研究报告

人参煎剂对实验红鲫经^{137}Cs 辐射后肝肾组织 HSP70 表达量的影响*

李登科[1] 彭赞平[2] 陈科洁[1] 吴端生[3] 王余德[4]

(1. 南华大学衡阳医学院,衡阳 421001)(2. 岳阳市妇幼保健院,岳阳 414000)(3. 南华大学实验动物学部,衡阳 421001)
(4.湖南师范大学生命科学学院省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室,长沙 410006)

摘要:目的 研究^{137}Cs 辐射对实验红鲫肝肾组织 HSP70 表达的影响,并探讨人参煎剂对实验红鲫的辐射防护效应。**方法** 将实验红鲫随机分为 8 组,即空白对照组、人参对照组、4.1Gy 辐照组、4.1Gy 人参预防组、4.1Gy 人参治疗组、8.2Gy 辐照组、8.2Gy 人参预防组及 8.2Gy 人参治疗组。分别以^{137}Cs 辐照处理,或辐照处理前以人参煎剂浸浴 7 d 做预防处理,或辐照处理后以人参煎剂浸浴 7 d 做治疗处理,然后分别采集实验红鲫肝脏和肾脏组织,利用 Western blot 方法检测各组 HSP70 表达量。**结果** 与空白对照组相比,经 4.1Gy 或 8.2Gy 辐照处理后的 HSP70 蛋白表达量均增加;与辐照组相比,经人参煎剂预防或治疗处理后的 HSP70 表达量均下降;单独的人参煎剂处理,对 HSP70 蛋白表达量无明显影响;比较人参煎剂做预防与治疗处理,发现两者之间的 HSP70 蛋白表达量差异不明显。**结论** ^{137}Cs 辐射能够引起实验红鲫肝脏和肾脏的 HSP70 表达量升高,再经人参煎剂预防或治疗处理后的 HSP70 表达量均下降。

关键词:人参煎剂;实验红鲫;^{137}Cs 辐射;热休克蛋白 70
中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)02-0016-06
DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2019.02.003

随着人类社会的发展,医学、农业和工业中的电离辐射日趋增加,人类受到来自各方面辐射的威胁,故加强辐射生物效应研究很有意义。辐射可直接诱导机体自由基 ROS 的产生,自由基与 DNA 相互作用可诱导遗传损伤[1],导致基因突变、致癌和细胞凋亡[2],影响蛋白质的表达,还可通过增加自由基的形成来启动细胞内一系列氧化应激反应[3]。而肝脏、肾脏作为机体高度代谢活跃的器官,易受到氧化应激损伤,导致其结构和功能受到损害。本实验室培育了标准化的实验红鲫[4],在探讨实验红鲫应用过程中,尝试过实验红鲫应用于辐射生物效应的研究[5]。本文旨在报道^{137}Cs 辐照对实验红鲫肝、肾组织 HSP70 表达的影响,并探讨人参煎剂对实验红鲫的辐射防护效应。

1 材料与方法

1.1 实验鱼及驯化

实验红鲫 C1HD 系,80 尾,雌雄各半,体长为(11.5±0.9)cm,体质量(64.2±1.6)g,均由南华大学实验动物学部提供。实验红鲫驯养于水族箱中,采用曝氯 2 d 的自来水,驯养 7 d 后用于实验,水温维持(18±2)℃,pH 值(6.48±0.3),溶氧量(6.28±0.5)mg/L。实验期间,按常规投喂维持饲料,并用

收稿日期:2018-10-29
* **基金项目:**"十二五"国家科技支撑计划项目(No.2015BAI09B05);湖南省重点研发计划项目(No.2015DK3004);湖南省研究生科研创新项目(No.CX2017B542)
作者简介:李登科与彭赞平为并列第一作者
李登科(1991—),女,硕士研究生,专业:生物学.E-mail:2608704215@qq.com
彭赞平(1990—),男,硕士,研究方向:生物学.E-mail:a646853204@163.com
王余德(1987—),男,博士后,研究方向:鱼类遗传育种. E-mail:461669793@qq.com
通信作者:吴端生(1956—),男,硕士,教授,研究方向:实验动物标准化.E-mail:wuduansheng@aliyun.com
王余德(1987—),男,博士后,研究方向:鱼类遗传育种. E-mail:461669793@qq.com

