

银杏叶提取物对辐射损伤小鼠的保护作用

金虹¹, 黄毅², 王继生³, 秦海燕², 叶平^{2*}

(1 四川中医药高等专科学校, 四川 绵阳 621000; 2 西南科技大学, 四川 绵阳 621010;

3. 绵阳市第三医院, 四川 绵阳 621000)

摘要:目的 研究银杏叶提取物对⁶⁰Co γ 射线辐射损伤小鼠的保护作用。方法 采用健康小鼠作为实验对象, 银杏叶提取物 ig 给药, 使用⁶⁰Co γ 作为辐射源制备辐射损伤模型, 眼眶取血计数外周血白细胞和淋巴细胞数; 取肝组织测定其蛋白质、MDA 及 SOD、GSH 活性。结果 银杏叶提取物能增加辐射小鼠白细胞、淋巴细胞数量, 减轻辐射对肝脏合成功能的损伤, 增加 SOD、GSH 活性, 降低 MDA 量。结论 银杏叶提取物对辐射损伤的小鼠具有保护作用, 其保护机制与其抗氧化作用以及免疫影响有关。

关键词:银杏叶提取物; 辐射; 抗氧化

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1339-04

随着人类和平利用原子能的日益广泛, 放射性辐射技术在工农业、医学、生命科学等方面的应用迅速发展, 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, 同时辐射对机体损伤的作用机制及其临床表现越来越被人们研究和认识, 辐射损伤的研究也由重视个体的医学救治向群体的医学防护转变。中药多成分多靶点对辐射引起的多器官损害有一定的保护作用, 因此研究抗辐射损伤药物, 特别是天然产物抗辐射损伤的研究日益得到重视。素有“活化石”之称的银杏 *Ginkgo biloba* L. 作为世界上最古老的子遗植物, 自古以来有很高的药用和食用价值, 目前银杏叶提取物广泛用于改善心脑血管功能^[1-3], 银杏叶提取物中量最高的是黄酮类物质。本研究在采用酶解萃取法进行银杏叶活性部位提取研究的基础上, 对银杏叶提取物进行了抗辐射实验研究, 为其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物: 昆明种小鼠, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 雌雄兼用, 四川大学实验动物中心提供。

1.2 药品及试剂: 银杏叶提取物 (GBE) 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 (每 1 mL 相当于银杏叶 1 g)。四物汤合剂 (泰安药业有限公司, 批号 0811028), 二甲基亚砷 (DM-SO) (成都联合化工试剂研究所)。丙二醛 (MDA) 测定试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、谷胱甘肽 (GSH) (除蛋白) 测定试剂盒和考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。其余

试剂均为分析纯。

1.3 仪器设备: ⁶⁰Co γ 辐照源 (四川科学城中国工程物理研究院钴源辐照技术有限公司); Backman 高速冷冻离心机 (德国); Eppendorf 移液器 (芬兰); Sysmex 1000i 全自动血液分析仪 (日本), SZ-93 自动双重纯水蒸馏器 (国产)。

2 方法

2.1 辐照条件: 采用 ⁶⁰Co γ 射线全身一次性照射, 吸收剂量率 192~214 cGy/min, 时间 2.5 min。

2.2 分组及给药方法: 设对照组、模型组、银杏叶提取物 (12.5、25、50 g/kg 水溶液) 组和阳性对照组 (四物汤合剂 30 g/kg, 25% DMSO 水溶液 2 g/kg)。每组 10 只, 照射前每天 ig 给药 1 次, 连续 5 d。

2.3 血液分析: 分别于照射后第 4、8 天, 每组 10 只小鼠眼眶取血, 测定白细胞数和淋巴细胞数。

2.4 肝组织中蛋白的测定: 取照射后各组活体小鼠肝脏, 在冷藏的生理盐水中漂洗后滤纸拭干水分, 称质量后剪碎, 置于匀浆器中, 按 1:9 加入生理盐水制备匀浆, 离心 10 min, 取上清液备用。照考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒说明书方法测定。

2.5 MDA、SOD、GSH 的测定: 取各组小鼠肝脏, 制备肝组织匀浆液, 按试剂盒说明书方法测定肝组织中 MDA、SOD、GSH 水平。

2.6 统计学处理: 所有数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 SPSS 13.0 软件系统进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 对辐射小鼠白细胞和淋巴细胞数目变化的影

