DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.03.004

硫化氢对大鼠肺的损伤作用

欧阳子倩 喻 凯* 余争平 叶明福△ （第三军医大学卫生防疫系 毒理学教研室）630038

提 要 Wistar大鼠吸入不同浓度硫化氢（0、100、200ppm）3h后不同时间收集支气管肺泡灌洗液（BALF）进行分析，观察硫化氢（H_2S）对肺的损伤作用，发现H_2S吸入后导致BALF中乳酸脱氢酶（LDH）、碱性磷酸酶（AKP）、酸性磷酸酶（ACP）、细胞总数（TC）、中性多形核白细胞（PMN）、唾液酸（SA）、蛋白以及血管紧张素转换酶（ACE）、磷脂（PL）含量明显增高。增高的峰值一般多在吸入后1h或6h，少数指标为12h。增高的程度与恢复时间均与吸入H_2S的浓度有关。实验结果表明H_2S对肺有强烈的细胞毒作用。磷脂含量的变化提示肺泡表面活性物质受损；ACE活性变化与SA及蛋白含量呈高度相关（前者$r=0.86$，$P<0.01$；后者$r=0.87$，$P<0.01$），说明肺血管通透性增加导致的肺水肿与血管内皮细胞受损有关。同时，肺泡表面活性物质受损也参与H_2S中毒性肺水肿的形成。这些结果与光、电镜观察相一致。

关键词 硫化氢；肺损伤；支气管肺泡灌洗液；肺表面活性剂物质

硫化氢中毒是常见的职业病之一，其毒理学特征及其中毒的救治迄今尚未完全解决。本实验通过大鼠吸入不同浓度的H_2S，观察对肺的损伤作用，探讨其损伤机制，为临床救治提供理论根据。

1 材 料 和 方 法

1.1 MT3-84动式吸入染毒装置，本室研制。用Na_2S与HCl连续发生H_2S气体，经配气系统送入中毒柜，用I_2-$Na_2S_2O_3$滴定法测定柜内H_2S浓度。

1.2 实验动物及分组

健康Wistar大鼠体重180g～220g，雌雄不拘，随机分正常对照（0组）、中毒Ⅰ组（100ppm）和中毒Ⅱ组（200ppm），在暴露3h后立即（0h）、1h、6h、12h、21h、72h及120h活杀动物，收集BALF进行各项指标的检测[1]。

1.3 观察指标及方法

LDH、AKP、ACP活性测定按文献[2]进行；常规方法作BALF细胞计数及分类；SA按文献[3]方法测定；蛋白含量按Lowry法进行；磷脂按文献[4]进行定量分析；ACE活性用海军总院提供的药盒进行测定。

1.4 病理观察

取大鼠右主支气管及两肺各叶的小块组织用常规方法作光镜及电镜超微结构观察。

1.5 统计分析

实验数据在IBM ps/30型计算机上作单、双因素方差分析，用最小显著差值法（FLSD）和N-K法以显著水平$\alpha=0.05$判定均数间差别的显著性；部分指标作了相关分析。

2 结 果

2.1 大鼠中毒表现

大鼠暴露于100ppm 3h后出现眼和上呼吸道轻微刺激症状和不安，停止吸入后有嗜睡和呼吸困难。暴露于200ppm的动物，10min～15min出现呼吸兴奋、深快及躁动不安，1h左右呼吸困难，12h～24h部分动物口鼻有泡沫状液体流出。动物在中毒过程及中毒后均无死亡，活杀后见肺充血，多数有肋骨压痕，肺切面有泡沫状液体溢出。

* 四川华西医科大学卫生系；△ 新桥医院病理科

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 LDH、AKP、ACP活性改变

如图1所示，LDH于中毒后立即升高，6 h达峰值，不同剂量组酶活性改变差别非常显著；两剂量组分别在24h（Ⅰ组）和72h（Ⅱ组）恢复至原有水平。

AKP于中毒后1 h开始升高（Ⅱ组），24h增至原有水平的500%，5 d恢复正常；ACP的变化趋势与AKP一致。低剂量组开始升高不明显，6 h高于正常对照值，12h接近正常水平（图1）。

2.3 细胞成分变化

大鼠200ppm吸入后0 h，BALF中TC、PMN%均显著增加（$P<0.05$），12h达最高值。至120h，TC及PMN%仍显著高于对照值。低剂量组TC数变化趋势与Ⅱ组一致，唯程度较轻，24h后接近正常。

