

氢气对缺血再灌注损伤保护的可能机制

贾晓晶 吴静 门秀丽

摘 要 缺血再灌注损伤是临床上常见的病理过程,目前认为导致缺血再灌注损伤的主要机制与氧化应激反应增强、炎症反应和细胞凋亡等有关。近年来,有研究发现氢气有抗氧化、抗炎性反应和抗细胞凋亡等作用。最近有研究者发现氢气有减轻缺血再灌注损伤的作用。本文主要就氢气对缺血再灌注损伤保护的可能机制进行简要综述。

关键词 氢气 缺血再灌注 损伤 细胞凋亡 炎症

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.12.005

宇宙中,氢元素是最基本、最简单的化学元素,占宇宙物质的 90%。氢气是一种无色、无嗅、无味的气体,它有一定还原性。近些年,研究发现氢气具有抗氧化、抗炎性反应和抗细胞凋亡等的作用。缺血再灌注损伤是临床上常见的病理过程,目前,氧化应激反应增强、炎症反应和细胞凋亡等被认为是导致缺血再灌注损伤的主要机制。最近,有研究者发现氢气具有减轻缺血再灌注损伤的作用。

一、氢气对器官缺血再灌注损伤的保护作用

近年来,随着休克治疗的进步及溶栓疗法、经皮腔内冠脉血管成形术、断肢再植、器官移植、动脉搭桥术等方法的开创和广泛应用,这些方法均会使缺血后的组织器官重新得到血液的再灌注。大多数情况下,这可以恢复受损组织器官的功能和修复损伤的结构,使患者病情好转;但有时却适得其反,使病情进一步加重,如使组织器官代谢紊乱进一步加重,此现象称为缺血再灌注损伤。目前,缺血再灌注损伤的具体发生机制还不完全清楚。不过,目前认为缺血再灌注损伤的重要发病环节有自由基的作用、细胞内钙超载、白细胞的作用、高能磷酸化合物的缺乏以及内皮素等的作用。目前针对缺血再灌注损伤防治的研究也逐渐引起了人们的重视。

2007 年 7 月,日本研究人员发现,给动物吸入含 2% 氢气的气体可以选择性的清除羟自由基,从而显著改善氧化应激反应导致的局部脑缺血再灌注损伤^[1]。并且,在肝脏、肾脏、心脏血再灌注模型中,也

陆续发现了氢气具有抗氧化、抗炎和抗凋亡等的作用^[2-4]。

二、氢气对缺血再灌注损伤保护作用的可能机制

1. 氢气的抗氧化作用:研究发现,氧化应激反应在缺血再灌注损伤过程中发挥着重要作用,且氧自由基的大量产生和激活是缺血再灌注损伤的主要发病机制之一。自由基可分为脂溶性的自由基和非脂溶性的自由基,后者主要是指氧自由基,即带有氧的自由基,它包括超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)等。正常情况下,机体产生的氧自由基可被抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶清除。缺血再灌注时氧自由基的过量产生会造成生物高分子的氧化损伤,如膜磷脂被破坏后导致的细胞功能障碍、蛋白质被破坏后导致的功能丧失以及 DNA 被破坏后导致的基因变异等。氧自由基中毒性最强的是 $\cdot\text{OH}$,到目前为止在哺乳动物还没有发现清除体内 $\cdot\text{OH}$ 的内源性途径。

过去,在生物学界氢气一直被认为是生理惰性气体,即类似于氮气和氦气,是没有生物学效应的气体。直到 2007 年日本医科大学研究者的报道彻底改变了人们对氢气的认识。该研究发现,吸入 2% 的氢气混合气 35min,能够非常有效地治疗脑缺血再灌注损伤,并且研究发现氢气只能中和毒性强的 $\cdot\text{OH}$ 和过氧亚硝基阴离子,但对体内的活性氧没有作用。因此 Ohsawa 指出,氢气可以保护氧化应激诱导的局部脑缺血再灌注损伤的基础是它的选择性抗氧化作用,由于氢气的跨膜扩散能力较快,并可以达到和与有细胞毒性的氧自由基发生反应,从而防止氧化损伤,所以氢气被认为是一种有效的抗氧化剂^[1]。

在常温下,氢气不易保存,且越来越多的实验开始使用富氢生理盐水(即氢气溶解在生理盐水中达

基金项目:河北省卫生厅医学研究重点课题(20130060);河北省高等学校科学技术研究优秀青年基金资助项目(Y2011117);华北理工大学基础医学院大学生创新性实验计划(JCDC2014-4)

