

氯气染毒致大鼠肺水肿时内皮素-1 和 E-选择素的变化

吴山¹, 蒋志学², 孙明², 盛延良², 周毅¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400000; 2. 佳木斯大学, 黑龙江 佳木斯 154000)

摘要: 目的 本研究观察氯气染毒致大鼠肺水肿时血中 E-选择素和内皮素-1 的变化, 分析氯气引发这些因子变化与肺水肿产生的关系。方法 采用固相双夹心酶联免疫吸附法和放免技术测定大鼠血中 E-选择素和内皮素-1 浓度及肺脏干湿重量。结果 氯气染毒后大鼠血中 E-选择素和内皮素-1 浓度明显升高, 并导致肺含水量增加。结论 氯气可升高 E-选择素和内皮素-1 浓度, 随着 E-选择素和内皮素-1 浓度的升高出现肺水肿并逐渐加重, 伴随这些因子降低肺水肿逐步缓解, 表明二者在肺水肿发生机制中起着重要作用。

关键词: 氯气; 肺水肿; E-选择素; 内皮素-1

中图分类号: R135. 14; R992 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)05-0268-03

Changes of the plasma levels of E-selectin and endothelin-1 in lung edema rats caused by chlorine

WU Shan¹, JIANG Zhi-xue², SUN Ming², SHENG Yan-liang², ZHOU Yi¹

(1. The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400000, China; 2. Jiamusi University, Jiamusi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of the plasma levels of endothelin-1 and E-selectin in lung edema rats by chlorine exposure. **Method** The rats were exposed to chlorine gas for 10 minutes to prepare lung edema model. Then, periodically take blood and lung tissue samples for various detection, such as wet and dry weights of lung tissues, plasma levels of E-selectin and endothelin-1 (with double antibody sandwich quantitative ELISA method and radioimmunoassay, respectively). **Result** Compared with those in normal control group, the plasma levels of E-selectin and endothelin-1 in chlorine-exposed rats were obviously increased with the increase of wet weights of lungs. **Conclusion** Chlorine exposure can increase the plasma levels of E-selectin and endothelin-1 which might play an important role in the pathogenesis of lung edema.

Key words: Chlorine gas; Lung edema; E-selectin; Endothelin-1

氯气作为工业生产原料而被广泛应用, 氯气泄漏时有发生, 由此而引发的损伤严重威胁人们生命健康, 因此, 对氯气的损伤机制应有足够重视。本研究观察了氯气致大鼠肺水肿时 E-选择素、内皮素-1 的变化, 以此来探讨氯气损伤致肺水肿的机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备

实验动物为健康成年 Wistar 雄性大鼠, 体重 250~300 g, 实验前 8 h 开始禁食, 不禁水。大鼠随机分为 2 组: (1) 正常组 ($n=120$), 不做氯气染毒处理; (2) 染毒组 ($n=120$), 做氯气染毒处理。各组于 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 心腔抽血处死 20 只, 分离出血浆待测, 取出右肺测干、湿重。取左肺组织用 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察。

预先配制的混合气体中氮气体积分数为 80%、氧气 20%, 向其中充入氯气浓度达到 5 mg/m^3 。自制

密封舱容积 18 m^3 , 预充含氯气的混合气体, 气压为 1 个大气压, 将实验组大鼠置于密封舱内, 再以 2 L/min 的流量将含氯气的混合气体持续输入密封舱, 染毒 10 min。大鼠离开密封舱并正常活动, 自由饮水, 禁食, 多数大鼠在染毒后活动减少, 24 h 内无大鼠死亡。对照组大鼠同样置于密封舱内 10 min, 所吸入混合气体中不含氯气, 其他条件一致。

1.2 检测方法

用固相双夹心酶联免疫吸附法测定 E-选择素和放免技术测定内皮素-1, 操作按试剂盒说明书进行, 内皮素试剂盒购于中国人民解放军总医院科技开发中心放免研究所, E-Selectin 试剂盒购于 Amersham 公司。肺总含水量按每克干重肺组织比湿肺中含水量计算, 肺干、湿重按克计算, 取出右肺立即测量肺湿重, 之后将右肺置于 50°C 烘干箱中 24 h 后测肺干重, 肺总含水量计算公式如下:

