

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.11.011

NaHS 抑制创伤出血性休克导致的大鼠心肌组织的凋亡

李 燕¹ 高 操² 郑 利³ 司马欣元¹ 武 阳^{1△}

(1 北京军区总医院体检中心 北京 100008; 2 第四军医大学唐都医院麻醉科 陕西 西安 710032;

3 解放军艺术学院门诊部 北京 100081)

摘要 目的:创伤导致的失血性休克是临床上常见的导致死亡的原因之一,传统的快速扩容措施会导致缺血-再灌注损伤,诱发炎症反应和组织细胞的凋亡坏死;新型气体信号分子硫化氢(H_2S)具有抗炎、促进心血管增生等多种生理保护功能,在此实验中我们探索了新型气体信号分子硫化氢(H_2S)对出血性休克大鼠心肌的保护作用。**方法:**复制雄性SD大鼠出血性休克模型:复制大鼠腹中正切口造成创伤模型,然后经右侧股动脉插管放血,造成失血性休克,右侧股静脉建立液体通道准备复苏,给药组大鼠经腹腔给予NaHS($28 \mu\text{mol/kg}$),经左侧股动脉插管至左心室监测大鼠血流动力学的影响;取大鼠复苏后2 h 静脉血,测量血清肌酸激酶(CK)及乳酸脱氢酶(LDH)水平,比较各组心肌酶改变。以蛋白印记法观察大鼠心肌组织凋亡相关因子Bcl-2、Bax、与Caspase-8的表达变化。**结果:**外源性 H_2S 对创伤性休克大鼠的血流动力学指标有不同程度的改善,保护了创伤休克导致的心肌细胞的损伤,并上调了大鼠心肌组织中抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,下调了促凋亡蛋白Bax及Caspase-8的表达。**结论:**外源性硫化氢可能通过抑制凋亡途径来保护创伤性休克导致大鼠的心肌组织的损伤,从而起到保护作用。

关键词:硫化氢;创伤出血性休克;心肌;凋亡;Bcl-2; Bax; Caspase-8

中图分类号:Q95-3, R363.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)11-2047-05

Exogenous H_2S Protects Cardiac Tissue Through Inhibiting Apoptosis in a Traumatic-hemorrhagic Shock Rat Model

LI Yan¹, GAO Cao², ZHENG Li³, SIMA Xin-yuan¹, WU Yang^{1△}

(1 Physical examination centre, Beijing military general hospital, Beijing, 100008, China;

2 Anaesthesiology department, Tangdu hospital, the Forth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi province, 710032, China;

3 Department of outpatient, People's Liberation Army Academy of Arts, Beijing, 100081, China)

ABSTRACT Objective: Trauma induced hemorrhagic shock is a common death reason clinically. Traditional rapid fluid infusion method will result in ischemia-reperfusion injury, inflammation response, and apoptosis even necrosis in cells or tissues. The new gaseous signaling molecule H_2S possesses kinds of physiological protective functions such as anti-inflammation and pro-angiogenesis. In the present study, we explored the protective effects of H_2S on a mimetic traumatic-hemorrhagic shock rat model. **Methods:** Duplicate male SD rats traumatic-hemorrhagic shock models, hemodynamic data was recorded by inserting a PE-50 catheter to left femoral artery of the rats which were treated with NaHS ($28 \mu\text{mol/kg}$) in advance. Two hours after injection NaHS, the rats' vein blood was obtained. Serum CK and LDH levels were analyzed and Bcl-2, Bax and Caspase-8 in rat cardiac tissue were detected by Western-blot assays. **Results:** Exogenous H_2S improved rats' hemodynamic function, protected rats' cardiac tissue from traumatic-hemorrhagic shock, up-regulated expression of Bcl-2 and down-regulated expression of the pro-apoptosis factors Bax and Caspase-8 in rats' cardiac tissue. **Conclusion:** Exogenous H_2S may exert cardio-protective effects through inhibiting apoptosis pathway.

Key words: Traumatic-hemorrhagic shock; Hydrogen Sulfide; Apoptosis; Bcl-2; Bax; Caspase-8

Chinese Library Classification: Q95-3, R363.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)11-2047-05

前言

创伤出血性休克是目前临床上创伤病人死亡的主要原因之一,并且以青壮年为主,占有死亡人数的10%^[1]。创伤出血性休克通常是机体在遭受严重创伤后所引起的急性循环功能不全,常常表现为微循环系统的障碍,并继而导致的多种组织器官缺血、缺氧和功能损害的一种综合征。在创伤失血性休克

