

## 综述

# 甲烷抗炎、抗氧化和抗凋亡生物学效应的研究进展

胡静芸<sup>1,\*\*</sup>, 蔡明<sup>2,\*\*</sup>, 王茜<sup>1</sup>, 姜淑杰<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>上海体育学院运动人体科学学院, 上海 200438; <sup>2</sup>上海健康医学院康复学院, 上海 201318

**摘要:** 甲烷(CH<sub>4</sub>)是结构最简单的碳氢化合物, 之前认为只有哺乳动物的口腔和胃肠道中的产甲烷菌才能生成CH<sub>4</sub>。但是近年来研究显示, 动物体内的胆碱及其代谢物也能分解或转变成CH<sub>4</sub>, 这种内源性CH<sub>4</sub>具有保护细胞膜免受活性氧(reactive oxygen species, ROS)的攻击以及促进细胞膜修复的作用。此外, 外源性CH<sub>4</sub>具有较强的抗炎、抗氧化、抗凋亡的生物学效应, 提高脑、心脏、肝脏等多种组织器官的抗氧化能力, 减轻其氧化应激损伤和炎症损伤的程度, 对多种临床疾病的治疗具有研究和应用价值。因此, 本文综述近年来CH<sub>4</sub>在哺乳动物体内的合成代谢及其抗炎、抗氧化和抗凋亡的生物学功能方面的最新研究进展, 为预防和治疗氧化应激相关疾病的研究提供新的治疗策略和切入点。

**关键词:** 甲烷; 合成代谢; 抗炎; 抗氧化; 小分子气体

**中图分类号:** R3

## Research advances on anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic biological effects of methane

HU Jing-Yun<sup>1,\*\*</sup>, CAI Ming<sup>2,\*\*</sup>, WANG Qian<sup>1</sup>, LOU Shu-Jie<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>School of Kinesiology, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China; <sup>2</sup>School of Rehabilitation, Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201318, China

**Abstract:** Methane (CH<sub>4</sub>) is the simplest hydrocarbons and endogenous CH<sub>4</sub> has been thought only to be generated by methanogens in the oral cavity and gastrointestinal tract of the mammals. However, recent animal studies have shown that endogenous CH<sub>4</sub> can also be generated from choline and its metabolites in the mammals to protect the plasma membrane from reactive oxygen species attack and repair the membrane. In addition, exogenous CH<sub>4</sub> can ameliorate the oxidative stress injury of multiple tissues and organs through its anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptosis effects. This paper reviews the recent researches about CH<sub>4</sub> synthetic metabolism and biological functions, and highlights its potential of wide application in the prevention and treatment of oxidative stress related diseases and the significance for the development of gas medicine.

**Key words:** CH<sub>4</sub>; synthetic metabolism; anti-inflammatory; antioxidant; small-molecule gases

甲烷(methane, CH<sub>4</sub>)是由1个碳和4个氢原子通过sp<sup>3</sup>杂化的方式组成的结构最简单的碳氢化合物, 相对分子质量只有16。自然界中的CH<sub>4</sub>俗称

瓦斯, 无色无味无毒, 是天然气、沼气、煤气等的主要成分, 且是一种优质燃料<sup>[1]</sup>。近些年研究显示, 牛、羊等反刍动物瘤胃内能产生大量的CH<sub>4</sub>, 而且

Received 2017-07-03 Accepted 2017-09-25

Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81572241), Graduate Student Education Innovation Projects of Shanghai University of Sport (No. yjscx2016018) and Shanghai Key Laboratory of Human Sport Competence Development and Maintenance (Shanghai University of Sport) (No. 11DZ2261100).

\*\*These authors contributed equally to this review.

\*Corresponding author. Tel: +86-21-51253243; E-mail: shujielou319@163.com

人的口腔、胃肠道等部位也能产生  $\text{CH}_4$  [2-4]。

随着对气体小分子的研究逐渐成熟, 小分子气体递质在疾病治疗中的作用越来越受关注。现已研究表明,  $\text{H}_2$  作为一种小分子气体递质具有一定的抗炎和抗氧化生理功能, 在临床上能治疗神经系统疾病、组织缺血再灌注损伤、代谢综合征等 [5,6]。  $\text{CH}_4$  和  $\text{H}_2$  有许多共同特点, 它们都是易扩散、无毒性的小分子气体, 键能也非常接近。因此, 人们猜想  $\text{CH}_4$  是否也具有类似  $\text{H}_2$  的抗炎和抗氧化效应。最近的动物实验显示, 补充一定浓度的外源性  $\text{CH}_4$  能显著减轻大鼠肝脏 [7-10]、脑 [11,12]、心脏 [13] 等组织器官的炎症和氧化应激损伤。但是, 目前关于  $\text{CH}_4$  这种小分子气体抗炎、抗氧化、抗凋亡的生物学效应的深入系统研究还非常少, 而且都处于动物基础研究阶段, 但这些研究均预示着  $\text{CH}_4$  在临床氧化应激相关疾病的治疗方面具有巨大的应用潜力和价值。

## 1 $\text{CH}_4$ 的概述

$\text{CH}_4$  是最简单的烃, 几何构型为正四面体, 四个键的键长相同, 键角为  $109^\circ 28'$ , 无孤对电子, 键能为  $414 \text{ kJ/mol}$  [14]。

