

富氢液通过 PI3K 通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤

陈克研, 董婉维

(中国医科大学实验动物部, 沈阳 110001)

【摘要】 目的 探讨富氢液对大鼠脑缺血再灌注致海马神经元凋亡及 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路表达的影响。**方法** 采用线栓法阻塞大鼠大脑中动脉, 建立大鼠局灶性脑缺血/再灌注(I/R)模型, SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、缺血/再灌注组(I/R 组)和富氢液处理组(HRS 组), 每组 10 只; 各组于再灌注后 24 h, ELISA 检测血清中炎症因子 IL-6、TNF- α 及 IL-1 β 的变化; HE 染色观察海马变化, TUNEL 法观察脑组织细胞凋亡情况; Western blot 法检测海马 p-PI3K、Akt、caspase-3 和 FoxO1 蛋白表达变化。**结果** 与 Sham 组相比, I/R 组锥体细胞排列疏松, 大量锥体细胞死亡, 海马凋亡细胞增多, 血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、表达显著增加($P < 0.05$), 脑组织中 p-PI3K、Akt、caspase-3 表达显著升高, FoxO1 蛋白降低, 两组间比较均具有统计学差异($P < 0.05$); 与 I/R 组相比, HRS 组炎症因子显著降低; p-PI3K、Akt、caspase-3 表达水平均显著降低, FoxO1 蛋白升高($P < 0.05$)。**结论** 富氢液可以减轻缺血再灌注导致的脑损伤, 其机制可能与 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路相关。

【关键词】 富氢液; 缺血再灌注; PI3K; FoxO1; 细胞凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 07-0013-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671-7856. 2017. 07. 003

Hydrogen-rich saline reduces cerebral ischemia-reperfusion injury in rats via PI3K pathway

CHEN Ke-yan, DONG Wan-wei

(Department of Laboratory Animal Science, China Medical University, Shenyang 110001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of hydrogen-rich saline on apoptosis in hippocampal neurons induced by cerebral ischemia-reperfusion in rats and PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway. **Methods** The rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion was established by thread-occlusion of the middle cerebral artery in rats. SD rats were randomly divided into sham operation group (Sham group), ischemia-reperfusion group (I/R group) and hydrogen-rich saline treatment group (HRS group), 10 rats in each group. At 24 h after reperfusion, the serum levels of IL-6, TNF- α and IL-1 β were detected by ELISA. Histological changes of the hippocampus were observed by pathology using HE staining. Apoptosis in brain tissues was observed by TUNEL staining. The expression changes of p-PI3K, Akt, caspase-3 and FoxO1 proteins were detected by Western blot assay. **Results** Compared with the sham group, pyramidal cells were arranged loosely in the I/R group and a large number of pyramidal cells were necrotized, and the amount of apoptotic hippocampal cells was increased. The levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were significantly increased ($P < 0.05$), as well as the expression of p-PI3K, Akt and caspase-3 in the brain tissue. However, the expression of FoxO1 protein was decreased. There were significant differences between the two groups ($P < 0.05$). Compared with the I/R group, the

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31201758); 中国医科大学新教师基金项目(XZR20160036)。

【通讯作者】 陈克研(1983 -), 男, 博士, 讲师, 从事基础医学和实验动物研究。E-mail: chenkeyan888@163.com

inflammatory factors were significantly decreased in the HRS group. The expressions of p-PI3K, Akt and caspase-3 were also significantly decreased, while the expression of FoxO1 protein was increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Hydrogen-rich saline can reduce brain injury caused by ischemia-reperfusion, and its mechanism may be related to PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway.

