

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.18.017

实验研究

西洋参胶囊对电磁辐射大鼠肝脏超微结构及氧化应激的影响

罗亚萍¹, 马惠荣^{2*}, 曹晓慧³, 宋翠森², 马雪莲²

(1. 河北省中医院, 河北省石家庄市中山路 389 号, 050011; 2. 河北中医学院; 3. 河北医科大学)

摘要 目的 研究西洋参胶囊防治电磁辐射致大鼠肝损伤的可能作用机制。方法 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、辐射组、水飞蓟宾组、西洋参组各 10 只。除正常组外其余 3 组大鼠每天暴露于电磁辐射 (900 MHz, $370 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) 4 h 连续 12 天, 辐射同时水飞蓟宾组、西洋参组大鼠每日灌服水飞蓟宾胶囊溶液 (浓度为 7 mg/ml) 和西洋参胶囊溶液 (浓度为 19.7 mg/ml) 1 ml/200 g, 正常组、辐射组灌服等量生理盐水。12 天后处死大鼠, 透射电镜观察肝脏超微结构, 检测肝组织丙二醛 (MDA) 含量和谷胱甘肽 (GSH) 活性, 检测大鼠肝组织磷酸化的血管共济失调突变蛋白 (ATM) 和磷酸化组蛋白 2A 变异体 (γH2AX) 表达。结果 与正常组比较, 辐射组大鼠肝细胞线粒体和粗面内质网轻度受损, 肝组织 MDA 含量升高, GSH 活性降低, ATM 和 γH2AX 表达明显升高 ($P < 0.01$); 与辐射组比较, 水飞蓟宾组和西洋参组大鼠肝线粒体和粗面内质网受损减轻, 肝组织 MDA 含量降低, GSH 活性增加, ATM 和 γH2AX 表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 西洋参胶囊可改善电磁辐射致大鼠肝脏超微结构损伤, 其机制可能与减轻氧化应激和降低 ATM 和 γH2AX 蛋白表达有关。

关键词 西洋参胶囊; 电磁辐射; 肝损伤; 氧化应激; 肝脏超微结构

肝脏是电磁辐射敏感器官, 电磁辐射损伤肝脏的早期主要表现为超微结构改变^[1-2]。研究表明, 多种电磁辐射可损伤肝脏, 引起氧化应激和功能损伤^[3-4]。中医学认为, 各种电磁辐射归六气之属, 为火热 (温热) 之气, 易食气灼液, 故气阴两虚可能为各种电磁辐射致病的基本病机, 治宜益气养阴。我们前期的研究证实, 电磁辐射可引起大鼠肝脏氧化应激, 肝脏组织形态异常, 肝细胞凋亡增加, 西洋参胶囊可防治电磁辐射所致大鼠肝损伤^[5]。本研究进一步观察电磁辐射对大鼠肝超微结构、氧化应激的影响, 探讨西洋参胶囊防治电磁辐射肝损伤的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 雄性大鼠 40 只, 体重 200 ~ 220 g, 购自河北医科大学实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK (冀) 2008-4-003。

1.2 主要仪器、试剂

辐射源由河北师范大学物理系研制; 电磁辐射测试仪 (LZT-1150, 北京龙震科技发展有限公司); 高速离心机 (TDL-5-A, 上海安亭科学仪器厂); 低温离心机 (Neofuge 23R, 上海力申科学仪器有限公司); 透射电子显微镜 (H-7500 型, 日本日立公司); DM2500 显微成像系统、RM2235 手动轮转式切片机为德国莱卡公司产品; BMJ-4 生物组织包埋机、TSJ-4A 自动组织脱水机、KZPJ-4A 生物组织摊烤片机为天津天利航空机电有限公司产品; 半干转膜仪系统 (WSE-4040 型, 日本 ATTO 公司); 凝胶成像系统 (CA91786 U. S. A UVP GDS-8000 system, 美国 Thermo 公司)。

