

高压氧预处理对减压病大鼠肺组织的影响*

李 娅¹ 徐孝娜² 王文岚¹ 谢小萍¹ 李金声¹ 海春旭³ 王 枫² 任 杰^{1△}

(1 第四军医大学航空航天医学院卫生与卫生勤务学教研室 陕西 西安 710032 ;

2 第四军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室 陕西 西安 710032 ;

3 第四军医大学军事预防医学院毒理学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 研究高压氧预处理对减压病大鼠肺组织的影响及其意义。方法 SD 大鼠 30 只,随机分为正常对照(CN)组,高压氧预处理(HBO)组,减压(DCS)组,减压组采用 20min 匀速升压至 7.0ATA,停留 20min 使大鼠充分换气,2min 内快速减压常压方案。减压 24h 后观察肺组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的变化,并通过 HE 染色观察肺组织病理学变化。结果 减压组肺泡腔不够完整,肺泡破裂融合,肺泡壁增厚,有中度炎性细胞浸润。高压氧组与减压组相比,病理改变明显减轻;与对照组相比,单纯减压使大鼠肺组织 GPx、MDA 升高,SOD 降低,高压氧预处理组 GPx、MDA 降低,SOD 降低升高。高压氧组与减压组相比 GPx、MDA 下降,SOD 升高($P<0.05$)。结论 高压氧预处理对减压病大鼠肺组织具有一定的保护作用。

关键词 减压病;肺组织;高压氧

中图分类号 Q95-3,R845.21 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)16-3004-04

Hyperbaric Oxygen Pretreatment on Rat Lung Tissue in Decompression Sickness*

LI Ya¹, XU Xiao-na², WANG Wen-lan¹, XIE Xiao-ping¹, LI Jin-sheng¹, HAI Chun-xu³, WANG Feng², REN Jie^{1△}

(1 Department of Aerospace Hygiene, School of Aerospace Medicine, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an, 710032, China; 2 Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Preventive Medicine, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an, 710032, China; 3 Department of Toxicology, School of Preventive Medicine, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of hyperbaric oxygen pretreatment on decompression sickness in rat lungs. **Methods:** SD rats were randomly divided into normal control (CN) group, hyperbaric oxygen preconditioning (HBO) group, decompression (DCS) group, decompression group by using 20min uniform boost to 7.0ATA, stay 20min in rats full ventilation, rapid decompression to atmospheric pressure program within 2min. Lung tissue glutathione peroxidase (GPx), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) changes were detected after decompression 24h; Pulmonary histopathological changes was detected by HE staining. **Results:** The alveolar cavity of the decompression is incomplete alveoli rupture integration, alveolar wall thickening, moderate inflammatory cell infiltration, the hyperbaric oxygen group significantly reduced pathological changes compared with that in the decompression group; Compared with that in the control group, simple decompression GPx, rat lung tissue of MDA increased, SOD decreased, GPx, of hyperbaric oxygen pretreatment group of MDA to reduce of SOD to reduce elevated; Hyperbaric oxygen group and the decompression group compared with GPx, MDA decreased, SOD increased ($P<0.05$). **Conclusion:** Hyperbaric oxygen preconditioning has a protective effect of decompression sickness in rat lungs.

Key words: Decompression sickness; Lung tissue; Hyperbaric oxygen

Chinese Library Classification: Q95-3, R845.21 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 16-3004-04

前言

减压病(decompression sickness,DCS)时有发生,常见于飞行员和潜水员,其实质是外周压力降低使组织出现气泡而导致气栓和缺血性损害发生,如不及时,可遗留严重后果^[1-4]。虽然可以通过体格选拔、吸氧排氮、装备防护、慢速减压、阶段减压等

措施预防其发生^[5-7]。但飞行中增压座舱失去密封性,潜水员快速上浮等情况,仍会造成减压病发生^[8,9]。为此我们采用大鼠减压病模型,通过观察高压氧预处理对减压病大鼠肺组织病理及自由基变化来探讨 HBO 对减压病的保护作用。

1 材料与方法

* 基金项目 国家自然科学基金(81000858)

作者简介 李娅(1982),女,硕士研究生,助教,主要研究方向 航空、航天与航海医学,电话:13772071564,E-mail:liya19821107@163.com

△通讯作者 任杰,E-mail:tklmg@163.com

(收稿日期 2012-03-14 接受日期 2012-04-10)

