·论著·

氢气对失血性休克大鼠急性肺损伤的影响

石海梅　周华成　贾雅蕊　王雅　刘金锋

【摘要】 **目的**　探讨氢气对失血性休克复苏诱导大鼠急性肺损伤的影响。**方法**　按照随机数字表法将24只雄性SD大鼠均分为假手术组、模型组、氢气治疗组，采用缺血1 h再灌注2 h制备大鼠压力控制型失血性休克复苏模型，模型动物在制模过程中吸入50%氧气-50%氮气，氢气治疗组再灌注开始前10 min改为吸入2%氢气-48%氮气-50%氧气直至复苏结束。于放血前、休克1 h和再灌注1 h、2 h取血，检测动脉血氧分压(PaO_2)；实验结束时取血和肺组织标本，检测血浆中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及白细胞介素-6(IL-6)水平，以及肺湿/干质量比值(W/D)、肺组织丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO)活性，并观察肺组织病理学改变。**结果**　再灌注结束后，与模型组相比，氢气治疗组可明显减轻肺水肿(肺W/D比值：4.72±0.12比4.94±0.14，$P<0.05$)，抑制氧化应激〔MDA(nmol/mg)：0.55±0.09比0.72±0.08，$P<0.05$〕，增强抗氧化酶活性〔SOD(U/mg)：79.53±14.33比59.55±9.07，$P<0.05$〕，减少促炎因子释放〔TNF-α(ng/L)：55.58±10.06比66.58±5.17，IL-6(ng/L)：23.00±2.77比27.09±2.46，$P<0.05$〕及中性粒细胞浸润〔MPO(U/g)：1.05±0.18比1.40±0.14，$P<0.05$〕，减轻肺组织病理学损伤，改善肺功能〔PaO_2(mm Hg，1 mm Hg=0.133 kPa)：146.3±22.1比123.6±16.0，$P<0.05$〕。**结论**　氢气治疗可减轻失血性休克复苏诱导的急性肺损伤。

【关键词】 氢气；　失血性休克；　复苏；　急性肺损伤

The effect of hydrogen on hemorrhagic shock induced acute lung injury in rats

SHI Hai-mei, ZHOU Hua-cheng, JIA Ya-rui, WANG Ya, LIU Jin-feng. Department of Pain, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang Provincial Key Lab of Research on Anesthesiology and Critical Care Medicine, Harbin 150086, Heilongjiang, China

Corresponding author: LIU Jin-feng, Email: mzliujf2004@126.com

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the effect of hydrogen inhalation on acute lung injury after hemorrhagic shock in rats. **Methods**　Twenty-four adult male Sprague-Dawley (SD) rats were equally randomized into three groups: sham operation group, model group and hydrogen-treatment group. Pressure-controlled hemorrhagic shock and resuscitation model was reproduced by blood-letting for 1 hour followed by fluid replacement for 2 hours. The rats in model group received a mixture of 50% oxygen-50% nitrogen during the process. The rats in hydrogen-treatment group received inhalation of a mixture of 2% hydrogen-48% nitrogen-50% oxygen 10 minutes before fluid replacement till the end of resuscitation. The arterial blood samples were collected for the measurement of arterial partial pressure of oxygen (PaO_2) before exsanguination, 1 hour after shock, 1 hour and 2 hours after fluid replacement. Blood and lung tissues were collected at the end of experiment, and tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) levels in plasma, lung wet/dry weight ratio (W/D), malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) and myeloperoxidase (MPO) activity in the lung tissue were determined. The lung tissue was subjected to pathological examination. **Results**　At the end of fluid replacement, compared with model group, hydrogen could significantly reduce pulmonary edema (lung W/D ratio: 4.72±0.12 vs. 4.94±0.14, $P<0.05$), inhibit oxidative stress〔MDA (nmol/mg): 0.55±0.09 vs. 0.72±0.08, $P<0.05$〕, enhance antioxidant activity〔SOD activity (U/mg): 79.53±14.33 vs. 59.55±9.07, $P<0.05$〕, reduce the release of pro-inflammatory cytokines〔TNF-α (ng/L): 55.58±10.06 vs. 66.58±5.17; IL-6 (ng/L): 23.00±2.77 vs. 27.09±2.46, $P<0.05$〕and inhibit neutrophil infiltration〔MPO (U/g): 1.05±0.18 vs. 1.40±0.14, $P<0.05$〕. It alleviated the damage to lung tissue, and then improved the lung function〔PaO_2 (mm Hg, 1 mm Hg=0.133 kPa): 146.3±22.1 vs. 123.6±16.0, $P<0.05$〕. **Conclusion**　Hydrogen treatment can alleviate acute lung injury as a result of hemorrhagic shock and resuscitation.

