

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

袁佳 王迪芬 刘颖 陈先俊 张海玲

【摘要】 目的 探讨富氢水对创伤性脑损伤 (TBI) 大鼠核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 表达及氧化应激损伤的影响。方法 将 90 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组、TBI 组、富氢水干预组, 每组 30 只。采用改良 Feeney 法自由落体撞击制作 TBI 模型; 假手术组开颅窗后不撞击。富氢水干预组撞击致脑损伤后腹腔注射富氢水 5 mL/kg, 每日 1 次, 共 5 d; 假手术组和 TBI 组给予等量生理盐水。各组分别于术后 6、12、24、48 h 和 5 d 时取 6 只大鼠进行神经功能缺损评分 (NSS), 活杀后取损伤灶周边皮质脑组织备检。分光光度法检测过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性及丙二醛 (MDA) 含量; 实时荧光定量反转录-聚合酶链反应 (RT-qPCR) 和蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测 Nrf2 mRNA 和核蛋白表达; 苏木素-伊红 (HE) 染色观察脑组织病理学改变。结果 ① NSS 评分: 富氢水干预组术后 12、24、48 h 和 5 d 时 NSS 评分 (分) 较 TBI 组明显下降 (12 h: 9.83 ± 2.32 比 13.17 ± 2.71 , 24 h: 9.83 ± 2.79 比 13.50 ± 2.43 , 48 h: 7.50 ± 2.07 比 11.83 ± 2.14 , 5 d: 5.50 ± 1.87 比 10.50 ± 2.43 , 均 $P < 0.05$)。② TBI 术后 CAT、GSH-Px 明显低于假手术组, MDA 明显高于假手术组, 以 24 h 时最为明显 [CAT (kU/g): 1.080 ± 0.312 比 3.571 ± 0.758 , GSH-Px (kU/g): 9.195 ± 3.173 比 32.385 ± 10.619 , MDA ($\mu\text{mol/g}$): 12.282 ± 2.896 比 4.349 ± 1.511 , 均 $P < 0.01$]; 富氢水干预组各项指标均明显改善, 接近假手术组水平。③ RT-qPCR: 3 组各时间点 Nrf2 mRNA 表达差异均无统计学意义。④ Western Blot: TBI 组术后脑组织 Nrf2 核蛋白表达 (灰度值) 较假手术组明显上升, 24 h 达高峰 (0.703 ± 0.262 比 0.238 ± 0.120 , $P < 0.05$); 富氢水干预组术后 Nrf2 核蛋白表达明显高于 TBI 组, 以 24 h 时最为明显 (1.110 ± 0.372 比 0.703 ± 0.262 , $P < 0.05$)。⑤ HE 染色: 假手术组脑组织结构完整; TBI 组各时间点出现不同程度的脑损伤, 以 24 h 时损伤最为明显; 富氢水干预组损伤较 TBI 组明显减轻。结论 富氢水可上调 TBI 大鼠脑组织 Nrf2 表达, 减轻脑组织氧化应激损伤, 其机制可能与 Nrf2 诱导其下游抗氧化物酶表达有关。

【关键词】 核因子 E2 相关因子 2; 富氢水; 创伤性脑损伤; 氧化应激

Effects of hydrogen rich water on the expression of Nrf 2 and the oxidative stress in rats with traumatic brain injury Yuan Jia*, Wang Difen, Liu Ying, Chen Xianjun, Zhang Hailin. *Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China
Corresponding author: Wang Difen, Email: 1078666485@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of hydrogen rich water on the expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and oxidative stress in rats with traumatic brain injury (TBI). **Methods** Ninety healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham operation group, TBI group and hydrogen rich water treatment group (HW group), with 30 rats in each group. TBI model was reproduced by the modified Feeney weight dropping method. The skulls of rats in sham operation group underwent only craniotomy without direct hit. The rats in HW group received brain injury by hitting after craniotomy, followed by injection of hydrogen rich water (5 mL/kg) intraperitoneally once a day for 5 days after successful reproduction of the model. The rats in sham operation group and TBI group were given an equal amount of normal saline in same manner. Six rats from each group were sacrificed at 6, 12, 24, 48 hours and 5 days after evaluating neurological severity scores (NSS). The brain tissue in injured ipsilateral cortex was harvested. The activity of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), and content of malondialdehyde (MDA) were determined by spectrophotometry. The expressions of mRNA and nucleoprotein of Nrf2 were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western Blot. The pathological changes were observed with microscopy after hematoxylin and eosin (HE) staining. **Results** ① NSS score:

