

# 油酸性急性肺损伤启动机制的实验研究

梅双, 赵金垣, 温韬, 邢俊杰, 张雁林

(北京大学第三医院职业病研究中心, 北京 100083)

**摘要:** 目的 从分子层面探讨油酸性急性肺损伤的启动机制。方法 分别在大鼠尾静脉注射油酸, 于 0.5、1、2、6、24 h 后, 观察氧自由基产生及与其清除相关的氧化-抗氧化指标, 同时检测肺组织中活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、肺湿/干重、血气分析及病理学的动态变化, 并用抗自由基的吡菲尼酮 (20、40、80 mg/kg 灌胃) 作用后检测上述指标动态变化。结果 大鼠尾静脉注射油酸后 XO 活性和 NADPH 氧化酶组分 (p47phox 蛋白) 表达高峰在 1 h 和 6 h, 与肺组织 ROS 含量的两个时间高峰相一致; 肺组织 GSH-Px 活性和总抗氧化能力在注射油酸后 2 h 一过性升高随后降低, 而肺湿/干重比和病理学评分在油酸注射后 1 h 达到峰值, 动脉血氧分压在油酸注射后 2 h 逐渐降至最低。吡菲尼酮作用后, 随着自由基减少, 急性肺损伤各项指标均有所好转。结论 通过正反两方面证实, XO 和 NADPH 氧化酶过量及导致 ROS 的大量生成乃 ARDS 最重要的源头事件, 其对血管内膜的损伤, 可进而引起微血管血栓形成、毛细血管膜-肺泡通透性增加及肺水肿形成, 从而严重影响肺的通气换气功能, 降低血氧分压, 导致严重低氧血症, 构成了急性肺损伤的病理学基础。

**关键词:** 急性肺损伤; 氧化; 抗氧化; 活性氧自由基; NADPH 氧化酶

中图分类号: R563 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)02-0067-06

## Studies on pathogenesis of oleic acid induced-acute lung injury in rats

MEI Shuang, ZHAO Jin-yuan, WEN Tao, XING Jun-jie, ZHANG Yan-lin

(Research Center of Occupational Medicine, The Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** **Objective** The aim of our study is the major cellular pathways of ROS production in oleic acid induced acute lung injury. **Method** Oleic acid induced group administered oleic acid (0.15 ml/kg, iv). The animal model of ARDS was verified by blood gas analysis and pathological examination of lung. To examine the major cellular pathways of ROS production in the lung, we assayed myeloperoxidase (MPO) activity, xanthine oxidase (XO) activity, the important component of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase) -p47phox expression, glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, total antioxidation capability (TAC), and reactive oxygen species (ROS) measured directly by electron spin resonance (ESR) spectroscopy in lung tissue at different time points without or with pifenidone (20 mg/kg, 40 mg/kg and 80 mg/kg, p.o., respectively). In addition, we explore lung wet/dry ratio, arterial blood gas analysis and lung pathologic score. **Result** ESR showed the content of ROS in the lung began to rise at 30 min and was measured at 1 h and 6 h after OA injection. The trend of the peak of the activity of XO and the component of NADPH oxidase, protein 47phox was unanimous with the change of lung ROS content by ESR, which showed NADPH oxidase and XO contribute to generating free radicals in lung with OA induced ARDS. The activity of GSH-Px and the total antioxidant capability increased only at 2 hours after OA injection in the lung, which shows that the increase of antioxidation did not overwhelm the excessive ROS generation from oxidant enzymes, and then the capability of the antioxidation system declined by excessive ROS generation from the oxidant enzymes. Lung wet/dry ratio enhanced significantly at 1 hour after oleic acid injection. Arterial blood gas analysis showed that arterial partial oxygen pressure was down to the lowest at 2 hours after OA injection. The sequence of the effect of PFD in ALI rats was at 0.5 h (MPO and p47phox), 2 h (GSH-Px and TAC) and 6 h (XO) after OA injection. **Conclusion** Associated with results of our previous study that the sequence of effect of PFD was at 0.5 h (oxygen radicals), 1 h (pathologic score), 2 h (lung edema) and 6 h (PaO<sub>2</sub>) after OA challenge, those results indicate the damage of the biological membrane system directly by excessive ROS leads to the permeability of alveolar-capillary and edema. Those changes above affect ventilation function severely in the lung leading to refractory hypoxemia and the exacerbation of lung injuries via positive feedback loops.

