

氢饱和生理盐水对慢性氧中毒肺、脑组织形态学的影响

李密密¹ 王安全¹ 孙学军² 吕世军^{1△} 刘文武^{2#}

(1 潍坊医学院, 潍坊 261042; 2 第二军医大学, 上海 200433)

摘要 目的:研究氢饱和生理盐水对慢性氧中毒的预防保护效应。方法:新生7 d SD大鼠于常压95%的氧中暴露24 h,制备慢性氧中毒模型。暴露过程中每6 h腹腔注射生理盐水或不同剂量含氢生理盐水。采用肺H-E、脑H-E和Nissl染色分别观察含氢生理盐水对慢性氧中毒时肺和脑组织的保护效应。结果:H-E染色显示,吸氧后生理盐水组小鼠肺毛细血管显著扩张、出血严重,支气管上皮变形明显,且肺间质和肺泡腔内可见大量红细胞,H-E及Nissl染色显示,脑神经元明显水肿和变性;氢饱和生理盐水组小鼠肺血管出血、支气管上皮变形以及炎症反应严重程度有所缓解,脑部神经元水肿和变性严重程度有所减轻,神经元的数量增加。结论:氢饱和生理盐水对慢性氧中毒肺及脑损伤具有一定预防作用。

关键词 氢饱和生理盐水;慢性氧中毒;肺;脑;损伤

Effects of saturated hydrogen saline on histomorphology of the lung and brain after chronic oxygen toxicity

Li Mimi¹, Wang Anquan¹, Sun Xunjun², Lü Shijun^{1△}, Liu Wenzu^{2#}

(1. Weifang Medical College, Weifang 261042; 2. Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of saturated hydrogen saline on normobaric oxygen induced chronic oxygen toxicity. **Methods:** Seven-day-old Sprague-Dawley (SD) rat pups were exposed to normobaric oxygen (95%) for 24 h to develop chronic oxygen toxicity. The animals with chronic oxygen toxicity were intraperitoneally administrated with normal saline or hydrogen saturated saline of different doses every 6 h during exposure (a total of 4 times). Pathological changes in the lung and the brain were evaluated by H-E staining and Nissl staining plus H-E staining, respectively. **Results:** Our results revealed that pulmonary damages in the hydrogen saline treated pups were significantly improved when compared with the saline treated pups. Saturated hydrogen saline could markedly alleviate pathological lesions in the lung tissue, ease inflammatory cell infiltration and decrease total cells; alleviate neuron edema and degeneration, and increase neuron number. **Conclusion:** Saturated hydrogen saline could prevent pulmonary and neuronal lesions induced by normobaric oxygen.

Key words saturated hydrogen saline; chronic oxygen toxicity; lung; brain; lesion

低氧血症是众多新生儿疾病中常见的临床表现,是导致新生儿死亡的重要原因,而氧疗可提高动脉血氧分压,改善组织缺氧,是目前主要的治疗方法。临床上根据给氧浓度分为低浓度氧疗和高浓度氧疗;根据给氧压力分为常压高浓度氧(normobaric hyperoxia, NH)和高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)两种,其中NH的使用更为广泛。但是就像所有的药物都有毒副作用一样,高氧治疗易引起慢性氧中毒,从而造成众多组织高氧性损伤,其中肺、脑和视网膜为最易受损器官^[1-3]。有研究表明高氧性损伤的机制与肺和脑发育不成熟、氧化应激及炎症损伤有重要关系^[4]。其中氧

化应激引起的自由基生产过多是重要的损伤机制。氢气具有还原性,氢能选择性中和羟自由基和过氧亚硝酸。本课题组前期研究也显示氢饱和生理盐水在脑缺血损伤及心肌缺血性损伤中的保护作用^[5-6],而未见有氢对慢性氧中毒的预防或治疗研究。本实验从形态学上研究氢饱和生理盐水对慢性氧中毒造成的肺和脑损伤的预防保护作用。

