文章编号:1000-5404(2006)22-2223-04

论著

氧自由基在大鼠硫芥中毒复合烧伤小肠损伤中的影响

王海燕[1],张黎明[2],朱明学[2],董兆君[1] ([1]第三军医大学军事预防医学院防化教研室,重庆 400038;[2]第二军医大学海军医学系防化教研室,上海 200433)

提 要:目的 探讨氧自由基在硫芥中毒复合烧伤对大鼠小肠损伤中的作用。**方法** SD大鼠随机分为对照组、单纯硫芥中毒组、30% TBSA Ⅲ度烧伤组、中毒复合烧伤组,观察动物致伤后2、6、12、24、48、72 h血浆二胺氧化酶(DAO)活性、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、回肠组织病理学的改变情况。**结果** 单纯及复合伤均导致动物外周血中SOD活力明显下降($P<0.01$),MDA含量、DAO活性显著上升($P<0.01$),复合致伤组与单纯烧伤以及单纯中毒组有明显差异($P<0.01$);致伤后小肠组织结构损伤明显,损伤程度与损伤时间呈正相关,复合伤组的改变较相同时相点单纯损伤组明显。**结论** 硫芥全身中毒早期,小肠即受到损伤,在复合烧伤的情况下所导致的该损伤更为严重,氧化应激反应也更为剧烈。提示自由基与硫芥中毒复合烧伤对大鼠小肠的损伤关系密切。

关键词:硫芥;烧伤;复合伤;回肠;氧自由基
中图法分类号:R574.502;R644;R827.174 **文献标识码**:A

Effect of OFR on small intestinal injury in rats exposed to sulfur mustard and burn

WANG Hai-yan[1], ZHANG Li-ming[2], ZHU Ming-xue[2], DONG Zhao-jun[1] ([1]Department of Military Toxicology, College of Preventive Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of oxygen free radical (OFR) on the injury of small intestine in rats treated with burn, sulfur mustard or sulfur mustard plus burn. **Methods** Totally 95 SD rats were randomly divided into four groups: 30 rats subjected to 30% third-degree TBSA scalding (B), 30 injected subcutaneously with 2 ml/kg sulfur mustard (S), 30 subjected to both (SB), 5 as normal controls (C). Activity of diamine oxidase (DAO) and superoxide dismutases (SODs), contents of malonaldehyde (MDA) in plasma, and pathological changes of ileum at 2, 6, 12, 24, 48, 72 h after injury were observed. **Results** Three treatments could induce significant decrease of activity of SODs ($P<0.01$) and significant increase of DAO activity and MDA contents in plasma ($P<0.01$), as compared with controls. The lesions of different degree were found in ileal specimens of three treated groups, severer in SB group than the other three groups ($P<0.01$), and there was a direct correlation between injury degree and the time after injury. **Conclusion** The complex injury of sulfur mustard intoxication and burn may produce more severe lesions in small intestine and high level of oxidative stress in rats than those induced by burn or sulfur mustard alone. OFR may play an important role in the injury due to burn and/or sulfur mustard.

Key words: sulfur mustard; burns; combined injury; ileum; oxygen free radical

硫芥(sulfur mustard, SM)是烃化作用很强的化学物质,战时可以用做糜烂性化学战剂,平时因突发泄露也可以造成大批人员中毒。我国有大量战争遗弃的硫芥弹药,殉爆时不仅导致中毒,还可能产生爆炸伤、烧伤等各种复合伤。硫芥全身吸收中毒可引起消化道损伤,出现腹泻、血便和脱水,肠道的病理改变及消化道症状与动物死亡率关系密切。有作者称这种中毒为肠型芥子气中毒[1]。肠道是应激时的中心器官,烧伤后氧自由基引起肠黏膜受损,体内的氧化应激水平可部分反应肠道损伤程度[2]。目前国内外关于硫芥中毒复合烧伤对消化道的损伤尚无系统的研究报道。本实验以烫伤复制深Ⅲ度烧伤模型,以研究联合损伤条件下大鼠血浆氧化应激水平及其伤情变化规律,以期

基金项目:全军医学科学技术研究"十五"计划指令性课题(011L054)
Supported by the Medical Research Projects of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA (011L054)
作者简介:王海燕(1976-),女,重庆市人,硕士研究生,技师,主要从事化学毒剂复合伤方面的研究。电话:(023)68752356,E-mail:whywang@yahoo.com
通讯作者:董兆君,电话:(023)68752285,E-mail:dongzj@163.com
收稿日期:2005-12-06;**修回日期**:2006-03-16

