

# 氢气饱和生理盐水对肺型氧中毒保护效应的研究

郑娟 刘刊 蔡建美 徐伟刚 李润平 陶恒沂 孙学军

**【摘要】** 目的 研究氢气饱和生理盐水对肺型氧中毒的影响。方法 Sprague-Dawley 大鼠持续暴露于浓度大于 98% 的氧(0.25 MPa, 5 h)中,持续小流量通风,制备肺型氧中毒模型。动物分组:常压空气对照组、生理盐水模型组、氢气饱和生理盐水模型组。应用 HE 染色观察肺部形态学变化,检测支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中总蛋白含量以及总细胞计数。结果 与生理盐水组相比,氢气饱和生理盐水明显减轻高压氧造成的肺损伤,减轻肺组织病理学损伤,减少炎细胞浸润,减少 BALF 中蛋白含量。结论 氢气饱和生理盐水可以减轻肺型氧中毒的损伤。

**【关键词】** 氢气饱和生理盐水; 高压氧; 肺损伤; 肺型氧中毒

**Protective effect of saturated hydrogen saline on pulmonary oxygen toxicity induced by hyperbaric oxygen exposure** ZHENG Juan, LIU Kan, CAI Jian-mei, XU Wei-gang, LI Run-ping, TAO Heng-yi, SUN Xue-jun. Department of Diving Medicine, Faculty of Naval Medicine, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of saturated hydrogen saline on pulmonary oxygen toxicity induced by hyperbaric oxygen exposure. **Methods** Sprague-Dawley (SD) rats were exposed to hyperbaric environment with 98% oxygen concentration at 0.25 MPa for 5 hours to develop the model of pulmonary oxygen toxicity. The animals were randomly divided into 3 groups: the normal air control group, the saline group, and the saturated hydrogen saline group. Hematoxylin and eosin (H&E) staining were used to observe morphological changes in the lung and measure the concentration of protein and total cell counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). **Results** Microscopy revealed that pulmonary impairment in the saturated hydrogen saline group was obviously less severe than that of the saline group. Saturated hydrogen saline could markedly alleviate pathological lesion in the lung tissue, ease inflammatory cell infiltration and decrease total cell and protein concentrations in BALF. **Conclusions** Saturated hydrogen saline could alleviate pulmonary lesion induced by hyperbaric oxygen exposure.

**【Key words】** Saturated hydrogen saline; Hyperbaric oxygen; Lung lesion; Pulmonary oxygen toxicity

潜水作业与临床治疗中常常接触到高分压氧,长期暴露于高浓度氧可对机体造成损伤。肺脏是氧毒性作用的主要靶器官之一。常压下,持续暴露于 0.1 MPa 的纯氧达 72 h 可使大鼠死于呼吸衰竭。暴露于 0.2 ~ 0.4 MPa 的高压氧可致肺脏发生形态学改变,如肺水肿、充血、肺泡内出血<sup>[1]</sup>。最近研究发

现,氢气是一种有效的抗氧化剂<sup>[2]</sup>,可选择性地清除羟自由基。Sato 研究小组也发现氢气饱和水能抑制基因剔除小鼠超氧化物的形成<sup>[3]</sup>。但有关氢气饱和生理盐水对肺型氧中毒效应的研究尚鲜见报道。本研究旨在观察氢气饱和生理盐水对高压氧暴露所致肺脏损伤的影响。

## 材料和方法

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, Sprague-Dawley (SD) 大鼠购于上海市中国科学院动物中心, BCA 蛋白定量试剂盒购于

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-6906.2009.04.002

基金项目:国家自然科学基金课题(30500579)

作者单位:200433 上海,第二军医大学海军医学系潜水医学教研室

江苏碧云天生物技术公司,氧气购于上海市江南气体公司,氢气购于上海基量标准气体有限公司。

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,将纯氢气溶解于正常生理盐水中达到饱和水平,4℃贮存。

3. 肺型氧中毒模型的制备:雄性 SD 大鼠 36 只,体质量 270 g 左右,随机分为 3 组,每组 12 只:A 组为常压空气组,B 组为高压氧 + 生理盐水组,C 组为高压氧 + 氢气饱和生理盐水组。高压氧暴露方案为 0.25 MPa,持续 5 h,持续微量通风并预先放置 CO<sub>2</sub> 吸收剂以防 CO<sub>2</sub> 积聚过多 (<0.05%),O<sub>2</sub> 每小时测定 1 次。动物进舱前腹腔注射生理盐水和氢气饱和生理盐水(0.6 ml/kg)。动物进舱后,纯氧洗舱 5 min,使舱内 O<sub>2</sub> 浓度 >98%,以 0.1 MPa/min 的速率加压至 0.25 MPa。暴露 5 h 后,动物出舱,进行指标测定<sup>[3]</sup>。

