

外源性硫化氢对创伤失血性休克大鼠血浆炎症因子的影响*

林家燕 丁倩 姚立农 谢冲 高操 王艳 柴伟[△]

(第四军医大学唐都医院麻醉科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:研究外源性硫化氢(H₂S)对创伤失血性休克大鼠炎症反应的影响。**方法:**选择健康成年雄性SD大鼠随机分为四组:假手术组(Sham),模型组(HTS),生理盐水组(NS),NaHS处理组(NaHS),采用创伤失血性休克模型,Sham组完成所有手术操作,但不放血和复苏,HTS组完成所有手术操作放血后给予Ringer's液复苏,NS组放血后在Ringer's液复苏前腹腔注射与NaHS组等容量的生理盐水,NaHS组在复苏前给与NaHS 28μmol/kg(生理盐水稀释至0.5ml)腹腔注射。持续监测各组平均动脉压(MAP)及心律(HR),并通过测定血浆中TNF-α、IL-1β、IL-6和IL-10浓度的变化,观察外源性硫化氢对创伤失血性休克大鼠血浆炎症因子的影响。**结果:**①与HTS组及NS组比较,NaHS组复苏后MAP明显改善(P<0.05)。②与HTS组及NS组比较,复苏后1小时NaHS组血浆TNFα、IL-1β、IL-6浓度明显降低(P<0.05);而IL-10浓度四组间差异不明显(P>0.05)。**结论:**外源性硫化氢可改善创伤失血性休克大鼠复苏后平均动脉压及抑制复苏后早期炎症反应。

关键词:硫化氢;创伤失血性休克;炎症;炎症因子

中图分类号:Q95-3,R605.971,R364.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-413-04

Effects of Exogenous Hydrogen Sulfide on Inflammatory Cytokines in Plasma of Rats with Hemorrhagic Traumatic Shock*

LIN Jia-yan, DING Qian, YAO Li-nong, XIE Chong, GAO Cao, WANG Yan, CHAI Wei[△]

(Dept. of Anesthesiology, Tang Du Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of exogenous hydrogen sulfide (H₂S) on inflammatory cytokines in plasma of rats with hemorrhagic traumatic shock. **Methods:** 40 SD rats weighing 220-250g were randomly divided into four groups (n=10): Sham group, HTS group, NS group, and NaHS group. All animals underwent hemorrhage and resuscitation except Sham group. In NaHS group, 28 μmol/kg NaHS were injected intraperitoneally at the beginning of the resuscitation. In NS group, the rats were administrated the same volume of vehicle at the beginning of the resuscitation. The changes of MAP and HR were recorded at many times. In each group blood samples were collected at 1 hour after resuscitation to determine the concentrations of TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-10 in plasma. **Results:** ① Compared with HTS group and NS group, MAP was improved significantly in NaHS group after resuscitation (P<0.05). ② At 1 hour after resuscitation, TNF-α, IL-1β and IL-6 in plasma increased significantly in HTS group and NS group compared with Sham group (P<0.05), decreased markedly in NaHS group compared with HTS group and NS group (P<0.05). The difference of IL-10 among four groups didn't have statistical significance (P>0.05). **Conclusion:** Exogenous hydrogen sulfide can improve the MAP after resuscitation, decrease the concentrations of inflammatory cytokines and relieve systemic inflammatory reaction.

Key words: Hydrogen sulfide (H₂S); Hemorrhagic traumatic shock; Inflammation; Inflammatory cytokines

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R605.971, R364.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)03-413-04

前言

创伤出血性休克是机体遭受严重创伤后通过"血管-神经"反射所引起的以微循环障碍为主要特征的急性循环功能不全,以及由此导致的组织、器官缺血、缺氧和内脏损害综合征^[1]。如何及时有效的改善机体缺血-再灌损伤,维持组织氧耗-氧供平衡,抑制炎症及氧化应激损伤是影响疾病转归的关键所在。H₂S是一种新型气体信号分子,有研究表明其广泛参与血管舒张、抗炎、抗氧化等生理、病理过程,并具有强烈的代谢抑制效应^[2,3],可使机体的氧代谢迅速降低,调节氧供需达到新

的平衡,有利于细胞存活并防止不可逆损伤。本实验室前期研究发现,外源性H₂S对创伤失血性休克大鼠继发肺损伤具有保护作用,可明显改善血气分析指标,减轻肺水肿,缓解肺部氧化应激损伤^[4]。本实验拟用外源性硫化氢供体NaHS复苏前处理,观察其对创伤失血性休克大鼠心脏血流动力学以及血浆炎症因子的影响,进一步探讨其保护作用的相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂及主要仪器