增氧泵持续充氧。

1.2　主要试剂及仪器

药用人参切片购于长白林宝公司;BCA 蛋白含量测定试剂盒及 ß-actin 一抗购于碧云天公司;HSP70 一抗购于 Abcam 公司;HSP70 二抗及 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购于康为生物试剂公司。

HXFS-IA 生物辐照仪:中国核工业集团;高速冷冻离心机:THERMO 公司;凝胶成像系统:Tanon 公司;半干/湿转膜仪:北京六一仪器厂。

1.3　方法

1.3.1　人参煎剂制备:称取 500 g 人参切片,将人参加双蒸水浸泡 30 min 后放于熬制罐中,加入蒸馏水,文火熬制三次,每次熬制 1 h,收集三次人参煎剂浓缩至 500 mL,制成 1 g/mL 人参煎剂后用过滤除菌法灭菌,4 ℃保存待用。人参煎剂给药方式为:加浓缩液至养殖水中稀释药液浓度至 0.1 g/L 后,投放实验鱼浸浴其中。

1.3.2　实验分组及处理:实验分组及处理,如表 1,分别解剖实验红鲫 3 尾,提取肝脏、肾脏用于 HSP70 表达量的测定。

表 1　实验分组及实验处理

Table 1　Group of Experiments and experimental treatment

组号	组别	实验鱼/尾	实验处理	观察(取样)时间/d
1	空白对照组	10	未经任何处理	分别于第 7 天、第 28 天解剖 3 尾,取肝脏、肾脏
2	人参对照组	10	以 0.1 g/L 人参煎剂连续浸浴	分别于浸浴后第 7 天、第 28 天解剖 3 尾,取肝脏、肾脏
3	4.1Gy 辐照组	10	以 4.1 Gy 剂量的 ^{137}Cs 一次性全身照射	分别于辐照后第 7 天、第 28 天解剖 3 尾,取肝脏、肾脏
4	4.1Gy 人参预防组	10	经 0.1 g/L 人参煎剂浸浴 7 d 后,以 ^{137}Cs 4.1 Gy 剂量一次性辐照	分别于辐照后第 7 天、第 28 天解剖 3 尾,取肝脏、肾脏
5	4.1Gy 人参治疗组	10	以 4.1 Gy 剂量一次性辐照后,再以 0.1 g/L 人参煎剂浸浴 7 d	分别于浸浴后第 7 天、第 28 天解剖 3 尾,取肝脏、肾脏
6	8.2Gy 辐射组	10	以 8.2 Gy 剂量的 ^{137}Cs 一次性全身照射	分别于辐照后第 7 天、第 28 天解剖 3 尾,取肝脏、肾脏
7	8.2Gy 人参预防组	10	经 0.1 g/L 人参煎剂浸浴 7 d 后,以 ^{137}Cs 8.2 Gy 剂量一次性辐照	分别于辐照后第 7 天、第 28 天解剖 3 尾,取肝脏、肾脏
8	8.2Gy 人参治疗组	10	以 8.2Gy 剂量一次性辐照后,再以 0.1 g/L 人参煎剂浸浴 7 d	分别于浸浴后第 7 天、第 28 天解剖 3 尾,取肝脏、肾脏

辐照处理组均用 HXFS-IA 生物辐照仪以不同剂量的^{137}Cs 一次性辐照。即:将实验红鲫个体放置在 HXFS-IA 生物辐照仪辐射室内自动旋转的金属载物筒内,鱼体距离辐射源头约 150 mm,通过调节辐照时间,辐照仪则自动设定辐射剂量率。

1.3.3　HSP70 蛋白表达量的测定:肝脏、肾脏组织经匀浆机研磨后,裂解离心提取总蛋白,采用 BCA 试剂盒检测总蛋白含量。用 10% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶 80 V,30 min;分离胶 110 V,80 min),湿转法进行蛋白转膜(300 mA,2h),用 5% 脱脂奶粉常温下封闭 2 h;加入一抗 HSP70(1∶1 000 稀释)以及 β-actin (1∶5 000 稀释),4 ℃孵育过夜,二抗(1∶3 000 稀释)室温下孵育 1 h,经洗涤、显影拍照后用软件 ImageJ 分析目的条带及内参 β-actin 条带的灰度值。

