

# 补肾解毒方对辐射损伤小鼠胸腺、脾脏的影响

杨利丹<sup>1</sup>, 杨云霜<sup>2</sup>, 杜磊<sup>2</sup>, 刘长坯<sup>3</sup>, 张箫月<sup>1</sup>, 张云静<sup>1</sup>, 石鹏展<sup>2</sup>, 张蓉<sup>2\*</sup>

(1. 辽宁医学院, 辽宁省锦州市凌河区松坡路三段 40 号, 121001; 2. 第二炮兵总医院; 3. 河南中医学院)

**摘要** **目的** 观察补肾解毒方对辐射损伤小鼠的防护作用及其可能作用机制。 **方法** 将 TLR4 基因敲除 (TLR4 - / -) 小鼠和未敲除 (TLR4 + / +) 小鼠随机分为空白对照组、辐射模型组、中药组。适应性喂养 7 天后, 各空白对照组、辐射模型组小鼠均给予 0.2 ml 生理盐水, 中药组给予补肾解毒方 13.50 g / (kg · d), 连续灌胃 10 天, 第 11 天除 TLR4 + / + 和 TLR4 - / - 空白对照组外, 其余各组小鼠进行一次性 <sup>60</sup>Co γ 射线 6Gy 剂量照射, 照射后第 2 天各组继续以上剂量灌胃 14 天。观察各组小鼠辐射后存活情况, 记录各组小鼠辐射后第 1、14、30 天的体重、胸腺及脾脏质量, 计算胸腺系数、脾脏系数。 **结果** TLR4 + / + 小鼠辐射模型组在辐射后第 2 ~ 14 天共计死亡 41 只, 中药组辐射后第 7 ~ 10 天共计死亡 15 只; TLR4 - / - 小鼠辐射模型组辐射后第 5 ~ 13 天共计死亡 39 只, 中药组小鼠在辐射后第 4 ~ 13 天共计死亡 38 只。与同鼠种空白对照组相比, 辐射模型组和中药组辐射后第 1 天小鼠胸腺系数、脾脏系数均有不同程度的降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。TLR4 + / + 和 TLR4 - / - 小鼠中药组辐射后第 14、30 天胸腺系数、脾脏系数较本组辐射后第 1 天明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。TLR4 + / + 小鼠中药组辐射后第 14、30 天胸腺系数较辐射模型组明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 而 TLR4 - / - 小鼠中药组与辐射模型组比较胸腺系数、脾脏系数差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。 **结论** 补肾解毒方可能通过 TLR4 信号途径显著减轻核辐射损伤, 保护免疫器官, 有较理想的辐射防护作用。

**关键词** 辐射损伤; 补肾解毒方; 胸腺系数; 脾脏系数

辐射损伤导致的免疫功能障碍是急性放射性损伤患者最常见的并发症, 至今仍是临床上亟待解决的难题<sup>[1]</sup>。中药资源丰富、低毒、高效、防治结合等优点成为当下新型核辐射防护剂的研究热点, 但因其防护机制及作用靶点尚不明确, 限制了临床的推广及应用<sup>[2-3]</sup>。前期研究结果显示, 六味地黄丸降低辐射损伤、保护重要脏器作用显著<sup>[4-5]</sup>。我们将六味地黄丸药物组方进行优化组合, 在原方基础上熟地黄用量减半, 加冬虫夏草、白花蛇舌草形成了补肾解毒方, 并从 TLR4 信号转导途径对其抗辐射作用机制及靶点进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SPF 级健康雄性小鼠 276 只, 体重 (20 ± 2) g, 南京大学-南京生物医药研究院提供, 实验动物合

格证号: SCXK (苏) 2010-0001。其中 138 只为直接从南京大学-南京生物医药研究院购买的 C57BL/10SCNJ TLR4 基因敲除 (TLR4 - / -) 小鼠, 另外 138 只为南京大学模式动物研究所从美国 JAX 公司代购的 C57BL/10J (TLR4 + / +) 小鼠。

### 1.2 药品

补肾解毒方组成: 熟地黄 10 g, 山萸肉 12 g, 山药 10 g, 泽泻 10 g, 茯苓 10 g, 牡丹皮 10 g, 冬虫夏草 3 g, 白花蛇舌草 10 g, 由康仁堂药业有限公司配置成中药颗粒, 加无菌水配成浓度为 1.38 g/ml 的混合液。

