基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0504-04

黄芪总黄酮对辐射损伤小鼠的防护作用研究

杨映雪[1],陈建业[2],赁中海[3],谭榜宪[4],唐恩洁[5],唐华英[2],王亚平[1]

(1. 重庆医科大学基础医学院组胚学教研室,重庆 400016; 2. 川北医学院应用技术研究所,南充 637000;3. 川北医学院附属医院检验科,南充 637000;4. 川北医学院附属医院放疗科,南充 637000;5. 川北医学院免疫学与微生物学教研室,南充 637000)

【摘 要】目的:研究黄芪总黄酮(Total flavonoids of astragalus,TFA)对受 ^{60}Co γ 射线损伤小鼠的辐射防护作用,为 TFA 的临床应用提供实验依据。方法:采用大剂量 ^{60}Co γ 射线一次性全身照射雌性昆明小鼠,制成放射损伤动物模型。小鼠在照射前 3 d 及照射后,以不同剂量的 TFA 连续灌胃 14 d,观察受致死剂量 ^{60}Co γ 射线照射小鼠的 30 d 存活率及生存时间长短。同时,在低剂量照射组检测用药后小鼠体重、外周血指标、脾脏指数的变化。用 HE 染色观察脾脏的病理学改变。结果:TFA 不仅能明显延长辐射损伤小鼠的平均存活天数,提高小鼠 30 d 存活率($P<0.05$);而且能显著降低辐射损伤小鼠外周血白细胞的下降幅度、缩短其恢复所需时间($P<0.05$);同时,TFA 还能促进小鼠脾重指数的恢复,减轻辐射对小鼠脾脏的损伤程度,促进造血灶增生,加快造血功能恢复。结论:TFA 具有较强的抗辐射作用,能显著提高受致死剂量 ^{60}Co γ 射线照射小鼠的存活率,降低辐射对小鼠外周血 WBC 和 PLT 及脾脏的损伤作用,其具体作用机制有待进一步深入研究。

【关键词】黄芪总黄酮;辐射损伤;辐射防护

【中国图书分类法分类号】R285.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-13

Research on the radioprotective effect of total astragalus flavonoids on the irradiated mice

YANG Ying-xue, et al

(*Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the radioprotective effect of TFA on the ^{60}Co γ-ray irradiated mice and provide an experimental basis for the clinical use of TFA. *Methods*: Normal female Kunming mice were intragastrically administered with TFA for 3days before exposure to lethal dose of ^{60}Co γ-ray radiation and then continuously administered with TFA for 11days. The 30-days survival rate and average life span of irradiated mice were estimated. Meanwhile the body weight, peripheral blood parameters, spleen indexes and the pathological changes of spleen were also observed in the sublethal dose irradiated mice. *Results*: TFA could not only increase the 30-days survival rate and the average survival days of dead mice($P<0.05$), but also could cut down significantly the descent extent of the peripheral blood WBC numbers and shorten the time of WBC restoration rapidly in γ-ray irradiated mice ($P<0.05$). Furthermore TFA could also promote the recovery of spleen index, decrease the damage of γ-ray on the spleen and promote the growth of hematopoietic cells and blood-producing function. *Conclusion*: TFA has significant anti-radiation effect and can effectively raise the survival rate of mice irradiated with a lethal dose of ^{60}Co γ-rays. It can also reduce the radiation injury of WBC and PLT as well as spleen in irradiated mice.

【Key words】Total flavonoids of astragalus; Radiation injury; Radioprotection

黄芪为豆科植物膜荚黄芪的根,黄芪总黄酮(Total flavonoids of astragalus,TFA)是黄芪的主要活性有效成分之一,具有抗氧化、抗肿瘤、抗突变等多种生物学功能[1-3]。临床放疗是治疗恶性肿瘤的有效方法之一,但常常引起放射损伤等副作用。常见的放射损伤如直接接触射线、肿瘤放疗等均与电离辐射导致大量自由基产生有关[4],后者可诱发细胞生物大分子及膜脂质过氧化,造成机体多系统器官损伤。本实验拟采用 ^{60}Co γ 射线对小鼠进行一次性大剂量全身照射,观察 TFA 对 γ 射线损伤小鼠的防护作用,研究 TFA 的抗放射机理,为辐射防护剂新药的开发和临床应用提供可靠的实验依据。

