

• 论著 •

硫化氢逆转脂多糖诱导大鼠肺动脉低反应性
以及一氧化碳的关系

张晓静 孟祥艳 黄新莉 戴鸿雁 韦鹏 凌亦凌

【摘要】 目的 观察整体水平应用硫化氢(H_2S)后脂多糖(LPS)诱导的离体肺动脉对 H_2S 舒张反应的变化及其与一氧化碳(CO)的关系。方法 将 48 只大鼠按照随机数字表法分为对照组(给予生理盐水(NS))、LPS 组、 H_2S 供体硫氢化钠(NaHS)+LPS 组和 NaHS+NS 组 4 组,每组 12 只。采用经大鼠气管内滴注 LPS (0.8 ml/kg)染毒;NaHS+LPS 组和 NaHS+NS 组滴注 LPS 或 NS 之前 10 min 和之后 2 h 腹腔注射 NaHS 各 0.5 ml ($28\text{ }\mu\text{mol/kg}$)。各组取 6 只大鼠于染毒后 12 h 制备肺动脉环(PARs),采用离体血管环张力测定技术检测用血红素氧合酶-1(HO-1)抑制剂锌原卟啉Ⅸ(ZnPPⅨ)孵育前后 PARs 对累积浓度 NaHS 的舒张反应变化;各组另取 6 只大鼠于染毒后 12 h 检测出肺血(EPB)和入肺血(APB)中碳氧血红蛋白(COHb)含量,以其差值反映肺循环 CO 生成的水平。结果 与对照组相比,滴注 LPS 后 PARs 对 NaHS 的最大舒张反应百分比明显降低[(75.72 ± 7.22)%比(96.40 ± 4.40)%, $P<0.01$];用 ZnPPⅨ 孵育 PARs 后,LPS 诱导的 PARs 对 NaHS 舒张反应进一步降低[(62.91 ± 8.22)%比(75.72 ± 7.22)%, $P<0.01$]。腹腔注射 NaHS 可明显逆转 LPS 诱导的 PARs 对 NaHS 的低反应性,PARs 对 NaHS 的最大舒张反应百分比明显升高[(94.65 ± 8.45)%比(75.72 ± 7.22)%, $P<0.01$];但用 ZnPPⅨ 孵育 PARs 后,PARs 对 NaHS 的舒张反应较孵育前显著下降[(83.75 ± 9.76)%比(94.65 ± 8.45)%, $P<0.01$]。NaHS+NS 组中 PARs 对 NaHS 的舒张反应与对照组相比无明显差异,且在 ZnPPⅨ 孵育前后也无明显变化。COHb 检测结果显示,与对照组相比,滴注 LPS 后 APB 和 EPB 中 COHb 水平的差值明显增高[(3.12 ± 0.48)%比(2.12 ± 0.32)%, $P<0.05$];腹腔注射 NaHS 后,COHb 水平的差值[(4.03 ± 0.56)%]较 LPS 组进一步升高($P<0.01$)。结论 腹腔注射 H_2S 可以改善 LPS 诱导的离体肺动脉对 H_2S 的低反应性,其机制可能与增强肺动脉 HO-1/CO 体系有关。

