

桦褐孔菌多糖对微波辐射致睾丸损伤的防护研究

赵丽微¹ 钟秀宏¹ 孙艳美² 杨淑艳¹ 沈楠³ 张以忠¹ 杨宁江⁴ 任旷⁵ 吕士杰⁶

摘要 目的 探讨桦褐孔菌多糖对高功率微波辐射致大鼠睾丸损伤的影响。**方法** Wistar 雄性大鼠 30 只,随机分为正常对照组、微波辐射模型组及治疗组、新微波辐射模型组及预防组,每组 6 只。除对照组外,其余组给予 200 mW/cm² 微波辐照 6 min。对照组和模型组生理盐水灌胃,治疗组和预防组给予桦褐孔菌多糖 2 mL(400 mg/kg)灌胃,每日 1 次,第 11 天处死各组大鼠,对各组大鼠精子密度、精子畸形率进行测定,以光镜和透射电镜观察睾丸的病理形态变化。**结果** 短期高功率微波照射可引起大鼠精子密度减少,精子畸形率上升($P < 0.05$),同时睾丸发生明显的病理改变;而桦褐孔菌多糖灌胃后,治疗组和预防组与 2 个模型组比较,精子密度增加,精子畸形率下降($P < 0.05$),光镜下生精细胞和间质细胞损伤以及血管扩张充血情况都明显减轻,超微结构显示线粒体肿胀和内质网扩张也明显减轻,其中治疗组各级生精细胞损伤和炎症反应均比预防组轻。**结论** 桦褐孔菌多糖对微波辐射致睾丸损伤具有显著防护效果,治疗性给药的效果较预防性给药更加显著。

关键词 桦褐孔菌多糖;高功率微波;睾丸损伤

Prevention of *Inonotus obliquus* Polysaccharides for High Power Microwave Radiation Induced Testicular Injury in Rats: an Experimental Research ZHAO Li-wei¹, ZHONG Xiu-hong¹, SUN Yan-mei², YANG Shu-yan¹, SHEN Nan³, ZHANG Yi-zhong¹, YANG Ning-jiang⁴, REN Kuang⁵, LU Shi-jie⁶ 1 Department of Pathology, Jilin Medical College, Jilin (132013), China; 2 Laboratory of Pathogenic Microorganism, Jilin Medical College, Jilin (132013), China; 3 Experimental Center, Jilin Medical College, Jilin (132013), China; 4 Department of Pathology, Affiliated Hospital of Jilin Medical College, Jilin (132011), China; 5 Department of Pharmacology, Jilin Medical College, Jilin (132013), China; 6 Department of Biochemistry, Jilin Medical College, Jilin (132013), China

ABSTRACT Objective To investigate the effect of *Inonotus obliquus* polysaccharides on testicular injury induced by exposure to high power microwave (HPM) in rats. **Methods** A total of 30 male Wistar rats were randomly divided into 5 groups, i.e., the normal control group, the microwave radiation model group, the treatment group, the new microwave radiation model group, and the prevention group, 6 in each group. All rats, except those in the normal control group, were exposed to microwave at an average power density of 200 mW/cm² for 6 min. Rats in the control group and the model group were administered with normal saline by gastrogavage, once a day. Rats in the treatment group and the prevention group were given with *Inonotus obliquus* polysaccharides by gastrogavage, 2 mL each time (400 mg/kg body weight), once a day. All rats were sacrificed on the 11th day. The sperm density and the rate of sperm deformity were determined. Pathological changes of testis were observed by light microscope and transmission electron microscope. **Results** Short-term HPM irradiation could significantly reduce the sperm density and increase the sperm deformity rate ($P < 0.05$). Meanwhile, obvious pathological changes of testes occurred. Compared with the two model groups,

基金项目: 吉林省教育厅课题(吉教科合字[2012]第 495 号);吉林省教育厅课题(吉教科合字[2013]第 348 号)

作者单位: 1. 吉林医药学院病理学教研室(吉林 132013); 2. 吉林医药学院病原微生物实验室(吉林 132013); 3. 吉林医药学院实验中心(吉林 132013); 4. 吉林医药学院附属医院病理科(吉林 132011); 5. 吉林医药学院药理教研室(吉林 132013); 6. 吉林医药学院生物化学教研室(吉林 132013)

通讯作者: 钟秀宏, Tel: 15144288179, E-mail: xzhong0611@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2014. 07. 0864

the sperm density increased and the sperm deformity rate decreased in the treatment group and the prevention group ($P < 0.05$). Under the light microscope, injuries of spermatogenic cells and stromal cells, as well as vascular dilatation and congestion were obviously alleviated in the treatment group and the prevention group. Mitochondrial swelling and endoplasmic reticulum expansion shown by ultrastructural observation were also significantly alleviated. Of them, injuries of spermatogenic cells and inflammation response were milder in the treatment group than in the prevention group. Conclusions *Inonotus obliquus* polysaccharides had significant protective effect on microwave radiation induced testicular injury. Better effect was obtained by therapeutic medication than preventive medication.

