

## 基础研究

## 氢气对急性肺损伤大鼠肺组织 p38 MAPK 活化的影响

梁灿鑫, 刘新伟, 刘玲, 何东伟

重庆医科大学附属第一医院麻醉科, 重庆 400016

**摘要:**目的 探讨氢气对脂多糖(LPS)诱导急性肺损伤大鼠的肺保护作用及其可能的分子生物学机制。方法 采用腹腔注射LPS法建立大鼠急性肺损伤模型。32只雄性SD大鼠(体质量200~250 g)随机分为4组( $n=8$ ):生理盐水组(SA组)、氢气吸入组(SH组)、急性肺损伤组(LA组)和急性肺损伤+氢气吸入组(LH组),氢气治疗为腹腔注射生理盐水或LPS后持续吸入混有低浓度氢气(2%)的空气6 h,用Western blot技术检测肺组织中p38 MAPK的表达,用ELISA法检测肺组织及血清中TNF- $\alpha$ 的浓度。结果 氢气吸入可以使肺组织中的活化的p38 MAPK明显降低,同时降低其下游因子TNF- $\alpha$ 在肺组织及血清中的浓度。结论 氢气吸入可下调肺组织及血清中TNF- $\alpha$ 的表达,此作用可能与抑制肺组织中p38 MAPK活化有关。

**关键词:**氢气;急性肺损伤;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;p38MAPK

中图分类号:R563 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)08-1211-03

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.08.32 http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20120716.1051.013.html

## Effect of hydrogen inhalation on p38 MAPK activation in rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury

LIANG Canxin, LIU Xinwei, LIU Ling, HE Dongwei

Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of hydrogen inhalation on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury (ALI) and the underlying molecular mechanisms. **Method** Thirty-two male SD rats were randomly divided into 4 groups ( $n=8$ ), namely the normal saline group (SA), saline with 2% hydrogen gas inhalation group (SH group), ALI group, and ALI with hydrogen inhalation group (LH group). In the two ALI groups, ALI was induced by intraperitoneal injection of 15 mg/kg LPS. Treatments with inhalation of 2% hydrogen gas for 6 h was administered after the injection of LPS or saline. The concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the lung tissue and serum were examined with ELISA. The expression of p38 MAPK in the lung tissue was detected by Western blotting. **Results** Hydrogen inhalation decreased the expression of p-p38 MAPK in the lung tissue, and significantly reduced TNF- $\alpha$  content in the lung tissue and serum of rats with ALI. **Conclusion** Hydrogen inhalation can decrease the expression of TNF- $\alpha$  in the lung tissue and serum, and this effect may be related with reduced p38 MAPK expression and inhibition of p38 MAPK activation.

**Key words:** hydrogen; acute lung injury; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; p38MAPK

氢气是体内一种重要的生理调节因子,能选择性降低活性氧中的羟自由基和过氧亚硝基阴离子<sup>[1]</sup>,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡的作用<sup>[2-4]</sup>。在急性肺损伤中,TNF- $\alpha$ 等炎症介质表达是肺损伤的主要原因之一。已有研究表明低浓度氢气对急性肺损伤有治疗作用,但具体机制尚不清楚。本研究参照Jesmin等<sup>[5]</sup>采用内毒素即脂多糖(LPS)腹腔注射的方法建立大鼠急性肺损伤(ALI)模型,观察低浓度氢气吸入对TNF- $\alpha$ 表达及p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)活化的影响,并探讨其可能的信号调控机制,将进一步阐明氢气下调促炎细胞因子表达的分子机制,为氢气治疗ALI提供理论依据。

## 1 材料

## 1.1 动物

健康清洁级SD雄性大鼠32只(体质量200~250 g),由重庆医科大学动物实验中心提供。

## 1.2 主要试剂

氢气(纯度>99.999%)由JK-300H氢气发生器产生(北京京科瑞达科技有限公司),LPS(*E.coli*, Sigma),兔抗大鼠p38 MAPK多克隆抗体和兔抗大鼠磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK)多克隆抗体均购自宜百康生物科技股份有限公司,辣根酶标记山羊抗兔IgG购自碧云天生物技术研究所,TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司。

