

氢气对体外循环肺损伤的影响

胡啸玲^{1,2}, 汤恢煊¹, 周志刚²

(1. 中南大学附属湘雅医院普通外科 湖南省长沙市 410078; 2. 南华大学附属第一医院麻醉科 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 心肺转流; 肺损伤; 氢气

[摘要] **目的** 观察体外循环时吸入2%氢气对体外循环(CPB)肺损伤的影响。**方法** 将Beagle犬随机分为两组:体外循环组(对照组),体外循环维持2 h,体外循环结束后继续观察2 h;氢气组,实验全程吸入氢气1 L/min。实验过程中在体外循环前(T_0)、体外循环结束时(T_1)、体外循环结束后15 min(T_2)、60 min(T_3)及120 min(T_4)记录中心静脉压(CVP)、肺动脉压(PAP)及肺毛细血管楔压(PCWP),采动脉血行血气分析计算氧合指数($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)。采集血标本监测血浆肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素6,白细胞介素8的变化。实验结束时监测支气管肺泡灌洗液(BALF)蛋白含量、白细胞计数,测定肺组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO)及肺组织湿干重比(W/D),并对肺组织进行光镜及电镜观察。**结果** 与对照组相比,氢气组肺动脉压(PAP)、外周血管阻力(PVR)及氧合指数 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 有明显改善,差异有统计学意义($P < 0.05$)。氢气能够显著降低炎症因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-8)释放,减轻组织氧化损伤(MDA、MPO 及 W/D 低于对照组,而 SOD 显著高于对照组),改善肺组织水肿、炎症细胞浸润。**结论** 前吸入2%氢气部分通过降低炎症因子释放,维持体内氧化与抗氧化平衡,缓解体外循环引起的肺组织损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Hydrogen Inhalation Alleviates Cardiopulmonary Bypass Induced Acute Lung Injury in Beagle Dogs

HU Xiao-Ling^{1,2}, TANG Hui-Huan¹, and ZHOU Zhi-Gang²

(1. Department of General Surgery, Xiangya Hospital of the Central South University, 410011; 2. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of the University of South China, 421001)

[KEY WORDS] Cardiopulmonary Bypass; Lung Injury; Hydrogen

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the therapeutic effect of Hydrogen inhalation on cardiopulmonary bypass (CPB) induced acute lung injury (ALI) in Beagle dogs. **Methods** CPB models were set up with living Beagle dogs. 20 dogs were divided into hydrogen inhalation group (H_2 group) and control group (C group) randomly. Pulmonary artery pressure (PAP), pulmonary capillary wedge pressure (PCWP) and pulmonary vascular resistance (PVR) were recorded at the five defined time points, artery blood samples were obtained for blood gas analysis and determined plasma cytokine levels (TNF- α , IL-6, IL-8) at the mean time. At the end of the research lung tissue were acquired for evaluation of pulmonary malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), myeloperoxidase (MPO), the ratio of wet to dry lung weight (W/D) and lung histopathology. Neutrophils and total protein content in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were also determined. **Results** Compared with control group, PAP, PCWP and PVR were significantly improved in H_2 group. Neutrophils, total protein, differentiation in the lung W/D and cytokine content were lower than those in control group. Pulmonary MDA and MPO in hydrogen group were lower than those in control group, and the SOD was higher than that in control group. Histologic analysis showed that less lung injury by microscope examination was seen in hydrogen group than that in control group. **Conclusion** 2% Hydrogen inhalation can alleviate CPB induced lung by inhibition of inflammatory and oxidative stress.

