

硫化氢中毒对大鼠肺钠水主动转运功能的影响

苏成磊¹,张华忠¹,陈俊杰¹,钱文溢²,张劲松^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院急诊科,江苏南京210029;²南京医科大学公共卫生学院神经毒理实验室,江苏南京210029)

[摘要] 目的:观察硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)中毒对大鼠肺钠水主动转运功能的影响,并探讨其机制。方法:SD大鼠充分暴露于亚致命浓度(300 ppm)的H₂S气体3 h,分别于暴露后6、12、24 h检测大鼠肺泡液体清除率(alveolar fluid clearance, AFC)和肺干湿比,光镜下观察肺组织HE染色,透射电镜下观察Ⅱ型肺泡上皮细胞的改变,real-time PCR检测肺组织α-上皮钠通道(epithelial sodium channel, ENaC)mRNA的表达,Western blot检测肺组织α-ENaC以及ERK1/2的蛋白表达。结果:SD大鼠暴露于H₂S后,与对照组比较,AFC明显下降,在暴露后6 h最低;肺含水量在暴露后6 h最高,并在12 h恢复至正常水平;光镜下,暴露后24 h大鼠肺组织出现明显损伤性改变;大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞在暴露后出现线粒体脊断裂、板层小体崩解;大鼠肺组织中α-ENaC mRNA在暴露后6 h表达增多,在12 h恢复至正常水平;α-ENaC的蛋白表达与对照组相比,则在暴露后6 h明显降低;大鼠肺组织ERK1/2磷酸化水平在暴露后6 h显著增高。结论:硫化氢中毒降低了大鼠AFC,其机制可能是下调了α-ENaC的表达,并且ERK1/2信号通路的激活可能参与了整个损伤过程。

[关键词] 硫化氢;α-上皮钠通道;肺泡液体清除率;ERK1/2

[中图分类号] R135.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)03-297-06

doi:10.7655/NYDXBNS20140305

Alteration of ENaC-mediated alveolar fluid clearance by hydrogen sulfide intoxication

Su Chenglei¹, Zhang Huazhong¹, Chen Junjie¹, Qian Wenyi², Zhang Jingsong^{1*}

(¹Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Key Lab of Neural Toxicology, School of Public Health, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effects of hydrogen sulfide (H₂S) intoxication on sodium and water transport function in rat lung and study its mechanism. **Methods:** SD rats were exposed to H₂S gas with semi-lethal concentration (300 ppm) for 3 h. After 6 h, 12 h and 24 h exposure to H₂S, alveolar fluid clearance (AFC) and wet/dry ratio were measured. HE staining of lung tissues was observed by light microscope, and the change of type II alveolar epithelial cells was observed by electron microscope. mRNA expression of α-epithelial sodium channel (ENaC) in the lung tissues was analyzed by real-time PCR. The expression of α-ENaC and ERK1/2 protein in the lung tissue was examined by Western blot. **Results:** After exposure to H₂S, AFC was significantly decreased in SD rats compared to the control group, and reached a lowest level after 6 h and returned to a normal level after 12 h. The lung water content reached a lowest level after exposure for 6 h. Obvious injury changes of the lung tissue of rats were found after exposure for 24 h by light microscope. Dilated mitochondrial cristae and collapsed lamellar bodies were found in type II alveolar epithelial cells of rats after exposure. The expression of α-ENaC mRNA in lung tissue was increased after exposure for 6 h and returned to a normal level after 12 h. Compared to the control group, the protein expression of α-ENaC was significantly decreased after exposure for 6 h. ERK1/2 dephosphorylation in lung tissues was significantly increased after exposure for 6 h. **Conclusion:** H₂S intoxication decreases the AFC of rats and down-regulation of α-ENaC expression may be involved in as a potential mechanism. Furthermore, activated ERK1/2 signaling pathway may participate in the whole damaging process.