## 2 方法

## 2.1 大鼠LPS性急性肺损伤模型和分组

采用随机数字表法将32只雄性SD大鼠(体质量

收稿日期:2012-05-08

作者简介:梁灿鑫,在读硕士研究生,医师,E-mail: 76353724@qq.com

通讯作者:刘新伟,硕士,主任医师,教授,E-mail: xxwliu@yahoo.com.cn

200~250 g)随机分为4组( $n=8$ ):生理盐水组(腹腔注射生理盐水+空气吸入)(SA组)、氢气吸入组(腹腔注射生理盐水+2%Vol氢气吸入)(SH组)、急性肺损伤组(腹腔注射脂多糖+空气吸入)(LA组)和急性肺损伤+氢气吸入组(腹腔注射脂多糖+2%Vol氢气吸入)(LH组),LA组和LH组由腹腔注射LPS 15 mg/kg,SA组和SH组腹腔注射同等剂量的生理盐水,腹腔注射完毕后立即暴露于不同的实验环境。SA组和LA组大鼠常规饲养6 h(吸入空气),SH组和LH组大鼠置于低浓度氢气环境(2%Vol氢气+空气)饲养6 h。

## 2.2 标本制备

各组动物观察6 h后,用水合氯醛(300 mg/kg,腹腔注射)麻醉,下腔静脉采血1 ml,离心(4000 r/min, 10 min),取上层血清冻存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱。同时快速剖胸取肺,在冰盘上迅速分离肺叶,右肺取出后立即置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱保存待测 p38 MAPK 和 p-p38 MAPK。左肺下叶置于4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋切片,用于光镜观察,其余肺组织冻存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱用于测定TNF- $\alpha$ 含量。

## 2.3 肺组织形态学观察

取左肺下叶石蜡包埋,切片,HE染色后,光镜下观察病理学结果。

## 2.4 肺组织及血清TNF- $\alpha$ 含量的测定

采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清和肺组织中TNF- $\alpha$ 的含量,试剂盒由北京四正柏生物科技有限公司提供。

## 2.5 Western blotting 法检测肺组织 p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 的表达

取肺组织20 mg匀浆,经RIPA裂解液提取蛋白,再用BCA法测定蛋白含量。测定蛋白含量后,计算含50  $\mu\text{g}$ 蛋白的溶液体积为上样量上样,经8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,用湿法将蛋白条带电转至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭1.5 h,兔抗大鼠 p38 MAPK 多克隆抗体(1:1000)或兔抗大鼠 p-p38 MAPK 多克隆抗体(1:1000)4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,辣根酶标记山羊抗兔IgG(1:1000)37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5 h,采用化学发光法显色,暗室中曝光、显影。抗兔GAPDH作为内参照校正加样蛋白浓度。采用Quantity One 4.6.2软件进行蛋白条带灰度分析,以反映p38 MAPK和p-p38 MAPK表达水平。

## 2.6 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,数据以均值 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析。

# 3 结果

## 3.1 光镜结果

SA组和SH组HE染色肺组织结构清晰,肺泡形态

未见异常;LA组肺组织可见弥散性水肿区,肺泡壁增厚,炎性细胞增多;LH组肺组织较LA组肺组织上述损伤程度减轻,见图1。

## 3.2 肺组织及血清中TNF- $\alpha$ 含量

ELISA检测表明,在LPS刺激后,TNF- $\alpha$ 在肺组织以及血清中的含量明显增加,和SA组大鼠肺组织及血清中TNF- $\alpha$ 含量相比,肺组织及血清中TNF- $\alpha$ 含量在SH组大鼠中均明显降低( $P<0.05$ );在给LPS刺激大鼠持续吸入低浓度氢气6 h后,肺组织及血清中TNF- $\alpha$ 含量较LA组大鼠肺组织及血清中TNF- $\alpha$ 含量均明显降低( $P<0.05$ ,表1)。

## 3.3 肺组织中 p38, p-p38 及 GAPDH(内参)表达

与SA组比较,SH组肺组织中p38 MAPK及p-p38 MAPK表达水平均降低。经LPS刺激后,LA组及LH组大鼠肺组织中p38 MAPK及p-p38 MAPK水平较SA组提高,而相比于LA组大鼠肺组织中p38 MAPK及p-p38 MAPK水平,LH组大鼠肺组织中p38 MAPK及p-p38 MAPK水平均明显降低(图2)。

# 4 讨论

急性肺损伤是临床上常见的危重病,是全身炎症反应综合征中最常见的器官组织损伤,虽然对其治疗已有很大进步,但死亡率仍高达35%~40%<sup>[6]</sup>。LPS是革兰氏阴性菌细胞壁组成成分,可通过激活多种效应细胞(如中性粒细胞)引起一系列级联反应,从而导致ALI的发生。

