

杜仲叶浸提物对碳离子束致小鼠急性损伤的防护作用

武振华^{1,2,3} 金雪莲⁴ 杨荣⁵ 王新宇⁶ 刘阳^{1,2,3} 王小虎⁵

刘斌^{1,2,3,6} 王振华^{1,2,3} 牛炳韬⁶ 赵卫平^{1,2,3} 张红^{1,2,3}

¹ (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000) ² (中国科学院重离子束辐射生物学重点实验室 兰州 730000)

³ (甘肃省重离子束辐射医学应用基础重点实验室 兰州 730000) ⁴ (兰州大学附属第二医院 兰州 730000)

⁵ (甘肃省肿瘤医院 兰州 730050) ⁶ (兰州大学 兰州 730000)

摘要 研究杜仲叶浸提物对碳离子束辐照小鼠急性损伤的防护效应及其可能机制。小鼠灌胃不同剂量杜仲叶浸提物7 d后, 6 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 束全身均匀辐照, 照射后12 h处死小鼠, 取其肝、肺组织, 分别用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法(TBA法)检测组织中的SOD活性和MDA含量; 用中性单细胞凝胶电泳技术(亦称彗星试验)检测组织细胞的DNA损伤; 并用流式细胞术检测组织细胞的凋亡率。和单纯辐照组相比, 预先灌服不同剂量的杜仲叶浸提物, 能有效抑制重离子束辐照引起的小鼠肺和肝组织SOD活性降低和MDA含量提高; 同时, 还能使辐照小鼠肺和肝组织细胞的拖尾率、拖尾长度和细胞凋亡率显著降低, 且有剂量效应关系。杜仲叶浸提物能显著减轻肝肺细胞DNA损伤和凋亡, 推测这与其显著消除自由基作用有关。

关键词 杜仲, $^{12}\text{C}^{6+}$, 抗辐射, 小鼠

中图分类号 TL71

随着科技的飞速发展, 核技术在生产及日常生活中得到了广泛应用, 特别在肿瘤患者的放射治疗及航天事业方面得到了充分应用。然而, 辐照也对肿瘤患者及其职业性受照人员带来了一定程度的危害, 尤其放射诊疗措施的滥用可能会造成较为严重的远期效应。已有研究表明^[1,2], 肿瘤的放射治疗可引起继发性肿瘤, 尤其胎儿或儿童更易受到伤害^[3,4]。作为临床肿瘤治疗最理想、最具前途的放疗射线^[5], 重离子束具有其独特的生物物理学优势, 当然也有难以避免的由于辐照造成的毒副作用。据报道, 重离子束辐照可导致正常机体细胞DNA链断裂^[6,7]、染色体畸变^[8]、不可逆的细胞毒性损伤^[9]以及生命周期缩短等, 其放疗的毒副作用也逐渐成为国内外科及医疗工作者关注的热点。所以, 寻求安全、高效的抗辐射损伤药物, 保护正常机体组织免受辐照损伤具有重要的意义。

杜仲(*Eucommia ulmoides*, EU), 杜仲科杜仲属植物, 以皮入药, 具有补肝肾、强筋骨、降血压、抗癌、安胎、强志、抗疲劳以及抗氧化等功效^[10,11]。近年来, 国内外学者对杜仲药理作用和成份进行了大量的研究, 结果表明, 杜仲叶与杜仲皮的化学成分非常相近^[12], 主要有木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类以及萜类化合物等^[13], 其中萜类化合物京尼

平甙具有抗氧化和抗肿瘤活性。但是, 有关杜仲提取物抗辐射方面的研究报道甚少, 为了进一步探讨其抗辐射功能, 本实验以小鼠为实验材料, 先灌服杜仲叶提取物, 然后重离子束辐照处理, 通过抗氧化酶的测定, DNA损伤和细胞凋亡的检测, 探讨其对重离子辐照的保护效应及其可能机制, 为更好地合理利用杜仲这一珍贵植物资源提供实验依据。