4. 肺组织病理学检查:动物处死后,取右肺下叶,用 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,切片,HE 染色。染色后用倒置相差显微镜观察其病理改变。

5. 肺泡灌洗液中蛋白含量和总细胞数的测定:实验结束后,腹主动脉放血,小心分离气管及主支气管,在近气管分叉处结扎右侧主支气管,然后进行气管插管,左肺以 4 ml 预冷无菌生理盐水进行肺泡灌洗,重复 3 次,收集每次灌洗液,1000 r/min 离心 10 min,收集上清贮存在 -80℃ 冰箱。蛋白定量按 BCA 蛋白定量试剂盒操作,取新鲜上清液用血细胞计数器进行细胞计数。

6. 统计学处理:所有数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,均数间的两两比较采用 SNK-q 检验。

### 结 果

1. 氢气饱和生理盐水对肺组织形态学的影响:高压氧暴露 5 h 后,处死动物,取整个肺脏,肉眼见生理盐水组肺体积明显增大,表面有多个散发出血点,水肿明显。HE 染色结果显示:肺泡腔不够完整,肺毛细血管扩张、充血,支气管上皮变形严重,且肺间质和肺泡腔内有红细胞渗出和大量炎性细胞浸润。氢气饱和生理盐水组与生理盐水组相比,上述病理改变明显减轻(图 1)。

2. 氢气饱和生理盐水对 BALF 中蛋白含量和总细胞数的影响:结果显示,氢气饱和生理盐水组 BALF 中蛋白含量和总细胞数与生理盐水组比较差

异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而与对照组比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 2、3)。

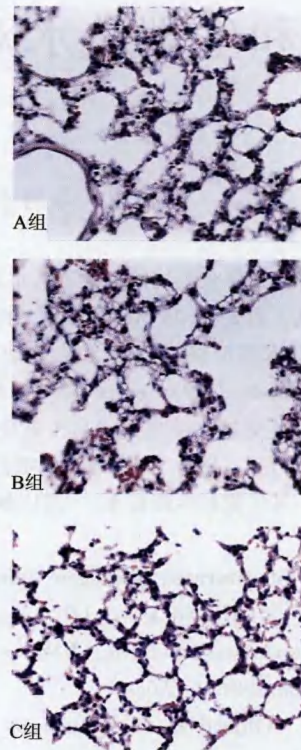
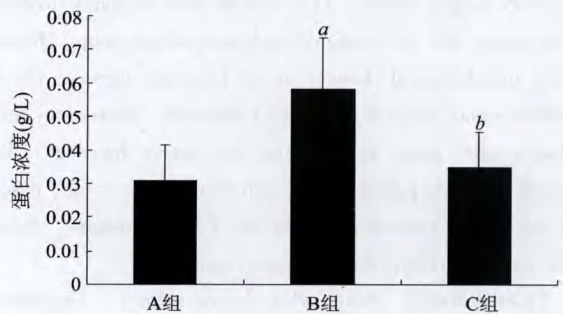
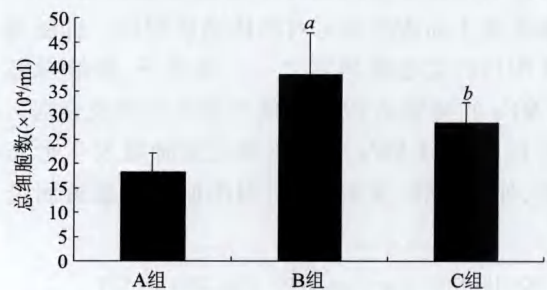


图 1 氢气饱和生理盐水对各组肺损伤的影响(HE × 200)



