

· 实验研究 ·

高氧致新生鼠肺损伤时肾组织 一氧化氮及氧自由基的变化

刘雪雁, 吴捷, 薛辛东

(中国医科大学附属第二医院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] **目的** 观察持续吸入高氧致新生大鼠肺损伤时肾组织自由基的变化,以探讨高氧对肾脏的损伤。**方法** 采用高氧致新生鼠肺损伤的模型,将足月新生鼠生后分别在90%±5%氧气($n=140$)和正常空气($n=88$)中持续暴露,于1,3,7,14,21 d各处死8只,用分光光度计比色法动态测定肺和肾组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)含量的变化。**结果** 高氧暴露3 d肺组织SOD的活性开始增高,7 d时明显高于对照组(214 ± 19 KNU/g vs 186 ± 19 KNU/g, $P < 0.01$),并逐渐增高持续至14 d (220 ± 15 KNU/g vs 197 ± 21 KNU/g, $P < 0.05$)和21 d (251 ± 15 KNU/g vs 195 ± 8 KNU/g, $P < 0.01$);MDA含量于高氧暴露3 d开始增高并高于对照组(28.1 ± 2.0 $\mu\text{mol/g}$ vs 21.1 ± 1.3 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$),7 d最高(30.8 ± 4.2 $\mu\text{mol/g}$ vs 19.9 ± 2.2 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$),14 d虽有下降但仍高于对照组(26.3 ± 3.8 $\mu\text{mol/g}$ vs 22.6 ± 2.3 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$);NO水平则于7 d时有所增高并高于对照组(99 ± 8 $\mu\text{mol/g}$ vs 89 ± 8 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$),14 d (128 ± 34 $\mu\text{mol/g}$ vs 93 ± 17 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$)和21 d (171 ± 34 $\mu\text{mol/g}$ vs 106 ± 25 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$)仍高于对照组。而高氧组肾组织SOD活性的改变与对照比较无差异,MDA和NO含量改变较肺晚,于吸高氧14 d时高于对照(分别为 24.1 ± 5.0 $\mu\text{mol/g}$ vs 16.0 ± 1.9 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$; 286 ± 71 $\mu\text{mol/g}$ vs 222 ± 45 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$),21 d仍高于对照(分别为 16.5 ± 2.2 $\mu\text{mol/g}$ vs 13.0 ± 2.7 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$; 298 ± 65 $\mu\text{mol/g}$ vs 204 ± 49 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$)。**结论** 高氧致新生大鼠肺损伤时可进一步诱发肾组织的自由基损伤,但其发生滞后于肺组织。

[中国当代儿科杂志,2005,7(1):71-74]

[关键词] 高氧;肺损伤;肾脏;自由基;大鼠,新生

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)01-0071-04

Changes of nitric oxide and oxygen free radical in the kidney of neonatal rats with prolonged hyperoxic lung injury

Xue-Yan LIU, Jie WU, Xin-Dong XUE. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: liu_xueyan2004@hotmail.com)

