

归芪益元膏对重离子辐射诱发体内旁效应中 Cyt-C, Bax 及 Bcl-2 表达的影响

张朝宁, 李金田*, 刘永琦, 蔺兴遥, 李雪燕, 孙少伯, 李娟, 王萌, 陈继尧
(甘肃中医药大学, 兰州 730000)

[摘要] **目的:**探讨归芪益元膏对重离子辐射旁效应大鼠肺肾组织中细胞色素-C (Cyt-C) 及 Bax, Bcl-2 基因表达的影响。**方法:**Wistar 雄性大鼠随机分为 7 组, 归芪益元膏组预先灌胃归芪益元膏 2 周(灌胃剂量为 $3.28 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 正常组和辐射组灌胃等量生理盐水。2 周后辐射组和归芪益元膏组大鼠右肺予 $2\text{Gy}^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束单次照射, 正常组不予照射。照射后 6, 12, 24 h 处死各组大鼠, 蛋白免疫印迹 (Western blot), 免疫组化及实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测各组大鼠右肺、左肺、左肾组织中 Cyt-C, Bax, Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达。**结果:**右肺、左肺、左肾中 Cyt-C, Bax mRNA 表达在照射后 6, 12, 24 h 均明显上调, 而蛋白表达只在照射后 24 h 明显上调, 与正常组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 右肺中, Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达只在照射后 24 h 明显下调, 而左肺、左肾中照射后 6, 12, 24 h 均明显下调, 与正常组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。右肺、左肺、左肾中, 归芪益元膏组 Cyt-C, Bax mRNA 表达在照射后 6, 12, 24 h 较辐射各组明显下调, 归芪益元膏组 Cyt-C, Bax 蛋白表达在照射后 24 h 较辐射组明显下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 右肺中, 归芪益元膏组 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达在照射后 24 h 较辐射组明显上调, 左肺、左肾中, 归芪益元膏组 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达在照射后 6, 12, 24 h 较辐射各组明显上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论:**重离子辐射大鼠右肺后, 左、右肺和左肾组织中 Cyt-C, Bax, Bcl-2 基因表达异常, 归芪益元膏通过延缓 Bcl-2 表达的下调而抑制 Bax, Cyt-C 表达的上调, 从而起到预防肺肾细胞凋亡, 发挥其对重离子辐射诱发体内旁效应损伤的防护作用。

[关键词] 辐射旁效应; 重离子; 归芪益元膏; 细胞色素-C

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0121-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017140121

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170324.1410.020.html>

[网络出版时间] 2017-03-24 14:10

Influence of Guiqi Yiyuangao on Expression of Cytochrome-C and Bax, Bcl-2 During Damage Caused by Heavy Ion Radiation Induced Bystander Effect *in Vivo*

ZHANG Chao-ning, LI Jin-tian*, LIU Yong-qi, LIN Xing-yao, LI Xue-yan,
SUN Shao-bo, LI Juan, WANG Meng, CHEN Ji-yao
(Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the influence of Guiqi Yiyuangao on the genetic expression of Bax, Bcl-2 and cytochrome-C (Cyt-C) in lung and kidney of rats damaged by heavy ion radiation induced bystander effect. **Method:** The Wistar male rats were randomly divided seven groups, the group of Chinese medicine in advance was given Guiqi Yiyuangao by gavage for two weeks. Later the right lung of the rats of the radiation group and the group of Chinese medicine was radiated by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion once. At 6, 12, 24 h after radiation all groups of rats were executed. The amounts of protein and mRNA expression of Bax, Bcl-2 and Cyt-C in right lung, left lung and left kidney were examined with Western blot, immunohistochemistry and Real-time PCR. **Result:** Compared with

[收稿日期] 20170103(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460695)

[第一作者] 张朝宁, 博士, 主治医师, 从事中医药防治西北地区常见病的研究, Tel:13609356623, E-mail:442940743@qq.com

[通讯作者] *李金田, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治西北地区常见病的研究, Tel:17739881852, E-mail:1754648867@qq.com

the normal control group, the amount of mRNA expression of Bax and Cyt-C in the right lung, left lung and left kidney of the radiation group obviously increases at 6, 12, 24 h after radiation. While the amount of protein expression of Bax and Cyt-C of the radiation group obviously increases at 24 h after radiation. There is statistically significant difference ($P < 0.01$). The amount of protein and mRNA expression of Bcl-2 in the right lung of the radiation group obviously weakens at 24 h after radiation. But in the left lung and left kidney of the radiation group it obviously weakens at 6, 12, and 24 h after radiation. There is statistically significant difference ($P < 0.01$). Compared with the radiation group, the mRNA expression of Bax and Cyt-C of the Chinese medicine groups obviously down-regulates at 6, 12, 24 h after radiation. While the protein expression of the Chinese medicine group obviously down-regulates at 24 h after radiation. There is statistically significant difference ($P < 0.01$). Compared with the radiation group, the expression of mRNA and protein of Bcl-2 in the right lung of the Chinese medicine group obviously up-regulates at 24 h after radiation. Compared with the radiation group, the expression of mRNA and protein of Bcl-2 in the left lung and left kidney of the Chinese medicine group obviously up-regulates at 6, 12, 24 h after radiation. There is statistically significant difference ($P < 0.01$). **Conclusion:** It indicates that there are abnormal expressions of Bax, Bcl-2 and Cyt-C of lung and kidney in rats damaged by heavy ion radiation induced bystander effect. By delaying the down-regulation of the expression of Bcl-2, controlling the up-regulation of the expression of Bax and Cyt-C, Guiqi Yiyuangao can prevent the lung and kidney cell apoptosis and defend the damage caused by heavy ion radiation induced bystander effect *in vivo*.

