

· 基础研究 ·

当归多糖对辐射损伤小鼠造血系统保护作用的研究*

何晓莉, 张雁, 吴宏[△], 姜蓉

(重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室/干细胞与组织工程研究室 400016)

摘要:目的 研究当归多糖(APS)对电离辐射引起小鼠骨髓损伤的影响,旨在阐明 APS 对放射性造血损伤的保护作用。方法 采用直线加速器一次性 4.0 Gy 剂量全身均匀照射 C57BL/6 小鼠,建立小鼠放射损伤动物模型。取外周血并进行常规检测,提取骨髓单个核细胞(BMNC)并计数;骨髓切片染色观察骨髓造血细胞数量改变;流式细胞术检测细胞周期,细胞凋亡率;免疫细胞化学法检测 p53 的表达。结果 与对照组相比,生理盐水(NS)组外周血白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板(PLT)及 BMNC 计数均明显减少,骨髓腔内造血组织显著减少,BMNC G₀/G₁ 期比例、凋亡率、p53 表达均升高;2 mg/kg APS 组和 8 mg/kg APS 组均能提高外周血 WBC、RBC、PLT 及 BMNC 计数,增加骨髓腔内造血细胞数量,降低 G₀/G₁ 期细胞比例以及细胞凋亡率。结论 APS 可以促进骨髓造血系统恢复,对辐射损伤具有良好的保护作用。

关键词:辐射损伤;造血系统;细胞周期;细胞凋亡;当归多糖

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.35.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)35-3734-03

Study of angelica polysaccharides on the protection of ionizing radiation in injured mice*

He Xiaoli, Zhang Yan, Wu Hong[△], Jiang Rong

(Department of Histology and Embryology, Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the effects of angelica polysaccharide(APS) on the damage of bone marrow by ionizing radiation in injured mice, so as to illuminate the protective effects of APS against radioactive haematogenesis injury. **Methods** Using the linear accelerator irradiate C57BL/6 mice one time with 4.0 Gy X ray to establish the animal radiation injured model. Then these mice were killed and extracted BMNC after 7 days injection. Counting the number of the blood cells and BMNCs and observing the pathology change of bone marrow. The cell cycle and apoptosis rate were detected by flow cytometry and the expression of p53 was detected by immunocytochemistry. **Results** Compared with normal group, the percentage of G₀/G₁ phase, apoptosis rate and the expression of p53 increased significantly, while the number of the blood cells and BMNCs, the number of cells in bone marrow obviously decreased in NS group; both in the 2 mg/kg APS and 8 mg/kg APS group, the percentage of G₀/G₁ phase and apoptosis rate decreased, while the number of the blood cells and BMNCs, the number of cells in bone marrow increased. **Conclusion** APS can improve the function of bone marrow hematopoietic system and have protection in ionizing radiation.

Key words: radiation injuries; hematopoietic system; cell cycles; apoptosis; angelica polysaccharide

当归被广泛应用在中药的复方和验方中,当归多糖(angelic polysaccharides, APS)是当归的主要生物活性物质^[1],近年来对 APS 成分和药理学研究有了新的进展,发现其对机体免疫系统、造血系统有明显作用以及抗肿瘤、抗放射性损伤的良好疗效^[2]。本文主要探讨 APS 在造血系统抗辐射损伤方面的作用,旨在为其作为辐射保护剂提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 采用健康清洁级 C57BL/6 小鼠,雌雄各半,6~8 周龄,体重(20±2)g,购自重庆医科大学动物实验中心。实验过程中对动物的处理符合《关于善待实验动物的指导性意见》的标准。主要试剂与设备,APS(产地:甘肃岷县)由重庆医科大学化学教研室分离、提纯(纯度大于 950 mg/g)。人淋巴细胞分离液(TBD 公司)。苏木素-伊红(HE)染色试剂盒,Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒(碧云天生物技术研究所);抗小鼠 P53 抗体(碧云天生物技术研究所进口分装)。免疫染色试