2.4 BALF蛋白含量

中毒后迅速升高，Ⅰ组和Ⅱ组分别于中毒后6 h、12h升至最高，24h后仍显著高于正常值，72h始降至原有水平。

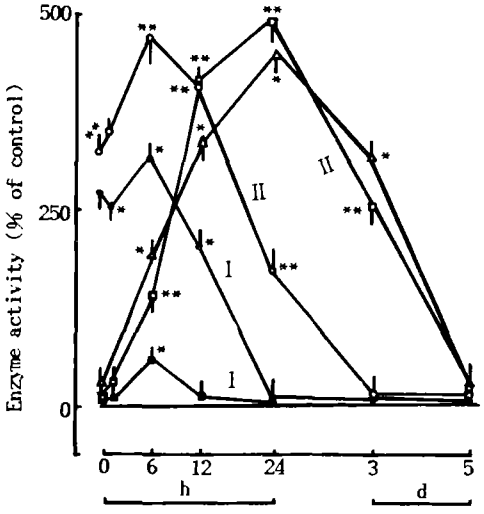


图1 H_2S中毒后BALF中酶活性的变化

Fig. 1 Changes in the activities of enzymes in BALF following H_2S exposure. ($n=6$, $\bar{x}\pm s$). (○, ●) LDH, (■, □) AKP, (△) ACP, *$P<0.05$ compared with control; **$P<0.05$ compared between group I and group II

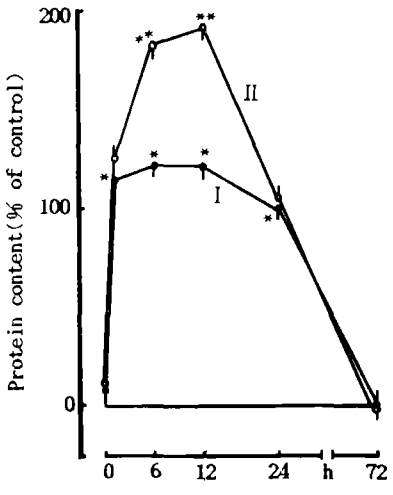


图2 H_2S中毒后BALF中蛋白(mg/L)含量的改变

Fig. 2 Changes in the contents of protein (mg/L) in BALF following H_2S exposure. ($n=6$, $\bar{x}\pm s$) *$P<0.01$ compared with control; **$P<0.01$ compared betweengroup I and group II

2.5 SA含量变化

中毒后立即升高，1h达峰值，24h仍高于正常值。Ⅱ组恢复较慢，至72h恢复至原有水平（图3）。

2.6 ACE活性及磷脂含量改变

图4所示，ACE活性于中毒后立即升高，1 h达峰值，至72h仍显著高于正常值，5 d接近正常。相关分析表明BALF中ACE活性变化与蛋白含量变化呈显著正相关（$r=0.87$，$P<0.01$）。

磷脂含量呈双相变化，中毒后0 h及24h后升高，持续至120h仍显著高于正常值（图4）。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

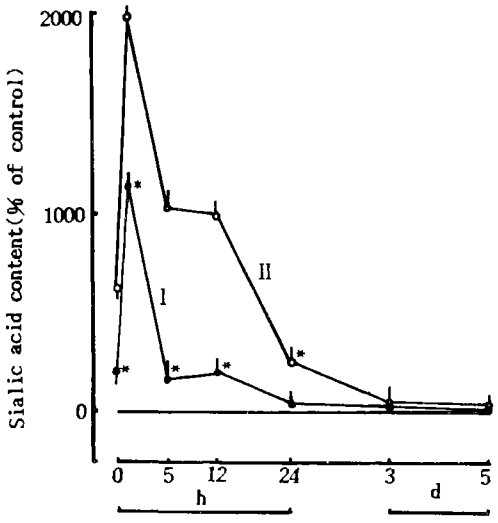


图 3 H_2S中毒后BALF中SA (ng/L) 含量的改变

Fig. 3 Changes in the contents of sialic acid (mg/L) in BALF following H_2S exposure. ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

* $P<0.01$ compared with control.