进展过程中,炎症、凋亡是多器官缺血缺氧的结果,并反过来加重了组织缺血缺氧,因此,如何及时有效的改善机体缺血-再灌注损伤,抑制炎症及凋亡等病理反应是影响疾病转归的关键所在。继NO和CO被发现之后, H_2S 是最近被发现的一种新的气体信号分子,后来多项研究发现它具有保护心血管系统、抑制炎症因子表达、抗氧化应急等多种病理生理学的作用,并且具有诱导生物体产生类似于冬眠的效应,因而可以降低机体的代谢活动,减少氧代谢而提高氧供,进而发挥细胞保护的作用^[2-3]。正常生理状态下, H_2S 以18.5%的 H_2S 与81.5%的NaHS的形式维持动态平衡,在发挥其生理功能的同时维持了内环境pH值的恒定^[4]。外源性硫化氢的供体NaHS可以在体内快速分

作者简介:李燕(1982-),女,护师,主要研究方向:心血管疾病与急救护理,E-mail: anglexu0_0@yahoo.com.cn

△通讯作者:武阳,电话:010-66721277, E-mail: a60861@hotmail.com

(收稿日期:2013-11-12 接受日期:2013-12-12)

解,释放出 H_2S ,产生多种保护作用,多项研究发现 NaHS 具有抗炎、抗氧化应激及促血管生成的作用^[5,6]。我们之前的研究发现腹腔给予外源性硫化氢可以减轻创伤失血性休克导致的大鼠继发性肺损伤^[7],并抑制休克导致的炎症因子的过量表达^[8]。本实验将深入探讨外源性硫化氢供体 NaHS 对创伤失血性休克大鼠心脏的保护作用,通过复制创伤失血性休克大鼠模型,通过观察 NaHS 对创伤失血性休克大鼠的血流动力学改善,对心肌酶谱的影响,以及对凋亡相关蛋白表达的调节作用,进一步探讨其心脏保护作用的机制,进而为临床救治创伤失血性休克提供基础实验资料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

Bcl-2 单克隆抗体(江苏碧云天生物技术有限公司)、鼠抗 Bax 单克隆抗体(江苏碧云天生物技术有限公司)、兔抗 Caspase-8 单克隆抗体(cell signaling 公司,波士顿,美国)、HRP 标记羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)、HRP 标记羊抗小鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)、酶标仪、PowerLab 生物信号采集处理系统等常规实验室仪器以及 NaHS 等药品见之前实验^[7,9]。

1.2 动物实验与分组

1.2.1 实验动物及分组 将 200 g-250 g 大小的 40 只雄性 SD 大鼠(购自第四军医大学动物实验中心)随机分为四组:假手术组(SHAM, n=10)、创伤出血性休克模型组(THS, n=10)、生理盐水组(NS, n=10)、NaHS 处理组(NaHS 组, n=10)。

1.2.2 THS 动物模型的复制及处理 参照我们之前的实验方法复制创伤出血性休克模型^[9],简述如下:手术造成大鼠创伤出血,监测其动脉血压,维持血压 35-40 mmHg 水平 1.5 小时,林格斯液复苏大鼠,其中假手术组(SHAM 组)大鼠给予创伤出血性休克动物模型制备操作,但无任何手术操作,并不予复苏,在与创伤组大鼠的相同时间点(复苏前),不给予药物及生理盐水。模型组(THS 组)大鼠接受创伤出血性休克动物模型制备所有手术,但在相同的复苏时间点不给予药物及生理盐水。生理盐水组(NS 组)大鼠接受创伤出血性休克动物模型制备所有手术,且在复苏前 20 分钟给予生理盐水 0.5 mL。治疗组(NaHS 组)大鼠给与创伤出血性休克动物模型制备所有操作,在复苏

前 20 min 给予 NaHS 28 μ mol/kg(生理盐水稀释至 0.5 ml)。复苏后 2 h 将大鼠杀死取静脉血,留取大鼠心尖的心肌组织浸泡于 0.4%甲醛中,固定 72 h,准备下一步实验。

1.3 检测指标

1.3.1 血流动力学监测 持续监测平均动脉压 MAP(mmHg)、心率 HR(次/分),分别记录各组在休克前、休克 90 min、复苏后 30 min、45 min、60 min 和复苏 60 min 的指标。

1.3.2 心肌酶学检测 抽取大鼠复苏后 2 h 静脉血,采用商品化的检测试剂盒测量血清肌酸激酶(CK)及乳酸脱氢酶(LDH)水平,比较各组心肌酶改变。

1.3.3 心肌组织切片 HE 染色 将固定好的心肌组织制作常规石蜡切片,进行常规的 HE 染色,光镜下由病理学专家观察各组大鼠复苏后心肌组织病理学改变(双盲法)。

1.3.4 Western blot 检测心肌组织凋亡相关的蛋白 提取各组大鼠心肌组织蛋白,Western blot 检测 Bcl-2、Bax 与 Caspase-8 的表达变化(稀释浓度:Bcl-2 为 1:500;Bax 为 1:400;Caspase-8 为 1:800)。

