论著

文章编号:1000-5404(2009)04-0294-03

密闭舱室内非金属材料燃烧释放有毒气体对大鼠肺组织通透性的影响

安 辉,孙 磊,周燕虹,郑有科,曹 佳 (第三军医大学军事预防医学院军事毒理学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 观察密闭舱室内非金属材料燃烧释放有毒气体对大鼠肺毛细血管通透性及肺表面活性物质相关蛋白A的影响。**方法** 建立密闭舱内动物烟雾吸入模型,将36只SD大鼠完全随机分为对照组及烟雾吸入后1、6、24、72 h和7 d组,观察吸入损伤后不同时相点肺组织的病理改变,肺水含量及肺通透指数的变化,采用RT-PCR法检测大鼠肺组织SP-A mRNA的表达。**结果** 烟雾吸入后大鼠肺组织病理改变与急性肺损伤样的病理改变特征相似,24 h为肺组织病理改变最严重期,在此期间动物的肺水含量也较对照组有明显增加($P<0.05$);肺泡灌洗液及血清中蛋白含量在烟雾吸入后不同时相点均增高,肺通透性指数在1、6 h和24 h显著高于对照组($P<0.05$);烟雾吸入后各时相点动物肺组织SP-A mRNA表达均降低,其中1、6、24 h和72 h组与对照组比较差异显著($P<0.01$)。**结论** 密闭舱室内非金属材料燃烧释放的毒性气体可引起肺泡毛细血管通透性的改变及肺表面活性物质相关蛋白A的降低,肺血管及间质之间液体交换障碍,导致肺水肿进而引发急性肺损伤。

关键词: 烟雾吸入;肺损伤;肺通透性;表面活性物质相关蛋白A

中图法分类号: R-331;R763.02;R827.12 **文献标识码:** A

Effect of poisonous gas produced from combustion of nonmetal materials on rat pulmonary microvascular permeability

AN Hui, SUN Lei, ZHOU Yan-hong, ZHENG You-ke, CAO Jia (Department of Military Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of poisonous gas produced from the combustion of nonmetal materials on the pulmonary microvascular permeability and the expression of surfactant-associated protein A (SP-A). Methods The model of injury from smoke inhalation in SD rat was set up propotionally scaling-down according to real cabin and operator. Thirty-six rats were randomly divide into 6 groups, namely control group, and the groups of 1, 6, 24 and 72 h, and 7 d following smoke inhalation respectively. The pathological changes in lung tissue were observed, and the lung water content and the index of pulmonary microvascular permeability were examined. The expression of SP-A mRNA in lung tissue were measured by real-time PCR. Results Histopathological observation revealed acute lung injury post-exposure, of which the most severe one was at 24 h post-exposure accompanied by significantly increased lung water content ($P<0.05$). The protein content of BALF and serum increased obviously after smoke inhalation, the index of pulmonary permeability in 1 h, 6 h and 24 h groups were obviously higher than that of control groups ($P<0.05$), while the expression of SP-A mRNA in lung tissue was significantly decreased at 1 h, 6 h, 24 h and 72 h ($P<0.01$). Conclusion Pulmonary microvascular permeability and the expression of SP-A can be significantly influenced by the poisonous gas produced by combustion of nonmetal cabin materials, which may induce the disordered function of liquid exchange between pulmonary blood vessel and interstitium, resulting in pulmonary edema and acute lung injury.

Key words: smoke inhalation; lung injury; pulmonary microvascular permeability; surfactant-associated protein A

坦克和装甲车等军事工事舱室内部环境狭小,是个相对密闭的空间,受到导弹或炮弹袭击后,其舱室内非金属材料可因高温燃烧,在迅速消耗氧气的同时释放大量烟雾。因此当密闭舱室内发生火灾时将产生比普通建筑物火灾更严重的后果,不完全燃烧的产物可导致作战人员死亡或不同程度的肺损伤[1]。肺表面

基金项目:全军医学科研"十一五"计划专项课题(06Z032)
Supported by the Research Project of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06Z032)
作者简介:安 辉,女,河北省石家庄市人,博士研究生,主要从事军事毒理学方面的研究。电话:(023)68772388
通信作者:曹 佳,电话:(023)68752271,E-mail: caojia@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2008-06-04;修回日期:2008-08-30

