

白药子总生物碱对X射线辐射小鼠白细胞减少症的保护作用及机制研究

李志敏¹, 孙桂波^{2*}, 王 敏²

1. 广东药科大学, 广东 广州 510006

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: **目的** 探讨白药子总生物碱对X射线辐射损伤致小鼠白细胞减少的保护作用及其机制。**方法** 采用辐射法(一次性全身照射, 照射剂量2.5 Gy)制备白细胞减少症小鼠模型, 90只昆明种小鼠随机分为对照组, 模型组, 白药子生物碱低、中、高剂量(1.25、2.50、5.00 mg·kg⁻¹)组以及重组人粒细胞刺激因子(G-CSF)阳性对照组, 共6组, 每组15只。除对照组外, 各组小鼠均进行1次性全身照射, 白药子总生物碱各组分别于照射前3 d及照射后连续ig给药3、15 d, G-CSF组于照射前3 d sc给药, 照射后ig给药15 d。实验结束后取小鼠股骨计算有核细胞数及DNA水平。处死小鼠后称取小鼠肝脏、脾脏和胸腺质量, 计算脏器指数。采用血液学分析仪分别于照射前及照射后3、7、15 d对外周血细胞中的白细胞(WBC)进行计数。收集小鼠血清, 采用酶联免疫吸附法检测粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、血清γ干扰素(IFN-γ)、白细胞介素-3(IL-3)、白细胞介素-4(IL-4)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)和可溶性细胞间黏附分子(SICAM-1)。通过苏木精和伊红染色检测小鼠肝脏、脾脏的病理变化。电镜观察脾脏、肝脏的超微结构。取肝脏组织, 检测抗氧化相关指标。**结果** 白药子总生物碱可以明显抑制X射线照射后14 d内外周血白细胞的减少, 同时提高X射线辐射后的骨髓DNA水平及小鼠造血生长因子GM-CSF水平, 提高X射线辐射后免疫炎症因子IL-3、SICAM-1水平, 减轻肝脏和脾脏组织损伤, 维持小鼠肝脏、脾脏正常功能, 并显著降低肝脏中的丙二醛(MDA)和黄嘌呤氧化酶(XOD)水平。**结论** 白药子总生物碱增强免疫和造血功能, 揭示其作为放射防护剂和辐射缓解剂的治疗潜力。

关键词: 白药子总生物碱; 白细胞减少症; 辐射损伤; 抗氧化; 丙二醛; 黄嘌呤氧化酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)06-1275-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.06.012

Protective effects and mechanism of total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* on leukopenia induced by X-ray radiation

LI Zhimin¹, SUN Guibo², WANG Min²

1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and the mechanism of the total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* on leukopenia induced by X-ray radiation damage in mice. **Methods** A mouse model of leukopenia was made by radiation method (one-time whole-body irradiation, irradiation dose of 2.5 Gy). Kunming mice were randomly divided into six groups: control group, model group, total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* low, medium, high dose (1.25, 2.50, 5.00 mg·kg⁻¹) groups, and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) positive control group with 15 animals in each group. Except for the control group, all groups of mice were subjected to one-time whole-body irradiation, and the total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* were ig administered consecutively for 15 d before and after irradiation in each group, respectively, while the G-CSF group was sc administered for 3 d before irradiation and ig for 15 d after irradiation. The number of nucleated cells and DNA level were calculated after the experiment. Liver, spleen and thymus mass were weighed to calculate organ indices after execution of mice. White blood cells (WBC) in peripheral blood cells were counted before and 3, 7, 15 d after, respectively, by using a hematology analyzer. Serum from mice were collected by enzyme-linked ELISA for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), serum interferon (IFN-γ), interleukin-3 (IL-3), interleukin-4 (IL-4), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and soluble intercellular

收稿日期: 2023-12-31

第一作者: 李志敏, 女, 硕士在读, 研究方向为中药药效评价。E-mail: 376501560@qq.com

*通信作者: 孙桂波, 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药及复方药效物质基础及分子机制。E-mail: sunguibo@126.com

adhesion factor (SICAM-1). Pathologic changes in the liver and spleen of mice were detected by hematoxylin and eosin staining. The ultrastructure of spleen and liver was observed by electron microscopy. Liver tissue was obtained and tested for antioxidant-related indices. **Result** It showed that the total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* could significantly inhibit the reduction of peripheral blood leukocytes within 14 d after X-ray irradiation, at the same time increase the content of bone marrow DNA and the content of hematopoietic growth factor GM-CSF in mice after X-ray radiation, increase the content of immunoinflammatory factors IL-3 and SICAM-1 after X radiation, reduce the damage of liver and spleen tissues, maintain the normal function of the liver and spleen in mice, and significantly reduce the levels of malondialdehyde (MDA) and xanthine oxidase (XOD) in liver. **Conclusion** Enhancement of immune and hematopoietic functions by the total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* reveals its therapeutic potential as a radioprotective and radiation mitigating agent.