1 材料和方法

1.1 仪器与材料

纯氧动物舱购于上海701研究所杨园医用氧舱厂;SD新生7 d大鼠由上海第二军医大学实验动物中心提供;氧气购于上海市江南气体公司;氢气购于上海计量标准气体有限公司。

1.2 氢气饱和生理盐水的制备

在0.5 MPa压力下加压暴露4 h,将纯氢气溶解于

第1作者 E-mail: limi2007007@163.com

△通讯作者, E-mail: sjlu@wfmcc.edu.cn

#并列通讯作者, E-mail: liuwenwu1980@hotmail.com

收稿日期:2010-01-25; 修回日期:2010-03-07

正常生理盐水中达到饱和水平,于4℃下保存。

1.3 慢性氧中毒模型的制备

40只SD新生大鼠,随机分为4组,每组10只:正常对照组(常压空气组);生理盐水组(vehicle, 10 ml/kg);氢饱和盐水组1(5 ml/kg);D组为氢饱和盐水组2(10 ml/kg)。饲料与水与动物一起入舱,进舱后纯氧洗舱5 min,使舱内氧气浓度接近95%,于常压下纯氧暴露24 h,持续微量通风并预先放置钠石灰以防CO₂聚集,氧气浓度每小时测量1次。每隔6 h开仓分别腹腔注射氢饱和生理盐水或生理盐水。于次日晨8:00出舱,开胸灌流,取肺、脑。

1.4 组织处理

出舱后,动物深度麻醉,剪开右心耳,经左心室分别灌注0.9%生理盐水40 ml和4%多聚甲醛60 ml。取出肺、脑,于4%多聚甲醛内固定48 h,石蜡包埋,切片(4 μm),行常规H-E染色。

1.5 Nissl染色

切片二甲苯脱蜡,乙醇脱苯至蒸馏水洗,放入经预热至50℃的1%甲苯胺蓝水溶液中,并在56℃温箱中染色30 min,蒸馏水冲洗,70%乙醇浸泡1 min,95%乙醇分化,显微镜下观察大鼠脑皮层和海马情况。

1.6 统计学处理

所有实验数据用SPSS11.0统计软件分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异用单因素方差分析,显著差异者用SNK-q检验进行比较。

2 结果

2.1 大鼠的一般情况

吸氧24 h后生理盐水组新生大鼠均出现少动,反应迟钝,呼吸较促,皮肤苍白,光泽渐失,精神不振,活动力差。而对照组和氢气饱和生理盐水组未见明显上述表现。各组小鼠吸氧过程中及吸氧24 h后均未出现惊厥、瘫痪、死亡等。

2.2 氢饱和生理盐水对大鼠肺组织形态学的影响

肉眼观察,生理盐水组肺体积明显增大,表面有多处散发出血,水肿明显,肺扩张尚均匀。光镜下H-E染色结果显示,常压空气组小鼠肺组织表现为肺泡结构清楚,无液体和炎性渗出(图1A)。生理盐水组小鼠肺泡腔不完整,肺泡大小不均,某些肺泡融合、体积增加,肺泡数目减少,肺毛细血管扩张、出血,支气管上皮变形严重,且肺间质和肺泡腔内可见大量红细胞(图1B)。氢饱和生理盐水组示肺泡腔较为完整,肺毛细血管扩张及支气管上皮变形减轻,且肺间质和肺泡腔内红细胞数量显著减少,这些结果表明,氢饱和生理盐水对慢性氧中毒鼠具有一定预防作用,而组织学检查显示,10 ml/kg氢饱和和预防效果优于5 ml/kg氢饱和生理盐水(图1C、1D)。

