

## Nrf2 在氢气改善脓毒症小鼠脑功能障碍中的作用

刘玲玲 谢克亮 陈红光 东晓晴 王国林 于泳浩

**【摘要】** 目的 探讨核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)在氢气改善脓毒症小鼠脑功能障碍中的作用。方法 按随机数字表法将雄性 ICR 小鼠分为假手术组、氢气对照组、脓毒症组和氢气治疗组,每组 20 只。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症模型;氢气治疗组于术后 1 h、6 h 吸入 2%氢气 1 h。各组于术后 24 h 取脑组织,光镜下观察海马组织病理学改变和神经元凋亡情况;蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测海马组织核 Nrf2 和总 Nrf2 的蛋白表达;检测海马组织超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)、8-异前列腺素 F<sub>2α</sub>(8-iso-PGF<sub>2α</sub>)的水平。术后 4~9 d 通过 Morris 水迷宫实验检测小鼠的学习和记忆能力。**结果** 与假手术组和氢气对照组比较,脓毒症组海马 CA1 区正常锥体神经元明显减少,神经元凋亡指数明显增高;核 Nrf2 和总 Nrf2 表达明显增加;海马 SOD 和 CAT 活性明显降低,MDA 和 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 浓度明显增高;术后 4~8 d 小鼠逃避潜伏期明显延长,游泳速度无差异,探索期在目标象限时间百分比和穿过站台次数明显减少。与脓毒症组相比,氢气治疗组海马 CA1 区正常锥体神经元明显增加(个:67.33 ± 6.89 比 42.33 ± 6.02, P<0.01),神经元凋亡指数明显降低[(30.00 ± 4.77)%比(80.50 ± 6.99)%, P<0.01];核 Nrf2 和总 Nrf2 表达均明显增加[核 Nrf2(A 值):5.07 ± 0.35 比 3.04 ± 0.34,总 Nrf2(A 值):4.24 ± 0.58 比 2.91 ± 0.37,均 P<0.01];海马 SOD 和 CAT 活性明显提高[SOD(U/mg):120.96 ± 13.44 比 81.16 ± 12.28, CAT(U/mg):9.11 ± 1.28 比 5.64 ± 1.88,均 P<0.01],MDA 和 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 浓度明显降低[MDA(nmol/mg):16.12 ± 1.49 比 27.64 ± 1.87, 8-iso-PGF<sub>2α</sub>(pg/mg):183.43 ± 13.07 比 864.07 ± 49.92,均 P<0.01];术后 5~8 d 小鼠逃避潜伏期明显缩短,游泳速度无差异,探索期在目标象限时间百分比[(37.06 ± 1.16)%比(24.42 ± 1.82)%, P<0.01]和穿过站台次数(次:7.13 ± 0.98 比 4.88 ± 0.99, P<0.01)明显增加。假手术组和氢气对照组各指标差异均无统计学意义。**结论** 氢气可明显减轻脓毒症小鼠脑组织病理损伤,改善其学习和记忆能力,其机制可能与上调 Nrf2、提高机体抗氧化水平及降低氧化产物水平有关。

