

黄花倒水莲对辐射损伤小鼠防护作用的研究

王晓平*, 黄翔, 赵仕花

(玉林师范学院, 广西 玉林 537000)

[摘要] **目的:**初步探讨黄花倒水莲提取物对小鼠辐射损伤的防护作用。**方法:**以辐射损伤小鼠作为研究对象,分别以黄花倒水莲提取物 2,4,8 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,阴性对照组、辐射模型组给予等量生理盐水。灌胃 5 d 后,除阴性对照组外各组小鼠接受 6 Gy 的⁶⁰Co γ 射线一次性全身均匀照射,然后再继续灌胃 10 d,最后 1 次灌胃 24 h 后,检测各组小鼠外周血中红细胞数(RBC)、白细胞数(WBC)、血小板数(PLT)、淋巴细胞数(Lymph),计算脾指数和胸腺指数,用单细胞凝胶电泳技术检测小鼠脾细胞、骨髓细胞的 DNA 损伤。**结果:**与阴性对照组比,辐射模型组、黄花倒水莲各剂量组小鼠的 RBC 数、WBC 数、PLT 数、Lymph 数、胸腺指数、脾指数明显减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),脾细胞、骨髓细胞的尾部 DNA 百分率(Tail DNA%)和尾矩(Tail Moment)明显增大($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);但与辐射模型组比,黄花倒水莲各剂量组小鼠的 RBC 数、WBC 数、PLT 数、Lymph 数、胸腺指数、脾指数明显增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),脾细胞、骨髓细胞的 Tail DNA% 和 Tail Moment 明显减少($P < 0.01$),存在剂量-反应关系。**结论:**黄花倒水莲提取物对辐射所致小鼠造血系统和免疫器官损伤有一定的防护作用。

[关键词] 黄花倒水莲; ⁶⁰Co γ 射线; 辐射损伤; 防护作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0234-04

[doi] 10.11653/syfj2013190234

Protective Effect of *Polygala fallax* in Radiation Injured Mice

WANG Xiao-ping*, HUANG Xiang, ZHAO Shi-hua

(Yulin Normal University, Yulin 537000, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss protective effect of polygala fallax in radiation injured mice. **Method:** *Polygala fallax* extract was given at dose of 2, 4, 8 g·kg⁻¹·d⁻¹ respectively, negative control group add equivalent normal saline as control group. After 5 days of administration, in addition to the negative control group, mice received disposable irradiate 6 Gy of ⁶⁰Co γ radiation uniformly, administration lasted 10 days. 24 h after end administration, red blood cell count (RBC), white blood cell count (WBC), platelet count (PLT), lymphocytes (Lymph), spleen index and thymus index, DNA damage of spleen cells and marrow cells were observed. **Result:** Compared with the negative control group, *P. fallax* decreased RBC, WBC, PLT, lymph thymus index, spleen index ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and increased spleen cells in bone marrow cells percentage of tail DNA and tail moment significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). But compared with the control group, *P. fallax* increased RBC count WBC PLT, Lymph thymus index, spleen index significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and decreased spleen cells in bone marrow cells percentage of tail DNA and Tail Moment significantly ($P < 0.01$). There is dose-response relationship. **Conclusion:** *P. fallax* extract have certain protective effect on hemopoietic system and immune organs in mice caused by radiation injury.

[Key words] *Polygala fallax*; ⁶⁰Co gamma rays; radiation injury; protective effect

黄花倒水莲又名黄花远志、黄花参、吊吊黄、鸡仔树等,为远志科远志属植物^[1],主要分布于江西、

[收稿日期] 20130514(007)

[基金项目] 广西教育厅 2011 年科研基金项目(200103YB121);玉林师范学院高层次人才科研启动基金项目(G20120017)

[通讯作者] 王晓平,教授,从事天然药物性能研究, Tel:0775-2679937, E-mail: sywxp@163.com

广东、广西和云南等地,以根或全草入药,是瑶、苗、壮等少数民族常用的民间药物。其味甘,性平,具补益、强壮、祛湿、散瘀之功效,治疗病后体虚、腰膝酸痛、跌打损伤、急慢性肝炎^[2]。该植物含有皂苷、多糖、酮类、有机酸和氨基酸等多种活性成分^[3],具有抗衰老、抗应激、降血脂、调节免疫等^[4-8]作用。近年来的研究还表明,黄花倒水莲各组分均有一定的清除自由基作用及抗氧化活性^[9]。目前尚未见到关于其在辐射防护方面的报道。本文以⁶⁰Co γ 射线照射小鼠建立辐射损伤模型,从造血系统和免疫器官多个指标探讨黄花倒水莲提取物的辐射防护作用。

