

含氢饱和生理盐水对急性一氧化碳中毒性迟发性脑病的神经保护作用

蔡建美, 毛旭强

(无锡市人民医院神经内科, 江苏省无锡市 214043)

[关键词] 氢气; 细胞凋亡; 一氧化碳; 中毒性脑病; 氧化应激; 炎症反应

[摘要] 目的 研究含氢饱和生理盐水对急性一氧化碳(CO)中毒迟发性脑病的神经保护作用及可能机制。方法 雄性SD成年大鼠随机分为空白对照组、CO+生理盐水组、CO+氢生理盐水组。制备一氧化碳中毒模型,含氢饱和生理盐水或者生理盐水以10 mg/kg剂量间隔8 h连续给药6次,观察一氧化碳中毒后5天内神经元凋亡指数,检测脑组织内Caspase-3活性、丙二醛含量、超氧化物歧化酶活性和肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6、8-羟基脱氧鸟嘌呤水平。结果 饱和氢生理盐水明显减少细胞凋亡,降低丙二醛、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6及8-羟基脱氧鸟嘌呤含量,抑制Caspase-3及超氧化物歧化酶活性。结论 饱和氢生理盐水通过抗凋亡、抗炎及抗氧化作用降低急性一氧化碳中毒迟发性脑损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Neuroprotective Effects of Hydrogen-rich Saline on Brain Injury of Acute Carbon Monoxide Poisoned Rats

CAI Jian-Mei, and MAO Xu-Qiang

(Department of Neurology, Wuxi People's Hospital, Wuxi, Jiangsu 214043, China)

[KEY WORDS] Hydrogen; Apoptosis; Carbon Monoxide; Toxic Encephalopathy; Oxidative Stress; Inflammation Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the neuroprotective effects of hydrogen-rich saline on brain injury of acute carbon monoxide (CO) poisoned rats. **Methods** Adult male Sprague-Dawley rats were randomly assigned to the following groups; normal group, CO + saline group and CO + hydrogen saline group. Hydrogen-rich saline or normal saline was given intraperitoneally in the dose of 10 mg/kg with an interval of 8 hours for six consecutive times. The normal group rats were used as normal controls. At 5 days after CO poisoning, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay (TUNEL) staining, the activity of caspase-3, superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA), the level of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine (8-OHdG) were conducted in established acute carbon monoxide poisoned rats. **Results** TUNEL-positive cells, the content of MDA, the level of TNF- α , IL-6 and 8-OHdG, decreased the activity of caspase-3 and SOD were apparently reduced by hydrogen-rich saline. **Conclusion** Hydrogen-rich saline reduced CO encephalopathy through its antioxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory actions.

急性一氧化碳(carbon monoxide, CO)中毒后,有3%~30%的患者会出现以痴呆、精神症状和锥体外系症状为主的神经系统疾病,称之为CO中毒迟发性脑病^[1],但其发生机制并不清楚。氧化应激和炎症反应被认为是CO中毒迟发性脑病的重要原因。近期研究证明氢气具有清除氧自由基、降低炎

症反应、抑制细胞凋亡等特性,对于与氧化应激及炎症相关疾病如动脉粥样硬化、帕金森、脑梗死等具有预防或治疗效果^[2-4],其作用机制为氢气选择性中和羟自由基和亚硝酸阴离子^[4]。本实验建立急性CO中毒模型,从炎症、凋亡、氧化损伤方面观察含氢饱和生理盐水对急性CO中毒迟发性脑病的

[收稿日期] 2012-11-14

[作者简介] 蔡建美,博士,主要研究方向为医学气体对脑血管疾病的影响,E-mail为 cailongxin1211@163.com。毛旭强,主任医师,主要研究方向为脑血管疾病的基础与临床,E-mail为 maoxq@wuxiph.com。

保护作用以及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 试剂

原位细胞凋亡检测 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay, TUNEL) 试剂盒、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 试剂盒、8-羟基脱氧鸟嘌呤 (8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanine, 8-OHdG) 试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司, Caspase-3/ CPP32 荧光检测试剂盒购自美国 BioVision 公司, 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

