# 补肾解毒方对辐射所致造血系统损伤的防护作用研究

张箫月[1]　杨云霜[1]　杜　磊[1]　刘　刃[2]　杨利丹[1]　张云静[1]　张　蓉[3]

**摘要**　**目的**　研究补肾解毒方对辐射所致造血系统损伤的防护作用。**方法**　将 C57BL/10J 小鼠(TLR4 +/+)及 TLR4 基因敲除小鼠(TLR4 −/−)随机分为空白对照组、辐射模型组、补肾解毒方组。分别于辐射后第 1、14、30 d 取材,观察小鼠一般情况,检测各组小鼠红细胞数、白细胞数、血小板数;取小鼠股骨标本,制作骨髓切片,观察骨髓标本病理形态学变化。**结果**　与空白对照组比较,辐射后 1 d 小鼠白细胞、红细胞、血小板均下降或呈下降趋势。辐射后 14 d 小鼠红细胞和血小板下降显著($P<0.01$, $P<0.05$);TLR4 +/+补肾解毒方组白细胞、血小板数目高于其他 2 组($P<0.01$, $P<0.05$)。辐射后 30 d 小鼠红细胞、血小板与空白对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),TLR4 +/+补肾解毒方组血小板与正常值最为接近。白细胞明显回升,但与空白对照组,比较差异仍有统计学意义($P<0.01$),TLR4 +/+补肾解毒方组白细胞恢复最快;除 TLR4 +/+补肾解毒方组外,光学显微镜观察辐射后其他小鼠骨髓结构均遭到不同程度破坏。**结论**　补肾解毒方能通过 TLR4 信号通路减轻辐射所致的造血系统损伤,起到显著的辐射防护作用。

**关键词**　补肾解毒方;辐射;造血功能;防护作用

Bushen Jiedu Recipe Protected Radiation Induced Hematopoietic Injury

ZHANG Xiao-yue[1], YANG Yun-shuang[1], DU Lei[1], LIU Ren[2], YANG Li-dan[1], ZHANG Yun-jing[1], and ZHANG Rong[3]

*1 Department of TCM and Rehabilitation Medicine, PLA Rocket Force General Hospital, Beijing (100088); 2 Department of Medical Affairs, PLA Rocket Force General Hospital, Beijing (100088); 3 TCM Clinical Research Laboratory, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100053)*

ABSTRACT　**Objective**　To observe the protective effects of Bushen Jiedu Recipe (BJR) on radiation induced hematopoietic injury. **Methods**　C57BL/10J mice TLR4 gene (TLR4 +/+) and knockout mice (TLR4 −/−) were randomly divided into 3 groups, the blank control group, the radiation model group, the BJR group. Sampling was respectively performed at day 1, 14, and 30 after radiation. The general condition of mice was observed. White blood cell (WBC), red blood cell (RBC), and platelet (PLT) were counted in each group. Thigh bone of mice was collected for bone marrow specimen. Bone marrow slice was prepared. Pathomorphological changes were observed under electron microscope. **Results**　Compared with the blank control group, WBC, RBC, and PLT all decreased or showed a decreasing tendency after one day radiation. RBC and PLT significantly decreased after 14 days of radiation ($P<0.01$, $P<0.05$). Counts of WBC and RBC were higher in the TLR4 +/+ BJR group than in the rest 2 groups ($P<0.01$, $P<0.05$). No statistical difference in RBC or PLT between mice after 30 days of radiation and mice in the blank control group ($P>0.05$). PLT count in the TLR4 +/+ BJR group was most approximate to the normal value. WBC count obviously increased, but still with statistical difference as compared with the blank control group ($P<0.01$). WBC count recovered most rapidly in the TLR4 +/+ BJR group. Results under light microscope showed the structure of bone marrow was injured to different degrees in all mice

基金项目:国家自然基金青年科学基金项目(No.81202637)

作者单位:1.中国人民解放军火箭军总医院中医与康复医学科(北京 100088);2.中国人民解放军火箭军总医院医务部(北京 100088);3.中国中医科学院广安门医院中医临床研究方法重点研究室(北京 100053)

通讯作者:张　蓉,Tel:18910883010,E-mail:zhangrongyisheng@sina.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.02.0220

except those in the TLR4 +/+ BJR group. Conclusion BJR could attenuate radiation induced hematopoietic injury possibly through TLR4 signal pathway, thus playing significant radioprotective roles.

