

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00233

氢分子对 H₂O₂ 体外诱导氧化损伤大鼠脊髓神经元的保护作用

刘芳婷¹, 李 建¹, 李向南¹, 徐盛明², 向正华³, 袁红斌^{1*}

1. 第二军医大学长征医院麻醉科, 上海 200003

2. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003

3. 第二军医大学基础部神经生物学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 证明氢分子对过氧化氢(H₂O₂)诱导氧化损伤的大鼠脊髓神经元具有保护效应,并初步探讨其相关机制。**方法** 将纯化培养7 d后的大鼠脊髓神经元分为4组:(1)常规培养液(NM)对照组;以NM培养;(2)富氢培养液(HM)组;以HM培养;(3)NM+H₂O₂组;以NM培养2 h后,加入100 μmol/L H₂O₂和15 μmol/L FeCl₂继续培养;(4)HM+H₂O₂组;以HM培养2 h后,加入100 μmol/L H₂O₂和15 μmol/L FeCl₂继续培养。各组处理后每6 h更换各自培养液及氧化剂,在12 h后停止处理并检测神经元胞内活性氧(ROS)生成的水平、细胞凋亡情况,以及糖原合成激酶3β(GSK-3β)和p-GSK-3β的表达水平。**结果** 与NM相比,HM可降低H₂O₂氧化损伤后神经元胞内ROS尤其是羟自由基(HO·)的生成($P < 0.01$),减少神经元凋亡的数量($P < 0.01$),下调caspase-3的表达($P < 0.01$),促进GSK-3β的磷酸化($P < 0.01$)。**结论** 氢分子对H₂O₂氧化损伤的神经元具有保护效应,其机制与降低神经元胞内ROS尤其是HO·的生成、减少神经元凋亡的数量和抑制凋亡信号通路的激活以及促进GSK-3β的磷酸化利于神经元生长有关。

[关键词] 氧化损伤;过氧化氢;活性氧;氢;神经元;细胞凋亡;糖原合成激酶3β

[中图分类号] R 744.9; R 965.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2014)03-0233-07

Protective effect of molecular hydrogen against H₂O₂-induced oxidative injury in cultured rat spinal cord neurons

LIU Fang-ting¹, LI Jian¹, LI Xiang-nan¹, XU Sheng-ming², XIANG Zheng-hua³, YUAN Hong-bin^{1*}

1. Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

3. Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of molecular hydrogen against hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative injury in primary cultures of rat spinal cord neurons and the related mechanism. **Methods** Rat spinal cord neurons were cultured for 7 days and were randomly assigned to four groups with different treatments-(1) Normal medium (NM) control; treated with NM; (2) Hydrogen-rich medium(HM); treated with HM; (3) NM+H₂O₂; treated with 100 μmol/L H₂O₂ and 15 μmol/L ferrous chloride (FeCl₂) after pretreatment with NM for 2 h; and (4) HM+H₂O₂; treated with 100 μmol/L H₂O₂ and 15 μmol/L FeCl₂ after pretreatment with HM for 2 h. The respective media were changed every 6 h in each group, and 12 h later the cells were collected for assays of reactive oxygen species (ROS), hydroxyl radical (HO·), apoptosis, and the expression of glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) and p-GSK-3β. **Results** Compared with NM, HM significantly reduced the H₂O₂-induced intracellular production of ROS and HO· in purified neurons ($P < 0.01$), significantly decreased the number of apoptotic neurons ($P < 0.01$) and expression of caspase-3 ($P < 0.01$), and significantly promoted phosphorylation of GSK-3β ($P < 0.01$). **Conclusion** Molecular hydrogen has protective effect against H₂O₂-induced oxidative injury in primary cultured neurons. The mechanisms might be related to reduction of intracellular production of ROS and HO·, inhibition of apoptosis in neurons and promotion of GSK-3β phosphorylation.

[收稿日期] 2013-09-25

[接受日期] 2014-01-02

[基金项目] 国家自然科学基金(81200953),全军医学科技“十二五”科研项目(CWS11J121). Supported by National Natural Science Foundation of China(81200953) and PLA Research Project of “the 12th Five-Year-Plan” for Medical Science Development(CWS11J121).