1.1 研究对象

30 只雄性 SD 大鼠,鼠龄 8 周,体重 180~220g,有第四军医大学实验动物中心提供,实验室温度控制在 $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度控制在 $50\pm 5\%\text{RH}$ 范围内,鼠料为清洁级啮齿类动物专用饲料,饮用水为自来水,自由饮水昼夜节律同自然。将动物随机分为 3 组 HBO 组、DCS 组和 CN 组,每组 10 只。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 上海 DWC450-1150 型动物实验舱仪器;752 型可见分光光度计(上海医用仪器厂);OlympusBX51 双目显微镜;Shandon Finesse 325 型旋转石蜡切片机;美国科峻台式高速冷冻离心机(Biofuge Fresco);匀浆机(PT-MR2100,CE)。

1.2.2 试剂 谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase GPx)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase enzyme SOD)、(maleic dialdehyde MDA) 检测试剂盒,均购于南京建成试剂公司;0.9%生理盐水;2%戊巴比妥钠,实验用水均为去离子水。

1.3 实验方法

1.3.1 高压氧预处理 HBO 组动物接受连续 5 天的高压氧预处理,高压氧处理过程:舱内预置钠石灰,动物进舱后,先以纯氧洗舱 10min,使舱内氧浓度达到 90%以上,再进行匀速加压,20 分钟加压至 2.5ATA,保留 60min 后,再用 20min 减至常压出舱。

1.3.2 大鼠减压病模型制备 依照陈锐勇等制作的动物模型^[10]。大鼠适应性饲养 5 天后,第 6 天同 HBO 组同时放置于动物加压舱内,舱底铺以钠石灰吸收残余 CO_2 。舱内温度维持在 $23\sim 25^{\circ}\text{C}$ 。20min 匀速升压至 7.0ATA,停留 20min 使大鼠充分换气,2min 内快速减压常压。

1.4 实验取材及制备

1.4.1 组织匀浆液的制备 减压 24h 后,每组 8 只动物用 2%戊巴比妥钠深麻醉,无菌条件下解剖取出肺脏,用冰冷的生理盐水漂洗,除去血液,放置冰块盘中迅速分离出左侧肺脏,用滤纸吸干水分,定量好组织,按 1:9 比例加入 0.9%氯化钠冷溶液,在冰浴中制成肺组织匀浆液,离心 15min(3000r/min)后,取上清液,待测。

1.4.2 肺组织病理学观察 每组 2 只动物用同样方法麻醉后,经心脏灌注生理盐水 150ml、4%多聚甲醛 400ml 后,立即分离出肺组织,将组织置于 4%多聚甲醛中固定,经石蜡包埋,做成 4 μm 的切片,HE 染色,观察病理组织学变化^[11]。

1.5 样品测定

1.5.1 肺组织 GPx 根据试剂盒测定操作表中的步骤,分别为酶促反应和显色反应两部分。酶促反应中分别设对照管和测试管,先在两管中分别加入 1 mmol/L GSH 0.2 ml,测试管中再加入 1:9 组织匀浆液 0.2 ml,再分别向两管中加入试剂一 0.1 ml, 37°C 准确反应 5 min,反应完成后分别加入试剂二 2 ml,对照管再加入 1:9 组织匀浆液 0.2 ml;反应完成后离心 10min (4000r/min),取上清 1 ml 作显色反应;显色反应中分别设空白管、标准管、对照管和测定管,空白管加入 1 ml GSH 标准品溶剂应用液,标准管加入 1 ml 20 $\mu\text{mol/L}$ GSH 标准液,对照管和测定管分别加入酶促反应中已制备好的上清液各 1 ml,具体步骤参照试剂盒说明书进行。

1.5.2 肺组织 SOD 的测定 根据试剂盒操作方法,分别设对照管和测定管,各管分别加入试剂一 1 ml,而后测定管加入加入 1:9 组织匀浆液 20 μl ,对照管加入 20 μl 蒸馏水,混匀后分别向各管依次加入试剂二、三、四各 0.1 ml 后按照试剂盒说明书操作。

1.5.3 肺组织 MDA 的测定 根据试剂盒操作方法,分别设标准管、标准空白管和测定管,先在标准管加入 10 nmol/mL 的四乙氧基丙烷 100 μl ,而后标准空白管加入 100 μl 无水乙醇,测定管加入 1:9 组织匀浆液 100 μl ,然后分别向各管试剂一 100 μl ,混匀后分别依次加入试剂二、三各 1.5 ml 后按照试剂盒说明书操作。