活性物质相关蛋白 A(surfactant-associated protein, SP-A)为亲水性蛋白,约占特异性结合蛋白(surfactant-associated protein, SP)的 50%,在调节磷脂的分泌和摄取,维持表面活性物质结构和功能的完整性等方面具有重要作用。既往的研究表明,烟雾吸入伤后可造成 SP-A mRNA 表达下降,并导致伤后 PS 功能受损引起肺损伤[2]。也有研究认为 SP-A 含量的降低可引起肺部炎症反应,磷脂的破坏加剧,从而使肺损伤恶化[3]。因此本研究以烟雾吸入性损伤大鼠为研究对象,观察烟雾吸入对肺毛细血管通透性及 SP-A 的影响,探讨其损伤机制,为相关人员采取合理的防护与救治措施提供重要的理论依据。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器

Bradford 蛋白浓度定量试剂盒为上海生工生物工程有限公司产品,Trizol 为美国 Invitrogen 公司产品,SP-A 及 β-actin 引物、PrimeScript™ RT Reagent Kit、SYBR ExScript™ RT-PCR Kit 均为大连 TaKaRa 工程有限公司产品。Spectra Max M2/M2e 酶标仪为美国 Molecular device 公司产品,紫外凝胶成像仪为美国 Gene 公司产品,ND-100 紫外分光光度计为美国 Nanodrop 公司产品,7300Real-Time PCR System 为美国 Applied Biosystems 公司产品。燃烧材料为坦克舱室内使用的 9 种非金属材料,由相关军事单位提供。燃烧箱与实验箱为本室自行设计和研制,由两边的循环管道相连,按照舱室实际体积和大鼠体积等比缩小[4]。

1.2　动物模型与实验分组

健康雄性 SD 大鼠 36 只(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),体质量(200 ± 20)g,按完全随机法分为 6 组,每组 6 只:正常对照组,吸入性损伤 1、6、24、72 h 和 7 d 组。将燃烧材料按一定的用量比剪成 10 mm × 10 mm 的小块置于燃烧箱内,用液化气炉点燃非金属材料发烟 3 min 后,将实验动物放入染毒箱内吸入染毒 10 min,然后将动物取出呼吸空气。

1.3　肺组织病理改变

取右肺上叶肺组织,迅速放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,然后进行石蜡包埋 HE 染色,光镜下观察肺组织病理学改变。

1.4　肺水含量测定

取右肺中叶,吸水纸吸干表面水分及血液,称质量。然后置于 80 ℃烤箱 72 h 后称量肺干质量,计算湿干质量比(W/D)。

1.5　肺通透指数的检测

股动脉收集血液于 10 ml 的无抗凝管中,2 500 r/min,4 ℃离心 10 min,分离血浆检测蛋白含量。开胸取出肺脏,寻找气管分叉,分离气管,结扎右侧主支气管,用冰生理盐水进行左肺肺泡灌洗,4 ml × 3 次,回收率大于 85%。将全部灌洗液收集,测总容量。然后将肺泡灌洗液离心(1 000 r/min, 4 ℃, 10 min),留取上清采用 Bradford 法测蛋白含量[5]。计算肺通透性指数 PPI = BALF 蛋白含量/血浆蛋白含量[6]。

1.6　RT-PCR 检测肺组织 SP-A mRNA 的表达

1.6.1　总 RNA 的提取　　将超低温冻存的右肺下叶部分组织(50 ~ 100 mg)称质量后迅速转移至用液氮预冷的研钵中,采用 Trizol 法提取总 RNA,用 ND-100 紫外分光光度计检测其浓度,并用 1% DEPC 水调整浓度至 500 ng/μl。

1.6.2　cDNA 的合成　　按照 PrimeScript™ RT Reagent Kit 说明将总 RNA 逆转录为 cDNA。

1.6.3　RT-PCR　　SP-A 上游引物 5′-AGGAGCTCCAGACTGAACTCTATGA-3′, 下游引物:5′-CTGACTGCCCATTGGTGGAA-3′,产物长度 123 bp;β-actin 上游引物:5′-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3′,下游引物:5′-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG -3′,产物长度 150 bp。反应体系 20 μl,反应条件为:94 ℃,5 min;40 个 PCR 循环(94 ℃,30 s;57 ℃,30 s;72 ℃,45 s)。结果计算采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 的计算方法[7]。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件对实验结果进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　烟雾吸入后不同时相点大鼠肺组织病理学改变

烟雾吸入后大鼠肺组织病理改变主要表现为肺间质水肿,弥漫性出血,肺泡腔内大量红细胞渗出和淋巴细胞的浸润,肺泡塌陷,以 24 h 组损伤最为严重;72 h 和 7 d 组可见部分肺泡壁断裂,肺泡腔增大形成肺大泡,出血和炎性渗出相对减少,在增宽的肺泡间隔内及小支气管周围可见梭形的成纤维细胞增生明显,并观察到肉芽肿的形成。各损伤组均可观察到黑色颗粒物的沉积,1、6 h 和 24 h 组主要沉积在小支气管内,72 h 和 7 d 组颗粒物呈弥漫性分布沉积在小支气管和肺泡腔内。见图 1。