**【关键词】** 核因子 E2 相关因子 2; 氢气; 脓毒症; 氧化损伤; 认知; 脑功能障碍

**Role of Nrf2 in the protective effects of hydrogen against cerebral dysfunction in septic mice** Liu Lingling\*, Xie Keliang, Chen Hongguang, Dong Xiaoping, Wang Guolin, Yu Yonghao. \*Department of Anesthesiology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China  
Corresponding author: Yu Yonghao, Email: yuyonghao@126.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in the protective effects of hydrogen against cerebral dysfunction in a mouse model of sepsis. **Methods** Male ICR mice were randomly divided into sham operation group, hydrogen control group, sepsis group and hydrogen treatment group, with 20 in each group. Sepsis model was reproduced by cecal ligation and puncture (CLP). 2% hydrogen inhalation was given for 1 hour at 1 hour and 6 hours after operation in hydrogen treatment group. The brain tissues were obtained at 24 hours after operation. The histopathologic changes and neuron apoptosis in the hippocampus were observed under the microscope. The expressions of nucleus and total Nrf2 in hippocampus were detected by Western Blot. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA) and 8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub> (8-iso-PGF<sub>2α</sub>) in hippocampus were also detected. The changes of learning and memory abilities were observed by Morris water maze test at day 4 to 9 after operation. **Results** Compared with the sham operation and hydrogen control groups, in the sepsis group, the number of normal pyramidal neurons in the hippocampal CA1 region was markedly reduced, the apoptotic index was marked increased, the expressions of nucleus and total Nrf2 were partly increased, the activities of SOD and CAT in the hippocampus were significantly decreased, and the levels of MDA and 8-iso-PGF<sub>2α</sub> were markedly increased, the escape latency at day 4 to 8 after operation was significantly extended, and there was no difference in swimming speed, the percentage of time in the target quadrant and the times of the platform crossing were significantly decreased on probe day. Compared with the sepsis group, in the hydrogen treatment group, the number of normal pyramidal neurons in the hippocampal CA1 region was markedly increased (67.33 ± 6.89 vs. 42.33 ± 6.02, P<0.01),

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.09.005

基金项目:国家自然科学基金(81071533,81101409);天津市应用基础及前沿技术研究计划(11JCYBJC12900, 13JCQNJC11400);天津市医药卫生科技计划项目(2011KZ108)

作者单位:300052 天津医科大学总医院麻醉科(刘玲玲、谢克亮、陈红光、东晓晴、王国林、于泳浩);300052 天津市麻醉学研究所(谢克亮、陈红光、王国林、于泳浩)

通信作者:于泳浩,Email:yuyonghao@126.com

the apoptotic index was dramatically reduced [(30.00 ± 4.77)% vs. (80.50 ± 6.99)%,  $P < 0.01$ ], the expressions of nucleus and total Nrf2 were significantly increased [nucleus Nrf2 (A value): 5.07 ± 0.35 vs. 3.04 ± 0.34, total Nrf2 (A value): 4.24 ± 0.58 vs. 2.91 ± 0.37, both  $P < 0.01$ ], the activities of SOD and CAT in the hippocampus were significantly increased [SOD (U/mg): 120.96 ± 13.44 vs. 81.16 ± 12.28, CAT (U/mg): 9.11 ± 1.28 vs. 5.64 ± 1.88, both  $P < 0.01$ ], and the levels of MDA and 8-iso-PGF<sub>2α</sub> were markedly reduced [MDA (nmol/mg): 16.12 ± 1.49 vs. 27.64 ± 1.87, 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (pg/mg): 183.43 ± 13.07 vs. 864.07 ± 49.92, both  $P < 0.01$ ], the escape latency at day 5 to 8 after operation was significantly shortened, and there was no difference in swimming speed, the percentage of time in the target quadrant [(37.06 ± 1.16)% vs. (24.42 ± 1.82)%,  $P < 0.01$ ] and the times of the platform crossing (7.13 ± 0.98 vs. 4.88 ± 0.99,  $P < 0.01$ ) were significantly increased on probe day. There was no statistical difference in above indexes between sham operation group and hydrogen control group. **Conclusion** Hydrogen inhalation can ameliorate pathological injury in brain and impairment of learning and memory abilities of septic mice, which may be associated with the up-regulation of Nrf2, the increase of antioxidant enzymes activities and the decrease of oxidative products.