【Key words】 Hydrogen rich saline; Ischemia reperfusion; PI3k; FoxO1; Apoptosis

对缺血脑组织进行及时再灌注是治疗脑卒中的有效措施之一,在脑缺血再灌注时,缺血局部组织会释放大炎症因子,这些激活的炎症细胞会浸润到局部组织,并激活相关的炎症信号通路,进而导致脑组织发生更严重的炎症性损伤^[1-3]。此外,有研究发现,缺血再灌注损伤会伴随着细胞凋亡的发生,且细胞凋亡会随着缺血时间的延长而加重,凋亡在缺血/再灌注损伤的病理过程中的作用不容忽视^[4]。目前认为,缺血再灌注损伤导致的炎症反应和凋亡与磷酸肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)及其下游蛋白 AKT 信号通路的激活息息相关^[5]。氢气通过特殊加压方式溶到生理盐水而获得的富氢液(hydrogen rich saline, HRS)是很好的抗氧化物,集高氢量、弱碱性、负电位、小分子水为一体,平衡身体酸碱度,可有效防止多种疾病^[6,7]。已有报道显示 HRS 在肝脏、肠缺血再灌注中对相应脏器有保护作用,而有关 HRS 在脑缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)中是否具有器官保护作用、其机制是否与抗炎性反应有关尚缺少相关研究。本研究通过建立大鼠缺血再灌注损伤模型,采用富氢液进行预处理,探讨富氢液对缺血再灌注大鼠脑损伤和 PI3K 通路蛋白表达的影响,阐明富氢液对脑组织损伤的保护作用及分子机制,旨在为富氢液治疗大脑缺血/再灌注损伤提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

清洁级 SD 大鼠 40 只,250 ~ 300 g,源于中国医科大学实验动物部【SCXK(辽)2013-0001, SYXK(辽)2013-0007】。实验随机分为假手术组(sham 组),缺血/再灌注组(I/R 组),富氢液处理组(HRS 组)。H 组大鼠于再灌注开始静脉泵注富氢水 5 mL/(kg·h)至灌注结束;模型组动物注射等量的生理盐水;假手术组组动物在麻醉后仅动脉分离手术。

1.2 富氢水的制备

参考文献^[8]制备富氢水溶液,将医用注射液软

包装袋,用低压舱 0.8 个大气压减压处理 24 h,常压下置 12 h,将饱和部分的气体析出;将包装袋置于 4℃ 冰箱冷却;取预冷的生理盐水,取总体积的 15%,注入同体积的纯氢气;将注入氢气后的盐水放入加压舱,4℃ 下持续加压 24 h,使氢气充分溶入注射液,取出后置 4℃ 保存。

1.3 脑缺血/再灌注动物模型的制备

脑缺血/再灌注动物模型的制备参照文献进行^[9]。大鼠经腹腔注射 2% 戊巴比妥钠进行麻醉,结扎右侧翼腭动脉和颈外动脉。在大鼠颈外动脉距结扎处约 0.5 cm 处用注射器针头刺一小口,将尼龙线栓经右侧颈外动脉主干切口缓慢向颈内动脉入颅方向推进,以颈总动脉分叉处为标记,推进 18 ~ 20 mm 感到轻微阻力时,即已阻断大脑中动脉。阻断 2 h 后,拔出尼龙线并扎紧动脉残端,缝合皮下组织和皮肤,完成脑缺血/再灌注损伤模型。

1.4 标本采集

各组于缺血再灌注术后 24 h 处死实验动物,经颈内静脉采血 3 mL 离心法分离血浆,采用 ELISA 试剂盒(美国 USCN)检测血浆中炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β ;另取右侧海马组织,置于福尔马林液中,常规石蜡包埋,HE 染色观察组织学变化, TUNEL 染色观察神经细胞凋亡情况;另一部分置液氮中, Western blot 技术检测 p-PI3K、Akt、caspase-3 和 FoxO1 蛋白表达变化。

1.5 统计学分析

采用统计学软件 SPSS 19.0 进行分析,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析进行,组内比较采用重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 富氢液对缺血再灌注大鼠海马形态学改变的影响

Sham 组大鼠海马区域神经细胞形态正常,排列规则、胞质均染,细胞核呈圆形或卵圆形,未见明显病变;I/R 组大鼠海马区域细胞排列紊乱,核固缩、溶解,神经元细胞及锥体细胞死亡,细胞数量明显

减少;HRS 组大鼠可见海马区域细胞紊乱程度减轻,变性/坏死的神经细胞明显减少(图 1)。

2.2 富氢液对血浆中炎症因子表达的影响

与 sham 组相比,I/R 组大鼠脑组织 IL-1β、IL-6、和 TNF-α 的表达显著升高,差异有显著性($P < 0.05$);与 I/R 组相比,HRS 组大鼠 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的表达显著降低,差异有显著性($P < 0.05$)(表 1)。

