

黄芪汤对重离子辐射($^{12}\text{C}^{6+}$)所致大鼠 放射性脑损伤的保护作用

颜春鲁^{1,2,3} 安方玉^{1,2,3} 刘永琦^{1,2,3} 苏 韞¹ 张利英¹ 李佳蔚¹
王彩霞¹ 王统香¹ 王国文¹ 李孟翰¹

¹(甘肃中医药大学 兰州 730000)

²(甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究省级重点实验室 兰州 730000)

³(敦煌医学与转化教育部重点实验室 兰州 730000)

摘要 探讨黄芪汤对受 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射后大鼠大脑中Bax、Bcl-2与Caspase-3表达的影响。无特定病原体(Specific pathogen free, SPF)级Wistar大鼠50只随机分为正常对照组,单纯辐照模型组,黄芪汤高、中、低剂量组,每组各10只。常规饲养7d后,黄芪汤高、中、低剂量组用黄芪汤(剂量分别为18 g/(kg·d)、9 g/(kg·d)、4.5 g/(kg·d))灌胃2周,正常对照组和单纯辐照模型组用等量生理盐水灌胃。从第7天起除正常对照组外,其余各组大鼠脑组织给予4 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束单次照射,辐照后第7天称量各组大鼠的体重,10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉各组大鼠后股动脉采血处死大鼠。计算各组大鼠的脑系数,HE染色法及TUNEL染色法观察脑组织病理学形态改变,并计算神经细胞凋亡率,实时荧光定量PCR法测定各组大鼠脑组织Bcl-2、Bax和Caspase-3的基因表达,Western-Blot法检测各组大鼠脑组织Bcl-2、Bax和Caspase-3的蛋白表达。单纯辐射模型组体重和脑系数均降低,脑组织存在大量凋亡细胞,脑组织Bcl-2的基因表达和蛋白表达均降低,Bax和Caspase-3的基因表达和蛋白表达均升高($p<0.01$)。黄芪汤中、高剂量组脑系数升高,黄芪汤高剂量组体重、脑组织Bcl-2的基因表达和蛋白表达均升高($p<0.05$ 或 $p<0.01$);而黄芪汤中、高剂量组脑组织细胞凋亡率明显降低,Caspase-3的基因表达和蛋白表达均显著降低,高剂量组Bax的基因表达和蛋白表达均显著降低($p<0.01$)。病理组织学检查发现单纯辐射模型组大鼠脑组织稀疏,细胞数量明显减少且间隙增大;黄芪汤高剂量组脑组织稀疏,脑细胞数量减少及间隙增宽等情况较单纯辐射组明显好转,但未完全恢复正常。黄芪汤对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐射所致的Wistar大鼠脑损伤具有较好的保护作用,其抗辐射作用可能主要是通过抑制大鼠脑组织Bax、Caspase-3的表达和促进其脑组织Bcl-2的表达来实现的。

关键词 黄芪汤, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束, 脑损伤, 凋亡蛋白

中图分类号 R818, R811.5

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2020.rj.38.060301

基金资助: 国家自然科学基金项目(81760797)和敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室开放基金项目(DHYX18-15)资助

第一作者: 颜春鲁,男,1979年11月出生,2018年于甘肃中医药大学获博士学位,目前主要研究中西医结合防治慢性病分子机制研究,副教授

通信作者: 安方玉,副教授, E-mail: anfyuwmh@163.com

收稿日期: 初稿 2020-04-16; 修回 2020-07-27

Supported by National Natural Science Foundation of China (81760797) and Open Fund Project of Key Laboratory of Dunhuang Medicine, Ministry of Education (DHYX18-15)

First author: YAN Chunlu (male) was born in November 1979, and obtained her doctoral degree from Gansu University of traditional Chinese medicine in 2018. Now he mainly engages in molecular mechanism study of prevention and treatment of chronic diseases with integrated traditional Chinese and Western Medicine, associate professor

Corresponding author: AN Fangyu, associate professor, E-mail: anfyuwmh@163.com

Received 16 April 2020; accepted 27 July 2020

Protective effects of *Huangqi* decoction on heavy ion radiation ($^{12}\text{C}^{6+}$) injury of the rat brain

YAN Chunlu^{1,2,3} AN Fangyu^{1,2,3} LIU Yongqi^{1,2,3} SU Yun¹ ZHANG Liying¹ Li Jiawei¹ WANG Caixia¹
WANG Tongxiang¹ WANG Guowen¹ LI Menghan¹

¹(Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

²(Provincial-Level Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Diseases and the Study on Prevention and Treatment of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

