DOI:10.16016/j.1000-5404.201607126

L-精氨酸治疗光气中毒大鼠肺损伤的实验研究

丁娇艳,赵远鹏,叶 枫,阳慧琼,程 晋,但国蓉,邹仲敏 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院毒理学研究所)

[**摘要**] **目的** 探讨 L-精氨酸对光气中毒急性肺损伤的治疗作用。**方法** 将 48 只 SD 大鼠按随机数字表法分为正常对照组、L-精氨酸对照组、光气中毒组、L-精氨酸低剂量治疗组、L-精氨酸中剂量治疗组、L-精氨酸高剂量治疗组、地塞米松治疗组、L-精氨酸 + 地塞米松治疗组,每组 6 只,除正常对照组和 L-精氨酸对照组外,其余组动物暴露于 0.45 g 固体光气发生舱室内,染毒 5 min,于染毒后立即腹腔注射 L-精氨酸、地塞米松及生理盐水。于染毒后 2、4、6 h 用小动物肺功能仪测定各组动物的肺功能指标;染毒 6 h 后处死动物,测定肺组织湿干质量比,血浆还原型谷胱甘肽(reduced glutathione,GSH)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量,超氧化物岐化酶(superoxide dismutase,SOD)及诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)活力;光学显微镜下观察肺组织病理学变化。**结果** 与正常对照组比较,光气中毒组肺功能指标发生显著变化,肺湿干质量比、血浆 MDA 含量及 iNOS 活力显著升高,血浆 GSH 含量和 SOD 活力显著下降($P<0.05$,$P<0.01$)。与光气中毒组比较,L-精氨酸各剂量治疗组对光气中毒大鼠肺功能指标有一定改善作用,但差异无统计学意义($P>0.05$),肺湿干质量比、血浆 MDA 含量及 iNOS 活力显著降低,血浆 GSH 含量和 SOD 活力显著升高($P<0.05$,$P<0.01$);地塞米松治疗组血浆 MDA 含量显著降低,SOD 活力显著升高($P<0.05$),但肺湿干质量比、血浆 GSH 含量及 iNOS 活力无显著变化($P>0.05$)。**结论** L-精氨酸对光气致肺损伤有保护作用,其机制可能与清除自由基抗氧化及抑制 iNOS 有关。

[**关键词**] 光气;L-精氨酸;肺功能;治疗
[**中图法分类号**] R563.05;R595.1;R977.4 [**文献标志码**] A

Therapeutic effect of L-arginine on phosgene-induced lung injury in rats

Ding Jiaoyan, Zhao Yuanpeng, Ye Feng, Yang Huiqiong, Cheng Jin, Dan Guorong, Zou Zhongmin (Institute of Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the therapeutic effect of L-arginine on phosgene-induced acute lung injury in rats. **Methods** Forty-eight male SD rats were randomized into 8 groups ($n=6$ per group): normal control group, phosgene exposure group, L-arginine control group, treatment groups with L-arginine at low, middle and high doses, dexamethasone treatment group and L-arginine plus dexamethasone treatment group. Except the normal control and L-arginine control groups, the other 6 groups were exposed to phosgene gas produced from 0.45 g triphosgene in a sealed cabin for 5 min. The L-arginine treatment, dexamethasone treatment, and control groups were intraperitoneally injected with L-arginine immediately after exposure, dexamethasone and saline, respectively. Lung function in each group were determined at 2, 4 and 6 hours after the phosgene exposure. All rats were sacrificed at 6 h after exposure. The wet/dry ratio of the lung, contents of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA), activities of superoxide dismutase (SOD) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plasma were measured, and pathological observation was performed on lung tissue under light microscope. **Results** Compared with the normal control group, the phosgene exposure group showed significant changes in lung function parameters. Meanwhile, significant increase of

[**基金项目**] 全军医学科技"十二五"重点项目(BWS11R02)
[**通信作者**] 邹仲敏,E-mail:zmzou@tmmu.edu.cn
但国蓉,E-mail:liroy@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161021.1700.020.html

lung wet/dry ratio ($P<0.01$), MDA content ($P<0.01$) and iNOS activity ($P<0.05$), as well as significant decrease of GSH content and SOD activity ($P<0.05$) in plasma were detected. Compared with the phosgene exposure group, lung function parameters were improved in the L-arginine treatment groups, accompanying with significantly decreased MDA content and iNOS activity, as well as significantly increased GSH content and SOD activity, The dexamethasone treatment group showed significantly decreased MDA content ($P<0.05$), increased SOD activity ($P<0.05$), but the changes in wet/dry ratio of the lung, GSH content and iNOS activity in plasma were not significant. **Conclusion** L-arginine has protective effect on phosgene-induced lung injury, and its protective mechanism may be associated with scavenging of free radicals and iNOS inhibition.

