

高浓度氢气对四氯化碳损伤性大鼠 睾丸生精细胞 Akt 表达的影响^①

田荆华

(菏泽医学专科学校解剖学教研室, 山东 菏泽 274000)

E-mail: tianjinghua66@126.com)

摘要: **目的** 研究吸入高浓度氢气后对四氯化碳损伤性大鼠生精细胞内 Akt 表达的影响。**方法** 选取健康雄性 3 月龄 SD 大鼠 30 只, 随机平均分为对照组 (Con 组), 四氯化碳组 (CCl₄ 组) 和氢气组 (H₂ 组)。Con 组大鼠于每周一、周五皮下注射橄榄油 (0.07 ml/100 g), CCl₄ 组和 H₂ 组于每周一、周五皮下注射 30% CCl₄ + 70% 橄榄油 (0.1 ml/100 g), 持续 6 周; H₂ 组在第 6 周加入高浓度 H₂ (3% H₂ + 97% 空气) 治疗, 每天 1 h, 连续 7 d。取睾丸, 应用免疫组织化学和 Western blot 方法检测 Akt 的表达水平。**结果** 免疫组化结果显示, Akt 主要表达于精原细胞和初级精母细胞的胞浆中, CCl₄ 组大鼠生精细胞内 Akt 表达水平较对照组明显降低, H₂ 组较 CCl₄ 组表达水平升高 ($P < 0.01$)。Western blot 结果显示与免疫组化结果相一致。**结论** 高浓度 H₂ 可以增加 CCl₄ 损伤性大鼠睾丸组织中 Akt 的表达。

关键词: 氢气; 四氯化碳; 生精细胞; 大鼠; Akt

中图分类号: R321 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2016)06-0574-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.06.006

The effects of high-concentration hydrogen gas on the expression of Akt in injured spermatogenic cells of rat testis induced by carbon tetrachloride

Tian Jinghua

(Department of Anatomy, Heze Medical College, Heze 274000, Shandong, China)

E-mail: tianjinghua66@126.com)

Abstract: **Objective** To investigate the influence of inhalation of high-concentration hydrogen gas (H₂) on the expression of Akt in injured spermatogenic cells of rats induced by carbon tetrachloride (CCl₄). **Methods** Thirty male healthy SD rats of three-month old were selected and randomly divided into 3 groups: control group (con group), CCl₄ group and H₂ group, each group had 10 rats. In control group, rats were subcutaneously injected with olive oil (0.07 ml/100g rat weight) on every Monday and Friday; in CCl₄ group and H₂ group, rats were subcutaneously injected with 30% carbon tetrachloride plus 70% olive oily solution (0.1 ml / 100 g rat weight) on every Monday and Friday for 6 weeks. Rats of H₂ group were added with inhalation of high-concentration hydrogen gas (3% H₂ + 97% air), an hour everyday for 7 days since the sixth week. Testes were taken out for detecting the Akt expression levels by using immunohistochemistry and Western blot. **Results** Immunohistochemical staining results showed that Akt mainly expressed in cytoplasm of spermatogonium and primary spermatocyte. Compared with control group, the expression of Akt in spermatogenic cells of rats was significantly decreased in CCl₄ group; compared with CCl₄ group, the expression of Akt was significantly increased in H₂ group ($P < 0.01$). The Western blot test results were consistent with the immunohisto-

① 基金项目: 山东省高等学校科技计划项目 (J13LK20)

chemical test results. **Conclusion** High-concentration hydrogen gas can increase the expression of Akt in rat testicular tissues induced by carbon tetrachloride injury.

Key words: hydrogen gas; carbon tetrachloride; spermatogenic cells; rats; Akt

四氯化碳(CCl_4)是一种无色、易挥发的液体,广泛应用于化工原料和有机溶剂,可用作灭火剂、药物萃取剂、织物干洗剂等,可在体内细胞色素 P450 的作用下生成自由基,对各种生物大分子造成损害,并通过脂质过氧化反应产生毒性代谢物,除对大脑、胰腺、肺等造成影响外,还可使睾丸生精细胞的形态发生改变并影响其功能^[1]。氢气(H_2)是一种无色无味的小分子气体,具有很强的还原性,Ohsawa I等^[2]发现其可作为治疗性抗氧化气体,中和细胞内的氧化自由基、缓解睾丸生精细胞的氧化损伤^[3]。Akt 处于 PI3K 的下游^[4-5],活化的 Akt 可以磷酸化其下游的 TSC2,使其失去活性,进而解除 Rheb 对 mTOR 的抑制,活化下游的 mTOR,从而促进蛋白质的合成,并参与细胞增殖、分化、迁移等过程,起到积极调节的作用^[6]。但吸入高浓度(3%) H_2 能否对 CCl_4 损伤的睾丸生精细胞起到缓解作用,目前报道较少。本实验选取了 mTOR 通路中的上游调控分子 Akt 作为指标,采用免疫组织化学和 Western blot 方法检测 Akt 在睾丸生精细胞中的表达,为高浓度 H_2 临床用于防治 CCl_4 所致的机体损伤、改善生殖功能方面提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 免疫组化试剂盒(中山金桥),DAB 试剂盒(中山金桥),兔抗大鼠 Akt 抗体(1:50, Santa),兔抗大鼠 GAPDH 抗体(1:50, Santa),ECL 化学发光试剂盒(Pierce Biotechnology)。

