还原型谷胱甘肽对四氧化二氮致小鼠肺损伤的防护作用

胡　杰[1],方　辉[1],李德远[1,*],乔　燕[2]
(1.军事经济学院军需系,湖北武汉 430035;
2.军事经济学院医院,湖北武汉 430035)

摘　要:目的:探讨还原型谷胱甘肽(GSH)对四氧化二氮(N_2O_4)吸入致小鼠肺损伤的防护作用。方法:动物模型采取在 120 L 静式染毒柜内吸入 N_2O_4 的方法制作。雄性 ICR 小鼠 64 只,随机分为对照组,染毒组,GSH 低、中、高剂量干预组(GSH 低、中、高剂量 + 染毒),共五组,对照组 8 只,其余每组 14 只。染毒前,干预组分别灌胃 GSH(1.25、2.50、3.75 g/kg bw·d),对照组和染毒组灌胃等体积生理盐水,连续 7 d,第 7 d 灌胃 1 h 后染毒。脱臼处死动物,检测肺组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量,观察肺病理改变。结果:与对照组比较,染毒组肺组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量均极显著降低($p < 0.01$);与染毒组比较,GSH 低、中剂量干预组肺组织 SOD 和 GSH-Px 活性均极显著提高($p < 0.01$),GSH 低剂量干预组 MDA 含量极显著提高($p < 0.01$),GSH 中剂量干预组 MDA 含量显著提高($p < 0.05$)。病理切片显示,GSH 干预组比染毒组肺损伤程度轻。结论:GSH 对 N_2O_4 吸入致小鼠肺损伤具有显著防护作用,其作用机制可能与其抑制氧化损伤有关。

关键词:还原型谷胱甘肽,四氧化二氮,肺损伤,防护作用

Protective effects of reduced glutathione on lung injury induced by N_2O_4 in mice

HU Jie[1], FANG Hui[1], LI De-yuan[1,*], QIAO Yan[2]

(1.Department of Quartermaster, Military Economic College, Wuhan 430035, China;
2.Hospital of Military Economic College, Wuhan 430035, China)

Abstract: Objective: To study the protective effects of reduced glutathione (GSH) on the lung injury induced by N_2O_4 inhalation in mice. Methods: The mice lung injury model was established through exposing 64 mice to N_2O_4 in a 120 L sealed cabinet. Sixty-four ICR male mice were randomly divided into five groups: the control group, the N_2O_4 group, the low, medium and high dose GSH-treated groups, 8 mice in control group, 14 mice in the other groups. 1.25, 2.50 and 3.75 g/kg bw·d GSH were ig administered to mice in GSH-treated groups respectively for 7 days before poisoning, equal volume of normal saline for control group and N_2O_4 group. The GSH-treated groups and the N_2O_4 group were exposed to N_2O_4 in the cabinet 1 hour after ig administration on 7 th day. The mice were killed by dislocation, and the activities of SOD and GSH-Px and the content of MDA in lung tissue were measured, and the pathology change of lung tissue was examined. Results: Compared with the control group, the SOD, GSH-Px activities and MDA content in lung tissue of N_2O_4 group were significantly decreased ($p < 0.01$). Compared with the N_2O_4 group, the SOD and GSH-Px activities in lung tissue of low and medium dose GSH-treated groups were significantly increased ($p < 0.01$), the MDA content in lung tissue of low dose GSH-treated groups was significantly increased ($p < 0.01$), the MDA content in lung tissue of medium dose GSH-treated groups was increased ($p < 0.05$). The pathology change of lung tissue showed that the injury in low dose GSH group was lighter than that in N_2O_4 group. Conclusion: GSH has remarkably protective effects against the lung injury induced by N_2O_4 inhalation in mice, and the mechanism may be related to its inhibitory effect against oxidative damage.