[Key words] H₂S; α-ENaC; alveolar fluid clearance; ERK1/2

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(03):297-302]

[基金项目] 江苏高校优势学科建设工程资助项目(JX10231801)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhangjs@sina.com

硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是具有致死性的环境和工业毒物。H₂S 中毒占我国职业性急性中毒的第 2 位,仅次于一氧化碳中毒,国内报道职业性急性 H₂S 中毒的病死率为 23.1%~50.0%^[1]。H₂S 中毒无特异性的解毒剂,严重肺水肿是其主要的致死原因之一^[2]。

肺泡钠水主动转运功能主要是由肺泡上皮细胞顶膜侧的上皮钠通道(epithelial sodium channel, ENaC)、囊性纤维化跨膜调节器以及底膜侧的钠钾泵共同维持的^[3]。近年来,肺泡钠水主动转运功能紊乱在肺部疾病发生发展中的作用越来越受到重视。在急性肺损伤中,钠水主动转运功能受到破坏,不能及时清除肺泡分泌物和水肿液,使得气体交换障碍更加严重。

ENaC 在肺组织上有 α、β、γ 3 种亚型。研究表明,α-ENaC 基因敲除小鼠围产期肺泡内肺液不能被清除,出生 40 h 后死于呼吸窘迫症^[4]。而存在 β、γ 基因缺陷的小鼠则仅仅表现出肺含水量增多,并不像敲除 α 基因一样,出现严重功能障碍。提示 α 亚基作为 ENaC 的功能亚基,在肺泡钠水主动转运功能中可能起到关键作用^[5]。

本研究旨在探明 H₂S 对肺泡上皮细胞钠水主动转运功能的影响、α-ENaC 亚基变化以及可能涉及的机制,以期为临床治疗 H₂S 中毒提供新的靶点和依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

H₂S 标准气体(南京上元工业气体厂,中国),ENaC 阻断剂 Amiloride(Sigma 公司,美国),BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo Fisher 公司,美国),HRP 标记二抗(Jackson 公司,美国),ECL 发光试剂盒(Millipore 公司,美国),α-ENaC 抗体(Santa Cruz 公司,美国)、GAPDH 抗体(Sigma 公司,美国)、t-ERK1/2 抗体(CST 公司,美国)、p-ERK1/2 抗体(CST 公司,美国)。其余未作说明试剂均购于美国 Sigma 公司。

1.1.2 实验动物

健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,雄性,14~16 周,体重(200 ± 20)g,购于南京医科大学动物实验中心(许可证号:SCXK(苏)2008-0004),实验前禁食 8 h,禁水 4 h。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

将大鼠随机分为对照组、H₂S 染毒组。染毒组参照参考文献[6],将大鼠放入染毒柜中,通入 H₂S 标准气体和空气,利用 H₂S 检测仪(由江苏省疾控中心提供),将 H₂S 浓度稳定在(300 ± 20)ppm,连续暴露 3 h,分别在染毒后 6、12、24 h 检测大鼠肺泡液体清除率(alveolar fluid clearance, AFC),或麻醉处死后保留肺脏。对照组大鼠同样置于染毒柜中,仅通入空气,其余条件同染毒组。

1.2.2 形态学观察

大鼠麻醉处死后,取左上肺叶,4%多聚甲醛固定后,石蜡包埋,2 μm 厚连续切片,行苏木精伊红(HE)染色,做病理学观察。取左下肺叶经 2.5%戊二醛和 1%锇酸双固定,梯度乙醇和丙酮脱水,包埋切片后,行透射电镜观察。

1.2.3 测定 AFC 和肺干湿比

AFC 测定:参考文献[7],大鼠麻醉后行气管插管,预热(37°C)的灌注液 2.5 ml 经气管导管滴入大鼠气道中。灌注液的成分为:37 mmol/L NaCl、4.67 mmol/L KCl、1.82 mmol/L CaCl₂·2H₂O、1.25 mmol/L MgSO₄·7H₂O、5.55 mmol/L Dextrose、12 mmol/L HEPES,小牛清蛋白(5%)和 Evans blue 染料(0.15 mg/ml)作为指示剂,含或不含 Amilorid(100 μmol/L)。滴注后给予大鼠气道 100%氮气,使气道维持在 7 cmH₂O 的正压。30 min 后吸取肺泡液,在 621 nm 处测定 Evans blue 标记的蛋白浓度,根据公式:AFC = [(V_i-V_f)/V_i]×100% V_f=(V_i-P_i)/P_i,计算出大鼠 AFC。

干湿比测定:参考文献[8],大鼠麻醉后处死,取右下肺叶,称量获得肺叶湿重;置于 70°C 烘箱 3 d 反复称重直至重量稳定,所得最终重量为肺叶干重。肺叶湿重除干重得到肺干湿比。