剂盒、DAB 显色试剂(北京中山金桥生物技术有限公司)。超净工作台、倒置显微镜、酶标仪、流式细胞仪。

1.2 方 法

1.2.1 分组处理 小鼠随机分为 4 组,对照组(注射生理盐水,共 18 只);生理盐水(NS)组、2 mg/kg APS 组和 8 mg/kg APS 组(后 3 组各 54 只),共计 180 只。后 3 组小鼠采用直线加速器全身均匀照射,总剂量 4.0 Gy^[3],时间 1.25 min, X 射线吸收剂量率为 3.76 Gy/min,焦点距小鼠 100 cm,面积 25 cm×25 cm^[4]。照射后约 3 h 内腹腔分别注射 NS、2 mg/kg APS 和 8 mg/kg APS,每天 0.2 毫升/次,连续注射 7 d 后眼眶取血并处死小鼠,取其骨髓^[5]。

1.2.2 外周血检测指标计数 常规方法进行白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板(PLT)计数并取出骨髓。采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法(密度:1.077±0.002),2 000 r/min 离心 20 min 后获取骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear

* 基金项目:重庆市渝中区科技计划项目(20110321)。△ 通讯作者, Tel:13368080808; E-mail:wuhong6368@126.com。

表 1 4 组小鼠外周血细胞和 BMNC 的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	WBC($\times 10^9/L$)	RBC($\times 10^{12}/L$)	PLT($\times 10^9/L$)	BMNC($\times 10^6/股骨$)
对照组	7.05 \pm 0.87	10.84 \pm 1.67	1 203.33 \pm 256.62	3.69 \pm 0.75
NS 组	1.54 \pm 0.13★	7.47 \pm 0.32★	287.76 \pm 79.65★	0.86 \pm 0.19★
2 mg/kg APS 组	1.87 \pm 0.19★	8.68 \pm 0.61★▲	318.08 \pm 96.01★	1.91 \pm 0.13★▲
8 mg/kg APS 组	3.41 \pm 0.07★▲	9.59 \pm 0.43★▲	623.08 \pm 187.91★▲	2.75 \pm 0.17★▲

★: $P < 0.05$, 与对照组比较; ▲: $P < 0.05$, 与 NS 组比较。

cell, BMNC), 制成悬液, 按 WBC 计数方法进行计数。

1.2.3 观察放射后小鼠骨髓的病理学改变 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 取出一侧股骨, 经取材、固定、洗涤、脱水、透明、透蜡、包埋、切片、脱蜡复水、HE 染色、封片后, 显微镜下观察骨髓病理学改变^[6]。

1.2.4 BMNC 细胞周期的测定 收集 BMNC, 70% 冰乙醇 4℃ 固定过夜; 经磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 再加入 100 μ L 牛胰核糖核酸酶 (1 mg/mL); 37℃ 水浴箱中孵育 30 min, 加入碘化丙啶染色液 (50 μ g/mL), 避光反应 30 min, 流式细胞仪检测, Multicycle 软件 (日本 Phenix 公司) 分析。

1.2.5 BMNC 凋亡率的检测 收集 BMNC, PBS 洗涤细胞 2 次, 用 1 \times binding 缓冲液调整细胞浓度约为 1 $\times 10^6$ /mL; 取 100 μ L 样品, 再加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L 碘化丙啶 (PI); 混匀细胞, 25℃ 暗室孵育 15 min; 每份样品加入 1 \times binding 缓冲液 100 μ L 后流式细胞仪检测; 利用 FCM 双参数分析区分出凋亡细胞并计算凋亡率。

1.2.6 BMNC p53 蛋白的免疫细胞化学检测 收集 BMNC, 制成细胞悬液。4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 冲洗 3 次每次 5 min; 按免疫染色及 DAB 显色试剂盒说明书进行染色、显色, 中性树胶封片。显微镜下观察, p53 阳性细胞核呈棕褐色, 阴性细胞不着色。随机选择 5 个视野 ($\times 400$), 每个视野计数 100 个细胞, 计算 p53 阳性率 = p53 阳性细胞数 / 100 $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 APS 对放射损伤小鼠外周血的影响 照射后第 7 天 NS 组与对照组相比, 全血各系及 BMNC 计数全面下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 2 mg/kg APS 组小鼠外周血 WBC、RBC 和 PLT 及 BMNC 与 NS 组相比, 各项指标均有所升高, 仅 RBC 和 BMNC 计数差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 8 mg/kg APS 组与 NS 组相比, 升高更明显, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 外周血各项指标及 BMNC 计数至第 7 天仍低于正常水平, 见表 1。