1.2 实验动物及分组

健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体重 250 ~ 280 g, 由中国科学院上海分院实验动物中心提供。术前禁食 12 h。50 只大鼠随机分成 3 组: 空白对照组 ($n=10$)、CO + 生理盐水组 ($n=20$)、CO + 氢生理盐水组 ($n=20$)。

1.3 含氢饱和生理盐水制备

将纯度 99.9% 氢气注入铝制密封生理盐水袋, 再将其袋放置密闭容器内, 在 4 atm (1 atm = 101.325 kPa)、4°C 条件下加压 4 h。根据 Ohsawa 方法^[4]检测袋内溶解的氢气含量可到 0.86 mmol/L。然后放置到 4°C 冰箱, 每次使用前用气相色谱仪 (日本岛津 QP5000 气相色谱仪) 测定氢气含量达 0.86 mmol/L 才可使用。

1.4 一氧化碳中毒模型

在密闭的容器 (DWC450-1150 型动物实验高压氧舱) 内, 大鼠呼吸 2 000 mL · L⁻³ 的 CO 气体 40 min, 然后再呼吸 3 000 mL · L⁻³ 的 CO 气体 20 min, 直至意识丧失, 再呼吸空气直至意识恢复。出仓后 0、6、12、18 h 给予 10 mL/kg 氢水或生理盐水。CO 中毒 5 天后断头取材做病理切片和组织匀浆。

1.5 细胞凋亡染色

4 μ m 脑冠状切片, 烤片, 恒温烤箱内 60°C 放置 1 h; 梯度脱蜡, 二甲苯浸洗 3 次, 每次 10 min, 浸洗梯度 (100%、95%、85%、75%) 乙醇各 1 次, 每次 3 min; 按罗氏凋亡试剂盒说明书操作, 切片放入 3% H₂O₂ 的甲醇溶液中, 10 min 后进行渗透处理, 蛋白水解酶 K 21 ~ 37°C 孵育 15 ~ 30 min, PBS 漂洗切片

2 次; 然后用吸水纸将样品周围区域水分吸干, 在样品上加入 50 μ L TUNEL 反应混合物, 放入湿盒中, 37°C 避光孵育 60 min; 然后用 PBS 漂洗切片 3 次, 每次 5 min, TSM1 处理 5 min, TSM2 处理 5 min; 用 TSM2 溶液配制 NBT/BCIP 显色液, 室温下避光显色 3 min, 双蒸水多次洗涤; 脱水、透明, 中性树胶封片。显微镜下观察各组大鼠损伤侧神经凋亡细胞情况, 随机选取 6 个放大 400 倍视野 (0.6 mm²) 计数阳性细胞数, 取平均值。

1.6 Caspase-3 活性的检测

应用 Caspase-3/ CPP32 荧光检测试剂盒测定。将各组样品按每孔 20 ~ 200 μ g 加入 96 孔板, 然后依次加入 2 倍稀释的反应缓冲液, 1 mmol/L DEVD-APC 酶 5 μ L, 37°C 避光孵育; 设定 400 nm 激发波和 505 nm 发射波, 记录各实验组相对荧光值 (relative fluorescence unit, RFU)。

1.7 MDA 和 SOD 含量测定

断头取双侧大脑皮层, 置冰冷生理盐水洗去浮血, 按脑重与匀浆介质体积比 1:9 制备 10% 匀浆, 经 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 BCA 法测定各样品中蛋白质含量, 按试剂盒说明书测定脑组织 SOD 活性和 MDA 含量。

1.8 8-OHdG、TNF- α 、IL-6 含量测定

取脑组织, 生理盐水冲洗, 保存在 4°C。匀浆取上清, 保存于 -80°C。按试剂说明用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 8-羟基脱氧鸟嘌呤、TNF- α 、IL-6 含量, 用酶标仪测定吸光值, 绘制数据曲线。