为硫芥烧伤复合伤的临床救治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

蒸馏硫芥，纯度97.5%，由军事医学科学院毒物药物研究所提供，实验当天以无菌生理盐水稀释至所需浓度。O-dianisidine(邻联茴香胺)、cadaverine dihydrochloride (盐酸腐胺)、二胺氧化酶(Diamine oxidase, DAO)均为Sigma公司产品，SOD、MDA检测试剂盒采用南京建成生物工程研究所产品。其他试剂为国产分析纯。图像采集使用日本尼康E600荧光显微镜照相系统。Spectrumlab 22pc型可见光分光光度计购自上海棱光技术有限公司。

1.2 实验动物及分组

健康成年SD大鼠95只，雌雄各半，体质量(200±20)g，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供，实验动物许可证号SCXK-(军)2002-008。动物进入实验室后常规饲料喂养，检疫3 d。致伤前禁食12 h，自由饮水。

将动物随机分为正常对照组(C)、单纯烧伤组(B)、单纯硫芥染毒组(S)、硫芥染毒复合烧伤组(SB)4组。除正常对照组外，其余各组下均设置2、6、12、24、48、72 h 6个时间组。每组5只。其中C组采用室温水和生理盐水来代替烫伤和硫芥注射。

1.3 动物致伤模型的建立

大鼠经腹腔注射1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉，按照2 ml/kg容积皮下注射硫芥。按照第三军医大学西南医院全军烧伤研究所常规方法复制烧伤模型。主要步骤是：大鼠背部电推脱毛后，将脱毛区置于(92±1)℃水浴中18 s，造成30%全身体表面积(total body surface area, TBSA)深Ⅲ度烧伤(病理切片证实)。伤后立即按每1%烧伤面积补液量2 ml/kg腹腔注入生理盐水抗休克。伤后动物分笼饲养，自由进食饮水。复合伤动物即在复制烫伤模型后立刻皮下注射硫芥，剂量为0.8 LD_{50}(4 mg/kg)。

1.4 血浆二胺氧化酶(DAO)活性测定

据文献[3]采用改良DAO化学比色分光光度法测定法测定大鼠血浆DAO活性。

1.5 血浆自由基测定

分别采用黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶法、硫代巴比妥酸法，按南京建成生物工程研究所提供的测定试剂盒说明书测定血浆超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)浓度。

1.6 组织病理学检测

在距回盲部5 cm处截取回肠组织1.5 cm，冷生理盐水清洗干净，置10%甲醛液固定，常规石蜡包埋切片，厚度5 μm，HE染色，光镜下观察。

1.7 统计学处理

数据以$x \pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件进行双因素方差分析和t检验。

2 结果

2.1 血浆DAO活性变化

表1显示单纯致伤及复合伤均可导致大鼠血浆中DAO活力上升($P<0.01$)。与C组相比，B、S、SB组血浆DAO活力均在致伤后2 h即上升，分别为C组的312.99%、296.10%、309.09%。B、SB组中6 h达到高峰，分别为组的327.27%、345.45%，S组12 h达到高峰，为C组的310.39%。此后逐渐下降，72 h达到最低，但仍高于C组水平，分别为C组的218.18%、254.54%、198.70%。致伤后48 h S组血浆DAO活力显著高于B、SB组($P<0.05$,0.01)，72 h S组血浆DAO活力仍显著高于SB组($P<0.05$)。

表1 大鼠血浆DAO活力的变化(U/ml, $n=5$, $x \pm s$)

组别	致伤后时间(h)						
	0	2	6	12	24	48	72
正常对照组(C)	0.77±0.03	–	–	–	–	–	–
单纯烧伤组(B)	–	2.41±0.02[a]	2.52±0.23[a]	2.44±0.37[a]	2.36±0.21[a]	1.81±0.11[a]	1.68±0.12[a]
单纯硫芥染毒组(S)	–	2.28±0.03[a]	2.35±0.08[a]	2.39±0.01[a]	2.21±0.08[a]	2.04±0.04[abc]	1.96±0.17[ad]
硫芥染毒复合烧伤组(SB)	–	2.38±0.13[a]	2.66±0.11[a]	2.30±0.10[a]	2.13±0.04[a]	1.75±0.07[a]	1.53±0.04[a]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.05$，与同时相点单纯烧伤组比较；c：$P<0.01$，d：$P<0.05$，与同时相点硫芥染毒复合烧伤组比较