³(Key Laboratory of Dunhuang Medicine, Ministry of Education, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT To explore the effect of *Huangqi* decoction on Bax, Bcl-2, and Caspase-3 expressions in rat brain tissues irradiated by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam, 50 Wistar rats were randomly divided into five groups—normal control group, radiation alone model group, and high-, medium-, and low-dose *Huangqi* decoction groups. After 7 days of routine feeding, rats in the high-, medium-, and low-dose *Huangqi* decoction groups were administered *Huangqi* decoction [18 g/(kg·d), 9 g/(kg·d), 4.5 g/(kg·d)] by gavage for 2 weeks. The normal control group and radiation alone group were administered the same volume saline by gavage. From the 7th day, the brain of the rats of the radiation alone model group and high-, medium-, and low-dose *Huangqi* decoction groups were radiated once by 4Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ ion. The brain of rats in the normal control group were not radiated. The rats were anesthetized with 10% chloral hydrate (3 mL/kg), and blood was collected from the femoral artery 7 days after irradiation. To calculate the brain coefficient with weighing, pathomorphism changes in the brain tissues were observed using hematoxylin and eosin and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling staining, and the apoptosis percentage of nerve cells was calculated. Bcl-2, Bax, and Caspase-3 gene expressions in the brain tissues were assessed using reverse-transcriptase polymerase chain reaction, and Bcl-2, Bax, and Caspase-3 protein expressions in the brain tissues were analyzed using western blotting. The body weight and brain coefficient significantly decreased; the apoptosis percentage of nerve cells had evidently increased; the gene and protein expressions of Bcl-2 in the brain tissues significantly decreased; the gene and protein expressions of Bax and Caspase-3 in the brain tissues significantly increased in the radiation alone model group ($p<0.01$). The brain coefficient increased in the medium- and high-dose *Huangqi* decoction groups; the body weight and the gene and protein expressions of Bcl-2 increased significantly in the high-dose group ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively). The apoptosis percentage of nerve cells was evidently declined in the medium- and high-dose *Huangqi* decoction groups; the gene and protein expressions of Caspase-3 decreased significantly in the medium- and high-dose *Huangqi* decoction groups; the gene and protein expressions of Bax decreased significantly in the high-dose *Huangqi* decoction group ($p<0.01$). The result of histopathologic examination displayed sparse cerebral tissues in the radiation alone model group, with the decreased amount of cells and enlarged interspace, while sparse cerebral tissues, the decreased amount of cells and enlarged interspace were obviously improved, but it did not return to normal. The protective effect of *Huangqi* decoction against brain injury induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam radiation is achieved mainly by controlling the up-regulation of Bax and Caspase-3 expressions and the down-regulation of Bcl-2 expression.

KEYWORDS *Huangqi* decoction, $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam, Brain injury, Apoptosis protein

CLC R818, R811.5

随着重离子($^{12}\text{C}^{6+}$)放疗技术在临床肿瘤治疗中的广泛应用,其对肿瘤病灶周围正常组织产生的辐射损伤效应也日益受到研究者的关注。这种辐射损伤效应主要表现为DNA损伤、细胞增殖或凋亡、基因表达改变、表观遗传学改变、炎症反应、致瘤性转化,甚至癌症形成等^[1-3]。因而探明

重离子辐射旁效应累及组织细胞、旁器官规律、发生机制及如何防治这种辐射损伤效应等具有重要意义。中药以低毒、高效、多靶点和整体调制等优势成为辐射防护研究的热点^[4-6]。摘自《医学心悟》中的经方黄芪汤,主要由黄芪、熟地、麦冬、人参、枸杞子和五味子组成,全方具有益气

滋阴, 生津养血之效。本实验旨在探讨黄芪汤对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐射所致大鼠脑损伤的保护作用及其机制, 为临床辐射损伤的防护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级Wister大鼠50只, 体质量(180 ± 20) g雌雄各半, 购自甘肃中医药大学科研中心, 实验动物质量合格证号为SCXK(甘)2018-0005, 所有动物自由饮水、摄食1周。本实验经通过甘肃中医药大学科研中心实验动物伦理委员会的严格审查。

1.2 主要试剂

反转录试剂盒和实时荧光定量试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司, 批号分别为: H7806580、H7825350); β -actin、Bcl-2、Bax、Caspase-3等引物基因序列为: β -actin上游引物5'-TGTGACGTTGACATCCGTAAAG-3', Size: 22, 下游引物5'-GGCAGTAATCTCCTTCTGCATC-3', Size: 25, 片段长度105 bp; Bcl-2上游引物5'-CTTCTTCCAGATGGTGAGTGAG-3', Size: 22, 下游引物5'-GTGGATGACTGAGTACCTGAAC-3', size: 22, 片段长度125 bp; Bax上游引物5'-GATGGCCTCCTTTCCTACTTC-3', size: 21, 下游引物5'-CTTCTTCCAGATGGTGAGTGAG-3', size: 22, 片段长度96 bp; Caspase-3上游引物5'-CTTGAAAGCATCCAGCAATAG-3', size: 22, 下游引物5'-ACTCAGCACCTCCATGATTAAG-3', size: 22, 片段长度122 bp(上述引物均由TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司设计并合成); 兔抗大鼠Bcl-2抗体(美国Gene Tex公司, 批号: 42970); 兔抗大鼠Bax抗体(美国Gene Tex公司, 批号: 39988); 兔抗大鼠Caspase-3抗体(美国Gene Tex公司, 批号: 42753); GAPDH抗体(美国Gene Tex公司, 批号: 41323)。

1.3 药物及给药剂量

黄芪汤方中的所有药材均购自甘肃中医药大学附属医院, 中药原药材均由本校甘肃省高校中藏药化学与质量研究室进行质量鉴定。黄芪汤由30 g黄芪、15 g熟地、15 g麦冬、15 g人参、15 g枸

杞子和10 g五味子组成, 人的临床用量为100 g/d, 按照人与大鼠的体表面积换算法得出剂量($100\text{ g}\times 0.018\times 5=9.0\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$)作为中剂量, 则黄芪汤高、中、低剂量分别为18.0 g/(kg·d)、9.0 g/(kg·d)、4.5 g/(kg·d)。

1.4 主要仪器

美国Q5000超微量紫外可见分光光度计(上海在途生物科技有限公司); PCR热循环仪(上海旦鼎国际贸易有限公司); 7500型实施荧光定量PCR扩增仪(上海兴曼生物科技有限公司); Western-blot分析仪(BIO-RAD); BX53型光学显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.5 动物分组及处理