1.9 统计学处理

实验结果用 SPSS 11.0 统计软件, 数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用单因素方差分析 (One Way ANOVA), 显著差异用 SNK-q 检验进行比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TUNEL 阳性细胞计数

空白对照组皮层中可见少量凋亡细胞。CO + 生理盐水组、CO + 氢生理盐水组皮层中阳性细胞明显增多。胞体中染色体浓聚, 一部分神经元形成凋亡小体, 形状各有不同, 最具特征性的是三角形的小体 (图 1)。仅仅清楚深染的神经元细胞被作为 TUNEL 阳性细胞计数。CO 中毒后神经元细胞凋亡增多, 与 CO + 生理盐水组比较, CO + 氢生理盐水组神经元细胞凋亡明显减少 ($P < 0.01$; 表 1)。

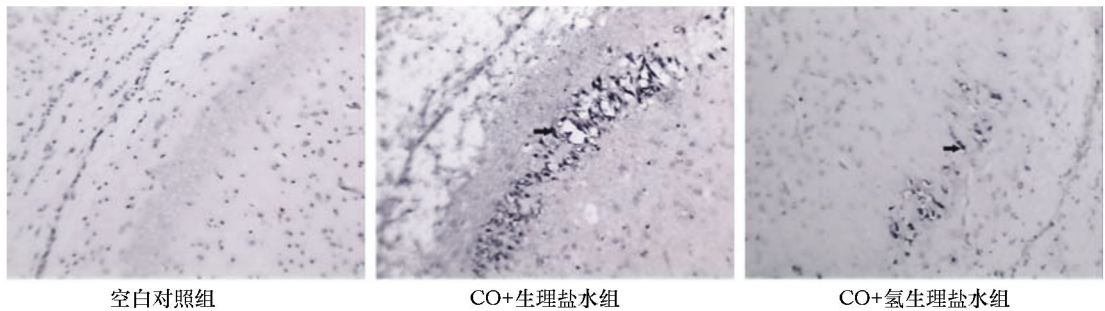


图 1. CO 中毒 5 天后凋亡染色 (×10)

Figure 1. TUNEL staining at fifth day after CO poisoning (×10)

2.2 脑组织匀浆 Caspase-3 活性

CO + 生理盐水组脑组织内 Caspase-3 活性显著升高,与 CO + 生理盐水组比较,CO + 氢生理盐水组 Caspase-3 活性显著降低 ($P < 0.01$; 表 1)。

表 1. 各组 TUNEL 阳性细胞计数、Caspase-3 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 1. Comparison of the numbers of TUNEL positive cells and Caspase-3 activity among three groups ($\bar{x} \pm s$)

分 组	TUNEL 阳性细胞 (个)	Caspase-3 活性 (RFU)
空白对照组	40.62 ± 1.75	0.28 ± 0.08
CO + 生理盐水组	77.43 ± 11.78	1.16 ± 0.18
CO + 氢生理盐水组	50.52 ± 9.65 ^a	0.74 ± 0.24 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与 CO + 生理盐水组比较。

2.3 脑组织匀浆 MDA 含量和 SOD 活性

与 CO + 生理盐水组比较,CO + 氢生理盐水组脑组织内 SOD 活性显著升高,MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$);CO + 氢生理盐水组与空白对照组比较无显著差异(表 2)。提示氢饱和生理盐水可降低氧化损伤作用。

表 2. 各组 MDA 含量、SOD 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2. Comparison of malondialdehyde and superoxide dismutase among three groups ($\bar{x} \pm s$)

分 组	MDA ($\mu\text{mol/g}$ 蛋白)	SOD (ku/g 蛋白)
空白对照组	4.14 ± 0.96	120.00 ± 20.59
CO + 生理盐水组	11.41 ± 3.74	86.59 ± 15.76
CO + 氢生理盐水组	7.63 ± 2.22 ^a	139.00 ± 29.62 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与 CO + 生理盐水组比较。

