

硫化氢/胱硫醚- γ -裂解酶系统在肺缺血/再灌注损伤中的作用

王兴民¹, 季海锋¹, 王万铁², 石 璐², 贾旭广²

(1. 浙江省瑞安市中医院, 浙江 瑞安 325200; 2. 温州医学院病理生理教研室, 浙江 温州 325053)

【摘要】 目的 探讨硫化氢/胱硫醚- γ -裂解酶(H₂S/CSE)系统在肺缺血/再灌注损伤(LIRI)中的作用。方法 将 40 只 SD 大鼠随机均分成假手术组、LIRI 组、NaHS 组、炔丙基甘氨酸(PPG)组 4 组。制备在体大鼠单肺原位 LIRI 模型。NaHS 组和 PPG 组分别于制模前腹腔注射 NaHS 28 μ mol/kg 或 PPG 30 mg/kg; 假手术组和 LIRI 组给予生理盐水 0.5 ml。实验结束后取血, 检测血浆 H₂S 浓度、超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO)活性和丙二醛(MDA)含量; 检测肺组织 H₂S 含量、CSE 活性和 CSE mRNA 表达水平; 计算肺系数及肺泡损伤率(IAR); 并观察肺组织病理改变。结果 与假手术组比较, LIRI 组血浆和肺组织 H₂S 水平、肺组织 CSE 活性和 CSE mRNA 表达均降低(均 $P < 0.01$), 血浆 SOD 降低, MDA、MPO 升高(均 $P < 0.01$); 肺系数、IAR 增高(均 $P < 0.01$); 同时 LIRI 组肺组织有明显的病理改变。与 LIRI 组比较, 预先给予 NaHS 组血浆和肺组织 H₂S 水平、肺组织 CSE 活性和 CSE mRNA 表达均升高(均 $P < 0.01$), 血浆 SOD 升高, MDA、MPO 降低(均 $P < 0.01$), 肺系数、IAR 降低(均 $P < 0.01$); 同时肺组织病理改变减轻。而预先给予 PPG 组则相反, 可加重 LIRI 所致的肺损伤($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 H₂S/CSE 系统功能下调参与 LIRI 的病理过程, 预先给予 NaHS 对肺组织有保护作用。

【关键词】 硫化氢; 胱硫醚- γ -裂解酶; 缺血/再灌注损伤, 肺; 硫化氢钠; 炔丙基甘氨酸

中图分类号: R256.1; R361.2 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.03.008

Role of hydrogen sulfide/cystathionine- γ -splitting enzyme system in rats with lung ischemia/reperfusion injury WANG Xing-min*, JI Hai-feng, WANG Wan-tie, SHI Lu, JIA Xu-guang. * Department of Internal Medicine, Ruian Traditional Chinese Medicine Hospital, Ruian 325200, Zhejiang, China
Corresponding author: WANG Wan-tie, Email: wzwwt@tom.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of hydrogen sulfide/cystathionine- γ -splitting enzyme (H₂S/CSE) system in lung ischemia/reperfusion injury (LIRI). Methods A total of 40 Sprague-Dawley (SD) rats were divided at random into four groups: sham operation control (sham) group, LIRI group, sodium hydrosulfide (NaHS) group, and propargylglycine (PPG) group. The animal model of single lung ischemia and reperfusion was established in vivo. NaHS (28 μ mol/kg) was given in the NaHS group and PPG (30 mg/kg), in the PPG group by intraperitoneal injection before the model was made, while the sham group and LIRI group were given equivalent normal saline 0.5 ml. The blood specimens gathered at the end of experiments were tested for the content of H₂S, melondialdehyde (MDA), the enzyme activities of superoxide dismutase (SOD) and myeloperoxidase (MPO). The content of H₂S, the CSE enzymatic activity and the expression of CSE mRNA in lung tissues were measured. The lung/body weight ratio (LW/BW) and the injured alveoli rate (IAR) were also counted. The histological and ultrastructural changes were observed as well. Results Compared to sham group, the contents of H₂S both in blood plasma and lung tissues, the activity of CSE and the expression of CSE mRNA in lung tissues were decreased (all $P < 0.01$); the activity of SOD was decreased and content of MDA, activity of MPO were increased in blood plasma in LIRI group (all $P < 0.01$). The values of LW/BW and IAR were significantly higher in LIRI group than those in sham group (both $P < 0.01$). Meanwhile, severe injuries of lung tissues were observed in LIRI group. Compared to LIRI group, the contents of H₂S both in blood plasma and lung tissue, the activity of CSE and the expression of CSE mRNA in lung tissues were significantly increased in NaHS group (all $P < 0.01$); the activity of SOD was increased and content of MDA, activity of MPO were decreased in blood plasma in NaHS group (all $P < 0.01$). The values of LW/BW and IAR were significantly lower in NaHS group than those in LIRI group (both $P < 0.01$); the injuries of lung tissues were attenuated in the former group. In contrast, pretreatment with PPG aggravated the injuries of lung in LIRI group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Conclusion The down regulation of H₂S/CSE system is involved in the pathogenesis and development of LIRI. Pretreatment with NaHS provides protection against the lung injuries.