Key words: reduced glutathione (GSH); dinitrogen tetroxide (N_2O_4); lung injury; protective effects

中图分类号:TS201.4　　**文献标识码**:A　　**文 章 编 号**:1002-0306(2016)18-0359-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.18.060

收稿日期:2016-02-21

作者简介:胡杰(1981-),男,博士,讲师,研究方向:军用食品,E-mail:cangqionghj1981@163.com。

*通讯作者:李德远(1966-),男,博士,教授,研究方向:军用食品,E-mail:flycangqiong@sina.com。

四氧化二氮(N_2O_4)是我国大型运载火箭液体推进剂的主要组分,具有强氧化性、腐蚀性和易挥发等特点,通过呼吸道吸入中毒可导致肺损伤,在各类火箭发射任务中,以 N_2O_4 为主的氮氧化物吸入中毒事故偶有发生[1-2]。目前,N_2O_4 吸入致肺损伤的研究主要见于临床救治[3-4],而关于饮食防护的研究报道较少[5]。

谷胱甘肽是一种天然活性物质,存在于多种生物细胞中,以小麦胚芽、酵母和动物肝脏中含量较高[6]。谷胱甘肽以两种形式在体内存在,氧化型(GSSG)和还原型(GSH),还原型谷胱甘肽(GSH)约占95%,是谷胱甘肽的活性成分。GSH 参与体内氧化还原过程,它具有抗氧化、解毒和细胞保护等多种生理功能,在医疗、保健品和食品等行业应用广泛[7]。GSH 可作为一种生物活性添加剂,应用于抗肿瘤、增强免疫力和延缓衰老等保健食品中;还可作为营养强化剂,应用于乳幼儿和孕妇等的口服保健品中[8]。相关研究表明,GSH 对急性肺损伤(ALI)具有重要保护作用。Buchler[9] 证实,GSH 对次氯酸盐诱导的家兔 ALI 有明显缓解作用。殷娜等[10] 观察到,GSH 能有效对抗盐酸吸入致大鼠 ALI。但是关于 GSH 对 N_2O_4 中毒所致动物肺损伤的保护作用,还未见报道。研究表明,ALI 和肺组织氧化应激关系密切[11-12]。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)以及丙二醛(MDA),是反映体内过氧化损伤程度的常用指标。因此,本研究结合小鼠肺组织 SOD 和 GSH-Px 活性以及 MDA 含量的变化,探讨 GSH 对 N_2O_4 吸入致小鼠肺损伤的防护作用,为开发富含 GSH 的食品和保健品提供借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

雄性 ICR 小鼠、饲料　体质量为 21~24 g,清洁级,购自北京大学医学院实验动物中心,许可证号:SYXK(京)2006-0025;液态 N_2O_4　纯度 >99.5%,由航天科技集团公司第 101 所提供;GSH　食品级,西安瑞林生物科技有限公司;GSH-Px、SOD 以及 MDA 检测试剂盒　南京建成生物工程公司。

120 L 静式染毒柜　由军事医学科学院提供;防护面罩　天津恩泽科技有限公司;NO_2 浓度检测管　由总装备部军事医学研究所提供;UV-245 型分光光度计　日本岛津公司;3-16PK 型高速冷冻离心机　Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1　动物建模　借鉴刘松等的方法[13],采取在 120 L静式染毒柜内吸入 N_2O_4 的方式。柜内设有温度计和微型风扇,温度始终保持(25 ± 1) ℃。用微量注射器抽取液态 N_2O_4 50 μL,由侧面专用小孔注入柜内,开动风扇使 N_2O_4 充分挥发并均匀扩散,每隔 10 min 向柜内补充 2 μL N_2O_4,维持 N_2O_4 浓度。除对照组外,所有小鼠均在染毒柜内吸入染毒,时间 0.5 h。染毒后将小鼠取出,正常饲养。

1.2.2　实验分组　ICR 小鼠 64 只,适应性饲养 7 d,饲养环境恒温(23 ± 1) ℃,恒湿 52% ±3%,自由饮水和摄食。适应期后随机分为对照组,染毒组,GSH 低剂量 + 染毒组,GSH 中剂量 + 染毒组,GSH 高剂量 + 染毒组,共五组,对照组 8 只,其余每组 14 只。染毒前,GSH 三个剂量干预组分别灌胃给予 1.25、2.50、3.75 g/kg bw 的 GSH[10,14],每只 0.3 mL,每天 1 次,连续 7 d,对照组和染毒组灌胃等体积生理盐水,第 7 d 灌胃后 1 h,按照动物损伤模型染毒。染毒 12 h 后,每组取 8 只,脱臼处死,取肺组织,观察病理改变,并检测各项生化指标;染毒 84 h 后,观察染毒组和 GSH 干预组其余 6 只小鼠的肺病理改变。