1.2.4 real-time PCR

利用 real-time PCR 技术^[9]观察大鼠肺组织中 α-ENaC mRNA 的表达。TRIzol (Invitrogen 公司,美国)试剂提取细胞或组织中的 RNA,取 2 μg RNA 用 M-MLV(Promega 公司,美国)逆转录为 cDNA,按照实时荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本)的步骤进行 real-time PCR,实验引物见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物
Table 1 Real-time PCR primers

产物	序列(5'→3')	长度(bp)
α-ENaC sense:	CTAGACCTTCACGCCTCCACC	365
antisense:	AGGTACTCCTCGAACAGCAAG	
GAPDH sense:	ACATCATCCCTGCATCCACT	
antisense:	GGGAGTTGCTGTTGAAGTCA	258

1.2.5 Western blot

参考文献[10],观察大鼠肺组织中 α -ENaC 蛋白的表达。RIPA 裂解液和 cooktaik 蛋白酶抑制剂提取细胞或组织中的蛋白。BCA 法检测蛋白浓度,20 μ g 蛋白上样至 10%的 SDS-PAGE 胶,60 mV 电泳 30 min,90 mV 电泳 2 h,湿转恒流 220 mA,90 min。5%的脱脂奶粉封闭 1 h, α -ENaC 抗体 (1:1 000)、GAPDH 抗体(1:5 000)、t- ERK1/2 抗体 (1:1 000)、p-ERK1/2 抗体 (1:2 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗 3 次,每次 5 min,二抗(1:50 000)室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,每次 5 min。ECL 显影,暗室胶片曝光。

1.3 统计学方法

使用 SPSS13.0 统计软件,计量资料均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,两两比较使用 SNK 法, $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况观察