* 收稿日期: 2009-12-16

基金项目: 西南科技大学国防重点学科实验室重点培育项目 (07JGZB18)

作者简介: 金虹 (1963—), 女, 重庆人, 学士, 副教授, 从事中药活性成分及分析的教學和研究。

Tel: (0816) 2392169 E-mail: jh1120@139.com

响: 表 1 结果显示, 模型组白细胞和淋巴细胞数目与对照组比较, 显著降低, 表明 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 辐射对小鼠白细胞和淋巴细胞有显著影响, 说明模型成功; 四物汤组、银杏叶提取物 25、50 mg/kg 组在 192 h 非常显著提高白细胞数量 ($P < 0.05$); 银杏叶提取物 12.5 mg/kg 组淋巴细胞数目在 96、192 h 显著提高

($P < 0.05$)。银杏叶提取物 25、50 mg/kg 组淋巴细胞数目在 96、192 h 非常显著提高 ($P < 0.05$)。表明四物汤、银杏叶提取物对辐射引起白细胞下降有一定保护作用, 银杏叶提取物对淋巴细胞的保护作用较强。

3.2 对肝组织蛋白质的影响: 表 2 结果显示: 模型组

表 1 银杏叶提取物对辐射损伤小鼠白细胞和淋巴细胞数目的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	白细胞/($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)		淋巴细胞/($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	
		96 h	192 h	96 h	192 h
对照	—	5.09 ± 0.23	5.09 ± 0.65	4.45 ± 1.68	4.37 ± 1.53
模型	—	0.28 ± 0.18 ^{##}	2.34 ± 0.57 ^{##}	0.13 ± 0.25 ^{##*}	1.17 ± 0.98 ^{##*}
DMSO	2	0.42 ± 0.26 ^{##*}	0.99 ± 0.67 ^{##*}	0.29 ± 0.53 ^{##*}	0.87 ± 0.52 ^{##}
四物汤	30	0.32 ± 0.09	1.05 ± 0.13 ^{##*}	0.13 ± 0.08 ^{##}	0.91 ± 0.38 ^{##*}
银杏叶提取物	12.5	0.34 ± 0.03	1.21 ± 0.86 ^{##}	0.14 ± 0.27 ^{##*}	1.18 ± 1.12 ^{##*}
	25	0.33 ± 0.25	2.31 ± 0.18 ^{##*}	0.16 ± 0.07 ^{##*}	0.98 ± 0.59 ^{##*}
	50	0.32 ± 0.18	2.37 ± 0.32 ^{##*}	0.20 ± 0.43 ^{##*}	1.05 ± 0.79 ^{##*}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ 表 2 同

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group Table 2 is same

肝组织总蛋白与对照组比较, 非常显著降低, 表明 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 辐射对实验小鼠肝组织总蛋白有非常显著影响 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 银杏叶提取物 25、50 mg/kg 组肝组织总蛋白量在 96、192、336 h 非常显著提高 ($P < 0.05$)。表明银杏叶提取物对辐射引起肝组织总蛋白降低有较强保护作用。

3.3 对肝组织 MDA 的影响: 表 3 结果显示模型组

肝组织 MDA 与对照组比较非常显著升高, 与模型组比较, 银杏叶提取物 25、50 mg/kg 组肝组织 MDA 量在 24、48 h 有非常显著影响 ($P < 0.01$)。银杏叶提取物各剂量组在 192、336 h 有显著影响 ($P < 0.05$)。表明银杏叶提取物对辐射引起肝组织 MDA 升高有较强保护作用。

