

槐角染料木黄酮对放射性肠损伤的保护作用

逢志骏^{1,2} 王昭维¹ 徐传洋¹ 张旭涛¹ 何磊¹ 李萌^{1,3} 张英起¹ 李正民³

¹(空军军医大学药理学系生物制药学教研室 西安 710032)

²(海军第九七一医院检验科 青岛 266000)

³(空军军医大学唐都医院麻醉科 西安 710038)

摘要 槐角染料木黄酮处理大鼠小肠上皮细胞(IEC-6) 24 h后, 接受X射线照射至吸收剂量6 Gy, 48 h后采用Cell counting kit-8试剂盒和流式细胞术检测细胞增殖和凋亡, 72 h后采用彗星电泳实验检测细胞DNA损伤程度。C57BL/6J雌性小鼠按200 mg/kg剂量颈部皮下注射槐角染料木黄酮, 24 h后接受X射线全身照射至剂量7.5 Gy。8 d后HE染色观察小肠病理形态改变, 采用免疫组化法检测小肠干扰素 γ (IFN- γ)表达情况, 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法检测小肠细胞凋亡情况。结果显示, 低剂量槐角染料木黄酮能促进IEC-6细胞增殖, 提高辐照后细胞存活率, 高剂量则抑制细胞增殖, 与辐射对照组相比, 5 μ mol/L槐角染料木黄酮预处理能有效提高IEC-6细胞存活率, 减少辐照诱发的细胞凋亡, 并显著降低彗尾DNA含量和尾距; 提前给予槐角染料木黄酮的小鼠与辐射对照组的小鼠相比, 小肠绒毛脱落减少, 肠道结构破坏得到改善, 小肠组织中IFN- γ 表达降低, 细胞凋亡程度得到缓解。结果提示, 槐角染料木黄酮对放射性导致的肠损伤具有明显的保护作用。

关键词 辐射损伤, 染料木黄酮, 辐射防护剂, 槐角

中图分类号 Q691, TL71

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2019.rj.37.010303

Protective effect of fructus sophorae genistein on radiation-induced intestinal injury

PANG Zhijun^{1,2} WANG Zhaowei¹ XU Chuanyang¹ ZHANG Xutao¹ HE Lei¹

LI Meng^{1,3} ZHANG Yingqi¹ LI Zhengmin³

¹(Department of Biopharmaceutics, School of Pharmacy, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

²(Clinical Laboratory, 971 Hospital of Navy, Qingdao 266000, China)

³(Department of Anesthesiology, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

ABSTRACT This study investigated the protective effect of genistein extracted from fructus sophorae (FSGen) on intestinal damage caused by radiation. After FSGen treatment of rat intestinal epithelial cells (IEC-6) for 24 h, the

基金资助: 国家自然科学基金项目(81673020)资助

第一作者: 逢志骏,男,1990年5月出生,2012年6月于第二军医大学获理学学士学位,现为第四军医大学药理学系硕士研究生,研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail: bigpie@yeah.net

通信作者: 李正民,主治医师, E-mail: lizhengminmazui@163.com

收稿日期: 初稿 2018-10-15; 修回 2018-11-02

Supported by National Natural Science Foundation of China (81673020)

First author: PANG Zhijun (male) was born in May 1990, and obtained his bachelor's degree from The Second Military Medical University in June 2012. Now he is a master's candidate in the Department of Pharmacy of The Fourth Military Medical University, majoring in biochemistry and molecular biology. E-mail: bigpie@yeah.net

Corresponding author: LI Zhengmin, attending doctor, E-mail: lizhengminmazui@163.com

Received 15 October 2018; accepted 02 November 2018

cells were irradiated with X-rays at an absorbed dose of 6 Gy. Cell counting kit-8 and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis 48 h after irradiation, and the extent of DNA damage was detected by comet assay 72 h later. C57BL/6J female mice were subcutaneously injected with FSgen at a dose of 200 mg/kg. After 24 h, they received whole-body irradiation with X-rays at a dose of 7.5 Gy. After 8 d, pathological changes in the small intestine were observed by HE staining. The expression of intestinal IFN- γ was detected by immunohistochemistry, and the apoptosis of small intestinal cells was detected by TdT-mediated dUTP nick-end labeling. Results showed that a low dose of FSgen could promote the proliferation of IEC-6 cells and improve survival rate after irradiation, whereas a high dose can inhibit cell proliferation. Compared with the radiation control group, 5 μ mol/L FSgen pretreatment could effectively improve the survival rate of IEC-6 cells, reduce the apoptosis induced by irradiation, and significantly reduce the comet tail DNA content and tail moment. Compared with the radiation control group, the mice administered with FSgen in advance had less villus shedding, better intestinal structure damage, lower expression of IFN- γ in small intestine tissue, and less apoptosis. The results reveal that FSgen has a significant protective effect on radiation-induced intestinal injury.

