

CNC-00692

SMC-0084

CN9301201

中国核科技报

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY NEWS

大枣等食用中药抗辐射效应的研究

THE RADIOPROTECTIVE EFFECT

OF EDIBLE HERBS

(In Chinese)



原子能出版社

中国核报中心



蒋莹：教授，苏州医学院生物化学教研室主任，1959年毕业于苏州医学院。

Jiang Ying: Professor, director of Biochemistry Department, Suzhou Medical College. Graduated from Suzhou Medical College in 1959.

CNIC-00662

SMC-0084

大枣等食用中药抗辐射效应的研究

蒋滢 黄美英 朱康伯

方几希 范秀缙

(苏州医学院)

摘 要

研究了大枣等两味食用中药抗动物辐射损伤的一系列效应,结果:食用中药(1)能降低辐照动物急性期的死亡率;(2)能提高辐照动物外周血白细胞数;(3)有提高血浆缬氨酸,羟脯氨酸,甘氨酸以及门冬氨酸+谷氨酸水平;(4)有升高辐照动物全血超氧化物歧化酶的活力;(5)食用中药对辐照动物的胸腺、睾丸等组织结构的破坏具有一定的保护作用。

THE RADIOPROTECTIVE EFFECT OF EDIBLE HERBS

(In Chinese)

Jiang Ying Huang Meiyong Zhu Gengbo

Fang Jixi Fan Xiudi

(SUZHOU MEDICAL COLLEGE)

ABSTRACT

The radioprotective effect of the edible herbs was studied in animals. The results showed: (1) The acute death rate of animals was decreased. (2) The peripheral leukocytes were increased. (3) The valine, hydroxyproline, glycine, aspartic acid and glutamic acid in the plasma also were increased. (4) The activity of SOD (superoxide dimutase) was risen. (5) The edible herbs have the function to protect the structure of organs of thymus and testes.

前言

近年来,常有报道^[1,2]我国学者利用国内特有的天然中药,研究其消除自由基作用,但选用卫生部规定的食用中药,即既是食品,又是药品,研究其抗辐照效应,尚未见有报道。本文研究了大枣等食用中药对遭受辐照纯种大鼠的体重、死亡率、外周血白细胞、全血超氧化物歧化酶,血浆游离氨基酸以及胸腺、睾丸等组织结构的影响,以此探讨食用中药的抗辐照效应及其机理。

1 实验方法与结果

实验是选用 Wistar 纯种大鼠,健康,随机分成三组,既不辐照,也不服食用中药为正常对照组,只辐照不服用食用中药为辐照对照组以及辐照后第二天开始服用食用中药,连续 24 天为食用中药实验组。这些大鼠均由本院动物室提供,统一饲养,统一饲料,选择的大鼠体重尽量接近,便于比较。食用中药每 200 g 大鼠体重为 0.135 g(按人 50 kg 体重的用量 $\times 0.021 = 200$ g 大鼠用量),按常规煎制成汤剂,每天一次灌胃。辐照剂量为每分钟 1.00 Gy,持续 5 min,共 5.00 Gy,一次全身性辐照,最后辐照的两组大鼠均在辐照后第 25 天活杀,取样,观察各项指标与正常对照组比较。

1.1 大鼠体重与死亡率的变化

辐照前后,使用自动计量仪(DS-88 型)分别称重三组大鼠 11 次,进行体重的动态观察,结果辐照对照组及中药实验组经辐照后,体重增长均低于正常对照组,而且中药实验组体重增长稍低于对照组,详见图 1。

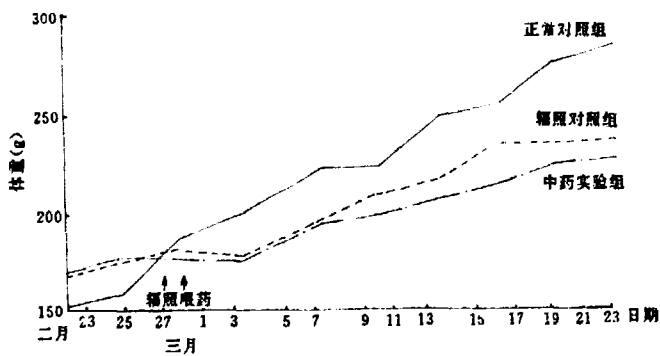


图1 大鼠体重增长曲线

按辐照后第1~15天为辐照损伤急性期,第16~24天为辐照损伤慢性期,对3组大鼠死亡率进行动态观察,结果中药实验组与正常对照组在急性、慢性期无一大鼠死亡,而辐照对照组大鼠在急性期死亡两只,死亡率达16.66%,于表1。

