

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.19.003

## 硫化氢对急性百草枯中毒大鼠肺过氧化损伤的影响\*

陈文龙<sup>1</sup>,舒 维<sup>2</sup>,汤旭惠<sup>1</sup>,肖翔宇<sup>1</sup>,傅 强<sup>1</sup>,陈宁南<sup>1</sup>,陈运和<sup>1</sup>

(1. 江西省人民医院急诊科,南昌 330006,2. 江西省胸科医院呼吸科,南昌 330006)

**[摘要]** **目的** 探讨硫化氢(H<sub>2</sub>S)对大鼠急性百草枯(PQ)中毒肺过氧化损伤的影响。**方法** 30只SD大鼠分成对照组、模型组、治疗组。模型组、治疗组采用PQ(80 mg/kg)灌胃染毒,模型组染毒后腹腔注射生理盐水,治疗组染毒后,腹腔注射NaHS(1.4 μmol/kg),2次/d;对照组采用生理盐水灌胃,灌胃后腹腔注射生理盐水。72 h后,观察肺组织病理改变;计算肺湿/干质量比值(W/D);测定肺组织匀浆内丙二醛(MDA)水平、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力。**结果** 模型组肺组织损伤明显,治疗组较模型组减轻;模型组肺W/D较对照组增高( $P<0.05$ ),治疗组较模型组降低( $P<0.05$ );模型组MDA高于对照组( $P<0.05$ ),SOD、GSH-Px低于对照组( $P<0.05$ );治疗组中MDA较模型组降低( $P<0.05$ ),SOD、GSH-Px较模型组升高( $P<0.05$ )。**结论** H<sub>2</sub>S对急性PQ中毒大鼠肺过氧化损伤具有一定的保护作用。

**[关键词]** 硫化氢;百草枯;中毒;过氧化损伤**[中图法分类号]** R595.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)19-2534-03

## Effects of hydrogen sulfide on lung peroxidative damage in rats with acute paraquat poisoning\*

CHEN Wenlong<sup>1</sup>,SHU Wei<sup>2</sup>,TANG Xuhui<sup>1</sup>,XIAO Xiangyu<sup>1</sup>,FU Qiang<sup>1</sup>,CHEN Ningnan<sup>1</sup>,CHEN Yunhe<sup>1</sup>

(1. Department of Emergency, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China;

2. Department of Respiration, Jiangxi Provincial Chest Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on the lung peroxidative damage in rats with acute paraquat (PQ) poisoning. **Methods** Thirty SD rats were divided into the control group, model group and treatment group. The model group and treatment group adopted PQ(80 mg/kg) gavage for poisoning contamination. The model group were intraperitoneally injected with normal saline after contamination. The treatment group was intraperitoneally injected by NaHS(1.4 μmol/kg), two times a day. The control group adopted the normal saline gavage and intraperitoneally injected by normal saline after gavage. After 72 h, the pathological changes of lung tissue were observed. The lung wet/dry weight ratio (W/D) was calculated. The malondialdehyde (MDA) level in lung homogenate was detected, and the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured. **Results** The lung tissue injury in the model group was obvious, the treatment group was slighter than the model group; The lung W/D in the model group was significantly increased compared with the control group ( $P<0.05$ ), and the treatment group was decreased compared with the model group ( $P<0.05$ ); the MDA level in the model group was higher than that in the control group ( $P<0.05$ ), while the levels of SOD and GSH-Px were lower than those in the control group ( $P<0.05$ ); the MDA level in the treatment group was decreased compared with the model group ( $P<0.05$ ), while the levels of SOD and GSH-Px were increased compared with the model group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** H<sub>2</sub>S has a certain protective effect on the lung peroxidative damage in rats with acute PQ poisoning.