【关键词】 硫化氢; 一氧化碳; 肺动脉; 脂多糖; 肺动脉高压

Administration of hydrogen sulfide intraperitoneally reverses the hyporesponsiveness of rat pulmonary artery induced by lipopolysaccharide and its relationship with carbon monoxide ZHANG Xiao-jing*, MENG Xiang-yan, HUANG Xin-li, DAI Hong-yan, WEI Peng, LING Yi-ling. * Faculty of Forensic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China
Corresponding author: LING Yi-ling, Email: lingyl2000@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of hydrogen sulfide (H_2S) on abnormal pulmonary artery reactivity induced by lipopolysaccharide (LPS) and its relationship with carbon monoxide (CO). **Methods** Forty-eight rats were divided into four groups randomly according to table of random number: control group (normal saline, NS), LPS group, a donor of H_2S sodium hydrosulfide (NaHS)+LPS group, and NaHS+NS group ($n=12$ in each group). Rats were given LPS by intratracheal instillation (0.8 ml/kg). 0.5 ml of NaHS ($28\text{ }\mu\text{mol/kg}$) was injected intraperitoneally 10 minutes before LPS or NS instillation and 2 hours after LPS or NS instillation in NaHS+LPS and NaHS+NS groups. Twelve hours after instillation of LPS, 6 rats from each group were sacrificed. The pulmonary artery rings (PARs) were prepared and the changes in cumulative relaxation response of PARs to NaHS were detected before and after incubation with an inhibitor of heme oxygenase-1 (HO-1) zinc protoporphyrin Ⅸ (ZnPPⅨ) using isolated vascular ring tension detecting technique. Twelve hours after LPS instillation, the remaining 6 rats in each group were sacrificed, and the contents of carboxyhemoglobin (COHb) in efferent pulmonary blood (EPB) and afferent pulmonary blood (APB) were measured, and the difference between the contents of COHb in EPB and that of APB was calculated to represent content of CO from pulmonary circulation. **Results** In the present study, compared with control group, after the instillation of LPS the percentage of relaxation response of PARs to NaHS was significantly declined [(75.72 ± 7.22)% vs. (96.40 ± 4.40)%, $P<0.01$]. After being incubated with ZnPPⅨ, the decreased relaxation response of PARs to NaHS induced by LPS was further depressed [(62.91 ± 8.22)% vs. (75.72 ± 7.22)%, $P<0.01$]. Administration of NaHS intraperitoneally reversed the hyporesponsiveness of PARs to NaHS, the percentage of relaxation response of PARs to NaHS was significantly increased [(94.65 ± 8.45)% vs. (75.72 ± 7.22)%, $P<0.01$]. However ZnPPⅨ also attenuated the effect [(83.75 ± 9.76)% vs. (94.65 ± 8.45)%, $P<0.01$]. NO significant changes were observed between NaHS+NS group and control group, also between the results before and after ZnPPⅨ incubation. Compared with control group, the difference between the contents of COHb in EPB and that of

APB increased after instillation of LPS [(3.12±0.48)% vs. (2.12±0.32)%, $P<0.05$], which further increased after intraperitoneal administration of NaHS [(4.03±0.56)%, $P<0.01$]. **Conclusion** The results suggested that intraperitoneal administration of H_2S could reverse hyporesponsiveness of PARs to H_2S induced by LPS, and the result might be related to an intensification of HO-1/CO system in pulmonary artery tissue.

【Key words】 Hydrogen sulfide; Carbon monoxide; Pulmonary artery; Lipopolysaccharide; Pulmonary artery hypertension

革兰阴性细菌内毒素的主要活性成分脂多糖(LPS)可引起肺动脉高压(PAH)^[1],其主要机制与肺动脉对舒血管物质如乙酰胆碱(ACh)的反应性下降及内皮细胞凋亡有关^[2-4]。硫化氢(H_2S)是继一氧化碳(CO)之后发现的又一种气体信号分子,它可直接作用于血管平滑肌上 ATP 敏感钾离子通道,促使平滑肌舒张^[5]。研究证实,在 LPS 作用下,大鼠肺动脉对 H_2S 的舒张反应降低,参与了 LPS 诱导的 PAH 形成^[6]。因此,探寻能够增强肺动脉对 H_2S 舒张反应的生物分子对于降低 LPS 引起的 PAH 具有重要意义。本室研究发现了 H_2S 除舒血管以外的另一个生物学作用,即在大鼠腹腔注射 H_2S 供体硫化钠(NaHS)可减轻 LPS 诱导的肺动脉损伤,改善肺动脉对 ACh 的低舒张反应性,抑制 PAH 的形成^[3,7-8],提示整体水平应用 H_2S 对于改善 LPS 诱导的血管反应性异常具有潜在作用。新近研究表明,CO 可增强 H_2S 舒张肺动脉的作用^[9],那么在整体应用 H_2S 调节离体肺动脉对 H_2S 反应性的过程中是否有 CO 的参与,也尚属未知。因此,本实验中将对上述问题进行探讨,以期对内毒素血症时 PAH 的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料: LPS、NaHS、锌原卟啉 IX (ZnPP IX)、消炎痛和苯肾上腺素(PE)均为美国 Sigma 公司产品。
1.2 实验动物及分组: 健康雄性 SD 大鼠 48 只,体重 220~270 g,由河北省实验动物中心提供,动物合格证号:1006174。按随机数字表法分为 4 组,每组 12 只。①对照组:经气管滴注无热原生理盐水(NS) 0.8 ml/kg;②LPS 组:经气管滴注 LPS 0.8 ml/kg;③NaHS+LPS 组:滴注 LPS 前 10 min 和滴注 LPS 之后 2 h 各经腹腔注射 0.5 ml NaHS 28 μ mol/kg;

