

五指毛桃水提液对 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线致小鼠骨髓细胞 DNA 损伤的防护作用

王晓平^{1a}, 段丽菊², 黄翔^{1b}, 岑业文^{1a}, 李桂芬^{1a}(1.广西玉林师范学院, a.化学与生物系; b.体育系, 广西 玉林 537000; 2.郑州大学公共卫生学院, 郑州 450001)

摘要: 目的 探讨五指毛桃水提液对 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线所致的小鼠骨髓细胞 DNA 损伤的防护作用。方法 40 只 SPF 级 ♂ 小鼠随机分为 5 组: 阴性对照组给予生理盐水, 辐射模型组单纯接受照射, 3 个五指毛桃剂量组分别给予相当于生药 5, 10, 20 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 五指毛桃水提液, 连续灌胃 7 d。除阴性对照组外, 所有小鼠接受全身一次性 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射, 照射剂量为 6 Gy。照射 24 h 后处死小鼠, 取股骨, 制作骨髓单细胞悬液, 用单细胞凝胶电泳实验检测小鼠骨髓细胞 DNA 损伤情况。
结果 辐射模型组小鼠骨髓细胞 DNA 的尾部 DNA 百分率(Tail DNA%)和尾矩(Tail Moment)高于阴性对照组($P<0.01$), 五

基金项目: 广西教育厅科研项目(200809MS124; 200911MS195)

作者简介: 王晓平, 女, 副教授 Tel: (0775)2622315 E-mail: sywxp@163.com

指毛桃各剂量组的 Tail DNA%和 Tail Moment 均显著低于辐射模型组($P<0.01$), 且随着给药剂量的增加, Tail DNA%和 Tail Moment 降低。结论 五指毛桃水提液对 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线损伤小鼠骨髓细胞 DNA 具有一定的防护作用。

关键词: 五指毛桃; $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线; 骨髓细胞; DNA 损伤; 单细胞凝胶电泳

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)04-0284-04

Protective Role of Aqueous Extract from Fici Hirtae Radix for DNA Damage of Bone Marrow Cells by $^{60}\text{Co}\gamma$ -Ray in Mice

WANG Xiaoping^{1a}, DUAN Liju², HUANG Xiang^{1b}, CEN Yewen^{1a}, LI Guifen^{1a}(1.Yulin Normal College, a.Department of Chemical and Biology; b.Department of Physical Education, Yulin 537000, China; 2.College of Pubilc Heath, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protective role of aqueous extract from Fici Hirtae Radix for bone marrow cells DNA of $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray irradiated mice. **METHODS** Forty SPF male mice were randomized into 5 groups. Negative control group was given normal saline, irradiated group was radiation model group and 3 Fici Hirtae Radix dose groups were orally given aqueous extracts from Fici Hirtae Radix of 5, 10, 20 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for 7 consecutive days. Except the negative control group, all mice received 6 Gy irradiation of whole body. After 24 h of irradiation, mice were sacrificed on femur. Single cell suspension was produced. DNA damage was detected using single cell gel electrophoresis experiment. **RESULTS** The results showed that Tail DNA% and Tail Moment of radiation model mice were higher than negative control group ($P<0.01$). Tail DNA% and Tail Moment of all Fici Hirtae Radix dose groups were significantly lower than radiation model group($P<0.01$). As the dose increased, Tail DNA% and Tail Moment reduced. **CONCLUSION** Aqueous extracts from Fici Hirtae Radix have good protective effect on $^{60}\text{Co}\gamma$ -organization of bone marrow cells DNA damage in mice.

KEY WORDS: Fici Hirtae Radix; $^{60}\text{Co}\gamma$ -rays; bone marrow cells; DNA damage; single-cell gel electrophoresis

五指毛桃(*Fici Hirtae Radix*)为桑科植物粗叶榕 *Ficus hirta* Vahl. 的干燥根, 为华南地区广泛运用的中药材, 味辛、甘, 性平, 有健脾补肺、利湿舒筋功能^[1]。该药又称为南芪、土北芪等, 且和北芪具有相同的补气扶正作用, 但不温不燥, 药效温和, 是客家人常用的煲汤材料。研究表明北芪可减轻 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线对骨髓的抑制作用, 具有抗 γ 射线辐射作用^[2]。 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射在临床常用作肿瘤病人辅助治疗的一种手段, 但在杀伤肿瘤细胞的同时可对造血系统产生不良影响, 骨髓细胞 DNA 是其攻击的主要对象, 因此, 寻找对骨髓细胞 DNA 辐射损伤的防护中草药具有重要意义。本试验利用单细胞凝胶电泳技术, 探讨五指毛桃对 $^{60}\text{Co}\gamma$ 照射后小鼠骨髓细胞 DNA 的防护作用, 为五指毛桃在临床上作为辐射防护剂的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 五指毛桃水提液的制备

