

富氢盐水对高原环境下烧伤小鼠肠道损伤的影响

崔强, 王洪瑾, 李毅, 晁生武, 吴晓伟, 王献珍^{*}(青海大学附属医院烧伤整形科, 西宁 810001)

摘要: **目的** 探究富氢盐水对高原环境下烧伤小鼠肠道损伤的保护作用及可能机制。**方法** 36只♀BALB/c小鼠随机分为假烧伤组、烧伤模型组和富氢盐水组, 实验均在低压氧舱室中模拟海拔3 000 m的高原环境。假烧伤组小鼠背部采用温水浴(37℃, 10 s)模拟致伤, 烧伤模型组和富氢盐水组小鼠背部采用沸水浴法(90℃, 10 s)致30% TBSA III度烫伤。烧伤后, 富氢盐水组注射富氢盐水10 mL·kg⁻¹(0.6 mmol·L⁻¹), 假烧伤组和烧伤模型组注射等量生理盐水。通过分析小肠组织病理情况, 血清中脂多糖的表达及肠道中紧密黏连蛋白1(zonula occludens-1, ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)、胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)、酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)和神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)的表达以阐明富氢盐水对高原环境下烧伤小鼠肠道屏障及肠神经系统的影响。另外, 通过分析血清中丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)的表达, 肠道中炎症因子TNF-α、IL-1β和IL-17A的表达及CD3 T淋巴细胞浸润情况以探究富氢盐水对高原烧伤小鼠氧化应激及炎症反应的影响。**结果** 与假烧伤组相比, 烧伤模型组小鼠表现出明显的肠道病理损伤、ZO-1、Occludin、ChAT、TH和nNOS的表达显著降低; 富氢盐水显著改善了模型组小鼠的肠道病理损伤、肠黏膜屏障损伤, 并且对肠神经系统表现出积极作用。另外, 富氢盐水可显著调控烧伤模型组小鼠血清中MDA、CAT及GSH-Px的表达, 降低炎症细胞因子的表达, 减少CD3 T淋巴细胞的浸润。**结论** 富氢盐水可减轻高原环境下烧伤小鼠的肠道病理损伤, 修复肠黏膜屏障, 并对肠神经系统发挥保护作用, 其作用可能通过调控氧化应激及炎症反应实现。

关键词: 富氢盐水; 烧伤; 高原环境; 肠道损伤; 氧化应激; 炎症反应

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2023)01-0010-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.01.002

引用本文: 崔强, 王洪瑾, 李毅, 等. 富氢盐水对高原环境下烧伤小鼠肠道损伤的影响[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(1): 10-17.

Effects of Hydrogen-rich Saline on Intestinal Damage in High-altitude Burned Mice

CUI Qiang, WANG Hongjin, LI Yi, CHAO Shengwu, WU Xiaowei, WANG Xianzhen^{*}(Department of Burn and Plastic Surgery, Qinghai University Affiliated Hospital, Xining 810001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the protective effect and possible mechanism of hydrogen-rich saline on intestinal injury in burned mice under high altitude environment. **METHODS** Thirty-six female BALB/c mice were randomly divided into sham group, burn model group and hydrogen-rich saline group, all experiments were conducted in a low-pressure oxygen chamber to simulate an altitude of 3 000 m. The back of mice in the sham group was simulated with a warm water bath(37℃, 10 s), and the back of mice in the burn model group and the hydrogen-rich saline group was simulated with a boiling water bath(90℃, 10 s) to cause 30% TBSA III scald. After burn, mice in the hydrogen-rich saline group was injected with 10 mL·kg⁻¹(0.6 mmol·L⁻¹), while the sham group and the burn model group were injected with the same amount of saline. The effects of hydrogen-rich saline on the intestinal barrier and intestinal nervous system of burned mice were analyzed by analyzing the pathological of intestinal tissue, the expression of lipopolysaccharide in serum and the expression of zonula occludens-1(ZO-1), Occludin, choline acetyltransferase(ChAT), tyrosine hydroxylase(TH) and neuronal nitric oxide synthase(nNOS) in intestinal. In addition, by analyzing the expression of malondialdehyde(MDA), catalase(CAT) and glutathione peroxidase(GSH-Px) in serum, expression of inflammatory factors of TNF-α, IL-1β and IL-17A and CD3 T lymphocyte infiltration in intestinal, the effects of hydrogen-rich saline on oxidative stress and inflammatory response in mice burned at high altitude were investigated. **RESULTS** Compared with the sham group, mice in the burn model group showed significant intestinal pathological damage, and the expressions of ZO-1, Occludin, ChAT, TH and nNOS were significantly decreased. Hydrogen-rich saline significantly improved intestinal pathological injury and intestinal mucosal barrier injury in the model group, and also showed a positive effect on the intestinal nervous system. In addition, hydrogen-rich saline could significantly regulate the expressions of MDA, CAT and GSH-Px in serum, reduce the expression of inflammatory cytokines, and reduce the infiltration of CD3 T lymphocytes in the intestinal tissue of burn model mice. **CONCLUSION** Hydrogen-rich saline can

基金项目: 青海省基础 Research 计划项目(2021-0301-ZJC-0142)

作者简介: 崔强, 男, 副主任医师 E-mail: cq6230896@163.com

^{*}通信作者: 王献珍, 男, 硕士, 副主任医师 E-mail: 10052690@qq.com

relieve the intestinal pathological damage, repair the intestinal mucosal barrier, and protect the intestinal nervous system of burned mice under high altitude environment, which may be realized by regulating oxidative stress and inflammatory response.

