

- Imaging the efficacy of anti-inflammatory liposomes in a rabbit model of atherosclerosis by non-invasive imaging [J]. *Methods Enzymol*, 2012, 508: 211-228.
- [9] KANG A C, AO C H, GUO H Y, et al. Association of platelet endothelial cellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms and its plasma level with severe coronary atherosclerosis [J]. *Chin J Mult Organ Dis Elderly*(中国老年多器官疾病杂志), 2008, 7(2): 84-89.
- [10] HASHIMOTO K, KATAOKA N. Oxidized LDL specifically promotes the initiation of monocyte invasion during transendothelial migration with upregulated PECAM-1 and downregulated Ve-cadherin on endothelial junctions [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 28(2): 721-726.
- [11] VERIN A D. Tyrosine phosphorylation and endothelial cell barrier regulation [J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(4): 955-957.
- [12] MADAMANCHI N, VENDROV A, RUNGE S. Oxidative stress and vascular disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(2): 29-38.
- [13] ASGARY S, SABERI S A, AZAMPANAH S. Effect of immunization against ox-LDL with two different antigens on formation and development of atherosclerosis [J]. *Lipids Health Dis*, 2007(6): 32.
- [14] MORROW J D. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(2): 279-286.

收稿日期: 2012-11-12

## 辐射对小鼠脾脏损伤及香菇多糖的保护作用

付青姐, 李明春, 柳迎华(中国人民解放军第401医院, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 目的 研究辐射对小鼠脾脏的损伤以及香菇多糖对其保护作用。方法 建立小鼠低剂量长期辐射的损伤模型。小鼠随机分为5组: 对照组、模型组、给药剂量分别为0.02, 0.1, 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>的香菇多糖组。测定各组小鼠的脾脏系数、MTT法测定小鼠脾脏淋巴细胞的增殖情况, HE染色法分析脾脏组织的病理变化, 用透射电镜法分析脾脏细胞的超微结构。结果 与对照组相比, 低剂量慢性辐射能降低小鼠的脾脏系数、抑制脾脏淋巴细胞的增殖, 对小鼠脾脏造成病理损伤, 破坏脾脏细胞的超微结构。香菇多糖0.1, 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>组可明显抑制辐射造成的脾脏的上述损伤。结论 香菇多糖对辐射造成的脾脏损伤具有保护作用。

**关键词:** 辐射; 香菇多糖; 脾脏

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)06-0606-04

### Protective Effects of Lentinan Against Spleen Injury in Mice to Radiation

FU Qingjie, LI Mingchun, LIU Yinghua(*The Chinese People's Liberation Army Hospital 401, Qingdao 266071, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the radiation damage on mouse spleen and the protective effects of lentinan. **METHODS** Mouse model of chronic injury was made by exposing to <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -ray which were divided into five groups: control group, model group, different doses of lentinan groups(0.02, 0.1, 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>). After exposing, spleen coefficient, ability of lymphocyte proliferation were checked by MTT, changes on pathology and ultramicrostructure were respectively determined. **RESULTS** Compared with control group, spleen coefficient, ability of lymphocyte proliferation, pathology and ultramicrostructure were damaged by <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -ray in model group. Whereas, the 0.1, 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> lentinan groups were uninfluenced by radiation. **CONCLUSION** Lentinan normalizes the injury of spleen.

**KEY WORDS:** radiation; lentinan; spleen

辐射在日常生活中逐渐增多, 成为潜在的巨大危险。研究表明, 电离辐射可直接杀伤细胞, 造成细胞的急性辐射损伤, 也可以通过产生自由基等方式造成慢性的辐射损伤。辐射可导致机体多系统出现功能改变, 如免疫器官功能减退, 免疫细胞减少<sup>[1]</sup>。因此, 研究辐射损伤的防治措施, 寻找积极有效的辐射损伤的防治药物具有非常重

要的意义。香菇多糖是从香菇子实体中提取出的一种高分子葡聚糖, 具有广泛的生物学活性。研究发现, 香菇多糖可以调节机体的免疫、抗病毒、抗肿瘤、降低血脂等<sup>[2-3]</sup>。目前对香菇多糖的研究大多集中于免疫调节作用, 对其辐射防护作用特别是其机理的研究较少。本实验以低剂量慢性辐射损伤小鼠为模型, 以小鼠免疫器官脾脏为目标,