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.11.009

基金项目: 贵州省科技攻关项目 (黔科合 SY [2010]3079 号); 贵州省高层次人才特助经费项目 (TZJF-2011-25); 国家临床重点专科建设项目 (财社 [2011]170 号); 贵州省临床重点学科建设项目 (黔卫办发 [2011]52)

作者单位: 550004 贵州贵阳, 贵州医科大学附属医院重症医学科

通讯作者: 王迪芬, Email: 1078666485@qq.com

compared with TBI group, NSS in HW group at 12, 24, 48 hours and 5 days were significantly decreased (12 hours: 9.83 ± 2.32 vs. 13.17 ± 2.71 , 24 hours: 9.83 ± 2.79 vs. 13.50 ± 2.43 , 48 hours: 7.50 ± 2.07 vs. 11.83 ± 2.14 , 5 days: 5.50 ± 1.87 vs. 10.50 ± 2.43 , all $P < 0.05$). ② Compared with sham operation group, the activity of GSH-Px and CAT in TBI group were markedly declined after operation, while the MDA content was elevated significantly, especially at 24 hours [CAT (kU/g): 1.080 ± 0.312 vs. 3.571 ± 0.758 , GSH-Px (kU/g): 9.195 ± 3.173 vs. 32.385 ± 10.619 , MDA ($\mu\text{mol/g}$): 12.282 ± 2.896 vs. 4.349 ± 1.511 , all $P < 0.01$]. Compared with TBI group, the parameters in HW group were improved, and they were similar as sham operation group. ③ RT-qPCR: no significant difference was found in the expression of Nrf2 mRNA at each time point in three groups. ④ Western Blot: the expression of Nrf2 nucleoprotein (gray value) in TBI group was apparently higher than that in sham operation group, and peaked at 24 hours (0.703 ± 0.262 vs. 0.238 ± 0.120 , $P < 0.05$), and the expression in HW group was obviously higher than that in TBI group, especially at 24 hours (1.110 ± 0.372 vs. 0.703 ± 0.262 , $P < 0.05$). ⑤ HE staining: the brain structure in sham operation group was found to be intact. However, there were different degrees of pathological changes at each time in TBI group, especially at 24 hours. The pathological damage of brain tissue in HW group was significantly milder. **Conclusions** Hydrogen rich water can up-regulate the expression of Nrf2, and reduce oxidative damage of traumatic brain injury in rats. Nrf2 can up-regulate the expression of its downstream antioxidant enzymes, which may be the mechanism of the upregulation expression of Nrf2 in the study.

【Key words】 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; Hydrogen rich water; Traumatic brain injury; Oxidative stress