1.4 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm SD$)表示,采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析。行单因素方差分析(ANOVA),组内及组间两两比较采用 LSD-T 检验。对不满足正态和方差齐性条件的,组内及组间采用 Dunnett's C 检验。以 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 NaHS 改善了创伤出血性休克导致的大鼠血流动力学变化

2.1.1 NaHS 对创伤出血性休克大鼠 MAP 的作用 休克前,四组大鼠的平均动脉压(MAP)比较无明显统计学差异($P > 0.05$)。休克 90 min,创伤失血性休克、生理盐水、NaHS 三组大鼠的 MAP 明显低于假手术组($P < 0.01$),没有观察到三组间存在明显统计学差异($P > 0.05$),据此判断休克模型建立成功。复苏后 15 min,创伤失血性休克、生理盐水、NaHS 三组大鼠的 MAP 均有所回升。创伤失血性休克、生理盐水组大鼠的 MAP 在复苏初期出现一过性的升高,继而下降;而 NaHS 组大鼠的 MAP 在复苏后 15 min 即达峰值,并一直维持,并且明显高于创伤失血性休克组及生理盐水组大鼠($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠 MAP 变化(n=10)

Table 1 MAP changes of each groups of rats (n=10, $\bar{X} \pm SD$)

Group 分组	Before shock 休克前	Shock 90 休克 90 分钟	Recovery 15 复苏 15 分钟	Recovery 30 复苏 30 分钟	Recovery 45 min 复苏 45 分钟	Recovery 60 min 复苏 60 分钟
SHAM 假手术组	113.5 $\pm$ 4.4	112.2 $\pm$ 4.6	111.6 $\pm$ 6.4	113.7 $\pm$ 4.7	111.7 $\pm$ 3.2	114.9 $\pm$ 5.2
THS 创伤休克组	114.7 $\pm$ 3.1	39.5 $\pm$ 2.1*	87.7 $\pm$ 3.3*	83.6 $\pm$ 1.4*	76.9 $\pm$ 2.3*	76.8 $\pm$ 1.3*
NS 生理盐水组	117.4 $\pm$ 2.8	38.9 $\pm$ 1.7*	89.8 $\pm$ 2.9*	82.9 $\pm$ 1.8*	81.5 $\pm$ 1.7*	80.4 $\pm$ 1.8*
NaHS 治疗组	116.7 $\pm$ 3.5	37.8 $\pm$ 1.6*	97.7 $\pm$ 4.5**	95 $\pm$ 1.7**	96.6 $\pm$ 1.4**	94.3 $\pm$ 1.6**

注:数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示, n=10, * $P < 0.05$, 与假手术组比较; # $P < 0.05$, 与创伤休克组及生理盐水组比较。

Note: Data are expressed as $\bar{X} \pm SD$, n=10, * $P < 0.05$, compared with SHAM group; # $P < 0.05$, compared with THS or NS group.

2.1.2 NaHS 对创伤出血性休克大鼠 HR 的影响 休克前四组大鼠的心率(HR)比较无明显统计学差异,休克 90 min,创伤失血性休克、生理盐水、NaHS 三组 HR 均较假手术组明显降低(* $P < 0.05$),此表现与休克中后期病理生理学过程相符。复苏

后 15 min,创伤失血性休克、生理盐水、NaHS 三组 HR 上升,且明显高于假手术组(* $P < 0.05$);但自复苏后 45 min 时间点开始,THS、NS 及 NaHS 治疗组三组大鼠 HR 有轻微下降,但组间比较无明显统计学差异($P > 0.05$)。

表 2 NaHS 对 HR 变化影响($n=10$)

Table 2 HR changes of each group of rats ($n=10$, $\bar{X} \pm SD$)

Group	Before shock	Shock 90	Recovery 15	Recovery 30	Recovery 45	Recovery 60
分组	休克前	休克 90 分钟	复苏 15 分钟	复苏 30 分钟	复苏 45 分钟	复苏 60 分钟
SHAM 假手术组	404.7 $\pm$ 22.6	398.5 $\pm$ 18.8	393.2 $\pm$ 19.4	397.6 $\pm$ 21.3	395.8 $\pm$ 22.5	388.9 $\pm$ 22.6
THS 创伤休克组	418.3 $\pm$ 12.2	327.7 $\pm$ 19.3*	423.5 $\pm$ 13.7*	424.1 $\pm$ 11.2*	401.5 $\pm$ 21.3	400.6 $\pm$ 21.2
NS 生理盐水组	420.6 $\pm$ 14.3	326.7 $\pm$ 22.6*	424.7 $\pm$ 15.7*	421.2 $\pm$ 11.5*	395.7 $\pm$ 21.3	395.5 $\pm$ 20.7
NaHS 治疗组	404.5 $\pm$ 23.2	328.4 $\pm$ 21.5*	415.3 $\pm$ 23.1*	410.7 $\pm$ 21.2*	401.9 $\pm$ 24.6	391.2 $\pm$ 18.4

注:数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示, $n=10$,* $P < 0.05$,与假手术组比较。

Note: Data are expressed as $\bar{X} \pm SD$, $n=10$, * $P < 0.05$, compared with SHAM group.