作者简介: 付青姐, 女, 博士, 副主任药师 Tel: (0532)51872904 E-mail: liueryh@163.com

通过测定辐射损伤对小鼠脾脏系数、脾脏淋巴细胞的增殖情况、脾脏组织的病理学变化及电镜分析脾脏细胞的超微结构,来探讨低剂量慢性辐射对脾脏的损伤以及香菇多糖的保护作用,以期对香菇多糖的辐射损伤保护作用机理进行探索。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 昆明种小鼠,♂,5周龄。体质量(22±2)g,购自青岛市药品检验所动物中心,实验动物合格证号:SCXK(鲁)20090007。

**1.1.2 试剂及器材** 香菇多糖注射液(金陵药业,批号:110103-3,规格:0.5 mg·mL<sup>-1</sup>);红细胞裂解液(碧云天公司);胎牛血清(四季青公司);其他试剂均为国产,分析纯。DW-86WHO型低温保存箱(澳柯玛公司);202型电热恒温干燥箱(天津泰斯特仪器有限公司);放射源(美国瓦里安直线加速器);BT-320组织切片机(博太科技)。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组** 昆明小鼠在室温 18~22℃,温度45%~65%,适应性饲养7d后,随机分为对照组、模型组、香菇多糖0.02,0.1,0.5 mg·mL<sup>-1</sup>组(以0.9%生理盐水将香菇多糖注射液稀释为所需浓度)。每组10只小鼠,自由摄食和饮水。

**1.2.2 辐射损伤模型的建立** 辐射条件:全身性辐射,吸收剂量为40 cGy·d<sup>-1</sup>,吸收剂量率为300 cGy·min<sup>-1</sup>,皮源距为150 cm,照射野为20 cm×20 cm,照射时间为40 d。

**1.2.3 给药方法** 对照组小鼠每天腹腔注射0.5 mL 0.9%生理盐水,模型组小鼠每天进行辐射处理,0.02,0.1,0.5 mg·mL<sup>-1</sup>香菇多糖组每天腹腔注射0.5 mL不同剂量的香菇多糖。各组小鼠给药后立即进行辐射。

**1.2.4 脾脏系数** 实验结束后,仔细剥离脾脏,去除周围脂肪及结缔组织,用生理盐水冲洗干净,小心用滤纸吸取多余的水份,称重,计算各脏器系数,脏器系数=脏器重量(mg)/小鼠体质量(g)。

**1.2.5 脾脏淋巴细胞增殖情况** 参照《体外培养的原理与技术》<sup>[4]</sup>,分离脾脏淋巴细胞,用MTT法测定淋巴细胞的增殖情况。

**1.2.6 脾脏的病理学分析** 取脾脏同一部位,用10%甲醛固定,石蜡切片,HE染色,光学显微镜下观察脾脏组织的情况。

**1.2.7 脾脏淋巴细胞电镜分析** 脾脏淋巴细胞调整浓度后,用2.5%戊二醛固定,漂洗、包埋,切片,柠檬酸铅溶液及醋酸双氧铀50%乙醇饱和溶液染色,进行电镜分析。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

与对照组相比,在辐射过程中,模型组小鼠精神表现为先兴奋后抑制,照射结束后,精神状态不佳,饮食减少,行动迟缓呆滞,条件反射出现障碍。辐射后期普遍出现脱毛现象,表现为头颈部脱毛,且随着时间的延长脱毛日趋严重。与模型组相比,香菇多糖0.02 mg·mL<sup>-1</sup>组小鼠外观状态无明显区别,0.1,0.5 mg·mL<sup>-1</sup>组精神状态较好,毛发光泽。