创伤性脑损伤 (TBI) 发病率高, 是致死和致残的主要原因之一^[1-2], 全球每年发病率为 200/10 万, 病死率为 20/10 万^[3]。TBI 发病机制复杂, 氧化应激被认为是 TBI 发生发展过程中的一个重要因素^[4]。氢气是一种强还原性物质, 可有效清除自由基, 具有选择性抗氧化作用, 将氢气溶解于液体制成富氢水, 其疗效与氢气吸入治疗相当^[5]。最近研究表明, 氢气或富氢水可能通过激活核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) - 抗氧化反应元件 (ARE) 通路, 以改善氧化应激引发的某些疾病, 如脓毒症所致肠损伤和脑功能障碍以及高压氧所致肺损伤^[6-8]等, 但其在 TBI 氧化应激损伤的作用目前尚未见相关报道。本实验通过建立 TBI 大鼠模型, 观察富氢水治疗后大鼠脑组织 Nrf2 表达和氧化应激相关指标的变化, 进一步探讨富氢水在 TBI 中的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂: 富氢水 (北京活力氢源饮品有限公司), Nrf2 和 β -肌动蛋白 (β -actin) 引物合成 (上海生工生物工程有限公司), 绿色荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 预混液 (美国 Thermo Scientific 公司), 核蛋白与胞质蛋白提取试剂盒 (南京凯基生物科技有限公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 小鼠抗大鼠 Nrf2 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司), 兔抗大鼠组蛋白 3 (H3) 多克隆抗体、山羊抗小鼠 / 抗兔二抗 (上海 Abmart 公司), 化学发光试剂盒 (美国 Millipore 公司), 过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、丙

二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.2 实验动物及分组: 90 只清洁级成年雄性 SD 大鼠, 体质量 250 ~ 300 g, 由第三军医大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK (军) 2012-0011。按随机数字表法将大鼠分为假手术组、TBI 组、富氢水干预组, 每组 30 只。

1.3 TBI 模型制备及分组处理: 腹腔注射 10% 水合氯醛 3.5 mL/kg 麻醉大鼠后, 固定于脑立体定位仪上, 采用改良 Feeney 法自由落体撞击制作 TBI 模型^[9]; 假手术组开颅窗后不行自由落体撞击。富氢水干预组于制模后每日腹腔注射富氢水 5 mL/kg, 每日 1 次, 连续 5 d; TBI 组和假手术组每日腹腔注射等量生理盐水, 连续 5 d。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.4 观察指标及检测方法: 各组分别于术后 6、12、24、48 h 及 5 d 处死 6 只大鼠, 取损伤灶周边皮质脑组织备检。

1.4.1 神经功能缺损评分 (NSS): 各组大鼠在处死前采用 NSS 评分从运动、感觉、共济和反射 4 个方面评价 TBI 后的神经功能缺损状况^[10], 以判断大鼠的损伤和恢复程度。总分 0 ~ 18 分, 分数越高, 说明神经功能受损程度越严重。

1.4.2 分光光度法检测脑组织 CAT、GSH-Px 活性及 MDA 含量: 取部分损伤灶周边皮质脑组织, 制备 10% 脑组织匀浆, 离心取上清, BCA 法测定蛋白浓度, 按照试剂盒说明书操作。

1.4.3 实时荧光定量反转录 - 聚合酶链反应

(RT-qPCR) 检测脑组织 Nrf2 mRNA 表达:取部分损伤灶周边皮质脑组织, TRIzol 法提取总 RNA, 反转录合成 cDNA, 使用绿色荧光染色法进行模板的荧光定量 PCR 检测。Nrf2 引物序列: 上游 5'-CA AATCCCACCTTGAACACA-3', 下游 5'-TGACTAAT GGCAGCAGAGGA-3'; β -actin 引物序列: 上游 5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3', 下游 5'-GGGG TGTGAAGGTCTCAA-3'。用 ABI ViiA7 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增, 反应体系体积为 20 μ L。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 / 延伸 60 s, 42 个循环。以溶解曲线检测引物特异性, β -actin 为内参照, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 Nrf2 的相对表达量。

1.4.4 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测脑组织 Nrf2 核蛋白表达:取部分损伤灶周边皮质脑组织, 按照细胞核与细胞质蛋白提取试剂盒说明书提取核蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。上样量 40 μ g, 配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 湿式电转移法经十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 转至聚偏二氟乙烯膜, 室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 洗膜后加小鼠抗大鼠 Nrf2 单克隆抗体 (1:3 500)、兔抗大鼠 H3 多克隆抗体 (1:5 000), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 用含吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (TBST) 洗膜 3 次, 加入山羊抗小鼠 / 抗兔二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 经免疫化学发光显色液显色, 将膜用化学发光仪器曝光, 采用 Chemi Analysis 软件分析灰度值, 以目的蛋白与内参 H3 的灰度比值表示目