KEYWORDS Radiation injury, Genistein, Radiation-protective agents, Fructus sophorae

CLC Q691, TL71

放射性物质通过产生大量亚原子微粒 (α 粒子、 β 粒子、质子和中子) 和高能量电磁波 (X 射线和 γ 射线) 直接穿透机体, 引发 DNA、脂质和蛋白质等生物大分子电离, 导致细胞死亡, 还能够在体内通过大量活性氧自由基的产生导致生物大分子氧化、细胞死亡和凋亡^[1-2]。人体中处于快速增殖的细胞由于 DNA 不稳定等原因对于放射性更为敏感, 这正是肿瘤放射治疗的理论基础之一^[3]。除了肿瘤细胞, 人体的肠上皮也是处于不断更新中的组织, 因此, 对于辐射也较为敏感^[4]。盆腔、腹腔的多种肿瘤在进行放射治疗时, 肠上皮损伤是最常见的并发症, 被称为“放射性肠病”或“放射性肠损伤”^[5]。研究放射性肠损伤的保护药物不仅对于放疗患者意义重大, 而且对生活中放射性物质的防护也很重要。

染料木黄酮, 化学名 4', 5, 7-三羟基黄酮, 又称金雀异黄酮, 是一种植物雌激素类化合物, 具有很强的抗氧化性和蛋白酪氨酸酶抑制活性, 可通过清除自由基、刺激造血干细胞增殖、DNA 损伤修复等发挥抗放射作用^[6]。目前, 作为民用和军事特殊条件下的放射损伤保护药品, 染料木黄酮被认为成药性最好。现阶段美国对化学合成的染料木黄酮在放疗保护以及军事放射损伤防护方面的研究均已进入临床试验^[7], 而我国在染料木黄酮放射损伤防护研究方面还相对滞后。

前期, 课题组结合我国国情及地域特色, 建立了从槐角中提取染料木黄酮的制备工艺, 获得纯度达到药用级的染料木黄酮单体^[8]。槐角是我

国北方最常见树种中国槐的成熟干燥果实, 以槐角提取染料木黄酮相对于国外研究的化学合成来说安全性更高, 价格更低, 更加符合我国国情。本研究旨在通过细胞实验和动物实验, 客观评价槐角染料木黄酮对放射性肠损伤的保护作用, 为将本产品开发成为放射性肠损伤保护药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 主要仪器和试剂

槐角染料木黄酮 (以下简称 FSgen, 由本实验室制备); 杜氏改良 Eagle 培养基 (DMEM, Gibco 公司); 胎牛血清 (ExCell 公司); 增殖及细胞毒性检测试剂盒 (Cell Counting Kit-8, CCK-8, Biosharp 公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (BD 公司); 正常熔点琼脂糖 (NMA, TAKARA 公司); 低熔点琼脂糖 (LMA, TAKARA 公司)。流式细胞仪 (型号 COULTER-XL, BECKMAN 公司); X 射线生物辐照仪 (型号 RS2000, RAD SOURCE 公司)。

1.1.2 细胞与动物

大鼠小肠引窝上皮细胞 IEC-6 购自上海中乔新舟生物科技有限公司, 置于 5% CO₂、37 °C 的培养箱中贴壁培养。培养基为 DMEM 完全培养基, 含 5% 胎牛血清、1% 青链霉素和 100 μ g/mL 胰岛素。传代时间为 3~4 d, 取对数生长期细胞进行实验。

健康清洁级 C57BL/6 雌性小鼠, 6~8 周龄, 体重 (20 ± 2) g, 购于空军军医大学实验动物中心, 实验期间在实验室动物房中统一喂养。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖实验

将 FSGen 提前溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 超声震荡 20 s, 配成浓度为 10^5 $\mu\text{mol/L}$ 的母液并置于 -20°C 保存, 使用时与新鲜培养基配成需要浓度。把生长至对数期的 IEC-6 细胞按 2 000 个/孔的数量接种至 96 孔板, 每组 5 个副孔, 置于原培养条件下贴壁过夜。照射前 24 h, 按照每孔 100 μL 将原培养基换成分别含 0、1、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 FSGen 新鲜培养基。待照射组细胞给予 X 射线照射至 6.0 Gy (444.4 cGy/min) 后, 所有细胞换新鲜培养基继续培养 48 h, 而后按 CCK-8 试剂盒说明书操作。酶标仪 450 nm 波长下检测每孔吸光度。

