

氢气对肺移植保护机制的研究进展



张梦菽, 周华成

哈尔滨医科大学第四附属医院(黑龙江哈尔滨 150001)

当前肺移植是治疗终末期肺疾病的最终方案,但其长期存活率和成功率都偏低。其中肺缺血再灌注损伤(lung ischemia reperfusion injury, LIRI)是影响预后的关键因素。氢气作为一种新型绿色能源和能量储存媒介,已广泛用于深海潜水和烧伤的治疗中。此外,氢气对心、脑、肾等器官的氧化应激损伤也具有保护作用:可通过抗炎症反应、抗氧化应激、抗凋亡、稳定线粒体、保护细胞等机制保护器官功能。氢气对肺移植相关损伤的研究仍处于初级阶段,本文就氢气对肺移植保护的可能机制进行综述。

1 肺移植中肺损伤的来源

肺移植相关肺损伤包括移植前损伤和移植后损伤。肺移植前,供体自身脏器功能的损害、供体脑死亡等肺外因素、机械通气等原因可导致肺损伤。取肺时,热缺血期对器官的损害最为严重,因为器官离体后虽无血供,但组织仍进行代谢,此时氧气和各种代谢底物供应严重缺乏,故器官缺血损害出现快且重。而冷缺血期时间较长、对血液和养分的需求多,同时低温灌注和长时间的冷保存都会导致钠泵失活、钙超载和铁离子释放,可引起细胞变性、炎症反应和氧化应激损伤^[1]。移植后损伤包括LIRI和急性排斥反应等。LIRI是肺移植损伤的重要原因,它是指造成组织损伤的主要因素不是缺血本身,而是恢复血供后,过量的自由基攻击重新获得血供的组织内的细胞。LIRI具有双向炎症反应,而在缺血再灌注后急性期,是由大量的中性粒细胞聚集引起活性氧(reactive oxygen species, ROS)释放,损伤肺实质。这是肺移植术后急性肺损伤的主要原因^[2]。移植后的免疫排斥反应也会造成严重的肺损伤,其中,急性排斥反应常发生在肺移植术后3 d内,它是由受者识别供者细胞表面的

组织相容性抗原引发的复杂免疫反应。慢性排斥反应则好发于术后3 d至1个月,它可导致移植失败,临床表现为闭塞性支气管炎,是制约患者长期生存率的主要原因^[3]。

2 氢气的理化性质

氢气是自然界中结构最简单、分子最小且大量存在的气体。本身无色透明、无臭无味、无毒、难溶于水,浓度在4%~75%时具有易燃性,在空气中浓度为0.000 06%。由于其分子量小,可在组织和细胞中迅速播散,快速高效到达作用部位发挥作用。常温下氢气的化学性质非常稳定,不易与其他物质发生反应。同时还具有还原性,选择性的降低ROS且不影响其他具有生理功能的ROS。

3 氢气应用于肺移植的进展

3.1 氢气应用于供体期

2011年Kawamura等^[4]发现供体采用2%氢气机械通气能够减轻肺功能不良、降低肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、细胞间黏附分子(intercellular cell adhesion molecule, ICAM)-1 mRNA的水平、增加血红素加氧酶-1(hemeoxygenase-1, HO-1)的表达。2015年Liu等^[1]应用3%氢气在冷缺血期间断通气2 h,发现氢气能够降低肺湿干重比(W/D)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、TNF- α 等炎症指标,在抗氧化方面增加超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、降低丙二醛(reactive oxide species, MDA)的含量,同时可抑制细胞凋亡。

3.2 氢气应用于受体期

2010年Kawamura等^[5]应用2%氢气作用于肺受体LIRI的研究,发现吸入氢气可以减轻肺泡水肿,减少ICAM-1、TNF- α 和IL-6等促炎因子生成,抑制巨噬细胞浸润,增加抗凋亡蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)并降低凋亡前体蛋白(Bcl-2-associated X-protein, Bax)的表达。2012年Noda等^[6]