Abstract: Objective To examine the changes of nitric oxide and oxygen free radical in the kidneys of neonatal rats with lung injury induced by prolonged hyperoxia in order to study the induction of renal damage by prolonged hyperoxic exposure. **Methods** Full-term newborn rats were continuously exposed to oxygen (90%±5% O₂, $n=140$) or room air (21% O₂, $n=88$) after birth. Dynamic changes of superoxide dismutase (SOD) activity and content of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) in the lung and kidney were monitored by spectrophotometer on days 1, 3, 7, 14 and 21 in the Hyperoxia and Control group. **Results** In the Hyperoxia group, SOD activity in lungs began to increase on the 3rd day, and significantly higher than that of controls on the 7th day (214 ± 19 KNU/g vs 186 ± 19 KNU/g, $P < 0.01$), 14th day (220 ± 15 KNU/g vs 197 ± 21 KNU/g, $P < 0.05$) and 21th day (251 ± 15 KNU/g vs 195 ± 8 KNU/g, $P < 0.01$). The MDA level in the lungs increased on the 3rd day (28.1 ± 2.0 $\mu\text{mol/g}$ vs 21.1 ± 1.3 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$) and reached a peak on the 7th day (30.8 ± 4.2 $\mu\text{mol/g}$ vs 19.9 ± 2.2 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$), then decreased but still remained higher than controls on the 14th day (26.3 ± 3.8 $\mu\text{mol/g}$ vs 22.6 ± 2.3 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$). The NO level began to increase and was higher than controls on the 7th day (99 ± 8 $\mu\text{mol/g}$ vs 89 ± 8 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$), and 14th day (128 ± 34 $\mu\text{mol/g}$ vs 93 ± 17 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$) and 21st day (171 ± 34 $\mu\text{mol/g}$ vs 106 ± 25 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$). In the kidney,

[收稿日期] 2004-04-20; [修回日期] 2004-07-26

[基金项目] 辽宁省博士科研启动基金(编号:20031041)。

[作者简介] 刘雪雁(1973-),女,博士在读,讲师。主攻方向:新生儿急救。

[通讯作者] 刘雪雁,中国医科大学第二附属医院儿科,邮编:110004。

although there was little difference in SOD activities between two groups, the levels of MDA and NO increased on the 14th day ($24.1 \pm 5.0 \mu\text{mol/g}$ vs $16.0 \pm 1.9 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$; $286 \pm 71 \mu\text{mol/g}$ vs $222 \pm 45 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$), continuously to 21st day ($16.5 \pm 2.2 \mu\text{mol/g}$ vs $13.0 \pm 2.7 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$; $298 \pm 65 \mu\text{mol/g}$ vs $204 \pm 49 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$). These changes appeared later than in the lungs. **Conclusions** Renal damage can be induced by prolonged hyperoxia exposure and be developed behind lung injury in neonatal rats.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(1):71-74]

Key words: Hyperoxia; Lung damage; Kidney; Free radical; Rat, neonatal

氧疗法是改善机体缺氧状态的一项重要措施,但长时间吸入高氧会导致不同程度的肺损伤,甚至发展成慢性肺疾病(chronic lung disease, CLD)。除局部肺组织病变外,关于高氧对视网膜、脑以及肝肠组织等远隔器官的损伤也有报道,但对肾组织的损伤未见研究。现研究认为肺部氧化应激反应参与介导高氧诱导未成熟肺损伤,本研究以高氧诱导 CLD 的新生大鼠为研究对象,动态观察肺损伤过程中肾组织一氧化氮(nitric oxide, NO)及氧自由基的变化,以探讨高氧对肾脏的损伤。

1 材料与方法

1.1 实验分组及动物模型的建立

50 只雌性大鼠体重达 250 g 左右后与雄性大鼠交配(4:1)。孕 21 d ~ 23 d 自然分娩的新生鼠生后 12 h 内随机分组(0 d):对照组($n = 88$)和高氧组($n = 140$)。高氧组置于氧箱(有机玻璃箱)中,氧浓度维持在 $(90 \pm 5)\%$,每日用数字式测氧仪监测, CO_2 浓度小于 0.5%,温度 25 ~ 26℃,湿度 60% ~ 70%,每天开箱 1 h,喂水及饲料,更换垫料,每天将母鼠与吸空气母鼠互换以避免代母鼠因氧中毒而致护理能力降低。对照组置于同一室内空气中,饲养条件与高氧组相同。于 1, 3, 7, 14, 21 d 分别从各组中随机抽取 8 只麻醉后,分离肺及肾组织,用冷生理盐水洗净右肺和肾组织的残血,吸干水分, - 80℃ 冷冻保存待测定。