**[Key words]** Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; Hydrogen; Sepsis; Oxidative damage; Cognition; Cerebral dysfunction

脓毒症是指由感染引起的全身炎症反应综合征(SIRS),是创伤、烧伤、大手术后的常见并发症,以及重症监护病房(ICU)内非心脏病患者死亡的主要原因<sup>[1-2]</sup>。尽管脓毒症的发生机制、早期诊断及防治措施已取得重大进展,但对脓毒症发生和不良结局的预测仍不理想<sup>[3]</sup>。研究发现,脓毒症患者出现中枢神经系统并发症常早于其他系统,且伴脑功能障碍时病死率明显提高<sup>[4]</sup>。80%的脓毒症存活患者存在长期的脑功能障碍,主要表现为认知功能障碍,包括注意力、学习和记忆能力降低等<sup>[5-6]</sup>。脓毒症脑功能障碍的发病机制复杂且尚不明确,大量氧自由基的产生和氧化还原反应的失衡在脓毒症脑功能障碍的病理生理过程中起着重要作用<sup>[3]</sup>。氢气是一种新型的气体信号分子,可直接清除氧自由基,还可通过上调抗氧化蛋白的表达进一步抑制氧化应激<sup>[7]</sup>。核因子E2相关因子2(Nrf2)是细胞调节抗氧化应激反应的重要转录因子,可通过清除自由基等作用来维持细胞内的氧化还原状态,发挥保护作用<sup>[8]</sup>。本实验拟探讨氢气对脓毒症小鼠脑功能障碍的保护作用及其是否与Nrf2有关,报告如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物及分组:**成年雄性ICR小鼠,6~8周,体质量20~25g,由中国军事医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK-(军)2012-0004。将小鼠按随机数字表法分为假手术组、氢气对照组、脓毒症组和氢气治疗组4组,每组20只。

本实验经天津医科大学实验动物管理委员会批准,动物处置过程符合伦理学要求。

**1.2 脓毒症模型制备:**采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备小鼠脓毒症模型<sup>[9-10]</sup>。假手术组和氢气对照组进行相同的操作,不进行盲肠结扎和穿孔。各组小鼠术后经颈部皮下注射50 mL/kg生理盐水进行液体

复苏治疗,并腹腔注射5%头孢哌酮50 mg/kg抗感染<sup>[10]</sup>;假手术组仅给予等量生理盐水。

**1.3 氢气吸入治疗:**使用GCH-300高纯氢气发生器(天津同普分析仪器科技有限公司)生成氢气。将动物放入密封的带有进气口和出气口的树脂玻璃箱内,用气体流量计混合氢气和空气后以4 L/min速率从进气口输入箱内,从出气口收集残余气体<sup>[11]</sup>。应用PG610氢气检测仪(河南英特电器设备公司)监测箱内气体浓度。氢气治疗组于术后1 h、6 h吸入2%氢气1 h;假手术组和脓毒症组仅将动物置于相同环境中,不吸入氢气。

**1.4 观察指标及检测方法:**于术后24 h腹腔注射2%水合氯醛15 mL/kg麻醉小鼠,取脑组织备检。

**1.4.1 光镜下观察海马区病理学改变:**取部分脑组织,用10%甲醛水溶液固定、石蜡包埋、切片,行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察病理学改变。海马CA1区正常椎体神经元排列整齐紧密,胞体较大,核圆呈淡染,核仁清晰;而受损神经元胞体排列紊乱,皱缩,核固缩深染。每个标本随机取3张切片,每张切片观察5个视野,采用Image pro-plus 6.0图像分析系统分析并计数正常椎体神经元数,取均值。

**1.4.2 原位末端缺刻标记试验(TUNEL)检测海马神经元的凋亡:**取脑组织切片,参照TUNEL凋亡试剂盒(美国Promega公司)说明书步骤操作,荧光显微镜下观察凋亡细胞并拍照分析,正常细胞核为蓝色,凋亡细胞呈绿色。每个标本随机取3张切片,每张切片取5个不同视野,采用Image pro-plus 6.0图像分析系统分析,计数凋亡细胞数并计算凋亡指数(凋亡指数=凋亡细胞数/有核细胞总数×100)%。

**1.4.3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定海马组织核Nrf2和总Nrf2表达:**取左脑海马组织,加入放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液和蛋白酶抑制剂