随着科学家们不断发现气体小分子在人体中的广泛应用和重要的生理作用, 在 2002 年创造了“气体递质 (gasotransmitter)”这个名词 [15], 气体递质的分类和标准有: (1) 小分子气体, 能或是不能溶解于生物环境中; (2) 可自由穿过细胞膜。因此, 它们穿过细胞并不依赖于膜受体或转运体; (3) 需要特异性底物和酶才能在哺乳动物细胞内生成; 其生成与代谢由信号传递功能调控; (4) 一定的生理浓度才能在机体内发挥特定的生理功能; (5) 外源性的气体分子可以模拟内源性的气体在体内所发挥的生理功能; (6) 它们参与信号转导, 有明确的细胞和分子靶点。目前符合上述标准的气体递质包括  $\text{NO}$ 、 $\text{CO}$ 、 $\text{H}_2\text{S}$ 、 $\text{H}_2$  等。尽管与这些已被公认的气体递质相比,  $\text{CH}_4$  有许多不同之处, 如它是有机物, 没有孤电子对, 不参与亲核反应以及酸碱反应的活跃性低等。但是,  $\text{CH}_4$  参与了多种反应 (卤化和氢的生产等), 表明它也具有气体递质的反应能力。更重要的是  $\text{CH}_4$  完全符合气体递质标准的前两点, 部分符合第三和第五点。因此, 它被认为可能是气体递质 [14,16]。

## 2 内源性 $\text{CH}_4$ 的生成

### 2.1 产甲烷菌生成 $\text{CH}_4$

近年来研究显示, 胃肠道和口腔内存在一种重

要的微生物——产甲烷菌, 且以甲烷短杆菌属居多。产甲烷菌能利用  $\text{CO}_2$ 、 $\text{H}_2$ 、醋酸这些细菌代谢产物和环境中的甲基化合物来生成  $\text{CH}_4$ , 为需氧菌提供碳源和能量来源 [17-20]。胃肠道内的甲烷优势菌是史氏甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter smithii*, *M. smithii*), 它占甲烷菌总数的 94% [21]。它生成的  $\text{CH}_4$  参与了胃肠道功能紊乱的病理过程 [17,18,22], 临床上常通过检测呼出的  $\text{CH}_4$  水平来反映胃肠道内  $\text{CH}_4$  生成的情况, 从而预测一些肠道疾病的类型及发病进程 [23-26]。Kemp 和 Brusa 等发现灵长类动物和人类的口腔中存在产甲烷菌 [27,28], 而人类口腔中的产甲烷菌在抗原性上接近于胃肠道内的产甲烷菌 [29]。Vianna 和 Kulik 等发现口腔甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter oralis*, *M. oralis*) 是引起牙周炎的优势菌 [20,30]。 *M. oralis* 只存在于牙周炎患者口腔中, 而健康人群的口腔中几乎不存在 [31]。它的生成量与牙周炎的严重程度显著相关, 可作为牙周炎的生物标记, 其量化有助于诊断牙周炎病情以及制定后续治疗方案 [3,32]。

### 2.2 胆碱及其代谢物分解/转变为 $\text{CH}_4$

近年来研究显示, 哺乳动物的线粒体、真核细胞在低氧的情况下会生成  $\text{CH}_4$ , 用于改善机体内的氧化应激。Ghyczy 等研究显示, 低氧条件下培养大鼠肝脏线粒体和牛主动脉内皮细胞, 会促使胆碱及其代谢物与羟基自由基结合生成  $\text{CH}_4$ , 这个反应可能是对还原反应的防御性响应, 而生成的  $\text{CH}_4$  则用于改善氧化还原失衡的状态 [33,34]。

低氧与线粒体功能紊乱关系密切, 在低氧的环境中线粒体会生成大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 对线粒体造成氧化损伤, 导致线粒体功能受损 [35]。Tuboly 等研究显示, 在注射叠氮化钠前给大鼠服用磷脂酰胆碱, 能显著抑制大鼠低氧时引起的 ROS 生成, 伴随  $\text{CH}_4$  呼出量减少, 从而起到保护线粒体功能的作用 [36]。而  $\text{CH}_4$  的呼出量减少是由于这些生成的内源性  $\text{CH}_4$  中和了自由基, 改善了机体内的氧化还原失衡。这种磷脂酰胆碱分解/转变的  $\text{CH}_4$  同样也能改善大鼠肠缺血再灌注导致的肠道炎症 [37]。其机制在于磷脂酰胆碱中的胆碱成分通过分解/转变为内源性  $\text{CH}_4$  来应对 ROS 对细胞膜的攻击以及参与细胞膜的修复, 从而减轻组织器官损伤。

## 3 $\text{CH}_4$ 的抗炎、抗氧化、抗凋亡生物学效应

Deñega 在 1968 年就发现, 给大鼠在大出血缺

氧期间吸入含有 CH<sub>4</sub> 的混合气体,能显著延长大鼠的存活时间<sup>[38]</sup>,提示吸入 CH<sub>4</sub> 能改善大鼠的贫血性缺氧和组织供血不足,但是其原理以及机制并不清楚。基于这些理论与研究的发现,Boros 等认为 CH<sub>4</sub> 可能具有抗炎的作用,并在 2012 年证明了这一猜想<sup>[39]</sup>。此后,关于 CH<sub>4</sub> 抗炎、抗氧化、抗凋亡的生物学效应引起广泛关注。

