· 论著 ·

富氢水后处理对谷氨酸损伤后乳鼠离体脑片的保护作用

刘慧婷[1]　王迪芬[2]

（1. 贵阳医学院，贵州 贵阳 550004；2. 贵阳医学院附属医院重症医学科，贵州 贵阳 550004）

【摘要】 **目的** 研究富氢水后处理对谷氨酸（Glu）介导的缺血 / 再灌注（I/R）损伤离体脑片的保护作用，并探讨其作用机制。**方法** 切取并培养出生 7 d SD 乳鼠离体脑片，按随机数字表法分为正常对照组，Glu 损伤组（1 mmol/L 的 Glu 损伤 30 min），富氢水后处理组（Glu 损伤 30 min 后用含 100 μmol/L 富氢水完全培养基处理），每 3 h 换液 1 次，共 24 h，每组 12 孔。苏木素 – 伊红（HE）染色观察脑片神经细胞的变化；通过测定乳酸脱氢酶（LDH）释放率、尼氏小体计数、碱性成纤维生长因子（bFGF）数量观察各组脑片神经细胞的损伤程度。**结果** 与正常对照组比较，Glu 损伤组神经细胞数量稀少，结构不完整；LDH 释放率、bFGF 数量明显增高〔LDH 释放率：（50.66±4.93）% 比（20.15±5.14）%，bFGF 数量（个 /400 倍视野）：22.79±2.13 比 4.13±1.17，均 $P<0.01$〕；尼氏小体数量减少（个 /400 倍视野：11.81±2.69 比 47.10±3.78，$P<0.01$）。与 Glu 损伤组比较，富氢水后处理组脑片中神经细胞形态结构得到恢复，LDH 释放率降低〔（39.13±3.66）% 比（50.66±4.93）%〕，bFGF 数量减少（个 /400 倍视野：14.22±1.22 比 22.79±2.13），尼氏小体数量增加（个 /400 倍视野：23.25±6.05 比 11.81±2.69），差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）。**结论** 富氢水后处理对 I/R 损伤离体脑片具有一定的保护作用，其机制可能是减少兴奋性氨基酸毒性引起的自由基、钙超载及炎性因子，抑制细胞凋亡。

【关键词】 富氢水；　缺血 / 再灌注损伤；　保护作用

Protective effects of hydrogen-rich water postconditioning on glutamate injury of brain slices of neonatal rats

Liu Huiting, Wang Difen.　*Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China.*

Corresponding author: Wang Difen, Department of Critical Care Medicine, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China, Email: 1078666485@qq.com

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the protective effects of hydrogen-rich water postconditioning on glutamate (Glu) mediated ischemia/reperfusion (I/R) injury in isolated brain slices of neonatal rats and explore its mechanism of action. **Methods** The brains of Sprague-Dawley (SD) neonatal rats aged 7 days were cut into slices and cultured. And then the cultured slices were randomly divided into the normal control group, Glu injury group (1 mmol/L Glu for 30-minute injury), hydrogen-rich water postconditioning group (after Glu injury for 30 minutes, cultured with complete medium containing 100 μmol/L of hydrogen-rich water), once per 3 hours to change the medium for totally 24 hours, each group having 12 holes. The brain slices were stained by hematoxylin-eosin (HE) staining to observe the changes of nerve cells. The lactate dehydrogenase (LDH) release rates, the numbers of nissl bodies and the basic fibroblast growth factor (bFGF) in each brain slice were determined to evaluate the degree of cerebral neuronal damage. **Results** Compared with the normal control group, the number of nerve cells was rare, and the structure not complete; the LDH release rate and the number of bFGF were increased significantly in Glu injury groups [LDH release rates: (50.66 ± 4.93)% vs. (20.15 ± 5.14)%, bFGF (cells/400 power field): 22.79 ± 2.13 vs. 4.13 ± 1.17, both $P < 0.01$); the Nissl body was decreased (cells/400 power field: 11.81 ± 2.69 vs. 47.10 ± 3.78, $P < 0.01$) in Glu injury group. Compared with Glu injury group, the morphological structure of brain nerve cells was restored, the LDH release rate was reduced [(39.13 ± 3.66)% vs. (50.66 ± 4.93)%]; bFGF was decreased (cells/400 power field: 14.22 ± 1.22 vs. 22.79 ± 2.13), and the Nissl body was increased (cells/400 power field: 23.25 ± 6.05 vs. 11.81 ± 2.69) in hydrogen-rich water postconditioning group (all $P < 0.05$). **Conclusions** Hydrogen-rich water postconditioning has protective effects on rat brain slices with I/R injury induced by Glu. Its mechanism was possibly related to the reduction of free radicals, calcium overload and inflammatory factors induced by excitatory amino acids toxicity, resulting in inhibition of cell apoptosis.