1.2.3　指标测定　小鼠处死后,迅速取左肺组织,用冰生理盐水冲洗、称重,冰浴中匀浆,制备 10% 肺匀浆液。4 ℃条件下以 3000 r/min 离心 10 min,取上清液。分别采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性、二硫代二硝基苯甲酸法测定 GSH-Px 活性、硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量[15-16]。

1.2.4　病理观察　处死动物,立即摘除右肺组织,置 4% 多聚甲醛溶液中固定,进行常规切片和 HE 染色处理,光镜观察病理学变化。

1.3 统计学分析

用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,结果以 $\bar{x} \pm S$ 表示,各组均数比较采用单因素方差分析,$p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 小鼠肺组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量测定结果

如表 1 所示,染毒组小鼠肺组织 SOD 活性极显著低于对照组($p < 0.01$);与染毒组相比,GSH 低、中剂量干预组 SOD 活性均极显著升高($p < 0.01$),GSH 高剂量干预组 SOD 活性改变不明显。染毒组小鼠肺组织 GSH-Px 活性较对照组极显著下降($p < 0.01$),GSH 三个剂量干预组 GSH-Px 活性较染毒组均极显著提高($p < 0.01$)。染毒组小鼠肺组织 MDA 含量极显著低于对照组($p < 0.01$),GSH 低剂量干预组 MDA

表 1　小鼠肺组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1　The activities of SOD, GSH-Px and MDA content in lung tissue of mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	SOD 活性(U/mg pro)	GSH-Px 活性(U/mg pro)	MDA 含量(mmol/L)
对照组	56.84 ± 3.90	9.74 ± 1.39	16.47 ± 2.97
染毒组	42.95 ± 2.10**	4.17 ± 0.26**	5.99 ± 0.54**
GSH 低剂量干预组	55.97 ± 2.72ΔΔ	7.40 ± 0.95ΔΔ	11.03 ± 1.75ΔΔ
GSH 中剂量干预组	53.44 ± 1.80ΔΔ	6.71 ± 0.63ΔΔ	9.80 ± 1.57Δ
GSH 高剂量干预组	45.26 ± 2.02	6.52 ± 0.56ΔΔ	10.37 ± 1.53Δ

注:**:与对照组比较差异极显著,$p < 0.01$;Δ:与染毒组比较差异显著,$p < 0.05$;ΔΔ:与染毒组比较差异极显著,$p < 0.01$。

含量极显著高于染毒组($p<0.01$),GSH 中、高剂量干预组 MDA 含量均显著高于染毒组($p<0.05$)。

N_2O_4 是中等毒性物质,其沸点较低,常温下可挥发分解为 NO_2。研究发现,氮氧化物吸入中毒损伤的靶器官是肺脏,严重时可导致 ALI,表现为肺水肿,损伤程度取决于吸入剂量[1]。相关研究证实,肺组织氧化应激与 ALI 密切相关[11-12]。NO_2 本身为自由基,且具有高度活性,推测其导致 ALI 的作用机制与其直接参与对肺脏的氧化和过氧化损伤有关[13,17]。

SOD 和 GSH-Px 是机体内重要的抗氧化酶,可以保护机体免受自由基和过氧化损伤。MDA 是过氧化脂质的一种分解产物,其含量能反映机体过氧化损伤程度。一般情况下,氧化损伤可导致动物血液或组织中 SOD 和 GSH-Px 活性降低及 MDA 含量增加。本实验中,N_2O_4 染毒使小鼠肺组织 SOD、GSH-Px 活性均显著降低,同时,MDA 含量明显减少。表明 N_2O_4 染毒导致小鼠 ALI。宋蔚忠等[18]发现,NO_2 致大鼠肺损伤时,肺组织 SOD 和 GSH-Px 活性均明显降低,与本研究结果一致。Sagai 等[19]发现,NO_2 染毒后,大鼠肺组织 MDA 含量显著减少。宋蔚忠等[20]通过体外实验证实,NO_2 可使大鼠肺组织匀浆 MDA 含量显著下降,且随染毒剂量加大,下降更加显著。以上研究均与本实验结果一致。其原因可能是:吸入物 NO_2 在肺组织内最终转化为 NO_3^- 和 NO_2^-,NO_3^- 对肺组织匀浆 MDA 含量没有影响,而 NO_2^- 能使肺组织匀浆 MDA 含量减少[20]。