1.6 统计方法

所有实验数据采用 SPSS17.0 统计软件分析,计算平均值及标准差,结果以 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示,采用单因素方差分析,不同处理组间差异显著性采用 t 检验。以 $P<0.05$,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 SD 大鼠肺组织 HE 染色病理变化

HE 染色结果显示:对照组大鼠肺组织,肺泡结构完整,肺泡壁薄,肺泡腔内比较清晰,未见异常变化(图 1A);减压组大鼠肺组织肺泡腔不够完整,肺泡破裂融合,肺泡壁增厚,有中度炎症细胞浸润(图 1B)。高压氧组与减压组相比,上述病理改变明显减轻(图 1C)。

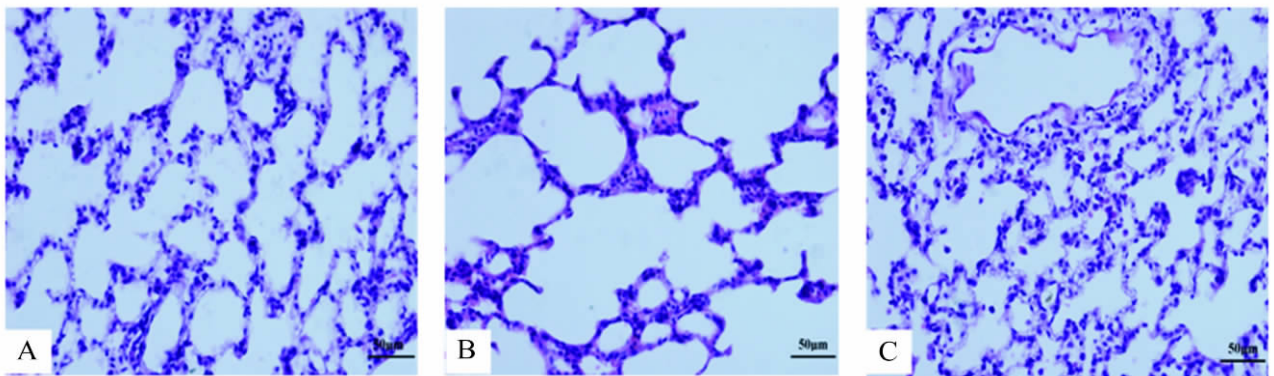


图 1 各组 SD 大鼠肺组织 HE 染色结果。A:正常对照组; B:减压组; C:高压氧组(标尺=50 μm)

Fig.1 The results of HE staining in lung tissues of the SD rats in each group. A:NC group; B:DCS group; C:HBO group (bar=50 μm)

2.2 实验 SD 大鼠肺组织 GPx 活性、SOD 活性、MDA 含量变化
大鼠减压 24h 后,检测肺组织 GPx 活性、SOD 活性、MDA 含量(表 1)。与对照组相比,减压组 GPx、MDA 升高,SOD 下降 ($P<0.05$) 高压氧组 GPx、MDA 下降,SOD 升高 ($P<0.05$)。高压氧组与减压组相比,GPx、MDA 下降 ($P<0.05$),SOD 升高 ($P<0.05$)。

表 1 各组 SD 大鼠肺组织 GSH-PX 活性、SOD 活性、MDA 含量变化 ($n=8,\bar{x}\pm s$)
Table 1 The contents of GSH-PX, SOD, MDA in lung tissues of the SD rats in each group($n=8,\bar{x}\pm s$)

Grouping	GSH-PX (U/mgprot)	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/mgprot)
NC group	18.76± 4.74057	17.961436± 3.9438845	0.552355± 0.1125087
HBO group	13.2167± 2.40641**	19.947558± 4.7565125**	0.393282± 0.0968354**
DCS group	30.3633± 3.68372*	12.531212± 3.6475434*	0.852911± 0.3005216*

