

· 实验研究 ·

吸入高浓度氢气对大鼠创伤性脑损伤的影响

王跃振 李庭庭 曹红玲 陈剑峰 杨万超

【摘要】 目的 研究高浓度氢气对大鼠创伤性脑损伤的影响及其机制。**方法** 雄性 SD 大鼠 30 只,体重 220~240 g,随机分为三组,每组 10 只:假手术组(S 组)、脑创伤组(T 组)和氢气治疗组(H 组)。S 组暴露硬脑膜但不进行撞击,T 组与 H 组通过液压颅脑损伤撞击建立大鼠创伤性脑损伤模型,H 组于术后第 1 天起每天吸入 1 h 高浓度氢气(42% H₂-21% O₂-37% N₂),连续 7 d。术后 48 h 采用 HE 染色法观察脑组织病理改变,免疫组化法检测创伤周围皮质氧化应激相关蛋白 MPO 和 HO-1 含量,尼氏染色法观察尼氏小体来判断神经元状态,术后 7 d 采用 Western blot 法检测凋亡相关蛋白 bcl-2, bax 以及 caspase-3 含量。**结果** 与 T 组比较,H 组神经元损伤减轻($P < 0.05$),异常神经细胞数量减少($P < 0.05$),促凋亡蛋白 bax, caspase-3 及氧化应激相关蛋白 MPO, HO-1 含量明显降低($P < 0.05$),抗凋亡蛋白 bcl-2 含量明显升高($P < 0.05$)。**结论** 高浓度氢气可减轻大鼠创伤性脑损伤,其机制可能与氢气抗凋亡以及抗氧化应激作用相关。

【关键词】 氢气;创伤性脑损伤;凋亡;氧化应激

Effects of inhaling high concentration hydrogen on traumatic brain injury in rats WANG Yuechen, LI Tingting, CAO Hongling, CHEN Jianfeng, YANG Wanchao. Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China
Corresponding author: YANG Wanchao, Email: dachao_1980@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of high concentration hydrogen on traumatic brain injury in rats. **Methods** Thirty male Sprague Dawley (SD) rats, weighing 220~240 g, were randomly divided into sham operation group (group S), traumatic brain injury group (group T) and high concentration hydrogen gas treatment group (group H), 10 rats in each group. Rats in group S were exposed dura mater but not impacted. Rats in group T and group H were induced by fluid percussion to establish traumatic brain injury model. Rats in group H inhaled high concentration hydrogen (42% H₂-21% O₂-37% N₂) for 1 h per day continuously for 7 d from the first day of the operation. The pathological changes of brain tissue were observed within 48 h. The expressions of oxidative stress-related proteins MPO and HO-1 were detected by immunohistochemistry. Neuron status was determined by observing Nissl bodies by Nissl staining within 7 d. The expressions of apoptosis-related proteins bcl-2, bax and caspase-3 were detected by Western blot. **Results** Compared with group T, the neuronal damage in group H was alleviated ($P < 0.05$), the number of abnormal nerve cells was decreased ($P < 0.05$), and the expressions of the proapoptotic proteins bax, caspase-3 and oxidative stress related proteins MPO and HO-1 were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with group T, the expression of protein bcl-2 was significantly increased in group H ($P < 0.05$). **Conclusion** High concentration of hydrogen gas can alleviate traumatic brain injury in rats, and the mechanism may be related to the anti-apoptosis and anti-oxidative stress effects of hydrogen.

【Key words】 Hydrogen gas; Traumatic brain injury; Apoptosis; Oxidative stress

创伤性脑损伤是由于外伤、撞击等因素导致的颅脑外伤。与此同时,创伤性脑损伤也是所有国家各个年龄段致死致残的主要因素,且每年造成巨大的全球经济负担^[1]。在我国,脑外伤是导致城乡居民死亡的主要因素^[2]。目前,关于改善脑外伤预后