1.2.2 实验分组与流式细胞术检测

实验分为 3 组, 分别为正常对照组、单独照射组与药物处理组。取对数生长期的 IEC-6 细胞接种于 6 cm 培养皿中贴壁过夜, 每组 3 个副皿。照射前药物处理组用含 FSGen 的培养基孵育 24 h, 而后单独照射组与药物处理组均接受 X 射线照射至剂量 6 Gy。继续培养 48 h 后, 按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作, 经流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.3 彗星实验

按 1.2.2 节对细胞进行分组、加药孵育、照射, 继续培养 72 h 后, 3 组细胞样本用胰酶消化, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次。45 $^\circ\text{C}$ 的 80 mL, 1% NMA 制作第一层胶, 取 10 μL 含 1 000 个细胞的 PBS 和 75 μL , 0.8% LMA 混匀滴到第一层胶上, 最后在凝固的 LMA 层上滴加 85 μL 预热 37 $^\circ\text{C}$ 的 0.5% LMA。浸入裂解液中 4 $^\circ\text{C}$ 裂解 1 h。PBS 冲洗 2 次, 碱解旋 20 min, 在 25 V、300 mA 条件下电泳 20 min。4 $^\circ\text{C}$ 中和 15 min, 滴加 50 μL 浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭 (EB) 避光染色 20 min。荧光显微镜下观察并对电泳图谱拍照, 利用 Comet Assay Software 图像分析软件分析计算彗星尾部 DNA 含量 (Tail DNA, %) 和尾矩 (Tail moment, %)。

1.2.4 动物分组、给药、照射及标本采集

将 30 只小鼠按 10 只/组随机分为 3 组。其中单

独照射组在小鼠接受照射 24 h 前颈后部皮下注射 0.1 mL 聚乙二醇 400 (PEG400); 参照文献 [9], 药物处理组在照射 24 h 前以 PEG400 为溶媒, 按 200 mg/kg 的剂量注射 FSGen 0.1 mL; 而后把小鼠置于有机玻璃盒中接受 X 射线照射至剂量 7.5 Gy, 剂量率为 222.2 Gy/min。正常对照组小鼠只注射 0.1 mL 的 PEG400。照射后第 8 天, 颈椎脱臼处死小鼠, 十二指肠下端 4~5 cm 处取长约 1 cm 小肠标本, PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 常规石蜡包埋。

1.2.5 HE 染色

石蜡包埋标本切成 4 μm 薄片, 脱蜡并常规苏木精-伊红染色, 脱水后封片, 光镜下观察小肠横切面形态结构并扫描图像。

1.2.6 免疫组化

小肠切片脱蜡并用 PBS 冲洗, 微波抗原修复, 一抗室温孵育 2 h, 二抗室温孵育 30 min, DAB 显色后 PBS 冲洗, 显微镜观察并拍摄, 采用 Image Pro Plus 对捕捉的图像进行处理并计算表达区域 IOD (累积光密度) 值。

1.2.7 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (TUNEL) 检测

按 DAPI/TUNEL 双染试剂盒说明书进行。

1.2.8 数据处理

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 统计学软件进行分析, 组间两两比较采用 *t* 检验, $p < 0.05$ 认为差异有统计学意义, $p < 0.01$ 时认为统计学差异非常显著。

2 结果

2.1 FSGen 对 IEC-6 细胞增殖的影响

IEC-6 细胞在 FSGen 孵育 24 h 后, 接受或者不接受 X 射线照射, 不接受照射为假照射组。未接受 X 射线照射时, 与无处理组细胞相比, 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ FSGen 显著刺激 IEC-6 细胞增殖 ($p < 0.01$), 其中浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时促增殖效果最为明显; 而 20 $\mu\text{mol/L}$ FSGen 处理的细胞增殖却减少 (图 1 左)。当细胞接受照射后, 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ FSGen 处理的细胞存活率明显大于无 FSGen 处理的细胞 ($p < 0.05$), 显示了 FSGen 良好的保护效果, 同时发现 5 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度保护效果最佳; 浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 保护效果则不明显 (图 1 右)。以上

