论著

文章编号:1000-5404(2012)23-2364-04

大鼠实验性高原肺水肿中 T-AOC、MDA、SOD、CAT 和 IL-6 的表达

生宝亮[1,2],徐 刚[2],陈德伟[1,2],陈 建[1,2],高文祥[1,2],李晓栩[2],杨 娟[2],刘福玉[2],高钰琪[1,2] (400038 重庆,第三军医大学高原军事医学系病理生理与高原生理学教研室[1],教育部高原医学重点实验室,全军高原医学重点实验室[2])

[摘要] **目的** 观察氧化应激反应在急性缺氧致大鼠高原肺水肿发生中的变化,并探讨其病理生理学意义。**方法** 成年雄性 SD 大鼠 72 只,体质量(200 ±20)g,按随机数字表法分为平原对照(C)组、模拟急性高原缺氧(H)6、12、24、48 和 72 h 组($n=12$)。H 组动物置于减压舱内模拟海拔 6 000 m 高原暴露相应时间;分别在平原和模拟高原环境取材,检测肺组织湿干质量比值、总抗氧化能力(total-antioxidant capacity,T-AOC)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、过氧化氢酶(catalase,CAT)、血浆及肺组织 IL-6。**结果** 与平原对照组比较:缺氧各组大鼠肺组织湿干质量比值均显著增加($P<0.05$,$P<0.01$);MDA 随缺氧时间延长逐渐增加,缺氧 72 h 达到最高($P<0.01$);SOD 在缺氧 12、24 h 显著降低($P<0.05$),在缺氧 48、72 h 进一步降低($P<0.01$);T-AOC、CAT 随缺氧时间延长在 24、48、72 h 显著降低($P<0.05$);血浆 IL-6 在缺氧 24、48、72 h 组显著增加($P<0.01$),肺组织 IL-6 在缺氧 48($P<0.01$)、72 h($P<0.05$)组显著增加。**结论** 急性缺氧诱导大鼠高原肺水肿的发生和氧化应激有关,机体抗氧化能力降低、自由基增加是 HAPE 发生的重要机制。

[关键词] 缺氧;高原肺水肿;氧化应激

[中图法分类号] R362;R364.4;R563.9 [文献标志码] A

T-AOC, MDA, SOD, CAT and IL-6 levels in rat pulmonary edema induced by hypobaric hypoxia

Sheng Baoliang[1,2], Xu Gang[2], Chen Dewei[1,2], Chen Jian[1,2], Gao Wenxiang[1,2], Li Xiaoxu[2], Yang Juan[2], Liu Fuyu[2], Gao Yuqi[1,2]([1]Department of Pathophysiology and High Altitude Physiology, [2]Key Laboratory of High Altitude Medicine of Ministry of Education, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To observe the changes of oxidative stress in the occurrence of pulmonary edema in rats induced by hypoxia and to investigate the pathophysiological significance. Methods A total of 72 adult male SD rats weighting 200 ± 20 g were randomly divided into control group (C), and simulated altitude acute hypoxia groups (H). The hypoxia group rats were exposed to a simulated altitude of 6 000 m for 6, 12, 24, 48 and 72 h respectively. The lung wet/dry (W/D) ratio, total-antioxidant capacity (T-AOC), malondialdehyde (MDA) content, activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured. Lung and plasma IL-6 were measured by ELISA. Results The W/D ratio was increased in hypoxia groups than in control group (H6, H12 and H24 *vs* C, $P<0.01$, H48 and H72 *vs* C, $P<0.05$). MDA content was gradually increased with the prolongation of hypoxia time, and reached the highest in 72 h after hypoxic exposure ($P<0.01$). SOD content was significantly deceased in 12 and 24 h after hypoxic exposure($P<0.05$) and further reduced in 48 and 72 h($P<0.01$). Contents of T-AOC and CAT were significantly reduced with the prolongation of hypoxia time in 24, 48 and 72 h($P<0.05$). Plasma IL-6 was significantly increased in hypoxic 24, 48 and 72 h groups ($P<0.01$), while that in lung tissue was significantly increased in hypoxic 48 and 72 h groups compared with the control group(H48 *vs* C, $P<0.01$; H72 *vs* C, $P<0.05$). Conclusion Acute hypoxia-induced high altitude pulmonary edema is related to oxidative stress. Decrease of antioxidant capacity and increase of free radicals contribute to the occurrence of high altitude pulmonary edema.

