

硫磺熏蒸山药对大鼠肝组织抗氧化能力及 ATP 酶活性的影响

郭婕^{1*}, 赵海霞², 颜燕¹, 程东¹, 谢玮¹, 姚文环¹

(1. 山东省疾病预防控制中心, 济南 250014; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

[摘要] 目的: 观察硫磺熏蒸山药对大鼠肝组织内抗氧化能力, $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+}$ -ATPase, $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase 活性的变化。方法: 将实验动物随机分为 4 组, 其中 3 组分别给予未熏蒸山药、市售品山药、硫磺熏蒸山药水提浓缩液 ($5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 掺入基础饲料, $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$; 正常对照组给予基础饲料, 测定 14 周后大鼠肝组织中 MDA 含量、总超氧化物歧化酶 (SOD) 活力、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力, $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+}$ -ATPase, $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase 活性; 同时观察肝组织结构的病理变化。结果: 经口给予受试物 14 周, 两性动物未熏蒸山药组、市售山药组肝组织中 GSH-Px 活力与对照组比较均显著增加, 均有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 市售山药组雌性大鼠肝组织内 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase 活性比对照组高, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论: 长期服用经大量硫磺熏制后的山药可能影响肝组织的氧化应激系统和 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase 过程。

[关键词] 山药; 硫磺熏蒸; 肝脏; 抗氧化; ATP 酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0150-04

Effect of Sulfur Fumigated *Dioscorea opposita* on Oxidative Stress and ATP Enzyme in Liver of Rats

GUO Jie^{1*}, ZHAO Hai-xia², YAN Yan¹, CHENG Dong¹, XIE Wei¹, YAO Wen-huan¹

(1. Shandong Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250014, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Chinese Medicine, Jinan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of Sulfur fumigated *Dioscorea opposita* on antioxidation, $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+}$ -ATPase, $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase in liver of rats. **Method:** Wistar rats were divided randomly into 4 groups, one control and three experimental groups administrated diets mixed with concentrated extractions from unfumigated, commercial and sulfur fumigated *D. opposita* respectively. The activities of $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+}$ -ATPase and $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase and the level of MDA and activities of SOD and GSH-Px 14 weeks after treatment were measured and observe liver framework of organization change. **Result:** Results showed that activities of GSH-Px 14 weeks after treatment of unfumigated, commercial *D. opposita* were significantly increased compared with control group; commercial *D. opposita* enhanced the activities of $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase. **Conclusion:** The long-term use of *D. opposita* has the possibility to cause lipid peroxidation and change the activities of $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase in liver.

[Key words] *Dioscorea opposita*; sulphur fumigation; liver; lipid peroxidation; ATPase

山药为薯蓣科多年生宿根蔓草植物山药 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干燥根茎, 具有补脾养胃、生津益肺、补肾涩精的功效。现代药理研究表明山

药有调节免疫、抗癌、降糖、抗衰老等作用, 而抗癌机制与调节免疫、ATP 酶活性有关^[1-2]。在现代加工处理过程中山药多采用硫磺熏制, 现代研究表明: 硫磺具有一定毒性, 山药经熏蒸后不仅对其有效成分含量有所影响, 而且药材表面还残存了对人体有害的二氧化硫和重金属^[3-4]。研究表明 SO_2 及其衍生物为全身性毒物, 可引起试验动物多种器官的损伤^[5], 报道中多见吸入致毒损伤, 有关采用口服给药方式给

[收稿日期] 2004-12-27

[基金项目] 山东省中医药科技发展计划项目(2007-051)

[通讯作者] * 郭婕, 硕士, 主管药师, Tel: 13173043987, E-mail: gjsd2008@126.com

予硫磺熏蒸药材的毒理学研究则少见报道。本文以山药为例探讨硫磺熏制对试验动物肝组织中抗氧化能力及 ATP 酶活性的影响。

1 材料和方法

1.1 样品 未熏蒸山药:新鲜山药经去皮、切片、采用自然烘干的饮片;市售山药:新鲜山药经去皮、切片、经硫磺熏蒸后销往市场的饮片,经检测 SO₂ 含量为 180.38 mg·kg⁻¹;熏蒸山药:新鲜山药经去皮、切片、采用硫磺反复熏蒸至硫磺含量达到饱和的山药饮片,经检测 SO₂ 含量为 1 976.40 mg·kg⁻¹;均由河南省温县农科所提供,经国家中药现代化工程技术中心曹晖教授鉴定为薯蓣科植物薯蓣 *D. opposita* 的干燥根茎。设计大鼠 90 d 喂养试验剂量组,共设立 4 个试验组。受试物剂量分别为 50 g·kg⁻¹ BW。