染毒组大鼠在染毒 15 min 后出现烦躁不安、呼吸急促,1 h 后部分大鼠口鼻出现泡沫样血迹。染毒结束时全部大鼠瘫倒在染毒柜中,四肢无力,染毒

大鼠未见昏迷或死亡。染毒后 6 h 观察大鼠一般情况有所恢复,活动自如。

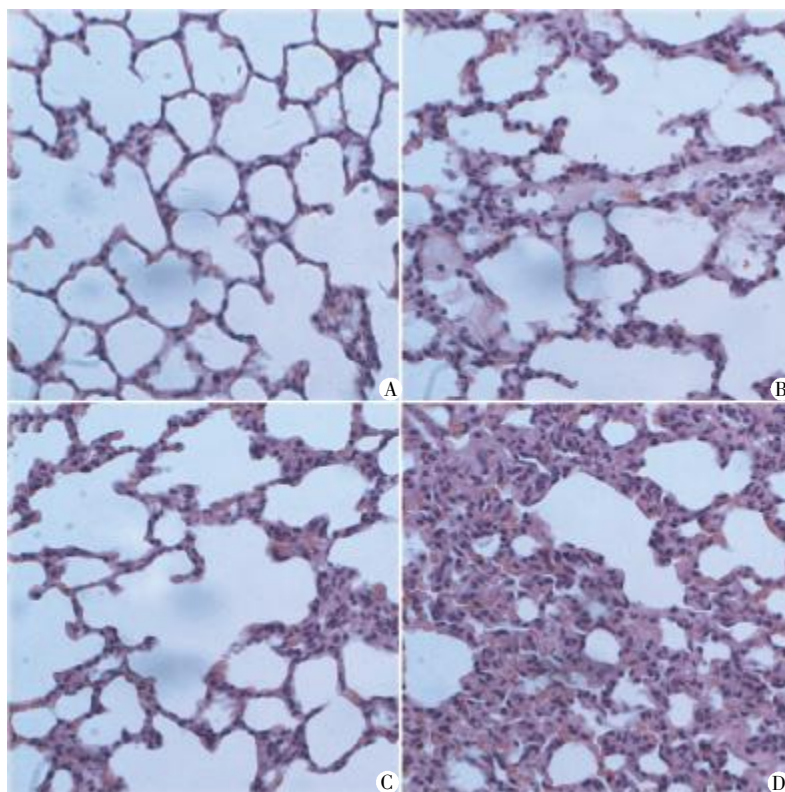
2.2 H₂S 暴露后对大鼠肺组织形态学观察

光镜下观察大鼠肺组织病理切片,对照组肺泡间质厚薄均一、肺泡腔面光滑、腔内无异物(图 1A)。H₂S 染毒组大鼠暴露后 6 h 肺组织出现明显的肺泡水肿液,肺泡间质稍增厚(图 1B)。暴露后 12 h 大鼠肺泡间质明显增厚,肺泡腔面欠光滑,肺泡腔结构破坏(图 1C);暴露后 24 h 大鼠肺组织出现严重的肺泡间质增厚、炎性细胞浸润、肺泡腔严重破坏(图 1D)。

透射电镜下观察大鼠 II 型肺泡上皮细胞:对照组大鼠 II 型肺泡上皮细胞板层小体层次清晰、线粒体嵴完整(图 2A)。和对照组相比,H₂S 染毒组 II 型肺泡上皮细胞板层小体出现空泡化、结构紊乱,线粒体肿胀、脊断裂。H₂S 暴露后 6 h、12 h 和 24 h,肺泡上皮细胞未见明显差异。

2.3 H₂S 对大鼠 AFC 和肺干湿比的影响

AFC 在维持肺泡液体平衡中起重要作用。H₂S 明显降低了大鼠 AFC。和对照组相比(24.86%),暴露后 6 h 大鼠 AFC 明显降低(21.44%),在暴露后 12、24 h 恢复至正常水平(图 3)。加入 Amiloride 后,阻断了

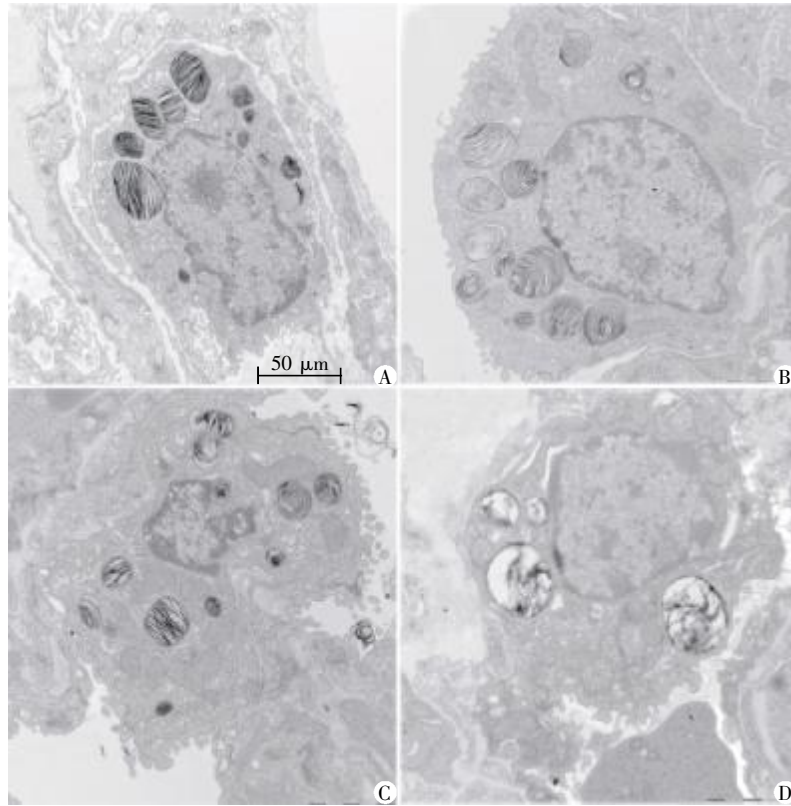


A:对照组;B:H₂S 暴露后 6 h 组; C:H₂S 暴露后 12 h 组;D:H₂S 暴露后 24 h 组。

图 1 硫化氢暴露后大鼠 II 型肺泡上皮细胞亚结构的改变

Figure 1 Ultra-structure abnormalities induced by H₂S in type II alveolar epithelial cells