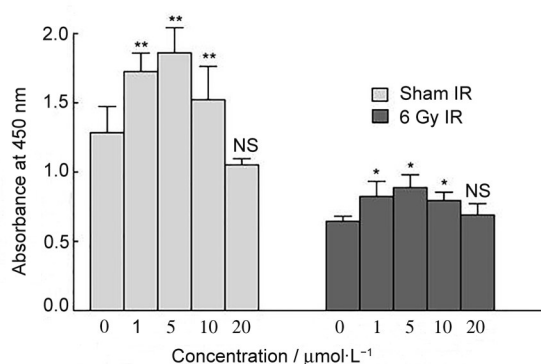


图1 FSGen对IEC-6细胞增殖的影响
(* $p<0.05$, ** $p<0.01$, 分别与对应无FSGen处理组相比)

Fig.1 Effects of FSGen on the proliferation of IEC-6 cells
(* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. corresponding groups without FSGen treatment separately)

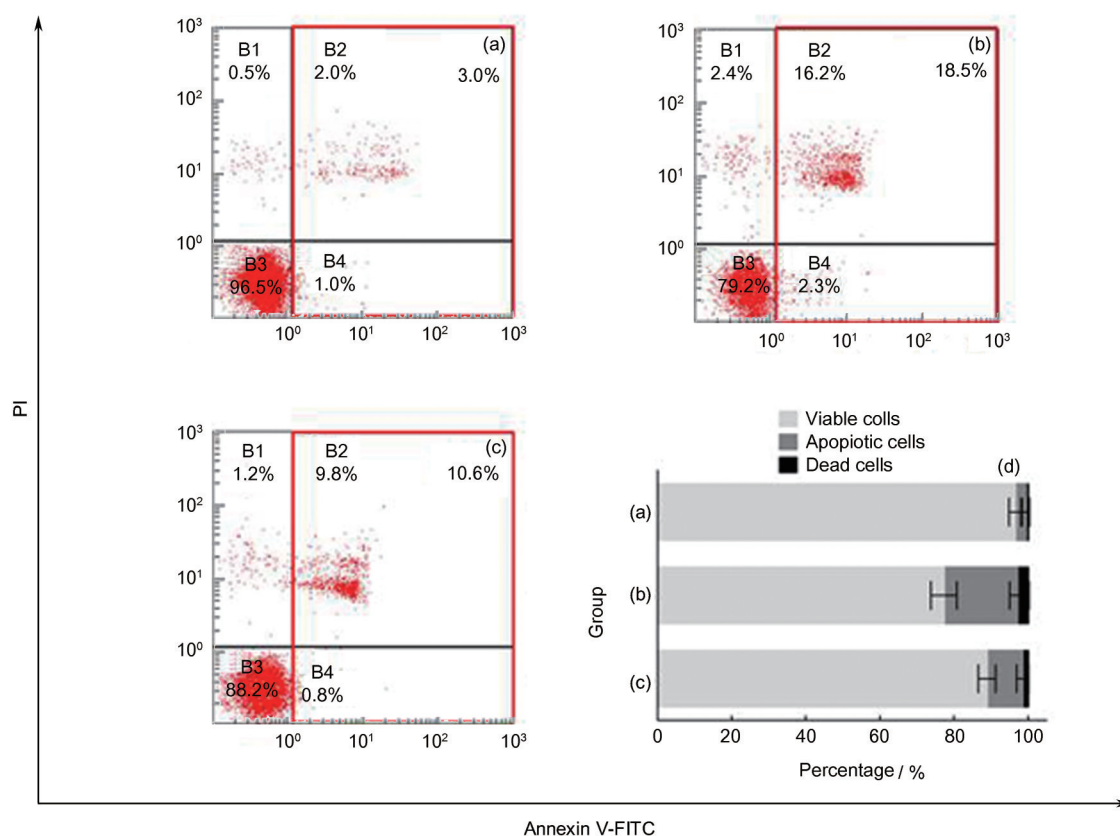


图2 FSGen对辐射诱导IEC-6细胞凋亡的影响:(a)正常对照组;(b)单独照射组;(c)FSGen处理组;
(d)各组凋亡细胞与死亡细胞比例统计结果

Fig.2 Effects of FSGen on radiation-induced apoptosis of IEC-6 cells: (a) normal control group; (b) irradiation alone group; (c) FSGen treatment group; (d) comparison of the percentage of total apoptotic cells and dead cells for each group

2.3 FSGen对辐射诱导IEC-6细胞DNA损伤的影响

彗星实验又称单细胞凝胶电泳实验,可在单细胞水平上检测DNA损伤程度。各组细胞拍摄的彗星图像、尾部DNA含量和尾矩见图3。IEC-6细

结果说明,高浓度的FSGen对于肠上皮细胞稍有毒性,而低浓度FSGen保护作用较强。我们选取了5 $\mu\text{mol/L}$ 作为下步细胞实验的给药浓度。