KEYWORDS: hydrogen-rich saline; burns; high altitude environment; intestinal damage; oxidative stress; inflammatory response

烧伤是常见的外伤性损伤,其发病率和死亡率较高,会引发病理生理变化,如缺氧、局部缺血、再灌注损伤、免疫反应、炎症、感染等^[1-2]。肠道被认为是应激反应中最重要的器官,对各种外界刺激极为敏感^[3]。在烧伤期间,肠道黏膜屏障可能会受到严重破坏,一般来说,胃肠道有机械、免疫、化学和生物 4 种屏障,烧伤后肠系膜血管收缩,肠道缺血缺氧环境增加肠道通透性,引起肠道细菌移位、肠道感染和全身炎症反应综合征,进而导致多器官功能障碍^[4]。此外,高原低压低氧环境可致使烧伤创面水分散失大,氧分压低,增加了烧伤带来的肠道缺血缺氧等损伤,给烧伤患者的救治增加了困难,高原环境下烧伤总体死亡率明显增加^[5]。因此,研究高原低氧环境下烧伤导致肠道损伤的防治措施对于降低高原环境下烧伤后患者的死亡率有重大意义。

烧伤后肠道损伤与氧化应激、炎症反应、免疫调节和细胞凋亡密切相关。因此,降低全身炎症反应,控制氧化应激负荷,减轻肠道损伤是严重烧伤治疗的重要策略。氢是最轻的化学元素,能轻易透过细胞膜进入细胞质和细胞器,发挥抗氧化、抗炎和抗凋亡的作用^[6]。氢气常被高压溶解在生理盐水(富氢盐水)中,观察其治疗和预防疾病的效果。研究证明富氢盐水可以对各种疾病提供保护,包括败血症、中风、多器官功能障碍综合征等^[7-8]。但是其在高原环境下烧伤导致肠道损伤中的作用尚不清楚。基于此,本研究通过模拟高原低压低氧环境,研究富氢盐水对高原环境烧伤小鼠肠道损伤及其氧化应激和炎症反应的影响,以期富氢盐水在高原低压低氧烧伤性肠损伤中的应用奠定基础。

1 材料

1.1 动物

8 周龄雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠共 36 只,体重 20~30 g,购自西安科奥生物科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(陕)2018-001;实验动物使用许可证号:SYXK(陕)2018-010。本研究通过青海大学附属医院伦理委员会批准,所有动物饲养于 SPF 级动物实验中心,均能自由进食与饮水,保障室温及每日 12 h 的光照时间。

1.2 药品与试剂

富氢盐水(北京富氢源生物有限公司,氢气浓度:0.6 mmol·L⁻¹;盐水浓度:0.9%;批号:20210245);脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) ELISA 试剂盒(武汉伊艾博科技股份有限公司,货号:E1526Ge);脂质氧化物丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(货号:S0131S)、过氧化氢酶(catalase, CAT)检测试剂盒(货号:S0051)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒(货号:S0057S)均购自碧云天生物技术有限公司;一抗 anti-ZO-1(货号:ab96587)、anti-Occludin(货号:ab216327)、anti-ChAT(货号:ab181023)、anti-TH(货号:ab137869)、anti-nNOS(货号:ab3511)、anti-CD3(货号:ab16669)、anti-PGP9.5(货号:ab180872)均购自英国 Abcam 公司。二抗:辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(货号:A0208)、Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(货号:A0423)、Alexa Fluor 647 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(货号:A0473)均购自碧云天生物技术有限公司。总 RNA 提取试剂盒 TRIzol Reagent(美国 Invitrogen 公司,货号:15596026)。反转录和 PCR 试剂盒:HiScript III RT SuperMix for qPCR(+g DNA wiper)(货号:R323-01)、ChamQ™ SYBR qPCR Master Mix(货号:Q311-02/03)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

2 方法

2.1 分组与建模

BALB/c 小鼠分为假烧伤组、烧伤模型组、富氢盐水组,每组 12 只,实验均在 DYC-3070 低压氧舱室中(贵州风雷)模拟海拔 3 000 m 高原环境(舱内压强:70.5 kPa;氧浓度:15%)。小鼠进行烧伤处理前 12 h 不进食和饮水,用 2%戊巴比妥钠以腹腔注射方式麻醉小鼠。背部区域进行剃毛后,假烧伤组小鼠采用温水浴(37 °C, 10 s)模拟致伤,烧伤模型组、富氢盐水组小鼠采用沸水浴法(90 °C, 10 s)致 30% TBSA III 烫伤(取小鼠全层皮肤组织病理切片验证)^[9-10]。烧伤后,富氢盐水组小鼠立即一次性腹腔注射富氢盐水 10 mL·kg⁻¹(氢气浓度 0.6 mmol·L⁻¹,盐水浓度 0.9%),假烧伤组和

烧伤模型组注射等量 0.9%生理盐水。

2.2 组织样本收集

烧伤 24 h 后处死小鼠,收集小鼠血清进行 LPS 及氧化应激指标检测;小肠组织分为 2 段,一段由 4%多聚甲醛固定,用于 HE、免疫荧光及免疫组化检测;另一段小肠组织置于液氮速冻,用于分子检测。

2.3 病理形态学检测

皮肤及小肠组织经过 4%多聚甲醛固定 24 h 后,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片后用苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin, HE) 染料进行染色,普通光学显微镜下观察肠组织的组织形态改变。

2.4 LPS 及氧化应激指标检测

收集各组小鼠血液,于 900 × g 离心 15 min,分离上层血清。血清中 LPS 含量通过 ELISA 进行检测,氧化应激相关指标 MDA、CAT 和 GSH-Px 通过对应试剂盒进行。所有操作严格按照产品说明书进行。

