DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.03.005

硫化氢中毒对大鼠肺亚细胞结构标记酶的影响

余争平 欧阳子倩 杨文杰 赵 清 朱俊信（第三军医大学卫生防疫系 毒理学教研室）630038

提 要 大鼠吸入H_2S 200ppm 3 h中毒，测定了中毒后3，12，24，48，72和96h血清及肺线粒体-溶酶体、细胞核、细胞浆及微粒体中LDH、ACP、CPK及Na^+-K^+-ATP酶活性的变化。结果表明，H_2S吸入中毒后亚细胞水平的肺损伤具有发生快、维持时间长等特点，中毒后3 h即有溶酶体线粒体破裂、细胞能量代谢抑制、细胞破裂及标记酶入血，12h亚细胞损伤达高峰，随后渐恢复，72h恢复至正常水平，血清酶活性变化与亚细胞水平的变化高度相关，提示血清酶的变化源于肺损伤，因此，测定血清酶的变化能较好地反映亚细胞水平的肺损伤。

关键词 硫化氢/毒性；肺/损伤；肺/病理学

硫化氢（H_2S）为一剧毒有害气体，吸入中毒能引起急性肺损伤早已为人所知[1]。既往对H_2S所致肺损伤的研究，多是在整体器官水平观察其细胞毒作用所致的形态学损伤及生化改变[2]，缺乏在亚细胞水平上进一步探讨H_2S所致肺损伤特征的研究。本研究目的在于观察H_2S中毒对肺亚细胞结构标记酶的影响和探讨亚细胞标记酶变化与血清酶变化的关系，在亚细胞水平进一步阐述H_2S所致肺损伤的特点。

1 材料与方法

1.1 动物及药品

Wistar大鼠，体重210±28g，雌雄兼用，实验前1 d禁食不禁水。Na_2S和HCl均为市售分析纯级产品。

1.2 中毒模型复制

H_2S气体经Na_2S与HCl连续反应发生，经配气系统送入MT 3-84型呼吸道动式中毒装置[3]，用文献报告的方法[4]动态监测中毒柜中H_2S浓度并使之维持在202±13ppm，中毒组大鼠40只置于该浓度的H_2S气体中暴露3 h中毒，于中毒后3，12，24，48，72及96h不同时间点经腹主动脉放血各活杀8只，采血并取出肺脏供实验用；对照组大鼠8只置于不含H_2S的气体的空气中暴露3 h后按中毒组所用的方法活杀及取样。

1.3 亚细胞结构的制备及其标记酶测定

按Frosolono等人的方法[5]加以改进制备肺亚细胞结构成份。用4 ℃的0.01molTris-HCl缓冲液（含0.25mol蔗糖，pH7.4）制备10%（w/v）肺匀浆，取匀浆5 ml，在HITACH I80P-7型低温超速离心机离心1 000g×10min，倾出上清液，沉淀部份加入与上清液等量的缓冲液，再次离心1 000g×10min，倾出上清液，沉淀部份即为核碎片，合并2次上清液离心10 000g×10min，沉淀部份为线粒体、溶酶体成份，上清液继续离心20万g×30min，沉淀部份为微粒体，上清液为可溶性细胞浆部份，上述离心均在-4 ℃条件下完成。亚细胞结构悬于3 ml 0.01mol Tris-HCl缓冲液中备用。用终点反应法在Beckman DU-C型生化分析仪上测血清及上述亚细胞结构中乳脱氢酶（LDH）、酸性磷酸酶（ACP）、磷酸肌酸激酶（CPK）的活性，用董伟的方法[6]测Na^+-K^+-ATP酶的活性，用Lowry法测蛋白质含量。

1.4 数理分析

全部实验数据在IBM PC型计算机上作单因素方差分析，用Newman-Keuls法以显著水平$\alpha=0.05$及0.01比较均数间差别的显著性，对部份指标作相关分析及相关系数显著性检验。

2 结果

2.1 LDH的变化

大鼠吸入H_2S中毒后3 h，血清LDH即显著增高，12h增高达峰值，随后渐下降，至96h恢复对照水平；

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

胞浆LDH于中毒后3 h显著下降，12h降至最低值，随后渐回升，至96h恢复对照水平；线粒体-溶酶体、胞核及微粒体LDH无显著变化。图1。

2.2 ACP的变化

大鼠吸入H_2S中毒后3 h，血清及细胞浆ACP没显著增高，12h增高达峰值，96h恢复至对照值；线粒体-溶酶体ALP于中毒后3 h显著降低，12h达最低水平，96h恢复至对照值；胞核及微粒体ACP在中毒后无显著变化。图1。

2.3 CPK的变化

大鼠吸入H_2S中毒后3 h，血清CPK显著增高，72h恢复对照水平；细胞浆及线粒体-溶酶体CPK在中毒后呈先下降后增高的双相变化过程，中毒后3 h开始显著降低，至72h恢复对照水平，96h显著高于对照值；细胞核及微粒体CPK无显著变化。图2。

