

一种辐射防护中药组方对小鼠脾脏辐射损伤的保护作用

周茜¹ 唐瑛² 孙欢³ 陈雪娇¹

¹(湖北文理学院 襄阳 441053)

²(中国人民解放军海军特色医学中心 上海 200433)

³(攀枝花市卫生健康委员会 攀枝花 617000)

摘要 探讨由黄芪、刺五加、山药、葡萄籽及酸枣仁提取物混合组成的一种辐射防护中药组方(简称防辐组方)对辐射损伤小鼠脾脏的影响及保护作用。实验小鼠随机分为5组:对照组、模型组、防辐组方低、中、高剂量组(500 mg/kg、1 000 mg/kg、2 000 mg/kg)。6.5 Gy ⁶⁰Co γ 射线一次性全身照射建立辐射损伤模型。观察各组小鼠脾脏系数、脾脏组织病理学形态、Caspase-3、Caspase-9及细胞色素C活性、凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2及P53蛋白表达、脾脏T淋巴亚群CD4⁺、CD8⁺百分比、CD4⁺/CD8⁺比值及各组脾脏细胞DNA损伤程度等指标的变化情况。实验结果显示:与模型组比较,给药组小鼠的体重及脾脏系数均有所增高。其中,中剂量组和高剂量组增高最为显著($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$);给药组小鼠脾脏中的CD4⁺、CD8⁺百分比、CD4⁺/CD8⁺比值及Bcl-2的蛋白表达均上升显著,Caspase-3、Caspase-9,细胞色素C活性及Bax、P53的蛋白表达有显著性下降($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$);同时各给药组小鼠脾脏细胞的Tail DNA%、Tail Length及Olive尾距(OTM)均有显著性下降($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$)。病理组织学观察发现,与模型组比较,给药组小鼠脾脏的红白髓区清晰,淋巴细胞坏死及中性粒细胞浸润均有明显下降。本研究提示,防辐组方对辐射损伤小鼠的脾脏具有一定的保护作用。推测其保护作用机制,可能与抑制细胞凋亡和减少DNA损伤有关。

关键词 防辐组方,辐射损伤,小鼠,脾脏

中图分类号 R81

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2022-0048

Protective effects of a Chinese medicinal formula on the spleen of irradiated mice

ZHOU Xi¹ TANG Ying² SUN Huan³ CHEN Xuejiao¹

¹(Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China)

²(Naval Medical Center of the PLA, Shanghai 200433, China)

³(Panzhuhua Health Commission, Panzhuhua 617000, China)

ABSTRACT A Chinese medicinal formula was prepared by combining extracts from *Astragalus*, Siberian ginseng, wild Yam, grape seed, and wild Jujube and assessed for the protective effect of the Fangfu formula powder on the spleen of radiation-injured mice. The mice were irradiated with a one-time ⁶⁰Co γ ray 6.5 Gy dose exposure. The experimental mice were randomized into five equal groups: the control, the model, and the low, middle, and

基金资助: 湖北省自然科学基金项目(2020CFB338)和襄阳市科技局医疗卫生领域科技计划项目(2020ZD06)资助

第一作者: 周茜,女,1987年2月出生,2013年于湖北中医药大学药理学专业获硕士学位,现就职于湖北文理学院

通信作者: 唐瑛,研究员, E-mail: 1446329418@qq.com

收稿日期: 初稿 2022-08-26; 修回 2023-01-19

Supported by the Natural Science Foundation of Hubei Province (2020CFB338) and Medical and health Science And Technology Plan Project of Xiangyang Science and Technology Bureau (2020ZD06)

First author: ZHOU Xi (female) was born in February 1987, and obtained her master's degree from Hubei University of Traditional Chinese Medicine in pharmacology in 2013. Now she works at Hubei University of Arts and Sciences

Corresponding author: TANG Ying, professor, E-mail: 1446329418@qq.com

Received 26 August 2022; accepted 19 January 2023

high-dose group (500 mg/kg, 1 000 mg/kg, 2 000 mg/kg, respectively). Changes in the spleen index, pathomorphisms in the spleen tissues, Caspase-3, Caspase-9, cytochrome C, CD4⁺, CD8⁺, the apoptosis-related proteins Bax, Bcl-2, and P53 protein expression, and the cell DNA damage in each group were measured. Compared with the model group, there was an increase in the body weight and spleen index of the dosed mice, with the most significant ($p < 0.01$ or $p < 0.05$) increase occurring in the middle- and high-dose groups. Furthermore, the Fangfu formula significantly ($p < 0.01$ or $p < 0.05$) increased the CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ percentages, and Bcl-2 protein expression and reduced the level of Caspase-3, Caspase-9, cytochrome C, Tail DNA%, Tail length, olive tail moment (OTM), Bax, and P53 protein expression in spleen tissue when compared with the model group. The histopathologic examination showed that the red and white pulp area of the spleen of the dosed mice was clear, and both lymphocyte necrosis and neutrophil infiltration were decreased significantly in the dosed mice as compared to that in the model group. The data suggest that the Fangfu Formula has a protective effect on the spleen of irradiated mice. These findings might be related to inhibition of DNA damage and apoptosis.

