DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.025

模拟高原大鼠梭曼中毒后肺中磷脂酶 A_2、ACE及 TNFα 的变化

赵吉青* 吕宏宇 魏相德 胡贵方 (第三军医大学预防医学系毒理学教研室) 重庆,400038

提 要 目的:阐明高原缺氧条件下梭曼中毒肺损伤的特点及机理。方法:应用微量滴定,酶联免疫技术,伊文思蓝标记白蛋白技术测定了在模拟高原 4000 m梭曼中毒后大鼠肺组织及肺灌洗液的磷脂酶 A_2 (PLA_2)、血管紧张素转换酶 (ACE)活性和肺组织肿瘤坏死因子 (TNFα)、伊文思蓝 (EB)含量的变化。结果:中毒 48 h PLA_2、ACE、TNFα 和 EB含量显著高于 12、24 h,在同一时相点,高原中毒组显著高于其它组。结论:提示 PLA_2活性增高和 TNFα 含量的增加可使肺微血管通透性升高,在高原梭曼中毒肺水肿发病机理中起重要作用。

关键词 模拟高原;梭曼;肺损伤;磷脂酶 A_2;TNFα
中图法分类号 R827.172

梭曼是一种毒性强、作用快并且难防难治的化学战剂,主要引起中枢神经系统的紊乱[1]。尤其在氧分压低的高原地区毒性加大,其中以肺损伤最为严重。其发病机理涉及多个环节,本研究主要探讨肺磷脂酶 A_2的活性和 TNFα 在肺损伤发病机理的作用。

1 材料与方法

1.1 动物和药品

Wistar鼠 78只,雌雄不拘,体重 180~240 g 随机分为平原对照组 (6只),平原中毒组 (24只),高原对照组 (24只),高原中毒组 (24只)。

梭毒 (纯度 94.28%)由军事医学科学院六所提供,临用以生理盐水配制溶液。

1.2 方法

平原对照直接取样;高原对照组和高原中毒组动物均预先在模拟高原 4000 m停留 6 h,中毒组大鼠再皮下注射梭曼后继续停留低压舱 12、24、36、48 h取样,同时对照组在相应时相点取样,行支气管肺泡灌洗 (BAL)术,收集支气管灌洗液 (BALF),同时用生理盐水作肺动脉灌注,制备 10% 无血的肺组织匀浆。

1.3 检测指标

1.3.1 肺组织及 BALF中 PLA_2活力测定参照文献 [2]。

1.3.2 伊文思蓝标记白蛋白的方法和其在肺组织中的含量测定参照文献 [3]的方法进行。

1.3.3 肺组织 TNFα 含量用北京邦定生物医学公司提供的药盒进行测定。

1.3.4 ACE活性用海军总医院提供的药盒进行测定。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 模拟 4000 m大鼠梭曼中毒临床特点

高原复合缺氧梭曼急性中毒后 5 min内动物很快出现流涎、震颤、四肢无力、阵发性惊厥等中毒症状,病理解剖发现中毒后 36 h可见两肺轻度肿大。

2.2 肺组织 EB、TNFα 含量的变化见表 1

表 1 模拟高原梭曼中毒大鼠肺组织 PLA_2的活性和 EB、TNFα 变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 1 Changes of PLA_2 activities and EB, TNFα in lung tissue by soman intoxication at simulated high altitude ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

		Control	Time after intoxication (t/h) 12	24	36	48
PLA_2	Ⅰ	29.20±8.23	30.18±6.88	42.76±7.41**	40.08±8.32**	34.22±6.64**
	Ⅱ		38.28±8.01*	53.54±7.18**	62.58±7.18**	67.82±8.26**
	Ⅲ		48.23±6.52**△△##	68.38±9.01**△△##	93.44±9.85**△△##	114.92±11.33**△△##
EB	Ⅰ	2.48±0.41	4.27±0.66**	3.98±0.32**	3.31±0.47**	2.74±0.38
	Ⅱ		2.91±0.46	3.28±0.53*	4.08±0.78**	5.13±0.58**
	Ⅲ		7.52±0.94**△△##	9.08±0.89**△△##	10.07±1.01**△△##	12.1±0.85**△△##
TNFα	Ⅰ	undetected	1.68±0.13**	2.10±0.27**	1.91±0.16**	1.33±0.30**
	Ⅱ		undetected	undetected	0.81±0.14**	0.93±0.28**
	Ⅲ		0.53±0.08**△△##	1.82±0.12**△△##	1.08±0.11**△△##	1.01±0.26**△△##

Ⅰ: Intoxicated group at sea level; Ⅱ: Control group at altitude; Ⅲ: Intoxicated group at altitude; PLA_2: Phospholipase A_2 (μg/g wet lung); EB: Evans blue contents (μg/100 mg wet lung); TNFα: Tumor Necrosis Factor (ng/g wet lung). *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ vs control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ vs Ⅰ; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ vs Ⅱ

