

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.01.012

生理性深层海水对小鼠高温耐受力的影响*

代佑果¹,李为明²,唐辉蓉²,石安华³,甘平¹,寸英丽¹,刘琴¹,关琼瑶¹,崔进^{2△}(1. 昆明医科大学第三附属医院/云南省肿瘤医院腹部外科 650118;2. 昆明医科大学第二附属医院
干部医科外科 650101;3. 云南中医学院病理教研室,昆明 650500)

[摘要] **目的** 探讨生理性深层海水(PDSW)对 45.0 ℃ 高温环境动物耐受性的影响及机制。**方法** 将取自我国海南省海域的深层海水进行制备,制成 PDSW,检测所含有的部分元素。20 只昆明小鼠,雌雄各半,分为对照组和实验组,对照组小鼠饮用自来水,实验组饮用 PDSW,连续 15 d,然后把各组小鼠放入 45.0 ℃ 高温环境下饲养,记录每只小鼠死亡时间,直至各组小鼠全部死亡为止。并取每只小鼠脑、肺、心、肝和肾做病理检查。**结果** 无论是雌性小鼠还是雄性小鼠,实验组的小鼠在 45.0 ℃ 高温下的生存时间比对照组的小鼠长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。并且雌性小鼠的生存时间要比雄性小鼠的生存时间长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。组织学分析表明 PDSW 对实验小鼠的脑、心、肺、肝、肾等器官均有保护作用。Western blot 检测发现,实验组小鼠肝组织 HSP72 表达较对照组强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** PDSW 可以增强小鼠对 45.0 ℃ 高温环境的耐受性,其机制考虑与 PDSW 促进热休克蛋白表达有关。

[关键词] 生理性深层海水;高温;诱发;耐受力**[中图分类号]** R282.77**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)01-0033-04

Effect of physiological deep-sea water on the hyperthermal tolerance of mice*

Dai Youguo¹, Li Weiming², Tang Huirong², Shi Anhua³, Gan Ping¹, Cun Yingli¹, Liu Qin¹, Guan Qiongyao¹, Cui Jin^{2△}

(1. Department of Abdominal, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650118, China; 2. Department of Cardres Medical the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650101, China; 3. Pathological Teaching and Research Office Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of physiological deep-sea water(PDSW) on hyperthermal tolerance of Kunming (KM) mice in the 45.0 ℃ environment. **Methods** Deep-sea water from the south Chinese sea was processed, and the metallic elements dissolved in the DSW were analysed. The mice were randomly divided into 2 groups: the control group received tap water; the experimental group treated with PDSW for 15 d. And then the mice were fed in the 45.0 ℃ conditions. The survival time and histomorphometric analyses of the brain, lung, heart, liver and kidney were investigated. **Results** The survival time in PDSW-fed group was significantly longer than that of the control group ($P < 0.05$). Moreover, histomorphometric analyses showed that PDSW could protect the brain, lung, heart, liver and kidney of KM mice from the 45.0 ℃ conditions. The results of western blot revealed that expression of HSP72 of liver tissues for PDSW-fed group substantially increased, when compared with the control mice ($P < 0.05$). **Conclusion** PDSW could improve hyperthermal tolerance of KM mice, which maybe in the relation with expression of HSP72 promoted by PDSW.

[Key words] physiological deep-sea water; hyperthermia, induced; tolerance

一般来说,海平面以下超过 200 m 深海中的海水即被称为深层海水。深层海水占海水总量的约 93%,储量丰富。大量研究表明,海洋深层水洁净,无菌,富含矿物质和微量元素,且所含矿物质和微量元素几乎达到均衡状态,从而使其有别于表层海水^[1]。由于深层海水具有的特质,其在海水养殖业、食品业受到欢迎。目前,深层海水在医学领域也有了用武之地,已成为一种奇妙的“绿色药品”。

