

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00101

外源性硫化氢对急性氧中毒的影响

Effect of exogenous H₂S on acute oxygen toxicity

张超¹, 李峻汐¹, 孙学军², 郑娟^{2*}

1. 第二军医大学长海医院实习大队, 上海 200433

2. 第二军医大学海医系潜水医学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究外源性硫化氢对急性氧中毒的影响。**方法** 昆明小鼠随机分为3组($n=12$): 正常对照组、生理盐水组+高压氧暴露组、硫化氢(NaHS)组+高压氧暴露组。动物暴露前按分组腹腔注射生理盐水和NaHS($50\ \mu\text{mol/kg}$)溶液后立即进舱暴露(100%纯氧, 压力500 kPa, 40 min), 观察动物惊厥潜伏期, 出舱后检测脑组织丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)含量。**结果** 外源性硫化氢可减轻急性氧中毒的损伤, 延长惊厥潜伏期, 降低脑组织MDA和NO含量。**结论** 外源性硫化氢对急性氧中毒造成的脑损伤具有保护作用, 其机制可能与降低NO含量有关。

[关键词] 硫化氢; 急性氧中毒; 氧化损伤

[中图分类号] R 848

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2011)01-0101-02

临床高压氧治疗及潜水作业都会接触到高分压氧, 吸入气中氧分压增高到一定程度, 会对机体造成一定损伤, 使某些组织器官发生病理性变化, 称之为氧中毒。根据氧分压高低和暴露时间不同, 将氧中毒分为急性氧中毒和慢性氧中毒。硫化氢曾经被认为是毒性气体, 但近几年研究证实硫化氢是继一氧化碳(CO)、一氧化氮(NO)后的第三种气体信号分子, 参与机体的多种生理、病理过程^[1-2]。硫化氢对炎症反应、缺血再灌注损伤以及氧化损伤都具有一定的保护作用^[3]。本课题旨在研究硫化氢对急性氧中毒的影响及其机制。硫化氢(NaHS)作为外源性硫化氢供体在研究中被广泛使用, 因此我们拟建立小鼠急性氧中毒模型, 腹腔注射NaHS水溶液, 通过测定惊厥潜伏期的长短、大脑皮质和海马的氧化损伤指标研究硫化氢对氧中毒的影响, 并测定脑组织NO含量, 初步探讨硫化氢的作用机制。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器 NaHS购自美国Sigma公司, NO试剂盒购于江苏碧云天生物技术研究所, 丙二醛(MDA)试剂盒购于南京建成生物工程研究所。纯氧(上海江南气体有限公司)。小型透明纯氧动物舱(上海701研究所杨园应用氧舱厂)。

1.2 模型制备 昆明种雄性小鼠36只, 体质量(30 ± 3)g。将动物随机分为3组($n=12$): 正常对照组、生理盐水+高压氧模型组、NaHS+高压氧模型组。氧中毒模型: 纯氧暴露压力为500 kPa, 舱内稳压观察40 min, 持续微量通风以防CO₂积聚过多, 舱内氧浓度维持在97%以上。动物腹腔注射生理盐水和NaHS溶液($50\ \mu\text{mol/kg}$)后立即进舱, 用纯氧

置换舱内空气约5 min, 然后以100 kPa/min的速度匀速加压至500 kPa, 开始计时, 稳压过程中持续微量通风防止CO₂积聚。

1.3 观察惊厥潜伏期 观察动物行为学改变, 当动物首次出现四肢抽搐、乱窜、倒地等表现时, 即为氧惊厥发作, 记录发作开始时间, 作为惊厥潜伏期。

1.4 测定脑组织NO和MDA含量 暴露结束后, 以100 kPa/min的速度将舱减压至常压, 取出小鼠, 立即断头处死, 小心摘取脑组织(包括海马和皮层), 用生理盐水漂洗干净, 滤纸吸干水分后称重, 用玻璃匀浆器加入生理盐水进行匀浆, 制备浓度为10%的组织匀浆, 3 000转/min, 离心10 min(离心半径约为5 cm), 收集上清, 根据试剂盒步骤测定NO和MDA含量。

