DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.02.007

别嘌呤醇对大鼠吸入性肺损伤的作用及其机制探讨

张 敏 黄钺华 （药理学教研室）

提 要 本实验采用大鼠烟雾吸入模型，观察了预先给予别嘌呤醇对吸入性肺损伤后6 h内肺微血管通透性、丙二醛生成、超氧化物歧化酶活性、肺灌洗液中蛋白浓度及白细胞计数和血清丙二醛的影响，并辅以肺脏病理检查。结果表明：别嘌呤醇对吸入伤大鼠可以显著降低肺微血管通透性，减少肺灌洗液中蛋白含量及白细胞计数，组织病理学检查也可见肺充血、出血、间质和肺泡水肿减轻，白细胞浸润减少等。别嘌呤醇在减轻肺水肿的同时，也使肺及血清丙二醛水平明显降低，而肺组织丙二醛含量的变化在伤后6 h内与肺微血管通透性、肺灌洗液中蛋白含量及白细胞计数的变化在时间及程度上都一致。以上结果提示，别嘌呤醇通过抑制黄嘌呤氧化酶，减少超氧阴离子产生，从而抑制肺脂质过氧化，减轻吸入性肺损伤。

关键词 别嘌呤醇—药效学；呼吸疗法—副作用；毛细血管渗透性—药物作用；超氧化物歧化酶；肺—病理学

吸入性肺损伤导致肺水肿的发生率和死亡率目前仍然很高，火灾引起的肺部损害死亡率介于20～40%，烧伤病人的吸入性肺损伤，可明显增加急性肺水肿和继发呼吸衰竭的发生率，并增加死亡率。由于伤情复杂，目前尚无满意的治疗药物。

别嘌呤醇（Allopurinol）是黄嘌呤氧化酶抑制剂，临床上已用作抗痛风药，不良反应较少。别嘌呤醇通过抑制黄嘌呤氧化酶活性，还可抑制超氧阴离子（O_2^-）的产生，使出血性休克狗寿命延长6倍[1]；使冠脉搭桥术造成心肌缺血动物的血液动力学指标改善[2]；提高肾缺血患者的生存率和改善肾功能[3]；防止大鼠严重体表烫伤引起的水肿，血细胞比积增高和血尿等[4]。本实验的目的在于从自由基代谢途径，探讨别嘌呤醇治疗吸入性肺损伤的可行性和有效性，为吸入性肺损伤的治疗寻找有效的药物。

材 料 及 方 法

健康Wistar系大白鼠144只，雌雄均用，体重200～250g，随机分成盐水对照组，给药组，致伤1 h组，致伤2h组，致伤6h组和致伤加给药组。其中48只动物用于测定肺微血管通透性（PMVP），48只动物用于测定支气管肺泡灌洗液（BALF）中蛋白浓度和白细胞计数及分类，48只动物用于测定血清及肺丙二醛（MDA）水平、肺超氧化物歧化酶（SOD）活性以及做病理检查。

药品及试剂 别嘌呤醇（片剂，上海黄河制药厂，批号860401），伊文思兰（上海新中化学厂），甲酰胺（化学纯，上海化试一厂），四乙氧基丙烷（Fluka公司），硫代巴比妥酸（TBA，上海试剂二厂），十二烷基硫酸钠（Sigma公司），黄嘌呤氧化酶（5u/0.5ml，Sigma公司），超氧化物歧化酶（50 000u/mg，上海生物化学研究所），次黄嘌呤（上海试剂二厂），鲁米诺（Luminol，Sigma公司），其它试剂均为分析纯级。

给药方法 动物于致伤前1天用别嘌呤醇（100 mg/kg）灌胃1次，致伤前1 h再以同样剂量灌胃1次。

实 验 与 结 果

一、急性吸入性肺损伤模型复制

根据本校烧伤中心以及Rowland等人[5]的烟雾吸入模型稍加改进。动物处于清醒自然状态，烟雾温度升至58±2℃，致伤方式2'—3'—2'—3'—2'，即吸烟2min，间歇3min，共吸烟6min。

二、检测指标及方法

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

1. 肺微血管通透性的测定：动物于致伤前30 min，由尾静脉注入伊文思兰（20mg/kg），采用伊文思兰荧光法[6]测定PMVP。

2. 血清及肺MDA的测定：取颈静脉血，常规分离血清，根据Yagi的TBA荧光法[7]测定血清MDA水平，以四乙氧基丙烷作标准。处死动物，取肺，制成10%肺匀浆，用TBA比色法[8]测定肺MDA水平，根据MDA的克分子消光系数（$\varepsilon = 1.56 \times 10^5 M^{-1} \cdot Cm^{-1}$）计算每毫克蛋白MDA的含量。

