

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.26.002

芥子气致大鼠气管急性损伤机制的探讨

祝筱姬¹,徐 睿²,孟 晓²,季 鹏¹,赵 超^{1△},韩 纬¹,王 涛¹,郭文君³

(1.解放军第八十九医院呼吸科,山东潍坊 261021;2.潍坊医学院研究生部,山东潍坊 261042;
3.潍坊医学院病理教研室,山东潍坊 261042)

摘要:目的 建立大鼠芥子气(SM)气管损伤模型,探讨 SM 致大鼠气管急性损伤的机制。方法 雄性 SD 大鼠全身麻醉下气管插管,SM 组(32 只)气管内注入稀释 SM(2.0 mg/kg,0.1 mL),丙二醇对照组(32 只)注入丙二醇 0.1 mL,正常对照组(8 只)不做任何处理。获取组织和血标本,行 HE 染色、免疫组织化学、血清炎性因子及酶测定。结果 SM 组黏膜下有大量淋巴细胞浸润;上皮层和黏膜下层凋亡细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 表达阳性;血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平 24 h 达高峰;血清乳酸脱氢酶(LDH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GP)、 γ 谷氨酰转移酶(GGT)、硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)水平 6 h 或 24 h 达到高峰。丙二醇对照组与正常对照组黏膜下层淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞均少见。结论 SM(2.0 mg/kg)致大鼠气管急性损伤机制涉及炎性反应、细胞凋亡、氧化应激,且损伤程度与时间有相关性。

关键词:芥子气;大鼠;气管损伤;炎性反应;细胞凋亡;氧化应激

中图分类号:R114

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)26-3412-04

Study on mechanism of sulfur mustard induced acute tracheal injury in rat

Zhu Xiaoji¹, Xu Rui², Meng Xiao², Ji Peng¹, Zhao Chao^{1△}, Han Wei¹, Wang Tao¹, Guo Wenjun³

(1. Department of Respiration, No. 89 Hospital of PLA, Weifang, Shandong 261021, China;

2. Department of Postgraduates, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261042, China;

3. Department of Pathology, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261042, China)

Abstract: Objective To establish the sulfur mustard(SM) induced tracheal injury model in rat and to investigate its mechanism. **Methods** Male rats (SD) were anesthetized and intra-tracheally intubated. The SM group was intra-tracheally injected by 2 mg/kg of diluted SM, while the propylene glycol control group only by 0.1mL of propylene glycol and the normal control group had no any treatment. The tissue and blood samples were taken for conducting the HE and immunohistochemical staining and measuring serum enzymes and andinflammatory factors. **Results** In the SM group, a large number of lymphocytes infiltration in submucosa were observed; the positive expression of caspase-3 and caspase-9 were observed in epithelium and submucosa; serum levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 reached the peak in 24 h; serum levels of LDH, GP, BARS reached the peak in 6h, so did GGT in 24 h. In the propylene glycol control group and the normal control group, lymphocytes, macrophages and neutrophils were rare in submucosa. **Conclusion** The mechanism of SM(2 mg/kg) induced acute tracheal injury involves the inflammatory reaction, apoptosis and oxidative stress, moreover the lesion degree has the correlation with time.

Key words: sulfur mustard; rat; tracheal injury; inflammatory reaction; apoptosis; oxidative stress

芥子气(sulfur mustard,SM)是一种糜烂性双功能烷化毒剂。SM 对呼吸道损伤常见、持久且严重,多因继发急性呼吸窘迫综合征或肺部感染致死^[1]。SM 气管损伤的主要组织病理学特征是黏膜侵蚀和炎性反应。国外已有 SM 致大鼠气管急性损伤的报道,但缺乏详细的损伤资料^[2]。本研究通过建立高浓度 SM 致大鼠气管急性损伤模型,应用组织病理学、免疫组织化学及生物化学参数,探讨 SM 致大鼠气管急性损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 所有动物经潍坊医学院动物研究伦理委员会批准。选取健康雄性 SD 大鼠(SPF 级,购于解放军军事医学科学院动物实验中心)72 只,体质量 280~300 g,年龄 15 周。分为 SM 组(32 只)、丙二醇对照组(32 只)、正常对照组(8 只)。SM 液(纯度大于 90%)临用前用丙二醇稀释至所需浓度。SM 致大鼠呼吸道损伤模型建立:实验前皮下注射阿托品(0.05 mg/kg),30 min 后腹腔内注射盐酸氯胺酮(100 mg/kg)实施麻