### 3.1 CH<sub>4</sub>在氧化应激相关疾病中的研究

#### 3.1.1 CH<sub>4</sub>改善肠道和肝脏的氧化应激与炎症损伤

Boros 等先给大鼠在低氧期间连续 4 h 吸入 2.5% 的 CH<sub>4</sub> 空气混合气体,发现 CH<sub>4</sub> 不仅能降低小肠和肺部髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 的活性,改善低氧引起的炎症反应,而且对大鼠血液的血气成分 pH、spaO<sub>2</sub>、paO<sub>2</sub> 这些生理指标没有明显影响,并使血液中 paCO<sub>2</sub> 显著降低,这可能是由于 CH<sub>4</sub> 具有降低血管阻力,舒张血管的作用。随后他们建立了犬肠缺血再灌注的模型,发现在再灌注前给犬吸入 2.5% 的 CH<sub>4</sub> 混合空气不仅不会影响它们的血液化学成分以及血流动力,而且还能改善缺血再灌注诱导的氧化应激和硝化应激,减轻炎症对肠道造成的损伤。其机制在于外源性 CH<sub>4</sub> 能调节白细胞活性,改善缺血再灌注诱导的氧化应激,从而减轻炎症的危害<sup>[39]</sup>。但是,Boros 等并没有说明给大鼠和犬吸入该浓度 CH<sub>4</sub> 气体的原因和标准。Zhang 等给葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 所诱导的结肠炎小鼠连续 3 天注射 16 mL/kg 的 CH<sub>4</sub> 水后,发现 CH<sub>4</sub> 水能抑制小鼠血清中 IL-6 的水平。在形态学上,CH<sub>4</sub> 能减少炎症细胞的浸润,减轻粘膜结构的破坏程度。同时,它还能抑制小鼠的体重下降以及结肠长度变短,降低疾病活动指数 (disease activity index, DAI),从而抑制结肠炎的发展,延长小鼠的存活时间。其机制在于 CH<sub>4</sub> 能通过激活巨噬细胞内 PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  信号通路来促进 IL-10 的表达,以抑制 NF- $\kappa$ B、MAPK 信号通路以及下游炎症因子的释放,从而抑制先天性免疫应答和宿主保护性免疫应答反应,最终达到抑制炎症 (如结肠炎) 的作用。此外,他们在研究中还发现,DSS 诱导前后给予 CH<sub>4</sub> 水均能抑制免疫反应,但是 DSS 诱导后给予 CH<sub>4</sub> 水的效果更佳<sup>[40]</sup>。这些研究结果表明,CH<sub>4</sub> 能通过抗炎、抗氧化的途径减轻肠道的炎症。

Ye 等在肝脏缺血再灌注手术前给 SD 大鼠注射 CH<sub>4</sub> 水,发现 CH<sub>4</sub> 水能抑制肝脏缺血再灌注损伤导致的丙氨酸转氨酶 (ALT)、天门冬氨酸转氨酶 (AST)

活性升高,降低肝脏炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的表达和 Caspase-3 活性,减少 MDA、8-OHdG 生成,提高肝组织抗氧化能力,减轻肝脏的氧化应激损伤。在形态学上,CH<sub>4</sub> 能减少缺血再灌注损伤后肝细胞凋亡数量和坏死的面积,保护肝细胞形态结构完整。因此 CH<sub>4</sub> 能通过抗炎、抗氧化、抗凋亡的途径显著改善肝脏缺血再灌注损伤。此外,他们在再灌注时给大鼠腹腔注射不同剂量的 CH<sub>4</sub> 水,发现 10 mL/kg 体重的注射剂量对肝脏缺血再灌注损伤的改善效果最佳<sup>[7]</sup>。Strifler 等认为外源性 CH<sub>4</sub> 在肝脏缺血再灌注损伤后,通过影响肝脏线粒体的呼吸活动,从而起到抗炎的作用。在再灌注的过程中吸入 2.2% 的 CH<sub>4</sub> 混合空气能够降低细胞色素 c 氧化酶 (cytochrome c oxidase, COX) 活性,改善肝脏线粒体膜损伤的程度,同时减少肝细胞凋亡的面积和肝脏的 MDA 生成,减轻肝脏氧化应激损伤<sup>[8]</sup>。在刀豆素诱导的自身免疫性肝炎的模型中,He 等利用 CH<sub>4</sub> 抗炎和抗氧化的生物学效应,给肝炎小鼠腹腔注射 20 mL/kg 体重的 CH<sub>4</sub> 水,发现 CH<sub>4</sub> 能显著降低血清中 ALT、AST 活性以及肝脏中 TNF- $\alpha$ 、TNF- $\gamma$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平,提高肝脏中 IL-10 水平,减少肝脏的炎症损伤。他们认为 CH<sub>4</sub> 能改善肝损伤的机制在于抑制了 NF- $\kappa$ B 和 P38 MAPK 的炎症信号通路,降低 I $\kappa$ B $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 和 P38 的磷酸化。此外,CH<sub>4</sub> 还能减少肝脏中 MDA 和 8-OHdG 生成,提高 SOD、CAT 这些抗氧化酶的活性,减轻肝炎对肝脏造成的应激损伤,从而减少肝脏细胞的坏死区域<sup>[9]</sup>。Yao 等在 CCl<sub>4</sub> 所诱导的小鼠急性肝损伤模型中发现,注射 16 mL/kg CH<sub>4</sub> 水能显著降低小鼠血清中 ALT、AST 的水平,抑制血清和白细胞中 CXCL-1、ICAM-1、MPO 的表达,从而减轻肝脏的炎症;而且 CH<sub>4</sub> 水还能保护肝细胞结构的完整性,抑制 CCl<sub>4</sub> 所导致的肝细胞坏死、肝静脉淤塞、白细胞渗透、气球样变性以及肝脏质地异常这些病理变化。他们认为 CH<sub>4</sub> 是通过活化 PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  信号通路和抑制 NF- $\kappa$ B、MAPK 信号通路,从而促进抗炎因子 IL-10 生成,以及抑制下游炎症因子 (如 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ ) 的表达<sup>[10]</sup>。我们研究组的研究显示 (待发表数据),在运动前给 SD 大鼠灌服 4 mL 的 CH<sub>4</sub> 水 (0.99 mmol/L) 能减少肝脏中 MDA 的生成,提高抗氧化酶 T-AOC、SOD 和 GSH-PX 活性,从而改善肝脏的氧化应激。这些研究表明,CH<sub>4</sub> 能通过抗炎、抗氧化的途径改善肝脏的氧化应激和炎症损伤。