在本试验中,大鼠经腹腔注射LPS(15 mg/kg, IP)后,光镜下大鼠肺泡壁增厚,结构明显破坏,炎症细胞浸润明显增多,这些组织学变化提示大鼠发生了ALI。在给大鼠持续吸入低浓度氢气6 h后可以使上述指标明显改善,说明氢气明显抑制了肺部炎症细胞的浸润,改善了肺功能,对急性肺损伤有一定的保护作用。

在ALI早期,TNF- $\alpha$ 被认为是炎症反应中释放最早和最重要的内源性介质。TNF- $\alpha$ 可诱导肺泡上皮细胞产生多种细胞因子,介导炎症细胞浸润并产生肺组织损伤<sup>[6]</sup>。大鼠经LPS刺激后,肺组织及血清中TNF- $\alpha$ 含量明显增加,说明TNF- $\alpha$ 可导致ALI的炎症反应。本实验不仅证实了持续吸入低浓度氢气(2% Vol)能有效抑制ALI引起的炎症反应,同时也证实氢气对急性肺损伤的保护作用是通过降低肺组织及血清中TNF- $\alpha$ 含量(表1),这充分提示氢气对脂多糖性急性肺损伤的保护作用与降低肺组织及血清中TNF- $\alpha$ 的含量相关。

已证实MAPK信号通路在介导细胞外应激引起的细胞反应中起重要作用<sup>[7]</sup>。p38 MAPK是MAPK家族重要组成之一。有研究显示,LPS诱导ALI时,p38 MAPK被激活,这提示p38 MAPK通路有可能共同参与了炎症过程<sup>[8]</sup>。同样有研究发现,氢气对脓毒症导致的肺损伤具有保护作用<sup>[9-14]</sup>,这种保护机制可能与抑



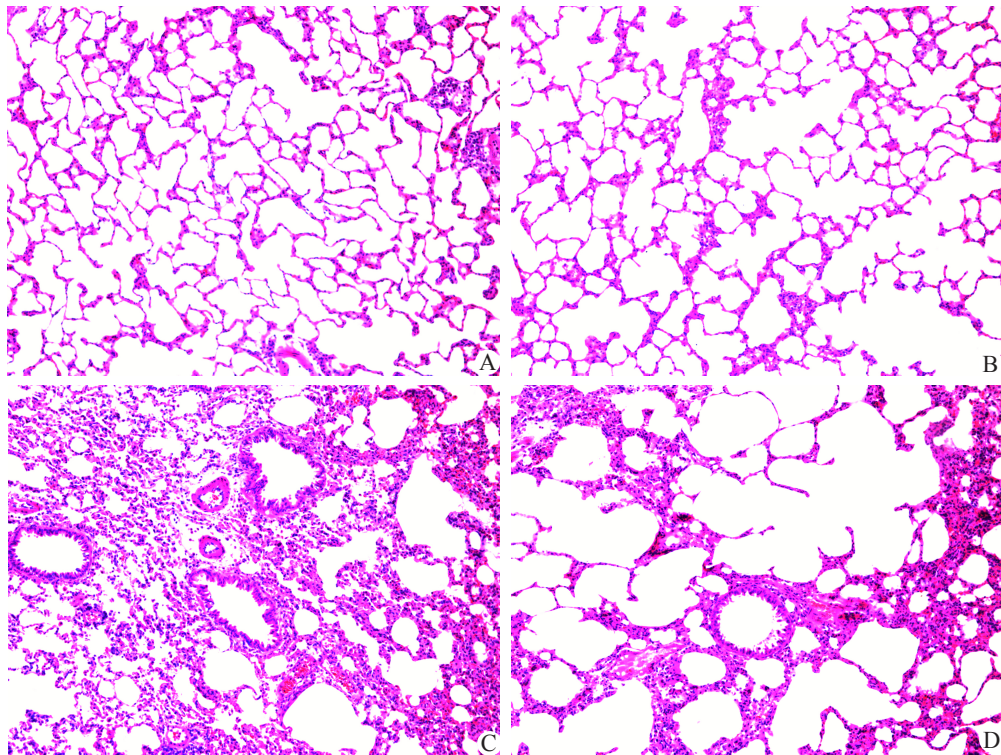


图1 实验处理6 h大鼠肺组织病理学改变

A: 生理盐水组大鼠肺组织病理切片HE染色光镜图; B: 氢气吸入组大鼠肺组织病理切片HE染色光镜图; C: 急性肺损伤组大鼠肺组织病理切片HE染色光镜图; D: 急性肺损伤+氢气吸入组大鼠肺组织病理切片HE染色光镜图

Fig.1 Pathological changes of the lung tissues at 6 h (HE staining, original magnification: ×100).

