

## 生血丸对小鼠低剂量辐射损伤的预防与修复作用及机制

严苏纯<sup>1</sup>, 张晓乐<sup>2</sup>, 王光普<sup>1</sup>, 齐立聪<sup>3</sup>

1. 天津医科大学总医院 中医科, 天津 300052

2. 天津医科大学研究生院, 天津 300072

3. 天津市蓟县中医医院, 天津 300900

**摘要:** **目的** 探讨生血丸对低剂量辐射致小鼠肝、脾、骨髓细胞、外周血淋巴细胞损伤的预防与修复作用及机制。**方法** 将小鼠随机分为5组: 对照组、生血丸预防给药组(预防给药组)、生血丸治疗给药组(治疗给药组)、模型1组(对应治疗给药组)、模型2组(对应预防给药组)。ELISA法检测肝、脾细胞中羟自由基、超氧阴离子自由基、鸟氨酸脱羧酶(ODC)的活性。高倍镜下观察骨髓细胞及外周血淋巴细胞的微核率。**结果** 与对照组相比, 2个模型组小鼠肝细胞内羟自由基、超氧阴离子自由基的量显著增加; 与各自模型组相比, 治疗给药组、预防给药组上述指标显著减小。与对照组相比, 2个模型组小鼠肝细胞内ODC活性显著增强, 外周血淋巴细胞与骨髓细胞的微核率显著增加; 与各自模型组相比, 预防给药组和治疗给药组ODC活性显著减弱, 外周血淋巴细胞与骨髓细胞的微核率显著降低。各组小鼠脾细胞中各指标间未见明显差异。**结论** 生血丸能有效预防和改善小鼠肝细胞、外周血淋巴细胞和骨髓细胞由于低剂量辐射所造成的损伤。

**关键词:** 生血丸; 低剂量辐射; 辐射损伤; 羟自由基; 超氧阴离子; 鸟氨酸脱羧酶; 微核率

**中图分类号:** R285.5; R979.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)05-0595-03

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.05.019

## Prevention and rehabilitation of Shengxue Pills on mice injured by low-dose radiation and their mechanisms

YAN Su-chun<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-le<sup>2</sup>, WANG Guang-pu<sup>1</sup>, QI Li-cong<sup>3</sup>

1. Department of Traditional Chinese Medicine, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

2. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300072, China

3. Tianjin Jixian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300900, China

**Abstract: Objective** To study the prevention and rehabilitation of Shengxue Pills on liver, spleen, bone marrow cells, peripheral blood lymphocyte of mice injured by low-dose radiation and their mechanisms. **Methods** Mice were randomly divided into five groups: control, Shengxue Pills prevention, Shengxue Pills rehabilitation, model 1 (corresponding to rehabilitation), and model 2 (corresponding to prevention) groups. Using the ELISA method to detect the activity of hydroxyl radical, superoxide anion radical, and ornithine decarboxylase (ODC) in liver and spleen cells. The bone marrow cells and peripheral lymphocyte micronucleus rate were observed under high power lens. **Results** Compared with control group, the amounts of hydroxyl radical and superoxide anion radical in the two model groups were obviously increased. Compared with the corresponding model groups, the above indexes in prevention group and rehabilitation group were significantly decreased. Compared with the control group, the activity of ODC in mice of the two model groups was obviously enhanced, but bone marrow cells and peripheral lymphocyte micronucleus rate were increased. Compared with the corresponding model groups, the activity of ODC in mice of prevention and rehabilitation groups was weakened, and bone marrow cells and peripheral lymphocyte micronucleus rate were decreased. But each index of spleen cells showed no significant difference. **Conclusion** Shengxue Pills could effectively prevent and rehabilitate the damage in liver cells, peripheral blood lymphocytes, and bone marrow cells of mice injured by low-dose radiation.

**Key words:** Shengxue Pills; low-dose radiation; radiation injury; hydroxyl radical; superoxide anion; ornithine decarboxylase; micronucleus rate

收稿日期: 2012-09-26

基金项目: 天津市中医药管理局中医中西医结合科研专项资金(11103)

作者简介: 严苏纯(1967—), 女, 副教授, 博士研究生, 研究方向为中医药对造血的调控。Tel: 13207607682 E-mail: d2004012@163.com

电离辐射污染可使接触人员的细胞、器官受到非特异性损伤,特别是生殖、造血、免疫等系统对辐射污染较为敏感,长期接触甚至可致癌、致畸。生血丸由鹿茸、黄柏、山药、炒白术、桑枝、白扁豆、稻芽、紫河车等组成,具有补肾健脾、填精补髓之功效。近年研究表明补肾健脾方药具有抗氧化、清除自由基、防止细胞损伤的功效<sup>[1]</sup>,以及提高骨髓抑制小鼠造血功能的作用<sup>[2]</sup>。本实验通过观察生血丸对低剂量电离辐射小鼠肝、脾细胞中羟自由基、超氧阴离子自由基、鸟氨酸脱羧酶(ODC)以及骨髓细胞与外周淋巴细胞微核率的影响,探讨生血丸对辐射损伤的预防与修复机制。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