1 实验材料和方法

1.1 实验动物及分组

从兰州生物药械厂实验动物部购买健康昆明小鼠30只, 体重(22±0.5)g, 鼠龄7~8周, 随机分为5组: 正常对照组(Control group, CK组), 单纯辐照组(Irradiated group, IR组), 低剂量药物组(50 mg/kg, Low EU+Irradiated group, LEU+IR组)、中剂量药物组(100 mg/kg, Moderate EU+Irradiated group, MEU+IR组)和高剂量药物组(200 mg/kg, High EU+Irradiated group, HEU+IR组), 每组6只, 雌雄各半。

1.2 试剂及仪器

杜仲叶浸提物干粉, 购于甘肃省药品检验所, SOD、MDA试剂盒均由南京建成生物工程研究所

国家重点基础研究发展计划项目(973计划, 2010CB834202)、国家自然科学基金重点项目(10835011)、国家自然科学基金项目(11175222)、甘肃省自然科学基金(0803RJZA074)和中国科学院院地合作项目(Y160040YDO)资助

第一作者: 武振华, 男, 1973年7月出生, 2013年6月于兰州大学获细胞生物学专业理学博士学位, 目前在中国科学院近代物理研究所从事辐射生物学效应方面的研究工作, 助理研究员

通讯作者: 张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn.

收稿日期: 初稿 2012-11-28, 修回 2012-12-27

提供, 碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 购自上海生物工程技术服务有限公司, RNAase (AMRESCO, USA), Triton-100 (AMRESCO, USA)。IGL-16 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂), BIO-TEK power-wave X 型全自动酶标仪 (美国)。

1.3 灌胃处理

除空白对照组和单纯辐照组用生理盐水外, 低、中、高剂量药物组均灌胃给药, 每只小鼠 0.2 mL/次, 1 次/d, 连续 7 d, 常规饲养。

1.4 重离子辐射

灌胃一周后, 除空白对照组外, 其余小鼠用 6 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束全身均匀辐照处理。 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束由中国科学院近代物理研究所兰州重离子研究装置 (Heavy ions research facility at Lan-zhou, HIRFL) 提供, 采用坪区照射, 剂量率为 2 Gy/min。

1.5 组织处理

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照后 12 h 颈椎脱臼处死小鼠, 取所需肝和肺组织, PBS 清洗, 剪碎, 研磨后用 200 目尼龙网过滤, 1000 r/min 离心 5 min, 去上清, 反复 3 次, 收集细胞, 一部分 70% 冷乙醇固定, 用于细胞凋亡的检测; 另一部分用于 SOD 活力和 MDA 含量的测定以及单细胞电泳检测细胞 DNA 的损伤。

1.6 单细胞电泳技术(Single cell gel electrophoresis, SCGE)

参照 Singh 等^[14]的方法但略加改进。取 200 μL 0.5% 的常熔点琼脂糖 (55 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 加在磨毛的载玻片上, 玻璃棒刮平, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固化 5 min, 即为底层胶, 然后取 45 μL 0.6% 低熔点琼脂糖 (37 $^{\circ}\text{C}$) 与 15 μL 收集的新制备的细胞悬液混匀, 迅速铺于底层胶上, 盖玻片压平, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固化 10 min, 即为第二层胶。移去盖玻片, 将胶板浸入预冷的裂解液 (2 mol/L NaCl, 30 mmol/L Na_2EDTA , 1% 月桂酰基氨基酸钠, 10 mmol/L Tris, 1% TritonX-100, 10% DMSO; pH=10), 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 2 h, 取出胶板, PBS 冲洗 3 次 (每次约 30 min),