Key words: total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix*; leukopenia; ionizing radiation damage; antioxidant; malondialdehyde; xanthine oxidase

放化疗是治疗恶性肿瘤最常见的手段,而白细胞减少症是其常见不良反应^[1]。白细胞减少症的特征是外周血白细胞数量异常减少^[2],白细胞减少可能会使患者身体各个部位发生严重感染,从而危及生命^[3]。20世纪90年代临床上首次采用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)治疗白细胞减少症,降低了放射损伤致白细胞减少症的发生率并改善了患者预后^[4],然而,G-CSF的应用附带着高昂的治疗成本与无法忽视的不良反应^[5],因此人们对价格低廉有效和低不良反应的预防及治疗辐射(IR)诱导的白细胞减少症的药物需求日益凸显。

生物体直接暴露于射线辐射会导致骨髓细胞的DNA损伤以及生物体内活性氧(ROS)的过量产生^[6],从而使机体造血、免疫和抗氧化功能受损^[7-9]。机体负责造血功能的造血干细胞(HSC)/祖细胞(HPC)对射线辐射极其敏感,暴露于射线辐射会减少HSC和HPC的数量,并导致细胞凋亡和有丝分裂停滞^[10]。脾脏是一个对辐射敏感度极高的器官^[11],免疫系统细胞是红外线敏感最高的细胞之一,射线辐射损伤的免疫抑制作用会增加所有脾细胞亚群的细胞凋亡^[12]。肝脏富含抗氧化酶和线粒体,是ROS产生的主要场所^[13],射线辐射在肝脏中诱导过多的ROS并导致氧化应激,严重损害肝脏的抗氧化功能^[14]。

白药子总生物碱是从防己科千金藤属植物头花千金藤(金线吊乌龟)*Stephania cepharantha* Hayata的干燥块根中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱。已有研究表明,双苄基异喹啉类生物碱在日本广泛应用于许多急性或慢性疾病的治疗,包括毒蛇咬伤^[15]、斑秃^[16]和放射治疗期间的白细胞减少症^[17],且没有严重的不良反应。研究证实,双苄基异喹啉类生物碱具有多种药理作用,包括稳定膜、逆转多药耐药性、抗肿瘤、诱导细胞凋亡、抗炎、清

除自由基、抗人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)、抗过敏和免疫调节作用^[11],有研究表明4种双苄基异喹啉类生物碱(头孢嘌呤、小檗胺、异四氢吲哚和环氨酸)的组合可增加边缘池中多形核细胞的募集^[18],这种组合不仅减少了辐射诱导的细胞凋亡,还减少了辐射对T细胞增殖的细胞毒性作用。推测白药子总生物碱对辐射诱导的白细胞减少症可能具有较好的保护作用。故本研究探讨白药子总生物碱对辐射诱导的白细胞减少、氧化应激和免疫损伤的保护作用及其机制。

1 材料

1.1 动物

雄性昆明种小鼠,体质量为18~22 g,购自斯贝福(北京)实验动物科技有限公司,合格证编号:11401500009009,生产许可证号:SCXK-(京)2011-0004。所有小鼠均饲养在特定的无病原体设施中,在整个研究过程中保持在23~25℃,饲养在中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所实验动物中心12 h/12 h光照/黑暗循环环境中。所有实验研究均按照中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所动物护理和使用委员会(IACUC)批准的程序进行(审查批号:SLXD-20160112023)。

1.2 药品与试剂

白药子总生物碱(总生物碱质量分数:73.96%)由安徽九方药物研究院有限公司提供,批号:20150624;用时以1%羧甲基纤维素钠溶液新鲜配制,4℃保存,供ig给药。

重组人粒细胞刺激因子注射液(G-CSF),规格:每支 1.2×10^7 IU(200 μg):1.2 mL,由齐鲁制药有限公司生产,批号:201510010TD;用时以0.9%氯化钠溶液新鲜配制,供sc给药。

小鼠血清ELISA试剂盒:粒细胞-巨噬细胞集落

刺激因子(GM-CSF)、 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-3(IL-3)、白细胞介素-4(IL-4)、可溶性细胞间黏附分子-1(SICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1),均购自RayBiotech公司。

生化试剂盒均购自南京建成生物工程研究所:超氧化物歧化酶(SOD,批号:20160524),丙二醛(MDA,批号:20160519),黄嘌呤氧化酶(XOD,批号:20160525),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px,批号:20160524),过氧化氢酶(CAT,批号:20160528)。

1.3 主要仪器

Thermo Scientific Nano2000 微量分光光度计,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;HT7700 透射电子显微镜购于日本 Hitachi 公司;Sysmex XT-2000i 血液分析仪,日本希森美康公司。

2 方法

2.1 辐射造模^[18]

本实验使用军事医学科学院放射与辐射医学研究所 RAD SOURCE RS2000 型 X 光-ray 生物学辐照仪(Pro Biological System)进行辐射造模,选择一次性全身照射,照射剂量:2.5 Gy;照射剂量率:95.61 cGy·min⁻¹。过滤条件 0.3 mm 铜,照射条件为能量 8 Mev,源轴距(SAD)100 cm。

2.2 动物分组与给药

90 只雄性昆明种小鼠(18~22 g),适应性喂养 1 周,按体质量随机分为对照组、模型组及白药子总生物碱低、中、高剂量组及 G-CSF 阳性对照组,每组 15 只。实验期间白药子总生物碱低、中、高剂量组分别 ig 给予白药子总生物碱 1.25、2.50、5.00 mg·kg⁻¹,每日 1 次,辐射前持续给药 3 d,辐射后持续给药 15 d;G-CSF 组以 100 μ g·kg⁻¹ 辐射前 ig 给药,持续 3 d,辐射后 sc 给药^[19],持续 15 d;对照组和模型组辐射前及辐射后均 ig 给予等容量溶剂(1%羧甲基纤维素钠)。给药 3 d 后除对照组外,均以 2.5 Gy 照射剂量 X 射线全身照射 1 次,分别于照射前及照射后第 3、7、15 天检测各组小鼠外周血白细胞数量。

2.3 骨髓有核细胞计数

照射后第 15 天颈椎脱臼处死小鼠,取出左侧股骨,用纱布去除软组织,使用 5 mL 注射器吸取 10 mL(pH=7.2)PBS 溶液,将全部骨髓冲入 15 mL 离心管中,再用 1 mL 注射器针头滤过 1 次,取 4% 乙酸 0.5 mL 和 0.5 mL 骨髓液于另一个试管中混匀,放置 2 min,再次混匀,取少量液体滴入细胞计数板中,