实验使用健康SD大鼠,雄性,220g-260g(第四军医大学动

* 基金项目:国家自然科学基金(30872444)

作者简介:林家燕(1982-),女,硕士研究生,医师,主要研究方向:失血性休克损伤的器官保护研究

△通讯作者:柴伟,电话:029-84777439, E-mail: tdmzka@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-11-03 接受日期:2010-11-27)

物实验中心提供)。NaHS(美国,Sigma 公司);大鼠白介素 10 酶联免疫分析试剂盒(美国,R&D 公司);大鼠白介素 1 β 酶联免疫分析试剂盒(美国,R&D 公司);大鼠白介素 6 酶联免疫分析试剂盒(美国,R&D 公司);大鼠肿瘤坏死因子 α 酶联免疫分析试剂盒(美国,R&D 公司)。酶标仪(美国,Molecular Devices 公司);PowerLab 生物信号采集处理系统(澳大利亚,AD Instruments 公司)。

1.2 方法和步骤

1.2.1 动物选择及分组 40 只大鼠随机分为四组:假手术组(Sham, n=10),模型组(HTS, n=10),生理盐水组(NS, n=10)和 NaHS 处理组(NaHS, n=10)。Sham 组:大鼠作为假手术对照,仅给予双侧股动脉及右侧股静脉插管,不给予放血、复苏及给药处理。HTS 组:大鼠制作创伤出血性休克动物模型并复苏。NS 组:同 HTS 组,在复苏前给与生理盐水 0.5 ml 腹腔注射。NaHS 组:同 HTS 组,在复苏前给与 NaHS 28 μ mol/kg(生理盐水稀释至 0.5ml)腹腔注射。

1.2.2 创伤失血性休克动物模型 大鼠禁食过夜,自由摄水,3%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉后,参照文献^[9]制作创伤失血性休克模型并复苏。复苏后,所有大鼠拔除插管,结扎血管,丝线缝合伤口后放回笼子观察,自由进食饮水。

1.2.3 血流动力学监测 持续监测平均动脉压 MAP(mmHg)、心率 HR(次/min),并记录各组大鼠休克前、休克 90 min,复苏

15 min、30 min、45 min 及 60 min 时的 MAP 和 HR。
1.2.4 炎症因子检测 每组大鼠复苏后 1h 抽取静脉血,离心后采集血浆,采用美国 R&D 公司提供的试剂盒,按照试剂盒操作说明,应用酶联免疫吸附测定法(Elisa)检测各组大鼠血浆 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 浓度。

1.3 统计学分析

用 SPSS11.5 统计软件处理数据,各数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,行单因素方差分析(ANOVA),组内及组间两两比较采用 SNK-q 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 血流动力学

2.1.1 MAP 如 Table 1 所示,休克前,四组 MAP 比较无统计学差异($P > 0.05$)。休克 90min 时,HTS、NS、NaHS 三组 MAP 均维持在模型要求范围,明显低于 Sham 组($P < 0.01$),三组间比较无统计学差异($P > 0.05$),表明模型建立成功。HTS 与 NS 组 MAP 在复苏初期短暂升高后开始逐渐下降;而 NaHS 组 MAP 在复苏后 15min 达峰值,并基本维持。复苏后 15 min、30 min、45 min 和 60 min,HTS 及 NS 组 MAP 均低于 NaHS 组($P < 0.05$)。

Table 1 Changes of MAP in groups

Groups	Before shock	Shock 90min	Resuscitation 15min	Resuscitation 30min	Resuscitation 45min	Resuscitation 60min
Sham	117.8 $\pm$ 10.5	107.2 $\pm$ 8.6	110 $\pm$ 7.4	108.2 $\pm$ 9.3	110.4 $\pm$ 7.9	111.4 $\pm$ 8.3
HTS	113.8 $\pm$ 8.4	37.4 $\pm$ 2.1*	90.6 $\pm$ 2.4*	80 $\pm$ 2.2*	77.6 $\pm$ 2.6*	78.2 $\pm$ 3.3*
NS	117.6 $\pm$ 10.1	36.4 $\pm$ 1.7*	90.6 $\pm$ 2.7*	83.6 $\pm$ 2.8*	80.6 $\pm$ 2.5*	78.4 $\pm$ 3.5*
NaHS	115.4 $\pm$ 10.1	37 $\pm$ 1.6*	99.2 $\pm$ 5.2*#	96.2 $\pm$ 5.0*#	95 $\pm$ 4.8*#	94.8 $\pm$ 5.5*#