肿瘤热疗作为定向能量外科技术中的一个重要组成部分,其在肿瘤治疗中的作用日渐突出^[2]。如何减轻热疗的不良反应以及提高机体的耐受力成为肿瘤热疗研究的热点。本研究给予实验小鼠饮用制备的生理性深层海水(physiological deep-

sea water, PDSW),并对其在 45.0 ℃ 高温环境下的耐受力做了初步研究。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 总共 20 只昆明种小白鼠,6~8 周龄,雌雄各半,购自昆明医科大学动物实验中心。

1.1.2 深层海水采集、制备及部分元素检测 在我国南海海域获取海平面 200 m 以下的深层海水,避光运至昆明,室温避光储存,在 0.3 MPa 压力下,经 5.1 μm 聚丙烯熔喷 PP 棉超微过滤后,用 KDF(铜锌合金)除去海水中的重金属,反复冻融方法浓缩并去除海水中多余的盐分浓缩海水,0.01 μm PVC 合

金超滤膜除细菌、部分病毒和微小杂质,活性炭吸附异味,制备成 PDSW。电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)多次检测 PDSW 中部分元素的含量(表 1、2),并用昆明地区自来水所含相应元素做对照。深层海水的硬度以如下公式计算^[3]:硬度 = Mg (mg/L) × 4.1 + Ca(mg/L) × 2.5。本实验用 PDSW 硬度为 3 000 ppm。

表 1 PDSW 与自来水中 7 种宏量元素检测结果比较(mg/L)^a

元素名称	PDSW	自来水	P
氯(Cl)	5 112.0	106.5	<0.01
钠(Na)	2 020.0	5.2	<0.01
镁(Mg)	636.0	9.0	<0.01
钾(K)	249.0	2.4	<0.01
钙(Ca)	158.0	32.9	<0.01
硫(S)	40.0	10.8	<0.05
磷(P)	18.9	0.6	<0.01

^a:农业部农产品质量监督检验测试中心(昆明)检测结果。

表 2 PDSW 与自来水中 16 种微量元素检测结果比较^b(mg/L)

元素名称	PDSW	自来水	P
硼(B)	3.420	0.004	<0.01
锶(Sr)	2.96	0.35	<0.01
锌(Zn)	2.05	0.07	<0.01
硒(Se)	0.321 0	0.000 3	<0.01
铜(Cu)	0.19	0.02	<0.01
锰(Mn)	0.050	0.003	<0.05
镍(Ni)	0.028 6	0.002 8	<0.05
钼(Mo)	0.018	0.011	>0.05
锡(Sn)	0.005 3	0.000 1	<0.01
铅(Pb)	0.001 4	0.001 6	>0.05
钴(Co)	0.001 3	0.000 3	<0.05
锑(Sb)	0.000 8	0.000 2	>0.05
镉(Cd)	0.000 30	0.000 04	<0.05
铬(Cr)	0.000 2	0.000 1	>0.05
钒(V)	未检出 ^a	0.000 4	—
砷(As)	未检出 ^a	0.002 0	—
汞(Hg)	未检出 ^a	未检出	—

^a:检出限(mg/L) V 0.000 2, As 0.001 0, Hg 0.000 2; ^b:农业部农产品质量监督检验测试中心(昆明)检测结果。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 同窝生昆明种小鼠分为两组,每组 5 只(其余小鼠最后未纳入实验),实验组饮用 PDSW,对照组饮用自来水。小鼠可自由饮水和采食,喂养 15 d。

1.2.2 45.0 °C 高温环境下小鼠的生存分析 给实验小白鼠口服 PDSW 15 d 后,把各组动物放入 45.0 °C 高温环境下饲养,记录每只小鼠死亡时间,直至实验组与对照组全部死亡为

止。绘制各组生存时间曲线,计算各组平均生存时间。

1.2.3 病理学检测分析 对所有死亡雄性动物的脑、心、肺、肝和肾等进行常规组织病理学检查,石蜡切片,HE 染色;观察各脏器的损坏程度和病变特点。

1.2.4 雄性小鼠肝组织热休克蛋白(HSP72)表达测定 采用 Western blot 检测各组肝组织 HSP72 表达情况。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS18.0 统计软件包处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验、方差分析和 LSD 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义,趋势图用 SPSS 软件制作。