于 Counstar 全自动细胞计数仪中计数骨髓有核细胞。

2.4 骨髓 DNA 水平测定

照射后第 15 天取右侧股骨,吸取 10 mL 5 mmol·L⁻¹的 CaCl₂ 溶液,将全部的骨髓冲入离心管中,在 4 °C 的条件下放置 30 min,2 500 r·min⁻¹ 离心 15 min,弃掉上清,向沉淀物中加入 0.2 mol·L⁻¹的 HClO₄ 溶液 5 mL,充分混匀,90 °C 水浴 15 min;冷却至室温后,3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液,用微量分光光度计测定骨髓 DNA 水平。

2.5 脏器指数测定

实验结束时称量小鼠体质量,处死小鼠,取肝脏、脾脏和胸腺,并分别称质量,计算脏器指数。

脏器指数=脏器质量/体质量

2.6 外周血白细胞计数

各组动物分别于照射前、照射后第 3、7、15 天尾末梢采血 40 μ L,加入血液稀释液 160 μ L,用血液分析仪进行白细胞计数。

2.7 血清免疫细胞因子和细胞黏附分子的测定

第 15 天尾末梢取血后,小鼠摘眼球取血,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,分离血清,利用 ELISA 试剂盒测定小鼠血清中 GM-CSF、IFN- γ 、IL-3、IL-4、SICAM-1、VCAM-1 水平。

2.8 脾脏和肝脏组织病理学检查

实验结束后,处死小鼠。收集脾脏和肝脏组织,用 4% 甲醛固定,石蜡包埋,切成 5 mm 切片,用苏木精和伊红(HE)染色,在光学显微镜下进行组织病理学检查。

2.9 脾脏和肝脏超微结构检查

收集脾脏和肝脏组织,切成 1 mm 切片,并固定在 2.5% 戊二醛中。石蜡包埋和超薄切片(30~40 nm)后,通过透射电子显微镜(TEM)观察细胞的超微结构。

2.10 肝脏抗氧化能力指标测定

处死小鼠后,收集肝脏组织。加入 0.9%NaCl 溶液,制备 10% 肝组织匀浆。将匀浆在 4 °C 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。收获上清液并储存在 -80 °C,用于检测 SOD、XOD、GSH-Px、CAT 和 MDA 水平,按试剂盒说明书步骤测定。

2.11 统计分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析,多样本两两比较采用 Duncan 检验。

3 结果

3.1 白药子总生物碱对辐射损伤小鼠外周血白细胞数量、骨髓DNA水平、骨髓有核细胞数量及脏器指数的影响

外周血中白细胞的数量是评估放射损伤的重要标志物。表1结果显示X射线照射后第3天,模型组白细胞数量显著降低($P < 0.01$)。照射后第15天,白药子总生物碱中、高剂量组小鼠的白细胞数

量仍低于照射前,但显著高于同时间点模型组($P < 0.05, 0.01$),G-CSF组小鼠的白细胞数量均高于同时间点模型组($P < 0.01$)。

白药子总生物碱中剂量组能够提高骨髓DNA水平($P < 0.05$),见表2,表明白药子总生物碱能够抑制X射线诱导的小鼠骨髓DNA损伤。白药子总生物碱各剂量组对骨髓有核细胞数量以及小鼠脏器指数无明显影响(表3)。

表1 白药子总生物碱对X射线辐射小鼠外周血白细胞计数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effects of total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* on peripheral blood leukocyte numbers of X-ray irradiated mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/(mg·kg ⁻¹) | 白细胞计数/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$) | | | |
|---------|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | 辐射0天 | 辐射第3天 | 辐射第7天 | 辐射第15天 |
| 对照 | — | 16.34±2.86 | 8.92±1.79 | 12.29±2.97 | 18.30±3.30 |
| 模型 | — | 15.17±4.20 | 2.48±0.61 ^{##} | 4.70±1.09 ^{##} | 6.70±2.12 ^{##} |
| 白药子总生物碱 | 1.25 | 14.18±6.06 | 2.68±0.60 | 6.07±2.39 | 8.24±1.41 |
| | 2.50 | 14.34±4.16 | 2.58±1.04 | 5.44±1.67 | 9.29±3.26* |
| | 5.00 | 14.38±3.86 | 2.33±0.56 | 4.56±2.11 | 9.18±1.60** |
| G-CSF | 0.10 | 13.66±4.31 | 3.73±0.82** | 10.45±3.52** | 15.74±3.71** |

与同时间点对照组比较:^{##} $P < 0.01$;与同时间点模型组比较:^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。

^{##} $P < 0.01$ vs control group at the same time; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group at the same time.

表2 白药子总生物碱对X辐射小鼠骨髓DNA水平和有核细胞计数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* on bone marrow DNA content and number of nucleated cells in X-ray irradiated mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/(mg·kg ⁻¹) | 骨髓DNA/(ng· μL^{-1}) | 骨髓有核细胞计数 |
|---------|---------------------------|---------------------------|-------------------|
| 对照 | — | 20.48±4.36 | 1 135 000±37 859 |
| 模型 | — | 19.58±2.75 | 870 000±378 101 |
| 白药子总生物碱 | 1.25 | 25.68±6.93 | 812 042±186 334 |
| | 2.50 | 24.80±4.73* | 709 750±128 407 |
| | 5.00 | 22.96±6.86 | 926 750±226 283 |
| G-CSF | 0.10 | 26.33±4.90* | 1 178 250±176 786 |

与模型组比较:^{*} $P < 0.05$ 。

^{*} $P < 0.05$ vs model group.

