

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.20.001

川芎提取物对辐射损伤小鼠的保护作用研究*

唐文诚,李敏,罗芳芳,易辉燕,唐莉,杨丽

(四川省绵阳市第三人民医院·四川省精神卫生中心,四川 绵阳 621000)

摘要:目的 研究川芎提取物对 ^{60}Co γ 射线辐射损伤小鼠的保护作用。方法 采用健康昆明种小鼠作为实验对象,通过灌胃方式给予川芎提取物及对照药物氨磷汀;使用 ^{60}Co γ 作为辐射源,制备辐射损伤动物模型;通过眼眶取外周血,测定白细胞(WBC)数和淋巴细胞(L)数;取肝组织,测定蛋白质、丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)活性。结果 川芎提取物能阻遏辐射所致的小鼠白细胞和淋巴细胞数量下降,减弱辐射对肝脏合成功能的损伤,增加SOD和GSH的活性,降低MDA含量。结论 川芎提取物对辐射损伤小鼠有一定的保护作用,保护机制可能与其抗氧化作用及免疫影响有关。

关键词:川芎提取物;辐射损伤;小鼠;保护作用

中图分类号:R932;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)20-0001-03

Protective Effect of *Rhizoma Chuanxiong* Extraction on Radiation-Injured Mice

Tang Wencheng, Li Min, Luo Fangfang, Yi Huiyan, Tang Li, Yang Li

(The Third People's Hospital of Mianyang, Sichuan Mental Health Center, Mianyang, Sichuan, China 621000)

Abstract: Objective To study the protective effect of *Rhizoma chuanxiong* extraction on radiation-injured(^{60}Co γ -ray, ^{60}Co γ) mice. **Methods** The health Kunming mice were selected as the experimental subjects. *Rhizoma chuanxiong* extraction and comparator drug were intragastric administrated. The radiation-injured animal models were established by using ^{60}Co γ as radiation source. The white blood cells(WBC) and lymphocytes were calculated from orbit peripheral blood. The proteins, contents of malondialdehyde(MDA) and the activity of super oxide dismutase(SOD), glutathione(GSH) in liver tissue were determined. **Results** *Rhizoma chuanxiong* extraction was able to repress the number of WBC and lymphocytes from decreasing in radiated mice, and also it could weaken radiation-injured liver synthesis function. Moreover, it could increase the activity of SOD and GSH, reduce the content of MDA. **Conclusion** *Rhizoma chuanxiong* extraction has certain protective effect on radiation-injured mice, its protection mechanism may related to its antioxidation and immunity effect.

Key words: *Rhizoma chuanxiong* extraction; radiation-injured; mice; protective effect

随着核能在工业、农业、军事、医学等方面应用的快速发展,人们遭受辐射损伤的可能性也随之增加。多种植物和中药制剂具有一定的防辐射作用^[1-7]。天然药物具有来源广、毒性低的特点^[8],以来源于中草药的药物作为辐射防护剂,前景广阔,是研究热点^[9-10]。川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 是伞形科藁本属多年生草本植物,以根茎入药,味辛、性温,具有活血行气、祛风止痛等功效^[11],主产于四川。其主要药效成分包括阿魏酸、洋川芎内酯A、藁本内酯和生物碱等^[12]。本试验中采用川芎提取物进行抗辐射氧化应激研究,以进一步探讨川芎提取物在抗辐射损伤方面的作用和可能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与材料

动物:昆明种小白鼠,雄性,体质量(20 ± 2)g,清洁级,四川大学实验动物中心提供,生产许可证号为SCXK(川)2013-026,饲养环境为昼夜比1:1循环饲养,保持室内相对湿度(65 ± 20)%,温度(25 ± 2)℃,适应性喂养7d。所有实验均经医院实验动物伦理委员会

审核,均遵守实验动物照料和使用原则。

仪器与设备: ^{60}Co γ 辐照源(中国工程物理研究院铀源辐照技术有限公司);Thermo ST16 ST16R型高速冷冻离心机(美国Thermo公司);Sysmex XS-1000i全自动血液分析仪(日本希森美康株式会社);Eppendorf Biomaster4830型移液器(德国Eppendorf公司);SZ-93型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