**Key words:** Acute lung injury/Acute respiratory distress syndrome; Reactive oxygen species; Oxidation; Antioxidation; NADPH oxidase

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是一类由多种病因 (包括刺激性气体中毒) 导致的以肺部炎症和急性肺泡-毛细血管膜损伤为主要病理特点, 以进行性呼吸困难和难以纠正的低氧血症为主要临床表现的

收稿日期: 2007-01-22; 修回日期: 2007-03-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571551)

作者简介: 梅双 (1975-), 女, 博士, 从事细胞学研究。

\*: 责任作者, 教授。

危重综合征。急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 则是 ALI 最严重后果或终末阶段<sup>[1]</sup>。ALI/ARDS 发病机制错综复杂, 迄今尚未完全阐明。目前认为 ROS, 尤其超氧阴离子在 ALI/ARDS 发生发展中起重要作用<sup>[2,3]</sup>。但对于 ALI/ARDS 时 ROS 增多的主要机制还不甚清楚, 因此本实验拟探讨油酸性急性肺损伤过程中肺组织 ROS 含量增加的机制, 为今后研究及临床应用提供理论依据。静脉注射油酸制备的 ALI/ARDS 动物模型是研究 ALI/ARDS 的经典模型, 因此本研究采用此模型<sup>[4]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 129 只, 体重 250 ~ 280 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。129 只 SD 大鼠共分为 5 组: 正常对照组, 油酸 (OA) 致 ARDS 组, 3 个不同剂量吡菲尼酮 (PFD) 早期干预组 (20、40、80 mg/kg, 灌胃)。根据油酸注射时间又分为 30 min、1 h、2 h、6 h、24 h 等 5 个亚组, 每亚组 5 只大鼠。

提前 3 天灌胃给药 3 个不同剂量的 PFD, 每天 1 次。第 4 天油酸注射前灌胃给予 3 个不同剂量的 PFD 一次, 灌胃后 1 h 内乙醚麻醉大鼠, 股静脉注射油酸, 剂量为 0.15 ml/kg, 按不同亚组分别于股静脉注射 OA 后 30 min、1 h、2 h、6 h、24 h 腹腔内注射 20% 乌拉坦麻醉, 暴露腹主动脉, 经腹主动脉放血处死。剪开胸腔, 小心分离肺组织, 肺组织以铝箔纸包好投于液氮中, 随后转入 -70 °C 冰箱保存, 用于检测黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、NADPH 氧化酶 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase) 重要组成成分 p47phox、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、总抗氧化能力 (total antioxidation capability, TAC)。

### 1.2 指标测定及方法

动脉插管采集动脉血 0.5 ml, 避免血中混有气泡, 迅速用胶塞封住针尖, 避免与空气接触, 放入冰盒, 避光保存, 10 min 内用 170 血气分析仪 (美国 CIBA Coming 公司) 进行血气分析。肺组织湿/干重比 = 肺组织湿重/肺组织干重 × 100%, 代表肺水肿程度。肺组织病理学光镜观察: 肺组织固定、包埋、切片、HE 染色及光镜观察。取 0.5 g 右肺上叶肺组织, 加 0.5 ml 捕集剂, 电动匀浆至匀浆化, 参照文献 [2] 方法处理并检测肺组织内自由基含量。肺组织内的 XO、MPO、GSH-Px、TAC 检测按南京建成生物工

程研究所生产的检测试剂盒说明书进行; BCA 法测定 NADPH 氧化酶 p47 蛋白含量, Western blotting 检测 NADPH 氧化酶 p47phox 蛋白表达, 用凝胶分析软件 Quantity One 图像处理系统对条带进行灰度分析, p47phox 表达以与 β-actin 比值表示。以各指标的对照组蛋白表达设定为基础值, 取各时间点油酸组蛋白表达与它的比值, 并做图表示。

### 1.3 统计学方法

1.3.1 采用 SPSS10.0 统计软件进行分析, 以均数 ± 标准误 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两样本间均数比较采用 Independent-Samples T Test。病理评分按照等级资料处理, 组间比较采用 Mann-Whitney 非参数检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

1.3.2 正交分析, 为了获得药物治疗的最佳剂量及作用时间, 应用正交设计 L4 (4<sup>2</sup>)<sup>[5]</sup> 将实验设置为 2 个因素 (A: PFD 剂量; B: PFD 最优作用时间), 每个因素又分为 4 个水平 (见表 1)。

