

蓝莓花青素的抗辐射损伤作用

郝文博^{1,2} 杨晓宇³ 车文实¹

¹ (黑河学院物理化学系 黑河 164300)

² (大连理工大学生命科学与技术学院 大连 116023)

³ (辽宁省鞍山市动物园 鞍山 114000)

摘要 研究蓝莓花青素对小鼠抗⁶⁰Co γ 射线辐照损伤的作用。采用实验血液学技术方法,检测受照射小鼠脾指数及胸腺指数、外周血象和血清超氧化物歧化酶(SOD)活力。蓝莓花青素能够有效拮抗⁶⁰Co γ 射线照射小鼠外周白细胞(WBC)及血清SOD活力的降低;但对外周血红细胞(RBC)、血小板数(PLT)和血红蛋白浓度(Hb)均无显著影响。蓝莓花青素对放射损伤小鼠具有一定的抗辐射和抗氧化作用。

关键词 蓝莓花青素, ⁶⁰Co γ 射线, 抗辐射, 造血功能, 超氧化物歧化酶

中图分类号 TL71

电离辐射对生物机体的损伤除直接作用于细胞外,还通过间接作用诱导产生超氧阴离子自由基、羟自由基等活性氧自由基。活性氧自由基是放射损伤细胞和组织的重要因素,可引起细胞内DNA的氧化、断裂或碱基错配等现象,并诱发细胞死亡^[1]。骨髓是对辐射高度敏感的组织,受照射后能造成包括骨髓抑制、造血组织功能障碍和外周血白细胞下降以及免疫功能降低等伤害^[2]。

蓝莓又名越橘,品种丰富且富含花青素^[3]。野生种蓝莓每百克鲜果中花青素含量高达0.33 g—3.38 g,栽培种每百克鲜果中一般0.07 g—0.15 g^[4]。花青素(Anthocyanins)又称花色素,是一类广泛存在于植物中的水溶性天然色素,属黄酮类化合物,多以糖苷的形式存在,也称花色苷^[5],结构单元为 α 苯基苯并吡喃型阳离子。花青素是一种天然食用色素,安全、无毒、资源丰富,具有强烈的抗氧化能力,可消除人体自由基,保护健康细胞,激活衰老细胞,提高人体活力,防癌抗癌功效明显,在食品、化妆、医药等方面具有广阔的应用前景^[6]。

本研究拟以⁶⁰Co γ 射线照射小鼠导致其造血功能损伤,通过体内给予蓝莓花青素,观察其对受照小鼠造血功能的影响,并探讨其可能的作用机制,以期为进一步挖掘蓝莓花青素的药用价值,开发新的抗放射产品提供实验参考;为正确合理开发这种具有食药同源性的资源提供理论依据。

1 实验材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性C57BL/6J雄性小鼠(购自大连医科大学实验动物中心,合格批号:scxk-11-00-0006),体质量18—22 g。

1.1.2 蓝莓花青素制剂 由本实验室制备。其主要的工艺流程如下:蓝莓鲜果→破碎→乙醇浸提→过滤→离心→花青素提取液→聚酰胺树脂吸附→60%乙醇洗脱→旋蒸→花青素纯化液→低温真空干燥。用蒸馏水制成1 g/L的悬浊液。

1.1.3 试剂 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,南京建成生物工程研究所;其它试剂均为国产分析纯。

1.1.4 仪器 ⁶⁰Co γ 射线源,大连医科大学附属第二医院肿瘤科提供;血细胞自动分析仪,SYSMAX公司;超净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司生产;CO₂培养箱,Thermo公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及照射 清洁级雄性C57BL/6J小鼠50只,随机分为阴性对照组(灌胃生理盐水,不照射)、阳性对照组(灌胃生理盐水,照射)和低、中、高剂量3个实验组,每组10只。实验组小鼠灌胃不同浓度的蓝莓花青素混悬液,剂量分别为100、300和900 mg/kg每日一次连续给药10 d后,除阴性对照组外,其余4组用⁶⁰Co γ 射线进行一次性全

黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511351)资助

第一作者:郝文博,女,1982年9月出生,2008年于沈阳农业大学获硕士学位,从事生物化工专业的研究

E-mail: chesci@126.com

收稿日期:初稿 2012-12-26,修回 2013-06-03

身照射,照射剂量为 2 Gy,照射时间 7 min。继续给药 3 d 后,测定脾和胸腺指数,外周血象以及血清 SOD 活性。

1.2.2 脾指数和胸腺指数的测定 末次给药后 3 d 小鼠称重,颈椎脱臼处死,剥离脾脏和胸腺,称重,计算脾指数和胸腺指数。

1.2.3 外周血象的测定 末次给药后 1 h,尾静脉采血,用血细胞自动分析仪测定白细胞数(WBC),红细胞数(RBC),血小板数(PLT)和血红蛋白浓度(Hb)。

1.2.4 MTT 法测定脾淋巴细胞转化率 参照文献[7]的测定脾淋巴细胞转化率。无菌条件下取小鼠脾脏,用 D-hank's 液洗净血液后,剪碎,于超净工作台内加入适量 RPMI 1640 培养液,在 200 目筛网上研磨,轻微挤压过滤,制成细胞悬液,加等量 D-hank's 液稀释后,用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞;将淋巴细胞用 D-hank's 液洗 2 遍,去上清,加入适量 RPMI1640 培养液,用台盼蓝染色计数活细胞数,调整细胞悬液浓度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$;将细胞悬液接种于 96 孔培养板中,每个样品做 3 个平行孔;加入 7.5 μL

ConA,于 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养,采用 MTT 方法检测 ConA 诱导的血淋巴细胞转化率。

1.2.5 SOD 活性测定 末次给药后 1 h,眼静脉采血,分离血清,按照试剂盒操作说明步骤测定血清 SOD 活性。

1.3 统计学分析

组间差异采用 *t* 检验,以 $p < 0.05$ 为具有统计学意义上的差异,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果和分析

2.1 蓝莓花青素对 ⁶⁰Co γ 射线照射小鼠脾指数和胸腺指数的影响

⁶⁰Co γ 射线照射明显抑制小鼠的脾及胸腺功能,辐照后阳性对照组小鼠的脾指数及胸腺指数比阴性对照组显著下降。预先灌胃不同剂量的蓝莓花青素 10 d,再经 ⁶⁰Co γ 射线照射,各实验组小鼠的脾指数及中、高剂量实验组的胸腺指数显著高于阳性对照组,表明蓝莓花青素对 ⁶⁰Co γ 射线照射所致免疫器官损伤有显著的拮抗作用见表 1。

表 1 蓝莓花青素对 ⁶⁰Co γ 射线照射小鼠脾指数和胸腺指数的影响

Table 1 Blueberry anthocyanin effects on spleen index and thymus index in ⁶⁰Co γ-ray irradiation damage mice ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Dose	脾指数 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Spleen index	胸腺指数 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Thymus index
阴性对照组 Negative control group	0	4.13±0.35	3.67±0.24
阳性对照组 Positive control group	0	1.24±0.14	0.61±0.12
低剂量组 Low dose group	100	1.62±0.16*	0.77±0.13
中剂量组 Medium dose group	300	1.65±0.09*	0.98±0.16*
高剂量组 High dose group	900	1.68±0.11*	1.04±0.15*

注: * $p < 0.05$, 与阳性对照组比较。

Note: * $p < 0.05$, Compared with positive control group.

2.2 蓝莓花青素对 ⁶⁰Co γ 射线照射小鼠外周血象的影响

⁶⁰Co γ 线照射后,小鼠外周血 WBC、RBC、PLT 和 Hb 均呈下降趋势,其中 WBC 最敏感,但各实验组 WBC 均高于阳性对照组。照射后,蓝莓花青素中、高剂量实验组小鼠外周血 WBC 显著高

于阳性对照组 ($p < 0.05$),表明蓝莓花青素能对 ⁶⁰Co γ 照射引起的白细胞减少有显著的拮抗作用。照射后各剂量组小鼠外周血 RBC、PLT、Hb 与照射差异不显著 ($p > 0.05$),说明蓝莓花青素对 ⁶⁰Co γ 实验组所致造血机能损伤小鼠的外周血 RBC、PLT 及 Hb 无明显影响见表 2。