1.2 肺和肾组织 NO、超氧化物歧化酶(superoxide

dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)的测定

取冻存的肺和肾组织 1 g 切碎,于冰盒内超声粉碎匀浆,制成 100 g/L 的组织匀浆,4℃ 低温离心后取上清液,分别采用南京建成生物工程研究所的 NO、SOD 及 MDA 试剂盒检测以上指标,应用紫外/可见分光光度计(法国 500-P 型)比色,考马斯亮蓝法测定组织蛋白含量,依据公式计算得出各指标数据。

1.3 统计学处理

所有数值均用 SPSS 10.0 统计软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本均数的比较用 t 检验;多组间比较采用方差分析,两两比较用 SNK- q 检验。

2 结果

2.1 肺组织 SOD 活性和 NO、MDA 含量

高氧暴露 3 d 开始 SOD 的活力增高,但与对照组相比差异无显著性意义。7 d 时明显高于对照组($t = 1.00$, $P < 0.01$),并逐渐增高持续至 14 d ($t = 0.29$, $P < 0.05$)和 21 d ($t = 0.42$, $P < 0.01$);而 MDA 的含量,吸入高氧 3 d 时即增高并高于对照组($t = 0.21$, $P < 0.05$),7 d 最高,14 d 虽有下降,但仍高于对照组($t = 0.06$, $P < 0.05$);NO 水平则于 7 d 时有所增高并高于对照组($t = 0.93$, $P < 0.05$),直至 14 d ($t = 0.05$, $P < 0.05$)和 21 d ($t = 0.07$, $P < 0.01$)仍高于对照组。见表 1。

表 1 肺组织 SOD 活性和 MDA、NO 含量在不同吸氧时间的动态变化

Table 1 Dynamic changes of lung SOD activity and MDA, NO level ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

吸氧时间(d)	SOD (KNU/g)		MDA ($\mu\text{mol/g}$)		NO ($\mu\text{mol/g}$)	
	对照组	高氧组	对照组	高氧组	对照组	高氧组
1	181 $\pm$ 22	183 $\pm$ 4	21.7 $\pm$ 1.0	22.8 $\pm$ 3.4	73 $\pm$ 16	72 $\pm$ 14
3	190 $\pm$ 10	200 $\pm$ 13 ^c	21.1 $\pm$ 1.3	28.1 $\pm$ 2.0 ^{a,c}	74 $\pm$ 11	77 $\pm$ 19
7	186 $\pm$ 19	214 $\pm$ 19 ^b	19.9 $\pm$ 2.2	30.8 $\pm$ 4.2 ^b	89 $\pm$ 8	99 $\pm$ 8 ^{a,c}
14	197 $\pm$ 21	220 $\pm$ 15 ^a	22.6 $\pm$ 2.3	26.3 $\pm$ 3.8 ^a	93 $\pm$ 17	128 $\pm$ 34 ^a
21	195 $\pm$ 8	251 $\pm$ 15 ^b	20.0 $\pm$ 2.1	23.3 $\pm$ 4.8	106 $\pm$ 25	171 $\pm$ 34 ^b

与对照组比较, a $P < 0.05$; b $P < 0.01$; c 与前一时间高氧组比较 $P < 0.05$

3.2 肾组织 SOD 活性和 NO、MDA 含量

随吸氧时间的延长,高氧组肾组织 SOD 的活性较对照组虽有增高趋势,但无差异;而 MDA 含量在 14 d 时增高并明显高于对照组 ($t = 0.32, P <$

0.01), 21 d 时虽有下降,但仍高于对照组 ($t = 0.71, P < 0.05$); NO 含量的变化趋势同 MDA,于吸氧 14 d 时高于对照组 ($t = 0.08, P < 0.05$), 21 d 仍明显较对照组增高 ($t = 0.29, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 肾组织 SOD 活性和 MDA、NO 含量在不同吸氧时间的动态变化
Table 2 Dynamic changes of kidney SOD activity and MDA and NO levels ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