H₂S 对大鼠 AFC 的降低效应。大鼠肺干湿比在 H₂S 暴露后明显升高,在暴露后6 h 达到最高(图4)。



A:对照组;B:H₂S 暴露后 6 h 组;C:H₂S 暴露后 12 h 组;D:H₂S 暴露后 24 h 组(标尺: 20 μm)。

图 2 硫化氢暴露后大鼠肺组织组织学改变

Figure 2 Histopathological changes in lung tissues in H₂S induced rats

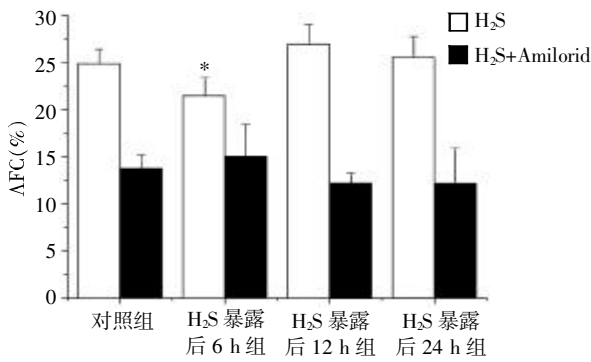


图 3 硫化氢对大鼠肺泡液体清除率的影响

Figure 3 Effects of H₂S on AFC in lung tissues

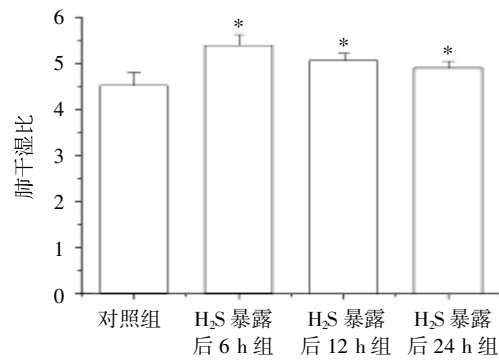


图 4 硫化氢对大鼠肺干湿比的影响

Figure 4 Effects of H₂S on the lung weight/dry ratio

2.4 H₂S 对 α-ENaC mRNA 表达的影响

α-ENaC 是维持 AFC 的基础,也是形成钠电流的限速步骤之一。以上结果表明,H₂S 对于 AFC 有显著抑制效应,所以对于 α-ENaC mRNA 的表达进行了进一步研究。结果表明,和对照组大鼠相比(100%),H₂S 暴露后 6 h 出现了 α-ENaC mRNA 增多(400%),并在 12 h 后恢复至正常水平(104%,表 2)。

表 2 大鼠肺组织 α-ENaC mRNA 的表达

Table 2 α-ENaC mRNA expression in lungs of rats

分组	α-ENaC(Δct)	GAPDH(Δct)	2 ^{-ΔΔ}
对照组 (n=8)	21.99 ± 0.01	17.21 ± 0.60	1.01 ± 0.10
H ₂ S 染毒组			
暴露后 6 h (n=6)	20.25 ± 0.09	17.48 ± 0.34	4.03 ± 0.57*
暴露后 12 h (n=6)	21.93 ± 0.05	17.21 ± 0.11	1.04 ± 0.32
暴露后 24 h (n=6)	22.12 ± 0.07	17.61 ± 0.17	1.21 ± 0.22

与对照组相比, *P < 0.05。

2.5 H₂S 对 α-ENaC 蛋白表达的影响

大鼠在 H₂S 暴露后 6 h,与对照组相比,α-ENaC 蛋白也明显减少;在 12 h 后开始部分恢复;在 24 h 后,大鼠肺组织 α-ENaC 蛋白表达仍低于对照组(图 5)。

