

富氢林格液减轻严重烧伤大鼠延迟复苏引起的肠损伤

金以超^{1,2}, 邱啸臣¹, 孙瑜¹, 罗鹏飞¹, 李武全^{1,2}, 付晋凤², 夏照帆^{1*}

1. 第二军医大学长海医院烧伤科, 上海 200433

2. 昆明医学院第二附属医院烧伤科, 云南省烧伤研究所, 昆明 650101

[摘要] **目的** 观察富氢林格液(富氢液)对延迟复苏严重烧伤大鼠肠组织的保护作用。**方法** 制备富氢液, 采用随机数字表法将 36 只 SD 大鼠随机分为 3 组(每组 12 只), 即假烫组、烫伤+普通林格液组和烫伤+富氢液组, 在后两组大鼠背部造成占体表面积(TBSA) 30% 的Ⅲ度烫伤, 并于烫伤后 7 h、9 h、17 h, 分别经腹腔补给相当于总补液体积 1/2、1/4、1/4 的普通林格液或富氢液, 假烫组不补液。24 h 后取小肠组织做 H-E 染色, 观察病理变化, 并检测肠组织中丙二醛(MDA)含量和髓过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)活性, 以及促炎细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 的含量。**结果** 相对于普通林格液组, 富氢液组小肠黏膜损伤减轻, 肠组织 MDA 含量($P < 0.05$)及 MPO 和 SOD 活性均降低($P < 0.01$); 促炎细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 含量在富氢液组均显著低于普通林格液组($P < 0.01$)。**结论** 富氢液对烧伤延迟复苏后肠组织具有保护作用, 可能主要从两方面体现: 一是降低大面积烧伤及延迟复苏所带来的氧化损伤; 二是抑制延迟复苏大鼠肠组织促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 的生成。

[关键词] 烧伤; 小肠; 延迟复苏; 氢; 炎症因子; 脂质过氧化作用

[中图分类号] R 644 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)02-0170-05

Protective effect of hydrogen-lactated Ringer's solution against extensive burn-induced intestine injury in rats after delayed fluid resuscitation

JIN Yi-chao^{1,2}, QIU Xiao-chen¹, SUN Yu¹, LUO Peng-fei¹, LI Wu-quan^{1,2}, FU Jin-feng², XIA Zhao-fan^{1*}

1. Department of Burns, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Burns, Burn Institute of Yunnan Province, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650101, Yunnan, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of hydrogen-rich lactated Ringer's solution (HRS) against intestine injury induced by extensive burn in Sprague-Dewley (SD) rat model after delayed fluid resuscitation. **Methods** Thirty-six male SD rats were randomly divided into three groups ($n=12$): sham-burn group(S group), burn plus normal lactated Ringer's solution(NRS) group (BR group) and burn plus hydrogen-rich lactated Ringer's solution(HRS) group (BH group). Rats in the S group were immersed into 37°C water without fluid replacement; those in BR group and BH group were subjected to 30% total body surface area (TBSA) III degree full-thickness scald. At first, a total of 2 ml · (1% TBSA)⁻¹ · kg⁻¹ of HRS or NRS were replaced at 7 h post-burn and half volume of the total solution was replaced at the 9 h and 17 h. All rats were sacrificed at 24 h. Small intestine tissues were removed for H-E staining and determination of MDA content, MPO and SOD activity; and the levels of the IL-1 β and TNF- α were determined by ELISA. **Results** The intestinal injury was relieved in BH group compared with BR group. The intestinal MDA content ($P < 0.05$) and activities of MPO and SOD ($P < 0.01$) were all decreased in BH group. IL-1 β and TNF- α levels in BH group were significantly lower than those in the BR group ($P < 0.01$). **Conclusion** HRS can attenuate intestine injury induced by extensive burn after delayed fluid resuscitation. It can decrease the oxidative injury following extensive burn and delay fluid resuscitation, and it can also suppress the generation of proinflammatory cytokine IL-1 β and TNF- α .

