

# 富氢水对氧化应激细胞模型的保护作用 及对 PI3K/Akt 信号通路的影响

陆瑞婷 刘娅迪 王迪芬

贵州医科大学附属医院重症医学科, 贵州贵阳 550004

通信作者: 王迪芬, Email: 1078666485@qq.com

**【摘要】** 目的 观察富氢水对小鼠星形胶质细胞氧化应激损伤的保护作用及对磷酸肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路的影响。方法 体外培养小鼠星形胶质细胞, 取对数生长期细胞进行实验。① 实验一: 取部分细胞, 用 1.25、2.50、5.00、10.00  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 作用细胞 20 min, 以确定  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导星形胶质细胞损伤所需的适宜浓度; 用 25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  富氢水分别培养 3、6、9、12 h, 以确定富氢水预处理的最佳浓度及时间; 用 50  $\mu\text{mol/L}$  富氢水与 PI3K/Akt 信号通路抑制剂渥曼青霉素 200 nmol/L 或 400 nmol/L 共同培养, 以确定渥曼青霉素最佳抑制浓度。采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法检测星形胶质细胞存活率。② 实验二: 取部分细胞, 按随机数字表法分为空白对照组、 $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤组、富氢水预处理组 (HW+ $\text{H}_2\text{O}_2$  组)、富氢水与渥曼青霉素共培养预处理组 (HW+WM+ $\text{H}_2\text{O}_2$  组)。采用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 PI3K、Akt 的 mRNA 表达, 用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测 PI3K、Akt、磷酸化 Akt (p-Akt) 的蛋白表达。结果 ① 实验一: 以空白对照组细胞存活率为 100%。细胞存活率随  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的增加而逐渐降低, 2.50  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 20 min 细胞存活率降至 50% 左右, 故以此浓度建立细胞损伤模型。细胞存活率随富氢水预处理浓度升高、作用时间延长呈先升高后降低趋势, 50  $\mu\text{mol/L}$  富氢水预处理 9 h 时细胞存活率最高, 故以此建立富氢水预处理保护模型。200 nmol/L 或 400 nmol/L 渥曼青霉素与富氢水共同培养后, 细胞活性得到抑制, 200 nmol/L 的渥曼青霉素干预后细胞存活率与  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤组差异无统计学意义, 故以此建立星形胶质细胞抑制模型。② 实验二: 与空白对照组比较,  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤组 PI3K、Akt 的 mRNA 表达及 PI3K、Akt、p-Akt 的蛋白表达均明显降低。与  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤组比较, HW+ $\text{H}_2\text{O}_2$  组 PI3K、Akt 的 mRNA 表达及 PI3K、Akt、p-Akt 的蛋白表达均明显升高 [PI3K mRNA ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ): 0.843  $\pm$  0.019 比 0.631  $\pm$  0.038, Akt mRNA ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ): 0.591  $\pm$  0.025 比 0.558  $\pm$  0.037, PI3K/ $\beta$ -actin: 1.277  $\pm$  0.008 比 0.757  $\pm$  0.004, Akt/ $\beta$ -actin: 1.308  $\pm$  0.015 比 0.682  $\pm$  0.006, p-Akt/ $\beta$ -actin: 1.210  $\pm$  0.005 比 0.614  $\pm$  0.005, 均  $P < 0.05$ ]。HW+WM+ $\text{H}_2\text{O}_2$  组 PI3K、Akt 的 mRNA 表达分别为 0.784  $\pm$  0.159 和 0.556  $\pm$  0.037, PI3K、Akt、p-Akt 的蛋白表达分别为 0.715  $\pm$  0.006、0.686  $\pm$  0.005 和 0.606  $\pm$  0.004, 均明显低于 HW+ $\text{H}_2\text{O}_2$  组 (均  $P < 0.05$ ), 而与  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤组比较差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。结论 富氢水通过激活 PI3K/Akt 信号通路介导小鼠星形胶质细胞而发挥抗氧化的生物学功能。

**【关键词】** 富氢水; 星形胶质细胞; 过氧化氢; 抗氧化; 磷酸肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B 信号通路  
基金项目: 贵州省高层次人才特助经费项目 (TZJF-2011-25)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.06.020

## Protective effect of hydrogen-rich water on oxidative stress cell model and the impact of the phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B pathway

Lu Ruiting, Liu Yadi, Wang Difen

Department of Critical Care Medicine, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China