表3 白药子总生物碱对X射线辐射小鼠脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* on viscera index in X-ray irradiated mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/(mg·kg ⁻¹) | 肝脏指数/(mg·g ⁻¹) | 脾脏指数/(mg·g ⁻¹) | 胸腺指数/(mg·g ⁻¹) |
|---------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 对照 | — | 60.67±8.19 | 3.55±0.54 | 1.58±0.98 |
| 模型 | — | 65.29±8.66 | 3.83±1.09 | 1.35±0.51 |
| 白药子总生物碱 | 1.25 | 76.83±11.73 | 3.47±0.37 | 1.55±0.59 |
| | 2.50 | 65.39±7.29 | 4.35±0.37 | 1.44±0.44 |
| | 5.00 | 64.64±12.22 | 4.52±1.32 | 1.56±0.34 |
| G-CSF | 0.10 | 67.50±6.26 | 7.07±1.71** | 1.64±0.47 |

与模型组比较:^{**} $P < 0.01$ 。

^{**} $P < 0.01$ vs model group.

3.2 白药子总生物碱对辐射损伤小鼠血清免疫细胞因子和细胞黏附分子的影响

表4、5结果显示,与对照组相比,模型组IFN- γ 、IL-3水平显著降低($P < 0.05$),与模型组比较,白药子总生物碱低剂量和中剂量组可以显著升高GM-CSF水平($P < 0.01$),白药子总生物碱中剂量组显著提高IL-3水平($P < 0.05$),而白药子总生物碱低剂量组和高剂量组显著升高小鼠血清SICAM-1水平($P < 0.01$)。这些结果提示白药子总生物碱能够一定程度上增强小鼠机体免疫功能。但结果也发现白药子总生物碱及G-CSF组IFN- γ 均显著低于模型组。

3.3 白药子总生物碱对辐射损伤小鼠脾脏组织病理变化的影响

各组小鼠脾脏组织病理变化观察结果见图1。结果显示对照组脾脏白髓、红髓结构正常,未见明显的病理变化;与对照组相比,模型组脾脏病变主要表现为白髓萎缩,白髓内淋巴细胞减少,淋巴小结细胞稀疏,红髓、白髓界限不清晰;淋巴细胞凋亡,红髓、白髓内可见空洞样结构,巨噬细胞吞噬淋

巴细胞残存碎片;与模型组相比,白药子总生物碱低、中、高剂量组都能使红髓髓系细胞增殖,白药子总生物碱中、高剂量组白髓萎缩、淋巴细胞凋亡有所减轻;与模型组相比,阳性药GCS-F组能使髓系细胞增殖,GCS-F组白髓萎缩、淋巴细胞凋亡有所减轻。结果表明白药子总生物碱在一定程度上可以减轻辐射诱导小鼠脾脏组织的损伤,对维持受照小鼠脾脏细胞结构的完整具有调节作用。

3.4 白药子总生物碱对辐射损伤小鼠脾脏超微结构的影响

各组小鼠脾脏的超微结构观察结果见图2。对照组,脾脏细胞膜完整,细胞器正常,胞质内有少量线粒体,细胞核大,核区明显,核内常染色质少,异染色质丰富;模型组,核内染色质出现固缩,核膜边缘不清,出现异形核甚至出现核溶解,胞核及胞质分界不清,粗面内质网出现断裂,线粒体嵴不可见;G-CSF阳性对照组,细胞膜完好,胞核大,核内异染色质丰富,核膜清晰,线粒体完好,嵴连续;白药子总生物碱低剂量组,染色质边集,核周间隙轻度增宽,线粒体肿胀、空泡化;白药子总生物碱中剂量

表4 白药子总生物碱对X射线辐射小鼠细胞因子(IFN- γ 、GM-CSF、IL-3)的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Effects of total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* on cytokines (IFN- γ , GM-CSF, IL-3) in X-ray irradiated mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

| 组别 | 剂量/(mg·kg ⁻¹) | IFN- γ /(ng·L ⁻¹) | GM-CSF/(ng·L ⁻¹) | IL-3/(ng·L ⁻¹) |
|---------|---------------------------|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 对照 | — | 176.28±53.18 | 25.86±5.21 | 35.00±7.53 |
| 模型 | — | 136.76±33.76 [#] | 24.15±3.71 | 28.89±2.80 [#] |
| 白药子总生物碱 | 1.25 | 85.85±29.39** | 38.89±3.47** | 27.17±1.71 |
| | 2.50 | 124.70±17.78** | 35.24±5.63** | 35.30±6.03* |
| | 5.00 | 89.18±23.33** | 24.44±3.53 | 27.36±2.55 |
| G-CSF | 0.10 | 107.38±21.75** | 33.81±3.30** | 26.77±2.16 |

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

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

表5 白药子总生物碱对X射线辐射小鼠细胞因子(IL-4、VCAM、SICAM-1)的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 5 Effects of total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* on cytokines (IL-4, VCAM, SICAM-1) in X-ray irradiated mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

| 组别 | 剂量/(mg kg ⁻¹) | IL-4/(ng·L ⁻¹) | VCAM/(ng·L ⁻¹) | SICAM-1/(ng·L ⁻¹) |
|---------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 对照 | — | 18.83±6.34 | 33.97±7.67 | 30.92±3.81 |
| 模型 | — | 13.16±3.89 | 33.39±8.58 | 29.05±4.09 |
| 白药子总生物碱 | 1.25 | 16.04±6.05 | 21.98±9.73 | 47.17±3.48** |
| | 2.50 | 16.62±5.14 | 22.41±7.47 | 34.47±3.52 |
| | 5.00 | 14.55±1.75 | 17.28±6.67 | 40.99±6.31** |
| G-CSF | 0.10 | 15.06±3.58 | 22.94±5.09 | 29.03±3.99 |

与模型组比较:^{**} $P < 0.01$ 。

^{**} $P < 0.01$ vs model group.