[收稿日期] 2010-11-25

[作者简介] 胡啸玲, 博士研究生, 副主任医师, 研究方向为麻醉与镇痛, E-mail 为 huxiaoling0734@126.com。通讯作者汤恢煊, 博士, 教授, 研究方向为肝胆外科, E-mail 为 tanghuihuan@yahoo.com.cn。周志刚, 硕士, 主治医师, 研究方向为麻醉, E-mail 为 zhouzhigang0734@sina.com。

目前在我国冠心病致死率位于肿瘤、脑血管意外后居第三位,而开胸行冠状动脉搭桥术是国际上公认的治疗冠心病最有效的方法,而行此手术经常需要体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)。体外循环后肺损伤首先描述于 50 年前^[1],其严重程度不一,从亚临床肺功能障碍到急性肺损伤(acute lung injury, ALI)及急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)均可能发生^[2],其中 ARDS 的发生率为 2%,病死率高达 60%。相关研究表明 CPB 引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)及缺血再灌注性损伤为导致肺组织损伤的重要机制。

氢气是自然界质量最轻的分子,容易自由扩散并能与羟自由基反应生成水和氢原子,氢原子可继续与羟自由基反应生成水,发挥抗氧化作用,减轻脑^[3]、心^[4]及肺^[5]等器官缺血再灌注损伤。本实验拟观察氢气对体外循环肺损伤影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康雄性 Beagle 犬 20 只,体重 15~20 kg,随机分为体外循环组(对照组)和氢气组(H₂组)两组。Dragger 麻醉机(德国),i-STAT 血气分析仪(美国),STOCKERT 体外循环机(德国),主动脉插管及腔房管(美国)等。

1.2 方法与监测

异丙酚(2 mg/kg)、芬太尼(2 μg/kg)、万可松(0.1 mg/kg)麻醉诱导后行气管插管,机械通气(呼吸机参数:潮气量 8~12 mL/kg、呼吸频率 20 次/分、吸入氧浓度 50%、吸呼比 1:2),维持动脉血二氧化碳浓度于 35~45 mmHg。右侧股动脉穿刺置管测压,右侧股静脉穿刺置入 Swan-Ganz 导管。胸部皮肤剃毛消毒,正中劈开胸骨,游离右侧颈内静脉,置入 5F 双腔中心静脉导管,打开心包,暴露心脏,右侧静脉注射肝素 3 mg/kg,待 ACT>200 s,行主动脉插管(12 F),通过右心耳置入 18 F 腔房管,待 ACT>480 s 后开始 CPB,CPB 过程中保持气道压于 5 cm H₂O。术中动态监测平均动脉压(MAP)、肺动脉压(PAP)及肺动脉楔压(PCWP)。

1.3 实验分组

体外循环组(对照组),CPB 维持 2 h,CPB 结束后继续观察 2 h;氢气组(H₂组),实验全程吸入氢气 1 L/min。20 只动物在 CPB 结束 2 h 后立即放血处死。

1.4 体外循环过程

两组均以万汶 500 mL 及乳酸林格氏液 500 mL 预冲,CPB 过程中维持肛温于 28~30℃,以 50~70 mL/(kg·min)流量转机,当肛温降至 30℃时,阻断升主动脉,主动脉根部灌注冷晶体停跳液(20 mL/kg),心脏停止跳动,主动脉阻断期间每半小时灌注冷晶体停跳液(10 mL/kg),CPB 维持 2 h 后,CPB 结束后鱼精蛋白 1:1 中和肝素作用,CPB 结束后继续观察 2 h。

1.5 监测指标

①在下列 5 个时点:CPB 前(T₀)、CPB 结束时(T₁)、CPB 结束后 15 min(T₂)、60 min(T₃)及 120 min(T₄)记录 MAP、PAP、肺动脉楔压(PCWP)及心输出量(CO),并计算肺血管阻力(PVR) [PVR = (PAP - PCWP)/CO × 79.92]。②抽取股动脉血 1 mL,测定动脉血气指标,经右侧股动脉抽取 1 mL 血标本,用酶联免疫吸附法(ELISA)监测肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素 6(IL-6)和白细胞介素 8(IL-8)。③实验结束时,取右肺上叶注入生理盐水 10 mL,灌洗 3 次,回收支气管灌洗液(BALF),取 1 mL BALF 用血细胞分析仪行白细胞计数,剩余 BALF 离心去除上清液,Bradford 法测定蛋白含量;取右肺中叶组织 0.5 mg,测定肺组织随过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)活性;取右肺下叶组织称湿重,然后置于 80℃恒温箱烘烤 72 h 后称干重,计算干湿比(W/D),右肺上叶组织 10% 甲醛固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋并薄层切片,HE 染色,光镜下观察肺组织病理形态学变化。