试剂:川芎提取物(由西南科技大学生命科学与工程学院药物制剂教研室提供);注射用氨磷汀(大连美罗大药厂,国药准字H20010403,规格为每支0.4g);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH,除蛋白)、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

辐照条件:常规饲养7d后,除正常组小白鼠外其余各组以 ^{60}Co γ 射线一次性全身照射,剂量为5.0Gy。

分组及给药方法^[13-15]:设正常组(A组)、模型组(B组)、氨磷汀组[C组,100mg/(kg·d)]和不同剂量

*基金项目:四川省应用基础研究计划项目[2014JY0058]。

第一作者:唐文诚,男,大学本科,主管药师,研究方向为天然药物抗辐射,(电子信箱)twc0012002@163.com。

[100, 200, 400 mg/(kg · d)]川芎提取物组(D₁组, D₂组, D₃组),各40只,辐射照射前连续5 d灌胃给药,每天1次(A组及B组给予等体积蒸馏水),每次0.5 mL。

外周血检测:分别取照射后第3, 7天的各组小鼠,每组10只,眼眶取血,测定外周血白细胞(WBC)数与淋巴细胞(L)数。

肝组织中蛋白质含量测定:取照射24, 48, 72, 168 h后各组活体小鼠的肝脏,用2~8℃生理盐水漂洗,滤纸吸干,称定质量,剪碎后放入匀浆器中,加入生理盐水(比例为1:9)制备成匀浆,离心10 min,取上清液备用。依照试剂盒说明书测定。

氧化应激指标测定:取各组小鼠肝组织匀浆液,依照试剂盒说明书分别测定MDA, SOD, GSH。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件。数据均以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见表1至表5。

3 讨论

辐射可直接导致细胞DNA链断裂,从而导致基因突变、染色体畸变甚至机体死亡。辐射还可作用于水分子,产生自由基,自由基通过损伤DNA改变细胞结构,最终导致细胞死亡^[16]。如今人们常与不同形式的辐射如电离辐射、紫外线等接触,机体受辐射损伤的概率增加,如何减少辐射损伤及加强医学防护正逐渐受到重视。

白细胞和淋巴细胞作为参与机体免疫调节和免

表1 各组小鼠免疫细胞数量变化比较($\bar{X} \pm s, \times 10^9, n = 10$)

组别	剂量 [mg/(kg · d)]	照射72 h		照射168 h	
		WBC	L	WBC	L
A组	-	6.42 ± 1.08	5.12 ± 0.76	6.11 ± 1.03	5.01 ± 0.60
B组	-	1.13 ± 0.64 ^{##}	0.36 ± 0.47 ^{##}	0.98 ± 0.42 ^{##}	1.46 ± 0.72 ^{##}
C组	100	0.58 ± 0.27	0.52 ± 0.25 ^{##}	2.21 ± 0.35 ^{##}	2.73 ± 1.17 ^{##}
D ₁ 组	100	1.66 ± 0.16	0.49 ± 0.31 ^{##}	2.08 ± 0.54 ^{##}	2.58 ± 0.44 ^{##}
D ₂ 组	200	1.68 ± 0.37	0.64 ± 0.32 ^{##}	3.12 ± 0.37 ^{##}	2.93 ± 1.06 ^{##}
D ₃ 组	400	1.32 ± 0.32	0.99 ± 0.32 ^{##}	3.22 ± 0.41 ^{##}	2.88 ± 1.18 ^{##}

注:与A组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与B组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。下表同。

表2 各组小鼠肝组织蛋白质含量比较($\bar{X} \pm s, g/L, n = 10$)