生血丸干粉,达仁堂制药厂,批号 k006;肝素钠注射液,  $1.25 \times 10^4$  U, 长春高士达生化药业(集团)股份有限公司,批号 20100502。快速姬姆萨染液、羟自由基检测试剂盒、超氧阴离子检测试剂盒,南京建成科技有限公司;类标准胎牛血清,中美合资兰州民海生物工程技术有限公司;ODC ELISA 试剂盒,华北制药金坦生物技术股份有限公司。

### 1.2 动物

雄性 Balb/c 小鼠,8~12 周龄,体质量( $20 \pm 2$ ) g,中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,许可证号:SCXK-(军)2007-004。

### 1.3 仪器

BX51 型 Olympus 显微镜,日本;ST-360 型酶标仪,上海科华实验系统有限公司;3k-30 型高速低温离心机,美国 Sigma 公司;BP61 型电子分析天平,德国 Sartorius 公司;Gamma cell 40 Exactor ( $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线源),加拿大 Nordion 公司。

## 2 方法

### 2.1 模型制备、分组与给药

小鼠 150 只随机均分为 5 组:对照组,普食、正常饮水 16 d;模型 1 组(对应治疗给药组),小鼠 X 射线 0.04 Gy 辐照 4 d 后,普食、正常饮水 12 d;模型 2 组(对应预防给药组),小鼠普食,正常饮水 12 d 后,X 射线 0.04 Gy 辐照 4 d;预防给药组,小鼠每天 ig 生血丸干粉 1 次,每次 2.5 g/kg,同时正常饮水,12 d 后 X 射线 0.04 Gy 辐照 4 d;治疗给药组,小鼠 X 射线 0.04 Gy 辐照 4 d 后,每天 ig 生血丸 1 次,每次 2.5 g/kg,同时正常饮水 12 d。

### 2.2 小鼠肝、脾细胞自由基及 ODC 检测

实验末,小鼠颈椎脱臼处死,取肝、脾脏组织 0.05 g,加 0.95 mL 生理盐水制成 5%组织匀浆,按羟自由基、超氧阴离子自由基及 ODC 检测试剂盒说明书操作,以吸光度(A)值表示各样本中羟自由基、超氧阴离子和 ODC 的水平。蛋白定量采用考马斯亮蓝法。

### 2.3 小鼠外周血淋巴细胞微核率检测

实验末,小鼠眼球后静脉丛采血,涂片,快速姬姆萨染液染色,油镜下( $\times 100$ )观察,每个样本随机选择胞浆完整的淋巴细胞 1 000 个。出现小于主核 1/3、染色与主核基本一致,有完全与主核分开的小核的细胞为一个微核细胞,计算微核细胞比例。

### 2.4 小鼠骨髓细胞微核率检测

实验末,小鼠颈椎脱臼处死,取双侧股骨,用胎牛血清冲出骨髓,离心,弃上清后用 0.5 mL 胎牛血清吹打,将沉淀悬浮、涂片,快速姬姆萨染液染色,油镜下( $\times 100$ )观察,每个样本随机选择胞浆完整的嗜多染红细胞 1 000 个。出现小于主核 1/3、染色与主核基本一致,有完全与主核分开的小核的细胞为一个微核细胞,计算微核细胞比例。

### 2.5 统计学方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组数据进行方差齐性检验,同时进行单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 对低剂量辐射损伤小鼠肝细胞中羟自由基、超氧阴离子及 ODC 的影响

与对照组相比,模型 1 组、模型 2 组小鼠肝细胞中羟自由基、超氧阴离子及 ODC 的 A 值均显著增加( $P < 0.05$ );分别与各自模型组相比,生血丸治疗给药组、预防给药组小鼠肝细胞中的羟自由基、超氧阴离子及 ODC 的 A 值显著减小( $P < 0.05$ )。结果见表 1。

### 3.2 对低剂量辐照损伤小鼠脾细胞中羟自由基、超氧阴离子及 ODC 的影响

与对照组相比,模型 1 组、模型 2 组小鼠脾细胞中羟自由基、超氧阴离子及 ODC 的量未发生显著变化;与各自模型组相比,生血丸预防给药组、治疗给药组脾细胞中羟自由基、超氧阴离子及 ODC 的量也无显著变化,结果见表 2。

### 3.3 对低剂量辐射损伤小鼠外周血淋巴细胞和骨髓细胞微核率的影响

与对照组相比,模型 1 组、模型 2 组小鼠外周

血淋巴细胞及骨髓细胞微核率显著升高 ( $P < 0.05$ ); 给药组小鼠外周血淋巴细胞及骨髓细胞微核率显著降低 ( $P < 0.05$ ), 结果见表 3。