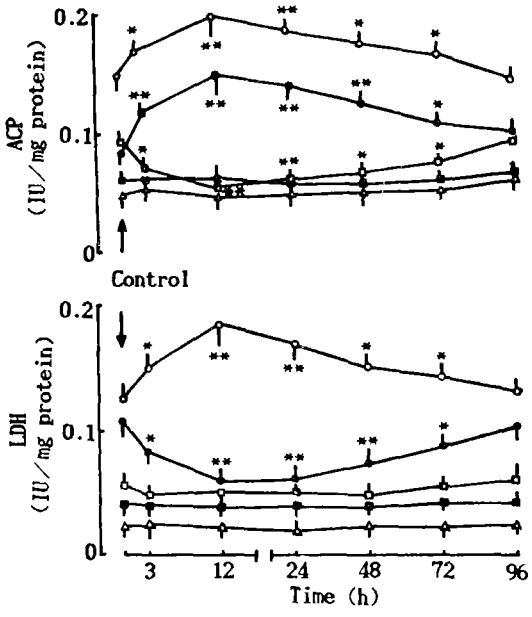


图1 硫化氢对血清和肺细胞器LDH和ACP的影响

Fig. 1 Effect of H_2S on LDH and ACP in serum and pulmonary subcellular organelles ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

*$P<0.05$; **$P<0.01$ compared with control. (○) Serum, (●)Cytoplasm, (□) Mitochondrion-lysosome, (△) Microsome, (■) Nucleus.

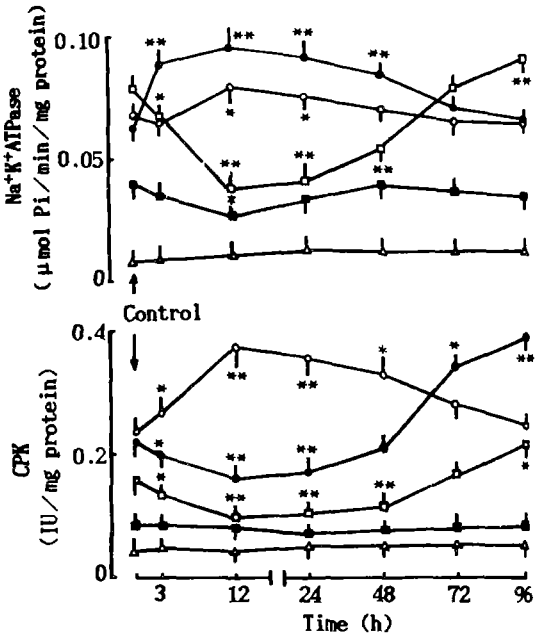


图2 硫化氢对血清和细胞器Na^+-K^+-ATPase和CPK的影响

符号注释同图1

Fig. 2 Effect of H_2S on Na^+-K^+-ATPase and CPK in serum and pulmonary subcellular organelles ($n=8$, $\bar{x}\pm s$).

Symbols defined in Fig 1

2.4 Na^+-K^+-ATP酶的变化

大鼠吸入H_2S中毒后12h，血清Na^+-K^+-ATP酶活性显著增高，48h恢复对照水平；细胞浆Na^+-K^+-ATP酶中毒后3 h显著增高，12h达峰值，72h恢复对照水平；线粒体-溶酶体Na^+-K^+-ATP酶呈先降低后增高的双相变化，3 h显著下降，12h降至最低水平，72h恢复至对照水平，96h显著增高；细胞核Na^+-K^+-ATP酶于中毒后12h有显著下降，24h即恢复至对照水平；微粒体该酶活性极低且无显著改变。

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

2.5 血清酶变化与亚细胞结构标记酶变化的关系

大鼠吸入H_2S中毒后血清LDH、ACP的变化分别与胞浆LDH、ACP变化呈显著的正、负相关；血清ACP、CPK、Na^+-K^+-ATP酶变化分别与线粒体-溶酶体中ACP、CPK、Na^+-K^+-ATP酶的变化呈显著的负相关关系。图3。

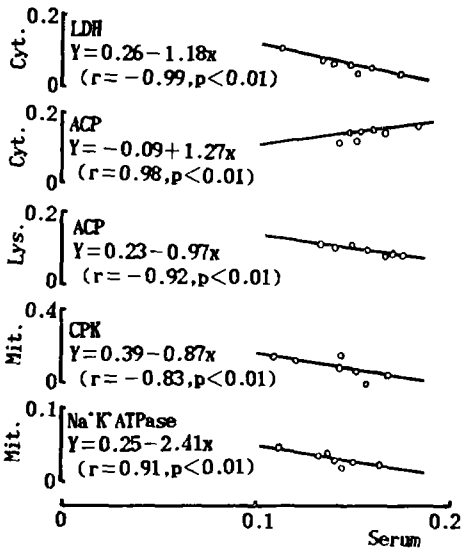


图3 血清与肺细胞器标记酶的相关性

Fig 3. Correlation between marker enzymes in serum and in pulmonary subcellular organelles

