

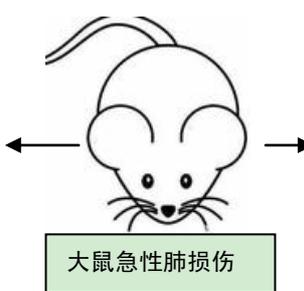
甲烷饱和和生理盐水对内毒素导致急性肺损伤模型大鼠的保护作用

孟庆溪¹, 王伟恒², 孙爱军³, 席焱海¹, 叶晓健¹ (¹第二军医大学长征医院脊柱微创中心, 上海市 200433; ²第二军医大学长征医院, 上海市 200433; ³第二军医大学解剖组胚教研室, 上海市 200433)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0599 ORCID: 0000-0001-9013-7761(孟庆溪)

文章快速阅读:

甲烷饱和和生理盐水对内毒素致大鼠急性肺损伤的保护作用



大鼠急性肺损伤

分组:

- (1)空白组
- (2)对照组
- (3)急性肺损伤组
- (4)急性肺损伤组+甲烷组

检测:

- (1)肺组织学观察;
- (2)肺泡灌洗液中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6、白细胞介素 1 β 质量浓度;
- (3)肺组织丙二醛和超氧化物歧化酶含量;
- (4)肺组织中细胞凋亡情况;
- (5)肺组织中 caspase-3 含量。

结论:

- (1)甲烷饱和和生理盐水可以显著降低内毒素引起的大鼠急性肺损伤的死亡率;
- (2)降低肺组织氧化应激反应, 炎症因子的表达, 肺组织的细胞凋亡。

孟庆溪, 男, 1978 年生, 山东省泰安市人, 汉族, 第二军医大学在读博士, 副主任医师, 主要从事脊柱外科研究。

通讯作者: 叶晓健, 博士, 教授, 主任医师, 第二军医大学长征医院脊柱微创中心, 上海市 200433

文献标识码: B
稿件接受: 2018-07-28



文题释义:

内毒素: 是革兰阴性细菌细胞壁的主要成分, 以脓毒症为起因的急性肺损伤与血浆中革兰阴性细菌细胞壁成分内毒素的水平密切相关, 被公认为是引起脓毒症性急性肺损伤的首要物质。

ARDS: 即急性呼吸窘迫综合征。是指严重感染、创伤、休克等肺内外疾病袭击后出现的以肺泡毛细血管损伤为主要表现的临床综合征, 属于急性肺损伤的严重阶段或类型。其临床特征包括呼吸频速和窘迫, 进行性低氧血症, X 射线呈现弥漫性肺泡浸润。ARDS 的病因甚多, 每类又有若干种疾病或致病因素。

摘要

背景: 研究表明甲烷在肠道、肝脏、心肌等多种缺血再灌注损伤疾病中具有显著的抗氧化和抗凋亡作用。甲烷对急性肺损伤的保护作用未见相关研究。

目的: 分析甲烷饱和和生理盐水对由于内毒素导致的大鼠急性肺损伤的保护作用及其可能的机制。

方法: 内毒素(20 mg/kg)诱导大鼠急性肺损伤。实验分为空白组, 对照组(甲烷饱和和生理盐水), 急性肺损伤组, 急性肺损伤组+甲烷组(急性肺损伤甲烷饱和和生理盐水治疗)。24 h 后取材测定肺组织湿干质量比, 苏木精-伊红染色及电镜组织学检查, ELISA 法检测肺泡灌洗液中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6、白细胞介素 1 β 炎症因子的质量浓度, 并检测肺组织丙二醛和超氧化物歧化酶活性; TUNEL 检测肺组织中细胞凋亡情况; Western blot 法检测肺组织中 caspase-3 含量。

结果与结论: ①空白组和对照组在各项指标上均无显著差异; ②与空白组相比, 急性肺损伤和急性肺损伤+甲烷组肺组织湿干质量比显著增加($P < 0.05$), 肺组织的炎症反应强度、氧化应激水平和凋亡率均显著增高($P < 0.05$); ③与急性肺损伤组相比, 急性肺损伤+甲烷组肺组织湿干质量比, 炎症因子、细胞凋亡率、caspase-3 表达及丙二醛含量均有显著降低($P < 0.05$), 超氧化物歧化酶活性提高($P < 0.05$); ④结果说明, 甲烷饱和和生理盐水可以通过降低肺组织氧化应激水平, 抑制炎症因子表达, 减少细胞凋亡等途径治疗由于内毒素导致的大鼠急性肺损伤。

关键词:

甲烷; 内毒素; 急性肺损伤; 湿干重比; 氧化应激; MDA; SOD; 炎症反应; 凋亡; caspase-3; 组织构建

主题词:

甲烷; 内毒素类; 急性肺损伤; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 6; 白细胞介素 1 β ; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 组织工程

中图分类号: R446; R318

缩略语:

急性呼吸窘迫综合征: acute respiratory distress syndrome, ARDS

Meng Qingxi, Doctoral candidate, Associate chief physician, Center for Minimally Invasive Spine Surgery, Shanghai Changzheng Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Ye Xiaojian, MD, Professor, Chief physician, Center for Minimally Invasive Spine Surgery, Shanghai Changzheng Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Protective effects of methane saturated saline on endotoxin-induced acute lung injury in rats

Meng Qingxi¹, Wang Weiheng², Sun Aijun³, Xi Yanhai¹, Ye Xiaojian¹ (¹Center for Minimally Invasive Spine Surgery, Shanghai Changzheng Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ²Shanghai Changzheng Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ³Department of Anatomy and Histoembryology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract

BACKGROUND: Methane has been shown to have significant antioxidant and anti-apoptotic effects in many diseases, such as intestine, liver, myocardium and other ischemia/reperfusion injury. The protective effect of methane on acute lung injury (ALI) has not been studied.

OBJECTIVE: To investigate the protective effect of methane saturated saline on ALI induced by endotoxin in rats and its possible mechanism.

METHODS: ALI in rats was induced by endotoxin (20 mg/kg). The experiment was divided into blank, control (methane saturated saline), ALI, ALI and methane (ALI treated by methane saturated saline) groups. After 24 hours, the wet/dry weight ratio of lung tissue was detected.