丙二醛 (MDA, 批号: 20131126)、谷胱甘肽 (GSH, 批号: 20131128) 测试盒均购自南京建成生物工程研究所; 磷酸化的血管共济失调突变蛋白 (ATM, 批号: GTX77613)、磷酸化组蛋白 2A 变异体 (γH2AX , 批号: Jan-22) 兔抗大鼠单克隆抗体, 美国 Rockland 公司产品; 兔抗鼠 β -actin (批

* 通讯作者: mahuirong@126.com (0311) 89926286

号: R1207) 购自杭州华安生物技术有限公司; 水合氯醛 (批号: 20080402) 购自郑州派尼化学试剂厂。

1.3 主要药物

水飞蓟宾胶囊 (35 mg/粒, 天津天士力制药股份有限公司生产, 批号: 120712); 西洋参胶囊 (590 mg/粒, 汤臣倍健股份有限公司生产, 批号: 20120704)。将 30 粒水飞蓟宾胶囊溶于蒸馏水制成 100 ml 混悬液, 浓度为 7 mg/ml; 将 8 粒西洋参胶囊溶于蒸馏水制成 240 ml 混悬液, 浓度为 19.7 mg/ml, 置于 4℃ 冰箱中密闭保存。

1.4 动物分组及处理方法

40 只大鼠按体重均衡的原则采用随机数字表法分为正常组、辐射组、水飞蓟宾组、西洋参组各 10 只。除正常组外其余各组大鼠辐射方法参照文献 [5]: 电磁辐射频率 900 MHz, 平均功率密度 $370 \mu\text{W}/\text{cm}^2$; 将大鼠笼置辐射箱内, 设定自动开关 4h/天, 打开电源, 每天除辐射外正常饲养。辐射同时水飞蓟宾组和西洋参组大鼠分别每天灌胃水飞蓟宾和西洋参混悬液 (1 ml/200 g), 相当于临床人用药剂量 10 倍。正常组、模型组每天灌胃等容积生理盐水, 连续 12 天。

1.5 观察指标及方法

大鼠于实验结束后禁食水, 次晨 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 体重腹腔麻醉, 立即取相同部位即下缘肝组织 (约 1 mm × 1 mm × 1 mm), 置于以磷酸缓冲液配制的 4% 戊二醛 (pH = 7.3) 溶液固定, 用于透射电子显微镜观察大鼠肝脏超微结构; 另取相同部位肝组织 (约 5 mm × 5 mm × 5 mm), 迅速置液氮冷冻后转 -70℃ 低温冰箱备存, 用于检测肝组织氧化应激指标及 Western blot 检测。

1.5.1 透射电镜观察肝脏超微结构 将肝组织 1 mm³ 固定于 pH = 7.3、4% 戊二醛固定液 4 h, 清洗后固定, 梯度丙酮脱水、浸透并室温过夜、包埋、聚合后 50 nm 超薄切片并电子染色后透射电镜观察照相。

1.5.2 肝脏组织 MDA 含量和 GSH 活性 采用比色法, 取组织块用 4℃ 的生理盐水漂洗, 用组织捣碎机 15 000 r/min 研磨制成 10% 组织匀浆, 照各指标的说明书采用简便操作法进行检测。

1.5.3 肝脏组织 ATM、 γH2AX 蛋白表达 采用 Western blot 法。肝组织裂解、研磨、震荡、静置、离心后取上清为样本, Bradford 方法测定蛋白浓

度, 常规 SDS-PAGE 凝胶电泳 (10% 分离胶 8 ml 和 5% 浓缩胶 4 ml, 上样量 40 μl , 电压 80V), PVDF 膜湿转后封闭, 洗膜、曝光及洗片, 采用美国 UVP 分析仪器, 对胶片进行扫描, 然后括住每一个条带, 系统自动生成灰度值, 即为结果。以各条带与 $\beta\text{-actin}$ 的比值为半定量指标。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行正态性及方差齐性检验, 符合正态分布方差齐者采用 *Oneway ANOVA* 方差分析, 组间两两比较用 *LSD* 分析。