2.2 NaHS 减少了创伤失血性休克引起的大鼠心肌酶谱的表达

复苏后 2 小时, THS、NS 及 NaHS 三组血清 CK 浓度明显高于假手术组(# $P < 0.05$,图 1),给予 NaHS 组 CK 浓度明显低于休克及生理盐水二组(* $P < 0.05$)(图 1A)。同样地,在复苏后 2

小时,THS、NS 及 NaHS 三组血清的 LDH 浓度亦明显高于假手术组(# $P < 0.05$),给予 NaHS 组的 LDH 浓度也明显低于休克和生理盐水两组。(* $P < 0.05$)。(图 1B)。

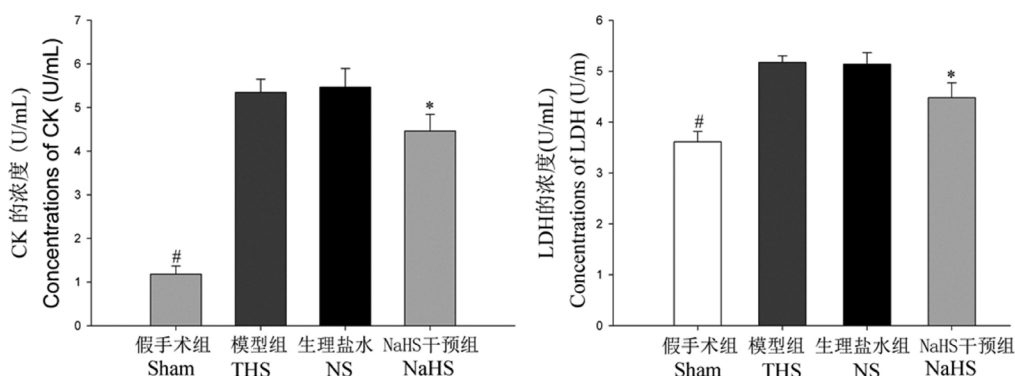


图 1 NaHS 对各组大鼠心肌酶 CK 和 LDH 的影响

Fig. 1 NaHS effects on CK and LDH of rat serum ($n=10$)

注:数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示, $n=10$,# $P < 0.05$,与模型组、生理盐水组及 NaHS 干预组比较; * $P < 0.05$,与创伤休克组及生理盐水组比较。

Note: Data are expressed as $\bar{X} \pm SD$, $n=10$, # $P < 0.05$, compared with THS, NS, and NaHS groups; * $P < 0.05$, compared with THS and NS groups.

2.3 NaHS 对创伤失血性休克大鼠心肌形态学的影响

HE 染色显示假手术组大鼠心肌细胞排列紧密整齐,组织染色均匀(图 2A);创伤失血性休克与生理盐水两组大鼠的心肌细胞表现:排列出现紊乱、淡染、细胞间隙增宽、局部水肿,但无明显的炎症细胞浸润(图 2B、C);NaHS 干预组的心肌细胞排列较休克组与生理盐水两组整齐,组织染色较均匀,水肿程度较轻(图 2D)。

2.4 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、caspase-8 蛋白表达($n=5$)

经过创伤出血性休克之后,创伤失血性休克组、生理盐水组两组大鼠的 Bcl-2 蛋白与假手术组相比显著降低(# $P < 0.05$),

NaHS 干预后增加了 Bcl-2 蛋白的表达(* $P < 0.05$;见图 3A、B);同时创伤出血性休克之后休克组、生理盐水组两组大鼠的 Bax 与 Caspase-8 蛋白表达较假手术组明显增加(* $P < 0.05$),而 NaHS 干预使得二者的表达均被明显降低(# $P < 0.05$;分别见图 3A、C 和图 3A、D)。

3 讨论

创伤出血性休克是临床上常见的严重危及病人生命的情况,常常被认为是预后差的一个指标^[10]。其病理生理学机制极为复杂,因创伤失血而导致有效循环血量不足,在毛细血管形成大量的微血栓而诱发微循环障碍,继而由于组织缺血缺氧、

