

光气对小鼠 MDA、GSH 和 SOD 的影响

李文丽/海春旭*/张晓迪/梁欣/王鹏
(第四军医大学预防医学系毒理学教研室,
陕西 西安 710032)

The Effect of Phosgene on MDA, GSH and SOD in Mice

LI Wen-li, HAI Chun-xu*, ZHANG Xiao-di
LIANG Xin, WANG Peng
(Department of Toxicology, Fourth Military Medical University,
Xi'an Shanxi 710033, China)

【摘要】背景与目的: 研究小鼠光气染毒后不同时间对肺脏、血清和肝脏的氧化损伤。材料与方法: 40 只雄性小鼠, 随机分为 4 组。正常对照组小鼠以空气为对照, 染毒组小鼠给予 11.9 mg/L 剂量的光气, 时间为 5 min, 染毒后 2、4、8 h, 测定各组小鼠肺脏、血清和肝脏的丙二醛(Malondialdehyde, MDA)和还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量、总超氧化物歧化酶(Total Superoxide Dismutase, T-SOD)活力。结果: 随着光气染毒后时间的增加, 小鼠肺脏、血清和肝脏的 MDA 含量升高; 肺脏的 T-SOD 活力升高; 肺脏和肝脏的 GSH 含量在染毒后 2 h 降低。结论: 光气染毒可引起小鼠肺脏、血清和肝脏的氧化损伤。

【关键词】光气; 肺; 氧化损伤

中图分类号: R733.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2005)02-090-03

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To study oxidative injury of lung serum and liver in different time in mice after exposed to phosgene. MATERIAL AND METHODS: 40 mice were randomly divided into 4 groups with 10 mice in each. The mice in negative group were exposed to room air and the mice in positive group were exposed to 11.9 mg/L phosgene for 5 minutes, respectively. After 2 hours', 4 hours', 8 hours' exposure to phosgene, all mice were killed. The content of malondialdehyde(MDA) and reductive glutathione (GSH), activities of the total superoxide dismutase(T-SOD) in lung, serum and liver were determined. RESULTS: With the time prolonged after the mice were poisoned, MDA content in lung, serum and liver significantly increased ($P < 0.05$); T-SOD activity significantly increased in lung ($P < 0.05$); GSH content significantly decreased in mice lung and liver in negative group compared with that of negative group 2 hours after phosgene exposed ($P < 0.05$). CONCLUSION: Phosgene can induce pulmonary edema and oxidative injury of lung serum and liver in mice.

【KEY WORDS】phosgene; lung; oxidative injury

光气既是一种广泛存在的环境污染物^[1], 也是一种威胁性较强的战剂。光气吸入后作用于肺脏深部组织, 产生肺水肿和气体交换障碍^[2]。如果大剂量暴露, 就会发生肺水肿引起窒息而死亡。在我国, 有多家光气生产厂家, 职业性接触人员较多, 光气中毒事故时有发生^[3-5]。有研究表明, 凡能够减少自由基生成或利于自由基清除的药物, 均可显著减轻光气中毒所致肺水肿

的程度。为进一步比较全面研究光气对肺脏、血清和肝脏造成的氧化损伤, 我们测定了光气染毒小鼠后不同时间丙二醛(Malondialdehyde, MDA)和还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量、总超氧化物歧化酶(Total Superoxide Dismutase, T-SOD)活性, 为光气致肺水肿的治疗提供实验依据。

收稿日期: 2004-08-30; 修订日期: 2004-09-22

基金项目: 军队十五指令课题(No. 01L077)

作者简介: 李文丽(1969-), 女, 内蒙古包头市人, 博士, 主要研究方向: 军事毒理学。

* Correspondence to: HAI Chun-xu Tel: 86-29-83374879, Email: cx-hai@fmmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验仪器及设备 752型可见分光光度计,上海医用仪器厂;970CRT荧光分光光度计,上海三科仪器有限公司生产;LD4-2型离心机,北京医用离心机厂。Portasens II气体检测仪,美国 Analytical Technology 公司生产。