1.5 统计学处理 所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 均数间的两两比较采用SNK- q 检验。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 外源性硫化氢对氧中毒惊厥潜伏期的影响 与生理盐水模型组[(16.88 ± 5.31) min]相比, 给予NaHS处理后, 动物惊厥潜伏期明显延长[(27.32 ± 6.22) min, $P<0.05$]。

2.2 外源性硫化氢对脑组织MDA含量的影响 结果显示, 与正常对照组[(1.92 ± 0.43) nmol/mg protein]相比, 生理盐水模型组MDA含量[(3.2 ± 0.79) nmol/mg protein]明显增加($P<0.05$); 而给予NaHS处理的小鼠脑组织内MDA含量[(2.26 ± 0.55) nmol/mg protein]低于生理盐水模型组($P<0.05$)。

[收稿日期] 2010-05-28 **[接受日期]** 2010-11-16

[基金项目] 第二军医大学“大学生创新能力培养”基金(MS2009023)。Supported by Undergraduate Innovation Ability Fund of Second Military Medical University (MS2009023)。

[作者简介] 张超, 第二军医大学临床医学专业本科2006级学员。E-mail: zhangchao987629@live.cn

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871144-809, E-mail: zjg1981girl@hotmail.com

2.3 外源性硫化氢对脑组织 NO 水平的影响 与正常对照组[(5.43±1.51) nmol/mg protein]相比,生理盐水模型组小鼠脑组织内 NO 水平[(12.14±4.11) nmol/mg protein]明显增高;NaHS 处理组的小鼠脑组织 NO 水平[(7.12±2.51) nmol/mg protein]较生理盐水模型组明显降低($P<0.05$)。

3 讨论

使用封闭式装具执行潜水作业和临床高压氧治疗时常暴露于过高的氧浓度中,可能会发生氧中毒。若发生在中枢神经系统,其主要表现为惊厥大发作,又称惊厥型氧中毒^[4-5]。动物暴露于 400 kPa 高压氧下一定时间就有中毒的表现,如脑电图异常、运动功能紊乱、神经细胞损伤和死亡等^[6-7]。有关氧中毒的确切机制目前尚未完全明了,比较公认的有自由基学说,自由基可以氧化特定的细胞成分而产生神经毒性^[8-9]。高压氧也可以诱导活性氮簇(reactive nitrogen species, RNS)产生,特别是 NO 与急性氧中毒关系更为密切,研究发现给予一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂可以对抗动物氧惊厥的发生^[10-13]。因此,通过减少 RNS 产生及自由基生成是防治氧中毒的有效方法。

近年来,硫化氢气体是备受人们关注的第三个气体信号分子。哺乳动物细胞能产生硫化氢,大鼠血清中硫化氢含量是 0~46 $\mu\text{mol/L}$,脑组织含量为 50~60 $\mu\text{mol/L}$ ^[14-15]。研究表明硫化氢可直接清除过氧化氢和超氧阴离子以及拮抗过氧化亚硝酸盐介导的损伤^[16-17];可以减少细胞色素 C 的表达,抑制线粒体呼吸链,使细胞氧自由基产生减少,并增加 NADPH/NADP 比例。目前关于硫化氢对急性氧中毒的影响未见报道。