1 材料

1.1 动物 SPF级昆明种雄性小鼠40只,体重(20±2)g,由广西医科大学医学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(桂)2009-0002。

1.2 药物与试剂 黄花倒水莲根(购于广西玉林市中药材公司,经玉林师范学院制药工程教研室陈晓白教授鉴定为*Polygala fallax* Hemsl.的根);低熔点琼脂糖(LMA,批号97R10105),正常熔点琼脂糖(NMA,批号09010230),TritonX-100(批号20110329),北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;十二烷基肌氨酸钠(SLS,批号20100327,Sigma公司产品);二甲基亚砜(DMSO,批号20111027),天津市永大化学试剂有限公司);乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA,批号0110108,上海实验试剂有限公司);三羟甲基氨基甲烷(Tris-base,批号17410C100,国药集团化学试剂有限公司);氢氧化钠(NaOH,批号20110511,广东光华科技股份有限公司);氯化钠(NaCl,批号100415,西陇化工股份有限公司)。

1.3 仪器 BX51TR-32FB3F01型奥林巴斯正置荧光相差生物显微镜(日本Olympus公司),FYC-50H型回转式钴-60放射治疗机(上海正用核子仪器厂),FA1104N型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司),L420型台式低速离心机(长江湘仪离心机有限公司),DYY-III33A型电泳槽、DYY-12型电泳仪(北京六一仪器厂),Dimension Rxl Max型全自动生化分析仪(美国德灵公司)。

2 方法

2.1 黄花倒水莲灌胃液的制备 将黄花倒水莲剪碎,放入60℃烘箱内烘干7h,冷却后放入万能粉碎机粉碎3次(3min/次)后过60目筛,得到黄花倒水莲细粉。称取黄花倒水莲粉末200g,加双蒸水过液面2cm,煮沸2次,30min/次。合并滤液浓缩至

400mL,加3倍量95%的乙醇,放冰箱静置,次日减压过滤,并回收滤液中乙醇,继续浓缩滤液得无醇味的提取物^[6]。提取物加双蒸水至200mL使药液为相当于生药1g·mL⁻¹,置冰箱中备用。用时加蒸馏水稀释至所需浓度。

2.2 动物分组和处理 40只小鼠,适应性饲养7d后,随机分为阴性对照组、辐射模型组、黄花倒水莲各剂量组,每组8只。黄花倒水莲各剂量组分别以黄花倒水莲提取物2,4,8g·kg⁻¹灌胃,阴性对照组、辐射模型组给予等量生理盐水。灌胃5d后,除阴性对照组外各组小鼠接受6Gy的⁶⁰Co γ 射线一次性全身均匀照射,然后再继续灌胃10d,最后1次灌胃24h后,所有小鼠摘眼球取血,抗凝,并颈椎脱臼处死小鼠取材进行相关的检测。

2.3 血象分析 用全自动生化分析仪检测外周血中红细胞数(RBC)、白细胞数(WBC)、血小板数(PLT)、淋巴细胞数(Lymph)。

2.4 免疫器官指数的计算 处死小鼠后,快速、完整取出脾脏和胸腺,用37℃生理盐水清洗,去除血液,用滤纸吸干后称重,计算脏器指数(脏器指数=脏器重/体重),用“mg·g⁻¹”表示。

2.5 小鼠脾细胞、骨髓细胞DNA损伤的检测

2.5.1 细胞悬液的制备 脾细胞悬液的制备:取脾脏放于玻璃平皿,用37℃生理盐水洗2遍,去除表面血迹,然后用眼科剪尽量剪碎脏器,以一定量的37℃生理盐水稀释后,用2层擦镜纸过滤,收集细胞液于离心管中,1000r·min⁻¹离心5min,废弃上清液,将离心管底部细胞用37℃生理盐水重悬浮,调整脾细胞密度为10⁵~10⁶个/mL。

