DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.03.014

活性氧在犬实验性呼吸窘迫综合征发病中的作用

张 琳* 毛宝龄 张楚毅 郭先健 (第三军医大学新桥医院呼吸科) 630037

提 要 将成龄杂种犬 25 只,随机分 3 组:致伤组、治疗组、盐水组。采集不同时相动、静脉血及活杀时的肺组织,肺泡灌洗液 (BAL),测超氧化物歧化酶 (SOD) 活性与脂质过氧化物 (LPO) 含量,结合临床、病理学检查,得以下结果:(1) 复制了骨髓型呼吸窘迫征(RDS) 模型;(2) 致伤组伤后血液、肺组织、BAL 中 SOD 和 LPO 明显升高,提示注射骨髓提取液后,活性氧 (AO) 的产生急剧增加,过氧化作用增强,出现不同程度的急性肺损伤表现;(3) 治疗组伤后血、肺组织和 BAL 中 SOD 和 LPO 虽亦升高,但均低于致伤组,提示由于 654-2 的干预,AO 产生减少。盐水组未见异常。结果提示,AO 在犬 RDS 急性肺损伤中可能发挥了重要作用。

关键词 氧;超氧化物歧化酶类;过氧化脂质类;狗

目前认为,成人呼吸窘迫综合征(ARDS)的肺损伤最终涉及到 AO 的毒性作用,它参与了肺泡-毛细血管膜 (ACM) 的损伤,导致急性肺水肿[1,2]。但详尽机理尚未完全阐明。鉴于 AO 半衰期极短,测定与其平行出现的 SOD 及 AO 毒性作用的产物 LPO,间接反映 AO 在体内的活性与组织损伤的程度[3,4]。本文以犬骨髓型 RDS 模型,检测不同时间的动、静脉血及活杀时肺组织与 BAL 中的 SOD 活性和 LPO 含量;同时观察临床,实验检查和病理学改变;并以 654-2 进行干预治疗,借以探讨 AO 在犬 RDS 早期肺损伤发病中的作用,为临床防治提供依据。

1 材料和方法

1.1 模型的复制与标本的采集

1.1.1 动物与分组:选健康成龄杂种犬 25 只,体重 10.38±1.86kg,性别不拘,随机分为 3 组:提取液致伤组(致伤组,14 只)、654-2 治疗组(治疗组,6 只)和生理盐水对照组(盐水组,5 只)。

1.1.2 模型的复制方法:将实验犬常规麻醉,固定后,分离右颈静脉和股动、静脉,分别插入肺动脉导管和塑料管。然后,致伤组按 1.4ml/kg 体重经右股静脉注入提取液,治疗组注入同量提取液后,立即注入 654-2 (10mg/kg/h);盐水组注入与提取液等量的生理盐水。

1.1.3 标本的采集与处理:各组动物在施加上述因素前 (简称伤前) 和施加处理因素后 (简称伤后) 5、30min,1、2、4、6h,分别采集动、静脉血各 2ml;于伤后 6h 股动脉放血活杀,立即取肺,肉眼观察后,将右肺部分作光、电镜检查,部分匀浆后测 SOD 和 LPO;将左肺下叶灌洗后,收集 BAL,测其 SOD 活性和蛋白含量。

1.2 SOD 和 LPO 的测定

SOD 活性测定采用化学发光法[5];丙二醛 (MDA) 是 LPO 的二次降解产物,其含量测定采用荧光法[6]。

1.3 病理学检查

活杀后立即结扎气管,分别取肺、心、肝、肾观察大体病变;同时进行光、电镜检查。

1.4 其他观测项目

一般情况、血气分析、肺动脉平均压 ($\overline{PAP}$)、胸部 X 片、肺水量、肺组织匀浆液和 BAL 中蛋白含量的测定等。

1.5 统计学处理

在 Apple-Ⅱ型电子计算机上进行曲线拟合、单因素和双因素方差分析。

2 结果

* 现在北京解放军 304 医院呼吸科

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

2.1 SOD 的测定结果

2.1.1 动、静脉血 SOD 活性：致伤组伤后 5min 动脉血中 SOD 活性即迅速升高，2h 达高峰；6h 内均显著高于伤前水平（$P<0.001$）和盐水组（$P<0.01$）；治疗组伤后动脉血中 SOD 活性亦高于伤前（$P<0.05$）和盐水组（$P<0.01$），但低于致伤组。静脉血中 SOD 活性，致伤组和治疗组伤后均高于伤前和盐水组（$P<0.01$），但致伤组和治疗组无显著意义（$P<0.05$）。（见表 1）

