

黄芪多糖与黄芪甲苷配伍对辐射损伤模型小鼠的保护作用^Δ

刘耀^{1*}, 石英^{1#}, 刘职瑞¹, 田志强², 夏培元¹ (1. 第三军医大学西南医院药剂科, 重庆 400038; 2. 第三军医大学全军免疫研究所, 重庆 400038)

中图分类号 R285;R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)03-0211-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.03.07

摘要 目的: 研究黄芪多糖与黄芪甲苷配伍对辐射损伤模型小鼠的保护作用。方法: 100只雌性ICR小鼠随机分为正常对照(等容生理盐水)组、黄芪多糖对照(80 mg/kg)组、黄芪甲苷对照(80 mg/kg)组、模型(等容生理盐水)组、黄芪多糖(80 mg/kg)组、黄芪甲苷(80 mg/kg)组与联合用药①、②、③、④(黄芪多糖80、40、20、80 mg/kg + 黄芪甲苷20、40、80、80 mg/kg)组。灌胃给药, 每天1次, 连续14 d。末次给药后小鼠接受⁶⁰Co γ射线(剂量: 5 cy)一次性全身辐射以复制辐射损伤模型。测定小鼠30 d存活率和死亡小鼠平均存活时间; 肝脏HE染色光镜下观察小鼠肝组织形态学; 测定小鼠外周血白细胞数、骨髓细胞DNA含量、血清超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果: 与正常对照组比较, 模型组小鼠30 d存活率降低, 死亡小鼠平均存活时间缩短; 小鼠肝细胞广泛肿胀, 出现大滴性脂肪变、气球样变, 肝细胞点状坏死严重, 炎症因子大面积浸润组织; 外周白细胞计数减少; 骨髓细胞DNA含量减少; 血清SOD活性减弱, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, 联合用药①、②、③、④组小鼠30 d存活率升高, 死亡小鼠平均存活时间延长, 外周白细胞计数增加, 骨髓细胞DNA含量增加, 小鼠肝细胞形态学明显改善; 联合用药①、②、③组小鼠血清中SOD活性增强, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结论: 黄芪多糖与黄芪甲苷配伍是通过多靶点发挥作用, 其中黄芪多糖与黄芪甲苷质量比为4:1时配伍效果最佳。

关键词 黄芪多糖; 黄芪甲苷; 配伍; 辐射保护作用

Protective Effects of Astragali Radix Polysaccharides Combined with Astragaloside IV against Radiation Injury Model Mice

LIU Yao¹, SHI Ying¹, LIU Zhi-rui¹, TIAN Zhi-qiang², XIA Pei-yuan¹ (1. Dept. of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Immunology Institute of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effects of Astragali Radix polysaccharides and astragaloside IV on radiation injury model mice. METHODS: 100 female ICR mice were randomized into normal control group (constant volume of normal saline), Astragali Radix polysaccharides control group (80 mg/kg), astragaloside IV control group (80 mg/kg), model group (constant volume of normal saline), Astragali Radix polysaccharides group (80 mg/kg), astragaloside IV group (80 mg/kg) and drug combination group I (Astragali Radix polysaccharides 80 mg/kg + astragaloside IV 20 mg/kg), drug combination group II (Astragali Radix polysaccharides 40 mg/kg + astragaloside IV 40 mg/kg) and drug combination group III (Astragali Radix polysaccharides 20 mg/kg + astragaloside IV 80 mg/kg) and drug combination group IV (Astragali Radix polysaccharides 80 mg/kg + astragaloside IV 80 mg/kg). They were given relevant medicine intragastrically once a day for consecutive 14 days. Radiation injury model was induced by disposable full-body exposure ⁶⁰Co γ ray (5 cy) after last administration. Survival rate of mice within 30 d and average survival duration of dead mice were determined. Hepatocyte morphology of mice was observed by HE staining. The number of peripheral blood leucocyte, DNA content of marrow cells and the activities of SOD in serum were determined. RESULTS: Compared with normal control group, the survival rate of model group within 30 d and average survival duration were decreased significantly. Hepatic cell swelling, large lipid drops fat denaturation and ballooning degeneration were observed, and severe spotty necrosis of hepatic cell and large area infiltration of inflammatory factor were also found. The peripheral blood leucocyte count, DNA content of marrow cells and the activities of SOD in serum were decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, 30 d survival rate of drug combination groups I, II, III and IV were increased significantly, and average survival duration of dead mice, peripheral blood leucocyte count and DNA content of marrow cells were increased significantly; hepatic cell morphology of mice was improved significantly. The activities of SOD in serum were increased significantly in drug combination group I, II and III ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: The compatibility of Astragali Radix polysaccharides and astragaloside IV can alleviate damage induced by irradiation by multi-target. Astragali Radix polysaccharides to astragaloside IV (mass ratio 4:1) are the most effective.