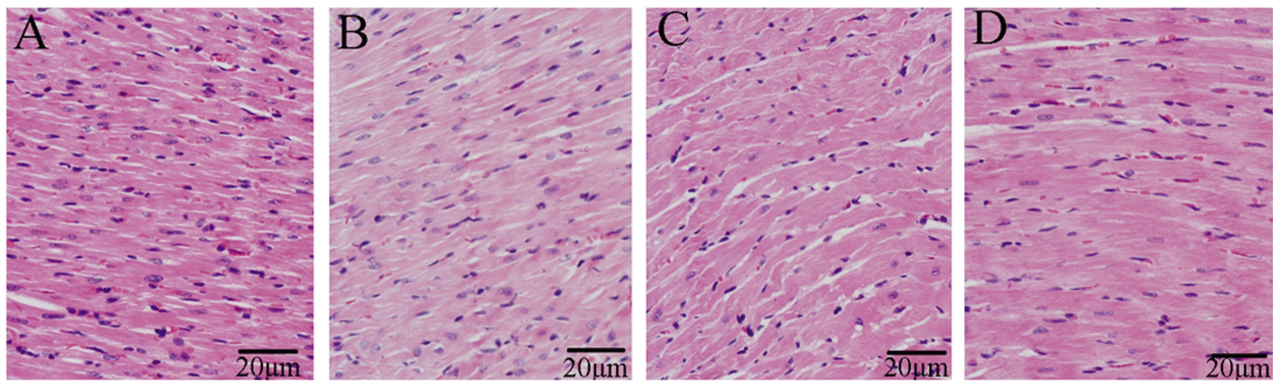


图2 NaHS 减轻了创伤失血性休克导致的大鼠心肌组织的损伤

Fig. 2 NaHS attenuated rat cardiac tissue injury induced by TTHS (HE staining, original amplification $\times$ 40)

注:A:假手术组;B:创伤性休克组;C:生理盐水组;D:NaHS 治疗组。图中标尺为 20 μ m。

Note: A:Sham group; B:TTHS group; C:NS group; D:NaHS group; the bar in the pictures represents 20 μ m.

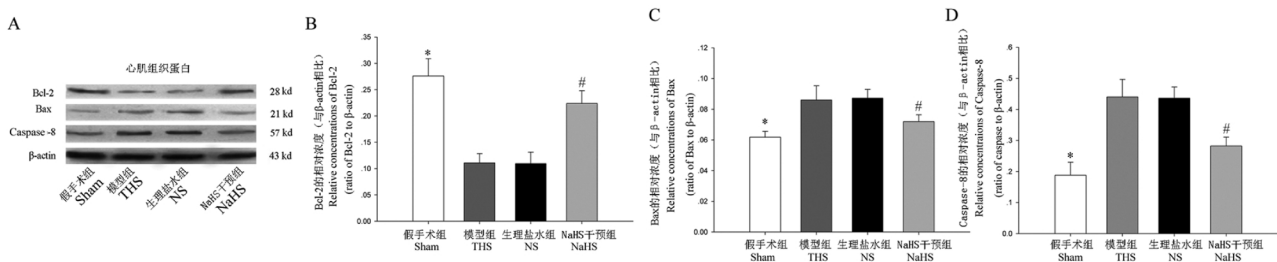


图3 NaHS 抑制了创伤出血性休克导致的大鼠心肌凋亡相关蛋白表达

Fig. 3 NaHS inhibited expression of apoptotic proteins resulted by TTHS in rat cardiac tissue

注:数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示, $n=5$, $*P<0.05$,与模型组、生理盐水组及 NaHS 干预组比较; $\#P<0.05$,与创伤性休克组及生理盐水组比较。

Note: Data are expressed as $\bar{X} \pm SD$, $n=10$, $*P<0.05$, compared with TTHS, NS, and NaHS groups; $\#P<0.05$, compared with TTHS and NS groups;

炎症物质大量释放、氧化应激导致细胞呼吸链的破坏等等因素而使得心脏等重要脏器发生细胞凋亡甚至坏死,进而诱发多器官功能失调(MODS)^[11,12]。虽然早期、快速、足量扩容是目前临床上救治创伤出血性休克的一个非常必要的手段,但由于快速的扩容等措施又会造成重要器官的缺血-再灌注损伤(IRI),由于组织缺血缺氧,活性氧大量生成,氧化-抗氧化系统的失衡,机体氧化应激反应被启动;再灌注过程中由于组织重新获得氧供应,中性粒细胞耗氧量显著增加,释放氧自由基和组织因子,由此,氧化应激反应与炎症反应形成正反馈回路,继而使得组织器官的氧耗增加,加剧“氧供-氧耗”的失衡,其结果是进一步导致细胞凋亡及组织的坏死^[13,14]。目前很多研究者在液体复苏治疗创伤失血性休克方面做了大量工作,国内的一个研究组发现一种改良的复苏液可以有效减少创伤导致的大鼠组织水肿及器官损伤^[15];Subeq 等发现低温慢速限量液体复苏可以减少创伤失血性休克导致的器官损伤^[16];但是目前关于凋亡在创伤失血性休克中的作用研究尚少。如何在使用传统方法救治创伤失血性休克的同时打破氧化应激-炎症反应的正反馈回路,抑制炎症反应,减少细胞损伤和细胞凋亡成为目前研究救治创伤出血性休克所面临的重要的科学问题。