Hematoxylin-eosin staining and electron microscopy were conducted. The contents of tumor necrosis factor α , interleukin 6, and interleukin 1 β in alveolar lavage, and activity of malondialdehyde and superoxide dismutase in lung tissue were determined by ELISA. Cell apoptosis was measured by TUNEL. The content of caspase-3 in lung tissue was detected by western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: There was no significant difference in each index between blank and control groups. Compared with the blank group, the wet/dry weight ratio, inflammatory reaction in lung tissue, oxidative stress and apoptotic rate were significantly increased in the ALI and ALI and methane groups ($P < 0.05$). Compared with the ALI group, the wet/dry weight ratio, inflammatory cytokines, apoptotic rate, caspase-3 expression and malondialdehyde content were significantly decreased, and superoxide dismutase activity was significantly increased in the ALI and methane group ($P < 0.05$). In summary, methane saturated saline can treat ALI caused by endotoxin by reducing the level of oxidative stress in lung tissue, inhibiting the expression of inflammatory factors and reducing apoptosis.

Subject headings: Methane; Endotoxins; Acute Lung Injury; Tumor Necrosis Factor- α ; Interleukin-6; Interleukin-1 β ; Malondialdehyde; Superoxide Dismutase; Tissue Engineering

0 引言 Introduction

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)和急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是临床上常见的致死率较高的危重症^[1]。急性肺损伤/ARDS病因不同发病率也不同,根据不同地区的ICU患者研究发现发病率在20%–50%^[2-3]。急性肺损伤/ARDS病死率的报道差异也较大(15%–72%)^[4-6],总体来说目前ARDS的病死率仍较高。急性肺损伤/ARDS发病机制错综复杂^[7],肺脏最容易受累,机体严重损伤时引起的全身免疫炎症反应导致肺容量减少,肺顺应性降低,通气/血流比例失调导致进行性的低氧血症和呼吸窘迫,进而威胁生命。

急性肺损伤/ARDS具体的细胞及分子机制至今仍未阐述清楚。研究证据表明,急性肺损伤的发病机制主要包括:细胞因子的失衡、氧化应激损伤、细胞凋亡等^[8]。细胞因子失衡主要是指在急性肺损伤的发病过程中大量单核巨噬细胞激活并释放大量的炎症因子,炎症因子和抗炎因子水平失衡诱发肺脏和全身炎症反应。急性肺损伤时中性粒细胞活化产生并释放大量的活性氧,活性氧可以通过氧化细胞膜脂质直接损伤肺实质细胞,也可损伤毛细血管基底膜等间质成分导致肺损伤。炎症反应和氧化损伤共同造成毛细血管通透性增高,组织水肿并进一步加重组织损伤。细胞凋亡在急性肺损伤时显著增加,在急性肺损伤的早期肺血管内皮细胞就可发生细胞凋亡,在急性肺损伤的恢复期,细胞凋亡也参与了肺组织的重建及功能恢复。

目前的急性肺损伤治疗策略主要集中在原发病的治疗、呼吸支持治疗、液体管理等。近来,有学者报道了饱和氢气生理盐水可以用于治疗急性肺损伤^[9-11],为急性肺损伤的治疗提供一种全新的思路。由于部分人群肠道内存在产甲烷细胞,可将肠道内的氢气转化为甲烷^[12],因此对氢气和甲烷的治疗效果产生混淆,而甲烷在体内生理作用一直被人们所忽视。

甲烷是一种广泛存在于自然界中分子量最小的有机物,是导致温室效应的主要气体之一^[13]。近年体内体外实验研究发现甲烷具有多种生物活性,具有抗氧化、抗炎症、

抗凋亡等作用,对多种疾病具有良好的治疗和潜在的临床应用价值^[14-15]。甲烷饱和生理盐水是否能够治疗急性肺损伤未见报道,因此研究就饱和甲烷生理盐水通过腹腔注射对由内毒素导致的大鼠急性肺损伤的治疗作用及其具体机制进行实验设计及研究。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2016年6月至2017年6月在第二军医大学动物实验中心完成。

1.3 材料

实验动物: 体质量200–220 g的雄性SD大鼠40只,所有的实验大鼠均购买于温州医科大学实验动物中心。动物实验前饲养于20–22 °C无特殊病原菌的动物房一两周以适应环境,并自由摄入食物和水。所有的实验过程均经温州医科大学实验动物管理伦理委员会批准进行。动物处理及实验操作过程均符合实验动物伦理要求。

饱和甲烷生理盐水: 参照文献[15]介绍方法配制,将生理盐水置于高纯度甲烷气体(纯度>99.999%)环境中,在0.4 mPa压力下加压暴露3 h,至甲烷溶解于生理盐水至饱和状态,4 °C保存。为保证生理盐水中的甲烷浓度,使用前新鲜配制,液相色谱法检测生理盐水中甲烷浓度为0.99 mmol/L。

实验用主要试剂: 内毒素(LPS, SIGMA公司, 5 mg/kg, Escherichia coli B55:5, iv); 大鼠肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6的ELISA试剂盒(R&D公司); MPO、SOD试剂盒(南京建成生物工程研究所)、TUNEL试剂盒(罗氏公司)、小鼠抗大鼠caspase-3抗体(CST公司)等。

1.4 实验方法 将40只健康的成年雄性SD大鼠随机分成4组($n=10$): 空白组,饱和甲烷生理盐水对照组(对照组),急性肺损伤组,急性肺损伤饱和甲烷生理盐水治疗组(急性肺损伤+CH4组)。大鼠实验前禁食12 h,自由饮水。参照已有文献方法^[16],急性肺损伤组和急性肺损伤+CH4组经腹腔注射相应剂量的内毒素(20 mg/kg)建立急性肺损伤大

鼠模型。急性肺损伤+CH4组在注射内毒素的同时注射甲烷饱和生理盐水20 mL/kg, 12 h注射1次; 对照组单纯腹腔注射甲烷饱和生理盐水20 mL/kg, 12 h注射1次; 空白组和急性肺损伤组腹腔注射生理盐水20 mL/kg, 12 h注射1次。大鼠处理24 h后水合氯醛过量麻醉处死, 取出肺组织及肺泡灌洗液待测相应指标。

1.5 主要观察指标

1.5.1 肺组织湿干质量比(W/D) 大鼠造模24 h后, 每组取5只大鼠, 体积分数10%水合氯醛过量麻醉处死后开胸取左肺, 迅速用滤纸将肺表面水分和血液吸干, 电子天平称质量记录后, 置于80 °C烘箱内烘烤48 h至恒质量, 电子天平再次称质量, 计算各组肺组织的W/D值($n=5$)。

1.5.2 肺组织苏木精-伊红染色 使用W/D测量取材的大鼠, 取材部分右肺上叶, 并于40 g/L的多聚甲醛固定12 h, 常规脱水处理石蜡包埋, 切片制成5 μm 切片, 经脱蜡按照苏木精-伊红染色步骤染色后于光学显微镜(奥林巴斯, 日本)下观察肺组织的病理形态学改变($n=5$)。