表1 3组大鼠死亡率比较

辐照后时间(d)	正常对照组(n=9)	辐照对照组(n=12)	中药实验组(n=12)
1~15	0	16.66%	0
16~24	0	0	0

1.2 外周血白细胞计数

用稀酸溶去红细胞,留下白细胞,再用血球计数盘计数,以每 μL 含白细胞数表示。3组大鼠在辐照前后,从尾部共分别取血4次,计数外周血白细胞数,进行比较,结果于表2。

表2 3组大鼠外周血白细胞计数比较

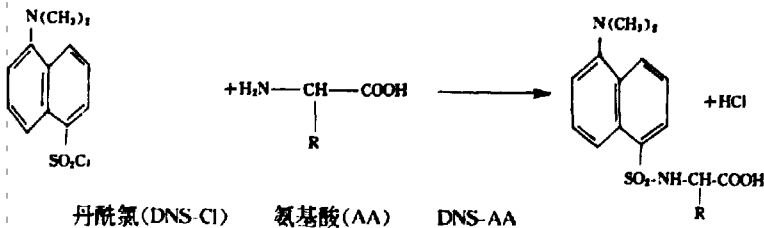
	正常对照组	辐照对照组	中药实验组
	$\bar{X} \pm \text{SD}$	$\bar{X} \pm \text{SD}$	$\bar{X} \pm \text{SD}$
辐照前2月25日	13711 \pm 1690	12636 \pm 2011	14183 \pm 2848
辐照后3月4日	10544 \pm 1214	3354 \pm 1895	4054 \pm 1827
3月14日	15077 \pm 2774	10470 \pm 371	11500 \pm 3112
3月25日	12322 \pm 2559	10327 \pm 2187	10411 \pm 2896
辐照后平均	12714 \pm 1952	8050 \pm 3321	8655 \pm 3283

表2.结果说明,大鼠辐照后,外周血白细胞数,先明显降低,以后逐步恢复,但辐照对照组降低比中药实验组明显些。

1.3 血浆游离氨基酸分析

选用一种经济、简便、快速以及灵敏度达 $3 \times 10^{-12} \text{mol}$,DNS-Cl(1-Dimethylamino-Naphthalene-5-Sulfonyl chloride,丹酰氯)荧光试剂标记氨基酸,然后经聚酰胺(polyamide)薄膜层析方法^[3,4]分离和定量,检测了3组大鼠血浆12种游离氨基酸,具体方法如下:

原理:丹酰氯荧光试剂标记氨基的反应如下:



然后用聚酰胺薄膜层析,将不同的 DNS-AA 分开,剪下每个荧光斑点,用重蒸甲醇洗脱剂洗脱,最后用日本,岛津 RF-510 荧光分光光度计检测定量,以每升血浆所含氨基酸的摩尔($\mu\text{mol/L}$)表示。

试剂:

- 1) DNS-Cl 的丙酮溶液(1 mg/mL)
- 2) 0.2 mol/L NaHCO_3
- 3) 12 种标准氨基酸
- 4) 展层溶剂。I. 苯:冰醋酸=9:1.7(V:V); II. 甲酸(85~95%):水=1.5:100 (V:V)。

5) 其他,5%磷钨酸,2 mol/L 醋酸,重蒸醋酸乙酯以及甲醇。

方法:

1) 样品处理及 DNS-Cl 化

1 mL 血浆用 5%磷钨酸 0.8 mL,沉淀蛋白质,制备成 1:0.8 无蛋白血液,然后将一定量无蛋白血液用 0.2 mol/L NaHCO_3 ,调节酸碱度至 pH9.5~10.5 范围内,最后加入相应量的 DNS-Cl 丙酮溶液,置暗处,水浴 40°C,1h,直至反应混合液中黄色消失。然后再加入相应量的 2 mol/L 醋酸,将溶液酸碱度调至 pH2.0~3.0,才能用醋酸乙酯萃取三次,每次萃取的醋酸乙酯用量为样品的 1.0 至 1.5 倍,最后将三次萃取液合并,蒸干,点样用。