2.2 APS 对放射损伤小鼠骨髓的影响 照射后第 7 天 NS 组与对照组相比, 骨髓腔内造血组织显著减少; 而 2 mg/kg APS 组与 NS 组相比, 造血组织有所增加; 8 mg/kg APS 组与 NS 组相比, 造血组织明显增加; 2 mg/kg APS 组与 8 mg/kg APS 组相比, 后者骨髓腔内造血组织多于前者, 但至照射后第 7 天, 各照射组骨髓造血面积仍未恢复至正常水平, 见图 1。

2.3 APS 对放射损伤小鼠 BMNC 细胞周期的影响 照射后

第 7 天 NS 组 BMNC 停滞于 G_0/G_1 期, 与对照组比较显著均有统计学意义 ($P < 0.05$); 随时间变化, G_0/G_1 期细胞比例呈由高到低的变化, 到第 7 天时仍未恢复正常。2 mg/kg APS 组和 8 mg/kg APS 组与 NS 组比较, 其 G_0/G_1 期比例均下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 4 组小鼠 BMNC 细胞周期、凋亡率以及 p53 表达阳性率的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	G_0/G_1 期 (%)	凋亡率 (%)	p53 表达阳性率 (%)
对照组	55.82 \pm 2.84	5.53 \pm 1.85	0.00
NS 组	75.23 \pm 10.69★	12.37 \pm 1.26★	23.39 \pm 4.34★
2 mg/kg APS 组	63.17 \pm 6.01★▲	7.25 \pm 0.93★▲	22.45 \pm 4.27★
8 mg/kg APS 组	64.65 \pm 4.17★▲	6.24 \pm 0.79★▲	22.57 \pm 1.97★

★: $P < 0.05$, 与对照组比较; ▲: $P < 0.05$, 与 NS 组比较。

2.4 APS 对放射损伤小鼠 BMNC 凋亡率的影响 照射后第 7 天 NS 组 BMNC 的凋亡率均较正常组显著增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 2 mg/kg APS 组和 8 mg/kg APS 组与 NS 组相比, 凋亡率均明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 但仍高于对照组水平, 见表 2。

2.5 APS 对放射损伤小鼠 BMNC p53 表达阳性率的影响 对照组小鼠 BMNC 不表达 p53, NS 组、2 mg/kg APS 组和 8 mg/kg APS 组均有表达, 且与对照组相比, p53 的表达率升高明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2, 封 4 图 2。

3 讨 论

骨髓是机体对电离辐射高度敏感器官之一, 也是机体的主要造血器官。电离辐射对造血系统的损伤主要表现为造血功能的破坏和抑制, 而造血功能障碍主要表现为全血细胞减少^[7]。本研究结果显示, 与对照组相比, NS 组 WBC、RBC、PLT 及 BMNC 计数显著降低。HE 染色结果显示, 与对照组相比, NS 组骨髓腔内造血组织面积明显减小, 造血细胞数量减少。

APS 有明显的抗辐射作用, 主要表现在促进机体造血功能恢复, 增加血细胞含量^[8-11]。本研究结果还显示, 与 NS 组相比, 两种剂量 APS 组 WBC、RBC、PLT 及 BMNC 计数均上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。HE 染色结果显示, 两种剂量 APS 组骨髓腔内的造血组织面积均明显增大, 造血细胞数量增多。证明 APS 可促进电离辐射引起的造血系统损伤的恢复, 与以往文献报道一致。

国内外大量研究表明, 电离辐射不仅可以加速细胞衰老, 还可以诱导细胞凋亡^[12]。p53 基因既参与细胞周期停滞, 还与

细胞凋亡密切相关^[13]。野生型 p53 基因半衰期短,免疫细胞化学方法检测不到其表达,故本研究检测突变型 p53 基因的表达。本研究结果显示,p53 基因在对照组不表达,照射组表达率显著升高,但各 APS 组和 NS 组比较差异不明显,这可能是由于突变型 p53 基因的表达不会因为损伤得到修复而减少所致。细胞周期和凋亡率检测结果显示,NS 组与对照组相比, G_0/G_1 期比例和凋亡率均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),各 APS 组与 NS 组比较, G_0/G_1 期比例和凋亡率均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明电离辐射可以诱导细胞凋亡,APS 可以促进细胞周期阻滞及凋亡的恢复。