H₂S 曾经长期以空气污染源而闻名于世。近年来 H₂S 越来越引人注目,如今已经被公认为是继 NO 与 CO 之后的第三种气体信号分子。近来的大量研究证实了 H₂S 参与了机体的多种生理病理过程,具有代谢抑制作用,可减少机体氧耗,调节“氧

供-氧耗”的平衡,且有诱导机体进入一种“类冬眠状态”^[17,18]。H₂S 对心血管系统的保护作用日益惹人注目,研究表明:H₂S 可以在多种疾病的动物模型中起到增强心功能、抗氧化应激、抑制炎症细胞聚集及促进毛细血管生成的作用^[5,6,19]。有的研究也显示了 H₂S 在心肌缺血-再灌注动物模型中发挥了抗凋亡的作用,其抗凋亡作用涉及调控多种凋亡相关基因与蛋白的表达,可能是通过抑制促凋亡蛋白 Bax 与 Caspase 家族的表达,升高抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达有关^[6,20,21]。因此,我们假设 H₂S 的抗凋亡效应可能在创伤失血性休克过程中起到了重要作用,在本研究中,我们观察了 H₂S 对心肌组织在休克过程中的凋亡相关蛋白表达的影响。

我们的研究表明:外源性 H₂S 的供体 NaHS 干预创伤出血性大鼠模型后,改善了创伤失血导致的大鼠血流动力学的变化,逆转了平均动脉压的降低;明显降低了 CK 和 LDH(心肌损伤指标),因此,NaHS 能够减轻创伤出血性休克导致的心肌损伤;HE 染色可见:NaHS 干预后,创伤出血性休克导致的心肌排列紊乱、心肌间隙增宽和水肿等表现被明显减轻。另外,NaHS 干预增加了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,抑制了凋亡蛋白 Bax 与 Caspase-8 的表达。因此,我们的实验结果表明 NaHS 可能在创伤出血性休克大鼠模型中起到了一定的抗凋亡作用。有研究表明在炎症信号通路与凋亡信号通路之间存在交叉联系:Fas/FasL 同时介导炎症与凋亡,在肺损伤中起到促进作用^[22]。尽管我们的研究显示了 NaHS 的抗炎抗凋亡的作用,然而,NaHS

的抗凋亡作用与其抗炎抗氧化应激之间的关系,以及三者各自在保护创伤失血性休克过程中的贡献比例依然需要进一步探讨。

作为凋亡通路中的重要因子,Bcl-2 家族成员在细胞凋亡过程中扮演了促凋亡和抗凋亡两个截然不同的角色,因此可以将 Bcl-2 家族分为两类:其中一类是以 Bax 为代表的促细胞凋亡因子;另一类则是以 Bcl-2 为代表的抗细胞凋亡因子。促细胞凋亡因子与抗细胞凋亡因子相互对抗,促凋亡/抗凋亡细胞因子在体内的水平(同样以 Bax/Bcl-2 水平为代表)的变化会表现为促凋亡或抗凋亡效应^[23]。在创伤失血、氧化应激、炎症等外源性因素的刺激下,Bax 蛋白被活化,从胞液迁移到线粒体,它一方面与线粒体膜上的 Bcl-2 蛋白结合而形成 Bax-Bcl-2 异二聚体,抑制 Bcl-2 的抗凋亡作用;另一方面,游离状态的 Bax 能够直接在线粒体膜上形成 Bax-Bax 同二聚体,增加线粒体膜的渗透性,并形成 Bax 通道,促使细胞色素 C 由线粒体释放到细胞浆,并使 Bcl-2 与 Apaf-1 分离,导致凋亡蛋白酶 Caspase 级联反应激活,最后通过 Caspase-3 等执行凋亡过程^[24]。我们的实验结果显示:Bcl-2 在创伤失血性休克大鼠心肌组织中的表达明显低于假手术组,经给予 NaHS 后,Bcl-2 的表达明显增加,同时 Bax 的表达也被 NaHS 所明显抑制。

Caspase-8 在 Fas/FasL 凋亡通路中发挥了重要的启动作用,在凋亡通路被激活后,Fas 相关的死亡结构域(FADD)募集 Caspase-8 的前体,经由死亡诱导的信号复合体(DISC)活化为有活性的 Caspase-8,Caspase-8 具有 FADD 样的死亡效应结构域(DED),能够通过 DED 结构域与 FADD 结合,所以 caspase-8 可以在凋亡过程中间接与细胞膜受体发生联系,从而将信号从细胞膜传导至细胞浆,引起凋亡信号的逐级活化。我们的研究显示 NaHS 处理减少了 Caspase-8 蛋白在大鼠心肌组织中的表达,这可能是 NaHS 抑制凋亡的一个重要途径。当然,Caspase 家族还有很多分子,它们之间的联系与 NaHS 的抗凋亡作用机制仍需进一步研究。