1.2 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 80 只,由中国医学科学院实验动物研究所[生产许可证号 SCXK-(京)2005-0013]。饲养环境为屏障环境,试验动物使用许可证号 SYXK(鲁)2008-0005。康大试验动物标准饲料由山东省实验动物中心提供,许可证号 SCXK(鲁)2004-0014。

1.3 方法 选用体重 160 ~ 180 g 大鼠 80 只,雌雄各半,随机分为 4 组,每组 20 只。其中 3 组分别给予未熏蒸山药、市售品山药、硫磺熏蒸山药水提浓缩液(5 g·mL⁻¹),受试物剂量分别为 50 g·kg⁻¹,将受试物按照动物体重计算食物摄入量掺入基础饲料中饲喂试验动物。对照组饲喂基础饲料。单笼喂养,自由饮食。连续观察 14 周。试验结束时测定肝组织中过氧化脂质降解产物(MDA)含量、总超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力及 Ca²⁺ Mg²⁺-ATPase, Na⁺ K⁺-ATPase 活性。

1.4 仪器和试剂 spectra MAX PLUS 连续光谱酶标仪、微量加样器、TDA-8002 恒温水浴锅(天津中环科技开发公司)、MULTIFUGE 3S 离心机、GF-1 型控时调速式高速分散器(江苏海门麒麟医用仪器厂)、TG328B 电子分析天平。生理盐水,0.2 mol·L⁻¹ 乙酸盐缓冲液 pH 3.5,0.2 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 pH 7.4,8.1% 十二烷基硫酸钠,0.8% 硫代巴比妥酸,40 μmol·L⁻¹ 四乙氧基丙烷,SOD 测定试剂盒,GSH-Px 测定试剂盒、Ca²⁺ Mg²⁺-ATPase 测定试剂盒,Na⁺ K⁺-ATPase 测定试剂盒(南京建成生物技术有限公司生产)。

1.5 Ca²⁺ Mg²⁺-ATPase, Na⁺ K⁺-ATPase 活性测定

应用无机磷酸根法原理,按照超微量 ATP 酶测试盒(南京建成生物工程研究所)进行。测定原理:ATP 酶可分解 ATP 生成 ADP 及无机磷,测定无机磷的量可判断 ATP 酶活力的高低。规定每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol·L⁻¹ 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。各组动物取肝组织制成 1% 匀浆,按照试剂盒法测定 Na⁺ K⁺-ATPase 的活力。

1.6 MDA 的测定 各组动物取肝肾组织制成 10% 匀浆,按照试剂盒法测定 MDA 的含量。

1.7 SOD 活力的测定 各组动物取肝肾组织制成 1% 匀浆,按试剂盒法测定总 SOD 活力。

1.8 GSH-Px 活力的测定 各组动物取肝肾组织制成 0.25% 匀浆,按试剂盒法测定 GSH-Px 活力。

1.9 统计学方法 用 Excel 软件建立数据库,用 SPSS 10.0 软件进行方差分析,再用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法(Dunnett 检验法)进行统计分析。*P* < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 4 种不同处理山药对大鼠肝组织内 Ca²⁺ Mg²⁺-ATPase 的影响 经口给予受试物 14 周,各试验组大鼠肝组织内 Ca²⁺ Mg²⁺-ATPase 含量与对照组比较无显著性差异。见表 1。

表 1 4 种不同处理山药对大鼠肝组织内 Ca²⁺ Mg²⁺-ATPase 活力的影响(*n* = 10) U·mg⁻¹

性别	对照	未熏	市售	熏制
雄	10.36 ± 0.64	10.41 ± 1.36	10.94 ± 0.35	11.03 ± 0.29
雌	11.38 ± 1.06	11.60 ± 0.65	11.52 ± 0.70	11.34 ± 0.93