的研究正逐渐受到关注。脑创伤区周围氧化应激与凋亡反应可能与脑外伤预后较差具有相关性^[3]。氢气具有抗氧化以及抗凋亡的作用,且这种作用具有剂量相关性^[4-5]。已有研究报道低浓度氢气的神经保护作用,而关于高浓度氢气是否能发挥更好的神经保护作用尚未可知。为此,本研究将探索高浓度氢气对脑外伤预后的影响及其作用机制。

材料与方法

试剂与仪器 兔抗大鼠 bcl-2 多克隆抗体(ab59348),兔抗大鼠 bax 单克隆抗体(ab32503),兔抗大鼠 caspase-3 单克隆抗体(ab184787),兔抗大鼠 MPO 多克隆抗体(PAA601Ra01),兔抗大鼠 HO-1 多克隆抗体(AF5393),DAB 显色剂(SA2023)。AMS H-01 氢氧气雾化机(惠美医疗科技,上海),液压冲击装置(AmScien Instruments,美国),偏光显微镜(Olympus,日本)。

动物与分组 雄性健康成年 SPF 级 SD 大鼠 30 只,体重 220~240 g,由哈尔滨医科大学实验动物学部提供[许可证号:SCXK(黑)2013-001],禁食不禁饮。随机分为三组:假手术组(S 组)、脑创伤组(T 组)和氢气治疗组(H 组),每组 10 只。

模型制备 大鼠液压颅脑损伤模型(FPI)是模拟脑外伤的经典模型^[6]。大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 30 mg/kg,于头皮正中注射 2%利多卡因浸润麻醉。固定大鼠头部于大鼠神经立体定向仪(Narishige,SR-6N,日本),正中切开头皮,暴露头骨,于颅骨前囟门后 2 mm,矢状缝左侧 2.5 mm,用磨钻磨出直径为 4 mm 的骨孔,并确保硬脑膜完好无破损。将大鼠液压颅脑损伤仪与暴露的硬脑膜紧密的连接,以牙胶密封此连接处,成为一个密闭的腔隙。待牙胶干涸后,将大鼠液压颅脑损伤仪的摆锤固定于 17°,松开摆锤固定装置,使摆锤自然下落,瞬时将液体罐内的无菌盐水冲击式作用于大鼠硬脑膜,对大鼠造成中度脑创伤,此时电脑中反馈的冲击压力在 1.5~2.0 atm。

脑组织形态学观察 术后 48 h 每组各取 5 只大鼠,深麻醉下依次行生理盐水冲洗和 4%多聚甲醛灌注固定,断头取脑组织置于 4%多聚甲醛中 4℃固定 24 h,常规石蜡包埋,切片(3 μm),分别进行以下检测。

(1)HE 染色,取脑组织切片行脱蜡、染色、分化、复染、透明,低倍镜下(×40)取相同皮质形状的切片视为脑组织同一平面,于高倍镜下(×400)观察神经细胞损伤情况。

(2)尼氏染色,切片脱蜡后在 70%乙醇中 6 min 左右,37℃孵育,取出切片在蒸馏水中洗至无乙醇为止,置入 1%甲苯胺蓝染色 15 min,分色,镜下控制,脱水、透明、封片,低倍镜下(×40)取相同皮质形状的切片视为脑组织同一平面,于高倍镜下(×400)观察尼氏小体。

(3)免疫组化,石蜡切片与兔抗血红素加氧酶-1(HO-1)(1:100)抗体、兔抗髓过氧化物酶(MPO)(1:200)抗体孵育过夜。第 2 天孵育二抗后,室温下进行 DAB 反应,脱水、透明、封片,低倍镜下(×40)取相同皮质形状的切片视为脑组织同一平面,于高倍镜下(×400)观察染色情况。

Western blot 检测 术后 7 d 每组取剩余 5 只大鼠,取脑损伤周围区皮质裂解,4℃下 14 000 r/min 离心 20 min,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品用 10%的 SDS-PAGE 胶进行电泳分离、上样、电泳、转膜,分别以兔抗 β-actin(1:3 000 稀释液)、兔抗 bcl-2(1:1 000 稀释液)、兔抗 bax(1:2 500 稀释液)和兔抗 caspase-3(1:10 000 稀释液)的一抗 4℃孵育过夜,次日复温后用 TBS-T 洗膜 3 次,用相应二抗室温孵育 1 h,TBS-T 洗膜 3 次,加入化学发光剂后暗室曝光,得到条带。以 β-actin 为内参,用凝胶成像分析系统采集分析 bcl-2、bax、caspase-3 条带的积分光密度值,其与相应 β-actin 条带的积分光密度值之比作为蛋白相对含量。