醉。成功后将大鼠仰卧位固定于实验用木板上,冷光源透照大鼠颈部,用自制的“L”型长柄金属钩挑起大鼠会厌,暴露声门,将 16 号套管针(前端修剪为圆钝状)插入大鼠气管内,拔出针芯,插入细塑料管。SM 组大鼠气管内注入稀释的 SM 0.1 mL(2 mg/kg),丙二醇对照组只注入丙二醇 0.1 mL,正常对照组不做任何处理。1,2-丙二醇溶液由天津致远化学有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及 HE 染色 按照实验需求(6、24、48、72 h),用 3% 戊巴比妥(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉,抽取心脏血 2 mL,采用放血法处死大鼠,然后获取气管组织标本,每个时段取大鼠 8 只。获取标本放置 10% 福尔马林液内固定 24 h,常规石蜡包埋、切片(5 μ m)。血标本用 37 ℃ 水浴 1 h,4 ℃ 过夜,2 000 r/min 离心 10 min,取上清液,分装在无菌小瓶中,−80 ℃ 保存备用。每个标本切片 15 份,每 5 份一组进行 HE 染色,光镜下进行炎细胞分析。

1.2.2 免疫组织化学染色 每一个标本切取 15 份,每 5 份一组进行免疫组织化学染色。pH 8.5,乙二胺四乙酸(EDTA)抗原修复,0.3% H₂O₂和山羊血清封闭。免疫组织化学采用 SP 法,一抗 4℃孵育过夜(兔抗大鼠 Caspase-3、Caspase-9 单克隆抗体标记凋亡细胞),DAB 显色,苏木素复染,封片。阴性对照以 PBS 代替一抗。试剂盒由德国拜耳公司提供,所有流程严格按照说明书进行操作。

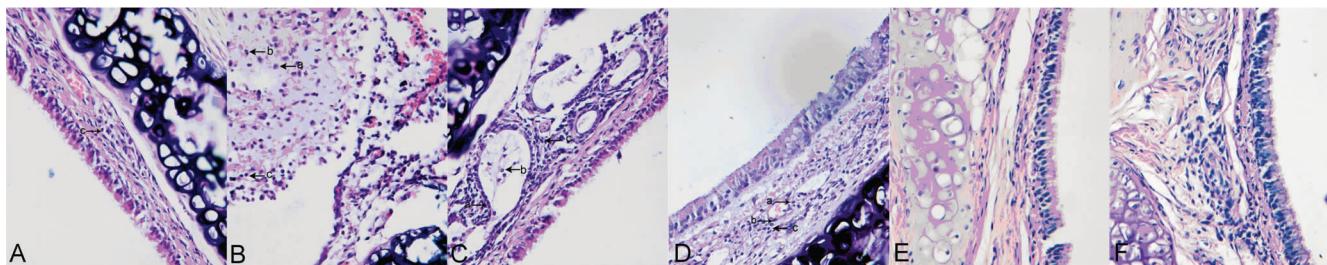
1.2.3 血清炎性因子与酶测定 采用全自动生化免疫分析一体机(COBAS 8000 型,罗氏公司,瑞士)分别进行血清乳酸脱氢酶(LDH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GP)、γ 谷氨酰转移酶(GGT)浓度测定。采用 Versa Max 酶标仪(Molecular Devices 公司,美国),检测血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 及硫代巴比妥酸反

应物质(TBARS)浓度。ELISA 试剂盒由中国深圳科润达生物工程有限公司提供,所有流程严格按说明书进行操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