### 1.3 主要仪器

电子天平 (赛多利斯科学仪器北京有限公司, 型号 00000246); γ 辐照装置 (北京师范大学化学学院)。

### 1.4 造模及分组

采用随机数字表法将 138 只 TLR4 + / + 小鼠分为空白对照组 (18 只)、辐射模型组 (60 只)、中

基金项目: 国家自然科学基金 (81202637)

\* 通讯作者: zhangrongyisheng@sina.com, 18910883017

药组 (60 只); 138 只 TLR4 - / - 小鼠分为空白对照组 (18 只)、辐射模型组 (60 只)、中药组 (60 只)。除空白对照组外, 其余各组均一次性接受  $\gamma$  辐照装置放射的  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线, 总时长 5 min, 剂量率 1.2 Gy/min。由于实验动物品系的不同, 在前期研究<sup>[4]</sup>基础上分别给予小鼠 5Gy、6Gy、7Gy 辐射剂量进行预实验处理, 发现 6Gy 是本实验最为合适的剂量。

### 1.5 给药方法

小鼠适应性喂养 7 天后, 每天 08:00 TLR4 - / - 和 TLR4 + / + 小鼠空白对照组、辐射模型组给予 0.2 ml 生理盐水, TLR4 - / - 和 TLR4 + / + 小鼠中药组给予补肾解毒方 13.50 g / (kg · d), 连续灌胃 10 天, 第 11 天进行一次性  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线照射, 照射后第 2 天继续以上剂量灌胃 14 天。

### 1.6 观察指标及方法

实验期间观察小鼠一般状况, 包括精神、毛色、体重、饮食、活动等情况并记录各组小鼠死亡时间及鼠数。TLR4 - / - 和 TLR4 + / + 小鼠空白对照组分别于辐射后第 1、14、30 天各取材 6 只; TLR4 - / - 和 TLR4 + / + 小鼠辐射模型组、中药组分别于辐射后第 1 天取材 7 只, 第 14 天取材每组存活小鼠数量的 1/2, 第 30 天取材每组剩余存活的小鼠, 取材不成功者不纳入统计。眼球取血处死后摘取小鼠的胸腺和脾脏, 用滤纸吸干残血后称重, 分别除以小鼠体重, 得到胸腺系数和脾脏系数。解剖观察自然死亡小鼠脏器异常。

### 1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学处理, 计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠死亡情况

辐射前 TLR4 + / + 小鼠辐射模型组 57 只, 中

药组 55 只, TLR4 - / - 小鼠辐射模型组、中药组各 58 只。TLR4 + / + 小鼠辐射模型组在辐射后第 2 ~ 14 天共计死亡 41 只, 中药组辐射后第 7 ~ 10 天共计死亡 15 只; TLR4 - / - 小鼠辐射模型组辐射后第 5 ~ 13 天共计死亡 39 只, 中药组小鼠辐射后第 4 ~ 13 天共计死亡 38 只。

### 2.2 各组小鼠一般情况观察

TLR4 - / - 和 TLR4 + / + 小鼠空白对照组在整个实验阶段一般情况良好, 毛色光亮, 体重、饮食均正常。其余各组小鼠辐射后第 1 天均出现烦躁不安、易惊恐、饮食量下降等情况; 第 2 天后出现精神萎靡, 毛色晦暗甚至片状脱毛, 饮食量明显下降, 体重普遍减轻。自然死亡的小鼠有出血迹象, 解剖发现部分小鼠有腹水、肝肿大、肝脾小结节, 肝脏、肾脏表面有成片点状脓肿, 胃黏膜损伤, 肠梗阻、肠胀气, 个别小鼠出现甲状腺肿大、生殖器淤血等现象, 其余脏器肉眼下未见明显异常。

### 2.3 各组小鼠不同时间点胸腺系数比较

表 1 示, 与本鼠种空白对照组比较, 辐射模型组和中药组辐射后第 1、14、30 天小鼠胸腺系数均有不同程度的降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与 TLR4 + / + 辐射模型组比较, TLR4 + / + 中药组辐射后第 14、30 天胸腺系数明显升高, 并且明显高于本组辐射后第 1 天 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); TLR4 + / + 辐射模型组第 30 天胸腺系数明显低于本组辐射后第 14 天 ( $P < 0.05$ )。TLR4 - / - 辐射模型组和中药组辐射后第 14、30 天较本组辐射后第 1 天明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 而 TLR4 - / - 辐射模型组和中药组两组间各时间点比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 各组小鼠不同时间点脾脏系数比较