改良神经功能评分(modified neurological severity score, mNSS) 术后第 1~7 天,每天评估大鼠 mNSS,内容包括提尾试验、置地活动试验、平衡木试验、反射及反常运动试验。记录各组大鼠四项评分总和,反映其神经功能损伤情况。

统计分析 采用 SPSS 21.0 统计学软件进行分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量数据方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

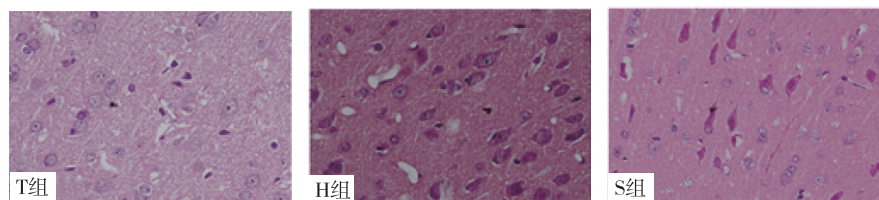
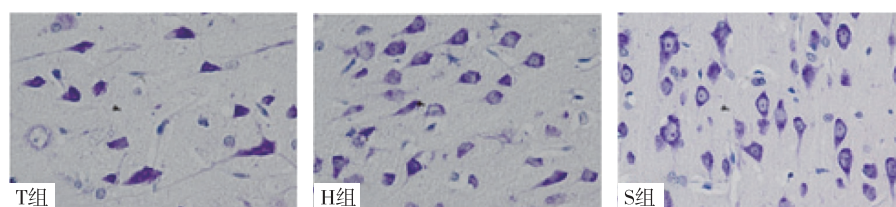
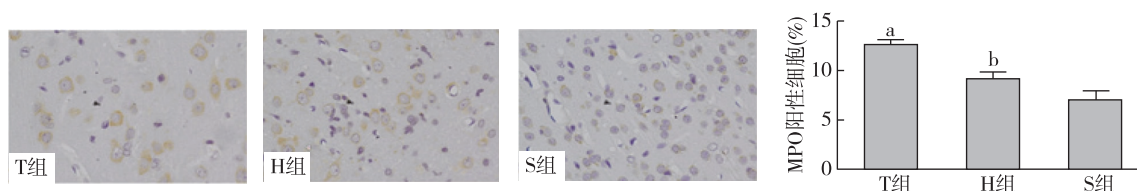
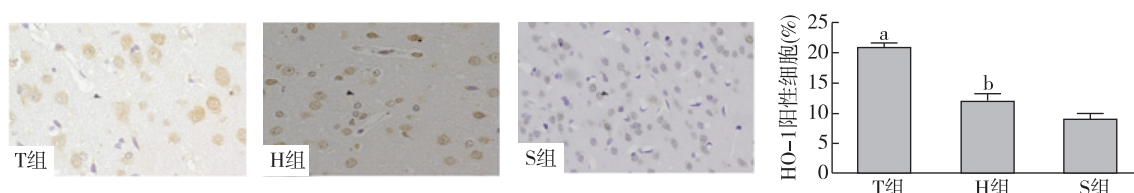
结 果

HE 染色 S 组细胞排列整齐密集,胞质丰富,胞核完整。T 组与 H 组细胞间隙增宽,细胞肿胀,神经元萎缩或肿胀形成核固缩。H 组较 T 组病理改变减轻(图 1)。

尼氏染色 光镜下脑组织尼氏染色后呈蓝紫色,S 组可见大而数量多的尼氏小体。T 组与 H 组尼氏小体数量减少甚至消失且形态异常。H 组较 T 组病理改变减轻(图 2)。