Corresponding author: Wang Difen, Email: 1078666485@qq.com

**【Abstract】** **Objective** To explore the protective effect of hydrogen-rich water on the oxidative stress injury of astrocytes in mice and its effect on phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signal pathway. **Methods** *In vitro*, mice astrocytes were cultured and the logarithmic growth period cells were taken for experiment. ① Experiment one: some cells were acted by 1.25, 2.50, 5.00, 10.00  $\mu\text{mol/L}$  hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) for 20 minutes to determine the appropriate concentration required for astrocyte damage induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; cultivating 3, 6, 9, and 12 hours with hydrogen-rich water of 25, 50, 100, and 200  $\mu\text{mol/L}$ , respectively, to determine the concentration and time of hydrogen-rich water pretreatment; the 50  $\mu\text{mol/L}$  hydrogen-rich water was cultured together with PI3K/Akt signal pathway inhibitors wortmannin (WM) 200 nmol/L or 400 nmol/L to determine the best inhibition concentration of wortmannin. Astrocyte activity was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry. ② Experiment two: some cells were divided into blank control group,  $\text{H}_2\text{O}_2$  injury group, hydrogen-rich water pretreatment group (HW+ $\text{H}_2\text{O}_2$  group), and co-culture of hydrogen-rich water and wortmannin pretreatment group (HW+WM+ $\text{H}_2\text{O}_2$  group). The mRNA expressions of PI3K and Akt were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); the protein expressions of PI3K, Akt and phosphorylated Akt (p-Akt) were detected by Western

**Blot. Results** ① Experiment one: the survival rate of the blank control group was 100%. Cell activity gradually decreased with the increase of  $H_2O_2$  concentration, and the survival rate of the  $H_2O_2$  action 20 minutes cells of 2.50  $\mu\text{mol/L}$  was reduced to about 50%, so a cell injury model was established at this concentration. With the increase of hydrogen-rich water pretreatment concentration, and the duration of action, the cell survival rate increased first and then decreased. The cell survival rate was highest when 50  $\mu\text{mol/L}$  hydrogen-rich water was pretreated with 9 hours, so a hydrogen-rich water pre-protection model was established. After 200 nmol/L or 400 nmol/L wortmannin was cultured together with hydrogen-rich water, cell activity was inhibited, and the cell survival rate of 200 nmol/L wortmannin group was no significantly different compared with that of  $H_2O_2$  injury group, so the astrocyte suppression model was established. ② Experiment two: compared with the blank control group, the mRNA expressions of PI3K and Akt and the protein expressions of PI3K, Akt and p-Akt were significantly decreased in the  $H_2O_2$  injury group. Compared with the  $H_2O_2$  injury group, the PI3K, Akt mRNA expressions and PI3K, Akt, p-Akt protein expressions were significantly increased in the HW+ $H_2O_2$  group [PI3K mRNA ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ):  $0.843 \pm 0.019$  vs.  $0.631 \pm 0.038$ , Akt mRNA ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ):  $0.591 \pm 0.025$  vs.  $0.558 \pm 0.037$ , PI3K/ $\beta$ -actin:  $1.277 \pm 0.008$  vs.  $0.757 \pm 0.004$ , Akt/ $\beta$ -actin:  $1.308 \pm 0.015$  vs.  $0.682 \pm 0.006$ , p-Akt/ $\beta$ -actin:  $1.210 \pm 0.005$  vs.  $0.614 \pm 0.005$ , all  $P < 0.05$ ]. The mRNA expressions of PI3K, Akt in the HW+WM+ $H_2O_2$  group was  $0.784 \pm 0.159$  and  $0.556 \pm 0.037$ , respectively, and the protein expressions of PI3K, Akt, p-Akt was  $0.715 \pm 0.006$ ,  $0.686 \pm 0.005$ , and  $0.606 \pm 0.004$ , respectively, both were significantly lower than those in HW+ $H_2O_2$  group (all  $P < 0.05$ ), and there was no significant difference with  $H_2O_2$  injury group (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** Hydrogen-rich water activates the PI3K/Akt pathway, thereby mediates mice astrocytes to exert the biological function of antioxidant.