2.2 血浆SOD活力的变化

SOD检测结果(表2)显示，正常大鼠血浆SOD活力为(269.52±3.60)U/ml。与C组相比，B、S组大鼠血浆SOD活力均出现明显降低($P<0.01$)，SB组SOD活力降低更为显著。B、S、SB组血浆SOD活力均在致伤后2 h出现下降，分别为C组的76.05%、77.55%、67.36%；6 h出现不同程度的恢复，分别为C组的88.95%、88.31%、70.34%。此后继续下降并持续至72 h达到最低水平，分别为C组的71.23%、72.47%、56.75%。各致伤时相点内，SB组大鼠血浆SOD活力显著低于B、S组($P<0.01$)。

2.3 血浆MDA含量的变化

MDA检测结果(表3)显示，正常大鼠血浆MDA含量为(3.80±0.03)nmol/ml。与C组相比，B、S组大鼠血浆MDA含量均出现明显升高($P<0.01$)，SB组MDA含量升高更为显著。B、S、SB组血浆MDA含量均在致伤后2 h出现升高，分别为对照组的168.68%、156.84%、211.58%。B、S组大鼠血浆MDA含量均持续升高并在24 h达到高峰，分别为C组的284.47%、238.42%，此后开始下降，至72 h仍显著高于C组水平，分别为C组的210.79%、214.21%。SB组大鼠血浆MDA含量在6 h略有恢复，此后持续性升高并在24 h达到高峰，为C组的309.21%，然后缓慢下降至72 h仍显著高于C组水平，为C组的264.74%。除12 h外，各致伤时相点，SB组大鼠血浆MDA含量显著高于B、S组($P<0.01$)。

表 2　各组大鼠血浆 SOD 活力的变化（U/ml，$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

组别	致伤后时间（h）						
	0	2	6	12	24	48	72
正常对照组（C）	269.52 ± 3.60	–	–	–	–	–	–
单纯烧伤组（B）	–	204.96 ± 14.04^{ab}	239.75 ± 3.60^{ab}	220.44 ± 10.69^{ab}	210.61 ± 6.25^{ab}	203.41 ± 5.69^{ab}	191.99 ± 4.38^{ab}
单纯硫芥染毒组（S）	–	209.02 ± 3.76^{ab}	238.00 ± 5.43^{ab}	225.69 ± 8.23^{ab}	214.70 ± 4.55^{ab}	202.15 ± 4.00^{ab}	195.33 ± 3.04^{ab}
硫芥染毒复合烧伤组（SB）	–	181.54 ± 2.87^{a}	189.57 ± 11.51^{a}	183.03 ± 5.55^{a}	179.00 ± 6.00^{a}	169.36 ± 7.15^{a}	152.96 ± 3.90^{a}

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与同时相点硫芥染毒复合烧伤组比较

表 3　各组大鼠血浆 MDA 活力的变化（nmol/ml，$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

组别	致伤后时间（h）						
	0	2	6	12	24	48	72
正常对照组（C）	3.80 ± 0.03	–	–	–	–	–	–
单纯烧伤组（B）	–	6.41 ± 0.08^{ab}	7.67 ± 0.15^{ab}	10.00 ± 0.08^{a}	10.81 ± 0.14^{ab}	8.84 ± 0.14^{ab}	8.01 ± 0.34^{ab}
单纯硫芥染毒组（S）	–	5.96 ± 0.14^{ab}	6.06 ± 0.28^{ab}	6.89 ± 0.44^{a}	9.06 ± 0.11^{ab}	8.86 ± 0.26^{ab}	8.14 ± 0.17^{ab}
硫芥染毒复合烧伤组（SB）	–	8.04 ± 0.15^{a}	7.94 ± 0.06^{a}	10.50 ± 0.13^{a}	11.75 ± 0.07^{a}	10.99 ± 0.17^{a}	10.06 ± 0.23^{a}

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与同时相点硫芥染毒复合烧伤组比较

2.4　肠黏膜损伤情况

大鼠对照组回肠绒毛形态正常，排列整齐，上皮细胞完整，表面平滑（图 1）。各组伤后小肠绒毛萎缩变短，肠黏膜固有层水肿、扩张，炎细胞浸润，黏膜上皮下出现囊性间隙，中央乳糜管明显扩张，随着致伤时间的延长，肠黏膜损伤更加明显，黏膜上皮细胞出现变性坏死、脱落，固有层裸露。SB 组肠黏膜损伤较单纯致伤组更为严重，并可见毛细血管扩张、充血，固有层崩解，出血并有溃疡形成，隐窝消失（图 2）。



