

文章编号: 1000-5692(2006)06-0604-04

山核桃外果皮提取液对小鼠的辐射防护作用

杨琼霞¹, 殷舒¹, 申屠垠¹, 高欣¹, 孙益², 胡军祥¹

(1. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310012)

摘要: 观察山核桃 *Carya cathayensis* 外果皮提取液对小鼠 *Mus musculus* 经 γ 射线辐照所致氧化损伤的防护作用。将小鼠随机分为阴性对照组、单纯辐射组和 3 种不同剂量提取液给药组。除阴性对照组外其余各组实验动物均用 ^{60}Co γ 射线全身照射, 至照射后第 5 天, 处死实验动物, 分别测定体质量、血象、丙二醛(MDA)浓度和超氧化物歧化酶(SOD)活性。实验结果表明: 单纯辐射组动物外周血白细胞、红细胞、血小板的数量, 血红蛋白以及红细胞压积与阴性对照组相比较显著降低($P < 0.05$), 而不同剂量的提取液给药组相应指标均有不同程度的升高。单纯辐射组血清和肝组织 MDA 浓度较阴性对照组显著升高($P < 0.05$), 各提取液给药组的血清和肝脏的 MDA 较单纯辐射组均有不同程度的降低, 并随着提取液剂量的增加而降低显著($P < 0.05$)。单纯辐射组血清和肝脏 SOD 活性较阴性对照组显著降低($P < 0.05$), 各提取液给药组血清和肝脏的 SOD 活性与单纯辐射组比较有不同程度的升高, 并且存在着一定的剂量效应关系, 提示提取液对于辐射引起的氧化损伤有较好的防护作用。表 2 参 7

关键词: 动物学; 山核桃; 外果皮提取液; NIH 小鼠; 辐射防护; 丙二醛; 超氧化物歧化酶
中图分类号: Q958; S789.5 **文献标识码:** A

山核桃 *Carya cathayensis* 是胡桃科 Juglandaceae 山核桃属 *Carya* 植物, 主要产于浙江临安、淳安和安吉等地, 是一种重要的经济作物^[1]。山核桃外果皮富含多种生物活性成分如单宁、黄酮类、多酚类和有机酸等。其中单宁(tannic acid), 又名鞣酸, 学名 3, 4, 5-三羟基苯甲酸, 是一种多酚羟基化合物, 具有较强的化学和生理活性, 可以生成儿茶酚或焦五倍子酚。它们均含有多元酚, 其酚羟基具有良好的捕集自由基功能^[2,3]。以往体外实验中发现单宁、黄酮类和多酚类具有抗氧化作用^[4], 但山核桃外果皮提取液对动物辐射损伤的防护作用未见相关报道。实验用 ^{60}Co γ 射线辐照小鼠 *Mus musculus* 制作氧化损伤动物模型, 观察提取液的体内抗氧化损伤作用。

1 材料与方 法

1.1 动物分组及处理

NIH 小鼠 50 只, 雌雄各半, 体质量(18.72 \pm 2.34)g, 由浙江省实验动物中心提供。将实验小鼠随机分成 5 组, 每组 10 只, 分别为阴性对照组、单纯辐射组和 3 种不同剂量提取液给药组(15, 9, 3

收稿日期: 2005-12-29; 修回日期: 2006-03-27

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y304053); 浙江省临安市科学技术局资助项目(05064)

作者简介: 杨琼霞, 硕士研究生, 从事动物生物学研究。E-mail: flower_964@163.com。通信作者: 胡军祥, 教授, 博士, 从事动物生物学研究。E-mail: hjxy@hznc.com

$\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。将提取液用三蒸水配成 500, 300 和 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水溶液, 实验开始时按照小鼠体质量确定剂量($30 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)分别灌胃, 阴性组和单纯辐射组给予相同量的三蒸水。3 d 后除阴性对照组外, 其余各组用 ^{60}Co 射线全身照射, 照射剂量为 6 Gy, 剂量率 138.35 min^{-1} 。照后继续灌胃饲养至第 5 天, 测定各组小鼠的体质量变化。处死小鼠, 取全血测定外周血细胞数量变化, 同时, 取血清测定丙二醛(MDA)浓度超氧化物歧化酶(SOD)活性; 取肝组织并用生理盐水制成 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的组织匀浆, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取匀浆上清测定 MDA 质量浓度和 SOD 活性。