水平放入电泳槽, 加电泳缓冲液 (2 mmol/L Na_2EDTA , 90 mmol/L Tris, 90 mmol/L H_3BO_3), 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光放置 20 min。25 V, 100 mA 条件下电泳 25 min。40 μL 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PI 避光染色 2 min, 湿润条件, 镜检拍照, 用 CASP 分析软件测定细胞拖尾率和彗尾长度。

1.7 细胞凋亡的检测

按改进的 Dosik 等^[15]的方法, 取固定的肝和肺细胞, 室温下用 PBS 1000 r/min 离心清洗 3 次, 除去固定液乙醇, 调整细胞计数在 (1-2) $\times 10^6/\text{mL}$, 加入 0.5 mL 染色液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA 酶, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 碘化丙啶, 体积分数 0.1% TritonX-100) 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗存放 30 min, 用 Becton/Dickinson 公司 FACSCalibur 流式细胞仪 (USA) 检测, 激发光波长为 488 nm, 每个样品测定 1×10^4 细胞。ModFit LT3.0 软件分析凋亡细胞的百分比。

1.8 统计学处理

各组实验都做两次重复, 数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间差异的显著性用 t 检验方法处理。

2 结果

2.1 杜仲对重离子辐照小鼠肝和肺细胞 SOD 活性和 MDA 含量的影响

如表 1 所示, 和正常对照组相比, 小鼠经 6 Gy 的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束全身辐照处理后, 肺和肝组织细胞中 SOD 活性明显降低 ($^a p<0.001$), 而 MDA 含量显著提高 ($^a p<0.001$)。但经不同剂量的杜仲叶浸提物处理后, 和辐射对照组相比, SOD 活性明显升高 ($^b p<0.05$, $^c p<0.01$), 而 MDA 含量显著降低 ($^b p<0.05$, $^c p<0.01$), 其中高剂量组效果更为显著 ($^c p<0.01$)。表明杜仲叶浸提物处理能够有效提高辐照小鼠肺和肝组织的 SOD 活性, 同时降低膜脂过氧化产物 MDA 的含量。提示: 杜仲叶浸提物能有效逆转辐射损伤小鼠肺和肝组织中 MDA 含量的提高和 SOD 活性的降低, 且具有一定的剂量效应关系。

表 1 杜仲浸提物对重离子束辐照诱导的小鼠肺和肝组织中 SOD 和 MDA 含量的影响
Table1 Effects of extraction of *Eucommia ulmoides* Oliver leaves on the SOD activity and MDA content of mice lung and liver tissue irradiated by heavy ions ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

分组 Group	超氧化物歧化酶 SOD (U/mg protein)		丙二醛 MDA (Nmol/mg protein)	
	Liver	Lung	Liver	Lung
CK	205.91 $\pm$ 19.7	228.34 $\pm$ 22.4	15.5 $\pm$ 2.2	19.4 $\pm$ 2.0
IR	112.50 $\pm$ 23.8 ^a	119.50 $\pm$ 21.9 ^a	36.6 $\pm$ 3.7 ^a	38.1 $\pm$ 3.3 ^a
LEU+IR	139.27 $\pm$ 17.6 ^b	141.34 $\pm$ 18.4 ^b	29.9 $\pm$ 3.2 ^b	31.5 $\pm$ 3.1 ^b
MEU+IR	158.06 $\pm$ 20.7 ^b	155.48 $\pm$ 22.7 ^b	27.2 $\pm$ 1.6 ^b	26.4 $\pm$ 2.3 ^b
HEU+IR	182.41 $\pm$ 18.2 ^c	186.66 $\pm$ 25.3 ^c	24.9 $\pm$ 2.1 ^c	23.7 $\pm$ 1.8 ^c

注: ^a $p<0.001$ vs. CK, ^b $p<0.05$, ^c $p<0.01$ vs. 辐照组。

Note: ^a $p<0.001$ vs. CK, ^b $p<0.05$, ^c $p<0.01$ vs. irradiation only groups.