KEYWORDS *Inonotus obliquus* polysaccharides; high power microwave; morphological change

近年研究表明,桦褐孔菌在抗肿瘤、抗 HIV、治疗糖尿病方面具有一定的潜力,其抗氧化作用和免疫调节作用也倍受科研工作者的重视^[1]。但关于其对微波辐射的防护研究国内外尚无相关报道。睾丸是微波辐射的敏感器官^[2],因此,本实验采用短期 200 mW/cm² 高功率微波 (high power microwave, HPM) 辐射大鼠以引起睾丸损伤,通过形态学观察桦褐孔菌多糖对微波辐射的防护作用,以期对桦褐孔菌多糖防护微波辐射的深入研究奠定基础。

材料与方法

1 动物及分组 清洁级成年 Wistar 雄性大鼠 30 只 (吉林大学白求恩医学院动物实验中心提供,许可证号 SCXK-吉 2008-0005), 体重 (200 ± 20) g。采用随机分组法将其分 5 组: 正常对照组、微波辐射模型组、治疗组、新微波辐射模型组、预防组, 每组 6 只。各组大鼠同一种饲料平行饲养, 适应性喂养 1 周后, 进行动物实验。

2 药物 桦褐孔菌精制多糖 (纯度 98%) 由河南大学药学院赵芬琴博士制备并鉴定。

3 仪器及试剂 微波辐射装置为雷达发射机改装的大功率脉冲微波辐射发射源 (吉林医药学院微波辐射研究重点实验室提供); 透射电子显微镜 (JEM-1200EX 型, 日本 JEOL 电子公司); 数码生物显微镜 (BA300 型, 中国麦克奥迪实业集团有限公司); 轮转式切片机 (RM2126 型, 上海徕卡仪器有限公司); 全自动组织包埋机 (ZMN-7803 型, 常州市华利电子有限公司)。

4 方法

4.1 动物模型制备及给药方法 参照文献^[3, 4]第 1 天仅对微波辐射模型组和治疗组给予微波辐射, 表面功率 200 mW/cm², 辐射时间 6 min。微波辐射 6 h 后, 正常对照组、微波辐射模型组、新微波辐射模型组给予蒸馏水灌胃, 每次 2 mL, 每日 1 次; 治疗

组和预防组给予桦褐孔菌多糖溶液 (按 400 mg/kg 体重^[5]) 灌胃, 每次 2 mL, 每日 1 次, 持续 10 天。第 10 天, 新微波辐射组和预防组接受相同功率和时间的辐射。辐射时环境温度为 (24 ± 0.5) °C, 相对湿度为 (74% ± 1%)。

4.2 标本采集及观察 末次灌胃后禁食不禁水, 18 h 后 (即第 11 天) 处死所有实验动物, 冰浴下迅速取出双侧睾丸, 一侧睾丸用 Bouin's 液固定, 常规脱水透明、石蜡包埋、切片, 苏木精-伊红 (HE) 染色, 光镜下观察睾丸组织形态学改变; 另一侧睾丸在冰浴下将睾丸切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 小块迅速置于 3% 戊二醛 4 °C 固定 2 h, PBS 漂洗, 进行常规透射电镜标本制备, 透射电镜下观察睾丸超微结构病理改变。取睾丸的同时取出双侧附睾, 取其中一侧附睾, 切取附睾尾部, 将附睾尾部放入 37 °C 预热的含有 M199 培养液平皿中, 用眼科剪剪碎附睾尾, 制备精子悬液, 然后按照血细胞计数法计数, 计数 5 个中方格内精子数, 计为 R, 最后按下式计算获得精子相对计数, 精子相对计数 = $R \times 50\,000 \times \text{固定液体积} / \text{附睾尾重}$ ^[6]; 取另一侧附睾, 剖开附睾和附睾管, 用生理盐水冲洗, 进行精子涂片和 HE 染色, 每只大鼠随机计数 200 个精子中有头部畸形的精子数, 并计算精子畸形率^[7]。