Note : Compared with NC group, * $P<0.05$; compared with DCS group, # $P<0.05$

3 讨论

研究证实,预先给予缺血预处理,能减轻其后发生的严重缺血所造成的组织损伤,称为缺血耐受^[12]。运用各种手段诱导缺血耐受是近来研究的热点。已经发现有很多种方法可以诱导缺血耐受,例如,缺血、低氧、高压氧、高温、低温、睡眠剥夺等,有些方法本身存在着明显的副作用。HBO 作为临床常用的安全有效的方法,可以诱导缺血耐受,受到很多研究者的青睐^[13-15]。减压病发生会时产生气泡,对神经、组织产生原发性的损害,还会形成气栓,造成局部血液循环障碍,引起组织缺血、缺氧等损伤。有文献报道,从高压环境快速、大幅度地减压所导致的肺损伤机制是由于减压过程中屏气等原因导致肺内压升高,撕裂肺组织和血管,气泡进入血管或组织,而发生气肿、气胸,引发一系列的呼吸、循环功能障碍^[16,17]。我们用高压氧预处理大鼠减压病模型观察了肺组织病理、抗氧化能力的变化。

肺组织病理结果显示,减压组与对照组对比,大鼠肺泡结构失去原来正常结构,肺泡破裂融合,肺泡壁增厚,有中度炎性细胞浸润,具有损伤特征 而高压氧组较减压组病理改变明显减轻。提示高压氧预处理可以通过对肺组织产生的缺血耐受来抑制快速减压时对肺组织造成的严重病理改变。

本实验发现减压 24 小时后,可以引起一系列氧化应激指标的改变,机体氧化和抗氧化的平衡被打破,过量的活性氧(ROS)攻击生物膜,与其中的多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应。减压后谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性明显升高,说明减压可对机体造成的一定程度氧化损伤,机体会调动一些列的防御机制来增强抗氧化能力 根据 DCS 的发病机理得知,减压后使机体产生大量气泡,这些气泡最后集中于肺,引起肺循环栓塞、血流瘀滞以及白细胞聚集并激活,这些都可引起肺内自由基生成增加;而高压氧组肺组织 GPx 活性降低则说明了高压氧可以抑制减压时 ROS 的生成,同时加快 ROS 清除,起到减轻肺组织氧化损伤的作用。丙二醛(MDA)作为脂质过氧化最主要的产物之一,可以直接反映脂质过氧化的程度,同时,也可间接反映氧化应激水平^[18],本实验发现在减压后,大鼠 MDA 含量明显增加,说明减压能使组织产生大量 ROS,攻击和损害组织,给予高压氧预防后可显著改善此现象,证明高压氧预处理具有一定的抗脂质过氧化反应作用。超氧化物歧化酶(SOD)是抗氧化防御体系中一种重要的酶类,其生物学作用是催化 $O_2^{\cdot-}$

转化为 H_2O_2 和 O_2 ,再通过其它酶类,将 H_2O_2 转化为 H_2O ,从而阻止 $O_2^{\cdot-}$ 在需氧生物体内聚集,并实现清除机体氧自由基,维持细胞内氧化还原状态,控制自由基处于无害低水平状态的目的^[19]。减压后肺组织中的自由基突然大量生成,使得 SOD 出现自由基过载,过多的自由基使得 H_2O_2 不能完全转化为 H_2O ,这些多余 H_2O_2 会抑制 SOD 的活性 过度产生的氧自由基还可直接氧化 SOD 的巯基,从而进一步降低了 SOD 的活性^[20]。给予高压氧预处理的大鼠 SOD 活性有所提高,说明 HBO 能加快体内的气泡排出,纠正局部缺血状态 同时还有一定的抑制白细胞激活的作用,因而使自由基生成减少,减轻 SOD 的负担。

综上,通过高压氧预处理,可使减压病大鼠肺组织病理、抗氧化能力得到明显的减轻作用。提示高压氧预处理对减压病具有一定的保护作用,可以为减压病的预防提供一种新的思路。

参 考 文 献 (References)

[1] 殷东辰,郑晓惠,刘晓鹏. 低压舱检查致高空减压病 1 例[J]. 东南国防医药,2011,13 (5) :427-432
Yin Dong-chen, Zheng Xiao-hui, Liu Xiao-peng. Low pressure tank inspection to altitude decompression sickness in 1 case [J]. Military Medical Journal of Southeast China, 2011, 13 (5) :427-432

[2] Richard DV, Frank KB, Simon JM, et al. Decompression illness[J]. Lancet, 2010, 377: 153-164

[3] Emmanuel G, Jean EB. Risk factors and treatment outcome in scuba divers with spinal cord decompression sickness[J]. Journal of Critical Care, 2010,25(2):236-242

[4] Sotiris P, Evgenidis, Nikolaos A, et al. Bubbly flow characteristics during decompression sickness: Effect of surfactant and electrolyte on bubble size distribution [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochem, Eng Aspects, 2010,365 (1-3):46-51