本实验中,与染毒组相比,中、低剂量 GSH 干预组小鼠肺组织 SOD、GSH-Px 活性均显著提高,表明 GSH 对 N_2O_4 吸入所致小鼠 ALI 具有保护作用。GSH 是生物体内重要的一种内源性抗氧化物,是肺泡上皮衬液中最重要的小分子类抗氧化物质[10],在多种原因引起的氧化应激所致肺损伤中,GSH 起重要保护作用[21]。张宏等[22]发现,GSH 可减轻内毒素致大鼠 ALI 症状,且越早应用 GSH 对肺脏保护作用越强。刘振威等[23]报道,GSH 可显著提高 ALI 大鼠肺组织 SOD 活性,缓解肺损伤。袁鼎山等[24]证实,GSH 可显著提升 ALI 大鼠肺组织 GSH 浓度,减轻氧化应激损伤。因此,GSH 对 N_2O_4 致小鼠 ALI 保护作用的机制与其可有效抑制氧化损伤有关。但是,本实验中,与染毒组相比,GSH 高剂量干预组小鼠肺组织 SOD 活性没有明显升高,其详细作用机制有待进一步研究。

2.2 小鼠肺组织病理观察

组织病理观察结果表明,对照组小鼠肺组织正常(图 1A);染毒组肺组织出现明显病变,可见部分出血灶,肺泡和肺间质水肿,大量炎性细胞浸润等典型 ALI 症状。染毒 12 h 后,染毒组肺组织肿胀、体积变大、部分淤血(图 1B);84 h 后,染毒组肺损伤更严重,显著出血,发白肿胀,有部分肺实变区出现(图 1C)。与染毒组相比,GSH 干预组肺组织病变均减轻,灶性出血、肺组织水肿、炎性细胞浸润等症状均得到缓解,而且随时间延长,肺损伤缓解效果更明显(图 1D、E)。低剂量 GSH(1.25 g/kg bw·d)对 N_2O_4 吸入致小鼠肺损伤的防护效果显著。

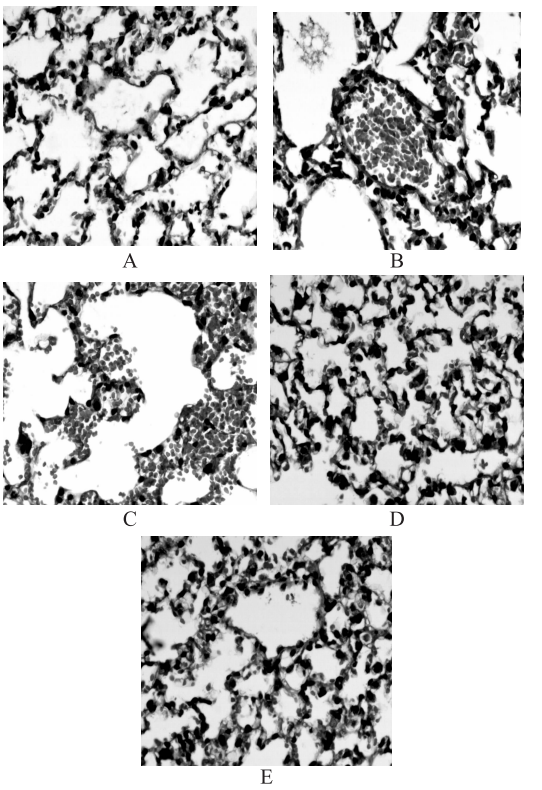

图 1 小鼠肺组织病理图(HE,200×)

Fig.1 The pathology picture of mice lung tissue(HE,200×)