KEYWORDS Fangfu formulas, Radiation injury, Mice, Spleen

CLC R81

随着核能在医疗、军事、工业等领域的广泛应用,辐射不可避免地出现在人们的生活之中,辐射损伤已成为一种潜在的健康威胁。根据世界卫生组织的统计,恶性肿瘤现已成为世界范围内70岁前死亡的首要原因^[1]。放射治疗作为治疗恶性肿瘤的主要手段之一,其适应性范围广、治疗简便,约70%的患者接受放射治疗,40%的实体肿瘤可以用其根治^[2-3]。但放射治疗及诊断时,除了患病部位以外,正常的组织器官也会暴露于电离辐射下,引起不同程度的辐射损伤,影响患者的生活质量^[4]。有研究发现,肺癌、乳腺癌等胸部恶性肿瘤接受放射治疗后,会导致放射性肺损伤的发生率较高^[5]。辐射损伤在中医病机中可概括为:邪盛伤正,气血乏源,虚实夹杂,升降失常,故在治法上应扶正祛邪,健脾益气,胜湿止泻,凉血活血,恢复升降之气机^[6]。中药提取物存在广泛,具有较强的抗氧化性,又没有明显的毒副作用,近年来已逐渐成为各国研究筛选天然抗辐射防护剂的热点^[7]。本研究所用防辐组方主要由黄芪、刺五加、山药、葡萄籽及酸枣仁中药提取物组成。黄芪,归肝、肾、肺、脾经,有益气固表、敛汗固脱、利水消肿等功效。多份研究显示,黄芪具有明显的抗辐射作用,能保护肾、肺、脑、心脏等器官免受电离辐射引起的各种损伤^[8-9]。刺五加,归肝、肾经,祛风湿,强筋骨,活血脉,其提取物可增强机体免疫力,调节非特异性防御能力,具有明显的抗辐射、抗肿瘤、抗疲劳作用^[10]。山药,归脾、肺、肾经,具有补脾养胃、生津益肺、补肾益精的功效。现研究表明,山药中的多种活性成分具有抗刺激,促进上皮组织的修复,保护免疫系统、生殖系统等作用^[11-12]。本实

验以辐射损伤小鼠为研究对象,以对辐射有较高敏感性的脾脏为研究目标,探讨防辐组方对辐射损伤小鼠脾脏的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

健康 SPF 级昆明种小鼠,50只,雄性,体重18~22 g,购自复旦大学实验动物科学部,生产许可证号:SCXK(沪)2009-0019。

1.1.2 主要试剂

防辐组方成分包括:黄芪提取物(黄芪多糖含量50.86% UV)、刺五加提取物(刺五加皂苷含量0.82% HPLC)、山药提取物(薯蓣皂苷元含量16.82% HPLC)、葡萄籽提取物(原花青素含量95.3% UV)及酸枣仁提取物(酸枣仁皂苷2.13% UV),均由西安天一生物技术有限公司提供;PBS, Tris-NH₄Cl缓冲液由武汉谷歌生物科技有限公司提供;Caspase-3测试试剂盒(产品批号:20121009), Caspase-9测试试剂盒(产品批号:20121018),细胞色素C检测试剂盒(产品批号:20121010)均由南京建成生物工程研究所提供;CD4⁺检测试剂盒(产品批号:E07036-1633),CD8⁺检测试剂盒(产品批号:E01036-1633)均由美国eBioscience公司提供。

1.1.3 仪器

BD FACSC antol II型流式细胞仪,美国BD公司;徕卡TCS SP8激光共聚焦显微镜,德国徕卡;Imark自动酶标仪,美国BIO-RAD公司;400R

labofuge型冷冻离心机,德国贺利氏公司;VIS-7220分光光度计,北京第二光学仪器厂;BSA124S电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 药品配制

防辐组方的制备:将5种提取物粉末,按照黄芪提取物:刺五加提取物:山药提取物:葡萄籽提取物:酸枣仁提取物(37.1:37.1:16.7:5.6:3.5)的比例混合均匀。加入一定量的去离子水,震荡混匀,配制成质量分数分别为4%的低剂量组方样本药品、8%的中剂量组方样本药品以及16%的高剂量组方样本药品。

1.2.2 实验分组及给药

50只昆明种小鼠,按体重随机分为5组,每组10只,即:对照组(给予药物同等体积的0.9%生理盐水灌胃,不照射),模型组(给予药物同等体积的0.9%生理盐水灌胃,照射),低剂量组(500 mg/kg,照射),中剂量组(1 000 mg/kg,照射),高剂量组(2 000 mg/kg,照射)。连续给药14 d。

1.2.3 辐射损伤模型的建立

于给药第7天,将小鼠在清醒状态下置于有机玻璃盒中限制其活动,除对照组外,其余各组均用⁶⁰Co γ源进行一次性全身照射(海军医学研究所辐照中心),总剂量6.5 Gy,剂量率1.0 Gy/min,建立辐射损伤模型。照射后继续给药7 d。

1.2.4 脾脏系数

称取各组小鼠末次体重。取出脾脏并称重,脾脏系数(mg/g)=小鼠脾脏质量(mg)/小鼠末次体重(g)

1.2.5 脾脏病理学检测

将脾脏组织浸没于4%多聚甲醛中固定24 h后梯度脱水,二甲苯中透明20 min后浸蜡包埋。将蜡块切片放进60℃烘箱内烘烤以备用。将其放于二甲苯I和二甲苯II中各脱蜡10 min。而后逐个放于无水乙醇、95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇中各5 min,蒸馏水去酒精5 min。苏木素染色8 min,1%盐酸乙醇分化30 s,流水冲洗。伊红染液染色3 min。95%乙醇及无水乙醇中各脱水5 min。二甲苯I和二甲苯II中各透明5 min,封片。光镜下观察拍照,并进行病理评分。评分标准:0分为在正常范围内,1分为很轻微病变,2分为轻微病变,3分为中等病变,4分为严重病变^[13]。