[**Key words**] radiation induced bystander effect; heavy ion; Guiqi Yiyuangao; cytochrome-C

辐射旁效应是指受辐射细胞将损伤信号传递给周围或远处未受辐射细胞,诱导其产生相同或相似生物学反应的现象,主要包括基因表达异常、炎症反应、细胞增殖与凋亡、染色体畸变、DNA 损伤与修复等^[1-2]。自 1992 年 Nagasawa 等^[3]报道辐射旁效应现象以来,近 20 多年的研究已经在体内、体外实验中证实了辐射旁效应的客观存在,目前已知旁效应的发生机制有两种:第一种是受到辐射的细胞通过细胞间隙连接传递信号给与之接触的旁效应细胞;第二种是直接受辐射细胞分泌产生的信号因子如活性氧自由基(ROS),一氧化氮(NO),转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)等对未受照射细胞的调节作用^[4-8]。但辐射旁效应具体的基础机制仍然不清楚,目前的研究大多集中在体外细胞实验中,对体内旁效应的研究仍然需要加强,对旁效应的防护罕见报道。

作为肿瘤放射治疗过程中的毒副作用,旁效应的防护是辐射生物学和临床治癌领域的重要研究内容。近几年的研究表明,细胞色素-C(Cyt-C)在辐射旁效应信号响应中发挥了关键作用^[9-11],由此笔者推测,抑制 Cyt-C 表达是开发防护辐射损伤药物的新靶点。辐射旁效应在中医学中属于“毒邪”致病的范畴,毒邪性质酷烈,致病猛烈,直中脏腑,耗伤机体气血津液,使机体气阴两虚,血虚血瘀。归芪益元膏源自清·程国彭《医学心悟》之黄芪汤,加甘肃道地药材当归而成,全方具有益气滋阴、养血活血之

效。本研究探讨了归芪益元膏对重离子辐射诱发体内旁效应中 Cyt-C 及 Bax, Bcl-2 基因表达变化的影响,为中医药防护重离子辐射旁效应损伤提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 42 只,体重(200 ± 20)g,由甘肃中医药大学 SPF 级实验动物中心提供,合格证号 SCXK(甘)2015-0002。所有动物实验均经过甘肃中医药大学医学与实验动物伦理委员会审查批准(编号 2016-108)。

1.2 药物 归芪益元膏组成为黄芪 30 g,当归、熟地黄、麦冬、人参、枸杞子各 15 g,五味子 10 g,方中原药材由甘肃中医药大学甘肃省高校中藏药化学与质量控制实验室提供并由甘肃中医药大学魏舒畅教授进行质量鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》一部要求。

1.3 试剂

1.3.1 蛋白免疫印迹(Western blot) Bax, Bcl-2 polyclonal Antibody(美国 Immuno Way 公司,批号分别为 Q07812, P10415), Cyt-C Western blot Antibody(英国 Abcam 公司,批号 ab53056); 高效 RIPA 组织/细胞裂解液, BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 4 × 蛋白上样缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 P0011, PC0021, P1018); 二抗辣根酶标记山羊抗兔 IgG, 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金

桥生物科技有限公司,批号分别为 ZB2301, ZB2305)。

1.3.2 免疫组化 多聚甲醛(北京索莱宝科技有限公司,批号 20160205);DAB 试剂盒、抗体稀释液、免疫组化 SP 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 ZB2307, ZB3501, ZB3505);鼠抗 Bcl-2 Monoclonal Antibody,兔抗 Bax Polyclonal Antibody(美国 Immuno Way 公司,批号分别为 YM3041, YT0459);Rabbit Anti-Cytochrome C(美国博奥森生物技术有限公司,批号 bs-0013R)。

1.3.3 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR) Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),DNA 模板和 SYBR Fast RT-PCR Mix(大连宝生物公司)。引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成,并在 Genbank 上核对证实。见表 1。

表 1 目的基因及内参引物序列

Table 1 Primer sequence of every target gene and reference gene

基因名称	引物序列	扩增产物长度/bp
β-actin	上游 5'-TTGTAACCACCTGGGACTAGATGG-3'	20
	下游 5'-AACACAATCTCCACGATAGCAG-3'	20
Bax	上游 5'-CAGTTGAAGTTGCCATCAGC-3'	18
	下游 5'-CAGTTGAAGTTGCCATCAGC-3'	20
Bcl-2	上游 5'-GACTGAGTACCTGAACCGGCATC-3'	23
	下游 5'-CTGAGCAGCGTCTTCAGAGACA-3'	22
Cyt-C	上游 5'-TGATCCTTTGTGTTGACCAG-3'	23
	下游 5'-GACCATGGAGGTTTGGTCCACT-3'	22