KEYWORDS Astragali Radix polysaccharides; Astragaloside IV; Compatibility; Radioprotective effect

随着核技术在工农业、医学生命科学等方面应用的迅速

Δ 基金项目: 军队“十二五”面上项目(No. CWS11J132)

* 主管药师, 博士。研究方向: 抗炎与抗感染药物药理。E-mail: liuyao@mmu@gmail.com

通信作者: 主管药师。研究方向: 天然药物。E-mail: swshiy@tom.com

发展, 人们与放射线接触的机会增多, 遭受辐射损伤的可能性也随之增加。长期以来, 人们曾试图寻找疗效可靠、价格低廉的抗放疗药物, 但均未奏效。近年来, 通过多成分多靶点协同发挥作用抗放疗的中草药越来越受到研究者的关注, 尤其是补虚类药物对免疫、造血等功能的改善报道较多, 但这些作用对辐照后机体的保护作用及其机制报道尚少。因此, 寻找防

治放射病安全有效的中草药无疑具有重要意义。

黄芪为中医临床重要的补气药,黄芪多糖和黄芪甲苷是其主要的活性成分^[1],具有显著的增强免疫、提升缺氧的耐受性、抗衰老和抗突变的活性^[2-5],但其对辐射损伤是否有保护作用鲜有报道^[6-7]。本研究旨在探索黄芪多糖和黄芪甲苷对辐射损伤的防护作用,并优化出配伍的最佳比例,为其临床合理应用提供一定的参考。

1 材料

1.1 仪器

BC-5800型全自动血细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);BX2型生物荧光显微镜(日本Olympus公司);21R型高速冷冻离心机(美国Beckman公司);680型酶标仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

黄芪多糖(批号:20100721,纯度:>70%)、黄芪甲苷(批号:20090912,纯度:>98%)均购自大连美仑生物科技有限公司;黄嘌呤氧化酶(美国Sigma公司);超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 动物

SPF级ICR小鼠100只,6~8周龄,♀,体质量18~22 g,由第三军医大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(渝)2012-0003]。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药

100只小鼠随机均分为10组,即正常对照(等容生理盐水)组、黄芪多糖对照(80 mg/kg)组、黄芪甲苷对照(80 mg/kg)组、模型(等容生理盐水)组、黄芪多糖(80 mg/kg)组、黄芪甲苷(80 mg/kg)组与联合用药①、②、③、④(黄芪多糖80、40、20、80 mg/kg+黄芪甲苷20、40、80、80 mg/kg)组。ig给药,每天1次,连续14 d。末次给药后采用⁶⁰Co γ射线(剂量:5 cy)全身一次性辐射,辐射距离为80 cm,时间为2.5 min,以复制小鼠辐射损伤模型。

2.2 30 d存活时间记录

辐射结束后,记录小鼠30 d存活数量和死亡小鼠平均存活时间。

2.3 小鼠肝组织形态学检测

按照常规方法进行HE染色,在光镜下观察小鼠肝细胞形态学变化。

2.4 外周血白细胞计数

分别于辐射前、辐射后第3天,3次在小鼠眼眶取血各20 μl,加入0.38 ml 1%的盐酸中混匀,用全自动血细胞分析仪测定外周血白细胞数。

2.5 骨髓细胞DNA含量测定

辐射后第3天,颈椎脱臼处死小鼠,剥离出股骨,除去软组织,以10 ml 5 mmol/L的CaCl₂将股骨中的骨髓细胞全部冲入离心管中,4℃放置30 min,以离心半径为8 cm、2 500 r/min离心15 min,弃上清,向沉淀物中加入10 ml 0.2 mol/L的HClO₄充分混匀,90℃加热15 min,冷却,以离心半径为8 cm、3 500 r/min离心10 min,取上清液200 μl加入96孔板中,以酶标仪测260 nm波长处光密度(OD)值。