[**Key words**] phosgenge; L-arginine; pulmonary function; treatment

Supported by the Key Project of the Twelfth Five-Year Plan of Medical Science and Technology of PLA (BWS11R02). Corresponding author: Zou Zhongmin, E-mail: zmzou@tmmu.edu.cn; Dan Guorong, E-mail: liroy@163.com

光气(phosgene)学名二氯碳酰,是一种强窒息性毒剂,作为重要的化工原料广泛应用于农药、高分子材料、印染、杀虫剂、塑料、制药等工业研究和生产中,常因防护不当或意外泄露而发生人员中毒。光气中毒后出现以急性肺损伤为主的一系列临床症状并最终发展成急性呼吸窘迫综合征甚至导致死亡。光气吸入致急性肺损伤的发病机制复杂,迄今为止尚未完全阐明。已有研究发现,肺组织发生酰化反应和氧化应激在光气吸入致急性肺损伤病程中起重要作用[1-3]。

L-精氨酸是一种脂肪族的碱性的含有胍基的极性α-氨基酸。在尿素合成的鸟氨酸循环学说中,精氨酸在精氨酸酶的作用下,水解产生尿素,将血液中的氨转变为尿素而排泄出去。另一方面,精氨酸通过一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化精氨酸生成NO和瓜氨酸,而NO可以有多重生物学效应,例如,NO吸入可以扩张肺泡局部肺小动脉,缓解肺动脉高压。一些实验研究证明,精氨酸对NOS抑制剂(L-NAME)引起的小鸡肺动脉高压综合征、脂多糖引起的大鼠急性肺损伤、腹腔注射穿孔性腹膜炎腹水诱导的大鼠急性肺损伤等均有一定的治疗作用,并可能与其能减轻肺内氧化反应和细胞凋亡有关[4-6]。文献[7-9]报道,光气中毒大鼠血清和肝脏中NO水平明显降低,诱导型一氧化氮合酶(inducible NOS, iNOS)水平上升,L-精氨酸对脂多糖引起的急性肺损伤和高原肺水肿有治疗效应。目前,尚没有精氨酸对光气引起的肺损伤的疗效研究。我们还推测,由于精氨酸有富含氨基,可能为活泼的光气分子提供反应靶点,从而减轻光气对组织的损伤。地塞米松是一种糖皮质激素,广泛使用于多种原因引起的肺水肿、急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征,同时对光气吸入性急性肺损伤有一定的保护作用。因而,本研究将以地塞米松为阳性对照药物,考察L-精氨酸对光气吸入性急性肺损伤模型大鼠肺功能的保护作用,并探讨其可能机制,为临床防治光气吸入性肺损伤提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

固体三光气(海宁中联化学有限公司),N,N-二甲基甲酰胺(上海生工生物工程有限公司),环己烷(上海生工生物工程有限公司),地塞米松磷酸钠注射液(天津药业焦作有限公司),超氧化物歧化酶(superoxidedismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)、丙二醛(malonaldehyde, MDA)检测试剂盒(南京建成生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 光气发生方法和染毒 称取三光气(固体光气)溶于3 mL环己烷中,置于25 L(长、宽、高为25、25、40 cm)密闭有机玻璃舱室的顶部的玻璃平皿中(图1)。向平皿中缓慢滴加3 mL DMF溶液(过量,反应完全,光气的比重为空气的3.4倍,光气发生后将下沉)。不限制动物活动,染毒时间5 min。

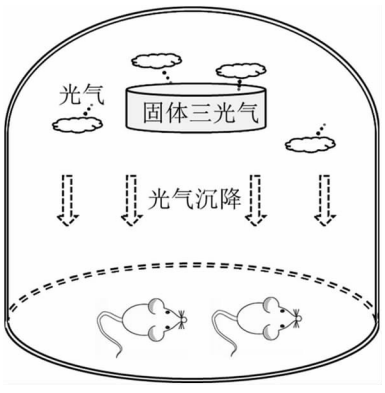


图1 染毒舱室示意图(25 cm×25 cm×40 cm)

1.2.2 实验动物及分组 成年雄性SD大鼠48只,体质量(200+20)g,由重庆第三军医大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(渝)2002002]。动物用随机数字表法分为:①正常对照组,腹腔注射等体积生理盐水;②光气中毒组,暴露于0.45 g固体光气发生

舱室内 5 min;③L-精氨酸对照组,腹腔注射精氨酸 200 mg/kg;④L-精氨酸低剂量治疗组,光气染毒后立即腹腔注射精氨酸 100 mg/kg(低剂量精氨酸组);⑤L-精氨酸中剂量治疗组,光气染毒后立即腹腔注射精氨酸 150 mg/kg(中剂量精氨酸组);⑥L-精氨酸高剂量治疗组,光气染毒后立即腹腔注射精氨酸 200 mg/kg(高剂量精氨酸组);⑦地塞米松治疗组,光气染毒后立即腹腔注射地塞米松 2.5 mg/kg(地塞米松组);⑧地塞米松+L-精氨酸治疗组,光气染毒后立即腹腔注射地塞米松 2.5 mg/kg 和精氨酸 100 mg/kg(地米精氨酸组)。