2.3 富氢液对大鼠海马神经元凋亡的影响

TUNEL 阳性细胞呈棕黄色,细胞核着色。与 sham 组比较,I/R 组 TUNEL 阳性细胞数量显著增

加,差异有显著性($P < 0.05$);与 I/R 组相比,HRS 组脑组织海马区域 TUNEL 阳性细胞数量显著降低($P < 0.05$)(图 2)。

2.4 富氢液对大鼠凋亡蛋白 p-PI3K、Akt、caspase-3 和 FoxO1 蛋白表达的影响

与 Sham 组相比,I/R 组大鼠脑组织中 p-PI3K、Akt、caspase-3 表达显著升高,FoxO1 蛋白降低,两组间比较均具有统计学差异($P < 0.05$);与 I/R 组相比,HRS 组大鼠脑组织 p-PI3K、Akt、caspase-3 表达显著降低,FoxO1 蛋白升高,差异有显著性($P < 0.05$)(图 3)。

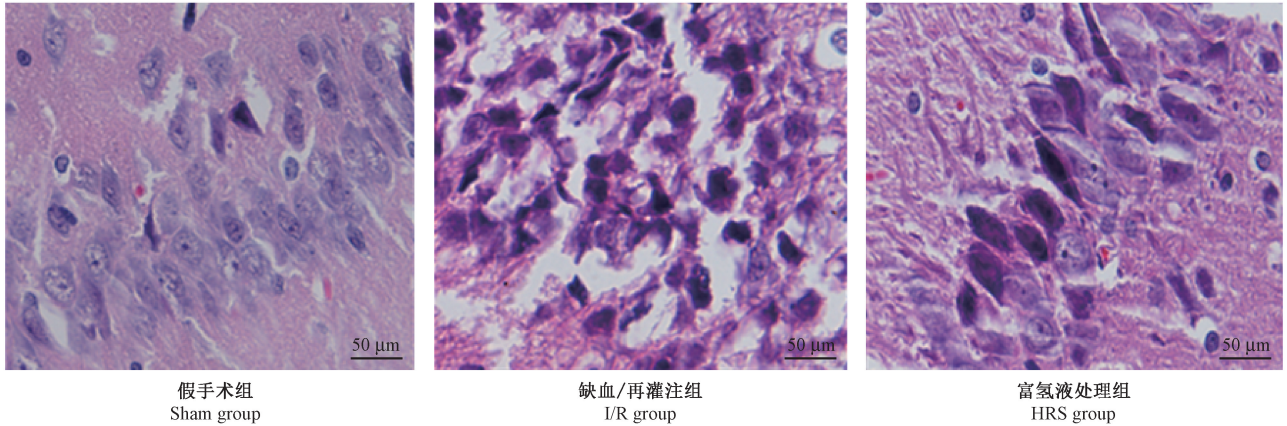


图 1 大鼠海马的组织学改变(HE 染色)

Fig. 1 Histological changes of hippocampal neurons in the rats (HE staining)

表 1 各组大鼠血清炎症因子检测($n = 10, \bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Detection of serum inflammatory factors in each group of rats

指标/分组 Index/Group	假手术组 Sham group	缺血/再灌注组 I/R group	富氢液处理组 HRS group
S100-β /ng/L	36.87 ± 0.91	112.96 ± 1.45 ^a	68.42 ± 1.30 ^{ab}
TNF-α /μg/L	75.54 ± 10.21	196.51 ± 30.31 ^a	118.47 ± 10.14 ^{ab}
IL-6 /ng/L	20.97 ± 2.38	68.69 ± 3.39 ^a	45.36 ± 5.14 ^{ab}

注:与 Sham 组相比,^a $P < 0.05$;与 HRS 组相比,^b $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the sham group, ^a $P < 0.05$; Compared with the HRS group, ^b $P < 0.05$.