作者单位:063000 唐山,华北理工大学

通讯作者:门秀丽,电子信箱:xiulimen@126.com

到饱和状态,氢浓度为 0.6mmol/L)代替氢气。Liu 等^[5]研究发现不同给药途径会影响氢气在组织中的分布。口服富氢生理水后,氢气在脾中浓度最高,其次是胰和小肠中浓度较高;腹腔给药后,胰腺中氢气含量最高,其次是脾脏和小肠;静脉注射后,各组织器官中氢气浓度都较高,但在胰腺中含量最多;吸入给药时,肌肉组织中氢气含量高,其次是胰腺和肾脏。因此,根据氢气在组织中的分布差异,可在组织缺血再灌注时制定最佳给药途径。

随后陆续有研究证明富氢生理盐水在肺脏、肾脏和肝脏缺血再灌注损伤的发挥抗氧化作用^[6-8]。Li 等^[9]发现富氢生理盐水可缓解兔肺脏缺血再灌注损伤可能是通过氢气的抗氧化途径实现的,并指出富氢生理盐水可以还增大 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 的比值以及增加超氧化物歧化酶的活性,降低丙二醛(MDA)含量、减少促炎因子的表达以及抑制髓过氧化物酶(MPO)的活性。另有研究发现,富氢生理盐水可以减轻鼠肾缺血再灌注损伤,表现为减轻间质充血水肿、减少出血和减轻炎症反应的组织学特征^[10]。此外,还可降低羟甲基脱氧鸟苷(8-OHdG)的含量,并指出这些作用主要是通过富氢生理盐水发挥抗氧化作用实现的。

2. 氢气的抗炎作用:炎症反应是缺血再灌注损伤的发病机制之一。缺血再灌注时诱发的炎症反应及其介质可加重缺血再灌注损伤,如若能有效地调控炎症反应则可减轻缺血再灌注损伤。缺血再灌注时活性氧的产生可激活白细胞的大量生成,从而导致炎症介质如前列腺素、血栓素 A_2 等的产生和释放,此外,白细胞的大量激活也可进一步促进氧自由基的产生,从而进一步放大炎症反应。目前,有研究者证明吸入氢气能有效地缓解小肠移植造成的氧化应激损伤,并提出氢气具有抗炎作用^[7]。随后,美国匹兹堡大学在氢气对抗小肠器官移植造成的损伤研究中,第 1 次证明了氢气具有抗炎症的作用。另外,研究表明,肝脏缺血再灌注导致的急性炎症反应主要是巨噬细胞造成的,原因是巨噬细胞在炎症部位聚集大量中性粒细胞,而富氢生理盐水却可有效地抑制肝缺血再灌注时中性粒细胞的浸润,从而减轻炎症反应,卞学艺等^[8]进一步证明该作用是通过抑制再灌注时肝组织中核转录因子 κB (NF- κB) 的活化以减轻炎症反应的。在此之前,Zheng 等^[6]在研究富氢生理盐水对肠缺血再灌注损伤的模型中也证明了富氢生理盐水可减轻急性肠损伤导致的炎症反应。随后,研究者研究缺血再灌注时富氢生理盐水对鼠皮瓣的保护作

用时,发现富氢生理水能够明显地降低促炎因子、MDA、趋化因子和脂质过氧化生长因子的水平,并指出此作用可能是通过富氢生理盐水能抗炎细胞的浸润实现的。Zhang 等^[12]研究发现,富氢生理盐水能降低鼠心脏局部缺血再灌注损伤的原因是其具有抗炎的作用,此作用表现在它能降低缺血区的中性粒细胞的浸润、抑制 MPO 的活性、减少细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达以及降低 3-硝基酪氨酸的水平。Liu 等^[13]研究缺血再灌注后富氢生理盐水对肝脏的保护作用中,发现富氢生理盐水可以限制高迁移率族蛋白 1(HMGB1)的表达和释放,从而减轻缺血再灌注时的炎症反应对肝脏的损伤。