1.2.3 肺功能测定 采用美国 BUXCO 公司小动物肺功能仪操作指导并参考文献[10]。实验前调整仪器各项参数,在光气中毒后 2、4、6 h,分别将各组动物置于的舱室中,不限制动物活动。每组动物置于舱室 10 min,待动物适应舱室内环境,呼吸平静后,再测量 10 min,采集后 10 min 数据进行统计分析得出肺呼吸功能指标,包括呼吸频率(frequency, f)、潮气量(tidal volume, TV)、每分钟通气量(respiratory minute volume, MV)、吸气时间(inspiratory time, Ti)、呼气时间(expiratory time, Te)、1/2 潮气量呼气流量(expiratory flow of 50% TV, EF50)、2/3 潮气量所需时间(time of 2/3 TV, Tr)、最大吸气流量(peak inspiratory flow, PIF)、最大呼气流量(peak expiratory flow, PEF)、呼吸间歇(pause of respiration, PAU)、增强的呼吸间歇(enhanced pause of respiration, Penh)。

1.2.4 肺湿干质量比的测定 光气染毒 6 h 后取右下肺,滤纸擦干表面,立即称质量记为肺湿质量,然后置于 80 ℃烤箱内烤至恒量,48 h 后称质量记为肺干质量,计算湿干质量比。肺湿干质量比 = 肺湿质量(g)/肺干质量(g) ×100%。

1.2.5 肺组织的病理学观察 光气染毒 6 h 后取出的肺组织经体积分数为 4% 的甲醛固定、脱水、石蜡包埋,制备 4 μm 切片。HE 染色,光学显微镜下进行病理学观察。

1.2.6 血浆 iNOS、SOD 活力及还原型 GSH 和 MDA 含量的测定 光气染毒 6 h 后心脏采血,离心(3 000 r/min, 10 min)分离血浆。采用南京建成生物工程研究所提供的测定试剂盒进行检测,应用可见分光光度计测定光密度值,根据公式计算 SOD、iNOS 活性和 MDA、GSH 含量。

1.3 统计学处理

所测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计分析,组间比较以 $P<0.05$ 为差异统计学意义。

2 结果

2.1 染毒后各组大鼠肺功能指标的比较

通过整体体积描记法测定各组大鼠在光气染毒后 2、4、6 h 于自由活动的情况下检测 f、TV、MV、Ti、Te、EF50、Tr、PIF 等肺呼吸功能指标。结果显示,与正常对照组相比,光气染毒后 2、4、6 h 动物的 f、TV、MV、PIF、PEF、PAU、Penh 均呈升高趋势,Ti、Te、Tr 均呈一定程度的降低趋势,且大部分参数变化均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。其中光气中毒组 Penh 指标在光气中毒后 2、4、6 h 较同一时相点正常对照组显著升高。与光气中毒组相比,各时相点、各治疗组的上述指标差异无统计学意义($P>0.05$,表 1~3)。

表 1 光气染毒 2 h 后的大鼠肺功能指标的比较 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	f(/min)	TV(mL)	MV(mL/min)	Penh	PAU
正常对照组	103.61±30.55	1.72±0.26	172.86±82.75	2.30±0.94	1.67±0.47
光气中毒组	166.38±51.39[a]	2.42±0.67[a]	409.85±206.65[a]	5.88±2.90[b]	4.32±1.84[b]
L-精氨酸对照组	92.63±13.73	1.71±0.37	151.53±25.52	2.19±1.12	1.66±0.64
低剂量精氨酸组	181.43±68.16[a]	3.48±1.29[b]	594.67±190.2[b]	6.62±3.90[a]	4.42±2.19[b]
中剂量精氨酸组	186.88±87.09[a]	1.91±0.54	381.25±285.94	7.92±5.50[a]	3.62±1.63[b]
高剂量精氨酸组	141.20±36.73[a]	2.15±0.52	323.89±88.26[b]	6.63±3.98[a]	4.32±1.99[b]
地塞米松组	137.97±29.41[a]	2.96±0.57	411.49±124.7[b]	6.44±3.05[b]	4.13±1.71[b]
地米精氨酸组	183.12±90.74[a]	2.03±0.31	387.15±254.87[a]	3.84±3.09	2.85±1.73