1.2.6 Elisa法检测脾脏Caspase-3、Caspase-9及细胞色素C的表达

用生理盐水制成10%的脾脏匀浆,离心15 min,3 000 r/min,收集上清。按照试剂盒说明,对脾脏匀浆中的Caspase-3、Caspase-9及细胞色素C活性进行Elisa法检测。使用自动酶联免疫标记仪检测,每组设8个平行样,每份样品取60 μL,于450 nm处测OD值。根据标准曲线,得出样本浓度。

1.2.7 蛋白质印迹(Western blot)分析

取脾脏,用预冷TBS洗涤2~3次,剪小块匀浆。加入裂解液(加入Cooktail+磷酸化蛋白酶抑制剂)冰上匀浆,制成蛋白上样品。然后定量、电泳、转膜,用5%脱脂牛奶(0.5% TBST配)封闭1 h,用目的抗体按照一定比例稀释,4℃孵育过夜。次日加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育2 h。转染上蛋白的膜加入ECL发光液,采用化学发光法显影,凝胶成像系统拍摄照片。以目的蛋白条带灰度值与GAPDH条带灰度值的比值来反映凋亡蛋白的表达水平,采用Image J软件进行灰度值分析。

1.2.8 流式细胞仪检测脾脏T淋巴亚群CD4⁺、CD8⁺百分比

取脾脏组织置于预冷PBS中洗涤,并在70 μm尼龙网中碾压过网,制备单细胞悬液。将细胞1 500 r/min离心5 min,弃上清。加入Tris-NH₄Cl缓冲液1 mL破红,室温放置5 min,加入10 mL PBS终止破红,离心后再用PBS将细胞沉淀洗涤一次,重复离心弃上清。PBS重悬细胞计数后避光待染色。按照抗体说明书严格操作,稀释荧光抗体,进行样品染色。PBS洗涤重悬后上机检测。

1.2.9 彗星实验法检测脾脏细胞DNA的损伤程度

采集脾脏中间部位3 mm³大小组织作为样本,置于3 mL切碎液(20 mmol/L EDTA-2Na+10% DMSO的Hank's平衡液)中,剪碎组织释放细胞,经40 μm滤膜滤过后置冰上。取10⁶/mL细胞悬浮液30 μL与LMP琼脂糖140 μL混匀备用。将1%正常熔点琼脂糖加热至取55℃,取100 μL滴于磨砂载玻片上,盖上盖玻片,4℃冷却10 min。取下盖玻片,取备用混悬液70 μL滴在第一层琼脂糖上,每个样本平行制样2个,4℃冷却。除去盖玻片,浸入4℃的裂解液(1 mol/L Tris-HCl+0.5 mol/L EDTA+10% SDS+5 mol/L NaCl+ddH₂O)中1 h。后用冷却的PBS洗2次,5 min/次。将载玻片置于预冷至4℃的碱性

电泳液中解旋 40 min。将预冷的碱性电泳液加入水平电泳槽中, 20 min, 25 V, 300 mA, 后用 PBS 将载玻片洗涤 2 次, 5 min/次, 后将其置于中和液中 15 min。4 °C 过夜。使用荧光显微镜(激发波长 530 nm)观察并拍照。随机选择 100 个细胞, 用 CASP 彗星分析软件进行分析, 统计各组细胞彗尾长、尾 DNA% 及 OTM。

1.3 统计学方法

采用 SPSS18.0 统计软件进行方差统计学分析, 数据结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间差异性比较采用单因素方差分析, $p<0.05$ 表示差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 小鼠脾脏系数及体重变化

与对照组比较, 照射后小鼠脾脏系数和末次体重均有不同程度的下降, 其中模型组, 低剂量组及高剂量组下降有显著性差异($p<0.01$)。与模型组对比, 中剂量组和高剂量组小鼠的脾脏系数恢复明显($p<0.01$), 中剂量组的末次体重有显著性上升($p<0.05$)。

表1 各组小鼠体重及脾脏系数的变化
Table 1 Changes of weight and spleen index of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	初始体重 / g Initial weight	末次体重 / g Last weight	脾脏系数 / (mg·g ⁻¹) Spleen index
对照组 Control group	24.37±1.56	36.97±1.11**	0.031±0.009**
模型组 Model group	24.93±1.03	31.28±3.33 ^{##}	0.009±0.002 ^{##}
低剂量组 Low-dose group	23.79±1.31	32.45±2.96 ^{##}	0.010±0.002 ^{##}
中剂量组 Middle-dose group	24.56±1.78	36.15±1.32**	0.024±0.007**
高剂量组 High-dose group	23.77±0.63	34.95±2.43 ^{##}	0.014±0.004 ^{##*}

注: 与对照组比较, [#], $p<0.05$; ^{##}, $p<0.01$; 与模型组比较, ^{*}, $p<0.05$; ^{**}, $p<0.01$ 。

Note: compared with the control group, [#], $p<0.05$, ^{##}, $p<0.01$; compared with the model group, ^{*}, $p<0.05$; ^{**}, $p<0.01$.

