

·论著·

两种苯丙烯酸类丹皮酚酯抗辐射作用初探

龙伟 靳瑾 白佳丽 巩伟民 沈秀 周则卫

【摘要】目的 观察两种苯丙烯酸类丹皮酚酯化合物——4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯和4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯的抗辐射作用。**方法** 以 ICR 小鼠为研究对象,通过相关脏器系数、白细胞数、血小板数、股骨有核细胞数和股骨骨髓 DNA 含量等指标,考察两个目标化合物低、中、高剂量下的抗辐射损伤效应。**结果** 与空白对照组比较,4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯和4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯均可以提高受照小鼠的骨髓 DNA 含量和脾结节数、增大脾系数和胸腺系数,并使血小板数得到一定的恢复。**结论** 4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯和4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯对小鼠辐射损伤具有一定的保护作用。

【关键词】 丹皮酚; 苯丙烯酸; 辐射损伤, 实验性; 抗辐射

A preliminary study on anti-radiation effects of two cinnamic paeonol ester compounds LONG Wei, JIN Jin, BAI Jia-li, GONG Wei-min, SHEN Xiu, ZHOU Ze-wei. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Corresponding author: ZHOU Ze-wei, Email: zhouzewe@irm-cams.ac.cn

【Abstract】Objective To study the anti-radiation effect of two cinnamic paeonol ester compounds. **Method** The index like white blood cell count, platelet count, bone marrow nucleated cells count, DNA and other organ index on ICR mice were observed to investigate the anti-radiation effect of the two compounds in high, medial and low dosages. **Results** Compared to the control group, the increase of DNA content in marrow, the number of splenic nodules, splenic index and thymus index have been observed in group of 4-methyl cinnamic acid paeonol ester and 4-fluoro cinnamic acid paeonol ester. **Conclusion** 4-methyl cinnamic acid paeonol ester and 4-fluoro cinnamic acid paeonol ester both have the protection effect against radiation damage.

【Key words】 Paeonol; Cinnamic acid; Radiation injuries, experimental; Anti-radiation

抗辐射药物的研发是放射医学研究的重要内容,一直以来,天然产物及其衍生物的抗辐射活性受到了普遍关注。丹皮酚(paeonol)为中药牡丹皮(芍药科植物牡丹的根皮)或徐长卿(萝藦科植物徐长卿的全草)的主要活性成分^[1]。其化学结构为2-羟基-4-甲氧基苯乙酮,分子式为C₉H₁₀O₃,相对分子质量为166.18。丹皮酚的药理作用十分广泛,包括镇静催眠、解热镇痛、抗炎、抗过敏、免疫调节、抗血小板聚集、抗糖尿病、抗肿瘤等。研究报告,丹皮酚具有明显的抗自由基活性和免疫增强活性^[2-5]。对丹皮酚雾化吸入影响大鼠免疫功能实验的观察显示,实验组大鼠肺巨噬细胞吞噬率比对照组

明显增高^[6]。丹皮酚对小鼠淋巴细胞转化影响的实验结果也表明,丹皮酚雾化吸入也可提高小鼠肺局部的非特异性免疫功能^[7]。

我们在丹皮酚化合物的基础上,对其结构进行修饰和优化,合成了一系列丹皮酚的衍生物,本实验对其中两种苯丙烯酸类丹皮酚酯进行了抗辐射作用的初步探索,这两种化合物的结构见图1和图2。

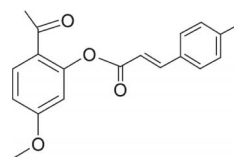
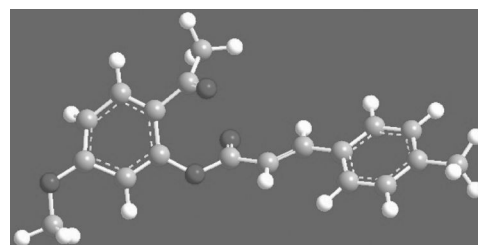


图1 4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯分子结构图

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.03.004

基金项目: 国家自然科学基金(81202153);北京协和医学院青年基金(2012D03);教育部博士点新教师基金(20121106120042);中国医学科学院放射医学研究所发展基金(SF1227)

作者单位: 300192 天津,中国医学科学院放射医学研究所,天津市分子核医学重点实验室

通信作者: 周则卫(Email: zhouzewe@irm-cams.ac.cn)