1.1.2 实验动物与分组 实验用 3 月龄 SD 雄性大鼠共 30 只,体重(250 ± 20) g,随机平均分为 Con 组($n=10$)、 CCl_4 组($n=10$)、 H_2 组($n=10$)。每组 10 只中,5 只用于免疫组化,5 只用于 Western blot,Con 组大鼠于每周一、周五皮下注射橄榄油(0.07 ml/100 g),持续 6 周; CCl_4 组于每周一、周五皮下注射 30% CCl_4 + 70% 橄榄油(0.1 ml/100 g),持续 6 周; H_2 组于每周一、周五皮下注射 30% CCl_4 + 70% 橄榄油(0.1 ml/100 g),持续 6 周,第 6 周用高浓度 H_2 (3% H_2 + 97% 空气)每天治疗 1 h,连续 7 d。应用免疫组织化学和 Western blot 方法检测睾丸组织中 Akt 的表达水平。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测 取一侧睾丸组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后;睾丸组织经梯度酒精脱水、二甲苯透明,石蜡浸润、包埋、切片,片厚 5 μm 。经常规脱蜡、封闭后加入 Akt 一抗(Santa, 1:50),4 $^\circ\text{C}$ 过夜,生物素化山羊抗兔 IgG 和 HRP 标记的链霉卵白素工作液、DAB 显色、苏木精复染、中性树胶封片,光学显微镜下观察。阴性对照组用 PBS 代替一抗,其余步骤相同。

1.2.2 Western blot 检测 取一侧睾丸组织置于 RIPA 裂解液中超声破碎,BCA 法测定蛋白浓度;20 μg /孔蛋白上样进行电泳,200 mA 湿转 2 h,牛奶室温封闭 2 h,4 $^\circ\text{C}$ 一抗(Akt, 1:50; GAPDH, 1:50)摇床过夜;TBST 洗膜,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗 1 h,加 ECL 发光剂,压片显影摄片,测定吸光度值。采用 Image J 软件进行蛋白半定量分析,得出 Akt/GAPDH 的相对吸光度值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 12.0 软件统计分析,数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- q 检验,当 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测结果 各组大鼠的生精细胞中可见数量不等的 Akt 阳性细胞。Con 组中阳性反应主要位于精原细胞和初级精母细胞的胞质中(见图 1A1、图 1A2),分布较为均匀。 CCl_4 组中的 Akt 阳性表达细胞较 Con 组明显减少(见图 1B1、图 1B2),呈弱阳性表达。 H_2 组较 CCl_4 组 Akt 阳性细胞表达增加(见图 1C1、图 1C2)。3 组大鼠睾丸组织中 Akt 阳性细胞数比较整体上差异有统计学意义($P < 0.001$);其中 CCl_4 组、 H_2 组 Akt 阳性细胞数明显少于 Con 组,差异均有统计学意义($P < 0.01$); H_2 组 Akt 阳性细胞数明显高于 CCl_4 组,两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

2.2 Western blot 检测结果 如图 2、表 2 所示,Con 组睾丸组织中 Akt 蛋白表达水平最高, CCl_4 组 Akt 蛋白表达水平最低,Con 组与 CCl_4 组两组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$), H_2 组高于 CCl_4 组,两组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