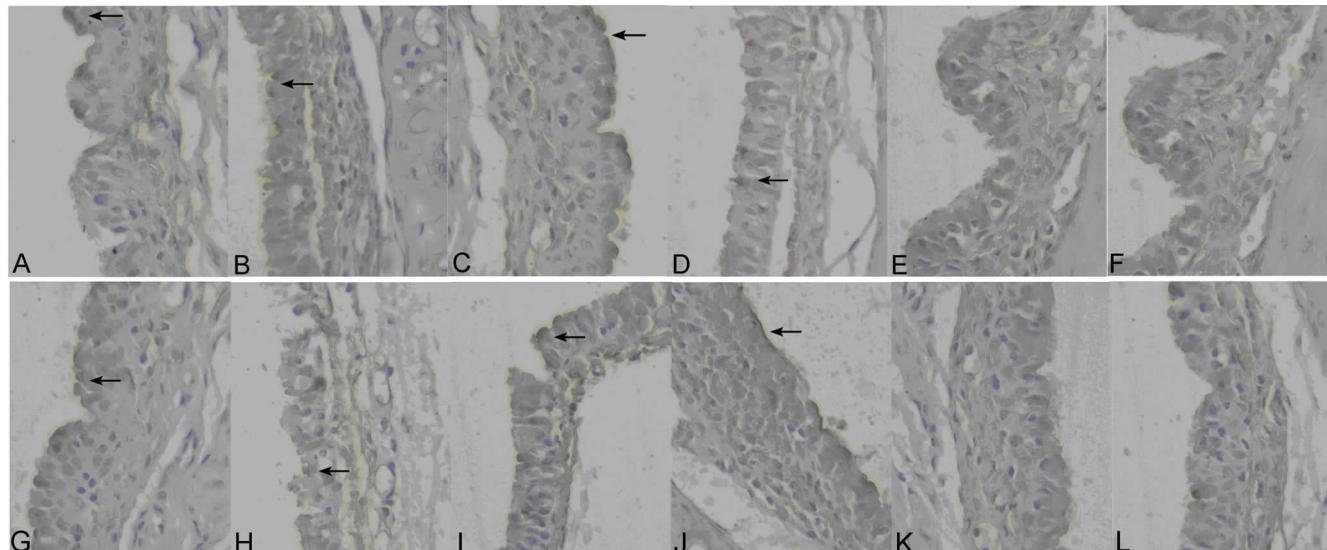
2 结 果

2.1 气管壁炎细胞浸润情况 SM 组:6 h 见气管黏膜下层淋巴细胞呈散在分布(图 1A),24、48、72 h 气管黏膜下层淋巴细胞聚集成簇;6、24、48、72 h 气管黏膜下层巨噬细胞呈散在分布,中性粒细胞呈零星分布(图 1B~D)。丙二醇对照组和正常对照组:黏膜下层淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞均少见(图 1E、F)。



A: SM 组 6 h 气管壁淋巴细胞浸润(箭头所示);B~D: SM 组 24、48、72 h 气管壁炎细胞浸润(箭头所示,a 示中性粒细胞,b 示巨噬细胞,c 示淋巴细胞)。E、F 分别表示丙二醇对照组和正常对照组气管壁炎细胞浸润。

图 1 气管壁炎细胞浸润(HE $\times 400$)



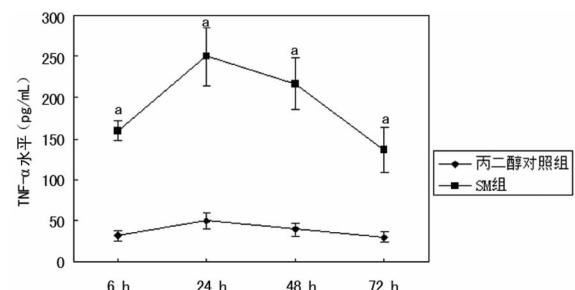
A~D: SM 组 6、24、48、72 h 呈阳性表达(箭头所示);E、F: 丙二醇对照组和正常对照组呈阴性表达(IHC, Caspase-3)。G~J: SM 组 6、24、48、72 h 呈阳性表达(箭头所示);K、L: 丙二醇对照组和正常对照组呈阴性表达(IHC, Caspase-9)。

图 2 细胞凋亡检测结果($\times 400$)

2.2 细胞凋亡检测分析 SM 组(Caspase-3):在气管上皮和黏膜下层凋亡细胞表达阳性,6 h 凋亡细胞呈散在分布(图 2A),24 h 凋亡细胞呈带状分布(图 2B),48、72 h 凋亡细胞聚集成簇(图 2C、D)。丙二醇对照组和正常对照组:在气管黏膜下层凋亡细胞呈零星分布(图 2E、F)。SM 组(Caspase-9):在气管上皮和黏膜下层凋亡细胞表达阳性,6 h 凋亡细胞呈散在分布(图 2G),24 h 凋亡细胞呈带状分布(图 2H),48、72 h 凋亡细胞聚集成簇(图 2I、J)。丙二醇对照组和正常对照组:在气管黏膜下层凋亡细胞呈零星分布(图 2K、L)。