的蛋白的相对表达量。

1.4.5 脑组织病理学改变:取部分损伤灶周边皮质脑组织, 10% 甲醛水溶液固定, 石蜡包埋、切片, 苏木素 - 伊红 (HE) 染色, 光镜下观察病理学改变。

1.5 统计学方法:应用 SPSS 20.0 软件分析数据, 各组数据先进行正态性检验, 若符合正态分布, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组变量比较用独立样本 t 检验; 多组变量比较采用单因素方差分析, 方差齐者, 组间两两比较用 LSD 检验, 方差不齐者用 Dunnett T3 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSS 评分 (表 1):假手术组各时间点 NSS 评分均为 0。TBI 组与富氢水干预组术后 6 h NSS 评分无统计学差异 ($P > 0.05$); 随时间延长, 富氢水干预组 NSS 评分逐渐下降, 术后 12、24、48 h 及 5 d 时 NSS 评分明显低于 TBI 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 损伤灶周边皮质组织 CAT、GSH-Px 活性和 MDA 含量 (表 1):假手术组、TBI 组和富氢水干预组 6 h 时 CAT、GSH-Px 活性差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。与假手术组比较, TBI 组于术后 12 h 起 CAT、GSH-Px 活性均明显降低, 24 h 达谷值 (均 $P < 0.05$); 富氢水干预组术后 12 h 起 CAT、GSH-Px 活性均较 TBI 组明显升高 (均 $P < 0.05$)。TBI 组术后各时间点 MDA 含量均较假手术组明显升高, 24 h 达峰值 (均 $P < 0.05$); 而富氢水干预组术后各时间点 MDA 含量均较 TBI 组明显降低, 以 24 h 时较为明显 (均 $P < 0.05$)。

