

· 基础研究 ·

加味补阳还五汤对 8Hz 130dB 次声暴露下小鼠大脑过氧化水平及超微结构的影响*

范建中¹ 杨俊峰¹ 陈景藻² 谭晓明¹

摘要 目的: 观察加味补阳还五汤对 8Hz 130dB 次声暴露下小鼠大脑过氧化水平及超微结构的影响。方法: 40 只 BALB/c 小鼠分为空白对照组、次声对照组、次声加用药组(根据用药剂量的不同又分高、中、低剂量 3 个亚组), 处理 14d 后测试其超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性、丙二醛(MDA)含量, 以及在电镜下观察其大脑皮质超微结构的变化。结果: 次声对照组的 SOD 活力与正常对照组相比有明显降低, 各用药组中的 SOD 活力较次声对照组有明显升高, 其中以高剂量组最为明显; 次声对照组的 GSH-PX 活力与正常对照组相比有明显升高, 各用药组中的 GSH-PX 活力较次声对照组也有明显升高; 次声对照组的 MDA 含量与正常对照组相比有明显升高, 高、中剂量用药组中的 MDA 含量较次声对照组有明显降低。透射电镜观察次声对照组的大脑皮质的神经元周围可见小胶质细胞水肿、增生; 线粒体畸形明显, 呈分叉、三角形, 并可见空泡化; 高尔基体中度扩张; 毛细血管周围间隙明显, 髓鞘板层排列紊乱, 脂褐素增多明显。在用药组中上述损伤有所减轻。结论: 8Hz 130dB 次声暴露 14d(2h/d)可引发小鼠大脑皮质的脂质过氧化, 给小鼠造成一定的损伤。加味补阳还五汤可以通过提高小鼠体内 GSH-PX 和 SOD 的活性来清除体内的自由基, 使 MDA 含量降低, 减轻次声对机体作用后的不良反应。

关键词 次声; 加味补阳还五汤; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 丙二醛; 超微结构

中图分类号: R28, R741, R493

文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2007)-04-0296-03

An experimental study on the effect of oxidation resistance and ultrastructure of Jia Wei Bu Yang Huan Wu Decoction after infrasound exposure(8Hz, 130dB)/FAN Jianzhong, YANG Junfeng, CHENG Jingzao, et al. //Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(4): 296—298

Abstract **Objective** To study the effects of Jia Wei Bu Yang Huan Wu Decoction on oxidation resistance after ultra-structure of mice exposed to 130dB infrasound (8Hz). **Method:** Forty BALB/c mice were divided into blank-control group, infrasound-control group, infrasound and drug-treated group (it was divided into 3 sub-groups according to drug dose). SOD and GSH-PX activities and MDA contents were tested and ultrastructure of pallium were observed 14 days afterward. **Result:** Compared with blank group, SOD activity decreased ($P < 0.05$), and MDA content increased ($P < 0.01$) in simple infrasound group; Compared with simple infrasound group, SOD activity increased ($P < 0.01$), MDA content decreased ($P < 0.01$) in infrasound and drug-treated group. **Conclusion:** 8Hz 130dB infrasound could damage learning and memory abilities causing by lipid peroxidation reaction in mice's cortex. Jia Wei Bu Yang Huan Wu Decoction could eliminate free radicals by enhancing the activity of GSH-PX and SOD, decreasing the content of MDA, and alleviating side effect of the brain caused by infrasound.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, Nanfang Hospital, Nanfang Medicine University, Guangzhou, 510515

Key words infrasound; Jia Wei Bu Yang Huan Wu Decoction; superoxide dismutase; glutathione peroxidase; malonal dehyde; ultrastructure

次声是频率在 0.0001—20Hz 之间的声波, 在空气中传播较远, 具有很强的穿透力。它在各类工业生产环境、交通环境、军事环境、直至自然环境中广泛存在^[1]。次声在一定的条件下可对人体造成损害, 但到目前为止, 关于次声防护的研究才刚刚开始, 有关这方面的报道甚少^[2]。本实验通过观察加味补阳还五汤对 8Hz 130dB 次声暴露下小鼠大脑超氧化物歧化酶(super oxide dismutase, SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)活性、丙二