2.5 RT-PCR 检测

收集各组小鼠小肠组织,根据试剂盒说明书进行总 RNA 提取和 RT-PCR 分析,使用 TRIzol Reagent 从肠组织中制备总 RNA,使用 HiScript III RT SuperMix for qPCR(+g DNA wiper) 将提取的总 RNA 反转录为 cDNA。采用 ChamQ™ SYBR qPCR Master Mix 和 CFX96™ RT-PCR 检测系统进行实时定量 PCR 检测。以 β -actin 为内源性对照,采用比较 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法测定胞质紧密黏连蛋白 1(zonula occludens-1, ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-17A 基因的相对表达水平。引物序列见表 1。

2.6 Western blotting 检测

Western blotting 检测小肠组织中 ZO-1、Occludin、胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)、酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)

和神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)、胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)、酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH)和神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)的蛋白表达。称取适量小鼠肠组织,放入含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中匀浆,冰上裂解 30 min,裂解液在 4 ℃下 10 000 × g 离心 10 min,收集上清。用 BCA 试剂盒检测上清液中总蛋白浓度。调整浓度后蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳对蛋白进行分离,转移到 PVDF 膜后,5%脱脂奶粉封闭 1 h。加入 ZO-1、Occludin、ChAT、TH 和 nNOS(1 : 1 000)一抗 4 ℃孵育过夜, TBST 洗涤后用二抗孵育 1 h 进行免疫反应。使用蛋白凝胶成像系统获取图像,用 Image J 分析软件进行蛋白灰度定量分析。

2.7 免疫荧光染色

小肠组织切片脱蜡后,用 1%BSA 封闭 1 h,加入一抗 ChAT、TH、nNOS(1 : 100),分别与 PGP9.5 (1 : 100)于 4 ℃共孵育过夜。PBS 洗涤后滴加带荧光的二抗,室温孵育 1 h,洗涤后滴加 DAPI 孵育 5 min 染核。荧光显微镜下观察 ChAT、TH 和 nNOS 的蛋白表达情况, Image J 分析软件分析荧光强度。

2.8 免疫组化染色

肠切片脱蜡后,用 3%双氧水处理 10 min 猝灭内源性过氧化物酶活性,然后用 CD3 抗体(1 : 50)与组织切片 4 ℃孵育过夜, PBS 洗涤后,滴加二抗 37 ℃孵育 30 min。PBS 洗涤后用二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)进行组织化学反应,苏木精复染。光学显微镜进行组织学检查, Image J 分析平均光密度。

2.9 统计方法

所有数据使用 SPSS 22.0 统计分析软件进行分析。两组比较采用 Student-*t* 检验。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 小鼠 RT-PCR 的引物序列

Tab. 1 Primer sequences used for Real-Time PCR assay in mice

基因	正向引物	反向引物
ZO-1	5'-GGAGATGTTTATGCGGACGG-3'	5'-CCATTGCTGTGCTCTTAGCG-3'
Occludin	5'-TGAATGGGTACCGAGGGAG-3'	5'-CCCAAGATAAGCGAACCTGCC-3'
IL-1 β	5'-AGCTTCAGGCAGGCAGTAT-3'	5'-CATCCCATGAGTCACAGAG-3'
TNF- α	5'-CTTCTCAGTCCTGCTTG-3'	5'-ACTTGGTGGTTTGCTACG-3'
IL-17A	5'-CCTGGACTCTCCACGCAA-3'	5'-TTCCCTCCGCATTGACACAG-3'
β -actin	5'-GAAGATCAAGATCATTGCTCC-3'	5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCA-3'

3 结果与分析

3.1 烧伤模型的建立

在模拟高原 3 000 m 环境采用 90 °C 水浴 10 s, 造成背部约 30% TBSA 烫伤, 病理切片显示, 烧伤模型组小鼠皮肤组织表皮、真皮及部分皮下组织正常结构基本消失; 复层鳞状上皮变性坏死, 局部表皮坏死脱落后消失; 真皮内胶原纤维松散, 大量胶原纤维及皮肤附属器坏死; 真皮下部分肌肉组织结构模糊, 胞质溶解; 坏死区域内炎性细胞浸润, 以淋巴细胞为主, 血管充扩张; 均为Ⅲ度烫伤的典型表现, 说明 TBSA Ⅲ烫伤模型建立成功。结果见图 1。