注:A:对照组、B:N_2O_4 染毒组 12 h 后、C:N_2O_4 染毒组 84 h 后、D:GSH 低剂量干预组 12 h 后、E:GSH 低剂量干预组 84 h 后。

3 结论

综上所述,GSH 对 N_2O_4 吸入中毒所致小鼠 ALI 具有明显防护作用,其作用机制可能与清除自由基和活性氧,提高抗氧化酶活性,恢复机体氧化还原平衡,增强机体抗氧化损伤能力有关。本研究可为以 GSH 作为基料,为开发防护 N_2O_4 损伤的特殊功能性食品提供理论依据,为深加工富含 GSH 的食品提供参考,也可为 N_2O_4 中毒防护研究提供思路。

参考文献

[1]曹巧玲,王中民,方志,等.双组元火箭推进剂引起肺损伤的研究进展[J].职业与健康,2014,30(3):417-419.

[2]李建忠,刘志国,吴继华,等.四氧化二氮吸入致肺损伤病理学改变及 SMAD 蛋白表达研究[J].西北国防医学杂志,2012,5(33):508-510.

[3]李胜亮,武志宏,张淑琴,等.30 例四氧化二氮群体吸入中毒急救分析[J].临床肺科杂志,2011,16(2):307-308.

[4]李建忠,刘志国,常李荣,等.四氧化二氮吸入中毒致小鼠急性肺水肿药物干预实验研究[J].临床和实验医学杂志,2015,14(3):173-176.

[5]吴海寰,叶明亮,夏亚东.蛋白质摄入量对四氧化二氮致肺水肿时心钠素的影响[J].航天医学与医学工程,2000,13(2):146-147.

[6]江洁,单立峰.谷胱甘肽的生产及其在食品工业中的应用

(下转第 383 页)

核/巨噬细胞炎症因子表达的影响[J].上海中医药杂志,2011,45(7):73-74,77.
[76]张书松,赵姗姗,黄鹏,等.板蓝根多糖对小鼠肠道形态学的影响[C].中国畜牧兽医学会动物解剖学及组织胚胎学分会第十六次学术研讨会议,2010:230-233.
[77]张红英,王学兵,赵现敏,等.板蓝根多糖抑制致病性大肠埃希菌细胞黏附的实验研究[J].微生物学杂志,2010,30(1):66-68.
[78]赵从凯,郝会军,王洪波,等.板蓝根多糖对小鼠S180肉瘤的抑制作用研究初探[J].潍坊高等职业教育,2008,4(3):65-66.
[79]苏辉,张培建,朗洁,等.板蓝根多糖减轻自体肝移植大鼠缺血再灌注损伤的研究[J].中国现代普通外科进展,2011,14(4):19-22.
[80]冯群先,毕一俐,仇健明,等.板蓝根多糖降脂作用的初步观察[J].中国医药学报,1993(S8):75.
[81]刘志明,孙清瑞,王雯,等.板蓝根多糖保健酒的研制[J]. 农产品加工·学刊,2010(11):50-53.
[82]刘志明,孙清瑞,王欣,等.板蓝根多糖胶冻的研制及其品质评价[J].食品科学,2011,32(8):335-338.
[83]方积年,丁侃.多糖的研究开发中值得注意的一些问题[J].食品与药品,2007,9(12$_A$):1-4.
[84]屠鹏飞.天然糖化学[M].北京:化学工业出版社,2012:29.

(上接第361页)