(上海生工生物工程技术有限公司),液氮匀浆,4℃下  $14\,000 \times g$  离心 10 min,取上清得到总蛋白,提取核蛋白后用 BCA 法测定蛋白浓度。取 50  $\mu\text{g}$  蛋白样品,加入 4  $\times$  蛋白上样缓冲液,经凝胶电泳、转膜、5%脱脂奶粉室温封闭后,加入 Nrf2 一抗(1:200,美国 Santa Cruz 公司)、组蛋白 1(Histone 1)一抗(1:1 000,英国 Abcam 公司)或内参照  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin, 1:1 000,杭州华安公司),4℃摇床过夜,含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(TBST)洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记二抗(1:5 000,美国 Sigma 公司)室温封闭 1 h,底物化学发光显影。应用 Gel-pro 软件分析吸光度(A)值,以目的条带与内参 Histone1 或  $\beta$ -actin 的 A 值比值反映目的蛋白的表达水平。

**1.4.4 海马组织超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)和 8-异前列腺素  $F_{2\alpha}$  (8-iso-PGF $_{2\alpha}$ )的测定:**取右脑海马组织进行匀浆,4℃下  $10\,000 \times g$  离心 10 min,取上清液。采用 722 分光光度计测定 SOD、CAT 的活性(美国 Cayman 公司)以及 MDA 浓度(南京建成生物工程研究所),采用 Multiskan 酶标仪测定 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  浓度(美国 Cayman 公司),实验步骤均参照试剂盒说明书进行。

**1.4.5 Morris 水迷宫实验:**Morris 水迷宫游泳池(直径 120 cm)内盛有不透明的水,平台(直径 6 cm)放置在任一象限,平台顶端在水面下 1 cm 处。术后第 4 天开始行 Morris 水迷宫训练,每天训练 4 次,连续 5 d。如果小鼠在 60 s 内未找到平台,就引导小鼠找到平台,并将它放置在平台上停留 30 s,然后移开。记录各组小鼠在隐蔽站台实验的逃避潜伏期和游泳速度。术后第 9 天撤去平台,用空间探索实验测试小鼠记忆能力,记录各组小鼠在目标象限时间的百分比和穿过站台的次数<sup>[12]</sup>。

**1.5 统计学分析:**采用 SPSS 18.0 软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD 检验;Morris 水迷宫实验用重复测量方差分析; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 海马区病理学改变(图 1;表 1):**假手术组和氢气对照组海马 CA1 区锥体神经元排列紧密,结构清晰;脓毒症组锥体神经元排列紊乱,胞质深染,核固缩,结构不清晰;氢气治疗组神经元排列尚规则,多数神经元形态正常,少量神经元损伤。与假手术组和氢气对照组相比,脓毒症组和氢气治疗组海马 CA1 区正常神经元数量明显减少;但氢气治疗组正常神经元数量较脓毒症组明显增加(均  $P < 0.01$ )。

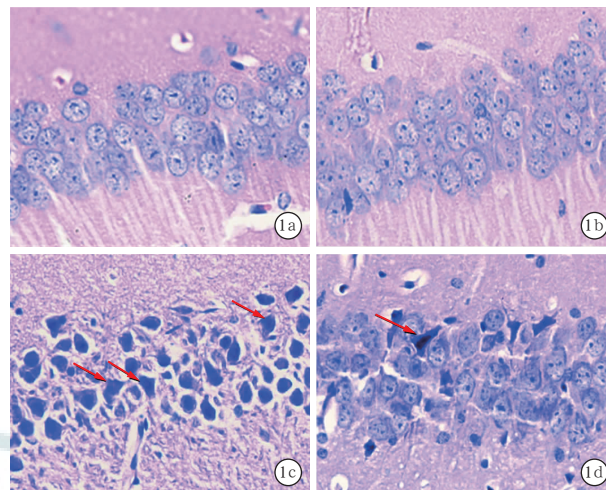


图 1 光镜下观察各组小鼠海马 CA1 区神经病理学改变假手术组(a)和氢气对照组(b)锥体神经元排列紧密,结构清晰;脓毒症组(c)锥体神经元排列紊乱,胞质深染,核固缩,结构不清晰(箭头所示);氢气治疗组(d)神经元排列尚规则,多数神经元形态正常,少量神经元损伤(箭头所示) HE 高倍放大