### 3.1.2 CH<sub>4</sub>改善脑、视网膜以及脊髓的氧化应激与炎症损伤

Fan 和 Shen 等通过建立大鼠 CO 中毒的模型, 发现在 CO 暴露 1 h 后腹腔注射 3 次 (即刻、8 h、16 h) 10 mL/kg 体重的 CH<sub>4</sub> 水能改善大鼠海马和大脑皮层的炎症和氧化应激损伤。研究显示, CH<sub>4</sub> 水能显著减少大鼠在急性 CO 中毒 1 天以及 9 天后海马和大脑皮层中 MDA、3-NT、8-OHdG 生成, 提高 SOD 活性, 减轻海马和皮层的氧化应激损伤; 降低因急性 CO 中毒导致的海马和皮层内 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平的升高, 减轻海马和皮层的炎症损伤。他们的研究表明, CH<sub>4</sub> 对大鼠在急性 CO 中毒后具有神经保护作用<sup>[11,12]</sup>。CH<sub>4</sub> 水通过其抗炎、抗氧化、抗凋亡的生物学效应改善了大鼠因急性 CO 中毒引起的延迟性脑病。

Wu 等通过给糖尿病大鼠连续 8 周注射 5 mL/kg 体重的 CH<sub>4</sub> 水, 发现 CH<sub>4</sub> 能显著抑制视网膜内炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平的升高, 改善视网膜的炎症损伤; 它还能降低视网膜内 VEGF 和 GFAP 的蛋白表达, 抑制视网膜不正常的血管新生和神经胶质反应。在形态学上, 注射 CH<sub>4</sub> 水后, 糖尿病大鼠视网膜厚度明显变薄, 神经节细胞减少的情况改善, 血视屏障通透性降低。CH<sub>4</sub> 改善糖尿病大鼠视网膜病变的机制在于它上调了糖尿病大鼠视网膜内 miR-192-5p 和 miR-335 的表达, 从而减轻视网膜的炎症损伤, 对视网膜病变有显著的治疗效果<sup>[41]</sup>。Liu 等研究显示, 在大鼠视网膜缺血再灌注期间给大鼠腹腔注射 25 mL/kg 体重的 CH<sub>4</sub> 水能减少因缺血再灌注导致的视网膜神经节细胞丢失, 改善大鼠视网膜层变薄和视觉功能障碍; 显著减少视网膜内氧化产物 MDA、8-OHdG、4-HNE 的生成, 提高 SOD、CAT、GPx 的活性, 提高视网膜的抗氧化能力, 促进氧化与抗氧化系统平衡; 它还能促进视网膜内抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 抑制促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3、Caspase-9 的表达及活性, 通过抗氧化、抗凋亡的生物学效应改善 SD 大鼠视网膜缺血再灌注损伤<sup>[42]</sup>。

Wang 等研究显示, 给脊髓缺血再灌注损伤的 SD 大鼠腹腔注射 10 mL/kg 体重的 CH<sub>4</sub> 水能提高大鼠在再灌注期间脊髓内 CH<sub>4</sub> 浓度, 提高灰质中神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞内 Nrf2 的转录活性; 提高 HO-1 和抗氧化酶 SOD、CAT、GSH 的活性, 减少氧化物的生成, 从而减轻脊髓的氧化应激损伤;

降低 NF- $\kappa$ B、CXCL1、TNF- $\alpha$ 、IL-1、ICAM-1、MPO 活性, 改善脊髓炎症损伤; 抑制 CytoC 释放到胞质中, 以及抑制 Caspase-3、Caspase-9 的活性, 从而减少灰质内的神经元凋亡; CH<sub>4</sub> 还能通过抑制 MMP-9 活性、促进紧密连接相关蛋白 ZO-1、Claudin-5、Occludin 的表达, 从而改善血-脊髓屏障功能障碍。因此, CH<sub>4</sub> 能通过促进 Nrf2 的活性, 从而起到抗炎、抗氧化、抗凋亡的作用, 最终改善 SD 大鼠脊髓缺血再灌注损伤<sup>[43]</sup>。而 Wang 等给脊髓损伤的大鼠注射 CH<sub>4</sub> 水后发现, 不同剂量的 CH<sub>4</sub> 水均能促进大鼠的运动功能恢复, 而 20 mL/kg 的剂量效果更好。它能减少 MDA 的生成, 提高 SOD 的活性, 抑制 TNF- $\alpha$  等炎症因子的表达, 起到抗炎、抗氧化的生物效应; 它能抑制 Caspase-3 的活性, 减少 TUNEL 阳性细胞数量, 降低细胞凋亡率, 起到抗凋亡的作用; 它还能减少 Ib- $\alpha$  (离子钙结合转接分子) 阳性细胞数量, 从而抑制小胶质细胞的激活。研究表明, CH<sub>4</sub> 水通过其抗炎、抗氧化、抗凋亡的作用, 抑制了小胶质细胞的激活及其引起的氧化应激与炎症, 从而减轻脊髓损伤<sup>[44]</sup>。

### 3.1.3 CH<sub>4</sub>改善其它组织器官的氧化应激与炎症损伤

Chen 等给心肌梗死大鼠在冠状动脉左前降支手术 30 min 后注射 0.6 mL/kg、2.5 mL/kg、10 mL/kg 体重的 CH<sub>4</sub> 水, 发现不同剂量的 CH<sub>4</sub> 水均能减少心肌梗死面积, 降低心肌梗死率和 CK-MB、cTnI 等血清心肌酶的活性, 减轻心肌氧化应激和炎症损伤; 还能减少细胞凋亡, 改善心肌功能, 抑制心肌重塑。CH<sub>4</sub> 这种改善心肌功能的作用具有剂量依赖性, 剂量越大治疗效果越明显, 而 10 mL/kg 体重的 CH<sub>4</sub> 水对心肌梗死的改善作用最佳。10 mL/kg 体重的 CH<sub>4</sub> 水能降低心肌梗死后的血液 pCO<sub>2</sub>, 改善血液循环; 抑制心肌内 Bax、Caspase-9、Caspase-3 表达, 提高 Bcl-2 表达, 减少 TUNEL 阳性细胞数量, 减少心肌细胞的凋亡。研究表明, CH<sub>4</sub> 能通过抗炎、抗氧化、抗凋亡的途径减轻心肌梗死的程度<sup>[13]</sup>。此外, 我们研究组的研究显示, 在运动前给 SD 大鼠灌服 4 mL 的 CH<sub>4</sub> 水 (0.99 mmol/L) 能减少心脏中 MDA 的生成, 提高抗氧化酶 T-AOC、SOD 活性, 从而改善心脏的氧化应激, 提高大鼠的运动能力, 延长其运动时间<sup>[45]</sup>。