1.4　统计方法

采用 GraphPad Prism 5 软件对数据进行单因素 ANOVA 分析,以 $P<0.05$ 认为差异有显著性,并用 GraphPad Prism5 软件制图。

2　结果

2.1　实验红鲫肝脏 HSP70 蛋白表达量变化

实验红鲫经^{137}Cs 辐照及人参煎剂给药处理后,分别于第 14、28 天取样检测实验红鲫肝脏中 HSP70 的表达量,结果如图 1 和图 2 所示。由图可知,1 组和 2 组的 Hsp70 的蛋白表达量,无论第 14 天还是第 28 天,差异较小,提示单一的人参煎剂处理对肝脏 HSP70 表达无明显影响。经分析 1 组、3 组和 6 组的 Hsp70 表达量变化,发现^{137}Cs 辐射可引起 HSP70 表达量的升高,且随辐射剂量和辐射时间的增加而增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。分别比较分析 3 组、4 组、5 组和 6 组、7 组、8 组,发现 4 组、5 组的 HSP70 表达量比 3 组有较大幅度的下降,7 组、8 组的 HSP70 表达量比 6 组有较大幅度的下降,差异均显著($P<0.05$),表明将人参煎剂用于预防或治疗均

可抑制辐射所致实验红鲫肝脏 HSP70 表达的上升；分别比较 4 组、5 组和 7 组、8 组，发现人参煎剂用做预防或治疗处理时，两者之间的 HSP70 表达量均无明显差异。

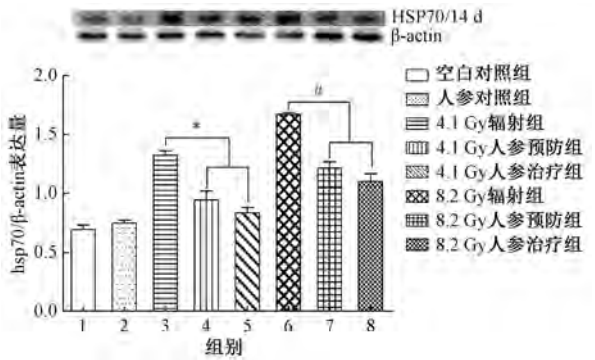

图 1 第 14 天实验红鲫肝脏 HSP70 表达量

注：与 4.1Gy 辐照组比较，$^{*}P<0.05$；与 8.2Gy 辐射组比较，$^{\#}P<0.05$

Fig.1 The expression of HSP70 in the laboratory red crucian carp liver at day 14

Note: Compared with 4.1Gy group, $^{*}P<0.05$; Compared with 8.2Gy group, $^{\#}P<0.05$

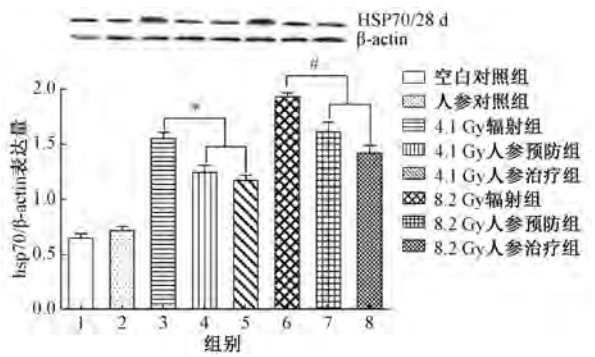

图 2 第 28 天实验红鲫肝脏 HSP70 表达量

注：与 4.1Gy 辐照组比较，$^{*}P<0.05$；与 8.2Gy 辐射组比较，$^{\#}P<0.05$

Fig.2 The expression of HSP70 in the laboratory red crucian carp liver at day 28

Note: Compared with 4.1Gy group, $^{*}P<0.05$; Compared with 8.2Gy group, $^{\#}P<0.05$