1.6 统计分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量的方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 PAP、PVR 和 PaO₂/FiO₂ 变化

随时间延长,两组 PAP 及 PVR 均呈上升趋势,较 T₀ 时刻,其余时点差异有统计学意义($P < 0.05$),且氢气组在 T₂、T₃、T₄ 时刻较对照组低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组 PaO₂/FiO₂ 逐渐降低,较 T₀ 时刻,其余时点差异有统计学意义($P < 0.05$),且氢气组在 T₂、T₃、T₄ 时刻较对照组高,差异

有统计学意义 ($P < 0.05$; 表 1, Table 1)。

2.2 两组 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 变化

两组 TNF- α 、IL-6、IL-8 在 T_2 时刻达峰, 且与 T_0 相比, 差异有统计学意义, T_4 时刻氢气组三者虽较 T_0 仍然为高, 但是差异无统计学意义; T_2 、 T_3 及 T_4 , H_2 组较对照组低, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$;

表 2, Table 2)。

2.3 两组 BALF 蛋白定量、白细胞计数、MPO、SOD、MDA 和 W/D 比较

两组 BALF 蛋白定量、白细胞计数、MPO、SOD、MDA 及 W/D 差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 表 3, Table 3)。

表 1. 两组 PAP、PVR、PaO₂/FiO₂ 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{mmHg}$)

Table 1. The change of PAP, PVR and PaO₂/FiO₂ in two groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

指标	分 组	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
PAP (mmHg)	对照组	7.31 \pm 0.90	8.16 \pm 1.21	9.16 \pm 1.23	10.9 \pm 1.35 ^a	12.6 \pm 1.30 ^a
	氢气组	7.40 \pm 1.25	7.85 \pm 0.87	8.49 \pm 1.19 ^{ab}	9.06 \pm 0.90 ^{ab}	9.50 \pm 1.31 ^{ab}
PVR (dyn \cdot s \cdot cm ⁻⁵)	对照组	97.65 \pm 17.68	203.43 \pm 30.01 ^a	184.85 \pm 28.56 ^a	217.06 \pm 53.72 ^a	215.28 \pm 62.74 ^a
	氢气组	77.46 \pm 13.04	108.92 \pm 40.35 ^{ab}	136.96 \pm 31.62 ^{ab}	139.48 \pm 36.65 ^{ab}	116.46 \pm 41.65 ^{ab}
PaO ₁ /FiO ₂ (mmHg)	对照组	413.00 \pm 17.00	360.00 \pm 19.00 ^a	306.00 \pm 27.00 ^a	261.00 \pm 21.00 ^a	226.00 \pm 17.00 ^a
	氢气组	420.00 \pm 21.00	390.00 \pm 21.00 ^a	320.00 \pm 23.00 ^{ab}	312.00 \pm 25.00 ^{ab}	300.00 \pm 26.00 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与 T_0 比较; b 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

表 2. 两组 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2. The change of TNF- α , IL-6 and IL-8 in two groups