KEYWORDS Bushen Jiedu Recipe; radiation; hematopoietic function; protection

核能是解决未来能源供给问题的重要支柱,然而各国核泄露事件及核辐射暴露的核能安全问题并不容忽视。在核事故情况下,骨髓极易受损,从而导致骨髓造血功能损伤,引起出血、贫血等临床症状。中药方剂六味地黄丸具有较好的辐射防护效应[1],本研究组根据既往临床经验和实验结果,以六味地黄丸为基础对组方进行更为合理的调整,形成在研的补肾解毒方,拟从 TLR4 信号转导途径探讨补肾解毒方对辐射所致造血系统损伤的防护作用,现报告如下。

## 材料与方法

1 动物 SPF 级健康雄性小鼠 276 只,体重(20 ±2)g,由南京大学 - 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 C57BL/10SCNJ TLR4 基因敲除(TLR4 -/-)小鼠,另外 138 只小鼠为南京大学模式动物研究所从美国 JAX 公司代购的 C57BL/10J (TLR4 +/+)小鼠繁育出的子代。采用随机数字表法将 138 只 TLR4 +/+ 小鼠随机分为 TLR4 +/+ 空白对照组(18 只)、TLR4 +/+ 辐射模型组(60 只)、TLR4 +/+ 补肾解毒方组(60 只);采用随机数字表法将 138 只 TLR4 -/- 小鼠随机分为 TLR4 -/- 空白对照组(18 只)、TLR4 -/- 辐射模型组(60 只)、TLR4 -/- 补肾解毒方组(60 只)。

2 药物 补肾解毒方(熟地 10 g 山茱萸 12 g 山药 10 g 牡丹皮 10 g 茯苓 10 g 泽泻 10 g 冬虫夏草 3 g 白花蛇舌草 10 g 组成)由康仁堂药业颗粒剂配置而成。

3 试剂及仪器 电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司,型号 00000246);光学显微镜(奥林巴斯中国有限公司,型号 BS53);γ 辐照装置(北京师范大学化学学院)。

4 方法

4.1 造模及给药方法 每天上午 8:00 给予中药组补肾解毒方灌胃 0.2 mL,空白对照组及辐射模型组给予等容积生理盐水灌胃,连续 10 d,第 11 d 除空白对照组外,其余 4 组小鼠均一次性接受 γ 辐照装置放射的 60Co γ 射线 6Gy 的全身照射,剂量率 1.2Gy/min,总时长 5 min。之后继续上述方法灌胃 14 d。小鼠给药量按人体给药量换算成小鼠等效剂量[2],给药剂量为 13.50 g/(kg·d)。因此,将每 25 g 中药颗粒加无菌水配成 18 mL 浓度为 1.38 g/mL 的混合液,现配现用。

4.2 取材小鼠分别于辐射后第 1、14、30 d 取材,眼球采血,应用全自动生化仪进行血常规测定,检测各组小鼠红细胞数、白细胞数、血小板数;取小鼠股骨标本保存,制作骨髓切片,电镜观察骨髓标本病理形态学变化。

4.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

1 各组小鼠一般情况 空白对照组(TLR4 -/- 和 TLR4 +/+)小鼠在整个实验阶段一般情况良好,毛色光亮,体重、饮食均在正常水平。其余各组小鼠辐射后次日均出现狂躁、易惊恐、饮食量下降等情况;第 2 天后开始精神萎靡,毛色暗淡甚至片状脱毛,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,解剖可见部分小鼠有腹水、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、生殖器瘀血等现象,余脏器肉眼下未见明显异常。