Note: * $P < 0.05$ compared with Sham group; # $P < 0.05$ compared with HTS group; $P < 0.05$ compared with NS group

2.1.2 HR 如 Table 2 所示,休克前,四组 HR 比较无明显统计学差异,休克 90min,HTS、NS、NaHS 三组 HR 均较 Sham 组偏低($P < 0.05$),符合休克中后期病理生理改变。复苏后 15min,

HTS、NS、NaHS 三组 HR 上升,且相较 Sham 组均偏高($P < 0.05$);复苏后 45min 开始,HTS、NS、NaHS 三组大鼠 HR 又有轻微下降,组间比较无明显统计学差异($P > 0.05$)。

Table 2 Changes of HR in groups

Groups	Before shock	Shock 90min	Resuscitation 15min	Resuscitation 30min	Resuscitation 45min	Resuscitation 60min
Sham	405.8 $\pm$ 22.5	397.4 $\pm$ 18.7	391.2 $\pm$ 19.3	398.4 $\pm$ 20.6	394.6 $\pm$ 22.6	389.8 $\pm$ 21.7
HTS	419.2 $\pm$ 12.0	328.6 $\pm$ 19.2*	422.2 $\pm$ 12.6*	422 $\pm$ 12.1*	400.4 $\pm$ 21.4	399.4 $\pm$ 23.1
NS	416.4 $\pm$ 14.2	325.8 $\pm$ 22.7*	423.6 $\pm$ 15.8*	419.6 $\pm$ 12.6*	396.6 $\pm$ 21.1	394.4 $\pm$ 21.5
NaHS	403.6 $\pm$ 22.1	327.4 $\pm$ 20.4*	414.2 $\pm$ 22.7*	409.8 $\pm$ 20.0*	400.8 $\pm$ 25.9	389.6 $\pm$ 19.3

Note: * $P < 0.05$ compared with Sham group

2.2 炎症因子

复苏后 1h,HTS 与 NS 组血浆 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 浓度明显高于 Sham 组($P < 0.05$);而 NaHS 组较 HTS 及 NS 组

IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 浓度明显降低($P < 0.05$)(Fig.1 a、b、c); Sham、HTS、NS 及 NaHS 四组血清 IL-10 浓度无明显统计学差异($P > 0.05$)(Fig.1 d)。