组别	PIF(mL/s)	PEF(mL/s)	Ti(ms)	Te(ms)	EF50(mL/s)	Tr(ms)
正常对照组	12.81±5.66	13.44±3.84	0.28±0.05	0.44±0.10	0.63±0.34	0.20±0.04
光气中毒组	33.98±11.91[b]	42.75±20.14[b]	0.12±0.01[b]	0.29±0.13[a]	3.02±1.96[b]	0.06±0.02[b]
L-精氨酸对照组	11.32±2.12	12.66±4.32	0.30±0.03	0.42±0.09	0.64±0.36	0.18±0.06
低剂量精氨酸组	45.82±12.08[b]	62.62±23.18[b]	0.12±0.01[b]	0.26±0.10[b]	4.68±2.30[b]	0.05±0.01[b]
中剂量精氨酸组	22.56±13.12[b]	38.49±21.00[b]	0.15±0.04[b]	0.25±0.13[a]	2.96±2.15[a]	0.06±0.04[b]
高剂量精氨酸组	26.08±8.02[b]	34.68±12.59[b]	0.14±0.03[b]	0.28±0.06[b]	2.40±0.90[b]	0.06±0.01[b]
地塞米松组	32.27±9.56[b]	44.40±16.12[b]	0.15±0.03[b]	0.31±0.08[a]	2.87±1.30[b]	0.06±0.02[b]
地米精氨酸组	26.29±11.90	30.17±15.73[a]	0.15±0.05[b]	0.25±0.10[b]	2.11±1.48[a]	0.07±0.04[b]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与正常对照组比较

表2 光气染毒4 h后的大鼠肺功能指标的比较($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	f(/min)	TV(mL)	MV(mL/min)	Penh	PAU
正常对照组	87.51±9.56	1.71±0.29	138.54±21.14	1.85±0.46	1.42±0.23
光气中毒组	160.19±69.95[a]	2.06±0.87	327.07±246.42[a]	4.64±2.98[a]	4.16±3.12[a]
L-精氨酸对照组	91.33±21.41	1.73±0.18	151.86±53.11	1.86±0.61	1.50±0.37
低剂量精氨酸组	161.75±59.98[b]	3.77±0.93[bc]	599.68±221.35[b]	8.13±3.48[b]	5.24±1.99[b]
中剂量精氨酸组	169.67±85.54[a]	2.16±0.49	386.33±265.60[a]	4.93±1.76[b]	3.71±1.44[b]
高剂量精氨酸组	197.08±64.13[b]	2.16±0.75	445.04±229.45[b]	3.72±1.89[a]	2.75±1.15[a]
地塞米松组	143.99±45.92[b]	3.25±0.69[bc]	480.40±223.42[b]	5.23±1.97[b]	3.76±1.13[b]
地米精氨酸组	174.08±61.63[b]	2.07±0.41	379.61±219.80[a]	4.55±3.06[a]	3.46±1.81[a]

组别	PIF(mL/s)	PEF(mL/s)	Ti(ms)	Te(ms)	EF50(mL/s)	Tr(ms)
正常对照组	10.21±1.51	10.78±0.97	0.31±0.02	0.46±0.06	0.44±0.05	0.22±0.03
光气中毒组	30.74±19.85[a]	32.36±23.45[a]	0.14±0.03[b]	0.36±0.25	2.11±2.04[a]	0.08±0.00[b]
L-精氨酸对照组	11.86±4.75	11.66±4.93	0.31±0.05	0.45±0.07	0.58±0.34	0.21±0.05
低剂量精氨酸组	48.14±10.49[b]	68.90±21.49[bc]	0.12±0.01[b]	0.29±0.10[b]	4.93±2.00[bc]	0.04±0.00[bc]
中剂量精氨酸组	27.36±14.07[b]	32.56±19.88[a]	0.16±0.09[b]	0.32±0.14[a]	2.28±1.87[a]	0.08±0.05[b]
高剂量精氨酸组	28.92±11.99[b]	36.25±18.55[b]	0.12±0.02[b]	0.22±0.08[b]	2.68±1.56[b]	0.06±0.02[b]
地塞米松组	38.85±15.71[b]	48.34±20.90[b]	0.15±0.07[b]	0.32±0.08[b]	2.96±1.70[b]	0.06±0.03[b]
地米精氨酸组	28.43±12.85[b]	33.19±19.21[b]	0.14±0.05[b]	0.26±0.07[b]	2.33±1.69[a]	0.06±0.04[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常对照组比较;c:$P<0.05$,与光气中毒组比较

表3 光气染毒6 h后的大鼠肺功能指标的比较($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	f(/min)	TV(mL)	MV(mL/min)	Penh	PAU
正常对照组	96.93±30.55	1.82±0.26	171.45±82.75	1.55±0.94	1.24±0.47
光气中毒组	153.73±77.24	2.37±0.68	380.78±274.50[a]	5.90±3.35[b]	4.70±2.56[b]
L-精氨酸对照组	95.74±13.73	1.93±0.37	173.53±25.52	2.45±1.12	1.79±0.64[a]
低剂量精氨酸组	196.44±62.84[b]	3.27±0.84[b]	651.28±331.96[b]	6.36±2.31[b]	4.08±1.17[b]
中剂量精氨酸组	142.13±68.07	1.51±1.12	161.50±102.14	4.36±2.95	3.39±2.62[a]
高剂量精氨酸组	224.15±67.27[b]	2.64±1.20	545.53±176.43[b]	3.56±2.21[a]	2.77±1.82[a]
地塞米松组	177.61±36.01[b]	3.27±0.84[b]	651.28±331.96[b]	6.36±2.31[b]	4.08±1.17[b]
地米精氨酸组	133.02±29.68[a]	2.10±0.37	274.23±48.88[b]	5.53±5.50[a]	3.89±2.89[a]

