

氢气对百草枯中毒大鼠急性肺损伤的保护作用

李孝全, 彭兴国, 刘克地, 胡俊华, 付守芝*

(郧阳医学院附属人民医院急诊科, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 目的:探讨氢气对百草枯中毒大鼠急性肺损伤的保护作用。方法:24 只大鼠随机分为 3 组:对照组、百草枯组和氢气组,百草枯组和氢气组腹腔注射百草枯(35 mg/kg),氢气组于注射后立即开始吸入含 2% 氢气的空气。72 h 后检测肺湿/干比、肺泡灌洗液 PMN、PaO₂、肺损伤评分、肺组织丙二醛含量。结果:与对照组比较,百草枯组、氢气组肺湿/干比、肺泡灌洗液 PMN、肺损伤评分、肺组织丙二醛含量升高,PaO₂ 降低;与百草枯组比较,氢气组肺湿/干比、肺泡灌洗液 PMN、肺损伤评分、肺组织丙二醛含量降低,PaO₂ 升高。结论:吸入氢气能够通过抑制脂质过氧化,抑制白细胞在肺部的聚集,从而减轻百草枯中毒后引起的急性肺损伤。

[关键词] 急性肺损伤;大鼠;百草枯;氢气

[中图分类号] R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9674(2010)01-025-03

The Effect of Hydrogen on Paraquat-induced Acute Lung Injury in Rats LI Xiao-quan, PENG Xing-guo, LIU Ke-di, HU Jun-hua, FU Shou-zhi* (Department of Emergency, Renmin Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of hydrogen on paraquat-induced acute lung injury in rats. Methods Twenty-four SD rats were randomly divided into control group, paraquat group and hydrogen group. The rats in paraquat group and hydrogen group were intraperitoneally injected with paraquat (35 mg/kg). The rats in hydrogen group were given inhalation exposure to air containing 2% hydrogen after injection. The lung wet/dry weight ratio, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) PMN, PaO₂, lung injury score, and malondialdehyde (MDA) were measured after 72 h. Results Compared with control group, the lung wet/dry weight, BALF PMN, lung injury score, MDA content were increased, PaO₂ were decreased in paraquat group and hydrogen group, while compared with the paraquat group, the lung wet/dry weight ratio, BALF PMN, lung injury score, the content of MDA were decreased, PaO₂ were increased in hydrogen group. Conclusion Inhalation of hydrogen could reduce the paraquat-induced acute lung injury by inhibiting lipid peroxidation and leukocyte accumulation in lungs.

Key words: Acute lung injury; Rat; Paraquat; Hydrogen

百草枯是一种广泛应用于农业生产的除草剂,进入机体后主要聚集于肺部,随后发生的氧化还原作用和产生的氧自由基触发嗜中性粒细胞 (polymorphonuclear, PMN) 介导急性肺部炎症反应,引起以肺出血、肺水肿等为特征的急性肺损伤,且可进展性地发展为不可逆的肺纤维化,最终导致患者死亡,危害极大。临床上常规使用维生素 C、超氧化物歧化酶、还原型谷胱甘肽等治疗,但疗效不佳。氢气是

一种还原剂,有研究显示氢气可以特异性的与体内的羟自由基,亚硝酸阴离子结合,发挥抗自由基作用^[1],治疗急性肺损伤的报道甚少。本研究探讨吸入氢气对百草枯中毒大鼠急性肺损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 模型的制备

24 只 SPF 级 SD 大鼠由湖北省实验动物中心提供,合格证号 SCXK(鄂)2006-2009。采用随机数字表法分为 3 组:对照组、百草枯组、氢气组,每组 8 只。百草枯组、氢气组按照 35 mg/kg 剂量腹腔注射百草枯(先正达南通作物保护有限公司),对照组注射等体积的生理盐水^[2]。氢气组于注射百草枯后立即饲养于特制的玻璃箱中,呼吸机(PB-760)持续