【Key words】 Hydrogen sulfide; Cystathionine- γ -splitting enzyme; Lung; Ischemia/reperfusion injury; Sodium hydrosulfide; Propargylglycine

基金项目: 浙江省温州市科技计划项目(Y20090326); 浙江省瑞安市科技计划项目(20083075)

通信作者: 王万铁, Email: wzwwt@tom.com

作者简介: 王兴民(1973-), 男(汉族), 浙江省人, 副主任医师。

新近,内源性硫化氢(H₂S)被确认为继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之后的第三种气体信号分子^[1-2]。在心血管系统,H₂S 主要由胱硫醚-γ-裂解酶(CSE)催化产生。H₂S/CSE 系统具有舒张血管平滑肌、降低血压、抑制血管平滑肌细胞(VSMC)增殖^[3]等多种生理性调节作用。已有多篇文献报道 H₂S/CSE 系统在急性肺损伤(ALI)^[4-7]、心肌缺血/再灌注(I/R)损伤^[8-9]等病理过程中扮演重要角色;但对于其在肺缺血/再灌注损伤(LIRI)中的直接作用尚未见报道。本研究中复制在体大鼠 LIRI 模型,采用 H₂S 供体 NaHS 和硫化氢合酶抑制剂炔丙基甘氨酸(PPG)预处理,探讨 H₂S/CSE 系统在 LIRI 中的作用,为临床防治 LIRI 提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂:NaHS(Lot 2326AH028)、PPG、5'-磷酸吡哆醛、L-半胱氨酸购自美国 Sigma 公司;TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;cDNA 试剂盒购自上海捷瑞公司;聚合酶链反应(PCR)Mix 购自天根公司;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;其余试剂均为市售分析纯产品。

1.2 动物分组及模型制备:清洁级 SD 大鼠 40 只,雌雄不拘,体重 220~260 g,由温州医学院动物实验中心提供。按随机数字表法将大鼠均分为假手术组、LIRI 组、NaHS 组、PPG 组,每组 10 只。参考 Sekido 等^[10]方法,于呼气末阻断左主支气管、左肺动脉和左肺静脉 30 min,开放进行再灌注 120 min 复制在体大鼠 LIRI 模型。假手术组仅穿线、不阻断肺门。NaHS 组、PPG 组分别于术前 5 d 和 15 min 腹腔注射 NaHS(28 μmol/kg,溶于 0.5 ml 生理盐水中)或 PPG(30 mg/kg,溶于 0.5 ml 生理盐水中);假手术组、LIRI 组每日腹腔注射生理盐水 0.5 ml。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 实验标本制备:制模成功后阻断自主呼吸,右颈总动脉放血处死大鼠,开胸取全肺并称量,计算肺系数(肺系数=全肺湿重/体重)。剪取部分左下肺组织用多聚甲醛水溶液固定 48 h,石蜡包埋切片,苏木素-伊红染色,光镜下观察组织病理改变;剪取另一部分左下肺组织用戊二醛固定,醋酸铀-硝酸铅双染,4℃下保存用于电镜观察;其余左肺组织用液氮冻存,用于制备肺组织匀浆进行 CSE mRNA 的逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)。

