硕士学位论文

矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的辐射防护作用及机制研究

PROTECTIVE EFFECT OF CYANIDIN-3-O-GLUCOSIDE ON RADIATION-INDUCED DAMAGE IN MICE AND ITS MECHANISM

刘力源

哈尔滨工业大学

2018 年 6 月

中国知网 https://www.cnki.net

国内图书分类号：TS201.4　　学校代码：10213
国际图书分类号：614　　密级：公开

工程硕士学位论文

矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的辐射防护作用及机制研究

硕士研究生　刘力源
导　师　赵海田 副教授
申请学位　工程硕士
学　科　化学工程
所在单位　化工与化学学院
答辩日期　2018 年 6 月
授予学位单位　哈尔滨工业大学

中国知网　https://www.cnki.net

Classified Index: TS201.4
U.D.C.: 614

Dissertation for the Master Degree in Engineering

PROTECTIVE EFFECT OF CYANIDIN-3-O-GLUCOSIDE ON RADIATION-INDUCED DAMAGE IN MICE AND ITS MECHANISM

Candidate: Liu Liyuan

Supervisor: A. Prof. Zhao Haitian

Academic Degree Applied for: Master of Engineering

Speciality: Chemical Engineering

Affiliation: School of Chemistry and Chemical Engineering

Date of Defence: June, 23th, 2018

Degree-Conferring-Institution: Harbin Institute of Technology

中国知网 https://www.cnki.net

摘 要

随着核工业和放射技术的发展，辐射与人们的关系越来越密切。然而，辐射对机体的造血系统、免疫系统、神经系统造成的伤害是巨大的。天然产物作为无毒无害的辐射防护剂，前景广阔。本研究以矢车菊素-3-O-葡萄糖苷为研究对象，对蓝靛果花色苷复合组分进行分离纯化得到 C3G 单一花色苷组分，对其进行体外清除自由基的测定，并对 C3G 的辐射防护功能及机制进行研究。

（1）C3G 的分离纯化：采用聚酰胺树脂层析和高效液相制备色谱技术分离纯化蓝靛果花色苷复合组分，得到 C3G 单一组分。通过高效液相分析测得制备样品纯度为 95.74%。

（2）C3G 体外清除自由基活性研究：通过体外清除自由基活性实验，比较蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及阳性对照—抗坏血酸的 ABTS 自由基、DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基清除活性。C3G 对上述四种自由基清除活性均高于蓝靛果花色苷复合组分。其中，C3G 对 ABTS 自由基和羟自由基的清除能力高于抗坏血酸。研究表明，C3G 是一种良好的天然抗氧化剂和自由基清除剂。

（3）C3G 对辐射诱导小鼠氧化应激损伤的防护作用研究：建立小鼠体内 ^{60}Coγ辐射损伤模型，分别为正常对照组、辐射对照组、阳性对照组、低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）和高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）。辐射前腹腔注射氨磷汀（200 mg/kg）作为阳性对照组。通过研究小鼠体重、脏器指数、外周血白细胞数、骨髓细胞微核数和肝脏组织形态学变化分析以及血清中 T-SOD 活力、CAT 活力、GSH 水平和 MDA 含量的测定，研究 C3G 对辐射诱导小鼠氧化损伤的防护作用。结果表明，C3G 可有效地提高辐射小鼠的免疫器官指数，改善小鼠肝脏形态学变化，增加小鼠外周血象白细胞数降低骨髓细胞微核率。C3G 显著提高小鼠血清中抗氧化酶 T-SOD、CAT 活性，增加内源抗氧化物 GSH 水平，降低脂质过氧化物 MDA 的含量，从而抑制辐射诱导的氧化应激对细胞及组织造成的损伤。

（4）C3G 对小鼠辐射防护用机制研究：采用荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹技术（Western blot）对小鼠肝脏组织中相关蛋白和 RNA 表达进行了研究，探讨 C3G 对小鼠辐射防护作用的机制。研究发现，辐射导致小鼠肝细胞核内 Nrf2 基因和蛋白及其下游的 HO-1、GST、NQO1 的基因和蛋白表达降低。与