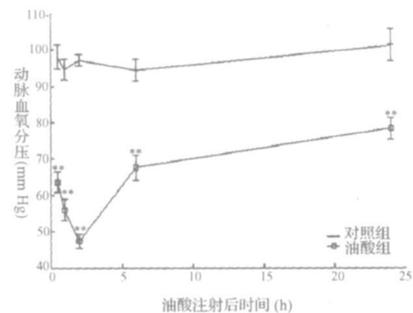
表 1 PFD 最优实验条件正交设计 L4 (4<sup>2</sup>)

水平	A		水平	B	
	吡菲尼酮剂量 (mg/kg)			吡菲尼酮有效作用时间 (h)	
0	0		1	0.5	
1	20		2	1	
2	40		3	2	
3	80		4	6	

## 2 结果

### 2.1 动脉血气分析结果

图 1 显示注射油酸后氧分压开始下降, 1 h 出现低氧血症, 2 h 降至最低, 随后逐渐回升直到 24 h, 油酸注射后各个时间点与正常对照组比较有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。二氧化碳分压和 pH 值与对照组比较无统计学意义, 在此处未显示。



与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ , 图 2 ~ 图 5 同。

图 1 油酸性 ARDS 中动脉血氧分压的变化

### 2.2 肺湿/干重比

油酸组肺湿/干重比 1 h 最高, 说明油酸注射后 1 h 肺水肿最严重, 以后逐渐减低, 但各油酸组肺湿/干重比与对照组相比均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

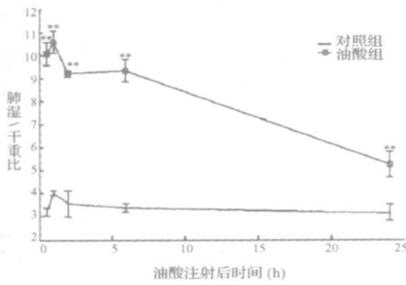


图 2 油酸性 ARDS 中肺湿/干重比的变化

### 2.3 病理学改变

2.3.1 光镜下观察, 对照组血管周围无明显炎性细胞浸润, 管壁无明显增厚。肺泡结构完整, 肺泡腔内可见少量巨噬细胞, 个别标本镜下偶尔可见到小片肺泡间隔轻度炎性细胞浸润增厚。OA 组有大量炎细胞浸润、肺泡间隔增宽、肺泡腔内大量粉红色水肿液和炎细胞、红细胞, 肺泡结构遭到破坏。OA 注射后 30 min 即出现上述病理表现, 24 h 肺组织损伤最严重, 出现大片坏死组织, 肺泡腔内充满水肿液, 出血增加, 大量炎细胞浸润, 肺泡巨噬细胞反应性增生。

2.3.2 病理学评分, 根据评分标准<sup>4</sup>, 与对照组相比, 模型组病理评分均显著增加 ( $P < 0.01$ ); 模型组油酸注射后 30 min 即出现升高, 2 h 降至最低, 仍高于对照组, 24 h 评分达到最高值。提示油酸作用后即出现病理损伤, 24 h 肺组织损伤最为严重。见图 3。

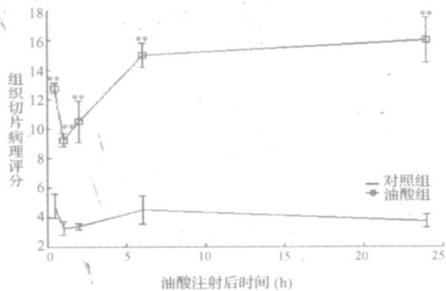


图 3 油酸性 ARDS 中病理学评分的变化

### 2.4 自由基产生和清除的酶

2.4.1 肺组织黄嘌呤氧化酶活性, 油酸组大鼠肺组织黄嘌呤氧化酶活性在 1 h 达到最高, 随后逐渐降低, 但各模型组与对照组相比具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。提示 XO 参与 ARDS 早期 ROS 的产生。见图 4。

2.4.2 肺组织髓过氧化物酶活性, 油酸组大鼠肺组织髓过氧化物酶活性逐渐升高, 24 h 达到最高, 模型组时间点与对照组相比具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。由于 MPO 是中性粒细胞激活和聚集的标志, 提示油酸注射后 24 h, 肺组织内中性粒细胞聚集和激活最多。见图 5。