**【Key words】** Hydrogen-rich water; Astrocyte; Hydrogen peroxide; Antioxidant; Phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B signal pathway

**Fund program:** Guizhou Province High-level Talent Special Assistance Project (TZJF-2011-25)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.06.020

氧化应激损伤是造成脑缺血/再灌注(I/R)损伤的重要原因之一。星形胶质细胞在中枢神经系统的发育和病理生理过程中以及在维持神经系统内环境稳定中发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>。因此,研究星形胶质细胞在氧化应激中的作用及其机制,可能为脑I/R损伤的治疗提供新靶点。氢气是一种重要的生理性调节气体,在细胞和器官水平上具有抗氧化、抗炎、抗凋亡等保护作用。研究表明,富氢水可以通过改善氧化应激减轻脑损伤<sup>[3]</sup>。富氢水减轻I/R导致的脑损伤可能与诱导激活磷酸肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路,调节其蛋白表达,进一步抑制氧化应激有关<sup>[4]</sup>。由此可见,富氢水与PI3K/Akt信号转导通路存在密切关系。富氢水对氧化应激损伤动物模型保护作用的报道屡见不鲜,但有关富氢水对星形胶质细胞氧化损伤的保护作用鲜见报道,其保护作用机制是否与激活PI3K/Akt信号通路有关目前尚不明确。本研究旨在细胞水平上研究富氢水对星形胶质细胞氧化应激损伤的保护作用,并探讨PI3K特异性抑制剂渥曼青霉素在阻断PI3K/Akt通路激活途径中的调节机制。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞及主要试剂:**健康小鼠星形胶质细胞由北京北纳创联生物技术研究院提供(细胞编号:BNCC338004)。富氢水(北京活力氢源饮品有限公司);DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国

Hyclone公司);二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT,美国Sigma公司);超纯RNA提取试剂、反转录(RT)试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)试剂盒、5倍浓缩上样缓冲液(北京索莱宝科技有限公司);兔抗PI3K抗体、兔抗Akt抗体(北京奥伯森生物技术有限公司);渥曼青霉素(美国Gene Operation公司)。

**1.2 细胞复苏与培养:**取出冻存的小鼠星形胶质细胞,置于37℃温水中快速振荡溶解;吸取细胞悬液移入15 mL离心管中,加入适量完全培养基,机械吹打制悬,离心5 min后弃上清,加入3 mL细胞培养基机械吹打搅拌均匀,转移至培养瓶中,补充培养基至5 mL,置于恒温培养箱中培养、传代,取对数生长期细胞进行实验。

**1.3 细胞分组及给药:**收集状态良好的对数生长期细胞,按随机数字表法分成空白对照组(完全培养基培养)、 $H_2O_2$ 损伤组(加入终浓度2.50  $\mu\text{mol/L}$ 的 $H_2O_2$ 作用20 min诱导细胞损伤)、富氢水预处理组(HW+ $H_2O_2$ 组,加入终浓度50  $\mu\text{mol/L}$ 的富氢水培养9 h,再换为含2.50  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$ 的培养基作用20 min)和富氢水与渥曼青霉素共培养预处理组(HW+WM+ $H_2O_2$ 组,加入终浓度50  $\mu\text{mol/L}$ 富氢水的同时加入终浓度200 nmol/L渥曼青霉素共同培养9 h,再换为含2.50  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$ 的培养基作用20 min)。富氢水每隔3 h换液1次,各实验组分别

设置3个复孔。

**1.4 MTT法检测细胞存活率:**将细胞接种于96孔培养板,每孔加入20 μL的MTT(5 g/L),37℃恒温培养箱孵育4 h,吸弃孔内培养上清液,加入DMSO溶液150 μL振荡直至结晶完全溶解。在酶联免疫检测仪上测定波长490 nm处的吸光度(A)值。以空白对照组细胞活性为100%,计算各实验组细胞存活率(细胞存活率=实验组A值/空白对照组A值×100%)。

**1.4.1 诱导星形胶质细胞损伤所需H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>适宜浓度的确定:**取对数生长期细胞接种于96孔培养板,将细胞按随机数字表法分为空白对照组及1.25、2.50、5.00、10.00 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组。吸去各组孔内完全培养基,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组分别换为含不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的完全培养基,对照组换为等体积的完全培养基,置于培养箱内作用20 min。采用MTT比色法检测各组细胞存活率。

**1.4.2 富氢水预处理浓度及时间的确定:**取对数生长期细胞接种于96孔培养板,将细胞按随机数字表法分为空白对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组和不同浓度HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组。吸去各组孔内完全培养基,不同浓度HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组分别用含终浓度25、50、100、200 μmol/L富氢水的完全培养基培养3、6、9、12 h,然后换为含2.50 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的培养基作用20 min;对照组用等体积完全培养基,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组用等体积含2.50 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的培养基作用20 min。采用MTT比色法检测各组细胞存活率。