2.2 杜仲对重离子辐照所致小鼠肝和肺细胞 DNA 损伤的影响

荧光显微镜下，正常对照组的细胞大多呈圆形

的荧光头，表明无 DNA 断裂；而辐射对照组细胞成彗星样图像，表现为头部的中间致密，而周边松散，且细胞拖着 DNA 断裂片断所形成的彗星尾巴（见图 1）。

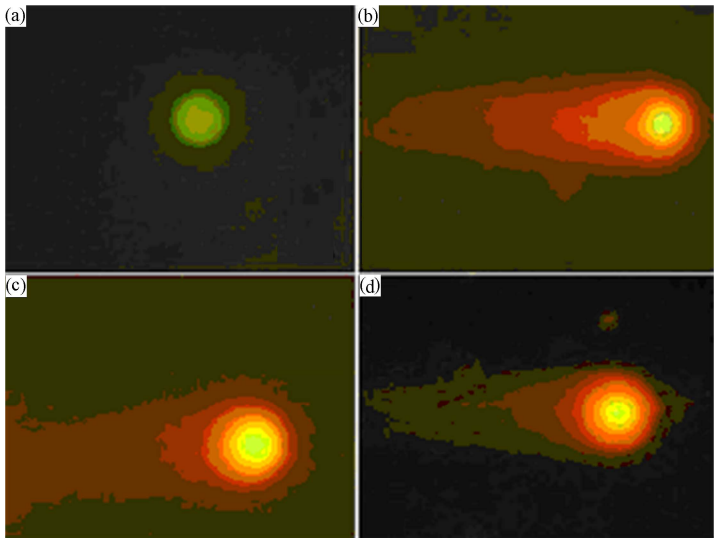


图 1 杜仲叶浸提物对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照诱导的小鼠肝细胞 DNA 损伤（单细胞凝胶电泳检测）的影响
(a) 正常对照组, (b) 单纯辐照组, (c) 低剂量药物组和 (d) 高剂量药物组

Fig.1 Effects of *Eucommia ulmoides* Oliver leaves extraction on the DNA damage of liver cells in mice induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ ions detected by SCGE: (a) CK group, (b) IR group, (c) LEU+IR group and (d) HEU+IR group

从图 2 和图 3 可以看出，和正常对照组相比，经 6 Gy 的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束全身辐照处理后，小鼠肝和肺细胞的拖尾率和拖尾细胞的尾长提高极其显著（* $p<0.001$ ）；而经过不同剂量杜仲叶浸提物处理后，与辐射对照组相比，细胞拖尾率及细胞拖尾尾长都显著降低（** $p<0.01$ ），且杜仲叶浸提物的剂量与拖尾率及拖尾细胞的尾长呈负相关，并存在一定的剂量效应关系。

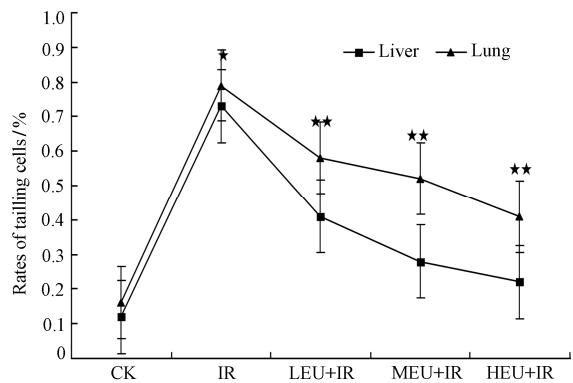


图 2 杜仲叶浸提物和 $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照诱导的小鼠肝和肺细胞 DNA 损伤的剂量效应关系

Fig.2 Dose-effects relationships between extraction of *Eucommia ulmoides* Oliver leaves and damage of liver and lung cells induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ ions in mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)
* $p<0.001$ vs CK; ** $p<0.01$ vs irradiation only group