表 2 蓝莓花青素对 ⁶⁰Co γ 射线照射小鼠外周血象的影响
Table 2 Blueberry anthocyanin effects on peripheral hemogram in ⁶⁰Co γ-ray irradiation damage mice (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 / mg·kg ⁻¹ Dose	WBC / 10 ⁹ ·L ⁻¹	RBC / 10 ¹² ·L ⁻¹	PLT / 10 ¹² ·L ⁻¹	Hb / g·L ⁻¹
模型组 Model group	0	0.56±0.05	7.31±0.26	613±28.5	140±5.82
低剂量组 Low dose group	100	0.81±0.04	7.53±0.24	654±27.9	147±5.70
中剂量组 Medium dose group	300	1.05±0.05 [*]	7.69±0.30	689±30.6	150±5.78
高剂量组 High dose group	900	1.12±0.05 [*]	7.81±0.27	730±28.7	155±5.71

注：**p*<0.05，与模型组比较。
Note: **p*<0.05, Compared with model group.

2.3 蓝莓花青素对 ⁶⁰Co γ 射线照射小鼠脾淋巴细胞转化率的影响

脾脏对电离辐射较敏感，并导致免疫功能下降。淋巴细胞转化率可反映受照射损伤程度。表 3 显示，阳性对照组的淋巴细胞转化率明显低于阴性对照组，表明电离辐射使机体的免疫机能受损。实验组

的淋巴细胞转化率虽然有所降低，但均高于阳性对照组，且中、高剂量实验组与之比较差异具有统计学意义（*p*<0.05）。表明蓝莓花青素可预防电离辐射对脾脏淋巴细胞产生的损伤。提示蓝莓花青素对于保护辐射小鼠的淋巴细胞，提高淋巴细胞对辐射的耐受性及机体免疫力有一定效果。

表 3 蓝莓花青素对 ⁶⁰Co γ 射线照射小鼠脾淋巴细胞转化率的影响
Table 3 Blueberry anthocyanin effects on lymphocyte transformation rate in ⁶⁰Co γ-ray irradiation damage mice (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 / mg·kg ⁻¹ Dose	脾淋巴细胞转化率 / % Lymphocyte transformation rate
阴性对照组 Negative control group	0	43.87±1.60
阳性对照组 Positive control group	0	35.61±1.98
低剂量组 Low dose group	100	36.88±1.83
中剂量组 Medium dose group	300	37.94±1.86 [*]
高剂量组 High dose group	900	39.17±1.83 [*]

注：**p*<0.05，与阳性对照组比较。
Note: **p*<0.05, Compared with positive control group.

2.4 蓝莓花青素对 ^{60}Co γ 射线照射小鼠血清 SOD 活性的影响

^{60}Co γ 射线照射可显著降低阳性对照组小鼠血

清 SOD 活性。而灌胃蓝莓花青素的各实验组小鼠 SOD 活性均显著高于阳性对照组,说明蓝莓花青素对 ^{60}Co γ 照射所致的小鼠体内过氧化有显著的拮抗作用见表 4。

表 4 蓝莓花青素对 ^{60}Co γ 射线照射小鼠血清 SOD 活性的影响
Table 4 Blueberry anthocyanin effect on serum SOD in ^{60}Co γ -ray irradiation damage mice (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Dose	SOD / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白
阴性对照组 Negative control group	0	67.56 $\pm$ 3.63
阳性对照组 Positive control group	0	27.93 $\pm$ 4.13
低剂量组 Low dose group	100	39.54 $\pm$ 4.01*
中剂量组 Medium dose group	300	41.84 $\pm$ 4.36*
高剂量组 High dose group	900	56.87 $\pm$ 4.72*

注: * $p < 0.05$, 与阳性对照组比较。

Note: * $p < 0.05$, Compared with positive control group.

3 讨论

采用实验血液学技术检测了蓝莓花青素对 ^{60}Co γ 射线照射小鼠脾指数、胸腺指数、外周血象和脾淋巴细胞转化率的影响。结果表明, 蓝莓花青素能够有效拮抗 ^{60}Co γ 射线照射小鼠脾和胸腺指数下降、脾淋巴细胞转化率的降低和外周血 WBC 数量的减少, 但对外周 RBC、PLT 及 Hb 含量无显著影响。说明其促进粒系造血作用, 但对红系造血无促进作用。提示蓝莓花青素对于保护电离辐射损伤小鼠的淋巴细胞, 提高淋巴细胞对电离辐射的耐受性及机体免疫力有一定效果。

