

# 肺表面活性物质对全氟异丁烯吸入性肺损伤的预防效果

荣曙, 唐治华

(南京军区军事医学研究所, 江苏 南京 210002)

**摘要:** 目的 通过观察外源性肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 对小鼠全氟异丁烯 (perfluoroisobutylene, PFIB) 吸入性肺损伤的防护效果, 以期寻找预防 PFIB 中毒的有效药物。方法 小鼠 PFIB 染毒前 2 h 经气管给予不同剂量的 PS 制剂 (含二棕榈酰磷脂酰胆碱, dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC)。采用静式全暴露法染毒 PFIB 5 min, 观察 48 h 内给药组与对照组小鼠的活存率、肺含水量和支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中蛋白含量。结果 预防给予 3 个剂量的 PS 制剂 (DPPC 25 mg/kg、50 mg/kg 和 100 mg/kg) 均能显著提高 PFIB 中毒小鼠的存活率 ( $P < 0.01$ ); DPPC 50 mg/kg 剂量组, 在中毒后 16 h 和 24 h 小鼠肺含水量明显低于生理盐水对照组 ( $P < 0.05$ ), 在中毒后 16 h BALF 中总蛋白和白蛋白的含量显著低于生理盐水对照组 ( $P < 0.01$ )。结论 外源性 PS 对小鼠 PFIB 吸入性肺损伤具有一定的预防作用。

**关键词:** 全氟异丁烯; 肺表面活性物质; 急性肺损伤; 预防

中图分类号: R563 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2004)03-0149-03

## Protective effect of pulmonary surfactant on acute lung injury induced by perfluoroisobutylene inhalation in mice

RONG Shu, TANG Zhi-hua

(Institute of Military Medicine of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China)

**Abstract Objective** To find a successful prophylactic intervention for the acute lung injury exposed to perfluoroisobutylene (PFIB) by testing the exogenous pulmonary surfactant. To looking for an effective measure to protect against PFIB poisoning by observing the effect of pulmonary surfactant on acute lung injury caused by PFIB inhalation in mice. **Method** Three dosages of pig pulmonary surfactant were intratracheal administration to mice 2 h before gaseous PFIB exposure for 5 minutes. The mortality, pulmonary water content and bronchoalveolar lavage fluid from the test groups were detected. **Result** All dosages of PS could significantly lower the mortality ( $P < 0.01$ ) compared with control group. The pretreated group with PS (50 mg/kg) could significantly lower the pulmonary water content at 16 h and 24 h after poisoning ( $P < 0.05$ ), and also could significantly lower protein concentration in BALF at 16 h after poisoning ( $P < 0.01$ ) compared with control group. **Conclusion** The exogenous PS has some protective effects on acute lung injury induced by PFIB.

**Key words:** Perfluoroisobutylene; Pulmonary surfactant; Acute lung injury; Prevention

全氟异丁烯 (perfluoroisobutylene, PFIB) 是聚四氟乙烯等含氟高分子化合物的裂解产物, 易穿透防毒面具, 毒性大约为光气的 10 倍。PFIB 主要通过呼吸道吸入中毒, 导致以通透性肺水肿为特征的肺损伤。反复急性低浓度 PFIB 中毒后的存活小鼠, 对致死量 PFIB 产生耐受性<sup>[1]</sup>。PFIB 中毒耐受小鼠肺组织的磷脂分析提示, 其耐受性与肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 含量的增多有一定的相关性<sup>[2]</sup>。本实验旨在观察预防性给予外源性 PS 对小鼠 PFIB 吸入性肺损伤的防护效果, 以寻求预防 PFIB 中毒的有效药物。

### 1 材料与方法

收稿日期: 2003-10-23; 修回日期: 2003-12-16

基金项目: 全军“十五”指令性课题 (编号: 01L077)

作者简介: 荣曙 (1979-), 女, 助理实验师, 研究方向: 吸入性肺损伤。

#### 1.1 实验动物

昆明种小鼠, 18~22 g, 雌雄各半, 购自南京中医药大学实验动物中心。

#### 1.2 试剂与仪器

PFIB 从聚四氟乙烯裂解残液中分离纯化, 色谱纯度为 99.05%; NaCO<sub>3</sub>、NaOH、酒石酸钾钠、硫酸铜均为国产分析纯; Folin 酚 (Sigma 公司, 华美公司分装); 白蛋白试剂盒购自南京建成生物工程研究所; DU 640 分光光度计 (BECKMAN 公司)。