1.3.2 血浆中 H₂S 的检测:参照文献^[11]的敏感硫电极法测定血浆 H₂S 含量。

1.3.3 肺组织中 H₂S 含量和 CSE 活性的检测:取大鼠肺组织制备组织匀浆,参照文献^[11]的敏感硫电极法测定肺组织 H₂S 含量和 CSE 活性,并计算 H₂S 生成率,结果以 nmol·min⁻¹·mg⁻¹表示,组织中 CSE 活性以每毫克组织在单位时间内生成 H₂S 的量(nmol/min)表示。

1.3.4 肺组织 CSE mRNA 表达的定量 RT-PCR 测定:按实验步骤经过提取总 RNA、逆转录合成 cDNA、进行 PCR 反应。取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,凝胶成像仪成像并保存结果。以 β-肌动蛋白(β-actin)作为内参照。用凝胶软件分析系统分析 CSE mRNA 和 β-actin 吸光度(A)值,以目的条带 CSE mRNA A 值和 β-actin mRNA A 值比值代表 CSE mRNA 的表达量。

1.3.5 血浆 SOD、MDA、MPO 含量检测:用黄嘌呤氧化酶法测定血浆中 SOD 活性;用硫代巴比妥酸(TBA)法测定血浆中 MDA 含量;用比色法测定血浆中 MPO 活性;操作按试剂盒说明书进行。

1.3.6 肺组织病理学观察:光镜下观察肺组织病理改变;按 Murata 等^[12]介绍的方法,于 200 倍下连续观察 10 个视野,数出含 2 个以上红细胞或白细胞的肺泡(视为损伤肺泡)数,计算肺泡损伤率(IAR),作为肺泡损伤的定量评价指标。透射电镜下观察肺组织超微结构变化。

1.4 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。所有数据先进行正态性检验,用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组样本均数比较进行方差齐性检验,采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用 LSD 法。双变量相关性分析采用 Bivariate 过程的 Pearson 相关分析法。计数资料采用 χ² 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肺系数和 IAR 的比较(表 1):LIRI、NaHS、PPG 组肺系数、IAR 均显著高于假手术组,NaHS 组较 LIRI 组显著降低,而 PPG 组却明显升高(P<0.05 或 P<0.01)。

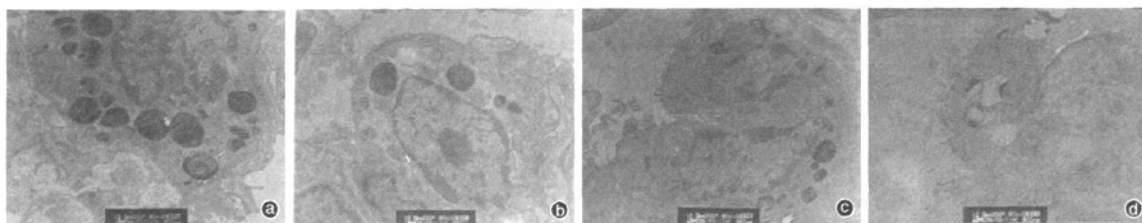
2.2 各组血浆和肺组织 H₂S 含量的比较(表 1):LIRI 组血浆和肺组织 H₂S 含量均低于假手术组,NaHS 组显著高于 LIRI 组,PPG 组显著低于 LIRI 组和 NaHS 组(P<0.05 或 P<0.01)。

2.3 各组肺组织 CSE 活性及 CSE mRNA 表达的比较(表 1;图 1):LIRI 组大鼠肺组织 CSE 活性及 CSE mRNA 表达均低于假手术组,NaHS 组高于 LIRI 组和 PPG 组(P<0.05 或 P<0.01)。

表 1 各组大鼠肺系数、IAR 及血浆和肺组织 H₂S 含量、CSE 活性、CSE mRNA 表达的比较($\bar{x}\pm s$)