【**Key words**】 Hydrogen-rich water;　Ischemia/reperfusion injury;　Protection

目前，脑缺血的发生率逐年增加，已成为患者死亡的主要原因。脑缺血后恢复血流能够挽救濒死的细胞，但再灌注后会加重细胞损伤甚至死亡[1]。有实验表明，吸入氢气或饮用、腹腔注射富氢水能够减轻缺血 / 再灌注（I/R）损伤，在体试验也证实富氢水疗效与吸氢气相当[2]，但是在离体脑片水平是否具有保护作用尚未见报道。本课题组通过培养乳鼠离

doi：10.3969/j.issn.1008-9691.2015.03.008

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

通讯作者：王迪芬，Email：1078666485@qq.com

体脑片复制 I/R 模型，用富氢水进行后处理，观察富氢水对神经细胞的保护作用，并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要材料：取出生 7 d 的 SD 大鼠乳鼠，雌雄均可，体质量 20～25 g，由贵阳医学院实验动物中心提供，动物合格证号：SCXK（黔）2012-0001。DMEM/F12 培养液和胎牛血清由美国 Hyclone Laboratorries 公司提供；富氢水为北京活力氢源饮品有限公司产品。

1.2 乳鼠皮质离体脑片的制作：用碘酊和 75% 医用乙醇消毒皮肤后断头取鼠脑，放入 0 ℃的磷酸盐缓冲液（PBS）中，剪掉脑干及小脑部位组织，剔除血管及软脑膜，在振动切片机（ZQP-86 型）上按冠状面连续切成厚 350～400 μm 的脑片，移入 Millicell 插入式培养皿中，再放入 6 孔板内（每孔 3 片），将 6 孔板移至 37 ℃的 CO_2 培养箱中，2 d 换液 1 次。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 实验分组及损伤模型制备：按随机数字表法将制备好的大鼠脑片分为正常对照组、谷氨酸（Glu）损伤组、富氢水后处理组，每组 12 片。模型脑片培养至第 6 天时，换用含 1 mmol/L Glu 的培养基继续培养 30 min。富氢水处理组于损伤 30 min 后用完全培养基与 100 μmol/L 富氢水的培养基对脑片分别进行换液，每 3 h 1 次，共 8 次；换液后将 6 孔板放入 37 ℃的 CO_2 培养箱中继续培养 24 h。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 神经细胞的改变：苏木素－伊红（HE）染色后在倒置显微镜下观察神经细胞的改变。

1.4.2 乳酸脱氢酶（LDH）释放率测定：收集各组培养液，用酶标仪测定其在波长 440 nm 处的吸光度（A_{440}）值；再将各组脑片组织匀浆离心后取上清液，测定 A_{440} 值。按照公式计算 LDH 释放率。

$$\text{LDH 释放率}=\frac{\text{培养液 LDH 的 } A_{440}}{\text{培养液 LDH 的 } A_{440}+\text{组织液 LDH 的 } A_{440}}\times 100\%$$