2 辐射后各组小鼠白细胞计数动态变化比较(表 1) 辐射后 1、14、30 d,与空白对照组比较,辐射模型组小鼠白细胞均有不同程度的降低($P < 0.01$),辐射后第 1、14 d TLR4 +/+ 补肾解毒方组白细胞明显高于 TLR4 +/+ 辐射模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 TLR4 -/- 补肾解毒方组与 TLR4 -/- 辐射模型组比较均无统计学意义($P > 0.05$);与同组辐射后第 1 d 比较,TLR4 -/- 辐射模型组第 14 d 白细胞明显下降($P < 0.01$);辐射后 30 d,各组小鼠白细胞均明显回升,与同组辐射后 1、14 d 比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 辐射后各组小鼠红细胞计数动态变化比较(表 2) 辐射后 1 d,与空白对照组比较辐射模型组红细胞计数差异无统计学意义($P > 0.05$);辐射后14 d,红细胞减少($P < 0.01$);与同时间点模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);辐射后 30 d,TLR -/- 辐射组及 TLR -/- 补肾解毒方组组小鼠红细胞回升明显。与辐射后第 1 d 比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

**表 1**　辐射后各组小鼠白细胞计数动态变化比较　($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | $n$ | 白细胞($\times 10^9$/L) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 辐射后第 1 d | 辐射后第 14 d | 辐射后第 30 d |
| TLR +/+空白对照 | 18 | 10.27 ±1.21 | 9.86 ±1.66 | 12.11 ±1.69 |
| TLR +/+辐射模型 | 60 | 0.48 ±0.13$^{**}$ | 0.60 ±0.13$^{**}$ | 4.48 ±0.37$^{**\blacktriangle\blacktriangle\circ\circ}$ |
| TLR +/+补肾解毒方 | 60 | 1.30 ±0.29$^{\triangle\triangle}$ | 1.32 ±0.14$^{\triangle\triangle}$ | 5.80 ±0.65$^{\blacktriangle\blacktriangle\circ\circ}$ |
| TLR −/−空白对照 | 18 | 8.90 ±0.65 | 7.48 ±0.97 | 9.19 ±0.75 |
| TLR −/−辐射模型 | 60 | 0.44 ±0.05$^{**}$ | 0.25 ±0.04$^{**\blacktriangle\blacktriangle}$ | 4.35 ±0.47$^{**\blacktriangle\blacktriangle\circ\circ}$ |
| TLR −/−补肾解毒方 | 60 | 0.54 ±0.08 | 0.65 ±0.11$^{\triangle\triangle}$ | 3.36 ±0.66$^{\blacktriangle\circ}$ |

注：与同种空白对照组同期比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与同种辐射模型组同期比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$；与本组第 1 d 比较，$^{\blacktriangle}P<0.05$，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$；与本组第 14 d 比较$^{\circ}P<0.05$，$^{\circ\circ}P<0.01$；下表同

**表 2**　辐射后各组小鼠红细胞计数动态变化比较　($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | $n$ | 红细胞($\times 10^{12}$/L) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 辐射后第 1 d | 辐射后第 14 d | 辐射后第 30 d |
| TLR +/+空白对照 | 18 | 10.20 ±0.25 | 9.64 ±1.19 | 10.60 ±0.57 |
| TLR +/+辐射模型 | 60 | 9.89 ±0.72 | 5.63 ±0.87$^{**\blacktriangle\blacktriangle}$ | 4.48 ±0.37$^{\circ\circ}$ |
| TLR +/+补肾解毒方 | 60 | 10.45 ±0.21 | 6.12 ±0.62$^{\blacktriangle\blacktriangle}$ | 5.80 ±0.65$^{\circ\circ}$ |
| TLR −/−空白对照 | 18 | 10.70 ±0.44 | 10.78 ±0.37 | 10.81 ±0.35 |
| TLR −/−辐射模型 | 60 | 10.61 ±0.61 | 4.16 ±0.60$^{**\blacktriangle\blacktriangle}$ | 9.73 ±0.68$^{\circ\circ}$ |
| TLR −/−补肾解毒方 | 60 | 10.22 ±0.78 | 6.20 ±0.97$^{\blacktriangle\blacktriangle}$ | 10.79 ±0.26$^{\circ\circ}$ |