[**Key words**] hypoxia;high-altitude pulmonary edema;oxidative stress

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2012CB518201), the National Key Technology R&D Program of China (2009BA185B00) and the National Natural Science Foundation of China (81101469). Corresponding author: Gao Yuqi, Tel: 86-23-68752331, E-mail: gaoy66@yahoo.com

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划,2012CB518201);国家科技支撑计划(2009BA185B00);国家自然科学基金(81101469)

[通信作者] 高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail:gaoy66@yahoo.com

高原肺水肿(high altitude pulmonary edema, HAPE)是在快速进入高原 2 500 m 及以上高原时发生的一种非心源性肺水肿,起病急,进展快,病死率高。其发病机制复杂,至今仍不完全清楚。目前认为,缺氧引起肺血管过度收缩、肺毛细血管通透性增加和肺泡对液体的清除能力降低是 HAPE 发生的重要机制。有研究提示,缺氧时肺血管内皮细胞功能障碍、一氧化氮(nitrogen oxide,NO)合成释放减少可能是肺血管收缩的重要机制[1],肺毛细血管通透性增加与炎症反应关系密切,而肺泡对液体的清除能力改变则受 Na^+-K^+-ATP 酶调控[2]。氧化应激是指机体氧化与抗氧化作用失衡,产生大量氧化中间产物如自由基等。以往研究显示,缺氧可引起氧化应激,后者具有调节炎症反应[3]、减少肺组织 NO 合成释放[4]、降低肺 Na^+-K^+-ATP 酶活力[5]等多种生物学作用。我们推测,缺氧引起的氧化应激可能在高原肺水肿的发生、发展中具有重要作用。为验证这一推测,本研究采用模拟急性高原缺氧大鼠模型,观察研究氧化应激在实验性高原肺水肿发生中的作用,并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

成年雄性健康 SD 大鼠 72 只,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。10%乌拉坦,BCA 法蛋白测定试剂盒(碧云天生物技术研究所),总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化物酶(CAT)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),大鼠 IL-6、ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司)。低压模拟舱(贵州风雷航天与第三军医大学联合研制),电子天平、烤箱、多功能酶标仪(美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型和实验程序 将大鼠按随机数字表法分为平原对照组、模拟急性高原缺氧 6、12、24、48 h 和 72 h 组(n = 12)。模拟缺氧组动物置于减压舱内模拟海拔 6 000 m 高原暴露相应时间[6],24 h 不间断连续减压,减压舱内温度控制在 25 ℃ 左右,大鼠自由摄食及饮水,取材前 24 h 禁食水。对照组动物于舱外(重庆,海拔 300 m)同时饲养。缺氧相应时间后缺氧各组大鼠在模拟海拔 6 000 m 的低压舱内进行取材,平原对照组在平原进行取材。10%乌拉坦腹腔注射麻醉大鼠,肝素抗凝管腹主动脉采血,4 ℃离心,3 000 r/min(950 × g),离心 15 min,分离血浆,分装后 -70 ℃冰箱保存待测;分离并摘取双侧肺脏,留取左侧肺叶,用于肺含水量的测定,其余肺组织分装在 3 个冻存管中立刻放入液氮冷冻保存。取右侧肺叶,按照试剂盒说明书制备 10% 肺组织匀浆,分别用于检测肺组织 T-AOC、MDA、SOD、CAT、IL-6 含量或活性。

1.2.2 肺组织含水量测定 取大鼠左肺用吸水纸吸干表面血迹,迅速称量后放入烤箱内 60 ℃烘烤 72 h,至质量不再减轻,并计算肺组织干质量[7]。肺组织含水量用湿质量/干质量表示。

1.2.3 肺组织 10% 匀浆总蛋白定量 采用 BCA 法,设置标准曲线孔及检测孔。依 BCA 测试盒说明书进行,用多功能酶标仪测量波长 562 nm 处光密度值,绘制标准曲线,根据检测孔光密度值计算出各检测样本蛋白浓度。