④NaHS+NS 组:滴注 NS 前 10 min 和滴注 NS 之后 2 h 各经腹腔注射 0.5 ml NaHS 28 μ mol/kg。

1.3 大鼠离体肺动脉环(PARs)制备: 滴注 12 h 后各组取 6 只大鼠,颈动脉放血处死,取心、肺,置于新配制的 Krebs 液(血管环活性保护液,含 NaCl 120 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, $CaCl_2$ 2.5 mmol/L, KH_2PO_4 1.2 mmol/L, $NaHCO_3$ 25 mmol/L, $MgSO_4$ 1.2 mmol/L 和葡萄糖 11.1 mmol/L, pH 值 7.2~7.4)中,通入含 95% O_2 、5% CO_2 的混合气体。分肺动脉制成 2~3 mm 的 PARs。

1.4 大鼠离体血管环张力测定: 将分离后的血管环垂直悬挂于盛有 8 ml Krebs 液的浴槽中,用两个不锈钢针轻轻穿过血管环,一端固定于浴槽底部,另一端连接张力传感器。温度保持在 37 $^{\circ}C$ 左右,并持续通入上述混合气体,PARs 在 1.5 g 基础张力下平衡 1 h,期间每隔 15 min 换液 1 次,用 1 μ mol/L PE 检测血管环的反应性,待收缩反应曲线至平台后冲洗,确认其反应性稳定后开始实验:①向浴槽中加入 PE (1 μ mol/L)预收缩 PARs,待收缩反应曲线至平台后,给予 NaHS (50、100、150、200 μ mol/L),记录累积浓度舒张反应曲线。②加入血红素氧合酶-1 (HO-1)抑制剂 ZnPP IX,孵育 20 min 后,再加入 1 μ mol/L PE、NaHS (50、100、150、200 μ mol/L),记录累积浓度舒张反应曲线。实验结束后将血管环烘烤至恒重,记录干重。收缩反应结果用每毫克血管环干重的克张力(g/mg)表示。舒张反应结果以占 PE (1 μ mol/L)收缩值的百分比表示。

1.5 出肺血(EPB)和入肺血(APB)的采集及其碳氧血红蛋白(COHb)水平的检测: 每组另取 6 只大鼠,分别于滴注 12 h 后采血。采血前 30 min 经舌静脉注入肝素抗凝,颈部切口,分离右颈静脉插管至右心房,分离左颈动脉插管至主动脉根部,采集血液分别代表 APB 和 EPB,用一氧化碳-血氧分析仪检测 COHb 水平以代表 CO 含量(%),计算二者差值,即 EPB 中的 COHb(%)减去 APB 中 COHb(%)。

1.6 统计学处理: 数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,给药前后行配对 t 检验,组间差异用单因素方差

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.04.004

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30800440);河北省自然科学基金资助项目(C2007000830,C2008001040)

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学基础医学院法医学系(张晓静);武警医学院病理生理学教研室(孟祥艳);河北医科大学基础医学院病理生理学教研室(黄新莉、戴鸿雁、韦鹏、凌亦凌)

通信作者:凌亦凌,Email:lingyl2000@163.com

分析,有显著差异者用 Student-Newman-Kuels q 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 离体肺动脉对 H_2S 的舒张反应变化:与对照组相比,滴注 LPS 后 PARs 对 NaHS 的最大舒张反应百分比明显降低[(75.72±7.22)%比(96.40±4.40)%], $P < 0.01$], NaHS 累积浓度舒张反应曲线明显右移(图 1)。用 ZnPPⅩ 孵育 PARs 后,对照组 PARs 对 NaHS 的舒张反应无明显变化(图 2A)。LPS 诱导的 PARs 对 NaHS 的舒张反应进一步降低[(62.91±8.22)%比(75.72±7.22)%], $P < 0.01$], NaHS 累积浓度舒张反应曲线明显右移(图 2B)。腹腔注射 NaHS 可明显逆转 LPS 诱导的 PARs 对 NaHS 的低反应性,PARs 对 NaHS 的最大舒张反应百分比明显升高[(94.65±8.45)%比(75.72±7.22)%], $P < 0.01$], NaHS 累积浓度舒张反应曲线明显左移(图 1);但用 ZnPPⅩ 孵育 PARs 后,PARs 对 NaHS 的舒张反应百分比较孵育前显著下降[(83.75±9.76)%比(94.65±8.45)%], $P < 0.01$], NaHS 累积浓度舒张反应曲线明显右移(图 2C)。NaHS+NS 组中 PARs 对 NaHS 的舒张反应与对照组相比无明显变化(图 1),且在 ZnPPⅩ 孵育前后也无明显变化(图 2D)。

注:PARs,肺动脉环;NaHS,硫氢化钠;LPS,脂多糖;NS,生理盐水;与对照组比较,* $P < 0.01$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