**1.4.3 PI3K/Akt信号通路抑制剂渥曼青霉素最佳抑制浓度的确定:**取对数生长期细胞接种于96孔培养板,将细胞按随机数字表法分为空白对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组、HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、HW+WM+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组。先吸去各组孔内完全培养基,HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组用含终浓度50 μmol/L富氢水的完全培养基培养9 h;HW+WM+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组用含终浓度50 μmol/L富氢水和终浓度200 nmol/L或400 nmol/L渥曼青霉素的完全培养基混合液共同培养9 h,然后换为含2.50 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的培养基作用20 min;对照组用等体积完全培养基,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组用等体积含2.50 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的培养基作用20 min。采用MTT比色法检测各组细胞存活率。

**1.5 RT-PCR测定细胞PI3K、Akt的mRNA表达:**收集细胞,提取总RNA,反转录合成cDNA。PI3K、Akt及内参3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因序

列设计及引物合成由上海生工生物工程有限公司完成。PCR反应体系20 μL;反应条件:95℃预变性10 min;95℃变性15 s、60℃退火/延伸60 s,扩增40个循环;60℃延伸。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶分离检测。用ABI 7500型荧光定量PCR仪,采用2<sup>-ΔΔCT</sup>法进行数据的定量分析。

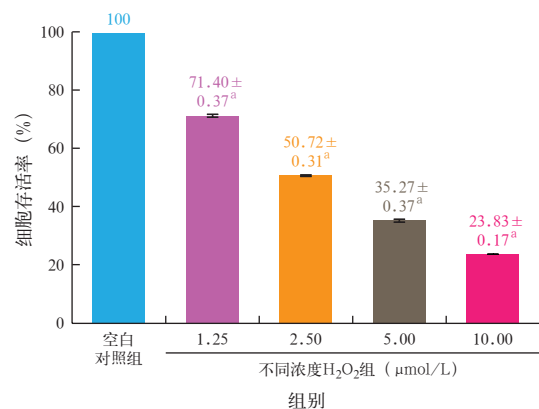
**1.6 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测细胞PI3K、Akt、磷酸化Akt(p-Akt)蛋白表达:**收集细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,离心弃上清液。每孔按1:100的比例加入蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)溶液与RIPA裂解液,4℃裂解15 min;离心10 min取上清液,按照1:5的比例加入蛋白上样缓冲液,水浴煮沸5 min。将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,室温下密封,在振荡器上缓慢摇动1 h。随后加入一抗(1:300)4℃反应过夜。PBS洗涤,加入相应二抗(1:3000),孵育1 h,漂洗3次。将PVDF膜用发光试剂染1 min,暗室曝光,用Image J软件分析灰度值,以目的蛋白与内参β-肌动蛋白(β-actin)的灰度值比值表示蛋白表达量。

**1.7 统计学方法:**使用SPSS 13.0软件处理数据,计量数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用方差齐性检验,方差齐组内比较采用单因素方差分析,多组间比较用Dunnnett检验。*P*<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞存活率

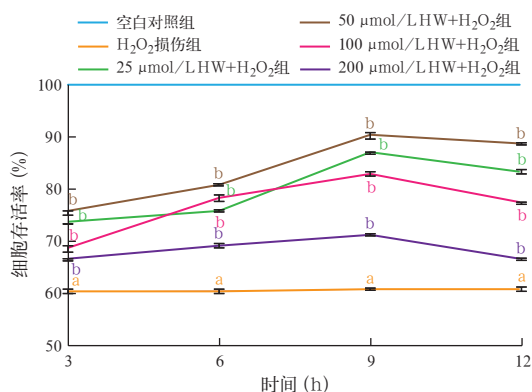
**2.1.1 不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对星形胶质细胞的损伤作用(图1):**细胞存活率随H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的增高而逐渐下降,各浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组细胞存活率均明显低于空白对照组(均*P*<0.01)。选择引起细胞存活率下降至50%左右的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度进行后续实验,即以2.50 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用20 min建立星形胶质细胞损伤模型。



注:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>为过氧化氢;与空白对照组比较,<sup>a</sup>*P*<0.01  
图1 不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对小鼠星形胶质细胞存活率的影响