2 结果

2.1 各组大鼠肝脏超微结构比较

正常组大鼠肝细胞核圆形或椭圆形, 细胞器结构分界完整, 线粒体排列整齐, 膜完整, 嵴密集, 粗面内质网形态正常。辐射组大鼠肝细胞线粒体大部分嵴和少部分膜融合, 模糊不清, 可见嵴断裂和缺失现象; 粗面内质网可见轻度颗粒融合或脱颗粒现象。水飞蓟宾组大鼠肝线粒体少部分膜可见融合, 少部分嵴缺失, 粗面内质网接近正常。西洋参组大鼠肝线粒体和内质网结构接近正常。

2.2 各组大鼠肝组织 MDA 含量和 GSH 活性比较

表 1 示, 与正常组比较, 辐射组大鼠肝组织 MDA 含量升高、GSH 活性降低 ($P < 0.05$); 与辐射组比较, 水飞蓟宾组和西洋参组 MDA 含量降低、GSH 活性升高 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠肝组织 MDA 含量和 GSH 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MDA (mol/gp)	GSH (mg/gp)
正常组	10	0.71 $\pm$ 0.08	51 $\pm$ 7
辐射组	10	0.89 $\pm$ 0.08*	38 $\pm$ 3*
水飞蓟宾组	10	0.69 $\pm$ 0.07 Δ	46 $\pm$ 5 Δ
西洋参组	10	0.67 $\pm$ 0.12 Δ	44 $\pm$ 6 Δ

注: MDA, 丙二醛; GSH, 谷胱甘肽; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与辐射组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 各组大鼠肝组织 ATM 和 γH2AX 蛋白表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 辐射组大鼠肝组织 ATM、 γH2AX 平均灰度比值增加 ($P < 0.05$); 与辐射组相比, 水飞蓟宾组和西洋参组大鼠肝组织 ATM、 γH2AX 平均灰度比值均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠肝组织 ATM 和 γH2AX 蛋白电泳图见图 1。

表 2 各组大鼠肝组织 ATM 和 γ H2AX 蛋白表达比较 (平均灰度比值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ATM	γ H2AX
正常组	3	0.329 $\pm$ 0.04	0.362 $\pm$ 0.02
辐射组	3	1.195 $\pm$ 0.24*	1.349 $\pm$ 0.18*
水飞蓟宾组	3	0.853 $\pm$ 0.07 Δ	1.345 $\pm$ 0.14 Δ
西洋参组	3	0.491 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$	0.434 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta$

注: ATM, 磷酸化的血管共济失调突变蛋白; γ H2AX, 磷酸化组蛋白 2A 变异体; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与辐射组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

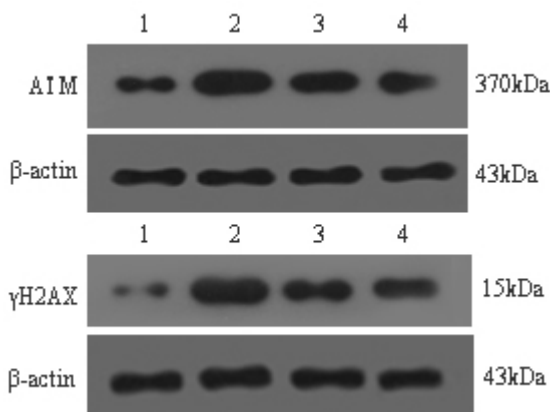


图 1 各组大鼠肝组织 ATM 和 γ H2AX 蛋白电泳图 ($\times 15000$)