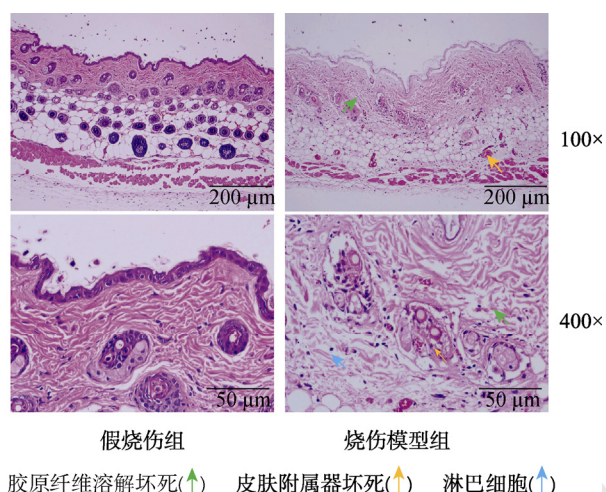


图 1 小鼠皮肤组织 HE 染色

Fig. 1 Micrographs of mouse skin tissue sections after HE staining

3.2 富氢盐水对高原环境烧伤小鼠肠道组织形态的影响

小肠组织 HE 病理染色结果显示, 假烧伤组小

鼠肠绒毛黏膜表面覆单层柱状上皮, 黏膜固有层内管状肠腺结构清晰, 腺上皮细胞形态正常, 小肠腺周围间质内细胞成分较多, 偶见少量淋巴细胞和巨噬细胞散在分布; 黏膜下层为疏松结缔组织, 其内分布血管和神经等; 肌层和浆膜层未见明显炎性细胞浸润和增生。烧伤模型组小鼠肠固有层内大量细胞变性坏死, 少量肠腺坏死, 间质内纤维组织增生, 以核呈长椭圆形或卵圆形的成纤维细胞和核呈长梭形的纤维细胞为主。富氢盐水处理后肠黏膜固有层内管状肠腺结构清晰, 腺上皮细胞形态正常, 肠腺周围少量细胞坏死, 间质内纤维组织增生减少。富氢盐水处理可明显改善高原环境烧伤小鼠的肠道病理损伤。结果见图 2。

3.3 富氢盐水对高原环境烧伤小鼠肠道屏障的影响

为了进一步探究富氢盐水对高原烧伤小鼠肠损伤的影响, 对小鼠血清中 LPS 的含量进行检测, 结果发现相比于假烧伤组, 烧伤模型组小鼠血清中 LPS 含量显著增加($P<0.01$), 而富氢盐水可逆转烧伤模型小鼠血清中 LPS 的增加($P<0.05$)。另外, ZO-1 和 Occludin 的基因及蛋白表达分析结果表明, 烧伤模型组中小鼠小肠组织中 ZO-1 和 Occludin 的基因及蛋白表达较假烧伤组均显著减少($P<0.001$), 富氢盐水干预显著逆转 ZO-1 和 Occludin 基因及蛋白表达的降低($P<0.05$ 或 $P<0.001$), 提示富氢盐水可修复高原环境烧伤小鼠的肠黏膜屏障损伤。结果见图 3。