组别	剂量 [mg/(kg · d)]	照射24 h	照射48 h	照射72 h	照射168 h
A组	-	7.49 ± 0.76	7.50 ± 0.78	7.52 ± 0.97	7.94 ± 0.82
B组	-	7.37 ± 0.74	7.18 ± 0.84	1.95 ± 1.64 ^{##}	2.01 ± 1.23 ^{##}
C组	100	7.46 ± 0.82	7.32 ± 0.68	3.05 ± 0.85 ^{##}	3.63 ± 0.71 ^{##}
D ₁ 组	100	7.23 ± 0.66	6.84 ± 0.75	2.63 ± 0.78 ^{##}	2.88 ± 0.56 ^{##}
D ₂ 组	200	8.06 ± 0.75	7.45 ± 0.87	3.28 ± 0.67 ^{##}	3.85 ± 0.43 ^{##}
D ₃ 组	400	8.03 ± 0.63	7.34 ± 0.54	3.31 ± 0.61 ^{##}	3.82 ± 0.38 ^{##}

疫应答的免疫细胞,对辐射敏感性高,表现为辐射后数量下降,而这一特点已成为评估辐射损伤的生物剂量指标^[17-18]。本研究结果显示,小鼠受⁶⁰Co γ射线辐射72 h和168 h后,外周血白细胞和淋巴细胞的数量均显著降低,与已有研究结果一致。

目前已知可作为抗辐射损伤的药物作用靶点包括增强DNA修复、减少自由基的形成、保护剂SOD等^[19]。川芎可减少中波紫外线(UVB)对HaCaT细胞的损伤,作用机制可能与影响p53和PCNA基因mRNA和蛋白表达有关^[19]。川芎不但可减轻UVB对皮肤的损伤,还可抑制炎症因子IL-10, IL-12, TNF-α的分泌^[20]。此外,李玉亮^[21]还发现,川芎提取物可显著清除化学发光体系产生的·OH和O₂^{-·},具有较强的抗氧化作用。本研究结果显示,小鼠受⁶⁰Co γ射线辐射72 h和168 h后,低、中、高剂量川芎提取物对辐射所致小鼠外周血白细胞数量、淋巴细胞数量降低均有一定阻遏作用,提示川芎提取物对⁶⁰Co γ射线辐射损伤有一定防护作用。

低剂量⁶⁰Co γ射线使小鼠的氧化应激水平升高,其中以肝脏最明显^[21]。本研究结果显示,其他组小鼠辐射

表3 各组小鼠肝组织MDA含量比较($\bar{X} \pm s, nmol/mg, n = 10$)

组别	剂量 [mg/(kg · d)]	照射24 h	照射48 h	照射72 h	照射168 h
A组	-	0.56 ± 0.23	0.67 ± 0.18	1.02 ± 0.35	1.07 ± 0.36
B组	-	0.65 ± 0.25 ^{##}	0.88 ± 0.16 ^{##}	1.56 ± 0.34 [#]	1.78 ± 0.28 [#]
C组	100	0.58 ± 0.12 ^{##}	0.62 ± 0.21 ^{##}	1.01 ± 0.14 [#]	1.03 ± 0.21 ^{##}
D ₁ 组	100	0.54 ± 0.13 ^{##}	0.78 ± 0.11 ^{##}	1.27 ± 0.16 [#]	1.19 ± 0.25 [#]
D ₂ 组	200	0.61 ± 0.27 ^{##}	0.68 ± 0.24 ^{##}	1.04 ± 0.20 [#]	1.09 ± 0.22 [#]
D ₃ 组	400	0.56 ± 0.16 ^{##}	0.75 ± 0.26 ^{##}	1.06 ± 0.15 [#]	0.98 ± 0.21 [#]

表4 各组小鼠肝组织SOD活性比较($\bar{X} \pm s, U/mg, n = 10$)

组别	剂量 [mg/(kg · d)]	照射24 h	照射48 h	照射72 h	照射168 h
A组	-	80.25 ± 5.76	75.35 ± 5.34	72.77 ± 6.56	77.44 ± 6.82
B组	-	40.12 ± 3.54 ^{##}	35.32 ± 4.23 ^{##}	28.50 ± 3.24 ^{##}	32.86 ± 2.79 ^{##}
C组	100	42.25 ± 3.14	37.30 ± 3.54 [#]	36.76 ± 3.07 [#]	50.88 ± 4.68
D ₁ 组	100	40.46 ± 3.07	34.28 ± 3.12 [#]	32.20 ± 3.22 [#]	43.63 ± 4.99
D ₂ 组	200	44.51 ± 2.62 [#]	43.09 ± 3.46 [#]	38.46 ± 3.50 [#]	49.27 ± 2.79 ^{##}
D ₃ 组	400	45.12 ± 2.53 [#]	44.51 ± 2.54 [#]	40.02 ± 3.86 [#]	52.46 ± 2.76 ^{##}