2.3 氢饱和生理盐水对慢性氧中毒脑组织形态学的影响

大体观察,生理盐水组小鼠脑外观与常压空气组相比明显充血、水肿,伴有轻微出血、萎缩等,氢饱和生理盐水组充血、水肿明显减轻,未见明显出血、萎缩等。H-E染色显示,生理盐水组,脑组织部分神经元呈水样变性,部分神经元胞质嗜酸性增强,尼氏体消失,出现核固缩、碎裂及溶解,神经元数量减少。病变主要累及大脑皮质,呈层状、灶状改变,外侧较内侧改变明显(图2B)。海马的CA3区和齿状回改变轻微(图3B)。正常对照组未见变性细胞(图2A、3A)。氢气饱和生理盐水组,皮层神经元水样变性和胞质嗜酸性有所缓解,可见尼氏体,核固缩、碎裂及溶解减少,神经元数量较生理盐水组增多(图2C、2D)。海马受损变化较轻,氢生理盐水预防组与生理盐水组相比病理变化不明显(图3C、3D)。Nissl染色显示,病变主要累及大脑皮层,生理盐水组神经元数目比对照组减少(图4A、4B),注射氢饱和的新生大鼠神经元数目明显增多,核浓缩减少,可见胶质细胞反应性增生(图4C、4D)。海马受损变化较轻,氢生理盐水预防组与生理盐水组相比病理变化不明显(图5)。

3 讨论

氧是机体赖以生存的“必需品”,一定压力一时程的氧对机体具有益处或治疗作用,但呼吸过多的氧对机体同样会造成损伤。目前已经明确,较长时间吸入常压高浓度的氧,能引起以肺部损伤为主要表现的肺型氧中毒,又称为慢性氧中毒。本实验用新生7 d大鼠制备慢性氧中毒模型,在通氧的过程中分次腹腔注射氢饱和生理盐水,观察肺及脑的病理学变化,结果显示注射含氢饱和生理盐水能有效减轻氧中毒导致的肺和脑组织损伤。表明含氢饱和生理盐水对慢性氧中毒具有一定预防保护作用。

在认识氧中毒效应的130多年里,研究者在自由基损伤、神经递质改变、脑内代谢紊乱、应激、血管舒缩、离子流变化等多方面进行了深入研究,显示有诸多变化^[7-9],但对于氧中毒的发病机制,至今仍未完全明了。在众多机制中,自由基损伤目前被认为是最主要的损伤机制。自由基是含有未成对的原子、原子团或分子。研究已经表明自由基是维持正常生命所必需的物质,也是细胞内重要的信号分子^[10]。自由基能损伤细胞膜脂质、蛋白质和DNA^[11]。正常情况下,机体产生的自由基被超氧化物歧化酶和过氧化氢酶清除,当机体暴露于高氧环境下,机体产生过多自由基,大大超过机体的清除能力。这些自由基使细胞膜脂质过氧化,并抑制或灭活含巯基的酶,造成肺毛细血管的通透性增加;自由基还可以损坏肺泡壁细胞内的板层小体和线粒体,使表面活性物质合成减少,并能直接抑制表

