

• 论著 •

茶多酚对急性呼吸窘迫综合征兔肺抗氧化作用的研究

龚裕强¹, 施小燕², 陈毅军², 孙来芳¹, 应斌宇¹, 陈大庆¹, 庄 荣¹

(1. 温州医学院附属第二医院, 浙江 温州 325027; 2. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009)

【摘要】 目的 观察雾化吸入茶多酚对急性呼吸窘迫综合征(ARDS)动物模型的干预效果,探讨其对 ARDS 兔肺的抗氧化作用机制。方法 静脉注射油酸建立兔 ARDS 模型。将 24 只日本大耳白兔随机均分为对照组、雾化 A 组和雾化 B 组。对照组采用机械通气+雾化吸入生理盐水 4 ml/kg;雾化 A 组采用机械通气+雾化吸入茶多酚 25 mg/kg;雾化 B 组采用机械通气+雾化吸入茶多酚 50 mg/kg。机械通气 4 h 后处死各组动物,取右下叶中部组织,测定丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和还原型谷胱甘肽(GSH)水平;取左肺下叶中部组织观察病理学变化。结果 两个雾化组机械通气 4 h 后动物动脉血氧分压(PaO₂)均明显高于对照组,二氧化碳分压(PaCO₂)均明显低于对照组(P 均 <0.01),但两个雾化组间比较差异却无统计学意义(P 均 >0.05)。两个雾化组间肺组织病理学改变基本相似;对照组肺组织病理学改变要明显比两个雾化组严重。与对照组比较,两个雾化组 MDA 水平均显著降低[A 组(389.58±4.71)μmol/g, B 组(213.84±43.25)μmol/g, 对照组(648.12±8.23)μmol/g, $P<0.05$ 和 $P<0.01$], SOD 活性均显著升高[A 组(45.43±5.27)kU/g, B 组(40.46±4.35)kU/g, 对照组(12.59±3.36)kU/g, P 均 <0.01], GSH 也均显著升高[A 组(88.52±7.29)μg/g, B 组(116.34±9.33)μg/g, 对照组(64.03±8.17)μg/g, $P<0.05$ 和 $P<0.01$], 且雾化 B 组 MDA 降低及 GSH 升高的水平较雾化 A 组更显著(P 均 <0.05)。结论 茶多酚通过其抗氧化作用可以减轻 ARDS 肺组织病理学改变,改善 ARDS 的临床表现。

【关键词】 茶多酚; 急性呼吸窘迫综合征; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 还原型谷胱甘肽

中图分类号: R285.5; R256.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2008)02-0092-03

A study of tea polyphenol on antioxidative action of lung in rabbits with acute respiratory dysfunction syndrome GONG Yu-qiang¹, SHI Xiao-yan², CHEN Yi-jun², SUN Lai-fang¹, YING Bin-yu¹, CHEN Da-qing¹, ZHUANG Rong¹. 1. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310009, Zhejiang, China

Corresponding author: SHI Xiao-yan (Email: xys0571@hotmail.com)

【Abstract】 Objective To observe the interference effect of tea polyphenol atomization on the animal model with acute respiratory dysfunction syndrome (ARDS) and approach its mechanism in the anti-oxidative effect on the lung in rabbits with ARDS. **Methods** An ARDS model of rabbit was established by injecting oleic acid via vein, and 24 rabbits were randomly divided into three groups ($n=8$ in each group): control group received mechanical ventilation (MV) and routine treatment, group A of atomization received MV and 25 mg/kg tea polyphenol and group B of atomization received MV and 50 mg/kg tea polyphenol given by atomization after ARDS models were induced. Both group A and B received all the other treatment the same as that of the control group. Animals were killed four hours after beginning of MV and tissue samples were taken from the middle part of the right lower lung to detect malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and reduced glutathione hormone (GSH) concentrations. Another tissue samples were harvested from the middle part of the left lower lung to observe pathologic changes. **Results** After MV for 4 hours, in both atomization groups, the arterial blood partial oxygen pressure (PaO₂) was found higher and the arterial blood partial carbon dioxide pressure (PaCO₂) was lower obviously than those of the control group (both $P<0.01$). However, there were no statistically significant differences found between atomization groups ($P>0.05$). The pathological changes were found severer in the control group than those in the two atomization groups and no significant differences in pathological changes were found between the two atomization groups. Compared with the control group, MDA level was significantly lower in both the atomization groups, statistically [group A: (389.58±4.71)μmol/g, B group: (213.84±43.25)μmol/g, control group: (648.12±8.23)μmol/g, $P<0.05$ and $P<0.01$]; SOD activity was significantly higher in both the atomization groups, statistically [A group: (45.43±5.27)kU/g, B group: (40.46±4.35)kU/g, control group: (12.59±3.36)kU/g, both