1.2.4 氧化应激相关指标检测 肺组织 T-AOC、MDA、SOD、CAT 等指标试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,严格按照测定试剂盒说明书进行检测。

1.2.5 ELISA 检测血浆及肺组织 IL-6 应用 ELISA 检测试剂盒检测大鼠血浆和肺组织中 IL-6 含量,详细步骤严格按照试剂盒说明书进行操作。

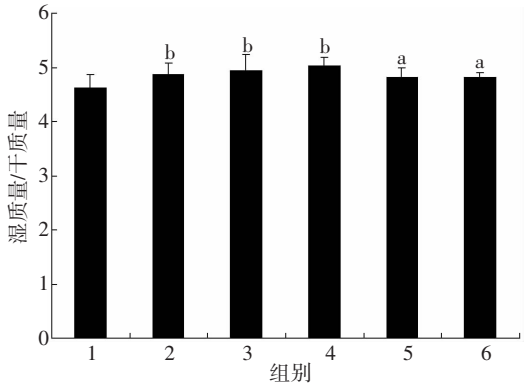
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件,各组间差异比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 急性缺氧不同时间对大鼠肺组织含水量的影响

大鼠肺组织湿质量/干质量比值在缺氧早期(6 h)即显著增加(P < 0.01),随缺氧时间延长继续增加,缺氧 24 h 达到最高,而后缺氧 48、72 h 略有降低,但仍显著高于平原对照组(P < 0.05,图 1)。



1:平原对照组;2:缺氧 6 h 组;3:缺氧 12 h 组;4:缺氧 24 h 组;5:缺氧 48 h 组;6:缺氧 72 h 组

a:P < 0.05,b:P < 0.01,与平原对照组比较

图 1 模拟海拔 6 000 m 不同时间大鼠肺湿、干质量比值的变化

2.2 急性缺氧不同时间对大鼠肺组织 T-AOC、MDA、SOD 及 CAT 的影响

T-AOC 结果显示,缺氧 6、12 h 组与平原对照组比较无明显变化,随缺氧时间延长,在缺氧 24、48、72 h 均显著下降(P < 0.05)。见表 1。

MDA 结果显示,与平原对照组比较,缺氧 12、24 h MDA 水平显著增加(P < 0.05),缺氧 48、72 h 进一步增加(P < 0.01)。见表 1。

SOD 结果显示,与平原对照组比较,缺氧 12、24 h SOD 水平显著降低(P < 0.05),缺氧 48、72 h 进一步降低(P < 0.01)。见表 1。