2.2 FSGen对辐射诱导IEC-6细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI流式细胞术检测结果显示,单独辐照组和FSGen预处理组IEC-6细胞在X射线照射至剂量6 Gy后均发生了不同程度的凋亡。如图2所示,与正常对照组相比,单独辐照组细胞凋亡率显著升高;而FSGen预处理组细胞凋亡率较单独辐照组降低了约一半,差异具有统计学意义($p<0.05$),该结果说明FSGen预处理能有效减少辐射导致的细胞凋亡。

胞接受X射线照射至剂量6 Gy后72 h,尾部DNA含量和尾矩均明显高于正常对照组,说明照射对细胞造成了DNA损伤;与单独辐照组相比,FSGen处理的细胞尾部DNA含量由57.5%减少为19.4% ($p<0.01$),尾矩由76.0%减少为7.4% ($p<$

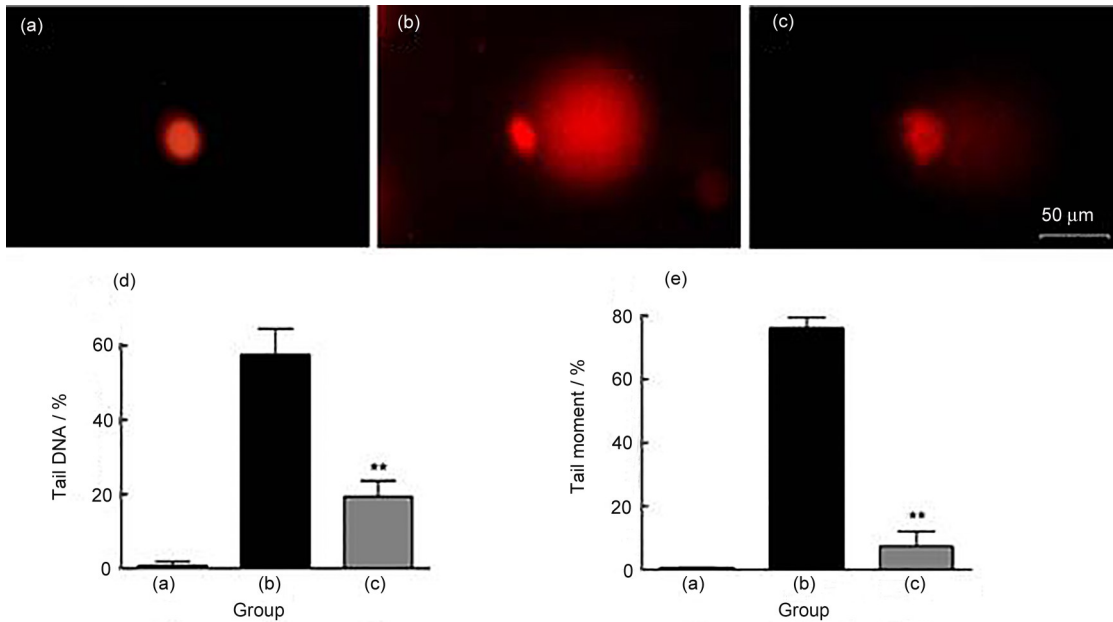


图3 FSGen对辐射诱导IEC-6细胞DNA损伤的影响:(a)为正常对照组;(b)为单独照射组;(c)为药物处理组;(d)尾部DNA含量统计结果;(e)尾矩统计结果(** $p<0.01$,与单独照射组相比)

Fig.3 Effects of FSGen on radiation induced DNA damage in IEC-6 cells: (a) normal control group; (b) irradiation alone group; (c) drug treatment group; (d) comparison of the percentage of the tail DNA for each group; (e) comparison of the tail moment for each group (** $p<0.01$, vs. irradiation alone group)

0.01), 提示FSGen预处理能显著减轻X射线照射引起的IEC-6细胞DNA损伤, 发挥保护作用。

2.4 FSGen对辐照小鼠小肠组织病理形态的影响

小鼠小肠病理切片从组织形态学上反映了小肠放射性损伤情况, 结果见图4。与正常对照组相

比, 小鼠接受X射线全身照射至剂量7.5 Gy后第8天, 小肠绒毛部分脱落, 尖端坏死, 残存绒毛高度缩短, 水肿情况较重; 与单独辐照组相比, 接受照射前预先颈部皮下注射FSGen的小鼠小肠绒毛脱落、坏死明显减少, 残存绒毛高度较高, 小肠结构相对完整, 且水肿程度得到改善, 表明FSGen能明显减轻照射后小肠的损伤程度。