1.4 仪器 D37520 型低温高速离心机(德国 Kendro 公司);PRO200 型组织匀浆器(美国 Bio-Gen 公司);041BR 109973 型电泳仪,C1000 型荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司);Q5000 型紫外分光光度计(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);BX-51 型普通光学显微镜(日本 Olympus 公司);M-2016 型石蜡切片机,TEC-VEM-J2 型石蜡包埋机,VIP-5JR-J2 型自动组织脱水机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 分组及饲养 采用随机数字表法将大鼠分为正常组、辐射 6 h 组、辐射 12 h 组、辐射 24 h 组、中药 6 h 组、中药 12 h 组、中药 24 h 组,每组 6 只。在甘肃中医药大学 SPF 级实验动物中心饲养[实验动物设施使用许可证号为 SYXK(甘)2015-0005],动物饲养室环境为温度 20 ~ 25 ℃,相对湿度 40% ~ 70%。

2.2 药物制备 按处方剂量称取完药材后,以水作溶剂,提取 2 次,第 1 次用水量为总药材量的 8 倍,

第 2 次为总药材量的 6 倍,每次提取 2 h。合并药液,滤布过滤,滤液减压浓缩,浓缩液加上制剂辅料(防腐剂、增稠剂等),制成膏剂,膏剂质量浓度为 1.64 g·mL⁻¹。药品制备由甘肃中医药大学中药制药实验室完成。

2.3 给药方法 中药各组予归芪益元膏灌胃 2 周(灌胃剂量按照临床用量人与大鼠体表面积折算法,大鼠 1 d 的给药剂量约为人的 10 倍,3.28 g·kg⁻¹·d⁻¹),正常组和辐射各组灌胃等量生理盐水。

2.4 动物照射 照射前将大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(按 3 mL·kg⁻¹ 计算注射剂量)麻醉,辐射各组和中药各组大鼠右肺予 2Gy¹²C⁶⁺ 离子束单次照射,铅皮屏蔽身体其余部位,正常组给予相同方式麻醉,但不予照射。

重离子照射在中国科学院近代物理研究所兰州重离子加速器研究装置的浅层肿瘤治疗终端上进行,束流为 2Cy¹²C⁶⁺ 离子束。坪区照射,能量为 165 MeV,LET 为 20 keV·μm⁻¹,吸收剂量率为 2 Gy·min⁻¹,用空气电离室监测剂量,照射剂量为 2 Gy。

2.5 取材及标本制作 照射后 6,12,24 h 处死各组大鼠,取出左肺、右肺、左肾,冰生理盐水冲洗,剪切分别放入相应的冻存管,-80 ℃ 冰箱冻存。行免疫组化检测的左肺、右肺、左肾分别用 4% 多聚甲醛固定。

2.6 指标检测方法

2.6.1 Western blot 检测肺肾组织中 Cyt-C, Bax, Bcl-2 蛋白水平 取冷冻的肺、肾组织,加 RIPA 裂解液,在冰上研磨,匀浆,12 000 r·min⁻¹,4 ℃ 离心 15 min,取上清,聚氧基丙烯酸正丁酯(BCA)法测蛋白浓度;每 30 μL 蛋白样品加入 10 μL 上样缓冲液,混匀,100 ℃ 水浴加热 8 min,冷却到室温。

12% 凝胶进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,浓缩胶 30 min,80 V,分离胶 90 min,120 V。随后进行转膜,封闭,孵育一抗(1:500 稀释)4 ℃ 过夜,孵育二抗(1:1 000 稀释),每次用 TBST 洗 3 次,每次 10 min;将发光液按 1:1 混匀后滴加在膜上,显色 1 min 后曝光。运用 Quantity One 软件进行光密度定量分析,以各目的蛋白条带灰度值与相应内参的条带灰度值比来计算各目的蛋白相对表达量。

2.6.2 免疫组化检测肺肾组织中 Cyt-C, Bax, Bcl-2 蛋白水平 常规石蜡包埋各组大鼠肺肾组织,切片厚度 4 μm,经脱蜡、水化、修复后,封闭加抗体,显色、脱水、封片后,用 Olympus 光学显微镜进行读片

拍照,用 BI-2000 免疫组化分析软件计算图片平均灰度值,并进行分析统计(用平均灰度值来表示蛋白相对表达量,灰度值越大,蛋白表达量越低)。

2.6.3 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肺肾组织中 Cyt-C, Bax, Bcl-2 mRNA 表达