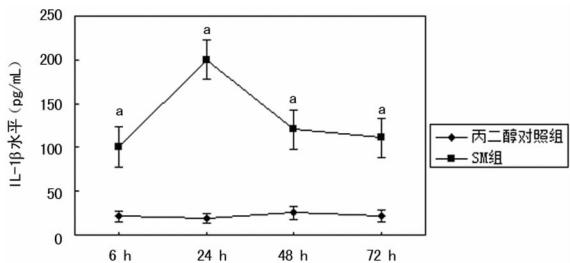
2.3 血清炎性因子定量分析 SM 组血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平 24 h 达高峰,各时间段分别与丙二醇对照组比较,差异均

有统计学意义($P < 0.05$),见图 3~5。



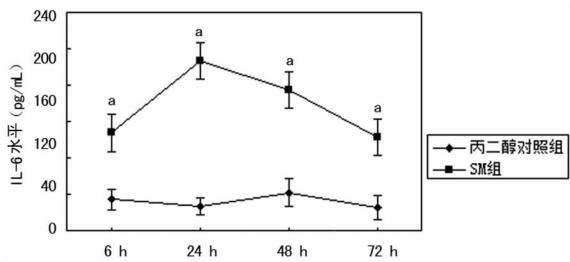
^a: $P < 0.05$, 与丙二醇对照组比较。

图 3 两组 TNF-α 水平比较



^a: $P < 0.05$, 与丙二醇对照组比较。

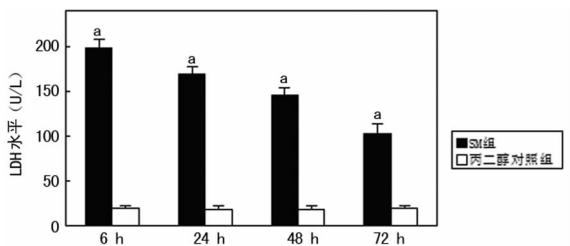
图4 两组IL-1 β 水平比较



^a: $P < 0.05$, 与丙二醇对照组比较。

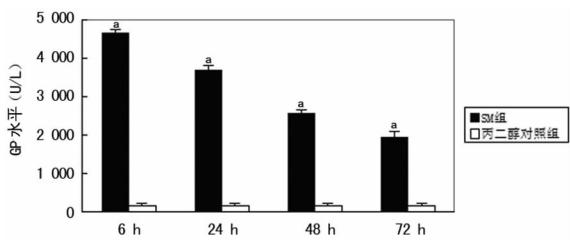
图5 两组IL-6水平比较

2.4 血清酶定量分析 SM组: 血清LDH、GP、TBARS水平6 h达高峰, GGT水平24 h达高峰, 然后持续下降, 各时间段分别与丙二醇对照组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见图6~9。