组别	PIF(mL/s)	PEF(mL/s)	Ti(ms)	Te(ms)	EF50(mL/s)	Tr(ms)
正常对照组	11.22±5.66	11.57±3.84	0.29±0.05	0.37±0.10	0.57±0.34	0.18±0.04
光气中毒组	34.14±19.19[b]	38.86±23.71[a]	0.15±0.05[b]	0.33±0.18	2.78±2.12[a]	0.06±0.02[b]
L-精氨酸对照组	13.15±2.12	13.97±4.32	0.31±0.03	0.42±0.09	0.74±0.36	0.18±0.06
低剂量精氨酸组	43.88±16.27[b]	62.68±22.67[b]	0.11±0.02[b]	0.23±0.08[b]	4.69±2.21[b]	0.04±0.00[b]
中剂量精氨酸组	16.01±12.61	17.58±12.87	0.18±0.09[a]	0.35±0.14	1.02±0.80	0.10±0.04[b]
高剂量精氨酸组	37.80±17.35[b]	44.82±19.22[b]	0.11±0.01[b]	0.18±0.08[b]	3.30±1.21[b]	0.05±0.00[b]
地塞米松组	43.88±16.27[b]	62.68±22.67[b]	0.11±0.02[b]	0.23±0.08[b]	4.69±2.21[b]	0.04±0.00[b]
地米精氨酸组	23.80±5.71[b]	27.91±16.17[a]	0.15±0.04[b]	0.32±0.07	1.75±1.23[a]	0.08±0.03[b]

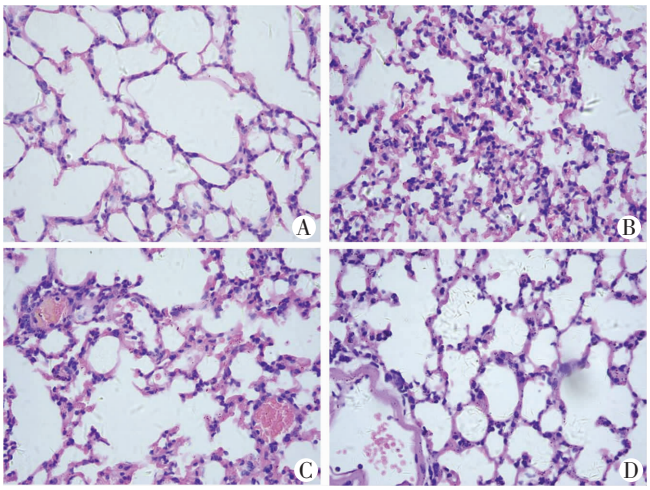
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常对照组比较

2.2 各组大鼠病理学观察结果

正常对照组大鼠肺泡壁完整、壁薄、厚度均匀,肺泡腔内无渗出液(图2A)。光气中毒组大鼠染毒后6 h泡腔内有渗出液,可见大量红细胞,肺泡壁厚(图2B)。低剂精氨酸量组有少量液体渗出,可见大量红细胞,肺泡壁增厚。高剂量精氨酸组大鼠肺泡腔内无渗出液,可见少量红细胞,肺泡壁无明显增厚(图2C)。地米精氨酸组肺泡腔内无渗出液,可见少量红细胞,肺泡壁薄(图2D)。

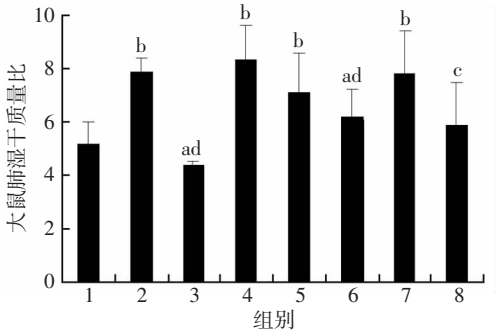
2.3 各组大鼠肺湿干质量比

光气染毒6 h后取大鼠肺进行湿干质量比测定的结果显示,光气中毒后肺湿干质量比显著升高,除地米松精氨酸组外,其余组别与正常对照组比较,均显著升高($P<0.05$,$P<0.01$)。随着精氨酸剂量的加大,肺湿干质量比呈下降趋势,与光气中毒组比较,高剂量的精氨酸处理后其湿干质量比显著下降($P<0.01$,图3)。



A:正常对照组;B:光气中毒组;C:高剂量精氨酸组;D:地米精氨酸组

图2 各组大鼠肺组织的病理变化 (HE ×200)

