DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.02.018

自由基机制在硫化氢中毒性肺损伤中的作用

朱俊信 刘 勇 欧阳子倩（第三军医大学卫生防疫系 毒理学教研室）

提 要 本文观察了自由基机制在大鼠硫化氢吸入中毒肺损伤中的作用。测定了肺组织及支气管肺泡灌洗液中丙二醛（MDA）、灌洗液蛋白浓度和细胞学变化；肺及血液SOD、GSH和Vit E。结果表明，大鼠在吸入H_2S后，MDA显著增加，灌洗液蛋白浓度明显增加，细胞学变化提示炎症反应明显。SOD活性先抑制后增强，GSH和Vit E在中毒后显著降低。上述各项指标变化的严重程度与硫化氢的吸入浓度有关。浓度高，损伤重，变化早，恢复慢。H_2S中毒导致自由基形成和脂质过氧化的增强是H_2S所致肺损伤的机制之一，其损伤程度与剂量有关。

关键词 自由基；肺；脂质过氧化；硫化氢

硫化氢（H_2S）是自然界中广泛存在的一种有害气体，其中毒机理与氰化物中毒相似，即抑制细胞色素氧化酶，引起细胞呼吸障碍。硫化氢可引起广泛的肺损伤，而氰化物则很少见。

需氧组织周围环境氧的变化，可使体内自由基形成与控制两种机能平衡失调，以致细胞受损，甚至机体死亡[2][3]。关于自由基机制在H_2S中毒性肺损伤中的作用，国内外未见报道。硫化氢中毒所致肺损伤与自由基机制是否有关则是本文感兴趣的问题。

1 材料和方法

1.1 动物中毒

Wistar大鼠84只由本校动物所提供，体重210±30g，雌雄各半，按表1随机分组。呼吸道中毒采用本室研制的MT3-84呼吸道动力中毒装置，动物在H_2S中暴露3 h。

表1 实验设计

Tab.1 Experimental Design

Groups	H_2S (ppm)	Control	Number of rats and killed at PEH*					
			0	1	6	12	24	72
Low dose	100	6	6	6	6	6	6	6
High dose	220	6	6	6	6	6	6	6

*PEH = postexposure hour

1.2 观察指标及方法

根据文献[4]的方法收集大鼠支气管肺泡灌洗液（BALF），制备10%无血肺组织匀浆，心脏采集血样。过氧化脂质（LPO）分解产物丙二醛（MDA）含量分析按文献[5]方法进行，紫外法测蛋白浓度，四氮唑蓝还原法[6]测超氧化物歧化酶（SOD）活性；用比色法[7]和荧光法[8]分别测定谷胱甘肽（GSH）和维生素E（Vit E）的含量。在光镜下进行BALF有核细胞计数及分类。

1.3 统计处理

用单、双因素方差分析及配对资料t检验在Apple-Ⅱ微机上进行显著性检验，以$\alpha = 0.05$判别显著性。

2 结 果

2.1 LPO分解产物MDA的变化

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

表2 H_2S中毒MDA的含量变化 (nmol MDA/mg蛋白或nmol/mlBALF)

Tab.2 MDA levels (nmol MDA/mg protein or nmol/ml BALF) in BALF and in lungs of rats exposed to 100、200 ppm H_2S

Sample	H_2S(ppm)	Control	Postexposure hour					
			0	1	6	12	24	72
Lung	100	0.397 ±0.04	0.411 ±0.04	0.407 ±0.04	0.582 ±0.11$^{\Delta}$	0.622 ±0.11$^{\Delta}$	0.424 ±0.02	0.418 ±0.01
	220	0.420 ±0.03	0.482 ±0.03$^{\Delta *}$	0.498 ±0.02$^{\Delta *}$	0.607 ±0.02$^{\Delta}$	0.647 ±0.02$^{\Delta}$	0.521 ±0.02$^{\Delta *}$	0.420 ±0.03
BALF	100	0.080 ±0.02	0.091 ±0.01	0.086 ±0.02	0.176 ±0.06$^{\Delta}$	0.083 ±0.03	0.068 ±0.03	0.106 ±0.03
	220	0.091 ±0.02	0.135 ±0.02$^{\bullet *}$	0.175 ±0.01$^{\Delta *}$	0.302 ±0.02$^{\Delta *}$	0.505 ±0.03$^{\Delta *}$	0.476 ±0.04$^{\Delta *}$	0.109 ±0.02

$^{\bullet}$:$P<0.05$; $^{\Delta}$:$P<0.01$ compared with control; *:$P<0.01$ compared between the two groups.