2.2 实验红鲫肾脏 HSP70 蛋白表达量变化

不同实验组的实验红鲫肾脏组织 HSP70 表达量，如图 3 和图 4 所示。由图 3 和图 4 经统计分析可知，在 ^{137}Cs 辐照后第 14 天，实验红鲫肾脏 HSP70 的表达量，辐照组的均显著高于对照组、预防组和治疗组的，差异有统计学意义（$P<0.05$）；在经 ^{137}Cs 辐照后第 28 天，4.1Gy 辐照组的实验红鲫肾脏 HSP70 表达量显著高于对照组的（$P<0.05$），但与预防组和治疗组的相比，差异均不明显（$P>0.05$）；8.2Gy 辐照组的实验红鲫肾脏 HSP70 表达量也显著高于对照组的和治疗组的（$P<0.05$），但与预防组的相比，无明显差异（$P>0.05$）。分别比较 3 组、4 组和 7 组、8 组，同样发现人参煎剂做预防或治疗处理，两者之间的 HSP70 表达量均无明显差异。

综合以上结果表明，^{137}Cs 辐照均能使实验红鲫肝脏和肾脏 HSP70 蛋白表达量升高，人参煎剂对正常实验红鲫肝脏和肾脏 HSP70 表达的影响不明显，但人参煎剂能够预防或抑制因 ^{137}Cs 辐照而引起的实验红鲫肝脏和肾脏 HSP70 蛋白表达量的升高。

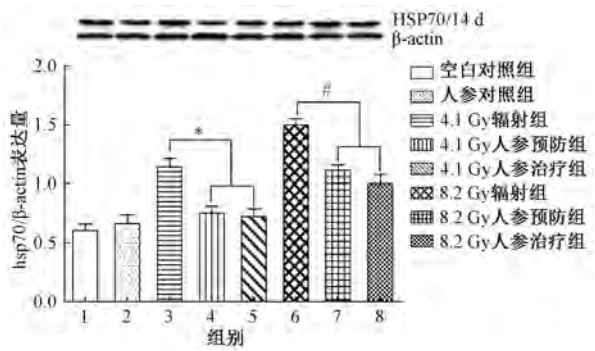

图 3 第 14 天实验红鲫肾脏 HSP70 表达量

注：与 4.1Gy 辐照组比较，$^{*}P<0.05$；与 8.2Gy 辐射组比较，$^{\#}P<0.05$

Fig.3 The expression of HSP70 in the laboratory red crucian carp kidney at day 14

Note: Compared with 4.1Gy group, $^{*}P<0.05$; Compared with 8.2Gy group, $^{\#}P<0.05$

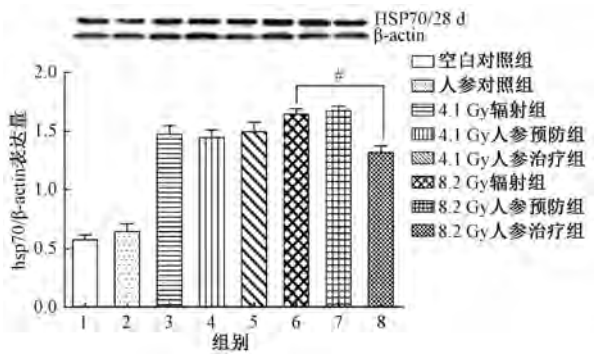

图 4 第 28 天实验红鲫肾脏 HSP70 表达量

注：与 8.2Gy 辐射组比较，$^{\#}P<0.05$

Fig.4 The expression of HSP70 in the laboratory red crucian carp kidney at day 28

Note: Compared with 8.2Gy group, $^{\#}P<0.05$

3　讨论

3.1　HSP70 及功能

热休克蛋白(heat shock protein,HSP)属于热应激反应性蛋白,是一种保护性蛋白。它在细胞中执行最基本的生理功能,以维持细胞的生存和功能,在应激的不利条件下,提高细胞的抵抗力,起到应激保护作用[6]。HSP 具有分子伴侣的作用,保护蛋白质免受损害或重新折叠有缺陷的多肽,以试图恢复其天然构象[7]。由于 HSP 家族不同成员的合成会响应各类不同应激源而表达,包括极端生理、环境和病理的损害,故有人提出热休克蛋白可作为环境监测的一般生物标志物[8]。在水产养殖中,鱼类经常遭受高温,水质差,细菌和病毒侵袭,造成机体与环境之间的平衡失调,引起鱼类发生应激反应[9]。HSP70 作为 HSP 家族中的成员之一,能在应激情况下迅速合成,并对应激产生保护耐受作用,在响应热休克,免疫保护,寄生虫感染等应激条件中发挥重要作用[10-11]。