$P < 0.01$); GSH level was significantly higher in both the atomization groups, statistically [A group: $(88.52 \pm 7.29) \mu\text{g/g}$, B group: $(116.34 \pm 9.33) \mu\text{g/g}$, control group: $(64.03 \pm 8.17) \mu\text{g/g}$, $P < 0.05$ and $P < 0.01$]. At the same time, significantly, lower level in MDA and higher level in GSH were found in B group compared with those in A group (both $P < 0.05$). **Conclusion** Tea polyphenol may reduce the pathological changes of ARDS lung and improve the clinical manifestations of ARDS by its anti-oxidation effect on ARDS lung.

【Key words】 tea polyphenol; acute respiratory distress syndrome; malondialdehyde; superoxide dismutase; reduced glutathione hormone

茶多酚为茶叶中的主要有效成分,其具有抗氧化、抗脂质过氧化和清除自由基等广泛的药理作用;急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是临床比较常见的急危重症,是目前重症加强治疗病房(ICU)的主要病种之一。据北京地区调查,ARDS 患者占同期 ICU 收治危重患者的 4.5%^[1],其发病原因、发病机制和病理生理尚未完全清楚,氧自由基及细胞因子仍是目前研究的热点和焦点。本实验旨在通过静脉注射(静注)油酸建立兔 ARDS 模型,检测肺组织中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)及还原型谷胱甘肽(GSH)的水平,探讨氧化/抗氧化平衡在兔 ARDS 中的作用,观察茶多酚雾化吸入对兔肺的保护作用,并初步探讨可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料:健康日本大耳白兔 24 只,雌雄各半,体重 $(2.50 \pm 0.45) \text{kg}$,由温州医学院实验动物中心提供。茶多酚由中国宁波保税区科博植物制品有限公司生产(批号:040816);MDA、SOD 和 GSH 试剂盒均由南京建成生物技术公司提供。

1.2 实验动物分组与 ARDS 模型制备:按随机数字表法将动物分为对照组、雾化 A 组(25 mg/kg 茶多酚雾化吸入)、雾化 B 组(50 mg/kg 茶多酚雾化吸入)3 组。经耳缘静注乌拉坦(1 g/kg)麻醉兔,分离并游离左侧颈动脉、右侧颈静脉和气管,右侧颈静脉内置入 22 号留置针用于持续静脉滴注(静滴)林格液;左侧颈动脉内插入 24 号留置针肝素帽封闭;选择气管环甲膜作 T 型切口,插入 4 号小儿气管插管。动物稳定后从左侧颈动脉取血进行血气分析并记录心率、呼吸频率;右侧颈内静脉注体积分数为 20%的乳化油酸 0.5 ml/kg,注射完毕后接呼吸机,予定容辅助通气,参数设定:呼吸频率 40 次/min,

吸/呼比(I/E)为 1:2,吸入氧浓度(FiO_2)为 0.60,呼气末正压(PEEP)为 0,根据血气分析调整潮气量(V_T)为 10~15 ml/kg,静注维库溴铵防止呼吸拮抗,如氧合指数($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) $< 200 \text{ mm Hg}$ (1 mm Hg = 0.133 kPa)说明 ARDS 模型建立成功。

1.3 实验干预:对照组成模后继续予呼吸机辅助通气,同时用生理盐水 4 ml/kg 雾化吸入,于实验 1、2、3 和 4 h 记录呼吸频率、心率及血气分析结果,机械通气 4 h 后结束实验。茶多酚雾化吸入组则雾化吸入茶多酚(用生理盐水稀释成 4 ml/kg),A 组剂量为 25 mg/kg,B 组为 50 mg/kg。