SPF级Wister大鼠自由饮水、摄食1周后, 按随机数字表法分为正常对照组, 单纯辐射模型组, 黄芪汤高、中、低剂量组, 每组10只。正常对照组和单纯辐射模型组给予等量生理盐水灌胃, 黄芪汤高、中、低剂量组给予黄芪汤灌胃(剂量为18.0 g/(kg·d)、9.0 g/(kg·d)、4.5 g/(kg·d)), 连续7 d。第8天腹腔注射10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉各组大鼠, 除正常对照组大鼠外, 其余各组大鼠脑部均给予4 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束单次照射。重离子照射是在中国科学院近代物理研究兰州重离子加速器研究装置的浅层肿瘤治疗终端上所完成的, 照射过程中的束流为 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束, 具体照射方法参考文献^[5], 采用坪区照射, 照射过程中的能量为165 MeV, LET为20 keV/ μm , 吸收剂量率为4 Gy/min, 用空气电离室监测剂量, 照射剂量为4 Gy。辐射后第7天称量各组大鼠的体质量, 股动脉采血, 处死大鼠, 分离血清, 摘取脑组织备用。

1.6 动物体质量及脑系数测定

辐射后第7天称量各组大鼠体质量, 股动脉采血处死各组大鼠, 用生理盐水冲洗脑组织并用吸水纸吸干后称重, 计算大鼠的脑系数。大鼠脑系数(mg/g)=脑质量(mg)/大鼠体质量(g)。

1.7 脑组织病理改变观察

称重后的脑组织用手术刀片做冠状脑切片后

放在4%多聚甲醛固定液中24 h，梯度乙醇脱水后二甲苯处理及常规石蜡包埋，60℃过夜后脱蜡、冲洗、苏木精-伊红(HE)染色，光镜下观察脑组织结构改变。

1.8 脑组织神经细胞凋亡测定

将适量脑组织制作冰冻脑片后用TUNEL试剂盒进行染色，抗荧光猝灭封片液封片后在显微镜下观察切片，随机各选择5个×100视野区域，每个视野区域至少包含30个细胞；使用Image proplus 6.0软件分析对每个视野范围内的总细胞个数和凋亡细胞个数进行计数。细胞凋亡百分率(%)=凋亡细胞数目/总细胞数目×100%。

1.9 脑组织Bcl-2、Bax和Caspase-3基因表达测定

脑组织RNA提取用4℃的Trizol试剂，提取后立即上机测定RNA含量和OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值。RT-PCR法合成模板cDNA后，以cDNA为模板进行PCR扩增反应，具体反应条件：95℃预变性2 min，95℃变性40 s，58℃退火50 s，60℃延伸2 min。共42个循环。实验过程中每个样品至少设置3个复孔，以β-actin基因为内参基因，用2^{-ΔΔC_t}来表示基因相对表达含量。

1.10 脑组织Bcl-2、Bax和Caspase-3蛋白表达测定

脑组织总蛋白的提取用4℃的RPMI裂解液。

BCA法测定各样品的蛋白含量，将所有的样品用裂解液稀释成4 mg/L，取10 μL与4×上样缓冲液混匀，调整蛋白进样浓度为40 μg/10 μL。点样后经过SDS-PAGE电泳、转膜，封闭液封闭等过程，加兔抗大鼠Bcl-2、Bax、Caspase-3和GAPDH等一抗4℃孵育过夜，TBST洗膜3~4次，二抗室温孵育2 h后TBST洗膜3~4次。电化学发光液化学发光显影、定影后用Western-blot分析仪进行图片采集与拍照。蛋白条带灰度值用Image J图像分析软件进行处理与分析，目的蛋白相对表达水平=目的蛋白条带的灰度值/内参蛋白条带的灰度值。

1.11 数据的统计与处理

所有实验数据经过SPSS 22.0软件分析，所得结果用“ $\bar{X} \pm s$ ”表示，组别之间的差异分析方法采用One-Way-Anova， $p < 0.05$ 为有显著性差异， $p < 0.01$ 为有极显著性差异。

2 结果

2.1 脑系数测定

单纯辐射模型组大鼠体质量和脑系数均显著降低($p < 0.01$)；黄芪汤中、高剂量组大鼠脑系数显著升高，并且其高剂量组体重也显著升高($p < 0.05$)，见表1。

表1 各组动物体质量及脑系数检测结果
Table 1 The weight and the cerebral coefficient in each group ($\bar{X} \pm s$, $n=10$)

组别 Group	体质量 / g Body mass	脑系数/(mg·g ⁻¹) Cerebral coefficient
正常对照组 Normal control group	235.09±19.91 ²	7.50±0.77 ²
单纯辐射模型组 Radiation alone model group	174.37±17.02	4.84±0.48
黄芪汤高剂量组 Huangqi decoction high-dose group	224.34±21.73 ¹	6.82±0.38 ¹
黄芪汤中剂量组 Huangqi decoction middle-dose group	198.44±15.18	6.61±0.33 ¹
黄芪汤低剂量组 Huangqi decoction low-dose group	187.36±20.99	5.98±0.43

注：¹ $p < 0.05$ ，² $p < 0.01$ ，与单纯辐射模型组比较。

Note: ¹ $p < 0.05$ ，² $p < 0.01$ ，compared with the radiation alone model group.

