

## 黄芪等5种中药对小鼠辐射损伤防护作用的实验研究

白崇智<sup>1,2</sup>, 仲启明<sup>2</sup>, 武玉鹏<sup>2</sup>, 贾力莉<sup>2</sup>, 牛艳艳<sup>2</sup>, 冯玛莉<sup>2\*</sup> (<sup>1</sup>山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西大学生物技术研究所, 山西太原 030006; <sup>2</sup>山西省中医药研究院, 山西太原 030012)

[关键词] 中药; 辐射; 免疫调节

[中图分类号] R392.12, R285.5, R979.5, X591

[文献标志码] B

随着核工业和放射医学的快速发展, 电离辐射对人体的损伤越来越受到重视。大剂量的辐射对人体各系统均有损伤, 其中造血系统和免疫系统最为敏感。电离辐射为非特异性刺激, 作用于机体引起器官、组织、淋巴细胞最终导致免疫系统功能下降<sup>[1]</sup>。由于造血系统和免疫系统对电离辐射极为敏感, 在辐射防护中增强对造血系统和免疫系统的保护是非常必要的。中医药在辐射损伤的防治中具有一定的作用<sup>[2]</sup>。本实验采用<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线对小鼠进行一次性大剂量全身照射, 观察具有调节免疫功能的5种中药黄芪、熟地、枸杞子、女贞子、菟丝子对辐射损伤小鼠的防护作用, 探讨5种中药的抗辐射机制, 为辐射防护剂新药的开发提供一定的实验依据。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 黄芪、熟地、枸杞子、女贞子、菟丝子: 由山西省中医院药房提供, 经山西省药品检验所标本室高天爱主任药师鉴定黄芪为豆科植物药用黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的根; 熟地为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根加黄酒进一步炮制加工而成; 枸杞子为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barba rum* L. 的干燥成熟果实; 女贞子为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实; 菟丝子为旋花科南方菟丝子 *Cuscuta australis* R. Br. 的干燥种子。流式细胞抗体: PC5 标记的抗大鼠 CD3 抗体、FITC 标记的抗大鼠 CD4 抗体、PE 标记的抗大鼠 CD8 抗体均为 Biologend 公司产品。雌性昆明种小白鼠, 体质量 20~24 g, 由山西省中医药研究院实验动物室提供, 符合 GB14922-94 II 级标准, 合格证号: 晋动(证)字第 A00-001 号。FC500 流式细胞分析仪、Q-Prep 溶血仪为贝克曼公司产品; BP-310P 电子天平为赛多利斯公司产品; ABC Vet-ICHOR 动物血球计数仪为 ABC 公司产品; 由中国辐射防护研究院辐照室施行<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线照射。

### 1.2 方法

**1.2.1 中药水煎剂溶液的制备** 称取中药饮片 50 g 置砂锅

中, 加 10 倍量水浸泡过夜, 加热至沸, 改用文火煎煮 30 min, 趁热滤过, 滤渣另加 8 倍量水, 同法煎煮 30 min, 滤过, 合并 2 次滤液于烧杯中<sup>[3]</sup>, 水浴浓缩后放凉至室温, 100 mL 容量瓶定容, 倒入输液瓶中, 盖薄膜, 压胶塞和铝盖, 高压灭菌(表压 0.7 kg/cm<sup>2</sup>、115℃、30 min), 取出放凉备用, 得每 1 mL 相当于原药材 0.5 g(1:1)的中药水煎剂溶液。

**1.2.2 分组与给药** 小鼠随机分为正常对照组、模型对照组、黄芪组、熟地组、枸杞子组、女贞子组、菟丝子组, 共 7 组, 每组 10 只, 雌性。将黄芪溶液、熟地溶液、枸杞子溶液、女贞子溶液、菟丝子溶液稀释为 0.33 g/mL, 给药容积 10 mL/kg, 正常对照组和模型对照组给予等容积蒸馏水。灌胃每日 1 次, 连续 14 d。

**1.2.3 辐射损伤模型的制备** 以上各组灌胃第 7 天, 除正常对照组外, 其余各组均施行 1 次性<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线全身照射, 吸收总剂量为 4 Gy, 剂量率为 1 Gy/min, 照射时间 4 min。