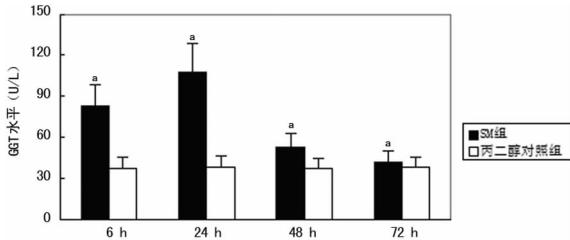
^a: $P < 0.05$, 与丙二醇对照组比较。

图6 两组LDH水平比较



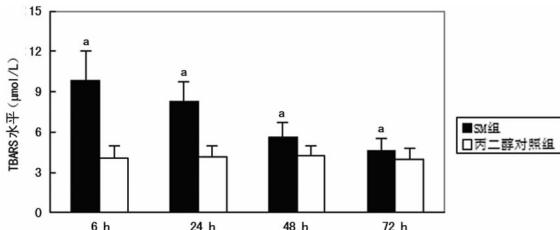
^a: $P < 0.05$, 与丙二醇对照组比较。

图7 两组GP水平比较



^a: $P < 0.05$, 与丙二醇对照组比较。

图8 两组GGT水平比较



^a: $P < 0.05$, 与丙二醇对照组比较。

图9 两组TBARS水平比较

3 讨 论

3.1 炎性反应 SM对呼吸道急性损伤以炎症和黏液分泌增多为突出特征。离体培养人呼吸道上皮细胞加入SM后, 可诱导促炎因子和化学增活素分泌增加(TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、RANTES、MCP-1、IP-10、G-CSF、GM-CSF、IL-15)^[3]。动物实验显示, 豚鼠吸入SM(40 mg/m³)后, 气道反应值、白细胞、IL-4、INF- γ 、嗜酸细胞、单核细胞明显升高^[4]。本研究发现, 血清炎性因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)水平明显升高, 与文献报道一致; 而气管壁黏膜下炎细胞浸润以淋巴细胞为主, 与文献报道不同(中性粒细胞和巨噬细胞浸润为主)^[5]。提示SM侵蚀气管的同时会伴随局部炎细胞浸润和全身一过性促炎反应, 且气管壁局部炎性反应可能与免疫反应有关。

3.2 细胞凋亡 细胞凋亡与细胞坏死最终结局是细胞死亡, 但二者有不同之处。SM是一种可诱导细胞凋亡和细胞坏死的烷化剂, 同样, Fas-Fasl相互作用也能诱导细胞凋亡^[6]。培养人支气管上皮细胞加入SM(300 μm)和FasR抗体CH11(100 ng/mL)诱导Caspase-3活性, 发现SM诱导细胞凋亡经Fas反应通道实现, 通过FasR siRNA和ZB4抑制SM诱导Caspase-3活性^[7]。研究表明, SM可导致细胞周期调控失调, 细胞凋亡标志物增加, 且细胞凋亡具有剂量和时间依从性^[8]。作者前期的电镜发现, 气管杯状细胞细胞膜缺失, 线粒体嵴模糊、髓样变; 纤毛细胞、基底细胞、成纤维细胞细胞核膜不清, 核固缩, 染色质边集^[9]。本研究SM损伤大鼠的气管壁免疫组织化学显示, 上皮层和黏膜下层凋亡细胞Caspase-3和Caspase-9表达阳性, 这一结果与Pohl等^[10]报道一致。可见, SM诱导细胞凋亡是SM致气管急性损伤的特征之一, 分析可能原因是线粒体参与了SM损伤气道上皮细胞凋亡的过程^[11]。

3.3 氧化应激 SM可导致线粒体功能失调, 并伴随线粒体活性氧簇(ROS)水平增多及细胞氧化应激反应^[12-13]。豚鼠气管内滴注2-氯乙硫醚(CEES)后, 超过氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶及谷胱甘肽S-转移酶活性会发生明显变化, 即诱导型一氧化氮合酶(iNOS)抑制、谷胱甘肽耗竭、ROS增加^[14]。本研究发现, 大鼠血清LDH、GP、TBARS、GGT水平在SM气道损伤后6 h或24 h达高峰, 证实氧化应激反应存在, 且呈一过性。因上述酶存在于线粒体中, 提示诸多酶的升高可间接反映上皮细胞线粒体受损, 表明氧化应激在SM损伤机制中起着重要作用^[15]。

综上所述, SM(2 mg/kg)致大鼠气管急性损伤机制涉及炎细胞浸润、促炎反应、细胞凋亡、氧化应激, 且损伤程度与时间有相关性。SM致鼠气管急性损伤的机制相当复杂, 目前尚不能完全明确, 这可能是SM抗毒药物研制难以突破瓶颈的重要原因。

参考文献:

[1] Rancourt RC, Veress LA, Ahmad A, et al. Tissue factor

pathway inhibitor prevents airway obstruction, respiratory failure and death due to Sulfur mustard analog inhalation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272(1): 86-95.

[2] Kreuter KA, Mahon SB, Mukai DS, et al. Detection and monitoring of early airway injury effects of half-mustard (2-chloroethylsulfide) exposure using high-resolution optical coherence tomography [J]. *J Biomed Opt*, 2009, 14(4): 044037.

[3] Karacsonyi C, Shanmugam N, Kagan E. A clinically relevant in vitro model for evaluating the effects of aerosolized vesicants [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 185(1): 38-44.

[4] Boskabady MH, Amery S, Vahedi NA. The effect of vitamin E on tracheal responsiveness and lung inflammation in Sulfur mustard exposed Guinea pigs [J]. *Inhal Toxicol*, 2011, 23(3): 157-165.