[Key words] burns; small intestine; delayed resuscitation; hydrogen; inflammatory factors; lipid peroxidation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(2):170-174]

烧伤是致死和致伤的重要原因。全世界每年有 300 000 人死于与烧伤有关的损伤^[1]。在美国, 每年

[收稿日期] 2011-08-16

[接受日期] 2011-12-22

[作者简介] 金以超, 博士, 讲师. E-mail: shuke2004@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873471, E-mail: xiazaofan@hotmail.com

大约有200万烧烫伤患者,其中有2万名患者烧伤总面积在25%以上,约有6500名患者因烧伤致死^[2-3]。严重烧伤后肠道是常见的受累和损伤较重的内脏器官,近年的研究表明它是烧伤后引起高代谢、失控性炎症反应、多器官功能障碍综合征的始动器官之一^[4],故肠道被称为创伤、休克后MODS发生的“启动器官”^[5]。以往的研究表明烧伤后肠道损伤主要有两方面的原因:一是严重缺血缺氧造成肠黏膜的直接损伤。因肠黏膜血管具有发夹状结构、逆流交换机制及代谢活跃等因素,成为休克后缺血最早、损伤最严重的部位。延迟复苏时的氧化应激状态及氧自由基损伤是严重烧伤、创伤和休克共同的病理生理基础,也是烧伤早期诱发肠道屏障损伤的主要因素^[6]。二是伤后肠道细菌移位、炎症介质释放、细胞因子级联放大效应等造成的继发性损伤。其最终结果是肠黏膜上皮细胞稳态被破坏,即生长与丢失的动态平衡被打破,细胞丢失、萎缩,黏膜屏障受损,功能障碍,如未得到纠正,则进入恶性循环^[7]。

最近,Ohsawa等^[8]在体内和体外试验中发现氢气作为一种有效的抗氧化剂以气体弥散的方式进入组织和细胞,并可以有选择地消除组织和细胞内毒性最强自由基中的 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{ONOO}^-$,以减轻氧化性损伤,从而有效地保护细胞。还有研究表明氢气能够降低器官移植缺血再灌注所引起的炎症损伤^[9-10],以及具有抗凋亡作用^[11]。Fang等^[12]在关于氢气治疗严重烧伤大鼠肺损伤的实验中发现腹腔给烫伤大鼠富氢水可以通过减轻肺脏的氧化应激和炎症反应从而提高肺功能。目前氢气正以各种形式如口服或注射富氢水、呼吸氢气的方式作为一种抗氧化和抗炎气体越来越多的用于各种与氧化应激有关的疾病模型^[13-14]。

本研究设计了用富含氢气的林格液(富氢液)替代普通的林格液进行大鼠烧伤延迟复苏的实验研究,通过检测氧化应激指标和促炎细胞因子的水平观察富氢液在严重烧伤后延迟复苏引起肠损伤中的保护作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验动物准备 雄性SD大鼠36只,体质量

为220~240g,由第二军医大学实验动物中心提供。实验前将大鼠适应性饲养7d,光照条件:白天/黑夜12h/12h循环,自由进食。所有实验操作均得到第二军医大学动物伦理委员会同意。

1.1.2 富氢液制作 参见Cai等^[15]的报道,运用自制的装置把氢气在0.4MPa的高压下溶解于林格液中以达到饱和,富氢液(氢浓度0.6mmol/L)在正常气压下储存于4℃冰箱。为保证后续动物实验氢气浓度,在实验前1d准备富氢水并经 γ 射线消毒备用。

1.1.3 试剂盒与仪器 戊巴比妥钠(美国Sigma),大鼠超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品,IL-1 β 和TNF- α ELISA试剂盒(美国Genmed),BCA蛋白测定试剂盒(美国Thermo),ELX800型全自动酶标仪(美国Bio-Tek公司),超速离心机(美国Thermo)。

1.2 实验分组及处理 大鼠随机分为假烫组(S组)、烫伤+普通林格液延迟复苏组(BR组)和烫伤+富氢林格液延迟复苏组(BH组),每组12只。S组动物用37℃水浴模拟烫伤过程,不进行液体复苏;BR组和BH组动物用100℃水浴12s,在背部和双侧腹部造成占体表面积(TBSA)30%的Ⅲ度烫伤(病理证实)。采用Parkland公式($4\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\%$ TBSA⁻¹)计算24h的补液量。BR组和BH组动物于伤后7、9、17h分别经腹腔补给24h补液量1/2、1/4、1/4的普通林格液或富氢林格液进行复苏^[6]。