表1 血清及肺组织中TNF-α含量

Tab.1 Content of TNF-α in the lung tissue and serum (Mean±SD)

	SA组	SH组	LA组	LH组
肺组织 (pg/mg)	9.25±0.28	6.77±0.25**	16.27±0.39	12.54±0.28*
血清 (pg/ml)	19.53±2.07	9.94±0.37**	159.42±3.03	40.07±1.99*

与SA组比较, \*\*P<0.05; 与LA组比较, \*P<0.05

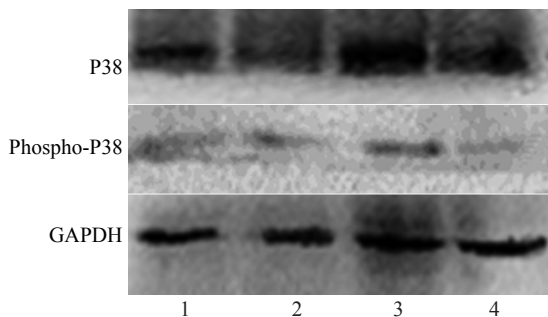


图2 Western blotting 检测肺组织中p38、p-p38、GAPDH蛋白的表达

1: 生理盐水组; 2: 氢气吸入组; 3: 急性肺损伤组; 4: 急性肺损伤+氢气吸入组

Fig.2 Expressions of p38, p-p38 and GAPDH in the lung tissue detected by Western blotting.

有可能参与了炎症反应过程,但关于氢气减轻急性肺损伤中炎症反应的机制缺少系统的解释。本实验采用采用LPS导致的急性肺损伤模型,结果表明持续吸入低浓度氢气(2% Vol)可抑制 p38 MAPK 激活及其下游 TNF-α表达并减轻肺部炎性粒细胞浸润,这表明氢气可能通过抑制 p38 MAPK 激活,减少其下游 TNF-α表达,从而减轻肺部炎性粒细胞浸润,发挥抗炎作用。另外本实验还意外地发现,持续吸入低浓度氢气可以降低肺组织内p38 MAPK 的表达,其具体机制仍有待进一步研究。

综上所述,持续吸入2%低浓度氢气可有效减轻内毒素所致急性肺损伤,对肺具有一定的保护作用,这种效应可能与其抑制 p38 MAPK 通路激活而下调其下游 TNF-α表达,从而抑制炎性细胞在肺组织的聚集、激活有关。

参考文献:

[1] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic Oxygen radicals[J]. Nat Med, 2007, 13(6): 688-94.

[2] Kawamura T, Huang CS, Tochigi N, et al. Inhaled Hydrogen gas therapy for prevention of lung transplant-induced ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Transplantation, 2010, 90(12): 1344-51.

[3] Huang CS, Kawamura T, Lee S, et al. Hydrogen inhalation ameliorates

制p38 MAPK活性有关<sup>[15]</sup>。本实验提示在LPS导致的ALI中,p38 MAPK被激活,这也提示p38 MAPK通路

(下转1217页)

部位深在,空间有限,巨大瘤体往往遮掩载瘤动脉及其分支而无法采用临时阻断技术。Lawton<sup>[9]</sup>报告的60例深低温停循环下行颅内巨大动脉瘤手术的病例中,有54例位于后循环,平均停循环时间为11 min,时间为7~53 min。由于深低温停循环技术操作复杂,费时,并发症多,阻碍了其广泛开展,但对于后循环的巨大动脉瘤的手术治疗,是一个值得注意的方向。Levati等<sup>[10]</sup>报告一组12例手术,停循环时间为(26.5±13.9) min,半年随访无死亡,9例恢复良好,1例轻度神经功能障碍,2例重度神经功能障碍。

根据有限的经验,我们认为,颅内巨大动脉瘤的手术治疗是对手术医师全方面的考验。为达到良好的治疗效果,手术医师必须具备两种能力:一是对各种形态的瘤夹的认识及空间想象力。在术中需备齐各种形态的瘤夹,手术医师对瘤颈的形态和瘤夹形态的适形做出最佳选择,是单夹、多夹、串列夹、并排夹等,并根据上夹的情况作出调整,直至达到最满意的夹闭效果。二是具备血管重建的能力。应熟练掌握动脉吻合和动脉缝合的技巧,以应对术中意外情况时的血管重建。

#### 参考文献:

[1] Sharma BS, Gupta A, Ahmad FU, et al. Surgical management of

giant intracranial aneurysms[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2008, 110(7): 674-81.