[5] Ekstrand-Hammarström B, Wigenstam E, Bucht A. Inhalation of alkylating mustard causes long-term T cell-dependent inflammation in airways and growth of connective tissue [J]. *Toxicology*, 2011, 280(3): 88-97.

[6] Pirzad G, Jafari M, Tavana S, et al. The role of Fas-FasL signaling pathway in induction of apoptosis in patients with Sulfur Mustard-Induced chronic bronchiolitis [J]. *J Toxicol*, 2010; 373612.

[7] Keyser BM, Andres DK, Nealey E, et al. Postexposure application of Fas receptor small-interfering RNA to suppress Sulfur mustard-induced apoptosis in human airway epithelial cells: implication for a therapeutic approach [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 344(1): 308-316.

[8] Dillman JF, Phillips CS, Dorsch LM, et al. Genomic analysis of rodent pulmonary tissue following bis-(2-chloroethyl) sulfide exposure [J]. *Chem Res Toxicol*, 2005, 18(1): 28-34.

[9] 孟晓, 祝筱姬, 徐睿, 等. 芥子气致大鼠气管损伤的形态学研究 [J]. 国际呼吸杂志, 2014, 34(8): 567-572.

[10] Pohl C, Papritz M, Moisch M, et al. Acute morphological and toxicological effects in a human bronchial coculture model after Sulfur mustard exposure [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 112(2): 482-489.

[11] Ray R, Keyser B, Benton B, et al. Sulfur mustard induces apoptosis in cultured normal human airway epithelial cells: evidence of a dominant caspase-8-mediated pathway and differential cellular responses [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2008, 31(1): 137-148.

[12] Gould NS, White CW, Day BJ. A role for mitochondrial oxidative stress in Sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced lung cell injury and antioxidant protection [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 328(3): 732-739.

[13] Nourani MR, Azimzadeh S, Ghanei M, et al. Expression of glutathione S-transferase variants in human airway wall after long-term response to Sulfur mustard [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2014, 34(2): 125-130.

[14] Gautam A, Vijayaraghavan R, Sharma M, et al. Comparative toxicity studies of sulfur mustard (2,2'-dichloro diethyl sulfide) and monofunctional sulfur mustard (2-chloroethyl ethyl sulfide), administered through various routes in mice [J]. *J Med CBR Def*, 2006, 4: 1-21.

[15] Ghanei M, Harandi AA. Molecular and cellular mechanism of lung injuries due to exposure to Sulfur mustard: a review [J]. *Inhal Toxicol*, 2011, 23(7): 363-371.

(收稿日期:2014-03-08 修回日期:2014-04-11)

(上接第 3411 页)

insulin resistance [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 10(26): 1155-1159.

[3] Oh H, Ghosh S. NF-κB: roles and regulation in different CD4+ T-cell subsets [J]. *Immunol Rev*, 2013, 252(1): 41-51.

[4] Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF-κB signaling [J]. *Annu Rev Biophys*, 2013, 42(3): 443-468.

[5] Glauert HP. Role of NF-κB in hepatocarcinogenesis and its potential inhibition by dietary antioxidants [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12(9): 1160-1172.

[6] Iomek A. NF-κB signaling pathway and free radical impact [J]. *Acta Biochim Pol*, 2012, 59(3): 323-331.

[7] 李勇, 张培建, 金成. NF-κB 与肝脏缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 中国现代普通外科进展, 2008, 2(11): 48-50.

[8] Krasnoff JB, Painter PL, Wallace JP, et al. Health-related fitness and physical activity in patients with nonalcoholic

fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2008, 47 (4): 1158-1166.

[9] Brinkley TE, Lovato JF, Arnold AM, et al. Effect of ginkgo biloba on blood pressure and incidence of hypertension in elderly men and women [J]. *Am J Hypertens*, 2010, 23 (5): 528-533.

[10] Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview [J]. *Sci World J*, 2013, 11(29): 162-175.

[11] Xiao ZP, Peng ZY, Peng MJ, et al. Flavonoids health benefits and their molecular mechanism [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11(2): 169-177.

[12] Kim HP, Park H, Son KH, et al. Biochemical pharmacology of biflavonoids: implications for anti-inflammatory action [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(3): 265-273.

(收稿日期:2014-03-20 修回日期:2014-06-09)