骨髓细胞悬液的制备:取小鼠股骨,剔尽肌肉,用眼科剪将股骨从骨干中间剪断,再用2mL注射器进行骨髓腔冲洗,直到骨头发白,收集冲洗下的细胞悬液,用2层擦镜纸过滤2次置于离心管中,1000r·min⁻¹离心5min,重悬。调整骨髓细胞密度为10⁵~10⁶个/mL。

2.5.2 单细胞凝胶电泳试验 参照Singh等^[10]的方法略加改进,其原理是DNA在碱性条件下解旋,DNA断片在电泳电场中移动形成彗星状图像,移动的程度直接反映DNA分子的损伤程度。电泳条件:19V,190mA电泳20min。用5mg·L⁻¹溴化乙锭染色,在荧光显微镜下阅片。细胞图像由CCD拍摄,每只小鼠随机选择50个细胞,用CASP彗星图像分析软件自动分析,选取彗星细胞尾部DNA百分率(tail DNA)和尾矩(tail moment)作为分析指标,Tail

DNA 为单一的彗尾强度指标, Tail Moment 为彗尾 DNA 百分率和彗尾长度的乘积。以上步骤在暗处进行, 避免其他原因所致的 DNA 损伤。

2.6 统计学处理 应用 Origin 7.5 统计分析软件, 进行双侧 *t* 检验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对辐射小鼠血象的影响 经 6 Gy⁶⁰Co γ 射线

表 1 黄花倒水莲对辐射小鼠血象的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	RBC/×10 ¹² /L	WBC/×10 ⁹ /L	PLT/×10 ⁹ /L	Lymph/×10 ⁹ /L
阴性对照	-	9.26 ± 0.33	7.79 ± 0.28	980.51 ± 29.91	5.15 ± 0.29
辐射模型	-	6.52 ± 0.17 ²⁾	1.56 ± 0.23 ²⁾	272.28 ± 17.32 ²⁾	0.44 ± 0.06 ²⁾
黄花倒水莲	2	7.36 ± 0.21 ^{2,3)}	2.44 ± 0.16 ^{2,3)}	435.92 ± 23.80 ^{2,4)}	0.68 ± 0.05 ^{2,3)}
	4	7.67 ± 0.26 ^{2,4)}	3.57 ± 0.18 ^{2,4)}	531.55 ± 23.09 ^{2,4)}	1.27 ± 0.15 ^{2,4)}
	8	8.17 ± 0.31 ^{1,4)}	4.55 ± 0.21 ^{2,4)}	643.19 ± 22.28 ^{2,4)}	2.11 ± 0.24 ^{2,4)}

注: 与阴性对照组比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与辐射模型组比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对辐射小鼠免疫器官指数的影响 与阴性对照组比较, 辐射模型组、黄花倒水莲各剂量组小鼠脾脏指数和胸腺指数均明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。黄花倒水莲各剂量组小鼠的脾及胸腺指数明显高于辐射模型组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 并随黄花倒水莲浓度的升高其脾脏指数及胸腺指数也逐渐增加, 存在剂量-反应关系。见表 2。

表 2 黄花倒水莲对辐射小鼠免疫器官指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
mg·g⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	脾脏指数	胸腺指数
阴性对照	-	3.57 ± 0.28	2.43 ± 0.15
辐射模型	-	1.59 ± 0.09 ²⁾	0.79 ± 0.08 ²⁾
黄花倒水莲	2	2.04 ± 0.14 ^{2,3)}	1.05 ± 0.07 ^{2,3)}
	4	2.43 ± 0.11 ^{2,4)}	1.24 ± 0.10 ^{2,4)}
	8	2.84 ± 0.12 ^{1,4)}	1.59 ± 0.16 ^{2,4)}

3.3 对辐射小鼠脾细胞、骨髓细胞 DNA 损伤的影响 经荧光染色后, 阴性对照组的脾细胞、骨髓细胞呈现圆形的荧光团。接受 6 Gy⁶⁰Co γ 射线照射后, 辐射模型组的细胞表现为尾长增加, 尾部荧光强度

照射后, 小鼠 RBC, WBC, PLT, Lymph 数量明显减少, 辐射模型组、黄花倒水莲各剂量组与阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。黄花倒水莲各剂量组小鼠 RBC, WBC, PLT, Lymph 数量随黄花倒水莲剂量的增加而升高, 呈剂量依赖关系, 黄花倒水莲各剂量组与辐射模型组比较, 存在统计学差异 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 1。

