

# 全氟异丁烯对小鼠肺组织巯基的影响

赵建, 张天宏, 丁高, 张完成, 黄春倩, 孙晓红

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要:** 目的 观察全氟异丁烯(perfluoroisobutylene, PFIB)吸入性急性肺损伤(acute lung injury, ALI)发病过程中,肺组织内巯基的变化情况。方法 采用动态吸入 PFIB 周身暴露装置染毒小鼠, Ellman 试剂法检测 PFIB 染毒前后小鼠肺组织内巯基(总巯基、蛋白巯基和非蛋白巯基)的含量变化。结果 染毒后,小鼠肺组织中非蛋白巯基(主要是还原型谷胱甘肽)含量与正常动物相比显著性的逐渐升高。结论 氧化性损伤可能不是 PFIB 吸入性肺损伤发病过程中主要的致病因素。

**关键词:** 全氟异丁烯; 肺损伤; 总巯基; 蛋白巯基; 非蛋白巯基

中图分类号: R563 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)05-0257-04

## Effects of inhaled perfluoroisobutylene on sulfhydryls in the lung tissues of mice

ZHAO Jian, ZHANG Tian-hong, DING Ri-gao, ZHANG Xian-cheng, HUANG Chun-qian, SUN Xiao-hong

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

**Abstract Objective** To investigate the changes of sulfhydryls (SH) in acute lung injury (ALI) in mice induced by inhalation of perfluoroisobutylene (PFIB). **Method** Mice were exposed to gaseous PFIB for 5 minutes in a flow-past whole-body exposure system. The changes of total sulfhydryls (TSH), nonprotein sulfhydryl (NPSH) and protein sulfhydryl (PSH) in the lung tissues were assayed by Ellman's reagent method. **Result** Level of NPSH, mainly reduced glutathion, elevated significantly in the lung tissues of mice from 4h to 24h after ALI induced by PFIB inhalation, as compared to that in normal mice. **Conclusion** Oxidative damage may not play a pivotal role in mouse ALI induced by PFIB inhalation.

**Key words:** Perfluoroisobutylene; Acute lung injury; Total sulfhydryls; Protein sulfhydryl; Nonprotein sulfhydryl

全氟异丁烯是氟塑料工业生产的主要副产物,是氟代高分子化合物(如聚四氟乙烯,又名特氟隆)高温裂解产物中毒性最高的组分,其毒性约为光气强度的10倍,吸入后可以引发肺损伤、肺水肿,严重者导致死亡<sup>[1~3]</sup>。随着我国有机氟塑料产业的迅猛发展,阐明PFIB吸入性急性肺损伤的毒作用机制是职业医学领域中十分重要的任务,也是研究针对性的防治药物和措施的重要基础。

有关PFIB中毒机制的研究表明,PFIB水解产生的氢氟酸仅介导了PFIB的部分中毒效应<sup>[4,5]</sup>;PFIB分子上的CF<sub>3</sub>具有强的吸电子性,使得C=C双键变得极为活泼,几乎可以与所有的亲核物质(nucleophiles)产生化学反应。生物体系的研究资料表明,外源性补充体内抗氧化剂(如口服N-乙酰半胱氨酸)可以减轻肺损伤的严重程度<sup>[6~10]</sup>。根据以上实验我们认为PFIB吸入性染毒有可能通过作用于肺组织局部的氧化还原系统而诱发形成急性肺损伤,

但是缺乏直接有力的实验室证据,而且迄今为止尚未见到有关PFIB与局部氧化还原系统相互作用的系统性研究报告。巯基物质作为抗氧化剂是反映机体抗氧化能力和组织氧化性损伤的重要指标,因此,我们拟通过实验观察PFIB染毒动物肺组织巯基物质的变化来探究氧化性损伤在PFIB吸入性肺损伤发病过程中的作用地位。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和材料

雄性ICR小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司),18~22g;UV-160A型紫外分光光度计(日本岛津株式会社)。

### 1.2 染毒方法与动物分组

小鼠动态吸入PFIB周身暴露染毒装置及PFIB染毒浓度的测定方法参考文献[11],实验中PFIB的质量浓度为130 mg/m<sup>3</sup>,染毒时间为5 min,染毒1次。

将实验小鼠随机分为9组,每组9只。分别于染毒前,染毒后0、0.5、1、2、4、8、16和24 h经腹主动脉放血处死。待排干血液后,打开胸腔,分离出气管并于甲状软骨下结扎,然后将气管连同全肺整块