2.2 小鼠脾脏病理组织分析

由图 1 可知, 对照组小鼠脾脏被膜厚薄均匀, 富含弹性纤维及致密结缔组织, 无明显异常; 脾脏实质红髓、白髓, 各层结构清晰, 其中脾索和脾血窦分布均匀与白髓分界清楚。模型组中大量白髓萎缩, 体积减小, 形态结构不规则, 白髓中可见淋巴细胞

坏死, 核固缩, 细胞减少(黑色箭头), 红髓大面积淤血(蓝色箭头)以及中性粒细胞浸润(黄色箭头)。病理评分(表 2)显示, 与模型组比较, 三个给药组小鼠脾脏的淋巴细胞坏死(黑色箭头)及中性粒细胞浸润(黄色箭头)均有明显下降, 红白髓区清晰, 未见明显淤血。这表明防辐组方能够减轻辐射后小鼠脾脏组织的损伤。

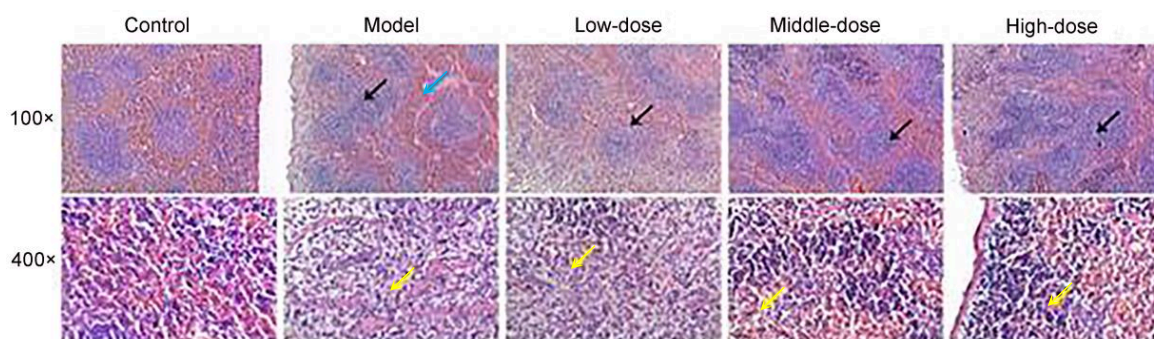


图1 各组小鼠脾脏 HE 染色组织病理图(彩色见网络版)

Fig.1 Pathological pictures of HE staining in different groups of mice spleen tissue (color online)

表2 各组小鼠脾脏组织的病理评分
Table 2 Pathological score of the spleen tissue of the mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	坏死 Necrosis	中性粒细胞浸润 Neutrophil infiltration
对照组 Control group	0.30±0.48	0.30±0.48
模型组 Model group	2.30±0.95 ^{###}	3.51±0.71 ^{###}
低剂量组 Low-dose group	1.71±0.167	1.40±0.52 ^{**}
中剂量组 Middle-dose group	0.92±0.88 ^{**}	1.32±0.82 ^{**}
高剂量组 High-dose group	0.41±0.52 ^{**}	0.61±0.52 ^{**}

注：与对照组比较，[#], $p<0.05$ ；^{###}, $p<0.01$ ；与模型组比较，^{*}, $p<0.05$ ；^{**}, $p<0.01$ 。

Note: compared with the control group, [#], $p<0.05$; ^{###}, $p<0.01$; compared with the model group, ^{*}, $p<0.05$; ^{**}, $p<0.01$

2.3 防辐组方对脾脏细胞 Caspase-3, Caspase-9 及细胞色素 C 活性的影响

如表3所示，与对照组比较，照射后小鼠脾脏细胞的 Caspase-9、Caspase-3 活性及细胞色素 C 活性均

升高，其中模型组和低剂量组最为显著 ($p<0.01$)。与模型组比较，三个给药组小鼠的 Caspase-9、Caspase-3 活性及细胞色素 C 活性均明显降低且均有统计学意义 ($p<0.01$, $p<0.05$)。

表3 防辐组方对脾脏细胞 Caspase-3, Caspase-9 及细胞色素 C 活性的影响
Table 3 Effect of Fangfu Formulas on Caspase-3, Caspase-9 and cytochrome C activity in spleen cells ($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	Caspase-3 / (ng·mL ⁻¹)	Caspase-9 / (ng·mL ⁻¹)	Cytochrome C / (nmol·mL ⁻¹)
对照组 Control group	2.98±0.03 ^{**}	1.49±0.01 ^{**}	22.87±0.83 ^{**}
模型组 Model group	3.54±0.10 ^{###}	1.62±0.03 ^{###}	34.32±2.42 ^{###}
低剂量组 Low-dose group	3.10±0.11 ^{###*}	1.57±0.02 ^{###*}	26.55±1.37 ^{###*}
中剂量组 Middle-dose group	3.05±0.02 ^{**}	1.53±0.01 ^{**}	23.12±0.77 ^{**}
高剂量组 High-dose group	2.98±0.02 ^{**}	1.50±0.08 [*]	20.90±0.18 ^{**}

注：与对照组比较，[#], $p<0.05$ ；^{###}, $p<0.01$ ；与模型组比较，^{*}, $p<0.05$ ；^{**}, $p<0.01$

Note: compared with the control group, [#], $p<0.05$; ^{###}, $p<0.01$; compared with the model group, ^{*}, $p<0.05$; ^{**}, $p<0.01$

2.4 防辐组方对脾脏 Bax, Bcl-2 及 P53 蛋白表达的影响

由图2显示，与对照组比较，模型组小鼠脾脏的 Bax, Bcl-2 及 P53 蛋白表达均有显著性变化

($p<0.01$)；与模型组比较，三个给药组小鼠脾脏的 Bax, P53 蛋白表达均明显下调, Bcl-2 蛋白表达明显提高，其中中剂量与高剂量组变化最为显著 ($p<0.01$, $p<0.05$)。