1.3 标本采集及检测

1.3.1 观察过程中大鼠总体情况及H-E染色 处死大鼠后立即取出小肠约1cm,4℃生理盐水冲洗肠管内容物后置于4%多聚甲醛液中固定24h,乙醇梯度脱水,石蜡包埋,切片,常规做H-E染色,显微镜下观察拍片。

1.3.2 肠组织MDA含量和MPO、SOD活性的检测 距胃幽门部5cm取小肠5cm,4℃生理盐水清洗小肠并冲洗肠管内容物,滤纸吸干水分后立即置液氮内,并在液氮冷冻状态下研磨成粉。取一定量组织按MDA、MPO和SOD试剂盒的说明进行检测。MDA水平通过与硫代巴比妥酸反应显色的方法进行检测,酶标仪535nm读板,MDA含量用pmol/mg表示。MPO与H₂O₂反应生成复合物,再

与供氢体生成黄色化合物,通过在 460 nm 处读板测定化合物的量来计算 MPO 活性, MPO 活性用 U/g 表示。SOD 活性通过氮蓝四唑还原法即通过黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶系统还原亚硝酸盐。SOD 活性通过 IC₅₀ 来反映, IC₅₀ 即 50% 抑制率所需的样品 SOD (μg/ml)。

1.3.3 肠组织促炎性细胞因子检测 取 200 mg 肠组织溶于 1 ml 组织裂解液, 12 000 × g, 4℃ 离心 15 min, 取上清用高敏感的酶联免疫吸附法检测 IL-1β、TNF-α 含量, 酶标仪 450 nm 读取光密度 (D) 值, 根据样品标准曲线计算 IL-1β、TNF-α 含量。用 BCA 法测样本蛋白浓度以标准化每 mg 蛋白 IL-1β、TNF-α 的含量。

1.4 统计学处理 所得数据采用 SPSS 16.0 统计

软件包处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间参数采用 *t* 检验, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 大体情况 3 组大鼠实验过程中无一例死亡, 均进入分析结果。S 组状态良好, 活动自如。BH 组和 BR 组烫伤后静卧不动, 背部弓起, 抓握时大鼠无尿或少尿, 补液后活动增多, 尿液多清亮。

2.2 伤后 24 h 大鼠小肠病理学改变 S 组大鼠小肠绒毛排列规则, 紧密, 绒毛无充血、水肿 (图 1A)。BR 组大鼠小肠腺体萎缩, 绒毛内有充血, 肠绒毛上皮变性、坏死、脱落 (图 1B)。BH 组大鼠小肠绒毛有水肿, 排列规则, 上皮有少许坏死、脱落 (图 1C)。

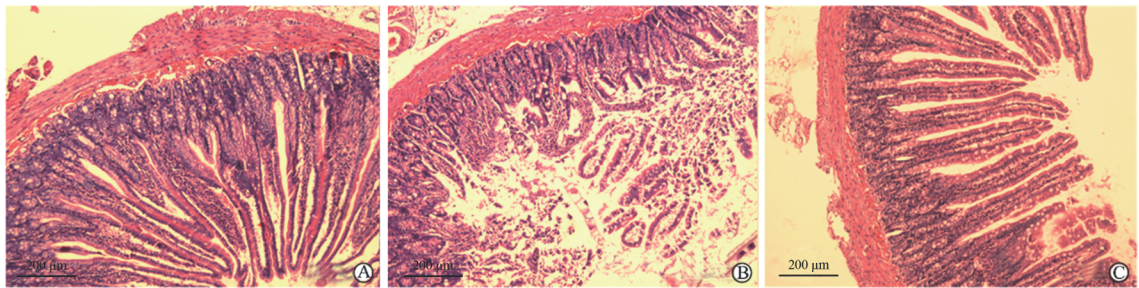


图 1 3 组大鼠肠组织病理学改变 (H-E 染色)