【**Key words**】 Hydrogen;　Hemorrhagic shock;　Resuscitation;　Acute lung injury

失血性休克是各种严重创伤的常见并发症之一。据统计，多发性创伤致休克的发生率可高达50%～70%，多见于交通事故伤、挤压伤和自然灾害伤(如地震)等[1]。失血性休克及复苏引发了各器官的缺血/再灌注(I/R)损伤。由于肺部具有低压系统和全身静脉血液滤器的特性，易发生I/R损伤和中性粒细胞(PMN)聚集，进而引发脓毒症和多器官功能障碍综合征(MODS)[1]。

氢气通过抗氧化、抗炎、抗凋亡机制对很多疾病

DOI：10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.06.008

基金项目：黑龙江省自然科学基金项目(D201109)

作者单位：150086 黑龙江省麻醉与危重病学研究重点实验室 哈尔滨医科大学附属第二医院疼痛科

通信作者：刘金锋，Email：mzliujf2004@126.com

具有治疗作用，尤其是 I/R 损伤。有大量研究证明，氢气对局灶性 I/R 损伤的器官如脑、心肌、肝脏、小肠、肺脏等具有保护作用；也有大量的研究报道，氢气对氧化应激引发的各种肺疾病[2]，如呼吸机相关性肺损伤（VILI）、高氧性肺损伤、脓毒症所致肺损伤、百草枯性肺损伤等具有治疗作用。但是氢气对失血性休克复苏致全身性 I/R 引发肺损伤的影响尚无报道。本研究通过大鼠失血性休克模型，探讨失血性休克复苏期吸入氢气对急性肺损伤（ALI）的保护作用及可能机制。

1　材料与方法

1.1　主要试剂：氢氮氧混合气、氮氧混合气购自哈尔滨黎明特种气体有限公司；BCA 蛋白定量试剂盒购于江苏碧云天生物技术研究所；丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）、髓过氧化物酶（MPO）试剂盒购于南京建成生物工程研究所；肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、白细胞介素 -6（IL-6）酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒购自美国 Bio Swamp 公司。

1.2　实验动物及分组：成年雄性 SD 大鼠 24 只，体质量 250～300 g，由大连医科大学实验动物中心提供，动物合格证号：SCXK（辽）2008-0002。按随机数字表法均分为假手术组、模型组、氢气治疗组 3 组。

1.3　失血性休克复苏模型制备：术前 1 周自由进食水，3%戊巴比妥钠（50 mg/kg）麻醉，气管插管保留自主呼吸，用自制面罩全程吸入 50%氧气 -50%氮气。无菌下行右侧股动、静脉穿刺，股动脉连接 MP150 多导生理信号记录仪（BIOPAC 公司，美国）监测有创血压，经右股静脉给予肝素（1 kU/kg）全身肝素化，15 min 后由股动脉以 3 ml·kg^{-1}·min^{-1} 速度放血，15 min 内使平均动脉压（MAP）降至（40 ± 5）mm Hg（1 mm Hg=0.133 kPa），然后通过抽取或回输血液使 MAP 维持在 40 mm Hg 左右 1 h，制成失血性休克模型。复苏时将自体血以 20 ml·kg^{-1}·min^{-1} 的速度全部回输并追加 1 倍量生理盐水以 10 ml·kg^{-1}·min^{-1} 速度输入，维持 MAP 在 80 mm Hg 以上，观察 2 h。假手术组则仅进行气管插管和股动脉、静脉穿刺，不进行放血及复苏。氢气治疗组在休克期间吸入 50%氧气 -50%氮气，再灌注开始前 10 min 开始吸入 2%氢气 -48%氮气 -50%氧气直至复苏结束。实验过程中用电热毯保持大鼠肛温在 36.5～37.5 ℃。