收稿日期: 2004-10-25; 修回日期: 2004-11-30

基金项目: 军事医学科学院创新基金

作者简介: 赵建(1975-),男,山东肥城人,医学博士,助理研究员,主要从事化学源性肺损伤研究。

取出, 小心剔除肺外组织, 生理盐水漂洗, 滤纸吸干, 左肺用于计算肺系数, 右肺则立即进行肺匀浆和肺组织巯基含量的测定。

### 1.3 肺系数计算

称取左叶湿肺质量, 然后置于 80℃ 烘箱中干燥 24 h, 称取左叶干肺质量。按照下列公式计算湿肺体比和肺湿干比:

$$\text{湿肺体比} = \frac{\text{湿肺质量}}{\text{小鼠体质量}} \times 10000$$

$$\text{肺湿干比} = \frac{\text{湿肺质量}}{\text{干肺质量}}$$

### 1.4 巯基含量测定

取肺组织按 2 ml/肺, 以生理盐水为匀浆介质, 在冰浴上制备肺匀浆。采用 Ellman 试剂法<sup>[12]</sup> 测定肺组织中总巯基和非蛋白巯基含量, 然后计算蛋白巯基含量。

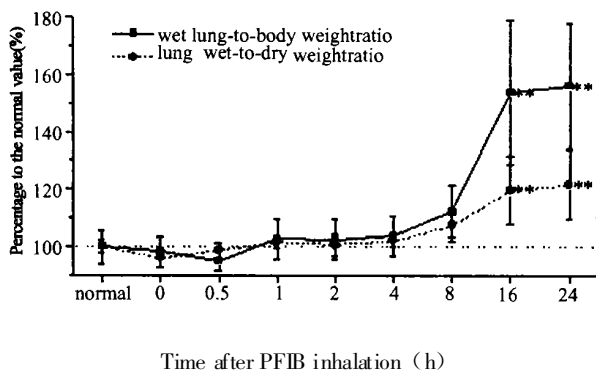
$$\text{蛋白巯基} = \text{总巯基} - \text{非蛋白巯基}$$

### 1.5 统计方法

采用单因素方差分析进行实验数据的统计分析, 采用 Dunnett t 检验进行 PFIB 染毒后各时间点与正常对照组的比较, 其数据的表示形式为  $\bar{x} \pm s$ 。

## 2 结果

### 2.1 PFIB 作用后染毒小鼠肺系数 (湿肺体比和肺湿干比) 的变化规律 (见图 1)



与正常对照组比较, \*\*  $P < 0.01$

注: 纵坐标是以正常对照组的均数为标准, 各染毒组与之进行比较所得百分比。图 2 同。

图 1 PFIB 作用下染毒小鼠湿肺体比和肺湿干比的变化规律

由湿肺体比和肺湿干比可以看出, 在染毒后 8 h 湿肺体比和肺湿干比开始升高, 说明从此时点开始, PFIB 吸入所致急性肺损伤表现出肺内水分渗出的症状, 并随着时间的推移逐渐加重, 至 24 h 最高, 表明在 PFIB 130 mg/m<sup>3</sup>, 吸入 5 min 的染毒条件下, 急性肺损伤模型的制作是成功的。

### 2.2 PFIB 作用后肺组织内总巯基、非蛋白巯基以及

### 蛋白巯基的含量变化

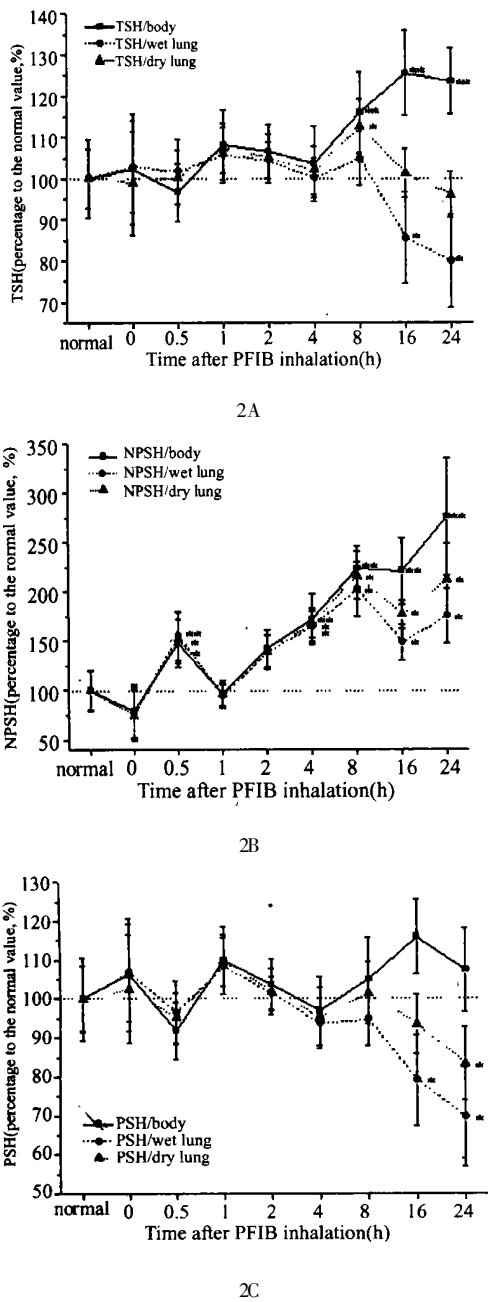
肺组织总巯基含量是反映肺组织内所有具有抗氧化能力的巯基总量, 包括蛋白巯基和游离的非蛋白巯基。