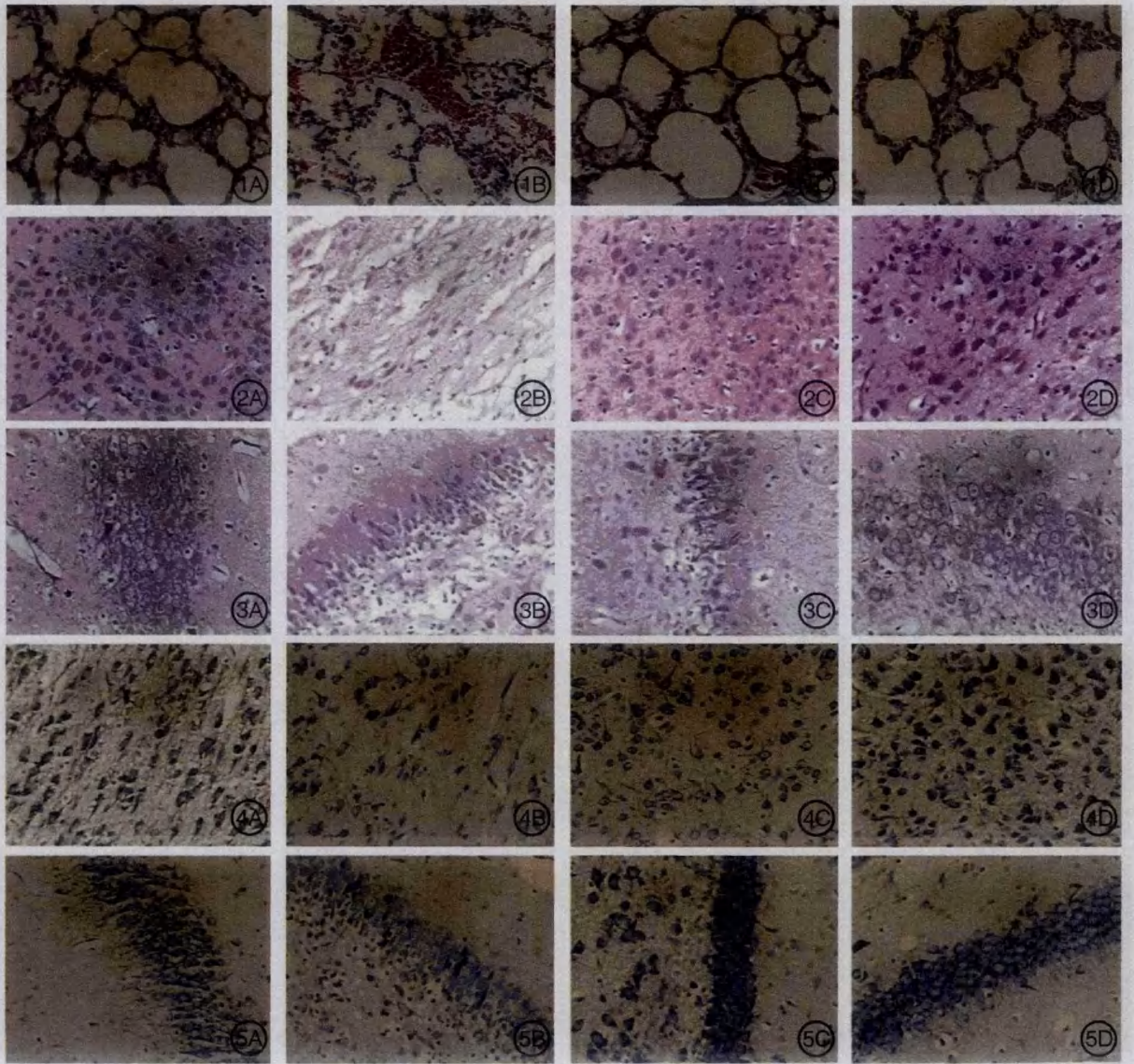


图 1 肺 H-E 染色, $\times 200$ 。生理盐水组(B)肺泡腔不完整,肺泡大小不均,某些肺泡融合、体积增加,肺泡数目减少,肺毛细血管扩张、出血,支气管上皮变形严重,且肺间质和肺泡腔内可见大量红细胞。氢生理盐水组(C、D)上述病理改变严重程度减轻。

图 2~3 生理盐水组(B)脑皮层和海马 H-E 染色, $\times 100$ 。神经元呈水样变性,部分神经元胞质嗜酸性增强,尼氏体消失,出现核固缩、碎裂及溶解,神经元数量减少。

图 4~5 大脑皮层和海马 Nissl 染色, $\times 100$ 。生理盐水组(B)神经元数目比对照组(A)减少,氢饱和和生理盐水组神经元数目明显增多,胶质细胞反应性增生(C、D)。海马受损变化较轻,氢生理盐水预防组(C、D)与生理盐水组(B)相比病理变化不明显。

Fig 1 H-E staining of the lung, $\times 100$. In the vehicle group (B), the alveolar space was incompletely with different sizes. Some alveoli were fused and their volumes were increased. The number of intact alveoli was markedly decreased when compared with hydrogen groups. The pulmonary capillaries were dilated and alveolar hemorrhage was noted. The bronchial epithelial cells were severely deformed and a large number of red blood cells were found in the alveolar space. The severity of pathological changes was significantly improved after hydrogen saline treatment.