Fig 1 Histopathology changes of small intestine in the three groups (H-E staining)

Rat intestinal villi in group S were arranged regularly and closely without congestion and edema (A). Rat intestinal glands were shrunk in group BR accompanied by intestinal villus epithelial degeneration, necrosis and drop, and congestion inside the villus (B). Rats intestinal villi in group BH presented edema, inerratic arrangement, with epithelial necrosis and drop (C). Original magnification: ×100

2.3 伤后 24 h 各组大鼠肠组织 MDA 含量和 MPO、SOD 活性 烫伤后 24 h BH 组肠组织 MDA 含量明显低于 BR 组 ($P < 0.05$)。相对于林格液复苏, 富氢液同样显著地降低了肠组织 MPO 和 SOD 活性 ($P < 0.01$, 表 1)。

2.4 伤后 24 h 各组大鼠肠组织 IL-1β、TNF-α 含量 BR 组和 BH 组肠 IL-1β、TNF-α 的含量均高于 S 组 ($P < 0.01$), BH 组肠组织 IL-1β、TNF-α 的含量较 BR 组有所降低 ($P < 0.01$, 图 2)。

表 1 3 组大鼠肠组织 MDA、MPO 和 SOD 变化

Tab 1 Changes of MDA, MPO and SOD in intestine of three groups

$n = 12, \bar{x} \pm s$

Group	MDA (pmol · mg ⁻¹)	MPO $\bar{x}_B / (U \cdot g^{-1})$	SOD $c_B / (\mu g \cdot ml^{-1})$
S	434.0 ± 157.3	0.87 ± 0.47	1.45 ± 0.577
BR	932.1 ± 198.3**	2.66 ± 1.04**	6.47 ± 0.631**
BH	681.8 ± 204.1*△	1.45 ± 0.42**△△	3.59 ± 0.727**△△

S: Sham-burn; BR: Burn plus normal lactated Ringer's solution treatment; BH: Burn plus hydrogen-rich lactated Ringer's solution treatment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs S group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs BR group

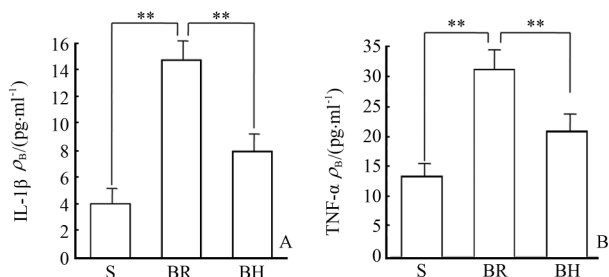


图2 3组大鼠肠组织内 IL-1β(A)和 TNF-α(B)的变化

Fig 2 Change of IL-1β(A) and TNF-α(B)

levels in intestine of three groups

** $P < 0.01$; $n = 12$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

本研究证实了腹腔注射富氢液延迟复苏烫伤大鼠,可以有效减轻肠组织的氧化应激损伤,并且抑制肠组织内促炎因子 IL-1β 和 TNF-α 的升高,肠组织病理学显示富氢液可保护肠黏膜。

氢气是大自然广泛存在的一种小分子气体,一直被认为是像氮气一样的惰性气体,但最近发现氢气在医学上有重要价值,氢分子进入体内能够自由穿过细胞壁进入细胞内清除体内过量产生的毒性最强的氧自由基·OH 和·ONOO⁻,并且具有抗氧化和抑制促炎因子产生的作用^[8]。

在正常生理情况下,氧自由基以较低水平存在于生物细胞组织中,其含量取决于自由基产生的速率以及各种抗氧化物和酶清除自由基速率之间的平衡^[16]。当烧伤时,机体在应激和组织损伤过程中产生大量自由基对机体本身带来伤害,而当延迟复苏时氧分子重新进入缺血肠组织,在一定的病理生理条件下又再次产生大量氧自由基^[17],肠的再氧化所产生的氧自由基可以进一步引发肠的微血管损伤,黏膜细胞坏死和凋亡的复杂过程,其严重程度依赖于缺血的时间和程度^[18]。MDA 是氧化损伤和脂质过氧化反应的良好指标,可反映烧伤的程度和范围。许多研究表明在烧伤和再灌注损伤中 MDA 水平在各种器官和组织中均有升高^[19-20]。在本研究中,我们观察到:烧伤后富氢液组大鼠肠组织的 MDA 水平显著低于普通林格液组,说明富氢液能减轻烧伤延迟复苏造成的细胞膜脂质过氧化反应和氧化应激损伤。