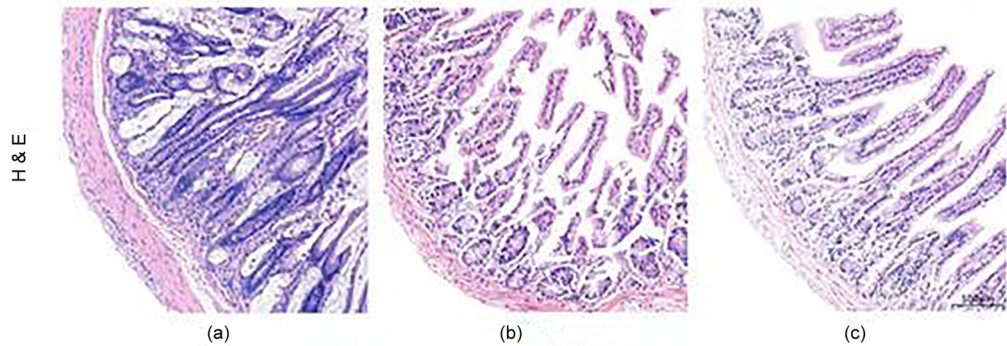


图4 FSGen对辐照小鼠小肠组织病理形态的影响:(a)正常对照组;(b)单独照射组;(c) FSGen处理组
Fig.4 Effects of FSGen on histopathological morphology of irradiated mice intestine: (a) normal control group; (b) irradiation alone group; (c) FSGen treatment group

2.5 FSGen对辐照小鼠小肠炎症程度的影响

正常对照组小鼠小肠组织存在少量的IFN- γ 。与正常对照组相比, 单独辐照组小鼠小肠IFN- γ 表

达水平明显升高; 而FSGen预处理组小肠IFN- γ 表达水平较单独辐照组明显降低, 说明FSGen预处理使小肠炎症程度得到缓解 (见图5)。

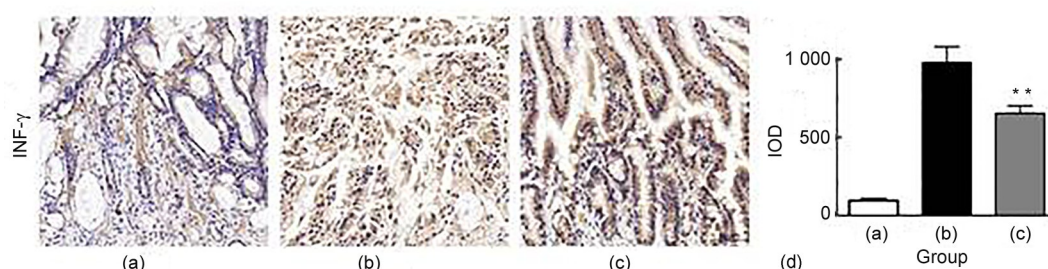


图5 FSGen对辐照小鼠小肠炎症程度的影响:

(a) 正常对照组; (b) 单独照射组; (c) FSGen处理组; (d) IOD统计结果(** $p<0.01$, 与单独照射组相比)

Fig.5 Effects of FSGen on the intestinal inflammation in irradiated mice: (a) normal control group; (b) irradiation alone group; (c) FSGen treatment group; (d) comparison of the integrated optical density for each group (** $p<0.01$ vs. irradiation alone group)

2.6 FSGen对辐照小鼠小肠细胞凋亡的影响

TUNEL染色结果如图6所示, 正常对照组小

鼠的小肠细胞无明显凋亡; 与正常对照组相比, 单独辐照组小肠细胞可见明显凋亡; 而FSGen预处理组小肠细胞凋亡程度显著降低。

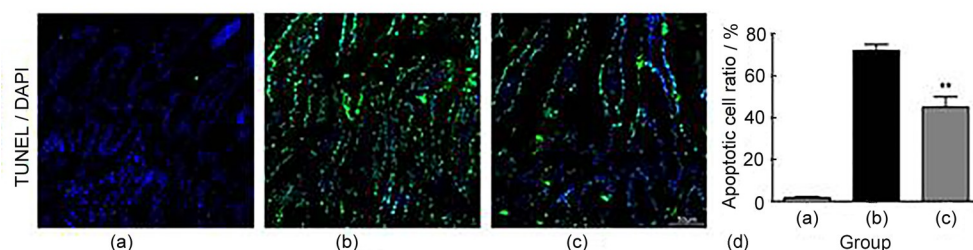


图6 FSGen对辐照小鼠小肠细胞凋亡的影响:

(a) 正常对照组; (b) 单独照射组; (c) FSGen处理组; (d) 凋亡细胞比例统计结果(** $p<0.01$, 与单独照射组相比)

Fig.6 Effects of FSGen on apoptosis of small intestinal cells in irradiated mice: (a) normal control group; (b) irradiation alone group; (c) FSGen treatment group; (d) comparison of the apoptotic cell ratio for each group (** $p<0.01$ vs. irradiation alone group)

3 讨论

肠道具有较快的自我更新速度, 为辐射高度敏感性组织。肠道在受辐照后往往会发生急性破坏, 且一般以小肠最为严重。肠道受到放射性损伤后, 屏障功能不再完整, 会导致大量致病微生物和毒性物质入血, 引起全身性病变, 严重时危害患者生命^[10]。目前应用于放射性肠损伤的临床治疗方案主要有高强度抗生素治疗、高压氧治疗和干细胞治疗等, 但仍缺乏切实有效的对因防治药物^[5]。

染料木黄酮是一种植物雌激素类化合物, 具有抑制蛋白酪氨酸激酶活性和很强的抗氧化活性。大量文献报道, 提前口服或注射染料木黄酮均可提高辐照小鼠存活率, 刺激辐照后大动物骨髓分化和造血干细胞增殖^[11-13]。染料木黄酮主要通过抗

氧化及清除自由基、调节信号转导和基因表达、调节细胞周期和抑制凋亡等机制发挥抗放作用。Song等^[14]发现, 低剂量染料木黄酮能通过上调hHR23A和HUS1等DNA修复相关的基因, 减轻DNA损伤, 通过上调Herp基因、下调GRP78基因来抑制内质网应激, 发挥细胞保护作用。Liu等^[15]研究发现, 染料木黄酮能降低脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶1/氧化还原因子-1(APE1/Ref-1)的表达, 进而下调核转录因子-κB(NF-κB)的表达, 从而减少炎症因子合成, 减轻炎症反应。目前, 美国Humanetics Pharmaceuticals制药公司开发的化学合成染料木黄酮制剂—Bio-300已在FDA注册研发。Bio-300对肿瘤放射治疗的保护研究已进入III期临床试验, 对急性放射病以及γ射线防护等方面的研究, 在美国宇航局(NASA)和美国军队放射生物

学研究院 (AFRRI) 的资助下也已进入临床试验阶段^[7]。然而, 我国目前对于染料木黄酮的研究多数处于实验室阶段, 且大多集中在抗肿瘤、心血管保护、抗骨质疏松等方面, 对于其放射保护作用的研究非常滞后。结合我国国情和地域特色, 我们建立了从槐角中提取染料木黄酮的工艺。槐角是我国北方大部分地区常见树种中国槐 *Sophora japonica* L. 的干燥成熟果实, 来源极为方便, 价格低廉, 具有凉血止血功效^[16]。相对于国外研究的化学合成品, 从槐角中提取的染料木黄酮作为原料药, 安全性更高, 价格更低, 更加符合我国国情。研发前期, 我们建立的从槐角中提取槐属甙, 再将槐属甙酸解成染料木黄酮的制备工艺获得中国发明专利, 回收药用级染料木黄酮单体的纯度达到 99% 以上, 每克成本小于 1 元, 使槐角染料木黄酮作为原料药应用成为可能。并且, 槐角染料木黄酮对绝经期妇女骨质疏松症的研究获得 SFDA 临床研究批件, 目前已完成 II 期临床试验 (批件号: 2004L01548)。

本文中, 我们对槐角染料木黄酮的放射性肠损伤保护功能进行了初步研究。结果显示, 槐角染料木黄酮低浓度时具有放射保护作用, 低浓度 ($\leq 10 \mu\text{mol/L}$) 的槐角染料木黄酮明显促进小肠上皮细胞增殖, 预处理小肠上皮细胞可明显提高辐照后细胞的存活率, 有效降低细胞凋亡, 显著抑制 DNA 损伤。槐角染料木黄酮预先给药还可有效缓解辐照后小鼠小肠损伤程度, 降低小肠中促炎因子 IFN- γ 表达水平, 减轻小肠炎症以及小肠细胞凋亡程度。槐角染料木黄酮低浓度起效的现象与文献报道的化学合成染料木黄酮一致^[14]。高浓度染料木黄酮被报道可通过抑制蛋白酪氨酸激酶来抑制肿瘤细胞增殖, 因此, 高浓度染料木黄酮抑制小肠细胞增殖的现象可能与它的蛋白酪氨酸激酶抑制活性相关^[17]。本文的研究结果为我们开发槐角染料木黄酮成为具有自主知识产权的放射性肠损伤保护药物奠定了基础。未来, 我们还将分子水平上对槐角染料木黄酮抗氧化、抗炎、调节基因表达作用的机制进行进一步实验验证。另外, 槐角染料木黄酮对其他组织细胞的放射保护作用如何, 也待进一步研究。

