

巯基丙酰甘氨酸对严重烫伤延迟复苏大鼠氧自由基作用的观察

陈旭 覃凤均 孙永华

【摘要】 目的 观察严重烫伤大鼠延迟复苏后氧自由基的损伤及巯基丙酰甘氨酸(硫普罗宁)的保护作用。**方法** 制作大鼠 30% III 度烫伤模型,分为延迟复苏组、巯基丙酰甘氨酸治疗组,应用电子自旋共振仪(ESR)检测技术和传统间接检测手段,观察伤后 24、48 h 血浆及烧伤水肿液中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)变化,同时观察心、肝、肾、小肠的病理形态变化,检测血生化指标。设不烫伤大鼠为正常对照组。**结果** 延迟复苏组大鼠较正常对照组血浆 SOD 含量下降,血浆及水肿液 MDA 明显升高,各脏器病理形态及血生化指标明显改变。巯基丙酰甘氨酸治疗组大鼠较延迟复苏组 SOD 增高($P < 0.01$),血液及痂下水肿液 MDA 含量下降($P < 0.05$),脏器病理形态及血生化指标有所改善。**结论** 严重烫伤大鼠延迟复苏后存在氧化应激损伤,应用巯基丙酰甘氨酸治疗有一定保护作用。

【关键词】 烧伤; 氧化性应激; 脂质过氧化作用; 巯基丙酰甘氨酸

An observation of the effects of Tiopronin on oxygen free radicals in severely scalded rats receiving delayed fluid resuscitation CHEN Xu, QIN Feng-jun, SUN Yong-hua. Department of Burns, Beijing Ji Shui Tan Hospital, Beijing 100035, P. R. China

【Abstract】 Objective To observe the harmful effects of oxygen free radicals and the protective roles of Tiopronin in severely scalded rats after delayed fluid resuscitation. **Methods** Rats inflicted with 30% III degree scald on the back were employed as the model. They were divided into delayed resuscitation (D) and Tiopronin treatment (T) groups. The changes in superoxide dismutase (SOD) and malonyldialdehyde (MDA) in plasma and subeschar fluid were determined at 24 to 48 postburn hours (PBHs) by means of electron spin resonance (ESR) technique and other routine methods. And the pathomorphological changes in the heart, liver, kidneys and small intestine, and changes in the blood biochemical indices were simultaneously determined. Normal rats were taken as control group (N). **Results** The plasma SOD level was lower than that in N group, while the MDA content in plasma and subeschar fluid in D group was much higher than that in N group. Changes in all the blood biochemical and internal organ pathomorphology were more obvious in the D group. On the other hand, the rat plasma SOD level in T group increased obviously ($P < 0.01$) while the MDA contents was decreased in T group ($P < 0.05$) when compared with those rats of D group. In addition, the internal organ pathomorphology and blood biochemical indices were improved evidently in T group. **Conclusion** Oxidative stress injury was evoked in severely scalded rats after delayed fluid resuscitation, and it could be protected to some extent by Tiopronin.

【Key words】 Burn; Oxidative stress; Lipid peroxidation; Tiopronin

严重烧伤后延迟复苏是烧伤早期治疗中尚未解决的问题之一,它给后续治疗带来很大影响,甚至导致多器官功能衰竭,氧自由基、脂质过氧化在上述过程中起重要作用^[1,2]。既往的研究表明,有些药物在动物实验中有较好的抗氧化应激疗效^[3],但由于条件所限,目前尚无理想的抗氧化应激药物用于临床。巯基丙酰甘氨酸(硫普罗宁)为一种含游离巯基的甘氨酸衍生物,作为肝功能改善剂用于临床。实验研究证实它具有清除自由基和保护生物膜的功能,可用于重金属和药物的解毒,以及防止放疗、化疗引起的组织细胞损伤^[4,5]。本研究拟将其用于烧

