

辐射所致小鼠肾脏氧化损伤及川芎嗪的保护作用*

彭洁 李文丽 李玉亮 海春旭[△]

(第四军医大学军事预防医学院毒理学教研室, 特殊作业环境危害评估与防治教育部重点实验室, 陕西省自由基生物学与医学重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 研究川芎嗪对辐射所致小鼠肾脏氧化损伤的预防和治疗作用。方法: 采用⁶⁰Co- γ 射线 5 Gy 全身单次照射小鼠造模, 在照射前和照射后分别于每天腹腔注射川芎嗪 130 mg/kg, 连续给药 10 d, 进行预防和治疗, 并设对照组, 观察肾组织中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及总抗氧化力(T-AOC)的变化。结果: 与阴性对照组比较, 照射可显著增加肾组织中 MDA 的含量($P<0.05$), 降低 SOD、CAT 的活性($P<0.05$), 升高 GSH-Px 活性($P<0.05$), 降低 GSH 含量($P<0.05$), 使肾组织 T-AOC 下降($P<0.05$)。与照射组比较, 给予川芎嗪预防和治疗后, 均可降低肾组织 MDA 含量($P<0.05$), 升高肾组织 T-AOC($P<0.05$), 且治疗组优于预防组, 与阴性对照组无显著性差异。同时, 预防组可使 SOD 活性和 GSH 含量升高($P<0.05$), 治疗组可使 SOD 和 CAT 活性增高($P<0.05$), 但均对 GSH-Px 活性无显著影响($P>0.05$)。结论: 川芎嗪具有很好的抗氧化作用, 无论预防和治疗均可降低辐射所致小鼠肾脏的氧化应激损伤, 并且治疗效果优于预防效果。

关键词 川芎嗪 辐射 肾脏 抗氧化

中图分类号: Q95-33 R285.5 R692 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)16-3064-04

Oxidative Stress Damage Induced by Irradiation in Mouse Kidney and the Protective Effect of Ligustrazine against it*

PENG Jie, LI Wen-li, LI Yu-liang, HAI Chun-xu[△]

(Department of Toxicology, the Ministry of Education Key Lab of Hazard Assessment and Control in Special Operational Environment, Shaanxi Provincial Key Lab of Free radical biology and medicine, School of Public Health, The Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the oxidative stress damage induced by irradiation in mouse kidney and the preventive and therapeutic effect of Ligustrazine against it. **Methods:** Mice were exposed to 5Gy single ⁶⁰Co- γ irradiation to induce oxidative stress, the concentration of Ligustrazine for intraperitoneal is 130 mg/kg to prevent and treat liver injury before and after irradiation, The injection lasted 10 days. The parameters of malondialdehyde(MDA), superoxide dismutase enzyme (SOD), catalase (CAT), reduced glutathione hormone(GSH), glutathione peroxidase (GPx), total antioxidation capability (T-AOC) activity in kidney were measured. **Results:** Compared with that in the normal control group, irradiation significantly increased kidney content of MDA ($P<0.05$), decreased CAT, SOD activity ($P<0.05$), GSH-Px activity ($P<0.05$), while it decreased kidney content of GSH ($P<0.05$), the kidney tissue T-AOC decreased ($P<0.05$). By use of Ligustrazine, MDA content decreased ($P<0.05$), T-AOC were significantly higher ($P<0.05$), CAT activity increased ($P<0.05$) and the effect of treatment group was better than the prevention group had no significant difference ($P<0.05$) compared with that in the normal group. Meanwhile, the activity of SOD and the content of GSH significant increased in prevention group ($P<0.05$); The activity of SOD and CAT significant increased in treatment group ($P<0.05$); But GSH-Px activity was no significant difference either in treatment group or in prevention group. **Conclusion:** The irradiation can cause oxidative stress damage in mouse kidney tissue, Ligustrazine can reduce or reverse this damage both in treatment and prophylaxis, and treatment group is better than the prevention group.