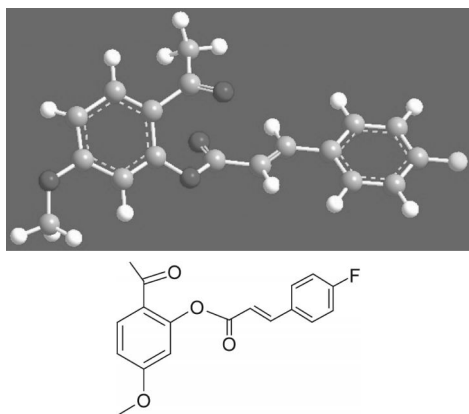


图2 4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯分子结构图

1 材料与方法

1.1 试剂及配制

阳性对照品炔雌醇由上海华联制药有限公司提供, 试验样品 4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯与 4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯(均由本实验室合成)经研细后, 用 5%羧甲基纤维素钠(购自天津科锐思精细化工有限公司)溶液配成浓度为 5、10、15 mg/ml 的混悬液, 给药时摇匀。取 0.555 g 无水 CaCl_2 , 加双蒸水 1000 ml, 完全溶解, 摇匀即得 CaCl_2 溶液。取 17.7 ml HClO_4 , 加双蒸水至 1000 ml, 摇匀即得 HClO_4 溶液。取 30 ml 冰醋酸, 加双蒸水至 1000 ml, 摇匀即得 3%醋酸液。取饱和苦味酸溶液 15 ml, 甲醛 5 ml, 冰醋酸 1 ml, 混匀即得 Bouin 氏液。

1.2 主要仪器设备

电子显微镜购自日本 Olympus 公司; LD4-2A 离心机由北京医用离心机厂提供; ^{137}Cs γ 射线辐射源由加拿大原子能有限公司提供; DU800 紫外可见分光光度计由美国贝克曼公司提供; BC-2800 全自动血液细胞分析仪由深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司提供。

1.3 实验动物

健康 ICR 小鼠 80 只, 体质量为 18~20 g, 每组 10 只, 雌雄各半, 由中国医学科学院实验动物研究所提供。将动物随机分组, 实验设空白对照组、阳性对照组(炔雌醇)以及 4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯与 4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯高(150 mg/kg)、中(100 mg/kg)、低(50 mg/kg)3 个剂量组。

1.4 实验方法

空白对照组给予 5%的羧甲基纤维素钠溶液, 阳性对照组给予炔雌醇, 空白对照组、阳性对照组

及各供试品给药组均按口服灌胃给药, 0.2 ml/只, 每天一次; 第 3 天给药 1 h 后, 所有动物均行 ^{137}Cs γ 射线一次性全身照射, 照射剂量为 6.5 Gy, 照射后连续给药 5 d。照射后第 8 天, 称取小鼠体质量, 于眼眶静脉丛取血, 加入抗凝剂乙二胺四乙酸钠(购自天津科锐思精细化工有限公司), 采用全自动血液细胞分析仪测定白细胞数和血小板数; 然后颈椎脱臼处死小鼠, 剥离出两侧股骨。一侧股骨用 10 ml 3%的醋酸冲出全部骨髓细胞, 电子显微镜下在血细胞计数盘上计数 4 个大方格内的细胞数, 所得之数乘以 2.5×10^4 , 即为一根股骨中的骨髓有核细胞数(bone marrow nucleated cell count, BMNC) [19-20]; 另一侧股骨用 10 ml CaCl_2 溶液将全部骨髓冲入离心管中, 2500 r/min, 离心 15 min (离心半径为 13.5 cm), 弃上清, 将沉淀物加入 5 ml HClO_4 溶液充分混合, 90 $^\circ\text{C}$ 加热 15 min, 冷却, 过滤, 滤液用紫外可见分光光度计在 268 nm 处测定吸光度, 得到股骨骨髓 DNA 的含量。

解剖取出胸腺、肝、脾, 称重并计算胸腺系数、脾系数, 胸腺系数(mg/g)=胸腺质量(mg)/体质量(g), 脾系数(mg/g)=脾质量(mg)/体质量(g)。将脾脏放入 Bouin 氏液内, 24 h 后肉眼计数脾结节数。

1.5 统计学处理

使用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对各项指标进行组间两两对比, 白细胞数、血小板数、BMNC、DNA 含量、脾结节数、脾系数、胸腺系数组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

实验观察了 4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯与 4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯对受照小鼠造血系统及免疫系统的作用, 与空白对照组相比, 两个化合物对受照小鼠的白细胞数、BMNC 和肝质量等无明显作用, 对血小板数、DNA 含量、脾系数、胸腺系数和脾结节数均产生了明显影响, 结果见表 1 和表 2。