指 标	分 组	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
TNF- α ($\mu\text{g/L}$)	对照组	1.26 \pm 0.14	1.80 \pm 0.11	2.02 \pm 0.12 ^a	1.72 \pm 0.11 ^a	1.47 \pm 0.13 ^a
	氢气组	1.10 \pm 0.10	1.41 \pm 0.09	1.73 \pm 0.14 ^{ab}	1.35 \pm 0.11 ^{ab}	1.22 \pm 0.06 ^b
IL-6 (ng/L)	对照组	15.86 \pm 1.57	25.09 \pm 1.69 ^a	28.66 \pm 1.62 ^a	25.36 \pm 1.73 ^a	19.46 \pm 2.10 ^a
	氢气组	15.21 \pm 0.98	20.04 \pm 1.05 ^{ab}	25.45 \pm 1.71 ^{ab}	17.82 \pm 0.74 ^b	15.91 \pm 1.08 ^b
IL-8 ($\mu\text{g/L}$)	对照组	0.27 \pm 0.15	0.81 \pm 0.07 ^a	1.11 \pm 0.10 ^a	0.67 \pm 0.07 ^a	0.48 \pm 0.06 ^a
	氢气组	0.26 \pm 0.03	0.52 \pm 0.08 ^{ab}	0.77 \pm 0.11 ^{ab}	0.42 \pm 0.05 ^{ab}	0.31 \pm 0.03 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与 T_0 比较; b 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

表 3. 两组 BALF 蛋白定量、白细胞计数、MPO、SOD、MDA 和 W/D 比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3. The comparison of the BALF protein quantitative, numeration of leukocyte, MPO, SOD, MDA and W/D

分组	BALF 蛋白定量 (mg/L)	白细胞计数 ($\times 10^6/\text{L}$)	MPO (U/g)	SOD (kU/L)	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	W/D
对照组	211.62 \pm 110.74	2.29 \pm 0.50	0.02 \pm 0	52.31 \pm 2.92	5.48 \pm 1.91	5.46 \pm 0.55
氢气组	76.28 \pm 12.79 ^a	1.04 \pm 0.22 ^a	0.01 \pm 0 ^a	60.9 \pm 3.05 ^a	2.21 \pm 0.66 ^a	3.18 \pm 0.32 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.4 肺组织形态学比较

肺组织形态学观察结果显示, 光镜下对照组肺泡周围毛细血管充血、出血及间质肺水肿, 肺泡间隔增宽, 间质及肺泡均有中性粒细胞等炎症细胞浸润。

氢气组肺组织中性粒细胞渗出及出血充血轻于对照组, 肺组织渗出不明显, 仅见轻度肺泡内水肿和少量中性粒细胞集聚 (图 1, Figure 1)。

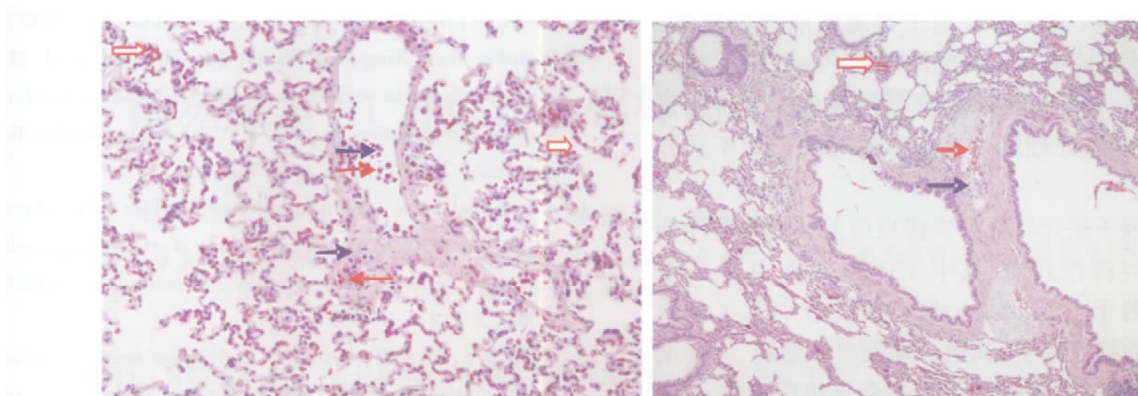


图 1. 光镜下肺组织形态学观察结果 (HE × 400) 左为对照组, 右为氢气组; \rightarrow 、 \leftarrow 、 \rightarrow 分别代表出血的毛细血管、血管中性粒细胞和红细胞。

Figure 1. Morphology of lung tissue under light microscope (HE × 400)