3.4 富氢盐水对高原环境烧伤小鼠肠神经系统的影响

为探讨富氢盐水对肠神经系统的保护作用, 采用蛋白免疫印迹和免疫荧光法检测肠神经递质

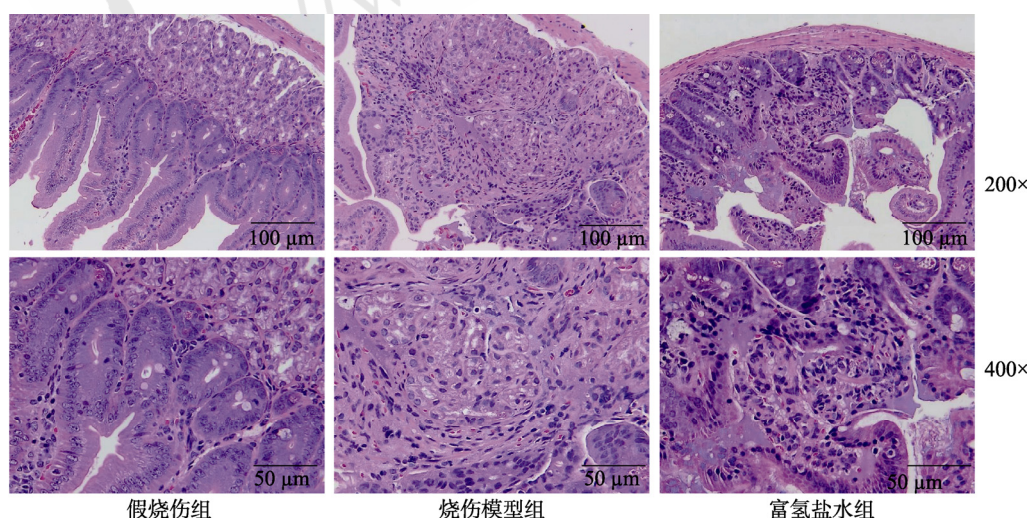


图 2 小鼠小肠组织切片 HE 染色

Fig. 2 Micrographs of mouse intestinal tissue sections after HE staining

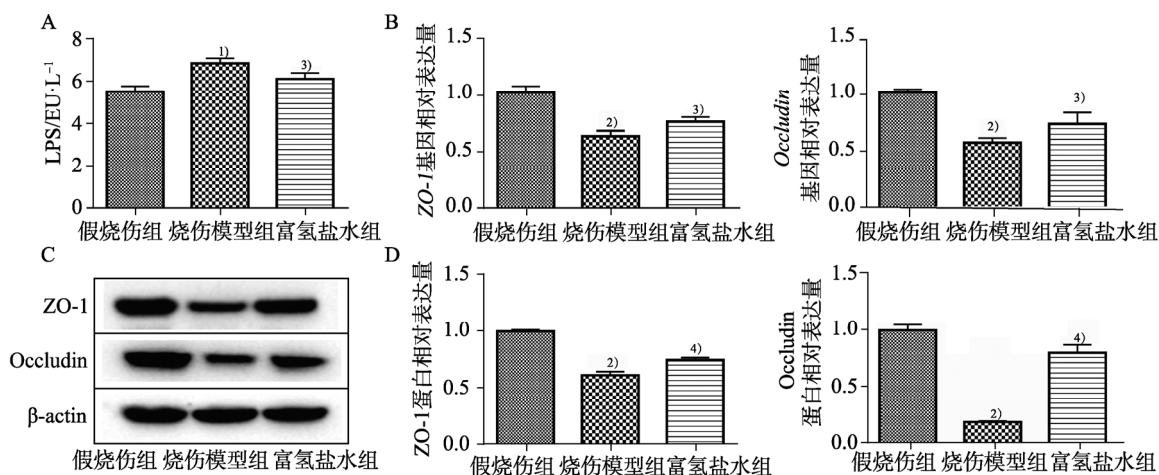


图3 富氢盐水对高原环境烧伤小鼠肠道屏障的影响

A-ELISA 检测小鼠血清中 LPS 含量; B-RT-PCR 检测小鼠肠组织中 ZO-1 和 Occludin 的基因表达; C-Western blotting 检测小肠组织中 ZO-1 和 Occludin 的蛋白表达; D-ZO-1 和 Occludin 的蛋白密度分析。与假烧伤组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; 与烧伤模型组比较, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 3 Effects of hydrogen-rich saline on intestinal barrier in mice burned in high altitude environment

A-content of LPS in serum of mice was determined by ELISA; B-gene expressions of ZO-1 and Occludin in the intestinal tissue were detected by RT-PCR; C-protein expressions of ZO-1 and Occludin in the intestinal tissue were detected by Western blotting; D-densitometry analysis of the intensity of the protein. Compared with the sham group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; compared with the burn model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.001$.

合成酶 ChAT、TH 和 nNOS 的表达。结果显示, 烧伤模型组小鼠小肠组织中 ChAT、TH 和 nNOS 的表达较假烧伤组明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$), 富氢盐水组与烧伤模型组比较, 其神经递质合成酶的表达显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.001$), 提示富氢盐水对肠神经系统有一定的保护作用。结果见图 4。

3.5 富氢盐水对高原环境烧伤小鼠氧化应激及炎症反应的影响

对小鼠血清中氧化应激指标进行检测, 结果发现相比于假烧伤组, 烧伤模型组小鼠血清中 MDA 水平显著增加($P<0.001$), CAT 和 GSH-Px 水平显著降低($P<0.01$), 烧伤显著增加高原环境小鼠的氧化应激水平。富氢盐水处理后烧伤模型组小鼠血清中 MDA 的增加、CAT 和 GSH-Px 的降低被显著逆转($P<0.05$), 提示富氢盐水可缓解高原烧伤小鼠的氧化应激水平。另外, RT-PCR 检测小鼠小肠组织中炎症细胞因子的表达, 结果显示, 烧伤模型组小鼠肠组织中 *IL-1β*、*TNF-α* 和 *IL-17A* 基因的表达较假烧伤组明显升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。而通过富氢盐水干预, 炎症细胞因子表达的增加被显著逆转($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 富氢盐水可显著逆转高原烧伤小鼠炎症因子的释放。肠组织 CD3 T 淋巴细胞浸润分析显示, 烧伤模型组小鼠肠组织中 CD3 T 淋巴细胞浸润明显高于假烧伤组($P<0.001$), 富氢盐水可减轻肠组织 CD3 T 淋巴细胞浸润情况($P<0.001$)。结果提示富氢盐水可缓解高原烧伤小鼠

肠道的氧化应激及炎症的发展。结果见图 5。

4 讨论

烧伤是一种严重的创伤, 对患者的生活有着长期影响^[11]。烧伤患者由于部分皮肤裸露, 机体皮肤保护层受损, 免疫功能衰退, 缺血/缺氧因子、促炎因子、应激细胞因子和肠毒素通过多种信号通路导致胃肠道菌群紊乱, 影响肠道环境, 导致肠上皮屏障中断, 总通透性增加, 进一步促进全身病理改变^[12]。此外, 由于高原特有的低压低氧环境, 相比于平原, 高原环境下相同程度的烧伤, 多器官功能衰竭发生率、休克死亡率与总体死亡率均显著增加^[13-14]。氢作为一种有效的无毒分子, 在治疗各种与氧化损伤相关的疾病方面具有广泛的潜力^[15]。氢的有效移植保护作用已在小肠移植鼠模型中得到证实, 可改善移植植物收缩性和黏膜屏障功能, 改善远端器官炎症^[16-17]。由于氢的易燃性风险, 长时间使用氢治疗会带来一些操作上的问题。富氢盐水是氢气经过特殊加压方式溶于生理盐水后获得的液体, 作为一种新型抗氧化剂, 被认为是一种新的治疗手段, 对多种器官发挥保护作用^[18-19]。本研究发现富氢盐水在改善高原烧伤小鼠肠道损伤中表现出积极作用, 可减轻肠道病理损伤, 改善肠道屏障功能, 保护肠神经系统。

烧伤后由于循环血容量迅速下降, 可引起微循环障碍, 进而诱导体内脏器缺血缺氧, 最终导致脏器功能不全。胃肠道对缺血缺氧最为敏感, 通常情况下, 烧伤引起体液流失过多, 肠系膜动