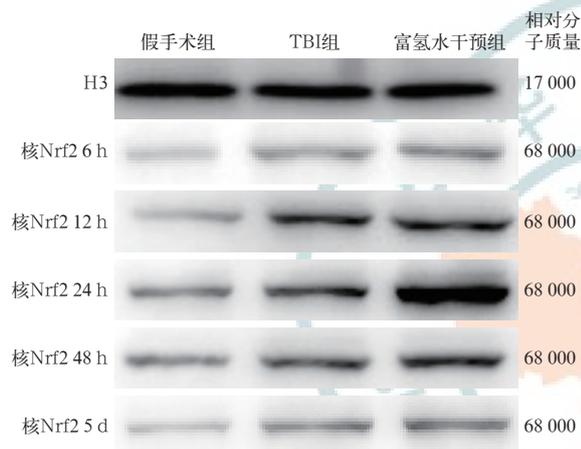
表 1 富氢水对 TBI 大鼠脑创伤后不同时间点 NSS 评分、脑组织 CAT、GSH-Px 活性和 MDA 含量以及 Nrf2 mRNA、Nrf2 核蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	NSS 评分 (分)	CAT (kU/g)	GSH-Px (kU/g)	MDA (μ mol/g)	Nrf2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Nrf2 核蛋白 (灰度值)
假手术 6 h 组	6	0	3.565 \pm 0.865	32.787 \pm 11.860	4.430 \pm 1.373	1.106 \pm 0.222	0.237 \pm 0.139
假手术 12 h 组	6	0	3.584 \pm 0.889	33.147 \pm 9.035	4.304 \pm 1.651	1.107 \pm 0.407	0.235 \pm 0.129
假手术 24 h 组	6	0	3.571 \pm 0.758	32.385 \pm 10.619	4.349 \pm 1.511	1.128 \pm 0.288	0.238 \pm 0.120
假手术 48 h 组	6	0	3.556 \pm 1.040	32.477 \pm 9.662	4.427 \pm 1.308	1.106 \pm 0.263	0.238 \pm 0.129
假手术 5 d 组	6	0	3.564 \pm 0.651	33.267 \pm 9.319	4.419 \pm 1.375	1.112 \pm 0.293	0.233 \pm 0.115
TBI 6 h 组	6	12.17 \pm 2.48	2.681 \pm 0.630	24.363 \pm 7.295	6.645 \pm 1.867 ^a	1.151 \pm 0.431	0.402 \pm 0.138
TBI 12 h 组	6	13.17 \pm 2.71	1.927 \pm 0.523 ^b	17.325 \pm 6.178 ^b	7.309 \pm 2.255 ^a	1.118 \pm 0.536	0.432 \pm 0.124 ^a
TBI 24 h 组	6	13.50 \pm 2.43	1.080 \pm 0.312 ^b	9.195 \pm 3.173 ^b	12.282 \pm 2.896 ^b	1.157 \pm 0.415	0.703 \pm 0.262 ^a
TBI 48 h 组	6	11.83 \pm 2.14	1.602 \pm 0.572 ^b	12.927 \pm 4.936 ^b	9.785 \pm 2.075 ^b	1.126 \pm 0.274	0.465 \pm 0.160 ^a
TBI 5 d 组	6	10.50 \pm 2.43	2.352 \pm 0.744 ^a	19.798 \pm 6.522 ^a	6.487 \pm 1.879 ^a	1.121 \pm 0.297	0.427 \pm 0.142 ^a
富氢水干预 6 h 组	6	11.00 \pm 2.83	3.038 \pm 0.665	30.207 \pm 5.391	4.036 \pm 1.593 ^c	1.170 \pm 0.434	0.607 \pm 0.188 ^c
富氢水干预 12 h 组	6	9.83 \pm 2.32 ^c	3.028 \pm 0.592 ^c	28.073 \pm 6.808 ^c	4.694 \pm 1.739 ^c	1.174 \pm 0.335	0.610 \pm 0.161 ^c
富氢水干预 24 h 组	6	9.83 \pm 2.79 ^c	2.360 \pm 0.343 ^d	22.943 \pm 3.016 ^d	6.367 \pm 2.254 ^d	1.168 \pm 0.375	1.110 \pm 0.372 ^c
富氢水干预 48 h 组	6	7.50 \pm 2.07 ^d	2.585 \pm 0.495 ^c	27.213 \pm 7.227 ^d	5.241 \pm 1.386 ^d	1.141 \pm 0.319	0.665 \pm 0.186 ^c
富氢水干预 5 d 组	6	5.50 \pm 1.87 ^d	3.300 \pm 0.776 ^c	33.417 \pm 12.112 ^c	3.831 \pm 1.202 ^d	1.158 \pm 0.348	0.615 \pm 0.179 ^c

注: TBI 为创伤性脑损伤, NSS 为神经功能缺损评分, CAT 为过氧化氢酶, GSH-Px 为谷胱甘肽过氧化物酶, MDA 为丙二醛, Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2; 与假手术组同期比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 TBI 组同期比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$

2.3 损伤灶周边皮质组织 Nrf2 mRNA 表达 (表 1): 3 组各时间点 Nrf2 mRNA 表达比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

2.4 损伤灶周边皮质组织 Nrf2 核蛋白表达 (表 1; 图 1): 与假手术组比较, TBI 组术后 6 h 脑组织 Nrf2 核蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而术后 12、24、48 h 和 5 d 时 Nrf2 核蛋白表达均明显上升 (均 $P < 0.05$), 并于 24 h 达高峰。富氢水干预组术后 6、12、24、48 h 和 5 d 时 Nrf2 核蛋白表达均明显高于 TBI 组 (均 $P < 0.05$), 以 24 h 最为明显。