2 结果

2.1 饮用 PDSW 的昆明小鼠对 45.0 °C 高温的耐受性影响 无论是雌性小鼠还是雄性小鼠,实验组小鼠在 45.0 °C 高温下的生存时间比对照组的小鼠长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。并且雌性小鼠的生存时间要比雄性小鼠的生存时间长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3、图 1。

表 3 实验组和对照组在 45.0 °C 高温环境下的生存时间($n=5, \text{min}$)

组别	小鼠编号					平均值($\bar{x} \pm s$)
	1	2	3	4	5	
实验组						
雄	69	83	86	100	108	89.2 ± 6.81
雌	157	160	162	171	173	164.6 ± 3.14
对照组						
雄	65	66	66	66	78	68.2 ± 2.46
雌	134	136	141	142	165	143.6 ± 5.56

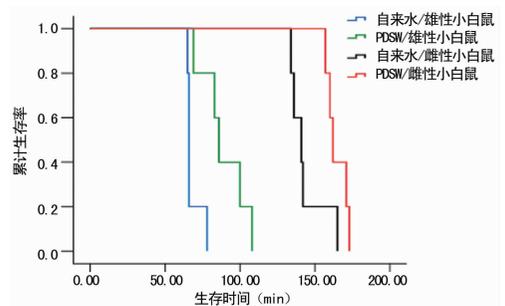


图 1 实验组和对照组在 45.0 °C 高温环境下的生存时间曲线

2.2 45.0 °C 高温对实验组雄性小鼠各重要器官的组织学的影响 组织学分析表明 PDSW 对实验小鼠的脑、心、肺、肝、肾等器官均有保护作用,放大倍数为 × 400,结果显示:与正常对照组比较,PDSW 组脑、心、肺、肝、肾均无明显异常;而对照组脑组织可见神经元丧失及胶样变性,间质疏松,充血、水肿;心肌组织可见心肌出血,心肌细胞局灶溶解,部分脂肪变性;肺组织可见肺泡壁毛细血管充血,肺泡腔无渗出物;肝组织可见部分肝细胞浆中空泡,肝窦充血;肾脏组织可见肾小管坏死、水肿,血管球及间质充血和出血。见图 2。

2.3 45.0 °C 高温对实验组雄性小鼠肝组织 HSP72 表达的影响 饮用 PDSW 小鼠在经历 45.0 °C 高温后,肝组织 HSP72 表达明显比对照组增强,两组比较差异有统计学意义($P = 0.017$)。见图 3。