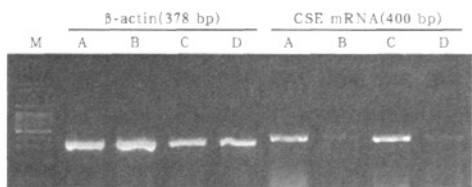
组别	动物数	肺系数	IAR (%)	血浆 H ₂ S 含量 (μmol/L)	肺组织 H ₂ S 含量 (nmol/mg)	肺组织 CSE 活性 (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	肺组织 CSE mRNA 表达
假手术组	10	4.45±0.26	14.9±4.2	46.78±8.64	362.52±24.37	0.256±0.054	0.414±0.017
LIRI 组	10	5.36±0.45 ^a	45.8±5.8 ^a	25.14±5.13 ^a	303.81±22.03 ^a	0.171±0.042 ^a	0.384±0.016 ^a
NaHS 组	10	4.84±0.27 ^{ac}	26.9±5.2 ^{ac}	49.47±9.35 ^c	407.62±32.57 ^c	0.373±0.064 ^c	0.432±0.014 ^c
PPG 组	10	5.82±0.21 ^{ab}	56.4±6.9 ^{ab}	20.33±3.23 ^{be}	272.37±30.09 ^{be}	0.091±0.023 ^{bd}	0.365±0.009 ^{be}

注:与假手术组比较,^aP<0.01;与 LIRI 组比较,^bP<0.05,^cP<0.01;与 NaHS 组比较,^dP<0.05,^eP<0.01



②:假手术组; ③:LIRI 组; ④:NaHS 组; ⑤:PPG 组

图 2 电镜下观察各组大鼠肺泡细胞超微结构(醋酸铀-硝酸铅双染,×12 000)



M:Marker; A:假手术组; B:LIRI 组; C:NaHS 组; D:PPG 组

图 1 RT-PCR 检测各组大鼠 CSE mRNA 表达

2.4 各组大鼠肺氧化/抗氧化系统的变化(表 2):与假手术组比较,LIRI 组血浆 SOD 活性显著降低,MDA 含量和 MPO 活性均显著增高(均 P<0.01);NaHS 组 SOD 活性显著高于 LIRI 组和 PPG 组,MDA 含量和 MPO 活性均显著低于 LIRI 组和 PPG 组(P<0.05 或 P<0.01)。

表 2 各组大鼠血浆 SOD 活性、MDA 含量和 MPO 活性比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	SOD(U/L)	MDA(nmol/ml)	MPO(U/L)
假手术组	10	145.39±19.77	5.74±1.69	24.46±12.77
LIRI 组	10	103.02±35.83 ^a	39.38±9.12 ^a	200.67±40.10 ^a
NaHS 组	10	143.14±22.21 ^c	14.66±5.72 ^c	108.10±46.20 ^c
PPG 组	10	68.45±12.09 ^{bc}	52.02±11.34 ^{bc}	246.62±26.94 ^{bc}

注:与假手术组比较,^aP<0.01;与 LIRI 组比较,^bP<0.05,^cP<0.01;与 NaHS 组比较,^dP<0.01

2.5 光镜下观察肺组织病理改变:假手术组肺组织结构完整,无炎症和水肿。LIRI 组肺间质水肿,组织疏松,肺泡内炎性细胞浸润。NaHS 组肺间质水肿减轻,肺泡轻度炎性细胞浸润和少许渗出物。PPG 组肺间质明显水肿,肺泡间及肺泡内炎性细胞浸润,部

分肺泡萎陷,部分呈透明膜样结构。

2.6 电镜下观察肺组织超微结构改变(图 2):假手术组肺泡 I 型上皮细胞(AT I)无水肿,线粒体结构完整,微绒毛整齐,板层小体呈圆形且密度均匀正常,无排空现象。LIRI 组 AT I 细胞水肿,核膜增粗扩张,板层小体数目减少,形成空泡;微绒毛脱落。NaHS 组 AT I 细胞轻度水肿,板层小体运动到细胞的一侧进行胞外分泌;板层小体排空及微绒毛脱落现象明显减少。PPG 组 AT I 细胞明显水肿,线粒体水肿,板层小体数目增加,多数板层小体排空现象明显,形成空泡;微绒毛脱落。