伤治疗,观察用药后对机体及各脏器的保护作用,为严重烧伤延迟复苏的早期治疗提供新的依据。

· 材 料 与 方 法

一、动物模型与分组

1. 动物模型:Wistar 大鼠 40 只(北京生物制品研究所实验动物中心提供),雌雄不拘,体重 250 ~ 300 g,经 7 d 饲养后用于实验。事先在大鼠身上预置痂下水肿液收集滤网,适应 1 周后,大鼠经乙醚麻醉,背部剃毛,将背部置于 100℃ 水浴锅内浸烫 12 s,造成 30% TBSA III 度烫伤。动物饲养及实验观察均在二级动物室进行。

2. 动物分组:(1)正常对照组(8 只),置滤网但不烫伤。(2)延迟复苏组(16 只),烫伤后 6 h 开始

作者单位:100035 北京,积水潭医院烧伤科

按 Parkland 公式腹腔注射等渗盐水补液, 2 次/d。 (3) 巯基丙酰甘氨酸治疗组 (16 只), 烫伤后延迟复苏, 用巯基丙酰甘氨酸 (300 mg/kg) 腹腔注射, 2 次/d, 液体补充量同延迟复苏组。

二、观察指标及方法

对照组即刻、其他各组大鼠分别于伤后 24、48 h 取材 (每时相点 8 只), 在乌拉坦麻醉下取心血、痂下水肿液及心、肝、肾、小肠标本进行检测。

1. 血浆超氧化物歧化酶 (SOD) 含量测定: 以电子自旋共振仪 (ESR, GES-RE1X 型, 日本) 检测, 采用黄嘌呤氧化酶体系 DMSO 自旋捕捉方法。

2. 血浆、痂下水肿液丙二醛 (MAD) 检测: 采用比色法, 试剂盒由南京建成生物制品研究所提供。

3. 血浆丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸转移酶 (AST)、尿素氮 (BUN)、肌酐 (CR)、肌酸磷酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸磷酸激酶同工酶 (CK-MB)、α-羟丁酸脱氢酶 (α-HBD) 检测: 采用自动生化分析仪 (美国 MONRH 公司) 测定。

4. 病理学检查: 伤后 48 h 处死动物后, 立即取心、肝、肾、小肠组织, 用体积分数 10% 甲醛固定, 常规石蜡制片、HE 染色, 备光镜检查。另取各脏器标本, 经体积分数 3% 戊二醛酸、质量浓度 10 g/L 四氧化锇固定后, 在 TEM-1200EX 电镜下进行观察、照相。

三、统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行 *t* 检验。

结 果

1. 血浆 SOD 含量变化: 正常对照组 180.13 ± 5.91 NU/ml; 伤后 24 h, 延迟复苏组为 66.38 ± 4.72 NU/ml, 巯基丙酰甘氨酸治疗组为 152.13 ± 9.19 NU/ml, 与对照组比较, 差异有非常显著性意义 (*P* < 0.01, *t* > 3.17); 伤后 48 h, 延迟复苏组为 64.88 ± 4.72 NU/ml, 巯基丙酰甘氨酸治疗组为 155.25 ± 4.13 NU/ml, 与延迟复苏组比较, 差异有非常显著性意义 (*P* < 0.01, *t* > 3.29)。伤后延迟复苏组大鼠 SOD 含量较对照组明显下降, 使用巯基丙酰甘氨酸治疗后 SOD 含量上升, 与延迟复苏组比较, 差异有显著性意义 (*P* < 0.05), 但仍低于对照组。

2. 血浆及痂下水肿液 MDA 含量变化: 延迟复苏组大鼠血浆及痂下水肿液 MDA 含量均明显高于对照组, 巯基丙酰甘氨酸治疗组血浆及痂下水肿液 MDA 含量较延迟复苏组有所下降, 但仍高于对照组 (表 1)。

3. 脏器功能变化: 延迟复苏组大鼠血浆 ALT、AST、BUN、CRE、CK、LDH、α-HBD、CK-MB 水平明显

高于对照组。巯基丙酰甘氨酸治疗组脏器功能变化轻于延迟复苏组, 血浆 ALT、AST (24、48 h), BUN、CK (48 h) 及 α-HBD (24 h) 变化低于延迟复苏组, 但仍高于对照组, 其余指标与对照组比较, 差异无显著性意义 (*P* > 0.05), 见表 2、3。

表 1 烫伤大鼠痂下水肿液、血浆 MDA 水平变化 (nmol/ml, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The changes of MDA content in plasma and subeschar fluid in scalded rats (nmol/ml, $\bar{x} \pm s$)

Table with 5 columns: 组别, 鼠数, 检测样本, 伤后时间 (h) [24, 48]. Rows include 复苏组 and 治疗组 for 水肿液 and 血浆.