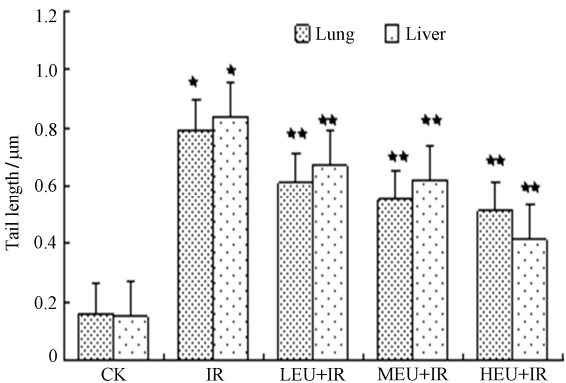


图 3 杜仲叶浸提物对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照诱导的小鼠肝和肺细胞 DNA 损伤的影响

Fig.3 Effects of extraction of *Eucommia ulmoides* Oliver leaves on the DNA damage of liver and lung cells in mice irradiated by $^{12}\text{C}^{6+}$ ions ($\bar{x} \pm s, n=6$)
* $p<0.001$ vs CK, ** $p<0.01$ vs irradiation only groups

2.3 杜仲对重离子辐照小鼠肝和肺细胞凋亡的影响

如图 4 所示，小鼠经 6 Gy 重离子束全身辐照处理后，其肝和肺组织细胞的细胞凋亡百分比与正常对照组相比均有极其明显的提高（** $p<0.001$ ）。而给予不同剂量的杜仲叶提取物之后再辐照处理，和单纯辐照组相比，肝和肺组织细胞的细胞凋亡百分比（* $p<0.05$ ，** $p<0.001$ ）显著降低了，且有较明显的剂量效应关系。

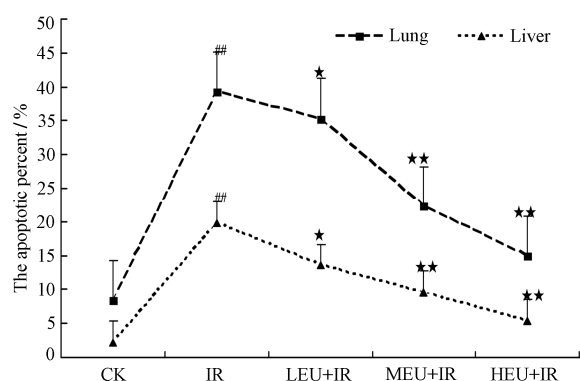


图4 杜仲叶浸提物对碳离子束辐照诱导的小鼠肝和肺细胞凋亡的影响

Fig.4 Effects of *Eucommia ulmoides* Oliver leaves extraction on the liver and lung apoptosis in mice induced by carbon ion beams ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3 讨论

活性氧自由基(ROS)是一类具有高生物活性的氧分子或含氧化合物,主要由细胞内的有氧代谢过程产生,在正常情况下,机体依靠自身存在的清除活性氧的酶系统和非酶系统维持细胞的氧化代谢稳态。当机体受射线等照射后可产生大量的ROS,引起强烈的脂质过氧化反应,并破坏核酸、蛋白质、酶等生物大分子,导致细胞和组织损伤^[16-19]。

MDA是ROS对生物膜脂质分子过氧化作用的产物,其含量反映了细胞膜成分受ROS损伤的程度和脂质过氧化的程度强弱,而SOD是天然的酶性自由基清除剂,是细胞内清除ROS的主要酶系统,衰老、电离辐射和环境污染等都能造成机体组织SOD活性降低,破坏机体氧化代谢稳态,诱发各种疾病^[12],其活性的高低也能间接反映机体清除自由基能力的大小。