2.2 4 种不同处理山药对大鼠肝组织内 Na⁺ K⁺-ATPase 的影响 经口给予受试物 14 周,市售山药组雌性大鼠肝组织内 Na⁺ K⁺-ATPase 含量比对照组显著升高,与对照组比较有显著性差异(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 4 种不同处理山药对大鼠肝组织内 Na⁺ K⁺-ATPase 活力的影响(*n* = 10) U·mg⁻¹

性别	对照	未熏	市售	熏制
雄	10.71 ± 1.80	10.94 ± 1.15	11.96 ± 0.60	11.92 ± 1.12
雌	10.54 ± 0.98	11.05 ± 1.22	12.65 ± 0.93 ¹⁾	11.77 ± 0.21

注:与对照组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01(表 5 同)。

2.3 山药对大鼠肝组织内过氧化脂质降解产物 MDA 的影响^[6-7] 经口给予受试物 14 周,各试验组大鼠肝组织内 MDA 含量与对照组比较无显著性差

异。见表 3。

表 3 4 种不同处理山药对大鼠肝组织中 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)			
	对照	未熏	市售	熏制
雄	5.57 ± 1.08	6.63 ± 0.44	7.72 ± 1.04	6.82 ± 1.21
雌	5.15 ± 1.00	5.15 ± 1.19	6.22 ± 1.17	6.23 ± 1.14

2.4 山药对大鼠肝组织内 SOD 活力的影响 经口给予受试物 14 周,各试验组大鼠肝组织内 SOD 活力与对照组比较无显著性差异。见表 4。

表 4 4 种不同处理山药对大鼠肝组织中 SOD 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)			
	对照	未熏	市售	熏制
雄	7.73 ± 0.54	7.75 ± 0.57	7.41 ± 0.26	7.56 ± 0.50
雌	7.97 ± 0.48	7.57 ± 0.66	8.37 ± 0.32	7.47 ± 0.87

2.5 山药对大鼠肝组织内谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-P_x) 活力的影响 经口给予受试物 14 周,雄、雌性动物未熏山药组、市售山药组肝组织中谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-P_x) 活力与对照组比较显著增加,均有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 5。

表 5 4 种不同处理山药对大鼠肝组织中 GSH-P_x 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)			
	对照	未熏	市售	熏制
雄	23.95 ± 1.19	26.95 ± 0.92 ¹⁾	27.58 ± 1.17 ²⁾	25.68 ± 1.79
雌	28.05 ± 1.50	32.00 ± 1.27 ¹⁾	31.95 ± 1.00 ¹⁾	30.79 ± 1.78

2.6 山药对大鼠肝脏组织结构的影响

正常结构清楚,肝小叶排列整齐,可见规则放射状排列肝细胞索、正常血窦、中央静脉、门管区。肝细胞呈多边形,胞浆轻度嗜酸性着色,细胞核圆形,中央位。对照组和试验组少数动物可观察到轻微病理改变(表 6)。对照组雄 1/10 例和熏山药组雄 1/10 例、雌 1/10 例及市售山药组雄 1/10 例标本内可观察到单个或数个肝细胞水样变性,肝细胞轻度肿胀,细胞质稀淡透亮。胞浆内可见边界清楚的圆形空洞样小泡;熏山药组雄 1/10 例标本内可见点状的炎细胞浸润灶。

3 讨论

ATP 酶存在于组织细胞和细胞器上,是生物膜上的一种蛋白,负责物质运送、能量转换及信息传递。其对细胞内外离子浓度的稳定,维持细胞正常形态具有重要作用。Na⁺ K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺ Mg²⁺-ATP 酶活性降低,可引起细胞离子跨膜运转障碍和

表 6 4 种不同处理山药对肝脏组织病理学病变的影响 ($n = 10$)