肺总含水量 (ml/g) = (肺湿重 - 肺干重) / 肺干重

1.3 统计处理

各参数以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 差异显著性采用 t 检验, 并进行直线相关分析。

收稿日期: 2003-01-07; 修回日期: 2003-05-12

作者简介: 吴山 (1967-), 男, 黑龙江省人, 副主任医师, 博士, 从事心肺保护的临床研究。

2 结果

2.1 内皮素-1和E-选择素水平的变化

如表1所示,染毒组在氯气染毒后1h、3h、6h、12h、24h内皮素水平显著高于对照组($P < 0.001$),于3h达到高峰,6h开始下降。

表1 血液内皮素-1和E-选择素水平($\bar{x} \pm s$)

组别	内皮素-1水平 (pg/ml)						血液 E-选择素水平 (ng/ml)					
	0h	1h	3h	6h	12h	24h	0h	1h	3h	6h	12h	24h
正常组	50.95±4.41	51.89±4.61	51.16±3.58	52.12±4.86	50.32±3.90	53.05±4.32	15.19±2.37	15.74±1.05	17.07±1.96	15.63±1.00	15.23±0.94	15.79±1.44
染毒组	50.98±4.99	134.85±19.35*	233.34±12.86*	195.18±8.21*	166.43±7.79*	103.88±7.85*	15.54±2.40	20.73±1.23	103.55±11.43*	117.16±7.55*	59.11±8.83*	17.93±1.81

与正常组比较 * $P < 0.001$, 下同。

2.2 肺含水量的变化

如表2示,染毒组在氯气染毒前肺含水量与正常对照组无差异,在氯气染毒后1h开始升高,在1h、

表2 氯气染毒大鼠不同时间肺含水量测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	0h	1h	3h	6h	12h	24h
正常组	2.12±0.08	2.09±0.03	2.12±0.03	2.12±0.03	2.09±0.03	2.05±0.04
染毒组	2.11±0.05	2.42±0.10*	3.07±0.07*	4.01±0.06*	4.05±0.07*	3.96±0.14*

2.3 肺脏病理组织改变

染毒组表现为不同程度的肺泡间隔水肿增厚,炎性细胞浸润,多数肺泡腔内充满粉红色水肿液,呈均质状,其中混有大量红细胞和炎性细胞,血管腔扩张。

3 讨论

Demnati等^[1]研究发现,在吸入高浓度氯气后1h、3h、6h、12h、24h可导致大鼠严重的肺损伤,包括肺水肿、上皮细胞脱落和坏死、上皮退化、轻度的黏膜炎性反应。氯气是一种刺激性毒气,它可与呼吸道组织内的水分结合产生多种不稳定的氧化产物,这些物质可以损伤肺泡上皮细胞及肺泡毛细血管,使其通透性增加,导致肺水肿^[2]。Menaouar等^[3]报道,氯气中毒导致家兔离体肺急性损伤并出现肺水肿时,肺毛细血管的通透系数明显升高,说明氯气中毒使肺毛细血管的通透性增高导致肺水肿。

内皮素-1(ET-1)主要产生于血管内皮,在呼吸系统中除肺血管内皮外,气道上皮细胞、肺泡吞噬细胞等均可合成释放ET-1,它也是单核细胞产生释放TNF α 和IL-8的有效刺激物^[4]。内皮素-1是高效血管收缩剂,最早从猪内皮细胞中分离出来,在生理上拮抗钠素^[5]。正常时内皮素主要在肺血管系统降解,肺脏能清除大片的ET-1,在ARDS发病过程中,除有ET-1的合成和分泌增多外,受损伤组织降解ET-1的能力下降是导致ET-1水平上升的一个重要原因^[6]。本实验中氯气染毒致肺水肿发生时,ET-1水平明显