受体大鼠服用饱和氢气水,发现饱和氢气水可以提高肺移植存活率,减轻内膜肥大细胞的增生。在免疫方面抑制 T 细胞的增生和 γ 干扰素、IL-2 的分泌。

4 氢气肺保护的具体机制

4.1 氢气抗炎症反应

炎症是具有血管系统的活体组织对损伤因子的防御性反应。在肺移植过程中,肺组织的缺血激活了细胞中炎性因子的释放,诱发了炎症级联反应。炎症反应可引起机体血管内皮损伤、白细胞增多、体液渗出等症状,抑制肺功能、影响肺移植预后。氢气能够直接减少 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、ICAM-1、8-OHdG 等炎症因子 mRNA 的表达,抑制 CCL2 等趋化因子 mRNA 的产生,减少白细胞的聚集^[7-8]。Zhai 等^[8]发现饱和氢气水处理组中用 CD11b 标记的中性粒细胞表达量明显低于对照组。MPO 作为中性粒细胞聚集的标志,在饱和氢气水组也显著低于对照组。

4.2 氢气抗氧化应激

氧化应激 (oxidative stress, OS) 是指机体在遭受各种有害刺激时,体内高活性分子如 ROS 等产生过多,氧化程度超出氧化物的清除程度,氧化和抗氧化系统失衡,从而导致组织损伤。氢气可以选择性的降低羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 和亚硝酸阴离子 (ONNO^-),使其生成水。降低由氧化损伤产生的自由基,维持其生理平衡。MDA 是脂质过氧化反应的氧化终产物、氧化损伤的重要指标。应用 3% 氢气通气能提高 SOD 水平,同时降低 MDA 水平^[1,9]。氢气还可以自由进入线粒体,减少来自线粒体的 ROS,进而抑制脂膜过氧化反应、DNA 的破坏、蛋白质的变性,恢复器官功能。

4.3 氢气抗细胞凋亡

凋亡是通过调控细胞内基因及其产物而发生的细胞程序性死亡。肺泡上皮细胞的凋亡是导致 LIRI 和肺功能障碍的重要因素。凋亡的激活主要是由于大量半胱氨酸天冬酶级联反应 (caspase cascade) 的发生。其中以 caspase-3 最显著且重要。Zhang 等^[10]发现,氢气能够通过外源性途径抑制细胞凋亡,显著抑制 caspase-3、caspase-8 蛋白的表达、降低 ROS 的产生。氢气还可通过调节线粒体,中断电子运输、调整氧化磷酸化、改变 ATP 的产量、释放触发 caspase 家族的活化蛋白、调整细胞氧化还原电位等机制影响凋亡的发生^[11]。

4.4 氢气抑制肺泡上皮细胞水肿

LIRI 可引起肺血管内皮通透性增加、细胞渗出

增多、肺间质水肿。肺泡是否能良好吸收肺泡内的液体是有无肺损伤的标志。氢气可以改善肺血管的通透性、减少组织水肿。Zhai 等^[8]发现,应用饱和氢气水处理后,急性肺损伤模型中肺内水容量以及肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中的蛋白浓度都明显下降。Kohama 等^[12]发现,氢气可以通过减少 ROS,减弱对肺泡上皮细胞的破坏和肺组织的水肿。

4.5 氢气对线粒体的影响

线粒体是真核生物进行氧化代谢的部位,是糖、脂肪和氨基酸最终氧化释放能量的场所。线粒体能合成 ATP 为细胞提供能量、参与细胞增殖与代谢调控、控制细胞程序性死亡,是细胞至关重要的细胞器之一。线粒体是调节氧化应激的重要通路, Liu 等^[13]发现,氢气能提高肝脏组织中 mSOD、mCAT、mGpx 的含量,降低 mMDA 的含量。即氢气能抑制线粒体的脂质过氧化反应。氢气还能通过保护线粒体抑制细胞凋亡^[14]。其机制首先为氢气可以稳定线粒体的膜通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP),降低线粒体膜的渗透性、维持线粒体膜的稳定性。其次,氢气能减少细胞色素 C 的释放,抑制下游 caspase 级联反应的发生。氢气可以通过增强线粒体的膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 提高细胞的生存状态。此外,氢气还可以增强线粒体的呼吸功能、提高 ATP 的含量。