2.4.3 肺组织谷胱甘肽过氧化物酶活性, 各时间点

油酸组肺组织谷胱甘肽过氧化物酶活性均有所增加, 但只有 2 h 与对照组有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 其余各模型组与对照组相比无统计学意义, 见图 6。提示油酸性 ARDS 大鼠肺损伤模型中, 抗氧化酶活性一过性增强, 但其活性并没有随 ROS 的大量产生而增强。

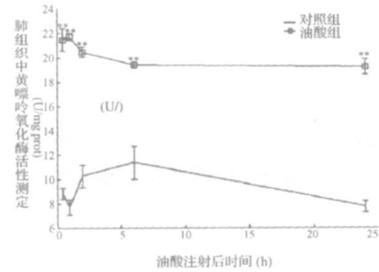


图 4 油酸性 ARDS 中肺组织黄嘌呤氧化酶活性的变化

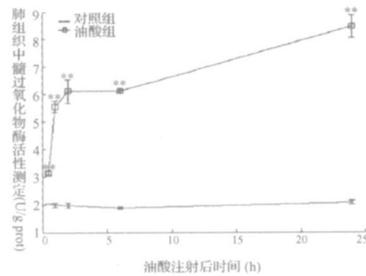
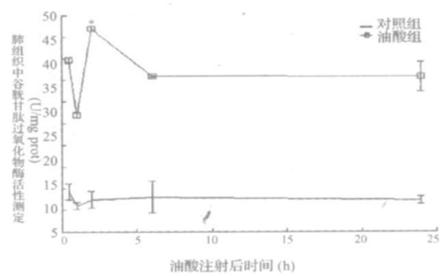


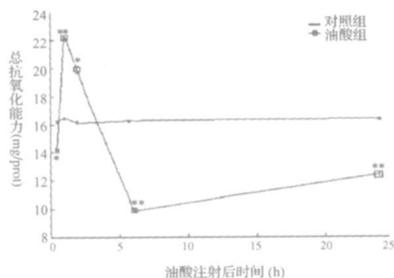
图 5 油酸性 ARDS 中肺组织髓过氧化物酶活性的变化



与对照组比较, \*  $P < 0.05$

图 6 油酸性 ARDS 中肺组织谷胱甘肽过氧化物酶活性的变化

2.4.4 肺组织总抗氧化能力, 各时间点油酸组肺组织的总抗氧化能力只有 2 h 升高, 其余各时间点均降低并与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。提示油酸性 ARDS 时, 机体的抗氧化能力一过性增高, 但随病程逐渐降低。见图 7。



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

图 7 油酸性 ARDS 中肺组织总抗氧化能力的变化

2.4.5 肺组织 NADPH 氧化酶重要成分 p47 蛋白表达, 肺组织 NADPH 氧化酶重要成分 p47 蛋白表达在油酸注射后 30 min 开始升高, 1 h 出现高峰, 随后逐渐降低, 在 6 h 再次升高, 24 h 略减少, 各时间点与对照组差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 8, 9。提示 NADPH 氧化酶可能是油酸性 ARDS 自由基主要来源之一。

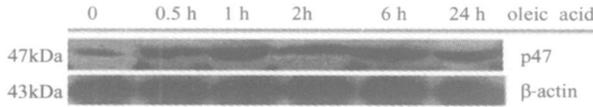
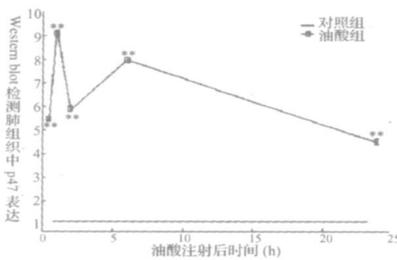


图 8 Western blot 检测油酸性 ARDS 肺组织中 p47 蛋白表达



与对照组比较,  $** P < 0.01$ , 图 11 同。

图 9 油酸性 ARDS 中肺组织中 p47 蛋白表达的变化

2.4.6 ESR 检测肺组织自由基含量变化, 图 10 中峰高代表肺组织自由基含量。图 10 和图 11 显示, 对照组肺组织自由基含量几乎检测不到, 油酸组肺组织氧自由基含量分别在 1 h 和 6 h 具有两个高峰, 各模型组与对照组相比均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