作者介绍:杨映雪(1972-),女,硕士,研究方向:组织工程与细胞工程。现工作单位:川北医学院应用技术研究所。

通讯作者:王亚平,男,教授,E-mail:ypwangcq@yahoo.cn。

基金项目:四川省科技厅重点项目(编号:05SG1859);四川省科技厅应用基础项目(编号:2006J13-031)。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 昆明种小鼠，雌性，体重 18~22 g，由川北医学院实验动物中心提供。

1.1.2 药品 TFA 由川北医学院应用技术研究所提供。按文献[5,6]方法提取，略加修改。药品经紫外分光光度法检测，结果与文献[6,7]报道相符。用前以 0.5%羧甲基纤维素钠（CMC-Na）配成所需浓度。

1.1.3 照射条件 采用 ^{60}Co γ 射线源（川北医学院附属医院放疗科钴源室 GWGP80 型 ^{60}Co 治疗机），源距 75 cm，照射面积 20 cm × 20 cm，对受试小鼠进行一次性全身照射。吸收剂量率为 73.9c Gy/min，受照射小鼠生存期和存活率试验吸收剂量为 7.5 Gy，其余试验吸收剂量为 5.0 Gy。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将实验小鼠按体重随机分成 5 组，每组 20 只，组间无差异（$P>0.05$）：正常对照组（N_1 组），不灌胃，不照射；灌胃对照组（N_2 组），用 0.5%羧甲基纤维素钠 0.5 ml/ 只灌胃，不照射。照射组（R 组，在小鼠生存期和存活率试验中以 R_H 表示，其余试验中用 R_L 表示），γ 射线照射 +0.5%羧甲基纤维素钠 0.5 ml/ 只灌胃。低剂量 TFA 保护组（T_L 组），γ 射线照射＋TFA 75 mg/kg 灌胃；高剂量 TFA 保护组（T_H 组），γ 射线照射＋TFA 150 mg/kg 灌胃。

1.2.2 实验处理 小鼠于照射前给药 3 d，照射后给药 11 d，连续灌胃给药 14 d。观察并记录受 7.5 Gy 照射小鼠的生存期和存活率；受 5.0 Gy 照射小鼠于照后第 6 d 及 16 d 检测外周血 WBC 和 PLT，并测定脾脏脏器指数，同时 HE 染色观察脾脏组织的病理学改变。

1.3 统计学分析

实验数据用 SPSS10.0 软件进行统计学分析，所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据用方差分析，然后再进行多个样本间的比较。

2 实验结果

2.1 体征变化

受 7.5 Gy ^{60}Co γ 射线照射 2~7 d 后，TFA 保护组小鼠运动活跃，毛色光泽，食欲无明显下降，无松脱毛和死亡现象；单纯照射组小鼠行动迟缓，毛色粘滞，食欲不振，松毛脱毛，便稀，部分鼠死亡。

2.2 生存期和存活率

至实验结束时，各实验组小鼠的 30 d 生存期（d）分别是：N_1 与 N_2 组均为 30.0 ± 0.0；R_H 组为 21.6 ± 8.1；T_L 组和 T_H 组分别为 27.6 ± 7.2 与 27.6 ± 5.1。TFA 保护组小鼠生存期明显高于单纯照射组，两者相比差异非常显著（$P<0.01$）（见表 1）；而药物保护组不同给药剂量之间无统计学差异。各组小鼠 30 d 存活率分别为：N_1、N_2 组为 100%，R_H 组为 40%，T_L 组和 T_H 组均为 80%。可见，TFA 不仅能够大大提高受致死剂量 ^{60}Co γ 射线照射小鼠的生存期，而且能够显著提高小鼠的存活率，显示出强大的抗辐射作用。

2.3 体重变化

各实验组小鼠在照射前体重均呈直线上升，用 5.0 Gy ^{60}Co γ 射线照射后各照射组小鼠体重均明显下降，其中单纯照射组小鼠体重降低最显著，在照射后第 15 d 出现低谷，以后体重缓慢回升。各药物保护组小鼠照射后体重虽也下降，但降幅明显小于单纯照射组，在照射后第 15 d 亦出现低谷，但谷底均显著高于单纯照射组，以后各药物保护组小鼠体重显逐渐增加之势（见图 1）。实验结束时，对照组（N_1 与 N_2）及高剂量黄酮保护组（T_H）小鼠体重均较实验开始时显著增加（$P<0.05$），但两者间无明显差异（$P>0.05$）；而给药组小鼠体

