损害的综合分析 大鼠的死亡率和血清中 Cr 和 BUN 变化的的异常情况进行肾损害的综合分析, 具体结果见图 2。如图所示, 随着时间的增加, 大鼠的总的死亡率也在一直增加, 到第 14 天时达到高峰 (33.3%); 从血 BUN 定性分析看, BUN 随时间的增加率与死亡率叠加形成的曲线可知: 该曲线的高峰发生在第 5 天 (86.0%), 直到第 14 天时才逐渐恢复 (33.3%); 而从血 Cr 定性分析看, Cr 随时间的增加率与死亡率叠加形成的曲线可知: 该曲线的高峰也在第 5 天 (100%), 直到第 14 天时逐渐恢复到 60.0%。即 DEG 注射后早期 (第 5 天), 实验组大鼠血 BUN, Cr 增加率都达到高峰, 与死亡率平行, 第 14 天时总的死亡率为 33.3%, 而实际上从第 7 天开始, 没有新的大鼠出现死亡。DEG 注射后晚期 (第 14 天) 各项肾功能的血生化指标逐渐恢复, BUN 恢复为 (8.26 ± 1.17) mmol/L, Cr 恢复为 (30.72 ±

5.03)  $\mu$ mol/L。

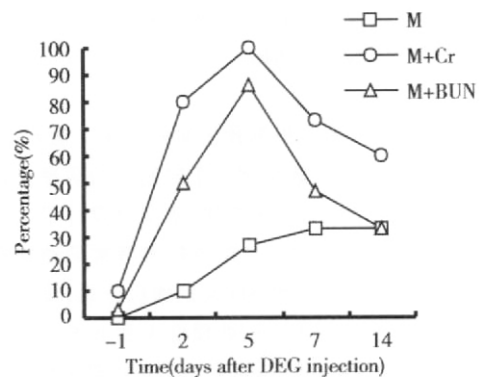


图 2 DEG 注射后大鼠肾功能损害的综合分析

Fig2 Aggregate analysis of the renal damage in the rats after DEG

M: mortality; M + Cr: mortality + Cr%; M+BUN: mortality + BUN%

### 3 讨论

DEG 相关药物性中毒事件近年来不断发生, 主要为口服途径中毒。DEG 在消化道吸收良好, 并通过血液快速分布到肾、脑、脾、肝、肌肉和脂肪等部位<sup>[6]</sup>, 但临床上主要表现为急性肾功能损害, 是动物和人中毒死亡的主要原因。然而, 2006 年 5 月在广州发生的属首次静脉中毒事件, 也是我国首次发生 DEG 中毒的重大事件。尽管本研究因可导致注射部位严重坏死而未能观察到静脉途径中毒的情况, 但观察到了采用腹腔注射途径也可引起大鼠死亡和肾功能血生化指标的显著异常。

2001 年张国华等<sup>[6]</sup>发现二甘醇中毒的肾组织病理表现为严重的急性肾小管坏死的表现, 如弥漫性肾小管坏死的改变, 特别是近曲小管。本实验研究发现死亡大鼠的肾损害也主要是急性的肾小管坏死, 尤其是近曲小管可见上皮细胞弥漫性水肿变性, 散在坏死, 管腔消失等严重表现。提示人类二甘醇中毒机制与 SD 大鼠中毒的机制类似, 即均可以导致急性肾衰而引起大鼠死亡。此外从表 1 的结果可知早期 (第 5 天内) 死亡和处死的大鼠的病理分级在 Ⅱ级或以上的有 45%, 而晚期 (第 14 天), 无大鼠的肾脏损伤达到 Ⅱ级以上。因此提示 DEG 中毒肾组织损伤主要发生在早期 (第 5 天), 但是随着时间的延长, 中毒大鼠的肾损害可能会逐渐恢复。

8 mL/kg 的 DEG 灌胃途径染毒已有文献显示可引起大鼠发生肾损害<sup>[7]</sup>。本研究使用该剂量进行腹腔注射显示, 个别大鼠可在 8 h 内死亡, 死亡高峰在第 5 天, 死亡率约为 30%, 而第 7 天后无新的死亡发生。大鼠的死亡率结合血生化指标的异常率综合分析显示, DEG 注射后第 5 天是肾损害的高峰, 可以证明大鼠的死亡主要是由于急性肾功能衰竭引起死亡的。在时间上, 我们的实验大鼠的死亡时间与国外文献报道的 4~8 d 相吻合<sup>[7]</sup>。进一步分析显示, 血生化指标, Cr、BUN 和 CO<sub>2</sub>CP 在注射后第 2 天出现明显改变, 以