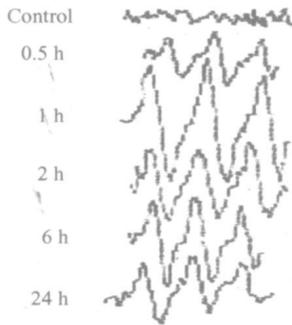


图 10 ESR 检测肺组织自由基含量变化

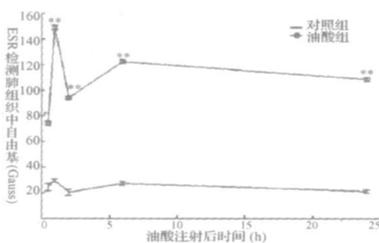


图 11 油酸性 ARDS 中肺组织自由基含量的变化

2.5 正交分析 PFD 对 NADPH 氧化酶组分 p47phox、MPO、XO、GSH-Px 活性和 TAC 作用的最佳时间

表 2 和表 3 显示 PFD 对上述指标的最佳作用时间顺序为 PFD 在油酸注射后 0.5 h 降低肺组织 MPO 活性, NADPH 氧化酶组分 p47 表达最少, 在 2 h TAC 和 GSH-Px 活性增加最明显, 6 h 肺组织 XO 活性降低最明显。

表 2 吡菲尼酮最佳实验条件的正交分析

level	A	B	GSH-Px	TAC	p47	MPO	XO
1	0	1	44.64	14.16	5.46	3.15	21.44
2	0	2	31.9	22.26	9.21	5.55	21.69
3	0	3	51.89	19.44	5.82	6.10	20.45
4	0	4	40.84	9.83	7.96	6.12	19.37
5	1	1	82.77	21.38	4.45	1.66	17.67
6	1	2	185.40	27.05	6.63	2.96	18.45
7	1	3	193.94	26.83	4.95	2.45	16.63
8	1	4	124.34	30.94	2.96	2.41	16.54
9	2	1	92.55	55.60	1.52	1.65	12.66
10	2	2	301.41	36.27	4.45	2.69	13.85
11	2	3	368.08	37.72	1.27	2.22	12.22
12	2	4	202.21	48.16	1.10	2.02	12.03
13	3	1	62.09	24.55	5.16	1.88	19.23
14	3	2	77.89	29.16	7.97	3.48	19.45
15	3	3	103.25	23.58	4.65	2.72	18.92
16	3	4	104.25	25.27	7.32	3.27	18.34

表 3 正交分析的变异

TAC	I j	65.66	115.69	A2:B3
	II j	106.1951	114.74	
	III j	177.75	107.57	
	IV j	102.56	114.20	
	Rj	112.09	8.12	
GSH-Px	I j	282.05	168.46	A2:B3
	II j	596.60	586.45	
	III j	717.16	964.25	
	IV j	471.64	347.48	
	Rj	314.55	795.79	
MPO	I j	20.92	8.34	A2:B1
	II j	9.48	14.68	
	III j	8.58	13.49	
	IV j	11.35	19.94	
	Rj	12.34	11.60	
XO	I j	82.95	71.00	A2:B4
	II j	69.29	73.44	
	III j	50.76	68.22	
	IV j	75.94	66.28	
	Rj	32.19	7.16	
p47	I j	28.46	16.09	A2:B1
	II j	19.00	28.27	
	III j	8.34	17.22	
	IV j	25.11	19.35	
	Rj	20.12	12.18	