2.2 观察脑组织病理形态学改变

正常对照组大鼠脑组织神经细胞排列整齐、规则，形态结构正常；单纯辐射模型组大鼠脑组织排列疏松，神经细胞数量减少，神经细胞核固缩、深染，血管周围间隙增宽，神经细胞周围间

隙增宽；黄芪汤低、中剂量组脑组织排列疏松，神经细胞数量减少，血管周围间隙增宽；黄芪汤高剂量组脑组织排列疏松及神经细胞数量减少等情况较单纯辐射组明显好转，但未完全恢复正常，见图1。

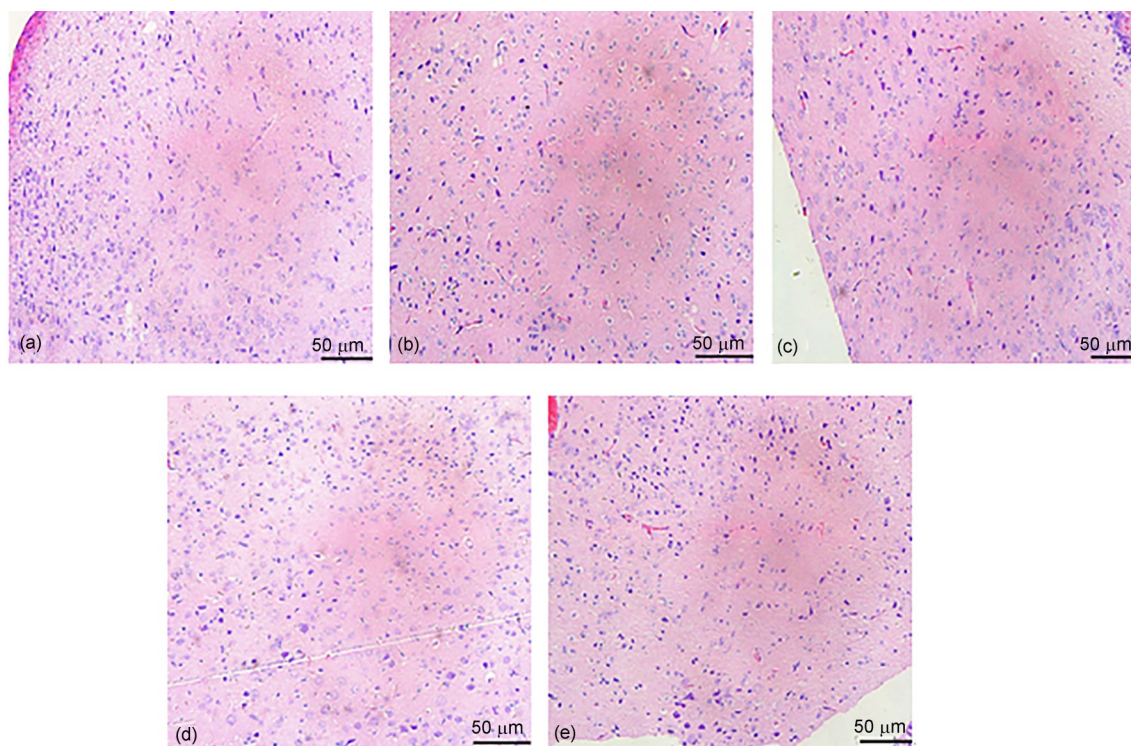


图1 各组动物脑组织病理形态学改变:(a)正常对照组;(b)单纯辐射模型组;(c)黄芪汤高剂量组;(d)黄芪汤中剂量组;(e)黄芪汤低剂量组

Fig.1 Changes of pathomorphological in brain tissue in each group: (a) normal control group; (b) radiation alone model group; (c) *Huangqi* decoction high-dose group; (d) *Huangqi* decoction middle-dose group; (e) *Huangqi* decoction low-dose group

2.3 脑组织神经细胞凋亡率测定

单纯辐射模型组和黄芪汤低剂量组大鼠脑组织的神经细胞发生明显凋亡现象,黄芪汤中、高剂量组大鼠脑组织的神经细胞凋亡现象明显减轻,

但未恢复到正常组水平。单纯辐射模型组大鼠脑组织的神经细胞存在大量凋亡细胞 ($p<0.01$);黄芪汤中、高剂量组的脑组织细胞凋亡百分率显著降低 ($p<0.01$)。见图2和图3。

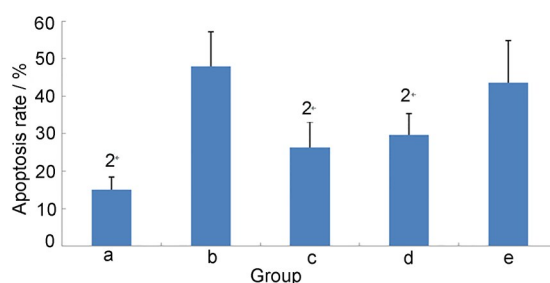


图2 各组动物脑组织神经细胞凋亡率测定:(a)正常对照组;(b)单纯辐射模型组;(c)黄芪汤高剂量组;(d)黄芪汤中剂量组;(e)黄芪汤低剂量组;² $p<0.01$,与单纯辐射模型组比较

Fig.2 Comparison of neuron apoptosis of brain tissue in each group: (a) normal control group; (b) radiation alone model group; (c) *Huangqi* decoction high-dose group; (d) *Huangqi* decoction middle-dose group; (e) *Huangqi* decoction low-dose group; ² $p<0.01$, compared with the radiation alone model group