吸氧时间(d)	SOD (KNU/g)		MDA ($\mu\text{mol/g}$)		NO ($\mu\text{mol/g}$)	
	对照组	高氧组	对照组	高氧组	对照组	高氧组
1	247 $\pm$ 49	247 $\pm$ 54	18.6 $\pm$ 4.3	16.1 $\pm$ 5.9	154 $\pm$ 9	160 $\pm$ 10
3	232 $\pm$ 41	258 $\pm$ 35	13.5 $\pm$ 5.0	17.3 $\pm$ 3.4	185 $\pm$ 38	182 $\pm$ 56
7	221 $\pm$ 19	273 $\pm$ 69	15.3 $\pm$ 3.7	18.6 $\pm$ 4.9	219 $\pm$ 15	233 $\pm$ 59
14	266 $\pm$ 9	293 $\pm$ 35	16.0 $\pm$ 1.9	24.1 $\pm$ 5.0 ^{b,c}	222 $\pm$ 45	286 $\pm$ 71 ^a
21	278 $\pm$ 27	289 $\pm$ 12	13.0 $\pm$ 2.7	16.5 $\pm$ 2.2 ^a	204 $\pm$ 49	298 $\pm$ 65 ^b

与对照组比较, ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$; ^c 与前一时间高氧组比较 $P < 0.05$

3 讨论

虽然 CLD 的发病机制仍不十分清楚,但活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及其诱导的脂质过氧化、蛋白氧化和 DNA 损伤在肺损伤中的作用一直受到关注。有研究发现,MDA 是高氧致肺早期损伤的一个敏感指标^[1],本研究也证实,吸入高氧后,MDA 水平早期升高,达到高峰后,逐渐下降趋于对照组,与以往报道类似^[1]。近年的研究结果表明,NO 这种新型细胞信使分子也是一种自由基,容易与氧、超氧化物自由基、过渡金属离子等起反应,因此在高氧情况下,NO 可产生高活力有害物质对未成熟的肺造成不同程度的损伤^[2]。国内学者研究表明高氧可上调早产大鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 NO 含量及肺炎细胞、上皮细胞一氧化氮合酶的表达^[3],本研究进一步证实,高氧可引起新生鼠肺组织 NO 含量的增加,但其发生较 MDA 增高迟并且持久,提示 NO 体系参与的高氧肺损伤是一复杂的病理生理过程。肺抗氧化酶发育在新生儿期仍处于未成熟阶段,但当吸入高氧而产生大量 ROS 时,也要作出保护性反应。有研究发现,高氧可诱导 SOD mRNA 表达^[4]。本研究表明,新生鼠吸入高氧早期 SOD 活性开始升高,7 d 时 SOD 活性高于对照组,随着高氧暴露时间的延长,SOD 活性的升高可能恰是对高氧后 ROS 产生增加的一种适应反应,但随着 ROS 的大量产生超过抗氧化系统的清除能力,或者抗氧化防御启动落后,均可能造成氧化/抗氧化失