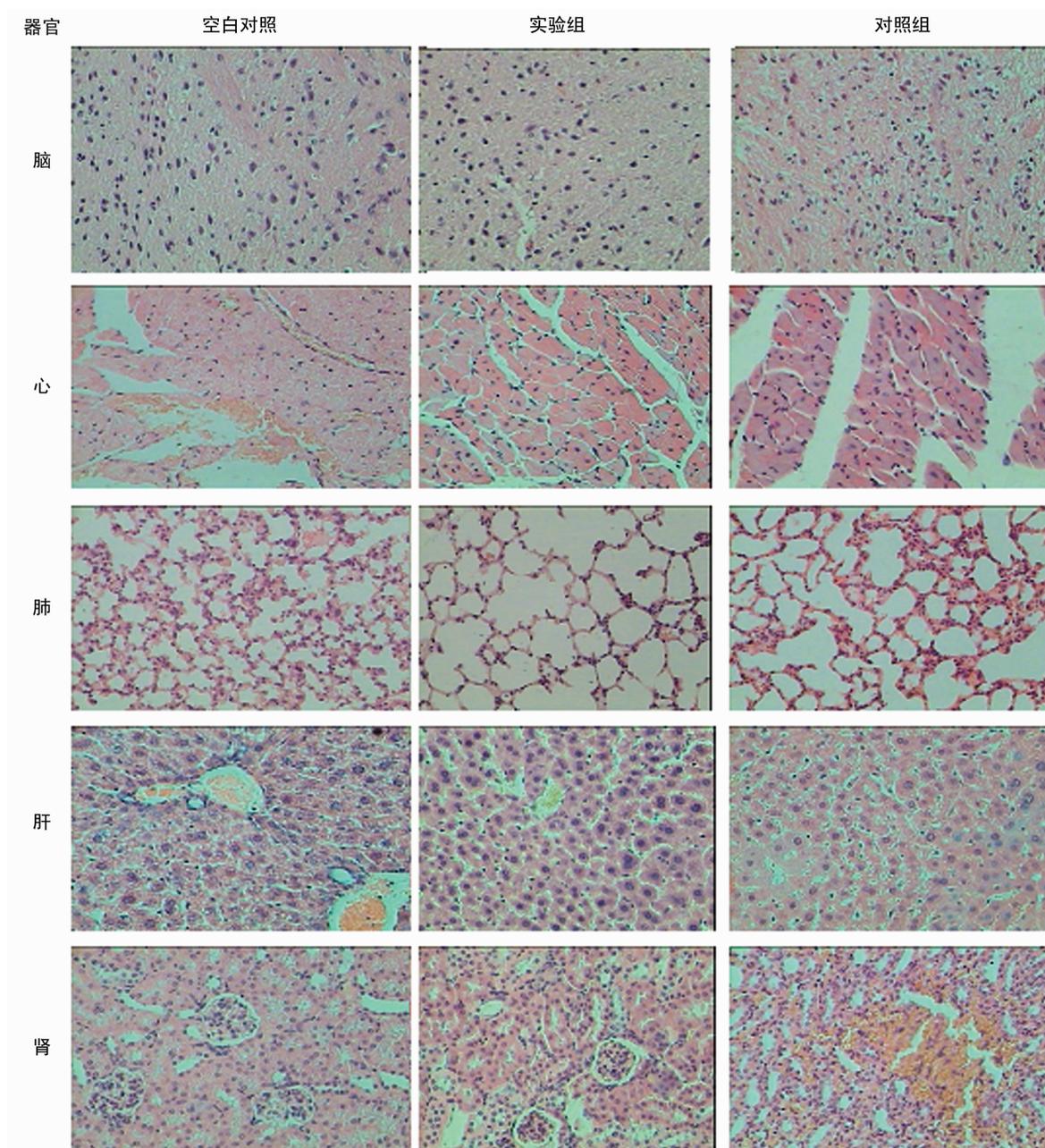


图 2 各组小鼠经历 45.0 °C 高温后各重要器官的组织学表现 (×100)

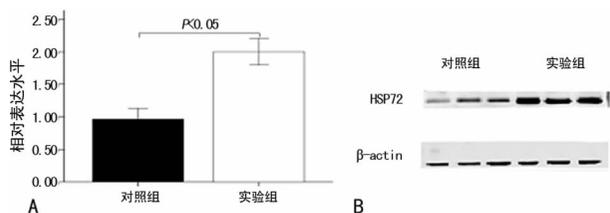


图 3 经历 45.0 °C 高温后各组小鼠肝组织 HSP72 表达情况

3 讨论

全身热疗是指通过使用各种方式设法使体温升高并维持在 39.5~41.5 °C 数小时的一种热疗方法,它作为肿瘤出现广泛转移时的一种治疗被使用,正越来越受到肿瘤治疗学家的关注^[3]。