4.3 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件指标均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析数据, 组间两两比较采用 LSD 检验, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

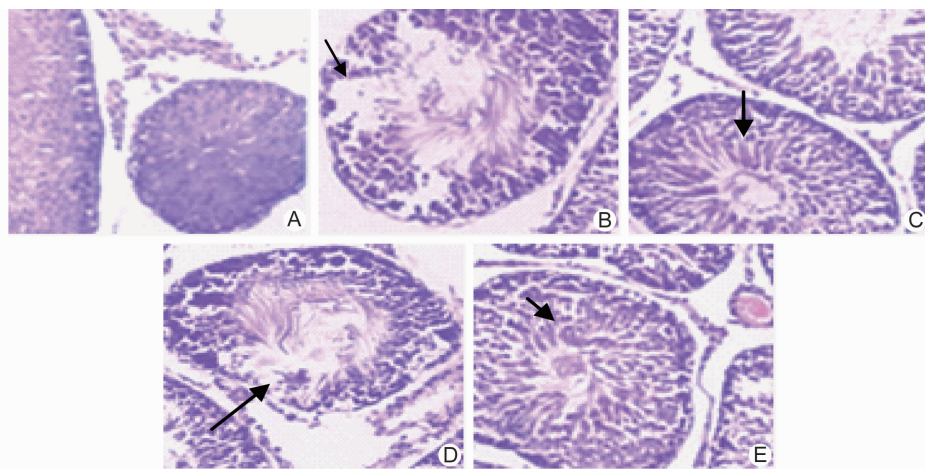
1 死亡及脱落情况 纳入 30 只大鼠, 实验过程中无动物意外死亡或其他原因导致的动物脱失, 30 只大鼠全部进入结果分析。

2 各组大鼠睾丸组织结构变化比较 (图 1) 正常对照组大鼠睾丸的曲细精管界膜完整平坦, 曲细精管内可见成熟的精子, 各类生精细胞排列整齐, 层次清楚, 间

质细胞结构正常;微波辐射模型组大鼠睾丸各类生精细胞排列不整齐,层次不清楚,部分生精上皮变薄,各级生精细胞有损伤,主要表现为变性、坏死脱落,生精小管管腔内可见蛋白水肿液和脱落的细胞,精子数目明显减少,血管扩张充血,组织水肿,有炎细胞浸润,间质细胞数目减少;新微波辐射组大鼠睾丸各类生精细胞排列疏松、不整齐,层次不清楚,部分生精上皮变薄,甚至曲细精管管腔断裂,支持细胞、精原细胞变性明显,精母细胞、精子细胞核浓缩为主,生精小管管腔内精子数目极少甚至缺失,间质细胞数目减少,血管扩张充血,组织水肿,有炎细胞浸润;治疗组和预防组大鼠睾丸各类生精细胞排列尚整齐,部分曲细精管内可见少量精子,与各模型组比较,生精细胞和间质细胞损伤以及血管扩张充血情况明显减轻,其中治疗组较预防组效果好。

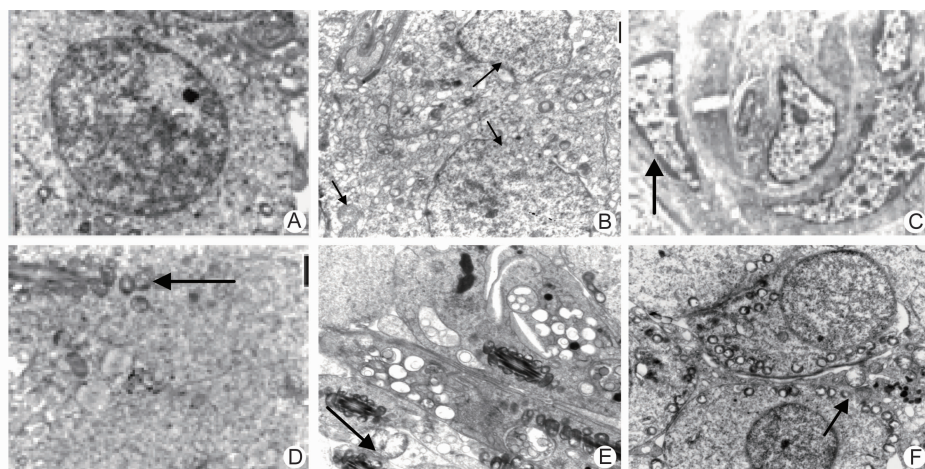
3 各组大鼠睾丸超微结构变化比较(图2) 正常对照组:大鼠睾丸结构正常。微波辐射模型组:各级生