注: 对照组组织液 MDA 为 7.29 ± 4.28 μmol/L, 血浆 MDA 为 8.75 ± 4.15 μmol/L; 与对照组比较, * *P* < 0.01, *t* > 3.64; 与复苏组比较, # *P* < 0.05, *t* > 2.83

表 2 烫伤大鼠血浆 ALT、AST、BUN、CRE 水平变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The changes of plasma contents of ALT, AST, BUN and Cr in scalded rats ($\bar{x} \pm s$)

Table with 5 columns: 组别, 鼠数, 检测指标, 伤后时间 (h) [24, 48]. Rows include 复苏组 and 治疗组 for ALT, AST, BUN, and CRE.

注: 对照组 ALT 为 35.11 ± 6.71 U/L, AST 为 240.60 ± 78.66 U/L, BUN 为 5.39 ± 1.51 mmol/L, CRE 为 57.16 ± 8.83 μmol/L; 与对照组比较, * *P* < 0.01, *t* > 2.97; 与复苏组比较, # *P* < 0.05, *t* > 2.14

表 3 大鼠血浆 CK、LDH、α-HBD、CK-MB 水平变化 (U/L, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The changes of the plasma contents of CK, LDH, αHBDH and CK-MB in scalded rats (U/L, $\bar{x} \pm s$)

Table with 5 columns: 组别, 鼠数, 检测指标, 伤后时间 (h) [24, 48]. Rows include 复苏组 and 治疗组 for CK, LDH, α-HBD, and CK-MB.

注: 对照组 CK 为 571.75 ± 235.77 U/L, LDH 为 1 036.63 ± 257.31 U/L, α-HBD 为 490.00 ± 105.10 U/L, CK-MB 为 1 315.36 ± 352.81 U/L; 与对照组比较, * *P* < 0.01, *t* > 3.23; 与复苏组比较, # *P* < 0.05, *t* > 2.31

4. 各脏器病理形态学变化:对照组大鼠各脏器光镜及电镜下均未见明显异常;延迟复苏组大鼠可见肝细胞浊肿,细胞变性,肝窦扩张淤血,呈局灶性坏死(图 1);心肌细胞及小肠粘膜细胞水肿,炎性细胞浸润,小肠粘膜浅肌层坏死。巯基丙酰甘氨酸治疗组各脏器病理改变明显减轻(图 2)。

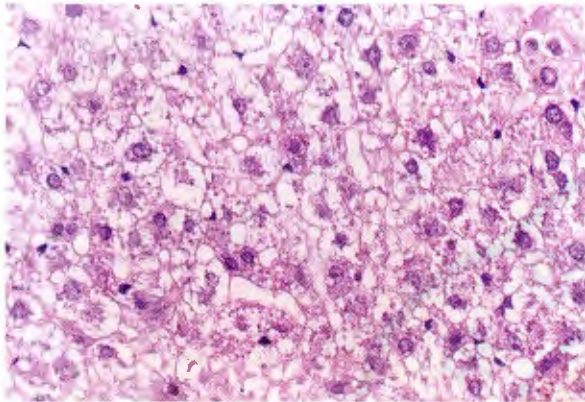


图 1 延迟复苏组大鼠可见肝细胞水肿、变性,呈局灶性坏死 HE $\times 20$

Fig 1 Hepatocytic edema, degeneration and focal necrosis could be identified in rats in D group HE $\times 20$