五指毛桃购自玉林市中药材公司, 经玉林师范学院化学与生物系植物学教研室杨存亮副教授鉴定为桑科植物粗叶榕 *Ficus hirta* Vahl. 的干燥根。五指毛桃水提液的制备参照周添浓等^[3]的方法略加改进: 取五指毛桃干燥药材, 用 10 倍体积的蒸馏水浸泡 1 h, 加热煮沸 3 h, 滤取药液; 残渣再

加 8 倍量体积蒸馏水, 煮沸 30 min, 合并两次滤液, 浓缩至相当于生药 $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。4℃冰箱保存, 用时稀释至所需浓度。

1.2 实验动物

SPF 级昆明种小鼠 40 只, ♂, 6 周龄, 体重 $(20\pm 2)\text{ g}$, 购自广西医科大学医学实验动物中心, 动物生产许可证号: SCXK(桂)2009-0002。

1.3 试剂和仪器

正常熔点琼脂糖(NMA)、低熔点琼脂糖(LMA): 美国Sigma公司; TritonX-100、十二烷基肌氨酸钠、溴化乙锭: 美国Premega公司; 淋巴细胞分离液(上海试剂二厂); 二甲基亚砜(DMSO)、乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris-base)和氢氧化钠(NaOH)均为国产分析纯。

FYC-50H $^{60}\text{Co}\gamma$ 治疗机(上海医用核子仪器厂); DYY-III型电泳槽、DYY-11B 型三恒电泳仪(北京市六一仪器厂); BX51-R-32FB3F01 正置荧光相差生物显微镜(日本Olympus公司); 150万像素 CCD(日本Nikon公司); L420 台式低速自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

1.4 动物分组和处理

将小鼠随机分为 5 组, 即阴性对照组、辐射模型组及五指毛桃低中高剂量组, 每组 8 只。五

指毛桃水提液低、中、高剂量组按相当于生药 5, 10, 20 g·kg⁻¹ 给予灌胃^[3], 每天 1 次, 连续 7 d, 阴性对照组、辐射模型组给予等量生理盐水。最后一次给药 1 h 后, 除阴性对照组外, 对各组小鼠用 ⁶⁰Coγ 射线一次性全身均匀照射, 照射率为 182.28 cGy·min⁻¹, 照射野 18 cm×18 cm, 照射距离为 75 cm, 照射剂量为 6 Gy。

1.5 单细胞悬液的制备

照射 24 h 后处死小鼠, 取股骨, 剔尽肌肉, 用生理盐水进行骨髓腔冲洗, 收集冲洗下的细胞悬液, 过滤后取滤液离心, 将细胞密度调节为 10⁵~10⁶·mL⁻¹。

1.6 单细胞凝胶电泳实验

1.6.1 铺胶 在完全磨毛的载玻片(75 mm×25 mm)上铺第1层180 μL质量分数为1%的NMA; 待其固化后铺第2层100 μL质量分数为0.8%的LMA和细胞悬液的混合液(体积比为5:3); 待第2层固化后铺第3层100 μL质量分数为0.5%的LMA。固化条件均为4℃, 10 min。

1.6.2 细胞裂解 将玻片置于碱性裂解液(2.5 mol·L⁻¹ NaCl, 100 mmol·L⁻¹ Na₂EDTA, 10 mmol·L⁻¹ Tris-base, 1%十二烷基肌氨酸钠, 临用前加终浓度为1% TritonX-100, 10%DMSO的应用液, NaOH调节pH为10)中, 4℃下裂解2 h。

1.6.3 细胞DNA解旋和电泳 将玻片置于水平电泳槽中, 加入新配制的电泳缓冲液(1 mmol·L⁻¹ Na₂EDTA, 300 mmol·L⁻¹ NaOH, pH 13.0)浸泡20

min, 以便双链DNA解螺旋。室温下调节缓冲液液面高低, 于22 V, 190 mA下电泳20 min。随后将玻片浸入0.4 mol·L⁻¹ Tris-base缓冲液(pH 7.5)中, 中和30 min。