Key words: Ligustrazine; Irradiation; Kidney; Antioxidant

Chinese Library Classification(CLC): Q95-33, R285.5, R692 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)16-3064-04

前言

电离辐射能够直接或通过次级反应间接引起介质电离。电离辐射可以引起放射病, 可以诱导产生大量自由基^[1-4]。自由基

是指能够单独存在的, 具有不配对价电子的离子、原子、分子基团, 他们的共同特征是最外层电子轨道上具有不配对电子, 也正是由于这一原因, 它们的性质及其活泼^[5]。在正常的生理状态下自由基发挥着对机体有益的作用, 当机体遇到病毒、细菌等

* 基金项目: 本项目得到长江学者, 创新团队发展计划资助; 国家自然科学基金资助(30872135; 31170807)

作者简介: 彭洁(1983-), 女, 硕士, 助教, 研究方向: 自由基生物学与药理学, E-mail: liluo_2006@163.com

[△]通讯作者: 海春旭, 电话: 029-84774-879, E-mail: xh-hai@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2012-03-13 接受日期: 2012-04-10)

外界因素侵扰时,免疫吞噬细胞可释放自由基,以有效防止感染、促进神经递质代谢、维持血流通畅,但当人体产生的自由基过多时,过多的自由基会攻击细胞膜上的不饱和脂肪酸,发生脂质过氧化损伤,同时还会氧化糖类、核酸、蛋白质、破坏酶的活性,诱导一系列炎症瀑布反应,严重破坏机体的正常生理活动,诱发疾病产生。电离辐射可引起机体全身性反应,几乎所有的器官、系统均发生病理改变^[6-11]。本文以肾脏为研究对象,从自由基产生的氧化应激损伤角度出发,探讨电离辐射引发肾损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备

二级雄性 BABL/c 小鼠 60 只,体重 20-22 g,由第四军医大学实验动物中心提供。注射用盐酸川芎嗪购于哈尔滨三联药业有限公司,规格 80 mg/支;所用试剂盒均购于南京建成试剂公司,MDA 标准品为德国 Merck 公司产品,过氧化氢、三羟甲基氨基甲烷(trisaminomethane,Tris)、抗坏血酸、磷酸铀溶液等均为国产分析纯;牛血清白蛋白为江苏华美试剂公司产品;3K30 型台式高速冷冻离心机均为美国 Sigma 公司产品;7200 型光栅分光光度计为尤尼柯产品。

1.2 照射所致氧化应激模型的建立

健康 BABL/c 小鼠 60 只,按体重随机分为 5 组,每组 12 只。分别为预防对照组(PC)、预防给药组(PS)、治疗对照组(TC)、治疗给药组(TS)、阴性对照组(C)。造模采用⁶⁰Co-γ射线 5 Gy 全身单次照射,剂量率为 303.81 cGy/min,预防对照和预防给药组在照射前 10 天给与生理盐水和 130 mg/kg/d 川芎嗪腹腔注射给药,照射后立即处死;治疗对照和治疗给药组从照射开始后立即给药,到处死当天终止,共 10 天;阴性对照组只给予生理盐水腹腔注射。

1.3 组织匀浆的制备及其生化指标检测

组织匀浆的制备 取肾组织于生理盐水中洗净,吸干表面液体,与生理盐水以 1:9 比例匀浆,匀浆液以 3000 r/min 离心,取上清液待测。

1.3.1 肾组织 MDA 的测定 分别设空白管、标准品管、样品管 3 组。取肾组织匀浆 0.05 ml,分别加入 1/24 mol/L 硫酸 4 ml 和 0.1 mg/ml 磷酸铀 0.1 ml,混匀放置 5 min,2 000 r/min 离心 10 min,弃上清,重复 1 次,得样品。空白管和样品管各加入 1 ml 双蒸水,标准管加入 1 μmol/L MDA 稀释液 1 ml,各管均加入 0.67% 硫代巴比妥酸(TBA) 1 ml,分别混匀,置于 100 °C 水浴 1 h,准时取出流水冷却至室温,最后分别加入 4 ml 水饱和正丁醇,振荡抽提 1 min,3 000 r/min 离心 10 min,取上清即正丁醇层 3 ml,以发射光 553 nm,激发光 515 nm,测定荧光强度。

1.3.2 肾组织 SOD、CAT、GSH、GSH-Px、T-AOC 的测定 取已制备好的组织匀浆液,检测其生化指标:① SOD 采用黄嘌呤氧化酶法检测;② CAT 采用加入过量 H₂O₂,待 CAT 与 H₂O₂ 反应完后用显色反应测量剩余 H₂O₂ 的方法检测;③ GSH 采用二硫代二硝基苯甲酸显色法检测;④ GSH-Px 采用测量其酶促反应中反应底物 GSH 的消耗量来检测;⑤ T-AOC 采用测量肾组还原金属离子的量来检测;以上各项检测均严格按照试剂盒操作。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 11.5 for windows 统计分析软件进行线性回归分析和方差分析,应用 Dunnett t 检验进行组间的两两比较,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 川芎嗪对 MDA 含量的影响