由表 1 可见, 与空白对照组比较, 4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯对白细胞数和 BMNC 基本无影响; 对血小板数有显著的提高作用, 尤其是中剂量组; 对骨髓中 DNA 含量有明显的提高作用, 并且呈现一定的量效关系; 对肝质量基本无影响, 可明显减弱辐射损伤所引起的脾缩小的作用。与阳性对照组

表1 4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯对辐射损伤 ICR 小鼠的影响

组别	只数	白细胞数 ($\times 10^9/L$)	血小板数 ($\times 10^{12}/L$)	BMNC ($\times 10^6/\text{根股骨}$)	DNA 含量	肝质量 (g)	脾系数 (mg/g)	胸腺系数 (mg/g)	脾结节数
空白对照组	10	0.59±0.21	0.737±0.158	2.803±1.054	0.089±0.078	0.832±0.137	1.269±0.316	1.047±0.457	2.8±0.6
阳性对照组	10	0.70±0.31	0.823±0.336	4.045±3.313	0.291±0.207*	0.887±0.302	2.078±1.507*	0.659±0.334*	2.8±0.9
4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯低剂量组 (50 mg/kg)	10	0.47±0.35	1.121±0.239*	2.780±1.165	0.124±0.078*	0.857±0.114	1.628±0.379*	1.784±0.441#	6.2±0.7*
4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯中剂量组 (100 mg/kg)	10	0.50±0.21	1.420±0.244 [△]	2.637±0.986	0.141±0.078*	0.889±0.191	1.618±0.648*	1.430±0.694**	4.1±0.5
4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯高剂量组 (150 mg/kg)	10	0.77±0.36	1.018±0.344*	3.853±2.616	0.279±0.226 [△]	0.903±0.072	1.893±1.270*	1.183±0.547**	4.5±0.8

注：表中，BMNC 为骨髓有核细胞数；* 表示与空白对照组相比，低、高剂量组血小板数明显升高($t=4.238$ 和 2.346 , P 均 <0.05)，阳性对照组、低、中、高剂量组的 DNA 含量明显升高 ($t=2.888$ 、 1.003 、 1.491 和 2.513 , P 均 <0.05)，阳性对照组的脾系数明显升高($t=1.661$ 、 2.300 、 1.531 和 1.508 , P 均 <0.05)，阳性对照组的胸腺系数明显升高($t=2.168$, P 均 <0.05)、低剂量组的脾结节数明显升高 ($t=11.66$, P 均 <0.05)；[△]表示与空白对照组相比，中剂量组血小板数显著升高 ($t=7.430$, P 均 <0.01)；**表示与阳性对照组相比，中、高剂量组的胸腺系数均明显升高($t=1.458$ 和 0.603 , P 均 <0.05)；# 表示与阳性对照组相比，低剂量组的胸腺系数显著升高($t=3.670$, P 均 <0.01)。

表2 4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯对辐射损伤 ICR 小鼠的影响

组别	只数	白细胞数 ($\times 10^9/L$)	血小板数 ($\times 10^{12}/L$)	BMNC ($\times 10^6/\text{根股骨}$)	DNA 含量	肝质量 (g)	脾系数 (mg/g)	胸腺系数 (mg/g)	脾结节数
空白对照组	10	0.59±0.21	0.737±0.158	2.803±1.054	0.089±0.078	0.832±0.137	1.269±0.316	1.047±0.457	2.8±0.6
阳性对照组	10	0.70±0.31	0.823±0.336	4.045±3.313	0.291±0.207*	0.887±0.302	2.078±1.507	0.659±0.334	2.8±0.9
4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯低剂量组 (50 mg/kg)	10	0.52±0.27	1.250±0.447**	3.091±1.079	0.248±0.139**	0.901±0.112	1.389±0.464	1.299±0.657 [△]	4.2±0.9
4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯中剂量组 (100 mg/kg)	10	0.94±0.54	0.822±0.340	3.261±2.947	0.246±0.213*	0.761±0.112	1.128±0.290	1.052±0.424 [△]	3.3±0.2
4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯高剂量组 (150 mg/kg)	10	0.61±0.39	1.019±0.517*	2.852±1.341	0.264±0.066**	0.856±0.147	1.373±0.367	1.150±0.497 [△]	3.2±0.7

注：表中，BMNC 为骨髓有核细胞数；* 表示与空白对照组相比，高剂量组血小板数明显升高 ($t=1.650$, P 均 <0.05)，阳性对照组和中剂量组的 DNA 含量明显升高($t=2.888$ 和 2.189 , P 均 <0.05)；** 表示与空白对照组相比，低剂量组血小板数($t=3.422$, P 均 <0.01)，低剂量组和高剂量组 DNA 含量显著升高($t=3.155$ 和 5.416 , P 均 <0.01)；[△]表示与阳性对照组相比，低、中、高剂量组的胸腺系数明显增大 ($t=0.996$ 、 0.025 和 0.482 , P 均 <0.05)。