2.4 脑组织匀浆 TNF- α 、IL-6、8-OHdG 含量

CO 中毒后 TNF- α 、IL-6、8-OHdG 含量升高,CO + 氢生理盐水组 TNF- α 、IL-6、8-OHdG 含量显著低

于 CO + 生理盐水组 ($P < 0.01$),与空白对照组比较无显著差异(表 3)。

表 3. 各组脑组织内 TNF- α 、IL-6 和 8-OHdG 的变化 ($\bar{x} \pm s$, pg/g)Table 3. Comparison of TNF- α , IL-6 and 8-OHdG among three groups ($\bar{x} \pm s$, pg/g)

分 组	TNF- α	IL-6	8-OHdG
空白对照组	5.10 ± 0.93	2.16 ± 0.67	2.40 ± 0.64
CO + 生理盐水组	7.31 ± 1.21	6.24 ± 1.14	6.41 ± 1.29
CO + 氢生理盐水组	4.67 ± 0.84 ^a	3.27 ± 0.81 ^a	3.81 ± 1.14 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与 CO + 生理盐水组比较。

3 讨 论

实验结果显示氢饱和生理盐水可显著抑制 CO 中毒后神经元细胞凋亡,增强抗氧化作用,减少氧化损伤,阻断炎症反应,从而有效降低 CO 中毒迟发性脑损伤。

CO 中毒迟发性脑病具体机制不很明确,CO 中毒迟发性脑病与氧化应激损伤有密切关系。在急性 CO 中毒时,由于缺氧及能量代谢障碍,存在着内皮细胞肿胀,微血管收缩,部分毛细血管闭塞,微循环障碍等病理生理改变。在随后给予的常压或者高压氧治疗过程中,随着微循环的改善,组织供氧的恢复,组织存在着“缺血-再灌注”的病理过程,在此过程中,出现脑血管和脑细胞严重损伤,自由基生成增多,脂质过氧化增强^[5],而脑组织更易受氧自由基的损伤,因此,最大程度降低自由基氧化损伤可防止急性一氧化碳中毒脑病的发生。丙二醛含量常可反映机体内脂质过氧化的程度,超氧化物歧化酶能清除超氧阴离子自由基,保护脑细胞免受损伤。8-羟基脱氧鸟嘌呤是 DNA 损伤后的氧化产物,直接反映细胞损伤程度。本实验检测 CO 中毒 5

天后脑组织内丙二醛含量、8-羟基脱氧鸟嘌呤水平、超氧化物歧化酶活性,结果显示氢饱和生理盐水显著降低脑组织中丙二醛及 8-羟基脱氧鸟嘌呤含量,提高超氧化物歧化酶活性,从而增强机体对抗氧化损伤,减轻 CO 中毒脑病损伤程度。

此外,研究表明一氧化碳可以直接诱导神经细胞凋亡^[6,7],其在急性一氧化碳中毒及迟发性脑病的病理过程中可能起着重要作用。神经细胞凋亡是脑缺血再灌注损伤的重要环节,Caspase-3 是细胞凋亡信号途径中最关键的效应酶,在细胞凋亡过程中处于核心位置,凋亡的最后实施是通过 Caspase-3 的活化而实现;Caspase-3 的活化预示着细胞凋亡执行阶段的开始。本实验结果显示氢饱和生理盐水可抑制 Caspase-3 活性,阻断细胞凋亡程序,减少神经元细胞凋亡。