表 1　3 组动、静脉血 SOD 活性变化比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	伤前	伤后 5min	30min	1h	2h	4h	6h
盐水组 A；	264.368	269.870	279.046	256.514	304.160	315.208	270.936
	±42.457	±125.013	±140.567	±112.330	±120.439	±42.455	±77.585
V；	262.096	365.386	340.042	350.470	325.838	244.368	272.434
	±28.444	±91.671	±73.534	±82.376	±23.080	±93.517	±112.778
致伤组**A*#；	262.221	502.746$^{\triangle\triangle}$	575.150$^{\triangle\triangle}$	616.031$^{\triangle\triangle}$	789.301$^{\triangle\triangle}$	611.700$^{\triangle\triangle}$	461.365$^{\triangle}$
	±99.573	±210.192	±214.693	±256.615	±382.836	±209.318	±276.024
V；	263.627	493.330$^{\triangle}$	535.559$^{\triangle}$	585.866$^{\triangle}$	572.627$^{\triangle}$	522.808$^{\triangle}$	534.606$^{\triangle}$
	±79.337	±236.162	±210.295	±212.704	±291.193	±293.718	±277.316
治疗组**A；	270.733	446.032	446.290	488.992$^{\triangle}$	448.128$^{\triangle}$	461.365$^{\triangle}$	494.273$^{\triangle}$
	±50.910	±127.719	±123.162	±139.144	±111.806	±177.402	±150.026
V；	245.390	543.092	407.002	438.610$^{\triangle}$	521.375$^{\triangle}$	501.022$^{\triangle}$	513.465$^{\triangle}$
	±55.655	±282.487	±184.948	±120.851	±224.029	±135.765	±169.916

伤前与伤后比较：$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$；组内动、静脉比较：$^{\#}P<0.05$；与盐水组动、静脉比较：$^{**}P<0.01$；致伤组与治疗组比较：$^{**}P<0.01$

2.1.2 肺组织和 BAL 中 SOD 活性：治疗组与盐水组无显著差异，而致伤组高于盐水组（$P<0.05$），且 BAL 中 SOD 活性还显著高于治疗组（$P<0.05$）。（见表 2）

表 2　肺组织及 BALF 中 SOD、LPO 变化的比较（$\bar{x}\pm s$）

	肺组织	BALF	
	LPO(nmol/mg)	SOD(u/mg)	SOD(u/ml)
盐水组	0.500±0.045	0.410±0.209	0.178±0.047
致伤组	0.873±0.168$^{\triangle\triangle}$	1.298±0.606$^{\triangle}$	0.495±0.296$^{\triangle}$
治疗组	0.662±0.242*	0.936±0.332	0.199±0.042*

与盐水组比较：$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$；治疗组与致伤组比较；$^{*}P<0.05$；未测定 BALF 中的 LPO

2.2 LPO 测定结果

2.2.1 动、静脉血中 LPO 含量：盐水组伤后无明显变化，治疗组伤后各时相均高于伤前（$P<0.05$）；致伤组动脉血 5、30min 和静脉血 30min 显著高于伤前（$P<0.05$）；致伤组和治疗组动、静脉血中 LPO 变化相似，均显著高于盐水组。（见表 3）

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

表 3 动、静脉血中 LPO 浓度变化比较（$\bar{x} \pm s$）

		伤前	伤后 5min	30min	1h	2h	4h	6h
盐水组	A	2.73±0.88	2.59±0.96	2.72±0.31	2.66±0.59	2.58±0.37	2.70±0.72	2.57±0.45
	V	2.57±0.48	2.69±0.56	2.66±0.71	2.47±0.57	2.67±0.15	2.45±0.37	2.66±0.79
致伤组*	A	2.86±0.42	4.12±0.80△	3.98±0.81△	3.59±1.19	3.72±1.37	3.60±1.03	3.18±0.75
	V	2.69±0.39	3.50±1.05	3.84±0.70△	3.78±1.39	3.48±0.90	3.21±0.42	3.57±0.92
治疗组*	A	2.67±0.34	3.60±0.51△	4.07±0.94△	3.66±0.77△	3.53±0.58△	3.73±0.44△	3.65±0.61△
	V	2.63±0.28	3.71±0.57△	3.52±0.48△	3.35±0.41△	3.26±0.66△	3.46±0.35△	3.68±0.63△