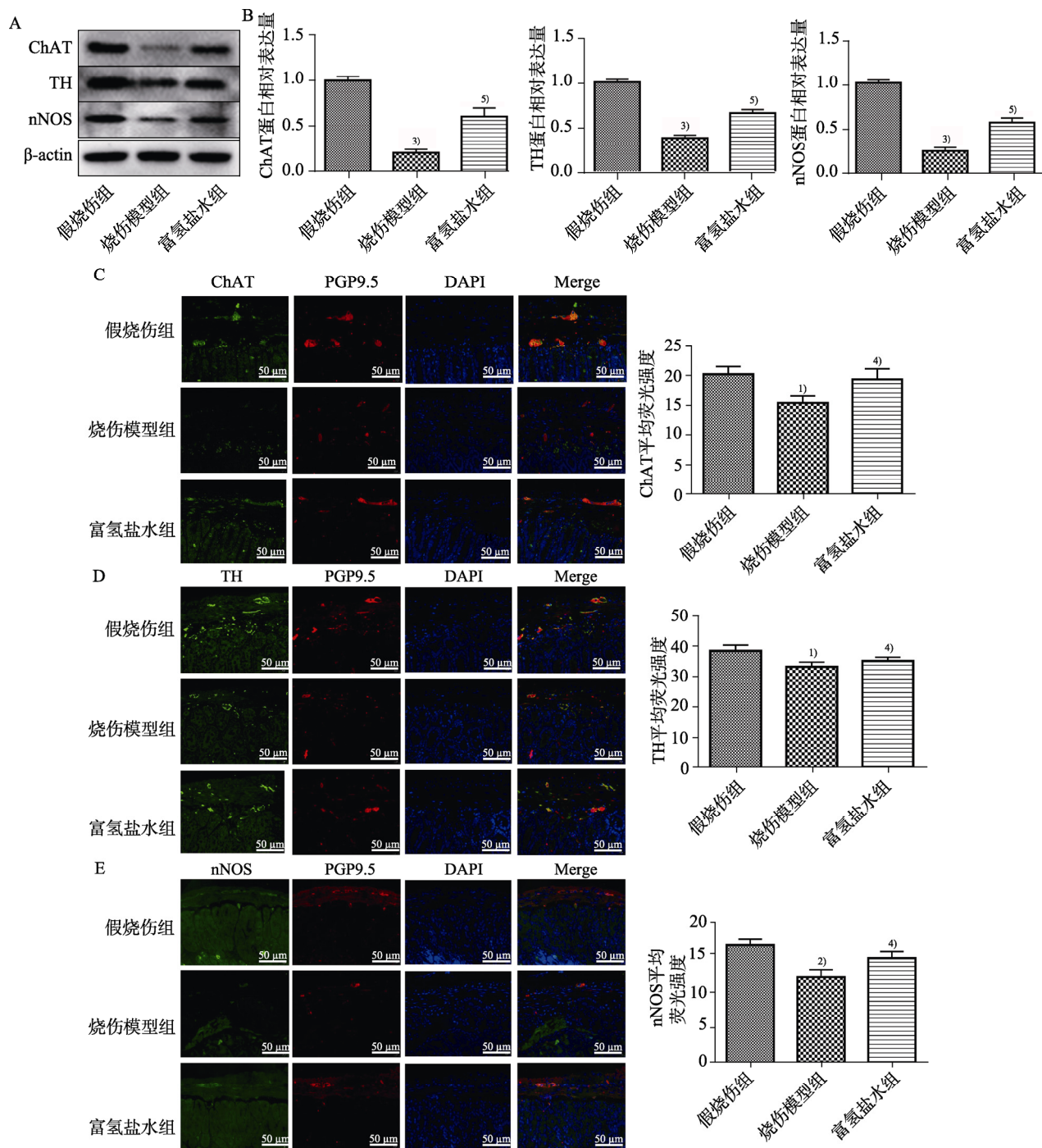


图4 富氢盐水对小鼠小肠组织中 ChAT、TH 和 nNOS 表达的影响

A—Western blotting 检测肠组织中 ChAT、TH 和 nNOS 蛋白的表达；B—ChAT、TH 和 nNOS 的蛋白密度分析；C—肠 ChAT(绿色)和神经元标记物 PGP9.5(红色)免疫荧光染色图(400×)及 ChAT 的平均荧光强度；D—肠 TH(绿色)和 PGP9.5(红色)免疫荧光染色图(400×)及 TH 的平均荧光强度；E—肠 nNOS(绿色)和 PGP9.5(红色)免疫荧光染色图(400×)及 nNOS 的平均荧光强度。免疫荧光中细胞核用 DAPI 染色(蓝色)；与假烧伤组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ ，³⁾ $P<0.001$ ；与烧伤模型组比较，⁴⁾ $P<0.05$ ，⁵⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 4 Effects of hydrogen-rich saline on the expression of ChAT, TH and nNOS in the intestinal tissue of mice

A—Protein expressions of ChAT, TH and nNOS in the intestinal tissue were detected by Western blotting; B—densitometry analysis of the intensity of the protein; C—representative micrographs showing immunofluorescent staining of ChAT(green) and a neuronal marker, PGP9.5(red) in the intestinal tissue(400×)and mean fluorescence intensity of ChAT; D—Representative micrographs showing immunofluorescent staining of TH(green) and PGP9.5 (red)(400×)and mean fluorescence intensity of TH; E—Representative micrographs showing immunofluorescent staining of nNOS(green) and PGP9.5 (red)(400×)and mean fluorescence intensity of nNOS. Nuclei were stained with DAPI(blue) in immunofluorescent. Compared with the sham group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$; compared with the sham group; compared with the burn model group, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.001$.