1.5.3 肺组织电子显微镜观察 使用W/D测量取材的大鼠, 取材右肺下叶, 将右肺下叶切成1.0–2.0 mm³立方体, 4 °C下固定在含有2.5%戊二醛的密闭容器中。使用注射器将容器抽吸成负压, 以排空肺组织内的气体然后使用四氧化锇处理, 并以连续浓度的乙醇脱水。再次用环氧丙烷处理组织, 然后加入环氧丙烷/环氧树脂混合物。最后用Epon812将它们嵌入带有新鲜制备的树脂中。切片后使用乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 并使用Hitachi-7500透射电子显微镜以10 000–20 000倍率进行观察($n=3$)。

1.5.4 支气管肺泡灌洗液(BALF)收集及细胞染色 内毒素处理动物24 h后, 每组取材剩下的5只大鼠, 体积分数10%水合氯醛麻醉动物。按照已有文献报道方法^[17-18], 于大鼠颈部暴露气管后将7号钝头腰穿针穿入气管后, 细线固定, 使用灭菌生理盐水5 mL, 在无菌条件下进行支气管肺泡灌洗, 反复3次, 回收约4.5 mL。将收集的灌洗液于4 °C, 1 500 \times g离心15 min, 上清液使用1.5 mL的ep管分装-80 °C保存待测。离心沉淀的细胞混匀取10 μL 涂在载玻片上, 冷风吹干, 无水乙醇固定后严格按照吉姆萨染色步骤进行染色, 光镜下(奥林巴斯, 日本)进行沉淀细胞的种类及形态学观察($n=5$)。

1.5.5 ELISA法检测支气管肺泡灌洗液中炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6水平 内毒素处理动物24 h后, 体积分数10%水合氯醛麻醉动物。按照上述方法收集各组支气管肺泡灌洗液, 使用ELISA试剂盒(R&D公司)检测支气管肺泡灌洗液中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 和白细胞介素6的质量浓度, 检测甲烷处理对正常大鼠及急性肺损伤肺组织中的炎症因子水平和炎症反应强度的影响。严格按照试剂盒使用说明书操作, 并使用酶标仪(ELx800, BioTek)于450 nm检测吸光度值, 并根据标准曲线分别计算支气管肺泡灌洗液样本中肿瘤坏死因子 α 、

白细胞介素1 β 、白细胞介素6的质量浓度($n=5$)。

1.5.6 丙二醛和超氧化物歧化酶试剂盒检测肺组织氧化应激水平 内毒素处理动物24 h后, 体积分数10%水合氯醛麻醉动物。麻醉后的大鼠经预冷的0.01 mol/L PBS心脏灌注后, 迅速取下右肺中叶, 匀浆后, 4 °C下10 000 \times g离心10 min, 取组织上清液, 使用BCA测定法测定上清液中的蛋白质浓度, 然后严格按照丙二醛和超氧化物歧化酶检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书检测肺组织中丙二醛和超氧化物歧化酶的活性($n=5$)。

1.5.7 TUNEL法检测肺组织的细胞凋亡 内毒素处理动物24 h后, 体积分数10%水合氯醛麻醉动物。麻醉后的大鼠经预冷的0.01 mol/L PBS心脏灌注后, 迅速取下右肺中叶, 并于40 g/L的多聚甲醛固定12 h, 经固定脱水石蜡包埋后, 严格按照TUNEL染色法步骤检测肺组织的细胞凋亡情况。在光学显微镜下观察所染肺组织, 其中细胞核呈黄色的为凋亡阳性的细胞。随机计数10个以上400高倍视野, 使用Image-Pro Plus 6.0软件观察凋亡细胞数和细胞总数, 计算肺组织细胞的凋亡率(阳性细胞数/总的细胞量, $n=5$)。

1.5.8 Western blot法检测肺组织中caspase-3蛋白表达 内毒素处理动物24 h后, 体积分数10%水合氯醛麻醉动物。使用W/D测量取材的大鼠, 取新鲜的部分右肺上叶组织使用caspase-3抗体(cell signaling #9662)检测肺组织中凋亡相关蛋白caspase-3的表达。将样本在细胞裂解液中溶解均匀, 之后在4 °C以14 000 \times g离心15 min后, 取上清, 用BCA法测定样品中的蛋白浓度。从每个样本中调整蛋白浓度后, 取50 μg 样品在Laemmli缓冲液中变性5 min, 上样于12%SDS-PAGE胶, 电泳(浓缩胶70 V, 分离胶90 V) 1.5 h后分离蛋白, 转至硝化纤维素膜上(250 mA, 2.5 h)。转印蛋白质后的硝化纤维素膜用含5%脱脂奶粉的TBS室温下封闭2 h, 再用TBST洗涤2次, 放入一抗caspase-3中孵育过夜(1 : 500), TBST洗涤3次后, 与辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(1 : 2 000)室温孵育2 h, TBST洗膜15 min漂洗5次。膜与化学发光检测试剂(试剂A : 试剂B=1 : 1)反应2 min, 取出膜, 甩去多余的液体, 用保鲜膜包好PVDF膜, 暗室中用X胶片感光、显影、定影。计算条带光密度值与GAPDH条带光密度值的比值, 作为该样品蛋白水平的相对表达量($n=5$)。

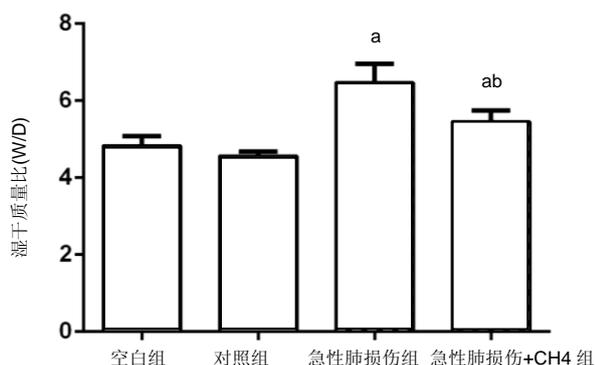
1.6 统计学分析 研究使用Graph Pad Prism 5软件制图, 采用SPSS 21.0(芝加哥, 美国)统计学软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单因素ANOVA方差分析, 设定 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用SD大鼠40只, 分为4组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 甲烷饱和生理盐水显著降低急性肺损伤大鼠肺组织W/D 内毒素及甲烷饱和生理盐水处理大鼠24 h后, 取右