染毒组在氯气染毒1h后,E-选择素水平开始上升,但差异无显著性($P > 0.05$),在3h、6h、12h E-选择素水平明显升高,与对照组比较差异有显著性($P < 0.001$),6h水平上升至最高,12h开始下降。

3h、6h、12h、24h肺含水量高于正常对照组且差异有显著性($P < 0.001$)。在12h升至最高,24h开始下降。

升高,该结果支持这一观点。

本实验结果显示氯气染毒后ET-1水平持续上升,至3h达到高峰,6h开始下降,与肺含水量呈正相关。其发生机制考虑为氯气染毒后进入呼吸系统,直接或间接损伤肺血管内皮细胞、气道上皮细胞、肺泡吞噬细胞,刺激这些细胞产生释放ET-1,ET-1通过诱发TNF α 和IL-8产生而提高肺泡-毛细血管膜通透性产生肺水肿。

E-选择素只在活化的内皮细胞表达,体内和体外培养的内皮细胞受IL-1、TNF α 、细菌内毒素等刺激后,2~4h表达达到高峰,24h降至基线水平,静止的内皮细胞不表达E-选择素^[7,8]。氯气染毒后静止的内皮细胞被激活并产生E-选择素,本实验显示,染毒后3h E-选择素开始表达,6h水平上升至最高。E-选择素涉及单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞的粘附,白细胞沿内皮产生滚动现象是通过选择素上的胞浆尾区和其配体紧密亲和实现的^[8]。E-选择素对这些白细胞的作用,可导致肺血管通透性增加,从而促进肺水肿的形成。

氯气染毒发生后,呼吸道及全身血液中ET-1和E-选择素均明显上升,并与肺含水量呈正相关,这表明二者在氯气染毒致肺水肿发生中起重要作用。这一结果为进一步开展氯气损伤的基础研究和临床治疗提供了理论依据。

(下转第273页)

泛, 参与学习、记忆等多种生理过程, 但在病理状态下, 由于兴奋性氨基酸的骤升及代谢障碍而引起的多种物质的过量释放, 可引起 NMDA 受体过度激活, 进而引起继发性脑损伤。大量实验结果表明, NMDA 受体拮抗剂对脑损伤后继发性脑损害具有确切的保护作用, NMDA 受体拮抗剂还可降低脑损伤后血脑屏障的通透性, 从而对血管源性脑水肿也有治疗作用^[8]。

3.3 敌敌畏染毒大鼠脑组织 NMDA 受体活性的变化特征首先表现为受体密度减少和亲和力下降, 这可能与脑组织中兴奋性氨基酸的大量释放有关。大量兴奋性氨基酸的释放与 NMDA 受体结合后引起 NMDA 受体数量显著减少, 即表现为下降调节, 是机体的一种自身调节机制, 可保护中枢减少过度刺激。另一方面激活后的 NMDA 受体对与其相偶联的 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 的通透性增加, 引起神经细胞内 Ca^{2+} 超载和 Na^{+} 蓄积, 神经细胞内高渗导致细胞毒性, 继发性脑损害又启动了神经细胞凋亡^[9], 抑制了 NMDA 受体合成, 加速了受体分解, 此外受体的过度兴奋会造成其寿命缩短而使受体数目减少^[10]。以上原因都导致神经细胞膜上的 NMDA 受体减少, 亲和力下降。在 Johnson PS 等^[11]的研究中发现, 敌敌畏等有机磷农药能够明显抑制 [³H] 3-(2-羧基哌嗪-4-基)-丙基-1-膦酸 ([³H] CPP) 对大鼠脑突触膜上 NMDA 受体的结合, 提示有机磷毒物可能通过直接与 NMDA 受体复合物的相互作用而对神经细胞产生毒作用。

用 NMDA 受体拮抗剂来治疗有机磷中毒是近几年才发展起来的新型治疗方法, 从本次实验中我们看到 DDVP 染毒对大鼠脑组织中 NMDA 受体产生下调作用, 表现为受体数量减少、亲和力下降。这一现象为我们选择 NMDA 受体拮抗剂作为 DDVP 中毒的辅助治