与伤前比较△$P<0.05$；与盐水组比较*$P<0.01$

2.2.2 肺组织中 LPO：致伤组显著高于盐水组和治疗组（$P<0.01$），但后两者无显著差异。（见表 2）

2.3 病理学结果

大体观：致伤组肺体积明显增大，表面有暗红斑，气管和肺切面有泡沫状液体流出。光镜下，主要表现为肺间质增宽，肺泡水肿，透明膜形成，大量多形核粒细胞（PMN）浸润、聚集，片状肺不张和代偿性肺气肿。透射电镜观：肺泡膜增厚，毛细血管扩张、充血、迂曲，PMN 和血小板（PC）聚集，并有颗粒排空现象。间质水肿明显，肺泡腔内有大量渗出物（图 1）。Ⅰ型肺泡上皮细胞（Ⅰ-C）肿胀，胞内有空泡形成；Ⅱ型肺泡上皮细胞（Ⅱ-C）内质网扩张，核周间隙扩大；内皮细胞（PCEC）肿胀，吞饮小泡减少，并见细胞连接处分离现象。扫描电镜观：肺泡隔增厚（图 2）。泡腔内可见大量 RBC、WBC、纤维素样渗出，并有阻塞肺泡孔现象（图 3）。治疗组病变较轻，盐水组未见异常。此外，3 组肝、肾、心未见明显病变。

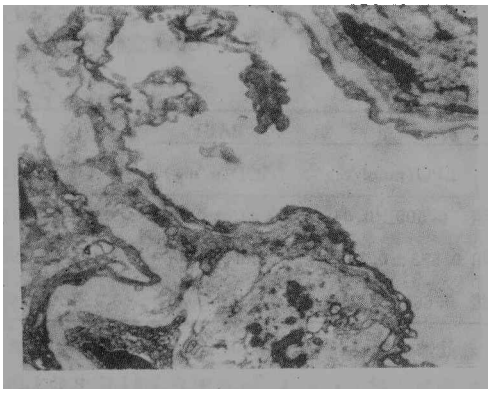


图 1 肺间质水肿，基底膜增厚，肺泡腔渗出物
致伤组×1 000

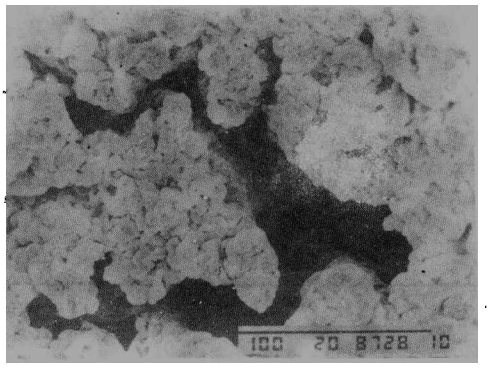


图 2 肺毛细血管扩张、迂曲；肺泡隔增厚
致伤组 · 500

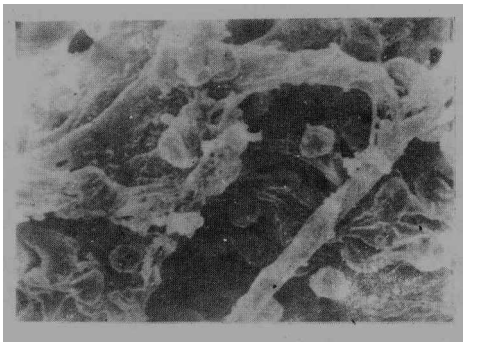


图 3 肺泡腔内大量细胞游出
致伤组×3 500

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

2.4 其他

2.4.1 一般情况：致伤组和治疗组伤后呼吸均明显快于伤前和盐水组（$P<0.01$），呼吸窘迫、紫绀和肺部干性罗音，前者较重，盐水组无异常。

2.4.2 血气分析：PaO_2 致伤组伤后 5min 明显下降，6h 内持续低于伤前和盐水组（$P<0.01$）；治疗组伤后 5min 亦明显下降，30min 后回升，此后各时相与盐水组无变化。$PaCO_2$ 和 pH 3 组间无差异。

2.4.3 PAP：致伤组伤后立即升高，伤后 5、30min，1h 和 6h 均显著高于伤前（$P<0.001$），亦高于盐水组和治疗组（$P<0.01$）；后二者间无差异。

2.4.4 胸部 X 线表现：致伤组伤后 6h，肺部出现网、片状阴影，呈磨玻璃样改变；治疗组肺纹理模糊，见小片阴影；盐水组无异常。

2.4.5 肺水量和 BAL 中蛋白含量：致伤组 6h 活杀时，肺水量、肺湿/干重等及 BAL 中蛋白含量均高于盐水组（$P<0.01$）；治疗组仅 BAL 中蛋白含量高于盐水组（$P<0.01$），且与致伤组无差异。