肺检测肺组织的W/D, 结果见图1, 空白组与对照组相比未见明显差异($P > 0.05$)。急性肺损伤组和急性肺损伤+CH4组肺组织的W/D明显高于空白组($P < 0.05$), 而急性肺损伤+CH4组的肺组织W/D比明显低于急性肺损伤组($P < 0.05$), 且低于空白组($P < 0.05$)。表明内毒素可以显著升高肺组织的W/D, 而甲烷饱和生理盐水可以显著降低内毒素处理后急性肺损伤大鼠的肺W/D, 且对正常肺组织的W/D比无显著影响。



图注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与急性肺损伤组比较, ^b $P < 0.05$ ($n=5$)。

图1 甲烷饱和生理盐水对肺组织湿干质量比的影响

Figure 1 Effect of methane saturated saline on wet/dry weight ratio of lung tissue

2.3 肺组织的苏木精-伊红染色和电子显微镜检测 内毒素处理1 h后大鼠开始出现活动度减少, 精神差, 痢疾等反应。急性肺损伤+CH4组与急性肺损伤组相比, 上述症状较为轻微, 大鼠活动度及精神状态尚可。组织学检查大体观察可见空白组和对照组大鼠肺组织表面光滑, 呈粉红色, 无液体渗出及出血点。光学显微镜下可见肺组织结构清晰, 肺泡壁薄, 肺泡内未见液体渗出, 见图2A, B。电镜下观察肺泡的超微结构可见肺泡上皮细胞具有典型的线粒体及内质网结构, 见图3A, B。内毒素处理组大鼠肺组织大体观察可见整个肺部充血水肿, 表面粗糙, 间有点状斑片状坏死。光学显微镜下见肺间质水肿, 弥漫性出血, 广泛炎性细胞浸润, 肺泡壁增厚, 内有大量液体渗出, 见图2C。电镜下可见1型肺泡细胞出现典型的空泡形成, 去颗粒, 线粒体肿胀, 核周池肿胀内质网变粗糙, 2型肺泡上皮细胞可见典型的板层小体空泡和管状髓鞘脱落, 见图3C。急性肺损伤+CH4组大鼠肺组织大体可见中度肺水肿, 表面点状坏死灶, 光学显微镜下可见肺泡出血及炎细胞浸润, 肺水肿、肺泡出血及炎细胞浸润但较急性肺损伤组为轻, 见图2D。电镜下肺泡上皮细胞超微结构明显好于急性肺损伤组, 见图3D。

2.4 甲烷饱和生理盐水对急性肺损伤大鼠支气管肺泡灌洗液细胞的影响 见图4A所示, 生理状况下大鼠支气管肺泡灌洗液中主要的细胞为中性粒细胞、巨噬细胞及淋巴细胞。甲烷饱和生理盐水处理对正常支气管肺泡灌洗液中细胞数量和种类影响不大($P > 0.05$), 见图4B。内毒素处理

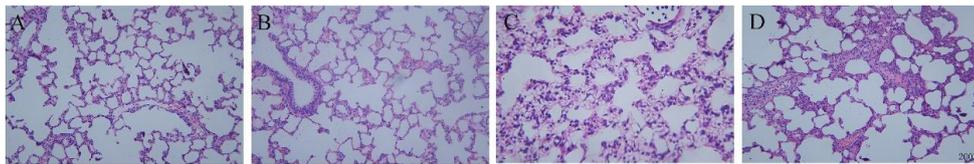
后, 支气管肺泡灌洗液中细胞总量明显增加($P < 0.05$), 见图4C, 其中以中心性粒细胞和巨噬细胞增多为主, 而甲烷饱和生理盐水处理可以明显降低内毒素导致的支气管肺泡灌洗液中细胞总量及中性粒细胞和巨噬细胞的数量($P < 0.05$), 见图4D, E。

2.5 甲烷饱和生理盐水对急性肺损伤大鼠支气管肺泡灌洗液中炎症因子的影响 见图5所示, 对照组和空白组相比炎症因子质量浓度差异无显著性意义($P > 0.1$), 表明富甲烷生理盐水对正常大鼠肺部的炎症因子无显著影响; 急性肺损伤组和急性肺损伤+CH4组的支气管肺泡灌洗液中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6和白细胞介素1 β 的质量浓度显著上升($P < 0.05$), 而经甲烷饱和生理盐水治疗后的急性肺损伤+CH4组与急性肺损伤组相比各炎症因子的质量浓度有显著降低($P < 0.05$), 但仍明显高于对照组和空白组($P < 0.05$)。说明饱和甲烷生理盐水可以通过抑制肺部炎症因子的产生和分泌, 降低由于内毒素导致的急性肺损伤。

2.6 甲烷饱和生理盐水对急性肺损伤大鼠肺组织氧化应激的影响 各组处理24 h后, 肺组织中丙二醛和超氧化物歧化酶的含量测定结果见图6所示, 空白组与对照组相比, 丙二醛和超氧化物歧化酶的含量差异无显著性意义($P > 0.1$)。急性肺损伤和急性肺损伤+CH4组与空白组相比肺组织中丙二醛含量显著升高, 超氧化物歧化酶的含量显著降低($P < 0.05$); 急性肺损伤+CH4组与急性肺损伤组相比, 丙二醛的含量显著降低, 而超氧化物歧化酶含量显著升高($P < 0.05$), 但仍然未达到空白组与对照组水平($P < 0.05$)。表明甲烷对正常大鼠肺组织中的丙二醛和超氧化物歧化酶的含量无显著影响, 而急性肺损伤造模后, 肺组织中丙二醛的含量显著增高, 而超氧化物歧化酶含量显著降低。甲烷治疗急性肺损伤可以显著的降低肺组织中丙二醛含量, 提高超氧化物歧化酶含量。

2.7 甲烷饱和生理盐水对急性肺损伤大鼠肺组织凋亡的影响 如图7所示, TUNEL染色时, 正常细胞染色后细胞核蓝绿色, 而凋亡细胞的细胞核被染成黄褐色。肺组织TUNEL染色结果显示: 各组均可见棕黄色、棕褐色的凋亡细胞核, 但Blank与对照组棕黄色细胞核出现率很低, 细胞凋亡较少, 且两组差异无显著性意义($P > 0.05$)。而急性肺损伤组和急性肺损伤+CH4组中棕黄色凋亡细胞核出现率明显高于空白组($P < 0.05$), 而急性肺损伤+CH4组与急性肺损伤组相比, 凋亡细胞的比例明显降低($P < 0.05$)。