Fig 2-3 H-E staining of the cortex and hippocampus, $\times 100$. Hydropic degeneration was found in a large number of neurons accompanied by increased eosinophilic staining. The Nissl body disappeared, and pyknosis, karyorrhexis as well as karyolysis were observed. The number of intact neurons was markedly decreased when compared with hydrogen treatment groups.

Fig 4-5 Nissl staining of the cortex and the hippocampus, $\times 100$. The number of neurons in the vehicle group was found less than normal group. The number of neurons in hydrogen saline group was significantly increased. Spongocytes were reactive hyperplasia, and the severity of pathological changes of hippocampus was significantly improved after hydrogen saline treatment.

面活性物质的作用,使肺泡表面张力增高,形成肺不张,造成肺损伤。此外高氧抑制肺间隔化,使肺泡Ⅱ型上皮细胞损伤修复能力下降。同时,过多的氧自由基可触发细胞凋亡,此外大量氧自由基通过氧化损伤膜、蛋白质和核酸,最终导致细胞坏死。目前对高氧肺损伤机制研究普遍认为,高氧通过过氧化损害、氧自由基产生、炎症细胞和炎症因子等作用导致肺组织的病理

改变。本实验中肺损伤较重,而且比脑损伤明显。NH对CNS的病理损害,目前仅有关于突触和内皮细胞的研究报道^[12-13]。本研究结果显示,正常新生大鼠持续吸入纯氧24h可造成中枢神经元损伤,表现为神经元变性和脑组织水肿。病变部位主要在双侧大脑皮质,呈对称性改变,海马病变较轻,其他部位未见明显异常,提示NH对神经元的损伤具有部位选择性。实验

表明, NH 暴露短时间内, 脑组织氧自由基显著增加, 能造成脑组织氧化损伤。

氢作为自然界分子量最小的分子, 广泛地存在于宇宙和地壳中。为减少氮麻醉的发生, 氢已经用于饱和潜水中。虽然就有人尝试采用氢来治疗疾病早在1975年, 但是其医疗用途一直未被认可。2007年, Ohsawa I 等^[14]发现了呼吸2%氢气对大鼠脑缺血再灌注具有保护作用, 其主要与氢的选择性抗氧化相关。他们研究显示, 氢能选择性清除羟自由基和过氧亚硝酸, 而对其他自由基未见明显影响。而在体内, 羟自由基和过氧亚硝酸缺乏特异性的清除酶, 且其氧化性极强, 极易对组织造成损伤, 因此, 氢对上述两个自由基的选择性清除作用对保护组织损伤具有重要意义。此外, 氢能自由通过细胞膜, 与自由结合后生成水, 而无其他副产物, 同时, 氢的选择性抗氧化并未干扰细胞的正常代谢。随后, 不同研究在不同的模型中均证实了氢对其他疾病的保护性作用。本课题组前期研究显示在新生儿缺血缺氧模型中氢有保护作用。

本实验主要从病理学角度研究氢饱和生理盐水对慢性氧中毒的预防作用。本研究结果表明, 长时间氧暴露情况下, 给予含氢饱和生理盐水能预防氧对肺及脑组织的损伤, 其机制可能与氢的抗氧化性有关。至于氢对氧中毒的预防和/或保护作用的具体机制, 尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 袁莉. 高氧性肺损伤的研究进展[J]. 国外医学: 麻醉学与复苏分册, 2003, 24(3): 184-187.
- [2] 许峰, 霍泰辉, 翁颂铭. 高氧对早产鼠和成熟鼠肺损伤的研究[J].

实用儿科临床杂志, 2001, 16(2): 69-70.