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2, TBI 为创伤性脑损伤, H3 为组蛋白 3

图 1 Western Blot 检测各组大鼠不同时间点 Nrf2 核蛋白表达

2.5 损伤灶周边皮质组织病理改变: 假手术组各时间点脑组织结构完整, 无出血、水肿, 未见炎性细胞浸润。TBI 组各时间点脑组织出现不同程度的损伤, 脑组织结构破坏, 局部水肿、出血, 血管周围水肿带形成, 血管周围炎性细胞浸润; 以伤后 24 h 组织水肿、出血最为明显, 神经元出现坏死、溶解。富氢水干预组损伤较 TBI 组明显减轻, 水肿、出血、坏死等明显减少。

3 讨论

TBI 包括创伤部位的原发性损伤和创伤后的继发性损伤。继发性损伤是原发损伤后启动的一系列生化降解过程的损伤级联反应, 减轻继发性脑损伤是临床改善预后的关键^[11]。继发性脑损伤机制包括兴奋性氨基酸毒性、炎症反应、线粒体损伤、钙超载及氧化应激损伤等^[4, 11-13], 其中氧化应激被认为是继发性脑损伤的核心病理环节。TBI 后机体发生氧化应激, 活性氧簇大量释放, 超过机体清除能力, 氧化 / 抗氧化系统失衡, 引起脂质、蛋白质、DNA 过

氧化及线粒体损伤, 诱导细胞凋亡^[14-16], 可见抑制氧化应激可能是改善继发性脑损伤的重要策略。

氢气可选择性清除羟自由基和过氧亚硝酸阴离子, 能快速扩散到靶细胞发挥抗氧化作用, 可减轻大鼠缺血 / 再灌注 (I/R) 损伤^[17]。TBI 后缺血、缺氧造成的继发性神经元损伤机制类似于脑 I/R 损伤^[18]。本课题组前期研究表明, 富氢水能减轻谷氨酸介导的 I/R 损伤离体脑片的兴奋性氨基酸毒性、自由基、钙超载、炎症反应等, 并发挥保护作用^[19]。本实验病理及 NSS 评分结果显示, 腹腔注射富氢水后, 大鼠脑损伤明显减轻, 水肿、出血、坏死明显减少, NSS 评分下降, 神经功能逐渐恢复, 推测富氢水可能对 TBI 后神经损伤具有保护作用。

Nrf2 广泛存在于心、肺、肝、胃肠和神经系统等组织器官内, 是内源性抗氧化应激通路 Nrf2-ARE 通路中重要的转录因子^[20], Nrf2 的激活对 TBI 后氧化应激损伤有保护作用^[21], Nrf2 基因敲除可加重小鼠 TBI 后神经功能障碍^[22]。生理状态下, Nrf2 受胞质接头蛋白 (Keap1) 的负性调控, 被限制于细胞质中, 保持低活性状态; 氧化应激时, 细胞质内非活性的 Nrf2 与 Keap1 解耦联后被激活, 移位并与细胞核上的 ARE 结合, 进而启动下游抗氧化因子表达, 发挥抗氧化作用^[23]; Nrf2 的激活不仅可通过磷酸化 Nrf2 使 Nrf2 与 Keap1 解耦联, 还可通过修饰 Keap1 上的半胱氨酸巯基进而改变 Keap1 蛋白的构象, 导致 Nrf2 与 Keap1 解耦联^[24-25]。本研究结果显示, 在 TBI 早期 Nrf2 可被激活, 但后期 Nrf2 水平下降, 推测 TBI 后若能持续稳定地将 Nrf2 维持在高表达水平, 可能是改善 TBI 后氧化损伤的有效措施。本实验还发现, 抵御 TBI 后氧化应激损伤可能是通过激活脑组织内 Nrf2 来实现的; 创伤后以及使用富氢水后 Nrf2 mRNA 表达水平均无明显改变, 与 Nrf2 核蛋白表达增高不一致, 该结果与 Hong 等^[21]研究结果相符。我们推测, TBI 后 Nrf2-Keap1 二聚体可能通过上述两种方式解耦联, 导致 Nrf2 向细胞核内移位, 使 Nrf2 核蛋白升高, 因上述两种方式均属于转录后修饰, 所以 Nrf2 蛋白升高的同时, Nrf2 mRNA 表达水平仍保持不变。但本研究结果与既往 Yang 等^[26]对大脑中动脉闭塞大鼠脑组织中 Nrf2 表达的研究结果不符, 这可能与损伤条件、损伤模型不同有关, 相关机制有待进一步研究。