表 1 TFA 对辐射损伤小鼠 30 d 存活率及平均生存期的影响

组别	平均存活时间（d）	30 d 存活率（%）
N_1	30.0 ± 0.0	100
N_2	30.0 ± 0.0	100
R_H	21.6 ± 8.1	40
T_L	27.6 ± 7.2*	80
T_H	27.6 ± 5.1*	80

注：* 与 R_H 组比较 $P<0.01$

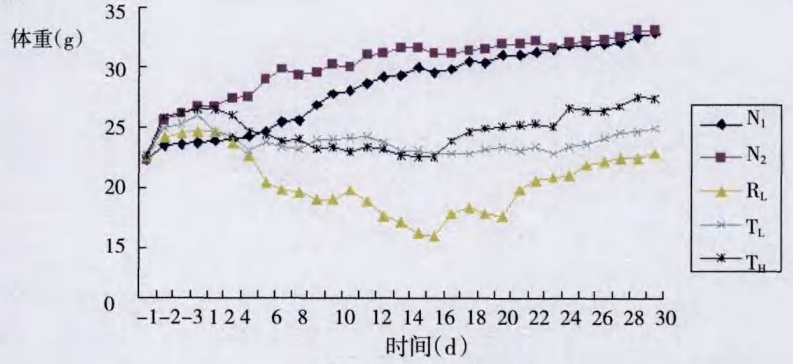


图 1 平均体重变化曲线

重平均增加值大大高于单纯照射组,两者之间的差异非常显著($P<0.05$)(见表 2)。

2.4 外周血象变化

经 5.0 Gy ^{60}Co γ 射线照射后,各照射组小鼠的 WBC 计数均显著降低,与 N_1、N_2 组比较差异非常明显($P<0.01$)。照后 6 d,R_L 组小鼠的 WBC 计数显著低于 T_H 组($P<0.05$)。照射后 16 d,各照射组小鼠外周血 WBC 计数虽呈回升趋势,但 R_L 组小鼠的 WBC 增殖速度仍显著低于 T_H 组($P<0.05$)。但在 PLT 计数上,R_L、T_L、T_H 各组间的差异无统计学意义(见表 3)。

2.5 脾重指数及脾结节计数

照射后 16 d 处死小鼠称取体重和脾重,计算脾重指数。结果显示,R_L 组和 T_L 组小鼠的脾重指数均低于 N 组,但无显著差异;而 T_H 组小鼠脾重指数则显著高于 R_L 组($P<0.05$)(见表 4)。结果表明,高剂量 TFA 能显著提高受照射小鼠脾脏指数,减轻辐射对小鼠脾脏的损伤,促进造血功能的恢复。

小鼠脾结节数于照射后明显增多,T 组(T_L 和 T_H)与 R_L 组比较有显著差异($P<0.05$)(见表 4)。提示 TFA 可促进小鼠造血组织中存活的脾集落生成单位(Colony-forming unit-spleen,CFU-S)迁移、增殖形成内源性脾结节,从而促进髓外造血,加快造血功能的恢复。

2.6 脾脏病理学观察

病理学观察显示,正常小鼠脾脏表面光滑无脾结节生成;γ 射线照射后,小鼠脾脏萎缩、表面可见白色的脾结节突起,但 TFA 保护组小鼠在照射后脾结节生成数量明显多于单纯照射组。正常小鼠脾脏组织切片 HE 染色后在显微镜下可见少量造血细胞,辐射损伤小鼠由于造血组织在不同程度上受到破坏或抑制,脾脏内残存的部分造血干/祖细胞可出现代偿性增生。照射后 16 d,TFA 保护组小鼠造血细胞增生活跃,各系统造血细胞比例及形态较单纯照射组多且增殖活跃(见图 1~3)。

3 讨 论

黄芪为多年生草本植物,味甘温、归肺脾,具有补气固表、利尿托毒、排脓止痛、敛疮生肌等多种药理作用。TFA 是黄芪的重要有效成份,具有抗损伤、抗突变、抗肿瘤和抑制动脉粥样硬化等多种生物学效应。本课题组曾以黄芪、灵芝、绿茶等为主要原料制成护生宝口服液,结果发现护生宝口服液具有明显的抗辐射作用[8]。提示黄芪在其中具有重要功能。