精细胞胞质变淡,电子密度降低,内质网扩张,线粒体灶性空化,核内染色质稀疏,核膜模糊不清或灶性溶解,核内染色质外溢,也可见到精原细胞内染色质边集凋亡现象,精子畸形可见,精子头部线粒体鞘不清楚,其他结构也不清楚,顶体发育不良,尾部未形成。细胞间紧密连接破坏,毛细血管内皮不完整,部分炎细胞侵入基底膜和精原细胞之间,并可见大量脂滴,溶酶体多为初级溶酶体。新微波辐射模型组:超微结构特点与微波辐射模型组类似,可见到肌上皮细胞和支持细胞空泡现象,精子细胞变性,尾鞘线粒体肿胀明显,灶性空化,嵴消失,毛细血管内皮细胞肿胀。治疗组:各级生精细胞内质网扩张及线粒体空化不明显,线粒体嵴结构尚清晰,染色质浓集和边集现象好转,毛细血管内皮完整;预防组:与新微波辐射组比较有改善,但可见部分生精细胞内质网扩张,线粒体肿胀,嵴欠清晰现象,有的细胞间有间隙,连接不紧密,较药物治疗组略重。



注:A 为正常对照组;B 为微波辐射模型组;C 为治疗组;D 为新微波辐射模型组;E 为预防组;箭头所示为生精上皮

图1 各组大鼠睾丸组织结构变化比较 (HE, ×100)



注:A 为正常对照组;B、C 均为微波辐射模型组;D 为治疗组;E 为新微波辐射模型组;F 为预防组

图2 各组大鼠睾丸超微结构变化比较 (TEM bar = 500nm)

4 各组大鼠精子密度及畸形率情况比较(表 1)与正常对照组比较,微波辐射模型组和新微波辐射模型组,精子密度分别减少了 51% 和 57%,精子畸形率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与微波辐射模型组比较,治疗组精子密度增加了 55%,精子畸形率减少了 46%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与新微波辐射模型组比较,预防组精子密度增加了 44%,精子畸形率减少了 43%;与预防组比较,治疗组精子密度明显增多,精子畸形率明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠精子密度及畸形率情况比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	精子密度 ($\times 10^6/\text{g}$ 附睾尾)	精子畸形率 (%)
正常对照	6	70.3 $\pm$ 4.1	8.5 $\pm$ 1.4
微波辐射模型	6	33.1 $\pm$ 5.1 *	34.9 $\pm$ 4.1 *
新微波辐射模型	6	29.7 $\pm$ 5.2 *	37.1 $\pm$ 4.9 *
预防	6	43.1 $\pm$ 4.1 Δ	21.1 $\pm$ 2.7 Δ
治疗	6	52.2 $\pm$ 3.9 $\Delta\bigcirc$	18.8 $\pm$ 3.3 $\Delta\bigcirc$

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与微波辐射模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与新微波辐射模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与预防组比较, $\bigcirc P < 0.05$

讨 论

微波是一种频率在 300 MHz-300 GHz 之间的电磁波。目前研究发现:微波辐射对组织器官的影响存在着量效关系^[7,8],并且不同组织器官对不同强度微波辐射所造成的损伤表现出不同的修复能力^[7]。有研究者认为,大于 100 mW/cm² 高强度微波可以产生多种生物学效应,并引起组织不可逆损伤^[3]。

本次实验用 200 mW/cm² 高功率微波照射大鼠 6 min,观察了辐射后 1、10 天大鼠睾丸组织的病理学变化,发现各实验组大鼠睾丸组织内实质细胞和间质细胞都有损伤,精子的数量和质量也受到了影响,并且我们也注意到睾丸组织在辐射后 10 天生精细胞仍处于“空虚”期,还没有进入再生修复期。短期高功率微波辐射引起上述睾丸组织损伤的病理学改变,与文献报导一致^[7,8]。