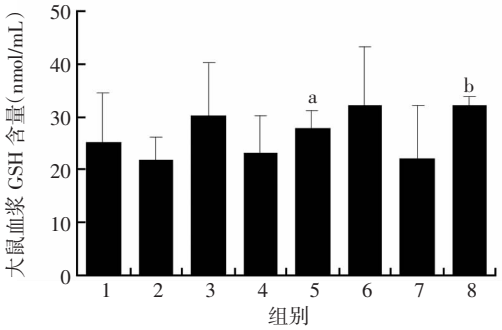


1:正常对照组;2:光气中毒组;3:L-精氨酸对照组;4:低剂量精氨酸组;5:中剂量精氨酸组;6:高剂量精氨酸组;7:地塞米松组;8:地米精氨酸组 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常对照组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与光气中毒组比较

图3 各组大鼠肺湿干质量比的变化

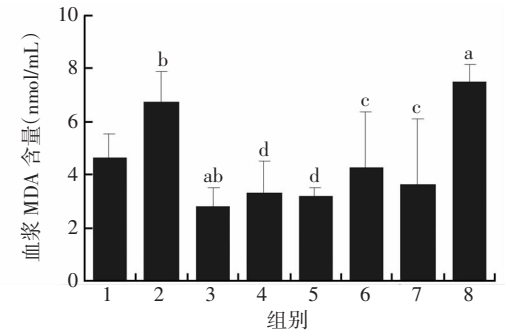
2.4 各组大鼠血浆还原型GSH、MDA的含量和iNOS、SOD活力比较

光气染毒6 h后测定血浆GSH、MDA含量及其iNOS、SOD活力,结果显示,光气中毒后,GSH含量降低,精氨酸有提高机体GSH水平的作用,随着精氨酸救治剂量的增高,GSH含量呈升高趋势($P<0.05$),地塞米松则无提高GSH水平的作用(图4)。正常动物给予精氨酸后,机体MDA含量显著降低;光气中毒后,MDA含量显著升高($P<0.01$);使用精氨酸治疗后,MDA含量显著降低($P<0.05$,$P<0.01$)。同时地塞米松也能显著降低光气中毒后机体MDA含量($P<0.05$,图5)。光气中毒后,SOD活力极显著下降($P<0.01$),动物经精氨酸和地塞米松治疗后,其SOD活力较光气中毒组显著升高($P<0.05$,$P<0.01$,图6)。正常动物给予精氨酸后,机体iNOS显著降低;光气中毒后,iNOS显著升高($P<0.05$);使用精氨酸治疗后,iNOS含量呈降低趋势,与光气中毒组比较,高剂量精氨酸组显著降低($P<0.05$),地塞米松组差异无统计学意义($P>0.05$),地米精氨酸组则显著降低($P<0.05$,图7)。这些结果表明,与地塞米松组相比,精氨酸治疗能显著提高光气中毒动物GSH含量,降低MDA含量,升高SOD活力,降低iNOS活力。



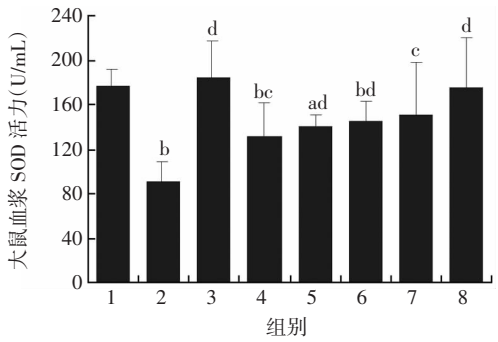
1:正常对照组;2:光气中毒组;3:L-精氨酸对照组;4:低剂量精氨酸组;5:中剂量精氨酸组;6:高剂量精氨酸组;7:地塞米松组;8:地米精氨酸组 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与光气中毒组比较

图4 各组光气中毒大鼠血浆GSH水平的比较



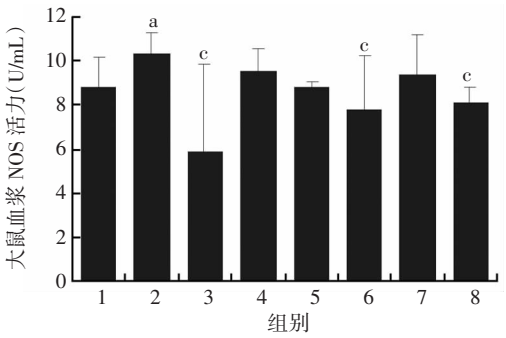
1:正常对照组;2:光气中毒组;3:L-精氨酸对照组;4:低剂量精氨酸组;5:中剂量精氨酸组;6:高剂量精氨酸组;7:地塞米松组;8:地米精氨酸组 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常对照组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与光气中毒组比较