注:与 A 组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 B 组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 2 氢气饱和生理盐水对肺泡灌洗液中蛋白浓度的影响



注:与 A 组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 B 组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 3 氢气饱和生理盐水对肺泡灌洗液总细胞数的影响

## 讨 论

肺型氧中毒表现为肺部出现充血、出血和炎细胞浸润等炎症表现<sup>[4]</sup>。本项研究结果显示,动物经过高压氧(0.25 MPa)暴露 5 h 后,肺脏明显水肿,体积增大,表面有多个散在出血点,HE 染色显示炎细胞浸润和红细胞渗出,肺泡腔扩大,肺毛细血管上皮变形,这些进一步验证了高压氧暴露造成的肺损伤与炎症类似,与文献报道一致,说明模型制备成功。

近两年,多个研究小组发现氢气有抗氧化的作用,对缺氧损伤、缺血再灌注、器官移植等都有保护作用<sup>[5-9]</sup>。此外,饮用饱和氢气水可治疗应激引起的神经损伤、药物中毒、人类 2 型糖尿病患者和小鼠基因缺陷慢性氧化应激损伤<sup>[10]</sup>。目前,尚未见氢气对氧中毒影响的报道。本研究以肺型氧中毒为模型,研究氢气饱和生理盐水对高压氧诱导肺损伤的影响。

由于肺型氧中毒与肺脏炎症反应类似,因此作者选择研究肺炎损伤常用的指标,如肺脏病理形态学、BALF 灌洗液中总蛋白和总细胞数的检测等。BALF 的检测可以客观有效地评价肺脏损伤,并且可以直接反应病变,所以在肺脏的基础研究中,此项检测显得尤为重要<sup>[11]</sup>。在本项研究中,生理盐水组 BALF 中总蛋白和细胞数明显升高,表明肺脏毛细血管通透性增高;而给予饱和氢气生理盐水预处理后,可以减少蛋白质和炎细胞的渗出,减轻高压氧暴露造成的肺通透性损伤。

综上所述,氢气饱和生理盐水对高压氧暴露诱导的肺损伤具有保护作用,但仅仅局限为效应研究。由于肺型氧中毒损伤机制涉及氧化损伤和肺毛细血管内皮细胞的凋亡,下一步作者将着重从这两个方面继续深入研究氢气的作用机制,以期寻找防治氧中毒的新策略奠定一定的实验基础。

## 参 考 文 献

- [1] Newman TS. Bennett and Elliott's physiology and medicine of diving. Flagstaff, AZ: Best Publishing, 2003:1.
- [2] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med*, 2007, 13(6):688-694.
- [3] Kajiyama S, Amano A, Kondo Y, et al. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375(3):346-350.
- [4] 王世锋,王文波,吴苏舒. 肺型氧中毒小鼠肺组织巨噬细胞炎症蛋白-2 mRNA 表达的改变. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2007, 13(4):239-242.
- [5] Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, et al. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia - reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373(1):30-35.
- [6] Cai J, Kang Z, Liu WW, et al. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia - ischemia rat model. *Neurosci Lett*, 2008, 441(2):167-172.
- [7] Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, et al. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *Am J Transplant*, 2008, 8(10):2015-2024.
- [8] Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, et al. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(4):1195-1198.
- [9] Zheng XF, Mao YF, Cai JM, et al. Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Res*, 2009, 43(5):478-484.
- [10] Sato Y, Kajiyama S, Amano A, et al. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375(3):346-350.
- [11] 王世锋,王文波,朱嘉. 高压氧对小鼠支气管肺泡灌洗液髓过氧化物酶活性的影响. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2005, 12(2):121-122.

(收稿日期:2009-06-02)

(本文编辑:张阵阵)

[1] Clark JM, Thom SR. Oxygen under pressure//Brubakk AO,

## 更正

本刊 2009 年第 2 期《角膜穿通伤合并海水浸泡致房水肿瘤坏死因子- $\alpha$  含量变化的实验研究》一文中,第 83 页第 15 行“无统计学意义”为“有统计学意义”。参考文献[5]应为“De Vos AF, Van MAC, Verhagen C, et al. Kinetics of intraocular tumor necrosis factor and interleukin-6 in endotoxin induced uveitis in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(4):1100-1106.”

特此更正。

(本刊编辑部)