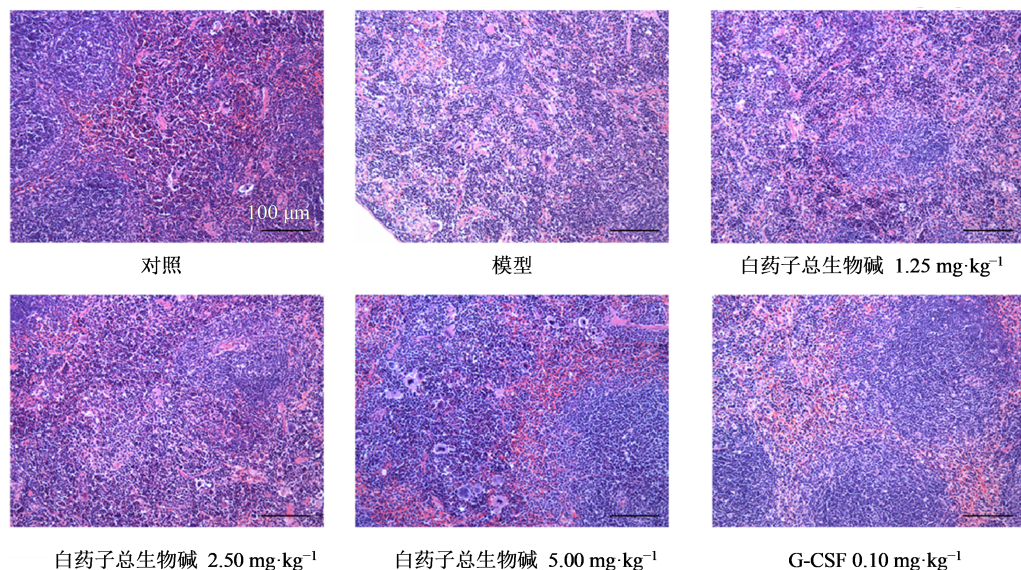


图 1 白药子总生物碱对 X 射线辐射小鼠脾组织病理改变的影响 (×20)

Fig. 1 Effect of total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* on spleen tissues of X-ray irradiated mice stained (×20)

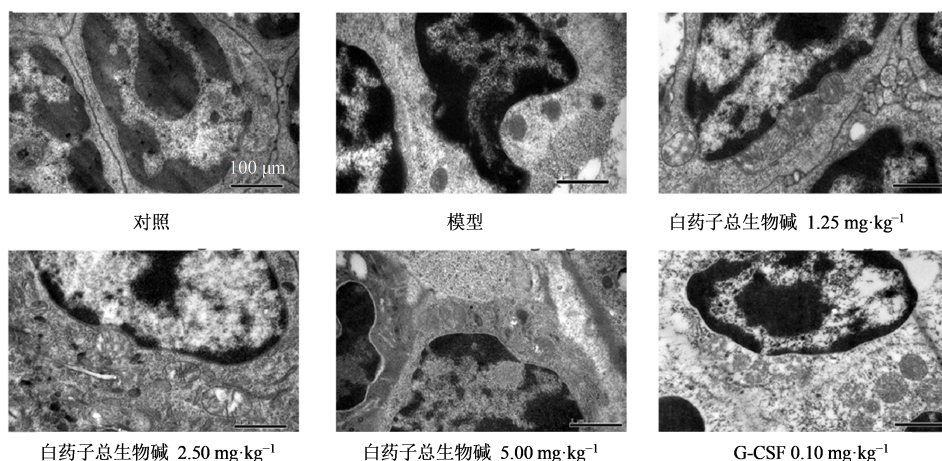


图 2 白药子总生物碱对 X 射线辐射小鼠脾组织超微结构的影响 (×30 000)

Fig. 2 Effect of total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* on ultrastructure of X-ray irradiated mice (×30 000)

组,细胞的超微结构改变与低剂量组相似,细胞结构完整,膜清晰,部分线粒体嵴可见;白药子总生物碱高剂量组,超微结构改变与低剂量组相似,细胞核清晰,核内可见染色质边集,线粒体轻度肿胀、空泡化。表明白药子总生物碱可一定程度减轻电离辐射诱导小鼠脾脏组织的损伤。

3.5 白药子总生物碱对辐射损伤小鼠肝脏抗氧化能力的影响

表 6 结果显示,与对照组比较,模型组小鼠肝脏中 MDA、XOD 水平显著升高 ($P < 0.001$);白药子总生物碱低、中、高剂量组能显著降低 MDA、XOD 水平 ($P < 0.01$)。与模型组比较,白药子总生物碱中剂量组 SOD 水平有升高的趋

势,但没有统计学差异 ($P > 0.05$)。而各组对 CAT 及 GSH-Px 活性没有显著影响 ($P > 0.05$)。

3.6 白药子总生物碱对辐射损伤小鼠肝脏组织病理变化的影响

图 3 结果显示,对照组肝脏病变主要表现为肝细胞肿胀,肝脏内小灶性炎性细胞浸润,可能与外界或自身因素有关;与对照组相比,模型组肝脏病变主要表现为肝细胞肿胀,胞浆空泡化,部分胞核固缩,甚至消失;与模型组相比,白药子总生物碱中、高剂量组肝细胞肿胀有所减轻,高剂量组较明显;与模型组相比,G-CSF 组肝细胞肿胀也有所减轻,改变不明显。