** $P<0.01$ compared between group I and group II

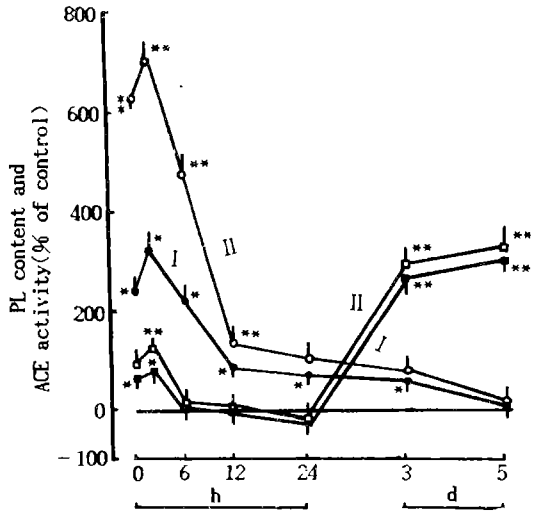


图 4 H_2S中毒后BALF 中 ACE活性及磷脂含量的变化

Fig. 4 Changes in ACE activities and phospholipi dcontents in BALF following H_2S exposure. ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

(○, ●)ACE,(□, ■) phospholipid, *$P<0.01$ compared with control; **$P<0.01$ compared between group I and group II

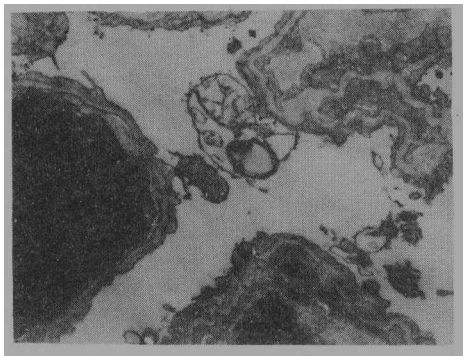


图 5 H_2S 200ppm,3h暴露后立即(0h),肺泡腔内表面活性物质碎片。×8 000

Fig. 5 Showing debris of surfactants in alveoli 0h following H_2S exposure. ×8 000



图 6 中毒后3h, 肺泡腔内表面活性物质碎片 (⇨) 及水肿液, I 型上皮细胞出现较多裂隙 (△)。 ×5 000

Fig. 6 Showing debris of surfactants (⇨) in alveoli, gaps (△) of alveolar type I epithelial cells and edema, 3h following H_2S exposure. ×5 000

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.7 病理形态改变

中毒后可见肺血管扩张、充血，间质轻度水肿及小灶性出血，肺泡腔内有表面活性物质碎片。3h、6h病变加重。Ⅰ型和Ⅱ型肺上皮细胞、血管内皮细胞等线粒体均显著肿胀，内质网扩张；Ⅰ型细胞及血管内皮细胞形成较多裂隙；肺间质及肺泡腔内出现水肿液、红细胞、脱落的上皮细胞及表面活性物质碎片。2d～7d：炎细胞浸润、肺间质增厚，肺泡性肺水肿明显，肺泡上皮细胞片状脱落或整个细胞脱落，胞质崩解后细胞器散布于肺泡腔内，细胞间出现明显裂隙。肺泡腔内水肿液及表面活性物质碎片主要见于中毒后2d、3d，7d后减少。一周后肺增生恢复（图5、6）。

3 讨 论

硫化氢为常见有害气体，其中毒机制与氢氰酸相似，能选择性抑制细胞色素氧化酶，影响细胞呼吸，严重中毒均可迅速引起人员死亡。究其病理变化却有不同之处，氢氰酸吸入中毒很少引起肺部损伤，而H_2S急性中毒，肺水肿是常见的重要病症之一。

硫化氢所致肺水肿的原因迄今尚未完全搞清，是否为炎性、心源性或神经性，或是不同病因的综合仍有待阐明[5]。

本实验结果表明，H_2S中毒性肺水肿的发生原因与下列因素有关。

3.1 硫化氢对肺有直接损伤作用：实验结果表明H_2S具有强烈的细胞毒作用，从BALF生化成分分析及病理观察可见肺损伤出现早、损伤重，恢复慢；生化成分的改变较之病理改变更为敏感；H_2S吸入中毒有明显的炎性渗出。