表3 H_2S中毒BALF蛋白浓度变化 (mg/ml)

Tab.3 Protein cocentrations in BALF(mg/ml)

H_2S (ppm)	Control	Postexposure hour					
		0	1	6	12	24	72
100	0.270 ±0.02	0.273 ±0.02	0.295 ±0.02$^{\bullet}$	0.313 ±0.02$^{\bullet}$	0.320 ±0.02$^{\bullet}$	0.269 ±0.02	0.255 ±0.02
220	0.288 ±0.02	0.297 ±0.01$^{\Delta}$	0.343 ±0.03$^{\bullet *}$	0.484 ±0.01$^{\bullet *}$	0.524 ±0.03$^{\bullet *}$	0.260 ±0.04	0.284 ±0.03

$^{\bullet}$:$P<0.01$ compared with control;

$^{\Delta}$:$P<0.05$; *:$P<0.01$ compared between the two groups

从表2可见，高浓度H_2S吸入中毒，MDA立即（0h）显著上升，72h恢复至对照水平；低浓度组MDA 6h开始升高，12h～24h恢复至对照水平。MDA开始升高和恢复的时间以及增高的程度与H_2S浓度有关。

2.2 BALF中蛋白含量的变化

由表3可见，中毒后1h、6h、12h，两组动物BALF蛋白含量均显著增高，高浓度组增高幅度显著高于低浓度组。

2.3 BALF中细胞学变化

低浓度组中毒后0h、1h、6h和高浓度组0h、1h、6h、12h及24h，BALF中有核细胞计数增高均非常显著。恢复至对照水平前者为12h，后者为72h（表4）。

细胞分类变化见表5，多形核粒细胞（PMN）百分率于中毒后立即升高，72h恢复至对照水平；肺泡吞噬细胞百分计数（PAM%）低浓度组先升高后下降，12h恢复；高浓度组72h恢复并高于对照组。肺泡吞噬细胞的绝对计数（PAMs）在中毒后显著升高，恢复时间分别为12h和72h。

2.4 机体抗氧化系统的变化

100ppm或200ppm吸入中毒，肺组织Vit E含量迅速下降，直至中毒后72h，Vit E水平仍低于对照组。相关分析表明其变化与肺组织MDA含量呈显著负相关（$r=-0.603$，$P<0.05$）。血浆Vit E变化与肺组织的变化一致（表6）。

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

表4 H_2S中毒BALF有核细胞计数 ($\times 10^5$/ml)

Tab.4 Number of nucleated cells in BALF of rats exposed to 100、200 ppm H_2S($\times 10^5$/ml)

H_2S (ppm)	Control	Postexposure hour					
		0	1	6	12	24	72
100	1.04 ±0.05	1.39 ±0.36*	1.95 ±0.15*	2.11 ±0.05*	1.15 ±0.03	1.11 ±0.05	1.05 ±0.02
220	1.07 ±0.24	1.75 ±0.22*	2.22 ±0.18*△	2.88 ±0.20*△	3.95 ±0.16**	2.40 ±0.20**	1.15 ±0.27

*: $P<0.01$ compared with control.

△: $P<0.05$; **: $P<0.01$ compared between the two groups.

表5 H_2S中毒BALF细胞分类变化

Tab.5 Cell differentiation of BALF of rats exposed to 100、200 ppm H_2S

Cells	H_2S (ppm)	Control	Postexposure hour					
			0	1	6	12	24	72
PMNs%	100	5.32 ±0.17	9.03 ±0.42*	11.15 ±0.59*	19.29 ±0.66*	7.12 ±0.24*	6.16 ±0.12*	5.21 ±0.05
	220	5.33 ±1.21	11.33 ±1.75**	15.33 ±2.25**	25.50 ±2.74**	40.83 ±2.23**	14.50 ±3.11**	5.92 ±0.97
PAMs%	100	76.62 ±2.46	81.16 ±4.03*	71.59 ±1.44	65.97 ±2.36*	75.06 ±0.73	75.31 ±0.93	72.56 ±1.32
	220	79.00 ±4.43	79.33 ±2.58	72.83 ±2.98*	62.17 ±3.19*△	53.00 ±3.23**	65.00 ±3.95**	88.33 ±1.94**
PAMs ($\times 10^5$/ml)	100	0.79 ±0.05	1.12 ±0.26*	1.39 ±0.09*	1.39 ±0.06*	0.86 ±0.03	0.83 ±0.04	0.76 ±0.02
	220	0.84 ±0.20	1.39 ±0.19*	1.62 ±0.15*△	1.75 ±0.17**	2.10 ±0.17**	1.56 ±0.18**	1.02 ±0.23△

*: $P<0.01$ compared with control

△: $P<0.05$; *: $P<0.01$ compared between the two groups.