按照 Trizol 说明书从肺、肾组织中提取总 RNA,紫外分光光度计测定各组肺、肾组织 RNA 的吸光度 A_{260} 和 A_{280} ,取 RNA 2 μg 加入逆转录体系,逆转录条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。以 cDNA 为模板,在 PCR 仪上进行 Real-time PCR。反应体系为 SYBR Fast Real-time PCR Mix (2 \times) 12.5 μL ,引物 2 μL , Cdna 2 μL , 并加灭菌蒸馏水至 25 μL 。反应条件为变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 循环 40 次。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对定量分析。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,服从正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并用单因素方差分析进行处理,两两比较时采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 归芪益元膏对辐射大鼠肺肾组织中 Cyt-C, Bax, Bcl-2 mRNA 表达的影响 右肺中,辐射组 Cyt-C, Bax mRNA 表达量在照射后 6, 12, 24 h 均明显升高,与正常组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 归芪益元膏组 Cyt-C mRNA 表达在照射后 6, 24 h 明显下调,与同时时间点的辐射组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$), 归芪益元膏组 Bax mRNA 表达量在照射后 12, 24 h 明显低于同时时间点的辐射组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。辐射组 Bcl-2

mRNA 表达量在照射后 24 h 明显降低,与正常组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 归芪益元膏组 Bcl-2 mRNA 表达量在照射后 24 h 明显高于同时时间点的辐射组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

左肺中,辐射组 Cyt-C mRNA 表达量在照射后 6, 12, 24 h 均明显升高,与正常组和同时时间点的归芪益元膏组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。辐射组 Bax mRNA 表达量在照射后 6, 12, 24 h 均明显升高,与正常组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 归芪益元膏组 Bax mRNA 表达量在照射后 12, 24 h 明显低于同时时间点的辐射组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。辐射组 Bcl-2 mRNA 表达量在照射后 6, 12, 24 h 均明显降低,与正常组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 归芪益元膏组 Bcl-2 mRNA 表达量在照射后 6, 12, 24 h 均明显升高,与同时时间点辐射组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

左肾中,辐射各组 Cyt-C, Bax mRNA 表达均上调,与正常组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 归芪益元膏组 Cyt-C 表达在照射后 12, 24 h 明显下调,与同时时间点辐射组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 归芪益元膏组 Bax mRNA 表达在照射后 24 h 明显下调,与同时时间点辐射组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。辐射组 Bcl-2 mRNA 表达量在照射后 6, 12, 24 h 均明显降低,与正常组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 归芪益元膏组 Bcl-2 mRNA 表达量在照射后 6, 12, 24 h 均明显升高,与同时时间点辐射组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 归芪益元膏对辐射大鼠肺肾组织中 Cyt-C, Bax, Bcl-2 mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	时间/h	Cyt-C mRNA/GAPDH			Bax mRNA/GAPDH			Bcl-2 mRNA/GAPDH		
		右肺	左肺	左肾	右肺	左肺	左肾	右肺	左肺	左肾
正常	-	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.02	1.03 \pm 0.31	1.00 \pm 0.04	1.01 \pm 0.20	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.01	0.98 \pm 0.01
辐射	6	9.76 \pm 0.28 ¹⁾	4.39 \pm 0.19 ¹⁾	4.02 \pm 0.17 ¹⁾	10.56 \pm 0.20 ¹⁾	2.03 \pm 0.12 ¹⁾	1.79 \pm 0.09 ¹⁾	0.80 \pm 0.13	0.71 \pm 0.05 ¹⁾	0.81 \pm 0.04 ¹⁾
	12	14.34 \pm 0.51 ¹⁾	5.42 \pm 0.19 ¹⁾	4.69 \pm 0.09 ¹⁾	16.13 \pm 1.73 ¹⁾	4.19 \pm 0.36 ¹⁾	2.52 \pm 0.07 ¹⁾	0.83 \pm 0.04	0.73 \pm 0.02 ¹⁾	0.79 \pm 0.03 ¹⁾
	24	16.00 \pm 0.40 ¹⁾	5.33 \pm 0.26 ¹⁾	5.72 \pm 0.16 ¹⁾	27.16 \pm 0.71 ¹⁾	4.73 \pm 0.66 ¹⁾	3.73 \pm 0.07 ¹⁾	0.53 \pm 0.04 ¹⁾	0.75 \pm 0.05 ¹⁾	0.72 \pm 0.03 ¹⁾
	归芪益元膏	6	9.07 \pm 0.25 ²⁾	3.03 \pm 0.11 ³⁾	3.95 \pm 0.11	5.82 \pm 0.16 ³⁾	2.07 \pm 0.17	1.88 \pm 0.08	0.83 \pm 0.04	0.89 \pm 0.03 ³⁾
	12	13.24 \pm 0.38	4.68 \pm 0.24 ³⁾	3.98 \pm 0.12 ³⁾	10.58 \pm 0.15	3.14 \pm 0.13 ³⁾	2.52 \pm 0.08	0.83 \pm 0.14	0.89 \pm 0.03 ³⁾	0.90 \pm 0.02 ³⁾
	24	14.63 \pm 0.41 ³⁾	3.86 \pm 0.10 ³⁾	3.95 \pm 0.08 ³⁾	8.42 \pm 0.24 ³⁾	3.74 \pm 0.16 ³⁾	2.30 \pm 0.18 ³⁾	0.85 \pm 0.14 ³⁾	0.91 \pm 0.05 ³⁾	0.91 \pm 0.02 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与同时时间点的辐射各组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.2 归芪益元膏对辐射大鼠肺肾组织中 Cyt-C, Bax, Bcl-2 蛋白表达结果的影响 右肺、左肺、左肾组织中,辐射组 Cyt-C, Bax, Bcl-2 蛋白表达在照射后 24 h 明显上调,与正常组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 归芪益元膏组 Cyt-C, Bax, Bcl-2 蛋白表