图 1　正常对照组大鼠的小肠形态　（HE × 200）

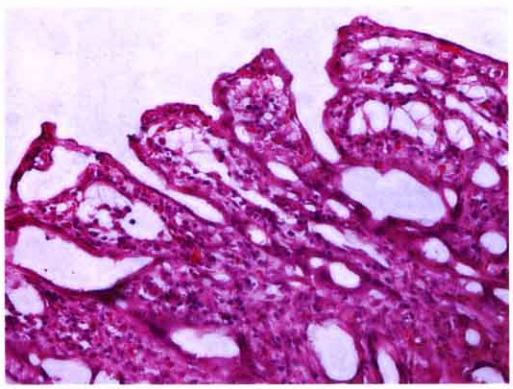


图 2　硫芥染毒复合烧伤组大鼠的小肠形态　（HE × 200）

3　讨论

硫芥中毒死亡原因是复杂的，其中，消化道结构和功能的损伤是重要因素之一。吕挺等[4]实验表明低于 LD_{50} 的染毒剂量已经能够引起肠道的损伤，小肠黏膜上皮细胞分裂受抑制，肠黏膜坏死脱落，露出溃疡创面，血浆和组织液不断渗出，严重时可造成低血容量性休克。本实验观察到，在中毒复合烧伤时，肠道的上述变化更为加剧。说明这两种性质的损伤共同作用，对机体产生的打击超过任何一种单纯损伤，可能是增加硫芥毒性的重要原因[5]。

DAO 是一种细胞内酶，存在于人和其他哺乳动物的小肠绒毛上，与肠核酸和蛋白合成紧密相关[6]。血中 DAO 来源肠上皮细胞，其活性增加与细胞受损后的膜通透性升高及细胞坏死、脱落有关，能更直接地反映肠上皮细胞和由此构成的肠屏障结构的受损状况。已有研究表明 DAO 活性在严重烧伤的患者血浆中显著增加，血浆 DAO 活性已被用以反映严重创伤下肠黏膜的改变[3]。本实验证实，烧伤大鼠血浆 DAO 活性在烧伤后 6 h 达到高峰，此后逐渐下降，至 72 h 仍未恢复到对照水平，与文献报道的结果基本一致。本研究表明，硫芥中毒后 2 h 血浆 DAO 即由 C 组的（0.77 ± 0.03）U/ml 升高至（2.28 ± 0.03）U/ml，中毒后 12 h 达到高峰，尔后逐渐下降，但下降速度比烧伤速度慢，至 48 h 仍显著高于 B 组。结合病理实验结果可以认为，0.8 LD_{50} 硫芥中毒可引起严重的肠道损伤，其持久时间可能比单纯烧伤还要长。

本实验显示，硫芥中毒复合烧伤动物血浆 DAO 水平在 2 ~ 72 h 均显著高于 C 组，提示也有明显的肠道

损伤。特别在早期阶段(6 h),血浆 DAO 活性略高于单纯烧伤和单纯中毒。但复合伤所引起的 DAO 活性变化在12 h 即开始下降,48 h 和72 h 也低于单纯烧伤和单纯中毒动物血浆 DAO 活性。由于血中 DAO 活性改变是 DAO 由肠上皮细胞释放与肠黏膜通透性增加因素的动态变化相结合的结果,故造成这种结果的原因有两种可能:一是硫芥与烧伤对肠道造成的复合效应恢复较快;二是复合效应严重,损伤的肠上皮细胞内 DAO 耗竭,因此由上皮细胞内释放出的 DAO 绝对量减少致使血浆中 DAO 活性降低。其详细机制尚待深入探讨。

胃肠道黏膜上皮细胞在全身组织中的更新代谢率较快,细胞的增长、分化、移行和凋亡过程易受多种因素影响,烧伤、感染、放疗、中毒及禁食等均可导致黏膜损伤。文献[7]报道硫芥对增殖旺盛的细胞有明显的细胞毒性作用。硫芥导致肠道结构损伤的原因仍不十分清楚,一般认为与硫芥对 DNA 的烃化反应有密切关系。有研究表明低剂量硫芥能激发 PMNs 释放 ROS,硫芥使细胞生成 ROS 显示出剂量依赖性[8]。本室前期研究显示随硫芥中毒时间的延长,细胞内出现了氧化应激状态的变化,细胞中毒产生的活性氧参与了硫芥的细胞毒性[9]。已知烧伤所造成的胃肠道损伤与应激有关。肠道是应激时的中心器官,烧伤后由于应激反应肠黏膜屏障受到损害。一般认为缺氧缺血是这一病理过程的中心环节[10]。