表 1 氢气治疗对脓毒症小鼠海马神经元数量和神经元凋亡的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 动物数(只) | 正常神经元数(个)                      | 凋亡指数(%)                        |
|-------|--------|--------------------------------|--------------------------------|
| 假手术组  | 6      | 79.50 $\pm$ 5.75               | 0.00 $\pm$ 0.00                |
| 氢气对照组 | 6      | 82.50 $\pm$ 6.98               | 0.00 $\pm$ 0.00                |
| 脓毒症组  | 6      | 42.33 $\pm$ 6.02 <sup>a</sup>  | 80.50 $\pm$ 6.99 <sup>a</sup>  |
| 氢气治疗组 | 6      | 67.33 $\pm$ 6.89 <sup>ab</sup> | 30.00 $\pm$ 4.77 <sup>ab</sup> |

注:与假手术组和氢气对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与脓毒症组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

**2.2 海马区神经元凋亡情况(表 1;图 2):**假手术组和氢气对照组海马 CA1 区基本无神经元凋亡。与假手术组和氢气对照组相比,脓毒症组和氢气治疗组海马 CA1 区神经元凋亡指数明显增加;但氢气治疗组神经元凋亡指数较脓毒症组明显减少(均  $P < 0.01$ )。

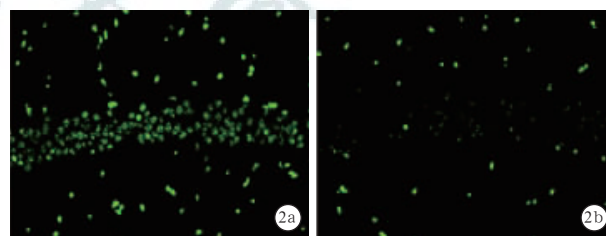
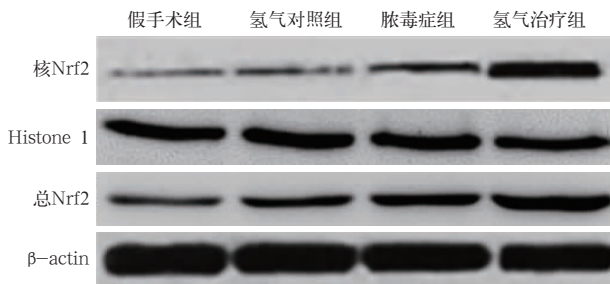


图 2 荧光显微镜下观察各组小鼠海马 CA1 区神经元凋亡情况 凋亡细胞呈绿色;脓毒症组(a)有大量神经元凋亡;氢气治疗组(b)有少量神经元凋亡 TUNEL 中倍放大

**2.3 海马组织核 Nrf2 和总 Nrf2 表达(图 3;表 2):**与假手术组和氢气对照组相比,脓毒症组和氢气治疗组海马组织核 Nrf2 和总 Nrf2 表达水平均明显增加;氢气治疗组海马组织核 Nrf2 和总 Nrf2 的表达较脓毒症组进一步显著增加(均  $P < 0.01$ )。



Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2, Histone 1 为组蛋白 1,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白

图 3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组小鼠海马组织核 Nrf2 和总 Nrf2 的表达

表 2 氢气治疗对脓毒症小鼠海马组织核 Nrf2 和总 Nrf2 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 动物数(只) | 核 Nrf2(A 值)               | 总 Nrf2(A 值)               |
|-------|--------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术组  | 6      | 1.00 ± 0.00               | 1.00 ± 0.00               |
| 氢气对照组 | 6      | 1.37 ± 0.19               | 1.22 ± 0.13               |
| 脓毒症组  | 6      | 3.04 ± 0.34 <sup>a</sup>  | 2.91 ± 0.37 <sup>a</sup>  |
| 氢气治疗组 | 6      | 5.07 ± 0.35 <sup>ab</sup> | 4.24 ± 0.58 <sup>ab</sup> |

注: Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2; 与假手术组和氢气对照组

比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与脓毒症组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