小肠缺血再灌注产生的大量氧自由基具有趋化和活化中性粒细胞的能力^[21]。活化的中性粒细胞浸润肠黏膜和黏膜下层,从而造成了肠通透性的显

著升高^[22],使肠黏膜屏障丧失和肠内细菌产物的移位,这些都参与了细胞因子的产生和炎症反应。MPO 是已知的由中性粒细胞产生的氧化酶,产生次氯酸破坏附近的组织,其占中性粒细胞干重的 5%,通常被用于评估白细胞浸润的程度^[23],也常作为肠损伤的指标。在本研究中,我们发现烧伤后富氢液组大鼠肠组织的 MPO 活性显著低于普通林格液组,此结果说明富氢液可使减少肠组织的炎细胞浸润减轻炎症反应。本实验中用富氢液替代普通林格液进行烧伤延迟复苏,观察到 SOD 的 IC₅₀(即 50% 抑制率所需的样品 SOD)值降低,说明 SOD 活性增高。SOD 等酶体系即为机体内存在着的抗氧化系统之一,能特异地清除体内的氧自由基,使机体免受氧自由基的损害。SOD(IC₅₀)的高低可反映体内清除自由基的能力,在实验中常作为清除自由基能力的主要指标^[24]。

本研究还观察到:虽然富氢液组和普通林格液组肠组织 IL-1β 和 TNF-α 水平均显著高于假烫组,但富氢液组肠组织 IL-1β 和 TNF-α 的升高幅度显著低于普通林格液组,提示给富氢液对促炎性细胞因子的释放有抑制作用。正常循环中促炎因子和抗炎因子处于平衡状态,大面积烧伤后,体内产生大量氧自由基,从而激活巨噬细胞和中性粒细胞,二者产生 IL-1β 和 TNF-α^[2, 25-26],IL-1β 是一种内源性的致热源,对诱导急性期反应起重要作用;TNF-α 是炎症反应的重要启动因子之一,也是介导系统性炎症反应放大效应的细胞因子^[27]。

总的来说,富氢液对烧伤延迟复苏后肠组织的保护作用主要从两方面来体现:一是降低大面积烧伤及延迟复苏所带来的氧化损伤;二是抑制延迟复苏大鼠肠组织中所产生的促炎因子 IL-1β 和 TNF-α,从而减轻肠损伤。鉴于富氢液有效、方便、成本低的特点,富氢液可能成为用于烧伤延迟复苏的一种良好的复苏液体。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Torpy M J, Lynn C, Glass M R. Burn injuries[J]. JAMA, 2009, 302:1828.
- [2] Singh V, Devgan L, Bhat S, Milner S M. The pathogenesis of burn wound conversion[J]. Ann Plast Surg, 2007, 59:109-115.
- [3] Ji Q, Jia H, Dai H, Li W, Zhang L. Protective effects of pentoxi-