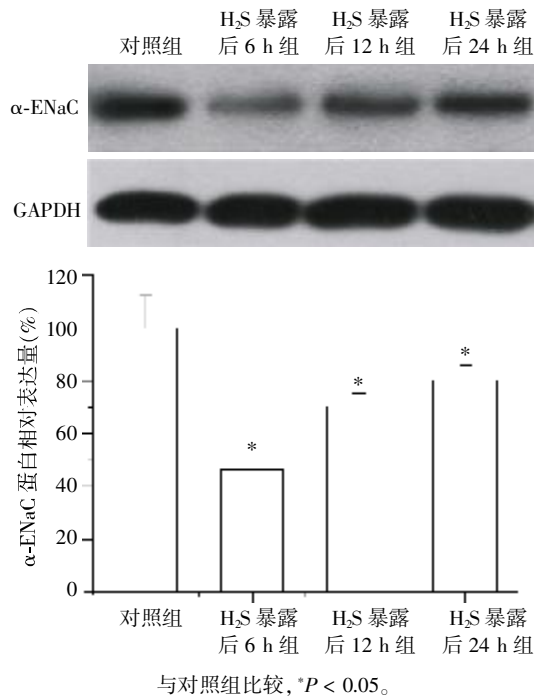


图 5 硫化氢对大鼠肺组织中 α-ENaC 蛋白表达的影响
Figure 5 Effects of H₂S on α-ENaC in lung tissues

2.6 H₂S 对 ERK1/2 信号通路的激活作用

如图 6 所示,H₂S 暴露后大鼠肺组织中 ERK1/2 磷酸化程度显著增高,在暴露后 6 h 达到最高,随后逐渐降低,在 24 h 后仍高于对照组。

3 讨论

H₂S 中毒在工业生产中比较常见,而严重肺水肿往往是 H₂S 中毒患者死亡的主要原因^[11]。但是对于 H₂S 介导肺水肿的机制,尚无详细研究。本文首次研究了 α-ENaC 在 H₂S 介导的肺水肿中的作用。结果表明 α-ENaC 的下调可能是 H₂S 致肺水肿的机制之一,并且 ERK1/2 信号通路的激活可能参与了 H₂S 对 α-ENaC 的下调过程。

本研究建立了 H₂S 介导的大鼠肺水肿模型。H₂S 对于肺水肿的产生并非是一个浓度依赖的线性关系,而是存在一个产生阈值,在 200 ppm 以上才会出现肺水肿的病理特征^[12]。本研究为了建立明显的 H₂S 吸入性急性肺水肿模型,采用 300 ppm 亚致命浓度 H₂S 气体连续暴露 3 h,在暴露过程中和暴露后 24 h 内无大鼠死亡,暴露后大鼠肺组织 HE 染色

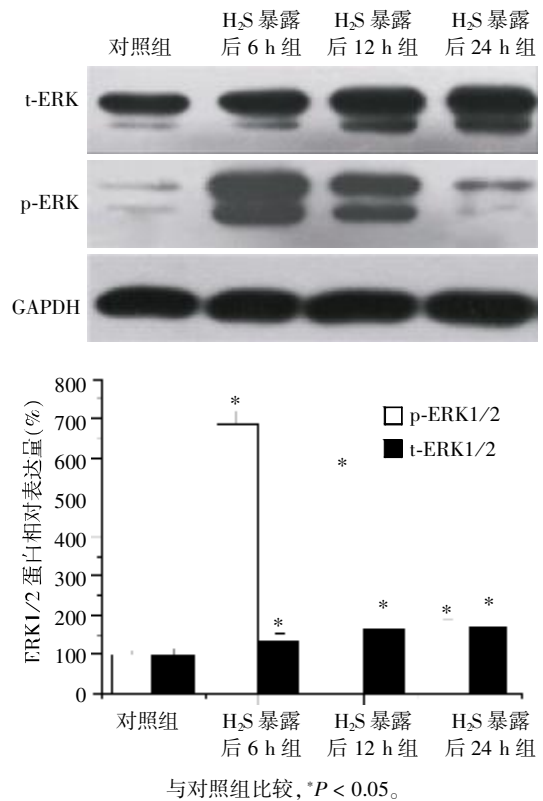


图 6 硫化氢对大鼠肺组织中 ERK1/2 蛋白表达的影响
Figure 6 Effects of H₂S on ERK1/2 in lung tissues

切片呈现明显肺水肿以及炎性细胞浸润、肺泡间隔增厚等急性肺损伤的病理特征;同时 II 型肺泡上皮细胞出现轻度亚微结构的损伤性改变,这些结果和之前的研究结果一致^[13],证明了本研究中的大鼠肺水肿模型建立是成功的。