2.4 海马组织 SOD、CAT、MDA 和 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  检测结果(表 3): 与假手术组和氢气对照组相比, 脓毒症组和氢气治疗组海马组织 SOD、CAT 活性明显降低, MDA、8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  浓度明显增高; 与脓毒症组比较, 氢气治疗组海马组织 SOD、CAT 活性明显升高, MDA、8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  浓度明显降低(均  $P < 0.01$ )。

表 3 氢气治疗对脓毒症小鼠海马组织 SOD、CAT、MDA 及 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 动物数(只) | SOD(U/mg)                    | CAT(U/mg)                 |
|-------|--------|------------------------------|---------------------------|
| 假手术组  | 6      | 140.45 ± 9.68                | 11.79 ± 1.89              |
| 氢气对照组 | 6      | 145.95 ± 10.70               | 12.02 ± 2.03              |
| 脓毒症组  | 6      | 81.16 ± 12.28 <sup>a</sup>   | 5.64 ± 1.88 <sup>a</sup>  |
| 氢气治疗组 | 6      | 120.96 ± 13.44 <sup>ab</sup> | 9.11 ± 1.28 <sup>ab</sup> |

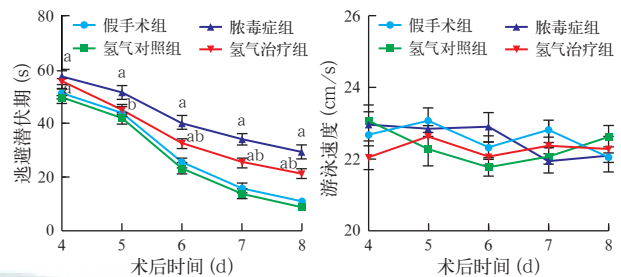
  

| 组别    | 动物数(只) | MDA(nmol/mg)               | 8-iso-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> (pg/mg) |
|-------|--------|----------------------------|---|
| 假手术组  | 6      | 13.28 ± 2.10               | 82.02 ± 13.92                                     |
| 氢气对照组 | 6      | 12.03 ± 2.47               | 80.06 ± 9.58                                      |
| 脓毒症组  | 6      | 27.64 ± 1.87 <sup>a</sup>  | 864.07 ± 49.92 <sup>a</sup>                       |
| 氢气治疗组 | 6      | 16.12 ± 1.49 <sup>ab</sup> | 183.43 ± 13.07 <sup>ab</sup>                      |

注: SOD 为超氧化物歧化酶, CAT 为过氧化氢酶, MDA 为丙二醛, 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  为 8-异前列腺素 F<sub>2 $\alpha$</sub> ; 与假手术组和氢气对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与脓毒症组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

2.5 Morris 水迷宫实验(图 4; 表 4): 与假手术组相比, 脓毒症组小鼠隐蔽站台实验中术后 4 ~ 8 d 时逃避潜伏期明显延长, 空间探索实验中在目标象限时间百分比和穿过站台次数明显减少; 与脓毒症组比较, 氢气治疗组小鼠术后 5 ~ 8 d 时逃避潜伏期明显

缩短, 在目标象限时间百分比和穿过站台的次数明显增加(均  $P < 0.01$ )。各组游泳速度比较差异无统计学意义。



注: 与假手术组和氢气对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ;

与脓毒症组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 4 Morris 水迷宫实验中各组小鼠逃避潜伏期和游泳速度的比较

表 4 氢气治疗对各组小鼠 Morris 水迷宫实验中目标象限时间百分比和穿过站台次数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 动物数(只) | 目标象限时间百分比(%)               | 穿过站台次数(次)                 |
|-------|--------|----------------------------|---------------------------|
| 假手术组  | 8      | 42.76 ± 1.96               | 8.25 ± 0.89               |
| 氢气对照组 | 8      | 43.89 ± 1.55               | 8.63 ± 0.92               |
| 脓毒症组  | 8      | 24.42 ± 1.82 <sup>a</sup>  | 4.88 ± 0.99 <sup>a</sup>  |
| 氢气治疗组 | 8      | 37.06 ± 1.16 <sup>ab</sup> | 7.13 ± 0.98 <sup>ab</sup> |