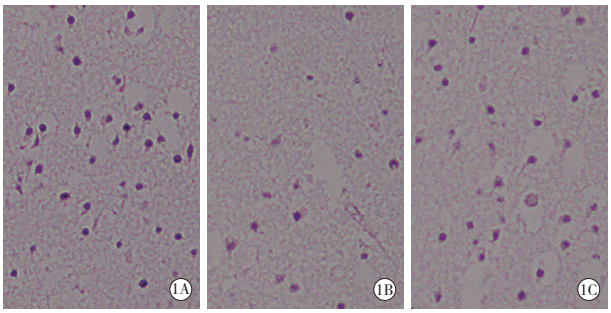
1.4.3 尼氏小体（Nissls body）计数：在高倍（×400）视野下随机选取 5 个不同的视野，在倒置显微镜下观察尼氏小体，取其平均值，单位：个 /400 倍视野。

1.4.4 bFGF：将制备好的脑组织石蜡切片脱蜡、中性树脂封片，脑片制备成功后置于倒置显微镜下观察阳性细胞数量（以细胞质呈棕黄色为阳性）。

1.5 统计学处理：使用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较用单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 光镜下观察神经细胞的变化（图 1）：正常对照组脑片神经细胞数量多，结构完整，胞核呈深蓝色圆形，胞质饱满、均匀呈浅紫红色；Glu 损伤组脑片中神经细胞数目较正常对照组明显减少，神经细胞结构多不完整，细胞膜皱缩、破裂，部分神经细胞的胞核出现固缩，胞质肿胀、不均匀；富氢水后处理组神经细胞数量减少不明显，仅少数细胞肿胀、坏死。



A：正常对照组；B：Glu 损伤组；C：富氢水后处理组

图 1 光镜下观察各组脑片神经细胞的变化（HE 染色 高倍放大）

2.2 LDH 释放率（表 1）：与正常对照组比较，Glu 损伤组脑片 LDH 释放率显著增加；与 Glu 损伤组比较，富氢水后处理组 LDH 释放率明显降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。

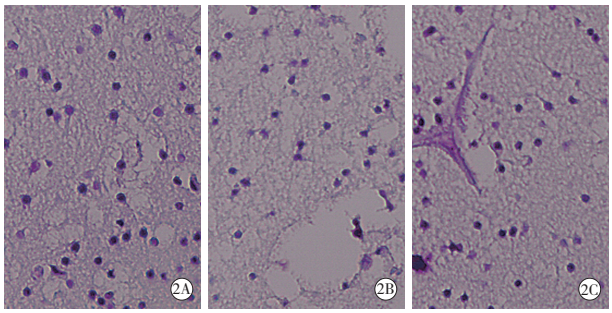
表 1 各组 LDH 释放率及尼氏小体、bFGF 数量比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	样本数（孔）	LDH 释放率（%）	尼氏小体数量（个 /400 倍视野）	bFGF 计数（个 /400 倍视野）
正常对照组	12	20.15±5.14	47.10±3.78	4.13±1.17
Glu 损伤组	12	50.66±4.93[a]	11.81±2.69[a]	22.79±2.13[a]
富氢水后处理组	12	39.13±3.66[ab]	23.25±6.05[ab]	14.22±1.22[ab]

注：与正常对照组相比，[a]$P<0.01$；与 Glu 损伤组相比，[b]$P<0.05$

2.3 尼氏小体计数（图 2；表 1）：正常对照组胞体圆形或椭圆形，数量多；Glu 损伤组脑片尼氏小体数较正常对照组显著减少（$P<0.01$），神经元萎缩，细胞之间空隙增大；富氢水后处理组尼氏小体数较 Glu 损伤组明显增多（$P<0.05$）。