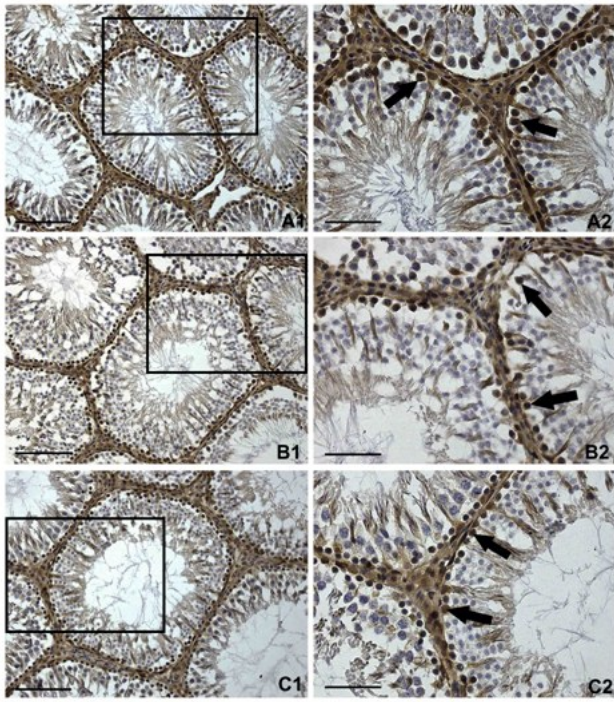


图 1 SD 大鼠睾丸组织免疫组织化学染色

注:箭头指示 Akt 阳性细胞。A: Con 组,B: CCl₄ 组,C: H₂ 组;A1、B1、C1 中标尺=40 μm,A2、B2、C2 中标尺=20 μm

表 1 各组大鼠睾丸组织中 Akt 阳性细胞数的比较 (x±s)

组别	n	阳性细胞数
Con 组	5	145.56±6.82
CCl ₄ 组	5	62.8±1.47 ^a
H ₂ 组	5	95.30±4.13 ^{ab}
F		396.76
P		<0.001

注:与 Con 组相比较,a: P<0.01;与 CCl₄ 组相比较,b: P<0.01

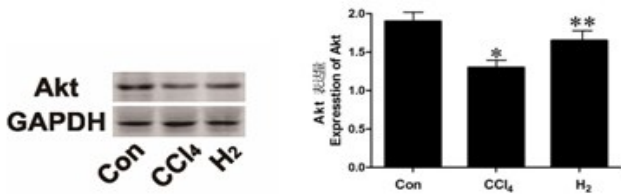


图 2 Western blot 检测各组 SD 大鼠睾丸组织中 Akt 表达水平

注:与 Con 组相比,*为 P<0.01;与 CCl₄ 组相比,**为 P<0.01

3 讨论

CCl₄ 常用于氧自由基形成的多器官损伤试剂,也常用于睾丸细胞增殖损伤模型的建立^[7],故本实验采用 CCl₄ 皮下注射的方法建立睾丸生精细胞增殖损伤模型。生物体内存在抗氧化系统,但当自身的氧化-

表 2 各组大鼠睾丸组织中 Akt 相对表达量 (x±s)

组别	n	Akt 相对表达量
Con 组	5	1.92±0.13
CCl ₄ 组	5	1.32±0.10 ^a
H ₂ 组	5	1.61±0.12 ^{ab}
F		32.70
P		<0.001

注:与 Con 组相比较,a: P<0.01;与 CCl₄ 组相比较,b: P<0.01

抗氧化系统失去平衡、无法对抗氧化应激时,就需要人为补充抗氧化剂以维持机体的正常功能运转。H₂ 是一种无色无味的小分子气体,具有很强的还原性。根据 Ohsawa I 等^[2]的研究,H₂ 可以与体内氧自由基如 OH 和 ONOO 发生反应,而不与其他氧化能力较弱的氧自由基如超氧根离子 O₂⁻、过氧化氢(H₂O₂)以及已被氧化的维生素 C 发生反应,因此 H₂ 不会影响体内的氧化-还原代谢反应以及氧自由基的信号传导功能。人们已经发现吸入 H₂ 可以缓解和治疗某些急慢性疾疾病^[8-10],如脑缺血、动脉粥样硬化或糖耐量异常等。近年来的研究表明^[8]:吸入 H₂ 并不影响人体正常的生理参数,是一种安全的抗氧化医疗气体。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)是存在于胞浆中的一种丝/苏氨酸蛋白激酶,是 PI3K/PKB (protein kinase B, PKB)信号通路下游的一个效应蛋白^[4-5],在细胞基因转录、蛋白质翻译起始、核糖体合成、细胞周期、细胞存活方面发挥重要作用。研究表明,mTOR 作为一种对细胞增殖、分化起关键作用的信号因子,在 SD 大鼠的精子发生过程中起着非常重要的作用。SD 大鼠精原细胞中,mTOR 接受上游信号后,调控促进精原细胞增殖的蛋白合成,从而促进精子发生。而 Akt 处于 PI3K 的下游,活化的 Akt 可以磷酸化其下游的 TSC2,使其失去活性,进而解除 Rheb 对 mTOR 的抑制,活化下游的 mTOR,从而促进蛋白质的合成,并参与细胞增殖、分化、迁移等过程,起到积极调节的作用^[11]。因此,Akt 是 mTOR 通路的上游调控因子。同时,Akt 还可磷酸化促凋亡蛋白 Bad 上 Ser136 位点,阻断 Bad 传导的凋亡信号;激活转录因子 NF-κB 和影响 p53 的活性间接影响细胞存活;通过降低细胞周期抑制剂的作用直接影响细胞增殖;在维持胚胎干细胞分化、脂肪细胞分化、成骨分化等的过程中也具有重要的作用。H₂ 能够调控 Akt 的表达,不仅可以通过 mTOR 通路促进精子细胞的发生,也可能参与细胞增殖、分化等过程,这