疗药物提供了实验依据, 根据 DDVP 染毒后 NMDA 受体的变化规律可以进一步指导 NMDA 受体拮抗剂的使用方法。目前我们课题小组正在进一步研究一种非竞争性的 NMDA 受体拮抗剂——美金刚对敌敌畏染毒大鼠脑组织 NMDA 受体的保护作用, 以及美金刚与阿托品和解磷定联用治疗的疗效观察。

参考文献:

- [1] Shih TM, McDonough JH. Neurochemical mechanisms in Sarin-induced seizures [J]. J Appl Toxicol, 1997, 17 (4): 255-264.
- [2] Erik HF, Wong JA, Kemp TR, et al. The anticonvulsant MK-801 is a potent *N*-methyl-*D*-aspartate antagonist [J]. Proc Natl Acad Sci, 1986, 83: 7104-7108.
- [3] 徐乐焱 王世真, 左萍萍, 等. 大鼠脑局灶缺血再灌注后 NMDA 受体的改变 [J]. 中华核医学杂志, 2000, 20 (6): 259-262.
- [4] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.
- [5] 郭定宗 杨世锦, 程大池, 等. 敌敌畏急性中毒对小鼠血清胆碱酯酶活性的影响 [J]. 中国兽医学报, 2000, 20 (6): 619-620.
- [6] Miller IP, Lyeth BG, Jenkins LW, et al. Excitatory amino acid receptor subtype binding following traumatic brain injury [J]. Brain Research, 1990, 526 (1): 103-107.
- [7] Choi DW, Monyer H, Giffard RG, et al. Acute brain injury, NMDA receptors, and hydrogen ions: observations in cortical cell cultures [J]. Adv Exp Med Biol, 1990, 268: 501-504.
- [8] Bullock R. Introducing NMDA antagonists into clinical practice: why head injury trials? [J]. Br J Clin Pharmacol, 1992, 34 (5): 396-401.
- [9] Takei N, Endo Y. Ca^{2+} ionophore-induced apoptosis on cultured embryonic rat cortical neurons [J]. Brain Res, 1994, 652: 65.
- [10] 罗成义, 王清华, 徐如祥. 大鼠大脑损伤后皮质 NMDA 受体活性变化与脑水肿的关系 [J]. 中华创伤杂志, 1998, 14 (4): 203-205.
- [11] Johnson PS, Michaelis EK. Characterization of organophosphate interactions at *N*-methyl-*D*-aspartate receptors in brain synaptic membranes [J]. Mol Pharmacol, 1992, 41: 750-756.

(上接第 269 页)

参考文献:

- [1] Demnati R, Fraser R, Plaa G, et al. Histological effects of acute exposure to chlorine gas on Sprague-Dawley rats lungs [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 1995, 14: 15-19.
- [2] Jiang XZ, Buckley LA, Morgan KT, et al. Pathology of responses to the RD50 concentration of chlorine gas in the nasal passage of rats and mice [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1983, 71 (2): 225-226.
- [3] Menouar A, Anglade D, Baussand A, et al. Chlorine gas induced acute lung injury in isolated rabbit lung [J]. Eur Respir J, 1997, 10 (5): 1100-1107.
- [4] Cunningham NE, Hunibal N, Bala RJ, et al. Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines [J]. Crit Care

Med, 1997, 25 (6): 958-964.

- [5] Parlapiano C, Paoletti V, Campana E, et al. CGRP and ET-1 plasma levels in normals subjects [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 1999, 3 (3): 139-141.
- [6] Celik G, Karabiyikoglu G. Local and peripheral plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension secondary to chronic obstructive pulmonary disease [J]. Respiration, 1998, 65 (4): 289-294.
- [7] Los K, Lee S, Ramos RA, et al. Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 stimulates the adhesion activity of leukocyte integrin CR3 on human neutrophils [J]. J Exp Med, 1991, 173: 1493-1500.
- [8] Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, et al. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectin [J]. Science, 1989, 243: 1160-1165.