

文章编号 1006-8147(2014)05-0354-03

论著

Nrf2 在富氢液减轻小鼠脓毒症氧化损伤中的作用

高秋文, 谢克亮, 陈红光, 王卫娜, 王国林, 于泳浩

(天津医科大学总医院麻醉科, 天津 300052)

摘要 目的:探讨富氢液对小鼠脓毒症氧化损伤的影响及核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)的具体作用机制。方法:雄性 C57BL/6 野生型小鼠 64 只,体质量 20~25 g,5 周龄,采用随机数字表法,将其随机分为 4 组($n=16$):假手术组(A 组)、盲肠结扎穿孔(CLP)组(B 组)、CLP+富氢液组(C 组)、CLP+富氢液+全反式维甲酸(ATRA)组(D 组)。采用 CLP 制备脓毒症模型。ATRA 处理为 CLP 实验前 1 周,每天腹腔注射 ATRA,10 mg/kg。各组于 CLP 或假手术后 1、6 h 时分别给予富氢液(HS)或生理盐水,5 mL/kg。每组取 10 只小鼠,观察 CLP 后 7 d 内生存情况。剩余 24 只动物,于手术后 24 h 下腔静脉采血,检测血清丙二醛(MDA)、抑制羟自由基($\cdot\text{OH}$)能力、超氧化物酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)水平,取肺检测 Nrf2 的表达。结果:与 A 组比较,B 组小鼠 7 d 生存率降低,肺组织 Nrf2 表达增加,血清 MDA 含量增加,抑制 $\cdot\text{OH}$ 能力、SOD 和 CAT 活性降低($P<0.05$);与 B 组比较,C 组小鼠 7 d 生存率升高($P<0.05$),肺组织 Nrf2 表达进一步增加,血清 MDA 含量降低,抑制 $\cdot\text{OH}$ 能力、SOD 和 CAT 活性增加($P<0.05$);与 C 组比较,D 组小鼠 7 d 生存率显著下降($P<0.05$),肺组织 Nrf2 表达降低,血清 MDA 含量增加,抑制 $\cdot\text{OH}$ 能力、SOD 和 CAT 活性降低($P<0.05$)。结论:富氢液对脓毒症氧化损伤具有治疗作用,可能与调节内源性抗氧化系统关键分子 Nrf2 有关。

关键词 富氢液;脓毒症;氧化损伤;小鼠;核因子 E2 相关因子 2

中图分类号 R631

文献标志码 A

Effect of Nrf2 in hydrogen-rich saline to reduce the oxidative damage in septic mice

GAO Qiu-wen, XIE Ke-liang, CHEN Hong-guang, WANG Wei-na, WANG Guo-lin, YU Yong-hao

(Department of Anesthesiology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Nrf2 in hydrogen-rich saline on sepsis in mice and the associated mechanism.

Methods: Sixty four mice, aged 5 weeks, weighing 20~25 g were randomly divided into four groups ($n=16$ each): sham operation group (group A), cecal ligation and puncture (CLP) group (group B), CLP + hydrogen-rich saline group (group C), CLP + hydrogen-rich saline + ATRA group (group D). Severe sepsis was induced by CLP operation. ATRA was given i.p. daily at 10 mg/kg for 1 week before CLP. 5 mL/kg of hydrogen-rich saline was given at 1 and 6 h after CLP or sham operation, respectively. The survival rates of four groups (40 animals) were observed in 7 day. In additional 24 animals, blood was collected to test malondialdehyde(MDA), inhibited ability of hydroxyl radical, activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) at 24 h after operation, then lung were collected to measure the Nrf2 protein expression.

Results: Compared with group A, survival rate of severe septic mice, the inhibited ability of hydroxyl radical, the activity of SOD and CAT were significantly decreased and the MDA was increased, the Nrf2 expression was increased in group B ($P<0.05$). Compared with group B, survival rate of severe septic mice, the inhibited ability of hydroxyl radical, SOD and CAT activities were significantly elevated and the MDA was decreased in serum of septic mice, the Nrf2 expression was further increased in group C($P<0.05$). Compared with group C, survival rate of severe septic mice, the inhibited ability of hydroxyl radical, the activity of SOD and CAT were obviously decreased and the MDA was increased, the Nrf2 expression was reduced in group D ($P<0.05$). **Conclusion:** Hydrogen-rich saline can alleviate sever sepsis in mice via regulating Nrf2 protein expression.