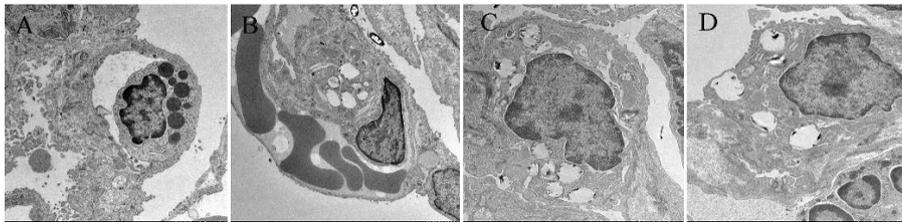
肺组织Western blot检测caspase-3蛋白在空白组与对照组中的表达无明显差异($P > 0.05$), 见图8, 这与TUNEL结果相符。而在急性肺损伤组和急性肺损伤+CH4组中其表达明显增加($P < 0.05$)。急性肺损伤+CH4组与急性肺损伤组相比, caspase-3的表达量显著降低($P < 0.05$)。由以上结果可知, 甲烷对正常大鼠肺组织的细胞凋亡没有显著影响, 急性肺损伤造模可以显著的增加肺组织细胞的凋亡, 饱和甲烷生理盐水处理可以显著的降低肺组织细胞的凋亡。



图注: 图 A 为空白组; B 为对照组; C 为急性肺损伤组; D 为急性肺损伤+CH4 组。急性肺损伤+CH4 组可见肺泡出血及炎细胞浸润, 肺水肿、肺泡出血及炎细胞浸润, 但较急性肺损伤组为轻。

图 2 甲烷饱和和生理盐水对肺组织细胞形态的影响(苏木精-伊红染色, ×200)

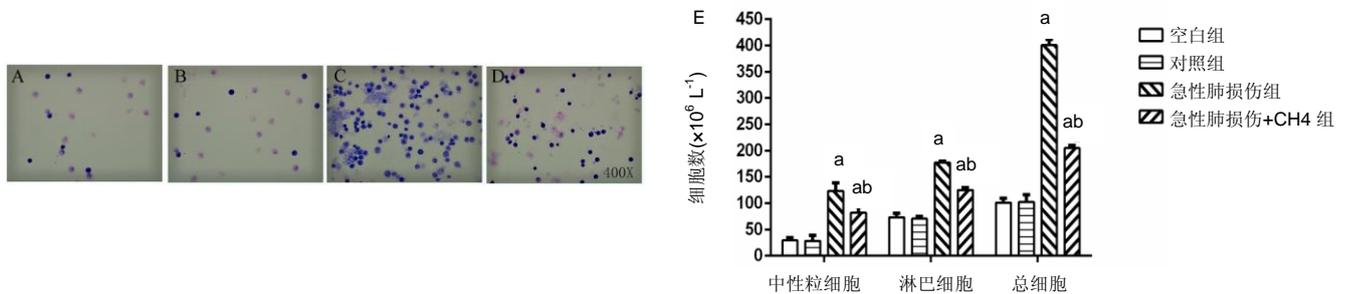
Figure 2 Effect of methane saturated saline on morphology of lung tissue (hematoxylin-eosin staining, ×200)



图注: 图 A 为空白组; B 为对照组; C 为急性肺损伤组; D 为急性肺损伤+CH4 组。急性肺损伤+CH4 组大鼠肺泡上皮细胞超微结构明显好于急性肺损伤组。

图 3 甲烷饱和和生理盐水对各组大鼠肺组织细胞超微结构的影响(×10 000)

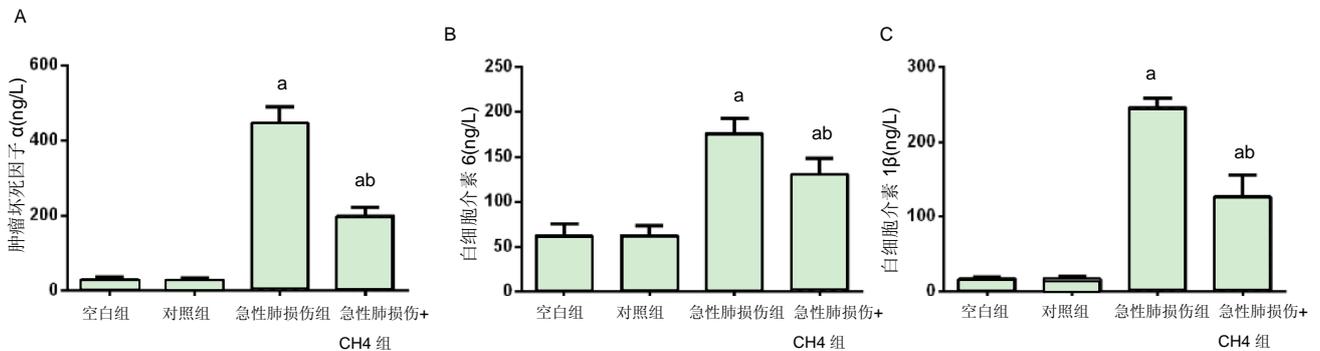
Figure 3 Effect of methane saturated saline on cell ultrastructure of rat lung tissue in each group (×10 000)



图注: 图 A 为空白组; B 为对照组; C 为急性肺损伤组; D 为急性肺损伤+CH4 组; E 表示各组中性粒细胞, 淋巴细胞及总细胞计数($n=5$)。与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与急性肺损伤组比较, ^b $P < 0.05$ 。

图 4 甲烷饱和和生理盐水对急性肺损伤大鼠支气管肺泡灌洗液中细胞的影响(图 A-D, ×400)

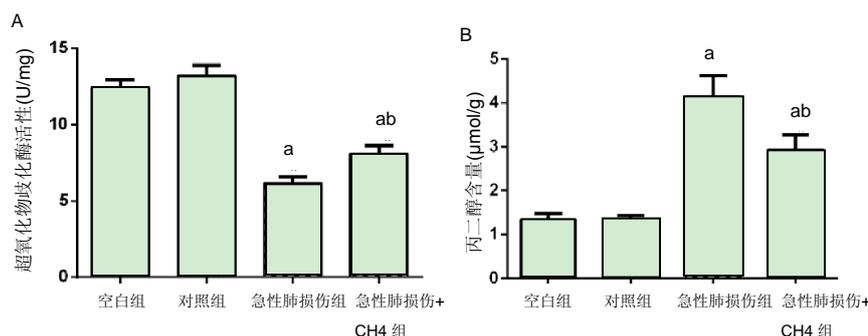
Figure 4 Effect of methane saturated saline on cells in alveolar lavage of rats with acute lung injury (×400)