1.4 标本收集与检测:实验结束时静注氯化钾处死动物,开胸取右肺下叶中部组织,立即置 -80 °C 冰箱冻存待测 MDA、SOD 及 GSH,测定时经组织匀浆器用冰生理盐水制成体积分数为 10%的肺组织匀浆。硫代巴比妥酸法测定 MDA,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD,二硫代二硝基苯甲酸法测定 GSH,具体操作严格按照说明书进行。同时取左肺下叶中部组织,用体积分数为 10%的中性甲醛固定,常规石蜡包埋,切成 5 μm 厚切片,苏木素-伊红(HE)染色,普通光镜观察病理学变化。

1.5 统计学处理:使用 SPSS 12.0 统计软件进行数据处理。计量资料以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 one way ANOVA 分析及 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床表现:两组动物体重、各指标基础值、成模值间比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。与 ARDS 模型刚建立时比较,处死前实验组动物口唇和皮肤发绀明显加剧,大部分可出现肺部干湿性啰音、双侧胸膜摩擦音,甚至有心率下降,对照组较雾化组更加明显。

2.2 各组动脉血氧分压(PaO_2)和二氧化碳分压(PaCO_2)比较(表 1):两个雾化组 PaO_2 和 PaCO_2 于各时间点比较差异无统计学意义。通气 4 h 各组 PaO_2 均有不同程度下降,对照组较雾化组下降明

基金项目:浙江省中医药科研基金项目(2004C095);浙江省医药卫生科研基金项目(2004B095)

通讯作者:施小燕,Email: xys0571@hotmail.com

作者简介:龚裕强(1968-),男(汉族),浙江省人,医学硕士,副主任医师,Email: gyq12120@163.com.

显, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.01); 各组 PaCO_2 均有不同程度上升, 对照组较雾化组上升明显, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.01); 雾化 A 组与雾化 B 组 PaO_2 和 PaCO_2 比较差异均无统计学意义。

表 1 各组动物 PaO_2 和 PaCO_2 变化 ($\bar{x} \pm s$) mm Hg

指标	组别	动物数	1 h	2 h	3 h	4 h
PaO_2	对照组	8	110 ± 24	95 ± 25	70 ± 15	57 ± 14
	雾化 A 组	8	109 ± 28	92 ± 23	85 ± 25	83 ± 16 ^b
	雾化 B 组	8	112 ± 22	97 ± 21	88 ± 23	86 ± 20 ^b
PaCO_2	对照组	8	37 ± 10	42 ± 7	45 ± 12	73 ± 14
	雾化 A 组	8	48 ± 7	37 ± 8	45 ± 9	49 ± 10 ^b
	雾化 B 组	8	47 ± 9	39 ± 6	42 ± 10	51 ± 5 ^b

注: 与对照组同期比较, ^b $P < 0.01$

2.3 各组肺组织 MDA、SOD 和 GSH 比较(表 2): 与对照组比较, 两个雾化组的 MDA 水平均显著降低, 且雾化 B 组低于雾化 A 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 雾化组 SOD 水平均明显高于对照组, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.01), 但雾化 A 组与雾化 B 组间差异无统计学意义; 两个雾化组 GSH 水平明显高于对照组, 雾化 B 组高于雾化 A 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 各组动物肺组织 MDA、SOD 和 GSH 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	MDA ($\mu\text{mol/g}$)	SOD (kU/g)	GSH ($\mu\text{g/g}$)
对照组	8	648.12 ± 8.23	12.59 ± 3.36	64.03 ± 8.17
雾化 A 组	8	389.58 ± 4.71 ^a	45.43 ± 5.27 ^b	88.52 ± 7.29 ^a
雾化 B 组	8	213.84 ± 43.25 ^{bc}	40.46 ± 4.35 ^b	116.34 ± 9.33 ^{bc}