如图 1 所示,采用⁶⁰Co-γ射线 5 Gy 全身单次照射后,与阴性对照组(NC)相比,治疗对照组(TC)和预防对照组(PC)肾组织中 MDA 含量明显增高($P<0.05$),提前预防给予 130 mg/kg 川芎嗪后发现,该预防组(PS)MDA 含量较 PC 组明显降低($P<0.05$),但仍高于 NC 组($P<0.05$)。给予同等剂量川芎嗪治疗后发现,该治疗组(TS)MDA 含量较 TC 组明显降低($P<0.05$),与 NC 组无显著性差异($P>0.05$)。

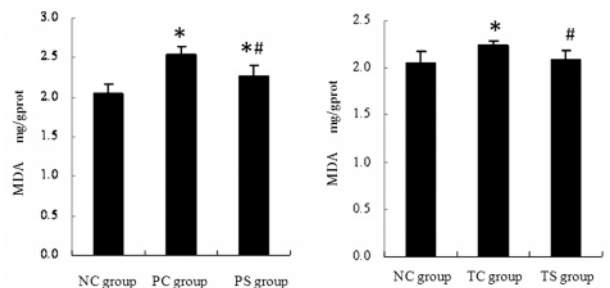


图 1 川芎嗪对肾组织 MDA 含量的影响 与阴性对照组(NC)组比较, * $P<0.05$;与预防对照(PC)组或治疗对照(TC)组比较 # $P<0.05$

Fig.1 Effect of Ligustrazine on the content of MDA in nephridial tissue Compared with NC group, * $P<0.05$, Compared with PC group or TC group, # $P<0.05$

2.2 川芎嗪对肾组织 SOD、CAT、GSH、GSH-Px、T-AOC 的影响

如表 1 所示,采用⁶⁰Co-γ射线 5 Gy 全身单次照射后,与阴性对照组(NC)相比,治疗对照组(TC)和预防对照组(PC)肾组织中 SOD、CAT、GSH、T-AOC 明显降低($P<0.05$),而 GSH-Px 却显著升高($P<0.05$)。提前预防给予 130 mg/kg 川芎嗪后发现,该预防组(PS)SOD、GSH、T-AOC 较 PC 组明显升高($P<0.05$),CAT 和 GSH-Px 无显著变化($P>0.05$)。给予同等剂量川芎嗪治疗后发现,该治疗组(TS)SOD、CAT、T-AOC 较 TC 组明显升高($P<0.05$),GSH 和 GSH-Px 则无显著变化($P>0.05$)。与 NC 组相比 PS 组中 GSH 和 GSH-Px 无显著性差异($P>0.05$),TS 组中 CAT、GSH-Px、T-AOC 无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

从以上实验数据中发现,暴露于电离辐射中的小鼠,其肾组织丙二醛(MDA)含量明显增高($P<0.05$),说明活性氧(ROS)攻击其生物膜,与不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,使组织产生严重的脂质过氧化损伤。同时,机体的抗氧化防御体系,如超氧化物歧化酶(SOD)的活性显著降低($P<0.05$),表明机体对 O₂⁻ 的催化转化受到阻扰,过氧化氢酶(CAT)活性明显降低($P<0.05$),机体对 H₂O₂ 转化为 H₂O 的能力降低,GSH 的量也发生了明显下降($P<0.05$),机体会堆积大量的活性氧、自由基,这

些化学性质非常活泼物质会与肾组织中的大分子物质如核酸、蛋白质的发生反应破坏肾组织正常的结构和功能。本研究发现在辐射过后 GSH-Px 活性却明显上升($P<0.05$) ,由于 GSH-Px 可以在以 GSH 为存在的情况下催化 H_2O_2 和许多有机氢过氧

化物 ,在实验中我们发现 GSH 含量下降 ,这样 GSH-Px 的酶催化反应无法正常进行 结过 GSH-Px 和氢过氧化物都发生大量堆积。肾组织总抗氧化能力(T-AOC)($P<0.05$)明显下降 ,肾组织处于氧化应激损伤状态。

表 1 川芎嗪对肾组织 SOD、CAT、GSH、GSH-Px 的影响
Table 1 The effect of Ligustrazine on the SOD,CAT,GSH,GSH-Px in nephridial tissue