注: 与假手术组和氢气对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与脓毒症组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

### 3 讨论

氢气是一种新型的选择性抗氧化剂, 与现有的抗氧化剂相比, 氢气的分子质量小、结构简单、可轻易透过各种细胞膜, 具有安全、易吸收的特点<sup>[13]</sup>。2007 年, Ohsawa 等<sup>[14]</sup>发现 2% 氢气可明显改善脑缺血 / 再灌注损伤, 其机制与选择性中和羟自由基和过氧亚硝酸阴离子有关。该研究得到了广泛关注并引发了研究氢气的热潮。研究表明, 富氢生理盐水预处理深低温循环骤停模型大鼠可明显提高其血清和脑组织中 SOD 活性, 发挥保护作用<sup>[15]</sup>。本课题组前期研究表明, 氢气吸入治疗脓毒症具有浓度和时间依赖性, 最佳治疗方案为制模后 1 h 和 6 h 分别吸入 2% 氢气 1 h, 可有效提高脓毒症小鼠的存活率, 改善器官功能, 并可提高心、肝、肺和肾组织中 SOD 和 CAT 的活性, 发挥保护作用<sup>[9]</sup>。

氧化应激是脓毒症导致多器官功能障碍的一个重要因素<sup>[16]</sup>。脓毒症时内毒素可激活巨噬细胞等产生大量活性氧族(ROS)。中枢神经系统尤其是海马区易受到 ROS 作用而出现早期氧化应激反应, 大量 ROS 可导致机体内源性抗氧化酶 SOD 和 CAT 的活

性失衡,脂质过氧化反应以及细胞膜和线粒体损伤,最终导致细胞凋亡<sup>[17-20]</sup>。SOD 和 CAT 的活性可反映机体清除活性氧的能力;而 MDA 和 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 都是脂质过氧化反应的产物,其水平可反映机体细胞受到 ROS 破坏的严重程度<sup>[21]</sup>。

Nrf2 信号通路是生物体内重要的保护系统,是调节氧化还原平衡的关键因子。生理状态下,Nrf2 转录受到负性调节蛋白 Keap1 的抑制;当机体受到氧化应激时,此通路被激活,Nrf2 与 Keap1 解耦联后转入核内,作用于抗氧化反应元件(ARE),启动下游 SOD、CAT、还原型辅酶 1 醌类氧化还原酶(NQO1)等抗氧化蛋白的表达<sup>[22]</sup>。研究表明,在脑损伤早期,Nrf2 可被激活并启动内源性应激防御系统,发挥抗氧化作用<sup>[23]</sup>。本课题组前期研究发现,2%氢气吸入可通过激活 Nrf2-ARE 通路来减轻脓毒症小鼠肠组织损伤<sup>[24]</sup>。本实验中用 2%氢气治疗可上调脓毒症小鼠海马组织 Nrf2 的表达,提高 SOD 和 CAT 的活性、降低 MDA 和 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 的水平,表明氢气可能通过激活 Nrf2 通路来减少脓毒症小鼠脑功能障碍。

海马组织是空间学习和形成长期记忆的结构基础,早期研究发现,腹腔注射脂多糖诱导的脓毒症大鼠的学习、记忆能力发生明显改变<sup>[25]</sup>。本实验中,氢气治疗可明显缩短脓毒症小鼠的逃避潜伏期,明显增加在目标象限时间的百分比和穿过站台次数,表明氢气可明显改善脓毒症小鼠海马相关学习和记忆能力的损伤,与小鼠海马 CA1 区的神经元损伤一致。临床上脓毒症早期可出现明显的认知和行为异常,早期干预可明显减轻脓毒症患者脑功能障碍<sup>[26]</sup>。早期氢气干预治疗或可成为一种新的治疗方法。