[作者简介] 刘芳婷, 硕士生. E-mail: liufangting0714@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885822, E-mail: jfjczyy@aliyun.com

[Key words] oxidative injury; hydrogen peroxide; reactive oxygen species; hydrogen; neurons; apoptosis; glycogen synthase kinase-3 β

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(3): 233-239]

原发性创伤性脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)破坏血脑屏障和神经轴突,导致血流中断、出血、水肿以及神经轴突横断后神经元的退行性反应,而在随后几分钟至数小时内即可因组织损伤引发细胞内线粒体功能失调、组织破坏,从而产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS),如超氧阴离子(superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)、羟自由基(hydroxyl radical, $HO\cdot$)等^[1-2]。ROS被认为是导致继发性SCI的关键因素,可诱发一系列级联反应,致使神经元功能障碍、死亡、凋亡的情况恶化^[3],因此抗氧化是创伤性SCI后进行脊髓保护的关键环节。氢分子被证实是一种安全有效的新型抗氧化剂^[4-5],由于氢气对 $HO\cdot$ 、过氧亚硝酸盐阴离子(peroxynitrite, $ONOO^-$)等具有选择性清除的能力且不干扰代谢性氧化还原反应,并且具有穿透生物膜的特性从而可扩散至胞质、线粒体、细胞核等部位,所以在抗氧化的过程中,氢分子与大多数已知的抗氧化剂相比具有相对较小的不良反应^[4,6-7]。动物实验发现,吸入氢气或腹腔注射饱和氢气生理盐水可有效清除 $HO\cdot$ 和 $ONOO^-$ 等ROS,从而对抗脑、肝、心肌、小肠等组织缺血再灌注诱发的氧化应激损伤^[4,8-10]。我们的前期研究也发现,建立大鼠SCI模型后,腹腔注射饱和氢气可促进其下肢运动功能的恢复^[5]。然而氢分子是否可对氧化损伤后的神经元产生显著神经保护作用及其相关机制尚未见报道。本研究通过离体实验,观察富氢培养对Feton反应所致氧化损伤神经元的保护效应,并初步探讨其作用机制,为氢分子在脊髓保护中的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与主要试剂 新生1 d的SD大鼠由第二军医大学实验动物中心提供。DMEM/F12培养基、胎牛血清(FBS)购自Gibco公司;TUNEL细胞凋亡检测试剂盒、Hoechst33342、2',7'-二氯荧光素二酯酸盐(DCF-DA)、D-Hanks液均购自碧云天

生物技术研究所以;羟苯基荧光素(HPF)购自Invitrogen公司;胰蛋白酶、神经生长因子(NGF)、 H_2O_2 、 $FeCl_2$ 均购自Sigma公司;兔抗糖原合成激酶3 β (GSK-3 β)抗体、兔抗p-GSK-3 β 抗体购自Santa Cruz公司;兔抗 β -actin抗体、兔抗caspase-3抗体、羊抗兔IgG二抗均购自Abcam公司。多聚甲醛(PFA)、PBS等其他常用试剂均由第二军医大学基础部神经生物学教研室提供。

1.2 脊髓神经元培养 参照肖伟等^[11]方法,新生1 d的SD大鼠剪头处死,浸入75%乙醇15 min, D-Hanks液冲洗2次,无菌条件下暴露脊髓后完整分离脊髓,取出后于预冷D-Hanks液中显微镜下剥除表面纤维血管膜,再将其剪碎成1 mm³大小颗粒,以0.25%胰蛋白酶消化20 min,终止消化后离心(1 000 r/min,离心半径为13.5 cm)5 min弃上清。以含20% FBS及10 ng/mL NGF的DMEM/F12培养液重悬,以约 5×10^5 个/mL密度接种于内置1 cm²盖玻片的12孔板内(预先以25 mg/mL多聚赖氨酸包被),每孔加入300 μ L,补足培养液至1 mL。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的孵箱内。每2 d更换培养液,7 d后给予不同处理。

1.3 富氢培养液(hydrogen-rich medium, HM)的制备 以特殊高压设备将氢气以0.4 MPa的压力溶解在常规培养液(normal medium, NM)中6 h,使氢气达到过饱和状态^[5],高压设备由第二军医大学潜水医学研究所提供。HM于正常大气压下,密封储存于4 $^{\circ}$ C冰箱中,每周重新制备1次。在密封静置状态下7 d内以及抽取进行细胞培养(静置)6 h内可保证氢气浓度0.6 mmol/L以上(氢气含量以气相色谱分析法进行检测^[4])。

1.4 实验分组及处理 将培养纯化培养7 d后的脊髓神经元分为4组,并分别换液进行以下处理:(1) NM对照组;以NM继续培养;(2) HM组;以HM继续培养;(3) NM+ H_2O_2 组;以NM培养2 h后,加入100 μ mol/L H_2O_2 和15 μ mol/L $FeCl_2$ (即Feton反应)继续培养;(4) HM+ H_2O_2 组;以HM