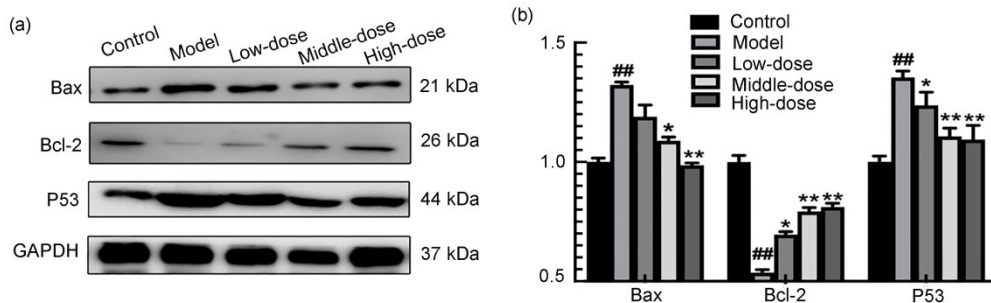


图2 各组小鼠脾脏 Bax、Bcl-2 及 P53 蛋白表达：

(a) Western blot 显示各组小鼠脾脏 Bax、Bcl-2 及 P53 蛋白的表达；(b) Bax、Bcl-2 及 P53 蛋白定量分析；与对照组比较，[#], $p<0.05$ ；^{###}, $p<0.01$ ；与模型组比较，^{*}, $p<0.05$ ；^{**}, $p<0.01$

Fig. 2 Expression of Bax, Bcl-2 and P53 proteins in the spleen of mice in each group: (a) western blot showing expression of Bax, Bcl-2 and P53 proteins in the spleen; (b) quantitative analysis of Bax, Bcl-2 and P53; compared with the control group, [#], $p<0.05$, ^{###}, $p<0.01$; compared with the model group, ^{*}, $p<0.05$, ^{**}, $p<0.01$

2.5 防辐组方对脾脏T淋巴细胞亚群的影响

由表4可以看出,与对照组比较,照射后的CD4⁺、CD8⁺及CD4⁺/CD8⁺均下降,其中模型组和低

剂量组下降显著($p<0.05$)。与模型组比较,三个给药组的CD4⁺、CD8⁺及CD4⁺/CD8⁺有显著性上升($p<0.01, p<0.05$)。

表4 防辐组方对各组小鼠脾脏T淋巴细胞亚群的影响
Table 4 Effect of Fangfu formulas on T lymphocyte subsets in spleen of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	CD4 ⁺ / %	CD8 ⁺ / %	CD4 ⁺ / CD8 ⁺
对照组 Control group	53.10±15 ^{**}	16.80±3.23 ^{**}	3.16±1.47 ^{**}
模型组 Model group	14.88±5.83 ^{##}	8.38±5.45 ^{##}	1.78±0.46 ^{##}
低剂量组 Low-dose group	42.45±3.32 ^{***}	16.33±0.58 ^{***}	2.60±0.03 ^{***}
中剂量组 Middle-dose group	44.95±19.59 ^{**}	16.64±0.78 ^{**}	2.71±1.34 ^{**}
高剂量组 High-dose group	45.85±1.06 ^{**}	16.73±0.88 ^{**}	2.74±0.86 ^{**}

注: 与对照组比较, #, $p<0.05$; ##, $p<0.01$; 与模型组比较, *, $p<0.05$; **, $p<0.01$
Note: compared with the control group, #, $p<0.05$, ##, $p<0.01$; compared with the model group, *, $p<0.05$; **, $p<0.01$.

2.6 防辐组方对脾细胞DNA损伤的影响

由图3可见,照射后小鼠的脾脏细胞呈现出彗星细胞指标的典型改变,提示其DNA损伤均十分明显。表5显示,与对照组比较,模型组和低剂量组小鼠脾脏细胞的彗尾DNA%,尾长和OTM均显著

上升($p<0.01$)。与模型组相比,给药组小鼠的小鼠脾脏细胞彗尾DNA%,尾长和OTM均降低,中剂量组和低剂量组更为显著($p<0.01$)。结果表明,辐射能严重破坏小鼠脾脏细胞DNA结构,引起DNA损伤,防辐组方对其具有保护作用。

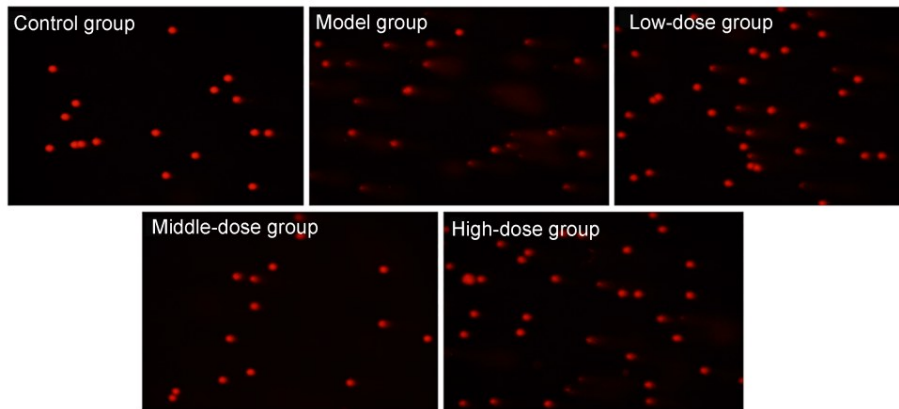


图3 各组小鼠脾脏细胞彗星实验图
Fig.3 Plot of comet assay of spleen cells of mice in each group

表5 防辐组方对各组小鼠脾脏细胞DNA损伤的影响
Table 5 Effects of Fufang capsules on DNA damage in spleen cells of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	Tail DNA / %	Tail length / μm	OTM / μm
对照组 Control group	8.14±0.52 ^{**}	9.10±1.07 ^{**}	1.07±0.83 ^{**}
模型组 Model group	20.02±2.11 ^{##}	20.60±3.22 ^{##}	3.76±1.65 ^{##}
低剂量组 Low-dose group	14.34±2.51 ^{***}	14.80±1.89 ^{***}	2.29±1.36 ^{***}
中剂量组 Middle-dose group	13.81±1.87 ^{**}	13.60±2.10 ^{**}	2.10±0.82 ^{**}
高剂量组 High-dose group	18.76±1.66 ^{**}	19.38±1.52 [*]	3.85±0.91 ^{**}