3. 氢气的抗细胞凋亡作用:细胞凋亡(apoptosis)是细胞死亡的一种方式,该过程由基因调控。细胞凋亡的形态学和生物化学特征为细胞皱缩、染色质凝集、凋亡小体的形成和质膜完整,其中,以凋亡小体的形成为标志。与细胞坏死不同的是,细胞凋亡没有明显的溶解过程,并且它是由基因调控的主动死亡过程。此外,细胞凋亡在生理和病理情况下都可以发生,它可以清除损伤、衰老和突变的细胞,是机体维持自身稳定的重要机制之一,也是组织保持平衡的方式之一。杨邵杰等^[14]认为细胞凋亡存在 3 条主要通路,即线粒体通路、内质网通路和死亡受体通路,各通路之间互相联系,共同调节细胞凋亡。线粒体凋亡通路的主要步骤是细胞色素 C(Cyt-C)的释放。细胞损伤时,Cyt-C 与细胞凋亡蛋白活化因子结合,并激活半胱氨酸蛋白酶 9(caspase-9)前体,进而活化半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3),引发半胱氨酸蛋白酶(caspase)的级联反应,从而诱发细胞凋亡^[15]。有研究发现,缺血再灌注过程中产生的活性氧可激活氧化还原敏感的转录因子如 NF- κB 和激活子蛋白-1(AP-1),前者通过上调促炎因子而造成损伤,后者通过促进 Cyt-C 和激活 caspase-3 加速细胞凋亡。此外,缺血再灌注时线粒体内膜通透性增大,使线粒体肿胀来改变线粒体内胶体渗透压,导致促凋亡因子 Cyt-C 的释放,从而诱导细胞凋亡。脑缺血再灌注时,神经细胞内线粒体钙超载,使线粒体肿胀破裂,导致促凋亡因子 Cyt-C、凋亡诱导因子和与细胞凋亡密切相关的因子的释放,最终导致细胞凋亡。死亡受体可以把细胞外的死亡信号转入胞内^[7]。死亡受体是一类跨膜蛋白,属于肿瘤坏死因子受体基因超家族^[14]。现在,已知的死亡受体有 5 种,人肿瘤坏死因子受体-1(TNFR-1)、Fas、死亡受体 3(DR3)、死亡

受体 4 (DR4) 和死亡受体 5 (DR5), 其中, 前 3 种受体相应的配体分别为肿瘤坏死因子 (TNF)、FasL、DR3/Apo-3 抗体 (Apo-3L), 后两种受体相应的配体均为 Apo-2L。死亡受体与其配体结合后可激活半胱氨酸蛋白酶 8 (caspase-8), 从而诱导细胞凋亡。有研究发现, 心肌缺血再灌注可激活 Fas/FasL 系统, 从而导致细胞凋亡, 且 Fas/FasL 系统的激活和细胞凋亡还会加重缺血再灌注损伤。

内质网是细胞内蛋白质合成的主要场所和钙离子的主要存储库。内质网不仅在维持细胞内钙离子的稳定和膜蛋白的合成、修饰及折叠等方面都发挥关键性作用, 也在凋亡信号的处理过程中发挥重要作用。内质网通路在上述两种通路不同。它是通过诱导位于内质网膜的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12 (caspase-12) 的表达, 使半胱氨酸蛋白酶 7 (caspase-7) 由胞质转移到内质网表面, 而 caspase-7 可以激活 caspase-12, 活化的 caspase-12 进一步剪切 caspase-3, 最终导致细胞凋亡。研究发现, 胞质中的钙离子的平衡依赖于位于内质网上 Bcl-2 家族中凋亡抑制蛋白调节内质网中的钙离子浓度实现的, 这可以防止细胞凋亡的发生^[14]。可见, 细胞凋亡的发生与内质网的形态功能是否正常有很大关系。研究发现, 脑缺血再灌注时, 导致神经细胞损伤的氧化应激与钙超载等导致内质网应激功能改变, 且内质网应激效应与缺血再灌注时间密切相关, 而长时程的内质网应激反应会引起神经细胞凋亡^[7]。有研究发现, 富氢生理盐水可通过降低细胞凋亡和抑制内质网应激减轻心肌再灌注损伤, 并且指出其机制可能与减少葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、caspase-12 和 Bax 蛋白的表达以及增加心肌组织 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2) 的表达有关^[17]。

由此可见, 3 条细胞凋亡通路最后都有 caspase 的激活, 这说明 caspase 是调控细胞凋亡通路的关键。所以, 如果能有效地抑制 caspase 系统的激活, 即可有效控制细胞凋亡。研究发现, 富氢生理盐水可降低心肌中 MDA 的浓度, 减弱 caspase-3 的活性, 减小心肌梗死面积^[17]。同时, 富氢生理盐水还可以降低氧化应激对线粒体的损伤, 并指出富氢生理盐水不仅可减轻组织损伤、线粒体肿胀的程度和线粒体膜的潜在损失, 还可保留了线粒体 Cytc 的含量^[16]。此外, 富氢生理盐水还可以降低脊髓缺血时 caspase-3 的活性, 指出富氢生理盐水是一种通过激活线粒体 ATP 敏感钾通道减轻氧化应激、细胞凋亡和炎症反应的有效剂^[18]。