在不考虑肺内水分渗出以及固形物 (蛋白质、细胞等) 漏出的影响, 以小鼠染毒前体重进行加权计算时, 肺组织中总巯基 (total sulfhydryl, TSH) 在染毒后 8 h 开始升高, 至染毒后 16 h 达峰, 24 h 时稍有降低但仍维持在一个较高的水平 (图 2A)。非蛋白巯基 (nonprotein sulfhydryl, NPSH) 在染毒后即刻虽有轻微下降, 但在染毒后 0.5 h 即有显著性升高, 从染毒后 4 h 开始, NPSH 显著性持续升高至 24 h 并达峰 (图 2B), 而肺组织蛋白巯基 (protein sulfhydryl, PSH) 的水平在染毒后并无明显改变 (图 2C)。

在考虑肺内水分渗出以及固形物漏出的影响, 以染毒小鼠取样时湿肺重进行加权计算时, TSH/湿肺重在 PFIB 染毒后 8 h 开始显著性降低 (图 2A); NPSH/湿肺重在染毒后 0.5 h 即有显著性升高, 从染毒后 2 h 开始显著性地持续升高至染毒后 8 h 达峰, 随后略有下降, 但是与正常对照组比较差异仍具有显著性 (图 2B); 而 PSH/湿肺重在 PFIB 染毒后 2 h 开始显著性的进行性降低 (图 2C)。结合 PFIB 染毒小鼠湿肺体比的时间变化规律, 可以看出 TSH/湿肺重以及 PSH/湿肺重的显著性降低与染毒小鼠湿肺体比的显著性升高在时间上紧密相关, 可能是肺内水分渗出稀释了肺组织内 PSH 的含量。

在考虑肺内固形物漏出的影响, 以染毒小鼠取样时干肺重进行加权计算时, TSH/干肺重在 PFIB 染毒后 8 h 有显著性升高 (图 2A); NPSH/干肺重在染毒后 0.5 h 即有显著性升高, 从染毒后 2 h 开始显著性地持续升高至染毒后 8 h 达峰, 随后略有下降, 但是与正常对照组比较仍具有显著性差异 (图 2B); 而 PSH/干肺重在 PFIB 染毒后 16 h 开始呈现下降趋势, 在 24 h 时较正常对照组显著性降低 (图 2C)。结合 PFIB 染毒小鼠干肺体比的时间变化规律, 可以看出 PSH/干肺重的显著性降低与染毒小鼠干肺体比的显著性升高在时间上紧密相关, 由此我们推测 PSH/干肺重在染毒后 24 h 的显著性降低可能是由于 PFIB 吸入性肺水肿蛋白质漏出显著性增加所引起的。

由图 2B 可以看出, 不论考虑 PFIB 染毒后肺内水分渗出和肺内固形物漏出与否, NPSH 的肺内含量在染毒后即刻有轻微的一过性降低, 其后则是则显著性升高。



与正常对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

图 2 肺组织内 TSH、NPSH、PSH 含量以及肺系数 (lung index) 在 PFIB 染毒前后的变化情况

### 3 讨论

正常的生物有机体具有完整的抗氧化系统, 能够使活性氧的产生与清除处于一种动态平衡, 其主要由两部分构成, 即抗氧化酶及非酶抗氧化物。巯基物质作为在化学结构上含有-SH 基团的化合物, 是非酶抗氧化物的主要组分。机体内的巯基物质可分为非蛋白质巯基 (NPSH) 和蛋白质巯基 (PSH) 两大类, 是体内重要的自由基清除系统<sup>[13]</sup>。NPSH 主要为还原型谷胱甘肽 (GSH) 及少量的游离半胱氨酸及其衍生