分组	SOD (U/mgprot)	CAT (U/mgprot)	GSH (mg/gprot)	GSH-Px (U/mgprot)	T-AOC (U/mgprot)
NC group	81.78± 9.59	25.75± 2.69	10.54± 0.89	851.38± 42.03	0.44± 0.08
PC group	49.48± 2.71*	20.40± 0.92*	7.98± 0.93*	985.34± 109.53*	0.22± 0.06*
PS group	68.14± 5.86*#	20.10± 1.26*	11.51± 0.59#	897.16± 97.88	0.30± 0.05*#
TC group	54.27± 7.27*	18.85± 1.56*	8.28± 0.74*	863.01± 58.08	0.34± 0.05*
TS group	73.52± 5.93*#&	24.52± 2.99&	9.13± 1.12*	852.67± 76.81	0.48± 0.05&

Note : Compared with NCgroup, * $P<0.05$;PS group compared with PC group, # $P<0.05$; TS group compared with TC group, & $P<0.05$.

中药川芎具有很好的抗氧化作用 ,川芎嗪作为其有效成分之一 ,已经被广泛应用于临床^[12-22]。本实验研究表明 ,无论是预防还是治疗给予川芎嗪注射液 ,都可以提高 SOD 的活性($P<0.05$) ,降低 GSH-Px 活性 ,预防给药还可以提高 GSH 含量($P<0.05$) ,但对 CAT 活性无显著影响 ,而治疗给药则可以显著提高 CAT 活性($P<0.05$) ,但对 GSH 含量无明显影响 ,说明给予川芎嗪无论是预防还是治疗均可以不同程度的改善抗氧化酶的活性 ,但预防和治疗给药 ,对不同的酶的作用并不是完全相同 ,可能与不同的酶对照射的敏感程度以及各种酶的修复能力不同决定的。川芎嗪还可以使照射后肾组织 T-AOC 明显增高($P<0.05$) ,增强机体总抗氧化防御能力 ,以清除过多的自由基 ,阻止组织进一步损伤 ,且治疗组明显优于预防组。从脂质过氧化产物 MDA 的实验结果上发现 ,预防和治疗给予川芎嗪注射液 ,都可以明显降低 MDA 含量($P<0.05$) ,使肾组织脂质过氧化损伤明显减轻 ,且治疗效果明显优于预防效果 ,治疗后与正常值相接近。

综上 ,川芎嗪有很好的抗氧化作用 ,可增强肾组织总抗氧化能力 ,提高肾组织中抗氧化酶的活性 ,显著降低因辐射所致肾脏氧化损伤程度。提示川芎嗪对预防和治疗照射引起的肾损伤具有一定的潜力 ,并且治疗效果优于预防效果。

参 考 文 献(References)

[1] 王崇道,强亦忠. 电离辐射所致自由基对机体的损伤与自由基清除剂的研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2002, 22(6): 461-463
Wang Cong-dao, Qiang Yi-zhong. The study of onizing radiation-induced free radical damage to the body and free radical scavenger [J]. Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection, 2002, 22 (6): 461-463

[2] 李滔,海春旭,秦绪军,等.⁶⁰Co-γ 射线局部照射对荷瘤大鼠骨髓蛋白质的影响 [J]. 癌变·畸变·突变, 2005, 17(1): 15-18
Li Bo, HAI Chun-xu, QIN Xu-jun, et al. Effects of ⁶⁰Co-γ Ray local Irradiation on Proteins of Bone Marrow in Tumor-bearing Rats Carcinogenesis [J]. Teratogenesis and Mutagenesis, 2005, 17(1): 15-18

[3] 秦绪军,何伟,海春旭,等. 复合抗氧化剂对荷瘤大鼠 ⁶⁰Co-γ 射线局部照射时血液氧化损伤的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(9): 850-852
Qin Xu-jun, He Wei, Hai Chun-xu, et al. Effect of antioxidants compound on oxidative injury in local radiated rats with tumor [J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2002, 23 (9): 850-852

[4] 赵康涛,海春旭,梁欣,等.⁶⁰Co-γ 射线照射大鼠损伤作用中硫辛酸对谷胱甘肽的调节与再生 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(11): 1007-1009
Zhao Kang-tao, Hai Chun-xu, Liang Xin, et al. Modulation of fipoic acid and regeneration of glutathion in rats injured by radiation with ⁶⁰Co-γ ray [J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2003, 24 (11): 1007-1009