预处理 2 h 后,加入 100 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 和 15 $\mu\text{mol/L}$ FeCl₂ 继续培养。处理后每 6 h 更换各自培养液及添加试剂,在 12 h 后停止处理并检测神经元胞内 ROS 生成水平、细胞凋亡情况以及 GSK-3 β 和 p-GSK-3 β 的表达水平。

1.5 细胞内 ROS 的检测

1.5.1 DCF-DA 检测胞内 ROS 按 1 : 1 000 以无血清培养液稀释 DCF-DA,使终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。各组处理 12 h 后,移除培养液,用 D-Hanks 液冲洗 1 次后,加入 0.5 mL 稀释好的 DCF-DA,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱内放置 20 min。再用无血清培养液洗涤 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCF-DA。其后在荧光显微镜下($\times 400$; fluoview 300; Olympus)直接观察并拍照,比较荧光强度。

1.5.2 HPF 特异性检测胞内 HO \cdot 各组处理 12 h 后,移除培养液,用 D-Hanks 液冲洗 1 次后,加入 0.5 mL 10 $\mu\text{mol/L}$ HPF(稀释方法同 DCF-DA),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱放置 30 min,余同 DCF-DA。

1.6 神经元凋亡的检测

1.6.1 TUNEL 染色 各组处理 12 h 后移除培养液,以 PBS 洗涤 1 次后,用 4% PFA 固定 30 min。再以 PBS 洗涤 2 次,加入含有 0.1% Triton X-100 的 PBS,冰浴 2 min。PBS 洗涤 2 次后置于甲醇配制的 0.3% H₂O₂ 溶液中室温孵育 20 min,随后用 PBS 洗涤 3 次。加 50 μL TUNEL 检测液(配制方法:TdT 酶 20 μL ,荧光标记液 480 μL ,TUNEL 检测液 500 μL),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min。PBS 洗涤 3 次后,用抗荧光淬灭封片液封片后于荧光显微镜下($\times 400$)观察拍照,比较阳性细胞百分比。

1.6.2 Caspase-3 染色 细胞接种于玻片,贴壁后用于实验;各组处理 12 h 后移除培养液,PBS 洗涤 1 次后,用 4% PFA 固定 20 min。再以 PBS 洗涤 5 min。0.5% Triton X-100 穿孔 15 min 后,用 PBS 漂洗 2 次。1% BSA 封闭 30 min 后,加入 1% BSA 稀释的兔抗 caspase-3 一抗,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。PBS 漂洗 2 次后,加入 1% BSA 稀释的 TRITC-羊抗兔 IgG 二抗,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。PBS 漂洗 2 次后,加入 5 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 染色 2 min。封片后于荧光显微镜下($\times 400$)观察、拍照,比较荧光强度。

1.7 GSK-3 β 和 p-GSK-3 β 表达水平的检测 采用蛋白质印迹法检测 GSK-3 β 和 p-GSK-3 β 表达水平。各组处理 12 h 后移除培养液,用 PBS 洗涤 2 次,加入 100 μL Rippa 蛋白裂解液(含 1% PMSF 蛋白酶抑制剂),于 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min 后,12 000 r/min(离心半径 13.5 cm)离心 30 min,吸取上清备用。根据样品数量,将 BCA 试剂 A 和 BCA 试剂 B 按体积比 50 : 1 配制适量 BCA 工作液,充分混匀。BCA 工作液室温 24 h 内稳定。用 PBS 完全溶解蛋白标准品,并稀释至终浓度为 0.5 mg/mL。将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 加到 96 孔板的标准品孔中,加标准品稀释液补足至 20 μL 。加适当体积样品到 96 孔板的样品孔中,加标准品稀释液补足至 20 μL 。各孔加入 200 μL BCA 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min。在 562 nm 处测定光密度值(D_{562}),根据标准曲线计算出蛋白浓度。用 Rippa 蛋白裂解液调整每管蛋白浓度至均值,加入含 2-巯基乙醇和溴酚蓝的 1 \times 蛋白上样缓冲液,95 $^{\circ}\text{C}$ 共孵育 10 min,取出置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。将 30% 聚丙烯酰胺按 8% 分离胶与 5% 浓缩胶配制,蛋白上样后电泳约 2 h(Bio-Rad protein3 电泳仪),随后将凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜(Bio-Rad trans blot 电转仪)。PVDF 膜用脱脂奶粉封闭 1 h 后,加入 1 : 1 000 一抗(兔抗 p-GSK-3 β 或兔抗 GSK-3 β 或兔抗 β -actin),于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 PBS-T 洗膜 3 次后,加入 1 : 2 000 羊抗兔二抗,室温孵育 2 h。再用 PBS-T 洗膜 3 次,稍干后按 1 : 1 加入 AB 显影液,在 Bio-Rad 的化学发光成像仪(Bio-Rad Chemidox)上显影。然后分析灰度值,再比较灰度系数比。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 17.0 进行统计学处理,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 SNK- q 检验分析组间差异,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 HM 对氧化损伤后神经元胞内 ROS 含量的影响 加入 H₂O₂(100 $\mu\text{mol/L}$)和 FeCl₂(15 $\mu\text{mol/L}$) 诱导氧化损伤 12 h 后,通过 DCF-DA 和 HPF 荧光强度的测定检测胞内 ROS 水平。ROS 总量(以 DCF-DA 染色表示,图 1)及 HO \cdot 的含量(以 HPF 染色表示,图