1.1.2 主要试剂 MDA标准品、硫代巴比妥酸为 E. Merck 产品。考马斯亮蓝 G-250 为 Sigma 产品。氯化硝基四氮唑蓝、牛血清白蛋白、邻苯二甲醛、GSH、磷钨酸购于上海生物化学试剂进出口公司。固体光气由润发化工有限公司生产。

1.1.3 动物 二级 BALB/C 小鼠,雄性,体重 18.1~23.6 g,本校实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与染毒 BALB/C 小鼠 40 只,随机分为 4 组:正常对照组、染毒后 2、4 和 8 h 组,每组小鼠各 10 只。正常对照组小鼠以空气为对照,染毒组小鼠置染毒柜中给予 11.9 mg/L 剂量的光气,时间为 5 min。

1.2.2 指标测定 染毒后 2、4、8 h,小鼠断头取血,分离血清,测定其 MDA 含量和 T-SOD 活性。剖腹取肺脏、肝脏,加生理盐水制成 1:5 的匀浆液,3000 r/min 离心 10 min,取上清测定 MDA 和 GSH 含量、T-SOD 活性。MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸荧光法,T-SOD 活性测定采用改良盐酸羟胺法,GSH 含量采用改良荧光法。蛋白定量采用考马斯亮蓝染色法。

1.3 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS10.0 统计软件进行多个实验组均数与一个对照组均数比较的 ANOVA、Dunnett-t 检验。

2 结果

2.1 光气染毒对小鼠肺组织的氧化损伤

2.1.1 光气染毒后不同时间小鼠肺组织 MDA 水平的变化 光气染毒后 4 和 8 h,小鼠肺组织 MDA 含量升高(表 1)。

2.1.2 光气染毒后不同时间小鼠肺组织 T-SOD

表 1 光气染毒对小鼠肺脏 MDA、GSH 含量和 T-SOD 活力影响($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Content of MDA, GSH and activity of T-SOD in lung of mice exposed to phosgene ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	MDA ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	T-SOD ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	GSH ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
Control	10	124.08 ± 18.41	711.49 ± 161.86	121.62 ± 24.10
Phosgene 2h	10	157.84 ± 64.14	870.65 ± 266.98	49.13 ± 9.25**
4h	10	324.75 ± 145.26*	171.67 ± 233.49*	22.20 ± 6.10**
8h	10	497.08 ± 207.64*	132.37 ± 570.13**	19.79 ± 3.43**

Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

活性的变化 光气染毒后 4 h,小鼠肺 T-SOD 活性升高;至 8 h T-SOD 活性升高显著(表 1)。

2.1.3 光气染毒后不同时间小鼠肺组织 GSH 含量的变化 光气染毒后 2 h 开始,小鼠肺 GSH 含量急速下降;至 8 h 后,肺 GSH 含量降低到极低水平($P < 0.001$,表 1)。

2.2 光气染毒对小鼠血清的氧化损伤

2.2.1 光气染毒时间对小鼠血清 MDA 水平的影响 11.9 mg/L 的光气染毒小鼠后,血清 MDA 水平随着光气染毒后时间的增加而呈增高趋势($r_s = 1.00$, $P = 0.05$)。见表 2。

2.2.2 光气染毒小鼠不同时间对血清 T-SOD 活性的影响 小鼠光气染毒后,血清 T-SOD 活力无显著改变(见表 2)。

表 2 光气染毒对小鼠血清 MDA 含量和 T-SOD 活力的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Content of MDA and activity of T-SOD in serum of mice exposed to phosgene ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	NMDA ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	T-SOD ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
Control	10	10.68 ± 2.53	43.97 ± 5.58
Phosgene 2 h	10	13.01 ± 1.93	47.62 ± 5.13
4 h	10	13.89 ± 1.11*	46.36 ± 5.15
8 h	10	14.85 ± 3.41*	50.17 ± 5.12

Compared with control group: * $P < 0.05$.