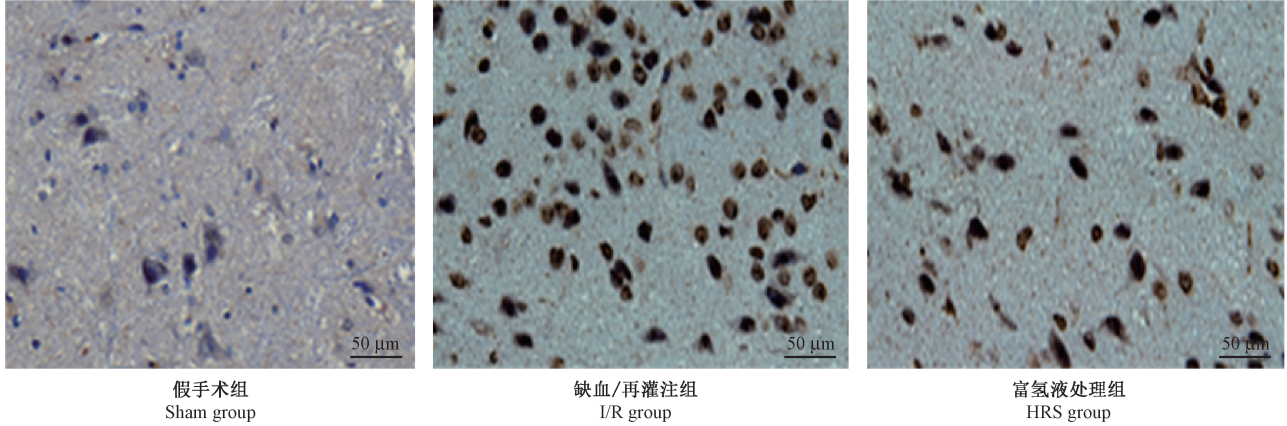


图 2 海马神经元的凋亡状况(TUNEL 染色)

Fig. 2 Apoptosis in the hippocampal neurons in the rats (TUNEL staining)

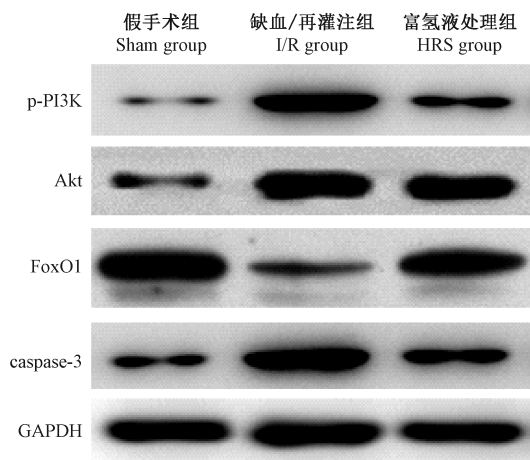


图3 Western blot 检测大鼠海马组织中多种基因蛋白表达的比较

Fig. 3 Changes of expressions of p-PI3K, Akt, caspase-3, FoxO1, and GAPDH in the rats detected by Western blot assay

3 讨论

本研究通过建立大鼠局灶性缺血再灌注脑损伤模型,采用 HE 染色、TUNEL、ELISA 和 Western blot 等技术,观察富氢液对大鼠海马区神经元形态学改变、细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 caspase-3、炎症因子和 PI3K/Akt/FoxO1 通路蛋白表达的影响。结果发现,富氢液可以减少缺血再灌注导致的大脑海马区形态学改变,降低炎症因子表达、减少细胞凋亡产生。此外,研究发现,富氢液可以降低缺血再灌注导致的 PI3K、Akt 和 FoxO1 通路蛋白表达,结果提示富氢液可以减轻缺血再灌注导致的大脑脑损伤,其机制可能是通过调控 PI3K/Akt/FoxO1 通路来实现。

氢气本身就是一种最佳天然抗氧化剂,所以加入氢气的水具有很强的还原功能,可以中和身体血液和细胞里的自由基。将氢气溶于生理盐水制备富氢液很容易进入细胞通道,参与新陈代谢,从而促进细胞排毒,增加了细胞的水合作用,提升人体的免疫力^[10,11]。通过动物实验或临床实验均证实,人或动物引用 HRS 后,对心、肝脏、肺脏和肠等缺血再灌注引发的相应器官损伤有明显的抑制作用,可以减轻机体炎症反应和过度氧化,对脏器有保护作用^[12,13]。研究发现,富氢液对脂多糖(LPS)诱导的大鼠急性肺损伤进行干预,它可以有效减少肺和支气管肺泡灌洗液的蛋白浓度、降低肺湿/干重比,显著抑制炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 α 、VCAM-1 mRNA 表达,结果表明,富氢液在临床上可用于有效治疗急性肺损伤的抗炎剂^[14]。Huang 等^[15]研究发