2)在 NM 组与 HM 组之间差异无统计学意义; Feton 反应使 NM 培养的神经元内 ROS 总量及 HO· 的含

量明显增加($P < 0.01$),而 HM 可降低氧化损伤后神经元内 ROS 以及 HO· 的含量($P < 0.01$)。

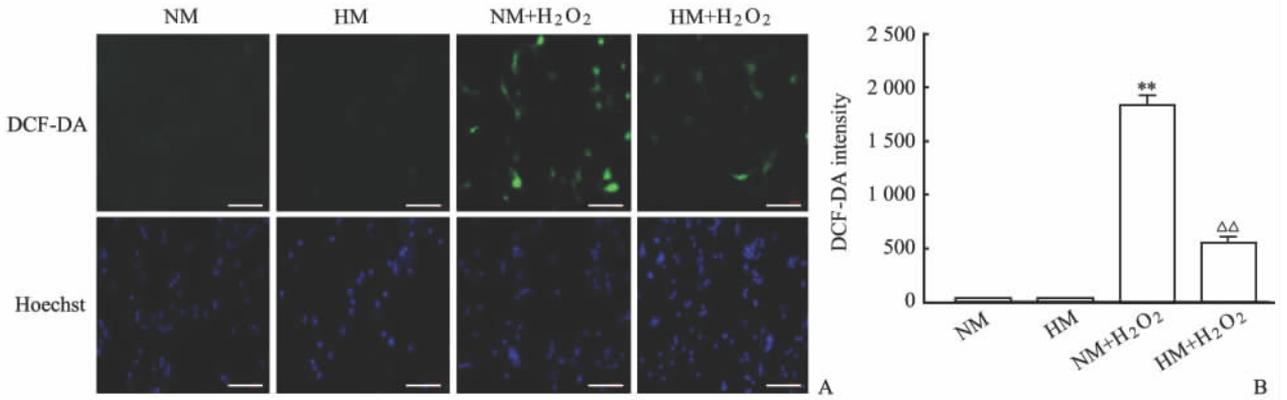


图 1 HM 对氧化损伤后神经元胞内 ROS 含量的影响

Fig 1 Effect of HM on production of intracellular ROS in oxidative injured neurons

NM: Normal medium; HM: Hydrogen-rich medium; DCF-DA: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate. Oxidative injury was induced by 100 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ and 15 $\mu\text{mol/L}$ FeCl₂ for 12 h. There was no difference between control and single HM groups, but the total amounts of ROS were significantly increased by H₂O₂ ($P < 0.01$), and was significantly decreased by HM ($P < 0.01$). A: DCF-DA stained pictures. Scale bar=100 μm ; B: Data were expressed as the fluorescence intensity of DCF-DA. ** $P < 0.01$ vs NM; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs NM+H₂O₂. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