醛(malonal dehyde, MDA)含量, 以及超微结构的影响来探讨其对次声损伤可能存在的防治作用, 并初步阐述其对次声防护的作用机制, 为次声的防治研究提供资料。

* 基金项目: 军队“十五”指令性课题(01L071)

1 南方医科大学南方医院康复医学科, 广州, 510515

2 第四军医大学西京医院康复医学科

作者简介: 范建中, 男, 主任医师, 教授, 博士

收稿日期: 2006-09-07

1 材料和方法

1.1 仪器与药物

次声声源及检测系统: 采用第四军医大学在中国科学院声学研究所和航天工业总公司第 41 所的指导和协作下建成的、声源为电动扬声器式次声压力仓系统及检测系统。次声压力仓系统由低频信号发生器、功率放大器和 4 个电动扬声器组成。检测系统包括次声传声器和信号数据采集分析系统。

透射电子显微镜型号为 JEM-2000EX (日本电子光学有限公司制造); 第四军医大学电镜室提供。

加味补阳还五汤由生黄芪、当归尾、红花、赤芍、地龙、桃仁、川芎、杭白菊等组成, 经第一军医大学中医系鉴定, 水煎 2 次, 生药含量为 3g/ml。

1.2 实验动物与分组

实验动物选用雄性 BALB/c 小鼠 40 只, 体重 20g 左右, 由第四军医大学实验动物中心提供。实验前 4 天领回, 分笼饲养于安静环境中, 自由饮水进食。动物室温度控制在 20—24℃, 湿度控制在 50% 左右。根据实验设计分为空白对照组、次声对照组、以及次声加用药组 (根据用药剂量的不同又分高、中、和低剂量 3 个亚组), 每组 8 只动物。

1.3 实验方法

动物给药均采用灌胃法, 每日 1 次。次声加用药组小鼠放入次声仓中暴露 8Hz 130dB 次声 2h, 暴露结束后, 1h 高、中、低剂量亚组分别按 20ml/kg、10ml/kg、5ml/kg 灌药。次声对照组在次声仓中暴露 8Hz 130dB 次声 2h, 暴露结束 1h 后按 10ml/kg 灌生理盐水。空白对照组放入次声仓中 2h, 但无次声输出, 取出 1h 后按 10ml/kg 灌生理盐水。上述处理每天进行 1 次, 连续进行 14d。

1.4 指标测定

小鼠在断头处死后取脑组织, 用冰生理盐水冲洗后, 置 -80℃ 冰箱中待测。指标测定时脑组织用生理盐水制成 10% 脑组织匀浆, GSH-PX 活性用化学比色法测定; SOD 活性用黄嘌呤氧化酶法测定; MDA 含量用硫代巴比妥酸法测定; 蛋白质检测用考马斯亮兰法。MDA 试剂盒、GSH-PX 试剂盒和 SOD 试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。

小鼠在断头处死后取部分大脑皮层修成 1mm³ 的小块浸入电镜液固定, 在第四军医大学电镜室常规方法包埋制备透射电镜标本后行透射电镜检查。

1.5 统计学分析

所有数据用 SPSS10.0 统计软件分析, 采用 ONE-ANOVA 检验方法, 以均数±标准差表示。

2 结果

2.1 SOD 活性、GSH-PX 活性 MDA 含量

见表 1。次声对照组的 SOD 活力与正常对照组相比有明显降低, 其差异有显著性 ($P<0.05$), 各用药组中的 SOD 活力较次声对照组有明显升高, 其差异有非常显著性 ($P<0.01$), 其中以高剂量组最为明显, 它与低剂量组之间有明显差异 ($P<0.05$)。次声对照组的 GSH-PX 活力与正常对照组相比有明显升高, 其差异有显著性 ($P<0.05$), 各用药组中的 GSH-PX 活力较次声对照组也有明显升高, 其差异有非常显著性 ($P<0.01$), 其中以高剂量组最为明显, 但它与中、低剂量组之间差异无显著性意义 ($P>0.05$)。次声对照组的 MDA 含量与正常对照组相比有明显升高, 其差异有非常显著性 ($P<0.01$), 高、中剂量用药组中的 MDA 含量较次声对照组有明显降低, 其差异有显著性 ($P<0.05$), 但低剂量组与次声对照组之间差异未见显著性意义 ($P>0.05$)。