本实验还观察了蓝莓花青素对小鼠体内过氧化水平的影响。结果表明, 蓝莓花青素能显著拮抗辐照所致小鼠血清中 SOD 活性的降低。研究表明, 辐照可引起骨髓基质细胞 SOD 活性降低, 细胞清除自由基的能力下降, 细胞脂质过氧化损伤严重^[7]。提示骨髓微环境基质细胞的过氧化损伤是辐射导致造血功能障碍的可能机制之一^[8]。蓝莓花青素具有清除自由基、抗氧化功能, 从而能有效拮抗辐射对造血机能的损伤。

由此可见, 蓝莓花青素可减轻 ^{60}Co γ 射线照射对小鼠的损伤。脾指数、胸腺指数、外周血 WBC

和 SOD 活性等检测指标均显示蓝莓花青素有抗 ^{60}Co γ 射线照射的损伤作用。

参考文献

- 1 夏寿萱, 魏康, 章杨培. 分子放射生物学[M]. 北京: 原子能出版社, 1992: 3-6
XIA Shouxuan, WEI Kang, ZHANG Yangpei. Molecular radiobiology [M]. Beijing: Atomic Energy Press, 1992: 3-6
- 2 吴德昌, 陈家佩, 毛秉智. 放射医学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2001: 16, 70-76
WU Dechang, CHEN Jiawei, MAO Bingzhi. Radiation medicine [M]. Beijing: Military Medical Science Press, 2001: 16-76
- 3 焦龙, 李玉伟. 蓝莓果实中花青素提取方法的研究进展[J]. 北京农业, 2011, 6(3): 10-11
JIAO Long, LI Yuwei. Blueberry fruits in the research on anthocyanin extraction method [J]. J Beijing Agric, 2011, 6(3): 10-11
- 4 扬桂霞, 范海棒, 李亚东, 等. RP-HPLC 法测定栽培种越橘果中花色素苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(10): 1222-1224
YANG Guixia, FAN Haibang, LI Yadong, et al. The RP-HPLC method for determination of flower pigments

- in cranberry fruit varieties of glycosides content [J]. J Pharm Anal, 2005, **25**(10): 1222-1224
- 5 Anna R, Renato C N, Daniela V, *et al.* Modification of glass transition temperature though carbohydrates addition and anthocyanin and soluble phenol stability of frozen blueberry juices [J]. Food Eng, 2003, **56**(2-3): 229-231
- 6 Castaeda-Ovando A, Pacheco-Hernández M L, Páez-Hernández M E, *et al.* Chemical studies of anthocyanins: A review [J]. Food Chem, 2009, **113**(4): 859-871
- 7 邓中荣, 陈景元. 微波对体外培养的骨髓基质细胞脂质过氧化损伤[J]. 第四军医大学学报, 2003, **24**(9): 820-821
- DENG Zhongrong, CHEN Jingyuan. Microwave on in vitro cultured bone marrow stromal cells lipid peroxidation injury [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2003, **24**(9): 820-821
- 8 霍蕊莉. 电磁辐射对骨髓影响的研究进展[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2005, **32**(3): 179-182
- HUO Ruili. The research progress of electromagnetic radiation effect on bone marrow [J]. Foreign Med: Hyg Pathol, 2005, **32**(3): 179-182

Radiation damage resistance of blueberry anthocyanin

HAO Wenbo^{1,2} YANG Xiaoyu³ CHE Wenshi¹

¹(Heihe University, Physics and Chemistry Department, Heihe 164300, China)

²(Dalian University of Technology, School of Life Science and Biotechnology, Dalian 116023, China)

³(Liaoning Anshan Zoo, Anshan 114000, China)

ABSTRACT To explore blueberry anthocyanin resistance to ⁶⁰Co γ-ray irradiation damage in mice, experimental hematology technology is used to detect model mice spleen index and thymus index, peripheral blood and serum superoxide disproportionation (SOD) enzyme activity. Blueberry anthocyanins antagonize peripheral WBC and the serum SOD activity of ⁶⁰Co γ-ray irradiation injury mice effectively and has no significant influence for peripheral RBC, PLT, and Hb. Blueberry anthocyanin has certain resistance and antioxidation to radiation in mice.

KEYWORDS Blueberry anthocyanin, ⁶⁰Co γ-ray, irradiation damage resistance, Hematopoietic function, Superoxide disproportionation (SOD)

CLC TL71