2.2　烟雾吸入后不同时相点大鼠肺水含量的变化

烟雾吸入后动物肺水含量呈增加趋势,24 h 达峰值与对照组比较差异显著($P < 0.05$),随后逐渐降低,7 d 左右恢复至正常水平,其他烟雾吸入损伤组与对照组比较均无显著性差异($P > 0.05$,表 1)。

2.3　烟雾吸入后不同时相点大鼠肺通透性指数变化

肺泡灌洗液及血清中蛋白含量在烟雾吸入后不同时相点均增高。肺泡灌洗液中蛋白含量在吸入损伤后 1、6 h 和 24 h 明显高于对照组($P < 0.05$);血清中蛋白含量的变化趋势与 BALF 中类似,1、6 h 和 24 h 的蛋白含量与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$);肺通透性指数在 1、6 h 和 24 h 显著高于对照组($P < 0.05$,表 1)。

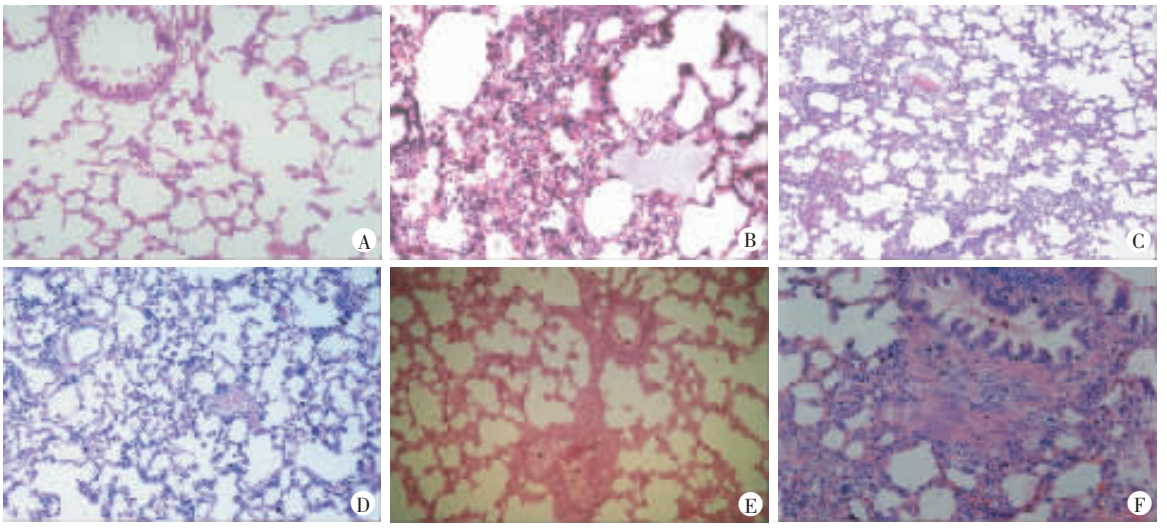
表 1　烟雾吸入后不同时相点大鼠肺水含量、肺泡灌洗液及血清中蛋白含量、SP-A 表达的变化情况($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	W/D	蛋白含量(μg/ml)		PPI	SP-A mRNA
		BALF	血清		
对照组	4.65 ± 0.21	90.7 ± 15.8	1 745.6 ± 87.1	0.26 ± 0.06	1.01 ± 0.15
吸入性损伤组					
1 h	4.88 ± 0.36	316.9 ± 100.1[a]	2 351.9 ± 191.5[b]	0.68 ± 0.23[a]	0.43 ± 0.08[b]
6 h	4.62 ± 0.14	402.6 ± 129.8[b]	2 379.4 ± 101.5[b]	0.84 ± 0.25[b]	0.14 ± 0.01[b]
24 h	5.42 ± 0.38[a]	314.7 ± 126.9[b]	2 356.1 ± 283.9[a]	0.66 ± 0.32[a]	0.08 ± 0.02[b]
72 h	4.77 ± 0.21	129.3 ± 58.9	2 041.8 ± 197.6	0.33 ± 0.21	0.12 ± 0.02[b]
7 d	4.90 ± 0.37	115.3 ± 22.8	1 995.1 ± 205.1	0.29 ± 0.11	0.80 ± 0.15

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$,与对照组比较

2.4　烟雾吸入后不同时相点大鼠肺组织 SP-A mRNA 的表达

烟雾吸入后各时相点动物肺组织 SP-A mRNA 表达均降低,24 h 组降低最为明显,随后 SP-A mRNA 表达呈增高趋势,其中 1、6、24 h 和 72 h 组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。