2.6 SOD活性检测

辐射后第14天,小鼠称定质量后颈椎脱臼处死,股动脉取

血清,以黄嘌呤氧化酶法测定SOD活性。

2.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 16.0统计分析软件处理。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 联合用药对模型小鼠30 d存活率和存活时间的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠存活率降低,存活时间缩短,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,黄芪多糖组、黄芪甲苷组与联合用药①、②、③、④组小鼠存活率升高,存活时间延长,差异具有统计学意义($P < 0.01$),且以联合用药①组效果最好。联合用药对模型小鼠存活率和存活时间的影响见表1。

表1 联合用药对模型小鼠存活率和存活时间的影响($\bar{x} \pm s$)
Tab 1 Effects of drug combination on survival rate and survival duration of model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	存活只数	存活率,%	存活时间,d
正常对照组	10	10	100	30.0±0.00
黄芪多糖对照组	10	10	100	30.0±0.00
黄芪甲苷对照组	10	10	100	30.0±0.00
模型组	10	0	0 [*]	11.3±3.42 [*]
黄芪多糖组	10	5	50 [#]	19.4±4.76 [#]
黄芪甲苷组	10	5	50 [#]	20.5±5.13 [#]
联合用药①组	10	9	90 [#]	28.7±5.42 [#]
联合用药②组	10	7	70 [#]	26.5±5.13 [#]
联合用药③组	10	7	70 [#]	24.3±4.78 [#]
联合用药④组	10	8	80 [#]	25.7±5.57 [#]

与正常对照组比较:^{*} $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.01$

vs. normal control group:^{*} $P < 0.01$; vs. model group:[#] $P < 0.01$

3.2 联合用药对模型小鼠肝脏组织形态学的影响

模型组小鼠肝细胞广泛肿胀,出现大滴性脂肪变、气球样变,肝细胞点状坏死严重,炎症因子大面积浸润组织;黄芪多糖组和黄芪甲苷组坏死有轻微减少,仍存在大范围的水肿和坏死;当二者配伍使用后,坏死细胞很少,形态接近正常,血管边缘细胞呈现出较好的放射状排列,偶见凋亡小体和点状坏死。提示黄芪多糖与黄芪甲苷配伍比单独使用对肝细胞有更好的恢复作用。联合用药对模型小鼠肝脏组织形态学的影响见图1。

3.3 联合用药对模型小鼠外周血白细胞数的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠外周血白细胞数减少,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,黄芪多糖组、黄芪甲苷组与联合用药①、②、③、④组小鼠外周血白细胞数增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$),且以联合用药①组效果最好。联合用药对模型小鼠外周血白细胞数的影响见表2。

3.4 联合用药对模型小鼠骨髓细胞DNA含量的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠骨髓细胞DNA含量显著减少,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,黄芪多糖组、黄芪甲苷组与联合用药①、②、③、④组小鼠骨髓细胞DNA含量增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$),且以联合用药①组效果最好。联合用药对模型小鼠骨髓细胞DNA含量的影响见表3。

3.5 联合用药对模型小鼠血清SOD活性的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠血清SOD活性减弱,差异