3 讨 论

H_2S中毒引起支气管肺泡灌洗液中生化及细胞学变化的研究已有报道[7]，然而灌洗液中酶活性的改变是继发于肺血管通透性增高、血液中酶漏出，还是源于细胞水平的肺损伤，缺乏直接的证据，H_2S中毒后血清酶有何改变及其意义如何，也未见有研究报道。

本研究表明，H_2S吸入中毒能迅速引起肺亚细胞结构的损伤，表现为各种亚细胞成份酶活性的改变。溶酶体标记酶ACP的变化提示H_2S吸入中毒能迅速引起溶酶体破裂，大量的溶酶体酶释放到细胞浆内，进而细胞破裂进入血液；LDH主要存在于细胞浆中[8]，胞浆中该酶活性降低并伴有血清中该酶活性增高提示H_2S中毒后肺组织有广泛的细胞破裂，胞浆酶释入血液；Na^+-K-$^+$ATP酶及CPK主要分布于线粒体内，其活性变化能敏感地反应线粒体能量代谢状况，上述两酶活性变化结果提示H_2S中毒能引起线粒体损伤，早期出现能量代谢抑制。

H_2S吸入中毒对肺亚细胞结构的损伤具有出现早、维持久、不同亚细胞结构对损伤敏感性有别等特点。中毒后3h即出现明显的损伤，表现为线粒体、溶酶体破裂，能量代谢抑制，细胞破裂各种标记酶释放入血等，中毒后12h损伤达高峰，随后渐恢复，3 d～4 d恢复至正常水平，晚期伴有能量代谢增强，可能与肺损伤后细胞增生修复代谢旺盛有关。细胞核及微粒体酶活性无显著变化，反应其对损伤的敏感性较低。H_2S中毒后血清LDH、ACP、CPK及Na^+-K^+-ATP酶的变化与肺亚细胞水平变化过程显著相关，且变化出现早，提示H_2S中毒后测定上述血清酶活性的变化能较好地反映亚细胞水平的急性肺损伤过程，在目前仍缺乏特异性的早期肺损伤诊断方法的情况下，对于早期诊断H_2S中毒所致的肺损伤具有一定的实际应用价值。

参 考 文 献

1. Beauchamp RO, Bus JS, Popp JA, et al. A critrical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. CRC Crit Rev Toxicol 1984; 13:25

2. Lopez A, Prior MG, Reiffenstein RJ, et al. Peracute toxic effects of inhaled hydrogen sulfide and injected sodium hydrosulfide on lungs of rats. Fundam Appl Toxicol 1989; 12:367

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

3. 毕绍洪 刘新琮 欧阳子倩。MT 3-84 呼吸道动式中毒装置的研制及其应用。第三军医大学学报 1990; 12(6):87
4. Elovaara E, Tossavainen A, Savolainen. Effects of subclinical hydrogen sulfide intoxication on mouse brain protein metablism. Exp Neurol 1978; 62:93
5. Frosolono MF, Pawlowski P. Effect of phosgene on rat lungs after single high-level exposure. Arch Environ Health 1977; 31(6):271
6. 董伟 沈定国。人细胞膜Na^+-K^+-ATP酶的研究。生物化学与生物物理进展 1986; 4:64
7. Lopez A, Prior MG, Yong S, et al. Biochemical and cytological alterations in the respiratory tract of rats exposured for 4 hours to hydrogen sulfide. Fundam Appl Toxicol 1987; 9:753
8. Henderson RF, Benson JM, Hann FF, et al. New approaches for the evaluation of pulmonary toxicity: bronchoalveolar lavage fluid analysis. Fundam Appl Toxicol 1985; 5:451

(收稿: 1990.12.22; 修回: 1991.03.05)

Effects of Hydrogen Sulfide Intoxication on Marker Enzymes of Pulmonary Subcellular Organelles in Rats

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

Abstract The changes of the marker enzymes of pulmonary subcellular organelles were determined in the 3rd, 12th, 24th, 48th, 72nd, and 96th hour after the rats were exposed to the air containing 200 ppm of hydrogen sulfide(H_2S) for 3 hours. It was found that H_2S injury on the subcellular organelles was characterized by the early occurrence of the rupture of lysosomes and mitochondria, the suppression on the energy-related enzymes, and the appearance of pulmonary subcellular marker enzymes in the serum. The pulmonary subcellular injury began to appear in the 3rd hour and the most obvious injury occurred in the 12th hour after exposure. Thereafter, the subcellular injury recovered gradually. In the 72nd hour after exposure, the activities of all the marker enzymes returned to the control level. The changes of serum marker enzymes were highly correlated with those in pulmonary subcellular organelles. The findings suggest that the occurrence of marker enzymes in the serum after H_2S intoxication originates from pulmonary injury. Therefore determination of the activities of serum marker enzymes can be used as an indicator of pulmonary subcellular injury H_2S intoxication produces.

Key words hydrogen sulfide/To; lung/IN; lung/PA

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