1.6.4 染色与观察 5 μg·mL⁻¹溴化乙锭染色, 双蒸水漂洗, 24 h内在荧光显微镜下观察。

1.6.5 拍照与分析 每只小鼠随机选择50个细胞进行分析, 每组共计数400个。细胞图像由CCD拍摄, 用CASP彗星图像分析软件自动分析。分析指标为国际公认的尾部DNA百分率(Tail DNA%)和尾矩(Tail Moment)。其中Tail DNA%为单一的彗尾强度指标, Tail Moment为复合指标, 定义为Tail DNA%和彗尾长度的乘积。

1.7 统计学分析

采用 Origin 7.0 统计分析软件对实验数据进行分析, 各实验组之间的差异性采用 t 检验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 小鼠骨髓细胞拖尾现象比较

经荧光染色后, 阴性对照组的骨髓细胞呈现圆形的荧光团, 无拖尾现象, 见图 1A; 辐射模型组的骨髓细胞表现为尾长增加, 尾部荧光强度增强, 细胞呈彗星样, 提示 DNA 链断裂, 细胞 DNA 受损严重, 见图 1B; 五指毛桃水提液各剂量组骨髓细胞的尾长和尾部荧光强度与辐射模型组相比均明显减少, 其中高剂量组骨髓细胞拖尾现象不典型, 见图 1C~1E, 提示各剂量组骨髓细胞 DNA 受损减轻。

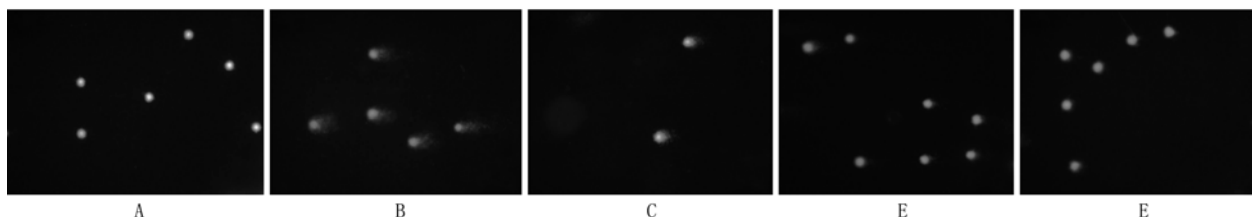


图 1 不同处理组骨髓细胞彗星实验图(×200)

A-阴性对照组; B-辐射模型组; C-五指毛桃低剂量组; D-五指毛桃中剂量组; E-五指毛桃高剂量组

Fig 1 Comet assay figures of bone marrow cells of different experimental groups (×200)

A-negative control group; B-radiation model group; C-low Fici Hirtae Radix dose group; D-medium Fici Hirtae Radix dose group; E-high Fici Hirtae Radix dose group

2.2 五指毛桃对小鼠骨髓细胞 Tail DNA%和 Tail Moment 的影响

各实验组 Tail DNA%和 Tail Moment 见表 1。结果显示, 小鼠接受 6 Gy ⁶⁰Coγ 射线照射后, 辐射模型组骨髓细胞的 Tail DNA%和 Tail Moment

与阴性对照组相比均明显升高, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。五指毛桃各剂量组的 Tail DNA%和 Tail Moment 也高于阴性对照组, 差异具有统计学意义($P<0.01$), 但是均低于辐射模型组, 差异具有统计学意义($P<0.01$), 且随着给药剂量的增加, Tail

DNA%和 Tail Moment 逐步降低。

表 1 五指毛桃水提液对小鼠骨髓细胞 Tail DNA%和 Tail Moment 的影响($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Influence of aqueous extract from Ficus Hirta Radix on Tail DNA% and Tail Moment of mice's bone marrow cell($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	细胞数	Tail DNA%	Tail Moment
阴性对照组	—	400	0.90±0.07	0.03±0.00
辐射模型组	—	400	23.35±1.02 ¹⁾	8.17±0.66 ¹⁾
五指毛桃低剂量组	5	400	5.50±0.34 ¹⁾²⁾	0.76±0.09 ¹⁾²⁾
五指毛桃中剂量组	10	400	3.30±0.28 ¹⁾²⁾	0.33±0.06 ¹⁾²⁾
五指毛桃高剂量组	20	400	2.48±0.20 ¹⁾²⁾	0.16±0.02 ¹⁾²⁾