2.3 光气染毒对小鼠肝组织的氧化损伤

2.3.1 光气染毒后不同时间小鼠肝 MDA 水平的变化 光气染毒后 4 h 内,小鼠肝组织 MDA 呈增高趋势,但差异无显著性,染毒后 8 h,MDA 升高(表 3)。

2.3.2 光气染毒后不同时间小鼠肝 T-SOD 活性的变化 当光气染毒后 2 h,小鼠肝 T-SOD 升高;染毒后 4 h,开始降低,染毒后 8 h,T-SOD 活性下降(表 3),约为正常对照动物的 T-SOD 平均活性的 71% (447.89:630.12)。

2.3.3 光气染毒后不同时间小鼠肝 GSH 含量的变化 光气剂量为 11.9 mg/L 时染毒后 8 h 内,小鼠肝 GSH 含量持续降低,与对照组不同(表 3)。

表 3 光气染毒对小鼠肝脏 MDA、GSH 含量和 T-SOD 活力的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Content of MDA, GSH and activity of T-SOD in liver of mice exposed to phosgene ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	MDA ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	T-SOD ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	GSH ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
Control	10	220.38 ± 28.94	630.12 ± 69.98	12.55 ± 2.20
Phosgene 2 h	10	271.06 ± 45.08	743.49 ± 96.76*	11.05 ± 0.82*
4 h	10	282.04 ± 48.65*	648.63 ± 103.15	10.86 ± 1.46**
8 h	10	296.69 ± 41.02*	447.89 ± 128.96**	10.53 ± 1.00**

Compared with control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

3 讨论

光气作为剧毒化学物,具有在 8 °C 就开始大量挥发的特殊物理性质,因此,被用于战争和恐怖活动的威胁逐渐增加。光气吸入中毒最显著的临床表现是肺水肿的形成,也是中毒人员致死的主要原因,但肺水肿形成



机制还不清楚。目前认为^[6],光气所致肺水肿可能与下面多种病理生理作用有关。①酰化作用;②肺神经内分泌细胞的作用;③血管紧张素转化酶活力的升高;④花生四烯酸的代谢产物的作用;⑤自由基损伤;⑥肺泡Ⅱ型上皮细胞中毒损伤;⑦酸碱平衡失调;⑧Ca²⁺内流损伤等。因此,深入研究光气的毒性作用机制,是制定中毒防治措施的基础,是保障化工生产及人民财产安全的迫切要求,具有重要的军事与民用意义。

自由基攻击细胞膜脂质中的多不饱和脂肪酸使之过氧化,可引起脂质过氧化链式反应,生成新的自由基和过氧化脂质产物,导致细胞膜生物功能的异常和生物大分子的损伤。自由基与急性肺损伤的发生和发展有着密切关系^[7, 8]。有人发现急性肺损伤(Acute Lung Injury, ALI)病人肺水肿液中MDA及呼出气体中H₂O₂增加,可见ALI的发生与氧自由基有关。产生氧自由基的有中性粒细胞(Polymorphonuclear leukocyte, PMN_s)、肺巨噬细胞及肺血管内皮细胞,它们均可产生C₂⁻,其中起着启动和原发作用的是血管内皮细胞产生黄嘌呤氧化酶,PMN_s起着继发和扩大自由基损伤的作用^[9]。研究发现,自由基造成的氧化损伤是光气肺水肿的重要原因之一。本文对小鼠血清、肺脏和肝脏进行了光气染毒后不同时间造成的氧化应激损伤的研究。

本实验中发现,不同剂量的光气染毒后,随着时间的延长,小鼠血清和肺脏的MDA水平增高,4 h后显著升高;但肝脏的MDA水平与对照组比较没有显著性差异。说明从MDA指标看,光气可引起血清和肺脏的氧化应激损伤,且血清和肺脏的损伤在染毒后的时间上是一致的,但光气对肝脏的损伤较轻微。