免疫组化 MPO 主要在细胞膜上表达,HO-1 主要在胞浆及胞膜表达。S 组 MPO 与 HO-1 含量明显低于 T 组($P < 0.05$);H 组 MPO 与 HO-1 含量明显低于 T 组($P < 0.05$)(图 3—4)。

蛋白含量 S 组脑皮质 bax 和 caspase-3 蛋白含量明显低于 T 组($P < 0.05$),bcl-2 蛋白含量明显高

图 1 三组大鼠脑组织病理改变 (HE 染色, $\times 400$)图 2 三组大鼠脑组织的病理改变 (尼氏染色, $\times 400$)注:与 S 组比较, ^a $P < 0.05$;与 T 组比较, ^b $P < 0.05$ 图 3 三组大鼠脑组织 MPO 免疫组化 ($\times 400$) 和含量的比较注:与 S 组比较, ^a $P < 0.05$;与 T 组比较, ^b $P < 0.05$ 图 4 三组大鼠脑组织 HO-1 免疫组化 ($\times 400$) 和含量的比较

于 T 组 ($P < 0.05$)。H 组脑皮质 bax 和 caspase-3 蛋白含量明显低于 T 组 ($P < 0.05$), bcl-2 蛋白含量明显高于 T 组 ($P < 0.05$) (图 5)。

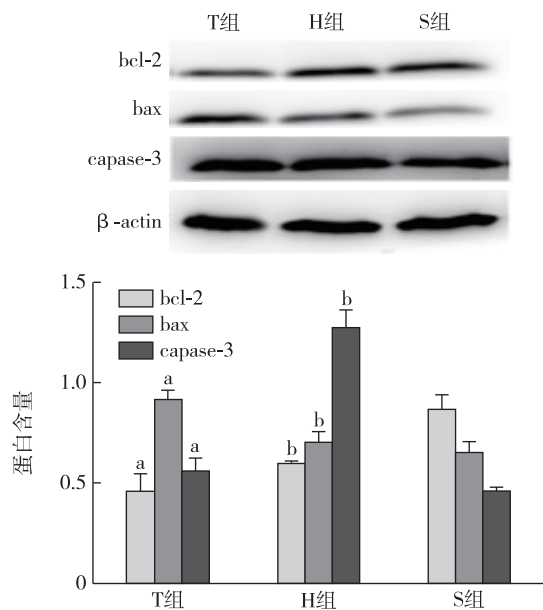
mNSS 评分 S 组神经功能未见异常, 评分基本一致。T 组神经功能明显异常, 但同时具有自愈趋势, 恢复速度较为缓慢。H 组神经功能在术后第 2~5 天内显著改善 ($P < 0.05$) (图 6)。

讨 论

脑外伤预后通常与创伤区周围的氧化应激与凋亡反应相关^[3], 氧化应激是颅脑创伤后期神经功能和可塑性破坏最主要的早期启动因素。活性氧

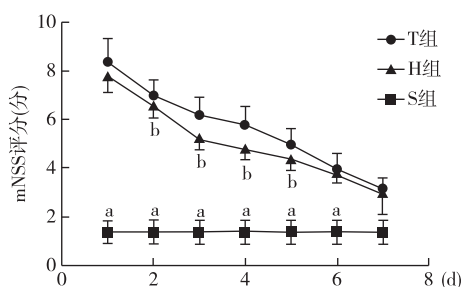
过度增加导致氧化应激, 可破坏脂类、蛋白质和核酸, 同时促进凋亡的发生。本研究结果显示, 高浓度氢气 (42%) 可明显改善脑创伤大鼠的短期预后, 其机制可能为高浓度氢气显著降低创伤区周围的氧化应激反应及细胞凋亡。

FPI 是模拟大鼠脑外伤的经典模型, 具有和临床相似的病理生理过程^[6]。根据创伤性压力数值的不同, 可将 FPI 分成 3 种程度的损伤, 分别是轻度、中度和重度。本实验采取的是中度损伤, 即压力范围控制在 1.5~2.0 atm, 大鼠在术后 7 d 恢复基本的神经功能, 包括运动、感觉、反射、平衡木等。根据前期研究发现, 创伤后 48 h 脑损伤程度最重。