表 2 示, 与本鼠种空白对照组比较, 辐射模型组和中药组辐射后第 1 天小鼠脾脏系数均有不同程度的降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。TLR4 + / + 中药组辐射后第 14、30 天脾脏系数较本组辐射后第

表 1 各组小鼠辐射后第 1、14、30 天胸腺系数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 鼠种         | 组别    | 辐射后第 1 天                 | 辐射后第 14 天                                      | 辐射后第 30 天                                     |
|------------|-------|--------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| TLR4 + / + | 空白对照组 | 3.656 $\pm$ 0.439 (6)    | 3.651 $\pm$ 0.292 (6)                          | 3.677 $\pm$ 0.447 (6)                         |
|            | 辐射模型组 | 1.174 $\pm$ 0.290 ** (7) | 1.793 $\pm$ 0.205 ** (5)                       | 0.913 $\pm$ 0.199 *** (4)                     |
|            | 中药组   | 0.942 $\pm$ 0.186 ** (7) | 2.330 $\pm$ 0.230 ** $\Delta\Delta\Delta$ (12) | 2.107 $\pm$ 0.280 ** $\Delta\Delta\Delta$ (8) |
| TLR4 - / - | 空白对照组 | 2.281 $\pm$ 0.256 (6)    | 2.164 $\pm$ 0.228 (6)                          | 2.274 $\pm$ 0.222 (6)                         |
|            | 辐射模型组 | 0.417 $\pm$ 0.079 ** (7) | 1.245 $\pm$ 0.159 ** $\Delta\Delta$ (5)        | 1.314 $\pm$ 0.190 ** $\Delta\Delta$ (5)       |
|            | 中药组   | 0.401 $\pm$ 0.048 ** (7) | 1.163 $\pm$ 0.174 ** $\Delta\Delta$ (6)        | 1.438 $\pm$ 0.262 * $\Delta$ (5)              |

注: 与同鼠种空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与同鼠种辐射模型组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与本组辐射后第 1 天比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与本组辐射后第 14 天比较, #  $P < 0.05$ ; ( ) 内为鼠数

表 2 各组小鼠辐射后第 1、14、30 天脾脏系数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 鼠种         | 组别    | 辐射后第 1 天            | 辐射后第 14 天                        | 辐射后第 30 天                        |
|------------|-------|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| TLR4 + / + | 空白对照组 | 4.470 ± 0.213 (6)   | 4.589 ± 0.344 (6)                | 4.634 ± 0.275 (6)                |
|            | 辐射模型组 | 2.661 ± 0.503* (7)  | 3.880 ± 0.562 (5)                | 3.648 ± 0.528 (4)                |
|            | 中药组   | 2.016 ± 0.354** (7) | 3.838 ± 0.868 <sup>△△</sup> (12) | 4.464 ± 0.404 <sup>△△</sup> (8)  |
| TLR4 - / - | 空白对照组 | 3.697 ± 0.392 (6)   | 3.531 ± 0.187 (6)                | 3.730 ± 0.241 (6)                |
|            | 辐射模型组 | 1.891 ± 0.213** (7) | 3.477 ± 0.361 <sup>△△</sup> (5)  | 4.938 ± 0.458 <sup>△△▲</sup> (5) |
|            | 中药组   | 1.738 ± 0.110** (7) | 5.622 ± 0.915 <sup>△△</sup> (6)  | 5.831 ± 0.930 <sup>△</sup> (5)   |

注: 与同鼠种空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与本组辐射后第 1 天比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与本组辐射后第 14 天比较,  $\Delta P < 0.05$ ; () 内为鼠数

1 天明显升高 ( $P < 0.01$ ); TLR4 - / - 辐射模型组和中药组辐射后第 14、30 天脾脏系数较本组辐射后第 1 天亦明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。TLR4 - / - 辐射模型组辐射后第 30 天脾脏系数较本组辐射后第 14 天明显升高 ( $P < 0.05$ )。TLR4 + / + 及 TLR4 - / - 中药组与本鼠种辐射模型组比较, 各时间点脾脏系数差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