1.2 试剂

山核桃外果皮提取液: 取干山核桃外果皮若干, 加入适量蒸馏水, 煮沸 3 次, 每次 1 h, 合并滤液, 水浴浓缩, 用三蒸水分别配制成生药质量浓度为 500, 300 和 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, G_6 漏斗抽滤除菌, 置冰箱备用; 硫代巴比妥酸(TBA)、进口 MDA 标准品, Merck 公司产品; 磷钨酸(AR)、牛血清白蛋白由 Boehringer 分装; 盐酸羟胺(AR)由天津化学试剂一厂提供, NBT 购自华美公司, TritonX-100 由上海化学试剂有限公司提供; 其他试剂均为分析纯, 分别由中国医药集团上海化学试剂公司和天津新纯化学试剂研究所提供。

1.3 仪器

MPF-4 型荧光分光光度计(日立公司), 970 CRT 荧光分光光度计(上海三科仪器有限公司), GL-20A 湘仪全自动高速冷冻离心机(湖南仪器仪表总厂离心机厂), LXJ-II 型低速离心沉淀机(上海医用分析仪器厂), 722 型光栅分光光度计(山东高密分析仪器厂), D40-1 型电动匀浆器(浙江杭州仪表电机厂), 电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂), SWX-DH 电热恒温水浴箱(汕头市第二医疗器械厂), ADVIA-60 型全自动血球分析仪(德国拜尔公司), SHZ-88-1 台式水浴恒温振荡器(江苏太仓鹿河生化仪器厂)。

1.4 测定指标

血常规测定指标: 采用德国拜尔公司的 ADVIA-60 型全自动血球分析仪。MDA 测定采用改良的八木国夫荧光法。具体实验步骤如下: 取样品依次加入 $0.042 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸 4 mL, $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷钨酸 500 μL , 1600 g 离心 10 min, 弃上清, 再加入 $0.042 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸 2 mL, $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷钨酸 300 μL , 1600 g 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 mL 三蒸水, $6.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ TBA 1 mL, 沸水浴 1 h, 冷却后加入 4 mL 水饱和正丁醇, 振荡抽提 1 min, 去上层, Ex515/Em553 荧光分光光度计测定。SOD 采用改良的盐酸羟胺法。样品管取样品 20 μL , 非酶管用三蒸水代替, 依次加入 $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 10.2 的碳酸盐缓冲液 2.0 mL, $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Triton X-100 0.3 mL, $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸羟胺 0.5 mL, $0.98 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NBT 0.1 mL, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 20 min, 2.0 mL 甲酸终止反应, 560 nm 比色。

1.5 统计学处理

实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用统计软件 SPSS 11.0 的 one-way ANOVA 进行分析, $P < 0.05$ 表示有显著差异。

2 结果

血常规显示(表 1), 单纯辐射组与阴性对照组相比较, 实验动物外周血白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板(PLT)数量显著降低($P < 0.05$), 血红蛋白(Hb)浓度和血红细胞压积也显著降低($P < 0.05$), 而不同剂量的提取液给药组相应指标均有着不同程度的升高, 并且随着提取液剂量的增加升幅度明显。实验动物体质量变化趋势与血常规指标相一致(表 2)。单纯照射组血清和肝组织 MDA 浓度较阴性对照组显著升高($P < 0.05$), 各提取液给药组的血清和肝组织的 MDA 较单纯辐射组均有不同程度的降低, 并随着提取液剂量的增加降低显著($P < 0.05$)。单纯照射组血清和肝脏 SOD 活性较阴性对照组显著降低($P < 0.05$), 各提取液给药组血清和肝脏的 SOD 活性与单纯照射组比较有不同程度的升高, 并且存在着一定的剂量效应关系。