正因为全身热疗治疗肿瘤的作用显著,目前已成功应用于

中晚期胃癌^[4]、胰腺癌^[5]、卵巢癌^[6]和黑色素瘤^[7]等的治疗,取得了令人鼓舞的结果。当然,全身热疗在发挥治疗作用同时也存在一些不足之处^[8]。(1)全身性生理变化:全身加热可使体温达到 41.0~43.0 °C,对机体将造成一定的影响。由于全身加热皮肤血流量、血液容积的增加,可引起高血压、心律加快、心率不齐等循环系统的改变。可能发生的并发症包括肺水肿、呼吸性酸中毒、消化道反应(恶心、呕吐、腹泻)以及热疗后短时间高热。(2)需要全身麻醉:由于人体皮肤对加热的耐受性难以达到在清醒状态下接受治疗的可能,因此需要在麻醉状态下进行全身热疗,由此引发较高的皮肤烫伤率,对患者的管理造成不便。这些问题的存在,制约了全身热疗的推广应用。目前认为亚高温热疗可以增加局部血流和降低肿瘤乏氧程度,而且不良反应轻。而要使亚高温热疗(39.5~41.5 °C)达到高温热疗(41.5~43.0 °C)同样的效果,就必须延长治疗的时间达 3~6 min。时间延长以及高温对患者的耐受均是一个考验。

与表层海水比较,深层海水具有以下特点:低温、洁净性、富含平衡易吸收的微量元素、氧化还原水、pH 值呈弱碱性^[9]。饮用深层海水可纠正元素异常,恢复患者的 Ca/Mg 比例及 Al、Hg 和 Pb 水平^[10]。长期饮用深层海水可促进机体的元素平衡,例如其中的 Na 和 K 均衡有助于维持机体的酸碱平衡^[11];Ca 和 Mg 比例的适当对调节脂代谢及维持心血管系统的正常功能尤为重要^[12-13]。内皮细胞中的微量元素 Cu、Zn 和 Mn,通过 Cu/Zn-超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)和锰-SOD 形式,可发挥清除氧自由基的重要生理功能^[14]。饮用深层海水可以增加机体 Se 水平,Se 也是机体内一种强大的自由基清除剂^[11]。Se、Cu、Zn 和 Mn 这些元素在机体的损伤修复,以及提高机体的耐受力中具有重要意义。现代研究表明饮用富含矿物质的深层海水能加速 30 °C 下训练后疲劳恢复^[15]。本研究组李为明等^[16]的研究表明深层海水能改善酶的功能,减少小鼠的耗氧量,能明显增强小鼠的耐受力。此外,深层海水可显著提高小鼠胸腺、脾指数,增强巨噬细胞吞噬功能,促进脾淋巴细胞增殖,提高外周血 CD4⁺ 细胞百分含量及 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比例,增加血清 IgA、IgM 水平。因而,深层海水可增强小鼠机体的免疫功能^[17]。在小鼠创伤模型中,给予小鼠深层海水,可以促进小鼠创面的愈合^[18]。

本研究使用 PDSW 喂养 KM 小鼠 15 d,然后在 45.0 °C 高温环境下饲养,发现无论是雌性小鼠还是雄性小鼠,饮用 PDSW 组的昆明小鼠在 45.0 °C 高温下的生存时间比饮用自来水组的小鼠长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。并且雌性小鼠的生存时间要比雄性小鼠的生存时间长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。组织学分析表明 PDSW 对实验小鼠的脑、心、肺、肝、肾等器官均有保护作用。这些结果表明,PDSW 能够提高实验昆明小鼠对高温的耐受性。

文献报道,HSP72 可通过:(1)分子伴侣作用;(2)抑制细胞凋亡;(3)减轻氧自由基对细胞的损伤;(4)防止 Ca 超载,抑制 NF- κ B 的活化和 TNF- α 的产生,使再灌注后肝酶释放显著减少,从而保护肝细胞线粒体的完整性,防止细胞凋亡,从而减轻肝脏实质的缺血再灌注损伤^[19]。而高温可激活热休克因子 1(heat shock factor 1,HSF1),促进 HSP 基因的转录,使其高度表达,通过 HSP 起保护作用。本研究发现,实验组小鼠在经历 45.0 °C 高温后,肝组织 HSP72 表达明显比对照组小鼠增强,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。由此推测,饮用 PDSW 的昆明小鼠对 45.0 °C 高温的耐受增强是 HSP72 表达增加的结果,进一步的机制需要更多的研究来阐明。