Song 等研究显示, 在腹部皮瓣缺血再灌注手术前和手术后给大鼠注射 CH<sub>4</sub> 水都能改善皮瓣细胞生存状况和炎症浸润程度, 显著减少凋亡细胞数量,

促使血流供应快速恢复。在手术后第3天,腹部皮瓣缺血再灌注组中注射了CH<sub>4</sub>水的大鼠与其手术对照组相比,皮瓣中抗凋亡蛋白Bcl-2表达升高,ASK-1和JNK磷酸化水平及促凋亡蛋白Bax表达下降,Caspase-3活性也显著降低。这表明CH<sub>4</sub>能通过抗凋亡的途径改善皮瓣缺血再灌注引起的炎症损伤<sup>[46]</sup>。

Xie等研究显示,给急性胰腺炎的小鼠注射CH<sub>4</sub>生理盐水能降低胰腺中淀粉酶和脂肪酶的水平,抑制炎症细胞浸润和炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 的表达,减轻炎症发生的程度;降低MPO活性,提高抗氧化酶SOD的活性,改善氧化应激损伤;它还能减少细胞的凋亡,抑制Caspase-3的表达,起到抗凋亡的作用。这表明CH<sub>4</sub>能通过抗炎、抗氧化、抗凋亡的途径减轻胰腺炎的发生程度<sup>[47]</sup>。

Sun等研究显示,在脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)干预前给大鼠注射CH<sub>4</sub>水能抑制炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 的表达,减轻大鼠肺部的炎症;减少氧化物生成,提高抗氧化酶的活性,改善肺部的氧化应激损伤;抑制Caspase-3的活性,减少凋亡细胞;它还能提高氧合指数(PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub>)、降低肺通透指数(lung permeability index, LPI)、肺组织湿/干比重(W/D),减少炎症细胞浸润,改善肺结构,减轻肺损伤的程度。这表明CH<sub>4</sub>能通过抗炎、抗氧化、抗凋亡的途径缓解急性肺损伤<sup>[48]</sup>。

Xin等研究显示,在一次性高强度力竭运动前给SD大鼠腹腔注射10 mL/kg的CH<sub>4</sub>水能提高其在力竭运动中的血糖利用率,减少运动后尿素氮(urea nitrogen, UN)、乳酸(lactic acid, LD)等代谢产物堆积,从而提高大鼠的抗疲劳能力,延长运动至力竭的时间。而在一次性力竭运动中,CH<sub>4</sub>能改善腓肠肌氧化应激和炎症损伤的程度,降低炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 的水平,提高大鼠腓肠肌内T-AOC、IL-10水平,改善一次性力竭运动后大鼠肌细胞的形态结构变化。研究表明,CH<sub>4</sub>能通过抗炎、抗氧化、抗凋亡的途径改善腓肠肌氧化应激和炎症损伤<sup>[49]</sup>。

上述诸多研究都表明了补充一定浓度的外源性CH<sub>4</sub>对组织器官的氧化应激和炎症损伤均具有较好的治疗效果,但是其具体的作用机制却未给出确切的解释。Fink认为CH<sub>4</sub>能发挥抗炎、抗氧化、抗凋亡效应的机制可能是:哺乳动物细胞能以CH<sub>4</sub>为底物,或是细胞内有CH<sub>4</sub>受体,又或是CH<sub>4</sub>有改变

细胞氧化还原环境的生物活性,但这仍有待于进一步的研究验证<sup>[50]</sup>(图1)。

### 3.2 外源性CH<sub>4</sub>的剂量效应

研究表明,无论是吸入还是注射外源性CH<sub>4</sub>,对改善组织器官损伤都有剂量依赖性。Boros等的研究表明吸入外源性的CH<sub>4</sub>气体能显著抑制犬小肠的超氧化物生成,且对超氧化物生成的抑制率随通入CH<sub>4</sub>的浓度升高而升高。1  $\mu$ mol、40  $\mu$ mol、80  $\mu$ mol CH<sub>4</sub>气体对超氧化物生成的抑制率分别为21.4%、41.9%、57%,表明CH<sub>4</sub>对于超氧化物的抑制作用具有剂量效应。此外1  $\mu$ mol、10  $\mu$ mol等不同浓度的CH<sub>4</sub>气体都不会抑制中性粒细胞的活性,而且10  $\mu$ mol CH<sub>4</sub>对其影响更小<sup>[39]</sup>。由于腹腔注射比吸入给药更简便易行,药物能被吸收地更快,效果更好,而且在实际应用中注射比吸入的方式更普及。因此, Ye和Chen等使用腹腔注射及注射不同的剂量来探究CH<sub>4</sub>水是否也能改善组织器官的炎症和氧化应激损伤<sup>[7,13]</sup>。Ye等腹腔注射1 mL/kg、5 mL/kg、10 mL/kg、20 mL/kg以及40 mL/kg体重的CH<sub>4</sub>水(0.99 mmol/L),发现注射不同剂量的CH<sub>4</sub>水均能起到改善肝脏缺血再灌注的作用,其最佳使用剂量是10 mL/kg体重的CH<sub>4</sub>水<sup>[7]</sup>。Chen等使用0.6 mL/kg、2.5 mL/kg、10 mL/kg体重的CH<sub>4</sub>水(0.99 mmol/L),发现注射这三种剂量梯度的CH<sub>4</sub>水也能对心肌梗死起到改善作用,其最佳使用剂量是10 mL/kg体重的CH<sub>4</sub>水<sup>[13]</sup>。之后也有其他的学者根据不同疾病模型来研究CH<sub>4</sub>水的剂量效应,使用浓度均为0.99 mmol/L。例如,Wang等使用0.5 mL/kg、5 mL/kg、20 mL/kg体重的CH<sub>4</sub>水来治疗脊髓损伤的大鼠<sup>[44]</sup>,他发现这三种剂量均能改善脊髓的损伤,但是20 mL/kg剂量的效果最好。Xie等在造模期间使用16 mL/kg、32 mL/kg、48 mL/kg的CH<sub>4</sub>水用于观察不同剂量CH<sub>4</sub>对胰腺炎的作用效果,他们发现48 mL/kg的剂量效果最好<sup>[47]</sup>。Sun等使用2 mL/kg和20 mL/kg的CH<sub>4</sub>水治疗大鼠急性肺损伤,发现20 mL/kg的剂量效果较好<sup>[48]</sup>。这些实验研究表明不同方式给予外源性CH<sub>4</sub>都具有抗炎、抗氧化、抗凋亡的生物学作用,其抗炎、抗氧化、抗凋亡作用具有剂量效应。