### 2.2 脾脏的脏器系数

动物的内脏器官质量和脏器系数是其主要的生物学特性之一,可用来衡量和反映动物的功能状态。与对照组相比,模型组小鼠的脏器系数明显降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );香菇多糖0.1,0.5 mg·mL<sup>-1</sup>组小鼠的脏器系数无显著性变化( $P>0.05$ )。与模型组相比,香菇多糖0.1,0.5 mg·mL<sup>-1</sup>组小鼠的脾脏系数显著增加,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。结果见表1。

表1 各组小鼠脾脏系数的变化( $n=10$ )

Tab 1 Variation of spleen index( $n=10$ )

组别	脾脏系数
对照组	5.56±1.26
模型组	2.95±1.01 <sup>1)</sup>
香菇多糖0.02 mg·mL <sup>-1</sup> 组	3.14±1.56
香菇多糖0.1 mg·mL <sup>-1</sup> 组	4.36±1.70 <sup>2)</sup>
香菇多糖0.5 mg·mL <sup>-1</sup> 组	4.37±1.85 <sup>2)</sup>

注:与对照组比较,<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup> $P<0.05$

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$

### 2.3 脾脏淋巴细胞增殖情况

与对照组相比,模型组小鼠脾脏增殖活性显著下降,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。香菇多糖0.1,0.5 mg·mL<sup>-1</sup>组小鼠脾脏淋巴细胞增殖活性略下降,但差异不具有统计学意义( $P>0.05$ );与模型组相比,香菇多糖0.1,0.5 mg·mL<sup>-1</sup>组小鼠的脾脏淋巴细胞增殖活性显著增加,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。结果见图1。

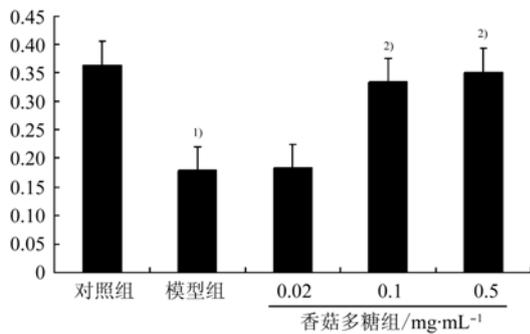


图1 各组小鼠脾脏淋巴细胞增殖活性  
与对照组比较, <sup>1)</sup>P<0.05; 与模型组比较, <sup>2)</sup>P<0.05

Fig 1 Proliferation of lymphocytes from spleen in mice  
Compared with control group, <sup>1)</sup>P<0.05; compared with model group, <sup>2)</sup>P<0.05

## 2.4 各组小鼠脾脏组织形态学分析

对照组小鼠脾脏白、红髓分界清楚, 淋巴细胞发达排列紧密, 无明显的分裂及分化现象。模型组小鼠脾窦扩张, 间质出血严重, 存在明显的淤血, 淋巴细胞稀疏, 数量减少。香菇多糖 0.02 mg·mL<sup>-1</sup> 组脾间质仍有充血。香菇多糖 0.1, 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 组脾脏内结构显著恢复, 淋巴细胞数量增加, 但见巨核细胞略减少。结果见图 2。

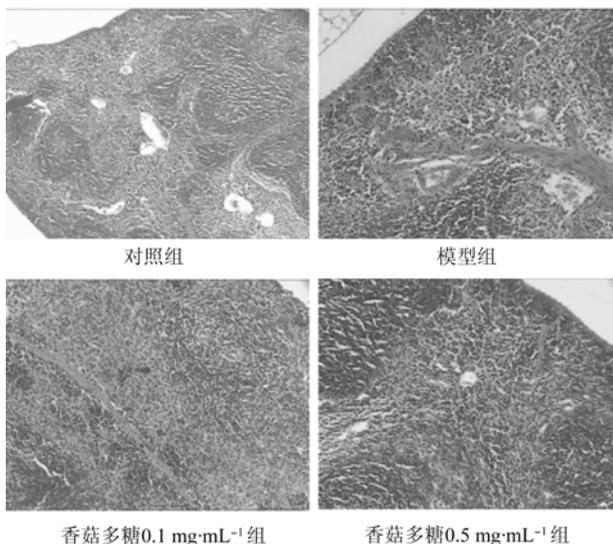


图2 各组小鼠脾脏组织结构(100×)

Fig 2 Construction of spleen in mice(100×)