有研究认为,高强度微波主要表现为热效应^[3]。因此,考虑睾丸组织出现上述不可逆性损伤的原因可能是由于微波功率密度较大,使生命体中的某些成分在吸收微波后,把较多的电磁能转变为这些成分的无规则运动的大量热能,此热效应不但引起了相对缺乏血管的睾丸组织局部缺血缺氧,还引起了心肌损伤^[9]。而心肌损伤会引起全身血液循环障碍,势必将进一步加重睾丸组织缺血缺氧程度,由此生精细胞线

粒体氧化磷酸化功能也将进一步受损,从而导致 ATP 产生减少或停止,造成钠-钾泵和钙泵功能低下,并最终发生胞浆内钙超载,引发细胞坏死及诱导细胞凋亡。在病变发展过程中,由于自由基不断产生,机体抗氧化物质逐渐被破坏及消耗,机体修复能力也因此受到了严重影响。睾丸是精子的生成场所,精子数量及质量是影响受孕的主要因素。目前众多研究显示:微波辐射引起生殖器官损伤可影响到生殖及生理功能^[2]。因此,辐射防护,尤其是对生殖器官损伤的防护一直是从事辐射防护研究人员急于解决的重要课题。

多糖类物质对造血系统、免疫系统、消化系统、生殖系统、心血管系统有较好的保护作用,并能促进受损伤的系统恢复功能,大多具有明显的抗辐射作用,能延长辐射照射后生物的存活时间,提高其生存率^[10]。在多糖类中,真菌类多糖以其独特明显的抗辐射活性和无毒性的特点,日益成为辐射防护研究的热点,正受到越来越多辐射防护研究学者的关注^[11,12]。在真菌中,桦褐孔菌被誉为“免疫之王”,目前在对桦褐孔菌防治疾病研究过程中,发现桦褐孔菌多糖是桦褐孔菌中主要有效成分之一^[1,13],它能够有效清除自由基,提高 ATP 酶活性,具有抗氧化、抗炎、抑制睾丸生精细胞凋亡等多种药理学作用^[14-16],在对生殖器官损伤防护方面起到很好的防护作用^[16,17]。

本实验在建立微波辐射睾丸损伤模型后,给予雄性大鼠桦褐孔菌多糖 400 mg/(kg·d)灌胃 10 天,治疗组与微波辐射模型组比较,大鼠睾丸生精小管生精上皮层次明显增多,各级生精细胞排列较整齐,生精细胞内质网扩张及线粒体空泡化不明显,线粒体嵴结构较模型组清晰,染色质浓集和边集现象有所好转,部分曲细精管内精子数量增多,血管扩张充血情况也明显减轻。提示桦褐孔菌多糖可减轻高功率微波辐射所致的睾丸损伤并且缩短损伤修复时间,对生殖器官睾丸的损伤具有良好的防护作用。目前国内外研究已证实,桦褐孔菌多糖进入机体后经代谢又可成为机体的营养物质,具有无毒、无蓄积作用^[1]。因此,桦褐孔菌多糖将可能成为有潜在价值的抗辐射活性物质。