图注: 图 A 为肿瘤坏死 α 质量浓度; B 为白细胞介素 6 质量浓度; C 为白细胞介素 1 β 质量浓度。与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与急性肺损伤组比较, ^b $P < 0.05$ ($n=5$)。

图 5 甲烷饱和和生理盐水对急性肺损伤大鼠支气管肺泡灌洗液中炎症因子的影响

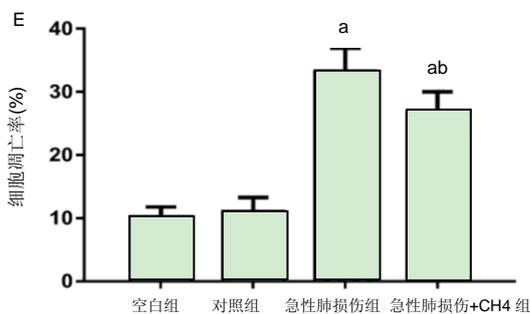
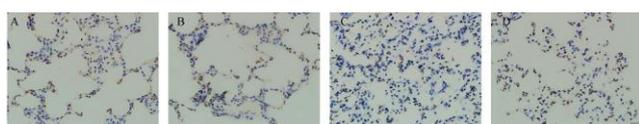
Figure 5 Effect of methane saturated saline on inflammatory cytokines in bronchoalveolar lavage of rats with acute lung injury



图注: 图 A 为超氧化物歧化酶的活性; B 为丙二醛的含量。与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与急性肺损伤组比较, ^b $P < 0.05$ ($n=5$)。

图 6 甲烷饱和和生理盐水对急性肺损伤大鼠肺组织中氧化应激水平的影响

Figure 6 Effect of methane saturated saline on oxidative stress in lung tissue of rats with acute lung injury



图注: 图 A 为空白组; B 为对照组; C 为急性肺损伤组; D 为急性肺损伤+CH4 组; E 表示各组肺组织的凋亡率。与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与急性肺损伤组比较, ^b $P < 0.05$ ($n=5$)。

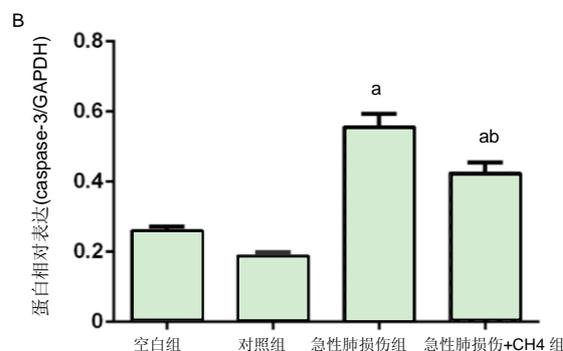
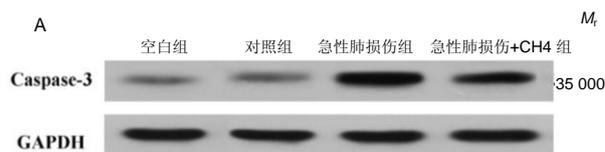
图 7 TUNEL 法检测甲烷饱和和生理盐水对急性肺损伤大鼠肺组织细胞凋亡的影响(图 A-D, $\times 400$)

Figure 7 Effect of methane saturated saline on cell apoptosis in lung tissue of rats with acute lung injury detected by TUNEL assay ($\times 400$)

3 讨论 Discussion

通过研究, 作者首次发现了通过腹腔注射甲烷饱和和生理盐水对内毒素导致的大鼠急性肺损伤的保护作用。甲烷饱和和生理盐水腹腔注射可以显著降低大鼠支气管肺泡灌洗液中炎症因子的水平, 减轻由于内毒素导致的肺部炎症。也可以通过显著提高肺组织的超氧化物歧化酶含量并降低丙二醛等氧化应激产物的含量, 起到抗氧化的作用。对于肺组织的细胞凋亡来说, 饱和甲烷生理盐水通过抑制肺组织内 caspase-3 的活化, 降低细胞的凋亡的发生, 进而降低肺组织损伤。总之, 甲烷饱和和生理盐水可以从抗氧化应激损伤、抗炎症、降低细胞凋亡等不同方面对于内毒素导致的急性肺损伤起到早期的保护作用。

急性肺损伤及 ARDS 是由于肺内外的各种原因引起的以进行性呼吸困难和顽固性低氧血症为特点的常见的高死亡率的综合征^[19]。急性肺损伤的重要原因之一就是脓毒症, 而脓毒症是临床常见的一种危重症, 可引起全身各器官的损伤, 其中肺脏是其最易受累的器官, 脓毒症时肺损伤发生早, 病情重, 常表现为急性肺损伤或者 ARDS, 是引起患者死亡的重要原因^[20]。内毒素是革兰阴性细菌细胞壁的主要成分, 以脓毒症为起因的急性肺损伤与血浆中革兰阴性细菌细胞壁成分内毒素的水平密切相关, 被公认为是引起脓毒症性急性肺损伤的首要物质。因此, 在实验中通过大鼠腹腔注射内毒素 (20 mg/kg) 来制作急性肺损伤的动物模型^[21]。作者发现内毒素处理动物后, 大体上动物出现了显著的呼吸增快, 活动减少等肺部损害和功能障碍的表现, 肺组织苏木精-伊红染色和电镜显示出显著的肺泡损害, 包



图注: 图 A 为 caspase-3 蛋白表达; B 表示各组 caspase-3 蛋白定量分析。与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与急性肺损伤组比较, ^b $P < 0.05$ ($n=5$)。

图 8 Western blot 检测甲烷饱和和生理盐水对急性肺损伤大鼠肺组织中 caspase-3 蛋白表达

Figure 8 Effect of methane saturated saline on caspase-3 expression in lung tissue of rats with acute lung injury detected by western blot assay