后逐渐恢复。其中 CO<sub>2</sub>CP 下降最明显, 且于第 5 天迅速恢复, 到第 7~14 天出现显著升高。Cr 恢复最慢, 到第 14 天其平均水平仍然显著升高。血清 Cr 和 BUN 相比, 前者在反映 DEG 肾损害更敏感。以上提示, 早期出现的严重酸中毒和继而出现的血清 Cr 显著升高是早期发现 DEG 中毒的重要线索。

综上所述, DEG 的腹腔注射途径可以引起大鼠的明显的肾功能损害甚至死亡, 包括肾组织出现的急性肾小管坏死的病理改变。早期出现严重的酸中毒和 Cr 的显著升高为 DEG 中毒的早期诊断提供重要线索, 同时 Cr 和 CO<sub>2</sub>CP 随时间的变化规律也有助于我们深入了解 DEG 中毒的特点, 并提示部分大鼠的肾功能变化是可能是可逆的, 这些均有利于指导临床的治疗, 但 DEG 中毒引起肾中毒的具体机制尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 周邦荣.二甘醇应用前景广阔[J].精细化工原料及中间体, 2006,(3):22- 24.

[2] 蔡皓东.1937 年磺胺酰剂(含二甘醇)事件及其重演[J].药物不良反应, 2006,8(3):217- 220.  
 [3] O BRIEN K L, SELANIKIO J D, HECDIVERT C, et al. Epidemic of pediatric deaths from acute renal failure caused by diethylene glycol poisoning. Acute Renal Failure Investigation Team [J]. JAMA, 1998, 279(15):1175- 1180.  
 [4] 李卫国, 陈伟良, 艾 虹, 等.小剂量顺铂联合 ~(32)P 玻璃微球对小鼠 S180 瘤细胞的细胞毒作用 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005,26(1):65- 68.  
 [5] HEILMAIR R, LENK W, LOHR D. Toxicokinetics of diethylene glycol (DEG) in the rat [J]. Arch Toxicol, 1993, 67 (10):655- 666.  
 [6] 张国华, 陈丽萍, 胡更奕, 等. 二甘醇中毒死亡 1 例 [J]. 法医学杂志, 2001,17(4):236- 237.  
 [7] KRAUL H, JAHN F, BRAUNLICH H, et al. Nephrotoxic effects of diethylene glycol (DEG) in rats [J]. Exp Pathol, 1991, 42(1):27- 32.

(编辑 孙慧兰)



(上接第 593 页 from page 593)

[5] MIYASHITA T, ARMSTRONG T D, WANG J, et al. Granulocyte macrophage colony stimulating factor transfected vaccine for esophageal cancer causes regression of subcutaneous implants in rats [J]. J Surg Res, 2007, 137(2): 194- 195.  
 [6] 张 革, 汪华侨, 邹俊涛, 等. A \_(1- 15)多价 DNA 疫苗的构建及其对体液免疫的效果 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005,26(4):371- 376.  
 [7] 赵 楷. 病毒疫苗的研究现状与展望 [J]. 第二军医大学学报, 2002, 23 (8):813- 815.  
 [8] KAPOOR D, AGGARWAL S R, SINGH N P, et al. Granulocyte - macrophage colony - stimulating factor enhances the efficacy of hepatitis B virus vaccine in previously unvaccinated haemodialysis patients [J]. J Viral Hepat, 1999, 6(5):405- 409.

[9] 张森涛, 白 华, 童德文. 双顺反子表达质粒在 DNA 疫苗研究中的应用 [J]. 中国兽医科学, 2006,36(5): 424- 428.  
 [10] GHERARDI M M, RAMIREZ J C, ESTEBAN M. Interleukin - 12 enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type I env antigen in a DNA prime virus boost vaccine regimen is time and dose dependent: suppressive effects of IL- 12 boost are mediated by nitric oxide [J]. J Virol, 2000, 74 (14):6278- 6286.  
 [11] KUSAKABE K, XIN K Q, KATOH H, et al. The timing of GM- CSF expression plasmid administration influence the Th1/Th2 response induced by HIV- 1- specific DNA vaccine [J]. J Immunol, 2000, 164(6):3111- 3120.

(编辑 徐 杰)