2.4 bFGF 计数（表 1）：Glu 损伤组脑片 bFGF 阳性细胞数目较正常对照组明显增加（$P<0.01$）；富氢水后处理组脑片 bFGF 数量较 Glu 损伤组明显降低（$P<0.05$）。



A：正常对照组；B：Glu 损伤组；B：富氢水后处理组

图 2　光镜下观察各组尼氏体数
（尼氏染色　高倍放大）

3　讨　论

富氢水是将氢气溶解于液体制成的含氢液体，2007 年 Ohsawa 等[3]证实氢气通过选择性中和羟自由基和过氧亚硝酸阴离子，可产生抗氧化作用；且最近也有研究证实，氢气可减少缺血后海马组织中一氧化氮（NO）含量及一氧化氮合成酶（NOS）活性，从而达到对脑组织的保护作用[4]。除了抗氧化作用外，富氢水在减轻脑 I/R 损伤方面还有以下作用，如抑制细胞凋亡[5-7]，抗炎[8-9]，调节信号通路[10]等。

I/R 的机制较为复杂，主要与兴奋性氨基酸毒性作用、细胞内钙超载、自由基损伤、细胞凋亡等有关[11]，其中兴奋性氨基酸学说是一个被广泛接受的学说。兴奋性氨基酸以 Glu 在脑内含量最高，其受体分为离子型谷氨酸受体（iGluR）和代谢型谷氨酸受体（mGluR）两种。iGluR 可引起神经元胞内钙超载，而 mGluR 则可通过第二信使物质改变，引起磷酯酰肌醇（PI）水解，细胞内 Ca^{2+} 释放与超载。脑 I/R 时 Glu 主要作用于 mGluR 介导的神经毒兴奋性增强效应和对 NMDA[12]，进而引起细胞内钙超载、促炎症因子的释放，同时兴奋性氨基酸介导 Ca^{2+} 通道开放，Ca^{2+} 内流，导致花生四烯酸代谢水平增高，激活 NOS 产生大量氧自由基，导致神经损伤[13-14]，引起脂质过氧化反应，进而损伤膜结构，最终导致细胞结构破坏，细胞器功能障碍，细胞膜稳定性下降，以致细胞膜通透性发生变化[15]。氧自由基能增加线粒体膜通透性，在胞质内释放细胞色素 C，可促进聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶（PARP）裂解，激活天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶（caspases）家族，导致细胞凋亡[16]。细胞凋亡主要出现在 I/R 早期，但会随着再灌注时间的延长而增加[17]，脑缺血后常引起神经元丢失，导致神经功能缺失[18-19]。

本实验采用乳鼠离体脑片加 1 mmol/L 的 Glu 复制 I/R 模型[20]，与传统的细胞培养方法相比，这一制模方式既保留了完整的解剖通路，又保持了神经元与其他神经元及胶质细胞的天然联系等；与在体脑相比，不但可以模拟体内的生理环境，而且还能有效地监控特定细胞周围的微环境，施加实验因素。本实验结果显示，Glu 损伤后神经细胞数量减少，细胞形态损伤，细胞器数量减少，尼氏小体萎缩，bFGF 数量增多，说明神经细胞进入应激反应期，表示制模成功。