表1 山核桃外果皮提取液对受辐照小鼠外周血白细胞数、红细胞数、血红蛋白质量浓度、红细胞压积和血小板数的影响

Table 1 Effect of extract from the hickory nut exocarp on WBC, RBC, Hb, HCT and PLT in peripheral blood of irradiated mice ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	白细胞数/ (个 \cdot L $^{-1}$)	红细胞数/ (个 \cdot L $^{-1}$)	血红蛋白质量 浓度/ (g \cdot L $^{-1}$)	红细胞压积	血小板数/ (个 \cdot L $^{-1}$)
阴性对照组	$(7.35 \pm 2.48) \times 10^9$ *	$(7.45 \pm 0.46) \times 10^{12}$ *	124.67 ± 6.73 *	0.41 ± 0.02 *	$(948.50 \pm 224.67) \times 10^9$ *
15 g \cdot kg $^{-1}$ 组	$(2.58 \pm 0.47) \times 10^9$	$(7.34 \pm 0.73) \times 10^{12}$ *	116.42 ± 22.36 *	0.36 ± 0.03 *	$(918.93 \pm 200.76) \times 10^9$ *
9 g \cdot kg $^{-1}$ 组	$(2.35 \pm 0.61) \times 10^9$	$(6.91 \pm 0.92) \times 10^{12}$ *	105.89 ± 39.08	0.34 ± 0.05	$(864.54 \pm 160.50) \times 10^9$
3 g \cdot kg $^{-1}$ 组	$(1.91 \pm 0.73) \times 10^9$	$(7.04 \pm 0.42) \times 10^{12}$ *	109.43 ± 40.47	0.34 ± 0.29	$(797.78 \pm 226.65) \times 10^9$
单纯辐射组	$(1.92 \pm 0.71) \times 10^9$	$(5.32 \pm 3.24) \times 10^{12}$	80.01 ± 56.01	0.27 ± 0.16	$(797.89 \pm 226.77) \times 10^9$

说明: * $P < 0.05$, 与单纯辐射组比较。

表2 山核桃外果皮提取液对受辐照小鼠体质量、血清和肝脏MDA和SOD活性的影响

Table 2 Effect of extract from the hickory nut exocarp on body weight and MDA content, SOD activities in serum and livers of irradiated mice ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	体质量/g	血清MDA/ (μ mol \cdot L $^{-1}$)	肝脏MDA/ (μ mol \cdot L $^{-1}$)	血清SOD活性/ (μ kat \cdot L $^{-1}$)	肝脏SOD活性/ (mkat \cdot g $^{-1}$)
阴性对照组	4.64 ± 2.82	58.33 ± 3.26 *	8.06 ± 1.06 *	561.45 ± 76.18 *	21.147 ± 6.072 *
15 g \cdot kg $^{-1}$ 组	2.88 ± 0.64	60.35 ± 1.97 *	8.23 ± 1.01 *	472.76 ± 50.84 *	15.871 ± 3.571 *
9 g \cdot kg $^{-1}$ 组	2.27 ± 1.28	61.52 ± 3.79	8.69 ± 1.12	469.43 ± 57.84 *	16.385 ± 5.587 *
3 g \cdot kg $^{-1}$ 组	2.22 ± 1.55	62.34 ± 3.17	8.86 ± 2.36	431.09 ± 132.03	14.948 ± 5.451
单纯辐射组	1.52 ± 1.44	64.03 ± 4.01	10.29 ± 2.74	366.07 ± 104.52	11.044 ± 5.048

说明: * $P < 0.05$, 与单纯辐射组比较。

3 讨论

对于辐射引起的外周血象改变早已有系统研究和报道^[5]。在该项实验中,与阴性对照组相比较单纯辐射组外周血WBC, RBC, PLT, Hb和HCT均显著降低($P < 0.05$),与公认的辐射后血象指标的变化趋势相一致,说明该实验辐射损伤模型制作成功。而各提取液给药组动物外周血象各项指标与单纯辐射组比较均有一定程度的升高,并呈现出一定的剂量效应关系,实验动物的体质量变化也表现出同样的变化趋势。这些都提示提取液具有一定的抗辐射损伤作用。