- [2] Mehta RI, Salamon N, Zipser BD, et al. Giant intracranial aneurysm [J]. *Radiographics*, 2010, 30(4): 1133-8.
- [3] Scozzafava J, Sutherland GA. Giant intracranial aneurysm [J]. *Cmaj*, 2011, 183(9): E604.
- [4] Ha SW, Jang SJ. Clinical analysis of giant intracranial aneurysms with endovascular embolization [J]. *J Cerebrovasc Endovasc Neurosurg*, 2012, 14(1): 22-8.
- [5] 漆松涛, 陈 状, 黄胜平, 等. 血管移植治疗颅内巨大蛇行动脉瘤1例及文献复习[J]. *中华神经外科杂志*, 2005, 21(11): 653-6.
- [6] Flamm ES. Suction decompression of aneurysms. Technical note [J]. *J Neurosurg*, 1981, 54(2): 275-6.
- [7] Li J, Lan ZG, Liu Y, et al. Large and giant ventral paraclinoid carotid aneurysms: Surgical techniques, complications and outcomes[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2012, 114(5): 427-528.
- [8] Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2012, 13(4): 267-78.
- [9] Lawton MT, Raudzens PA, Zabramski JM, et al. Hypothermic circulatory arrest in neurovascular surgery: evolving indication and predictors of patient outcome[J]. *N Neurosurg*, 1998, 43(1): 10-20.
- [10] Levati A, Tommasino C, Moretti MP, et al. Giant intracranial aneurysms treated with deep hypothermia and circulatory arrest[J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2007, 19(1): 25-30.

(编辑:吴锦雅)

(上接1213页)

- ameliorates ventilator-induced lung injury [J]. *Crit Care*, 2010, 14(6): R234.
- [4] Huang CS, Kawamura T, Peng X, et al. Hydrogen inhalation reduced epithelial apoptosis in ventilator-induced lung injury via a mechanism involving nuclear factor-kappa B activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 408(2): 253-8.
- [5] Jesmin S, Gando S, Zaedi S, et al. Differential expression, time course and distribution of four PARs in rats with endotoxin-induced acute lung injury[J]. *Inflammation*, 2007, 30(1-2): 14-27.
- [6] 贾雪梅, 杨光福. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征发病机制的研究进展[J]. *中国实用医药*, 2011, 6(32): 242-4.
- [7] 姚 琳, 余书勤, 张锡然. 内毒素诱导p38 MAPK信号转导作用的研究进展[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(12): 2357-62.
- [8] Schnyder-Candrian S, Quesniaux VF, Di Padova F, et al. Dual effects of p38 MAPK on TNF-dependent bronchoconstriction and TNF-independent neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome[J]. *J Immunol*, 2005, 175(1): 262-9.
- [9] Xie K, Yu Y, Pei Y, et al. Protective effects of hydrogen gas on

murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release[J]. *Shock*, 2010, 34(1): 90-7.

- [10] 谢克亮, 侯立朝, 王国林, 等. 氢气吸入对重度脓毒症小鼠血清高迁移率族蛋白B1水平的影响[J]. *浙江大学学报:医学版*, 2010, 39(5): 454-7.
- [11] 林淑芑, 孙雪峰, 陈香美, 等. 增龄对急性肺损伤大鼠肺组织ICAM-1和MCP-1表达的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(3): 584-7.
- [12] 邹豪杰, 马俊清, 严首春, 等. 盐酸戊乙奎醚联合地塞米松对大鼠内毒素性急性肺损伤的保护作用[J]. *实用临床医药杂志*, 2009, 13(9): 1-4.
- [13] 闫亚敏, 李忆东, 宋兴磊, 等. 雾化吸入肺表面活性物质对急性肺损伤大鼠血液氧合水平的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32(1): 1-4.
- [14] Qiu X, Li H, Tang H, et al. Hydrogen inhalation ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(12): 2130-7.
- [15] Itoh T, Fujita Y, Ito M, et al. Molecular hydrogen suppresses FcepsilonRI-mediated signal transduction and prevents degranulation of mast cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 389(4): 651-6.

(编辑:孙昌朋)