本实验大鼠处置方法符合动物伦理学的要求。

1.4　检测指标及方法

1.4.1　标本采集及处理：所有大鼠在放血前、休克 1 h 和再灌注 1 h、2 h 各取动脉血 0.1 ml 进行血气分析并补充 0.2 ml 的生理盐水。在实验结束时采集动脉血 5 ml，离心取上清（血浆），使用 ELISA 检测炎症因子 TNF-α、IL-6 水平。

1.4.2　肺湿 / 干质量比值（W/D）的测定：再灌注 2 h 后经股动脉快速放血处死大鼠，取右肺中叶，生理盐水冲洗后滤纸吸干多余水分，称湿质量，然后放入 80 ℃烘干箱内 72 h 至恒重，计算 W/D 比值。

1.4.3　肺组织中 MDA 含量及 SOD、MPO 活性测定：取右下肺组织，制成 10%肺组织匀浆。BCA 法测定蛋白浓度，分光光度法测定 MDA 水平及 SOD、MPO 活性，按试剂盒说明书操作。

1.4.4　肺组织病理学改变：处死大鼠后留取右上肺叶，4%多聚甲醛固定，石蜡包埋、切片，苏木素 - 伊红（HE）染色，光镜下观察肺组织病理学改变。

1.5　统计学方法：使用 SPSS 17.0 统计软件。实验数据采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组内比较采用重复测量方差分析，组间比较采用单因素方差分析的 SNK 检验，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结　果

2.1　血气分析结果（表 1）：放血前，3 组动脉血氧分压（PaO_2）处于同一水平。假手术组各时间点 PaO_2 无明显改变（均 $P>0.05$）。休克 1 h 时，模型组和氢气治疗组 PaO_2 较假手术组明显降低（均 $P<0.05$）；再灌注 1 h 时，模型组和氢气治疗组 PaO_2 较休克 1 h 时升高，但两组之间无差异；再灌注 2 h 时，氢气治疗组 PaO_2 较模型组明显升高（$P<0.05$）。

表 1　氢气对失血性休克大鼠各时间点 PaO_2 的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	动物数	PaO_2（mm Hg）			
		放血前	休克 1 h	再灌注1 h	再灌注2 h
假手术组	8	151.5 ± 18.9	155.2 ± 24.6	149.2 ± 15.8	159.8 ± 15.7
模型组	8	152.8 ± 21.0	131.5 ± 20.1^{ab}	135.1 ± 26.3^{a}	123.6 ± 16.0^{ab}
氢气治疗组	8	147.2 ± 19.5	130.3 ± 14.9^{ab}	138.4 ± 16.1	146.3 ± 22.1^{c}

注：PaO_2：动脉血氧分压；与本组放血前比较，$^{a}P<0.05$；与假手术组比较，$^{b}P<0.05$；与模型组比较，$^{c}P<0.05$；1 mm Hg=0.133 kPa

2.2　肺 W/D 比值（表 2）：与假手术组相比，模型组肺水肿严重，W/D 比值明显升高（$P<0.05$）；氢气治疗可降低 W/D 升高程度而减轻肺水肿（$P<0.05$）。

2.3　肺组织 MDA、SOD 活性（表 2）：再灌注结束时，与假手术组相比，模型组肺组织 MDA 含量增加、SOD 活性降低（均 $P<0.05$）；与模型组比较，氢气治疗组肺组织 MDA 含量显著降低，SOD 活性显著增加（均 $P<0.05$）。

2.4　炎症反应指标（表 2）：再灌注结束时，动脉血浆中炎症因子 TNF-α、IL-6 水平及肺组织中 MPO 活

性均较假手术组明显增加(均 $P<0.05$);氢气治疗降低了血浆中 TNF-α 和 IL-6 水平,并抑制了休克复苏引起的 MPO 活性升高(均 $P<0.05$)。