3 讨论

3.1 模型的特点

RDS 模型复制方法很多[2,3,4]，本文建立了骨髓型犬 RDS 模型，其临床和病理学改变基本符合 ARDS 诊断要点，其优点：(1) 模拟了严重创伤和多发性骨折 ARDS 发生的有关病因学条件。(2) 模型稳定，重复性好。(3)它较其它小动物模型更适于进行综合性研究。

3.2 AO 与 RDS

3.2.1 AO 参与犬 RDS 肺损伤的证据：SOD 的活性不仅与 AO 含量有较好的相关性，而且与组织损伤程度亦有良好的关联性[2,3,4]；LPO 作为 AO 引发链锁反应的产物，与肺损伤的程度有直接的量相关[7]。无疑，SOD 和 LPO 的动态变化，可以反映 AO 的消长及组织损伤的程度。本实验有三点证据间接提示 AO 参与犬 RDS 肺损伤的病理过程。

3.2.1.1 致伤组：伤后动、静脉血 SOD 立即升高，6h 内持续高于伤前，且动脉血明显高于静脉血；与此同时，血中 LPO 也升高。提示注射提取液后 AO 产生急剧增加，其过氧化作用增强，生成较多的 LPO。犬出现呼吸窘迫和肺部干湿性罗音；活杀后发现，PCEC、Ⅰ-C、Ⅱ-C 和间质成分呈不同程度的急性损伤，同时测得肺组织 SOD、LPO 及 BAL 中 SOD 活性均明显升高。

3.2.1.2 治疗组：伤后动、静脉血中 SOD 和 LPO 均高于伤前，但动脉血 SOD 显著低于致伤组；BAL 中 SOD 及肺组织中 LPO 均低于致伤组，说明由于 654-2 的干预，AO 产生减少，其脂质过氧化作用减轻；该组犬临床和病理所见，亦较致伤组轻。

3.2.1.3 盐水组：动、静脉血 SOD 和 LPO，伤后均无变化；活杀时肺组织 SOD 和 LPO 及 BAL 中 SOD 活性显著低于致伤组；未发现任何病理改变。

3.2.2 AO 的来源：上述 SOD 和 LPO 的升高，表明体内产生了大量 AO，其来源：①聚集于肺内的 PMN 被激活经呼吸骤发而释放[2]；②脂肪栓塞致组织灌流不足，由缺血缺氧的肺组织产生[8]；③其它：肺泡巨噬细胞（AM）的吞噬过程，活化的环氧合酶催化花生四烯酸（AA）代谢产物的生成过程中，PC 被激活后，皆可释放 AO[9]。

3.2.3 AO 的损伤作用：AO 的生成一旦超过机体的清除能力，则损伤组织细胞[2,3]。SOD 活性的增加，是机体对 AO 增加的一种防御性抗氧化反应，而 LPO 的增加则是 AO 损害机体的有力证据。本实验中，致伤组 BAL 中蛋白含量增高，肺水量明显增加，肺水肿显著，表明 PCEC 及基底膜受损，致 ACM 通透性增加；结合动、静脉血、肺组织和 BAL 中 SOD 和 LPO 显著增加这一事实，提示 AO 可参加肺损伤的病理过程，机理可能是：①过氧化作用和细胞毒作用，直接破坏 PCEC 和 ACM[2,3]；②参与血浆内脂类趋化因子的形成，使 PMN 聚集、激活与 AO 释放的正反馈[10]；③加速 AA 代谢产物生成，促进小气道痉挛和 PAP 升高，从而加重肺损伤[1]；④AO 可使 α_1-抗胰蛋白酶失活，继而

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

使活性增强的弹性蛋白酶分解结缔组织，导致 ACM 和肺间质破坏。AO 可激活一些蛋白水解酶，从而加重了酶促组织损伤过程[10]。

3.3 654-2 的治疗作用与机理

治疗组的改变较致伤组轻，说明治疗作用是肯定的。可能与间接对抗 AO 的作用有关。即 654-2 对微循环的改善和对肺组织细胞的保护作用[11]，间接地抑制或减少 AO 的生成与释放。