研究表明,杜仲具有明显的清除ROS和自由基的作用^[20-25],其抗氧化作用的主要成分为杜仲黄酮^[26]和萜类化合物的京尼平甙等。本研究发现,重离子辐照后小鼠肺和肝组织MDA含量异常增高,而SOD活性明显降低,表明辐射损伤小鼠体内脂质过氧化反应增强,产生了大量的氧自由基。同时,清除自由基的能力下降,但小鼠经不同剂量的杜仲叶浸提物灌胃处理之后再辐照,和辐照对照组相比,SOD活性显著提高,MDA含量明显降低($p<0.05$),其中高剂量组效果最为显著($p<0.01$)。提示:杜仲叶浸提物可提高辐照损伤小鼠组织的SOD活性,及时清除机体细胞内ROS分子,有效缓解ROS对生物膜的过氧化作用(降低MDA含量),使SOD和MDA恢复到接近正常的水平,对辐射损伤小鼠有保护作用。

单细胞凝胶电泳(Single cell gel electrophoresis assay, SCGE),又称彗星实验(Comet assay),是近年来建立和逐渐发展起来的一种能够灵敏、快速、简便地检测单个细胞水平DNA链断裂的实验技术。其原理是如果细胞未受损,核DNA停留在核基质中,电泳时荧光染色呈球状而无拖尾,若细胞受到损伤,则膜结构破坏,胞内成分溢出,大分子量的DNA留在原位,损伤的DNA超螺旋松散而外渗,在电场作用下,离开核区向阳极迁移,形成拖尾。一般来说,细胞受损越严重,DNA产生碎片就越多,电泳时细胞拖尾率越高,彗尾越长。因此,电泳时细胞的拖尾率和彗尾长度就可以反映出DNA的损伤程度^[14]。本研究发现,经6 Gy的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束全身辐照处理,小鼠肺和肝细胞的拖尾率和彗尾长度都显著增加($*p<0.001$),说明 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束辐照对小鼠造成了一定的损伤,但经不同剂量的杜仲叶浸提物灌胃处理一周,再用相同剂量的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束全身辐照处理发现,与辐照对照组相比,药物组小鼠细胞拖尾率和彗尾长度都显著降低($**p<0.01$),并存在剂量效应关系。这可能是由于杜仲叶浸提物对小鼠DNA损伤修复的酶促系统活力具有诱导作用,它通过提高酶活力的间接作用,进而促进DNA断裂后粘性末端的重新连接而加速DNA的辐射损伤修复,从而减弱对小鼠细胞的DNA损伤。

研究结果提示:杜仲叶浸提物能够有效遏制辐照对小鼠的急性损伤,对辐射损伤具有一定的防护作用,其作用机理可能与提高组织细胞SOD活性而及时清除体内自由基ROS分子、抑制自由基反应能力、缓解生物膜过度的脂质过氧化(降低MDA含量),减轻DNA损伤,加速DNA损伤修复以及降低细胞凋亡等有关,但是其具体防护机理尚有待于进一步探讨。

参考文献

- 1 Dörr W, Herrmann T. Second tumors after oncologic treatment [J]. *Strahlenther Onkol*, 2008, **184**(2): 67-72
- 2 Rubino C, de Vathaire F, Shamsaldin A, et al. Radiation dose, chemotherapy, hormonal treatment and risk of second cancer after breast cancer treatment [J]. *Br J Cancer*, 2003, **89**(5): 840-846
- 3 Paulino A C, Fowler B Z. Secondary neoplasms after radiotherapy for a childhood solid tumor [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2005, **22**(2): 89-101
- 4 Wakeford R, Little M P. Risk coefficients for childhood cancer after intrauterine irradiation: a review [J]. *Int J Radiat Biol*, 2003, **79**(5): 293-309