综上所述,外源性 H₂S 供体 NaHS 可以明显改善创伤出血性休克大鼠的平均动脉压、保护心肌组织;同时增加了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,减少了促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-8 的表达;本实验的结果显示抑制凋亡途径可能是 NaHS 保护创伤出血性休克的一个重要机制。因为硫化氢的心血管保护作用,目前已经有许多 H₂S 的外源性供体被开发出来,例如 H₂S 的缓释供体 GYY4137^[25],还有多种复合性的 H₂S 供体如双氯芬酸衍生物等^[26,27]。研究者们希望复合性的 H₂S 供体药物能够在治疗创伤、感染甚至抗肿瘤方面发挥多重作用,但迄今为止 H₂S 类药物距离临床应用还有一段距离。在下一步工作中我们将进一步探讨 NaHS 在创伤失血性休克中的抗氧化应激的作用,进一步揭示其抗炎、抗凋亡与抗氧化应激之间的联系。我们的研究进一步揭示了 H₂S 的保护作用机制,可能为将来的 H₂S 供体的药物开发及临床治疗创伤出血性休克提供基础的参考资料,然而未来还有很多工作需要进一步完善,我们将在未来工作中深入探讨其作用机制。

参考文献(References)

- [1] Angele MK, Schneider CP, Chaudry IH. Bench-to-bedside review: latest results in hemorrhagic shock [J]. Crit Care, 2008, 12(4):218
- [2] Calvert JW, Coetzee WA, Lefer DJ. Novel insights into hydrogen sulfide--mediated cytoprotection [J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 12(10):1203-1217
- [3] Lowicka E, Beltowski J. Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists [J]. Pharmacol Rep, 2007, 59(1):4-24
- [4] Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 237(3):527-531
- [5] Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P, et al. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats [J]. J Appl Physiol, 2007, 102(1):261-268
- [6] Wang MJ, Cai WJ, Li N, et al. The hydrogen sulfide donor NaHS promotes angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia [J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 12(9):1065-1077
- [7] 王艳,姚立农,蒋玮,等. 外源性硫化氢对创伤失血性休克继发性肺损伤的保护作用[J]. 实用医学杂志, 2010, (8):1318-1320
Wang Yan, Yao Li-nong, Jiang Wei, et al. Protective effects of exogenous H₂S on secondary lung injury induced by traumatic-hemorrhagic shock [J]. The Journal of Practical Medicine, 2010, (8):1318-1320
- [8] 林家燕,丁倩,姚立农等. 外源性硫化氢对创伤失血性休克大鼠血浆炎症因子的影响[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(3):413-416
Lin Jia-yan, Ding Qian, Yao Li-nong, et al. Effects of Exogenous Hydrogen Sulfide on Inflammatory Cytokines in Plasma of Rats with Hemorrhagic Traumatic Shock [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(3):413-416
- [9] Gao C, Xu DQ, Gao CJ, et al. An exogenous hydrogen sulphide donor, NaHS, inhibits the nuclear factor kappaB inhibitor kinase/nuclear factor kappaB inhibitor/nuclear factor-kappaB signaling pathway and exerts cardioprotective effects in a rat hemorrhagic shock model [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(7):1029-1034
- [10] Cutress R. Fluid resuscitation in traumatic haemorrhage [J]. J Accid Emerg Med, 1995, 12(3):165-172
- [11] Gutierrez G, Reines HD, Wulf-Gutierrez ME. Clinical review: hemorrhagic shock [J]. Crit Care, 2004, 8(5):373-381
- [12] Villela NR, Tsai AG, Cabrales P, et al. Improved Resuscitation From Hemorrhagic Shock With Ringer's Lactate With Increased Viscosity in the Hamster Window Chamber Model [J]. J Trauma, 2011, 71(2):418-424
- [13] Ribeiro MJ, Epstein MG, Alves L.D.. Volume replacement in trauma [J]. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, 2009, 15(4):311-316
- [14] Munoz-Sanchez A, Murillo-Cabezas F. Tranexamic acid therapy decreases mortality of traumatic hemorrhagic shock [J]. Med Intensiva, 2011, 35(5):286-287
- [15] Subeq YM, Hsu BG, Lin NT, et al. Hypothermia caused by slow and limited-volume fluid resuscitation decreases organ damage by hemorrhagic shock [J]. Cytokine, 2012, 60(1):68-75
- [16] Li CH, Huang ZQ, Zhou C, et al. Experimental study of a battlefield shock resuscitation fluid with new formula [J]. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, 2011; 23(3):162-165
- [17] Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential [J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(11):917-935
- [18] Martelli A, Testai L, Breschi MC, et al. Hydrogen sulphide: novel opportunity for drug discovery [J]. Med Res Rev, 2010, 32(6):1093-1130