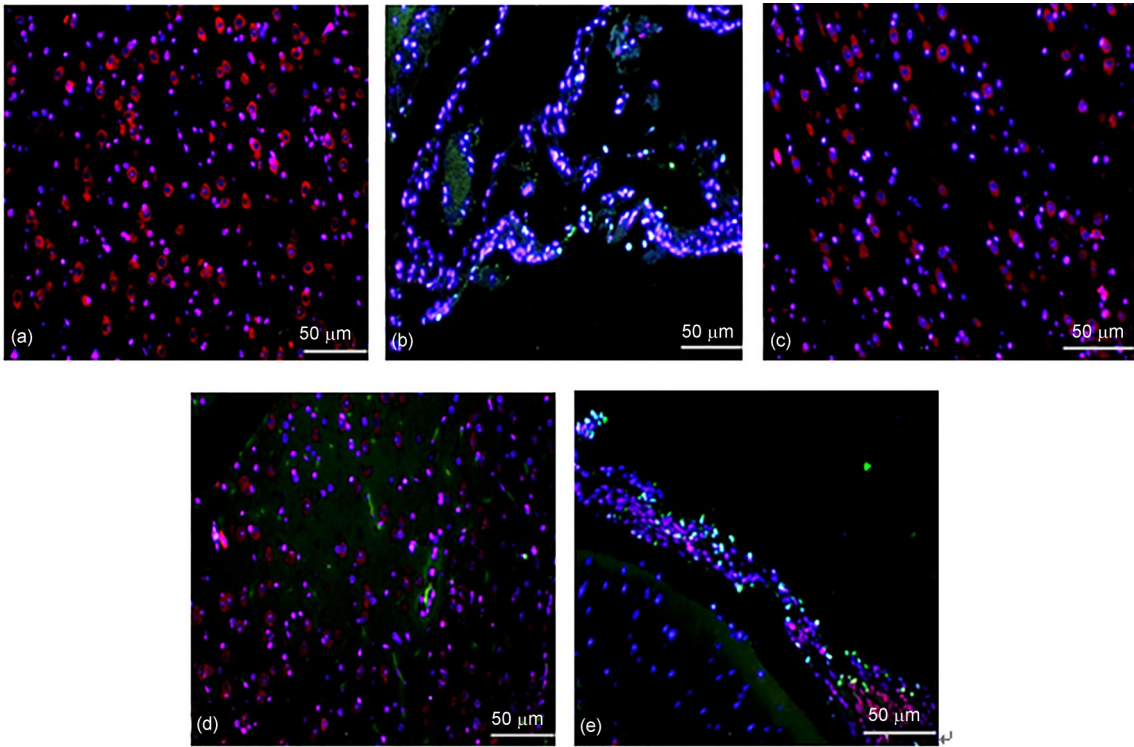


图3 各组大鼠脑组织神经细胞凋亡改变: (a)正常对照组; (b)单纯辐射模型组; (c)黄芪汤高剂量组; (d)黄芪汤中剂量组; (e)黄芪汤低剂量组

Fig. 3 Section results of brain tissue in each group by TUNEL stain: (a) normal control group; (b) radiation alone model group; (c) *huangqi* decoction high-dose group; (d) *Huangqi* decoction middle-dose group; (e) *Huangqi* decoction low-dose group

2.4 脑组织Bcl-2、Bax和Caspase-3基因表达测定

单纯辐射模型组大鼠脑组织Bcl-2基因表达显著降低, Bax和Caspase-3基因表达显著升高 ($p<$

0.01); 黄芪汤中、高剂量组大鼠脑组织Caspase-3基因表达显著降低, 黄芪汤高剂量组大鼠脑组织Bax基因表达也显著降低, Bcl-2基因表达显著升高 ($p<0.01$)。见表2。

表2 各组动物脑组织Bcl-2、Bax和Caspase-3基因表达的检测结果
Table 2 Gene expressions of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in brain tissues in each group ($\bar{X}\pm s, n=10$)

组别 Group	Bcl-2 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	Bax ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	Caspase-3 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)
正常对照组 Normal control group	2.67±0.41 ²	0.35±0.06 ²	0.27±0.09 ²
单纯辐射模型组 Radiation alone model group	1.05±0.07	1.08±0.02	1.03±0.05
黄芪汤高剂量组 <i>Huangqi</i> decoction high-dose group	2.03±0.15 ²	0.44±0.07 ²	0.44±0.05 ²
黄芪汤中剂量组 <i>Huangqi</i> decoction middle-dose group	1.10±0.17	1.05±0.20	0.46±0.11 ²
黄芪汤低剂量组 <i>Huangqi</i> decoction low-dose group	1.04±0.19	1.27±0.15	1.12±0.17

注: ² $p<0.01$, 与单纯辐射模型组比较。
Note: ² $p<0.01$, compared with the radiation alone model group.

2.5 脑组织Bcl-2、Bax和Caspase-3蛋白表达测定

单纯辐射模型组大鼠脑组织Bcl-2蛋白量表达显著降低, Bax和Caspase-3蛋白表达量显著升高

($p<0.01$); 黄芪汤中、高剂量组大鼠脑组织Caspase-3蛋白表达量显著降低, 黄芪汤高剂量组大鼠脑组织Bax蛋白表达量也显著降低, Bcl-2蛋白表达量显著升高 ($p<0.01$)。见表3和图4。

表3 各组动物脑组织 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白灰度值的检测结果
Table 3 Protein expressions of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in brain tissues in each group ($\bar{X} \pm s, n=10$)

组别 Group	Bcl-2 (OD)	Bax (OD)	Caspase-3 (OD)
正常对照组 Normal control group	0.87±0.09 ²	0.13±0.01 ²	0.32±0.04 ²
单纯辐射模型组 Radiation alone model group	0.35±0.05	0.56±0.04	0.69±0.09
黄芪汤高剂量组 <i>Huangqi</i> decoction high-dose group	0.45±0.03 ¹	0.21±0.02 ²	0.40±0.08 ²
黄芪汤中剂量组 <i>Huangqi</i> decoction middle-dose group	0.38±0.03	0.54±0.08	0.47±0.05 ²
黄芪汤低剂量组 <i>Huangqi</i> decoction low-dose group	0.34±0.04	0.63±0.10	0.74±0.02

注: ¹ $p<0.05$, ² $p<0.01$, 与单纯辐射模型组比较。

Note: ¹ $p<0.05$, ² $p<0.01$, compared with the radiation alone model group.