注: 与对照组比较, #, $p<0.05$; ##, $p<0.01$; 与模型组比较, *, $p<0.05$; **, $p<0.01$
Note: compared with the control group, #, $p<0.05$, ##, $p<0.01$; compared with the model group, *, $p<0.05$; **, $p<0.01$

3 讨论

免疫系统是辐射损伤较为敏感的靶点,脾脏作为机体最大的外周免疫器官,电离辐射会对脾脏哪些方面产生影响,值得深入探讨。本实验通过检测脾脏系数,脾脏病理形态,脾脏细胞凋亡,DNA损伤,T淋巴细胞亚群比例等指标,研究电离辐射对脾脏,乃至免疫系统的影响具有重要的意义^[14]。防辐组方由黄芪、刺五加、山药等组成,以“扶正祛邪、虚则补之”为指导配制而成。本文通过分析防辐组方对辐射损伤小鼠脾脏的保护作用,以进一步探讨其对免疫系统的影响。

辐射损伤往往会造成小鼠脏器的损伤萎缩,表现为其系数的减少^[15]。本实验分别从体重及脾脏系数变化分析,照射后小鼠的末次体重及脾脏系数明显下降,与模型组对比,中剂量和高剂量防辐组方的小鼠的末次体重及脾脏系数均有显著性提高($p<0.01$, $p<0.05$)。由于脏器系数可在一定程度上反映机体免疫功能的强弱^[16],初步可见防辐组方对辐射损伤小鼠脾脏及免疫功能有一定的保护作用。

有研究表明,辐射可以通过直接或间接作用,产生自由基破坏人体细胞的生物膜及核酸,导致细胞膜和蛋白质的损伤,进而引起细胞的凋亡,这也是辐射损伤最早期的生物学效应^[17]。P53、Bax、Bcl-2和Caspase是调控细胞凋亡的重要蛋白,细胞凋亡即为Caspase不可逆水解底物的级联放大反应的过程^[18]。当P53上调时,控促凋亡基因(Bax)表达升高和抗凋亡基因(Bcl-2)表达降低,线粒体收到凋亡信号,释放的细胞色素C会与Apaf-1结合形成凋亡体,凋亡体即可激活Caspase-9,活化的Caspase-9会继续激活下游的Caspase-3引发级联反应,进而引起细胞凋亡。检测结果显示,照射后小鼠脾脏细胞的细胞色素C、Caspase-9、Caspase-3活性及Bax表达均升高,其中模型组和低剂量组上升最为显著($p<0.01$),说明辐射已引发小鼠脾脏细胞凋亡。与模型组比较,三个给药组小鼠的细胞色素C、Caspase-9、Caspase-3活性及Bax表达均明显下降($p<0.01$, $p<0.05$)。提示,防辐组方对由电离辐射造成的脾脏细胞凋亡有明显的抑制作用,作用机制见图4。

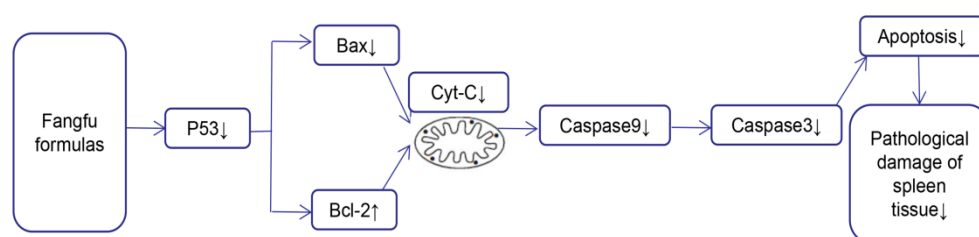


图4 防辐组方对辐射损伤小鼠脾脏组织的抗凋亡机制
Fig.4 Anti-apoptotic mechanism of Fangfu formulas decoction on spleen of mice with radiation injury

脾脏组织病理结果显示,三个给药组小鼠脾脏红骨髓区清晰,同时淋巴细胞坏死及中性粒细胞浸润等情况较模型组明显好转,但也未完全恢复正常。说明防辐组方的干预机制可能是通过抑制Bax过度表达和促进Bcl-2过度表达来抑制线粒体凋亡通路激活,抑制Caspase的级联反应,从而缓解脾脏组织的病理形态损伤,发挥抗辐射作用^[19]。

DNA是辐射损伤的重要靶点,当受到电离照射后,分子结构发生改变,一般包括DNA交联、单链断裂及双链断裂,进而可导致生物学功能改变^[20]。彗星实验可灵敏地预测受试物对细胞核和DNA碱基的损伤作用^[21]。本次试验通过测定细胞DNA迁移长度,尾DNA含量及OTM,来测定脾脏细胞的DNA损伤程度,从而确定防辐组方的使用剂量与DNA损伤效应的对应关系。实验结果显示,模型组小鼠脾

脏细胞DNA确实损伤严重($p<0.01$)。与模型组比较,给药组小鼠的DNA损伤程度显著降低($p<0.01$, $p<0.05$),说明防辐组方对电离辐射造成的小鼠脾脏细胞DNA损伤具有一定的保护作用。