表 1 SOD 活性、GSH-PX 活性以及 MDA 含量的结果

($\bar{x} \pm s$)

指标	高剂量组	中剂量组	低剂量组	次声对照组	空白对照组
SOD(U/mgprot)	101.18±12.21 ^①	88.18±8.44 ^①	70.57±9.51 ^①	40.14±6.54	60.27±11.98 ^②
GSH-PX(U)	92.96±12.97 ^①	80.95±10.07 ^①	74.60±18.11 ^①	40.63±4.26	27.52±4.88 ^②
MDA(nmol/mgprot)	4.39±0.83 ^①	5.14±0.89 ^②	5.58±1.36	6.42±1.35	3.79±0.90 ^①

与次声对照组相比: ① $P<0.01$, ② $P<0.05$

2.2 超微结构的结果

正常对照组: 神经元及胶质细胞形态完整, 胞核清晰, 核内染色质以常染色质为主, 核仁明显; 可见丰富的粗面内质网、游离核糖体和线粒体; 线粒体排列规则, 髓鞘结构正常; 毛细血管结构正常; 突触结构正常, 髓鞘板层结构完整 (图 1, 见前置彩色插页 9)。

次声对照组: 神经元的形态基本完整, 其周围可见较多的小胶质细胞水肿、增生; 染色质边集明显,

出现异染色质; 线粒体畸形明显, 呈分叉、三角形, 并可见空泡化; 高尔基体中度扩张; 髓鞘板层排列紊乱, 脂褐素增多明显 (图 2—3, 见前置彩色插页 9)。

高剂量用药组: 神经元形态基本完整, 胞核形态可, 以常染色质为主; 未见明显的线粒体肿胀及空泡化, 高尔基体扩张不明显; 毛细血管结构基本正常, 与周围连接紧密, 髓鞘结构基本正常, 可见少量的脂褐素 (图 4—5, 见前置彩色插页 9)。

中剂量用药组: 神经元的形态基本完整, 可见少

量异染色质;毛细血管周围间隙不大,有轻度水肿;有少量的髓鞘板层分离现象,可见稍多的脂褐素(图 6—7,见前置彩色插页 9)。

低剂量用药组:神经元的形态基本完整,其周围可见小角质细胞;线粒体中度水肿、空泡化;高尔基体以正常为主;毛细血管周围间隙较大,有较多的髓鞘板层分离现象,脂褐素增多明显(图 8,见前置彩色插页 9)。

3 讨论

既往的研究表明:大鼠暴露于 8Hz90dB 和 120dB 的次声后可观察到其脑组织中 SOD 活性较对照组均有显著降低;GSH-PX 活性及 MDA 含量较对照组显著增高^[3];同时 8Hz,90dB 和 100dB 的次声暴露后对鼠大脑皮质的电镜观察发现神经细胞的脂质氧化过程加剧,细胞内脂褐素沉积,细胞萎缩老化^[4]。本实验中观察到小鼠在暴露 8Hz 130dB 次声 14d 后次声对照组较正常对照组的 SOD 活力明显降低,GSH-PX 活力明显升高,MDA 含量明显升高。电镜结果示次声暴露神经元的周围可见较多的小角质细胞水肿、增生;染色质边集明显,出现异染色质;线粒体畸形明显,呈分叉、三角形,并可见空泡化;髓鞘板层排列紊乱,脂褐素增多明显。这与以往的结果一致,提示次声的损伤可能是激活了氧化系统,产生自由基而损害细胞功能。