[J].中国调味品,2009,34(2):40-43.
[7]代涛,李松涛,赵红玲,等.谷胱甘肽的合成及其活性初步评价[J].天然产物研究与开发,2015,27:1140-1145.
[8]冷非凡,孙尚琛,魏清伟,等.酵母谷胱甘肽的研究[J].粮油加工,2015(2):58-61.
[9]Buchler N.Tissue lipid peroxidation and reduced glutathione depletion in hypochlorite-induced lung injury[J]. American College of Chest Physicians,2002,121(2):573-581.
[10]殷娜,卢明军,邓小明,等.还原型谷胱甘肽对大鼠盐酸吸入性肺损伤的保护作用及其机制探讨[J].山东医药,2013,53(44):25-27.
[11]Alastair G,Proudfoot,Danny F,et al.Human models of acute lung injury[J].Dis Model Mech,2011,4(2):145-153.
[12]Perl M,Lomas-Neria J,Venet F,et al.Pathogenesis of indirect(secondary)acute lung injury[J].Expert Rev Respir Med,2011,5(1):115-126.
[13]刘松,俞森洋.N-乙酰半胱氨酸对偏二甲基肼和四氧化二氮吸入性肺损伤的保护作用[J].中国危重病急救医学,2004,16(10):611-614.
[14]焦桂萍,赵兵,袁志柳,等.还原型谷胱甘肽对大鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国临床保健杂志,2006,9(2):142-144.
[15]管娴月,戴传超,徐玉芬,等.富硒轮梗霉与奶醋对小鼠降血脂和抗氧化作用的影响[J].食品科学,2009,30(17):319-323.
[16]王蕾,包谛,王振宇,等.红豆越橘提取物对小鼠慢性应激损伤的防护作用[J].食品工业科技,2016,37(6):346-350.
[17]Lehnert BE,Archuleta DC,Ellis T,et al.Lung injury following exposure of rats to relatively high mass concentrations of nitrogen dioxide[J].Toxicology,1994,89:239-277.
[18]宋蔚忠,夏亚东,郭绪益,等.二氧化氮致大鼠急性肺损伤及其机理探讨[J].军事医学科学院院刊,1999,23(4):263-265.
[19]Sagai M,lchinose T,Oda H,et al.Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide.Ⅱ.Changes of the protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by acute exposure[J].Toxicol Environ Health,1982,9(5):153-164.
[20]宋蔚忠,夏亚东,郭绪益,等.二氧化氮对肺组织匀浆某些生化指标的影响[J].卫生毒理学杂志,1999,13(4):70-271.
[21]孔令贵,文辉,杜宝青,等.谷胱甘肽在预防呼吸机相关性肺损伤中的作用机制分析[J].中国基层医药,2015,22(8):1125-1127.
[22]张宏,刘文操.谷胱甘肽对内毒素致大鼠急性肺损伤的保护作用[J].广东医学,2007,28(5):701-703.
[23]刘振威,李玉霞,方阅,等.还原型谷胱甘肽对大鼠急性肺损伤的保护作用[J].中国临床医学,2012,19(6):605-607.
[24]袁鼎山,李爱林,包玉华.还原型谷胱甘肽对脓毒症大鼠急性肺损伤的干预作用[J].中华危重症医学杂志,2013,6(6):353-358.

(上接第377页)

[39]Wenchang Chiang,Chin-yen Cheng,Meng-tsan Chiang,et al.Effects of Dehulled Adlay on the Culture Count of Some Microbiota and Their Metabolism in the Gastrointestinal Tract of Rats[J].Journal of Agriculture and Food Chemistry,2000,48(3):829-832.
[40]Yukio Ishiguro,Kenji Okamoto,Hideki Sakamoto,et al.A Novel Antimicrobial Substance in Etiolated Seedlings of Adlay[J]. Bioscience,Biotechnology,and Biochemistry,2014,57(5):866.
[41]韦璐,许文涛,屈伟,等.一种从薏仁种子中提取出来的抗真菌蛋白[J].农业生物技术学报,2010,18(4):689-694.
[42]V Singh,RA Moreau,KB Hicks,et al.Yield and phytosterol composition of oil extracted from grain sorghum and its wet-milled Fractions[J].Cereal Chemistry,2003,80(2):126-129.
[43]Eun-Kyeong Choi,Yu Jeong Cho,Hea Jung Yang,et al.Coix seed extract attenuates the high-fat induced mouse obesity via PPARγ and C/EBPα downregulation[J].Mol Cell Toxicol,2015,11:213-221.
[44]Sunmin Park,Jung Bok Lee,and James W.DailyAnti-Obesity Effects of Chang-Chul-Eui-Ee-In-Tang in Female Rats with Diet-Induced Obesity[J].Chinese Journal of Integrative Medicine,2011,17(12):925-932.
[45]陶小军,雷雪霏,李云兴,等.薏苡仁油的镇痛止血作用[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(17):161-163.