电离辐射损伤的主要机制是活性氧(ROS)损伤^[5],MDA是反映ROS损伤的指标之一^[9]。从该实验结果可以看出,单纯辐射组动物血清和肝脏组织MDA显著高于阴性对照组($P < 0.05$),即单纯辐射组动物受到很强的ROS损伤。而各提取液给药组的MDA较阳性对照组均有不同程度的降低,并且随着提取液剂量的增加这种降低MDA的效果更加明显,至给药15 g \cdot kg $^{-1}$ 时与单纯辐射组比较已有显著差异($P < 0.05$),显示了提取液在体内有较好的抗氧化损伤作用。SOD是机体的抗氧化损伤防御体系中的重要组成之一,其活性变化反映了机体的抗ROS损伤状态^[7]。该实验中单纯辐射组动物的血清和肝脏中的SOD活性均较阴性对照组有显著降低($P < 0.05$),说明辐射引起机体抗氧化损伤能力受到一定破坏,而各提取液给药组动物血清和肝脏的SOD活性较单纯辐射组均有不同程度的升高,起到了一定的保护作用,并且也存在着一定的剂量效应关系,提示提取液具有较好的抗氧化损伤效果。

综上所述,山核桃外果皮提取液对于辐射引起的氧化损伤有较好的保护作用,提示该提取液有着较好的体内抗氧化效果,这为山核桃外果皮的进一步开发和利用提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 黄坚钦, 方伟, 丁雨龙, 等. 影响山核桃嫁接成活的因子分析[J]. 浙江林学院学报, 2002, 19(3): 227—230.
- [2] 何强, 姚开, 石碧. 植物单宁的营养学特性[J]. 林产化学与工业, 2001, 21(1): 80—85.
- [3] NAKAMUKA Y, TSUJI S, TONOGAI Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: application to tannic acid metabolism in the rat [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(1): 331—339.
- [4] RIEDL K M, HAGERMAN A E. Tannin-protein complexes as radical scavengers and radical sinks[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(10): 4917—4923.
- [5] 夏寿萱. 放射生物学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998: 426—466.
- [6] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 213—233.
- [7] 海春旭. 抗氧化剂、抗衰老与疾病控制的研究进展[J]. 疾病控制杂志, 2002, 6(4): 289—293.

Radioprotective effects of extract from *Carya cathayensis* nut exocarp on mice

YANG Qiong-xia¹, YIN Shu¹, SHENTU Yin¹, GAO Xin¹, SUN Yi², HU Jun-xiang¹

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, Zhejiang, China)

Abstract: Radioprotective effects of the extract from hickory (*Carya cathayensis*) nut exocarp on NIH mice which were radiated by γ ray were studied. Subject mice were randomly divided into five groups: negative control group, radiation group and three medicine groups which were given extract of different dosage. Except negative control group, all the other groups were exposed to $^{60}\text{Co}\gamma$ ray; all mice were killed in five days. Body weight, index of hemogram, content of malondialdehyde (MDA) and vitality of superoxide dismutase (SOD) were tested respectively. The results indicated that compared with negative control group, radiation group's quantity of periphery blood leucocyte, red blood corpuscles, blood platelet, hemoglobin and hematocrit significantly lowered ($P < 0.05$), and the corresponding indexes of medicine groups given extract of different dosage increased. The content of MDA in serum and liver tissue of radiation group was notably higher than negative control group ($P < 0.05$), compared with radiation group, the content of MDA of medicine groups remarkably reduced with the increase of extract dosage ($P < 0.05$). The vitality of SOD in serum and liver of radiation group was notably lower than negative control group ($P < 0.05$), compared with radiation group, the vitality of SOD of medicine groups increased and had certain dosage effect. The results suggested that the extract had good radioprotective effects on the oxidation damage caused by radiation. [Ch, 2 tab. 7 ref.]

Key words: zoology; *Carya cathayensis*; exocarp extract; *Mus musculus*; radioprotection; malondialdehyde (MDA); superoxide dismutase (SOD)