本实验采用溶剂萃取、柱层析纯化分离得到 TFA,研究

表 2 TFA 对受照射小鼠体重的影响

组别	照射前	照射后 30 d	平均增加值
N_1 组	22.25 ± 2.42	30.80 ± 4.14	8.45 ± 4.91
N_2 组	22.20 ± 1.86	33.00 ± 2.98	10.80 ± 4.26
R_L 组	22.60 ± 2.50	22.75 ± 1.71	0.13 ± 2.25*
T_L 组	22.65 ± 2.49	24.80 ± 3.60	2.00 ± 2.95*
T_H 组	22.65 ± 2.86	27.25 ± 5.26	4.88 ± 3.91*

注:* 与 R_L 组比较 $P<0.05$

表 3 TFA 对受照射小鼠外周血 WBC 和 PLT 的影响

组别	照射后天数	WBC(10^9 个 /L)	PLT(10^9 个 /L)
N_1 组	照后 3 d	11.20 ± 3.10	-
N_2 组		10.30 ± 1.92	-
R_L 组		1.40 ± 0.27*	-
T_L 组		1.70 ± 0.38*	-
T_H 组		1.80 ± 0.85*	-
N_1 组	照后 6 d	13.98 ± 1.57	900.60 ± 340.58
N_2 组		11.64 ± 1.31	672.60 ± 146.64
R_L 组		2.10 ± 0.58	314.80 ± 105.27
T_L 组		3.32 ± 0.64	374.00 ± 184.02
T_H 组		3.52 ± 0.38*	561.20 ± 297.66
N_1 组	照后 16 d	15.43 ± 2.58	1 077.50 ± 698.38
N_2 组		12.30 ± 1.81	906.00 ± 354.05
R_L 组		3.68 ± 1.05	476.20 ± 228.03
T_L 组		5.20 ± 1.18	489.60 ± 150.84
T_H 组		5.36 ± 2.09*	761.60 ± 168.30

注:*与 N 组比较 $P<0.01$;* 与 R_L 组比较 $P<0.05$

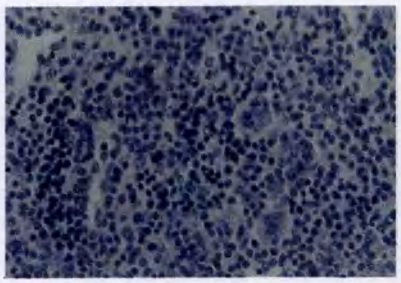


图 2 正常小鼠脾脏组织（×400）

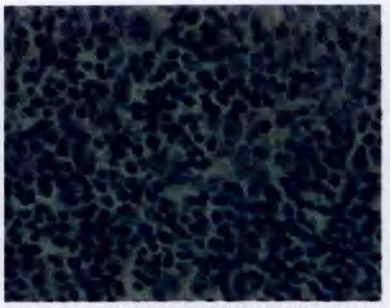


图 3 γ 射线照射小鼠脾脏组织（×400）

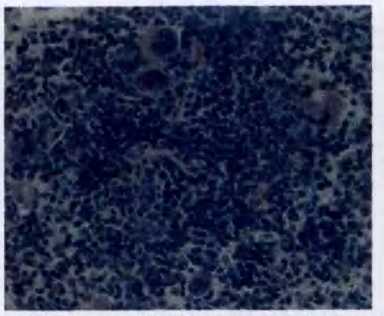


图 4 TFA 对 γ 射线照射小鼠脾脏的影响（×400）

表 4 TFA 对受照射小鼠脾重指数及脾结节计数的影响

组别	脾重指数	脾结节数(CFU-S)
N_1	0.004 1 ± 0.001 1	0
N_2	0.005 0 ± 0.002 1	0
R_H	0.003 6 ± 0.002 3	5.77 ± 2.05
T_L	0.003 8 ± 0.002 3	13.56 ± 6.34*
T_H	0.005 7 ± 0.002 9*	18.98 ± 8.43*