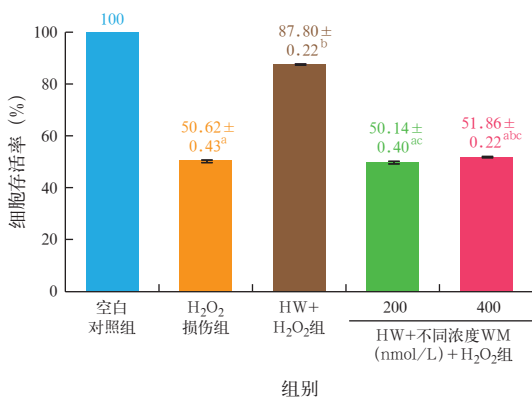
**2.1.2 不同浓度富氢水预处理不同时间对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤星形胶质细胞的保护作用(图 2):**富氢水预处理各组细胞存活率均明显高于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组(均  $P < 0.01$ )。随富氢水浓度升高,细胞存活率呈先升高后下降趋势,50 μmol/L 浓度时细胞存活率最高。随富氢水预处理时间延长,细胞存活率亦呈先升高后下降趋势,预处理 9 h 时细胞存活率最高。50 μmol/L 富氢水预处理 9 h 时细胞存活率最高,后续实验以此建立富氢水预保护模型。



注: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为过氧化氢;与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 2 不同浓度富氢水预处理不同时间对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤小鼠星形胶质细胞存活率的影响

**2.1.3 不同浓度渥曼青霉素对经富氢水预处理的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤星形胶质细胞的干预作用(图 3):**与 HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组相比,不同浓度渥曼青霉素干预均可降低星形胶质细胞存活率(均  $P < 0.01$ )。随渥曼青霉素浓度增加,细胞存活率有所增加 ( $P > 0.05$ ),其中 400 nmol/L 渥曼青霉素干预组细胞存活率明显高于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组 ( $P < 0.01$ )。故后续实验选择 200 nmol/L 渥曼青霉素与 50 μmol/L 富氢水共同培养建立星形胶质细胞抑制模型。



注: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为过氧化氢;与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与 HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$

图 3 不同浓度渥曼青霉素(WM)干预对经富氢水(HW)预处理的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤星形胶质细胞存活率的影响

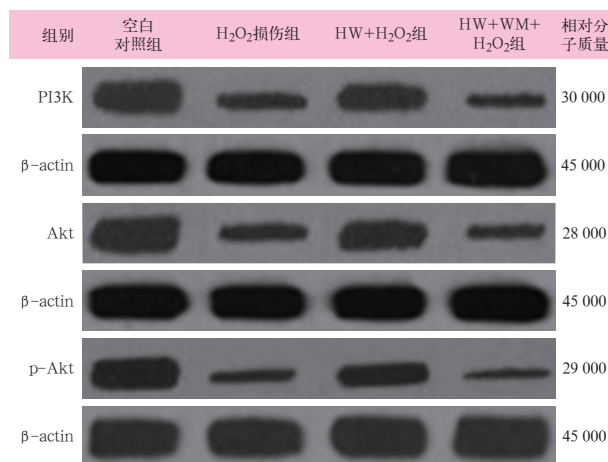
**2.2 富氢水对星形胶质细胞 PI3K、Akt mRNA 表达的影响(表 1):**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组 PI3K、Akt mRNA 表达较空白对照组明显降低(均  $P < 0.05$ )。HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 PI3K、Akt mRNA 表达明显高于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组(均  $P < 0.05$ )。HW+WM+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 PI3K、Akt mRNA 表达明显低于 HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组(均  $P < 0.05$ ),而与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。

表 1 各组小鼠星形胶质细胞 PI3K、Akt mRNA 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                                    | 样本数(孔) | mRNA 表达 ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) |                             |
|---------------------------------------|--------|------------------------------------|-----------------------------|
|                                       |        | PI3K                               | Akt                         |
| 空白对照组                                 | 6      | 1.004 ± 0.012                      | 1.003 ± 0.010               |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤组     | 6      | 0.631 ± 0.038 <sup>a</sup>         | 0.558 ± 0.037 <sup>a</sup>  |
| HW+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组    | 6      | 0.843 ± 0.019 <sup>b</sup>         | 0.591 ± 0.025 <sup>b</sup>  |
| HW+WM+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组 | 6      | 0.784 ± 0.159 <sup>ac</sup>        | 0.556 ± 0.037 <sup>ac</sup> |