* 赵吉青,男,28岁,助教,硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

高原中毒组肺组织伊文思蓝含量随时间延长而递增,在 48 h显著高于其它时相点($P < 0.01$或 $P < 0.05$);各时相点均明显高于平原中毒组、高原对照组和平原对照组。平原中毒组肺组织伊文思蓝含量,中毒后 12 h最高,至 48 h已回落到平原对照水平。而高原对照组随时间延长呈上升趋势;高原缺氧 48 h显著高于 12、24 h和平原对照组。

平原中毒组 TNFα含量在中毒后 12、24、36 h显著高于高原中毒组。高原中毒组与平原中毒组肺组织 TNFα含量变化规律一致,中毒 24 h达高峰。

2.3　BALF中 ACE活力的变化见表 2

表 2　模拟高原梭原中毒大鼠肺灌洗液 PLA_2和 ACE的活性变化($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab 2　Changes of PLA_2, ACE activities in BALF by soman intoxication at simulated high altitude ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

		Control	Time after intoxication(t /h)			
			12	24	36	48
PLA_2	Ⅰ	1.18± 0.24	1.51± 0.18	2.48± 0.61***	3.05± 0.44**	2.97± 0.58**
	Ⅱ		1.44± 0.21	1.85± 0.47	2.82± 0.51**	3.62± 0.66**
	Ⅲ		2.18± 0.47**△△##	4.07± 1.02**△△##	7.06± 1.23**△△##	7.25± 1.82**△△##
ACE	Ⅰ	11.33± 2.88	20.07± 6.66**	18.26± 5.65**	15.84± 4.21*	13.61± 4.26**
	Ⅱ		12.94± 3.06	19.96± 5.61***	25.64± 6.38**	30.08± 6.04**
	Ⅲ		18.28± 3.99**△	32.46± 8.01***△△##	38.27± 8.88**△△##	37.12± 8.54**△△##

Ⅰ: Intoxicated group at sea level. Ⅱ: Control group at altitude. Ⅲ: Intoxicated group at altitude. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ *vs* control; △: $P < 0.05$, △△: $P < 0.01$ *vs* Ⅰ; #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$ *vs* Ⅱ

高原中毒组 BALF中 ACE活力在中毒后 12、24、36 h逐渐上升;在同一时相点高原中毒组 ACE活力高于平原对照组、高原对照组、平原中毒组。相关分析显示,高原中毒组 ACE活力与肺组织 EB含量显著相关($r = 0.91$, $P < 0.01$)。

2.4　肺组织及 BALF中 PLA_2活力变化见表 1、2

高原中毒组肺组织及 BALF中 PLA_2活力在不同时相点之间变化显著,中毒后 48 h显著高于 12 h和 24 h($P < 0.01$)。在同一时相点,高原中毒组 PLA_2活力明显高于平原对照组、高原对照组、平原中毒组。平原中毒组 PLA_2活力在 24、36、48 h高于对照组。高原对照组 PLA_2活力随高原缺氧时间延长而上升明显,缺氧 48 h显著高于 12 h和 24 h。

相关分析显示,高原中毒组肺组织和 BALF中 PLA_2活力变化一致($r = 0.9275$, $P < 0.01$),同时肺组织和 BALF中 PLA_2活力也与肺组织伊文思蓝含量显著相关($r = 0.82$, $r = 0.88$, $P < 0.01$)。

2.5　光电镜观察

2.5.1　光镜观察结果　　高原复合缺氧中毒后 48 h可见肺小血管高度扩张充血,肺间质和肺泡腔内都水肿非常显著:肺泡隔厚部和薄部明显增宽,肺泡腔扩张,内有液体渗出,大部分肺泡壁被渗出的液体覆盖。

2.5.2　电镜观察结果　　高原缺氧复合梭曼中毒后 48 h肺组织Ⅱ型肺泡细胞内质网扩张,板层体排空,数量减少;核周间隙增宽,肺泡腔散布有表面活性物质碎片;肺毛细血管内皮细胞肿胀,其核明显凸向管腔,胞浆中可见内质网扩张。

3　讨论

本实验结果显示,高原复合梭曼中毒后 BALF中 ACE活力明显升高,且与肺组织 EB含量显著相关,提示增高的 ACE来源于肺循环,可能为肺毛细血管内皮细胞受损所致。电镜下呈见肺间质和肺泡水肿,毛细血管内皮细胞和肺泡Ⅱ型上皮细胞出现损伤性变化,从而证明毛细血管通透性增高与其内皮细胞损伤有关。此外磷脂酶 A_2和 TNFα在肺损伤过程中也起一定作用。

有研究表明内毒素、休克、缺血、缺氧及氧自由基均能激活 PLA_2而造成炎症介质的大量释放和膜功能的变化,增加肺血管通透性,引起肺水肿[4]。本实验发现无论是单纯梭曼作用还是梭曼复合缺氧均可使肺组织和 BALF中 PLA_2活力升高。复合作用引起肺泡腔出现水肿液的同时, PLA_2活力升高也非常明显(36 h, 48 h),且与肺组织 EB含量明显相关。说明肺毛细血管通透性增高与 PLA_2的作用有关。