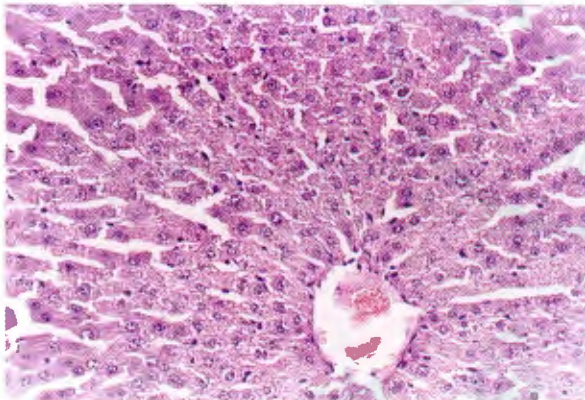


图 2 巯基丙酰甘氨酸治疗组大鼠肝组织损伤明显减轻 HE $\times 20$

Fig 2 Significant relieving of hepatic tissue injury could be determined in rats in T group HE $\times 20$

讨 论

巯基丙酰甘氨酸为一种含游离巯基的甘氨酸衍生物,能与自由基(如羟自由基 OH^- 、超氧自由基 O_2^- 、过氧化氢 H_2O_2 等)可逆性结合成二硫化物,作为一种自由基清除剂,在体内形成一个再循环的抗氧化系统。此外,巯基丙酰甘氨酸还可以激活铜、锌-SOD 酶,以增强其清除自由基的作用。

烫伤大鼠延迟复苏组痂下水肿液及血浆中 MDA 浓度明显升高,且两者水平相似,伤后 48 h 无下降趋势,提示延迟复苏的严重烫伤大鼠有全身性的氧化应激损伤。伤后 24 h,实质性脏器肝、心、肾组织切片均有病理性改变,以肝脏损伤最为明显。但延迟补液 48 h 后,脏器功能有逐渐恢复的趋势。严重烫伤后延迟复苏大鼠经巯基丙酰甘氨酸治疗,可见烧伤痂下水肿液及血浆中 MDA 含量下降,说明巯基丙酰甘氨酸对实质性器官有保护作用。

由于严重烧伤后血流重新分布以及体液大量渗出,使有效循环血量骤减,各脏器处于低灌注状态,造成主要器官缺血缺氧。虽然延迟复苏能部分改善组织供氧状态,但事实上形成了非典型的缺血再灌注模型,为氧自由基(OFR)的过量产生创造了有利条件。研究表明,烧伤延迟复苏组 SOD 消耗明显,抗氧化能力显著下降,而 MDA 含量大幅度增高,提示脂质过氧化反应增强。OFR 反应所导致的脂质过氧化无疑会损伤细胞膜性结构,同时与蛋白甚至核酸起反应,使之遭受氧化损伤,造成细胞变性、坏死、器官功能障碍。OFR 反应在烧伤后内脏器官损伤中起重要作用,被认为是多脏器系统功能衰竭(MSOF)的重要发病机制之一^[6]。巯基丙酰甘氨酸治疗组的大鼠机体抗氧化能力增强,MDA 含量显著下降,脏器结构和功能损伤减轻,说明巯基丙酰甘氨酸对烧伤大鼠的 OFR 有一定清除作用,对机体脏器有较好的保护作用,为烧伤治疗提供了新的思路。

参 考 文 献

- 1 Chen ZR, Xiong Y, Lou S, et al. Lipid peroxidation of mitochondrial membrane induced by DI: an organic solvent extractable component isolated from crude extract of burn eschar. Burns, 1996, 22: 369 - 375.
- 2 路卫,陈玉林,刘林,等. 烧伤休克延迟补液后氧自由基对心脏的损害. 中华整形烧伤外科杂志, 1995, 2: 112 - 114.
- 3 陈旭,覃凤均,程时,等. 锌-金属硫蛋白对严重烫伤大鼠氧自由基损伤的保护作用. 中华烧伤杂志, 2001, 6: 46 - 48.
- 4 唐望先,杜荔菁,张文英,等. 巯基丙酰甘氨酸对 D-氨基半乳糖所致肝损害保护作用. 中华肝病杂志, 1997, 5: 52 - 53.
- 5 杨磊,李宾,周一平. 烫伤豚鼠皮下水肿液收集动物模型的建立. 中华整形烧伤外科杂志, 1999, 7: 317.
- 6 杨红明,盛志勇,郭振荣,等. 严重烫伤大鼠延迟复苏后多器官损伤机制中的氧自由基作用. 中华整形烧伤外科杂志, 1995, 11: 106 - 111.

(收稿日期:2002-04-18)

(本文编辑:王旭)