括肺泡壁变薄, 炎症细胞浸润、液体渗出等, 肺组织 W/D 比值显著升高, 肺泡灌洗液细胞量增多, 炎症因子水平显著升高特征, 这与之前的研究相符^[22]。

急性肺损伤致病机制为肺部炎症反应、氧化应激和细胞凋亡的紊乱等导致肺血管广泛损伤, 导致肺换气功能障碍以及多器官功能受损^[23-24]。因此, 抑制炎症反应, 氧化应激和细胞凋亡是减轻急性肺损伤的有效途径之一。急性肺损伤时肺组织内的炎症细胞被激活, 产生级联免疫反应, 炎症因子, 趋化因子、黏附分子、活性氧等损伤介质。有研究表明炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 和白细胞介素 1 β 在急性肺损伤的早期炎症反应中增高并起到了重要作用^[25]。炎症反应作为内毒素导致的急性肺损伤的中心环节, 通过检测支气管肺泡灌洗液中细胞的含量及形态变化以及检测其中重要的炎症因子水平可以较为准确的反映肺组织的炎症反应强度。

越来越多的研究表明氧化应激损伤在内毒素导致的急性肺损伤的发生发展中起到重要的作用^[26]。生理状况下, 体内存在着氧化与抗氧化的平衡机制, 而急性肺损伤时, 由于肺内中性粒细胞聚集活化产生大量的氧自由基, 而抗氧化系统相对削弱, 导致细胞和组织发生不可逆的氧化损伤。活性氧产生过多超出了抗氧化系统的防御能力, 一方面直接损伤细胞膜中不饱和脂肪酸, 导致脂肪酸链断裂, 膜的流动性减低而通透性增加。另一方面更多的氧自由基被释放到肺组织, 直接损伤肺泡上皮细胞和肺血管内皮细胞, 气血屏障的完整性被破坏, 通透性增加, 引发并加重肺水肿。活性氧还可以激活 NF- κ B^[27], 导致细胞损伤和凋

亡加重组织损伤。

有研究表明自由基清除剂内毒素用于诱导小鼠急性肺损伤模型,可以有效减少支气管肺泡灌洗液中炎症因子的释放,降低急性肺损伤的损伤程度^[28]。因此,寻找可以降低急性肺损伤的氧化应激损伤的方法是治疗和预防急性肺损伤的一个重要潜在方向。实验中运用丙二醛和超氧化物歧化酶作为检测肺组织氧化应激损伤的指标,可以较好的反映肺组织的氧化应激损伤程度。其中丙二醛是自由基与细胞的膜性结构,如细胞膜、线粒体膜等发生脂质过氧化反应的产物,它反映体内氧自由基生成量及活性,间接地反映细胞受损的程度。丙二醛含量的变化可代表体内氧自由基的变化,进而反映肺内氧化损伤程度^[29]。超氧化物歧化酶是重要的抗氧化酶,其参与清除超氧阴离子、减少还原型亚硝酸盐的形成及所致的损伤,对肺组织具有保护作用。超氧化物歧化酶的表达活性水平与肺损伤的程度呈明显负相关,而氧化应激产物可降低该酶活性^[30]。

研究表明,饱和甲烷生理盐水可以有效降低肺组织丙二醛含量,增加超氧化物歧化酶的含量,从而对急性肺损伤起到保护作用。急性肺损伤时caspase通路被激活,是诱导细胞凋亡的重要通路^[31]。Caspase-3介导的细胞凋亡激活后可诱导了肺上皮细胞的凋亡,同时也诱导了单核细胞和巨噬细胞活化,产生多种炎症因子,诱发炎症反应。炎症反应又可以增强上皮细胞对caspase诱导的凋亡的敏感性^[32]。因此,急性肺损伤的病理过程也是肺细胞凋亡紊乱的病理过程。但细胞凋亡的确切分子机制及凋亡和炎症的关系仍待进一步的研究。研究从组织层面上,运用TUNEL法检测肺组织的细胞凋亡率,从蛋白层面对运用Western blot检测凋亡蛋白caspase-3水平。研究发现,急性肺损伤时肺组织细胞凋亡显著增加,饱和甲烷生理盐水可以明显降低肺组织caspase-3的活化从而降低肺细胞凋亡。

气体医学作为一种经济安全有效的医学治疗手段受到人们广泛的关注,多项研究表明氢气在多种疾病中起到了抑制氧化应激反应,降低炎症反应等作用^[9, 33-34]。甲烷作为一种自然界中最简单的有机物,其在人体中的生理作用近年来受到越来越多的关注^[35-36]。因此作者尝试用饱和甲烷生理盐水治疗由内毒素导致的急性肺损伤并取得一定的治疗效果,证明了甲烷饱和生理盐水的治疗急性肺损伤的效果,并从多角度分析其作用机制。Pimentel等^[37]首先发现了肠道内的产甲烷细菌产生的甲烷气体可以减缓肠道转运及增强肠道收缩等功能。

近年的多项研究表明了甲烷不仅与肠道疾病密切相关,还可以在多种疾病中发挥抗氧化,抗凋亡,抗炎等作用^[11, 15, 36, 38]。然而,甲烷抗氧化、抗炎和抗细胞凋亡的具体机制尚不清楚。不同的人提出了不同的假设。Boros等^[39]假设认为甲烷可能在细胞膜的界面瞬时积累,从而改变嵌入在该环境中的蛋白质的物理化学性质或原位功能。Kai等^[40]假设甲烷可能对膜通道产生影响,影响G蛋白,膜

或受体介导的信号传导和乙酰胆碱激活的离子通道动力学来发挥作用。Frink等^[41]提出,应该在将来阐明哺乳动物细胞是否含有能够使用甲烷作为底物的酶,甲基化等的生物效应,NAD(P)+NAD(P)H比例的变化,细胞的氧化还原环境的变化以及细胞是否存在甲烷“受体”等方面来研究。甲烷的抗氧化,抗炎和抗细胞凋亡的具体分子机制仍需进一步研究。

总之,此次实验首次证明了富甲烷生理盐水可以有效降低由于内毒素导致的急性肺损伤的肺损伤程度,其作用机制可能是通过降低肺组织的炎症反应强度,减少氧化应激损伤,并通过降低caspase-3的活化降低肺组织细胞的凋亡,对早期的急性肺损伤起到有效的保护作用。尽管,有关富甲烷生理盐水治疗急性肺损伤的具体分子机制仍待进一步研究,但基于其制备简单,价格便宜,使用方便,安全性较高,不良反应较少,甲烷可以作为一种潜在的有效治疗急性肺损伤的方法,值得深入研究。

作者贡献: 实验设计及评估为第一作者和通讯作者,实施为全体作者。

经费支持: 该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Ladha K, Vidal Melo MF, McLean DJ, et al. Intraoperative protective mechanical ventilation and risk of postoperative respiratory complications: hospital based registry study. *BMJ*. 2015;351:h3646.
- [2] Gu WJ, Wan YD, Tie HT, et al. Risk of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome in critically ill adult patients with pre-existing diabetes: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(2):e90426.
- [3] Londhe C, Ganeriwala A, deSouza R. Study of clinical profile of acute respiratory distress syndrome and acute lung injury in Plasmodium vivax malaria. *J Vector Borne Dis*. 2014;51(4):339-342.
- [4] Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M, et al. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(6):1849-1861.