2.5 肺组织病理学改变:假手术组肺大体标本呈粉红色,表明光滑,无渗出及出血;光镜下见肺泡结构清晰完整,肺泡壁薄,未见明显的充血和间质水肿,肺泡腔内仅散在少量炎性细胞,未见水肿液及出血,无肺实变(图1a)。模型组大鼠肺组织出现严重损害,肉眼见整个肺充血,间有斑片状坏死;光镜下见肺泡结构紊乱,肺泡腔内大量炎性细胞浸润,毛细血管扩张、充血,部分肺泡腔可见水肿液、出血,肺泡壁增厚,部分肺实变(图 1b)。氢气治疗组与模型组相比,肺泡炎性细胞浸润、肺泡壁充血及肺间质水肿减轻,肺实变组织减少(图 1c)。

3 讨　论

失血性休克及复苏诱发肺损伤的机制众多,活性氧大量增加[3]、炎症反应失控[4]在其中发挥了重要作用。目前针对失血性休克诱发肺损伤的治疗方法众多,但是仍局限于所用药品价格昂贵、不易获取、难以普及和作用单一等,人们一直致力于寻求更合理而有效的治疗方案[5]。

最近大量的基础和临床研究表明,氢分子具有抗氧化、抗炎、抗凋亡的作用,对氧化应激性疾病及炎症性疾病等都有保护作用。目前主要是通过吸入氢气或口服、腹腔注射、静脉注射富氢液体,增加肠道细菌产氢能力等方式增加体内氢气,发挥治疗作用[2]。氢气是一种易燃易爆的气体,但是浓度小于4%时对人体是安全的[6]。Ohsawa 等[6]报道再灌注期吸入 2%氢气对大脑 I/R 损伤具有明显的治疗作用。Kawamura 等[7]给移植后受体大鼠吸入 2%氢气 1 h,结果发现氢气通过减少炎症介质释放和细胞凋亡对 I/R 损伤肺脏起保护作用。所以本实验选择再灌注前 10 min 吸入 2%氢气治疗失血性休克及复苏诱发的肺损伤。

在失血性休克复苏诱发肺损伤的众多发病机制中,氧自由基损伤扮演着重要的角色[2]。氢气是一种具有一定还原性的气体分子。在放射化学领域,氢气能直接与羟基发生反应;然而,在生物医学领域,氢气一直被认为是一种具有生理惰性的气体。1975 年 Dole 等[8]发现高压氢气可通过抗氧化作用明显减小小鼠皮肤肿瘤。随后,多个研究小组发现氢气有抗氧化的作用,对缺氧损伤[9]、I/R[10]、器官移植[11]等都有抗氧化作用。本实验结果显示,吸入 2%氢气可减轻失血性休克大鼠肺组织中氧化损伤,提高反映体内还原能力的 SOD 活性。证明氢气通过抗氧化机制减轻了失血性休克肺组织氧化损伤。与现有的抗氧化剂相比,氢气具有生物选择性强、穿透力强、毒副作用小、价格低廉及直接作用于靶细胞器等优点[12],这些使氢气具有广阔的临床应用前景。

失血性休克发生后肺泡巨噬细胞受细菌和脂多糖刺激,释放大量的促炎因子 TNF-α、IL-1、IL-6 和 IL-8 等,其中 TNF-α 可直接导致内皮细胞功能减退,增加血管通透性,降低循环阻力,并能诱导 IL-1、IL-6 和 IL-8 等细胞因子及黏附分子的"瀑布"

表 2　氢气对失血性休克大鼠肺 W/D 比值、肺组织氧化酶活性及动脉血浆中炎症因子含量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	肺 W/D 比值	肺 MDA(nmol/mg)	肺 SOD(U/mg)	血 TNF-α(ng/L)	血 IL-6(ng/L)	肺 MPO(U/g)
假手术组	8	4.71 ± 0.09	0.49 ± 0.10	85.26 ± 15.63	47.59 ± 4.19	21.85 ± 3.94	0.34 ± 0.21
模型组	8	4.94 ± 0.14[a]	0.72 ± 0.08[a]	59.55 ± 9.07[a]	66.58 ± 5.17[a]	27.09 ± 2.46[a]	1.40 ± 0.14[a]
氢气治疗组	8	4.72 ± 0.12[b]	0.55 ± 0.09[b]	79.53 ± 14.33[b]	55.58 ± 10.06[ab]	23.00 ± 2.77[ab]	1.05 ± 0.18[ab]