[5] Donald EW. Degassed liquids to prevent/treat decompression sickness [J]. Medical Hypotheses, 2003, 60(5):720-723

[6] 秦志峰,肖华,郑晓慧.高空减压病预防、治疗方法进展[J].航空军医, 2001,29 (2) :87-90
Qin Zhi-feng, Xiao Hua, Zheng Xiao-hui. Decompression sickness prevention, treatment progress[J]. Flight Surgeon, 2001, 29 (2) :87-90

[7] Christopher A. Duplessis, David F. Investigating the potential of statin medications as a nitric oxide (NO) release agent to decrease decompression sickness: A review article [J]. Medical Hypotheses, 2008,70 (3) :560-566

- [8] Silverman D, Gendreau M. Medical issues associated with commercial flights[J]. Lancet, 2009,373(9680):2067-2077
- [9] Giovita AP, Aurelio P, L Manfrè, et al. Decompression sickness in a sea-hedgehog diver [J]. European Journal of Internal Medicine, 2008,19 (1) :50
- [10] 陈锐勇. 快速减压致中枢神经损伤机制及高压氧效用的研究[D]. 上海 第二军医大学,2005
Chen Rui-yong. The Mechanism of Central Nerve Injury induce by fast decompression and the effects of hyperbaric Oxygen [D]. Shang Hai: Second Military Medical University,2005
- [11] 王周,王晓君,陈清华,等. 高压氧对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经干细胞的影响[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志,2010,17 (3) : 150-154
Wang Zhou, Wang Xiao-jun, Chen Qing-hua, et al. Effect of hyperbaric Oxygen on neural stem cell proliferation following ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin J Naut Med & Hyperbar Med, 2010,17(3):150-154
- [12] Alon E, Enrique Z F, Melvyn R, et al. Ischemic preconditioning : nearly two decades of research. A comprehensive review [J]. Atherosclerosis, 2004,172: 201-210
- [13] 王海涛,方以群,姚健,等. 极快速减压对大鼠肺组织的损伤作用[J]. 环境与职业医学,2008,25 (6) :565-567
Wang Hai-tao, Fang Yi-qun, Yao Jian, et al. Rat Lung Injury Caused by Extremely Fast Decompression[J]. J Environ Occup Med, 2008,25 (6) :565-567
- [14] Boettger ML. Scuba diving emergencies: pulmonary overpressure accidents and decompression sickness [J]. Ann Emerg Med, 1983,12 (9):563-567
- [15] Ran A, Elran B, Yehuda A, et al. Oxygen pretreatment as protection against decompression sickness in rats: pressure and time necessary for hypothesized denucleation and renucleation[J]. Eur J Appl Physiol, 2011, 111(6):997-1005
- [16] 朱祥祺,倪大智,李慈,等. 高压氧对减压病大鼠肺组织自由基的影响[J]. 中华理疗杂志,2000,23 (6) :353-355
Zhu Xiang-qi, Ni Da-zhi, Li Ci, et al. Effect of hyperbaric oxygenation on free radicals in lung tissue of rats with decompression sickness[J]. Chin J Phys Ther, 2000,23(6):353-355
- [17] Bruce DS, Jiepei Z, Benjamin P, et al. Effects of Perfluorocarbon Infusion in an Anesthetized Swine Decompression Model [J]. Journal of Surgical Research, 2009, 153(1):83-94
- [18] Michael JD, Lynell WK, Courtney SS, et al. Malondialdehyde-acetaldehyde adduct is the dominant epitope after MDA modification of proteins in atherosclerosis [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2010,49(10):1480-1486
- [19] Meltem OD, Hale MK, Cennet D. Effect of pentylentetrazole and sound stimulation induced single and repeated convulsive seizures on the DDA GSH and NO levels, and SOD activities in rat liver and kidney tissues[J]. Brain Research Bulletin, 2010,83(6):356-359
- [20] 席允平,刘和平,许传喜,等. 实验性减压病兔血清 NO 和 SOD 的含量变化及其意义[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志,2003,12 (2) : 100-102
Xi Yun-ping, Liu He-ping, Xu Chuan-xi, et al. Changes of nitric oxide and superoxide dismutase in the serum of rabbits with experimental decompression Sickness [J]. Chin J Naut Med & Hyperbar Med, 2003,12 (2) : 100-102