参考文献

- 1 Lehnert S. Biomolecular action of ionizing radiation[M]. Boca Raton : CRC Press, 2007. DOI: 10.1080/

08893110802580167.

- 2 Stone H B, Coleman C N, Anscher M S, *et al.* Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms [J]. *Lancet Oncology*, 2003, **4**(9): 529-536.
- 3 Chen H, Kuo M T. Improving radiotherapy in cancer treatment: promises and challenges[J]. *Oncotarget*, 2017, **8**(37): 62742-62758. DOI: 10.18632/oncotarget.18409.
- 4 Wei B, Chen L, Li R, *et al.* Stem cells in gastrointestinal cancers: a matter of choice in cell fate determination[J]. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2010, **10**(10): 1621-1633. DOI: 10.1586/era.10.52.
- 5 Shadad A K, Sullivan F J, Martin J D, *et al.* Gastrointestinal radiation injury: prevention and treatment [J]. *World Journal of Gastroenterol*, 2013, **19**(2): 199-208. DOI: 10.3748/wjg.v19.i2.199.
- 6 Zhou Y, Mi M T. Genistein stimulates hematopoiesis and increases survival in irradiated mice[J]. *Journal of Radiation Research*, 2005, **46**(4): 425-433.
- 7 Humanetics Corporation. Humanetics pharmaceuticals [EB/OL]. (2018-07-17) [2018-10-15]. <http://www.humaneticscorp.com/>.
- 8 王增禄, 王剑波, 王四旺. 染料木素的制备工艺及其药物组合物与应用: 02123450.7[P]. 2004-01-07. WANG Zenglu, WANG Jianbo, WANG Siwang. Preparation process of genistein and its pharmaceutical composition and application: 02123450.7[P]. 2004-01-07.
- 9 Landauer M R, Srinivasan V, Seed T M. Genistein treatment protects mice from ionizing radiation injury[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2003, **23**(6): 379-385. DOI: 10.1002/jat.904.
- 10 Shadad A K, Sullivan F J, Martin J D, *et al.* Gastrointestinal radiation injury: symptoms, risk factors and mechanisms[J]. *World Journal of Gastroenterol*, 2013, **19**(2): 185-198. DOI: 10.3748/wjg.v19.i2.185.
- 11 Singh V K, Grace M B, Parekh V I, *et al.* Effects of genistein administration on cytokine induction in whole-body gamma irradiated mice[J]. *International Immunopharmacology*, 2009, **9**(12): 1401-1410. DOI: 10.1016/j.intimp.2009.08.012.
- 12 Day R M, Davis T A, Barshishat-Kupper M, *et al.* Enhanced hematopoietic protection from radiation by the combination of genistein and captopril[J]. *International Immunopharmacology*, 2013, **15**(2): 348-356. DOI: 10.1016/j.intimp.2012.12.029.
- 13 Davis T A, Mungunsukh O, Zins S, *et al.* Genistein induces radioprotection by hematopoietic stem cell

- quiescence[J]. International Journal of Radiation Biology, 2008, **84**(9): 713-726. DOI: 10.1080/09553000802317778.
- 14 Song L, Ma L, Cong F, *et al.* Radioprotective effects of genistein on HL-7702 cells via the inhibition of apoptosis and DNA damage[J]. Cancer Letters, 2015, **366**(1): 100-111. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.06.008.
- 15 Liu G D, Xia L, Zhu J W, *et al.* Genistein alleviates radiation-induced pneumonitis by depressing Apel/Ref-1 expression to down-regulate inflammatory cytokines[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2014, **69**(3): 725-733. DOI: 10.1007/s12013-014-9859-x.
- 16 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2008. Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China: Part 1[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2008.
- 17 Tallett A, Chilvers E R, Hannah S, *et al.* Inhibition of neuropeptide-stimulated tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity stimulates apoptosis in small cell lung cancer cells[J]. Cancer Research, 1996, **56**(18): 4255-4263.