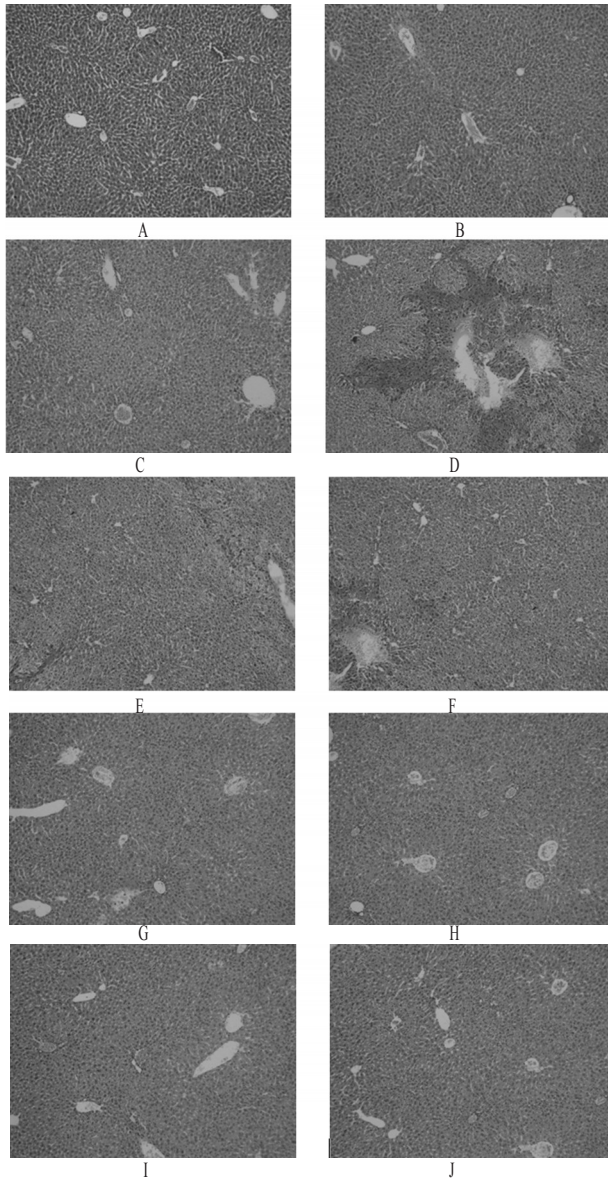


图1 联合用药对模型小鼠肝脏组织形态学的影响

A.正常对照;B.黄芪多糖对照;C.黄芪甲苷对照;D.模型组;E.黄芪多糖组;F.黄芪甲苷组;G.联合用药①组;H.联合用药②组;I.联合用药③组;J.联合用药④组

Fig 1 Effects of drug combination on hepatic morphology of model mice

A.normal control group; B.Astragali Radix polysaccharides control group; C.astragaloside IV control group; D.model group; E.Astragali Radix polysaccharides group; F.astragaloside IV group; G. drup combination group I ; H.drup combination group II ; I.drup combination group III ; J. drup combination group IV ;

具有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,联合用药①、②、③组小鼠血清SOD活性增强,差异具有统计学意义($P<0.01$),且以联合用药①组效果最好。联合用药对模型小鼠血清SOD活性的影响见表4。

4 讨论

随着放射性核素在能源、医疗、战争等方面的广泛应用,核辐射对机体的损伤及医学防护越来越被人们重视。本研究发现,黄芪多糖、黄芪甲苷及其不同比例的配伍能显著提高致

表2 联合用药对模型小鼠外周血白细胞数的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of drug combination on peripheral blood leucocyte count of model mice($\bar{x} \pm s$)

组别	n	白细胞数, $\times 10^9 L^{-1}$
正常对照组	10	7.65 ± 0.86
黄芪多糖对照组	10	7.82 ± 0.95
黄芪甲苷对照组	10	7.69 ± 0.96
模型组	10	$1.24 \pm 0.66^*$
黄芪多糖组	10	$1.77 \pm 0.44^*$
黄芪甲苷组	10	$1.83 \pm 0.33^*$
联合用药①组	10	$2.46 \pm 0.75^*$
联合用药②组	10	$2.01 \pm 0.48^*$
联合用药③组	10	$1.96 \pm 0.71^*$
联合用药④组	10	$2.11 \pm 0.43^*$