- [5] Irish Critical Care Trials Group. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in Ireland: a prospective audit of epidemiology and management. *Crit Care*. 2008;12(1):R30. .
- [6] Lewandowski K, Metz J, Deutschmann C, et al. Incidence, severity, and mortality of acute respiratory failure in Berlin, Germany. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(4):1121-1125.
- [7] Johnson ER, Matthay MA. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2010;23(4):243-252.
- [8] Sawa T. The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response. *J Intensive Care*. 2014;2(1):10.
- [9] Xie K, Yu Y, Pei Y, et al. Protective effects of hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release. *Shock*. 2010;34(1):90-97.
- [10] Kohama K, Yamashita H, Aoyama-Ishikawa M, et al. Hydrogen inhalation protects against acute lung injury induced by hemorrhagic shock and resuscitation. *Surgery*. 2015;158(2):399-407.
- [11] Zhang Y, Liu Y, Zhang J. Saturated hydrogen saline attenuates endotoxin-induced lung dysfunction. *J Surg Res*. 2015;198(1):41-49.
- [12] Cloarec D, Bornet F, Gouilloud S, et al. Breath hydrogen response to lactulose in healthy subjects: relationship to methane producing status. *Gut*. 1990;31(3):300-304.
- [13] Jo JY, Kwon YS, Lee JW, et al. Acute respiratory distress due to methane inhalation. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2013;74(3):120-123.
- [14] Liu W, Wang D, Tao H, et al. Is methane a new therapeutic gas? *Med Gas Res*. 2012;2(1):25. .
- [15] Ye Z, Chen O, Zhang R, et al. Methane Attenuates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Rats Through Antiapoptotic, Anti-Inflammatory, and Antioxidative Actions. *Shock*. 2015; 44(2):181-187.
- [16] Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(3):L379-99.
- [17] Choi CW, Lee J, Oh JY, et al. Protective effect of chorioamnionitis on the development of bronchopulmonary dysplasia triggered by postnatal systemic inflammation in neonatal rats. *Pediatr Res*. 2016;79(2):287-294.
- [18] Lee HJ, Lee YJ, Jo HS, et al. Double exposure to intra-amniotic lipopolysaccharide and maternal betamethasone induces sustained increase of neutrophils in the lungs and disrupts alveolarization in newborn rats. *J Perinat Med*. 2013;41(6):711-718.
- [19] Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1685-1693.
- [20] Huang Y, Pettitt SJ, Guo G, et al. Isolation of homozygous mutant mouse embryonic stem cells using a dual selection system. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(3):e21.
- [21] Aulakh GK, Suri SS, Singh B. Angiostatin inhibits acute lung injury in a mouse model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014; 306(1):L58-68.
- [22] Xie K, Yu Y, Huang Y, et al. Molecular hydrogen ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through reducing inflammation and apoptosis. *Shock*. 2012;37(5):548-555.
- [23] Liu H, Yu X, Yu S, et al. Molecular mechanisms in lipopolysaccharide-induced pulmonary endothelial barrier dysfunction. *Int Immunopharmacol*. 2015;29(2):937-946.
- [24] Ward PA, Grailer JJ. Acute lung injury and the role of histones. *Transl Respir Med*. 2014;2:1.
- [25] Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*. 2004;202(2):145-156.
- [26] Biswal S, Remick DG. Sepsis: redox mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(11):1959-1961. .
- [27] Qi XF, Teng YC, Yoon YS, et al. Reactive oxygen species are involved in the IFN-gamma-stimulated production of Th2 chemokines in HaCaT keratinocytes. *J Cell Physiol*. 2011;226(1):58-65.
- [28] Tajima S, Soda M, Bando M, et al. Preventive effects of edaravone, a free radical scavenger, on lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Respirology*. 2008;13(5):646-653.
- [29] Gwarzo MY, Muhammad SA. Extracellular superoxide dismutase activity and plasma malondialdehyde in human immunodeficiency virus subjects of kano state as surrogate markers of CD4 status. *Int J Biomed Sci*. 2010;6(4):294-300.
- [30] Hassett P, Curley GF, Contreras M, et al. Overexpression of pulmonary extracellular superoxide dismutase attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *Intensive Care Med*. 2011; 37(10):1680-1687.
- [31] Song Y, Mao B, Qian G. Effects of dexamethasone on apoptosis and expression of Fas/FasL system in lung tissues of ALI rats. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2000;23(1):23-26.
- [32] Nakamura M, Matute-Bello G, Liles WC, et al. Differential response of human lung epithelial cells to fas-induced apoptosis. *Am J Pathol*. 2004;164(6):1949-1958.
- [33] Chen X, Liu Q, Wang D, et al. Protective Effects of Hydrogen-Rich Saline on Rats with Smoke Inhalation Injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:106836.
- [34] Zhao LL, Hu GC, Zhu SS, et al. Propofol pretreatment attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats by activating the phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway. *Braz J Med Biol Res*. 2014 Oct 14;0:0. [Epub ahead of print].
- [35] Song K, Zhang M, Hu J, et al. Methane-rich saline attenuates ischemia/reperfusion injury of abdominal skin flaps in rats via regulating apoptosis level. *BMC Surg*. 2015;15:92.
- [36] Wu J, Wang R, Ye Z, et al. Protective effects of methane-rich saline on diabetic retinopathy via anti-inflammation in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;466(2):155-161.
- [37] Pimentel M, Lin HC, Enayati P, et al. Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Jun;290(6):G1089-1095.
- [38] Wang W, Huang X, Li J, et al. Methane Suppresses Microglial Activation Related to Oxidative, Inflammatory, and Apoptotic Injury during Spinal Cord Injury in Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:2190897.
- [39] Boros M, Ghyczy M, Érces D, et al. The anti-inflammatory effects of methane. *Crit Care Med*. 2012;40(4):1269-1278.
- [40] Kai T, Jones KA, Warner DO. Halothane attenuates calcium sensitization in airway smooth muscle by inhibiting G-proteins. *Anesthesiology*. 1998;89(6):1543-1552.
- [41] Fink MP. Pharmacological effects of inhaled methane: plausible or not?. *Crit Care Med*. 2012;4:1379-1380.