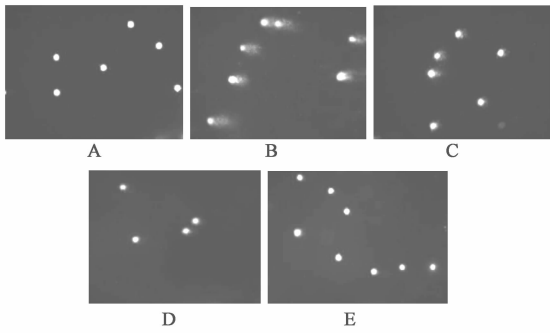
增强, 细胞呈彗星样, 提示 DNA 链断裂, 细胞 DNA 受损严重, tail DNA% 和 tail moment 与阴性对照组相比明显增大 ($P < 0.01$)。黄花倒水莲低、中、高剂量组小鼠脾细胞、骨髓细胞的尾长和尾部荧光强度与辐射模型组相比均明显减小, 其中高剂量组细胞拖尾现象不典型, 各剂量组的 tail DNA% 和 tail moment 虽高于阴性对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 但是也均明显低于辐射模型组 ($P < 0.01$), 并存在剂量-反应关系。见图 1, 表 3。

4 讨论

造血系统是对辐射高度敏感的组织之一, 受照后造血干细胞急剧减少, 使外周血中成熟血细胞来源匮乏, 反映在外周血象中为各类细胞均明显减少^[11]。本实验结果显示, 经 6Gy⁶⁰Co γ 射线照射后各组小鼠的 RBC, WBC, PLT, Lymph 均显著减少, 说明小鼠造血系统明显受损。经过黄花倒水莲处理后, 各数值均比辐射模型组明显增高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 提示黄花倒水莲对⁶⁰Co γ 射线辐射致小鼠造血系统的损伤有一定的防护作用, 可促进受辐射损伤小鼠外周血象的恢复。

表 3 黄花倒水莲对辐射小鼠脾细胞、骨髓细胞 DNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	脾细胞		骨髓细胞	
		tail DNA/%	tail moment	tail DNA/%	tail moment
阴性对照	-	3.49 ± 0.54	0.27 ± 0.06	3.87 ± 0.46	0.46 ± 0.09
辐射模型	-	25.79 ± 2.83 ²⁾	11.39 ± 1.98 ²⁾	26.42 ± 1.79 ²⁾	12.73 ± 1.60 ²⁾
黄花倒水莲	2	16.53 ± 1.75 ^{2,4)}	4.87 ± 0.97 ^{2,4)}	16.03 ± 1.04 ^{2,4)}	5.50 ± 0.89 ^{2,4)}
	4	10.39 ± 1.14 ^{2,4)}	1.30 ± 0.31 ^{2,4)}	10.49 ± 0.51 ^{2,4)}	1.99 ± 0.25 ^{2,4)}
	8	5.63 ± 0.51 ^{2,4)}	0.51 ± 0.08 ^{1,4)}	6.45 ± 0.57 ^{2,4)}	0.89 ± 0.15 ^{1,4)}



A. 阴性对照组;B. 辐射模型组;C. 黄花倒水莲 2 g·kg⁻¹;
D. 黄花倒水莲 4 g·kg⁻¹组;E. 黄花倒水莲 8 g·kg⁻¹组

图1 不同处理组细胞单细胞凝胶电泳(溴化乙锭染色,×200)

胸腺和脾脏是机体重要的免疫器官,是辐射敏感的细胞群^[12]。本研究表明,照射后,胸腺系数、脾脏系数均低于阴性对照组,说明辐射引起了小鼠脾脏和胸腺的萎缩,造成了机体免疫系统的损伤。而黄花倒水莲可使胸腺系数、脾脏系数升高,提示黄花倒水莲可对抗⁶⁰Co γ射线辐射而保护胸腺和脾脏,提高机体的免疫功能。