2.7 相关性分析:血浆 H₂S 与肺组织 CSE 和 H₂S 呈正相关($r_1=0.778, r_2=0.747$,均 P<0.01);血浆 H₂S 与 SOD 呈正相关($r=-0.878, P<0.01$),与 MDA 呈负相关($r=-0.890, P<0.01$);血浆 H₂S 与肺系数呈负相关($r=-0.703, P<0.01$),与 IAR 呈负相关($r=-0.796, P<0.01$)。

3 讨论

LIRI 是决定多种临床情况发生发展的重要病理过程,对其防治方法的研究一直是人们关注的热点。传统上的研究多集中在应用中药预处理^[13-15]。许益笑等^[14]研究发现,葛根素可通过提高体内 NO 水平、降低氧自由基水平、减轻脂质过氧化反应、下调天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)的 mRNA 和蛋白表达,从而抑制再灌注后肺组织细胞的异常凋亡,减轻 LIRI。耿庆等^[15]研究发现,人参皂苷能抑制肺 LIRI 的促凋亡基因 Bax 表达,增加 Bcl-2/Bax 比值,从而减少细胞凋亡,减轻 LIRI。

但由于 LIRI 为一种复杂的病理过程,因此积极寻求新的发病机制和防治方法就显得十分必要。

近年来多项研究证实,内源性气体信号分子 NO 和 CO 以其独有的持续产生、迅速传播、作用广泛等特点,参与了 LIRI 发生发展的病理过程^[16-18]。新近确认了内源性 H₂S 为第三种气体信号分子,且由于其参与广泛的病理生理过程而成为目前研究的另一热点。周晓红等^[19]报道了内/外源性 H₂S 具有抗内毒素所致 ALI 的作用,该作用可能与其抗氧化效应、减轻中性粒细胞所致肺过度的炎症反应以及下调 NO/iNOS 体系、上调 CO/血红素氧合酶-1 (HO-1)体系有一定关系。但是对于 H₂S 在 LIRI 中的直接作用尚未见报道。

本研究显示,与假手术组比较,LIRI 组 CSE 活性降低,H₂S 水平下降,且肺系数、IAR 升高,肺组织形态结构明显异常,提示肺 I/R 导致肺组织损伤。预先给予 NaHS 后 H₂S/CSE 系统上调,即 CSE 活性增强、H₂S 水平升高,同时肺系数、IAR 及形态结构提示 LIRI 所致的肺损伤减轻;而预先给予 CSE 抑制剂 PPG 则相反,CSE 活性降低,H₂S 水平下降,LIRI 进一步加重。提示 H₂S/CSE 体系下调在 LIRI 病理过程中有一定的作用,而给予一定量的 NaHS 对肺组织具有保护作用,其机制尚不十分清楚。本实验中检测了血浆 SOD 和 MPO 活性及 MDA 含量,NaHS 组血浆和肺组织 H₂S 水平升高,同时 SOD 水平升高,MDA、MPO 水平降低;而 PPG 组血浆和肺组织 H₂S 水平降低,同时 SOD 水平降低,MDA、MPO 水平升高;相关分析也显示,血浆 H₂S 水平与 SOD 水平呈正相关,与 MDA 水平呈负相关。众所周知,SOD 是一种内源性的氧自由基清除剂,MDA 是脂质过氧化反应的客观指标,MPO 反映了中性粒细胞的聚集程度。提示 H₂S 有对抗氧化应激和炎症反应的作用,与韦鹏等^[5]研究结果是一致的。

LIRI 时肺组织 CSE 活性和 H₂S 水平降低的可能原因:一方面是 LIRI 时肺组织弥漫性损害降低了 CSE 的生物活性,从而导致肺组织 H₂S 生成下降;有研究提示 H₂S 和 NO 具有协同效应,LIRI 时 NO 系统受损可能亦会导致 H₂S 系统生物活性的下降^[2]。另一方面,在多种炎症介质的作用下,肺组织局部 CSE 基因在转录水平可能下调。本研究结果支持该假设,RT-PCR 显示,LIRI 组 CSE 转录水平明显低于假手术组,而 NaHS 能诱导 CSE mRNA 表达和 CSE 活性,并可能通过对抗氧化应激等机制而对肺组织产生保护作用。