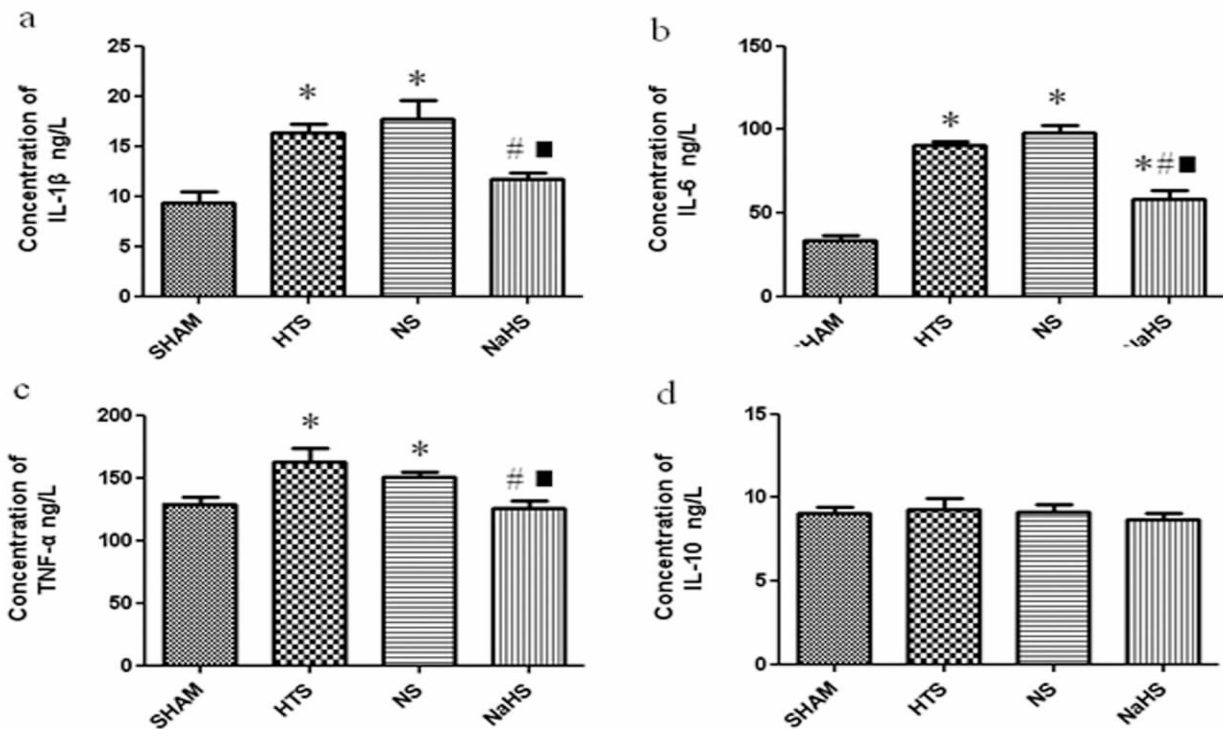


Fig.1 Concentrations of IL-1 β 、IL-6、TNF- α and IL-10 in plasma 1 hour after resuscitation

Note:* P < 0.05 compared with Sham group;# P < 0.05 compared with HTS group; P < 0.05 compared with NS group

3 讨论

创伤出血性休克是战、创伤导致死亡的主要病因,涉及心血管、微循环、氧化代谢、应激反应、炎症反应等多器官、多个病理过程。微循环障碍所导致氧供/需失衡,以及缺血时产生的大量代谢产物和炎症因子在再灌注时导致机体"呼吸爆发",及"瀑布样"炎症效应加剧了血流动力学紊乱和组织、器官损伤。传统的快速补液以及使用心脏正性肌力或血管活性药物等复苏方法救治效果很不理想,仍有大批伤病员死于早期失血、或者死于创伤后全身炎症反应综合征(SIRS)及多器官功能衰竭(MOF)^[1]。因此,降低机体代谢率,平衡氧供/需,改善微循环,抑制炎症及应激反应等成为救治的关键及困难所在。

H₂S是一种常见的具有强烈臭鸡蛋气味的毒性气体。多年来,人们多专注于H₂S的毒性作用的研究。上世纪90年代中期,有学者发现H₂S对神经系统特别是海马的功能具有调节作用,并可以调节消化道和血管平滑肌的张力^[6]。随着研究的进一步深入,人们发现作为继NO、CO之后的第三类气体信号分子,H₂S在众多生理病理调节过程中都起到了重要作用。在器官保护方面,H₂S可以明显改善缺血-再灌注后心脏功能,保护心肌超微结构,提高缺血再灌注后心肌细胞生存率^[7,8]。本实验室前期研究发现,外源性H₂S对创伤失血性休克大鼠继发肺损伤具有一定保护作用^[4]。在炎症调节机制方面,Zanardo等研究发现^[9],H₂S作为重要的创伤炎症调节因子,可抑制白细胞粘附、渗出以及炎性水肿形成,在急性炎症过程发挥重要的作用。但也有研究报导,硫化氢有促进炎症的调节作用^[10]。

为进一步研究外源性硫化氢对创伤失血性休克大鼠的保护作用及其对创伤失血性休克所致炎症反应的调节机制,本实

验应用NaHS作为外源性H₂S供体,在对创伤失血性休克大鼠液体复苏前按28 μ mol/kg(约0.392mg/kg)剂量腹腔注射,结果显示,NaHS组复苏后MAP明显优于HTS组与NS组,其机制可能在于一定浓度的硫化氢可以扩张外周血管,改善冠状动脉血供,减轻复苏后心脏后负荷,保护心脏功能,进而稳定血流动力学。同时,作为K⁺ATP通道开放剂,H₂S也可能通过促进心肌细胞内K⁺外流,抑制细胞外Ca²⁺内流,防止细胞内钙超载,从而减轻重要器官缺血再灌注损伤^[11]。

复苏后15min,HTS、NS、NaHS三组相较Sham组HR上升;复苏后45min开始,HTS、NS、NaHS三组大鼠HR又有轻微下降,四组间比较无明显统计学差异,考虑复苏后的短期心率增加可能为液体复苏的反应,与NaHS无关。