bFGF 是一种广泛分布于中枢神经系统内的生长因子，它主要存在于星形胶质细胞核及神经元细胞质中，主要以旁分泌方式与其靶细胞受体结合发挥作用[21]。有研究表明，外源性注射 bFGF 能通过拮抗 N- 甲基 -D- 天冬氨酸受体（NDMA 受体）减轻神经细胞内钙超载[22]，且能够通过上调 Bcl-2 和 Bcl-xl 水平、减少 caspase-3 蛋白表达以减少细胞凋亡[23-24]。正常生理情况下脑内仅有少量的 bFGF 表达，而脑组织损伤后 2 h，胶质细胞开始分泌内源性 bFGF，于 24 h 达到峰值[25]。现已明确，胶质细胞膜上存在 bFGF 的两类受体：一类为位于膜表面的高亲和力的酪氨酸激酶受体（FGFRs）；另一类为存在于细胞表面和细胞外基质中低亲和力的肝素或硫酸乙酰肝素蛋白聚糖受体。神经细胞损伤后，胞质内的 bFGF 被分泌到细胞外，经过受体自身激活[26]作用，bFGF 先与低亲和力受体表面的 HSPGs 结合，然后启动内源性酪氨酸酶激活途径及酪氨酸的自身磷酸化，激活酪氨酸酶后诱导肌醇磷脂（PIP2）释放乙酸甘油和三磷酸肌醇，最后导致蛋白激酶的激活和胞内 Ca^{2+} 的释放[27]。本实验结果显示，Glu 损伤组 bFGF 阳性细胞数增多，说明损伤后 bFGF 反应性增高，推测胶质细胞激活，钙超载现象增加；而富氢水后处理组 bFGF 阳性细胞数下降，可能与该组神经细胞损伤减轻相关，推测其机制是减轻了细胞钙超载。本实验结果在蛋白水平说明了富氢水后处理组中 bFGF 阳性细胞数较损伤组 bFGF 阳性细胞数减少，但其具体机制有待进一步明确。我们推测富氢水的保护机制可能并不是主要通过增加 bFGF 的含量来发挥作用的。本实验在损伤 30 min 后即加入富氢水，推测可能是富氢水发挥脑保护的作用要比 bFGF 迅速，故在 bFGF 表达高峰前已通过其他途径如减轻钙超载或炎症反应等途径缓解了细胞损伤。

LDH 是一种存在于正常细胞质中的蛋白质，在细胞膜受损的情况下，LDH 才被释放到细胞外[28]。LDH 升高水平与神经细胞损伤程度呈正相关，因此测定 LDH 含量可以衡量神经细胞的损伤程度[29]。

本实验结果显示,富氢水后处理组 LDH 释放率较 Glu 损伤组明显降低,表明富氢水能够减轻神经细胞膜损伤。另外,富氢水后处理组神经细胞数量增多,细胞形态有所恢复,细胞膜破损减轻,尼氏小体数量增加,排列相对规则,细胞核较完整,由以上指标可以看出,富氢水对 I/R 后脑损伤有一定的保护作用,推测其作用机制可能与减少兴奋性氨基酸、抑制细胞凋亡、减轻细胞器损伤等有关。

综上所述,在离体脑片水平,富氢水对 Glu 介导的 I/R 损伤脑组织有一定保护作用,其机制可能是富氢水减少了兴奋性氨基酸毒性引起的自由基、钙超载及炎性因子释放,抑制细胞凋亡并减轻细胞器损伤等,但其具体机制还需进一步研究。

参考文献

[1] 付江泉,王迪芬,刘辉. 神经生长因子和依达拉奉对缺血 / 再灌注损伤脑保护作用的比较研究[J]. 中华危重病急救医学, 2010, 22(4): 226-229.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 张连双,范秀琴,李珊珊,等. 氢气对脑缺血再灌注大鼠海马一氧化氮及其合酶的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2014, 16(1): 81-83.

[5] 刘漪,李雪梅,谭永星. 氢气饱和生理盐水对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能缺损、神经细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 临床神经病学杂志, 2013, 26(5): 351-354.

[6] 惠康丽,韩云飞,周玉弟,等. 富氢液对大鼠全脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 医学研究生学报, 2011, 24(6): 573-577.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 刘颖,孙强,张威,等. 氢气饱和生理盐水对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(3): 238-241.

[10] Wang C, Li J, Liu Q, et al. Hydrogen-rich saline reduces oxidative stress and inflammation by inhibit of JNK and NF-kappaB activation in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease[J]. Neurosci Lett, 2011, 491(2): 127-132.