正常情况下,T细胞作为机体内进行细胞免疫的主要效应细胞,其细胞亚群的数目在脾脏组织中相对稳定,CD4⁺/CD8⁺比值动态平衡。当T细胞总数或CD4⁺/CD8⁺比值发生变化时,可视为免疫调节功能异常^[22],即比值过低常见于免疫性疾病、恶性肿瘤或病毒性感染等,比值过高则可能发生自身免疫性疾病。致死剂量⁶⁰Co γ 射线全身照射可抑制免疫系统活性,但也有研究报道,低剂量辐射所致的自身损伤细胞或组织可诱导机体发生免疫应答^[23-24]。本研究的结果显示,与对照组比较,照射后各组小鼠的CD4⁺、CD8⁺百分比和CD4⁺/CD8⁺比值均下降明

显,说明辐射已造成小鼠免疫功能异常。与模型组比较,三个给药组的CD4⁺、CD8⁺百分比及CD4⁺/CD8⁺比值有显著性上升($p<0.01$, $p<0.05$)。与对照组比较,中剂量组和高剂量组的CD4⁺、CD8⁺百分比和CD4⁺/CD8⁺比值无统计学差异,提示本研究的辐射剂量已造成免疫系统抑制,防辐组方对辐射损伤的脾脏细胞免疫活性有显著的保护作用。

4 结论

辐射损伤会造成小鼠脾脏系数下降、脾脏组织病变、脾细胞凋亡、DNA损伤及免疫调节功能异常。本实验中,防辐组方中的黄芪、刺五加、山药、葡萄籽及酸枣仁提取物通过健脾益气,补肾益精等发挥了抗辐射作用,从病理组织、细胞凋亡、脾脏免疫功能及DNA损伤等方面对辐射引起的小鼠脾脏损伤起到一定的保护作用。综上所述,其作用机制可能是通过抑制线粒体凋亡通路来实现的。

作者贡献声明 周茜完成实验设计、实验操作及文章撰写;孙欢完成部分试验操作及数据处理;陈雪娇负责文献调研及图片处理;唐瑛负责实验设计并指导整个实验。全体作者均已阅读并认可该论文的最终版本。

参考文献

- 1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018, **68**(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- 2 付海英, 吴国忠. 草本组方对 γ 射线全身照射小鼠的保护作用[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2022, **40**(2): 020301. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2021-0205. FU Haiying, WU Guozhong. Protection against γ ray-induced damage using herbal formulas[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2022, **40**(2): 020301. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2021-0205.
- 3 Gilbert E S. Ionising radiation and cancer risks: what have we learned from epidemiology? [J]. International Journal of Radiation Biology, 2009, **85**(6): 467-482. DOI: 10.1080/09553000902883836.
- 4 Dowlath M J H, Karuppanan S K, Sinha P, *et al.* Effects of radiation and role of plants in radioprotection: a critical review[J]. Science of the Total Environment, 2021, **779**: 146431. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146431.

- 5 薛琦, 王曼, 刘丽波. 表没食子儿茶素没食子酸酯的辐射防护作用及其机制研究进展[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2020, **38**(5): 050101. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2020.rj.38.050101. XUE Qi, WANG Man, LIU Libo. Research progress on the radioprotective effect of epigallocatechin gallate and its mechanism[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2020, **38**(5): 050101. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2020.rj.38.050101.
- 6 李盼飞, 卢曦, 何昶昊, 等. 电离辐射致肠道急性损伤的中医病机探讨[J]. 环球中医药, 2020, **13**(4): 616-619. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1749.2020.04.012. LI Panfei, LU Xi, HE Changhao, *et al.* Discussion on TCM pathogenesis of acute intestinal injury caused by ionizing radiation[J]. Global Traditional Chinese Medicine, 2020, **13**(4): 616-619. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1749.2020.04.012.
- 7 Checker R, Patwardhan R S, Jayakumar S, *et al.* Chemical and biological basis for development of novel radioprotective drugs for cancer therapy[J]. Free Radical Research, 2021, **55**(8): 828-858. DOI: 10.1080/10715762.2021.1876854.
- 8 Chen T, Wang R N, Jiang W J, *et al.* Protective effect of astragaloside IV against paraquat-induced lung injury in mice by suppressing rho signaling[J]. Inflammation, 2016, **39**(1): 483-492. DOI: 10.1007/s10753-015-0272-4.
- 9 Lu M L, Tang F T, Zhang J, *et al.* Astragaloside IV attenuates injury caused by myocardial ischemia/reperfusion in rats via regulation of toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling pathway[J]. Phytotherapy Research: PTR, 2015, **29**(4): 599-606. DOI: 10.1002/ptr.5297.
- 10 李思佳. 刺五加中改善辐射小鼠脑损伤的功能成分研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2019. LI Sijia. Study on the functional components of acanthopanax sentionsus for improving brain damage in irradiated mouse[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2019.
- 11 徐俊杰, 王珺, 杨占群. 山药多糖对低强度连续微波辐射小鼠免疫系统功能的影响[J]. 上海中医药杂志, 2019, **53**(11): 82-85. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2019.11.017. XU Junjie, WANG Jun, YANG Zhanqun. Effect of yam polysaccharides on immune system function of mice exposed to continuous low-density microwave radiation [J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2019, **53**(11): 82-85. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2019.11.017.