CAT 结果显示,与平原对照组比较,缺氧 6、12 h 组 CAT 无明显变化,缺氧 24、48、72 h 均显著下降(P < 0.05)。见表 1。

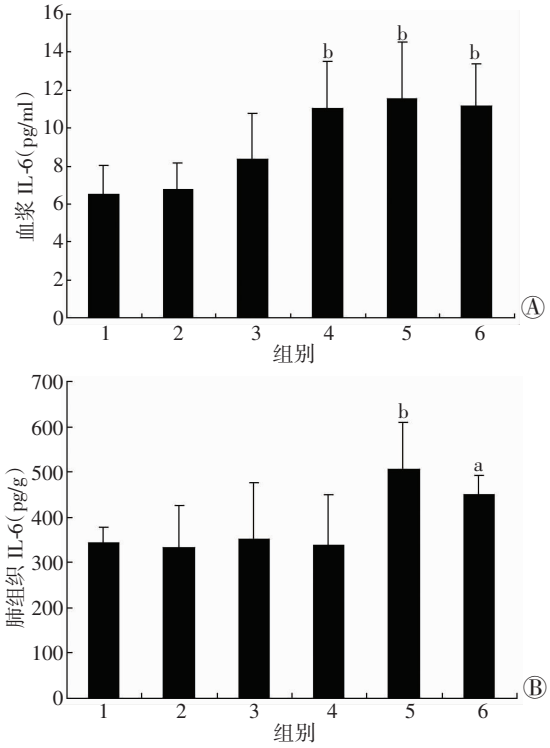
表1 各组大鼠肺组织 T-AOC、MDA、SOD 及 CAT 的比较

组别	n	肺组织 T-AOC (U/g)	肺组织 MDA (mmol/g)	肺组织 SOD (10^3U/g)	肺组织 CAT (10^3U/g)
平原对照组	8	0.900 7 ±0.268 9	1.013 ±0.132	3.420 ±0.445	5.874 ±0.616
缺氧6 h组	8	0.781 3 ±0.158 3	1.091 ±0.190	3.309 ±0.564	5.424 ±1.362
缺氧12 h组	8	0.793 6 ±0.167 7	1.297 ±0.209[a]	2.981 ±0.259[a]	5.318 ±1.036
缺氧24 h组	8	0.686 9 ±0.122 4[a]	1.402 ±0.176[a]	2.955 ±0.271[a]	4.811 ±0.787[a]
缺氧48 h组	8	0.732 0 ±0.104 6[a]	1.443 ±0.349[b]	2.669 ±0.522[b]	4.795 ±1.011[a]
缺氧72 h组	8	0.717 9 ±0.109 1[a]	1.492 ±0.189[b]	2.823 ±0.455[b]	4.777 ±0.754[a]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与平原对照组比较

2.3 急性缺氧不同时间对大鼠血浆和肺组织 IL-6 变化的影响

与平原对照组比较,血浆 IL-6 在缺氧6、12 h 无明显变化($P>0.05$),缺氧24、48、72 h 显著增加($P<0.01$,图2A)。缺氧6、12、24 h 肺组织匀浆中 IL-6 与平原对照组比较无明显变化,缺氧48、72 h 显著增加($P<0.01$, $P<0.05$,图2B)。



1:平原对照组;2:缺氧6 h组;3:缺氧12 h组;4:缺氧24 h组;5:缺氧48 h组;6:缺氧72 h组

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与平原对照组比较

图2 急性缺氧不同时间大鼠血浆(A)和肺组织(B)IL-6 变化

3 讨论

高原肺水肿(HAPE)是一种发生于平原初入或再入高原者的急性高原病,起病急,主要发生在到达高原后的2~4 d,病情发展快,若不及时治疗,常有生命危险。主要临床表现为咳嗽,咳粉红色泡沫痰,渐进性劳累和睡眠困难,运动能力降低等。其发病机制复杂,至今仍不完全清楚,可能和交感神经张力增加、缺氧肺血管收缩、肺血管通透性增加以及神经体液因素等有关[8]。对 HAPE 发病机制与防治的研究是当前高原医学的前沿与热点,近来有关氧化应激和炎症在 HAPE 发生中的作用也越来越受到关注[9-12],高原缺氧导致机体氧化/抗氧化能力失衡,可通过多条途径参与 HAPE 发生。

SOD 是机体内主要的抗氧化酶,是机体内天然存在的超氧自由基清除因子。正常情况下,机体内氧化与抗氧化系统处于动态平衡中,SOD 可以把有害的超氧自由基转化为过氧化氢,在体内过氧化氢酶和过氧化物酶作用下分解为无害的水,保护机体免受损伤。MDA 是自由基介导的脂质过氧化反应的氧化终产物,是机体内反映氧化损伤程度最经典同时也是最有效的指标之一。它可引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,且具有细胞毒性。作为脂质过氧化反应的终产物,MDA 的含量与细胞损伤的程度呈正相关。MDA 不仅可以反映脂质过氧化的程度,也可以间接反映机体氧自由基的生成量及细胞损伤的程度[13]。既往实验研究[14-15]也发现高原低氧环境下机体抗氧化酶系统的活力会降低。本实验结果显示,缺氧组大鼠肺组织匀浆中 SOD 活力显著低于平原对照组,MDA 含量显著增加。提示缺氧能使大鼠肺组织产生大量自由基,过氧化反应增加,导致大量 SOD 被消耗,MDA 生成增多。机体内氧化/抗氧化系统平衡受到破坏,从而氧自由基产生增加,进而引起强烈的脂质过氧化反应,导致细胞膜基本特征发生改变,酶活性降低甚至丧失,从而进一步影响细胞功能,损伤肺毛细血管屏障的完整性,肺血管通透性增加,导致肺组织间渗出增加进而形成水肿。