**[Key words]** hydrogen sulfide; paraquat; poisoning; peroxidation injury

百草枯(paraquat, PQ)是一种非选择型除草剂,因其除草效率高,被广泛应用。PQ对人和动物均有强毒性,主要通过口服途径引起急性中毒,中毒致死率非常高<sup>[1]</sup>,是目前国内中毒致死率最高的农药。

PQ进入体内吸收后,在肺内聚集,较大剂量可短时间引起急性肺损伤,多脏器功能障碍,晚期导致肺纤维化,呼吸衰竭<sup>[2]</sup>。研究认为,过氧化损伤为PQ中毒造成机体损伤的重要环节。目前PQ中毒治疗仍处在探

\* 基金项目:江西省卫生和计划生育委员会委科技计划(20155006)。 作者简介:陈文龙(1979—),主治医师,硕士,主要从事急诊重症研究。

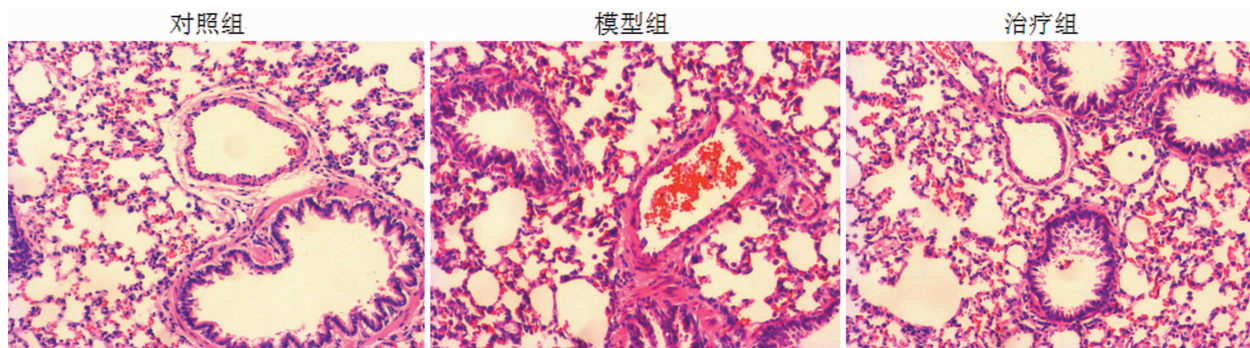


图 1 肺组织病理图(HE×200)

索期,尚未发现特效解毒剂,也无有效的排毒剂。长期以来,硫化氢( $H_2S$ )被认为是一种有毒气体,但近年被证实是一种新的气体信号分子<sup>[3]</sup>。国内外的许多研究已经证实,内源性  $H_2S$  参与机体多种生理和病理过程, $H_2S$  具有舒张血管、清除氧自由基、抑制炎症因子,改善再灌注损伤,抑制肺纤维化等作用。本实验以 NaHS 作为  $H_2S$  供体干预 PQ 中毒大鼠,探讨  $H_2S$  对 PQ 中毒大鼠肺过氧化损伤的影响,为改善 PQ 中毒的治疗效果提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 动物及分组** 选择 30 只健康雄性 SD 大鼠,普通级,体质量( $350 \pm 50$ )g,由南昌大学医学院动物实验部提供。随机分为对照组、模型组、治疗组,每组 10 只。

**1.2 材料** 质量浓度为 20% PQ 浓缩液购自上海先正达有限公司,NaHS 注射液购自 Sigma-Aldrich 公司,丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

### 1.3 方法

**1.3.1 造模方法** 模型组:采用 PQ(80 mg/kg)一次性灌胃,复制急性 PQ 中毒模型<sup>[4]</sup>;同时腹腔注射生理盐水(6 mL/kg),2 次/d,连续 3 d。治疗组:采用 PQ(80 mg/kg)一次性灌胃染毒法染毒后,腹腔注射 NaHS( $1.4 \mu\text{mol/kg}$ ),2 次/d<sup>[5]</sup>。对照组:采用等量生理盐水灌胃后,腹腔注射生理盐水(6 mL/kg),2 次/d。

**1.3.2 观察指标** 72 h 后采用 10%水合氯醛(4.5 mL/kg)腹腔注射麻醉,然后取出肺脏组织,观察大体情况;分离大鼠肺组织,取大鼠右肺中叶用 4 °C 生理盐水冲洗,用滤纸将水吸干,称湿质量(W),然后将肺组织置于 80 °C 烘干 48 h,称干质量(D),计算肺 W/D。取大鼠右肺后叶打浆、离心,硫代巴比妥酸(TBA)法测定肺组织匀浆内 MDA 水平,黄嘌呤氧化酶(羟胺)法测定肺组织匀浆内 SOD 活力,酶促谷胱甘肽反应法测定肺组织匀浆内 GSH-Px 活力。取左侧肺组织 10%甲醛固定、石蜡包埋、切片、HE 染色,在光学显微镜下观察肺组织病理变化。