[基金项目] 十堰市科技局科技计划项目(No. 2009S08)。

[作者简介] 李孝全(1974-),男,主治医师,硕士研究生,主要从事中毒研究。

***[通讯作者]** 付守芝(1955-),女,副主任医师,副教授,硕士生导师,主要从事急危重症研究。E-mail:fsz188@yahoo.com.cn

向箱中送入含2%氢气的空气(氢气购自上海浦江特种气体有限公司)。

1.2 动脉血氧分压的测定

百草枯中毒后72 h,麻醉动物腹主动脉取血1 mL,用AVL OMNITM血气仪(美国GMI实验公司)测PaO₂。取血后放血处死。

1.3 肺组织形态学观察

取右肺上叶,10%甲醛固定,石蜡包埋切片,HE染色,光镜下观察,每组选取8张玻片,每张玻片观察10个视野(400倍),评定病变程度^[3-4],0分:无异常改变,无RBC和PMN,无透明膜;1分:轻度充血、水肿,偶见RBC和PMN,透明膜见于<20%肺泡;2分:中度充血、水肿,RBC和PMN部分充盈肺泡,透明膜见于>20%肺泡;3分:重度充血、水肿,RBC和PMN充满肺泡腔,透明膜见于>50%肺泡。取其均值作为肺损伤的组织学半定量评分。

1.4 肺湿/干比及肺泡灌洗液中性粒细胞百分比

取右肺中叶,用滤纸吸去肺组织表面水分后称湿重(Wet Weight, W),置于电热恒温烤箱中,80℃烤48 h至恒重(Dry Weight, D),计算W/D;左肺用生理盐水2 mL做肺泡灌洗2次,收集肺泡灌洗液,以1 500 r/min离心10 min,沉渣涂片做瑞氏染色,计数PMN(%)。

1.5 肺组织丙二醛(MDA)的测定

取右肺下叶,采用硫代巴比妥酸比色法检测,标本检测步骤严格按试剂盒说明进行。

1.6 统计学方法

正态分布的计量资料采用均数±标准差的方式表示,使用SPSS 13.0统计分析软件进行分析,多组样本的均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),均数间的两两比较采用 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表1 各组大鼠肺泡灌洗液PMN、PaO₂、肺损伤评分、MDA的比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	PMN(%)	肺湿/干比	PaO ₂ (mmHg)	肺损伤评分	MDA($\mu\text{mol/g}$)
对照组	3.1 ± 1.6	5.23 ± 0.58	99.95 ± 8.83	0.50 ± 0.45	15.35 ± 2.35
百草枯组	90.2 ± 3.4*	8.61 ± 0.62*	65.21 ± 7.81*	7.12 ± 0.92*	45.27 ± 5.42*
氢气组	70.5 ± 4.7**	6.87 ± 0.41**	83.54 ± 9.25**	5.00 ± 0.76**	31.29 ± 4.61**

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与百草枯组比较,** $P < 0.05$

3 讨论

百草枯进入体内,经过单电子还原形成自由基,然后与分子氧反应生成联吡啶阳离子和超氧阴离子(O₂⁻),后者歧化形成H₂O₂,再在Fe²⁺存在下形成高活性自由基OH⁻^[5],引发链式脂质过氧化反应损伤

2 结果

2.1 肺大体观察、肺湿/干比变化

对照组肺组织色泽红润、质软、弹性好、表面光滑。百草枯组两肺呈现充血、水肿,体积增大,广泛点状、片状出血灶,切面疏松、肿胀,氢气组病变与百草枯组类似,但肺部出血灶有所减少。与对照组比较,百草枯组肺湿/干比显著增加($P < 0.05$),氢气组与百草枯组比较明显降低($P < 0.05$),见表1。