本研究在对 H₂S 暴露后大鼠 AFC 的研究中发现,H₂S 中毒降低了大鼠 AFC,表明 H₂S 暴露后大鼠肺泡液体重吸收功能受到损害,从而加速了肺水肿的发生和发展。肺泡液体主动重吸收功能是以 Na⁺跨肺泡上皮细胞为驱动力而产生的^[14],为进一步研究 H₂S 对于肺泡液体主动重吸收功能的损伤机制,本研究检测了 α-ENaC mRNA 和蛋白水平的表达变化。结果显示在 H₂S 暴露后大鼠肺组织中 α-ENaC 蛋白表达明显下降,但是大鼠肺组织中 α-ENaC mRNA 的表达则在暴露后 6 h 出现异常增高,并在 12 h 后恢复至正常水平。推测可能是由于 mRNA 下调的时间较为短暂,在暴露后 6 h 因为全身性应激反应而出现应激性增高现象。

ERK1/2 信号通路是 α-ENaC 的损伤性调控机制之一^[15-16]。本研究发现 H₂S 暴露激活了 ERK1/2 信号通路,提示 ERK1/2 信号通路的激活可能是 H₂S 下调 α-ENaC 蛋白表达的机制之一。

本研究首次证明了 H₂S 可以下调大鼠 AFC 和肺组织中 α -ENaC 蛋白的表达,并且 ERK1/2 信号通路的激活可能参与了整个损伤过程。这一发现将对临床急性 H₂S 中毒的治疗提供新靶点和思路。

[参考文献]

- [1] 吴娜,王涤新. 硫化氢中毒机制及治疗研究进展[J]. 中国工业医学杂志,2010,23(6):434-436
- [2] Oesterhelweg L,Puschel K. "Death may come on like a stroke of lightning":phenomenological and morphological aspects of fatalities caused by manure gas[J]. Int J Legal Med,2008,122(2):101-107
- [3] Eaton DC,Helms MN,Koval M,et al. The contribution of epithelial sodium channels to alveolar function in health and disease[J]. Annu Rev Physiol,2009,71:403-423
- [4] Hummler E,Barker P,Gatzy J,et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice[J]. Nat Genet,1996,12(3):325-328
- [5] Hummler E,Planes C. Importance of ENaC-mediated sodium transport in alveolar fluid clearance using genetically-engineered mice[J]. Cell Physiol Biochem,2010,25(1):63-70
- [6] Prior M,Green F,Lopez A,et al. Capsaicin pretreatment modifies hydrogen sulphide-induced pulmonary injury in rats[J]. Toxicol Pathol,1990,18(2):279-288
- [7] Berger MM,Pitzer B,Zugel S,et al. Alveolar but not intravenous S-ketamine inhibits alveolar sodium transport and lung fluid clearance in rats[J]. Anesth Analg,2010,111(1):164-170
- [8] Yadav AK,Doran SF,Samal AA,et al. Mitigation of chlorine gas lung injury in rats by postexposure administration of sodium nitrite[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2011,300(3):L362-L369
- [9] 王平,夏永祥,张传永,等. 选择性抑制一氧化氮合酶对大鼠小体积肝移植的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2011,31(12):1713-1716
- [10] 钱晓娟,袁小青,马向华,等. MAPKs 通路在胰岛素促人乳腺癌细胞系增殖中的机制研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2011,31(5):684-688
- [11] 范发才,惠萍,宋天云. 5 例中重度急性硫化氢中毒致多器官损害分析[J]. 中国急救医学,2012,32(2):181-183
- [12] Prior MG,Sharma AK,Yong S,et al. Concentration-time interactions in hydrogen sulphide toxicity in rats[J]. Can J Vet Res,1988,52(3):375-379
- [13] 杜旭芹,王涤新,吴娜,等. 氧疗对急性硫化氢中毒大鼠的心肌和肺及肝组织形态学的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2011,29(5):338-342
- [14] Althaus M,Urness KD,Clauss WG,et al. The gasotransmitter hydrogen sulphide decreases Na (+) transport across pulmonary epithelial cells[J]. Br J Pharmacol,2012,166(6):1946-1963
- [15] Lazrak A,Chen L,Jurkuvenaite A,et al. Regulation of alveolar epithelial Na⁺ channels by ERK1/2 in chlorine-breathing mice[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2012,46(3):342-354
- [16] Niisato N,Ohta M,Eaton DC,et al. Hypotonic stress up-regulates beta-and gamma-ENaC expression through suppression of ERK by inducing MKP-1 [J]. Am J Physiol Renal Physiol,2012,303(2):F240-F252

[收稿日期] 2013-11-08

本刊邮发代号 28-61

网址: <http://jnm.njmu.edu.cn>