近几年免疫反应被认为是 CO 中毒后脑组织损伤的一种重要机制^[8]。CO 中毒后脑组织缺血缺氧引起髓鞘碱性蛋白变性及氧化丙二醛产生以及血浆中的髓过氧化物酶活化^[9]等,最终导致巨噬细胞和淋巴细胞浸润、中性粒细胞和血小板聚集等免疫反应的发生,促进 TNF- α 、IL-6、IL-1 等炎症因子产生与分泌,诱导一系列炎症反应损伤。在我们的模型,检测到一氧化碳中毒后大鼠脑组织中炎症标志物 TNF- α 、IL-6 含量显著提高,表明大量炎症在 CO 中毒后脑组织损伤发展中起到了重要的作用。在给予氢饱和生理盐水处理后,脑组织内 TNF- α 、IL-6 含量显著降低,抑制了炎症反应,从而降低 CO 中毒性脑损伤。我们前期研究证明,氢饱和生理盐水可改善 CO 中毒大鼠学习记忆能力,降低髓鞘蛋白变性,抑制 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 表达^[10]。Wang 等^[2]通过对疾病模型的行为学指标和细胞学改变以及参与自由基反应的重要金属离子的改变三方面阐述了氢水的治疗作用。而我们的研究除了观察凋亡的改变之外,从脑部炎症的角度进一步探索了氢水对 CO 引起的炎症的直接调节。我们在组织水平的研究取得了初步结果,但是其中具体的细胞以及分子机制尚待进一步深入研究。

众所周知,氧化应激导致低密度脂蛋白氧化,同时刺激内皮细胞炎症因子和黏附因子释放,加剧动脉硬化斑块炎症反应,总之,氧化应激贯穿于动脉硬化斑块形成、发展及破裂出现并触发血管事件的始终^[11,12]。Ohsawa 等^[13]研究采用载脂蛋白基因敲除小鼠证明,饮用含氢水降低了主动脉的氧化应激水平,阻止了动脉粥样硬化的发生;其后 Song

等^[14]在细胞水平证实氢气可能通过抑制核因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 活性,减少炎症因子诱导凝集素样氧化低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 表达,发挥抗动脉粥样硬化作用。因此新型抗氧化剂氢气将为抗动脉粥样硬化基础和临床研究开辟一种新的思路。

[参考文献]

- [1] Piantadosi CA. Carbon monoxide poisoning[J]. Undersea Hyperb Med, 2004, 31(1): 167-177.
- [2] Wang W, Li Y, Ren J, et al. Hydrogen rich saline reduces immune-mediated brain injury in rats with acute carbon monoxide poisoning[J]. Neurol Res, 2012, 34(10): 1 007-015.
- [3] Fu Y, Ito M, Fujita Y, et al. Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease[J]. Neurosci Lett, 2009, 453(2): 81-85.
- [4] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic anti-oxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radical[J]. Nat Med, 2007, 13(6): 688-694.
- [5] Thom SR, Bhopale VM, Fisher D, et al. Delayed neuropathology after carbon monoxide poisoning is immune mediated [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(37): 13 660-665.
- [6] Thom SR. Carbon monoxide-mediated brain lipid peroxidation in the rat[J]. J Appl Physiol, 1990, 68(3): 997-1 003.
- [7] Piantadosi CA, Zhang J, Levin ED, et al. Apoptosis and delayed neuronal damage after carbon monoxide poisoning in the rat [J]. Exp Neurol, 1997, 147(1): 103-114.
- [8] Turcanu V, Dhoub M, Gendrault JL, et al. Carbon monoxide induces murine thymocyte apoptosis by a free radical-mediated mechanism[J]. Cell Biol Toxicol, 1998, 14(1): 47-54.
- [9] Thom SR, Bhopale VM, Han ST, et al. Intravascular neutrophil activation due to carbon monoxide poisoning[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 174(11): 1 239-248.
- [10] Sun Q, Cai J, Zhou J, et al. Hydrogen-rich saline reduces delayed neurologic sequelae in experimental carbon monoxide toxicity[J]. Crit Care Med, 2011, 39(4): 765-769.
- [11] 陈媛,周玫. 氧化应激-炎症在动脉粥样硬化发生发展中作用研究的新进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(10): 757-762.
- [12] 刘虹彬,温进坤,韩梅. 氧化应激与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9(4): 360-362.
- [13] Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, et al. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(4): 1 195-198.
- [14] Song G, Tian H, Liu J, et al. H₂ inhibits TNF- α -induced lectin-like oxidized LDL receptor-1 expression by inhibiting nuclear factor κ B activation in endothelial cells[J]. Biotechnol Lett, 2011, 33(9): 1 715-722.

(此文编辑 曾学清)