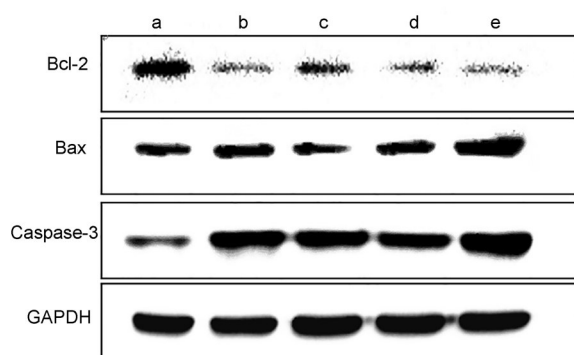


图4 各组动物脑组织 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达:
(a)正常对照组;(b)单纯辐射模型组;(c)黄芪汤高剂量组;
(d)黄芪汤中剂量组;(e)黄芪汤低剂量组

Fig.4 Protein expressions of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in brain tissue in each group: (a) normal control group; (b) radiation alone model group; (c) *Huangqi* decoction high-dose group; (d) *Huangqi* decoction middle-dose group; (e) *Huangqi* decoction low-dose group

3 讨论

重离子辐射发病过程具有急、猛、快、多、广等特点,继而引起机体各脏腑功能紊乱、气血阴阳失调等恶候,兼挟火热痰瘀、迁延难愈,其引发的病理演变过程符合毒邪致病的特点,因此,中医学将其归属于“毒邪”的范畴^[7-9]。机体受辐射后不仅可耗损人体正气,还使体内火热毒邪亢盛,严重耗损津液。因此,中医认为火、瘀、虚是辐射损伤的基本病机^[10]。根据辐射损伤的基本病机,中医药防护辐射损伤以培元固本、益气滋阴、活血散瘀为基本治则。黄芪汤方中,熟地、枸杞子,滋阴补肾;五味子,益气生津,滋肾养阴;麦冬,润肺养阴;黄芪,补中益气;人参大补元气,补脾益肺,生津养血。诸药合奏发挥益气滋阴,生津养血之功效,使得“正气存内,邪不可干”,起到防护辐射损伤的作用。

研究表明,辐射损伤最早期的生物学效应是细胞凋亡^[11]。Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 是调控细胞

凋亡的重要蛋白。Bcl-2 是属于 Bcl-2 家族的抗凋亡蛋白, Bax 是属于 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白, Caspase-3 是 Bcl-2 家族通过线粒体途径调控细胞凋亡的下游促凋亡蛋白^[12-14]。在线粒体凋亡调控通路中,当 Bax 形成 Bax-Bax 同源二聚体时会促进细胞凋亡,当 Bax 形成 Bax-Bcl-2 异源二聚体时会抑制细胞凋亡^[15]。重离子辐射会激活机体受损组织的 Bax 过度表达,过度表达的 Bax 可通过线粒体途径激活下游的 Caspase-3,激发 Caspase 发生级联反应,促进受损组织的细胞凋亡^[16]。但是,重离子辐射同时又会抑制机体受损组织 Bcl-2 的过度表达,使 Bax 无法与 Bcl-2 形成异源二聚体,从而无法抑制 Bax 蛋白对线粒体下游 Caspase-3 的激活,进一步促进了 Caspase 的级联效应,促进受损伤组织的细胞凋亡^[17-18]。

本研究结果显示,4 Gy ¹²C⁶⁺离子束照射大鼠脑组织后,单纯辐射模型组大鼠体质量及脑系数在照射后第7天均显著降低,并且其脑组织的 Bcl-2 的基因表达和蛋白表达也在照射后第7天显著降低,而脑组织的神经细胞凋亡率明显增加, Bax 和 Caspase-3 的基因表达和蛋白表达则在照射后第7天显著升高。脑组织病理形态显示,单纯辐射模型组大鼠脑组织排列疏松,神经细胞数量减少,神经细胞核固缩、深染,血管周围间隙增宽,神经细胞周围间隙增宽。说明 ¹²C⁶⁺离子束辐照后,凋亡相关蛋白 Bax 过度表达和 Bcl-2 过度抑制会促进线粒体凋亡通路激活,激活 Caspase 的级联反应,从而促进脑组织的神经细胞发生凋亡,进一步加重脑组织的病理形态损伤(见图5)。

而在 ¹²C⁶⁺离子束照射大鼠脑组织之前预先给予黄芪汤干预1周,结果发现,黄芪汤中、高剂量组的脑系数显著升高,而脑组织神经细胞凋亡率明显降低, Caspase-3 的基因表达和蛋白表达均显著降低;黄芪汤高剂量组体质量及脑组织 Bcl-2 的基

因表达和蛋白表达均升高，而其Bax的基因表达和蛋白表达均显著降低。脑组织病理结果显示，黄芪汤高剂量组脑组织排列疏松及神经细胞数量减少等情况较单纯辐射组明显好转，但未完全恢复正常。说明黄芪汤的干预机制可能是通过抑制Bax

过度表达和促进Bcl-2过度表达来抑制线粒体凋亡通路激活，抑制Caspase的级联反应，从而抑制受 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射脑组织的神经细胞发生凋亡，进而缓解脑组织的病理形态损伤，发挥抗辐射作用（见图6）。