**表 3**　辐射后各组小鼠血小板计数动态变化　($\bar{x} \pm s$)

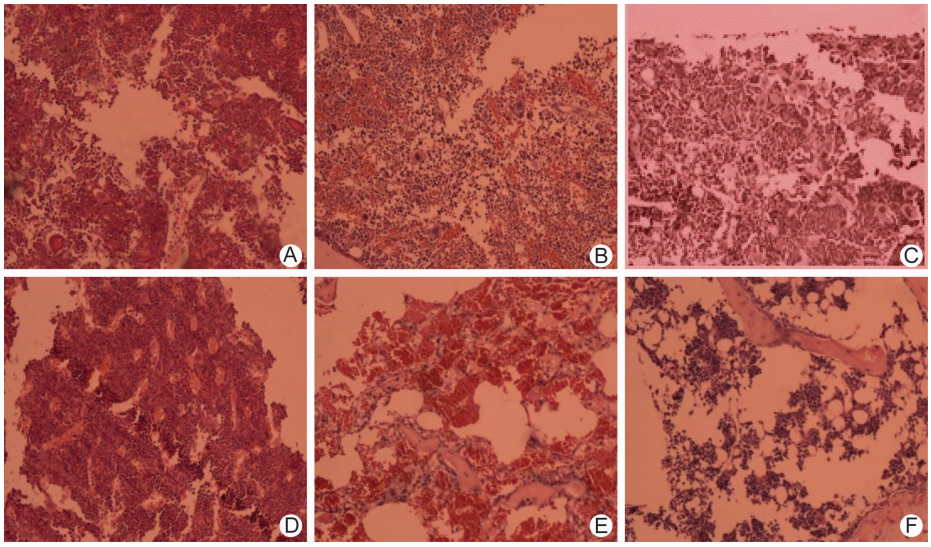
| 组别 | $n$ | 血小板($\times 10^9$/L) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 辐射后第 1 d | 辐射后第 14 d | 辐射后第 30 d |
| TLR +/+空白对照 | 18 | 966.7 ±45.7 | 939.6 ±160.4 | 931.0 ±106.9 |
| TLR +/+辐射模型 | 60 | 947.6 ±104.1 | 142.9 ±24.8$^{**\blacktriangle\blacktriangle}$ | 771.6 ±129.4$^{\circ}$ |
| TLR +/+补肾解毒方 | 60 | 1124.7 ±216.1 | 291.7 ±71.7$^{\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle}$ | 904.3 ±161.9$^{\circ\circ}$ |
| TLR −/−空白对照 | 18 | 991.7 ±58.3 | 1 005.8 ±17.4 | 1 028.2 ±32.3 |
| TLR −/−辐射模型 | 60 | 677.9 ±38.5$^{**}$ | 71.0 ±16.3$^{**\blacktriangle\blacktriangle}$ | 844.4 ±152.3$^{\circ\circ}$ |
| TLR −/−补肾解毒方 | 60 | 718.5 ±134.5 | 89.3 ±8.9$^{\blacktriangle\blacktriangle}$ | 901.4 ±154.9$^{\circ\circ}$ |

4　辐射后各组小鼠血小板计数动态变化比较(表3)　辐射后1 d，除TLR4 +/+补肾解毒方组血小板略有上升外，其他各组血小板均下降，其中TLR4 −/−辐射模型组与空白对照组比较，差异有统计学意义($P<0.01$)；辐射后 14 d，与空白对照组比较，各辐射模型组小鼠血小板下降明显(均$P<0.01$)，TLR4 +/+补肾解毒方组血小板明显高于TLR4 +/+辐射模型组，差异有统计学意义($P<0.01$)；辐射后30 d，各组小鼠血小板迅速回升，与辐射后第 1 d 比较，差异有统计学意义($P<0.05$，$P<0.01$)。

5　各组小鼠骨髓标本病理学变化(图1)　正常小鼠骨髓标本切片可见骨髓结构整齐，排列紧密有致，黏膜结构完整，有核细胞增生活跃，造血细胞比例正常。TLR +/+及 TLR-/−空白对照组骨髓切片形态同正常小鼠。辐射后 TLR +/+辐射模型组骨髓结构疏松，排列紊乱，粒细胞增生明显。TLR-/− 辐射模型组骨髓结构已不完整，排列遭到明显破坏，细胞呈团状聚集凝结。TLR −/− 补肾解毒方组骨髓结构重度疏松，部分组织已遭破坏，脂肪细胞增生。TLR4 +/+补肾解毒方组骨髓结构整齐，排列紧密，粒红比例正常，最接近空白对照组。