也是今后仍需要研究的内容。

在本研究中使用 SD 大鼠皮下注射 CCl_4 的方式建立睾丸生精细胞损伤模型,旨在研究 mTOR 通路上游蛋白 Akt 在生精细胞,尤其是精原细胞上的表达水平,观察它在调节生精细胞增殖过程中的重要作用。免疫组化检测结果发现,mTOR 通路上游因子 Akt 主要位于精原细胞和初级精母细胞的胞质中,而 CCl_4 降低 Akt 在精原细胞和初级精母细胞中的表达,尤其是精原细胞;本次研究发现经高浓度 H_2 吸入后,Akt 的表达上调,但仍略低于对照组;Western blot 结果与免疫组化结果相一致,Con 组睾丸组织中 Akt 蛋白表达水平最高, CCl_4 组 Akt 蛋白表达水平最低。结果说明, H_2 对于缓解由于 CCl_4 造成的 Akt 下降是有一定作用的。有研究发现,注射 CCl_4 四周后,大鼠睾丸生精细胞中 PCNA 蛋白的表达明显下降^[12],而这种蛋白同样是 mTOR 通路相关蛋白,我们的结果进一步证实 mTOR 通路与睾丸生精细胞增殖关系密切,通路上多种因子参与精子发生和细胞分化过程。同时我们也应注意,Akt 存在三种亚型,不同的亚型对于 CCl_4 和 H_2 的敏感度、反应性是否也会不同。 H_2 之所以能发挥细胞保护作用,我们推测可能是通过选择性降低活性氧(reactive oxygen species,ROS)的含量,减少氧自由基对 IRS-1 的攻击,进而通过改善 PI3K-Akt-mTOR 通路的信号传导,实现对 CCl_4 所造成的睾丸损伤的缓解。本研究仅限于了 mTOR 的上游因子,但对其下游因子等在生精细胞增殖过程中的作用、变化还有待进一步的系统研究,为高浓度 H_2 在临床防治 CCl_4 等所致的机体损伤、改善生殖功能方面提供实验依据^[12]。

参考文献:

- [1] Hom MM, Ramos AR, Winkelmann L, et al. Seminiferous epithelium of rats with food restriction and carbon tetrachloride-induced cirrhosis [J]. *Int Braz Urol*, 2006, 32(1):94-99.
- [2] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytoxic oxygen radicals [J]. *Nature Medicine*, 2007, 13(6): 688-694.
- [3] Lee JW, Kim JI, Lee YA, et al. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of testicular ischemia /reperfusion injury in rats [J]. *J Pediatric Surgery*, 2012, 47(4): 736-742.
- [4] Nissim H, Nahum S. Upstream and downstream of mTOR [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(16): 1926-1945.
- [5] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex [J]. *Science*, 2005, 307: 1098-1101.
- [6] Rosen N, She QB. AKT and cancer——is it all mTOR [J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(4): 254-256.
- [7] Yuce A, Turk G, Ceribasi S, et al. Effectiveness of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark oil in the prevention of carbon tetrachloride-induced damages on male reproductive system [J]. *Andrologia*, 2014, 46(3): 263-272.
- [8] Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, et al. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia - reperfusion injury [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 373(1): 30-35.
- [9] Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, et al. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising antitumor activity in mice [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 64(4): 753-761.
- [10] Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, et al. Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance [J]. *Nutrition Research*, 2008, 28(3): 137-143.
- [11] Guo TB, Chan KC, Hakovirta H, et al. Evidence for a role of glycogen synthase kinase-3 beta in rodent spermatogenesis [J]. *J Androl*, 2003, 24(3): 332-342.
- [12] 王致远, 栾英杰, 田荆华, 等. 吸入高浓度氢气增强四氯化碳损伤性大鼠生精细胞核糖体蛋白 S6 激酶的表达 [J]. *解剖学报*, 2015, 46(1): 113-117.

收稿日期: 2016-10-12; 修回日期: 2016-12-02