现富氢液可以降低溃疡性结肠炎大鼠血清 LDH、ALP、IL-1 β 、TNF- α 和 MPO 水平,而增加前列腺素 E2 和 IL-10 水平,结果提示富氢液可用于治疗溃疡性结肠炎,为富氢液的临床抗炎应用提供了直接证据。本研究发现,富氢液显著降低缺血再灌注大鼠脑组织促炎因子 IL-1 β 、IL-6、和 TNF- α 的表达。此外,富氢液还可以显著降低缺血再灌注导致促凋亡蛋白 caspase-3 表达,提示富氢液对缺血再灌注大鼠脑损伤有保护作用,这种作用是通过抗炎和抗凋亡实现的。

既往的研究证实 PI3K/AKT 信号通路参与了脑缺血神经细胞凋亡,内在通路和外部的炎症激活时均可驱动 AKT 介导的细胞存活通路,激活磷脂酰肌醇 3 激酶连接 AMPA 受体的胞内 C 末端,可激活其下游激酶 Akt ser473 残基磷酸化,诱导下游蛋白 FoxO1 向细胞膜转位,磷酸化 Ser9 导致 FoxO1 失活,磷酸化 β 连环蛋白促进细胞生存。同时抑制下游蛋白 caspase-3 激活,从而抑制促炎因子释放,发挥抗炎、抗凋亡、减少脑损伤作用^[16-18]。本研究发现,与对照组相比,缺血再灌注大鼠海马组织 p-PI3K、p-Akt 和 p-FoxO1 蛋白表达均显著增加,而经过富氢液预处理后大鼠脑组织 p-PI3K、p-Akt 和 p-FoxO1 表达显著降低,结果提示,富氢液可能通过激活 PI3K/Akt/FoxO1 通路,对缺血再灌注大鼠脑损伤发挥保护作用。

综上,富氢液可以减少缺血再灌注导致的大脑海马区形态学改变,降低炎症因子表达、减少细胞凋亡产生,其机制可能是通过调控 PI3K/Akt/FoxO1 通路来实现。

参考文献:

- [1] 王斌,曹慧,沈甜,等.麝香、冰片对大鼠脑缺血-再灌注急性期和恢复早期炎症损伤的保护作用及机制研究[J].中药材,2015,38(10):2139-2143.
- [2] Yang SI, Yuan Y, Jiao S, et al. Calcitonin gene-related peptide protects rats from cerebral ischemia/reperfusion injury via a mechanism of action in the MAPK pathway[J]. Biomed Rep, 2016, 4(6): 699-703.
- [3] 曾兆禄,韩继超,薛云,等.针刺结合丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国比较医学杂志,2016,26(2):62-66.
- [4] Diaz-Ruiz A, Roldan-Valadez E, Ortiz-Plata A, et al. Dapsone improves functional deficit and diminishes brain damage evaluated by 3-Tesla magnetic resonance image after transient cerebral ischemia and reperfusion in rats[J]. Brain Res, 2016, 1646: 384-392.

(下转第 33 页)

- infection in cynomolgus monkeys by ELISA using simian agent 8 as alternative antigen [J]. *Exp Anim*, 2001, 50 (4): 345 – 347.
- [12] Tanaka S, Mannen K, Sato H. Use of herpesvirus papio 2 as an alternative antigen in immunoblotting assay for B virus diagnosis [J]. *J Vet Med Sci*, 2004, 66(5): 529 – 532.
- [13] 向志光, 佟巍, 李雨函, 等. 大鼠仙台病毒 ELISA、间接免疫荧光和免疫印迹三种检测方法比较[J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(1): 23 – 26.
- [14] Pereylygina L, Patrusheva I, Zurkuhlen H, et al. Characterization of B virus glycoprotein antibodies induced by DNA immunization [J]. *Arch Virol*, 2002, 147(11): 2057 – 2073.
- [15] 韦毅, 符明泰, 石寒, 等. 三种不同抗原对猴 B 病毒抗体检测结果的比较研究[J]. *实验动物科学*, 2001, 18(2): 1 – 3.
- [16] 周亚敏, 李绍东, 杨森富, 等. 猴疱疹病毒(B 病毒)抗体检测方法的比较研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2005, 15(4): 237 – 239.
- [17] 贺争鸣, 卫礼, 巩薇, 等. 猴 B 病毒抗体 ELISA 法的建立和应用研究[J]. *中国实验动物学报*, 2003, 11(3): 161 – 164.
- [18] 王晓明, 邵伟娟, 王建飞. 猴 B 病毒抗体及 B 病毒相关抗体 ELISA 检测结果比较[J]. *实验动物与比较医学*, 1997, 17(2): 80 – 81.
- [19] 李舜, 李筱青, 蔡标, 等. 猕猴血清 B 病毒抗体 3 种检测方法的比较[J]. *动物医学进展*, 2012, 33(1): 134 – 135.
- [20] Pereylygina L, Zhu L, Zurkuhlen H, et al. Complete sequence and comparative analysis of the genome of herpes B virus (*Cercopithecine herpesvirus 1*) from a rhesus monkey [J]. *J Virol*, 2003, 77(1): 6167 – 6177.
- [21] Eing BR, Kühn JE, Braun RW. Neutralizing activity of antibodies against the major herpes simplex virus type 1 glycoproteins[J]. *J Med Virol*, 1989, 27(1): 59 – 65.