[5] 海春旭. 自由基医学 [M]. 中国, 西安: 第四军医大学出版社, 2006: 3-4

[6] 高林峰,王洪复,朱飞鹏. 电离辐射肾损伤病理特点及其机理研究 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2004, 24(5): 430-432
Gao Lin-feng, Wang Hong-fu, Zhu Fei-peng. The study of pathological features and mechanism of renal injury induced by ionizing radiation [J]. Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection, 2004, 24(5): 430-432

[7] 韩瑞刚,彭瑞云. 电离辐射对骨髓损伤的研究进展 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2005, 25(6): 586-588
Han Rui-gang, Peng Rui-yun. The progress of bone marrow damage induced by ionizing radiation [J]. Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection, 2005, 25(6): 586-588

[8] 王宏,万丹丹,王彦,等. 电离辐射诱发晶状体损伤评价及剂量探讨 [J]. 中国职业医学, 2011, 38(3): 259-260
Wang Hong, Wan Dan-dan, Wang Yan, et al. Study on evaluation and dose limit of lens injuries induced by ionizing radiation [J]. China Occupational Medicine, 2011, 38(3): 259-260

[9] 王瑜,张再重,邹忠东,等. 电离辐射对大鼠肠屏障功能的损伤作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(1): 126

- Wang Yu, Zhang Zai-chong, Zou Zhong-dong, et al. Ionizing radiation damage effects on intestinal barrier function [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2009, 26(1): 126
- [10] 张恒, 吴红英, 李德冠, 等. 电离辐射对小鼠脾脏 B 淋巴细胞损伤的研究 [J]. 中国辐射卫生, 2010, 19(2): 143-144
- Zhang Heng, Wu Hong-ying, Li De-guan, et al. The Study of Ionizing Radiation on Proliferation of Mouse Spleen B Lymphocyte [J]. Chinese Journal of Radiological Health, 2010, 19(2): 143-144
- [11] 张慧娟, 李亚军, 宋学茹. 小剂量电离辐射与生殖损伤 [J]. 中华全科医师杂志, 2011, 10(8): 557-558
- Zhang Hui-juan, Li Ya-jun, Song Xue-ru. Small doses of ionizing radiation on reproductive damage [J]. Chinese Journal of General Practitioners, 2011, 10(8): 557-558
- [12] Fu H, Li J, Li Q, et al. Protective effect of ligustrazine on accelerated anti-glomerular basement membrane antibody nephritis in rats is based on its antioxidant properties [J]. European Journal of Pharmacology, 2007, 563(2007): 197-202
- [13] Shi J, Wang Y, Luo G. Ligustrazine Phosphate Ethosomes for Treatment of Alzheimer's Disease, In Vitro and in Animal Model Studies [J]. AAPS PharmSciTech, 2012[Epub ahead of print]
- [14] Gao C, Liu Y, Ma L, et al. Effects of Ligustrazine on pulmonary damage in rats following scald injury [J]. Burns, 2012 [Epub ahead of print]
- [15] Meng QT, Xia ZY, Luo T, et al. Ligustrazine attenuates acute lung injury induced by blunt chest trauma [J]. Saudi Med J, 2012, 33(2): 139-145
- [16] Wang B, Ni Q, Wang X, et al. Meta-analysis of the clinical effect of ligustrazine on diabetic nephropathy [J]. Am J Chin Med, 2012, 40(1): 25-37
- [17] Wu HJ, Hao J, Wang SQ, et al. Protective effects of ligustrazine on TNF-alpha-induced endothelial dysfunction [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 674(2-3): 365-369
- [18] Lv L, Jiang SS, Xu J, et al. Protective effect of ligustrazine against myocardial ischaemia reperfusion in rats: the role of endothelial nitric oxide synthase [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012, 39(1): 20-27
- [19] Yang QH, Liang Y, Xu Q, et al. Protective effect of tetramethylpyrazine isolated from Ligusticum chuanxiong on nephropathy in rats with streptozotocin-induced diabetes [J]. Phytomedicine, 2011, 18(13): 1148-1152
- [20] Jiang F, Qian J, Chen S, et al. Ligustrazine improves atherosclerosis in rat via attenuation of oxidative stress [J]. Pharm Biol, 2011, 49(8): 856-863
- [21] Liu X, Li J, Li Q, et al. Protective effects of ligustrazine on cisplatin-induced oxidative stress, apoptosis and nephrotoxicity in rats [J]. Environ Toxicol Phar, 2008, 26(2008): 49-55
- [22] Fu H, Li J, Li Q, et al. Protective effect of ligustrazine on accelerated anti-glomerular basement membrane antibody nephritis in rats is based on its antioxidant properties [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 563(2007): 197-202