#### 1.3 PS 制备<sup>[3]</sup>

0.9% NaCl 液灌洗新鲜猪肺, 合并灌洗液, 室温下离心 (1 000 r/min, 15 min) 以去除细胞等杂质。取上清液 4℃ 下离心 (8 000 r/min, 60 min), 将含 PS 的沉淀悬浮于 0.9% NaCl 液中, 用 0.68 mol/L 蔗糖盐水溶液 4℃ 下密度梯度离心 (6 000 r/min, 30 min)。

收集盐水电蔗糖界面层的物质,再悬浮于 0.9%NaCl 液中,4℃下离心(11 000 r/min, 30 min),如此重复 2 次。将含 PS 的最终沉淀物悬浮于 0.9%NaCl 液中,加入 3 倍体积的氯仿/甲醇〔V(氯仿):V(甲醇)=2:1〕进行抽提,取氯仿层,经丙酮沉淀去除中性脂质,再用 N<sub>2</sub> 将氯仿和丙酮吹干。所得 PS 置 4℃下储存备用,使用时悬浮于 0.9%NaCl 液中。用高效液相色谱法分析其主要活性成分二棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC)的含量,作为 PS 剂量依据。

#### 1.4 染毒方法及动物分组

采用静式全暴露法染毒,染毒前 2 h 经气管穿刺给药。在观察 PS 对 PFIB 急性中毒小鼠存活率的研究中,设 DPPC 25 mg/kg、50 mg/kg 和 100mg/kg 3 个剂量给药组和 1 个生理盐水对照组,每组 10 只小鼠,染毒 5 min,毒物质量浓度为 170 μg/L。在观察 PS 对 PFIB 急性肺损伤预防的效应关系时,设 DPPC 50 mg/kg 给药组和生理盐水对照组,毒物浓度均为 155 μg/L,染毒时间 5 min;共设 3 个时相点,每个时相点给药组和生理盐水对照组各 12 只小鼠;另设一个正常对照组。

#### 1.5 观测指标

(1) 3 种不同剂量的 PS 对 PFIB 急性中毒小鼠的存活率的影响。(2) PFIB 中毒小鼠的肺水含量,小鼠染毒后 8 h、16 h 和 24 h,每个时相点取 6 只处死,解剖取肺,称肺湿重,然后干燥至恒重称肺干重,计算肺含水量。(3) 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中蛋白的含量,小鼠染毒后 8 h、16 h 和 24 h,每个时相点处死 6 只,打开胸腔暴露气管和肺,通过插管用 0.9 ml 生理盐水灌洗肺,反复抽取 3 次。将灌洗液置于 1.5 ml 离心管中离心(4℃, 1 500 r/min, 10 min),取上清于-20℃保存。分别用酚试剂法<sup>[4]</sup>和溴甲酚绿比色法测定 BALF 中的总蛋白和白蛋白的含量。

#### 1.6 统计方法

用 SPSS 软件对数据进行分析。存活率比较采用  $\chi^2$  检验,给药组与对照组的肺含水量和蛋白含量比较采用 *t* 检验。

### 2 结果

#### 2.1 3 种不同剂量的 PS 对 PFIB 急性中毒小鼠存活率的影响

预防给予 PS,48 h 后小鼠存活情况见表 1。3 个给药组小鼠的存活率均明显高于生理盐水对照组(*P*

<0.01)。50 mg/kg 剂量组小鼠的存活率达 100%,高于其他两组,因此选择此给药剂量用于观察 PS 的预防效应。

表 1 预防给予不同剂量 PS 的小鼠急性 PFIB 中毒后存活情况

组别	动物数	死亡数	存活率(%)
生理盐水对照组	10	6	40
DPPC 25 mg/kg 组	10	2	80**
DPPC 50 mg/kg 组	10	0	100**
DPPC 100 mg/kg 组	10	3 <sup>△</sup>	70**

<sup>△</sup>2 只于给药后、染毒前死亡。\* \* 与生理盐水对照组比较 *P*<0.01

#### 2.2 预防给予 PS 对 PFIB 中毒小鼠肺含水量的影响

预防给予 PS(含 50 mg/kg DPPC),以低于致死浓度(155 μg/L)的 PFIB 染毒 24 h 后,给药组 36 只小鼠死亡 1 只;生理盐水对照组 36 只小鼠,死亡 6 只,其余观察肺含水量,结果见表 2。中毒后 8 h、16 h 和 24 h,给药组小鼠的肺含水量与正常对照组比较差异无显著性。中毒后 16 h 和 24 h,给药组小鼠的肺含水量明显低于生理盐水对照组(*P*<0.05)。