2) 聚酰胺薄膜层析

点样:取一定量的丙酮溶液,溶解以上蒸干物,用平头微量注射器,在 7×7 cm 的聚酰胺薄膜左下角,距左边各 1.0 cm 处,进行点样,每次点样总量为 5~10 μL ,分多次点完并控制样点直径不超过 2 mm。

展开:分两次进行展开,第一次用 I 溶剂展开,方向 \uparrow ,全程;第二次用 II 溶剂展开,方向 \rightarrow (与第一次方向垂直),全程。

3) 在 366 nm 紫外层析灯下,观察游离氨基酸的荧光层析图谱,确定每个荧光斑点的相应氨基酸。

4) 检测图谱中 12 种游离氨基酸的含量,用剪刀剪下每个荧光斑点,浸泡于甲醇洗脱剂,4 h 后,轻轻混匀。最后使用日本岛津 RF-510 荧光分光光度计检测。

5) 计算,按以下公式

$$\frac{\text{每种被测氨基酸荧光强度} - \text{空白}}{\text{相应标准氨基酸荧光强度} - \text{空白}} \times \text{标准浓度}(\mu\text{mol/L}) \times \frac{1000}{\text{样品实际用量}} = (\mu\text{mol/L})$$

计算结果经计算机一般统计及多元逐步回归分析于表 3~4。

表 3 3组大鼠血浆游离氨基酸浓度($\mu\text{mol/L}$)比较

氨基酸	正常对照组	辐照对照组	中药实验组
	$\bar{X} \pm \text{SD}$	$\bar{X} \pm \text{SD}$	$\bar{X} \pm \text{SD}$
异亮氨酸(Ile)	84.94 \pm 17.80	45.10 \pm 6.65 *	56.91 \pm 19.40 *
亮氨酸(Leu)	127.66 \pm 22.19	80.19 \pm 14.30 *	90.24 \pm 25.56 *
苯丙氨酸(Phe)	116.88 \pm 22.80	79.26 \pm 15.30 *	87.66 \pm 22.17
缬氨酸(Val)	145.66 \pm 51.52	81.92 \pm 32.56 *	117.31 \pm 36.97*
脯氨酸(Pro)	260.80 \pm 40.93	167.84 \pm 41.00 *	197.22 \pm 63.72 *
羟脯氨酸(Hyp)	528.77 \pm 27.73	33.76 \pm 11.70 *	151.22 \pm 9.39 *†
苏氨酸(Thr)	89.35 \pm 50.24	57.12 \pm 21.60	66.01 \pm 22.05
丙氨酸(Ala)	226.82 \pm 48.45	197.65 \pm 27.66	234.53 \pm 56.82
甘氨酸(Gly)	463.30 \pm 141.46	342.70 \pm 79.73 *	408.47 \pm 150.31
酪氨酸(Tyr)	133.70 \pm 33.35	71.05 \pm 19.89 *	86.06 \pm 27.31 *
门冬氨酸+谷氨酸 (Asp+Glu)	237.82 \pm 69.67	129.15 \pm 57.06	195.86 \pm 42.36†

表 3 结果：“*”为辐照对照组，中药实验组分别与正常对照组大鼠，比较后，差异显著($P < 0.01$ 或 < 0.05)，说明大鼠经辐照后，血浆 12 种游离氨基酸水平，大部分降低，但其中缬氨酸及甘氨酸水平，中药实验组降低不明显。“†”为中药实验组与辐照对照组大鼠，比较后，差异显著($P < 0.01$ 或 < 0.05)，说明中药实验组大鼠血浆缬氨酸、羟脯氨酸以及门冬氨酸+谷氨酸水平明显高于辐照对照组大鼠。

表 4 3组大鼠血浆 12 种氨基酸多元逐步回归分析

氨基酸代号	F 值	标准复相关系数	作用大小顺序
X_6 (Ala)	8.011085	+0.5070370	1
X_7 (Ile)	29.895990	-0.4507345	2
X_2 (Phe)	6.041137	-0.3875702	3
X_{10} (Tyr)	3.510652	-0.3290805	4
X_2 (Leu)	5.015456	-0.2050666	5
X_1 (Val)	1.610335	+0.1602738	6

复相关系数(r)=0.90

表 4 结果：3 组大鼠血浆 12 种游离氨基酸中，正、负相关的氨基酸共有 6 种，其中 Ala 与 Val 为正相关，其余为负相关。它们相关性的大小，依次为 Ala>Ile>Phe>Tyr>Leu>Val。