注:空白对照组为完全培养基培养, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组为 2.50 μmol/L 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)作用 20 min, HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组为 50 μmol/L 富氢水(HW)预处理 9 h+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 20 min, HW+WM+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组为 50 μmol/L HW 与 200 nmol/L 渥曼青霉素(WM)共同预处理 9 h+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 20 min; PI3K 为磷酸肌醇 3 激酶, Akt 为蛋白激酶 B;与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

**2.3 富氢水对星形胶质细胞 PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达的影响(图 4;表 2):**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组 PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达明显低于空白对照组(均  $P < 0.01$ )。HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达明显高于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组(均  $P < 0.01$ )。HW+WM+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达明显低于 HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组(均  $P < 0.01$ ),而与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。



空白对照组为完全培养基培养, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组为 2.50 μmol/L 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)作用 20 min, HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组为 50 μmol/L 富氢水(HW)预处理 9 h+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 20 min, HW+WM+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组为 50 μmol/L HW 与 200 nmol/L 渥曼青霉素(WM)共同预处理 9 h+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 20 min; PI3K 为磷酸肌醇 3 激酶, Akt 为蛋白激酶 B, p-Akt 为磷酸化 Akt, β-actin 为 β-肌动蛋白

图 4 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组小鼠星形胶质细胞中 PI3K、Akt、p-Akt 的蛋白表达

表2 各组小鼠星形胶质细胞PI3K、Akt、p-Akt的蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                                    | 样本数(孔) | PI3K/<br>β-actin          | Akt/<br>β-actin           | p-Akt/<br>β-actin         |
|---------------------------------------|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 空白对照组                                 | 6      | 1.432±0.030               | 1.415±0.020               | 1.418±0.007               |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤组     | 6      | 0.757±0.004 <sup>a</sup>  | 0.682±0.006 <sup>a</sup>  | 0.614±0.005 <sup>a</sup>  |
| HW+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组    | 6      | 1.277±0.008 <sup>b</sup>  | 1.308±0.015 <sup>b</sup>  | 1.210±0.005 <sup>b</sup>  |
| HW+WM+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组 | 6      | 0.715±0.006 <sup>ac</sup> | 0.686±0.005 <sup>ac</sup> | 0.606±0.004 <sup>ac</sup> |

注:空白对照组为完全培养基培养, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组为2.50 μmol/L过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)作用20 min, HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组为50 μmol/L富氢水(HW)预处理9 h+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用20 min, HW+WM+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组为50 μmol/L HW与200 nmol/L 渥曼青霉素(WM)共同预处理9 h+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用20 min; PI3K为磷酸肌醇3激酶, Akt为蛋白激酶B, p-Akt为磷酸化Akt, β-actin为β-肌动蛋白;与空白对照组比较,<sup>a</sup>P<0.01;与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组比较,<sup>b</sup>P<0.01;与HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较,<sup>c</sup>P<0.01

### 3 讨论

越来越多的研究表明,氧化应激损伤与多种中枢神经系统疾病的发生发展密切相关<sup>[5]</sup>。缺血性脑血管疾病引起的脑I/R损伤也有氧化应激损伤的参与。因此,寻找有利且效果显著的抗氧化剂阻断氧化应激损伤已成为目前重要的研究课题。氧化应激对脑I/R损伤和神经系统病变的形成具有重要作用,通过生成的活性氧簇(ROS)严重影响着心脑血管系统,以及免疫功能和细胞代谢调控途径<sup>[6]</sup>。有研究者指出,有多种信号途径在氧化应激过程中产生作用,主要涉及PI3K、Akt等,这些通路紧密集成直接影响脑血管疾病<sup>[7-8]</sup>。

星形胶质细胞在组织水、电解质运输和平衡调节过程中以及中枢神经系统中发挥着重要作用。星形胶质细胞本身具有很强的抗氧化应激损伤作用,但同时也容易受到氧化应激的损伤。因此,我们通过建立星形胶质细胞氧化应激损伤模型来研究富氢水对星形胶质细胞氧化应激损伤的作用及机制。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是活性氧的一种主要形式,已证实其可以介导细胞损伤。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>既能通过直接氧化核酸、脂质和蛋白质来损伤细胞,也能作为信号分子引发细胞内途径导致细胞凋亡<sup>[9]</sup>。本实验以H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤小鼠星形胶质细胞,成功建立了细胞损伤模型,即使用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用于体外培养的小鼠星形胶质细胞,通过模拟神经系统损伤时氧自由基所引起的星形胶质细胞氧化性损伤,其可作为一种良好的筛选神经抗氧化保护剂的模型,为临床应用药物治疗神经系统疾病提供细胞实验基础。