表 2 急性 PFIB 中毒小鼠的肺水含量变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	8 h	16 h	24 h
生理盐水对照组	78.41±1.53	80.11±2.07	80.54±2.86
给药组	77.49±0.75	77.87±1.04*	76.71±0.58*
正常对照组		77.25±0.21	

\* 与生理盐水对照组比较 *P*<0.05

#### 2.3 预防给予 PS 的小鼠 PFIB 中毒后 BALF 中蛋白含量

表 3 可见,中毒后 8 h 给药组 BALF 中蛋白含量高于生理盐水对照组(*P*<0.05)。中毒后 16 h,给药组小鼠 BALF 中的总蛋白和白蛋白含量均显著低于生理盐水对照组(*P*<0.01),而在中毒后 24 h,两组蛋白含量差别不大。

表 3 急性 PFIB 中毒小鼠 BALF 中蛋白含量变化( $\bar{x} \pm s$ ) g/L

时间	生理盐水对照组		给药组	
	总蛋白	白蛋白	总蛋白	白蛋白
8 h	0.38±0.05	0.17±0.16	0.95±0.42*	0.46±0.27*
16 h	3.45±0.62	1.09±0.26	2.04±0.60**	0.77±0.29**
24 h	6.50±3.56	3.99±2.92	5.42±3.21	2.55±2.08

与生理盐水对照组比较。\**P*<0.05, \*\**P*<0.01

### 3 讨论

PS 是由肺泡 II 型上皮细胞合成和分泌的磷脂-蛋白复合物,其中 85% 以上为磷脂,磷脂的 90% 以上是二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC),它是 PS 的主要活性成分。PS 分布在肺泡表面,形成单层磷脂膜,具有降低肺泡表面张力、保持肺泡内液体平衡、防止肺水肿、对抗氧化性肺损伤、调节局部免疫和炎症反应等功能。90 年代国内外开始将 PS 用于各种原因所致

肺损伤的治疗<sup>[5,9]</sup>, 结果发现, 外源性 PS 能够不同程度地降低肺泡表面张力、减轻肺水肿、提高肺顺应性、改善氧合功能和降低死亡率。由于 PFIB 中毒耐受小鼠的 PS 含量增多, 我们尝试了外源性 PS 对小鼠 PFIB 急性中毒肺损伤的保护作用。

本实验结果显示, PS 预防性给药可以显著提高 PFIB 急性中毒小鼠的存活率, 表明 PS 对小鼠 PFIB 急性中毒具有预防作用, 可能具有一定的临床应用价值。染毒前 2 h 给予小鼠 PS, 中毒后 16 h 和 24 h 的肺含水量显著低于对照组, 并与正常小鼠无差异。中毒后 16 h BALF 中蛋白含量显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 而在中毒后 24 h 与对照组无差别。该结果提示直接补充外源性 PS, 增加肺内 PS 的总量, 可改善 PFIB 中毒小鼠的早期肺水肿, 减小肺细胞损伤。

本研究中生理盐水对照组小鼠的存活率为 40%, 而以往同样中毒浓度小鼠的存活率均为 0<sup>[1,2]</sup>。这可能是因为本研究染毒前行气管穿刺给予生理盐水, 对小鼠呼吸道造成了一定程度的损伤, 其呼吸变浅, 实际吸入毒物量小于理论量。在中毒后 8 h, 给药组小鼠 BALF 中的蛋白含量高于对照组, 可能与给予的外源性 PS 中含有蛋白成分有关。

实验中我们也发现, 有机提取的猪肺 PS 于染毒前 2 h 给药, 虽然动物存活率明显提高, 但对肺含水量和 BALF 中蛋白含量的改善效果并不是很理想, 这可能与下列因素有关: (1) 外源性 PS 在肺内代谢加快, 以及被肺泡内一些可溶性蛋白和其他物质抑制,

还有部分制剂损失在气道内<sup>[7]</sup>; (2) PS 气管给药在肺内分布不均, 从而影响 PS 疗效; (3) PS 预防性用药的时机过早, PS 部分失活。另外, 谢尔凡等人的研究<sup>[8]</sup>也表明, 虽然外源性 PS 替代治疗吸入性损伤有一定实用价值, 但对肺组织的细胞保护作用小, 需要结合其他综合性治疗措施才能更好地发挥作用。因此, PS 作为 PFIB 吸入性肺损伤的候筛预防药物, 还需在 PS 的制剂类型、给药途径、给药时机以及用药次数等方面进行探讨, 必要时联合其他药物使用。