由于肠黏膜上皮细胞富含黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO),故当肠黏膜发生缺血-再灌注后,将产生大量来源于黄嘌呤氧化酶系统的氧自由基,氧自由基能攻击生物膜磷脂中的多不饱和脂肪酸(PUFA),形成脂质自由基和脂质过氧化物。此反应可反复进行,从而导致脂质不断消耗和脂质过氧化物的大量生成,并最终损伤肠黏膜上皮细胞。血浆超氧化物歧化酶(SOD)是氧自由基的清除酶,在防止氧代谢物的损伤中具有重要作用。MDA 是脂质过氧化物的一种,是氧自由基损害生物膜的产物,因而 MDA 的含量常可反映自由基对组织造成的损害程度。在本实验中,我们发现烧伤复合硫芥中毒后,大鼠血浆 MDA 含量增加($P<0.01$),SOD 活力下降($P<0.01$),除 12 h 的 MDA 含量外,各指标的变化幅度远大于单纯烧伤或单纯硫芥中毒的效应,提示硫芥中毒和烧伤对机体的氧化应激水平的影响可能具有联合效应。

我们在实验中观察到单纯硫芥染毒与烧伤后肠道的损伤情况具有类似的改变,故推测其有相似的致伤机制。目前国内外已有诸多研究表明氧自由基与肠黏膜屏障的损伤关系密切,以自由基清除剂进行预防治疗实验,可明显减轻肠黏膜的损伤程度,减少肠道细菌的移位数量及炎性细胞因子的形成[11]。鉴于硫芥中毒、烧伤对肠道的致伤机制现有多种假设且尚不能确定,通过研究其致伤机制,特别是针对其共同致伤机制将更有助于复合伤的临床救治。

综上所述,硫芥全身中毒早期,小肠即受到损伤,且相同剂量染毒并伴烧伤导致的小肠损伤较单纯中毒更为严重。全身性氧化应激水平可反映该损伤程度,自由基在该损伤中可能具有促进作用。

(致谢:本实验在组织切片制作及病理学观察方面得到第三军医大学慧康组织学技术中心陈德英老师的大力帮助,在此深表谢意!)

参考文献:

[1] 杨进生,张理汉,郑凤仙,等. 小白鼠致死量芥子气吸收中毒死因的探讨[J]. 卫生毒理学杂志,1997, 11(1): 28-30.

[2] OCAL K, AVLAN D, CINEL I, *et al*. The effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in intestine and bacterial translocation after thermal injury[J]. Burns, 2004, 30(8): 778-784.

[3] PENG X, YAN H, YOU Z, *et al*. Effects of enteral supplementation with glutamine granules on intestinal mucosal barrier function in severe burned patients[J]. Burns, 2004, 30(2): 135-139.

[4] 吕 挺,赵炎军,张海云,等. 芥子气染毒剂量及防治药物筛选实验的研究[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(4): 426-428.

[5] 曾 惠,刘 勇,朱明学,等. 低剂量硫芥诱导大鼠脾脏氧化应激状态的改变[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(14): 1421-1423.

[6] KITANAKA J, KITANAKA N, TSUJIMURA T, *et al*. Expression of diamine oxidase (histaminase) in guinea-pig tissues[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 437(3): 179-185.

[7] LIN P P, BERNSTEIN I A, VAUGHAN F L. Bis(2-chloroethyl) sulfide (BCES) disturbs the progression of rat keratinocytes through the cell cycle[J]. Toxicol Lett, 1996, 84(1): 23-32.

[8] LEVITT J M, LODHI I J, NGUYEN P K, *et al*. Low-dose sulfur mustard primes oxidative function and induces apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes[J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(5): 747-756.

[9] 曾 惠,刘 勇,朱明学,等. 硫芥对大鼠淋巴细胞谷胱甘肽含量的影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(11): 940-942.

[10] 黎 鳌. 烧伤治疗学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 119-120.

[11] TAMION F, RICHARD V, BONMARCHAND G, *et al*. Reduced synthesis of inflammatory cytokines by a free radical scavenger after hemorrhagic shock in rats[J]. Crit Care Med, 2000, 28(7): 2522-2527

(编辑 汪勤俭)