3.7 白药子总生物碱对肝脏超微结构的影响

图 4 结果可以看出,对照组,细胞内线粒体膜完

表 6 白药子总生物碱对 X 射线辐射小鼠肝脏抗氧化指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effects total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* on liver antioxidant indexes of X-ray irradiated mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/(mg·kg ⁻¹) | CAT/(U·mg ⁻¹) | GSH-Px/(U·mg ⁻¹) | SOD/(U·mg ⁻¹) | MDA/(nmol·mg ⁻¹) | XOD/(U·mg ⁻¹) |
|---------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 对照 | — | 52.83±11.50 | 136.28±44.71 | 75.68±15.47 | 2.18±1.24 | 0.38±0.08 |
| 模型 | — | 63.43±14.10 | 262.22±92.65 | 67.99±14.75 | 9.47±3.70 ^{###} | 0.73±0.20 ^{###} |
| 白药子总生物碱 | 1.25 | 58.44±36.62 | 216.11±54.74 | 83.42±29.04 | 4.51±3.50 [*] | 0.51±0.15 [*] |
| | 2.50 | 111.47±34.96 | 390.10±99.91 | 123.57±54.16 | 5.36±3.34 [*] | 0.62±0.16 |
| | 5.00 | 108.32±23.93 | 162.64±39.89 | 81.14±22.74 | 7.36±2.94 | 0.49±0.06 ^{**} |
| G-CSF | 0.10 | 107.07±68.08 | 354.32±191.30 | 106.47±50.59 | 4.25±2.26 [*] | 0.58±0.08 |

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

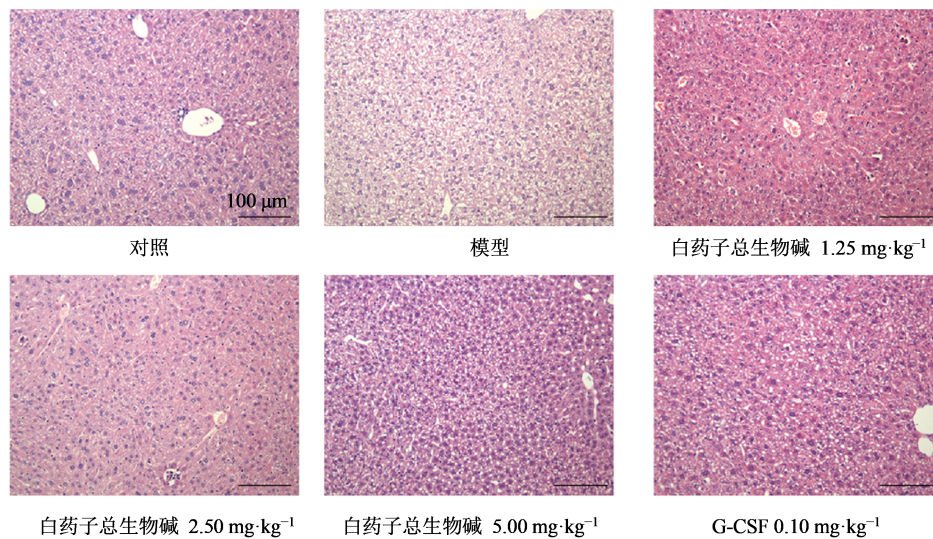


图 3 白药子总生物碱对 X 射线辐射小鼠肝组织病理变化的结果 (×20)

Fig. 3 Effects of total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* on liver tissues of X-ray irradiated mice stained with HE (×20)

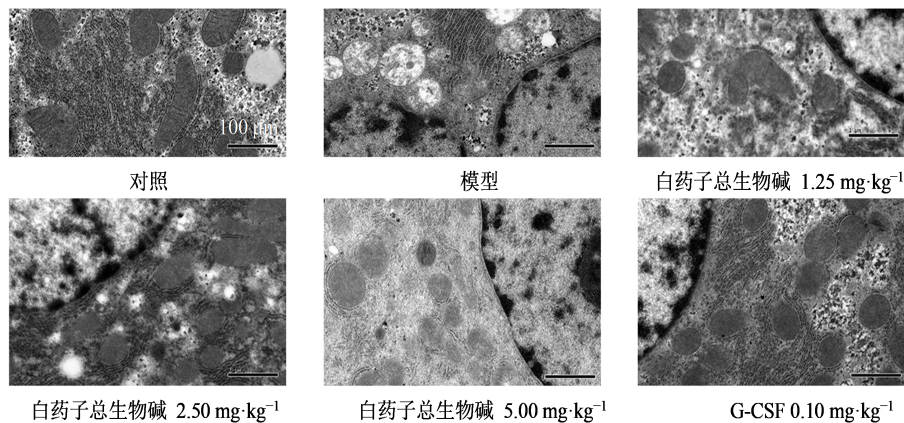


图 4 白药子总生物碱对 X 射线辐射小鼠肝组织超微结构的影响 (×30 000)

Fig. 4 Effect of total alkaloids of *Stephaniae Cepharantha Radix* on liver ultrastructure in X-ray mice (×30 000)

整,嵴结构清晰;胞浆内可见粗面内质网及糖原颗粒;细胞核双层膜完整,核孔清晰。模型组,较多肝细胞破坏,细胞核变形,核内染色质聚集,说明辐射造成了DNA合成下降。核周隙变大,胞质内空泡化增加;粗面内质网断裂,数量减少,其上附着的核蛋白体脱落于细胞质内。G-CSF阳性组,肝细胞及细胞核形态接近对照组,线粒体损伤有所减轻,膜清楚完整,嵴可见;细胞核较完整,可见双层核膜及核孔,且异染色质数量增加。白药子总生物碱低剂量组,肝脏超微结构改变基本同阳性组,但细胞核略微变形,部分线粒体嵴不清,粗面内质网断裂,数量减少,其上附着的核蛋白颗粒脱落严重。但核膜较完整,且核内可见核仁。白药子总生物碱中剂量组,表现基本同阳性组,核内可见核仁区,异染色质数量增加,部分线粒体嵴可见。白药子总生物碱高剂量组,表现基本同低剂量组,核内异染色质数量减少,较阳性组严重,部分线粒体嵴可见。肝脏组织超微结构观察的结果进一步证实,白药子总生物碱对维持受照小鼠肝脏细胞结构完整具有调节作用。