综上所述,氢气可明显减轻脓毒症小鼠脑组织病理损伤和神经元凋亡,改善脓毒症小鼠短期和长期的认知功能障碍,其机制可能与上调 Nrf2 信号通路、提高机体抗氧化水平及降低氧化产物水平有关。

### 参考文献

- [1] Nguyen HB, Smith D. Sepsis in the 21st century: recent definitions and therapeutic advances[J]. Am J Emerg Med, 2007, 25(5): 564-571.
- [2] 姚咏明, 盛志勇, 林洪远, 等. 脓毒症定义及诊断的新认识[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(6): 321-324.
- [3] Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang MS, et al. Pathophysiology of septic encephalopathy—an unsolved puzzle [J]. Crit Care, 2010, 14(3): 165.
- [4] 梁华平, 姚咏明, 王正国. 关注脓毒症及其结局的预测研究[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(12): 709-711.
- [5] Girard TD, Jackson JC, Pandharipande PP, et al. Delirium as a predictor of long-term cognitive impairment in survivors of critical illness[J]. Crit Care Med, 2010, 38(7): 1513-1520.

- [6] Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, et al. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis[J]. JAMA, 2010, 304(16): 1787-1794.
- [7] Ohta S. Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress with potential for the improvement of mitochondrial diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820(5): 586-594.
- [8] Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation [J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(3-4): 385-394.
- [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[J]. Shock, 2010, 34(1): 90-97.
- [10] Zhou J, Chen Y, Huang GQ, et al. Hydrogen-rich saline reverses oxidative stress, cognitive impairment, and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture [J]. J Surg Res, 2012, 178(1): 390-400.
- [11] Xie K, Yu Y, Huang Y, et al. Molecular hydrogen ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through reducing inflammation and apoptosis[J]. Shock, 2012, 37(5): 548-555.
- [12] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 848-858.
- [13] 韩焕芝, 陈红光, 谢克亮, 等. 氢气治疗疾病的相关机制[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2012, 18(1): 102-104.
- [14] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. Nat Med, 2007, 13(6): 688-694.
- [15] Shen L, Wang J, Liu K, et al. Hydrogen-rich saline is cerebroprotective in a rat model of deep hypothermic circulatory arrest [J]. Neurochem Res, 2011, 36(8): 1501-1511.
- [16] Ritter C, Andrades M, Frota Júnior ML, et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation[J]. Intensive Care Med, 2003, 29(10): 1782-1789.
- [17] Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, et al. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation [J]. Crit Care Med, 2006, 34(3): 886-889.
- [18] Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?[J]. Nat Med, 2004, 10 Suppl: S18-25.
- [19] d'Avila JC, Santiago AP, Amâncio RT, et al. Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction [J]. Crit Care Med, 2008, 36(6): 1925-1932.
- [20] Montagnaro S, Ciarcia R, De Martinis C, et al. Modulation of apoptosis by caprine herpesvirus 1 infection in a neuronal cell line [J]. J Cell Biochem, 2013, 114(12): 2809-2822.
- [21] Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ 2nd. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress [J]. FASEB J, 2004, 18(15): 1791-1800.
- [22] Negi G, Kumar A, Joshi RP, et al. Oxidative stress and Nrf2 in the pathophysiology of diabetic neuropathy: old perspective with a new angle[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 408(1): 1-5.
- [23] 郑海燕, 洪远, 陈高. Nrf2-ARE 在大鼠创伤性脑损伤模型中的表达及意义[J]. 中华神经外科杂志, 2013, 29(1): 80-84.
- [24] 李媛, 谢克亮, 陈红光, 等. Nrf2 在氢气治疗严重脓毒症肠损伤中的作用[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(6): 415-419.
- [25] 信玉昌, 吕苗苗, 侯立朝, 等. 不同浓度脂多糖腹腔注射对大鼠认知功能的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2009, 25(11): 971-973.
- [26] 马春林, 王荣辉, 梁道业, 等. 涤痰醒脑承气汤治疗脓毒症脑功能障碍的临床研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20(4): 210-212.

(收稿日期: 2014-05-05)  
(本文编辑: 李银平)