3 讨论

肝脏是腹腔最大的消化腺和实质性器官,参与体内多种重要生理过程,并和有害有毒物质代谢相关。染色体 DNA 是活细胞和微波共振交互反映的靶点,细胞生长、发育、增殖及遗传之重要物质基础。研究证实, DNA 损伤反应 (DDR) 通路参与了氧化应激后的细胞命运决定,而 ATM 和 γ H2AX 是内源性氧化剂所致 DDR 的特异性标志物^[6-7]。生物体内氧化应激可致 DNA 损伤并激活其损伤修复系统,活化 ATM 和 H2AX^[8]; ATM 是一种蛋白激酶,是位于 DDR 通路上游最为重要的信号感受和转导分子^[9]。研究证实,氧化应激可使 ATM 活化,对 DNA 的损伤做出快速反应进行修复^[9-10]。真核细胞中的 DNA 是以组蛋白和非组蛋白形成复合物存在, Rogakou 等^[11]首次发现 H2AX 基因与细胞应答 DNA 损伤有关, H2AX 可维持细胞遗传信息的完整性,阻断肿瘤的形成,是一种重要的抑癌基因,并把磷酸化的 H2AX 命名为 γ H2AX, DNA 损伤越严重则 γ H2Ax 产生越多。本研究结果显示,电磁辐射后大鼠肝线粒体的嵴和膜出现异常,粗面内质网超微结构受损,肝组织 MDA 含量增加和

GSH 活性降低,肝组织 ATM、 γ H2AX 蛋白表达增强,提示电磁辐射 (900 MHz, 370 μ W/cm²) 造成大鼠肝氧化应激代谢产物增多,可能造成了肝细胞线粒体和粗面内质网受损,进一步引起 DDR, DNA 损伤的特异性标志物 ATM、 γ H2AX 蛋白表达增强,证实了本实验条件下的电磁辐射是一种有损大鼠肝脏健康的环境毒邪。

根据电磁辐射致病多是从体外侵犯人体,多表现为头晕、食欲不振、乏力、口干、发热 (38℃ 以下) 等火热之邪耗气伤阴的证候特征,电磁辐射归属于“六气”范畴,具火 (温) 热之性,邪热日久或亢盛易灼烁阴液,致阴液亏虚,故电磁辐射易伤津耗液,且“壮火之气衰”,故电磁辐射损伤的病机属气阴两虚。西洋参性寒,味甘微苦,入肺、脾经,具有补气养阴、养胃生津之效,适用于气阴虚而有火之证,多用于肺热燥咳、气虚懒言、四肢倦怠等症。现代药理研究证实,西洋参多糖能减弱氧化损伤,增强辐照小鼠免疫功能,有抗电磁辐射之效应^[12]。西洋参茎叶皂苷对肝损伤有保护作用^[13]。水飞蓟宾是一种黄酮木脂素类化合物,能降低血清转氨酶,清除自由基和抑制脂质过氧化活性,对多种实验性肝损伤有保护作用^[14],故在本研究中被选为对照用药。结果显示,水飞蓟宾组和西洋参胶囊组大鼠肝超微结构均出现明显改善,且肝组织氧化应激减弱,ATM、 γ H2AX 蛋白表达量减少,提示西洋参胶囊有助于修复电磁辐射后大鼠肝细胞损伤,其机制可能与改善肝脏超微结构、减轻氧化应激损伤有关。

参考文献

- [1] 钟秀宏,姜艳霞,任旷,等. 苓丹扶正胶囊对微波辐射致大鼠心肌和肝损伤超微结构的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(2): 249-251.
- [2] Trosic I, Pavicic I, Milkovic-Kraus S, et al. Effect of electromagnetic radiofrequency radiation on the rats brain, liver and kidney cells measured by comet assay [J]. Coll Antropol, 2011, 35(4): 1259-1264.
- [3] 田志杰,沈南. 高强微波辐射对 Wistar 大鼠血清 SOD、HSP 和肝脏 MDA、Mit 肿胀的影响 [J]. 四川动物, 2009, 28(4): 528-531.
- [4] 姚莉,梁晓俐,王德文. 高场强电磁脉冲辐射对小鼠肝损伤效应的初步研究 [J]. 中华理医学与康复杂志, 2004, 26(2): 69-72.
- [5] 罗亚萍,李春香,马惠荣,等. 西洋参胶囊对手机频率电磁辐射大鼠肝脏组织氧化损伤及 Nrf2 蛋白表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(5): 596-601.