## 讨　论

核能是通过核反应从原子核释放的能量，其释放能量巨大而被应用于各个领域。生物制品类抗辐射药物研发取得了长足的进展，但其开发应用仍存在一些难点[3]。中药资源丰富多样，某些药效中具有不反弹、不耐药的特点，不良反应小，具有增强免疫和改善造血功效，在抗核辐射方面具有得天独厚的优势。核辐射类同六淫之火(热)邪，俱为阳邪，燔灼炎上，易耗气伤津，伤风动血。五脏中肾主水，藏精，火热易伤肝肾之阴，动摇人之根本。核辐射其致病




注:A 为 TLR +/+空白对照组;B 为 TLR +/+辐射模型组;C 为 TLR +/+补肾解毒方组;D 为 TLR −/−空白对照组;E 为 TLR −/−辐射模型组;F 为 TLR −/−补肾解毒方组

**图 1** 各组小鼠骨髓标本病理变化(HE 染色,×100)

发病及防治均与肾阴亏虚密切相关[4],六味地黄丸肝脾肾并补,尤补肾之真阴。现代研究表明六味地黄丸具有调节机体免疫、抗肿瘤的作用[5]。补肾解毒方在六味地黄丸原方基础上进行优化调整,辐射后脾胃运化功能减弱,熟地质润滋腻,故熟地用量减至 10 g,再加冬虫夏草 3 g 提高机体免疫力、白花蛇舌草 10 g 清热解毒,共奏扶正祛邪之功。

TLR 是一类病原体模式识别受体,一旦机体识别病原体即可激活核因子 κB(NF-κB)。研究认为,NF-κB 的活化可诱导细胞因子分泌,而这些细胞因子可抑制电离辐射诱导的细胞凋亡[6]。近年来,TLR4 信号通路在电离辐射损伤机制研究中备受关注[7]。TLR4 信号转导通路是目前发现的重要炎性通路之一,研究显示该通路是辐射免疫损伤的重要途径[8]。造血组织对电离辐射极为敏感,是辐射损伤的主要靶器官之一。辐射射线可导致机体出现严重造血功能障碍,同时还能降低骨髓中基质细胞的数目和分泌细胞因子的能力,进一步阻碍辐射后造血机能的恢复。保护残存造血细胞的数量、促进辐射后造血细胞的增殖及维持照后造血微环境的稳定,是治疗辐射后造血损伤的有效措施。本研究利用 TLR4 基因敲除小鼠观察辐射后补肾解毒方对辐射所致造血系统损伤的防护效应,探究其是否通过 TLR4 信号转导通路发挥作用。

电离辐射能够引起造血系统损伤,减少血中中性粒细胞和血小板的数量,最终可导致败血症、出血、贫血和死亡[9]。机体受到辐射照射后,外周血细胞几乎都经历这样一个过程:初期迅速下降,极期降到最低值,恢复期则逐步恢复[10]。本研究可见辐射后各组小鼠白细胞、红细胞、血小板变化趋势均符合此规律,辐射后 1 d 各组小鼠白细胞、血小板开始下降,白细胞在辐射后 14 d 开始回升,辐射后 30 d 大幅回升;血小板在辐射后 14 d 下降至极值,辐射后 30 d 已恢复接近正常水平。红细胞在辐射后 14 d 开始明显下降,辐射后 30 d 已接近正常水平,初步推测因小鼠取血量较少,红细胞浓度较高导致差异不明显。辐射后 1 d,TLR4 +/+补肾解毒方组白细胞保留最多,血小板数量与空白对照组相比还有上升,表明补肾解毒方能在辐射初期保护残存血细胞的数量,调动造血系统产生更多血细胞来抵抗辐射带来的损害。补肾解毒方在辐射后 14 d 干预作用最强,其发挥效应的通路为 TLR4 信号通路,能有效促进辐射后造血细胞的增殖,维持造血微环境的稳定。辐射后 30 d,各组小鼠白细胞、红细胞、血小板均得到明显回升,TLR4 +/+补肾解毒方组白细胞高于 TLR4 +/+辐射模型组,TLR4 −/−补肾解毒方组白细胞则低于 TLR4 −/−辐射模型组,TLR4 +/+补肾解毒方组血小板与正常值最为接近,再次证明补肾解毒方发挥主要效应的通路为 TLR4 信号通路,补肾解毒方能有效修复电离辐射引起的造血系统损伤,促进造血微环境趋向正常,辐射防护作用明显。电镜观察可见 TLR +/+辐射模型组、TLR −/−补肾解毒方组、TLR −/−辐射模型组小鼠骨髓结构均遭到不同程度破坏,而 TLR4 +/+补肾解毒方组骨髓结构整齐,排列紧密,粒红比例正常,最接近空白对照组,有力佐证补肾解毒方能通过 TLR4