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与雾化 A 组比较, ^c $P < 0.05$

2.4 病理学改变: ①大体观察: 对照组肺组织可见弥漫性出血、充血、实变, 病变程度随动物重力体位逐渐加重, 表面渗出逐渐加剧, 在胸部病变较轻, 在背部病变较重; 与对照组比较, 雾化组出血、充血、实变程度较轻, 病变范围相对较小。②镜下观察: 对照组肺泡壁水肿、增厚, 肺泡壁内血细胞浸润、炎性细胞浸润, 肺间质水肿、增厚, 肺泡上皮肿胀, 部分肺泡萎陷, 甚至肺泡结构完全破坏, 肺间隔增宽。雾化组见肺泡壁内少量血细胞浸润、炎性细胞浸润, 少数肺泡壁水肿、增厚, 但不明显, 个别肺间质发现水肿、增厚, 肺泡上皮无肿胀, 肺组织完整性明显好于对照组, 肺间隔未见改变; 两个雾化组改变基本相似。

3 讨论

ARDS 的确切发病机制尚未完全阐明, 近来研究认为, 肺部炎性细胞聚集并释放炎症介质从而导致肺毛细血管膜通透性增高是 ARDS 的病理学标志, 氧自由基作为主要的炎症介质是造成肺血管损

伤的重要因素。体内氧化/抗氧化失衡在 ARDS 发病中起主要作用^[2]。正常情况下肺可以维持氧化和抗氧化的平衡, 当肺受到致病因素攻击时, 产生大量氧自由基而导致肺脏局部强烈的氧化应激反应, 造成急性肺泡损害, 并发展为 ARDS。

MDA 的含量反映脂质过氧化的速率和强度, 间接反映体内自由基的水平。肺是富含脂质的器官, 容易受到氧自由基的攻击, 形成脂质过氧化物, 脂质过氧化物进一步分解又能引起细胞的损伤。SOD 活性可反映组织内自由基水平及脂质过氧化程度^[3], 其高低可间接反映机体清除氧自由基能力。GSH 是人体内重要的抗氧化剂和自由基清除剂, 可反映机体内非酶类还原物质水平。在氧化应激状态下, GSH 与氧自由基结合, 消除其毒性作用。

茶多酚有抗氧化、抗脂质过氧化、清除自由基、抗突变和抗肿瘤形成等生物学活性和药理效应^[4-5]。本研究显示, 茶多酚雾化吸入对静注油酸导致的兔 ARDS 模型具有降低 MDA 生成作用, 且不同剂量间存在一定的量-效关系; 茶多酚有防止 SOD 降低作用, 虽然不同剂量组间差异无统计学意义, 可能与设定的剂量组少、剂量相差不大有关, 在我们前期测定炎症因子时也有类似现象^[6]; 茶多酚雾化吸入组的 GSH 含量要高于对照组, 且有量-效关系。

综上所述, 茶多酚雾化吸入可降低 ARDS 兔肺 MDA 水平, 提高 SOD 和 GSH 活性, 减轻 ARDS 肺病理改变, 改善 ARDS 临床表现, 提示茶多酚对肺的保护作用与其清除或抑制自由基有关。

参考文献

- [1] 北京市科委重大项目 MODS 课题组. 1998—2003 年北京地区重症加强治疗病房急性呼吸窘迫综合征的临床流行病学调查 [J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(4): 201-204.
- [2] 高晓玲, 刘卓拉. 氧自由基在急性肺损伤发病中的作用 [J]. 国外医学呼吸系统分册, 2002, 22(6): 310-312, 315.
- [3] 金建秋, 赵克森, 赵桂玲, 等. SOD 与 NaHCO_3 对重症失血性休克低血管反应性的影响 [J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(2): 144-147.
- [4] Nagai K, Jiang M H, Hada J, et al. Epigallocatechin gallate protects against NO stress-induced neuronal damage after ischemia by acting as an anti-oxidant [J]. Brain Res, 2002, 956(2): 319-322, 315.
- [5] Park Y H, Han D W, Sun H, et al. Protective effects of green tea polyphenol against reactive oxygen species-induced oxidative stress in cultured rat calvarial osteoblast [J]. Cell Biol Toxicol, 2003, 19(5): 325-337.
- [6] 龚裕强, 陈毅军, 施小燕, 等. 不同途径茶多酚对兔急性呼吸窘迫综合征肺保护的研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(3): 154-158.

(收稿日期: 2007-11-01)

(本文编辑: 李银平)