图 1 各组离体大鼠 PARs 对不同累积浓度 NaHS 的舒张反应

2.2 APB 与 EPB 中 COHb 差值比较(表 1):与对照组相比,滴注 LPS 后 APB 和 EPB 中 COHb 差值明显增高($P < 0.05$)。腹腔注射 NaHS 后,COHb 差值较 LPS 组进一步升高($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠出肺血和入肺血中碳氧血红蛋白水平差值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	碳氧血红蛋白差值(%)
对照组	6	2.12±0.32
LPS 组	6	3.12±0.48 ^a
NaHS+LPS 组	6	4.03±0.56 ^{ab}
NaHS+NS 组	6	2.67±0.36 ^a

注:LPS,脂多糖;NaHS,硫氢化钠;NS,生理盐水;与对照组比较,* $P < 0.05$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.01$

3 讨论

本实验发现,滴注 LPS 后 PARs 对 H_2S 的舒张反应明显降低,这与本室以往研究结果一致。有文献报道,去除血管内皮细胞后可减弱 H_2S 的舒血管效应^[5],表明 H_2S 介导的舒血管作用虽然不依赖内皮细胞,但受到内皮细胞的调节。由于 LPS 可损害肺动脉内皮细胞,因此可认为 LPS 诱导的 PARs 对 H_2S 的舒张反应减弱可能与内皮细胞受损有关^[4,6]。本室新近研究发现,整体水平应用 H_2S 可增强肺动脉对 ACh 的内皮依赖性舒张反应,降低肺动脉压,提示整体水平应用 H_2S 对于改善 LPS 诱导的血管反应性紊乱可能具有重要作用^[3,7-8]。本研究在整体水平应用 H_2S 并观察 LPS 诱导的离体肺动脉对 H_2S 低舒张反应的影响发现,腹腔注射 H_2S 可明显逆转 LPS 诱导的离体肺动脉对 H_2S 的低反应性。由于腹腔注射 H_2S 可通过抗氧化应激减轻 LPS 引起的肺动脉内皮细胞损伤^[8],因此我们认为,这可能是腹腔注射 H_2S 逆转 LPS 诱导的离体肺动脉对 H_2S 的低反应性的机制之一。

CO 主要由 HO 催化血红素降解产生,目前已证实 HO 有 HO-1、HO-2 和 HO-3 种不同的异构

注,ZnPPⅩ,锌原卟啉Ⅹ;PARs,肺动脉环;NaHS,硫氢化钠;A,对照组;B,脂多糖(LPS)组;C,NaHS+LPS 组;D,NaHS+生理盐水(NS)组;与本组孵育前比较,* $P < 0.01$

图 2 各组由 ZnPPⅩ 孵育前后离体大鼠 PARs 对不同累积浓度 NaHS 的舒张反应

体形式^[10],其中 HO-1 为诱导型,主要分布于血管平滑肌和单核/巨噬细胞系统等,HO 的抑制剂主要是金属卟啉,如 ZnPPⅨ。LPS 可诱导肺动脉平滑肌细胞中 HO-1 mRNA 和蛋白表达增加,使 CO 生成增多^[11]。新近研究结果表明,CO 可增强 H₂S 舒张肺动脉的作用^[9]。本实验表明,CO 确实可以增强 H₂S 舒张肺动脉的作用,并提示整体水平应用 H₂S 逆转 LPS 诱导的离体肺动脉对 H₂S 的低反应性与 CO 有关。整体水平应用 H₂S 可能增强了肺动脉组织中 HO-1 的表达,促进了 CO 生成,使肺动脉对 H₂S 的反应性增强。对 COHb 水平的测定结果表明,血中 COHb 水平来自肺循环本身的 CO 增加,与我们的推测一致。

综上所述,本研究显示,整体水平应用 H₂S 可以改善 LPS 诱导的离体肺动脉对 H₂S 的低反应性,其作用机制除与减轻内皮损伤有关外,还可能与增强肺动脉 HO-1/CO 体系有关。深入探讨 H₂S 调节 LPS 诱导的血管反应性异常机制将为防治内毒素血症时 PAH 的形成提供新思路 and 策略。