表6 H_2S中毒Vit E的变化 (μg/100mg蛋白)

Tab.6 Changes in the levels of Vit E after H_2S exposure (μg/100 mg protein)

Sample	H_2S (ppm)	Control	Postexposure hour					
			0	1	6	12	24	72
Lung	100	4.88 ±0.91	3.85 ±0.51	1.30 ±0.74*	2.13 ±1.16*	2.81 ±0.39*	3.19 ±1.53*	2.64 ±0.46*
	220	4.47 ±0.59	2.98 ±0.10*△	1.75 ±0.13*	1.04 ±0.07*	1.06 ±0.09*△	1.63 ±0.14*	2.69 ±0.43*
Plasma	220	2.34 ±0.08	2.03 ±0.10*	1.58 ±0.10*	1.35 ±0.10*	1.20 ±0.12*	1.26 ±0.06*	1.83 ±0.08△

*: $P<0.01$ compared with control.

△: $P<0.01$ compared between the two groups.

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

肺组织GSH的变化，低浓度组动物中毒后各时相点较之对照组分别下降46%、59%、71%、82%、42%和9%。相关分析表明其变化与肺组MDA含量呈高度负相关（$r=-0.761$，$P<0.01$）；高浓度组动物全血GSH分别降低33%、40%、48%、55%、34%和13%，与对照组比较相差均非常显著（表7）。

表7 H_2S中毒后GSH的变化（μmol/mg蛋白）

Tab. 7 Changes in the levels of GSH after H_2S exposure (μmol/mg protein)

Sample	H_2S (ppm)	Control	Postexposure hour				
			0	1	6	12	24	72
Lung	100	5.07 ±0.49	2.76 ±0.19*	2.07 ±0.08*	1.49 ±0.10*	0.92 ±0.15*	2.93 ±0.24*	4.62 ±0.13*
Blood	220	36.54 ±0.49	24.33 ±0.70*	21.96 ±1.10*	8.95 ±10.93*	16.51 ±1.57*	24.05 ±3.07*	31.77 ±2.05*

* $P<0.01$ compared with control

肺组织SOD活力变化，低浓度组中毒后迅速降低，6 h降至最低，24h恢复至对照水平，72h显著增高；高浓度组，血浆SOD活力1 h降至最低，24h后高于对照水平（$P<0.01$），见表8。

表8 H_2S中毒后SOD的变化（u/mg蛋白）

Tab. 8 Changes in the activities of SOD after H_2S exposure (u/mg protein)

Sample	H_2S (ppm)	Control	Postexposure hour				
			0	1	6	12	24	72
Lung	100	423.6 ±48.3	313.2 ±41.6*	253.1 ±33.5*	224.0 ±27.2*	300.5 ±8.9*	456.2 ±24.9	526.0 ±27.8*
Plasma	220	4333 ±395	2626 ±306*	2052 ±235*	2269 ±403*	2447 ±345*	6025 ±463*	5014 ±258*

*$P<0.01$ compared with control

2.5 MDA变化与BALF中蛋白浓度、有核细胞计数之间的关系

相关分析表明，肺组织匀浆MDA含量变化与BALF中蛋白浓度、有核细胞计数都有显著的相关性（r值分别为0.71和0.75，$P<0.01$）提示BALF中蛋白浓度和有核细胞计数的变化与H_2S引起自由基反应所致的组织损伤有关。

3 讨 论

氧自由基在肺损伤中的作用近年来曾引起人们的广泛重视。在体内产生氧自由基的途径很多，由于体内含有天然抗氧化系统（如SOD、GSH-PX、GSH、Vit E等），故能维持体内自由基产生与控制两种机能的平衡。但当氧中毒、低氧血症、缺氧或其它病理因素导致机体防御机能不足或(和)自由基产生过多时，活性较强的氧自由基将与所接触的非自由基分子反应，形成另一自由基。自由基反应一经引发，常呈链式蔓延，导致细胞和组织损害[2]。