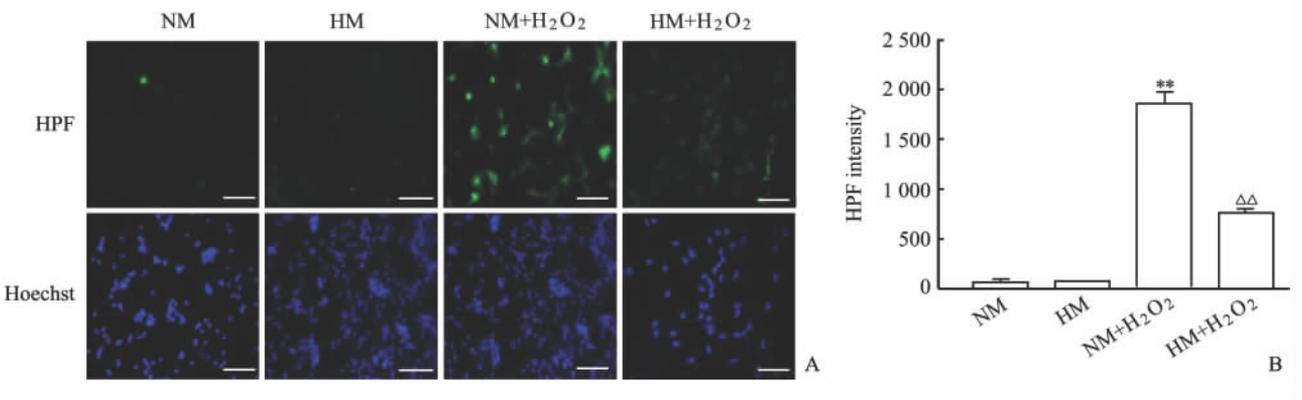


图 2 HM 对氧化损伤后神经元胞内 HO· 含量的影响

Fig 2 Effect of HM on production of intracellular HO· in oxidative injured neurons

NM: Normal medium; HM: Hydrogen-rich medium; HPF: Hydroxyphenyl fluorescein. There was no difference between control and single HM groups, but after 12 h H₂O₂-induced injury, the total amounts of HO· were significantly increased ($P < 0.01$), and was significantly decreased by HM ($P < 0.01$). A: HPF stained pictures. Scale bar=100 μm ; B: Data were expressed as the fluorescence intensity of HPF. ** $P < 0.01$ vs NM; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs NM+H₂O₂. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.2 HM 对氧化损伤后神经元凋亡的影响 由 TUNEL 检测结果(图 3)可知, H₂O₂ 诱导氧化损伤使 NM 培养的神经元内凋亡细胞百分比增加($P < 0.01$),而 HM 可降低氧化损伤后神经元凋亡细胞百分比($P < 0.01$)。由凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达结果(图 4)可见, H₂O₂ 诱导氧化损伤上调 NM

培养的神经元 caspase-3 的表达($P < 0.01$),而 HM 可降低氧化损伤后神经元 caspase-3 的表达($P < 0.01$)。

2.3 HM 对氧化损伤后神经元 GSK-3 β 和 p-GSK-3 β 表达水平的影响 如图 5 所示, H₂O₂ 诱导氧化损伤后,神经元 GSK-3 β 的总表达量在组间差异无

统计学意义。然而,其磷酸化失活状态即 p-GSK-3 β 的比例在 H₂O₂ 诱导氧化损伤后降低 ($P < 0.01$)。HM 可使氧化损伤后神经元 p-GSK-3 β 的比例升高的比例在 H₂O₂ 诱导氧化损伤后降低 ($P < 0.01$)。 ($P < 0.01$)。

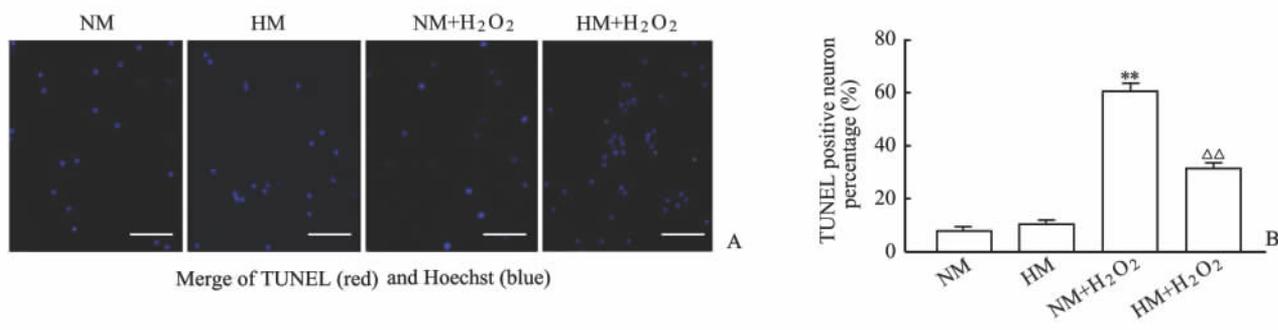


图 3 HM 对氧化损伤后 TUNEL 阳性神经元数量的影响

Fig 3 Effect of HM on the percentage of TUNEL positive neurons after oxidative injury