**1.2.4 血常规检测** 照射造模后第 7 天, 称取每只小鼠体质量, 进行眼球取血, 加入 EDTA 钠盐抗凝管中, 动物血球仪自动检测。

**1.2.5 免疫、造血器官指标检测** 称取每只小鼠体质量, 摘取胸腺、脾脏, 电子天平称质量, 以胸腺或脾脏质量与体质量之比作为胸腺或脾脏指数。

**1.2.6 外周血 T 淋巴细胞亚群分析** 照射造模后第 7 天, 进行眼球取血, 加入 EDTA 钠盐抗凝管中, 按照生产商推荐的荧光团标记的单克隆抗体试剂剂量, 与 100  $\mu$ L 全血, 混匀, 置室温避光孵育 15 min。经溶血仪处理后, 采用 BECKMAN COULTER FC500 流式细胞仪检测分析 T 淋巴细胞百分率<sup>[4]</sup>。

**1.2.7 统计学分析** 所有数据采用 SPSS 11.5 软件包进行分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异用  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

模型对照组白细胞(WBC)和血小板(PLT)显著低于正常对照组( $P < 0.01$ ), 各给药组 WBC 比模型对照组 WBC 显著升高( $P < 0.01$ ); 熟地组和黄芪组

收稿日期: 2013-04-16; 接受日期: 2013-05-08

基金项目: 山西省科技厅实验动物专项 2011(K04); 国家科技支撑计划(2011BA107B01)

作者简介: 白崇智(1982-), 男, 山西大同人, 博士研究生

Tel: 0351-4174328; E-mail: ichanger@163.com

\* Corresponding author, 冯玛莉, E-mail: fengmali\_1@163.com

PLT比模型对照组PLT显著升高( $P < 0.01$ ),其他中药组PLT比模型组PLT升高( $P < 0.05$ )。黄芪组和熟地组对辐射所致WBC和PLT的损伤具有较好的保护和促进恢复作用(表1)。

表1 不同单味中药对血常规影响( $\times 10^9/L$ ,  $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	WBC	PLT
正常对照	5.36 ± 1.00 <sup>b</sup>	387.0 ± 29.7 <sup>b</sup>
模型对照	0.98 ± 0.48	42.0 ± 13.6
黄芪	3.80 ± 0.86 <sup>b</sup>	280.4 ± 26.0 <sup>b</sup>
熟地	3.18 ± 0.93 <sup>b</sup>	223.2 ± 54.3 <sup>b</sup>
枸杞子	2.58 ± 0.18 <sup>b</sup>	166.4 ± 45.1 <sup>a</sup>
女贞子	2.78 ± 1.09 <sup>b</sup>	132.4 ± 28.0 <sup>a</sup>
菟丝子	3.32 ± 0.45 <sup>b</sup>	178.0 ± 24.9 <sup>a</sup>

\* $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 模型对照组。

照射后模型组胸腺指数和脾指数比正常组均降低( $P < 0.05$ ),黄芪组胸腺和脾指数比模型对照组胸腺和脾指数显著升高( $P < 0.05$ ),其余各给药组胸腺指数和脾指数与模型对照组相比,无明显变化(表2)。

表2 不同单味中药对大鼠胸腺、脾指数的影响

组别	( $\times 10^{-2}$ , $n=10$ , $\bar{x} \pm s$ )	
	胸腺指数	脾指数
正常对照	3.21 ± 0.91	2.89 ± 0.82
模型对照	2.05 ± 0.97	2.24 ± 0.53
黄芪	2.72 ± 0.50 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.89 <sup>a</sup>
熟地	2.01 ± 0.86	2.26 ± 0.71
枸杞子	2.06 ± 0.99	2.28 ± 0.81
女贞子	2.31 ± 0.74	2.43 ± 0.77
菟丝子	2.24 ± 0.80	2.15 ± 0.75

\* $P < 0.05$  vs 模型对照组。

照射后模型对照组CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞比正常组CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞显著降低( $P < 0.01$ ),模型组比正常组CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T细胞比值降低( $P < 0.05$ ),提示模型组CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞受损严重。各给药组与模型组比较,黄芪组CD4<sup>+</sup>T细胞增加明显( $P < 0.01$ ),其他各组无显著性差异( $P > 0.05$ ),CD8<sup>+</sup>T细胞均无明显变化( $P > 0.05$ ),CD4<sup>+</sup>T细胞/CD8<sup>+</sup>T细胞有增加趋势,黄芪组有显著性差异( $P < 0.05$ ,表3)。