- 5 刘建香, 苏旭. 重离子辐射生物效应的研究进展[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2003, **23**(1): 65-67
LIU Jianxiang, SU Xu. The research development of heavy ion beams on the biological effect [J]. Chin J Radiol Med Prot, 2003, **23**(1): 65-67
- 6 Giustranti C, Rousset S, Balanzat E. Heavy ion-induced plasmid DNA damage in aerated or deaerated conditions [J]. Biochem, 2008, **82**(1): 79-83
- 7 Wada S, Kobavashi Y, Funayama T, *et al*. Detection of DNA damage in individual cells induced by heavy-ion irradiation with an non-denaturing comet assay [J]. J Radiat Res (Tokyo), 2002, **43** Suppl : s153-156
- 8 Zhang H, Duan X, Yuan Z G, *et al*. Chromosomal aberrations induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ ions and ^{60}Co γ -rays in mouse immature oocytes [J]. Mutat Res, 2006, **595**(1-2): 37-41
- 9 Zhang H, Zhang X, Yuan Z G, *et al*. Germ cell loss induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ irradiation in young female mice [J]. J Radiat Res, 2006, **47**(2): 131-134
- 10 杨春霞, 翟文俊. 杜仲叶提取物抗疲劳作用研究[J]. 食品科学, 2008, **29**(9): 550-552
YANG Chunxia, ZHAI Wenjun. Study on anti-fatigue effect of extract from eucommia ulmoides oliver leaves [J]. Food Sci, 2008, **29**(9): 550-552
- 11 陈贤均, 赵红刚. 杜仲对小鼠蛋白质代谢及 SOD 活性的影响[J]. 山东中医杂志, 2004, **23**(12): 745-747
CHEN Xianjun, ZHAO Honggang. The effects of eucommia to the protein metabolism and SOD activity of mice [J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2004, **23**(12): 745-747
- 12 王亚琴, 朱媛. 仲细胞悬浮培养生产桃叶珊瑚甙的研究[J]. 西植物, 2007, **27**(2): 236-239
WANG Yaqin, ZHU Yuan. Studies on the cell suspension culture of eucommia ulmoides oliv. and its metabolite-ucubin [J]. Guihaia, 2007, **27**(2): 236-239
- 13 张康健, 王蓝, 张凤云, 等. 杜仲叶与皮有效成分含量的比较研究[J]. 西北林学院学报, 1996, **11**(2): 42-43
ZHANG Kangjian, WANG Lan, ZHANG Fengyun, *et al*. A comparison between active component contents [J]. J Northwest For Univ, 1996, **11**(2): 42-43
- 14 Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al*. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells [J]. Exp Cell Res, 1988, **175**(1): 184-191
- 15 Dosik G M, Barlogie B, Smith T L, *et al*. Pretreatment flow cytometry of DNA content in adult acute leukemia [J]. Blood, 1980, **55**(3): 474-479
- 16 Gandhi N M, Nair C K. Radiation protection by diethyldithiocarbamate: Protection of membrane and DNA in vitro and in vivo against γ -radiation [J]. Radiat Res, 2004, **45**(2): 175-180
- 17 Agrawal A, Kale R K. Radiation induced peroxidative damage: mechanism and significance [J]. Indian J Exp Biol, 2001, **39**(4): 291-309
- 18 Cadet J, Bellon S, Douki T, *et al*. Radiation-induced DNA damage: formation, measurement, and biochemical features [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2004, **23**(1): 33-43
- 19 鞠洋, 骆勤, 党月兰. 红毛五加多糖对辐射损伤小鼠的保护作用及其机制[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2005, **25**(6): 533-536
JU Yang, LUO Qin, DANG Yuelan. Protective effect of acanthopanax giraldii harms polysaccharides on radiation injury in mice and its mechanism [J]. Chin J Radiol Med Prot, 2005, **25**(6): 533-536
- 20 刘方, 武子斌, 牛淑敏, 等. 中药材抗氧化及自由基清除活性的研究[J]. 中国药学杂志, 2001, **36**(7): 442-445
LIU Fang, WU Zibin, NIU Shumin, *et al*. Studies on antioxidative and free radical scavenging activities of Chinese herbs [J]. Chin Pharm J, 2001, **36**(7): 442-445
- 21 Chiu L H, Gow C Y. Antioxidant actions of du-zhong (Eucommia ulmoides Oliv) toward oxidative damage in biomolecules [J]. Life Sci, 2000, **66**(15): 1387-1400
- 22 周华珠, 陈翠华, 孙云, 等. 杜仲叶提取物对衰老小鼠抗氧化功能的影响[J]. 徐州医学院学报, 1998, **18**(6): 463-464
ZHOU Huazhu, CHEN Cuihua, SUN Yun, *et al*. The effects of eucommia leaf extract on antioxidant effects of aging mice [J]. Acta Acad Med Xuzhou, 1998, **18**(6): 463-464
- 23 Gow C Y, Chiu L H. Inhibitory effects of du-zhong (Eucommia ulmoides Oliv.) against low-density lipoprotein oxidative modification [J]. Food Chem (in China), 2002, **77**(4): 449-456
- 24 Ho J N, Lee Y H, Park J S, *et al*. Protective effects of aucubin isolated from eucommia ulmoides against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts [J]. Biol Pharm Bull, 2005, **28**(7): 1244-1248
- 25 ZHANG Hongyu, CHEN Dezan. Theoretical characterization and its application of free radical scavenging activity for phenolic antioxidants [J]. Acta Biochim et Biophysica Sinica, 2000, **16**(1): 1-9
- 26 吴春, 胡小妹, 陈林林, 等. 杜仲黄酮的提取及抗氧化