综上所述,本研究结果表明,H₂S/CSE 体系功能下调在 LIRI 的病理过程中有一定的作用;一定量外源性 H₂S(NaHS)能上调 H₂S/CSE 体系而对肺组织发挥保护作用,PPG 则可进一步抑制该体系的功能而加重肺损伤。

参考文献

- [1] Lowicka E, Bellowski J. Hydrogen sulfide (H₂S): the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep*, 2007, 59(1): 4-24.
- [2] Wang R. Two's company, three's a crowd; can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter. *FASEB J*, 2002, 16(13): 1792-1798.
- [3] Du J, Hui Y, Cheung Y, et al. The possible role of hydrogen sulfide as a smooth muscle cell proliferation inhibitor in rat cultured cells. *Heart Vessels*, 2004, 19(2): 75-80.
- [4] Esehie A, Kiss L, Olah G, et al. Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation. *Clin Sci (Lond)*, 2008, 115(3): 91-97.
- [5] 韦鹏,周晓红,凌毅群,等. 硫化氢在脂多糖所致大鼠急性肺损伤中的作用. *基础医学与临床*, 2006, 26(3): 306-311.
- [6] 田凤军,凌亦凌,黄新莉,等. 内源性 H₂S 在 CCK-8 减轻脂多糖所致急性肺损伤中的作用. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(4): 761-766.
- [7] 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. *Exp Bio Med (Maywood)*, 2008, 233(9): 1081-1087.
- [8] 常芳,李凌,常庆. 硫化氢对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的保护作用. *中原医刊*, 2005, 32(9): 2-3.
- [9] 王晓燕,曾翔俊,郑少鹏,等. 硫化氢对离体大鼠心脏缺血/再灌注损伤的影响及机制初探. *中国药理学通报*, 2006, 22(12): 1447-1451.
- [10] Sekido N, Mukaida N, Harada A, et al. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature*, 1993, 365(6447): 654-657.
- [11] 耿彬,杜军保,唐朝枢. 敏感硫电极法在测定心血管组织细胞及血浆胱硫醚-γ-裂解酶/硫化氢的应用. *北京大学学报(医学版)*, 2005, 37(5): 545-548.
- [12] Murata T, Nakazawa H, Mori I, et al. Reperfusion after a two-hour period of pulmonary artery occlusion causes pulmonary necrosis. *Am Rev Respir Dis*, 1992, 146(4): 1048-1053.
- [13] 林丽娜,张圣恭,王万铁,等. 生脉注射液对兔肺缺血/再灌注损伤时细胞凋亡的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(6): 361-363.
- [14] 许益笑,王万铁,徐正祚,等. 葛根素对缺血/再灌注损伤肺组织天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 变化的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(2): 104-107.
- [15] 耿庆,乌达,谢远财,等. 人参皂甙 Rb1 对肺缺血/再灌注损伤细胞凋亡及其调控基因表达的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2005, 12(3): 159-161.
- [16] 梁贵友,牛义民,刘达兴,等. 内源性一氧化氮抗兔肺缺血/再灌注损伤作用及其机制探讨. *四川大学学报(医学版)*, 2005, 36(2): 246-248.
- [17] 曹华,廖崇先,黄雄飞,等. 缺血/再灌注兔肺组织一氧化氮合酶的表达. *福建医科大学学报*, 2002, 36(1): 54-55, 67.
- [18] 王万铁,周伟斌,倪世蓉,等. HO-1/CO 径路在肺缺血-再灌注损伤中的作用. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(9): 1739-1743.
- [19] 周晓红,黄新莉,韦鹏,等. 硫化氢/胱硫醚-γ-裂解酶在内毒素急性肺损伤发生中的作用. *中国危重病急救医学*, 2009, 21(4): 199-202.

(收稿日期:2010-03-14) (本文编辑:李银平)