目前,放疗是肿瘤的主要治疗方式,它在杀死肿瘤细胞的同时也损伤机体正常细胞,因此,辐射保护剂的开发势在必行。大量文献报道 APS 有明显的抗辐射、抗肿瘤等作用,但其具体机制仍不清楚,本研究就 APS 抗电离辐射的机制进行基础研究,为后续研究提供参考依据。

参考文献:

- [1] 李成军,金香兰,沈云虹. 当归多糖的成分及其生物学作用[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2007,28(9):1096-1097.
- [2] 胡小平,李玉云,李先何. 当归多糖的成分及药理学研究新进展[J]. 中药材,2004,27(1):70-72.
- [3] Wong SH,Lowes KN,Bertoncello L, et al. Evaluation of Scl-1 and c-kit as selectivemarkers for muscle remodeling by nonhemopoietic bone marrow cells [J]. Stem Cells, 2007,25(6):1364-1374.
- [4] 张雁,吴宏,关雪晶,等. 当归多糖对放射损伤小鼠骨髓单个核细胞黏附分子表达及细胞周期的影响[J]. 中国生物制品学杂志,2010,23(6):1-6.
- [5] 胡晶,吴宏. 当归多糖对小鼠外周造血干细胞动员作用的研究[J]. 中草药,2006,37(12):1835-1838.
- [6] 张荣侠,杜秀平. 磷酸羟基哌啶对血液系统辐射损伤保护作用的研究[J]. 徐州医学院学报,2010,30(2):99-101.
- [7] 周永,糜漫天,杨镇洲,等. 染料木素对小鼠辐射造血损伤保护作用的研究[J]. 第三军医大学学报,2006,28(24):2406-2408.
- [8] 王燕,单体中. 当归多糖的生物学功能研究进展[J]. 中国饲料,2006,16(9):18-21.
- [9] 孟慧玲. 当归多糖的药理学研究新进展[J]. 甘肃中医,2007,20(1):44-46.
- [10] 聂小燕,陈青,李祝,等. 当归多糖药理活性研究新进展[J]. 现代农业科学,2008,15(10):36-37.
- [11] 李宗山,邱世翠,韩兆东,等. 当归对 X 线辐射小鼠骨髓细胞增殖抗体产生的影响[J]. 中国中医药科技,2005,12(2):118.
- [12] Richardson RB. Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea[J]. AGING,2009,1(11):887-902.
- [13] Fumagalli S,Thomas G. The Role of p53 in Ribosomopathies[J]. Semin Hematol,2011,48(2):97-105.

(收稿日期:2012-06-13 修回日期:2012-09-12)

(上接第 3733 页)

- [1] 2010,14(42):7966-7970.
- [4] Wei J, Jia J, Wu F, et al. Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium-calcium phosphate for bone tissue regeneration [J]. Biomaterials, 2010, 31(6):1260-1269.
- [5] Habibovic P, Barralet JE. Bioinorganics and biomaterials: Bone repair [J]. Acta Biomaterialia, 2011, 7(9): 3013-3026.
- [6] Xue W, Dahlquist K, Banerjee A, et al. Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants[J]. J Mater Sci Mater Med, 2008, 19(7): 2669-2677.
- [7] He Y, Tao H, Zhang Y, et al. Biocompatibility of bio-Mg-Zn alloys within bone with Heart, liver, kidney and spleen [J]. Chinese Science Bulletin, 2009, 11(3): 484-491.
- [8] Zreiqat H, Valenzuela SM, Nissan BB, et al. The effect of surface chemistry modification of titanium alloy on signaling pathways in human osteoblasts [J]. Biomaterials, 2005, 26(36): 7579-7586.
- [9] 王茸影,易静. 骨形成蛋白调控成骨分化的信号机制[J]. 生命科学, 2005, 17(1): 34-39
- [10] Reddi AH, Reddi A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(5/6): 341-342.
- [11] Li C W, Zhou R, Ge W. Differential regulation of gonadotropin receptors by bone morphogenetic proteins in the zebrafish ovary [J]. Gen Comp Endocrinol, 2012, 176(3): 420-425.
- [12] Garcia P, Pieruschka A, Klein M, et al. Temporal and spatial vascularization patterns of unions and nonunions; role of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic proteins [J]. J Bone Joint Surg Am, 2012, 94(1): 49-58.

(收稿日期:2012-06-13 修回日期:2012-09-12)