4.6 氢气对内质网的影响

内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 承担运输细胞内物质的作用^[15],是细胞内举足轻重的细胞器。内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 表现为 ER 腔内错误折叠、未折叠蛋白聚集以及钙离子平衡紊乱。可激活未折叠蛋白反应、内质网超负荷反应和 caspase-12 介导的凋亡通路等信号途径。IRI 过程中引发的氧化应激、钙超载、炎症等均可诱发内质网应激,而过度 ERS 介导的细胞功能障碍及凋亡又会参与 IRI。Gao 等^[16]研究发现饱和氢气水能降低细胞葡萄糖调节蛋白 78 (78-kDa glucose regulated protein, GRP78)、caspase-12、Bax、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白质 (C/EBP-homologous protein antibody, CHOP) 蛋白表达,升高 Bcl-2 蛋白表达,从而抑制内质网应激,降低细胞凋亡,减轻 IRI。

4.7 信号通路

4.7.1 核转录因子 kappa B 核转录因子 kappa B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 信号传导通路是炎

症反应的一条重要调节通路。Kohama 等^[12]发现吸入 1.3% 氢气可通过抑制 NF- κ B 信号传导通路最终抑制炎症反应。Chian 等^[17]应用 SN50 抑制 NF- κ B 后,发现 IL-1 β 、TNF- α 的表达减低。Xie 等^[18]也在研究中指出,氢气抑制 NF- κ B 的机制包括:首先为氢气直接抑制 IkB- α 的磷酸化,其次是氢气可以减少氧自由基。NF- κ B 还可以促进凋亡前级联反应的发生。氢气能够增加 Bcl-2、降低 Bax 的表达、抑制细胞色素 C 的释放、抑制肺泡上皮细胞的氧化应激反应,即通过内源性通路抑制细胞凋亡。Huang 等^[19]添加 NF- κ B 抑制剂后,氢气的抗凋亡能力失效、抑制水肿的作用消失。即氢气可以通过介导 NF- κ B 诱导的 Bcl-2 通路实现抗凋亡,同时氢气减轻水肿的作用也可能与 NF- κ B 通路有关。

4.7.2 丝裂原活化蛋白激酶 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路中的 P38MAPK 和细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinases, ERK1/2) 是生物体内重要的信号转导分子,在细胞分化、凋亡及炎症等过程中至关重要。P38MAPK 的激活是炎症诱发肺损伤的触发器。Zhai 等^[8]发现饱和氢气水能抑制 P38MAPK 和 NF- κ B 的活化和磷酸化。Liu 等^[20]则证明了饱和氢气水能通过抑制 ERK1/2 通路减轻炎症级联反应的发生和器官功能的损伤。此外研究发现 P38 除了可作用于靶基因、炎症通路外还能作用于凋亡通路。饱和氢气水可以通过抑制 P38 通路而抑制凋亡^[10]。Liu 等^[21]指出,抑制 P38 通路可以增加 Bcl-2 和 BclxL 的表达,减轻内毒素引起的凋亡。

4.7.3 核因子 E-2-相关因子/HO-1 核因子 E-2-相关因子 2 (nuclear factor E2 related factor, Nrf2) 是调节氧化应激、控制 HO-1 基因表达的重要转录因子。Kawamura 等^[22]认为 HO-1 是一种抗炎、抗凋亡的限速酶,能够抑制 IRI 中血管内皮细胞激活和黏附因子上调,减弱血管通透性和细胞渗透力。HO-1 可以通过催化血红素转变成胆绿素进而降低受损伤细胞胆红素的释放,降低胆红素对器官造成的毒性反应。Diao 等^[23]发现氢气能够调节 Nrf2 诱导 HO-1 大量生成,进而对海水灌注导致的急性肺损伤起到保护作用。

4.7.4 ROS-JNK-Caspase-3 Qiu 等^[24]发现氢气能抑制内毒素引起的肺损伤产生大量的 ROS,抑制 JNK 的激活,下调促凋亡基因 Bax、caspase-3,上调抗凋亡基因 Bcl-xl 的表达,进而抑制由内毒素引起的细胞凋亡。