衡,导致氧化应激性肺损伤。

新生儿缺氧、缺血可引起肾组织的自由基损伤,而吸入高氧后,除局部肺组织病变外,肾组织能否发生自由基损伤至今未见研究。新生儿肾单位发育未完善,在活性肾发生区内仍有处于发育中的肾小球和小管,这与肺脏很相似,因此,本研究在观察高氧肺损伤的同时,也观察了肾组织的氧化应激状态。结果发现 SOD 的活性与对照组相比无差异,MDA、NO 含量在吸入高氧 7 d 内无明显变化,14 d 时方明显增高。这提示,高氧肺损伤时,肾组织存在自由基损伤,但发生时间滞后于肺损伤,其发生机制考虑有以下几种可能性:(1)吸入高氧本身对肾脏的影响:肾脏是一个高灌注器官,虽然吸入高氧只增加溶解状态氧而不能明显改变氧含量,但由于肾特殊的血管排列,高氧使肾局部的氧分压 (PO_2) 增高,而高 PO_2 具有潜在的血管收缩作用,可使总肾血流减少^[5]。此外,吸入氧浓度还可直接通过影响肾交感神经活性、血液循环中的激素水平、局部因素等多种途径而改变肾的血液动力。这种防御反应,在减少过多的氧进入肾组织的同时,也导致了肾缺血,从而引起肾组织氧自由基损伤。(2)高氧诱导肺部的氧化应激反应,MDA、NO 等自由基大量生成并释放入血,引发肾组织的自由基损伤。(3)高氧可触发肺部炎症反应,使大量的细胞因子、炎症介质、蛋白酶类等释放入血,进一步活化炎性细胞,通过呼吸暴发、脱颗粒、释放氧自由基而致肾组织自由基损伤。(4)高氧诱发的 CLD 可引起细胞外基质重建,最终发生肺纤维化,肺部通气和换气功能的障碍和通气/

血流比例的失调,必将造成周身各个脏器的供氧不足,从而导致肾组织的继发损伤。肾组织的自由基损伤可能正是上述诸多的因素相互作用的结果,因为肾组织自由基损伤滞后于肺,推测可能主要由高氧肺损伤所诱导,但是否引起病理学改变尚待研究。

吸入高浓度氧不但可引起新生动物局部肺组织的损伤,对其它远隔器官亦可能造成不同程度地损害,因此在临床工作中,积极防治早产儿 CLD 的同时,也不能忽略高氧对肾脏及其他器官的损伤。

[参 考 文 献]

[1] Qian L-L, Chang L-W, Zhang Q-S, Rong Z-H. Lung injury of pre-

term rats induced by prolonged exposure to high oxygen concentration of 85% [J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(2): 95-99.

[2] Narula P, Xu J, Kazzaz JA, Robbins CG, Davis JM, Horowitz S. Synergistic cytotoxicity from nitric oxide and hyperoxia in cultured lung cells [J]. Am J Physiol, 1998, 274 (3 Pt 1): L411-L416.

[3] 马丽亚, 常立文, 全裕凤. 高浓度氧对早产鼠肺一氧化氮合酶表达的影响 [J]. 中国当代儿科杂志, 2001, 3(3): 232-235.

[4] Ho YS, Dey MS, Crapo JD. Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hyperoxia [J]. Am J Physiol, 1996, 270 (5 Pt 1): L810-L818.

[5] Flemming B, Seeliger E, Wronski T, Steer K, Arenz N, Persson PB. Oxygen and renal hemodynamics in the conscious rat [J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11(1): 18-24.

(本文编辑:钟乐)

· 会议纪要 ·

第三届全国婴儿高压氧舱治疗新生儿缺氧缺血性脑病 协作组研讨会会议纪要

2004年11月23日在长沙举行了第三届全国婴儿高压氧舱治疗新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)协作组会议,大部分协作组成员负责人和全国新生儿脑损伤专家研讨会的全体专家出席了本次会议。

杨于嘉教授对协作组过去2年的工作作了小结,提出了存在的问题和面临的困难。在过去2年中,主要由于HIE纳入标准过严,经费短缺和家长不合作等原因,不少医院1年中无符合纳入标准的病例。但与代表与专家一致认为协作组的工作是很有意义的,一定要坚持下去。高压氧治疗新生儿HIE是否有效,目前尚无科学的、使人信服的证据。只有通过多中心协作,合理的科研设计进行前瞻性的临床研究才能获得符合循证医学原则的科学结论。这样的结论无论是阴性还是阳性对临床均具有重要指导意义。纳入标准宜适当放宽,可分组总结。本次新生儿脑损伤会上修订的HIE诊断标准既考虑到与国际接轨,又结合我国国情,作为协作组纳入病例的依据是合理的。通过本次会议,协作组有决心将本课题进行到底。

(祁伯祥 整理)