NM: Normal medium; HM: Hydrogen-rich medium. After 12 h H₂O₂-induced injury, the percentage of TUNEL positive neurons was significantly increased ($P < 0.01$), and was significantly decreased by HM ($P < 0.01$). A: TUNEL stained pictures. Scale bar=100 μ m; B: Data were expressed as the percentage of TUNEL positive neurons. ** $P < 0.01$ vs NM; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs NM+H₂O₂. $n = 3, \bar{x} \pm s$

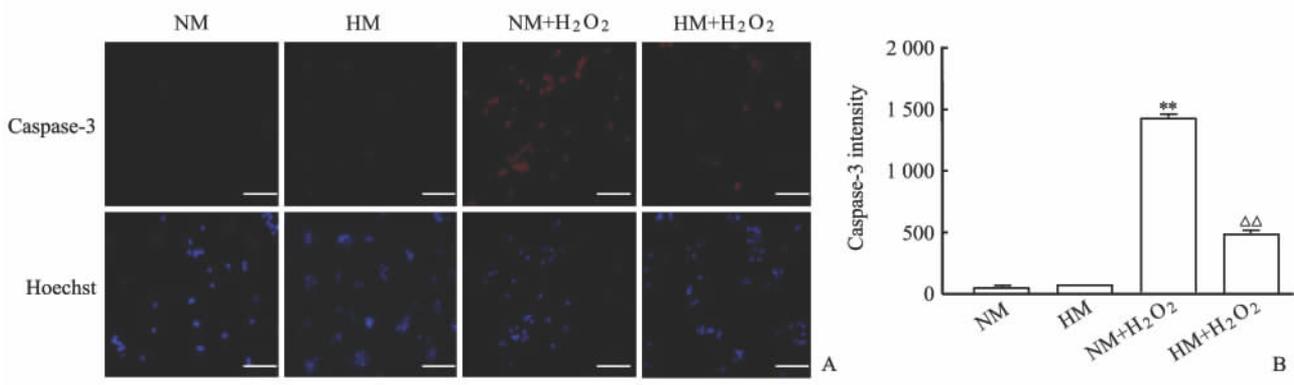


图 4 HM 对氧化损伤后神经元 caspase-3 表达水平的影响

Fig 4 Effect of HM on the expression of caspase-3 after oxidative injury

NM: Normal medium; HM: Hydrogen-rich medium. After 12 h H₂O₂-induced injury, the fluorescence intensity of caspase-3 was significantly increased ($P < 0.01$), and was significantly decreased by HM ($P < 0.01$). A: Caspase-3 stained pictures. Scale bar=100 μ m; B: Data were expressed as the fluorescence intensity of caspase-3. ** $P < 0.01$ vs NM; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs NM+H₂O₂. $n = 3, \bar{x} \pm s$

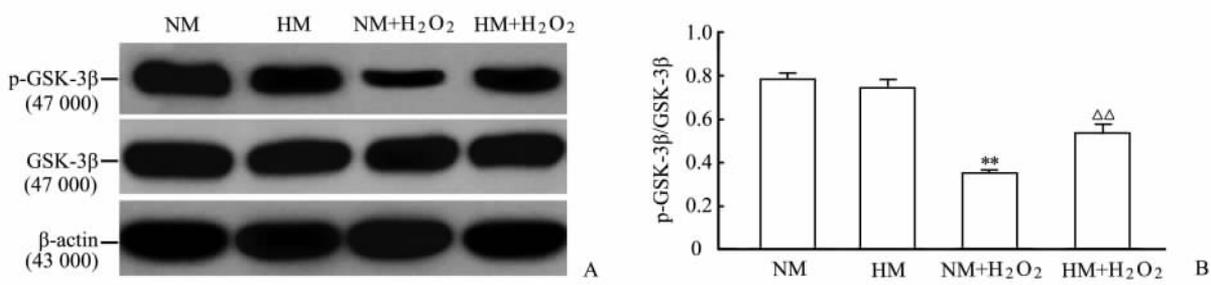


图 5 HM 对氧化损伤后神经元 GSK-3 β 及 p-GSK-3 β 表达水平的影响

Fig 5 Effect of HM on the expression of GSK-3 β and p-GSK-3 β after oxidative injury

NM: Normal medium; HM: Hydrogen-rich medium. After 12 h H₂O₂-induced injury, there were no significant differences among different groups. However, the phosphorylation of GSK-3 β was significantly reduced by H₂O₂-induced oxidative injury ($P < 0.01$), and HM significantly increased the level of p-GSK-3 β ($P < 0.01$). A: The production of GSK-3 β and p-GSK-3 β was assayed by Western blotting analysis; B: Data were expressed as relative gray values. ** $P < 0.01$ vs NM; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs NM+H₂O₂. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