## 4 总结与展望

虽然人们自2012年来对CH<sub>4</sub>抗炎、抗氧化、抗凋亡的生物学效应进行了一系列动物实验与探

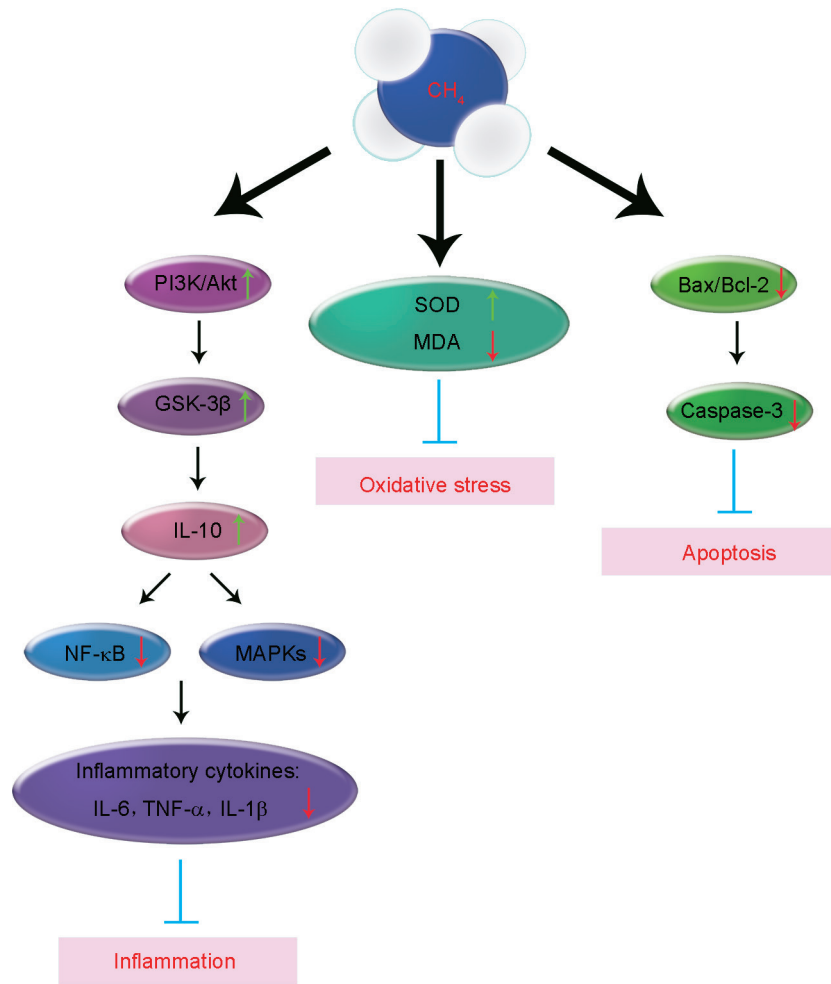


图 1.  $\text{CH}_4$  抗炎、抗氧化、抗凋亡的可能信号机制

Fig. 1. The possible signaling mechanisms of methane playing the anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic effects. Red arrow indicates the down-regulation expression of proteins or decreased MDA content. Green arrow indicates the up-regulation expression of proteins or increased SOD activity. Blue arrow indicates  $\text{CH}_4$  inhibiting inflammation, apoptosis and oxidative stress through PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ , Bax/Bcl-2 signal pathways, decreasing MDA and increasing SOD activity.

究, 但是还有很多问题尚不明确。首先, 目前对于  $\text{CH}_4$  生物学作用的研究范围并不广泛。已有的动物实验大部分是对肠道、肝脏、心脏等组织器官缺血再灌注损伤的研究, 缺少脑、胃、骨骼肌等其它组织器官缺血再灌注损伤模型以及神经系统疾病、泌尿系统疾病等模型的研究和探索, 因此并不能充分说明  $\text{CH}_4$  抗炎、抗氧化、抗凋亡的生物学效应能广泛地适用于所有的组织器官和疾病类型。其次, 人们对于  $\text{CH}_4$  在人体内的生理作用及其作用机制研究目前处于起步阶段, 对于  $\text{CH}_4$  在机体内的细胞信号传导和基因表达等机制的研究均较简单, 其作用机制及对各信号通路的最有效作用靶点尚不明确, 研究这些有效的作用靶点对于氧化应激相关临床疾病的治疗具有重要意义。此外, 关于  $\text{CH}_4$  对血液中基

本的生理指标无毒副作用这一认识也只是来自动物实验的推断。上述这些问题均制约了  $\text{CH}_4$  向临床应用的转化进程。

$\text{CH}_4$  之前一直被认为是机体内不具有生物活性的有害气体, 但是近年来研究发现胆碱及其代谢物分解或转变的内源性  $\text{CH}_4$  能调节氧化与抗氧化系统失衡。此外, 补充外源性  $\text{CH}_4$  能显著改善组织器官炎症、氧化应激损伤, 其抗炎、抗氧化、抗凋亡的生物学效应为今后研究  $\text{CH}_4$  在治疗疾病中的应用提供了新的思路。今后的研究重点应放在  $\text{CH}_4$  对于氧化应激相关疾病的治疗, 以及研究其对多种疾病模型的治疗效果, 并对  $\text{CH}_4$  做出系统安全性评价, 例如  $\text{CH}_4$  的浓度以及使用时间是否会对机体健康产生不利影响等, 这些对于推动  $\text{CH}_4$  的生物学效应研究