与正常对照组比较: * $P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.01$

vs. normal control group: * $P<0.01$; vs. model group: * $P<0.01$

表3 联合用药对模型小鼠骨髓细胞DNA含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of drug combination on the content of DNA in bone marrow cells of model mice($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD
正常对照组	10	1.33 ± 0.17
黄芪多糖对照组	10	1.27 ± 0.21
黄芪甲苷对照组	10	1.29 ± 0.22
模型组	10	$0.41 \pm 0.14^*$
黄芪多糖组	10	$0.65 \pm 0.24^*$
黄芪甲苷组	10	$0.60 \pm 0.15^*$
联合用药①组	10	$0.84 \pm 0.18^*$
联合用药②组	10	$0.76 \pm 0.17^*$
联合用药③组	10	$0.79 \pm 0.16^*$
联合用药④组	10	$0.81 \pm 0.21^*$

与正常对照组比较: * $P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.01$

vs. normal control group: * $P<0.01$; vs. model group: * $P<0.01$

表4 联合用药对模型小鼠血清SOD活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Effects of drug combination on the activity of SOD in serum of model mice($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD, U/ml
正常对照组	10	480.7 ± 39.4
黄芪多糖对照组	10	490.5 ± 47.0
黄芪甲苷对照组	10	476.3 ± 21.2
模型组	10	$360.1 \pm 17.9^*$
黄芪多糖组	10	413.5 ± 33.5
黄芪甲苷组	10	420.1 ± 16.9
联合用药①组	10	$440.2 \pm 35.6^*$
联合用药②组	10	$450.1 \pm 44.6^*$
联合用药③组	10	$435.6 \pm 34.8^*$
联合用药④组	10	$429.5 \pm 37.1^*$

与正常对照组比较: * $P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.01$

vs. normal control group: * $P<0.01$; vs. model group: * $P<0.01$

死剂量 $^{60}Co \gamma$ 射线辐射小鼠的平均存活天数,延长其生存期,特别是黄芪多糖与黄芪甲苷配伍后的联合用药①组能提高存活率达90%,说明黄芪多糖、黄芪甲苷及其配伍对受致死剂量 $^{60}Co \gamma$ 射线辐射小鼠具有较强的防护作用。通过肝脏组织切片HE染色的形态学方法观察,发现模型组小鼠组织损伤严重,而黄芪多糖、黄芪甲苷及其不同比例配伍组小鼠细胞坏死减轻,炎症因子减少,各组织形态较完整,这就从组织形态学的角度证实了黄芪多糖与黄芪甲苷配伍的防辐射作用。

白细胞作为机体免疫调节和免疫效应细胞,对辐射有极高的敏感性,极易受到辐射的影响而发生DNA的断裂,细胞形态、功能以及细胞数量改变,因而白细胞计数已被用来作为辐射损伤程度的评估指标。与模型组比较,黄芪多糖、黄芪甲苷及其配伍组小鼠白细胞有不同程度的增加,表明黄芪多糖、黄芪甲苷及其配伍对辐射损伤有保护作用。同时,联合用药①组的白细胞数大于其它配伍组和单独给药组,提示联合用药①组对免疫细胞的保护作用优于其它配伍组和单独给药组。

小鼠被⁶⁰Co γ辐射后,体内分子发生电离、激发,产生能量转移,首先使体内一些重要的大分子物质,如DNA受到破坏,从而产生组织细胞一系列生理功能的障碍。核辐射对生物大分子的破坏有两条途径,一是直接作用于生物大分子,把能量转移给大分子,使其发生变化,可使DNA分子上的长链发生断裂,可以让单链断裂,也可以使双链断裂;二是作用于细胞内水分子,产生一些活性基团,这些自由基再作用于生物大分子,使其发生变化,破坏DNA^[8-9]。与模型组比较,黄芪多糖、黄芪甲苷及其配伍组小鼠骨髓细胞DNA含量有不同程度的提高,表明黄芪多糖、黄芪甲苷及其配伍对辐射损伤有保护作用。同时,联合用药①组的骨髓细胞DNA含量大于其它配伍组和单独给药组,提示联合用药①组对DNA的保护作用优于其它配伍组和单独给药组。