SCI后短时间内即可因组织破坏引发线粒体功能失调产生大量 ROS^[1-2]。ROS 被证实是导致继发性 SCI 的关键因素,可诱发一系列级联反应,加重神经元功能障碍、死亡,并诱导神经元凋亡^[3]。氢分子作为一种新型抗氧化剂,仅与性质活跃造成细胞损伤的主要分子 HO·、ONOO⁻等自由基反应,HO·和 ONOO⁻均是强氧化剂,可导致核酸、脂类以及蛋白质变性,这种选择性清除的能力,使其不干扰机体正常的代谢性氧化还原反应,不良反应小^[4,6-7]。由于氢气具有易燃易爆的性质,将其制成过饱和的氢气溶液不但在给药时更加安全便捷,而且氢分子的浓度更高^[4-5]。已有研究表明,氢分子对氧化应激造成损伤的脑、肝、心肌、小肠等组织均具有保护作用^[4-5,8-10],但其是否可降低氧化损伤后神经元的凋亡并促进神经元的生长少有报道。本研究中我们采用体外纯化培养的大鼠脊髓神经元,证明富氢培养可降低 H₂O₂ 诱导氧化损伤后神经元胞内 ROS 尤其是 HO· 的生成、降低神经元凋亡的数量和抑制凋亡信号通路的激活,以及促进 GSK-3β 的磷酸化,从而利于神经元生长与修复。

目前对氢气具有器官保护作用的研究中,明确了的作用机制限于其对氧自由基的清除作用,尤其是对羟自由基和过氧化硝酸盐的选择性清除;氢分子具有细胞保护作用的其他可能机制包括增加超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等从而产生抗氧化作用、抑制 caspase-3 抗凋亡、降低炎症因子抑制氧化应激诱发的炎症等^[12],但对具体的信号通路均没有深入研究。本研究以 H₂O₂ 诱导氧化损伤模拟 SCI 后出现氧化应激的病理状态。H₂O₂ 不但可以穿透生物膜,并且可在亚铁离子的催化下生成大量 HO· (即 Fenton 反应),胞内 H₂O₂ 和 HO· 均可导致细胞损伤^[13]。通过实验我们发现,富氢培养确实可以降低氧化损伤诱导 12 h 后神经元胞内 ROS (DCF 荧光强度) 特别是 HO· (HPF 荧光强度) 的产生 (HM+H₂O₂ 组 vs NM+H₂O₂ 组, $P < 0.01$),从而降低氧化应激造成的细胞损伤。氧化应激可激活细胞凋亡信号通路,caspase-3 是主要的细胞凋亡信号分子之一,在细胞凋亡信号通路中起着不可替代的作用^[14]。我们也观察到富氢培养降低 H₂O₂ 诱导氧

化损伤 12 h 后神经元凋亡的数量,TUNEL 阳性的神经元比例下降 ($P < 0.01$);同时富氢培养还下调了氧化损伤后神经元 caspase-3 的表达水平 ($P < 0.01$),也证实 HM 可抑制氧化应激导致的神经元凋亡。

此外,我们还发现氢分子可促进神经元胞内信号分子 GSK-3β 的磷酸化。GSK-3β 是降解 β-catenin 的激酶,磷酸化 (即 p-GSK-3β) 是 GSK-3β 的失活状态。当胞质中 β-catenin 含量较高时,β-catenin 发生核易位与转录抑制因子——T 细胞因子结合,可激活 cyclin D1 使细胞 G₁ 期缩短进入 DNA 合成期,同时激活 c-myc 使细胞快速进入 S 期从而促进细胞的生长、增殖和分化^[15-16]。因此正常比例的 p-GSK-3β/GSK-3β 控制了细胞过度增殖和分化并维持细胞的生长与更新。Dill 等^[16] 经研究证实,GSK-3β 的失活 (即 p-GSK-3β/GSK-3β 比例升高) 促进了中枢神经系统神经元轴突的生长和恢复。值得注意的是,ROS 正是抑制 GSK-3β 失活的一个重要因素^[17]。因此,ROS 可以通过抑制 GSK-3β 失活 (即磷酸化水平降低) 影响中枢神经系统的轴突生长与修复。本研究中,我们也观察到了 H₂O₂ 诱导氧化损伤 12 h 后神经元 p-GSK-3β/GSK-3β 的比例降低 ($P < 0.01$),而 GSK-3β 的总表达量组间差异无统计学意义,这可能是由于 ROS 尚没有从基因水平改变 p-GSK-3β 的表达,但是却对快速调节的磷酸化反应造成了抑制。而富氢培养可提高 H₂O₂ 诱导氧化损伤后神经元 p-GSK-3β/GSK-3β 的比例 ($P < 0.01$),说明氢分子可能通过抑制 GSK-3β 的活性,促进神经元的生长与修复。