3 讨论

氢气是自然界质量最轻的分子,人和动物体内也存在一定数量的氢气,体内氢气来自大肠内厌氧菌,潜水医学长期研究表明,人呼吸氢气是安全的。氢气本身结构简单,还原性比较弱,只与活性强和毒性强的活性氧反应,不与具有重要信号作用的活性氧反应,且多余的氢气可通过呼吸排出体外,不会有残留,这明显不同于其他抗自由基物质,如维生素 C,与自由基反应后生成对机体不利的代谢产物(氧化型维生素 C),这些产物仍需要机体继续代谢清除,破坏机体氧化与抗氧化平衡,导致患者死亡率增加^[6]。并且再次氢气制备容易方便,因此其具有很强的临床应用前景。

当 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300 \text{ mmHg}$ 即可诊断为 ALI。本实验结果表明对照组在体外循环结束后 1 h 内都发生了 ALI (T_3 、 T_4 时刻 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300 \text{ mmHg}$),而氢气组无 ALI 发生,说明实验过程中吸入 1 L/min 的氢气能有效预防 ALI 发生,并能降低肺动脉压及肺血管阻力,具有一定的肺保护作用。其机制之一是因为氢气能显著提高神经病理性的痛阈,进而降低疼痛引起的交感神经的张力,减少儿茶酚胺类物质的释放达到降低肺血管阻力的效果。

CPB 术后肺损伤是多因素、多环节共同作用的结果。研究显示术前 $\text{PAP} \geq 20 \text{ mmHg}$ 、年龄 ≥ 75 岁、体质指数 (BMI) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ 、每搏指数 (SVI) $\leq 30 \text{ mL/m}^2$ 及急诊手术者是 CPB 诱发肺损伤的高危因素^[7],但其确切机制并未完全明确,全身炎症反应综合征 (SIRS) 及缺血再灌注性损伤为导致肺组织损伤的重要机制。现有旨在降低 CPB 后肺功能损伤的措施主要有 CPB 系统及方式改进^[8]及围术

期应用药物干预炎症反应(如乌司他丁、抑肽酶及西维来司钠等)^[9]。

氢气本身结构简单,还原性较弱。研究表明氢气通过选择性与羟自由基及过氧亚硝基阴离子反应,减少自由基对组织损伤,同时其还可以减少炎症介质的释放从而发挥器官保护作用^[3]。Mao 等^[5]研究表明,氢气能够减轻小鼠肠缺血再灌注导致的肺损伤。本实验研究了氢气对 CPB 导致的肺组织损伤的影响。

在正常生理状态下,自由基生成与清除处在动态平衡中,当缺血再灌注发生时,出现自由基形成和清除失衡,自由基与脂类、蛋白质和核酸发生反应,引起一系列过氧化损伤。丙二醛 (MDA) 是脂质过氧化反应的稳定代谢物,间接反映细胞损伤的程度^[9]。超氧化物歧化酶 (SOD) 是体内重要的抗氧化酶,能清除超氧阴离子,保护细胞免受损伤,对机体的氧化与抗氧化平衡起重要作用^[10]。髓过氧化物酶 (MPO) 是中性粒细胞特异性酶,检测组织内 MPO 活性及 BALF 中白细胞计数也可反映肺组织中性粒细胞浸润程度。肺缺血再灌注时,脂质过氧化活跃,MDA 生成增多,SOD 则因消耗而减少,白细胞迁移至肺泡腔内,肺组织 MPO 增加,本研究结果证明与此相符,但氢气组较对照组有明显减轻肺组织中心粒细胞浸润,增强 SOD 活性,减轻肺组织过氧化。

TNF- α 是缺血再灌注后组织产生的早期致炎因子,关于 TNF- α 在缺血再灌注组织中产生的时点和达峰时间,文献报道不一。Khimenko 等^[11]认为在组织缺血早期就可以监测到 TNF- α 的升高,而 Ep-pinger^[12]等研究表明 TNF- α 的升高出现在再灌注后 30 分钟,并在之后的 3 个小时内呈线性上升。Pavel