## 2.5 各组小鼠脾脏淋巴细胞超微结构分析

**2.5.1 对照组** 电镜下淋巴细胞结构正常。胞膜及核膜正常未见损伤, 均可见双层膜结构, 胞膜表面存在突起。胞内胞质丰富, 游离核糖体较多, 线粒体结构完整嵴清晰。胞核圆形或椭圆形, 核内常染色质居多。见图 3 中箭头所示。

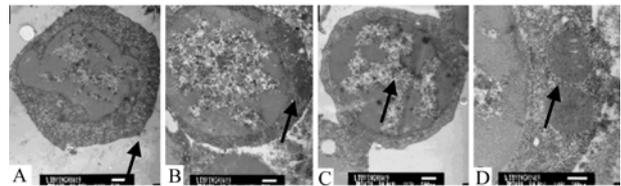


图3 对照组小鼠脾脏淋巴细胞超微结构

A-胞膜突起; B-线粒体; C-核质; D-线粒体嵴结构

Fig 3 Ultrastructure of lymphocytes in mice from normal control group

A-membrane protrusions; B-mitochondria; C-nucleoplasm; D-mitochondrial cristae

**2.5.2 模型组** 小鼠淋巴细胞出现渐进性坏死及凋亡现象。细胞器崩解, 胞质内出现空泡。细胞形态异常, 细胞核固缩, 细胞膜上突起消失。见图 4 中箭头所示。

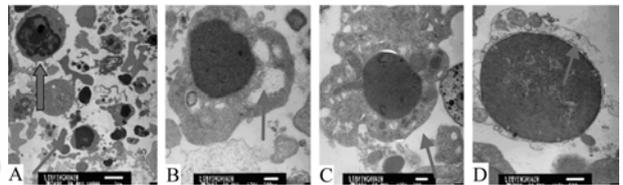


图4 模型组小鼠脾脏淋巴细胞的超微结构

A-凋亡小体; B-胞质; C-浓缩的染色质; D-胞膜破裂

Fig 4 Ultrastructure of lymphocytes in mice from radiation group

A-apoptotic body; B-cytoplasm; C-condensed chromatin; D-membrane rupture

**2.5.3 香菇多糖组** 香菇多糖 0.02 mg·mL<sup>-1</sup> 组小鼠淋巴细胞仍然存在坏死及凋亡, 细胞器崩解, 和固缩, 与模型组差别不明显。香菇多糖 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> 组小鼠细胞形态改善。细胞膜较平滑, 膜上突起减少。胞质肿胀淡染, 部分细胞存在空泡。线粒体肿胀, 嵴变粗变短变少。胞核内异染色质较多。香菇多糖 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 组细胞结构与对照组淋巴细胞差别不大。细胞形态正常, 膜表面突起较多。胞质内无空泡。核大居中央, 核内异染色质少。见图 5 中箭头所示。

## 3 讨论

免疫系统对辐射损伤极为敏感, 辐射能引起免疫器官及细胞的形态学及功能学的改变, 机体在受到高剂量或长期低剂量辐射后, 免疫系统的功能急剧下降, 放射损伤程度严重并且恢复较慢。脾脏是机体重要的免疫器官, 是各种成熟的淋巴细胞定居、增殖分化并发挥免疫功能的重要场所。

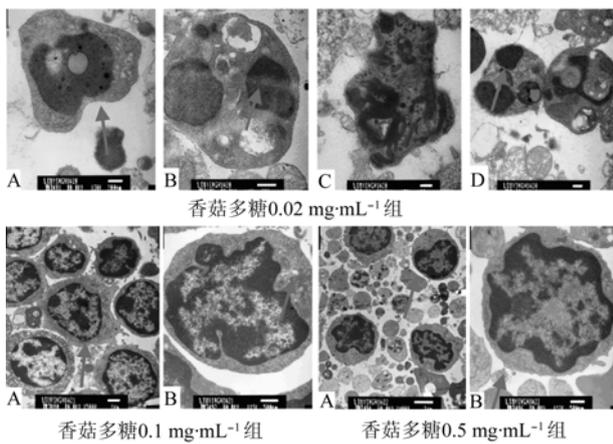


图5 多糖组小鼠脾脏淋巴细胞的超微结构  
Fig 5 Ultrastructure of lymphocytes in mice from lentinan group