1.4 全血超氧化物歧化酶活力的测定

参照 Hara 等^[5]改良的肾上腺素自动氧化法具体方法如下：

原理：

肾上腺素在碱性条件下，发生自动氧化，在氧化过程中产生超氧阴离子(O_2^-)，后者促使肾上腺素转变成肾上腺色素，超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)，能消除 O_2^- ，

从而抑制了肾上腺素转变成肾上腺色素,抑制率的高低与测定液中所含的SOD活力有关。

材料:

1)样品 取Wistar纯种雄鼠的新鲜动脉血,以肝素为抗凝剂。

2)试剂 5 mmol Tris-HCl缓冲液,pH7.4;氯仿;95%乙醇;0.005 mol 磷酸钾缓冲液,pH7.8; 2.25×10^{-3} mol L-肾上腺素酸溶液,pH2.5;0.15 mol 碳酸盐缓冲液,pH10.2。

方法:

1)SOD粗提取液的制备 取新鲜肝素抗凝全血0.1 mL,加5 mmol Tris-HCl缓冲液0.9 mL,混匀,再加0.4 mL 95%乙醇氯仿混合液,振摇后,静止15 min,以3,000 r/min,离心15 min,取上清液备用。

2)活性测定 取不同 μ L SOD上清液,分别再用磷酸钾盐缓冲液加至1.2 mL,然后加入碳酸盐缓冲液1 mL,肾上腺素酸溶液0.4 mL,混匀,25°C,480 nm波长下,测定肾上腺素自动氧化的净增速率,以 $\Delta OD/min$ 表示。

SOD活性单位为,当肾上腺素自动氧化净增速率与不加SOD上清液相比,达到最大百分抑制时,到达最大百分抑制的一半所对应的SOD上清液 μ L,就是一个SOD单位,参见图2。

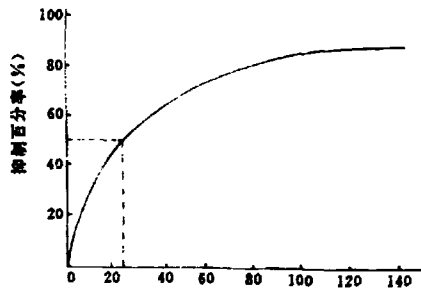


图2 SOD 抽提液体积(μ L)

3组大鼠全血SOD活力测定的结果,比较于表5

表5 3组大鼠全血SOD活力(μ /mL)改变的比较

判别	正常对照组	辐照对照组	中药实验组
$\bar{X} \pm SD$	418.89 \pm 84.47	364.11 \pm 50.20	512.25 \pm 89.08
n	9	9	8
P值		0.05 < P < 0.1	P < 0.005

表5结果,说明大鼠经辐照后,全血SOD活性明显下降,但中药实验组全血SOD活力不仅明显高于辐照对照组,而且还高于正常对照组。

1.5 组织学检查

胸腺组织学检查 打开3组动物胸腔,分别取胸腺,经福尔马林固定,石蜡切片,伊红染色,然后在光学显微镜下,观察3组大鼠胸腺,并比较其组织结构的变化。

1)正常对照组 大鼠胸腺小叶发达,皮质、髓质分界清楚,皮质厚,淋巴细胞多而密集,分裂相多,染色深而髓质比例较小,淋巴细胞较少,染色浅。上皮网状细胞和血管含量丰富,可见胸腺小体,小叶间无脂肪浸润。

2)辐照对照组 大鼠胸腺小叶萎缩,皮质、髓质分界不清,皮质变薄,髓质变小并有局灶性自溶变性区,散布于髓质区,此外还见有淋巴细胞坏死,碎裂,固缩。上皮网状细胞明显减少,充血,血管软化,巨噬细胞浸润。

3)中药实验组 大鼠胸腺小叶较大,皮质髓质分界清楚,皮质较厚,淋巴细胞密集,可见分裂相,髓质比例较小,上皮网状细胞多见,胸腺小体散在分布。

以上3组大鼠胸腺组织结构比较,食用中药对辐照大鼠胸腺组织结构具有一定的保护作用。

睾丸组织学检查 打开3组大鼠阴囊,分别取出睾丸,经福尔马林固定,石蜡切片,伊红染色,然后在光学显微镜下,观察3组大鼠睾丸,并比较其组织结构的变化。

1)正常对照组 曲线精管内,各级生精细胞排列有序,4~5层,腔内可见大量精子,小管基膜不增厚,间质细胞3~5成群,血管丰富。

2)辐照对照组 曲线精管严重破坏,横断面直径缩短,萎缩,塌陷,大多数小管生精上皮脱落,变性,坏死,腔内仅剩下变性的支持细胞空泡,初级精母细胞,精原细胞大部分核固缩或消失,精子细胞碎裂。