注: I j, II j, III j, IV j 分别代表 16 个实验均数的总和; Rj 代表最大数和最小数值的变异; 最佳实验条件用 A:B 表示。

### 3 讨论

正常情况下, XO 是以黄嘌呤还原酶 (xanthine dehydrogenase, XDH) 形式存在。当 XDH 向 XO 转化时, 分子氧作为电子受体产生超氧阴离子, 超氧阴离子参与其他引起 ARDS 的自由基 (过氧化氢、羟自由基等) 的产生<sup>[9]</sup>, XDH/XO 定位在内皮细胞内和内皮细胞膜糖蛋白的糖链上<sup>[7]</sup>, 来自肺血管内皮细胞的黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统所产生的自由基被认为在肺损伤中起主要作用<sup>[8]</sup>。NADPH 氧化酶是一种广泛存在于吞噬细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞、纤维母细胞的过氧化酶, 其主要结构包括: 结合于膜上的细胞色素 b558 (包括 gp91phox 和 p22phox 两个亚单位) 和存在于胞浆内的水溶性蛋白 (含 p67phox、p47phox、p40phox 和 Rac1/Rac2 等亚单位)。当细胞受到外界刺激后, 胞浆内的 p47phox 磷酸化并与 p67phox 和 Rac1/Rac2 一起移位到质膜, 与细胞色素 b558 结合, 参与 NADPH 氧化酶的活化<sup>[9]</sup>。p47phox 在 NADPH oxidase 形成有功能全酶产生自由基的过程中起关键作用<sup>[10]</sup>。活化后的 NADPH 氧化酶产生超氧阴离子, 后者在超氧化物歧化酶催化下生成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。超氧阴离子和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 都具有较强的氧化性, 被称为活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 参与机体防御、炎症反应及细胞间信号传递等过程<sup>[11]</sup>。吞噬细胞和非吞噬细胞的 NADPH 氧化酶在定位和酶特性上有一定差异。大多数研究认为, NADPH 氧化酶在吞噬细胞跨膜存在, 而在非吞噬细胞则存在于细胞内。内皮源性的 NADPH 氧化酶在没有刺激时也有持续的低水平活性, 而它产生的 ROS 不会达到有高爆发活性的吞噬细胞所产生的 ROS 的水平<sup>[12-13]</sup>。吞噬细胞, 尤其中性粒细胞的 NADPH 氧化酶是机体 ROS 的主要来源<sup>[14]</sup>。本研究检测结果显示 XO 活性和 NADPH 氧化酶组分 (p47 蛋白) 表达高峰均与肺组织 ROS 含量的两个时间高峰相一致, 结合吡菲尼酮作用后正交分析结果显示油酸注射后 0.5 h NADPH 氧化酶活性明显减弱, 而黄嘌呤氧化酶活性在油酸注射后 6 h 降低最明显。中性粒细胞嗜天青颗粒中的髓过氧化物酶亦参与 ROS 生成, 可以与过氧化氢反应生成次氯酸, 具有很强的毒性损伤作用<sup>[15]</sup>。虽然吡菲尼酮作用后 MPO 活性降低也在油酸注射后 0.5 h 最明显, 但本实验结果显示油酸性 ARDS 大鼠肺损伤模型中, 肺组织 MPO 在油酸注射后 24 h 达到高峰。提示 NADPH 氧化酶可能是油酸性 ARDS 大鼠肺损伤模型肺组织 ROS 的主要来源。

生理情况下, 肺内有很多抗氧化物质如超氧化物

歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶等及时清除机体内产生 ROS, 保护肺组织免受 ROS 损伤<sup>[3]</sup>。本研究实验结果显示, 肺组织 GSH-Px 活性和 TAC<sup>[14]</sup> 仅在油酸注射后 2 h 有所升高, 吡菲尼酮药物作用后的正交分析结果与此相一致, 提示油酸性 ARDS 时, 机体可能因氧化应激一过性增强抗氧化能力, 但大鼠肺组织的抗氧化能力不能完全清除 ROS, 加之各种氧化酶产生的过量 ROS, 共同作用破坏体内的抗氧化系统的清除能力, 使肺组织中的 GSH-Px 活性和总 TAC 降低。

油酸性 ARDS 大鼠的病理学评分和肺湿/干重比在油酸注射后 1 h 达到高峰, 提示此时肺组织损伤及肺水肿程度最重, 动脉血气分析结果显示, 动脉血氧分压在油酸注射后 2 h 降至最低, 结合我们以前研究结果<sup>[16]</sup> PFD 在 0.5 h 减少 ROS 效果最佳, 1 h 对病理评分改善最佳, 2 h 肺水肿减轻最明显, 6 h 血氧分压升高最明显, 推测过量的 ROS 大量生成乃是最重要的 ARDS 的源头事件, 其对血管内膜系统的直接损伤, 导致了微血管血栓形成及毛细血管膜-肺泡通透性增加<sup>[17-19]</sup>, 肺水肿形成, 从而严重影响肺的通气换气功能, 使血氧分压减低, 引起严重低氧血症。