病变类型	出现病变的雄性动物数			出现病变的雌性动物数		
	对照	市售	熏制	对照	市售	熏制
肝小叶	细胞变性	1	1	1	0	0
	出血	0	0	0	0	0
	坏死	0	0	0	0	0
汇管区	炎细胞浸润	0	0	0	0	1
	纤维化	0	0	0	0	0
	出血	0	0	0	0	0
其他	胆管增生	0	0	0	0	0
	炎细胞浸润	0	0	0	0	0

注:未熏组均为 0。

能量代谢的紊乱,就会引起细胞内高 Na⁺ 和高 Ca²⁺,从而导致细胞形态、结构和功能的异常;而 Na⁺ K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺ Mg²⁺-ATP 酶活性的提高有助于维持细胞内外离子浓度,保持细胞内外 Na⁺, K⁺ 及 Ca²⁺ 的平衡,缓解组织缺氧。

经口给予受试物 14 周,市售山药组雌性大鼠肝组织内 Na⁺ K⁺-ATPase 活力与对照组比较显著增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示山药经硫磺熏制后可能改变参与 ATPase 过程。经口给予受试物 14 周,雄、雌性动物未熏山药组、市售山药组肝组织中 GSH-P_x 活力与对照组比较显著增加,均有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示山药有抗氧化作用,经大量硫磺熏制后抗氧化作用有一定程度降低。

本试验研究表明,长期大量食用 SO₂ 严重超标的山药可引起大鼠肝组织学结构的改变,提示其有引起肝损伤的可能。

山药含有多种化学成分,如山药多糖、尿囊素等。山药多糖具有抗氧化、提高免疫、抑制肝损伤等作用;尿囊素具有修复上皮组织,促进皮肤溃疡和伤口愈合,具有生肌作用,可用于胃及十二指肠溃疡等病症。山药经硫磺熏蒸后药材中二氧化硫及尿囊素等含量均有不同程度改变,这导致了其抗氧化及 ATPase 代谢过程的变化。山药经硫磺熏蒸后药材表面残存了大量二氧化硫及重金属,SO₂ 及其衍生物为全身性毒物,吸入 SO₂ 可引起小鼠肝、脾、脑及生殖器官 DNA 的损伤以及心、肝、肺及消化道等组织的氧化损伤,报道中多见吸入致毒损伤,有关采用口服给药方式给予硫磺熏蒸药材的毒理学研究则少

见报道;而重金属过量可引起机体肝肾等重要器官组织的损伤,这些均需继续深入研究。硫磺熏蒸是中药材产地加工的传统方法,此法具有使药材干燥快,防虫蛀、防霉变、保持色泽鲜亮的优点,而且大大延长其贮存时间,但药材经硫磺熏蒸后药材表面残存了大量二氧化硫及重金属,对药材的化学成分亦有影响^[8]。选择既能保持药材较好的外观和防腐,又能保证其质量及用药安全的新的加工工艺势在必行。

[参考文献]

[1] 赵彦青,王爱凤. 山药的药理研究进展[J]. 中医研究, 2000,13(5):49.
[2] 熊竹娟,林苹,张洁. Na^+ , K^+ -ATP 酶 β_1 亚基与肿瘤细胞生长相关性[J]. 中国肿瘤, 2007,16(3):193.

[3] 赵海霞,刘伟,曹晖,等. 硫磺熏蒸对山药中二氧化硫含量的影响[J]. 齐鲁药事, 2009,28(3):176.
[4] 赵海霞,刘伟. 硫磺熏蒸对山药中尿囊素的影响[J]. 中草药, 2009,40(6):903.
[5] 孟紫强,张波,秦国华. 二氧化硫对小鼠不同脏器 DNA 的损伤作用[J]. 中国环境科学, 2005,25(4):424.
[6] 赵平,叶志文,何丹璇,等. 鸡骨草胶囊对大鼠肝纤维化的保护作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009,15(10):99.
[7] 刘建鸿,姚凝,王昕. 五味子对醋酸氢化可的松致氧化平衡紊乱影响的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009,15(5):69.
[8] 王巧,刘荣霞,郭洪祝,等. 加工炮制对白芍化学成分的影响[J]. 中国中药杂志, 2006,31(17):1418.

[责任编辑 邹晓翠]