补阳还五汤始以补气药与活血祛瘀药相配伍,以益气固摄为主,化瘀通络为辅清,具有补气活血,通经活络的功效^[5]。在次声的损伤中,除了肝肾亏虚,气虚血瘀外,还有肝阳上亢的表现,而杭白菊除了以上的药理作用外还具有疏风散热、明目、平降肝阳、清热解毒的功效^[6],因此,我们在补阳还五汤里加杭白菊来平肝潜阳,对次声的损伤进行全面防护。

GSH-PX 和 SOD 是体内重要的抗氧化酶。GSH-PX 特异的催化还原型 GSH 对过氧化氢的还原反应。SOD 可以有效的清除超氧化物阴离子使组织细胞免受自由基损害^[9]。GSH-PX 和 SOD 的活性高低在一定程度上反映体内抗氧化能力的高低。MDA 含量可以反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出机体细胞受自由基攻击的程度^[7]。脂褐素是一种次级溶酶体,有作用底物,为成群不规则的小体,外有界膜包围,内含电子密度不等的物质及脂滴

和小泡,是一些未消化和不能消化的残渣以及脂类的混合物。在本实验中小鼠接受次声暴露后脑组织 MDA 含量明显增高,同时大脑皮质中出现较多脂褐素以及细胞器的损伤,这提示次声暴露后可以使组织细胞产生过量的自由基而损害细胞功能,同时 GSH-PX 及 SOD 的活性在一定时期内出现代偿性增加,这是机体提高抗氧化能力的代偿性反应。用加味补阳还五汤后小鼠的 GSH-PX 和 SOD 的活性有显著性增加,而 MDA 含量明显降低,这提示加味补阳还五汤可以通过增强体内 GSH-PX 和 SOD 的活性来加强体内清除自由基的能力,降低脂质过氧化物浓度,减少对生物膜等方面的损伤,从而减轻次声对机体作用后的不良反应。

在实验中还观察了不同用药剂量与过氧化物水平及大脑超微结构的关系。在过氧化物水平中,用药的剂量与 SOD 及 GSH-Px 活性呈正相关,而与 MDA 含量呈负相关,但它们之间比较无显著性意义;在大脑皮质的超微结构中,高、中剂量组之间的差别不太明显,但它们与低剂量组相比,损伤程度减轻的较明显,防护效果较好。

综上所述,加味补阳还五汤可以通过增强 SOD 及 GSH-PX 活力,降低 MDA 的含量来减轻暴露次声后小鼠大脑的损伤。它的防护效果与用药剂量有关。在本实验中,观察到高、中、低剂量组均有效果,结合过氧化物水平以及超微结构的变化,高、中剂量组的效果更为明显,且它们之间的差别不明显,因此推荐以治疗性用药的中剂量来防护次声所致的损伤。

参考文献

- [1] 陈景藻.次声的存在及其基本生物效应和研究意义[J].中华物理医学与康复杂志,1999,21:131—133.
- [2] 杜宝东,刘淑芳.次声对人体及动物影响的研究进展[J].国外医学·耳鼻喉科学分册,2001,25:99—102.
- [3] 叶琳,龚书明,陈耀明,等.次声暴露对大鼠大脑皮层脂质过氧化的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2002,24(6):360—362.
- [4] 叶琳,龚书明,黄晓峰,等.次声作用对鼠大脑皮层超微结构的影响[J].第四军医大学学报,2002,23:856—858.
- [5] 张健康,王岳,刘春燕.试论补阳还五汤的实际应用[J].中医药信息,2000,5:18—20.
- [6] 蒋惠娣,夏强,徐万红,等.杭白菊的心血管药理作用及其机制研究进展[J].世界科学技术—中药现代化,2002,4(2):31—33.
- [7] 赵克然,杨毅军,曹道俊,主编.氧自由基与临床[M].北京:中国医药科技出版社,2000.21—24.