综上所述, NADPH 氧化酶激活而产生的大量 ROS, 乃 ARDS 发生发展的基础, 其可直接启动肺血管内皮损伤, 造成肺内微血栓形成、肺内分流、肺泡毛细血管膜通透性增加、肺水肿, 导致难以纠正的低氧血症, 进一步加重上述损伤过程, 形成恶性循环。

#### 参考文献:

- [1] Bernard G R, Artigas A, Brigham K L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, 149: 818-824.
- [2] Liu Heliang, Zhao Jinyuan. Superoxide anion, the main species of ROS in the development of ARDS induced by oleic acid [J]. *Free Radical Research*, 2004, 38 (12): 1281-1287.
- [3] Yang C, Moriuchi H, Takase J, et al. Oxidative stress in early stage of acute lung injury induced with oleic acid in guinea pigs [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26 (4): 424-428.
- [4] Su X, Bai C, Hong Q, et al. Effect of continuous hemofiltration on hemodynamics, lung inflammation and pulmonary edema in a canine model of acute lung injury [J]. *Intensive Care Med*, 2003, 29 (11): 2034-2042.
- [5] Wang S H, Liu Min, Chi Mugen, et al. Production of human liver prolidase by *saccharomyces cerevisiae* as host cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25 (6): 794-800.
- [6] Parks D A, Granger D N. Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution and physiology [J]. *Acta Physiol Scand Suppl*, 1986, 548: 87-99.
- [7] Nordback I H, Cameron J L. The mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in acute pancreatitis in the canine isolated pancreas preparation [J]. *Surgery*, 1991, 113: 90-97. (下转第 78 页)

PI 均比溶剂对照组低, 当 TCE 浓度大于 0.50 mmol/L 时, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); Vit E 保护组可

见细胞 PI 指数较 TCE 处理组高, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 TCE 染毒组及 Vit E 保护组体外培养人 KC 周期动力学检测结果 ( $n = 4 \bar{x} \pm s$ )

组别	TCE 作用组				150 $\mu$ mol/L Vit E 保护组				%
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	PI	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	PI	
空白对照组	95.07±1.15	0.97±0.26	3.96±1.51	4.93±0.89	95.07±1.15	0.97±0.26	3.96±1.51	4.93±0.89	
溶剂对照组	95.26±1.94	0.93±0.66	3.81±0.73	4.74±0.63	95.26±1.94	0.93±0.66	3.81±0.73	4.74±0.63	
TCE 0.125 mmol/L 组	97.60±0.75	0.58±0.31	2.71±0.77	3.26±0.81	95.32±1.53	0.92±0.57	3.76±0.86	4.68±0.60 $\Delta$	
TCE 0.50 mmol/L 组	97.45±0.54	0.53±0.30	1.95±0.46	2.48±0.78*	95.51±1.95	0.87±0.31	3.62±0.67	4.49±0.72 $\Delta$	
TCE 2.0 mmol/L 组	97.93±0.85	0.22±0.17	1.85±0.76	2.07±0.88*	95.48±1.64	0.91±0.49	3.61±0.62	4.52±0.58 $\Delta$	
阳性对照组	98.32±1.20	0.32±0.28	1.36±1.01	1.68±0.85*	98.32±1.20	0.32±0.28	1.36±1.01	1.68±0.85 $\Delta$	

与溶剂对照组比较 \* $P < 0.05$  与 TCE 作用组比较,  $\Delta P < 0.05$

### 3 讨论

KC 是机体防护外源性化学物质损伤的第一道防线, 正常情况下 KC 处于增殖与凋亡的平衡状态。当外源化学物引起 KC 氧化应激并超出其承受能力时, 可引起细胞多种成分不可逆的氧化损伤, 导致细胞死亡或细胞凋亡<sup>[7]</sup>, 增殖与凋亡平衡被打破, 出现多种皮肤损伤。

TCE 作为常用的工业有机溶剂对人体具有毒性作用, 国内外研究表明其对肝、肾、皮肤等组织均具有氧化损伤作用<sup>[8,9]</sup>。本课题组在前期实验中已经发现 TCE 对体外培养人 KC 具有氧化损伤作用<sup>[3]</sup>。本次研究进一步利用 TCE 对体外培养人皮肤 KC 作用, 通过透射电子显微镜形态学观察和流式细胞仪定量检测, 发现 TCE 对 KC 具有凋亡诱导作用, 细胞周期动力学分析显示 TCE 可以抑制 KC 增殖; 而抗氧化物质 Vit E 的使用可对 TCE 诱导的细胞凋亡起到有效的保护作用, 也反证了 TCE 诱导的 KC 凋亡水平上升可能与其导致细胞氧化应激负荷升高、损伤线粒体、启动线粒体介导的凋亡途径有关。

#### 参考文献:

[1] Nakajima T, Yamanoishi O, Kamijima M, et al. Generalized skin reac-

tions in relation to trichloroethylene exposure; a review from the viewpoint of drug-metabolizing enzymes [J]. J Occup Health, 2003, 45: 8-14.