4.7.5 水通道蛋白-1 (aquaporin-1, AQP-1)、水

通道蛋白-5 (aquaporin-1, AQP-5) 在肺损伤模型中,氢气能通过激活 AQP-1 增加肺泡-动脉血氧分压差 (A-aDO₂)、增强肺泡上皮细胞的屏障功能、改善肺功能^[25]。此外, Tao 等^[26]认为,氢气能够通过上调 AQP-1 和 AQP-5 来转运肺泡、肺组织间隙、肺血管中的液体,缓解肺水肿。

4.7.6 Caspase-12 在内质网外膜 caspase-12 以无活性的酶原形式存在,ERS 的激活使 caspase-12 从内质网转移至胞质,剪切 caspase-9,激活 caspase-3,导致细胞凋亡。饱和氢气水能通过调节 CHOP 降低 GRP78 的表达,抑制由 ERS 特异介导的 caspase-12 通路,减少细胞的凋亡^[16]。

总之,由于氢气安全、高效能、分子小、低价、方便获取、不蓄积等特点,将来可作为一种药物应用于临床。然而目前研究均处于动物研究阶段,将此技术应用于人体肺移植仍需要一个长期过程。

参考文献

- Liu R, Fang X, Meng C, *et al.* Lung inflation with hydrogen during the cold ischemia phase decreases lung graft injury in rats. *Exp Biol Med* (Maywood), 2015, 240(9): 1214-1222.
- Zhao M, Fernandez LG, Doctor A, *et al.* Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 291(5): L1018-L1026.
- Nakagiri T, Warnecke G, Avsar M, *et al.* Lung function early after lung transplantation is correlated with the frequency of regulatory T cells. *Surg Today*, 2012, 42(3): 250-258.
- Kawamura T, Huang CS, Peng X, *et al.* The effect of donor treatment with hydrogen on lung allograft function in rats. *Surgery*, 2011, 150(2): 240-249.
- Kawamura T, Huang CS, Tochigi N, *et al.* Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of lung transplant-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplantation*, 2010, 90(12): 1344-1351.
- Noda K, Tanaka Y, Shigemura N, *et al.* Hydrogen-supplemented drinking water protects cardiac allografts from inflammation-associated deterioration. *Transpl Int*, 2012, 25(12): 1213-1222.
- Takahashi M, Chen-Yoshikawa TF, Saito M, *et al.* Immersion in hydrogen-rich saline attenuates lung ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2017, 51(3): 442-448.
- Zhai Y, Zhou X, Dai Q, *et al.* Hydrogen-rich saline ameliorates lung injury associated with cecal ligation and puncture-induced sepsis in rats. *Exp Mol Pathol*, 2015, 98(2): 268-276.
- Meng C, Ma L, Niu L, *et al.* Protection of donor lung inflation in the setting of cold ischemia against ischemia-reperfusion injury with carbon monoxide, hydrogen, or both in rats. *Life Sci*, 2016, 151: 199-206.
- Zhang Y, Liu Y, Zhang J. Saturated hydrogen saline attenuates endotoxin-induced lung dysfunction. *J Surg Res*, 2015, 198(1): 41-49.
- Chen X, Liu Q, Wang D, *et al.* Protective effects of hydrogen-rich