脉收缩增多，血液重新分布，最终导致肠黏膜缺血缺氧损伤^[20]。严重烧伤和延迟复苏的患者在液

体复苏过程中甚至可能出现缺血-再灌注损伤，进一步损伤肠黏膜，重要脏器损伤和全身炎症反应

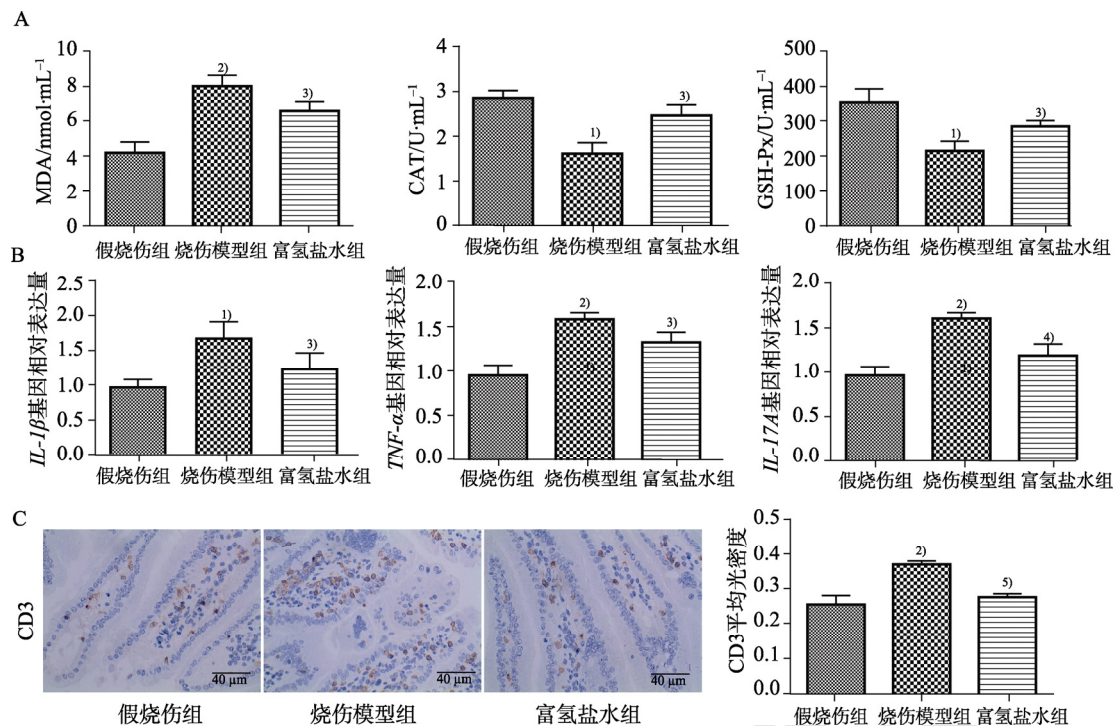


图5 富氢盐水对高原环境烧伤小鼠氧化应激及炎症反应的影响

A-试剂盒检测小鼠血清中MDA、CAT和GSH-Px的表达; B-RT-PCR检测小鼠肠组织中 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $IL-17A$ 的基因表达; C-免疫组化法检测小鼠肠CD3 T淋巴细胞的表达情况(400 $\times$)。与假烧伤组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; 与烧伤模型组比较, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$, ⁵⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 5 Effects of hydrogen-rich saline on oxidative stress and inflammation in mice burned in high altitude environment

A-Expressions of MDA, CAT and GSH-Px were detected by corresponding kits; B-gene expressions of $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$ and $IL-17A$ in the intestinal tissue were detected by RT-PCR; C-expression of CD3 T lymphocytes in the intestinal tissue of mice was detected by IHC(400 $\times$). Compared with the sham group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; compared with the burn model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$, ⁵⁾ $P<0.001$.

风险增加^[21]。及时有效地保护肠黏膜的屏障功能在控制肠损伤中至关重要^[22-23]。肠屏障由上皮细胞和顶端连接复合体组成,在阻止有毒物质的通过和允许营养物质的吸收和分泌方面发挥着重要作用^[24]。紧密连接蛋白,包括Occludin和ZO-1,对于维持上皮屏障的完整性至关重要^[25]。本研究发现富氢盐水可显著增加肠道中ZO-1和Occludin的表达,对肠道屏障表现出改善作用。此外,肠神经系统是胃肠道的重要组成部分,肠神经系统的病理改变是胃肠道功能障碍的潜在原因^[26]。本研究发现高原烧伤小鼠肠神经递质ChAT、TH和nNOS表达显著降低,富氢盐水可显著增加肠组织肠神经递质的表达,对肠神经系统亦表现出保护作用。

当肠屏障被破坏时,腔内毒素和抗原通过该屏障并穿透皮下组织,引起黏膜氧化应激和全身炎症反应^[27]。氧化应激在肠黏膜损伤中起重要作用,脂质过氧化引起的细胞损伤是氧化应激损伤的原因之一^[28]。在本研究中,笔者发现富氢盐水可显著下调MDA,上调CAT和GSH-Px的表达,提示富氢盐水作用可抑制高原严重烧伤诱导的氧化应激。此外,创面损伤导致机体产生各种炎症

反应。在肠道环境中,肠道炎症与黏膜屏障密切相关^[29]。炎症反应可导致肠道黏膜屏障的破坏和通透性的增加,导致微生物群的暴露和肠道代谢物的渗漏,从而进一步加重炎症反应^[30]。本研究发现富氢盐水可显著降低炎症因子 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $IL-17A$ 的表达,减少CD3 T淋巴细胞浸润,对烧伤导致炎症反应有较好的抑制作用。