- fylline on the brain following remote burn injury[J]. *Burns*, 2010, 36:1300-1308.
- [4] Wilmore D W, Smith R J, O'Dwyer S T, Jacobs D O, Ziegler T R, Wang X D. The gut; a central organ after surgery stress[J]. *Surgery*, 1988, 104:917-923.
- [5] Zhang C, Sheng Z Y, Hu S, Gao J C, Li J Y, Liu Y. The role of oxygen-free radical in the apoptosis of enterocytes in scalded rats after delayed resuscitation[J]. *J Trauma*, 2004, 56: 611-617.
- [6] Xia Z F, He F, Borrow R E, Broemeling L D, Herndon D N. Reperfusion injury in burned rats after delayed fluid resuscitation[J]. *J Burn Care Rehabil*, 1991, 12: 430-436.
- [7] Grossmann J, Walther K, Artinger M, Rümmele P, Woelckhaus M, Schölmerich J. Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells [J]. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97:1421-1428.
- [8] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13:688-694.
- [9] Kawamura T, Huang C S, Tochigi N, Lee S, Shigemura N, Billiar T R, et al. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of lung transplant-induced ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Transplantation*, 2010, 90:1344-1351.
- [10] Mao Y F, Zheng X F, Cai J M, You X M, Deng X M, Zhang J H, et al. Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381:602-605.
- [11] Huang C S, Kawamura T, Peng X, Tochigi N, Shigemura N, Billiar T R, et al. Hydrogen inhalation reduced epithelial apoptosis in ventilator-induced lung injury *via* a mechanism involving nuclear factor-kappa B activation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 408:253-258.
- [12] Fang Y, Fu X J, Gu C, Xu P, Wang Y, Yu W R, et al. Hydrogen-rich saline protects against acute lung injury induced by extensive burn in rat model [J]. *J Burn Care Res*, 2011, 32: e82-e91.
- [13] Chen C, Chen Q, Mao Y, Xu S, Xia C, Shi X, et al. Hydrogen-rich saline protects against spinal cord injury in rats[J]. *Neurochem Res*, 2010, 35:1111-1118.
- [14] Zheng X F, Sun X J, Xia Z F. Hydrogen resuscitation, a new cytoprotective approach [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2011, 38:155-163.
- [15] Cai J, Kang Z, Liu K, Liu W, Li R, Zhang J H, et al. Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model [J]. *Brain Res*, 2009, 1256:129-137.
- [16] Sies H. Strategies of antioxidant defense[J]. *Eur J Biochem*, 1993, 215:213-219.
- [17] Bertin-Maghit M, Goudable J, Dalmas E, Steghens J P, Bouchard C, Gueugniaud P Y, et al. Time course of oxidative stress after major burns[J]. *Intensive Care Med*, 2000, 26:800-803.
- [18] Stojadinovic A, Smallridge R, Nath J, Ding X, Shea-Donohue T. Anti-inflammatory effects of U74389F in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion injury [J]. *Crit Care Med*, 1999, 27: 764-770.
- [19] Horton J W. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy [J]. *Toxicology*, 2003, 189:75-88.
- [20] Makay O, Yukselen V, Vardar E, Yenisey C, Bicakci T, Ersin S, et al. Role of allopurinol on oxidative stress in caustic burn: cure for stricture[J]. *Pediatr Surg Int*, 2007, 23:1105-1112.
- [21] Azuara D, Sola A, Hotter G, Calatayud L, de Oca J. Apoptosis inhibition plays a greater role than necrosis inhibition in decreasing bacterial translocation in experimental intestinal transplantation[J]. *Surgery*, 2005, 137:85-91.
- [22] Khanna A, Rossman J E, Fung H L, Caty M G. Intestinal and hemodynamic impairment following mesenteric ischemia/reperfusion[J]. *J Surg Res*, 2001, 99:114-119.
- [23] Sener G, Kabasakal L, Cetinel S, Contuk G, Gedik N, Yegen B C. Leukotriene receptor blocker montelukast protects against burn-induced oxidative injury of the skin and remote organs [J]. *Burns*, 2005, 31:587-596.
- [24] Ocal K, Avlan D, Cinel I, Unlu A, Ozturk C, Yaylak F, et al. The effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in intestine and bacterial translocation after thermal injury [J]. *Burns*, 2004, 30:778-784.
- [25] Wright K, Nwariaku F, Halaihel N, Schulman C, Yin H L, Turnage R H. Burn-activated neutrophils and tumor necrosis factor-alpha alter endothelial cell actin cytoskeleton and enhance monolayer permeability [J]. *Surgery*, 2000, 128:259-265.
- [26] van der Poll T, van Deventer S J. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 1999, 13:413-426.
- [27] Chang K C, Ma H, Liao W C, Lee C K, Lin C Y, Chen C C. The optimal time for early burn wound excision to reduce pro-inflammatory cytokine production in a murine burn injury model [J]. *Burns*, 2010, 36:1059-1066.

[本文编辑] 魏学丽, 邓晓群