- [6] Mah LJ, Orlowski C, Ververis K, et al. Evaluation of the efficacy of radiation-modifying compounds using γ H2AX as a molecular marker of DNA double-strand breaks [J]. Genome Integr, 2011, 2(1): 3.
- [7] Zhao H, Traganos F, Albino AP, et al. Oxidative stress induces cell cycle-dependent Mre11 recruitment, ATM and Chk2 activation and histone H2AX phosphorylation [J]. Cell Cycle, 2008, 7(10): 1490-1495.
- [8] Malyarchuk S, Castore R, Shi R, et al. Artemis is required to improve the accuracy of repair of double-strand breaks with 5'-blocked termini generated from non-DSB-clustered lesions [J]. Mutagenesis, 2013, 28(3): 357-366.
- [9] Guo Z, Kozlov S, Lavin MF, et al. ATM activation by oxidative stress [J]. Science, 2010, 330(6003): 517-521.
- [10] Guo Z, Deshpande R, Paull TT. ATM activation in the presence of oxidative stress [J]. Cell Cycle, 2010, 9(24): 4805-4811.
- [11] Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 [J]. J Biol Chem, 1998, 273(10): 5858-5868.
- [12] 于永超, 张佳丽, 林兵, 等. 西洋参多糖对⁶⁰Co 辐照小鼠免疫功能的调节作用 [J]. 现代预防医学, 2012, 39(11): 2685-2687.
- [13] 赵玉珍, 刘蕾, 陈立平, 等. 西洋参茎叶皂甙对大鼠实验性肝损伤的影响 [J]. 中成药, 2000, 22(3): 219-220.
- [14] 薛洪源, 侯艳宁, 刘会臣, 等. 水飞蓟宾胶囊对异烟肼和利福平肝损害小鼠的保护作用 [J]. 中成药, 2003, 25(4): 317-310.

Effects of American Ginseng Capsules on the Liver Ultrastructure and the Oxidative Stress of Rats after Exposure to Electromagnetic Radiation

LUO Yaping¹, MA Huirong², CAO Xiaohui³, SONG Cuimiao², MA Xuelian²

(1. Chinese Medicine Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei Province, 050011; 2. Hebei University of Chinese Medicine; 3. Hebei Medical University)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanisms of American ginseng capsules in prevention and treatment of rat liver injury induced by electromagnetic radiation. **Methods** Forty Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group, radiation group, silibinin group, and American ginseng group, with ten in each group. Except the normal group, the three rest groups of rats were exposed to electromagnetic radiation (900 MHz, 370 μ W/cm²), 4 h per day, for 12 days in a row. At the same time, the silibinin group and the American ginseng group rats were administered orally with silibinin capsules solution (7 mg/ml) and American ginseng capsules solution (19.7 mg/ml) 1 ml/200 g every day respectively. And the normal group and the radiation group were given with equivalent normal saline. After 12 days, the rats were killed and liver ultrastructure was observed under transmission electron microscope. The content of malondialdehyde (MDA), the activity of glutathione (GSH), and the expression of phosphorylated vascular ataxia mutation protein (ATM) and phosphorylated histone 2A variants (γ H2AX) in liver tissue were also detected. **Results** Compared with the normal group, the mitochondria and rough endoplasmic reticulum of liver cells mildly damaged, the content of MDA in liver tissue increased, the activity of GSH decreased, and the expression of ATM and γ H2AX increased significantly in the radiation group ($P < 0.01$). Compared with the radiation group, the mitochondria and rough endoplasmic reticulum of liver cells showed less damage, the content of MDA in liver tissue decreased, the activity of GSH increased, and the expression of ATM and γ H2AX decreased significantly in the silibinin group and the American ginseng group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** American ginseng capsules can improve the ultrastructure injury of rat liver induced by electromagnetic radiation. Its mechanism may be related to reduction of oxidative stress and the protein expression of ATM and γ H2AX.

Keywords American ginseng capsules; electromagnetic radiation; liver injury; oxidative stress; liver ultrastructure
(收稿日期: 2015-01-08; 修回日期: 2015-03-06)

编辑: 邓 媛