3.4 对肝组织 SOD 活性的影响: 表 4 结果显示, 模

表 2 银杏叶提取物对辐射损伤小鼠肝组织蛋白量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of GBE on protein contents in liver of radiation-injured mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	蛋白/(g · L ⁻¹)				
		24 h	48 h	96 h	192 h	336 h
对照	—	8.09 ± 1.26	8.10 ± 1.28	8.43 ± 1.02	8.52 ± 1.76	8.21 ± 2.54
模型	—	8.46 ± 0.96	8.49 ± 3.75	2.02 ± 2.35 ^{##}	2.05 ± 0.85 ^{##}	2.08 ± 0.63 ^{##}
DMSO	2	8.62 ± 0.85	8.93 ± 2.94	3.43 ± 2.63 ^{##*}	2.68 ± 1.98 ^{##}	0.43 ± 0.25 ^{##}
四物汤	30	8.08 ± 0.76	8.07 ± 1.78	2.68 ± 1.69 ^{##}	3.20 ± 2.17 ^{##*}	2.02 ± 1.28 ^{##}
银杏叶提取物	12.5	6.93 ± 1.53	7.58 ± 1.45	2.36 ± 4.32 ^{##*}	2.21 ± 2.54 ^{##*}	2.02 ± 1.27 ^{##}
	25	7.36 ± 1.26	8.32 ± 2.65	2.73 ± 2.01 ^{##*}	2.61 ± 1.68 ^{##*}	2.44 ± 1.53 ^{##}
	50	7.52 ± 1.41	8.17 ± 1.76	2.97 ± 1.84 ^{##*}	2.73 ± 1.49 ^{##*}	2.65 ± 1.28 ^{##}

表 3 银杏叶提取物对辐射损伤小鼠肝组织 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effect of GBE on MDA in liver of radiation-injured mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	MDA/(nmol · mg ⁻¹)			
		24 h	48 h	192 h	336 h
对照	—	0.82 ± 0.17	0.61 ± 0.32	0.76 ± 0.28	0.91 ± 1.21
模型	—	1.25 ± 0.38 ^{##}	2.06 ± 1.06 ^{##}	1.39 ± 0.15 [#]	1.22 ± 2.31 [#]
DMSO	2	6.09 ± 2.05 ^{##**}	1.54 ± 0.45 ^{##}	0.57 ± 0.83 [*]	0.03 ± 2.16 [*]
四物汤	30	2.30 ± 1.81 ^{##*}	2.12 ± 1.65 ^{##*}	0.55 ± 0.26 [*]	2.37 ± 1.94 [*]
银杏叶提取物	12.5	2.17 ± 1.34 ^{##*}	3.42 ± 2.08 ^{##**}	0.97 ± 0.99 [*]	0.09 ± 0.24 [#]
	25	1.90 ± 0.97 ^{##*}	2.98 ± 1.24 ^{##**}	0.71 ± 0.69 [*]	0.07 ± 0.09 [*]
	50	1.86 ± 1.22 ^{##*}	2.05 ± 1.37 ^{##**}	0.62 ± 0.75 [*]	0.08 ± 0.15 [*]

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

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

型组肝组织 SOD 活性与对照组比较非常显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 银杏叶提取物 25、50 mg/kg 组肝组织 SOD 在各时间点有显著影响 ($P < 0.01$), 表明银杏叶提取物对辐射引起肝组织 SOD 活性降低有较强保护作用。

3.5 对肝组织 GSH 活性的影响: 表 5 结果显示, 模型组肝组织 GSH 活性与对照组比较有非常显著差异 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 银杏叶提取物组肝组织 GSH 在各时间点有显著影响 ($P < 0.01$)。说

明银杏叶提取物对辐射引起肝组织 GSH 活性降低有较强保护作用。

4 讨论

机体免疫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、细胞数量和功能改变, 从而导致免疫功能紊乱; 淋巴细胞是机体特异性免疫细胞。在外周血细胞中, 淋巴细胞对辐射最敏感, 极易发生形态和功能的变化。淋巴细胞染色体畸变是机体受