2.2 肺组织光镜观察及病理学形态积分的变化

对照组肺组织结构清晰完整,几乎无炎细胞浸润,未见肿胀、充血、出血等现象,肺泡间隔不厚(见图1)。与对照组比较,百草枯组肺泡腔及肺间质弥漫性水肿,炎性细胞浸润,肺泡间隔增宽(见图2),肺损伤评分明显增高($P < 0.05$)。与百草枯组比较,氢气组炎细胞浸润减少,肺泡间隔变窄,肺泡充血、出血现象显著减轻(见图3),肺损伤评分与百草枯组比较明显下降($P < 0.05$),见表1。

2.3 肺泡灌洗液中性粒细胞百分比

百草枯组肺泡灌洗液中性粒细胞比例较对照组明显升高($P < 0.05$),氢气组肺泡灌洗液中性粒细胞百分比与百草枯组比较明显下降($P < 0.05$),见表1。

2.4 PaO₂的变化

百草枯组PaO₂较对照组明显下降($P < 0.05$),氢气组PaO₂与百草枯组比较明显上升($P < 0.05$),见表1。

2.5 MDA的变化

百草枯组MDA较对照组明显升高($P < 0.05$),氢气组MDA与百草枯组比较明显降低($P < 0.05$),见表1。

细胞膜,使膜受体、膜蛋白酶和离子通道的脂质微环境改变,引起组织细胞,尤其是肺组织的氧化损伤^[6]。本研究采用丙二醛作为监测细胞脂质氧化反应的指标,观察到百草枯组丙二醛明显升高,伴随肺泡灌洗液中的白细胞升高,急性肺损伤评分增加,肺湿/干比增加、PaO₂下降,说明氧化应激反应在百草

枯中毒肺损伤中发挥了重要作用。

百草枯中毒临床上十分常见,由于无特殊解药,死亡率极高。基于百草枯是一种亲电子体,具有氧化性,临床上常规使用维生素 C、还原型谷胱甘肽、SOD 等治疗,但疗效不佳。推测可能与这些物质分子量较大,不具有亲脂性,难以透过膜结构到达细胞内发挥作用,且不能对抗作用最强的 OH^- 有关。因此需要寻找新的抗氧化剂。

氢气是一种还原剂。正常人肠道可以产生氢气,但一般被认为是一种生理惰性气体,用于研究肠道动力,但氧化应激状态时内源性氢气减少,提示氢气可能参与了机体内的抗氧化过程^[7-9]。Ohsawa^[10]等采用化学反应、细胞学等手段证明,氢气能自由穿过细胞膜结构,分布于细胞液、线粒体内,可选择性中和羟自由基和亚硝酸阴离子,而后两者是病理性氧化损伤的最重要介质,目前体内尚未找到特异性清除途径。氢气只会和体内最强的自由基-羟自由基反应^[10],这表明氢气不会干扰其他自由基在细胞信号传递间的正常氧化还原反应。因此,氢气是一种理想的抗氧化剂。

本研究通过给中毒大鼠吸入氢气,发现能明显改善大鼠急性肺损伤,使肺损伤评分、肺湿/干比降低, PaO_2 上升。这种改变伴随白细胞在肺泡灌洗液中的减少,肺组织丙二醛浓度的下降,提示氢气可能抑制百草枯在体内进行反应产生的自由基,使自由基对细胞膜的氧化损伤减少。Fukuda^[11]的研究显示吸入氢气可以通过发挥抗自由基作用,减少缺血/再灌注肝脏组织的丙二醛,从而保护缺血/再灌注肝脏损伤,提示氢气的这种保护作用并不局限于某一器官的损伤,可能对全身损伤均有保护作用。百草枯中毒肺组织氧化损伤导致肺毛细血管内皮细胞通透性增加,同时表达大量炎症粘附分子如 I-CAM、E-CAM、P 选择素等,诱导中性粒细胞在肺部过度聚集,释放大量细胞毒性物质如弹性蛋白酶、胶原酶、促炎因子等,进一步造成血管内皮损伤,肺间质水肿,气体交换障碍,从而造成急性肺损伤。氢气可能通过特异性的中和百草枯在体内反应产生的过量的羟自由基而减轻了自由基导致的急性肺损伤反应。