达在照射后 24 h 明显下调,与辐射 24 h 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 3, 图 1 ~ 3。

正常肺组织中 Cyt-C 几乎无表达,照射后 24 h 在支气管黏膜周围表达增强,归芪益元膏 24 h 组阳性表达减弱。正常肾组织中 Cyt-C 几乎无表达,

表 3 归芪益元膏对辐射大鼠肺肾组织中 Cyt-C, Bax, Bcl-2 平均灰度值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Influence of Guiqi Yiyuangao on protein expression of Cyt-C, Bax, Bcl-2 in lung and kidney tissue of radiated rats

组别	时间/h	Cyt-C			Bax			Bcl-2		
		右肺	左肺	左肾	右肺	左肺	左肾	右肺	左肺	左肾
正常	-	92.42 ± 4.70	91.01 ± 1.41	92.80 ± 2.51	85.99 ± 1.53	85.13 ± 4.83	83.05 ± 0.57	86.22 ± 3.07	88.15 ± 0.35	84.72 ± 5.59
辐射	6	89.78 ± 4.32	87.74 ± 2.08	86.35 ± 3.45	81.67 ± 3.59	76.94 ± 4.02	78.95 ± 1.86	91.33 ± 0.51	95.00 ± 1.25 ¹⁾	95.21 ± 3.11 ¹⁾
	12	87.05 ± 3.00	86.97 ± 2.16	87.74 ± 4.76	81.95 ± 4.78	75.95 ± 4.92	78.71 ± 1.48	91.09 ± 2.96	96.33 ± 0.51 ¹⁾	94.62 ± 2.97 ¹⁾
	24	84.50 ± 5.29 ¹⁾	84.19 ± 2.91 ¹⁾	83.43 ± 3.67 ¹⁾	78.35 ± 3.30 ¹⁾	67.67 ± 3.64 ¹⁾	76.86 ± 1.59 ¹⁾	95.32 ± 4.31 ¹⁾	97.83 ± 0.63 ¹⁾	97.44 ± 1.94 ¹⁾
归芪益元膏	6	91.47 ± 1.70	88.68 ± 3.03	89.23 ± 3.21	82.79 ± 2.95	77.62 ± 2.92	78.83 ± 6.36	88.20 ± 6.25	86.90 ± 2.46 ³⁾	83.67 ± 0.71 ³⁾
	12	90.16 ± 3.58	88.43 ± 3.56	87.17 ± 2.34	82.66 ± 1.63	77.21 ± 8.19	79.72 ± 2.52	89.75 ± 3.69	85.02 ± 2.28 ³⁾	87.76 ± 0.27 ³⁾
	24	93.35 ± 2.09 ³⁾	91.52 ± 1.51 ³⁾	92.42 ± 4.63 ³⁾	85.34 ± 2.90 ³⁾	82.58 ± 6.71 ³⁾	83.15 ± 3.60 ³⁾	84.30 ± 2.22 ³⁾	84.39 ± 3.43 ³⁾	84.79 ± 2.60 ³⁾

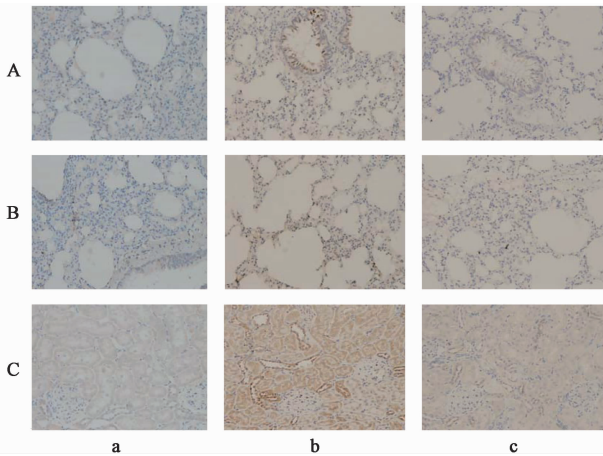


图 1 归芪益元膏对辐射大鼠肺肾组织中 Cyt-C 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×40)

Fig. 1 Influence of Guiqi Yiyuangao on protein expression of Cyt-C in lung and kidney tissue of radiated rats (IHC, ×40)

Fig. 1 Influence of Guiqi Yiyuangao on protein expression of Cyt-C in lung and kidney tissue of radiated rats (IHC, ×40)