4 讨论

放射治疗作为恶性肿瘤的主要治疗手段,对免疫功能的损伤不可忽视^[20],尤其是放射损伤导致的白细胞减少^[21],使患者机体免疫力降低诱发感染,常迫使治疗中断,严重的引发败血症,危机患者生命^[2],因此在辐射损伤中保护白细胞尤其重要。外周血白细胞起源于骨髓造血干细胞(HSC)^[22],它们在数量和质量上的变化可以反映骨髓造血组织的功能状态^[23-24],因此,外周血中白细胞的数量是评估放射损伤的重要标志物。本研究结果表明,暴露于X射线下的鼠外周血白细胞数量显著降低,白药子总生物碱组(2.5、5 mg·kg⁻¹)显著上调白细胞数量,证明白药子总生物碱可以缓解X射线诱导的鼠白细胞减少^[25]。

快速分裂的组织细胞如造血系统的细胞,容易受到辐射引起的损伤^[8]。脾脏作为体内最大的外周免疫器官,在小鼠造血功能恢复中起关键作用^[26]。研究表明,与模型组相比,白药子总生物碱组增加了辐射诱导小鼠的有核细胞计数和骨髓中DNA水平,表明白药子总生物碱治疗促进了辐射损伤后造血功能的恢复。而骨髓和红髓细胞的增加表明白药子总生物碱组通过减轻辐射诱导的脾脏损伤来发挥放射保护作用,超微结构观察结果也证实了这一点。

本研究通过检测几种重要的细胞因子水平进一步验证了白药子总生物碱对免疫功能的保护作用。IFN- γ (II型干扰素)是由活化的T淋巴细胞分泌的细胞因子,在免疫反应中起着重要的调节作用,这种细胞因子不仅可以激活巨噬细胞,还可以促进细胞毒性T细胞(CTL)的分化^[27]。VCAM-1在白细胞募集中起关键作用^[28],且与多种炎症性疾病有关,它与白细胞上的整合素相互作用,促进VCAM-1在血管内皮上的黏附和迁移。本研究中暴露于射线的模型组小鼠VCAM-1水平较对照组升高,白药子总生物碱反而有降低VCAM-1表达水平的趋势,提示白药子总生物碱可能具有一定的血管内皮保护作用,其相关机制值得深入探讨;白药子总生物碱(1.25、2.5 mg·kg⁻¹)组显著增加GM-CSF水平;白药子总生物碱(2.5 mg·kg⁻¹)组显著增加IL-3水平;白药子总生物碱(1.25 mg·kg⁻¹)显著增加SICAM-1水平,这些结果表明,白药子总生物碱通过促进白细胞募集和白细胞细胞因子的产生以及增强免疫反应来增强机体免疫功能。

已知电离辐射会使机体产生过多的ROS,随后破坏机体生物大分子,如DNA和蛋白质^[29],这种病理性连锁反应使肝脏处于严重的氧化应激状态,并导致肝细胞凋亡^[13],因此必须重视化疗后的肝损伤。SOD是细胞中的主要抗氧化酶^[30],MDA是脂质过氧化的最终产物,是氧化应激升高和组织损伤的标志物^[31],XOD属需氧脱氢酶类,能够催化次黄嘌呤生成尿酸和过氧化氢,是体内核酸代谢中的重要酶之一,在肝细胞损伤时,XOD早于丙氨酸氨基转移酶释放入血清,因此,血清XOD活性升高可敏感地反映急性肝损害^[32]。因此SOD、MDA和XOD是衡量机体抗氧化能力的重要指标。本研究结果表明,白药子总生物碱(1.25、2.5 mg·kg⁻¹)组显著降低MDA、XOD水平,白药子总生物碱(2.5 mg·kg⁻¹)组SOD水平较模型组有升高趋势,这提示白药子总生物碱可以通过氧化还原平衡清除自由基和ROS,从而减轻小鼠的氧化应激。此外,肝脏的组织病理学和超微结构观察结果证实,白药子总生物碱对辐射损伤小鼠肝细胞结构的完整性具有保护作用。

本研究结束表明白药子总生物碱对辐射损伤小鼠具有保护作用,其机制可能与增加外周血白细胞数量、增强免疫功能和增强抗氧化能力来减轻X射线诱导的白细胞减少有关。白药子作为一种传统的中药,来源广泛,价格低廉,本研究为临床上治疗辐射损伤提供了新的思路。后续将对其潜在的