实验中,11.9 mg/L的光气染毒后,随着时间的延长不引起血清T-SOD活性的显著改变,但引起肺脏的活性显著升高,肝脏的活性先增加后降低且肝脏的活性增加早于肺脏;随着光气染毒剂量的增加和染毒后时间的延长,血清T-SOD活性显著升高。提示,血清抗氧化酶对光气引起的氧化应激损伤的反应性低于肺脏;光气对肝脏也存在氧化应激损伤。文献报道^[10],急性光气接触几天后,作为肺损伤的应激反应,肺组织SOD增加了。本实验与文献报道相一致。肺脏的T-SOD活力持续增高可能与扣留在肺内的PMN_s释放大量超氧阴离子有关。

GSH参与许多毒物的解毒过程,是网络抗氧化剂中含量最丰富的抗氧化剂,它是机体从食物中获得的三种氨基酸(谷氨酸、胱氨酸和甘氨酸)所生成的。细胞内的GSH是机体对抗自由基的重要武器,保持体内GSH的高水平至关重要。已经证实,光气可耗竭亲核成分,特别是GSH。应用半胱氨酸(NAC)补充细胞内GSH,利

于清除活性氧自由基^[11]。本实验中,11.9 mg/L光气染毒小鼠后2 h,肺脏和肝脏的GSH开始降低;随着染毒后时间的延长,肺脏的GSH降低比肝脏明显。

由上可见,光气可引起血清、肺脏和肝脏多系统发生氧化应激损伤。而我们以往的研究表明^[12-14],光气可以造成小鼠肺脏多种细胞凋亡和肝细胞肿胀,而活性氧可诱导细胞凋亡^[15]。光气是否通过诱发体内产生大量的活性氧而诱导细胞凋亡,从而导致肺水肿的产生,还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Krajewski JA. Chemical accidents and catastrophes as a source of the greatest hazard to the environment and human health[J]. *Med Pr*, 1997, 48(1): 93-103.
- [2] Alfred MS. Disruption of gas exchange in mice after exposure to the chemical threat agent phosgene[J]. *Military Medicine*, 2001, 166(9): 809-821.
- [3] 杜 桃, 高繁标. 光气中毒10例报告[J]. *心血管康复医学杂志*, 1999, 8: 33.
- [4] 施玉兴. 抢救急性光气中毒一例体会[J]. *职业卫生和应急救援*, 2000, 18: 4.
- [5] 王招兄, 李思惠. 急性光气中毒112例临床分析[J]. *中国工业医学杂志*, 1998, 11: 165-166.
- [6] 李文丽. 光气诱发小鼠肺水肿的凋亡与氧化损伤机理研究[D]. 西安. 第四军医大学博士学位论文, 2004, 13-19.
- [7] Weinberg SE. Recent advances in pulmonary medicine [J]. *N Engl J Med*, 1993, 328: 1462-1470.
- [8] Kietzmann D, Kahl R, Muller M, et al. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS[J]. *Int Care Med*, 1993, 19: 78-81.
- [9] Shenkar R, Schwartz MD, Terade LS, et al. Hemorrhage activates NF-κB in murine lung mononuclear cells *in vivo* [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270: 1729-1735.
- [10] Jaskot RH, Grose EC, Richards JH, et al. Effects of inhaled phosgene on rat lung antioxidant systems[J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1991, 17: 666-674.
- [11] Said SI, Kiko NY. The pulmonary circulation and acute lung injury[M]. *Futura Publishing Co. Inc*, 1985. 3-10.
- [12] 李文丽, 海春旭, 张晓迪, 等. 光气诱导小鼠原代肺Ⅱ型细胞凋亡[J]. *第四军医大学学报*, 2004, 25(3): 229-232.
- [13] 李文丽, 海春旭, 梁 欣, 等. 光气致小鼠肺水肿及肝脏过氧化损伤[J]. *卫生毒理学杂志*, 2004, 18(1): 19-21.
- [14] 李文丽, 海春旭, 陈宏莉, 等. 小鼠光气染毒对肺脏细胞凋亡作用的研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2004, 16(4): 199-202.
- [15] 郭碧花. 活性氧诱导细胞凋亡作用机理的研究进展[J]. *川北医学院学报*, 2002, 17(4): 166-169.