缺氧和梭曼中毒均可使 PLA_2活性升高,也可诱发氧自由基的产生和聚集,两者对细胞膜的损害有协同作用。当缺氧和梭曼中毒时,严重影响或损害 ATP功能,导致线粒体氧化磷酸化过程受阻,激活黄嘌呤氧化酶,分解产生次黄嘌呤,引起氧自由基生成增多,自由基可直接激活 PLA_2[5]。 PLA_2可直接作用于肺毛细血管和/或通过破坏肺内肾上腺素能受体平衡而使毛细血管通透性增大[6];同时 PLA_2激活还可导致膜磷脂降解,产生溶血卵磷脂和一分子游离脂肪酸。当游离脂肪酸增加时,严重影响中枢能量代谢、血脑屏障通透性和膜离子梯度改变,使水进入细胞内,诱发组织水肿[7]。有人还发现 PLA_2可直接损伤Ⅱ型上皮细胞[8,9],

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

本研究病理结果与其一致[9]。

本实验结果还发现梭曼中毒和高原缺氧复合梭曼中毒都能使肺组织 TNFα 含量增加,但梭曼中毒增加更为明显,同时伴有肺组织病理改变,说明肺毛细血管通透性增高也可能与 TNFα 的作用有关。TNFα 作为一种细胞因子,具有广泛的生物学活性,它可通过多种途径造成血管内皮细胞的损伤,使表面微绒毛减少,胞质次级溶酶体增多,线粒体肿胀、变性,引起血紧张度调节方面的障碍,进而增加肺毛细胞血管通透性[10]。据报道[11],TNFα 还可激活 PLA_2,引起细胞损伤,有关它们间的协同作用尚待进一步研究。

由此可见,高原复合梭曼中毒引起的肺水肿可能与 PLA_2的活性升高和 TNFα 的作用有关,这为预防复合致伤性肺水肿的发生提供了有力的理论依据。

参考文献

1 Blick D W, Weathersby F R, Brown G C *et al*. Brhavioral toxicity of anticholinesterases on primates: effects of daily repeated soman exposure. Pharmacol Biochem Behav, 1994, 48(3): 643

2 陈思锋,吴中力,丁自强等.狗急性胰腺炎时磷脂酶 A_2的变化及其在急性肺损伤中的作用.第二军医大学学报,1989,10(1): 105

3 Saria A, and Lundberg J M. Evans blue fluorescence: quantitative and morpholgical evaluation of vascular permeability in animal tissues. J Neurosci Method, 1983, 8(1): 41

4 Bowton D L, Seeds M C, Fasano M B *et al*. Phopholipase A_2 and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled atigen challenge inasthmatics. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 55(2): 421

5 Cutaia M, Parks N. Effect of hyperoxia and exogenous oxident stress on pulmonary artery endothelial cell Na^+/H^+ atiport activity. J Lab Clin Med, 1996, 128(2); 154

6 易寄东,田 英,品宝璋.大鼠磷脂酶 A_2激活与肺中肾上腺素能受体平衡失调.中国药理与毒理学杂志,1992,6(2): 210

7 魏相德,赵 清,王仕丽.梭曼中毒对大鼠脑水肿的影响.第三军医大学学报,1996,18(1): A2

8 丁自强,吴中立.肺泡II 型肺泡上皮细胞的分离和磷脂酶 A_2的损伤作用.第二军医大学学报,1992,13(1): 17

9 宋双明,陆松敏,刘建仓等.内毒素休克中红细胞膜的损伤及与磷脂酶 A_2的关系.中国病理生理学杂志,1995,11(6): 633

10 朱明光,金伯泉,吴光裕等.肿瘤坏死因子介导病理性氧供应依赖性的实验研究.中国应用生理学杂志,1995,11(2): 169

11 Goodman R, Stevens T M, Mantegna L R *et al*. Phospholipase A_2 activity in bovine pulmonary artery endothelial cells. Agents and Actions, 1991, 34(1~2): 113

(收稿: 1996-08-06;修回: 1997-06-12)

(编辑 张大春)

Changes of PLA_2, ACE and TNFα in the lungs after soman intoxication at a simulated high altitude in rats

Zhao Jiqing, Lu Hongyu, Wei Xiangde, Hu Guifang (Department of Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To clarify the mechanism of pulmonary damage after soman intoxication at high altitudes. **Methods**: The changes of the activity of phospholipase A_2 (PLA_2) and contents of Evans blue (EB) and TNFα in the pulmonary tissue and the activity of PLA_2 and ACE in BALF were observed in rats after soman intoxication at a simulated altitude of 4000m. **Results**: The activity of PLA_2 and ACE and the contents of EB and TNFα were significantly at the 48th hour than at the 12th and 24th hour after soman intoxication at the simulated high altitude. **Conclusion**: The increase in the activity of PLA_2 and content of TNFα can cause the increase of pulmonary microvascular permeability, which plays an important role in the development of pulmonary edema after soman intoxication at high altitudes.

Key words simulated high altitude; soman; pulmonary damage; phospholipase A_2; TNFα; rat

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net