参考文献

- [1] Tsuchiya Y, Watanabe A, Fujisawa N, et al. Effects of desalted deep seawater on hematologic and blood chemical values in mice[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2004, 203(3): 175-182.
- [2] 刘珈. 肿瘤热疗技术与临床实践[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2009: 243-250.
- [3] Hwang HS, Kim HA, Lee SH, et al. Anti-obesity and antidiabetic effects of deep sea water on ob/ob mice[J]. *Mar Biotechnol*, 2009, 11(4): 531-539.
- [4] Zhao C, Dai C, Chen X. Whole-body hyperthermia combined with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for the treatment of stage IV advanced gastric cancer[J]. *Int J Hyperthermia*, 2012, 28(8): 735-741.
- [5] Bakshandeh-Bath A, Stoltz AS, Homann N, et al. Preclinical and clinical aspects of carboplatin and gemcitabine combined with whole-body hyperthermia for pancreatic adenocarcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(8): 3069-3077.
- [6] Atmaca A, Al-Batran SE, Neumann A, et al. Whole-body hyperthermia (WBH) in combination with carboplatin in patients with recurrent ovarian cancer—a phase II study[J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 112(2): 384-388.
- [7] Jia D, Rao W, Wang C, Jin C, et al. Inhibition of B16 murine melanoma metastasis and enhancement of immunity by fever-range whole body hyperthermia[J]. *Int J Hyperthermia*, 2011, 27(3): 275-285.
- [8] 唐劲天, 洛小林, 朱京丽. 全身加温治疗的现状与展望[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2000, 9(2): 140-143.
- [9] Tsuchiya Y, Nakamura K, Sekikawa H, et al. Subacute effects of deep-sea water from the Japan Sea on blood examination values in mice[J]. *Environ Health Prev Med*, 2002, 7(5): 189-192.
- [10] Kimata H, Tai H, Nakagawa K, et al. Improvement of skin symptoms and mineral imbalance by drinking deep sea water in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS) [J]. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2002, 45(2): 83-84.
- [11] Hataguchi Y, Tai H, Nakajima H, et al. Drinking deep-sea water restores mineral imbalance in atopic eczema/dermatitis syndrome[J]. *Euro J Clin Nutr*, 2005, 59(9): 1093-1096.
- [12] Yoshioka S, Hamada A, Cui T, et al. Pharmacological activity of deep-sea water: examination of hyperlipemia prevention and medical treatment effect[J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(11): 1784-1787.
- [13] Chi CW. Dietary deep seawater and hepatic steatosis[J]. *J Chin Med Assoc*, 2013, 76(3): 121-122.
- [14] Katsuda S, Yasukawa T, Nakagawa K, et al. Deep-sea water improves cardiovascular hemodynamics in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic (KHC) rabbits [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(1): 38-44.
- [15] Hou CW, Tsai YS, Jean WH, et al. Deep ocean mineral water accelerates recovery from physical fatigue[J]. *J Int Soc Sports Nutr*, 2013, 10(1): 1-7.
- [16] 李为明, 崔进, 徐鹏远, 等. “深层海水”对小鼠耐受力的影响[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25(7): 826-829.
- [17] 李为明, 崔进, 徐鹏远, 等. “深层海水”对小鼠免疫功能的影响[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25(7): 903-906.
- [18] 李为明, 崔进, 徐鹏远, 等. 深层海水对小鼠创面愈合的促进作用[J]. *重庆医学*, 2014, 43(4): 462-464.
- [19] Mokuno Y, Berthiaume F, Tanimura Y, et al. Heat shock preconditioning inhibits CD4⁺ T lymphocyte activation in transplanted fatty rat livers[J]. *J Surg Res*, 2006, 135: 92-99.