注:与 S 组比较, $^a P < 0.05$; 与 T 组比较, $^b P < 0.05$

图 5 三组大鼠脑皮质蛋白含量的比较



注:与 T 组比较, $^a P < 0.05$, $^b P < 0.05$

图 6 三组大鼠术后不同时点 mNSS 评分的比较

HO-1、MPO 与 bcl-2、bax、caspase-3 分别在脑皮质创伤区周围的氧化应激反应^[8]及凋亡反应^[9-10]中发挥重要作用,HO-1、MPO、bax 与 caspase-3 下调以及 bcl-2 上调可能是改善大鼠脑外伤预后的一个重要分子机制^[11-13]。脑外伤后,由于红细胞大量破裂,自由基产生增多,创伤区周围水肿及大量细胞凋亡反应,触发机体自身抗氧化应激和抗凋亡反应。本研究结果表明,大鼠 FPI 后吸入 42% 氢气能够显著改善神经功能评分,上调抗氧化剂 MPO 和 HO-1 的表达,下调凋亡相关蛋白 bax 和 caspase-3 表达,并上调 bcl-2 表达,由此可见,大鼠持续 7 d 吸入 42% 氢气后,脑皮质创伤区周围的氧化应激及凋亡反应明显减轻,且明显改善大鼠脑创伤后的神经功能评分,其作用机制可能与氢气的抗氧化应激与抗凋亡反应有关。

近年来,许多研究表明氢气可以改善多种疾病预后^[14-15],但关于氢气治疗脑外伤的研究仍处于探索阶段,且内容多局限于低浓度 (<4%) 氢气和氦水。报道显示,氢气的神经保护作用可能具有剂量依赖性,高浓度氢气具有更好的抗氧化应激、抗凋亡和抗炎作用,且并未出现毒性作用^[5,7]。前期研究发现,低浓度氢气对脑外伤效果不明显,因此本次探索高浓度氢气对脑外伤预后的影响。本研究利用氢氧雾化机,以水为原料,采用水电分解法制备氢氧混合气。与以往报道的氢源相比,水电解法制备的氢源具有多方面的优势,它是从纯净的蒸馏水中提取的天然氢,而不是金属和酸的化学反应生成,所制备的气体浓度较高,且生产方便。在实验过程中,为保证高浓度氢气的安全性,大鼠在特定的防爆箱中吸入氢气,当气体逸出时,会很快被稀释到比爆炸极限浓度低得多的浓度,并通过特定的氢气浓度检测仪实时监测防爆箱周围的氢气浓度,确保整个实验过程的安全。

综上所述,吸入高浓度氢气能够改善 TBI 大鼠神经损伤,促进大鼠神经功能恢复,其相关机制可能与氢气抑制损伤区周围半暗带凋亡反应及氧化应激反应相关。

参考文献

- [1] Maas A, Menon DK, Adelson PD, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol*, 2017, 16(12): 987-1048.
- [2] Cheng P, Yin P, Ning P, et al. Trends in traumatic brain injury mortality in China, 2006-2013: a population-based longitudinal study. *PLoS Med*, 2017, 14(7): e1002332.
- [3] Yang C, Yang G, Xu S, et al. Glutamate carboxypeptidase II gene knockout attenuates oxidative stress and cortical apoptosis after traumatic brain injury. *BMC Neurosci*, 2016, 17(1): 15.
- [4] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med*, 2007, 13(6): 688-694.
- [5] Chen X, Cui J, Zhai X, et al. Inhalation of hydrogen of different concentrations ameliorates spinal cord injury in mice by protecting spinal cord neurons from apoptosis, oxidative injury and mitochondrial structure damages. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(1): 176-190.
- [6] Brizuela M, Blizzard CA, Chuckowree JA, et al. Mild traumatic brain injury leads to decreased inhibition and a differential response of calretinin positive interneurons in the injured cortex. *J Neurotrauma*, 2017, 34(17): 2504-2517.
- [7] Jin C, Xiao C, Xiao Z, et al. Inhalation of water electrolysis-derived hydrogen ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats-a possible new hydrogen resource for clinical use. *Neuro-*