- saline on rats with smoke inhalation injury. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 106836.
- 12 Kohama K, Yamashita H, Aoyama-Ishikawa M, *et al*. Hydrogen inhalation protects against acute lung injury induced by hemorrhagic shock and resuscitation. *Surgery*, 2015, 158(2): 399-407.
- 13 Liu Q, Li BS, Song YJ, *et al*. Hydrogen-rich saline protects against mitochondrial dysfunction and apoptosis in mice with obstructive jaundice. *Mol Med Rep*, 2016, 13(4): 3588-3596.
- 14 Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell*, 2011, 21(1): 92-101.
- 15 Bai X, Liu S, Yuan L, *et al*. Hydrogen-rich saline mediates neuroprotection through the regulation of endoplasmic reticulum stress and autophagy under hypoxia-ischemia neonatal brain injury in mice. *Brain Res*, 2016, 1646: 410-417.
- 16 Gao Y, Gui Q, Jin L, *et al*. Hydrogen-rich saline attenuates hippocampus endoplasmic reticulum stress after cardiac arrest in rats. *Neurosci Lett*, 2017, 640: 29-36.
- 17 Chian CF, Chiang CH, Chuang CH, *et al*. SN50, a cell-permeable inhibitor of nuclear factor-kappaB, attenuates ventilator-induced lung injury in an isolated and perfused rat lung model. *Shock*, 2016, 46(2): 194-201.
- 18 Xie K, Yu Y, Huang Y, *et al*. Molecular hydrogen ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through reducing inflammation and apoptosis. *Shock*, 2012, 37(5): 548-555.
- 19 Huang CS, Kawamura T, Peng X, *et al*. Hydrogen inhalation reduced epithelial apoptosis in ventilator-induced lung injury via a mechanism involving nuclear factor-kappa B activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 408(2): 253-258.
- 20 Liu Q, Shen WF, Sun HY, *et al*. Hydrogen-rich saline protects against liver injury in rats with obstructive jaundice. *Liver Int*, 2010, 30(7): 958-968.
- 21 Liu H, Chen X, Han Y, *et al*. Rho kinase inhibition by fasudil suppresses lipopolysaccharide-induced apoptosis of rat pulmonary microvascular endothelial cells via JNK and p38 MAPK pathway. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(3): 267-275.
- 22 Kawamura T, Wakabayashi N, Shigemura N, *et al*. Hydrogen gas reduces hyperoxic lung injury via the Nrf2 pathway in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 304(10): L646-L656.
- 23 Diao M, Zhang S, Wu L, *et al*. Hydrogen gas inhalation attenuates seawater instillation-induced acute lung injury via the Nrf2 pathway in rabbits. *Inflammation*, 2016, 39(6): 2029-2039.
- 24 Qiu X, Li H, Tang H, *et al*. Hydrogen inhalation ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(12): 2130-2137.
- 25 Liu LD, Wu XY, Tao BD, *et al*. Protective effect and mechanism of hydrogen treatment on lung epithelial barrier dysfunction in rats with sepsis. *Genet Mol Res*, 2016, 15(1): DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15016050>
- 26 Tao B, Liu L, Wang N, *et al*. Effects of hydrogen-rich saline on aquaporin 1, 5 in septic rat lungs. *J Surg Res*, 2016, 202(2): 291-298.

收稿日期: 2017-06-08

本文编辑: 梁宗国

· 消 息 ·

《中国呼吸与危重监护杂志》征订启事

《中国呼吸与危重监护杂志》是由中华人民共和国教育部主管,中国医师协会、四川大学华西医学中心及华西医院主办的专业性学术期刊,也是国内呼吸与危重医学相结合的第一本国家级刊物。2002年正式出版,向国内外公开发行。刊号: CN 51-1631/R, ISSN 1671-6205。

本刊的办刊宗旨是:尊重学术自由,提倡学术争鸣,鼓励学术创新,促进学术交流。本刊及时报道国内外呼吸与危重医学领域领先的科研成果和临床诊疗经验,以及对临床有指导作用,且与临床紧密结合的基础理论研究。每期分别设有慢性阻塞性肺疾病,支气管哮喘与气道炎症,急性肺损伤与急性呼吸窘迫综合征,机械通气,睡眠与呼吸,感染性疾病,肿瘤,危重监护等栏目。

本刊入编《中文核心期刊要目总览》(2014年版),为中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊和中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),已被美国《化学文摘》(CA)、美国《剑桥科学文摘》(ProQuest CSA)、WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)及《中国学术期刊文摘》(CSAC)等国内外多家检索机构收录。

本刊欢迎呼吸与危重医学及相关专业的各级医护人员和科研工作者投稿、订阅。通信地址:四川省成都市武侯区国学巷37号四川大学华西医院《中国呼吸与危重监护杂志》编辑部,邮政编码:610041;电话(传真):028-85422382;Email: editor1@cjrcm.com。网址: <http://www.cjrcm.com>。本刊为双月刊,大16开本,100页。邮发代号62-246,每期定价25.00元,全年150.00元。