本实验结果表明，H_2S吸入中毒，肺内脂质过氧化作用增强，MDA形成增加，且增加的程度与吸入H_2S浓度有关。浓度高，变化大、时间早、恢复慢。MDA增高的原因可能与下列因素有关：（1）H_2S对细胞色素氧化酶的抑制引起细胞内环境的变化，导致自由基产生增加；（2）H_2S对肺组织气血屏障的破坏使气体交换障碍，因缺氧而使自由基产生增加；（3）H_2S中毒，粒细胞及肺泡吞噬细胞的增加可诱导自由基的产生；（4）H_2S对体

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

内天然抗氧化系统的损伤。

超氧化物歧化酶在中毒后早期抑制明显，这可能与H_2S对SOD的直接作用有关；中毒后24h SOD活性升高，提示由于大量自由基的生成，诱导其活性增高。低浓度H_2S引起的自由基损伤较轻，故SOD活性变化幅度也较小。

GSH和Vit E在中毒早期即急剧减少，此时低浓度组动物自由基损伤并不严重，说明H_2S对GSH和Vit E含量的影响除了通过自由基与之作用使其减少外，还可能有其它机制[9]。

H_2S中毒对机体抗氧化损伤的防御机能有明显的削弱作用，这是造成机体组织自由基损伤的重要原因之一。

H_2S中毒，肺内MDA含量的变化与BALF中蛋白及有核细胞计数的变化显著相关，表明自由基引起肺组织损伤，以致灌洗液蛋白和细胞发生变化。综上所述，H_2S中毒后组织内自由基的产生，诱导脂质过氧化反应是H_2S中毒性肺损伤机制之一。此外，H_2S对机体抗氧化系统的直接作用也可能与肺损伤有关。

参 考 文 献

1. Peterson LC. The effect of inhibitors on oxygen kinetics of cytochrome oxidase. Biochem Biophys Acta 1977; 460:299～307
2. Ferrari R, Ceconi C. Oxygen Free Radicals and Reperfusion Injury, The effect of Ischemia and Reperfusion on the Cellular Ability to Neutralise Oxygen Toxicity. J Mol Cell Cardiol 1986; 18 (Suppl. 4) :67
3. Webster NR and Nunn JE. Molecular Structure of Free Radicals and their importance in Biological Reaction. Br J Aneasth 1988; 60:98～108
4. Lopez A Prior M, yong S, et al. Biochemical and Cytological Alterations in the Respiratory Tract of Rats Exposed for 4 Hours to Hydrogen Sulfide. Fundam Appl Toxicol 1987; 9:753～762
5. 钟福孙。硫代巴比妥酸法测定血清过氧化脂质。临床检验杂志 1986; 4(3):129
6. 李益新，方允中。生物化学与生物物理学进展。1983; 2:59～62
7. 张嘉麟，方允中。血液中谷胱甘肽过氧化物酶活力微量测定。中华医学检验杂志 1985; 8(4):199～201
8. 侯少范 朱振源。生物材料中生育酚的荧光测定法。分析化学 1986; 10(9):305～307
9. Smith RP and Abbanate RA. Protective effect of oxidized glutathion in acute sulfide poisoning. Toxicol Appl pharmacol 1966; 9:209～217

(收稿：1990.07.02；修回：1991.01.18)

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

Role of Free Radicals in Lung Damage after Hydrogen Sulfide Inhalation

Zu Junxin, Liu Yong and OU Yang Ziqian
(Department of Toxicology, Third Military Medical Colle ge, Chongqing 630038)

Abstract The role of free radicals in the precipitation of lung damage after hydrogen sulfide inhalation was investigated in rats, which were killed right after and in the 1st, 6th, 12th, 24th, and 72nd hour after exposure to 100 and 220 ppm of hydrogen sulfide (H_2S) for 3 hours respectively. Malondialdehyde(MDA) level in lung homogenate and in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), protein content and the number of leucocytes and pulmonary alveolar macrophages (PAM) in BALF, superoxide dismutase(SOD), glutathione(GSH), and vitamin E(VE) level in lung tissue and blood were determined. It was found that H_2S inhalation resulted in an increase of MDA level which occurred much earlier after exposure to 220 ppm than after exposure to 100 ppm. Protein content was increased in the 1st, 6th, and 12th hour after inhalation. The number of leucocytes and PAM were increased, which implies the existence of inflammatory response in the respiratory tract. SOD activity decreased in the early period after inhalation but significantly increased later. Both GSH and VE levels decreased

These findings suggest that H_2S inhalation induces an inflammatory response in the respiratory tract and an increase of free radical formation which in turn brings about exessive lipid peroxidation. It is concluded that free radical formation is a contributing factor of lung damages after H_2S inhalation.

Key words free radicals; lung/IN; lipid peroxides; hydrogen sulfide/PO

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