3. 肺SOD活性测定：根据Mclord等人的方法[9]提取肺匀浆中SOD粗提液，采用化学发光法[10]测定SOD的活性。以次黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶—鲁米诺作为发光体系，用液体闪烁计数仪记录发光强度，测定标准SOD和样本SOD抑制发光的强度，根据标准SOD的C_{50}值（抑制50%发光强度所需SOD的量，也称为1个活性单位）计算样本SOD的活性单位，即：肺SOD活性（u/mg蛋白）

$$= \frac{\text{实测样本SOD量（ng）}}{\text{标准曲线}C_{50}\text{值（ng）}} \text{。}$$

4. 白细胞计数、分类及蛋白含量测定：用10 ml等渗盐水灌入肺内，收集BALF，常规检查其中的白细胞计数及分类，用Lowry法测定BALF中蛋白含量。

5. 病理检查：取右肺下叶，按光镜常规处置标本，观察其病理变化。

三、统计分析

采用Apple-Ⅱ型计算机作单因素方差分析，用最小显著值（F-protected least significant difference，FLSD）法判定各均数间差别的显著性。用线性回归法比较变量间的相关性。各项参数均以$\bar{X} \pm SD$表示。

四、结果

1. 别嘌呤醇对吸入性肺损伤早期大鼠PMVP的影响（见表）：动物于伤后1 h PMVP已显著增加，2 h达高峰，6h仍维持高水平，别嘌呤醇可明显抑制伤后2h PMVP的增加（$P<0.01$）。

2. 别嘌呤醇对吸入性肺损伤早期大鼠肺SOD活性的影响（见表）：肺SOD活性在伤后1h开始下降，2h降至最低水平，6h仍维持低水平。别嘌呤醇对正常大鼠和致伤大鼠肺SOD活性无显著影响（$P>0.05$）。

3. 别嘌呤醇对吸入性肺损伤早期大鼠肺及血清MDA水平的影响（见表）：肺MDA水平在伤后1h开始明显增加（$P<0.05$），2h达到峰值，6h仍维持高水平，血清MDA水平则在2h才开始升高，6h显著升高（$P<0.01$），血清MDA峰值落后于肺MDA峰值。别嘌呤醇可明显抑制伤后2h肺MDA水平和伤后6h血清MDA水平的升高（$P<0.01$）。

附表　各项指标测定结果（$\bar{X} \pm SD$）

	盐水组	给药组	致伤组			致伤+给药	
			1h	2h	6h	2h	6h
	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
PMVP (μg/100mg肺)	2.25 ±0.78	2.05 ±0.44	13.27 ±3.39**	15.97 ±3.39**	14.28 ±1.25**	10.65 ±2.69ΔΔ	
肺SOD (u/mg蛋白)	380.2 ±78.5	349.6 ±49.7	342.6 ±142.9	270.9 ±63.6*	292.8 ±81.8*		296.0 ±44.7
肺MDA (nmol/mg蛋白)	0.40 ±0.04	0.40 ±0.05	0.49 ±0.07*	0.59 ±0.02**	0.53 ±0.08**	0.47 ±0.06ΔΔ	
血清MDA (nmol/L)	5 810 ±48	5 860 ±51	5 790 ±47	6 060 ±35	7 400 ±0.90**		6 390 ±28ΔΔ
BALF中WBC (×10⁸/L)	5.008 ±0.961	4.725 ±1.157	9.319 ±1.349**	11.105 ±2.292**	10.375 ±1.808**		8.500 ±1.964ΔΔ
BALF中蛋白含量 (g/L)	194 ± 12	220 ± 27	268 ± 44**	586 ± 58**	534 ±124**		356 ±49ΔΔ

注：* 致伤组与盐水组比 $P<0.05$　　Δ 致伤+给药组与单纯致伤组比 $P<0.05$

** 致伤组与盐水组比 $P<0.01$　　ΔΔ 致伤+给药组与单纯致伤组比 $P<0.01$

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

4. 别嘌呤醇对吸入性肺损伤早期BALF中蛋白含量、白细胞计数及分类的影响（见表）：伤后1h，BALF中蛋白明显增加，2h达高峰，6h仍维持高水平，别嘌呤醇可使伤后6hBALF中蛋白含量明显减少（$P<0.01$）。BALF中白细胞计数在伤后1h就显著升高，2h达高峰，6h仍维持高水平。正常BALF中肺泡巨噬细胞占80%，中性粒细胞仅占1%左右，致伤后的动物，中性粒细胞的比例增加，可达20%左右。别嘌呤醇可明显降低伤后6h BALF中白细胞计数，但不影响BALF中肺泡巨噬细胞与中性粒细胞的比例。

5. 别嘌呤醇对吸入性肺损伤早期病理改变的影响：烟雾吸入后，大体可见肺弥漫性出血点，光镜下见肺充血、出血、间质和肺泡水肿，大量白细胞浸润（见图Ⅰ、Ⅱ）。别嘌呤醇可使肺充血、出血、水肿明显减轻，白细胞浸润减少。