综上所述,吸入氢气可能通过发挥中和自由基的作用,进而抑制自由基导致的细胞损伤,减少中性粒细胞在肺部的聚集所造成的损害,达到减轻急性肺损伤的作用。

(文中图 1~3 见封四)

[参 考 文 献]

- [1] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals [J]. *Nat Med*, 2007, 13(6): 688 - 694.
- [2] 卜志勇, 胡俊华, 付守芝, 等. 大剂量表面活性物质和地塞米松联用对大鼠百草枯中毒急性肺损伤的治疗作用 [J]. *郟阳医学院学报*, 2007, 26(4): 196 - 199.
- [3] Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, et al. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, 150(1): 113 - 122.
- [4] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893 - 899.
- [5] Jones GM, Vale JA. Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of diquat poisoning: a review [J]. *J Toxicol Clin Toxicol*, 2000, 38(2): 123 - 128.
- [6] Wilhelm J, Frydrychova M, Vizek M. Hydrogen peroxide in the breath of rats: the effects of hypoxia and paraquat [J]. *Physiol Res*, 1999, 48(6): 445 - 449.
- [7] Maier RJ. Availability and use of molecular hydrogen as an energy substrate for *Helicobacter* species [J]. *Microbes Infect*, 2003, 5(12): 1159 - 1163.
- [8] Bond JH, Levitt MD, Prentiss R. Investigation of small bowel transit time in man utilizing pulmonary hydrogen (H_2) measurements [J]. *J Lab Clin Med*, 1975, 85(14): 546 - 555.
- [9] Tharanathan RN. Food derived carbohydrates structural complexity and functional diversity [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2002, 22(1): 65 - 84.
- [10] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals [J]. *Nat Med*, 2007, 13(6): 688 - 694.
- [11] Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, et al. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(3): 670 - 674.

[收稿日期] 2009-06-30

(本文编辑:朱佩筠)

碱性成纤维细胞生长因子和地塞米松联合诱导骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化

90718X
10, 29, (1)

(正文见9页)



图1 骨髓间充质干细胞第一代2d后贴壁生长形态不规则 (×200)

图2 骨髓间充质干细胞第三代, 贴壁生长, 形态规则 (×200)

图4 茜素红染色, 可见细胞聚集, 中心区域呈现棕红色钙盐沉积 (×100)

氢气对百草枯中毒大鼠急性肺损伤的保护作用

(正文见25页)