注:W/D:湿 / 干质量比值,MDA:丙二醛,SOD:超氧化物歧化酶,TNF-α:肿瘤坏死因子 -α,IL-6:白细胞介素 -6,MPO:髓过氧化物酶;与假手术组比较,[a]$P<0.05$;与模型组比较,[b]$P<0.05$

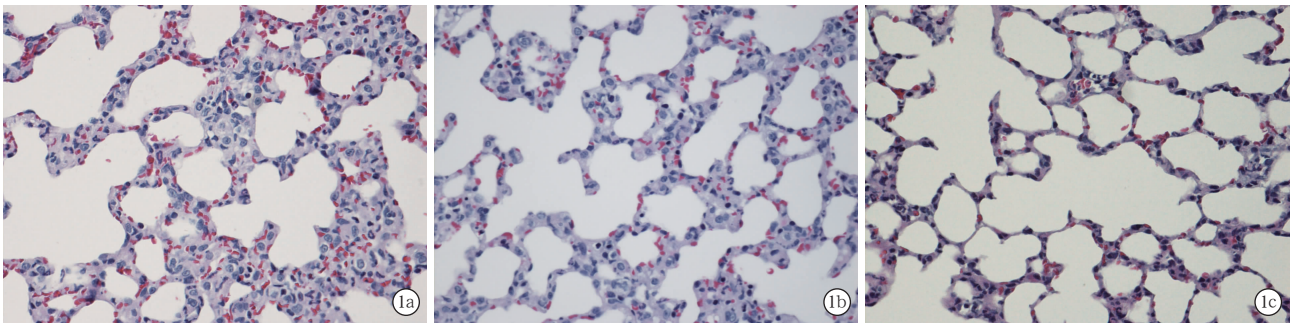

图 1　光镜下观察氢气对失血性休克大鼠肺组织病理学的影响　假手术组(a)肺泡结构清晰完整,肺泡壁薄,未见明显的充血和间质水肿;模型组(b)肺泡结构紊乱,肺泡腔内大量炎性细胞浸润,部分肺泡腔可见明显出血,肺泡壁增厚,肺间质水肿;氢气治疗组(c)肺泡腔内炎性细胞浸润、肺泡壁充血及肺间质水肿较模型组减轻　HE 低倍放大

样释放，构成炎性损伤的级联放大效应[4]。本研究结果发现，模型组血浆中促炎因子 TNF-α、IL-6 水平较假手术组明显升高，肺组织中反映中性粒细胞浸润程度的 MPO 也明显增加，肺组织病理学观察显示肺泡腔内有大量炎性细胞浸润；经过氢气处理的大鼠，上述病理改变明显减轻，说明氢气具有抗炎作用。这与氢气在肠道 I/R 诱发的肺损伤[13]、VILI[14]及肺移植受体[7]中的抗炎作用一致。

总之，本实验从改善肺功能、减轻肺水肿、缓解氧化损伤及抑制炎症反应等方面证明了氢气对失血性休克肺损伤具有保护作用；氢气具有抗氧化、抗炎的作用，为失血性休克诱发肺损伤提供了新的治疗方法，也进一步拓展了氢气治疗的应用范围。

参考文献

[1] Pfeifer R, Kobbe P, Darwiche SS, et al. Role of hemorrhage in the induction of systemic inflammation and remote organ damage: analysis of combined pseudo-fracture and hemorrhagic shock. J Orthop Res, 2011, 29: 270-274.

[2] 陈红光，谢克亮，韩焕芝，等. 氢气对肺损伤的保护效应及其机制研究进展. 中国危重病急救医学，2011，23：696-698.

[3] 姚咏明，盛志勇，施志国，等. 杀菌/通透性增加蛋白对休克大鼠肺组织细胞因子 mRNA 表达的影响. 中华外科杂志，1997，35：389-391.

[4] Alam HB, Stanton K, Koustova E, et al. Effect of different resuscitation strategies on neutrophil activation in a swine model of hemorrhagic shock. Resuscitation, 2004, 60: 91-99.

[5] Dutton RP. Resuscitation: when less is more. Anesthesiology, 2011, 114: 16-17.

[6] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. Nat Med, 2007, 13: 688-694.

[7] Kawamura T, Huang CS, Tochigi N, et al. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of lung transplant-induced ischemia/reperfusion injury in rats. Transplantation, 2010, 90: 1344-1351.