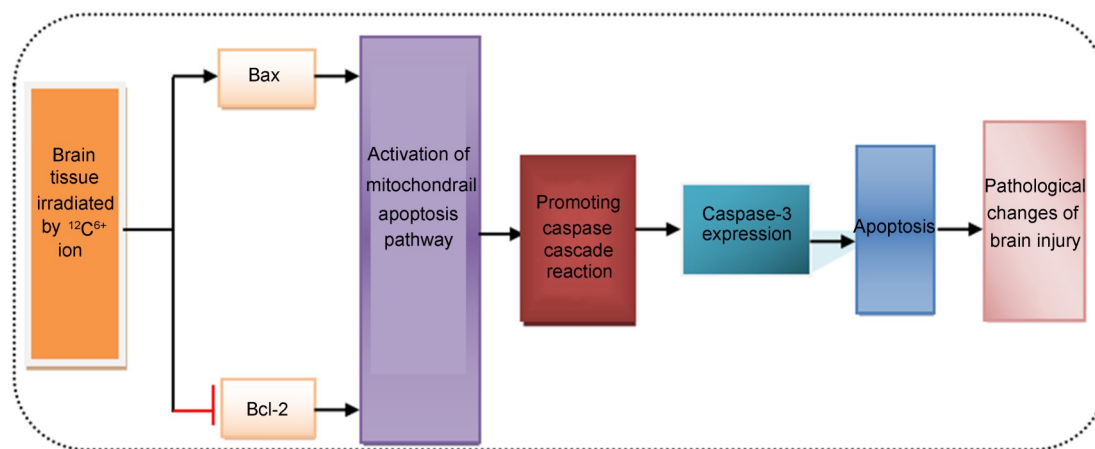


图5 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射脑组织的发病机制
Fig.5 Pathogenesis of brain tissue irradiated by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam

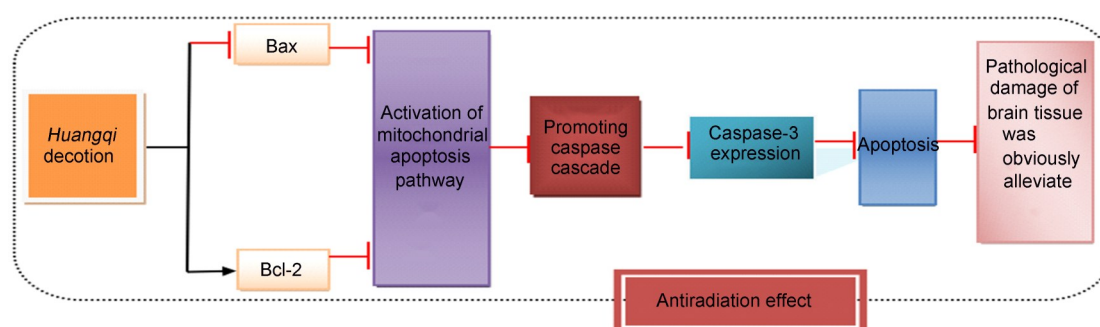


图6 黄芪汤对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射大鼠脑组织的抗辐射机制
Fig.6 Resistant radiation mechanism of *Huangqi* decoction on brain tissue of rats irradiated by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam

综上所述，黄芪汤中的黄芪、熟地、麦冬、人参、枸杞子和五味子通过益气、生津、养血和滋阴等发挥抗辐射作用，具体机制可能是通过抑制线粒体凋亡通路来实现的。

参考文献

- 1 Mukherjee S, Chakraborty A. Radiation-induced bystander phenomenon: insight and implications in radiotherapy[J]. International Journal of Radiation Biology, 2019, 95(3): 243-263. DOI: 10.1080 / 09553002.2019.1547440.
- 2 Tong L P, Yu K N, Bao L Z, et al. Low concentration of exogenous carbon monoxide protects mammalian cells against proliferation induced by radiation-induced bystander effect[J]. Mutation Research/Fundamental and

Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2014, 759: 9-15. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2013.11.006.

- 3 Najafi M, Fardid R, Hadadi G, et al. The mechanisms of radiation-induced bystander effect[J]. Journal of Biomedical Physics & Engineering, 2014, 4(4): 163-172.
- 4 王毓国, 谭洪玲, 冯剑, 等. 基于Bax/Bcl-2探讨凉血固元汤对放射性脾损伤的作用[J]. 军事医学, 2019, 43(5): 364-368. DOI: 10.7644/j.issn.1674-9960.2019.05.010. WANG Yuguo, TAN Hongling, FENG Jian, et al. Liangxue Guyuan decoction on spleen injury in rats induced by ^{60}Co -gamma radiation based on Bax/Bcl-2[J]. Military Medical Sciences, 2019, 43(5): 364-368. DOI: 10.7644/j.issn.1674-9960.2019.05.010.
- 5 张朝宁, 李金田, 刘永琦, 等. 归芪益元膏对重离子辐射旁效应损伤大鼠肺肾组织caspase-3及caspase-9表达的影响[J]. 解放军医学杂志, 2018, 43(4): 278-282. DOI:

- 10.11855/j.issn.0577-7402.2018.04.02.
- ZHANG Chaoning, LI Jintian, LIU Yongqi, *et al.* Influence of *Guiqiyiyuan* Ointment on the expression of caspase-3 and caspase-9 in rat lung tissues injured by heavy ion radiation-induced bystander effect[J]. Medical Journal of Chinese PLA, 2018, **43**(4): 278-282. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2018.04.02.
- 6 卢志伟, 许小敏, 王磊, 等. 当归及当归多糖对辐射所致大鼠肝肾损伤的防护作用[J]. 解放军医学杂志, 2017, **42**(9): 815-819. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2017.09.12.
 - LU Zhiwei, XU Xiaomin, WANG Lei, *et al.* Protective effects of *Angelica sinensis* and *Angelica sinensis* polysaccharides against liver and kidney injury induced by irradiation in rats[J]. Medical Journal of Chinese PLA, 2017, **42**(9): 815-819. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2017.09.12.
 - 7 高明泽, 徐文慧, 王天琪, 等. 急性辐射损伤的中医病因学探讨[J]. 中医杂志, 2016, **57**(6): 454-457. DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.06.002.
 - GAO Mingze, XU Wenhui, WANG Tianqi, *et al.* Exploration of Chinese medicine etiology of acute radiation injury[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, **57**(6): 454-457. DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.06.002.
 - 8 王磊, 王安, 胡素敏. 试论急性辐射损伤的中医学病因: 电离毒[J]. 北京中医药大学学报, 2017, **40**(1): 27-30. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2017.01.006.
 - WANG Lei, WANG An, HU Sumin. Exploration of Chinese medicine etiology of acute radiation injury: ionization toxin[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2017, **40**(1): 27-30. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2017.01.006.
 - 9 第五永长, 李妮娇. 论中医“毒”概念的演变及其阴阳属性[J]. 中华中医药杂志, 2010, **25**(5): 654-657.
 - DIWU Yongchang, LI Nijiao. Concept evolution of du (toxicity) in TCM and its yin-yang nature[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2010, **25**(5): 654-657.
 - 10 张蓉, 骆斌, 李峰, 等. 从毒邪致病论电离辐射损伤的中医病机[J]. 北京中医药大学学报, 2007, **30**(9): 595-596. DOI: 10.3321/j.issn:1006-2157.2007.09.006.
 - ZHANG Rong, LUO Bin, LI Feng, *et al.* Discussion on Chinese medicine pathogenesis of radiation injury from the point of view of toxin pathogen causing disease[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2007, **30**(9): 595-596. DOI: 10.3321/j.issn:1006-2157.2007.09.006.
 - 11 Furlong H, Mothersill C, Lyng F M, *et al.* Apoptosis is signalled early by low doses of ionising radiation in a radiation-induced bystander effect[J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2013, **741/742**: 35-43. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2013.02.001.
 - 12 Gross A. BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2016, **1857**(8): 1243-1246. DOI: 10.1016/j.bbabo.2016.01.017.
 - 13 Ola M S, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2011, **351**(1/2): 41-58. DOI: 10.1007/s11010-010-0709-x.
 - 14 石文英, 严洁, 常小荣, 等. 基于心脑相关理论探讨电针心经、心包经穴对大鼠中动脉梗死大鼠心、脑细胞凋亡的影响[J]. 针刺研究, 2019, **44**(2): 107-112. DOI: 10.13702/j.1000-0607.170332.
 - SHI Wenying, YAN Jie, CHANG Xiaorong, *et al.* Observation of electroacupuncture intervention on cell apoptosis and Bax and Bcl-2 expression in cerebral and myocardial tissues in cerebral ischemia rats based on “heart-brain correlation theory[J]. Acupuncture Research, 2019, **44**(2): 107-112. DOI: 10.13702/j.1000-0607.170332.
 - 15 王晓玲, 赵舒武, 王媛媛, 等. 当归补血汤对骨髓辐射损伤过程中NF- κ B及bax、bcl-2表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, **35**(11): 2887-2889. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2015.11.003.
 - WANG Xiaoling, ZHAO Shuwu, WANG Yuanyuan, *et al.* Effect of *Danggui* buxue decoction on NF-kappa B and its downstream molecule bax and bcl-2 expressions of mouse bone marrow in the process of radiation damage [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2015, **35** (11): 2887-2890. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2015.11.003.
 - 16 张朝宁, 李金田, 刘永琦, 等. 归芪益元膏对重离子辐射诱发体内旁效应中Cyt-C、Bax及Bcl-2表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, **23**(14): 121-127. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2017140121.
 - ZHANG Chaoning, LI Jintian, LIU Yongqi, *et al.* Influence of *Guiqi Yiyuangao* on expression of cytochrome-C and Bax, Bcl-2 during damage caused by heavy ion radiation induced by stander effect *in vivo*[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2017, **23**(14): 121-127. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2017140121.
 - 17 王毓国, 冯剑, 窦永起. 基于Bax、Bcl-2、与Caspase-3探

- 讨凉血固元汤对大鼠急性胃辐射伤的作用机制[J]. 环球中医药, 2019, **12**(11): 1625-1630. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1749.2019.11.002.
- WANG Yuguo, FENG Jian, DOU Yongqi. Mechanism of Liangxue Guyuan decoction on acute gastric radiation injury in rats based on Bax, Bcl-2 and Caspase-3[J]. Global Traditional Chinese Medicine, 2019, **12**(11): 1625-1630. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1749.2019.11.002.
- 18 朱贝贝, 畅艳娜, 李应东, 等. 当归红芪多糖对辐射损伤心肌细胞线粒体凋亡通路的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2015, **38**(12): 811-816. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2015.12.004.
- ZHU Beibei, CHANG Yanna, LI Yingdong, *et al.* Effects of *polysaccharide* in angelica and hedysari combination on mitochondrial apoptosis pathway in radiation-injured myocardial cells[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2015, **38**(12): 811-816. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2015.12.004.