PI3K/Akt信号通路是细胞内重要的转导通路之一,其主要通过影响下游多种相应分子的活化作用,从而在细胞内发挥促进增殖、抑制凋亡等生物学功

能。有研究表明,PI3K/Akt通路的活化不仅参与了不同预处理方式诱导的细胞保护作用,而且是氧化应激(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)预处理诱导的适应性细胞保护机制之一<sup>[10]</sup>。脑缺血及脑I/R损伤是由多种机制相互作用引起的,其中PI3K/Akt信号通路的转导在脑组织损伤中起着重要作用<sup>[11]</sup>。而PI3K特异性抑制剂渥曼青霉素可抑制PI3K/Akt信号通路,并抑制Akt磷酸化。因此,本研究应用PI3K/Akt信号通路来探讨富氢水对星形胶质细胞的保护作用,并使用抑制剂渥曼青霉素来阻断PI3K/Akt信号通路,以此来证明富氢水的保护作用与PI3K/Akt信号通路有关。

有研究表明,吸入氢气或静脉注射富氢水均可通过抗炎、抗氧化和抗凋亡等作用对大鼠脑缺血、缺氧或脑创伤,对肺、肾脏I/R损伤以及深低温循环后神经损伤产生明显保护作用<sup>[12]</sup>。本课题组前期研究表明,富氢水可通过上调核因子E2相关因子2(Nrf2)核蛋白水平,提高过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性,减轻创伤性脑损伤(TBI)大鼠氧化应激损伤<sup>[13]</sup>;富氢水可下调水通道蛋白(AQP1、AQP4)的表达,从而减轻TBI大鼠脑水肿<sup>[14-15]</sup>;富氢水还可促使TBI后CD34<sup>+</sup>内皮祖细胞的动员,并返回创伤区,促进新生血管生成<sup>[16]</sup>,由此提示,富氢水对TBI引起的氧化应激反应具有一定的保护作用。Hong等<sup>[17]</sup>研究发现,富氢水对大鼠脑I/R损伤的保护作用与抑制神经细胞凋亡有关,腹腔注射富氢水可激活PI3K信号通路,影响细胞凋亡相关蛋白表达[上调Bax、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3),并下调Bcl-2蛋白表达],有效减少脑I/R所致大鼠海马和皮质区早期的神经元凋亡。另有研究表明,富氢水可以降低I/R导致的PI3K、Akt和FoxO1通路蛋白表达,从而减轻脑损伤,其机制可能是通过调控PI3K-Akt-FoxO1通路实现的<sup>[4]</sup>。

本实验结果显示,HW+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组细胞PI3K、Akt的mRNA表达以及PI3K、Akt、p-Akt的蛋白表达均较H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组明显增高。表明富氢水可以上调PI3K、Akt的mRNA和蛋白表达,从而激活PI3K/Akt通路。富氢水对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导损伤星形胶质细胞引起的氧化应激反应具有抑制效应,而这种保护作用能被渥曼青霉素所阻断,这种抑制作用可能与激活PI3K/Akt信号通路有关。PI3K/Akt信号通路的作用可为保护神经元对抗损伤因子,激活Akt能保护细胞膜的完整性,防止损伤因子诱导的细胞膜上的磷