图5 各组光气中毒大鼠血浆MDA水平的比较



1:正常对照组;2:光气中毒组;3:L-精氨酸对照组;4:低剂量精氨酸组,5:中剂量精氨酸组;6:高剂量精氨酸组,7:地塞米松组;8:地米精氨酸组 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常对照组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与光气中毒组比较

图6 各组光气中毒大鼠血浆SOD水平的比较



1:正常对照组;2:光气中毒组;3:L-精氨酸对照组;4:低剂量精氨酸组,5:中剂量精氨酸组;6:高剂量精氨酸组;7:地塞米松组;8:地米精氨酸组 a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与光气中毒组比较

图7 各组光气中毒大鼠血浆 iNOS 水平的比较

3 讨论

本实验中大鼠吸入光气后肺脏损伤指标(肺功能指标、肺湿干质量比)及光学显微镜下病理观察证实光气吸入导致急性肺损伤。肺功能指标 Penh 在染毒后极显著升高,表明光气染毒后动物出现了呼吸道阻力增加,肺水含量增加,肺毛细血管通透性增加等改变均符合急性肺损伤的病理生理改变,也说明所建立的光气中毒模型是可信的。许多指南都建议在光气损伤后尽快使用糖皮质激素,而且在临床实践中一直都作为一线治疗措施,尽管糖皮质激素的作用并没有得到确切的证明[11]。本研究结果也显示地塞米松对防止肺水肿是有效的。

L-精氨酸是一种脂肪族的碱性的含有胍基的极性α-氨基酸,可以改善饥饿大鼠肠道免疫屏障[12],改善重型颅脑损伤后大鼠免疫功能和蛋白代谢紊乱[13],对多种因素引起的肺损伤有一定疗效,但机制尚无定论[9,14]。总结已有文献报道并分析 L-精氨酸的生化代谢途径,我们推测 L-精氨酸的可能作用机制包括:① 光气的酰基能与氨基酸发生酰化反应,L-精氨酸能为酰化反应提供反应底物;②胍的碱性与无机强碱相当,可与光气水解产生的盐酸反应成盐;③精氨酸为合成 NO 的前体,外源性 NO 经气道吸入肺内可迅速弥散入肺泡周围组织,选择性舒张肺小血管平滑肌,从而降低肺血管阻力,降低肺动脉压,改善肺循环,从而缓解肺水肿;④L-精氨酸可通过促进 NO 生成与释放,减少氧自由基的生成,进一步减少 $ONOO^-$ 的产生,从而减轻自由基对肺泡壁及肺部毛细血管壁的损伤,达到保护肺功能[15]。本研究尝试用 L-精氨酸治疗光气引起的急性肺损伤,证实其有效性,但给药的时间、剂量和伍用药物还有待更进一步研究。

光气吸入使肺脏局部氧化/抗氧化系统的平衡破坏,导致氧化应激。还原型 GSH 的含量反映了机体氧化/抗氧化系统的平衡状况,还原型 GSH 的含量减少,表明平衡向氧化方向偏移。MDA 是氧自由基攻击生物膜中多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化而形成的脂质过氧化物,能引起细胞损伤。SOD 是反映氧自由基清除情况,是抗氧化酶中最常用的检测指标之一。iNOS 的上调可以导致 NO 大量生成,引起氧化应激反应。因此,机体内还原型 GSH、MDA 的含量和 SOD、iNOS 的活力常作为评价氧化应激反应的指标。本研究表明,与正常对照组大鼠比较,光气染毒大鼠肺组织 MDA 含量明显升高,GSH 含量明显下降,SOD 活力显著下降,iNOS 活力升高。这表明大鼠吸入光气后机体发生了明显的氧化应激,导致严重的肺损伤。精氨酸处理光气染毒动物后随着剂量增加 GSH 含量逐渐升高,MDA 含量逐渐下降,SOD 活力逐渐升高,iNOS 活力逐渐下降,且与光气染毒组比较,有显著变化。同时,肺损伤指标及光学显微镜下病理改变证实精氨酸处理后肺组织损伤也明显减轻。这些结果表明精氨酸可清除大量氧自由基,使肺损伤程度减轻,在光气吸入性肺损伤中发挥保护作用。

目前地塞米松被认为是治疗急性肺损伤的有效药物,本实验对精氨酸和地塞米松进行比较发现,两者处理光气染毒动物后,肺损伤指标都有明显减轻,MDA 含量下降和 SOD 活力升高,但精氨酸能显著升高 GSH 含量和降低 iNOS 活力,而地塞米松对 GSH 含量和 iNOS 活力没有显著影响。由此推论:精氨酸有与地塞米松相似的肺保护作用,但精氨酸有比地塞米松更强的抗氧化应激作用。至于地米精氨酸组 MDA 含量为何会升高,还没有合理的解释。