低氧时肺血管平滑肌细胞产生大量氧自由基,消耗大量 SOD、CAT 等体内抗氧化酶,氧自由基不能及时清除而在体内蓄积,进而引发一系列脂质过氧化反应,破坏细胞膜完整性,引起细胞内钙超载,细胞遭受致死性损伤,最终可导致血管内皮依赖的血管舒张反应减弱,收缩反应增强[16]。氧化应激自由基增加可减少一氧化氮合成和释放[4],一氧化氮可舒张肺血管。缺氧情况下,肺一氧化氮合成、释放减少,是引起缺氧肺血管收缩增强的重要因素。Gonzalez 等[17]认为氧自由基/一氧化氮平衡在高原适应中具有重要作用,缺氧可改变氧自由基/一氧化氮平衡,可能和 HAPE 的发生有关。

高原缺氧氧化应激引起的自由基产生增加可抑制肺基底膜 Na^+-K^+-ATP 酶功能,正常 Na^+K^+-ATP 酶主要负责将细胞内 Na^+ 转到胞外,其功能受到抑制将引起 Na^+ 在细胞堆积,降低缺氧时肺内液体的清除能力,可能引起肺水肿[5]。Stern 等[18]发现通过增加 Na^+K^+-ATP 酶的表达,可增加肺内液体清除并减轻肺水肿的形成。

氧自由基不但可以对组织细胞造成直接损伤,而且可以通过激活 MAPK 信号通路及核因子 κB 等转录因子等方式[19],增加其下游细胞因子的产生,促进炎症发生,对肺泡上皮细胞和肺毛细血管内皮细胞造成损伤。Bailey 等[8]通过检测急进高原人群的脂质过氧化物、炎症介质,结果发现到达高原后发生急性高原病的人群中血浆 IL-6 和 C-反应蛋白水平显著增高,提示自由基在肺血管通透性改变和其后的炎症反应中起了重要作用。冉玉华等[20]发现高原肺水肿患者血清中 IL-6 水平显著高于其转归后水平,HAPE 的发生过程中伴随着炎症因子的变化,提示 IL-6 可能参与高原肺水肿发病。

本实验主要观察氧化应激反应在急性缺氧致大鼠肺水肿发生中的变化,急性缺氧暴露不同时间对大鼠肺湿干质量比值,肺组织总抗氧化能力,抗氧化酶 SOD、CAT,脂质过氧化产物 MDA 及 IL-6 含量或活性的影响,探讨其在大鼠 HAPE 发生中的作用和相关机制。结果表明,急性缺氧可显著增加肺组织湿干质量比值,随缺氧时间延长,肺组织抗氧化能力和相关抗氧化酶活力显著降低,而脂质过氧化产物 MDA 却显著增加,血浆及肺组织 IL-6 水平亦显著增加,与文献[21]报道相符合。提示我们氧化应激诱导的自由基增加,可能通过直接对机体的损伤和其诱导的 IL-6 增加、NO 合成释放减少以及抑制肺组织 Na^+K^+-ATP 酶活力等参与了 HAPE 的发生。另一方面,缺氧大鼠肺组织含水量变化早于氧化应激相关指标 T-AOC、MDA、SOD、CAT 以及 IL-6 等的改变,提示高原肺水肿发病机制复杂,是众多因素叠加作用的结果。

综上,缺氧引起的机体抗氧化能力降低自由基增加是 HAPE 发生的重要因素之一,可能通过多条途径促进 HAPE 的发生。同时,本实验结果提示,应用补充抗氧化剂可能对防治高原肺水肿具有良好作用,值得进一步研究。

参考文献:

[1] Mam V, Tanbe A F, Vitali S H, *et al*. Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2010, 332(2): 455 – 462.

[2] Zhou G, Dada L A, Sznajder J I. Regulation of alveolar epithelial function by hypoxia[J]. Eur Respir J, 2008, 31(5): 1107 – 1113.

[3] Himadri P, Kumari S S, Chitharanjan M, *et al*. Role of oxidative stress and inflammation in hypoxia-induced cerebral edema: a molecular approach[J]. High Alt Med Biol, 2010, 11(3): 231 – 244.