3)食用中药组 曲线精管受到部分损伤,而且还存少量精原细胞,提示仍有恢复生精作用的可能性。

2 讨论

2.1 大鼠辐照后的死亡率分为急性期及慢性期死亡率。正常对照组,辐照对照组,中药实验组大鼠急性期死亡率分别为0%,16.66%以及0%,说明食用中药能降低辐照大鼠急性期死亡率。

2.2 大鼠经辐照后,外周血白细胞数立即均明显下降,然后逐步上升,但食用中药实验外周血白细胞数降低没有辐照对照组降低得多。

2.3 辐照后的大鼠血浆12种游离氨基酸有7种氨基酸明显低于正常对照组,但食用中药组血浆缬氨酸,羟脯氨酸,甘氨酸,门冬氨酸+谷氨酸都明显高于辐照对照组,缬氨酸是支链氨基酸,它反映免疫功能加强,甘氨酸,门冬氨酸+谷氨酸是核酸合成原料,有利组织再生。此外,还发现了大鼠血浆Ala, Ile, Phe, Tyr, Leu, Val等六种游离氨基酸与辐照损伤有相关性。

2.4 正常大鼠体内超氧化物歧化酶,主要捕获O₂·自由基,保护细胞膜脂质及细胞核中核酸,免受O₂·自由基的损伤。辐照对照组超氧化物歧化酶活力明显低于正常对照组,而食用中药实验组虽也经辐照,但超氧化物歧化酶活力不仅明显高于辐照对照组,而且也高于正常对照组,说明食用中药,有较强的提高辐照大鼠全血超氧化物歧化酶的活力作用,有

利预防O₃对大鼠的毒害作用。

2.5 通过3组大鼠胸腺、睾丸等组织的活检比较,食用中药实验组,虽经辐照,但大鼠的胸腺、睾丸等组织结构没有辐照对照组破坏严重,说明食用中药对辐照大鼠的胸腺、睾丸等组织结构具有一定的保护作用。

根据以上研究,说明食用中药有降低辐照大鼠死亡率;提高辐照大鼠外周血白细胞数及血浆游离缬氨酸水平。这些均有利于增强大鼠免疫功能;提高全血SOD活力及血浆甘氨酸、门冬氨酸+谷氨酸水平,有利消除自由基及促进组织再生;此外,对辐照大鼠的胸腺及睾丸等组织结构,具有一定的保护作用,这些结果,较充分地说明,食用中药作为抗放保健剂,具有一定的前途。

参考文献

- [1] 林宣夜等. 中国药理通讯. 1990,7(2):21
- [2] 李定东等. 中国药理通讯. 1990,7(2):22
- [3] 蒋澄等. 中华医学检验杂志. 1983,6(3):129
- [4] 蒋澄等. 氨基酸杂志. 1986,2:15
- [5] Hara P et al., J. Biol. Chem. 1972. 247:3170
- [6] 陈瑞梅等. 组织化学手册,人民卫生出版社,1982. 48~52
- [7] Nawar. N et al. JPEN. 1983. 7:521

大鼠等食用中药抗辐射效应的研究

原子能出版社出版

(北京2106信箱)

中国原子能工业公司翻译部排版

核科学技术情报研究所印刷

☆

开本787×1082 1/16·印张1/2·字数8千字

1992年8月北京第一版·1992年8月北京第一次印刷

ISBN 7-5022-0758-9

TL·481

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT



This report is subject to copyright. All rights are reserved. Submission of a report for publication implies the transfer of the exclusive publication right from the author(s) to the publisher. No part of this publication, except abstract, may be reproduced, stored in data banks or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior written permission of the publisher, China Nuclear Information Centre, and/or Atomic Energy Press. Violations fall under the prosecution act of the Copyright Law of China. The China Nuclear Information Centre and Atomic Energy Press do not accept any responsibility for loss or damage arising from the use of information contained in any of its reports or in any communication about its test or investigations.

ISBN 7-5022-0758-9

TL • 4P1

P.O.Box 2103

Beijing, China