- [5] David A, Fishman, Yueying Liu, et al. Lyso- phosphatidic acid pro-motes matrix metalloproteinase (MMP) activation and MMP-2 depend invasion in ovarian cancer cells [J].Cancer Res, 2001,61(7): 3194-3199
- [6] Zhang F, Tom CC, Kugler MC, et al. Distinct ligand binding sites in integrin $\alpha 3\beta 1$ regulate matrix adhesion and cell-cell contact [J]. Cell Biol, 2003,163(1):177-188
- [7] Chen X, Liu S, Hou Y. Micro PET imaging of breast cancer alphav-integrin expression with 64 Cu-labeled dimeric RGD peptides[J]. Mol Imaging Biol, 2004, 6(5):350-359
- [8] Xie H, Diagaradjane P, Deorukhkar AA, et al. Integrin $\alpha (v)\beta (3)$ -targeted gold nanoshells augment tumor vasculature-specific imaging and therapy[J]. Nanomedicine, 2011, 6:259-269
- [9] Kim M, Carman CV, Springer TA. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins[J].Science, 2003, 301(5640):1720-1728
- [10] He Chen, Wei-Wei Yang, Qiu-Ting Wen, et al. TGF- β - induced increases the proliferation, adhesion, and migration of HO-8910PM [J]. 2009,87(3):189-194
- [11] Rettig WJ, Garin-Chesa P, Beresford HR, et al. Cell-surface glycoproteins of human sarcomas: differential expression in normal and malignant tissues and cultured cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 85(9):3110-3124
- [12] Jeong SJ, Luo R, Singer K, et al. GPR56 Functions Together with $\alpha 3\beta 1$ Integrin in Regulating Cerebral Cortical Development[J]. PLoS One, 2013, 8(7):e68781
- [13] Park CC, Zhang H, Pallavicini M, et al. Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo [J].Cancer Res, 2006,66 (3): 1526-1535
- [14] Nakada M, Nambu E, Furuyama N, et al. Integrin $\alpha 3$ is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion [J]. Br J Cancer, 2013, 108(12):2516-2524
- [15] Chen X, Liu S, Hou Y. Micro PET imaging of breast cancer alphav-integrin expression with 64 Cu-labeled dimeric RGD peptides[J]. Mol Imaging Biol, 2004,6(5):350-359
- [16] Raghu H, Sodadasu PK, Malla RR, et al. Localization of uPAR and MMP-9 in lipid rafts is critical for migration, invasion and angiogenesis in human breast cancer cells [J]. BMC Cancer, 2010,2 (4):620-647
- [17] Gregory KJ, Zhao B, Bielenberg DR, et al. Vitamin D binding protein-macrophage activating factor directly inhibits proliferation, migration, and uPAR expression of prostate cancer cells [J]. PLoS One, 2010,5(10):e13428
- [18] Gutova M, Najbauer J, Gevorgyan A, et al. Identification of uPARpositive chemoresistant cells in small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2007, 2(2):243-252
- [19] Almasi CE, Brasso K, Iversen P, et al. Prognostic and predictive value of intact and cleaved forms of the urokinase plasminogen activator receptor in metastatic prostate cancer [J]. Prostate, 2011, 71 (8):899-907
- [20] Crippa MP. Urokinase-type plasminogen activator [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(4):690-698

(上接第 2051 页)

- [19] Taniguchi S, Kang L, Kimura T, Niki I. Hydrogen sulphide protects mouse pancreatic beta-cells from cell death induced by oxidative stress, but not by endoplasmic reticulum stress [J]. Br J Pharmacol, 2011, 162(5):1171-1178
- [20] Sivarajah A, Collino M, Yasin M, et al. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R [J]. Shock, 2009, 31(3):267-274
- [21] Zhuo Y, Chen PF, Zhang AZ, et al. Cardioprotective effect of hydrogen sulfide in ischemic reperfusion experimental rats and its influence on expression of survivin gene [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(8): 1406-1410
- [22] Neff TA, Guo RF, Neff SB, et al. Relationship of acute lung inflammatory injury to Fas/FasL system [J]. Am J Pathol, 2005, 166(3): 685-694
- [23] Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex [J]. J Biol Chem, 1998, 273(10):5841-5845
- [24] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. Science, 1998, 281(5381):1322-1326
- [25] Li L, Salto-Tellez M, Tan CH, et al. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat [J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(1):103-113
- [26] Rossoni G, Sparatore A, Tazzari V, et al. The hydrogen sulphide-releasing derivative of diclofenac protects against ischaemia-reperfusion injury in the isolated rabbit heart [J]. Br J Pharmacol, 2008, 153 (1):100-109
- [27] Sidhapuriwala J, Li L, Sparatore A, Bhatia M, et al. Effect of S-diclofenac, a novel hydrogen sulfide releasing derivative, on carrageenan-induced hindpaw oedema formation in the rat [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 569(1-2):149-154