活性氧类(ROS)在由射线引起的辐射损伤中起重要的调节作用^[10]。超氧阴离子自由基和羟自由基均是化学性质非常活跃的活性氧,如果它们在组织中大量存在就会导致细胞的损伤。SOD能分别清除这两种氧自由基,保护细胞免受损伤。研究表明,电离辐射可引起机体内产生大量超氧阴离子自由基,而造成机体组织中细胞的过氧化损伤。当机体遭受电离辐射后,各种免疫细胞的功能被激活,特别是T细胞的激活与分化,导致有氧代谢旺盛,产生超氧阴离子自由基较静止状态更多。而随着辐射剂量的升高,机体产生大量的超氧阴离子自由基,过量的自由基攻击细胞,使SOD防御系统被破坏,细胞免疫能力下降,SOD活性降低^[11]。黄芪多糖、黄芪甲苷及其配伍能不同程度地提高实验小鼠的SOD活性,降低辐射对实验小鼠的损害。

本研究优化了黄芪多糖和黄芪甲苷的最佳配比,发现其

质量比为4:1时对辐射损伤的防护作用最好。黄芪多糖、黄芪甲苷及其配伍能够通过免疫调节、抑制突变和提高抗氧化酶活性等多种途径,提高机体抗辐射损伤的能力,但详细机制尚待进一步的研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010版.北京:中国医药科技出版社,2010:196.
 - [2] 戴芹,曲小璐,汤家铭,等.黄芪对慢性肾功能衰竭大鼠抗氧化作用的研究[J].中国中西医结合急救杂志,2009,16(4):223.
 - [3] 丁海玲,李华伟,李雪花,等.复方黄芪多糖对小鼠的抗疲劳和耐缺氧作用[J].延边大学医学学报,2009,32(4):160.
 - [4] 钟灵,王振富,文德鉴,等.黄芪多糖抗衰老作用的实验研究[J].中国应用生理学杂志,2013,29(4):350.
 - [5] 王晓波,刘殿武,郭丽莉,等.发酵黄芪对BALB/C小鼠免疫功能及细胞因子的作用[J].时珍国医国药,2010,21(7):F0003.
 - [6] 杨映雪,陈建业,费中海,等.黄芪总黄酮对辐射损伤小鼠的防护作用研究[J].重庆医科大学学报,2010,35(4):504.
 - [7] 邹丹.黄芪对辐射所致小鼠损伤的保护作用[D].郑州:郑州大学,2005.
 - [8] 戴昌世,王秉伋.抗辐射药物研究[M].北京:军事医学科学出版社,2010:126.
 - [9] 王晓平,黄翔,段丽菊,等.五指毛桃水提液对辐射致小鼠肺细胞DNA损伤的保护作用研究[J].中国药房,2011,22(3):201.
 - [10] 孙元琳,汤坚,顾小红,等.当归多糖对小鼠肝细胞辐照后Bcl-2和Bax蛋白表达的影响[J].中华放射医学与防护杂志,2009,29(5):476.
 - [11] 肖引,陈崇尚,华君,等.五加双参片对辐射和化学物质损伤细胞的影响[J].第四军医大学学报,2006,27(14):1331.
- (收稿日期:2013-10-31 修回日期:2013-11-20)

国家卫生和计划生育委员会副主任徐科会见伦敦卫生和热带医学学院院长皮奥特教授

本刊讯 2013年12月13日下午,国家卫生和计划生育委员会副主任徐科在北京会见来访的伦敦卫生和热带医学学院院长皮奥特教授(Peter Piot)。

徐科欢迎皮奥特教授访华,简要介绍了中国深化医药卫生体制改革和疾病预防控制工作,表示愿为伦敦卫生和热带医学学院与国内研究和教育机构的合作搭建桥梁,进一步推动双方在公共卫生人才培养、疾病防控、政策研究、全球卫生

领域的交流与合作。

皮奥特教授表示,伦敦卫生和热带医学学院是全球历史悠久的公共卫生学院之一,加强与中国的合作是其工作重点。目前该院已经与中国疾控中心寄生虫病预防控制所、四川大学等机构开展合作,今后愿意继续在传染病、慢性病防控、卫生体制改革等方面加强与中国机构的合作。