物; PSH 主要是蛋白质肽链上半胱氨酸残基所带的巯基。体内 NPSH 中 GSH 具有重要生物学作用, GSH 可以结合进入体内的毒性物质和机体自身产生的有毒代谢物, 并可以作为自由基的直接清除剂, 是体内自由基清除系统中的重要组成部分<sup>[14]</sup>, 在组织的自身保护中具有重要的作用, 对于维持细胞结构和功能非常关键<sup>[15]</sup>; 同时, GSH 还起着保护蛋白巯基的作用, 而 GSH 的耗竭被认为是蛋白巯基氧化的前提。由此可见, NPSH 是一较敏感并能综合反映组织细胞抗氧化能力的观测指标。

在光气吸入染毒所诱发的肺损伤中, Jaskot 等人观察到在光气 1 ppm 染毒后即刻内源性 NPSH 一过性显著降低, 而 0.25 ppm、0.5 ppm 的光气染毒后仅有轻微下降, 其后内源性 NPSH 显著性升高<sup>[16]</sup>。与此相类似, 本实验观察到在 PFIB (130 mg/m<sup>3</sup>) 染毒 5 min 后, NPSH 虽有一过性轻微下降, 但是在染毒后 4 h 即开始显著性升高并持续升高直至染毒后 24 h, TSH 在染毒后 8 h 开始显著性升高并持续至染毒后 24 h; 虽然染毒动物 PSH/湿肺和 PSH/干肺变化曲线在染毒后 24 h 较正常对照动物有显著性下降, 但是根据湿肺体比和干肺体比的变化曲线可以看出, 这种显著性变化发生在 PFIB 染毒后肺损伤出现明显加重的情况下, 即可能是由于肺内水分渗出和固形物漏出所致。本文的研究表明 PFIB 染毒后, 由 NPSH 所反映的肺组织抗氧化能力并未见降低, 而是维持较高水平的抗氧化能力。由此我们认为氧化性损伤在 PFIB 吸入性肺损伤发病过程中有可能不是主要的致损伤因素。

### 参考文献:

- [1] 张宪成. 全氟异丁烯的理化性质及侦检防护 [J]. 国外医学军事医学分册, 1995, 12 (3): 113-118.
- [2] Robbins JJ, Ware RL. Pulmonary edema from Teflon fumes [J]. New England Journal of Medicine, 1964, 271: 360-361.
- [3] Harris DK. Polymer-fume fever [J]. Lancet, 1951, 1008-1011.
- [4] Brainard JR, Kinkead SA, Kober EM, et al. Potential involvement of HF in perfluoroisobutylene induced lung injury [J]. Toxicologist, 1992, 12: 843-851.
- [5] Lehnert BE, Starest DM, Kinkead SA, et al. Mechanisms of lung injury caused by perfluoroisobutylene and related agents [Z]. ADA 297352 USAMRICD-TR-9501, 3-51.
- [6] Amoyo CM. The chemistry of perfluoroisobutylene (PFIB) with nitron and nitroso spin traps: an EPR/Spin trapping study [J]. Chem Biol Interact, 1997, 105: 119-129.
- [7] Maidment MP, Upshall DG. Retention of inhaled perfluoroisobutylene in the rat [J]. J Applied Toxicol, 1992, 12 (6): 393-400.

(下转第 262 页)

### 3 讨论

近年来, 环境中铅污染对儿童学习记忆能力的损伤及远期危害已经引起广泛关注。但铅的神经毒性机制并不完全清楚, 可能为多途径多因素相互作用的结果。有研究表明铅能促进活性氧自由基 (ROS) 的产生, 使脑组织处于氧化应激从而增强脂质过氧化过程<sup>[2]</sup>。超氧化物歧化酶 (SOD) 是机体能够清除超氧阴离子的酶, 该酶受到抑制, 必然造成超氧阴离子的堆积, 并可通过其他反应生成羟自由基等氧自由基产物。Hodgson 指出, 超氧阴离子和羟自由基是脂质过氧化过程的关键因素<sup>[2,3]</sup>。本研究发现, 脂质过氧化程度与 SOD 活力下降间存在平行直接的关系。在真核细胞中, 以存在于细胞浆的 Cu, Zn-SOD 为主要形式, 且活性最强<sup>[3]</sup>。Mylorie 认为 SOD 活力下降是由于铅所致的铜缺乏, 因为铜在这种酶的反应过程中起到催化作用<sup>[4]</sup>。本研究应用原子吸收火焰法测定仔鼠脑组织中铜、锌含量, 中、高剂量组与对照组相比, 铜含量有下降趋势。