注：与阴性对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与辐射模型组比较，²⁾ $P<0.01$
Note: Compared with negative control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with radiation model group, ²⁾ $P<0.01$

3 讨论

辐射可导致骨髓造血系统损伤^[4],DNA作为辐射作用的靶分子,在辐射时极易发生结构的改变,其中,DNA双链断裂是最常见的损伤形式^[5]。因此,骨髓细胞DNA的损伤和修复情况可以直接反映出机体的状况。单细胞凝胶电泳是一种在单细胞水平检测DNA损伤与修复的方法,可对辐射损伤进行定量测定,且灵敏度高,可检测各种类型的辐射损伤^[6]。本试验应用单细胞凝胶电泳技术,检测出当小鼠经6 Gy ⁶⁰Co γ 射线照射后,其骨髓细胞的Tail DNA%和Tail Moment与阴性对照组相比明显升高,提示⁶⁰Co γ 射线可导致小鼠骨髓细胞DNA链的断裂。

近年来,国内学者就中医药在预防和治疗辐射损伤方面进行了研究和探索,发现某些中药具有良好的抗辐射作用。中医理论认为辐射损伤表现为热毒炽盛、气血两虚和阴阳失调等症状,所采用的治法多为清热解毒、活血化瘀和补益气血,与之相应使用的药物也大致为清热解毒药,活血化瘀药和补益药^[7]。五指毛桃具有清热祛湿,益气补虚等功效。补骨脂素为五指毛桃的主要活性成分之一,具有抗菌、抗病毒、抑制肿瘤、免疫调

节等作用^[8]。童曾寿等^[9]研究发现补骨脂素对辐射引起的白细胞降低具有提升作用,可以防止骨髓细胞DNA的照射损伤,提高小鼠存活率。本试验也表明,不同剂量的五指毛桃均可对辐射损伤小鼠骨髓细胞DNA产生防护作用,使骨髓细胞DNA断片减少,且随着剂量的升高,这种防护作用越明显。因此,五指毛桃可作为辅助药配合放疗等抗肿瘤治疗,病人可在放疗前口服五指毛桃水提液,或者食用五指毛桃保健汤,有利于减轻放疗的毒副作用。

综上所述,五指毛桃对⁶⁰Co γ 射线辐射损伤具有一定的防护作用,但其作用机制需进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] Nanjing University of Chinese Medicine. Dictionary of Chinese Herbal Medicine(中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 2006: 529.
- [2] LI Z S, ZHANG D, QIU S C, et al. Research of the function of *Astragalus membranaceus*(AM) on the anti-radiation of γ -ray [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2003, 14(12): 733-734.
- [3] ZHOU T N, WANG Y, TANG L H, et al. Comparison study on anti-stress and immune regulation of Radix Astraga Li and Radix Fici Hirtae [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2008, 19(1): 15-18.
- [4] WANG X H, ZHOU Z Y, LI B Y, et al. Radioprotection of vitamin D on mice injured by irradiation [J]. J Radiation Res Radiation Processing(辐射研究与辐射工艺学报), 2008, 26(2): 122-124.
- [5] HAN R G, PENG R Y. Research progress on ionizing radiation damage to bone marrow [J]. Chin J Radiol Med Prot (中华放射医学与防护杂志), 2005, 25(6): 586-588.
- [6] JIANG L, MU W J, LIU G P, et al. Application of single cell gel electrophoresis in post-evaluation of organism radiation damage [J]. J Nucl Chem Radiochem(核化学与放射化学), 2009, 31(1): 36-41.
- [7] SHI G B, AN H, ZHAO Q C. Research progress on TCM prevention and treatment of nuclear radiation injury [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2008, 39(12): Appendix 1-4.
- [8] WEN L, XU G, YANG W H, et al. Research survey of south China herbal drugs *Ficus hirta* [J]. Inf Tradit Chin Med (中医药信息), 2007, 24(1): 18-20.
- [9] TONG Z S, HUANG M X, DAI C S. The inquiry of coumarin radiation protection and its structure-activity relationship [J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 1994, 4(2): 150-151.

收稿日期: 2010-07-23