Key words hydrogen-rich saline; sepsis; oxidative injury; mice; Nrf2

脓毒症(sepsis)是感染因素诱发的全身炎症反应综合征,是烧伤、创伤和大手术等的常见并发症,是危重患者死亡的首要因素^[1]。氧化应激在脓毒症的发病过程中发挥重要的作用^[2]。近年来研究发

现,氢气及富氢液可提高脓毒症小鼠的生存率、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)的活性,减少丙二醛(malondialdehyde, MDA)的表达,为脓毒症的救治研究提供新的方向^[3-5]。核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)是氧化应激启动内源性保护反应的关键因素,是 CNC(cap'n collar)转录因子家族成员中活力最强的转录调节因子,亦是脓毒症发生发展的关键调节因子^[4]。Thimmulappa 等^[6]研究发现,Nrf2 基因敲除的脓毒症

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81071533, 81101409);天津市应用基础及前沿技术研究计划资助(11JCYBJC12900, 13JC-QNJ11400);天津市卫生局科研基金资助项目(2011KZ108)

作者简介 高秋文(1968-),女,主管护师,研究方向:麻醉护理;通信作者:于泳浩,E-mail: yuyonghao@126.com。

小鼠生存率远远低于野生型脓毒症小鼠。本研究拟探讨 Nrf2 在富氢液减轻小鼠脓毒症氧化损伤中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物选择及分组 野生型雄性 C57BL/6 小鼠 64 只,购自中国军事医学科学院实验动物中心。体质量 20~25 g,5 周龄,适应性观察 1 周后,采用随机数字表法,将其随机分为 4 组($n=16$):假手术组(A 组)、脓毒症组(B 组)、脓毒症+富氢液组(C 组)、脓毒症+富氢液+反义维甲酸 (antisense retinoic acid, ATRA)组(D 组)。

1.2 重度脓毒症小鼠模型的建立及 ATRA 的处理 按照参考文献[5]方法麻醉、备皮和铺单。沿腹中线切开皮肤、腹壁约 1 cm,在回盲瓣下方盲肠近段 1/4 处结扎盲肠(避免结扎回肠及盲肠系膜血管),用 20 G 无菌针头行被结扎盲肠穿孔,然后挤压盲肠,使其内容物沿穿孔部位挤出 0.2~0.3 mL,将盲肠和挤出内容物一起送回腹腔,逐层缝合腹壁切口。A 组只进行相同的操作,不进行盲肠结扎和穿孔。参考文献[7]及前期实验结果,选择 ATRA 为 Nrf2 抑制剂,在盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture,CLP)实验前 1 周,每天腹腔注射 ATRA,10 mg/kg (Sigma - Aldrich),ATRA 溶于玉米油中。

1.3 富氢液的制备及应用 按照参考文献[4]方法并加以改进,将生理盐水置于高纯氢气(纯度>99.999 9%)环境中,在 0.4 MPa 压力下加压暴露 4 h,至氢气溶解于生理盐水达到饱和状态,放于 4 ℃ 贮存、备用。为了保证生理盐水中氢气浓度,每次使用富氢液新鲜制备,气相色谱法检测氢浓度大于 0.6 mmol/L。C 和 D 组于 CLP 术后 1、6 h 分别腹腔给予富氢液 5 mL/kg,而 A 组给予同等剂量的生理盐水。

1.4 生存率观察 每组取 10 只小鼠,观察实验后 7 d 内小鼠生存情况。

1.5 血清 MDA、抑制·OH 能力、SOD 和 CAT 水平的测定 每组取 6 只小鼠,于假手术或 CLP 24 h 后,采集下腔静脉血样 1.5 mL,4 ℃ 3 000×g 离心 15 min,取血清,采用 722 可见分光光度计(上海分析仪器厂)测定 MDA、·OH、SOD 和 CAT(试剂盒购自南京建成生物工程研究所,中国)。