A:正常对照组;B:烟雾吸入后 1 h 组;C:烟雾吸入后 6 h 组;D:烟雾吸入后 24 h 组;E:烟雾吸入后 72 h 组;F:烟雾吸入后 7 d 组

图1 大鼠肺组织病理学观察 (HE×200)

3 讨论

完全或不完全燃烧时产生的烟雾是造成吸入性损伤的主要原因。烟雾作为损伤因素可以直接作用于肺泡膜引起直接的肺损伤,也可以通过激活中性粒细胞、巨噬细胞和血小板等引起间接的肺损伤。烟雾吸入后动物肺损伤的主要病理改变与急性肺损伤病理改变特征相似,24 h 为组织病理改变最严重期,在此期间动物的肺水含量也较对照组有明显增加。随着染毒后时间的延长,病理观察可见间质及肺泡内出血,炎细胞的浸润逐渐被吸收和吞噬,气管周围大量纤维母细胞的增生,及肺水含量的降低均提示肺组织开始自我修复的过程。我们同时测定了 BALF 和血清中蛋白的含量及通透性指数,与动物肺水含量的变化进行了比较,结果表明变化一致。提示烟雾吸入可导致肺组织损伤,发生肺水肿,进而形成急性肺损伤。杨天德等[8]采用^{131}I 标记的牛血清白蛋白测定大鼠烟雾吸入性损伤后肺血管通透性的变化及肺水含量的变化也是一致。

本实验结果显示,烟雾吸入后 SP-A 表达下降,提示肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)功能可能受到严重的破坏或抑制,其机制可能与肺泡Ⅱ型上皮细胞的损伤,肺泡毛细血管通透性增加有关。肺泡Ⅱ型上皮细胞变性及破坏,使 SP-A 蛋白合成和分泌减少,从而降低肺泡表面张力。既往的研究认为,SP-A 可用来评价肺气血屏障的完整性,也可作为急性肺损伤后Ⅱ型肺泡上皮细胞功能的早期指标,作为判断患者肺损伤程度的指标[9]。烟雾吸入后引起肺泡毛细血管通透性增加,可造成血管内大分子和 PS 双向漏出。一方面由于炎性细胞释放出大量弹性蛋白酶及漏出大量血浆蛋白均可使 SP-A 变性失活,从而引起表面张力降低;另一方面,SP-A 可通过通透性增加的肺毛细血管进入血循环,使 SP-A 减少。因而在合成减少和破坏增加的双重作用下使 SP-A mRNA 表达明显下降。我们前面实验测定了大鼠烟雾吸入后肺通透性的变化,与 SP-A mRNA 表达的变化进行比较,结果显示是一致的,在烟雾吸入后的 6 ~ 24 h 肺通透性指数最高,此时的 SP-A mRNA 表达也降至最低。

综上所述,有毒气体吸入导致肺泡血管通透性增加,SP-A 表达降低,进而使肺内气体和液体交换障碍。

参考文献:

[1] Lee A S, Mellins R B. Lung injury from smoke inhalation [J]. Paediatr Respir Rev, 2006, 7(2): 123 - 128.

[2] 傅祖红, 杨宗城, 胡振红, 等. 烟雾吸入性肺损伤肺泡表面活性物质结合蛋白 A 表达异常机制的研究[J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(6): 518 - 519.

[3] Kishore U, Greenhough T J, Waters P, *et al*. Surfactant proteins SP-A and SP-D: Structure, function and receptors [J]. Mol Immunol, 2006, 43(9): 1293 - 1315.

[4] 孙 磊, 安 辉, 郑有科, 等. 模拟密闭舱室烟雾吸入染毒装置的研制[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(4): 290 - 293.

[5] Fernandez A, Wendt J O L, Witten M L. Health effects engineering of coal and biomass combustion particulates: influence of zinc, sulfur and process changes on potential lung injury from inhaled ash [J]. Fuel, 2005, 84(10): 1320 - 1327.

[6] 林 彦, 刘 岩, 俞森洋. 地塞米松对急性肺损伤大鼠细胞信号转导系统 ERK 和 PI3-K 的影响[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(6): 592 - 594.

[7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402 - 408.

[8] 杨天德, 杨宗城, 罗奇志. 烟雾吸入伤后大鼠肺内低分子磷脂酶 A_2 mRNA 表达与活性变化[J]. 重庆医学, 2004, 33(4): 581 - 583.

[9] Hastings R H. Monitoring alveolar epithelial function in acute lung injury [J]. J Clin Monit Comput, 2000, 16(5 - 6): 385 - 392.

(编辑 王小寒)