等^[13]研究提示 TNF- α 含量于再灌注后开始增加,并在 1 h 达到峰值。本研究结果与 Pavel 等^[13]的研究大致相符,TNF- α 变化的时点差异可能与研究采用的动物模型、处理因素及观察的时间长短不同有关。

细胞因子是介导全身炎症反应及缺血再灌注损伤的主要内源性介质,其中 TNF- α 、IL-6、IL-8 为重要的促炎因子^[14]。TNF- α 是炎症反应中最早释放且最重要的细胞因子,其通过增强单核细胞、巨噬细胞活性,增加细胞粘附因子表达介导组织损伤;IL-6 具有多种生物活性,诱导急性期炎症反应,其增高水平与创伤程度、手术时间及术后并发症有关;IL-8 在炎症组织中白细胞聚集起关键作用。本研究结果表明,与对照组相比,氢气能显著减少血浆中上述促炎因子释放,减轻肺组织炎症反应。

由此可见,氢气可能通过维持体内氧化与抗氧化平衡及减少炎症介质如 TNF- α 、IL-6、IL-8 释放,减少毛细血管充血、出血及间质肺水肿,改善肺组织损伤,从而发挥肺保护作用。

[参考文献]

- [1] Kolff WJ, Effler DB, Groves LK. Pulmonary complications of open heart operations. Their pathogenesis and avoidance [J]. Cleve Clin Q, 1958, 25 (2) : 65-83.
- [2] Shroyer AL, Coombs LP, Peterson ED, et al. The Society of Thoracic Surgeons:30-day operative mortality and morbidity risk models [J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75 (6) : 1 856-864.
- [3] Ohsawa M, Ishikawa K, Takahashi M, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals [J]. Nat Med, 2007, 13 (6) : 688-694.
- [4] Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, et al. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. Biochemical and Biophysical Research [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 373 (1) : 30-35.
- [5] Yan-Fei Mao, Xing-Feng Zheng, Jian-Mei Cai, et al. Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, (381) (4) : 602-605.
- [6] Goran Bjelakovic, Dimitrinka Nikolova, Lise Lotte Gluud, et al. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention [J]. JAMA, 2007, 297 (8) : 842-857.
- [7] Rady MY, Ryan T, Starr JN. Early onset acute pulmonary dysfunction after cardiovascular surgery: Risk factors and clinical outcome [J]. Crit Care Med, 1997, 25 (11) : 1 831-839.
- [8] Suzuki T, Fukuda T, Ito T, et al. Continuous pulmonary perfusion during cardiopulmonary bypass prevents lung injury in infants [J]. Ann Thorac Surg, 2000, 69 (2) : 602-606.
- [9] ZHANG Hong, GOU Da-Ming, CAI Hui-Jun, et al. Protective effects of sivelestat against acute lung injury during cardiopulmonary bypass in dogs [J]. Fourth Mi Med Univ, 2006, 27 (15) : 1 380-383.
- [10] Du Yan-ling, Chen Rui. Protective role of superoxide dismutase in cerebral ischemia [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2005, 9 (21) : 191-195.
- [11] Khimerko PL, Bagby G, Fuseler J. Release of tumor necrosis factor-alpha after pulmonary artery occlusion and reperfusion [J]. Res Respir Dis, 1993, 10 (1) : 147-143.
- [12] Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, et al. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung [J]. Pathol, 1997, 150 (5) : 1 773-784.
- [13] Pavel L, Khiemko GJ, Bagby J, et al. Tumor necrosis factor-alpha in ischemia and reperfusion injury in rat lungs [J]. Appl Physiol, 1998, 85 (6) : 2 005-011.
- [14] Marc de Perrot, Mingyao Liu, Thomas K, et al. Ischemia-Reperfusion induced lung injury [J]. Respir Crit Care Med, 2003, 167 (4) : 490-511.

(此文编辑 李小玲)