此外,脾脏还能分泌干扰素、补体、细胞因子等重要的免疫活性物质<sup>[5-6]</sup>。与体液免疫及细胞免疫均有密切关系,在机体的免疫功能中具有重要作用。因此对脾脏进行分析从一定程度上可以反映辐射对免疫系统的影响及香菇多糖的保护作用。

长期辐射后,小鼠的脏器受损,可发生充血、水肿或萎缩,表现为脏器系数的增大或减少<sup>[7]</sup>。本实验观察到,低剂量长期辐射可改变小鼠的一般状况,表现为精神状态差、普遍脱毛;可引起小鼠脾脏系数的显著下降,降低脾脏淋巴细胞的增殖活性,而香菇多糖 0.1, 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>组可显著改善小鼠的一般状况,并提升小鼠的脾脏系数,增加脾脏淋巴细胞的增殖活性。对各组小鼠脾脏进行组织形态学分析,发现长期低剂量辐射可造成脾脏结构的破坏,间质充血、淋巴细胞数量减少、出现凋亡、坏死。香菇多糖对辐射损伤有很好的改善作用。除 0.02 mg·mL<sup>-1</sup>组外,0.1 和 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>的香菇多糖均可使辐射损伤小鼠的脾脏内结构显著恢复,淋巴细胞数量增加。对各组小鼠脾脏淋巴细胞进行超微结构分析,发现,电镜下模型组淋巴细胞单位膜结构模糊不清,细胞膜表面变平滑,膜上突起变少或基本消失,严重者淋巴细胞

出现凋亡或崩解,胞质外流。电镜下显示细胞裂解成为小体,疑为凋亡小体,推测与凋亡相关的膜受体受到损伤,导致细胞自发性的凋亡程序出现错误,细胞不能正常凋亡,而使细胞多呈崩解状态。胞质内出现空泡。细胞形态异常,细胞核固缩,细胞膜上突起消失,多糖低剂量组与模型组相比无明显改善,而多糖中、高剂量组淋巴细胞形态改善,淋巴细胞数量恢复,细胞膜较平滑,胞内细胞器结构完整,与对照组相比,没有显著性的差别。

本实验结果表明,香菇多糖对低剂量长期辐射造成的脾脏损伤具有良好的拮抗作用,它不仅可以改善小鼠的一般情况,而且可以促进脾脏组织形态和淋巴细胞超微结构正常化,从而达到免疫保护作用。由实验结果可知,这种保护作用可能与香菇多糖减少脾脏淋巴细胞的凋亡、坏死,促进受损脾脏结构和功能的恢复相关,表明香菇多糖对辐射造成的免疫损伤有一定的保护作用。

#### REFERENCES

- [1] LI D G, WANG Y Y, LU L, et al. Study of radiation on the mice immune system [J]. Chin J Cell Mol Immunol(细胞与分子免疫学杂志), 2011, 27(12): 1362-1363.
- [2] WANG G J, CAO H. The research progress of lentinan [J]. Pharm J Chin PLA(解放军药学报), 2011, 27(5): 452-455.
- [3] HANG L, LI J S, LIU Y. A clinical observation of lentinan combined with GP regimen in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. Her Med(医药导报), 2012, 31(8): 1029-1032.
- [4] XUE Q S. Principles and Techniques of *in Vitro* Culture(体外培养的原理与技术) [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [5] YANG Y J, LIANG L, LI M, et al. The protective effective of Radix Adenophorae polysaccharides on sub-chronic radiation injury [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2002, 18(5): 21-23.
- [6] BOGDÁNDI E N, BALOGH A, FELGYINSZKI N, et al. Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation [J]. Radiat Res, 2010, 174(4): 480-489.
- [7] HUANG L M, SHI P, ZHANG L J, et al. Compound Chinese medicine of anti-radiation protective effect of radiation injury in mice [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2011, 25(2): 132-134.

收稿日期: 2012-08-28