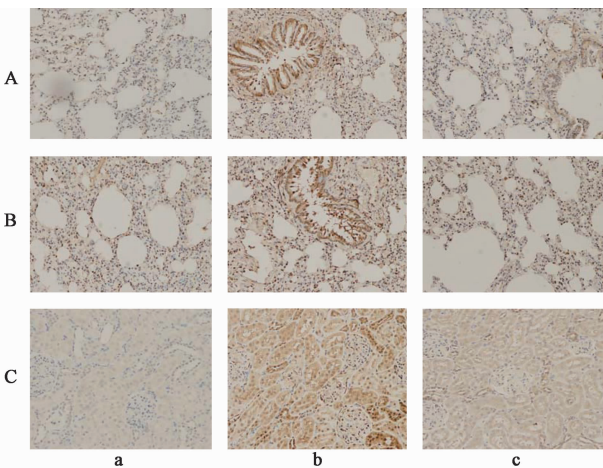


图 2 归芪益元膏对辐射大鼠肺肾组织中 Bax 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×40)

Fig. 2 Influence of Guiqi Yiyuangao on protein expression of Bax in lung and kidney tissue of radiated rats (IHC, ×40)

照射后 24 h 在肾小管中表达增强, 归芪益元膏 24 h

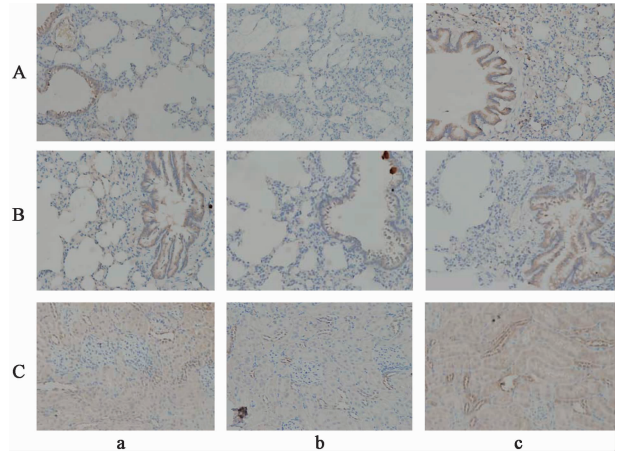


图 3 归芪益元膏对辐射大鼠肺肾组织中 Bcl-2 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×40)

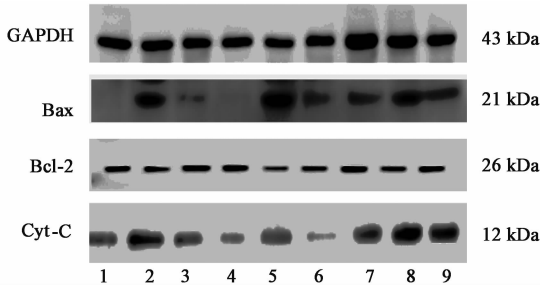
Fig. 3 Influence of Guiqi Yiyuangao on protein expression of Bcl-2 in lung and kidney tissue of radiated rats (IHC, ×40)

组阳性表达减弱。

正常肺组织中, Bax 在支气管黏膜及肺泡上皮细胞中均有少量表达, 照射后 24 h 表达明显增强, 归芪益元膏 24 h 组阳性表达降低。正常肾组织中, Bax 几乎无表达, 照射后 24 h 在肾小管和肾小球中表达增强, 归芪益元膏 24 h 组阳性表达降低。

正常肺组织中, Bcl-2 在支气管黏膜及肺泡上皮细胞中均有少量表达, 照射后 24 h 表达明显减弱, 归芪益元膏 24 h 组阳性表达增加。正常肾组织中, Bcl-2 在肾小管和肾小球中均有轻度表达, 照射后 24 h 表达减弱, 归芪益元膏 24 h 组阳性表达增加。

3.3 归芪益元膏对辐射大鼠肺肾组织中 Cyt-C, Bax, Bcl-2 蛋白相对表达的影响 右肺、左肺、左肾中, 辐射 24 h 组 Cyt-C, Bax 蛋白表达明显上调, Bcl-2 蛋白表达明显下调, 与正常组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与辐射 24 h 组比较, 归芪益元膏 24 h 组 Cyt-C, Bax 蛋白表达明显下调, Bcl-2 表达明显上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4, 表 4。



1. 左肺正常组; 2. 左肺辐射 24 h 组; 3. 左肺中药 24 h 组; 4. 右肺正常组; 5. 右肺辐射 24 h 组; 6. 右肺中药 24 h 组; 7. 左肾正常组; 8. 左肾辐射 24 h 组; 9. 左肾中药 24 h 组

图 4 归芪益元膏对辐射大鼠肺肾组织中 Bax, Bcl-2, Cyt-C 蛋白水平的影响

Fig. 4 Influence of Guiqi Yiyuanguo on expression of protein of Cyt-C, Bax, Bcl-2 in lung and kidney tissue of radiated rats