由实验研究向临床应用转化具有重要意义。总之,进一步研究和探索 CH<sub>4</sub> 的生物学效应,将为预防和治疗氧化应激相关疾病的研究提供新的治疗策略和切入点,对气体医学的发展具有重要意义。

### 参考文献

- 1 Wuebbles DJ, Hayhoe K. Atmospheric methane and global change. *Earth-Sci Rev* 2002; 57(3-4): 177-210.
- 2 Moraes-Filho JP, Quigley EM. The intestinal microbiota and the role of probiotics in irritable bowel syndrome: a review. *Arq Gastroenterol* 2015; 52(4): 331-338.
- 3 Horz HP, Conrads G. Methanogenic *Archaea* and oral infections - ways to unravel the black box. *J Oral Microbiol* 2011; 3.
- 4 Wang Z, Elekwachi CO, Jiao J, Wang M, Tang S, Zhou C, Tan Z, Forster RJ. Investigation and manipulation of metabolically active methanogen community composition during rumen development in black goats. *Sci Rep* 2017; 7(1): 422.
- 5 Hong Y (洪远), Cheng S, Zhang JM. Research advances on hydrogen therapy in nervous system disease. *J Zhejiang Univ (Med Sci)* (浙江大学学报:医学版) 2010; 39(6): 638-643 (in Chinese with English abstract).
- 6 Dong WB (董文彬), Zheng GL. Medical research advances on hydrogen. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志) 2012; 26(5): 669-673 (in Chinese with English abstract).
- 7 Ye Z, Chen O, Zhang R, Nakao A, Fan D, Zhang T, Gu Z, Tao H, Sun X. Methane attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats through antiapoptotic, anti-inflammatory, and antioxidative actions. *Shock* 2015; 44(2): 181-187.
- 8 Strifler G, Tuboly E, Szél E, Kaszonyi E, Cao C, Kaszaki J, Mészáros A, Boros M, Hartmann P. Inhaled methane limits the mitochondrial electron transport chain dysfunction during experimental liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* 2016; 11(1): e0146363.
- 9 He R, Wang L, Zhu J, Fei M, Bao S, Meng Y, Wang Y, Li J, Deng X. Methane-rich saline protects against concanavalin A-induced autoimmune hepatitis in mice through anti-inflammatory and anti-oxidative pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 470(1): 22-28.
- 10 Yao Y, Wang L, Jin P, Li N, Meng Y, Wang C, Xu M, Zhang Y, Bian J, Deng X. Methane alleviates carbon tetrachloride induced liver injury in mice: anti-inflammatory action demonstrated by increased PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ -mediated IL-10 expression. *J Mol Histol* 2017; 48: 301-310.
- 11 Fan D F, Hu H J, Sun Q, Lv Y, Ye ZH, Sun XJ, Pan SY. Neuroprotective effects of exogenous methane in a rat model of acute carbon monoxide poisoning. *Brain Res* 2015; 1633: 62-72.
- 12 Shen M, Fan D, Zang Y, Chen Y, Zhu K, Cai Z, Liu Y, Sun X, Liu J, Gong J. Neuroprotective effects of methane-rich saline on experimental acute carbon monoxide toxicity. *J Neurol Sci* 2016; 369: 361-367.
- 13 Chen O, Ye Z, Cao Z, Manaenko A, Ning K, Zhai X, Zhang R, Zhang T, Chen X, Liu W, Sun X. Methane attenuates myocardial ischemia injury in rats through anti-oxidative, anti-apoptotic and anti-inflammatory actions. *Free Radic Biol Med* 2015; 90: 1-11.
- 14 Wang R. Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends Biochem Sci* 2014; 39(5): 227-232.
- 15 Wang R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002; 16(13): 1792-1798.
- 16 Boros M, Tuboly E, Mészáros A, Amann A. The role of methane in mammalian physiology-is it a gasotransmitter. *J Breath Res* 2015; 9(1): 014001.
- 17 Roccarina D, Lauritano EC, Gabrielli M, Franceschi F, Ojetti V, Gasbarrini A. The role of methane in intestinal diseases. *Am J Gastroenterol* 2010; 105(6): 1250-1256.
- 18 Matarazzo F, Ribeiro AC, Faveri M, Taddei C, Martinez MB, Mayer MP. The domain *Archaea* in human mucosal surfaces. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(9): 834-840.
- 19 Samuel BS, Gordon JI. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(26): 10011-10016.
- 20 Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2006; 44(4): 1274-1282.
- 21 Scanlan PD, Shanahan F, Marchesi JR. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using mcrA gene analysis. *BMC Microbiol* 2008; 8(1): 1-8.
- 22 Pimentel M, Lin HC, Enayati P, van den Burg B, Lee HR, Chen JH, Park S, Kong Y, Conklin J. Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290(6): 1089-1095.
- 23 Conway de Macario E, Macario AJ. Methanogenic archaea in health and disease: a novel paradigm of microbial pathogenesis. *Int J Med Microbiol* 2009; 299(2): 99-108.
- 24 Weaver GA, Krause JA, Miller TL, Wolin MJ. Incidence of methanogenic bacteria in a sigmoidoscopy population: an association of methanogenic bacteria and diverticulosis. *Gut* 1986; 27(6): 698-704.
- 25 Furnari M, Savarino E, Bruzzone L, Moscatelli A, Gemignani L, Giannini EG, Zentilin P, Dulbecco P, Savarino V. Reassessment of the role of methane production between irritable bowel syndrome and functional constipation. *J Gastrointest Liver Dis* 2012; 21(2): 157-163.
- 26 Peled Y. Methane production and colon cancer. *Gastroenter-*