- science, 2016, 335: 232-241.
- [8] Liu Y, Tang G, Li Y, et al. Metformin attenuates blood-brain barrier disruption in mice following middle cerebral artery occlusion. J Neuroinflammation, 2014, 11(1): 177.
- [9] Tamatani M, Ogawa S, Yong HC, et al. Involvement of Bcl-2 family and caspase-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis. J Neurochem, 2010, 71(4): 1588-1596.
- [10] 欧阳文, 左新华, 段开明, 等. 利多卡因对缺氧/复氧后肝细胞 Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达及细胞凋亡的影响. 临床麻醉学杂志, 2006, 22(9): 686-688.
- [11] Tehrani R, Rose ME, Vagni V, et al. Disruption of bax protein prevents neuronal cell death but produces cognitive impairment in mice following traumatic brain injury. J Neurotrauma, 2008, 25(7): 755-767.
- [12] Darakchiev BJ, Itkis M, Agajanova T, et al. Changes of MPO activity and brain water accumulation in traumatic brain injury experiments. Acta Neurochir Suppl, 1997, 70(70): 98-101.
- [13] Deng C, Cao J, Han J, et al. Liraglutide activates the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway and protects brain nerve cells against cerebral ischemia in diabetic rats. Comput Intell Neurosci, 2018, 2018: 3094504.
- [14] 石海梅, 周华成, 刘金锋, 等. 吸入氢气对休克复苏大鼠急性肺损伤的影响. 临床麻醉学杂志, 2014, 30(5): 490-493.
- [15] 任恒昌, 杜洪印, 喻文立, 等. 含饱和氢气肾保存液对大鼠肾脏冷缺血再灌注损伤的影响. 中华麻醉学杂志, 2012, 32(12): 1491-1494.

(收稿日期: 2018-11-07)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》可直接使用缩略语的词汇

美国麻醉医师学会 (ASA)	聚合酶链反应 (PCR)	美国纽约心脏病协会 (NYHA)
酶联免疫吸附试验 (ELISA)	N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA)	吸入氧浓度 (FiO ₂)
γ-氨基丁酸 (GABA)	血浆靶浓度 (C _p)	白细胞介素 (IL)
效应室靶浓度 (C _e)	肿瘤坏死因子 (TNF)	心率 (HR)
血红蛋白 (Hb)	血压 (BP)	血小板 (Plt)
收缩压 (SBP)	红细胞压积 (Hct)	舒张压 (DBP)
红细胞计数 (RBC)	心率与收缩压乘积 (RPP)	白细胞计数 (WBC)
平均动脉压 (MAP)	体重指数 (BMI)	中心静脉压 (CVP)
心肺转流 (CPB)	脉搏血氧饱和度 (SpO ₂)	靶控输注 (TCI)
潮气量 (V _T)	患者自控静脉镇痛 (PCIA)	呼吸频率 (RR)
患者自控硬膜外镇痛 (PCEA)	呼气末二氧化碳分压 (P _{ET} CO ₂)	患者自控镇痛 (PCA)
动脉血二氧化碳分压 (PaCO ₂)	呼气末正压 (PEEP)	动脉血氧分压 (PaO ₂)
间歇正压通气 (IPPV)	静脉血氧分压 (PvO ₂)	最低肺泡有效浓度 (MAC)
静脉血二氧化碳分压 (PvCO ₂)	脑电双频指数 (BIS)	视觉模拟评分法 (VAS)
听觉诱发电位指数 (AAI)	重症监护病房 (ICU)	麻醉后恢复室 (PACU)
四个成串刺激 (TOF)	天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)	心电图 (ECG)
丙氨酸氨基转移酶 (ALT)	警觉/镇静状态评定 (OAA/S)	核因子 (NF)
磁共振成像 (MRI)	羟乙基淀粉 (HES)	计算机断层扫描 (CT)
伊红染色 (HE)	术后认知功能障碍 (POCD)	急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)