讨　论

本实验发现，烟雾吸入后，大鼠PMVP显著增加，同时BALF中蛋白含量和白细胞计数也明显增加，病理检查见肺充血、出血、间质和肺泡水肿，白细胞浸润等，符合通透性肺水肿表现。与上述结果一致的是肺MDA水平也在伤后明显增加，与PMVP的增加呈显著正相关（$r=0.9378, P<0.01$），而肺SOD活性则在伤后逐渐下降，与PMVP的增加呈显著负相关（$r=-0.8821, P<0.05$）。根据自由基说[11]，自由基攻击生物膜系统，引起多聚未饱和脂肪酸脂质过氧化，破坏镶嵌于膜系统上的许多酶的空间构型，致膜孔隙扩大，通透性增加，毛细血管内皮损伤，出现炎症反应和退行性改变。SOD是体内存在的天然抗氧化剂，其活性降低，可加重氧化性损伤。上述结果提示，自由基参与了烟雾吸入性肺损伤和肺水肿形成过程。可能是肺脂质过氧化，尤其是肺血管内皮细胞的脂质过氧化，导致了内皮细胞结构及功能改变，PMVP增加，肺水肿形成。当然，也不排除烟雾中的化学物质，热力和其它介质的直接或间接影响。

别嘌呤醇是经典的黄嘌呤氧化酶抑制剂。黄嘌呤脱氢酶（D型酶）在缺血缺氧时可迅速转变成黄嘌呤氧化酶（O型酶），催化次黄嘌呤分解为黄嘌呤，黄嘌呤又分解为尿酸，同时产生大量的超氧阴离子（O_2^-）。O_2^-，H_2O_2在过渡性金属离子如铁离子的存在下，生成强氧化剂羟自由基（$OH\cdot$），后者可促发脂质过氧化[12]。本实验证实别嘌呤醇可降低PMVP，减轻肺水肿，同时也降低肺MDA水平，提示别嘌呤醇能有效地抑制烟雾吸入性损伤早期肺水肿，其机理在于抑制黄嘌呤氧化酶，减少O_2^-产生，从而抑制肺脂质过氧化。

参 考 文 献

1. Crowell JW, et al. Effect of allopurinol on hemorrhagic shock. Am J Physiol 1969; 216:744
2. Dewall RA, et al. Responses of the ischemic myocardium to allopurinol. Am Heart J 1971; 82:362
3. Chatterjee SN, et al. Protective effect of allopurinol in renal ischemia. Am J Surg 1976; 131:658
4. Saze JC, et al. Superoxide radical involvement in the pathogenesis of burn shock Circ Shock 1984; 12:229
5. Rowland RRR, et al. Smock inhalation model for lung permeability studies. J Trauma 1986; 26:153
6. Saria A, et al. Evens blue fluorescence quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. J Neurosci Method 1983; 8:41
7. Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. Biochem Med 1976; 15:212
8. Buege JA, et al. Macrosomal lipid peroxidation. Method in Enzymology 1978; 52:302
9. Mccord JM, et al. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 1969; 244: 6049
10. 李益新，等。超氧化物歧化酶活力测定的新方法——化学发光法。生物化学与生物

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

物理进展 1983; 1:59

11. Delmaestro RF. et al. Free radicals as mediators of tissue injury. Acta Physiol Scand 1980; 492:43(Suppl)

12. Bucher JR, et al. Three mechanisms for the formation of an initiator of lipid peroxidation by xanthine oxidase. In: Oxy radicals and their scavenger systems. Gerald Cohen and Robert A Greemwald (eds). Elsevier Science Publisher, BV, 1983: p296

Effects of Allopurinol on Inhalation Pulmonary Injury in Rats

Zhang Min and Huang Yuehua (Department of Pharmacology, Third MilitaryMedical College)

Six hours after inhalation pulmonary injury, the pulmonary microvascular permeability(PMVP), pulmonary malondialdehyde (MDA) level, superoxide dismutase activity(SOD), the contents of protein and leucocytes in broncho-alveolar lavage fluid(BALF), and serum MDA level were determined in rats pretreated with allopurinol. In addition, the pathological changes of the lung tissues were also studied.

It was found that early administration of allopurinol resulted in marked reduction of PMVP, and the protein content and leucocyte count in BALF. Histopathological examinations revealed that allopurinol could reduce the leucocyte accumulation in pulmonary vessels, interstitial leucocyte infiltration, interstitial and alveolar edema and hemorrhage, and vascular congestion. The serum and pulmonary levels of MDA also markedly decreased. The changes of pulmonary level of MDA were parallel to those of PMVP, and the protein content and leucocyte count in BALF in time course and in degree.

The results listed here imply that the mechanism of the therapeutic effects of allopurinol on inhalation pulmonary injury is to reduce the production of superoxide anions through the inhibition of xanthine oxidase, in turn to inhibit the peroxidation of pulmonary lipids to alleviate pulmonary damage.

Key words: Allopurinol/pharmacodynamics; Capillary permeability/drug effects; Superoxide dismutase; Lung/pathology

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