**1.4 统计学处理** 采用统计软件 SPSS19.0 进行分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,多样本均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较应用 SNK-*q* 检验,方差不齐选用 Dunnett's *T3* 检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肺脏的大体情况** 对照组大鼠双肺呈均匀粉色、无充血水肿、未见出血点、光滑,触之柔软;模型组大鼠双肺明显充血水肿、呈不均一暗红色、表面见出血点、片状出血灶、触之粗糙;治疗组双肺表面呈现充血肿胀、可见少量出血点。

**2.2 肺组织病理结果** 对照组肺组织形态结构正常;模型组肺泡水肿充血、肺泡间质增厚、肺泡间隙大量炎症细胞浸润和聚集、毛细血管扩张、充血;治疗组肺组织损伤较模型组减轻,见图 1。

**2.3 肺组织 W/D 比值** 与对照组大鼠肺组织 W/D( $3.06 \pm 0.40$ )比较,模型组( $6.68 \pm 0.78$ )明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,治疗组肺组织 W/D( $5.41 \pm 0.68$ )降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.4 肺组织匀浆内 MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活力** 模型组中 MDA 水平明显高于对照组,SOD、GSH-Px 活力明显低于对照组( $P < 0.05$ );治疗组 MDA 水平较模型组明显降低,SOD、GSH-Px 活力较模型组明显升高( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 大鼠肺组织匀浆 MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活力变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)	GSH-Px(U/mg)
对照组	10	$6.34 \pm 0.36$	$24.77 \pm 1.29$	$40.74 \pm 4.40$
模型组	10	$8.02 \pm 0.56^a$	$18.40 \pm 1.32^a$	$21.11 \pm 3.13^a$
治疗组	10	$7.34 \pm 0.43^b$	$20.47 \pm 1.93^b$	$32.69 \pm 3.55^b$

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与模型组比较

## 3 讨论

PQ 经皮肤、胃肠道及呼吸道等吸收后,分布于肺脏、肝脏、肾脏、骨骼肌等脏器组织中,在肺组织的浓度最高。PQ 在肺组织内的聚集作用,依赖于肺泡 II 型细胞、肺泡 I 型细胞及气管 Clara 细胞的细胞膜上胺类摄取系统,PQ 通过与胺类物质竞争而被主动摄

入,在肺组织内聚集<sup>[6]</sup>。PQ 进入机体组织后,经还原型辅酶 II 还原作用生成氧自由基(PQ<sup>+</sup>),然后与氧分子(O<sub>2</sub>)形成二联吡啶阳离子及超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)。O<sub>2</sub><sup>-</sup>在 SOD 作用下歧化形成过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>经 Fe<sup>2+</sup>作用产生毒性更强的氧自由基,导致细胞膜脂质过氧化反应,引起细胞膜结构、功能破坏<sup>[7]</sup>。过氧化反应还能促进中性粒细胞的炎性浸润、影响细胞凋亡<sup>[8]</sup>。MDA 是氧化应激的重要代谢产物,其组织浓度体现了组织细胞过氧化损伤的严重程度<sup>[9]</sup>。SOD 是机体内重要的抗氧化酶,它能清除体内多种有毒性作用的氧自由基,消除氧自由基对细胞膜生物功能蛋白及 DNA 的破坏,具有抗氧化、抗毒性作用,维持内环境的稳定。本实验也证实,PQ 中毒后,肺组织出现过氧化损伤,MDA 水平显著升高,SOD、GSH-Px 活力显著降低。研究发现,应用抗氧化剂治疗百草枯中毒,可以阻断炎性细胞与自由基之间的恶性循环,降低组织中 MDA 的水平,减轻肺组织的过氧化损伤,改善肺泡功能,抑制肺纤维化<sup>[10-11]</sup>。