Nrf2-ARE 通路可调节编码的内源性保护基因超过 200 个, CAT、GSH-Px 是该通路下游两个重要

的抗氧化酶^[20,27],能清除氧自由基,保护机体免受自由基损伤,其活性可反映机体清除自由基的能力。MDA 是细胞损伤后膜脂质降解产生的主要代谢产物,常用来反映脂质过氧化程度^[28]。本实验结果显示,TBI 后 CAT、GSH-Px 活性降低,MDA 含量升高,表明氧化损伤确实参与了 TBI 的病理损伤过程。CAT、GSH-Px 作为 Nrf2-ARE 通路下游的抗氧化酶,其合成受 Nrf2 调控。但本实验结果显示,CAT、GSH-Px 活性降低与 Nrf2 核蛋白表达水平增高不一致,分析可能的原因为:TBI 后脑组织受氧化应激刺激,Nrf2 反应性被激活以增强机体对氧化应激损伤的耐受力,CAT、GSH-Px 活性受氧自由基、脂质过氧化产物影响而降低,提示创伤后机体虽可以启动内源性防御机制,但仍处于氧化/抗氧化失衡状态,需要积极干预。Hong 等^[21]发现,Nrf2 激动剂莱菔硫烷干预 TBI 大鼠后,脑组织 Nrf2 核蛋白水平明显上调,神经元氧化损伤明显减轻。本实验显示,富氢水干预脑创伤大鼠后,Nrf2 核蛋白表达量较 TBI 组进一步增加,CAT、GSH-Px 活性明显提高,MDA 含量减少,说明富氢水对 TBI 后氧化应激损伤具有保护作用,推测其作用与莱菔硫烷类似,可作为一种新型的 Nrf2 激活剂,通过上调 Nrf2 核蛋白水平,提高抗氧化酶 CAT 和 GSH-Px 的活性,增强机体抗氧化能力。由于本实验观察时间点仅到 TBI 后 5 d,并未对富氢水远期效果进行观察,是否延长富氢水使用时间会使其抗氧化作用增加或降低,还有待于深入研究。

综上所述,富氢水可能作为一种新型的 Nrf2 激活剂,通过上调 Nrf2 核蛋白水平,提高抗氧化酶 CAT 和 GSH-Px 的活性,从而实现减轻 TBI 大鼠氧化应激损伤的作用,具有一定的治疗价值,为临床研究和治疗 TBI 提供了一种新思路。