3.2　^{137}Cs 辐射与 HSP70 表达

研究资料表明,生物暴露于辐射环境中可引起体内产生大量的自由基 ROS(O^{2-}、H_2O_2 及 $HO^{2\cdot}$、·OH等),而使细胞或组织产生氧化应激反应,进而引发 HSP70 的大量合成而使细胞减弱氧化应激伤害[12]。本实验结果也发现,实验红鲫经^{137}Cs 辐照后肝脏及肾脏中 HSP70 表达水平均有显著上升,且存在一定的量效关系。HSP70 可通过多种途径减少辐射对组织和器官的损伤,可直接抑制 ROS 产生依赖的 NADPH 氧化酶的活性,并能控制蛋白复合物的正确折叠、转运、组装和拆卸,维持细胞的正常生理功能[13-14]。有研究表明,通过用紫草红处理人角质形成细胞 HaCaT 细胞,使 HSP70 过表达,发现 HSP70 不仅能干扰半胱天冬酶活化以阻断细胞凋亡,还可通过抑制 NF-kB 信号传导减少促炎细胞因子(如 IL-1b)的产生,起到抗炎作用[15]。此外,HSP70 的辐射防护潜力还与其免疫调节能力有关[16]。这些都说明 HSP70 在调节细胞辐射损伤的修复过程中起关键作用。

3.3　人参抗辐射氧化损伤

人参对辐射所致机体损伤的保护作用已有文献报道[17]。本实验结果也表明,实验红鲫在经 4.1 Gy 和 8.2 Gy 辐照后,HSP70 的表达量增加,说明 HSP70 具有抗氧化应激的作用,这一实验结果与本课题组前期实验结果相吻合[5]。本实验结果也表明,经人参煎剂处理(预防或治疗)的实验红鲫肝、肾 HSP70 的表达量均显著下降,提示人参煎剂具有抗辐射氧化损伤的作用。已有的研究表明,人参煎剂抗辐射氧化损伤的机理可能与人参皂甙的药效有关。人参皂甙是人参发挥药效的主要活性物质,可通过清除机体产生的多余自由基发挥其抗氧化能力,具有抗炎,辐射防护,抗应激,免疫调节,抗疲劳和抗肿瘤等特性[18-19]。此外,人参可通过调节细胞凋亡信号通路来发挥对辐射致肝损伤的保护作用[20]。本实验中,在 8.2Gy^{137}Cs 辐照实验红鲫后第 28 天时辐照组肾脏 HSP70 表达量与预防组、治疗组的差异不明显,可能是人参药效减弱所致;而肝脏 HSP70 表达量均高于预防组和治疗组的 HSP70 表达量,可能是由于人参皂甙在实验红鲫体内的肝肠循环使肝脏仍有一定的药物浓度。

3.4　实验红鲫应用于辐射生物效应研究

实验红鲫 C1HD 系是南华大学吴端生教授研究团队近年来培育的中国本土的实验鱼类近交系,具有应用于毒理学研究和环境安全性评价的许多优点[21],在辐射生物效应方面曾做过实验,结果表明,实验红鲫经^{137}Cs 辐照 1.92Gy 剂量即可出现血液生理生化指标的改变,相当于人类的 0.5Gy 辐照剂量,表现为肝脏、肾脏、脑及心脏等不同程度的损伤,且存在着一定的“剂量-时间-效应”关系[5]。2016 年 12 月,湖南省质量技术监督局发布了《实验红鲫 C1HD 系遗传质量控制》地方标准[4]。通过本次实验,作者认为实验红鲫作为辐射生物效应研究的模式动物是可行的。

参 考 文 献

[1] 赵维超, 胡南, 龙鼎新,等.低剂量 γ 射线辐照对斑马鱼胚胎的发育和遗传毒性效应[J].原子能科学技术, 2018, **52**(9): 1695-1703.

[2] Roos W P and Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response, apoptosis[J]. Cancer Letters,2013,**332**(2):237-248.