表 4 银杏叶提取物对辐射损伤小鼠肝组织 SOD 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effect of GBE on SOD in liver of radiation injured mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	SOD/(U · mg ⁻¹)			
		24 h	48 h	192 h	336 h
对照	—	72.60 ± 12.38	65.40 ± 9.66	70.26 ± 13.92	68.72 ± 10.29
模型	—	34.29 ± 2.17 [#]	24.76 ± 8.95 [#]	36.77 ± 12.76 [#]	52.98 ± 11.68 [#]
DMSO	2	29.71 ± 3.68	42.12 ± 6.86 [*]	46.03 ± 4.68 [*]	20.71 ± 13.57 [*]
四物汤	30	33.04 ± 7.26	49.12 ± 9.78 [*]	44.89 ± 11.78 [*]	56.07 ± 10.86
银杏叶提取物	12.5	32.32 ± 4.27	47.47 ± 7.43 [*]	42.13 ± 6.39 [*]	52.85 ± 6.80
	25	38.80 ± 6.58 [*]	41.30 ± 12.38 [*]	49.19 ± 13.28 [*]	33.67 ± 9.68 ^{**}
	50	37.56 ± 3.98 [*]	45.30 ± 9.40 [*]	50.39 ± 8.27 [*]	34.21 ± 7.40 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 表 5 同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group Table 5 is same

表 5 银杏叶提取物对辐射损伤小鼠肝组织 GSH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 5 Effect of GBE on GSH in liver of radiation injured mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	GSH/(mg · g ⁻¹)			
		24 h	48 h	192 h	336 h
对照	—	28.09 ± 5.87	28.40 ± 6.82	26.70 ± 6.98	28.50 ± 4.35
模型	—	35.36 ± 12.85 [#]	2.41 ± 1.09 [#]	7.19 ± 5.61 [#]	4.08 ± 2.67 [#]
DMSO	2	8.19 ± 7.63	4.55 ± 2.37 [*]	11.32 ± 7.29 [*]	4.08 ± 3.71 [*]
四物汤	30	3.53 ± 12.32	1.59 ± 3.36 [*]	3.78 ± 2.16 [*]	5.02 ± 2.47
银杏叶提取物	12.5	6.71 ± 8.30	6.85 ± 3.26 [*]	8.60 ± 7.45 [*]	1.09 ± 2.06 ^{**}
	25	21.30 ± 11.78 [*]	9.18 ± 10.26 [*]	9.47 ± 7.82 [*]	2.45 ± 1.35 ^{**}
	50	20.79 ± 7.92 [*]	9.68 ± 6.49 [*]	10.43 ± 6.49 [*]	2.98 ± 1.19 ^{**}

到核辐射后淋巴细胞染色体出现的形态学异常, 已被用来作为辐射损伤的生物剂量评估指标。

血液系统中有核细胞白细胞、淋巴细胞细胞核的 DNA 被⁶⁰Co- γ 射线损伤导致 DNA 合成受损, 表现在辐射后数量的下降^[4]。实验中银杏叶提取物组与模型组比较, 白细胞、淋巴细胞有不同程度提高, 表明银杏叶提取物组的 DNA 受损程度低于模型组, 说明银杏叶提取物对 DNA 有保护作用; 同时银杏叶提取物对实验小鼠肝脏总蛋白质降低有明显保护作用。

当机体处于低剂量的电离辐射胁迫时, 体内的抗氧化机制被激活, 产生了大量相关的酶类保护组织免受自由基攻击, 所以 MDA 会维持在一个相对较低的水平。随辐射剂量增大, 机体抗氧化机制遭到破坏, 抗氧化酶活性降低, 细胞被无法清除的自由

基攻击, 大量脂质过氧化物降解, MDA 量增加^[5]。实验表明银杏叶提取物能不同程度降低小鼠肝组织的 MDA 水平, 降低辐射对实验小鼠的损害。

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, 从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, 导致有氧化代谢旺盛, 产生超氧阴离子自由基较静止状态要多。但随着照射剂量的升高, 机体遭受电离辐射后产生了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, 导致实验小鼠肝组织 SOD 活性降低^[6]。实验结果显示银杏叶提取物能不同程度提高实验小鼠的 SOD 活性, 降低辐射对实验小鼠的损害。

谷胱甘肽 (GSH) 既是细胞自我保护系统的重

要物质之一,也是 DNA 合成中不可缺少的小分子巯基化合物,具有消除氧自由基、维持细胞内正常的氧化还原环境和蛋白质的结构与功能等多方面的作用,广泛存在于真核细胞中,影响 GSH 合成的因素主要包括半胱氨酸 (Cysteine, Cys) 的供给和合成限速酶谷氨酰半胱氨酸合成酶 (glutamylcysteine synthetase, GCS) 的活性。辐射的直接效应是引起细胞中氧自由基的增加,损伤细胞核及膜成分。GCS 转录增加, GSH 水平升高修复氧化损伤是辐射应激反应的一个组成部分^[7]。实验结果显示银杏叶提取物能不同程度提高实验小鼠的 GSH 活性,降低辐射对实验小鼠的损害。