表 4 归芪益元膏对辐射大鼠肺肾组织中 Cyt-C, Bax, Bcl-2 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Influence of Guiqi Yiyuanguo on relative expression of protein of Cyt-C, Bax, Bcl-2 in lung and kidney tissue of radiated rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	Cyt-C/GAPDH			Bax/GAPDH			Bcl-2/GAPDH		
	右肺	左肺	左肾	右肺	左肺	左肾	右肺	左肺	左肾
正常	1.000 ± 0.032	1.000 ± 0.078	1.000 ± 0.027	1.000 ± 0.054	0.999 ± 0.421	1.000 ± 0.021	1.000 ± 0.046	1.000 ± 0.018	1.000 ± 0.024
辐射 24 h	5.116 ± 0.158 ¹⁾	2.616 ± 0.149 ¹⁾	3.334 ± 0.047 ¹⁾	33.782 ± 2.297 ¹⁾	97.536 ± 2.993 ¹⁾	2.260 ± 0.055 ¹⁾	0.470 ± 0.009 ¹⁾	0.548 ± 0.015 ¹⁾	0.895 ± 0.04 ¹⁾
中药 24 h	0.349 ± 0.002 ²⁾	1.162 ± 0.019 ²⁾	2.093 ± 0.056 ²⁾	11.074 ± 0.411 ²⁾	2.260 ± 0.055 ²⁾	1.471 ± 0.021 ²⁾	0.718 ± 0.006 ²⁾	0.748 ± 0.003 ²⁾	1.414 ± 0.035

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与辐射 24 h 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

递性指辐射损伤信号从直接受照细胞传递至未直接受照细胞,使未直接受照细胞产生损伤反应,毒邪的传舍性是指毒邪在机体从原发部位播散到其他部位,在某个部位停留而产生损伤。故中医学认为辐射旁效应损伤的病因为“毒邪”,毒邪直中脏腑、败坏形体、耗伤机体气血阴津,使机体气血两虚,阴津不足,气虚无力推动血行,瘀血内阻,故其病机以气血两虚、阴津不足为主,兼瘀血阻滞^[17-19]。

元气是人体生命活动的原动力,根于命门,由肾所藏之先天之精化生,须得后天脾胃化生的水谷之精的滋养补充。遵循中医学“治未病”的预防思想,以大补元气、益精填髓、益气养血为切入点,通过“培元固本”以提高机体防御抗邪能力,最终达到防毒、抗毒之目的。归芪益元膏切合辐射旁效应损伤的中医病机,方中重用黄芪以补中益气,壮后天之本,使元气充实,配伍当归补气以生血、养血活血,配伍人参大补元气,生津养血;熟地黄补血滋阴、益精填髓,枸杞子补肾滋阴,麦冬清热生津、养阴润肺,五味子益气生津、滋补肺肾,诸药合用共凑补中益气、养血活血、益精填髓之效,使得“正气存内,邪不可干”,起到防护辐射损伤的作用。

4 讨论

越来越多的研究已经证实辐射诱发的体内旁效应不仅在相邻组织产生,还可发生在远源器官,这些体内旁效应包括基因表达改变, DNA 损伤, 细胞增殖和凋亡, 表观遗传学改变等^[12-16]。重离子虽然被誉为 21 世纪最理想的肿瘤放疗用射线, 但在放疗中也会损伤肿瘤周围或远处的健康组织, 产生辐射旁效应。

中医学中虽无辐射及辐射旁效应损伤的相关记载, 但射线的致病特点如高能、快速、穿透力强、杀伤力大等与中医“毒邪”的致病特点(如致病猛烈、发病急骤、传变迅速、耗伤机体气血阴津等)极为相似, 尤其辐射旁效应损伤信号具有“传递性”的特点与中医毒邪的“传舍性”更具有惊人的相似之处, 传

Bcl-2 家族是细胞凋亡重要的调节基因, Bax 是 Bcl-2 家族中最早发现的促凋亡蛋白, Bax 是 Cyt-C 的上游调控机制, 当辐射等外源性刺激诱导凋亡发生时, Bax 被激活, 构象发生改变, BH3 结构域暴露, 并从胞浆中转移至线粒体, Bax 过度表达可以引起线粒体释放大量的 Cyt-C, 进而激活 Caspase 级联反应, 诱导细胞凋亡^[20]。Bcl-2 是抑凋亡蛋白, 可以抑制 Cyt-C 释放, 使 Cyt-C 无法达到激活下游 Caspase 的表达阈值, 从而保护细胞不发生凋亡^[21]。Bcl-2 还可以中和 Bax 的表达, 使 Bax 表达量减少, 抑制细胞凋亡, 反之, Bax 表达量增加, Bcl-2 表达量降低时, 促进细胞凋亡^[22-23]。

实验结果显示, 2Gy¹²C⁶⁺ 离子照射大鼠右肺部后, 右肺、左肺、左肾中 Cyt-C, Bax mRNA 表达在照射后 6, 12, 24 h 均明显升高, 蛋白表达在照射后 24 h 明显升高; 右肺中, Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达只在照射后 24 h 明显上调, 而左肺、左肾中照射后 6, 12, 24 h 均明显上调。表明未直接照射的左肺和左肾出现了与直接照射组织右肺类似甚至更早的凋亡基因异常表达的现象, 未受照射组织也对辐射产生了响应, 辐射诱导了体内旁效应的产生。Cyt-C, Bax,