创伤失血性休克时,由于微循环障碍,局部代谢物堆积,使得白细胞活化,从而释放了大量促炎介质,如IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等,这些"前炎症因子"又通过NF- κ B、JAK-STAT等途径进一步促进炎症细胞的激活,形成"炎症瀑布",造成炎症介质的泛滥,微血管通透性增加,组织器官损伤。本实验中,创伤出血性休克大鼠复苏后1h,HTS组与NS组血浆IL-1 β 、IL-6及TNF- α 浓度明显高于Sham组,符合上述病理生理表现,而NaHS组较HTS及NS组IL-1 β 、IL-6及TNF- α 浓度明显降低,提示一定浓度的外源性H₂S可抑制创伤出血性休克大鼠炎症反应,其机制目前尚不十分清楚。有研究提示,H₂S可能通过HO-1-NF- κ B途径^[12]、p38 MAPK途径^[13],以及激活K⁺ATP通道等途径^[9]来调节炎症细胞因子的释放,从而发挥其抗炎作用。此外,还有研究表明,外源性H₂S可增加急性肺损伤大鼠血浆及肺组织中抗炎因子IL-10的浓度^[4],但本实验中四组大鼠复苏后1h血浆IL-10浓度没有明显统计学差异,考虑

可能与模型处理、给药浓度、采血时间、以及样本量大小等因素影响有关。

综上所述,在大鼠创伤失血性休克模型中应用外源性 H_2S 供体 NaHS 28 μ mol/kg 复苏前给药,可改善大鼠复苏后血流动力学,减轻复苏后炎症反应,从而产生器官保护作用。本实验为外源性 H_2S 应用于临床创伤出血性休克的救治提供了一定理论依据。但是,对于外源性 H_2S 的作用是否随给药浓度或时间的不同而有所差异,还有待进一步的研究发现。

参考文献(References)

- [1] 赵克森. 创伤性休克的新概念[J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(1): 29-31
Zhao Ke-sen. New conception of traumatic shock [J]. Chin J Traumatol, 2005, 21(1): 29-31
- [2] Lefer DJ. A new gaseous signaling molecule emerges: Cardioprotective role of hydrogen sulfide[J]. PANS, 2007, 104(46):17907-8
- [3] 王新国, 袁建国. 内源性硫化氢的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(11):1765-1767
Wang Xin-guo, Yuan Jian-guo. The research progresses of endogenous hydrogen sulfide[J]. J Pract Med, 2007, 23(11):1765-1767
- [4] 王艳, 姚立农, 蒋玮, 等. 外源性硫化氢对创伤失血性休克继发肺损伤的保护作用[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(8):1318-1320
Wang Yan, Yao Li-nong, Jiang Wei, et al. The protective effects of exogenous hydrogen sulfide on lung injury secondary to trauma-hemorrhagic shock[J]. J Pract Med, 2010, 26(8):1318-1320
- [5] Hsieh YC, Yang S, Choudhry MA, et al. Flutamide restores cardiac function after trauma-hemorrhage via an estrogen-dependent pathway through upregulation of PGC-1 [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290:H416-H423
- [6] Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 237 (3): 527 - 531
- [7] Hu Y, Chen X, Pan TT, et al. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways[J]. Pflugers Arch - Eur J Physiol, 2008, 455:607-616
- [8] Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2007, 104(39):15560-5
- [9] Zanardo RC, Brancialeone V, Distrutti E, et al. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation [J]. FASEB. 2006, 20(12):2118-20
- [10] Li L, Bhatia M, Zhu YZ, et al. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide -induced inflammation in the mouse [J]. FASEB. 2005, 19(10):1196-98
- [11] Bian JS, Yong QC, Pan TT, et al. Role of Hydrogen Sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes[J]. JPET, 2006, 316(2):670-678
- [12] Oh GS, Pae HO, Lee BS, et al. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor- κ B via heme oxygenase-1 expression in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide [J]. Free Radic Biol Med. 2006, 41(1):106-19
- [13] Hu LF, Wong PT, Moore PK, et al. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide- induced inflammation by inhibition of p38 MAPK in microglia[J]. J Neurochem. 2007, 100(4):1121-8
- [14] Li T, Zhao B, Wang C, et al. Regulatory effects of hydrogen sulfide on IL-6, IL-8 and IL-10 levels in the plasma and pulmonary tissue of rats with acute lung injury[J]. Exp Biol Med, 2008, 233(9):1081-7