比较，4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯可明显减弱辐射损伤所引起的胸腺缩小的作用，低剂量的 4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯对胸腺的作用极其明显。

由表 2 可见，与空白对照组比较，4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯对白细胞数和 BMNC 数基本无影响；对血小板数有显著的提高作用，尤其是小剂量的 4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯；可明显提高骨髓中 DNA 的含量，并且呈现一定的量效关系。这些皆表明 4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯能够提高小鼠的造血功能。与空白对照组比较，4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯量基本无影响；脾结节数增多；而脾系数基本无变化；与阳性对照组比较，可明显减弱辐射损伤所引起的胸

腺缩小的作用，尤其是低剂量的 4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯。

3 讨论

造血系统和免疫系统对辐射最为敏感，受照后机体的造血功能和免疫功能受到明显抑制。造血功能和免疫功能的恢复是预后的关键因素。骨髓 DNA 含量和脾结节数代表机体造血功能恢复的程度，脾系数和胸腺系数代表免疫功能恢复的程度。从本实验可以看出，与空白对照组比较，4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯和 4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯均可以

(下转第 159 页)

- 150(2): 283-291.
- [5] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 2004, 432(7015): 396-401.
- [6] McCord AM, Jamal M, Williams ES, et al. CD133⁺ glioblastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16): 5145-5153.
- [7] Olive PL, Frazer G, Banáth JP. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res*, 1993, 136(1): 130-136.
- [8] Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, et al. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*, 2000, 10(15): 886-895.
- [9] Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, 2002, 296(5569): 922-927.
- [10] Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 1998, 273(10): 5858-5868.
- [11] Golding SE, Rosenberg E, Khalil A, et al. Double strand break repair by homologous recombination is regulated by cell cycle-independent signaling via ATM in human glioma cells. *J Biol Chem*, 2004, 279(15): 15402-15410.
- [12] Tarsounas M, Davies D, West SC. BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene*, 2003, 22(8): 1115-1123.

(收稿日期: 2012-11-26)

(上接第 145 页)

提高受照小鼠的骨髓 DNA 含量和脾结节数、增大脾系数和胸腺系数、使血小板数得到一定的恢复。同时,从实验结果中可以看出,4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯和 4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯的小剂量给药组对脏器系数和造血系统的影响都呈现出更好的效果,这提示我们,这两种化合物抗辐射作用的发挥可能与某种特定的机制相关联,而不是简单的剂量效应。另外,这两种化合物对骨髓中 DNA 含量的变化均产生了明显的增加效应,对骨髓有核细胞数和白细胞数也有一定的影响,但却并未观察到显著的变化趋势,这可能与实验设置的观察时间有一定关系,机体对辐射损伤的修复需要一个相对的周期,骨髓中 DNA 含量开始增加,表示细胞已经开始进行有丝分裂,机体已着手准备对损伤的修复,但在观察周期内还未影响到骨髓有核细胞数和白细胞数的增加,所以实验中骨髓有核细胞数和白细胞数的观察数据并未出现显著性差异。

综上所述,本实验结果表明,4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯和 4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯均能使辐射损伤小鼠的造血功能和免疫功能得到一定程度的恢

复,表明这两种化合物对辐射损伤具有一定的保护作用,但其抗辐射作用与相关机制的阐明需要进一步地深入研究。

参 考 文 献

- [1] 章灵华,肖培根,黄艺,等.丹皮酚的药理与临床研究进展. *中国中西医结合杂志*, 1996, 16(3): 187-190.
- [2] 戴敏,刘青云,顾承刚,等.丹皮酚对脂质过氧化反应及低密度脂蛋白氧化修饰的抑制作用. *中国中药杂志*, 2000, 25(10): 625-627.
- [3] Upasani CD, Balaraman R. Protective effect of Spirulina on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats. *Phytother Res*, 2003, 17(4): 330-334.
- [4] Lee SC, Kwon YS, Son KH, et al. Antioxidative constituents from *Paeonia lactiflora*. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(7): 775-783.
- [5] 武继彪,隋在云,管华诗.丹皮酚对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用. *中华中医药学刊*, 2008, 26(9): 1887-1888.
- [6] 孙言才,沈玉先,孙国平.丹皮酚的主要药理活性研究进展. *中成药*, 2004, 26(7): 579-582.
- [7] 应康,王玉珍.丹皮酚对小鼠淋巴细胞转化的影响. *包头医学院学报*, 2001, 17(2): 92-93.

(收稿日期: 2012-09-24)