脂酰丝氨酸外翻,阻断细胞氧化应激损伤。

综上所述,富氢水通过激活PI3K/Akt信号通路,从而介导星形胶质细胞发挥抗氧化的生物学功能。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23 (2): 137-149. DOI: 10.1097/01.WCB.0000044631.80210.3C.
- [2] 王昕虹,柳华东,卢洁,等.脑缺血性疾病中星形胶质细胞保护机制研究[J].*医学研究杂志*, 2008, 37 (3): 65-66. DOI: 10.3969/j.issn.1673-548X.2008.03.025.  
Wang XH, Liu HD, Lu J, et al. Study on the protective mechanism of astrocyte in cerebral ischemic disease [J]. *J Med Res*, 2008, 37 (3): 65-66. DOI: 10.3969/j.issn.1673-548X.2008.03.025.
- [3] Shen L, Wang J, Liu K, et al. Hydrogen-rich saline is cerebroprotective in a rat model of deep hypothermic circulatory arrest [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36 (8): 1501-1511. DOI: 10.1007/s11064-011-0476-4.
- [4] 陈克研,董婉维.富氢液通过PI3K通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤[J].*中国比较医学杂志*, 2017, 27 (7): 13-16, 33. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.07.003.  
Chen KY, Dong WW. Hydrogen-rich saline reduces cerebral ischemia-reperfusion injury in rats via PI3K pathway [J]. *Chin J Comp Med*, 2017, 27 (7): 13-16, 33. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.07.003.
- [5] Hou S, Vigeland LE, Zhang G, et al. Zn<sup>2+</sup> activates large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel via an intracellular domain [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (9): 6434-6442. DOI: 10.1074/jbc.M109.069211.
- [6] Chong ZZ, Shang YC, Wang S, et al. SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16 (2): 167-178. DOI: 10.1517/14728222.2012.648926.
- [7] Jayaram HN, Kusumanchi P, Yalowitz JA. NMNAT expression and its relation to NAD metabolism [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18 (13): 1962-1972. DOI: 10.2174/092986711795590138.
- [8] Yang H, Jin X, Kei Lam CW, et al. Oxidative stress and diabetes mellitus [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2011, 49 (11): 1773-1782. DOI: 10.1515/CCLM.2011.250.
- [9] Shin SY, Kim CG, Jho EH, et al. Hydrogen peroxide negatively modulates Wnt signaling through downregulation of beta-catenin [J]. *Cancer Lett*, 2004, 212 (2): 225-231. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.03.003.
- [10] 张梅,李卫,郭瑞鲜,等.PI3K/AKT通路介导H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>预处理减轻PC12细胞氧化损伤[J].*基础医学与临床*, 2011, 31 (8): 894-899. Zhang M, Li W, Guo RX, et al. PI3K/AKT pathway mediates the anti-oxidative injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> preconditioning in PC12 cell [J]. *Basic Clin Med*, 2011, 31 (8): 894-899.
- [11] Cai J, Kang Z, Liu K, et al. Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model [J]. *Brain Res*, 2009, 1256: 129-137. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.11.048.
- [12] Ji Q, Hui K, Zhang L, et al. The effect of hydrogen-rich saline on the brain of rats with transient ischemia [J]. *J Surg Res*, 2011, 168 (1): e95-101. DOI: 10.1016/j.jss.2011.01.057.
- [13] 袁佳,王迪芬,刘颖,等.富氢水对创伤性脑损伤大鼠Nrf2表达及氧化应激损伤的影响[J].*中华危重病急救医学*, 2015, 27 (11): 911-915. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.11.009.  
Yuan J, Wang DF, Liu Y, et al. Effects of hydrogen rich water on the expression of Nrf2 and the oxidative stress in rats with traumatic brain injury [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (11): 911-915. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.11.009.
- [14] 陈先俊,王迪芬,刘颖,等.富氢液对创伤性颅脑损伤大鼠大脑皮质水通道蛋白1表达的影响[J].*中华危重病急救医学*, 2016, 28 (5): 460-464. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.05.016.  
Chen XJ, Wang DF, Liu Y, et al. Effects of hydrogen-rich water on the expression of aquaporin 1 in the cerebral cortex of rat with traumatic brain injury [J]. *Chin Crit Care Med*, 2016, 28 (5): 460-464. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.05.016.
- [15] 陈先俊,王迪芬,刘颖,等.富氢水对创伤性脑损伤后大鼠脑内水通道蛋白4表达的影响[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2018, 25 (3): 228-232. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2018.03.002.  
Chen XJ, Wang DF, Liu Y, et al. Effects of hydrogen-rich water on expression of aquaporin 4 in brain tissue of rats after traumatic brain injury [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2018, 25 (3): 228-232. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2018.03.002.
- [16] 刘颖,兰青,王迪芬,等.富氢水对创伤性脑损伤大鼠脑创伤区CD34表达的影响[J].*中华危重病急救医学*, 2017, 29 (3): 260-264. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.013.  
Liu Y, Lan Q, Wang DF, et al. Effect of hydrogen-rich water on the CD34 expression in lesion boundary brain tissue of rats with traumatic brain injury [J]. *Chin Crit Care Med*, 2017, 29 (3): 260-264. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.013.
- [17] Hong Y, Shao A, Wang J, et al. Neuroprotective effect of hydrogen-rich saline against neurologic damage and apoptosis in early brain injury following subarachnoid hemorrhage: possible role of the Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (4): e96212. DOI: 10.1371/journal.pone.0096212.

(收稿日期: 2019-01-14)