Bcl-2 mRNA 表达在照射后 6 h 即出现明显变化,但蛋白表达在照射后 24 h 最明显,分析认为蛋白的表达滞后于 mRNA 的表达,mRNA 表达量达到峰值时蛋白表达量还在增加之中,但在照射后 24 h mRNA 与蛋白表达量达到了一致,均明显高于正常组。

预先灌胃归芪益元膏后,大鼠右肺、左肺、左肾中 Cyt-C、Bax 蛋白及 mRNA 表达较同时时间点的辐射各组明显下调,Bcl-2 明显上调,表明预先灌胃归芪益元膏可以抑制 Cyt-C、Bax 蛋白及 mRNA 表达量的升高,延缓 Bcl-2 表达量的下降。分析认为归芪益元膏通过延缓 Bcl-2 表达的下调而抑制 Bax、Cyt-C 表达的上调,从而起到预防肺、肾细胞凋亡的作用。

综上所述,重离子辐射大鼠右肺部后,左、右肺和左肾组织中存在 Cyt-C、Bax、Bcl-2 基因表达异常,归芪益元膏通过延缓 Bcl-2 表达的下调而抑制 Bax、Cyt-C 表达的上调,从而起到预防肺肾细胞凋亡,发挥其对重离子辐射诱发体内旁效应损伤的防护作用。

[参考文献]

[1] TONG L, YU K N, BAO L, et al. Low concentration of exogenous carbon monoxide protects mammalian cells against proliferation induced by radiation induced bystander effect[J]. *Mutat Res*, 2014, 759(2):9-15.

[2] Najafi M, Fardid R, Hadadi G, et al. The mechanisms of radiation-induced bystander effect[J]. *J Biomed Phys Eng*, 2014, 15(4):163-172.

[3] Nagasawa H, Little J B. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles [J]. *Cancer Res*, 1992, 52(6):6394-6396.

[4] Campa A, Balduzzi M, Dini V, et al. The complex interactions between radiation induced non-targeted effects and cancer [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(1):126-136.

[5] HE M, DONG C, Konishi T, et al. Differential effects of p53 on bystander phenotypes induced by gamma ray and high LET heavy ion radiation [J]. *Life Sci Space Res*, 2014, 312(1):53-59.

[6] Azzam E I, de Toledo S M, Little J B. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to non-irradiated cells[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2001, 98(2):473-478.

[7] Azzam E I, de Toledo S M, Little J B. Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect [J]. *Oncogene*, 2003, 22(45):7050-7057.

[8] WANG H, YU K N, HOU J, et al. Radiation-induced bystander effect: early process and rapid assessment [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(1):137-144.

[9] YANG G, WU L, CHEN S, et al. Mitochondrial

dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs radiation-induced bystander effect [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(12):1912-1919.

[10] HE M, ZHAO M, SHEN B, et al. Radiation induced intercellular signaling mediated by cytochrome-c via a p53-dependent pathway in hepatoma cells [J]. *Oncogene*, 2011, 30(16):1947-1954.

[11] HE M, YE S, REN R, et al. Cytochrome-c mediated a bystander response dependent on inducible nitric oxide synthase in irradiated hepatoma cells [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(5):889-895.

[12] Khan M A, Van Dyk J, Yeung I W, et al. Partial volume rat lung irradiation: assessment of early DNA damage in different lung regions and effect of radical scavengers [J]. *Radiother Oncol*, 2003, 66(1):95-101.

[13] Koturbash I, Rugo R E, Hendricks C A, et al. Radiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2006, 25(31):4267-4273.

[14] Koturbash I, Boyko A, Rodriguez-Juarez R, et al. Role of epigenetic effectors in maintenance of the long-term persistent bystander effect in spleen *in vivo* [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(8):1831-1838.

[15] Mancuso M, Pasquali E, Leonardi S. Oncogenic bystander radiation effects in patched heterozygous mouse cerebellum [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2008, 105(34):12445-12453.

[16] 雷润宏,赵拓,吴国松.脑局部重离子辐射诱导大鼠外周旁效应研究[J]. *生命科学仪器*, 2015, 13(12):25-32.

[17] 赵智强. 略论毒邪的致病特点、界定与治疗[J]. *南京中医药大学学报*, 2003, 19(2):73-76.

[18] 第五永长,李妮娇.论中医“毒”概念的演变及其阴阳属性[J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(5):654-656.

[19] 张蓉,骆斌,李峰.从毒邪致病论电离辐射损伤的中医病机[J]. *北京中医药大学学报*, 2007, 30(9):595-597.

[20] Gross A. Bcl-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(8):1243-1249.

[21] Bindu I. S, Mudasir A, K. Rapid eye movement sleep deprivation induces neuronal apoptosis by noradrenaline acting on alpha1 adrenoceptor and by triggering mitochondrial intrinsic pathway [J]. *Front Neurol*, 2016, 156(7):25-32.

[22] Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 351(1/2):41-46.

[23] 富苏,韩经丹,周杰,等. 通络化痰胶囊对脑缺血损伤大鼠神经细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(8):247-250.

[责任编辑 邹晓翠]