H<sub>2</sub>S 是继 NO、CO 之后被发现的第 3 种重要的内源性气体信号介质,广泛参与机体多系统病理生理功能调节,能够影响炎症因子、血管增生、细胞凋亡,对脏器的缺血/再灌注损伤具有保护作用。大量研究发现,H<sub>2</sub>S 具有抑制氧自由基,抗氧化损伤作用。H<sub>2</sub>S 通过直接清除氧自由基、抑制氧自由基的生成、促进机体抗氧化作用等调节氧化应激<sup>[12]</sup>。何艳晶等<sup>[13]</sup>应用外源性 H<sub>2</sub>S 干预大鼠慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型,发现 H<sub>2</sub>S 在 COPD 大鼠中有抗氧化作用。王勇等<sup>[14]</sup>实验发现,外源性 H<sub>2</sub>S 通过抑制氧自由基对脂多糖致大鼠急性肺损伤发挥保护作用。本实验采用 NaHS 溶液作为外源性 H<sub>2</sub>S 供体简单易行。H<sub>2</sub>S 在体内以未分解的 H<sub>2</sub>S、HS<sup>-</sup>和 H<sup>+</sup>的形式存在,维持动态平衡。NaHS 溶液同样以 H<sub>2</sub>S、HS<sup>-</sup>、H<sup>+</sup>和 Na<sup>+</sup>的方式存在,与饱和 H<sub>2</sub>S 溶液比较,NaHS 溶液定量更准确。

本研究结果显示,模型组与对照组大鼠比较,肺组织匀浆 MDA 水平明显升高,SOD、GSH-Px 活力降低,肺组织 W/D 明显增高,肺肉眼观察充血、水肿、出血明显,光镜下肺组织明显损伤,符合 PQ 中毒急性肺损伤表现,证实采用 PQ(80 mg/kg)灌胃染毒能成功复制急性 PQ 中毒大鼠肺过氧化损伤模型。治疗组大鼠与模型组比较,MDA 水平降低,SOD、GSH-Px 活力升高,双肺充血、水肿、出血减轻,光镜下肺组织损伤明显减轻。据以上结果分析,H<sub>2</sub>S 能够抑制急性 PQ 中毒大鼠肺过氧化损伤,对急性肺损伤具有一定的保护作用。但是因观察的时间有限,还需更长时间对肺纤维化的影响、脏器功能影响、中毒预后,以及不同浓度 H<sub>2</sub>S 的作用比较进行观察。

## 参考文献

- [1] KERVEGANT M, MERIGOT L, GLAIZAL M, et al. Paraquat poisonings in France during the European ban: experience of the Poison Control Center in Marseille[J]. *J Med Toxicol*, 2013, 9(2): 144-147.
- [2] WU W P, LAI M N, LIN C H, et al. Addition of immunosuppressive treatment to hemoperfusion is associated with improved survival after paraquat poisoning: a nationwide study[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87568.
- [3] LOWICKA E, BELTOWSKI J. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)-the third gas of interest for pharmacologists[J]. *Pharmacol Rep*, 2007, 59(1): 4-24.
- [4] 磨静佳, 赵晓琴, 邝晓聪. 百草枯致急性肺损伤大鼠模型的建立[J]. *蛇志*, 2009, 21(2): 101-102.
- [5] 李虹, 刘新民, 耿彬, 等. 新型气体信号分子硫化氢在大鼠肺纤维化发病中的作用[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2006, 38(2): 140-145.
- [6] CHEN J G, ELDRIDGE D L, LODESERTO F J, et al. Paraquat ingestion: a challenging diagnosis[J]. *Pediatrics*, 2010, 125(6): e1505-1509.
- [7] GAWARAMMANA I B, BUCKLEY N A. Medical management of paraquat ingestion[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2011, 72(5): 745-757.
- [8] ESREFOGLU M. Oxidative stress and benefits of antioxidant agents in acute and chronic hepatitis[J]. *Hepat Mon*, 2012, 12(3): 160-167.
- [9] LIU S, LIU K, SUN Q, et al. Consumption of hydrogen water reduces paraquat-induced acute lung injury in rats[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011: 305086.
- [10] HE X, WANG L, SZKLARZ G, et al. Resveratrol inhibits paraquat-induced oxidative stress and fibrogenic response by activating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 342(1): 81-90.
- [11] ZHI Q, SUN H, QIAN X, et al. Edaravone, a novel antidote against lung injury and pulmonary fibrosis induced by paraquat? [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(1): 96-102.
- [12] KIMURA Y, KIMURA H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress[J]. *FASEB J*, 2004, 18(10): 1165-1167.
- [13] 何艳晶, 陈亚红, 齐永芬, 等. 内源性硫化氢调节慢性阻塞性肺疾病大鼠氧化/抗氧化平衡[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(6): 1169-1175.
- [14] 王勇, 王迅雷, 刘锐, 等. 硫化氢对脂多糖致急性肺损伤大鼠氧化应激的影响[J]. *国际呼吸杂志*, 2015, 35(19): 659-662.