- [3] 戈平, 姜毅. 常压高浓度氧对正常新生大鼠脑组织的影响[J]. 中华儿科杂志, 2000, 38(6): 390-391.
- [4] 赵秀侠, 姜红. 常压高浓度氧环境对早产大鼠脑损伤的影响[J]. 齐鲁医学杂志, 2008, 23(3): 241-243.
- [5] Cai J, Kang Z, Liu K, et al. Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia — ischemia rat model[J]. Brain Res, 2009, 1256(2): 129-137.
- [6] Sun Q, Cai J, Kang Z, et al. Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Exp Biol Med, 2009, 234(10): 1212-1219.
- [7] Schaal S, Beiran I, Rubinstein I, et al. Lenticular oxygen toxicity [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(8): 3476-3484.
- [8] Brown L H. Pulmonary oxygen toxicity[J]. Focus Crit Care, 1990, 17(1): 68-75.
- [9] Bitterman N. CNS oxygen toxicity[J]. Undersea Hyperb Med, 2004, 31(1): 63-72.
- [10] Chan P H. Role of oxidants in ischemic brain damage[J]. Stroke, 1996, 27(6): 1124-1129.
- [11] Lesser M P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology[J]. Annu Rev Physiol, 2006, 68(1): 253-278.
- [12] Gordon-Majszak B W, Gajkowska B. Biochemical and morphological changes in rat brain synaptosomes after expose to normobaric hyperoxia in vivo[J]. Exp Toxic Pathol, 1992, 44(2): 96-101.
- [13] Shaikh A Y, Xu J, Wu Y, et al. Melatonin protects bovine cerebral endothelial cells from hyperoxia-induced DNA damage and death[J]. Neurosci Lett, 1997, 229(3): 193-197.
- [14] 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.

(编辑: 冀凯宏)

(上接 309 页)

参考文献

- [1] Phillips D J. New developments in the biology of inhibins, activins and follistatins [J]. Trends Endocrinol Metab, 2001, 12(3): 94-96.
- [2] Matzuk M M, Lu N, Vogel H, et al. Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin [J]. Nature, 1995, 374(6520): 360-363.
- [3] Buckingham M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates [J]. Curr Opin Genet Dev, 2006, 16(5): 525-532.
- [4] Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, et al. Follistatin complexes myostatin and antagonises myostatin-mediated inhibition of myogenesis [J]. Dev Biol, 2004, 270(1): 19-30.
- [5] Nieuwkoop P D, Faber J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin) 2nd ed. N. hollan; Garland Publishing Inc, New York.
- [6] Khokha M K, Yeh J, Grammer T C, et al. Depletion of three BMP antagonists from Spemann's organizer leads to a catastrophic loss of dorsal structures [J]. Dev Cell, 2005, 8(3): 401-411.
- [7] Sater A K, Jacobson A G. The specification of heart mesoderm occurs during gastrulation in *Xenopus laevis* [J]. Development,

1989, 105(4): 821-830.

- [8] Shi Y, Katsev S, Cai C, et al. BMP signaling is required for heart formation in vertebrates [J]. Dev Biol, 2000, 224(2): 226-237.
- [9] Scott I C, Steiglitz B M, Clark T G, et al. Spatiotemporal expression patterns of mammalian chordin during postgastrulation embryogenesis and in postnatal brain [J]. Dev Dyn, 2000, 217(4): 449-456.
- [10] Suasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, et al. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. [J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(5): 607-611.
- [11] Bram van W, Antoon F M Moorman, Maurice J B. et al. Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation [J]. Cardiovasc Res, 2007, 74(2) 244-255.
- [12] Mohun T, Orford R, Shang C. The origins of cardiac tissue in the amphibian, *Xenopus laevis* [J]. Trends Cardiovasc Med, 2003, 13(6): 244-248.
- [13] Patel K. Follistatin [J]. Int J Biochem Cell Biol, 1998, 30(10): 1087-1093.

(编辑: 冀凯宏)