结合我们的前期研究^[5],以上结果表明对氧化损伤的神经元产生保护效应,是氢分子促进 SCI 后大鼠下肢运动功能恢复机制的一部分。目前,在动物模型上给予氢分子基本上通过两种给药途径来实现,即腹腔注射 (2.5~7.5 mL/kg) 饱和氢气以及吸入 2% 的氢气,对不同给药方式的疗效比较以及剂量-效应关系,仍需进一步探讨。此外,SCI 后还可造成其他不利于轴突再生与修复的影响,如破坏血脑屏障、激活小胶质细胞导致炎症扩大化,以及激活星形胶质细胞形成胶瘢痕等^[1,18]。氢分子的脊髓保护作用是否与抑制上述病理变化有关及相关机制,也值得进一步研究,相关研究将为氢分子应用于临床

进行脊髓保护、促进功能恢复提供更多的理论依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Bains M, Hall E D. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822:675-684.
- [2] Xiong Y, Rabchevsky A G, Hall E D. Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury[J]. *J Neurochem*, 2007, 100:639-649.
- [3] Yin X, Yin Y, Cao F L, Chen Y F, Peng Y, Hou W G, et al. Tanshinone II A attenuates the inflammatory response and apoptosis after traumatic injury of the spinal cord in adult rats[J]. *PLoS One*, 2012, 7:e38381.
- [4] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13:688-694.
- [5] Chen C, Chen Q, Mao Y, Xu S, Xia C, Shi X, et al. Hydrogen-rich saline protects against spinal cord injury in rats[J]. *Neurochem Res*, 2010, 35:1111-1118.
- [6] James A M, Cochem H M, Murphy M P. Mitochondria-targeted redox probes as tools in the study of oxidative damage and ageing[J]. *Mech Ageing Dev*, 2006, 126:982-986.
- [7] Sun H, Chen L, Zhou W, Hu L, Li L, Tu Q, et al. The protective role of hydrogen-rich saline in experimental liver injury in mice[J]. *J Hepatol*, 2011, 54:471-480.
- [8] Liu Q, Shen W F, Sun H Y, Fan D F, Nakao A, Cai J M, et al. Hydrogen-rich saline protects against liver injury in rats with obstructive jaundice[J]. *Liver Int*, 2010, 30:958-968.
- [9] Sun Q, Kang Z, Cai J, Liu Y, Zhang J H, Denoble P J, et al. Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009, 234:1212-1219.
- [10] Zheng X, Mao Y, Cai J, Li Y, Liu W, Sun P, et al. Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Free Radic Res*, 2009, 43:478-484.
- [11] 肖伟, 罗卓荆, 黄明, 胡学昱, 龚凯. 不同营养因子组合对大鼠脊髓神经元的作用研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2008, 16:940-943.
- [12] Xie K, Yu Y, Pei Y, Hou L, Chen S, Xiong L, et al. Protective effects of hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release[J]. *Shock*, 2010, 34:90-97.
- [13] Lee M N, Lee S H, Lee M Y, Kim Y H, Park J H, Ryu J M, et al. Effect of dihydrotestosterone on mouse embryonic stem cells exposed to H₂O₂-induced oxidative stress[J]. *J Vet Sci*, 2008, 9:247-256.
- [14] Snigdha S, Smith E D, Prieto G A, Cotman C W. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death[J]. *Neurosci Bull*, 2012, 28:14-24.
- [15] 魏颖, 王国林, 王海云, 王晨旭. Akt-GSK3 β 通路在丙泊酚后处理对脑缺血再灌注大鼠长时程脑保护效应中的作用[J]. *中华麻醉学杂志*, 2013, 33:91-94.
- [16] Dill J, Wang H, Zhou F, Li S. Inactivation of glycogen synthase kinase 3 promotes axonal growth and recovery in the CNS[J]. *J Neurosci*, 2008, 28:8914-8928.
- [17] Pizarro J G, Yeste-Velasco M, Rimbau V, Casadesús G, Smith M A, Pallás M, et al. Neuroprotective effects of SB-415286 on hydrogen peroxide-induced cell death in B65 rat neuroblastoma cells and neurons[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2008, 26(3-4):269-276.
- [18] Sofroniew M V, Vinters H V. Astrocytes: biology and pathology[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 119:7-35.

[本文编辑] 孙岩