[8] Dole M, Wilson FR, Fife WP. Hyperbaric hydrogen therapy: a possible treatment for cancer. Science, 1975, 190: 152-154.

[9] Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, et al. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. Am J Transplant, 2008, 8: 2015-2024.

[10] Zheng X, Mao Y, Cai J, et al. Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. Free Radic Res, 2009, 43: 478-484.

[11] Cai J, Kang Z, Liu WW, et al. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. Neurosci Lett, 2008, 441: 167-172.

[12] Zheng XF, Sun XJ, Xia ZF. Hydrogen resuscitation, a new cytoprotective approach. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011, 38: 155- 163.

[13] Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, et al. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 373: 30-35.

[14] Huang CS, Kawamura T, Lee S, et al. Hydrogen inhalation ameliorates ventilator-induced lung injury. Crit Care, 2010, 14: R234.

（收稿日期：2012-12-09）
（本文编辑：李银平）

·科研新闻速递·

急性呼吸窘迫综合征患者吸入依前列醇的疗效、安全性及用药差错研究

急性呼吸窘迫综合征（ARDS）是一种缺氧性呼吸衰竭，近期美国学者报道了一项小样本量的观察性研究，旨在确定 ARDS 患者吸入依前列醇是否能提高 10%或更高的氧合指数（PaO_2/FiO_2），同时观察不良事件的发生和用药差错。从 2008 年 1 月 1 日至 2010 年 12 月 31 日，在佛罗里达州任何一家医院接受至少吸入 1 个剂量依前列醇的患者均被列入研究。收集人口统计学、用药剂量、治疗时间、副作用、用药错误和预后数据。最终共有 16 例患者纳入了该研究，其中 62.5%（10/16）的患者氧合改善 10%或以上，并且氧合指数在最初 4 h 内平均增加 44.5%。依前列醇的平均起始剂量为（30 ± 10）$ng \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$，并且观察到 25%（4/16）的患者有用药错误。低血压是最常见的不良事件，发生率为 18.8%（3/16）。该研究结果表明，吸入依前列醇可改善 ARDS 患者的氧合，有 62.5%的患者对治疗有反应。然而这些效果对改善生存的意义仍不清楚。同时该研究观察到的高用药错误率引发人们对该药使用的担忧，尚需进一步前瞻性对照研究来确定吸入依前列醇是否有改善 ARDS 患者预后的作用。

喻文，胡森，编译自《Ann Pharmacother》，2013-05-08（电子版）

肺动脉高压往往被误诊

肺动脉高压（PH）是一种致命的疾病，尽管随着医疗技术的发展，PH 的预后有所改善，但早期正确的诊断对 PH 的预后至关重要。为此，美国研究人员进行了一项多中心观察性研究，旨在评估转诊至三级 PH 中心的患者 PH 诊断（转诊前）的准确性和在诊断不明或误诊的情况下动脉性肺动脉高压（PAH）专治药物的使用情况。研究对象为 2010 年至 2011 年转诊至三大三级 PH 中心的 140 例患者，平均年龄为 56 岁，其中 95 例（68%）患者的转诊医师是心肺专家；而且大多数患者（86 例，61%）在转诊前已属于 WHO 功能分级的Ⅲ～Ⅳ级。56 例患者（40%）转诊前诊断为 PAH，42 例患者（30%）诊断不确定，22 例患者（16%）诊断为继发于肺部疾病或缺氧的 PH。其中 98 例患者在转诊前已有明确诊断，并且 33%属于误诊。有 59 例患者在转诊至三级 PH 中心前没有接受过心室导管辅助诊断，在三级 PH 中心第一次接受右心室导管辅助诊断的 38 例患者中，有 14 例患者（37%）的诊断与转诊前不一致；而左右心室均接受过导管插入的 21 例患者中，有 11 例患者（52%）的诊断与转诊前不一致。42 例患者（30%）在转诊前就已经开始接受 PAH 相关治疗，其中有 24 例患者（57%）的处方违背了现有的治疗指南。因此，研究人员认为，转诊到 PH 中心进行诊疗的患者往往过晚，而且误诊和不合理的治疗时有发生。

罗红敏，胡森，编译自《JAMA Intern Med》，2013-04-08（电子版）