信号通路发挥辐射防护效应,修复电离辐射引起的骨髓造血系统损伤。

综上所述,补肾解毒方通过 TLR4 信号转导通路发挥辐射防护作用,能有效保护残存造血细胞的数量,促进辐射后造血细胞的增殖,维持辐射后造血微环境的稳定,从而保护了机体的造血功能,为机体进一步恢复奠定了基础和有利条件。

## 参 考 文 献


[1] 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): 21 -23.

[2] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069 -1072.

[3] 石童,王陈,蒋辉,等. 抗辐射生物药物的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2014, 41(6): 658 -662.

[4] 张蓉,石鹏展,杨云霜,等. 从肾阴亏虚探讨核辐射损伤的中医病因病机[J]. 湖南中医药大学学报, 2014, 34(3): 40 -42.

[5] 李沫函,何文婷,张洪亮.六味地黄丸增强免疫抗肿瘤作用的研究进展[J]. 新疆中医药, 2013, 31(6): 97 -98.

[6] Gudkov AV, Komarova EA. Radioprotection: smart games with death[J]. J Clin Invest, 2010, 120(7): 2270 -2273.

[7] Rana S, Kumar R, Sultana S, et al. Radiation-induced biomarkers for the detection and assessment of absorbed radiation doses[J]. J Pharm Bioallied Sci, 2010, 2(3): 189 -196.

[8] Lewis W, Simanyi E, Li H, et al. Regulation of ultraviolet radiation induced cutaneous photoimmunosuppression by Toll-like receptor-4 [J]. Arch Biochem Biophys, 2011, 508(2): 171 -177.

[9] Dainiak N. Rationale and recommendations for treatment of radiation injury with cytokines[J]. Health Phys, 2010, 98(6): 838 -842.

[10] Dainiak N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation[J]. Exp Hematol, 2002, 30(6): 513 -528.


(收稿:2015 -06 -29　修回:2016 -11 -10)

## 第六届全国雷公藤学术会议征文通知

经中国中西医结合学会批准,定于2017 年6 月22—26 日在江苏省徐州召开“第六届全国雷公藤学术会议”。会议由中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会主办,将就近年来我国雷公藤研究中的新成就、新进展及研究热点进行学术交流和讨论。大会将邀请国内外雷公藤研究方面的知名专家和学者参加会议,欢迎从事雷公藤的基础、临床研究人员和相关人员踊跃投稿和参会。

**征文内容**　(1)雷公藤的基础研究;(2)雷公藤相关制剂的研究;(3)雷公藤在各科的临床应用。

**征文要求**　应征论文须提供全文及 400 ~800 字左右的摘要,请将论文及摘要的电子稿用 E-mail 发到大会组委会专用信箱 pfkxh@126.com,并注明“雷公藤投稿”。稿件中请务必注明单位详细地址、单位名称、邮编、作者姓名及联系电话。

**截稿日期**　2017 年5 月10 日。

**联系方式**　联系人:卫凤莲,电话 021 -81885497 或 18019481480。

**说明**　本会将对符合要求的论文作者发会议通知,其论文将编入大会论文集并发论文证书。参加会议者将获得国家级继续医学教育Ⅰ类学分 6 分,会议还将评选优秀论文,并颁发奖励证书。

中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志