综上所述,富氢盐水可显著改善高原环境下烧伤小鼠的肠道病理损伤,修复肠黏膜屏障,并对肠神经系统发挥保护作用,其机制可能与缓解氧化应激及炎症反应进程有关。

REFERENCES

- [1] BARRETT L W, FEAR V S, WAITHMAN J C, et al. Understanding acute burn injury as a chronic disease[J]. Burns Trauma, 2019(7): 23.
- [2] CHI Y F, LIU X Y, CHAI J K. A narrative review of changes in microvascular permeability after burn[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(8): 719.
- [3] WILMORE D W, SMITH R J, O'DWYER S T, et al. The gut: A central organ after surgical stress[J]. Surgery, 1988, 104(5): 917-923.
- [4] BECKMANN N, PUGH A M, CALDWELL C C. Burn injury

- alters the intestinal microbiome's taxonomic composition and functional gene expression[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205307.
- [5] ZHOU W J. The effects of oxidative stress on the apoptosis and apoptotic-related gene expression of enterocytes after severe burn with delayed resuscitation in rats at plateau[D]. Lanzhou: Lanzhou university, 2009.
- [6] DONG A L, YU Y, WANG Y Y, et al. Protective effects of hydrogen gas against Sepsis-induced acute lung injury via regulation of mitochondrial function and dynamics[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018(65): 366-372.
- [7] MO X Y, LI X M, SHE C S, et al. Hydrogen-rich saline protects rat from oxygen glucose deprivation and reperfusion-induced apoptosis through VDAC1 via Bcl-2[J]. *Brain Res*, 2019(1706): 110-115.
- [8] ZOU R, WANG M H, CHEN Y, et al. Hydrogen-rich saline attenuates acute lung injury induced by limb ischemia/reperfusion via down-regulating chemerin and NLRP3 in rats[J]. *Shock*, 2019, 52(1): 134-141.
- [9] MIAO M S, WANG T, TIAN S. Specifications for preparation of burn and scald injury models (draft)[J]. *Chin J Exp Trad Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(24): 11-16.
- [10] 彭旦明, 刘雯. 烧(烫)伤动物模型的建立及评价[J]. *辽宁中医杂志*, 2011, 38(9): 1712-1713.
- [11] SPRONK I, LEGEMATE C, OEN I, et al. Health related quality of life in adults after burn injuries: A systematic review[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0197507.
- [12] HE W, WANG Y, WANG P, et al. Intestinal barrier dysfunction in severe burn injury[J]. *Burns Trauma*, 2019(7): 24.
- [13] YAN X P. Autophagic flux and myocardial damage is mediated by changed lysosomal V-ATPase activity following burns under plain and plateau environment[D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2017.
- [14] 彭建军. 高原地区烧伤后多系统功能衰竭 28 例临床分析[J]. *青海医药杂志*, 2006, 36(7): 67.
- [15] NAITO H, NOJIMA T, FUJISAKI N, et al. Therapeutic strategies for ischemia reperfusion injury in emergency medicine[J]. *Acute Med Surg*, 2020, 7(1): e501.
- [16] BUCHHOLZ B M, KACZOROWSKI D J, SUGIMOTO R, et al. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury[J]. *Am J Transplant*, 2008, 8(10): 2015-2024.
- [17] BUCHHOLZ B M, MASUTANI K, KAWAMURA T, et al. Hydrogen-enriched preservation protects the isogeneic intestinal graft and amends recipient gastric function during transplantation[J]. *Transplantation*, 2011, 92(9): 985-992.
- [18] YAO L, CHEN H G, WU Q H, et al. Hydrogen-rich saline alleviates inflammation and apoptosis in myocardial I/R injury via PINK-mediated autophagy[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(3): 1048-1062.
- [19] CHU X L, CAO L L, YU Z Y, et al. Hydrogen-rich saline promotes microglia M2 polarization and complement-mediated synapse loss to restore behavioral deficits following hypoxia-ischemic in neonatal mice via AMPK activation[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 104.
- [20] WANG P, FENG Y H, WANG S B, et al. Significance of intestinal fatty acid binding protein in evaluation of intestinal barrier dysfunction of mice at early stage of severe burn injury[J]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 2019, 35(6): 459-463.
- [21] NIELSON C B, DUETHMAN N C, HOWARD J M, et al. Burns: pathophysiology of systemic complications and current management[J]. *J Burn Care Res*, 2017, 38(1): e469-e481.
- [22] MALLICK I H, YANG W X, WINSLET M C, et al. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury[J]. *Dig Dis Sci*, 2004, 49(9): 1359-1377.
- [23] ZHANG T, LU S H, YANG X X, et al. Protective effect of amomi fructus water extraction on intestinal mucositis induced by 5-FU[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2019, 36(3): 286-291.
- [24] MARCHIANDO A M, GRAHAM W V, TURNER J R. Epithelial barriers in homeostasis and disease[J]. *Annu Rev Pathol*, 2010(5): 119-144.
- [25] BALDA M S, MATTER K. Tight junctions at a glance[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 22): 3677-3682.
- [26] FURNESS J B. The enteric nervous system and neurogastroenterology[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 9(5): 286-294.
- [27] LING K H, WAN M L Y, EL-NEZAMI H, et al. Protective capacity of resveratrol, a natural polyphenolic compound, against deoxynivalenol-induced intestinal barrier dysfunction and bacterial translocation[J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29(5): 823-833.
- [28] BHATTACHARYA A, CHATTOPADHYAY R, MITRA S, et al. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(2): 329-354.
- [29] SÁNCHEZ DE MEDINA F, ROMERO-CALVO I, MASCARAQUE C, et al. Intestinal inflammation and mucosal barrier function[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(12): 2394-2404.
- [30] ONALI S, FAVALE A, FANTINI M C. The resolution of intestinal inflammation: The peace-keeper's perspective[J]. *Cells*, 2019, 8(4): 344.

收稿日期: 2022-01-11
(本文责编: 陈怡心)