[4] Scherrer U, Turini P, Thalmann S, *et al*. Pulmonary hypertension in high-altitude dwellers: novel mechanisms, unsuspected predisposing factors[J]. Adv Exp Med Biol, 2006, 588: 277 – 291.

[5] Dada L A, Sznajder J I. Hypoxic inhibition of alveolar fluid reabsorption[J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 618: 159 – 168.

[6] 张兆瑞, 肖华军, 何萍萍, 等. 乙酰唑胺对大鼠高原肺水肿的预防作用[J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(6): 648 – 650.

[7] Li Q F, Zhu Y S, Jiang H, *et al*. Isoflurane preconditioning ameliorates endotoxin-induced acute lung injury and mortality in rats[J]. Anesth Analg, 2009, 109(5): 1591 – 1597.

[8] Stream J O, Grissom C K. Update on high-altitude pulmonary edema: pathogenesis, prevention, and treatment[J]. Wilderness Environ Med, 2008, 19(4): 293 – 303.

[9] Bailey D M, Kleger G R, Holzgraefe M, *et al*. Pathophysiological significance of peroxidative stress, neuronal damage, and membrane permeability in acute mountain sickness[J]. J Appl Physiol, 2004, 96(4): 1459 – 1463.

[10] Askew E W. Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients[J]. Toxicology, 2002, 180(2): 107 – 119.

[11] Yang C, Ling H, Zhang M, *et al*. Oxidative stress mediates chemical hypoxia-induced injury and inflammation by activating NF-kappab-COX-2 pathway in HaCaT cells[J]. Mol Cells, 2011, 31(6): 531 – 538.

[12] Sarada S, Himadri P, Mishra C, *et al*. Role of oxidative stress and NFkB in hypoxia-induced pulmonary edema[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2008, 233(9): 1088 – 1098.

[13] 缪捷飞. 益气活血方对大鼠胸部照射肺组织 SOD 活性、MDA 及 HP 含量的影响[J]. 南通大学学报: 医学版, 2010, 30(4): 255 – 257, 259.

[14] Sun Y, Hu G, Zhang X, *et al*. Phosphorylation of caveolin-1 regulates oxidant-induced pulmonary vascular permeability via paracellular and transcellular pathways[J]. Circ Res, 2009, 105(7): 676 – 685.

[15] Shukla D, Saxena S, Jayamurthy P, *et al*. Hypoxic preconditioning with cobalt attenuates hypobaric hypoxia-induced oxidative damage in rat lungs[J]. High Alt Med Biol, 2009, 10(1): 57 – 69.

[16] Shen C Y, Lee J F, Su C L, *et al*. Hypoxia and reoxygenation of the lung tissues induced mRNA expressions of superoxide dismutase and catalase and interventions from different antioxidants[J]. Transplant Proc, 2008, 40(7): 2182 – 2184.

[17] Gonzalez N C, Wood J G. Leukocyte-endothelial interactions in environmental hypoxia[J]. Adv Exp Med Biol, 2001, 502: 39 – 60.

[18] Stern M, Ulrich K, Robinson C, *et al*. Pretreatment with cationic lipid-mediated transfer of the Na^+K^+-ATPase pump in a mouse model in vivo augments resolution of high permeability pulmonary oedema[J]. Gene Ther, 2000, 7(11): 960 – 966.

[19] Zhao S, Zhang L, Lian G, *et al*. Sildenafil attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF-κB signaling pathways in N9 microglia[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(4): 468 – 474.

[20] 冉玉华, 张东祥, 肖忠海, 等. 急性高原肺水肿患者血清中 VEGF, TNF-α, IL-6 及 NO 的含量变化[J]. 中国应用生理学杂志, 2011, 27(2): 201 – 203.

[21] 赵远鹏, 但国蓉, 董兆君. 低氧复合氰化钠中毒对兔动脉血超氧化物歧化酶、还原型谷胱甘肽和丙二醛的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(16): 1532 – 1534.

(**收稿**:2012-07-20;**修回**:2012-10-06)

(编辑 栾 嘉)