[11] 姚娜,王迪芬,宋曦,等. 依达拉奉联合异丙酚预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]. 中华危重病急救医学, 2012, 24(5): 286-289.

[12] 费舟,章翔,刘恩渝,等. 代谢型谷氨酸受体在脑损伤后的表达及意义[J]. 中华危重病急救医学, 2002, 14(9): 545-547.

[13] 张莉,李新宇. 谷氨酸在心肺脑复苏中的影响[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(4): 795-797.

[14] 薄丰山,王迪芬,刘文悦,等. 亚低温预处理对谷氨酸诱导原代大鼠皮质神经细胞损伤的保护作用[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(4): 264-268.

[15] 梁钢,黄巨恩,陈纡,等. 碱性成纤维细胞生长因子对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 广西医科大学学报, 2002, 19(4): 465-467.

[16] 林丽娜,张圣恭,王万铁,等. 生脉注射液对兔肺缺血 / 再灌注损伤时细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(6): 361-363.

[17] 刘曼莉,王迪芬. 丙泊酚及醒脑静预处理对大鼠离体脑片不同性质损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21(2): 126-130.

[18] 李春阳,李林,魏海峰,等. 局灶性脑缺血大鼠血瘀证相关指标和脑损伤病理生理的动态变化[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(5): 259-263.

[19] 高剑峰,朱长连,李建生. 脑脉通对老龄大鼠脑缺血 / 再灌注海马内源性神经干细胞增殖分化的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(1): 26-29.

[20] 刘辉,王迪芬,付江泉. 异丙酚和依达拉奉对脑缺血 / 再灌注损伤保护作用的研究比较[J]. 中华危重病急救医学, 2008, 20(11): 691-692.

[21] 张相彤,王忠诚,董丽萍,等. 成年大鼠脑创伤后脑组织碱性成纤维细胞生长因子表达的变化[J]. 中国临床神经科学, 2003, 11(1): 4-7.

[22] 张化彪. bFGF 与脑缺血损伤[J]. 国外医学神经病学神经外科学分册, 2002, 29(1): 62-65.

[23] 熊露,田少霞,范吉平,等. 脑缺血 / 再灌注后 BDNF 和 bFGF 表达与神经元凋亡的关系及脑脉康的干预作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(5): 271-275.

[24] 骆文龙,陈红江. 碱性成纤维细胞生长因子对受损面神经元凋亡及 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达影响研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(12): 1124-1127.

[25] 朱建辉. 碱性成纤维细胞生长因子的自分泌与反应性星形细胞胶质化[J]. 中华病理学杂志, 1997, 26(1): 9-12.

[26] 叶诸榕. 5- 甲基硫代腺苷对培养鼠脑星形胶质细胞反应性胶质化的抑制[J]. 上海医科大学学报, 1997, 24(3): 177-180.

[27] 郭和,邢雪松. 外源性 bFGF 对缺血性脑损伤的神经保护作用[J]. 沈阳医学院学报, 2008, 10(3): 179-182.

[28] 周晓峰,黄丁丁,王迪芬,等. 丙泊酚预处理对谷氨酸损伤大鼠脑组织的保护作用研究[J]. 中华危重病急救医学, 2012, 24(12): 750-753.

[29] 韩爱龙,王迪芬,梅治,等. 利多卡因对谷氨酸致大鼠大脑皮质神经元损伤的保护作用研究[J]. 中华危重病急救医学, 2008, 20(12): 751-752.

(收稿日期: 2015-1-17)
(本文编辑: 李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对关键词的有关要求

关键词是为了便于编制文献索引、检索和阅读而选取的能反映文章主题概念的词或词组。一般每篇论文选取 2 ~ 5 个关键词。中英文关键词应一致。

关键词尽量从美国国立医学图书馆的 MeSH 数据库中选取,中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语(自由词)可直接作为关键词使用,建议排在最后。

医脉通中英文 MeSH 检索网址: http://mesh.medlive.cn/