[3] Zhou R, Si J, Zhang H,*et al.* The effects of x-ray radiation on the eye development of zebrafish[J]. Human & Experimental Toxicology, 2014,**33**(10):1040-1050.

[4] DB43/T 1191—2016,实验鱼类 实验红鲫 C1HD 系遗传质量控制[S].

[5] 彭赞平, 陶宏婷, 廖小立,等.实验红鲫对^{137}Cs 辐射的氧化应

激响应[J].实验动物科学, 2016,**33**(2):6-13.

[6] Valbonesi P, Franzellitti S, Bersani F, *et al.* Effects of the exposure to intermittent 1.8 GHz radio frequency electromagnetic fields on HSP70 expression and MAPK signaling pathways in PC12 cells[J]. International Journal of Radiation Biology,2014, **90**(5):382-391.

[7] Lennikov A, Kitaichi N, Kase S, *et al.* Induction of Heat Shock Protein 70 Ameliorates Ultraviolet-Induced Photokeratitis in Mice [J]. Int J Mol Sci,2013,**14**(1):2175-2189.

[8] Datkhile K D, Mukhopadhyaya R, Dongre T K, *et al.* Hsp70 expression in Chironomus ramosus exposed to gamma radiation [J].Int J Radiat Biol,2011,**87**(2):213-221.

[9] Cheng W, Li D, Wang Y, *et al.* Cloning of heat shock protein genes (hsp70, hsc70 and hsp90) and their expression in response to larval diapause and thermal stress in the wheat blossom midge, Sitodiplosis mosellana [J]. Journal of Insect Physiology, 2016, **95**:66-77.

[10] Leppä S, Sistonen L. Heat shock response—pathophysiological implications [J]. Trends in Molecular Medicine, 1997, **29**(1): 73-78.

[11] Song L, Li C, Xie Y, *et al.*Genome-wide identification of Hsp70 genes in channel catfish and their regulated expression after bacterial infection [J]. Fish Shellfish Immunol, 2016, **49**: 154-162.

[12] Fulgentini L, Passini V, Colombetti G, *et al.*UV Radiation and Visible Light Induce hsp70 Gene Expression in the Antarctic Psychrophilic Ciliate Euplotes focardii[J]. Microb Ecol, 2015, **70**(2):372-379.

[13] Park S H, Lee S J, Chung H Y, *et al.* Inducible heat-shock protein 70 is involved in the radioadaptive response [J]. Radiation Research,2000, **153**(3):318-326.

[14] Gil Lorenzo A F, Costantino V V, Appiolaza M L, *et al.* Heat Shock Protein 70 and CHIP Promote Nox4 Ubiquitination and Degradation within the Losartan Antioxidative Effect in Proximal Tubule Cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, **36** (6): 2183-2197.

[15] Yoshihisa Y, Hassan M A, Furusawa Y, *et al.* Alkannin, HSP70 inducer, protects against UVB-induced apoptosis in human keratinocytes[J].PloS One,2012,**7**(10):e47903.

[16] Multhoff G, Pockley A G, Schmid T E, *et al.*The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in radiation-induced immunomodulation[J]. Cancer Letters,2015,**368**(2): 179-184.

[17] 黄颖, 梁晓燕, 李骋进, 等.人参皂苷预处理对电离辐射下人造血干细胞的保护作用及其机制探讨[J].山东医药,2015, **55**(08):1-3.

[18] Li J, Liu D, Wu J, *et al.* Ginsenoside Rg1 attenuates ultraviolet B-induced glucocortisides resistance in keratinocytes via Nrf2/HDAC2 signalling[J].Scientific Reports,2016,**6**:39336.

[19] Li W, Yan M H, Liu Y, *et al.* Ginsenoside Rg5 Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Mice through Inhibition of Inflammation, Oxidative Stress, and Apoptosis[J]. Nutrients, 2016,**8**(9):1-17.

[20] Kim H G, Jang S S, Lee J S,*et al.* Panax ginseng Meyer prevents radiation-induced liver injury via modulation of oxidative stress and apoptosis[J]. J Ginseng Res, 2017,**41**(2):159-168.

[21] 吴端生.实验红鲫标准化研究与应用的现状及展望[J].实验动物科学,2016,**33**(3): 56-60.

(下转至第 26 页)