中医理论认为, 高能射线具火热邪气的特点, 热毒蕴于体内, 充斥三焦<sup>[4]</sup>。补肾解毒方是由滋阴补肾代表方六味地黄丸优化组合而来, 在原方基础上熟地黄用量减至 10 g, 加冬虫夏草 3 g、白花蛇舌草 10 g, 在滋阴补肾的同时亦有补益气血、固护正气、清热解毒之效。免疫系统是电离辐射损伤最为敏感的靶器官之一, 主要表现在核辐射会诱导机体产生一系列特异性和非特异性免疫应答, 使组织器官处于强烈的应激损伤状态, 释放大量的内源性危害因子<sup>[5]</sup>。TLR4 信号转导通路是目前发现的重要炎性通路之一, 是辐射免疫损伤的重要途径<sup>[6]</sup>。

本研究结果显示, TLR4 + / + 小鼠中药组有明显的辐射防护作用, 而补肾解毒方对 TLR4 - / - 小鼠未显示出明显的辐射防护作用。从初始死亡时间方面考虑, TLR4 + / + 中药组开始出现死亡的时间晚于 TLR4 + / + 辐射模型组及 TLR4 - / - 辐射模型组和中药组, 而 TLR4 - / - 辐射模型组与 TLR4 - / - 中药组相比无明显差异, TLR4 + / + 中药组对辐射耐受力明显强于其他 3 组, 说明补肾解毒方对 TLR4 - / - 小鼠的核辐射损伤不能发挥较好的防护效应。从死亡数量方面考虑, TLR4 + / + 中药组死亡数量明显低于其他 3 组, TLR4 - / - 辐射模型组与 TLR4 - / - 中药组相比无明显差异, TLR4 + / + 中药组对辐射抵抗力明显优于其他 3 组, 说明补肾解毒方对 TLR4 - / - 小鼠的辐射损伤不能发挥较

好的防护效应。以上结果显示, 补肾解毒方对 TLR4 + / + 小鼠具有很好的辐射防护效应, 可减轻辐射损伤、延长存活时间, 可能通过 TLR4 信号转导通路发挥防护效应。

胸腺、脾脏是机体重要的免疫器官, 是免疫细胞发生、分化、发育和成熟的场所, 对于维持机体免疫功能起着重要的作用, 其脏器系数可在一定程度上反映机体免疫功能的强弱<sup>[7]</sup>。本实验结果显示, 辐射后第 1、14、30 天 TLR4 + / + 和 TLR4 - / - 小鼠胸腺系数明显下降, 辐射后第 14 天辐射模型组和中药组均有不同程度的恢复, 但均未恢复至正常水平, 且 TLR4 + / + 中药组恢复最快, 表明补肾解毒方可增强机体免疫识别能力。辐射后第 14、30 天 TLR4 + / + 中药组胸腺系数比辐射模型组升高, 而 TLR4 - / - 辐射模型组、中药组相比无明显差异, 初步考虑辐射第 14 天以后 TLR4 信号通路介导的炎性反应对胸腺有损伤作用, 补肾解毒方可以减轻这种损伤, 对胸腺有保护作用。辐射后第 1 天 TLR4 + / + 和 TLR4 - / - 小鼠脾脏系数亦明显下降, 辐射后第 14、30 天 TLR4 + / + 和 TLR4 - / - 中药组脾脏系数明显升高, 并且以 TLR4 - / - 中药组升高最明显, 表明补肾解毒方可以增强辐射后脾脏的修复能力, 从而使机体免疫力得到提高, 防病抗病能力得到加强。

综上所述, 补肾解毒方可能通过 TLR4 信号转导通路发挥辐射防护作用, 延长辐射损伤小鼠存活时间、提高存活率, 增强胸腺、脾脏的组织修复能力, 提高免疫器官脏器系数, 在提高机体免疫力的同时也有效抑制机体的自身炎性损伤, 从而发挥免疫抑制作用。

### 参考文献

- [1] TAJIMA G, DELISLE AJ, HOANG K, et al. Immune system phenotyping of radiation and radiation combined injury in outbred mice [J]. Radiat Res, 2013, 179(1): 101-112.