* 与 R_L 组比较，$P<0.05$

发现 TFA 具有明显的抗辐射作用，能显著提高受致死剂量 ^{60}Co γ 射线照射小鼠的平均存活天数，延长其生存期，存活率提高约 40%，说明 TFA 对受致死剂量 γ 射线照射小鼠具有较明显的辐射防护作用。进一步研究发现 TFA 还能降低辐射对小鼠外周血 WBC 的损伤程度：在照射后高剂量 TFA 组的 WBC 数明显高于单纯照射组，说明 TFA 对辐射造成的外周血 WBC 减少有一定的防护作用，可促进 ^{60}Co γ 射线损伤小鼠外周血 WBC 的恢复。与单纯照射组比较，高剂量 TFA 组还能明显提高受照射小鼠脾脏器指数，增加脾脏表面脾结节数。1 个脾结节表示 1 个脾集落生成单位（CFU-S），是由 1 个造血干细胞（Hematopoietic stem cell，HSC）增殖分化而来。HSC 是产生各系血细胞的原始祖细胞，是维持机体正常造血功能、促进放射损伤后造血重建的关键细胞。1 个脾集落内包含了不同分化等级的各种造血祖细胞群体，如红细胞系、粒细胞巨噬细胞系、巨核细胞系及淋巴细胞系或三者混合的细胞系群体等。脾脏组织切片显示：正常脾脏组织可见少量造血细胞，辐射损伤小鼠脾脏的造血细胞明显增多，而 TFA 保护组小鼠的造血细胞增生更加明显，各系统造血细胞比例及形态较单纯照射组多且增殖活跃。正常机体的造血系统更新活跃，增殖旺盛，具有很高的辐射敏感性。辐射损伤小鼠的外周血 WBC、PLT 数明显下降，主要原因是造血组织受到辐射破坏，外周血造血干细胞受到了明显抑制。机体受照后，造血细胞因凋亡坏死而数量急剧减少，部分残存的具有增殖分裂能力的造血干细胞可从骨髓迁移到脾脏形成集落[9]。脾脏作为小鼠的造血组织终身具有造血功能，当机体受到照射损伤时，残存的具有增殖分裂能力的造血干细胞在脾脏中代偿性增殖形成脾结节。脾结节数量的多少反映了造血干细胞的功能及相对数量，与骨髓中具有增殖分裂能力的造血干细胞数量呈现良好的线性关系。在我们的实验中，TFA 能使放射损伤小鼠外周血 WBC 数增多、脾脏指数和脾结节数增加，推测可能是由于 TFA 通过清除辐射产生的自由基[10-12]，一方面减少辐射造成的骨髓造血细胞的凋亡和坏死，另一方面可能减少了辐射对造血干细胞增殖能力的损害。这些结果为 TFA 抗放射机理的进一步研究，为抗放射中药有效成份的筛选、开发与应用研究提供了有意义的实验资料。

参 考 文 献

[1] 汪德清，沈文梅，田亚平，等.黄芪的三种提取成分对氧自由基作用的影响[J].中国药理学通报，1994，10(2)：129-132.

[2] 汪德清，沈文梅，田亚平，等.黄芪总黄酮对 γ 射线所致 V79 细胞 DNA 链断裂损伤防护作用的实验研究[J].中华放射医学与防护，1995，15(2)：106-107.

[3] 汪德清，田亚平，宋淑珍，等.黄芪总黄酮抗突变作用实验研究[J].中国中药杂志，2003，28(12)：1164-1167.

[4] 方允中，郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M].北京：科学出版社，2002，709.

[5] 汪德清，房征宇，沈文梅，等. 黄芪总黄酮抗紫外线损伤作用的实验研究[J].劳动医学，1998，15(4)：200-202.

[6] 吕归宝，吕曙华，张国庆，等. 黄芪中黄酮类似物的分离鉴定[J]. 中草药，1984，15(10)：452-454.

[7] 王志学，马启凤，何 群，等. 黄芪化学成分的研究[J]. 中草药，1983，14(3)：97-99.

[8] 陈建业，曾益新，陈小君，等. 护生宝口服液对辐射的防护作用研究[J]. 中华放射医学与防护杂志，2000，20(4)：273-275.

[9] 吴德昌，陈家佩，毛秉智. 放射医学[M]. 北京：军事医学科学出版社，2001.16，70-76.

[10] Torel T，Cillard J，Cillard P，et al. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radica1[J].Phytochemistry，1986，25：383-385.

[11] 宋立华，蔡东联，陈小莉. 大豆异黄酮对小鼠辐射损伤的防护效果[J]，营养学报，2005，27(2)：134-138.

[12] 郭 喆，吕秋军，郭建平. 葛根黄酮的辐射防护及其机制的研究[J].中华放射医学与防护杂志，2006，26(12)：579-582.

（责任编辑：冉明会）