1.6 Western blot 方法测定 Nrf2 的表达 于实验后 24 h,每组随机取 6 只小鼠,下腔静脉采血后处死,取两肺中叶,用组织裂解液裂解细胞,离心取上清后进行蛋白定量。取 50 μg 蛋白进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,以半干法点转移转膜、封闭后,用

Nrf2 单克隆抗体(稀释度 1:200,Santa Cruz 公司,美国)进行孵育,漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释度 1:5 000,Sigma 公司,美国)。在暗室中以增强化学发光液进行显色、曝光,采用 Bio-Rad 图像分析系统(Bio-Rad 公司,美国)进行扫描,以目的蛋白条带积分光密度值与内参 β-actin 条带积分光密度值的比值反映目的蛋白表达水平。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,,生存率比较采用 Kaplan-Meier 法分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 与 A 组比较,B 组小鼠 7 d 生存率降低 ($P<0.05$);与 B 组比较,C 组小鼠 7 d 生存率升高 ($P<0.05$),与 C 组比较,D 组小鼠 7 d 生存率显著下降 ($P<0.05$),见表 1。

表 1 4 组小鼠 Sham 或 CLP 后不同时点生存率的比较($n=10$,%)

Tab 1 Comparison of survival rates at different time after Sham or CLP operation ($n=10$,%)

组别	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d
A 组	100	100	100	100	100
B 组	60	20	0	0	0 ^a
C 组	90	80	70	70	70 ^b
D 组	60	30	10	0	0 ^c

与 A 组比较,^a $P<0.05$;与 B 组比较,^b $P<0.05$;与 C 组比较,^c $P<0.05$

2.2 与 A 组比较,B 组血清 MDA 含量增加,抑制·OH 能力、SOD 和 CAT 活性降低($P<0.05$);与 B 组比较,C 组血清 MDA 含量降低,抑制·OH 能力、SOD 和 CAT 活性增加($P<0.05$);与 C 组比较,D 组血清 MDA 含量增加,抑制·OH 能力、SOD 和 CAT 活性降低($P<0.05$),见表 2。

表 2 小鼠血清 MDA、抑制·OH 能力、SOD 和 CAT 活性的比较($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Comparison of MDA, inhibition of ·OH, SOD and CAT activity in blood of mice ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	MDA/(nmol/mL)	·OH/(U/mL)	SOD/(U/L)	CAT/(U/mL)
A 组	2.31±0.41	358±72	232±55	26.3±3.9
B 组	15.62±3.68 ^a	121±20 ^a	128±26 ^a	12.4±1.6 ^a
C 组	5.89±1.26 ^b	283±49 ^b	209±42 ^b	22.6±2.8 ^b
D 组	15.89±3.85 ^c	129±20 ^c	128±28 ^c	10.9±1.2 ^c

与 A 组比较,^a $P<0.05$;与 B 组比较,^b $P<0.05$;与 C 组比较,^c $P<0.05$

2.3 A 组肺组织 Nrf2 为 0.20±0.04,B 组为 0.38±0.08,C 为 0.60±0.16,D 组为 0.30±0.07。与 A 组比较,B 组肺组织 Nrf2 表达增加($P<0.05$);与 B 组比较,C 组肺组织 Nrf2 表达进一步增加($P<0.05$);与 C

组比较,D组肺组织 Nrf2 表达显著降低($P<0.05$),见图1。

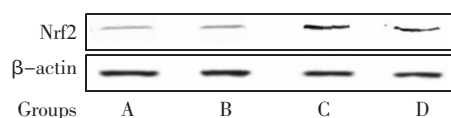


图1 各组小鼠肺 Nrf2 表达的比较($n=6$)

Fig 1 Comparison of Nrf2 expression in lung of mice of different groups ($n=6$)

3 讨论

CLP 是脓毒症实验研究的经典动物模型^[3-5]。本实验采用此方法复制了重度脓毒症小鼠模型,本课题组前期研究发现,CLP 后 1 h 和 6 h 给予 2% 氢气吸入,可以显著改善小鼠 SOD 活性和生存率。