此外, 缺血再灌注也会导致氧化应激反应和大量炎性介质的生成, 前者是通过使生物大分子氧化损伤而诱导细胞凋亡, 后者则会加重细胞凋亡。蔡建美等研究证实, 呼吸 2% 氢气对 7 天大鼠幼崽脑缺血缺氧性脑病有效减少神经细胞凋亡的作用, 此研究证明氢气具有抗凋亡作用, 其机制可能与减少氧化应激反应和炎性介质表达有关。随后, Chen 等在探究富氢生理盐水对鼠缺血再灌注时肠上皮内部结构变化的研究中发现富氢生理盐水可有效改善肠上皮的收缩功能障碍和损伤, 并指出这一缓解损伤作用可能与富氢生理盐水抗细胞凋亡作用有关。目前, 氢气的抗凋亡作用尚不清楚, 其抗凋亡作用可能与减轻氧化应激和减少炎性介质产生有关, 亦可以是氢气本身对细胞凋亡有抑制作用。

三、展 望

氢气制备容易、价格低廉、渗透性强, 对人体没有明显不良反应, 众多研究也表明氢气在缺血再灌注损伤方面有明显的保护作用, 因而有较好的临床应用前景。常温下, 氢气易燃易爆, 且不宜存储, 但富氢生理盐水安全性好, 且使用方便。相比之下, 富氢生理盐水更具有优势。研究发现, 富氢生理盐水可通过口服或静脉注射发挥其生物学功能。口服富氢生理盐水时会有部分氢气在消化道中有损失, 而静脉注射富氢生理盐水可以更精确的控制氢气在体内的浓度, 充分发挥氢气的生物学功能。此外, 尽管许多研究表明氢气对缺血再灌注损伤具有保护作用, 但具体机制还不清楚, 仍需深入研究。氢气除在缺血再灌注损伤中具有保护作用, 在其他疾病如急性胰腺炎、变态反应、高血压等疾病中也具有保护作用。如能深入研究氢气治疗疾病的作用机制, 可对临床多种疾病的治疗产生深远影响。

参考文献

- 1 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
- 2 Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, *et al.* Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(3): 670-674
- 3 宋少华, 沈筱芸. 静脉注射含饱和氢气生理盐水减轻小鼠肾脏缺血再灌注损伤 [J]. *中华器官移植杂志*, 2010, 31(2): 109-113
- 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 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373(1): 30-35

(下转第 37 页)

参考文献

- 1 Shi N, Chen SY. Mechanisms simultaneously regulate smooth muscle proliferation and differentiation [J]. J Biomed Res, 2014, 28(1): 40-46
- 2 Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet - derived growth factors in physiology and medicine [J]. Genes Dev, 2008, 22(10): 1276-1312
- 3 Rehman MU, Ali N, Rashid S, *et al.* Alleviation of hepatic injury by chrysin in cisplatin administered rats: probable role of oxidative and inflammatory markers [J]. Pharmacol Rep, 2014, 66(6): 1050-1059
- 4 Huang CS, Lii CK, Lin AH, *et al.* Protection by chrysin, apigenin, and luteolin against oxidative stress is mediated by the Nr2 - dependent up - regulation of heme oxygenase 1 and glutamate cysteine ligase in rat primary hepatocytes [J]. Arch Toxicol, 2013, 87(1): 167-178
- 5 Gresa - Arribas N, Serratos J, Saura J, *et al.* Inhibition of CCAAT/ enhancer binding protein delta expression by chrysin in microglial cells results in anti - inflammatory and neuroprotective effects [J]. J Neurochem, 2010, 115(2): 526-536
- 6 Weng MS, Ho YS, Lin JK. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen - activated protein kinase [J]. Biochem Pharmacol, 2005, 69(12): 1815-1827
- 7 Kasala ER, Bodduluru LN, Madana RM, *et al.* Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives [J]. Toxicol Lett, 2015, 233(2): 214-225
- 8 Zou XQ, Peng SM, Hu CP, *et al.* Synthesis, characterization and vasculoprotective effects of nitric oxide - donating derivatives of chrysin [J]. Bioorg Med Chem, 2010, 18(9): 3020-3025
- 9 秦小江, 侯晓敏, 梁泰刚. 白杨素对大鼠离体肾动脉的舒张作用 [J]. 中国药物与临床, 2014, 14(8): 1009-1011