表5 各组小鼠肝组织GSH活性比较($\bar{X} \pm s, mg/g, n = 10$)

组别	剂量 [mg/(kg · d)]	照射24 h	照射48 h	照射72 h	照射168 h
A组	-	31.38 ± 3.51	30.02 ± 4.76	32.12 ± 2.56	31.43 ± 3.78
B组	-	17.45 ± 4.87 ^{##}	10.67 ± 0.96 ^{##}	6.45 ± 1.24 ^{##}	3.12 ± 0.43 ^{##}
C组	100	18.46 ± 3.01	16.88 ± 1.43 [#]	13.87 ± 1.05 [#]	17.69 ± 1.73
D ₁ 组	100	16.48 ± 3.24	14.58 ± 1.30 [#]	11.25 ± 1.67 [#]	9.18 ± 0.89 ^{##}
D ₂ 组	200	17.43 ± 3.80 [#]	16.07 ± 1.56 [#]	11.80 ± 1.93 [#]	16.34 ± 2.67 ^{##}
D ₃ 组	400	18.88 ± 2.65 [#]	16.84 ± 1.44 [#]	12.82 ± 1.67 [#]	18.45 ± 2.04 ^{##}

24 h 和 48 h 后,肝组织的总蛋白质含量与正常组小鼠无显著差异,不同剂量的川芎提取物对肝组织蛋白含量也无影响。这可能是由于经短时间辐射后,小鼠的造血和免疫功能得以快速重建,可一定程度抵御辐射损伤^[22]。辐射 72 h 和 168 h 后,小鼠肝组织的总蛋白质含量显著降低,不同剂量的川芎提取物均可缓解肝组织总蛋白质含量的降低。提示川芎提取物对长时间辐射引起的肝组织蛋白质含量降低有更明显的保护作用。

在电离辐射条件下,机体抗氧化机制被破坏,可致 MDA 含量增加^[23]。MDA 细胞内脂质过氧化物的降解产物,可直接反映机体脂质过氧化水平及细胞受自由基攻击的程度^[24]。SOD 可清除过量的自由基,提高机体细胞免疫能力。辐射可促使机体产生超氧阴离子自由基,机体 SOD 平衡被打破,从而造成机体组织细胞过氧化损伤^[25]。而能消除氧自由基的 GSH 在细胞自我保护系统及 DNA 合成中同样发挥着重要作用。升高 GSH 含量来修复氧化损伤已是减轻辐射损伤方案的一个组成部分^[26]。本研究结果显示,小鼠经 ^{60}Co γ 辐射 24, 48, 72, 168 h 后,肝组织的 MDA 含量明显增高, SOD 和 GSH 活性均明显降低,且不同剂量的川芎提取物对上述指标的降低均有一定逆转作用。

以上研究结果表明,川芎提取物对辐射引起的氧化应激损伤有保护作用,且与辐射时间的长短无关。同时,氧化应激反应对辐射比较敏感,短时间辐射即可增强小鼠机体的氧化反应。

综上所述,川芎提取物对 ^{60}Co γ 射线辐射损伤的小鼠具有一定保护作用,其作用机制可能与川芎提取物的抗氧化及增强免疫作用有关。此研究结果可为进一步开展抗辐射损伤的药物研究提供参考。

参考文献:

- [1] 金虹,黄毅,王继生,等.银杏叶提取物对辐射损伤小鼠的保护作用[J].中草药,2010,41(8):1339-1342.
- [2] 段亚彬,姚星辰,王财,等.黑果枸杞对X射线辐射小鼠的保护作用研究[J].天然产物研究与开发,2015,27(1):148-152.
- [3] 姜新宇,邓霜,王建芬.绞股蓝提取物防辐射的小鼠实验研究[J].长沙医学院学报,2011,9(1):14-18.
- [4] 施雨露,刘照轩,陈强,等.银杏叶提取物辐射防护作用的研究[J].中国实验诊断学,2013,17(11):1973-1974.
- [5] 谢立梅,王淑娥,江红梅,等.葡萄籽提取物对辐射所致小鼠氧化损伤的影响[J].环境与健康杂志,2011,28(8):725-726.
- [6] 伦博书,李东,刘金平,等.抗辐射中药及天然产物的研究进展[J].国际药学研究杂志,2015,42(4):453-462.
- [7] 刘耀,石英,刘职瑞,等.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[J].中国药房,2014,25(3):211-214.
- [8] Kma L. Plant extracts and plant-derived compounds: promising players in a countermeasure strategy against radiological exposure[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(6):2405-2425.
- [9] 王庆宾,韩婷,孙连娜,等.抗辐射的天然药物研究进展[J].药学实践杂志,2012,30(3):171-174.
- [10] 李敏,赵德华,王继生.抗辐射药物研究进展[J].实用药物与临床,2017,20(12):1435-1440.
- [11] 张晓琳,徐金娣,朱玲英,等.中药川芎研究新进展[J].中药材,2012,35(10):1706-1711.
- [12] 刘芳,吴萍,王宇红,等.HPLC-DAD同时测定川芎 CO_2 超临界流体萃取物中阿魏酸、洋川芎内酯A和藁本内酯含量[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(10):48-51.
- [13] 邓子亮,张刘珍,丛悦,等.氨磷汀对急性放射病小鼠早期骨髓造血功能的防护作用[J].中国实验血液学杂志,2014,22(3):791-796.
- [14] Kouvaris JR, Kouloulis VE, Vlahos LJ. Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector[J]. Oncologist, 2007, 12(6):738-747.
- [15] Kim HG, Jang SS, Lee JS, et al. *Panax ginseng* Meyer prevents radiation-induced liver injury via modulation of oxidative stress and apoptosis[J]. J Ginseng Res, 2017, 41(2):159-168.
- [16] 陈英.辐射所致DNA损伤与肿瘤风险[J].癌变·畸变·突变,2011,23(6):473-475.
- [17] 金宇林,吴洁莹,陆琰,等.6.0Gy X射线辐照所致BALB/c小鼠造血系统损伤的动态检测[J].中国医药导报,2017,14(13):13-16.
- [18] 吴永飞,汪江良,何前送,等.五加双参片对辐射损伤小鼠G-CSF水平的影响[J].河南中医,2016,36(1):41-43.
- [19] 骆丹,林向飞,徐晶,等.3种中药对中波紫外线辐射HaCaT细胞的干预及其机制[J].中国药理学通报,2007,23(6):750-755.
- [20] 刘昕,骆丹,沈春花,等.黄芩苷和川芎对UVB辐射皮肤成纤维细胞的影响[J].中国美容医学,2007,16(7):977-980.
- [21] 李玉亮.川芎及其有效成分对照射所致机体氧化应激损伤的保护作用[D].西安:第四军医大学,2011.
- [22] 张蕊莹,欧红玲,熊国林,等.大剂量 ^{60}Co γ 射线照射恒河猴造血系统指标的早期变化[J].国际检验医学杂志,2017,38(15):2022-2024.
- [23] 舒尊鹏,杨燕妮,王毅,等.枳壳多糖对辐射损伤小鼠的防护作用研究[J].中国药理学通报,2018,34(5):670-674.
- [24] 邓海平,俞诗源,陈玉琴,等.X射线辐射对仔鼠体重、皮毛生长及肝、肾脏组织SOD、CAT活力及MDA含量的影响[J].动物学报,2008,54(6):1029-1037.
- [25] 许文黎,岳娟,袁慧,等.氮氧自由基在辐射防护中的应用[J].癌变·畸变·突变,2015,27(6):490-492.
- [26] 胡雅梦,刘琅嬛,刘宝婵,等.黄芪甲苷对肝细胞的辐射防护作用[J].辐射研究与辐射工艺学报,2015,33(6):19-24.

(收稿日期:2018-03-21)