表3 不同单味中药对小鼠外周血T淋巴细胞亚群的影响

组别	(n=10, $\bar{x} \pm s$ )		
	CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
正常对照	50.5 ± 3.7 <sup>b</sup>	21.2 ± 5.1 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.74 <sup>a</sup>
模型对照	29.3 ± 3.7	24.7 ± 5.4	1.25 ± 0.26
黄芪	44.9 ± 3.9 <sup>b</sup>	27.2 ± 1.9	1.63 ± 0.16 <sup>a</sup>
熟地	30.2 ± 5.3	24.5 ± 7.6	1.25 ± 0.21
枸杞子	31.6 ± 6.9	20.6 ± 2.3	1.55 ± 0.27
女贞子	29.4 ± 11.1	27.7 ± 3.0	1.07 ± 0.54
菟丝子	32.4 ± 4.2	21.1 ± 2.2	1.52 ± 0.39

\* $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 模型对照组。

### 3 讨论

电离辐射能引起造血系统、免疫系统和淋巴系统严重损伤,经不同剂量射线照射后,小鼠外周血、胸腺、脾脏和淋巴组织中的淋巴细胞出现大量凋亡<sup>[5]</sup>。本实验室前期筛选5种浓度为0.33 g/mL中药水煎液,对辐射损伤小鼠进行研究,实验结果显示,与正常组比较,一次性接受<sup>60</sup>Coγ射线照射7d后的模型组小鼠,外周血象WBC、PLT计数显著下降,与文献报道一致,可作为放射损伤模型。与模型组比较,各给药组小鼠外周血WBC、PLT计数显著升高,其中黄芪和熟地效果较为明显,表明黄芪、熟地对辐射引起的外周血WBC、PLT损伤有较好的防治作用。

脾脏是人体重要的造血器官,受到辐射后,脾脏受损、造血障碍,对全身有着重要影响。胸腺是机体的中枢免疫器官,照射后受到破坏而且损伤严重,造成淋巴细胞数下降<sup>[6]</sup>,可引起机体免疫功能低下,易诱发各种感染。本研究实验结果显示,与正常组比较,模型组小鼠胸腺、脾指数显著降低;与模型组比较,黄芪组小鼠两器官指数显著升高,表明黄芪对重要脏器胸腺、脾的辐射损伤也有较好的保护作用,与其他具有单一性的防护药物相比,体现出黄芪对辐射损伤具有多方面防治的综合作用。

辐射早期外周血淋巴细胞亚群数量明显下降<sup>[7]</sup>。T淋巴细胞是一类对放射敏感的细胞群体,放射损伤常以T淋巴细胞作为重要参考指标。本研究中,4 Gy的<sup>60</sup>Coγ射线照射小鼠可使小鼠CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞数量明显下降,提示<sup>60</sup>Coγ射线照射可造成机体细胞免疫功能受损。T淋巴细胞是人体内重要的免疫活性细胞,CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞2个亚群在T细胞的活化过程中发挥重要功能,同时也是鉴定T细胞亚群的重要表面标志<sup>[8]</sup>。CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T细胞的比值能够作为机体免疫系统是否维持一个“平衡状态”的重要指标。本研究结果表明,较模型对照组相比,灌服黄芪水煎液可显著增加受照射小鼠外周血CD4<sup>+</sup>T细胞和CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值,而CD8<sup>+</sup>T亚群水平无显著性差异,表明黄芪组CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞亚群比例维持在一个低水平的“平衡状态”,这与中医“平衡阴阳”的观点有相似处。从细胞计数的宏观角度评价,具有一定疗效,从分子水平微观分析,是否存在这种调节“平衡”的作用,这种“平衡”作用的分子机制还有待进一步研究。