参考文献

- [1] Cui T, Zhu G. Ulinastatin attenuates brain edema after traumatic brain injury in rats [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71 (2): 595-600.
- [2] 向镜芬,杨祥,龚剑锋,等. 重型颅脑损伤患者动态血糖监测的临床意义[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21 (1): 31-34.
- [3] Reilly P. The impact of neurotrauma on society: an international perspective [J]. *Prog Brain Res*, 2007, 161: 3-9.
- [4] Songarj P, Luh C, Staib-Laszarik I, et al. The antioxidative, non-psychoactive tricyclic phenothiazine reduces brain damage after experimental traumatic brain injury in mice [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 584: 253-258.
- [5] Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, et al. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 64 (4): 753-761.
- [6] 刘玲玲,谢克亮,陈红光,等. Nrf2 在氢气改善脓毒症小鼠脑功能障碍中的作用[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (9): 629-633.
- [7] 李媛,谢克亮,陈红光,等. Nrf2 在氢气治疗严重脓毒症肠损伤中的作用[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (6): 415-419.
- [8] Kawamura T, Wakabayashi N, Shigemura N, et al. Hydrogen gas reduces hyperoxic lung injury via the Nrf2 pathway in vivo [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 304 (10): L646-656.
- [9] Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat [J]. *Brain Res*, 1981, 211 (1): 67-77.
- [10] Ohayon S, Gruenbaum SE, Artru AA, et al. Anatomical location of arterial and venous lines significantly affects motor performance in rats [J]. *Anim Sci J*, 2012, 83 (9): 656-662.
- [11] Schmidt OI, Leinhausen I, Hasenboehler E, et al. The relevance of the inflammatory response in the injured brain [J]. *Orthopade*, 2007, 36 (3): 248, 250-258.
- [12] Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury [J]. *Br J Anaesth*, 2007, 99 (1): 4-9.
- [13] 黄慧玲,刘锐,王琴,等. 亚低温对创伤性脑损伤后线粒体呼吸功能和超微结构的影响[J]. *中华创伤杂志*, 2008, 24 (5): 350-354.
- [14] Shao C, Roberts KN, Markesbery WR, et al. Oxidative stress in head trauma in aging [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41 (1): 77-85.
- [15] Singh IN, Sullivan PG, Hall ED. Peroxynitrite-mediated oxidative damage to brain mitochondria: Protective effects of peroxynitrite scavengers [J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85 (10): 2216-2223.
- [16] 白立曦,宋锦宁. 创伤性脑损伤后氧化应激损伤机制研究进展[J]. *中华脑科疾病与康复杂志(电子版)*, 2013, 3 (5): 325-328.
- [17] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals [J]. *Nat Med*, 2007, 13 (6): 688-694.
- [18] 李国福,贾佳,符加红,等. 异氟烷预处理或后处理对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (6): 431-435.
- [19] 刘慧婷,王迪芬. 富氢水后处理对谷氨酸损伤后乳鼠离体脑片的保护作用[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2015, 22 (3): 258-261.
- [20] Kulkarni SR, Donepudi AC, Xu J, et al. Fasting induces nuclear factor E2-related factor 2 and ATP-binding Cassette transporters via protein kinase A and Sirtuin-1 in mouse and human [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20 (1): 15-30.
- [21] Hong Y, Yan W, Chen S, et al. The role of Nrf2 signaling in the regulation of antioxidants and detoxifying enzymes after traumatic brain injury in rats and mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31 (11): 1421-1430.
- [22] 贾玥,王汉东,吴国健,等. Nrf2 基因敲除对小鼠颅脑损伤后神经功能障碍和胶质细胞活化的影响[J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2011, 16 (7): 325-328.
- [23] 郭瑞娟,陈隆望,连洁,等. 调控对氧磷酶 1 基因对急性敌敌畏中毒小鼠肝氧化损伤的保护作用[J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27 (4): 285-290.
- [24] Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention [J]. *Mutat Res*, 2005, 591 (1-2): 93-102.
- [25] McMahon M, Thomas N, Itoh K, et al. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 domain and the redox-insensitive Neh6 domain [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (30): 31556-31567.
- [26] Yang C, Zhang X, Fan H, et al. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia [J]. *Brain Res*, 2009, 1282: 133-141.
- [27] 李航,段惠军. Nrf2/ARE 信号通路及其调控的抗氧化蛋白[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27 (3): 300-303.
- [28] 宋曦,王迪芬,姚娜,等. 依达拉奉联合异丙酚后处理对乳鼠离体脑皮质细胞缺血/再灌注损伤保护作用的研究[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2013, 20 (1): 30-34.

(收稿日期:2015-08-10) (本文编辑:李银平)