氢气是易燃易爆的危险气体,在空气中安全浓度为 $<4.6\%$, $>74.2\%$ 。在安全范围内氢气对多种疾病有治疗作用,但是这种方法在日常生活中使用相当不便,也不适合长期预防和治疗使用,所以 Li 等^[4]通过使用富氢液观察其对脓毒症小鼠的影响,他们研究发现富氢液可以提高脓毒症小鼠 SOD、CAT 活性和脓毒症小鼠生存率,与 2% 氢气治疗脓毒症具有同样效果。故本实验参考上述研究,选择富氢液作为传递氢分子的方式,选择 CLP 后 1 h 和 6 h 作为治疗时间点。

脓毒症在发展过程中,体内氧化物质大量堆积,抗氧化物质大量丢失,打破机体的氧化-还原系统平衡,导致病情进一步恶化,形成体内病理状态恶性循环。MDA 是多不饱和脂肪酸脂质过氧化的副产物,被用作氧化应激水平评估。 $\cdot\text{OH}$ 是活性最高、毒性最大的一种氧自由基,可以氧化核酸、蛋白质和脂质,同时发挥其生物毒性作用。SOD 和 CAT 是清除氧自由基的主要酶类。本实验结果表明,脓毒症机体的氧化与抗氧化失衡中,SOD 和 CAT 活性受到明显抑制,机体抑制 $\cdot\text{OH}$ 能力显著下降,而评价氧化损伤的 MDA 却大量表达。

目前认为 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路是生物体内最重要的内源性抗氧化系统,其中 Nrf2 是此系统

的关键性分子。机体细胞受到有害刺激时,Nrf2 激活后与核内 ARE 结合,诱导下游抗氧化蛋白(SOD、CAT、GSH-Px 和 NQO1 等)和Ⅱ相解毒酶(HO-1、Trx、Prx 和 GSTs)的表达,在防御保护中发挥重要作用。Thimmulappa 等^[6]发现 Nrf2 是先天性免疫反应关键性调节分子,Nrf2 基因敲除可使脓毒症动物器官损伤明显加重,存活率明显降低,而 Nrf2 高表达可使脓毒症动物器官损伤减轻,存活率明显提高。本实验结果发现,富氢液可增加脓毒症小鼠抑制 $\cdot\text{OH}$ 能力以及 SOD、CAT 活性表达和生存率,同时降低 MDA 表达。但是富氢液对 D 组脓毒症小鼠抑制 $\cdot\text{OH}$ 能力以及 SOD、CAT、MDA 表达和生存率无明显影响。本实验研究结果提示,富氢液可能通过作用于 Nrf2 分子,促进其下游抗氧化酶的表达,降低氧自由基产生,从而逐渐恢复机体氧化-还原系统平衡,促进脓毒症机体恢复,提高生存率。

综上所述,富氢液是一种安全方便的氢气使用方式,且对脓毒症氧化损伤具有治疗作用,其具体机制可能是通过激活内源性抗氧化系统 Nrf2 信号通路得以实现。

参考文献:

- [1] Cheng B, Xie G, Yao S, et al. Epidemiology of severe sepsis in critically ill surgical patients in ten university hospitals in China[J]. Crit Care Med, 2007, 35(11): 2538
- [2] Reid V L, Webster N R. Role of microparticles in sepsis[J]. Br J Anaesth, 2012, 109(4): 503
- [3] 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: 90
- [4] Li G M, Ji M H, Sun X J, et al. Effects of hydrogen-rich saline treatment on polymicrobial sepsis[J]. J Surg Res, 2013, 181(2): 279
- [5] 陈红光, 谢克亮, 韩焕芝, 等. 氢气对脓毒症小鼠急性肺损伤的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2012, 32(2): 195
- [6] Thimmulappa R K, Lee H, Rangasamy T, et al. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis[J]. J Clin Invest, 2006, 116(4): 984
- [7] Wang X J, Hayes J D, Henderson C J, et al. Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor alpha[J]. PNAS, 2007(49): 19589

(2013-07-09 收稿)