有研究在单侧肺缺血-再灌注损伤兔模型上,发现 L-精氨酸组抑制细胞凋亡的 bcl-2 mRNA 的表达及 bcl-2/bax mRNA 的比值显著高于模型组;肺湿干质量比和肺组织形态学异常有不同程度减轻,提示精氨酸对肺缺血-再灌注损伤有保护作用[16]。光气损伤主要是肺内皮和肺泡上皮的损伤,导致细胞间的紧密连接破坏,血浆渗漏到肺泡间质和肺泡内,形成肺水肿。由于急性肺水肿的发生多在数小时,一般会早于明显的细胞凋亡,但有研究在分离的染毒后离体肺泡上皮上证实细胞凋亡的发生[17]。本研究观察了光气暴露后 2~6 h 的肺损伤情况,故凋亡相关指标没有考虑在内。在较长时相点的研究上,可以加入细胞凋亡的相关检测指标。

参考文献:

[1] 海春旭. 急性光气中毒机制与防护研究进展[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(5): 371 - 376. DOI: 10.3969/j.issn.1002-3127.2007.05.009

[2] 姜桢,郭克芳,董苏斐. 左旋精氨酸与氧自由基的相互作用[J]. 临床麻醉学杂志, 2000,16(10): 503 - 505. DOI: 10.3969/j.issn.1004-5805.2000.10.010

[3] Jaskot R H, Grose E C, Richards J H, *et al*. Effects of inhaled phosgene on rat lung antioxidant systems[J]. Fundam Appl Toxicol ,1991,17(4): 666 - 674. DOI: 10.1093/toxsci/17.4.666

[4] Tisljar M, Grabarevic Z, Artukovic B, *et al*. The impact of L-NAME and L-arginine chronic toxicity induced lesions on ascites-pulmonary hypertension syndrome development in broiler chickens[J]. Coll Antropol, 2011,35(2): 547 - 556.

[5] 范玉丽,盛净,朱健, 等. L-精氨酸对大鼠脂多糖致急性肺损伤的影响及机理[J]. 临床与病理杂志,2015,35(4): 642 - 647. DOI: 10.3978/j.issn.2095-6959. 2015.04.023

[6] 苏艳军,刘其雨,刁畅,等. L-Arg 与腹腔注射 PPAF 诱导的大鼠急性肺损伤的实验研究[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2012,19(3): 282 - 287.

[7] 秦绪军,海春旭,梁欣,等. 急性光气吸入对大鼠抗氧化酶及一氧化氮和一氧化氮合酶的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004,22(3): 200 - 202. DOI: 10.3760/cma.j.issn. 1001-9391.2004.03.012

[8] 郭玉新. L-精氨酸对高原肺水肿患者血液流变学的作用[J]. 西南国防医药,2005,15(3): 256 - 258. DOI: 10.3969/j. issn.1004-0188.2005.03.009

[9] 李立萍,张建新,李兰芳. L-精氨酸对脂多糖诱导大鼠肺损伤的保护作用及其机制的研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2010, 26(1): 90 - 93. DOI: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.04.023

[10] Luo S, Pauluhn J, Trübel H, *et al*. Corticosteroids found ineffective for phosgene-induced acute lung injury in rats [J]. Toxicol Lett, 2014,229(1): 85 - 92. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.06.011

[11] Holmes W W, Keyser B M, Paradiso D C, *et al*. Conceptual approaches for treatment of phosgene inhalation-induced lung injury[J]. Toxicol Lett,2016,244: 8 - 20. DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.10.010

[12] 王立媛,杨贺庆,安友仲. 联合应用谷氨酰胺和 L-精氨酸对饥饿大鼠肠屏障作用的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008,30(3): 272 - 273. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2008.03.009

[13] 曾兢,朱京慈. 精氨酸营养干预对重型颅脑损伤大鼠细胞免疫功能和蛋白代谢的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007,29(19): 1877 - 1879. DOI: 10.3321/j.issn: 1000-5404.2007.19.014

[14] Mabalirajan U, Ahmad T, Leishangthem G D, *et al*. L-arginine reduces mitochondrial dysfunction and airway injury in murine allergic airway inflammation [J]. Int Immunopharmacol, 2010,10(12): 1514 - 1519. DOI: 10.1016/j.intimp.2010.08.025

[15] 崔建华,王引虎,张西洲, 等. 雾化吸入 L-精氨酸对高原肺水肿患者 NOS 的影响[J]. 高原医学杂志,2001,11(4): 8 - 11. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3809.2001.04.003

[16] 王万铁,戴雍月,许益笑, 等. L-精氨酸对肺缺血/再灌注损伤时 bcl-2、bax 基因表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(2): 288 - 292.

[17] Li W L,Hai C X,Liang X, *et al*. Apoptosis of AT Ⅱ cells in mice induced by phosgene[J]. Inhal Toxicol,2006,18(1): 71 - 77. DOI: 10.1080/08958370500282936

(**收稿**:2016-07-19;**修回**:2016-09-23)

(编辑 王 红)