大量研究表明, 在神经系统发育过程中, 细胞凋亡具有重要的生物学意义<sup>[5]</sup>。为适应发育进程的需要, 整个神经系统处于神经细胞的增殖和自然凋亡的动态平衡之中。蔡文琴等<sup>[6]</sup>应用 Tunel 法测定大鼠大脑半球皮层、海马、基底节区等脑区的神经细胞凋亡, 发现高峰期发生在出生后 7 d。Oberto 认为在中枢神经系统发育期, 铅导致的神经毒性作用是通过细胞凋亡来进行的。他们使用出生后 6~8 d 的新生大鼠小脑颗粒细胞在体外复制铅的神经毒作用模型, 结果发现 1 μmol/L 铅暴露不影响谷氨酸所致神经元细胞坏死, 但促进了细胞凋亡的发生<sup>[7]</sup>。另外, 可能

在氧化应激和细胞凋亡间存在一些联系。有报道认为可引起自由基增多的氟化物能明显引起体外培养软骨细胞及成骨细胞发生细胞凋亡, 而加入 SOD 后对细胞凋亡有拮抗作用<sup>[8]</sup>。在体内环境中, 铅能否诱导发育期神经元细胞的凋亡, 我们能检索到的国内外的报道甚少。本研究结果提示, 在出生 7 d 时, 高剂量染铅组仔鼠脑组织海马附近皮质区 TUNEL 阳性细胞核与对照组相比明显升高。染铅所致铜等微量元素含量下降造成 SOD 活力降低, 从而使 ROS 增加, 而 ROS 则可能是细胞凋亡的传递器。故铅的发育神经毒性机制与微量元素铜缺乏所致 SOD 酶活性下降, 和由此造成的自由基增加以及由 ROS 所介导的细胞凋亡间存在密切关系。本研究为铅神经毒性的自由基学说提供了一些佐证。

#### 参考文献:

[1] 张军. 发育期铅暴露的远期危害及其机制的研究进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 1999, 12: 106.  
 [2] Adonayb VN. Lead intoxication; antioxidant defense and oxidative damage in rat brain [J]. Toxicology, 1999, 135: 77-85.  
 [3] 万伯健. 卫生毒理学 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1991. 216.  
 [4] Mylorie AA. SOD activity and other parameter [J]. Toxicol Applied Pharm 1985, 82: 375-392.  
 [5] Yuan J. Apoptosis in the nervous system [J]. Nature, 2000, 407: 802-813.  
 [6] 蔡文琴. 发育神经生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 221.  
 [7] Oberto A. Lead promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons; pathological implications [J]. J Pharm Experi Thera, 1996, 279: 435-442.  
 [8] 桂枝枝, 王长松, 于艳妮, 等. 氟对软骨细胞与成骨细胞凋亡及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、SOD、NO 的影响 [J]. 中国地方病杂志, 2004, 23: 108-112.

(上接 259 页)

[8] Lailey AF, Hill L, Lawston IW, et al. Protection by cysteine esters against chemically induced pulmonary edema [J]. Biochem Pharmacol 1991, 42 (suppl): 47-54.  
 [9] Hobbs MJ, Battenworth M, Cohen CM, et al. Structure-activity relationships of cysteine esters and their effects on thiol levels in rat lung in vitro [J]. Biochem Pharmacol, 1993, 45 (8): 1605-1612.  
 [10] Lailey AF, Upshall DG. Thiol levels in rat bronchio-alveolar lavage fluid after administration of cysteine esters [J]. Human Exp Toxicol, 1994, 13: 776-780.  
 [11] 赵建, 丁日高, 张宪成, 等. 四氢吡咯二硫代氨基甲酯对全氟异丁烯吸入性肺损伤的防治效果 [J]. 中国工业医学杂志, 2001, 14 (6): 331-335.  
 [12] Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and non-

protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent [J]. Anal Biochem, 1968, 25: 192-205.  
 [13] 张在兴, 祝学光, 才文彦, 等. 内源性一氧化氮对大鼠应激性胃粘膜损伤的保护作用 [J]. 北京医科大学学报, 1997, 29: 510-512.  
 [14] Sies H. Glutathione and its role in cellular functions [J]. Free Radic Biol Med, 1999, 27: 916-921.  
 [15] Jurina-Romet M, Abbott FS, Tang W, et al. Cytotoxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamins C and E in glutathione 2 depleted rat hepatocytes [J]. Toxicology, 1996, 112: 69-85.  
 [16] 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.