- ④ 黄黎明, 石鹏, 张琳静, 等. 抗辐射复方中药对辐射损伤小鼠的防护作用研究 [J]. 中国药事, 2011, 25(2): 132-134.
- ⑤ 杨映雪, 陈建业, 费中海, 等. 黄芪总黄酮对辐射损伤小鼠的防护作用研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(4): 504-507.
- ⑥ 杨云霜, 张蓉, 李延晖, 等. 中药对免疫器官抗核辐射损伤的实验研究 [J]. 湖北中医药大学学报, 2013, 15(2): 21-23.
- ⑦ 瞿彬, 张蓉, 杨云霜, 等. 中药对辐射致大鼠造血系统损伤的干预作用 [J]. 中国医药, 2013, 8(12): 1734-1737.
- ⑧ 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.

- ⑨ 杨晓云, 马琼, 潘秀颖, 等. 6Gy  $\gamma$  射线对小鼠 Th17 细胞含量和血清 IL-17A 含量的影响 [J]. 感染、炎症、修复, 2013, 14(1): 19-21.
- ⑩ LEWIS W, SIMANYI E, LI H, et al. Regulation of ultra-violet radiation induced cutaneous photoimmunosuppression by Toll-Like Receptor-4 [J]. Arch Biochem Biophys, 2011, 508(2): 171-177.
- ⑪ 毛建平, 方静, 周颖, 等. 免疫调节剂与辐射损伤所致免疫损伤对辐射免疫重建的启示 [J]. 军事医学科学院院刊, 2010, 34(5): 480-484.

# The Effect of *Bushen Jiedu Fang* (补肾解毒方) on Thymus and Spleen of Mice with Radiation Injury

YANG Lidan<sup>1</sup>, YANG Yunshuang<sup>2</sup>, DU Lei<sup>2</sup>, LIU Changpi<sup>3</sup>, ZHANG Xiaoyue<sup>1</sup>, ZHANG Yunjing<sup>1</sup>, SHI Pengzhan<sup>2</sup>, ZHANG Rong<sup>2</sup>

(1. Liaoning Medical University, Liaoning 121001; 2. General Hospital of the Second Artillery Force; 3. Henan College of Chinese Medicine)

**ABSTRACT Objective** To observe the protective effect and possible mechanism of *Bushen Jiedu Fang* (补肾解毒方) on mice with radiation injury. **Methods** Randomly divided mice of TLR4 gene knockout (TLR4 -/-) and none knockout (TLR4 +/+) into blank control group, radiation model group and Chinese medicine group. Gave normal saline 0.2 ml to mice in the blank control group and the radiation model group, and the Chinese medicine group was given *Bushen Jiedu Fang* 13.50 g/(kg · d) after adaptive feeding for 7 days. Mice in all groups except the TLR4 +/+ and TLR4 -/- blank control group were given one-time <sup>60</sup>Co  $\gamma$  ray 6Gy dose exposure after 11 days of gavage. Each group continued to receive 14-day gavage of above dose the second day after exposure. Observed the survival condition of mice after radiation exposure. Recorded the body weight and the weight of thymus and spleen, on the first, 14th, and 30th day after radiation. Calculated thymus coefficient and spleen coefficient. **Results** TLR4 +/+ mice in the radiation model group which died 2 to 14 day after radiation exposure counted up to 41 in total, while that of the Chinese medicine group counted up to 15 mice during 7 to 10 day after radiation; TLR4 -/- mice in the radiation model group which died 5 to 13 day after radiation exposure counted up to 39 in total, while that of the Chinese medicine group counted up to 38 mice during 4 to 13 day after radiation; Compared to the same mice type in the blank control group, thymus coefficient and spleen coefficient of mice in the radiation group and the Chinese medicine group decreased to different degrees one day after treatment ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Thymus coefficient and spleen coefficient of TLR4 +/+ and TLR4 -/- mice in the Chinese medicine group 14 and 30 day after radiation remarkably increased compared to that of this group one day after treatment ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Thymus coefficient of TLR4 +/+ mice in the Chinese medicine group 14 and 30 day after radiation remarkably increased compared to that of the radiation model group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); But thymus coefficient and spleen coefficient of TLR4 -/- mice in the Chinese medicine group had no statistical difference with that of the radiation model group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** *Bushen Jiedu Fang* may remarkably decreased nuclear radiation injury and protect immune organ through TLR4 signal passage. It had good radiation-defending function.

**Keywords** radiation injury; *Bushen Jiedu Fang*; thymus coefficient; spleen coefficient

(收稿日期: 2015-03-26; 修回日期: 2015-07-08)

[编辑: 邓媛]