3.2 肺毛细血管损伤，导致肺毛细血管通透性增加：缺氧可引起部分肺毛细血管痉挛，继而使未痉挛的肺毛细血管血流量和流体静力压增加；缺氧也可引起细胞浆突起回缩，增加毛细血管内皮的通透性。本文还观察到BALF中ACE活性增强，且与SA及蛋白含量呈高度相关，证明肺水肿的形成与血管内皮细胞受损有关[6]。病理学改变（细胞出现较多裂隙、线粒体肿胀等）也支持这一观点。

3.3 肺泡壁通透性增强：肺泡壁通透性增强可能与下列因素有关：①肺泡上皮受损；②肺泡表面活性物质受损；③缺氧。BALF中磷脂含量的改变能够反映肺泡表面活性物质受损情况，因此游离于肺泡腔中，灌洗时大量出现于BALF中。结合电镜观察，肺泡表面活性物质在中毒后很快出现在肺泡腔中，2～3d尤甚，此与BALF中的磷脂含量分析基本一致。此外，磷脂含量在第5天仍然很高，此时病理观察肺泡水肿液仍很明显，由此可见表面活性物质受损也参与了H_2S中毒性肺水肿的形成。

最后，H_2S中毒性肺水肿形成的起因可能是多方面的。朱俊信还发现自由基引起的脂质过氧化也参与了肺水肿的形成[7]。因此我们认为H_2S中毒性肺水肿是由多种因素联合作用造成的。其中也不能排除心源性和神经源性的可能。总之，H_2S中毒性肺水肿的形成，原因是复杂的，这在H_2S中毒的防治工作中应予充分考虑。

参 考 文 献

1. 欧阳子倩。检测肺损伤的新途径。预防医学情报 1989；5(3)：144
2. Bergmeyer HU, Gawehn K, Grassl M. Enzymes as reagents. In: Methods of Enzymatic Analysis. (Begmeyer HU, ed.) Vol. I, Academic Press, New-York, 1974：425～522
3. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. JBC 1959；234(8)：1971
4. 李健斋。血清磷脂测定。临床生化检验。上海科技出版社，1979：185
5. Lopez A, Prior M, Yong S, et al. Biochemical and cytologic alterations in the

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

respiratory tract of rats exposed for 4 hours to hydrogen sulfide. Fundm Appl Toxicol 1987; 9:753～762

6. Shasby DM, Shasbby SS, Bowman CM, et al. Angiotensin converting enzyme concentrations in the lung lavage of normal rabbits and rabbits treated with nitrogen mustard exposed to hyperoxia. Amer Rev Respir Dis 1981:124～202

7. 朱俊信 刘勇 欧阳子倩。自基机制在H_2S中毒性肺损伤中的作用。 第三军医大学学报 1991; 13(2):156

(收稿: 1990.12.22; 修回: 1991.03.15)

Pulmonary Injury due to Hydrogen Sulfide Inhalation in Rats

Ou-Yang Ziqian, Yu Kai, Yu Zhengping, et al (Department of Toxicology, Third Military Medical College, Chongqing 630038)

Abstract Witsar rats were forced to inhale air containing 0, 100, and 200 ppm of hydrogen sulfide (H_2S) for 3 hours, and the brocho-alveolar lavage fluid (BALF) of the rats was collected and analyzed in different period after inhalation to observe the pulmonary injury H_2S produced. It was found that H_2S inhalation resulted in an increase of the content of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase, acid phosphatase, total number of cells, polymorphonuclear leucocytes, sialic acid, protein, angiotensin converting enzyme, and phospholipid in BALF. Peak elevation of most parameters occurred in the 1st or 6th hour after inhalation, but a few of them in the 12th hour. The extent of elevation and the rapidity of recovery of the parameters were dependent on the amount of H_2S inhaled.

It is concluded that H_2S inhalation can exert severe cytotoxic and edematogenic effects on the pulmonary parenchyma. Changes of phospholipid in BALF suggests the damage on alveolar surfactants. Changes of angiotensin converting enzyme level were correlated with those of protein and saliac acid in BALF of the intoxicated rats ($r=0.86$, $P<0.01$ and $r=0.87$, $P<0.01$ respectively), which indicates that pulmonary edema resulting from increased vascular permeability is closely related to the injury of pulmonary vascular epithelium. Moreover, the injury of alveolar surfactants also plays a part in the development pulmonary edema. These findings are in agreement with the pathological findings of the intoxicated rats.

Key words hydrogen sulfide; pulmonary injury; bronchoalveolar lavage fluid; alveolar surfactant

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net