- ology 1984; 87(3): 601–605.
- 27 Kemp CW, Curtis MA, Robrish SA, Bowen WH. Biogenesis of methane in primate dental plaque. *FEBS Lett* 1983; 155(1): 61–64.
  - 28 Brusa T, Conca R, Ferrara A, Pecchioni A. The presence of methanobacteria in human subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1987; 14(8): 470–471.
  - 29 Belay N, Johnson R, Rajagopal BS, Conway de Macario E, Daniels L. Methanogenic bacteria from human dental plaque. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54(2): 600–603.
  - 30 Kulik EM, Sandmeier H, Hinni K, Meyer J. Identification of archaeal rDNA from subgingival dental plaque by PCR amplification and sequence analysis. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 196(2): 129–133.
  - 31 Bringuier A, Khelaifia S, Richet H, Aboudharam G, Drancourt M. Real-time PCR quantification of *Methanobrevibacter oralis* in periodontitis. *J Clin Microbiol* 2013; 51(3): 993–994.
  - 32 Yamabe K, Maeda H, Kokeguchi S, Tanimoto I, Sono N, Asakawa S, Takashiba S. Distribution of *Archaea*, in Japanese patients with periodontitis and humoral immune response to the components. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 287(1): 69–75.
  - 33 Ghyczy M, Torday C, Kaszaki J, Szabó A, Czóbel M, Boros M. Hypoxia-induced generation of methane in mitochondria and eukaryotic cells: an alternative approach to methanogenesis. *Cell Physiol Biochem* 2008; 21(1–3): 251–258.
  - 34 Ghyczy M, Torday C, Boros M. Simultaneous generation of methane, carbon dioxide, and carbon monoxide from choline and ascorbic acid: a defensive mechanism against reductive stress. *FASEB J* 2003; 17(9): 1124–1126.
  - 35 Duranteau JI, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1998; 273(19): 11619–11624.
  - 36 Tuboly E, Szabó A, Garab D, Bartha G, Janovszky Á, Erős G, Szabó A, Mohácsi Á, Szabó G, Kaszaki J, Ghyczy M, Boros M. Methane biogenesis during sodium azide-induced chemical hypoxia in rats. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; 304(2): 207–214.
  - 37 Ghyczy M, Torday C, Kaszaki J, Szabó A, Czóbel M, Boros M. Oral phosphatidylcholine pretreatment decreases ischemia-reperfusion-induced methane generation and the inflammatory response in the small intestine. *Shock* 2008; 30(5): 596–602.
  - 38 Deñega VG. On some peculiarities of reaction of the body of albino rats to hypoxia during inhalation of methane-oxygen mixtures. *Farmakol Toksikol* 1968; 31(4): 494–497.
  - 39 Boros M, Ghyczy M, Érces D, Varga G, Tókécs T, Kupai K, Torday C, Kaszaki J. The anti-inflammatory effects of methane. *Crit Care Med* 2012; 40(4): 1269–1278.
  - 40 Zhang X, Li N, Shao H, Meng Y, Wang L, Wu Q, Yao Y, Li J, Bian J, Zhang Y, Deng X. Methane limit LPS-induced NF- $\kappa$ B/MAPKs signal in macrophages and suppress immune response in mice by enhancing PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$ -mediated IL-10 expression. *Sci Rep* 2016; 6: 29359.
  - 41 Wu J, Wang R, Ye Z, Sun X, Chen Z, Xia F, Sun Q, Liu L. Protective effects of methane-rich saline on diabetic retinopathy via anti-inflammation in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 466(2): 155–161.
  - 42 Liu L, Sun Q, Wang R, Chen Z, Wu J, Xia F, Fan XQ. Methane attenuates retinal ischemia/reperfusion injury via anti-oxidative and anti-apoptotic pathways. *Brain Res* 2016; 1646: 327–333.
  - 43 Wang L, Yao Y, He R, Meng Y, Li N, Zhang D, Xu J, Chen O, Cui J, Bian J, Zhang Y, Chen G, Deng X. Methane ameliorates spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats: Antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activity mediated by Nrf2 activation. *Free Radic Biol Med* 2017; 103: 69–86.
  - 44 Wang W, Huang X, Li J, Sun A, Yu J, Xie N, Xi Y, Ye X. Methane suppresses microglial activation related to oxidative, inflammatory, and apoptotic injury during spinal cord injury in rats. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017(8): 2190897.
  - 45 Wang Q (王茜), Xin L, Chen XH, Hu JY, Lou SJ. Protective effect of methane water on exhaustive exercise-induced myocardial injury in rats. *J Beijing Sport Univ (北京体育大学学报)* 2017; 40(7): 43–48 (in Chinese with English abstract).
  - 46 Song K, Zhang M, Hu J, Liu Y, Liu Y, Wang Y, Ma X. Methane-rich saline attenuates ischemia/reperfusion injury of abdominal skin flaps in rats via regulating apoptosis level. *BMC Surg* 2015; 15(1): 92.
  - 47 Xie Q, Fei M, Fa Z, Wang L, Wang J, Zhang Y, Wang J, Deng X. Methane-rich saline alleviates cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting inflammatory response, oxidative stress and pancreatic apoptosis in mice. *Int Immunopharmacol* 2017; 51(2017): 17–24.
  - 48 Sun A, Wang W, Ye X, Wang Y, Yang X, Ye Z, Sun X, Zhang C. Protective effects of methane-rich saline on rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 7430193.
  - 49 Xin L, Sun X, Lou S. Effects of methane-rich saline on the capability of one-time exhaustive exercise in male SD rats. *PLoS One* 2016; 11(3): e0150925.
  - 50 Fink MP. Pharmacological effects of inhaled methane: plausible or not. *Crit Care Med* 2012; 40(4): 1379–1380.