参考文献

1. Raffin TA. Novel approaches to ARDS and sepsis. In: Chernow B & Shoemaker WC (eds). Critical Care-State of the Art. The USA: The Society of Critical Care Medicine 1986; 7:247
2. Ward PA, Johson KJ, Till GP. Animal models of oxidant lung injury. Respiration 1986; 50(suppl 1):5～12
3. Bishop CT, Hassan MM. Free radicals and lung injury. In: Armstrong D(eds). Free Radicals in Molecular Biologv.aging, and Disease. New York: Raven Press, 1984:381
4. Repine JE. Neutrophils, radicals, and acute pulmonary edema. In: Acute Respiratory Failure, based on a meeting held in Tutzing, Germang. Printed in the U.S.A., 1985:347
5. 李益兴 方充中 刘智峰。血液和组织中超氧化物酶的微量测定。军事医学科学院院刊 1984; (3):359～362
6. 周翔，辛中国，孙国光，等。血清过氧化脂质的测定和意义。白求恩医科大学学报 1985; 11(4):358～361
7. Ward PA, Till GO, Hatherill JR, et al. Systemic complement activation, lung injury, and products of lipid peroxidation. J Clin Invest 1985; 76(2):517～527
8. Mccord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med 1985; 312(3):159～163
9. Hechthan HB, Valeri CR, Shepro D. Role of humoral mediators in adult respiratory distress syndrome. Chest 1984; 86(4):623～627
10. Mcguire WW, Spragg RG, Cohen AB, et al. Studies on the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. J Clin Invest 1982; 69(3):543～553
11. 陈祥银 严仪昭 西品香，等。山莨菪碱(654-2)可能具有肾上腺皮质激素样作用 。中国医学科学院学报 1985; 7(5):348

（收稿：1991-08-10；修回：1992-02-25）

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

Study on the role of active oxygen in the pathogenesis of respiratory distress syndrome in dogs

Zhang Lin, Maó Baoling, Zhang Chuyi, et al. (Department of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630037)

Abstract Twenty-five mongrel dogs were randomized into 3 groups; the animals of group Ⅰ were traumatized with bone marrow extract, those of group Ⅱ were similarily traumatized and then treated with anisodamine, and those of group Ⅲ received saline only and served as control. The specimens of arterial and venous blood were collected and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung homogenate were obtained after the animal was killed. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the concentration of lipid peroxides (LPO) were determined. Meanwhile, the clinical manifestations, blood gas analysis, chest radiography, and pathological examinations were performed or observed. It was found there were following findings: (1) In group Ⅰ, SOD activity and LPO level in the lung homogenate and BALF were markedly elevated immediately after injury, which suggests that there had been a rapid production of active oxygen. As a result, various degrees of lung damages were pricipitated. (2) In group Ⅱ, an increase of SOD activity and LPO level in the blood, lung homogenate and BALF: The elevation was more marked than that in group Ⅲ but less marked than that in group Ⅰ, which indicates that there was a relatively of less amount of active oxygen production by the interference anisodamine. (3) In group Ⅲ, no significant changes of SOD activity and LPO livel were found.

Our findings suggest that active oxygen is likely to play a very important role in the pathogenesis of acute lung damages in respiratory distress syndrome.

Key words oxygen; superoxide dismutase; lipid peroxides; dogs

多腺体自身免疫综合征Ⅱ型一例报告

孟 萍 叶绍珍 (第三军医大学西南医院内分泌科) 630038

患者 女，52 岁，1990 年 9 月入院。21 年前曾患甲亢，行甲状腺次全切除术，次年复发经放射性碘治愈。18 个月以前，感皮肤紧束，四肢无力，经血清学及皮肤活检等检查，诊为皮肌炎，强的松 30mg/d 治疗 2 个月，症状缓解后减至小剂量维持。12 个月前现多饮、多尿、消瘦，空腹血糖＞11.1mmol/L，诊为Ⅰ型糖尿病(NIDDM)，间断服 $D_{860}1\sim3g/d$，血糖较稳。近一月，感极度疲乏、易感冒。家族性阴性。体检：血压 20/13kPa，体重 40kg，皮肤粘膜无色素沉着，无突眼，甲状腺未及，心肺无异常发现，肌力正常，阴腋毛稀少。辅助检查：心肌酶谱、TT_3、TT_4、TSH、血生化均正常，血脂略高，血沉 35mm/h，FBG 9.0mmol/L，晚餐前血糖 17mmol/L，尿酮体±，4 次尿糖 －、卄、卅、卅，RF(-)，Tg-Ab 及 Tm-Ab(-)，胰岛素释放试验：各点分别为：79.6 pmol/L、148.5 pmol/L、185.9 pmol/L、178.6 pmol/L、165.7 pmol/L。24h 尿蛋白 0.6g、糖 48.3mmol/L，肝胆胰脾肾及肾上腺 B 超未见异常。蝶鞍片正常。入院诊断：NIDDM、甲亢；甲状腺次全切除术后及放疗后，皮肌炎。

(下转 288 页)

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