- 10 Pushpavalli G, Veeramani C, Pugalendi KV. Influence of chrysin on hepatic marker enzymes and lipid profile against D - galactosamine - induced hepatotoxicity rats [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(6): 1654-1659
- 11 El - Bassossy HM, Abo - Warda SM, Fahmy A. Chrysin and luteolin alleviate vascular complications associated with insulin resistance mainly through PPAR - γ activation [J]. Am J Chin Med, 2014, 42(5): 1153-1167
- 12 Lo HM, Wu MW, Pan SL, *et al.* Chrysin restores PDGF - induced inhibition on protein tyrosine phosphatase and reduces PDGF signaling in cultured VSMCs [J]. J Nutr Biochem, 2012, 23(6): 667-678
- 13 Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study [J]. Lancet, 1993, 342(8878): 1007-1011
- 14 Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, *et al.* Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study [J]. BMJ, 1996, 312(7029): 478-481
- 15 Pichichero E, Cicconi R, Mattei M, *et al.* Acacia honey and chrysin reduce proliferation of melanoma cells through alterations in cell cycle progression [J]. Int J Oncol, 2010, 37(4): 973-981
- 16 Zhang Q, Zhao XH, Wang ZJ. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE - 510) by induction of G2/M arrest and apoptosis [J]. Toxicol In Vitro, 2009, 23(5): 797-807
- 17 Araújo JR, Gonçalves P, Martel F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines [J]. Nutr Res, 2011, 31(2): 77-87
- 18 Lim S, Kaldis P. Cdk, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation [J]. Development, 2013, 140(15): 3079-3093

(收稿日期:2015-04-24)

(修回日期:2015-05-19)

(上接第 17 页)

- 5 Liu C, Kurokawa R, *et al.* Estimation of the hydrogen concentration in rat tissue using an airtight tube following the administration of hydrogen via various routes [J]. Sci Rep, 2014, 4: 5485
- 6 Zheng X, Mao Y, Cai J, *et al.* Hydrogen - rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Free Radic Res, 2009, 43(5): 478-484
- 7 Sun Q, Kang Z. Hydrogen - rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Exp Bio Med, 2009, 234(10): 1212-1219
- 8 卞学艺, 姜保成. 含饱和氢气生理盐水减轻小鼠肝脏缺血再灌注损伤 [J]. 中华器官移植杂志, 2011, 32(3): 177-181
- 9 Li H, Zhou R. Hydrogen - rich saline attenuates lung ischemia - reperfusion injury in rabbits [J]. J Surg Res, 2012, 174(1): 11-16
- 10 Shigu C, Koga H. Hydrogen - rich saline solution attenuates renal ischemia - reperfusion injury [J]. J Anesth, 2010, 24(4): 569-574
- 11 Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, *et al.* Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury [J]. Am J Transplant, 2008, 8(10): 2015-2024
- 12 Zhang Y, Sun Q. Anti - inflammatory effect of hydrogen - rich saline

in a rat model of regional myocardial ischemia and reperfusion [J]. Int J Cardiol, 2011, 148(1): 91-95

- 13 Liu Y, Yang L, Tao K, *et al.* Protective effects of hydrogen enriched saline on liver ischemia reperfusion injury by reducing oxidative stress and HMGB1 release [J]. BMC Gastroenterol, 2014, 14: 12
- 14 杨邵杰, 孟金萍. 细胞凋亡信号传导通路的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(5): 297-301
- 15 Zhao L, Wang YB. Protective effect of hydrogen - rich saline on ischemia/reperfusion injury in rat skin flap [J]. J Zhwhjiang Univ Sci B, 2013, 14(5): 382-391
- 16 Cui Y, Zhang H. Hydrogen - rich saline attenuates neuronal ischemia - reperfusion injury by protecting mitochondrial function in rats [J]. J Surg Res, 2014, 192(2): 564-572
- 17 Zhao Y, Tang Y. Effects of hydrogen - rich saline on endoplasmic reticulum stress during myocardial ischemia - reperfusion in rats [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2014, 94(38): 3024-3028
- 18 Zhou L, Wang X. Beneficial effects of hydrogen - rich saline against spinal cord ischemia - reperfusion injury in rabbits [J]. Brain Res, 2013, 1517: 150-160

(收稿日期:2015-04-11)

(修回日期:2015-04-24)