以上几个方面实验结果均表明银杏叶提取物对辐射损伤的实验小鼠具有较强保护作用,其作用机制可能与银杏叶提取物抗氧化作用以及免疫影响有关,但其他作用机制以及银杏叶提取物中银杏内酯

的相关作用正在进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 洪森荣,尹明华. 银杏叶提取物对缺血再灌注小鼠脑细胞凋亡的保护作用[J]. 中草药, 2007, 38(12): 1864-1867
- [2] 李年生,钟志莲,姜德建. 银杏叶提取物的心肌延迟保护作用及其机制研究[J]. 中草药, 2007, 38(7): 1046-1050
- [3] 杲海霞,李军霞,王永利. 银杏叶提取物对缺血再灌注大鼠脑线粒体的保护作用[J]. 中草药, 2006, 37(9): 1380-1383
- [4] 王宁,李应东,刘凯. 当归、黄芪及其有效成分抗辐射作用研究概况[J]. 中国辐射卫生, 2008, 3(17): 121-122
- [5] 路晓钦,高月,刘永学,等. 四物汤对辐射小鼠造血功能影响的初步探讨[J]. 中国中医药科技, 2002, 9(4): 216-218
- [6] 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): 1331-1333
- [7] 邓海平,愈诗源,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

注射用夏天无总碱对沙鼠全脑缺血再灌注损伤的影响

姚丽梅,段启*

(广东食品药品职业学院,广东 广州 510520)

摘要:目的 观察注射用夏天无总碱对沙鼠全脑缺血再灌注损伤的影响。方法 建立沙鼠全脑缺血再灌注损伤模型,观察注射用夏天无总碱对沙鼠脑卒中指数、脑指数、脑组织含水量及脑组织病理变化的影响。结果 注射用夏天无总碱高、中剂量均能显著降低沙鼠全脑缺血再灌注损伤脑卒中指数、脑组织含水量,减轻脑组织病变程度,但对脑指数无明显影响。结论 注射用夏天无总碱对沙鼠全脑缺血再灌注损伤具有治疗作用。

关键词:注射用夏天无总碱;脑缺血;再灌注;沙鼠

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)08-1342-03

夏天无为罂粟科植物伏生紫堇 *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. 的干燥块茎,味苦、微辛,性温,归肝经,具有活血通络、行气止痛的功效,用于中风偏瘫、跌打损伤、风湿性关节炎、坐骨神经痛。夏天无的主要活性成分为生物碱^[1],已有研究表明^[2-6],夏天无总碱对大鼠实验性脑缺血具有保护作用;可抑制大鼠实验性脑血栓形成,减轻脑栓塞引起的伊文思蓝染和脑水肿;对小鼠脑缺血损伤有保护作用,可降低脑组织内乙酰胆碱酯酶活性,保护神经元、抗神经元凋亡。注射用夏天无总碱是由从夏天无中提取的总生物碱制成的冻干粉针剂,可显著降

低家兔全血黏度、红细胞压积和红细胞聚集指数,抑制二磷酸腺苷、花生四烯酸和胶原诱导的血小板聚集,具有改善家兔血液流变性、活血化瘀的作用^[7]。本实验采用沙鼠全脑缺血再灌注损伤模型,进一步观察注射用夏天无总碱对脑缺血的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 试验药物:注射用夏天无总碱(冻干粉针,含总生物碱>90%)(TACDI),2 mg/瓶,由石家庄华康制药有限公司提供,批号 050508,试验前用 0.9% 氯化钠注射液配制;灯盏细辛注射液,云南生物谷灯盏花药业有限公司生产,10 mL/支(含总黄

* 收稿日期:2010-01-04

作者简介:姚丽梅(1975-),女,河南漯河人,讲师,硕士,主要从事中药教学科研工作。

Tel: (020) 28854936 13711409229 E-mail: yaolm@gdyzy.edu.cn

* 通讯作者 段启