[2] 夏丽华, 黄汉林, 邱守仁, 等. 三氯乙烯所致药疹性皮炎 50 例临床分析 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004, 22: 207-209.

[3] 丁锐, 沈彤, 朱启星. 三氯乙烯和四氯乙烯对体外培养人皮肤角质形成细胞脂质过氧化物的影响 [J]. 中国工业医学杂志, 2006, 19 (3): 129-131.

[4] 鄂征. 组织培养和分子细胞技术 [M]. 北京: 北京出版社, 1995: 56.

[5] 丁锐, 沈彤, 涂登云, 等. 人皮肤角质形成细胞的胰蛋白酶消化分离及无血清培养 [J]. 安徽医科大学学报, 2003, 38 (6): 415-418.

[6] Yokoyama S, Nakano H, Yamazaki T, et al. Enhancement of ultraviolet-induced apoptosis by NF- $\kappa$ B decoy oligonucleotides [J]. British Journal of dermatology, 2005, 153 (Suppl 2): 47-51.

[7] Sandeep R, Brian H R. Mitochondria, Oxygen free radicals, and apoptosis [J]. American Journal of Medical Genetics, 2001, 106: 62-70.

[8] Tomason M, Clark J, Dankovic D, et al. Oxidative Vit E stress and DNA damage in Fisher rats following acute exposure to trichloroethylene or perchloroethylene [J]. Toxicology, 1999, 138: 43-53.

[9] 戴宇飞, 李海山, 孙耀峰, 等. 代谢活化在三氯乙烯对小鼠致敏及肝毒性中的作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2005, 19 (5): 378-382.

(上接 71 页)

[8] Quinlan G J, Lamb N J, Tilley R, et al. Plasma hypoxanthine levels in ARDS: implications for oxidative stress, morbidity, and mortality [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155: 479-484.

[9] Segal A W, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes [J]. Trends Biochem Sci, 1993, 18: 43-47.

[10] Babior B M, Lambeth J D, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase [J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 379: 342-344.

[11] Fan jie, Frey Randalls, Malik Asrar B. TLR4 signaling induced TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase [J]. Clin Invest, 2003, 112 (8): 1234-1243.

[12] Tampo Y, Tsukamoto M, Yonaha M. Superoxide production from paraquat evoked by exogenous NADPH in pulmonary endothelial cells [J]. Free Radic Biol Med, 1999, 27 (5-6): 588-595.

[13] Zalba G, Jose G S, Moren M U, et al. Oxidative stress in arterial hypertension. Role of NADPH oxidase [J]. Hypertension, 2001, 38:

1395-1399.

[14] Sanders K A, Huecksteadt T, Xu P, et al. Regulation of oxidant production in acute lung injury [J]. Chest, 1999, 116: 56-61S.

[15] Jemigan T W, Croce M A, Fabian T C. Apoptosis and necrosis in the development of acute lung injury after hemorrhagic shock [J]. Am Surg, 2004, 70 (12): 1094-1098.

[16] Mei S, Yao Y, Zhu Y J, et al. Protection of Pifenidone against an early phase of oleic acid induced acute lung injury in rats [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 313 (1): 379-388.

[17] 陈莉, 赵金垣. 油酸型急性呼吸窘迫综合征肺血液流变学变化及其意义探讨 [J]. 中国工业医学杂志, 2000, 13 (3): 129-131.

[18] 陈莉, 赵金垣. 急性呼吸窘迫综合征纤维蛋白原水平的变化及其意义初探 [J]. 中华内科杂志, 2000, 39 (6): 474-475.

[19] 刘和亮, 赵金垣. 化学性急性肺损伤时肺内皮细胞及血液流变学的实验研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2003, 21 (1): 37-40.