活性研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2004,
20(5): 509-511
WU Chun, HU Xiaomei, CHEN Linlin, *et al.* Study on

extraction and anti-oxidation of flavonoids from
eucommia umoides [J]. J Harbin Univ Commer (Sciences
Edition) , 2004, 20(5): 509-511

Protective effects of *Eucommia ulmoides* Oliver leaves extraction on acute injury induced by carbon ion beams in mice

WU Zhenhua^{1,2,3} JIN Xuelian⁴ YANG Rong⁵ WANG Xinyu⁶ LIU Yang^{1,2,3} WANG Xiaohu⁵
LIU Bin^{1,2,3,6} WANG Zhenhu^{1,2,3} NIU Bingtao⁶ ZHAO Weiping^{1,2,3} ZHANG Hong^{1,2,3}

¹(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

²(Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

³(Key laboratory of Heavy Ion Radiation Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

⁴(The Second Hospital Affiliated to Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

⁵(Tumour Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730050, China)

⁶(Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT The aim of this study was to explore the protective effects and possible mechanism of *Eucommia ulmoides* Oliver leaves extraction on acute injury induced by carbon ion beams in mice. The Kun-Ming mice were fed orally with crude extracts of *Eucommia ulmoides* Oliver leaves in various doses for 7 days, whole bodys were then irradiated with 6Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ ions, the liver and lung tissues of mice were collected at 12 h after irradiation. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of Malondialdehyde (MDA) in liver and lung tissues were detected by the xanthine oxidase method and the thiobarbituric acid (TBA) reaction chromometry, respectively. Meanwhile, the DNA injury was determined by single cell gel electrophoresis (SCGE, comet assay) and the apoptosis was assayed by flow cytometry method. The results showed that there were dose-related significant decreases in MDA level, percentages of apoptosis cell, tail moment rate of cells and tail length in each concentration groups of drug. The dose-dependent marked increment of SOD activity in pretreated with drug groups compared with irradiation only groups. The extraction of *Eucommia ulmoides* Oliver leaves could greatly reduce the DNA damage and inhibit the cells apoptosis of irradiated mice. It can be deduced that the extraction of *Eucommia ulmoides* Oliver leaves can protect mice from the radiation damage due to its dramatic capacity scavenging free radical.

KEYWORDS *Eucommia ulmoides*, $^{12}\text{C}^{6+}$, Radio-resistance, Mice

CLC TL71