参考文献

- [1] Liaudet L, Szabó C, Evgenov OV, et al. Flagellin from gram-negative bacteria is a potent mediator of acute pulmonary inflammation in sepsis. *Shock*, 2003, 19, 131-137.
- [2] 谷振勇, 凌亦凌, 孟爱宏, 等. 八肽胆囊收缩素对脂多糖诱导离体兔肺动脉反应性变化的影响. *中国病理生理杂志*, 1999, 15, 484-487.
- [3] 黄新莉, 周晓红, 韦鹏, 等. 内源性硫化氢在脂多糖引起的肺动脉高压中的作用. *生理学报*, 2008, 60, 211-215.
- [4] 谷振勇, 凌亦凌, 王杏云, 等. 八肽胆囊收缩素对脂多糖诱导肺动脉内皮细胞凋亡的抑制作用. *中国危重病急救医学*, 2001, 13, 724-727.
- [5] Zhao W, Zhang J, Lu Y, et al. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J*, 2001, 20, 6008-6016.
- [6] 戴鸿雁, 凌亦凌, 黄新莉, 等. 硫化氢在内毒素血症大鼠肺动脉舒张反应性改变中的作用及其与一氧化氮的关系. *河北医科大学学报*, 2004, 25, 355-356.
- [7] 周晓红, 黄新莉, 韦鹏, 等. 硫化氢/胱硫醚-γ-裂解酶在内毒素性急性肺损伤发生中的作用. *中国危重病急救医学*, 2009, 21, 199-202.
- [8] 张晓静, 黄新莉, 孟祥艳, 等. 硫化氢对脂多糖诱导大鼠肺动脉反应性和损伤的影响. *中国危重病急救医学*, 2010, 22, 465-468.
- [9] 张晓静, 孟祥艳, 黄新莉, 等. 一氧化碳对硫化氢舒张大鼠肺动脉作用的影响. *河北医科大学学报*, 2010, 31, 497-500.
- [10] Donnelly LE, Barnes PJ. Expression of heme oxygenase in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24, 295-303.
- [11] Huang XL, Ling YL, Ling YQ, et al. Heme oxygenase-1 in cholecystokinin-octapeptide attenuated injury of pulmonary artery smooth muscle cells induced by lipopolysaccharide and its signal transduction mechanism. *World J Gastroenterol*, 2004, 10, 1789-1794.

(收稿日期: 2010-07-15)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

压力支持通气可改善急性肺损伤动物的氧合作用并更好地保护肺功能

近日, 多国学者合作科研以探究常规压力支持通气是否比压力控制通气能更好地改善肺功能、减轻肺脏炎症, 同时观察压力支持参数的随机变化, 以求提高通气效果。研究人员选择 24 只幼猪作为研究对象, 并随机分为压力控制通气组、压力支持通气组及含噪压力支持通气组。3 组动物均在制备急性肺损伤模型后进行 6 h 机械通气, 驱动压均设置为平均潮气量 6 ml/kg。实验结束时处死动物, 提取肺组织进行组织学和生化分析。每小时检测呼吸、气体交换和血流动力学变量, 弥漫性肺泡损伤和肺的炎症应答定量化。结果显示, 与压力控制通气相比, 压力支持通气和含噪压力支持通气气体交换增强, 肺组织学损伤减轻, 白细胞介素-6 含量减少。学者们认为, 与压力支持通气相比, 含噪压力支持通气能更好地改善气体交换, 减轻肺泡水肿和炎症浸润, 从而减少吸气困难。

刘先奇, 编译自《Crit Care Med》, 2011-01-21(电子版); 胡森, 审校

以急性高碳酸血症呼吸衰竭患者肥胖与否决定治疗策略

在普通人群中肥胖率大幅增加, 这种情况同样出现在重症监护病房(ICU)。治疗高碳酸血症呼吸衰竭(呼衰)最好的办法是通过呼吸机进行无创机械通气。近日土耳其学者对高碳酸血症呼衰的肥胖与非肥胖患者无创通气时的策略与结果进行了评估。73 例接受机械通气的患者被纳入研究, 并随机分为肥胖组(体质指数(BMI) > 35 kg/m²)与非肥胖组(BMI < 35 kg/m²)两组, 对两组患者呼吸机的工作压力、模式以及使动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)降到 50 mm Hg(1 mm Hg = 0.133 kPa)以下所需时间进行统计。研究发现, 对于肥胖患者来说, 因肺水肿需进行机械通气治疗者占大多数, 因肺部严重感染而需机械通气者极少, 而非肥胖患者的情况则与此相反; 在呼吸机模式、吸入气压等级方面两组间没有明显差异; 肥胖患者比非肥胖患者需要更多的呼气末正压和时间使 PaCO₂ 降到 50 mm Hg 以下。研究人员认为, 对高碳酸血症呼衰患者想要改善高碳酸血症, 肥胖患者比非肥胖患者需要更高的呼气末正压和更长的治疗时间。

钟毓贤, 编译自《Minerva Anestesiol》, 2011, 77, 17-25; 胡森, 审校