分子机制以及途径进行更深入的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 毕盛, 吴胤文, 李丽玲, 等. 从卫气的生成与输布探讨化疗后白细胞减少症的中医治疗策略 [J]. 中医杂志, 2024, 65(1): 113-118.
Bi S, Wu Y W, Li L L, et al. Treatment strategy of leukopenia after chemotherapy with traditional Chinese medicine from the generation and transmission of defense *qi* [J]. J Tradit Chin Med, 2024, 65(1): 113-118.
- [2] Christen D, Brümmendorf T H, Panse J. Leukopenia - A diagnostic guideline for the clinical routine [J]. Dtsch Med Wochenschr, 2017, 142(23): 1744-1749.
- [3] Wang M, Xie X H, Du Y Y, et al. Protective effects of biscoclaurine alkaloids on leukopenia induced by ^{60}Co - γ radiation [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 2162915.
- [4] Blayney D W, Schwartzberg L. Chemotherapy-induced neutropenia and emerging agents for prevention and treatment: A review [J]. Cancer Treat Rev, 2022, 109: 102427.
- [5] Singh V K, Newman V L, Seed T M. Colony-stimulating factors for the treatment of the hematopoietic component of the acute radiation syndrome (H-ARS): A review [J]. Cytokine, 2015, 71(1): 22-37.
- [6] Sharapov M G, Novoselov V I, Penkov N V, et al. Protective and adaptogenic role of peroxiredoxin 2 (Prx2) in neutralization of oxidative stress induced by ionizing radiation [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 134: 76-86.
- [7] Betlazar C, Middleton R J, Banati R B, et al. The impact of high and low dose ionising radiation on the central nervous system [J]. Redox Biol, 2016, 9: 144-156.
- [8] Das S K, Vasudevan D M. Alcohol-induced oxidative stress [J]. Life Sci, 2007, 81(3): 177-187.
- [9] Xu W Q, Yang F J, Zhang Y J, et al. Protective effects of rosmarinic acid against radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice [J]. J Radiat Res, 2016, 57(4): 356-362.
- [10] Liu W C, Chuang W L, Tsai M L, et al. *Cordyceps sinensis* health supplement enhances recovery from taxol-induced leukopenia [J]. Exp Biol Med, 2008, 233(4): 447-455.
- [11] Gridley D S, Rizvi A, Luo-Owen X, et al. Low dose, low dose rate photon radiation modifies leukocyte distribution and gene expression in CD4^+ T cells [J]. J Radiat Res, 2009, 50(2): 139-150.
- [12] Li S, Tan H Y, Wang N, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11): 26087-26124.
- [13] Nakaoji K, Nayeshiro H, Tanahashi T, et al. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania cepharantha* and their effects on proliferation of cultured cells from the murine hair apparatus [J]. Planta Med, 1997, 63(5): 425-428.
- [14] Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(25): 8082-8091.
- [15] Furusawa S, Wu J H. The effects of biscoclaurine alkaloid cepharanthine on mammalian cells: Implications for cancer, shock, and inflammatory diseases [J]. Life Sci, 2007, 80(12): 1073-1079.
- [16] Morita K, Nakamura M, Nagamachi M, et al. Seventeen cases of alopecia areata: Combination of SADBE topical immunotherapy with other therapies [J]. J Dermatol, 2002, 29(10): 661-664.
- [17] Rogosnitzky M, Danks R. Therapeutic potential of the biscoclaurine alkaloid, cepharanthine, for a range of clinical conditions [J]. Pharmacol Rep, 2011, 63(2): 337-347.
- [18] Kumazawa Y, Kaneko M, Inagaki K, et al. Accelerated recovery from gamma-irradiation-induced leukopenia in mice by the biscoclaurine alkaloid, Cepharanthin: Comparison with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor [J]. Int J Immunopharmacol, 1990, 12(5): 523-530.
- [19] Wang M, Xie X, Du Y, et al. Protective effects of biscoclaurine alkaloids on leukopenia induced by Co - γ radiation [J]. Evid Based Complement Alternat Med. 2020 May 18;2020:2162915.
- [20] Schmid M P, Pötter R, Bombosch V, et al. Late gastrointestinal and urogenital side-effects after radiotherapy: Incidence and prevalence. Subgroup-analysis within the prospective Austrian-German phase II multicenter trial for localized prostate cancer [J]. Radiother Oncol, 2012, 104(1): 114-118.
- [21] 何秀丽, 黎光强, 陈林. 中药防治肿瘤放疗化疗后白细胞减少症研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2014, 10(13): 33-37.
He X L, Li G Q, Chen L. Research progress of traditional Chinese medicine in preventing and treating leukopenia after radiotherapy and chemotherapy for tumor [J]. Asia Pac Tradit Med, 2014, 10(13): 33-37.
- [22] 朱剑, 林冬静. 造血干细胞研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2013, 34(3): 218-221.
Zhu J, Lin D J. Progress in research of hematopoietic stem cell [J]. J Jilin Med Coll, 2013, 34(3): 218-221.
- [23] Sundaramoorthy P, Wang Q H, Zheng Z H, et al.

- Thioredoxin mitigates radiation-induced hematopoietic stem cell injury in mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8 (1): 263.
- [24] Venkateswaran K, Shrivastava A, Agrawala P K, et al. Author Correction: Mitigation of radiation-induced hematopoietic injury by the polyphenolic acetate 7, 8-diacetoxy-4-methylthiocoumarin in mice [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23482.
- [25] 陈红. 白药子提取物成分鉴定及升白细胞实验研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2016.
- Chen H. Study on component identification and leukogenic effect of the extract from *Stephania cepharantha Hayata* [D]. Chongqing: Southwest University, 2016.
- [26] Yi L R, Tian M, Piao C N, et al. The protective effects of 1,2-propanediol against radiation-induced hematopoietic injury in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108806.
- [27] Qin Y H, Zhang C. The regulatory role of IFN- γ on the proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2017, 13(6): 705-712.
- [28] Mollà M, Gironella M, Miquel R, et al. Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, 57(1): 264-273.
- [29] Szumiel I. Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability: The pivotal role of mitochondria [J]. *Int J Radiat Biol*, 2015, 91(1): 1-12.
- [30] Kanzaki N, Kataoka T, Etani R, et al. Analysis of liver damage from radon, X-ray, or alcohol treatments in mice using a self-organizing map [J]. *J Radiat Res*, 2017, 58 (1): 33-40.
- [31] Papac-Milicevic N, Busch C J L, Binder C J. Malondialdehyde epitopes as targets of immunity and the implications for atherosclerosis [J]. *Adv Immunol*, 2016, 131: 1-59.
- [32] Schmidt H M, Kelley E E, Straub A C. The impact of xanthine oxidase (XO) on hemolytic diseases [J]. *Redox Biol*, 2019, 21: 101072.

[责任编辑 齐静雯]