[修回日期]2017-02-13

(上接第 16 页)

- [5] Tang Y, Liu X, Zhao J, et al. Hypothermia-induced ischemic tolerance is associated with Drp1 inhibition in cerebral ischemia-reperfusion injury of mice[J]. *Brain Res*, 2016, 1646: 73 – 83.
- [6] 潘震华 赵悦 于宏颖, 等. 饱和氢盐水对心肌缺血再灌注老年大鼠心肌细胞自噬的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(25): 2022 – 2026.
- [7] Tao B, Liu L, Wang N, et al. Effects of hydrogen-rich saline on aquaporin 1, 5 in septic rat lungs [J]. *J Surg Res*, 2016, 202(2): 291 – 298.
- [8] Sun Q, Cai J, Zhou J, et al. Hydrogen-rich saline reduces delayed neurologic sequelae in experimental carbon monoxide toxicity [J]. *Crit Care Med*, 2011, 39(4): 765 – 769.
- [9] Li YH, Qiao LJ, Lin XY. Mechanism of low molecular weight GTP binding protein RAC1 in injury of neural function of rats with cerebral ischemia reperfusion [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(5): 474 – 477.
- [10] Tian Y, Guo S, Zhang Y, et al. Effects of hydrogen-rich saline on hepatectomy-induced postoperative cognitive dysfunction in old mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(4): 2579 – 2584.
- [11] Qin L, Tao Y, Wang L, et al. Hydrogen-rich saline as an innovative therapy for cataract: a hypothesis [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 3191 – 3195.
- [12] Shi Q, Chen C, Deng WH, et al. Hydrogen-rich saline attenuates acute hepatic injury in acute necrotizing pancreatitis by inhibiting inflammation and apoptosis, involving jnk and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent reactive oxygen species [J]. *Pancreas*, 2016, 45(10): 1424 – 1431.
- [13] Du H, Sheng M, Wu L, et al. Hydrogen-rich saline attenuates acute kidney injury after liver transplantation via activating p53 – mediated autophagy [J]. *Transplantation*, 2016, 100(3): 563 – 570.
- [14] Meng X, Chen H, Wang G, et al. Hydrogen-rich saline attenuates chemotherapy-induced ovarian injury via regulation of oxidative stress [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(6): 2277 – 2282.
- [15] Huang SL, Jiao J, Yan HW. Hydrogen-rich saline attenuates steroid-associated femoral head necrosis through inhibition of oxidative stress in a rabbit model [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(1): 177 – 182.
- [16] 薛金龙, 孙芳玲, 刘婷婷, 等. 莫诺苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Wnt7a 和 APC 表达的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(9): 9 – 13.
- [17] 刘志辉. 立普妥对高糖诱导的 HUVEC 凋亡及 PI3K/AKT/eNOS 信号通路的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(3): 58 – 63.
- [18] Tsai WH, Wu CH, Yu HJ, et al. L-Theanine inhibits proinflammatory PKC/ERK/ICAM – 1/IL – 33 signaling, apoptosis, and autophagy formation in substance P-induced hyperactive bladder in rats [J]. *Neurourol Urodyn*, 2017, 36(2): 297 – 307.

[修回日期]2017-01-05