DNA 是辐射直接影响的靶点,也是辐射所产生的自由基间接攻击的目标,辐射可引起 DNA 断裂、基因突变、染色体重组、细胞转化和细胞死亡等,也导致造血细胞的增殖抑制^[13]。造血组织中造血干细胞增殖分化的中心环节是 DNA 的合成;骨髓辐射损伤的恢复是外周血细胞数量回升的前提。本实验结果显示:⁶⁰Co γ射线造成了脾细胞和骨髓细胞的 DNA 损伤,而黄花倒水莲能够使受照小鼠的脾细胞和骨髓细胞 DNA 的 tail DNA% 和 tail moment 降低,提示黄花倒水莲对受照小鼠脾细胞和骨髓细胞的 DNA 损伤有良好的修复作用,从而促进机体造血功能和免疫损伤的恢复。

传统医学认为,放射线具有“火热毒邪”的特点,辐射损伤表现为热毒炽盛、气血两虚和阴阳失调等症状,具有清热解毒、活血化瘀、补血益气的多种中草药均有不同程度的抗辐射作用^[14]。中药黄花倒水莲属于补益类中草药,具有补益气血、健脾祛湿、活血散瘀等功效,含有丰富的总皂苷、黄酮类、多糖等生物活性物质。许多学者的研究表明,天然植物中的黄酮类、多糖类、皂苷类等活性成分对 γ 射线、X 射线、紫外线等多种射线造成的骨髓抑制、免疫低下等具有很好的保护作用^[15-17]。中药抗辐射机制主要通过通过对造血系统、免疫系统的保护,清除自由基、抗氧化、保护 DNA 发挥作用^[18]。黄花倒水莲有增强免疫、抗氧化、清除自由基等作用,其化学成分和药理活性可能是其对辐射损伤具有防护作用的

药效学基础。在后续的研究中,本课题组将对黄花倒水莲的药效、抗辐射的有效成分及作用机制作进一步研究。

[参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第 43 卷. 第 3 分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1997:151.

[2] 谢万宗, 范崔生, 朱北仪. 全国中草药汇编. 上册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996:791.

[3] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993:2079.

[4] 李萍, 钟鸣, 邱翠娥. 黄花参抗衰老作用的初步探讨 [J]. 云南中医中药杂志, 1995, 16(4): 13.

[5] 秦华珍, 夏新华, 李钟文. 黄花倒水莲多糖的抗应激作用 [J]. 广西中医药, 1996, 19(3): 52.

[6] 李良东, 李洪亮, 范小娜, 等. 黄花倒水莲提取物抗血脂作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 650.

[7] 李浩, 王秋娟, 朱丹妮. 黄花倒水莲总苷对血瘀大鼠和高脂血症家兔血液流变学指标的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(11): 21.

[8] 秦华珍, 夏新华. 黄花倒水莲多糖对正常小鼠免疫功能的影响 [J]. 中药材, 1998, 21(9): 467.

[9] 林黎琳, 黄锋, 陈四保, 等. 黄花倒水莲的化学成分及抗氧化活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(11): 827

[10] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells [J]. Exp Cell Res, 1988, 175(1): 174.

[11] 王虹, 刘屏, 戴畅, 等. 异名异种鸡血藤对⁶⁰Coγ射线辐射小鼠外周血象的影响 [J]. 中西医结合学报, 2007, 5(2): 189.

[12] 刘叶玲, 朱莉, 韩志武, 等. 青紫薯色素保护小鼠抗⁶⁰Coγ射线辐射所致的氧化损伤的作用 [J]. 青岛大学医学院学报, 2005, 41(1): 46.

[13] 季屹红, 倪美鑫, 蔡晶, 等. 补康灵对辐射损伤小鼠造血功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 184.

[14] 毕良文, 段伟, 王晓莉, 等. 中药辐射防护剂的研究进展 [J]. 中国辐射卫生, 2006, 15(1): 118.

[15] 李德远, 周韞珍, 余应利, 等. 银杏叶黄酮抗辐射效应研究 [J]. 营养学报, 2004, 26(3): 220.

[16] 王宗伟, 王勇, 黄兆胜, 等. 芦荟多糖对小鼠放射损伤的防护作用研究 [J]. 中草药, 2002, 33(3): 251.

[17] 陈月, 王宝贵, 张桂英, 等. 刺五加皂苷的抗辐射损伤作用 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2005, 31(3): 423.

[18] 袁凤锦, 彭代银. 中药抗辐射作用的研究进展 [J]. 安徽医药, 2011, 15(7): 902.

[责任编辑 聂淑琴]