本研究显示,黄芪、熟地等水煎液对辐射引起的造血系统、免疫系统和淋巴系统重要脏器的损伤具有一定的防护作用。辐射防护涉及细胞、组织和器

官的修复,分子途径涉及阻止 DNA 断裂,抑制细胞凋亡、细胞间干预、诱导细胞释放炎症因子等因素<sup>[9-12]</sup>,有大量的文献报道黄芪中有效活性物质黄芪甲苷在体内外都有抑制细胞凋亡作用<sup>[13]</sup>,具体分子机制还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Rehani MM. Challenges in radiation protection of patients for the 21st century[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2013, 200(4): 762-764.
- [2] 刘智勤,陈鹤汀,李岩,等.肉苁蓉对化疗荷瘤小鼠造血和免疫功能的影响[J].*北京中医药大学学报*, 2010, 33(11): 758-761.
- [3] 王璟.如何煎制中药汤剂[J].*首都医药*, 2000, 7(2): 55-55.
- [4] 左连富.流式细胞术与生物学[M].沈阳:辽宁科学技术出版社, 1996: 68-385.
- [5] 崔其芳,丁彦青,徐茵.致死剂量的 $\gamma$ 线照射后小鼠胸腺淋巴细胞的凋亡规律与 bax、bcl-2 和 Bcl-XL 表达的关系[J].*细胞与分子免疫学杂志*, 2004, 20(6): 750-753.
- [6] 吴德昌.放射医学[M].北京:军事医学科学院出版社, 2001, 6: 85-88.
- [7] 陈素梅,包永星,纪卫政.不同剂量 x 线照射对小鼠免疫功能损伤的动态观察研究[J].*农垦医学*, 2007, 29(3): 182-184.
- [8] Amanda LM, Vaiva V, Kimbedy D. Fully functional memory CD8 T cells in the absence of CD4 T cells[J]. *J Immunol*, 2004, 1(73): 969-975.
- [9] Bin X, Ya JL, Xi BZ, et al. Mechanism of the protective effect of phenylephrine pretreatment against irradiation-induced damage in the submandibular gland[J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(1): 19-24.
- [10] Liao Q, Zhang HM, Li HH, et al. A preliminary study on the radiation-resistance mechanism in ovarian cancer[J]. *J Cancer Res Ther*, 2013, 9(1): 22-24.
- [11] Zhou ZR, Zhu XD, Zhao W, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the mechanism of irradiation-induced CNE-2 human nasopharyngeal carcinoma cell autophagy and inhibition of autophagy contributes to the radiation sensitization of CNE-2 cells[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(6): 2498-2506.
- [12] Chen T, Chen M, Chen J. Ionizing radiation potentiates dihydroartemisinin-induced apoptosis of A549 cells via a caspase-8-dependent pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59827.
- [13] Ding KC, Yong PG, Feng W. Astragaloside IV, a novel antioxidant, prevents glucose-induced podocyte apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39824.
- 
- (上接 1051 页)
- [4] Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, et al. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers[J]. *Cardiology*, 2012, 122(1): 23-35.
- [5] 曾菊绒,胥晓丽,于晓江,等.压力负荷大鼠心肌重构与 TNF- $\alpha$  和 IL-10 表达的动态相关性研究[J].*细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(7): 699-708.
- [6] Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system[J]? *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(3): 176-189.
- [7] 陈晶.免疫调节治疗对老年心力衰竭患者心功能的影响分析[J].*中国医药指南*, 2012, 10(34): 544-545.
- [8] 杨杰,杨萍,怀淑君.免疫球蛋白对心梗后心衰血清 IL-6、TNF- $\alpha$  表达的影响[J].*中国老年学杂志*, 2011, 31(5): 790-792.
- [9] 杨杰,杨萍,怀淑君.免疫球蛋白对心梗后心衰大鼠心功能及非梗死区胶原的影响[J].*中国老年学杂志*, 2011, 31(6): 977-980.
- [10] Givvimani S, Kundu S, Narayanan N, et al. TIMP-2 mutant decreases MMP-2 activity and augments pressure overload induced LV dysfunction and heart failure[J]. *Arch Physiol Biochem*, 2013, 119(2): 65-74.
- [11] Halade GV, Jin YF, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: A proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation[J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 139(1): 32-40.
- [12] Heymans S, Lupu F, Terclavers S, et al. Loss or inhibition of uPA or MMP-9 attenuates LV remodeling and dysfunction after acute pressure overload in mice[J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(1): 15-25.
- [13] Yu H, Zhao G, Li H, et al. Candesartan antagonizes pressure overload-evoked cardiac remodeling through Smad7 gene-dependent MMP-9 suppression[J]. *Gene*, 2012, 497(2): 301-306.