表 1 生血丸对低剂量辐射损伤小鼠肝细胞中羟自由基、超氧阴离子和 ODC 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

Table 1 Effect of Shengxue Pills on hydroxyl radical, superoxide anion, and ODC in liver cells of mice injured by low-dose radiation ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	羟自由基	超氧阴离子	ODC
对照	—	0.314 ± 0.21	0.412 ± 0.41	0.478 ± 0.08
模型 1	—	0.731 ± 0.71*	0.698 ± 0.24*	0.726 ± 0.09*
治疗给药	2.5	0.421 ± 0.31 <sup>△</sup>	0.403 ± 0.27 <sup>△</sup>	0.513 ± 0.26 <sup>△</sup>
模型 2	—	0.542 ± 0.18*	0.715 ± 0.34*	0.703 ± 0.11*
预防给药	2.5	0.324 ± 0.71 <sup>▲</sup>	0.502 ± 0.34 <sup>▲</sup>	0.427 ± 0.19 <sup>▲</sup>

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型 2 组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$ ; 与模型 1 组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 表 3 同

\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs model group 2; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs model group 1; same as Table 3

表 2 生血丸对低剂量辐射损伤小鼠脾细胞中羟自由基、超氧阴离子和 ODC 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

Table 2 Effect of Shengxue Pills on hydroxyl radical, superoxide anion, and ODC in spleen cells of mice injured by low-dose radiation ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	羟自由基	超氧阴离子	ODC
对照	—	0.079 ± 0.010	0.100 ± 0.009	0.144 ± 0.03
模型 1	—	0.073 ± 0.008	0.114 ± 0.006	0.135 ± 0.03
治疗给药	2.5	0.068 ± 0.005	0.106 ± 0.023	0.150 ± 0.04
模型 2	—	0.080 ± 0.008	0.103 ± 0.016	0.162 ± 0.04
预防给药	2.5	0.076 ± 0.009	0.107 ± 0.009	0.159 ± 0.04

表 3 生血丸对低剂量辐射损伤小鼠外周血淋巴细胞及骨髓细胞微核率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

Table 3 Effect of Shengxue Pills on peripheral blood lymphocytes and bone marrow micronucleus rate of mice injured by low-dose radiation ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	微核率 / %	
		外周血淋巴细胞	骨髓细胞
对照	—	0.225 ± 0.06	0.112 ± 0.07
模型 1	—	0.438 ± 0.13*	0.245 ± 0.11*
治疗给药	2.5	0.229 ± 0.09 <sup>△</sup>	0.156 ± 0.04 <sup>△</sup>
模型 2	—	0.469 ± 0.11*	0.299 ± 0.09*
预防给药	2.5	0.314 ± 0.11 <sup>▲</sup>	0.189 ± 0.09 <sup>▲</sup>

#### 4 讨论

超氧阴离子自由基、羟自由基、一氧化氮自由基等含氧自由基是人体内较常见的自由基。超氧阴离子自由基可以氧化体内很多物质, 使细胞膜脂质过氧化, 还可以使过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶和肌酸激酶失活, 从而诱发多种疾病的发生和发展<sup>[3]</sup>。ODC 是细胞中控制多胺生成的关键酶之一, 而多胺则是调控细胞增殖的重要因素, 对肿瘤的发

生、发展起重要作用, 抑制 ODC 的活性可以减少多胺的生成, 从而达到抑制肿瘤生长的目的。微核为细胞损伤后染色体畸变断裂而形成的异常结构, 细胞微核率可反映细胞损伤及染色体畸变程度。

本实验研究显示, 经静态电离辐射后, 模型组小鼠肝细胞中羟自由基、超氧阴离子的量显著增加, ODC 活性发生变化, 外周血淋巴细胞与骨髓细胞微核率升高; 而生血丸预防给药组、治疗给药组可以清除小鼠肝细胞中羟自由基、超氧阴离子自由基, 降低微核率, 抑制肝细胞中 ODC 的生成。以上结果表明, 生血丸可有效预防和修复肝细胞氧化损伤以及外周血淋巴细胞和骨髓细胞损伤, 减少染色体断裂率, 从而进一步预防细胞突变, 癌变。

#### 参考文献

- [1] 张光银, 张军平, 李明, 等. 补肾抗衰老片对实验性动脉粥样硬化家兔海马氧化应激的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 1228-1231.
- [2] 严苏纯, 王光普, 刘彤. 生血丸对骨髓抑制小鼠造血功能的调控作用 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1853-1856.
- [3] 高斌, 高洪. 氧自由基与细胞损伤 [J]. 动物医学进展, 2002, 23(5): 34-36.