本实验观察并比较了治疗组和预防组睾丸组织病理形态学变化,发现治疗组各级生精细胞损伤和炎症反应要比预防组轻。关于治疗性给药效果好的原因可能是桦褐孔菌多糖针对微波辐射引起的细胞损伤及炎症反应可能更易发挥它的药理作用,从而更好地调节睾丸血供,缓解微波辐射所导致的生殖系统功能的损伤,并加速其恢复,但是其具体机制尚需进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] Zhong XH, Ren K, Lu SJ, et al. Progress of research on *Inonotus obliquus* [J]. Chin J Integr Med, 2009, 15(2): 156-160.
- [2] 魏秀梅, 孙艳美, 赵丽微, 等. 微波辐射对雄性生殖系统的影响的研究进展[J]. 中国男科学杂志, 2013, 27(3): 67-68.
- [3] 田志杰, 沈楠, 吕士杰, 等. 黑木耳多糖对高强度微波辐射大鼠血清超氧化物歧化酶和肝脏脂质过氧化的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 3011-3013.
- [4] 朱辛为, 田洪艳, 徐冶, 等. 黑木耳多糖对高功率微波辐射大鼠卵巢和子宫形态结构的影响[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(5): 735-736.
- [5] 陈辉, 钟秀宏, 杨森林, 等. 桦褐孔菌多糖对急性酒精性肝损伤模型大鼠的保护作用研究[J]. 中国药房, 2013, 24(27): 2510-2511.
- [6] 林孟端, 陈昱, 陈华, 等. 不同强度的低功率微波辐射对雄性小鼠生殖系统的影响[J]. 癌变 畸变 突变, 2007, 19(6): 494-496.
- [7] 王水明, 彭瑞云, 高亚兵, 等. 高功率微波辐射所致大鼠睾丸损伤的病理学研究[J]. 中华男科学杂志, 2006, 12(6): 486-495.
- [8] 尉春华, 杨瑛, 李东红, 等. 高功率微波辐射照对大鼠睾丸形态和超微结构的影响[J]. 解放军预防医学杂志, 2004, 22(5): 331-334.
- [9] 钟秀宏, 徐俊杰, 刘洪梅, 等. 高功率微波辐射致大鼠心和肝损伤形态学观察[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(12): 1559-1560.
- [10] 王庆蓉, 马丽, 雷呈祥. 多糖抗辐射作用的研究进展[J]. 海军医学杂志, 2009, 30(3): 273-276.
- [11] 陈立, 董俊兴. 多糖抗辐射作用研究进展[J]. 癌变 畸变 突变, 2004, 16(6): 380-382.
- [12] 文静, 徐天昊, 彭瑞云. 微波辐射损伤及防护研究进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2009, 33(4): 385-387.
- [13] 张旭, 赵芬琴, 韩光, 等. 桦褐孔菌的化学成分及抗炎活性[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(3): 433-436.
- [14] Zheng W, Zhang M, Zhao Y, et al. Analysis of antioxidant metabolites by solvent extraction from sclerotia of *Inonotus obliquus* (chaga) [J]. Phytochem Anal, 2011, 22(2): 95-102.
- [15] Won DP, Lee JS, Kwon DS, et al. Immunostimulating activity by polysaccharides isolated from fruiting body of *Inonotus obliquus* (chaga) [J]. Mol Cells, 2011, 31(2): 165-173.
- [16] 刘妍, 鞠玉琳, 刘力本, 等. 桦褐孔菌粗多糖对急性弓形虫感染雄性小鼠睾丸生精细胞凋亡的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(19): 10474-10475.
- [17] 张杰, 杨旭东, 包海花, 等. 桦褐孔菌多糖诱导人卵巢癌细胞凋亡的研究[J]. 中国食用菌, 2010, 29(4): 38-39.

(收稿: 2013-03-01 修回: 2013-11-20)

“2014 中医药科研设计与 SCI 论文写作培训班(上)”顺利召开

2014 年 4 月 19—20 日, 中国中西医结合杂志社“2014 中医药科研设计与 SCI 论文写作培训班(上)”于南京市召开, 来自全国各地 260 余名专家、学员参加此次培训班。中国中医科学院副院长刘保延教授在开幕式上致辞, 中国科学院院士陈可冀教授、香港浸会大学中医药学院卞兆祥教授、上海中医药大学副校长季光教授、中国中医科学院西苑医院副院长史大卓教授、上海中医药大学肝病研究所所长刘成海教授、江苏省中医院呼吸科主任周贤梅教授、中国中医科学院广安门医院李光熙教授、中国中医科学院心血管病研究所副所长徐浩教授、第二军医大学附属长征医院心内科梁春教授、江苏省人民医院心血管内科张海峰教授、Chinese Journal of Integrative Medicine 副编审郭艳编辑等介绍科研设计及论文发表经验。以此次培训班授课内容为基础, 编辑部将出版相关书籍, 使更多人可以了解专家授课内容。

Chinese Journal of Integrative Medicine 创办于 1995 年, 主编为陈可冀院士, 是我国第一本被 SCI 收录的中医、替代医学及结合医学领域的杂志。2013 年 6 月公布本刊最新影响因子为 1.059, 较以往继续稳步提升, 在补充替代医学杂志领域学科排名也由 2012 年的 16 名上升至 12 名。为进一步提高我国中医、中西医结合临床医生、科研人员的科研设计及 SCI 论文写作技巧, 促进科研成果转化, 中国中西医结合杂志社编辑部召开了相关培训班。培训班针对临床研究、基础研究、系统综述等不同类型文章邀请具有丰富经验的专家学者讲述发表经验及写作技巧。

“2014 中医药科研设计与 SCI 论文写作培训班(下)”也将在今年 11 月于福州召开, 期待您下次参会!