#### 参考文献:

- [1] 唐治华, 荣曙, 丁树标, 等. 小鼠全氟异丁烯急性中毒后的耐受性及其病理学改变[J]. 卫生毒理学杂志, 2003, 17(2): 103-104.
- [2] 荣曙, 唐治华, 丁树标. 全氟异丁烯中毒耐受小鼠的肺表面活性物质含量改变[J]. 卫生毒理学杂志, 2004, 18(1): 18-20.
- [3] 郑珊, 张文颖, 孙波, 等. 肺表面活性物质治疗大鼠小肠缺血性再灌注所致肺损伤[J]. 中华小儿外科杂志, 2001, 22(1): 48-51.
- [4] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 164-166.
- [5] Benggren P, Lachmann B, Custedt T, et al. Gas exchange and lung morphology after surfactant replacement in experimental adult respiratory distress syndrome induced by repeated lung lavage[J]. Acta Anaesthesiol Scand 1986, 30(4): 321-328.
- [6] Morton NS. Exogenous surfactant treatment for the adult respiratory distress syndrome? A historical perspective[J]. Thorax 1990, 45(11): 825-830.
- [7] 张耀恒, 齐顺贞. 肺表面活性物质在吸入性损伤中的应用[J]. 实用心脑血管病杂志, 2002, 10(3): 170-174.
- [8] 谢尔凡, 杨宗城, 何保斌, 等. 外源性肺表面活性物质替代治疗对烟雾吸入所致肺组织细胞损害的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 1998, 14(1): 66-68.

## 高压电场对大鼠脑多巴胺递质的影响

唐会清<sup>1</sup>, 张成海<sup>1</sup>, 李秀文<sup>2</sup>

(1. 沈阳市劳动卫生职业病研究所, 辽宁 沈阳 110024;

2. 沈阳市中心医院, 辽宁 沈阳 110024)

为探讨高压电场对神经系统的影响, 对大鼠的单胺类递质多巴胺进行了研究, 现报道如下。

### 1 实验方法

在高压生物实验室内由实验变压器产生高电压, 调至 200 kV/m, 分别施加于 3 组平行平板板, 板间所产生的场强分布均匀。取 Wistar 雄性大鼠 38 只, 随机分为实验组和对照组。实验组每天置于 200 kV/m 场强下暴露 2 h, 于暴露第 25 min 和第 60 天各处死一批进行多巴胺递质检测, 同时检测对照组。采用 M460 型电化学检测器, U<sub>6</sub>K 型进样阀, WatersM510 型高压泵, M740 型数据处理器, ResolveS<sup>+</sup>-SphenicalC18 色谱柱 150 m×3.9 mm。流动相为 0.1 mol/L 柠檬酸乙酸钠缓冲液, pH3.95, 流速 1.0 ml/min。工作电压 0.75 V, 检测灵敏度 750 nA。数据处理仪信号衰减比 128。室温 18

20℃。检测多巴胺递质所用标准品由 Sigma 公司提供。庚烷磺酸钠、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)、柠檬酸、乙酸钠、甲醇均为国产 AP 或 CP 级试剂。纯水由中国医科大学提供。

样品制备: 将大鼠断头处死, 迅速于冰中取下丘脑, 称重匀浆, 低温 15 000r/min 离心 20 min, 取上清 195 μl 加 5 μl 内标准液混匀后 80 μl 进样检测。

### 2 结果

在 200 kV/m 电场下暴露 25 min 时检测大鼠下丘脑多巴胺递质为 (1.14±0.39) μg, 与对照组 [(2.04±0.66) μg] 比较, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。暴露 60 d 时测定多巴胺递质为 (0.84±0.30) μg, 与对照组 [(0.72±0.18) μg] 比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

多巴胺递质是中枢神经调节链中不可忽视的组成成分, 可调节中枢神经系统功能, 具有较强的生理活性。我们研究发现, 在高压电场 (200 kV/m) 作用下, 大鼠下丘脑多巴胺递质有下降趋势, 于 2 个月后逐渐恢复。

(收稿日期: 2004-03-03; 修回日期: 2004-03-31)