根据本科室前期对减压病的研究,暴露压力 700 kPa、持续 100 min、大幅度快速减压才可能诱发减压病^[18],而在本研究中暴露压力 500 kPa,维持 40 min,压力低,暴露时间短,因此动物不会发生减压病,实验中也未发现发病动物。结果显示,与生理盐水模型组相比,高压氧暴露之前给予外源性硫化氢处理后明显延长动物惊厥潜伏期。检测过氧化损伤指标 MDA 在脑组织的含量,结果发现硫化氢处理组脑组织 MDA 含量明显低于生理盐水模型组,提示硫化氢具有一定的抗氧化作用,这与文献报道^[3]一致。此外,由于 NO 产生增多与急性氧中毒关系密切,因此我们又检测了脑组织 NO 水平,发现硫化氢明显降低了 NO 含量。上述结果表明外源性硫化氢具有一定的抗氧化能力,可以保护急性氧中毒造成的损伤,但具体机制仍有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Hui Y, Du J, Tang C, Bin G, Jiang H. Changes in arterial hydrogen sulfide (H_2S) content during septic shock and endotoxin shock in rats[J]. *J Infect*, 2003, 47: 155-160.
 [2] 叶婷, 刘晓城. 内源性硫化氢在心血管系统中的作用[J]. 国外医学:内科学分册, 2004, 31: 482-485.
 [3] 曾翔俊, 王红霞, 王艳霞, 陈玉涵, 芦玲巧, 唐朝枢, 等. 硫化氢拮抗乳鼠心肌缺氧/复氧损伤机制初探[J]. 中国病理生理杂志,

2009, 25: 839-843.
 [4] Plafki C, Peters P, Almeling M, Welslau W, Busch R. Complications and side effects of hyperbaric oxygen therapy[J]. *Aviat Space Environ Med*, 2000, 71: 119-124.
 [5] Thom S R. Applications of pressure biology: toxic and beneficial effects of oxygen[M]//Bennett P B, Marquis R E. Basic and applied high pressure biology. New York: University of Rochester Press, 1994: 365-373.
 [6] Bean J W, Lignell J, Coulson J. Regional cerebral blood flow, O_2 , and EEG in exposure to O_2 at high pressure[J]. *J Appl Physiol*, 1971, 31: 235-242.
 [7] Torbati D, Parolla D, Lavy S. Blood flow in rat brain during exposure to high oxygen pressure [J]. *Aviat Space Environ Med*, 1978, 49: 963-967.
 [8] Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation[J]. *J Experiment Biol*, 1998, 201: 1203-1209.
 [9] Li Q, Guo M, Xu X, Xiao X, Xu W, Sun X, et al. Rapid decrease of GAD 67 content before the convulsion induced by hyperbaric oxygen exposure[J]. *Neurochem Res*, 2008, 33: 185-193.
 [10] Atochin D N, Demchenko I T, Astern J, Boso A E, Piantadosi C A, Huang P L. Contributions of endothelial and neuronal nitric oxide synthases to cerebrovascular responses to hyperoxia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23: 1219-1226.
 [11] Demchenko I T, Atochin D N, Boso A E, Astern J, Huang P L, Piantadosi C A. Oxygen seizure latency and peroxynitrite formation in mice lacking neuronal or endothelial nitric oxide synthases[J]. *Neurosci Lett*, 2003, 344: 53-56.
 [12] Demchenko I T, Welty-Wolf K E, Allen B W, Piantadosi C A. Similar but not the same: normobaric and hyperbaric pulmonary oxygen toxicity, the role of nitric oxide[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293: L229-L238.
 [13] Allen B W, Demchenko I T, Piantadosi C A. Two faces of nitric oxide: implications for cellular mechanisms of oxygen toxicity [J]. *J Appl Physiol*, 2009, 106: 662-667.
 [14] Szab C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6: 917-935.
 [15] Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, et al. H_2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase[J]. *Science*, 2008, 322: 587-590.
 [16] Whiteman M, Armstrong J S, Chu S H, Jia-Ling S, Wong B S, Cheung N S, et al. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite scavenger[J]. *J Neurochem*, 2004, 90: 765-768.
 [17] Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, et al. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318: 756-763.
 [18] 范丹峰, 康志敏, 张荣佳, 蔡志宇, 郑娟, 刘昀, 等. 高压氧预处理对大鼠减压病发病率的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2010, 28: 448-450.

[本文编辑] 尹茶