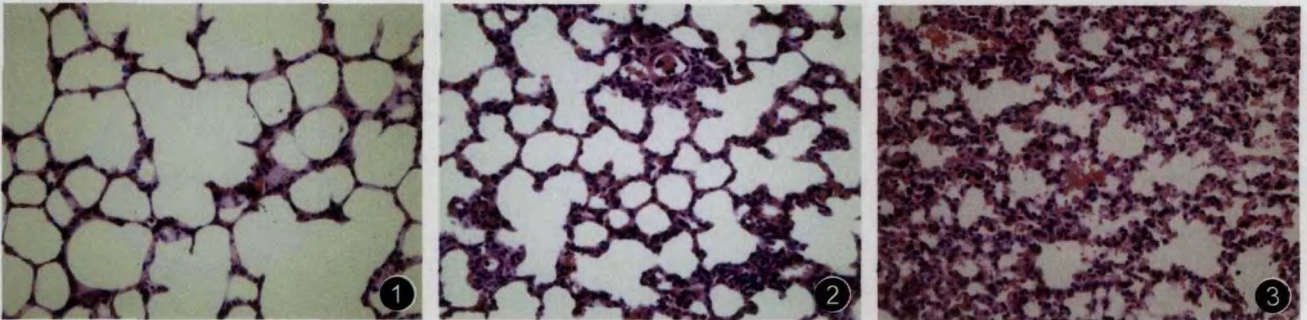


图1 对照组肺组织结构清晰完整, 几乎无炎细胞浸润, 未见肿胀、充血、出血等现象, 肺泡间隔不厚

图2 百草枯组肺泡腔及肺间质弥漫性水肿, 炎性细胞浸润, 肺泡间隔增宽

图3 氢气组炎细胞浸润减少, 肺泡间隔变窄, 肺泡充血、出血现象显著减轻

兔激素性股骨头坏死软骨与软骨下骨组织损伤的实验研究

(正文见45页)

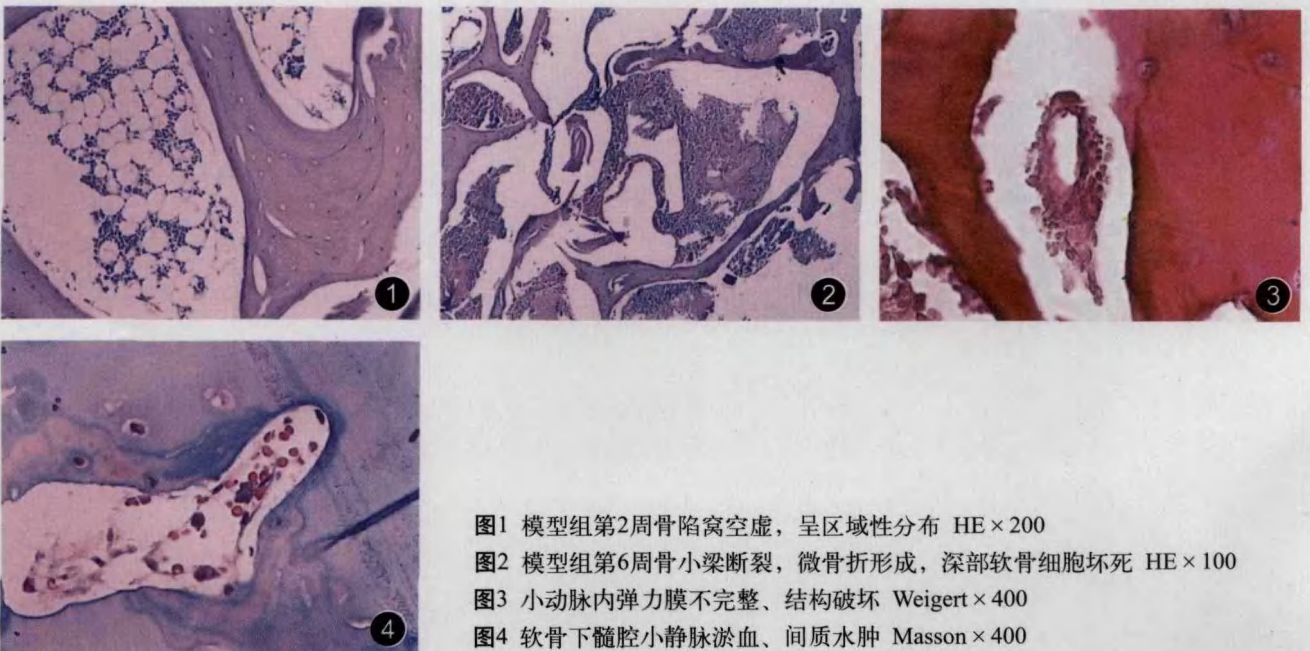


图1 模型组第2周骨陷窝空虚, 呈区域性分布 HE×200

图2 模型组第6周骨小梁断裂, 微骨折形成, 深部软骨细胞坏死 HE×100

图3 小动脉内弹力膜不完整、结构破坏 Weigert×400

图4 软骨下髓腔小静脉淤血、间质水肿 Masson×400