- 12 周茜, 杨林, 张文静, 等. 薯蓣皂苷元对少弱精子症小鼠精子质量和生殖系统氧化应激损伤的影响[J]. 湖北文理学院学报, 2017, **38**(5): 85-88.
ZHOU Xi, YANG Lin, ZHANG Wenjing, *et al.* Assessment of sperm quality and oxidative stress injury of reproductive system after oligoasthenospermia mice received diosgenin[J]. Journal of Hubei University of Arts and Science, 2017, **38**(5): 85-88.
- 13 Peter C. Mann. 大鼠和小鼠病理变化术语及诊断标准的国际规范(INHAND)[M]. 杨利峰, 周向梅, 赵德明, 主译. 北京: 中国农业出版社, 2019.
Peter C. Mann. International Specification for pathological terminology and diagnostic criteria in rats and mice (INHAND) [M]. YANG Lifeng, ZHOU Xiangmei, ZHAO Deming, chief translator. Beijing: China Agricultural Press, 2019.
- 14 颜贺欣, 夏玉军, 苏威. UCMSC对辐射损伤小鼠脾脏和肠道屏障防护作用[J]. 青岛大学医学院学报, 2016, **52**(3): 291-293. DOI: 10.13361/j.qdyxy.201603011.
YAN Hexin, XIA Yujun, SU Wei. Barrier protection of umbilical cord mesenchymal stem cells on spleen and intestine of mouse with radiation damage[J]. Acta Academiae Medicinae Qingdao Universitatis, 2016, **52**(3): 291-293. DOI: 10.13361/j.qdyxy.201603011.
- 15 Huang L M, Shi P, Zhang L J, *et al.* Compound Chinese medicine of anti-radiation protective effect of radiation injury in mice[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2011, **25**(2): 132-134. DOI: 10.3402/mehd.v23i0.14787.
- 16 杨建鑫, 年永琼, 段雅彬, 等. 发酵冬虫夏草菌粉中虫草多糖的含量测定及其抗辐射作用初探[J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2020, **41**(1): 53-59. DOI: 10.13452/j.cnki.jqmc.2020.01.012.
YANG Jianxin, NIAN Yongqiong, DUAN Yabin, *et al.* Assay of polysaccharides in fermented cordyceps sinensis powder and anti-radiation effect of cordyceps sinensis polysaccharides[J]. Chinese High Altitude Medicine and Biology, 2020, **41**(1): 53-59. DOI: 10.13452/j.cnki.jqmc.2020.01.012.
- 17 Furlong H, Mothersill C, Lyng F M, *et al.* Apoptosis is signalled early by low doses of ionising radiation in a radiation-induced bystander effect[J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2013, **741/742**: 35-43. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2013.02.001.
- 18 Codenotti S, Faggi F, Ronca R, *et al.* Caveolin-1 enhances metastasis formation in a human model of embryonal rhabdomyosarcoma through Erk signaling cooperation[J]. Cancer Letters, 2019, **449**: 135-144. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.02.013.
- 19 颜春鲁, 安方玉, 刘永琦, 等. 黄芪汤对重离子辐射($^{12}\text{C}^{6+}$)所致大鼠放射性脑损伤的保护作用[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2020, **38**(6): 060301. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2020.rj.38.060301.
YAN Chunlu, AN Fangyu, LIU Yongqi, *et al.* Protective effects of *Huangqi* decoction on heavy ion radiation ($^{12}\text{C}^{6+}$) injury of the rat brain[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2020, **38**(6): 060301. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2020.rj.38.060301.
- 20 张超, 傅华, 蔡建明, 等. CpG-ODN对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射所致胸腺损伤的防治作用[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2021, **39**(1): 010302. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2021.rj.39.010302.
ZHANG Chao, FU Hua, CAI Jianming, *et al.* Effect of CpG-ODN on thymus damage radiated by carbon ions[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2021, **39**(1): 010302. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2021.rj.39.010302.
- 21 文海若, 颜玉静, 王曼虹, 等. 基于彗星实验的大黄素型单萜酮体内外毒性研究[J]. 中国现代中药, 2020, **22**(10): 1644-1649. DOI: 10.13313/j.issn.1673-4890.20191030001.
WEN Hairuo, YAN Yujing, WANG Manhong, *et al.* A toxicity study of monanthone with emodin type based on comet assay[J]. Modern Chinese Medicine, 2020, **22**(10): 1644-1649. DOI: 10.13313/j.issn.1673-4890.20191030001.
- 22 张续, 郑洁, 赵莉平, 等. 骨性关节炎中T细胞变化和作用的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2022, **38**(1): 107-112. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2022.01.020.
ZHANG Xu, ZHENG Jie, ZHAO Liping, *et al.* Research progress of T cell changes and functions in osteoarthritis [J]. Chinese Journal of Immunology, 2022, **38**(1): 107-112. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2022.01.020.
- 23 Ratikan J A, Micewicz E D, Xie M W, *et al.* Radiation takes its toll[J]. Cancer Letters, 2015, **368**(2): 238-245. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.03.031.
- 24 田宇, 赵冬梅, 尹玲玲, 等. ^{60}Co γ 射线致死剂量全身照射对小鼠脾脏和肠系膜淋巴结T细胞亚群表面免疫分子表达水平的影响[J]. 国际输血及血液学杂志, 2016, **39**(1): 26-30. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-419X.2016.01.005.
TIAN Yu, ZHAO Dongmei, YIN Lingling, *et al.* Effects on expression levels of surface immune molecules on T cell subsets in spleens and mesenteric lymph node of mice irradiated by ^{60}Co γ -ray lethally total body irradiation[J]. International Journal of Blood Transfusion and Hematology, 2016, **39**(1): 26-30. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-419X.2016.01.005.