中国知网 https://www.cnki.net

辐射组相比，C3G 干预组小鼠总 Nrf2 及核内 Nrf2 基因和蛋白表达均显著增加，同时，HO-1、GST、NQO1 的基因和蛋白表达也显著增加。结果表明，C3G 上调 Nrf2 基因和蛋白表达，促进 Nrf2 的入核转运，激活下游抗氧化蛋白及二相解毒酶 HO-1、GST 及 NQO1 的基因和蛋白表达，激活 Nrf2 通路，从而抑制辐射对小鼠造成的氧化应激损伤。

关键词：矢车菊素-3-O-葡萄糖苷；辐射防护；氧化应激；抗氧化；Nrf2 通路

中国知网 https://www.cnki.net

Abstract

With the development of nuclear industry, the application of radiation technology in medical diagnosis and treatment is becoming more and more extensive, and the relationship between radiation and people is getting closer. However radiation caused great harm to the hematopoietic system, the immune system, and the nervous system. As non-toxic and harmless radiation protection agents, the natural products have great prospects. The purpose of this study was to investigate the protective effect of cyanidin-3-O-β-glucoside (C3G), a predominant anthocyanin from blue honeysuckle, on radiation-induced damage and its mechanism.

(1) Separation and purification of C3G: Using polyamide resin chromatography and high performance liquid preparative chromatography to separate and purify the anthocyanin complex components from the blue pod, a single C3G component was obtained. The purity of the prepared sample was determined to be 95.74% by HPLC.

(2) C3G scavenging free radical activity in vitro: In vitro free radical scavenging activity experiments were performed to compare the scavenging activities of the blueberry anthocyanin complex component, C3G and the positive control-ascorbic acid ABTS free radical, DPPH free radical, hydroxyl radical and superoxide anion free radical. The above four free radical scavenging activities of C3G were higher than those of the blue pod anthocyanin complex component. Among them, C3G has a higher scavenging activity on ABTS radicals and hydroxyl radicals than ascorbic acid. Studies have shown that C3G is a good natural antioxidant and free radical scavenger.

(3) Protective effects of C3G on radiation-induced oxidative stress injury in mice: The ^{60}Coγ radiation damage models in mice were established as normal control group, radiation control group, positive control group, low dose C3G(50 mg/kg bw) group and high dose C3G (150 mg/kg bw) group. Amifostine (200 mg/kg) was injected intraperitoneally before radiation as a positive control group. Through the study of mouse body weight, organ index, peripheral blood leukocyte count, bone marrow cell micronucleus number, liver tissue morphological change analysis , T-SOD activity, CAT activity, GSH level and MDA content determination in serum, we have studied the protective effects of C3G on radiation-induced oxidative damage in mice. The results showed that C3G can effectively increase the index of immune organs in irradiated mice, improve the morphological changes of liver in mice, increase the number of

中国知网 https://www.cnki.net

peripheral blood leukocytes in mice and reduce the micronucleus rate of bone marrow cells. C3G inhibited radiation-induced oxidative stress on cells and tissues damage significantly by increasing T-SOD and CAT activities and GSH level and decreasing the content of MDA in serum of mice.

(4) The mechanism of C3G radiation protection in mice: Realtime quantitative PCR and Western blot were used to study the expression of related RNA and proteins in liver tissue of mice. The mechanism of C3G radiation protection in mice was explored. Studies have found that radiation led to decreased expression of Nrf2 and downstream proteins of HO-1, GST, and NQO1 in mice. Compared with the irradiation group, the expression of both total Nrf2 and Nrf2 in nucleus of the C3G intervention group significantly increased, and the expression of HO-1, GST, and NQO1 also increased significantly. The results showed that C3G upregulated the expression of Nrf2, promoted nuclear transport of Nrf2, activated the expression of downstream antioxidant proteins HO-1, GST and NQO1, and activated Nrf2 pathway. Thus C3G inhibits radiation-induced oxidative stress damage in mice.

Keywords: cyanidin 3-O-glucoside, radiation protective, oxidative stress, anti-oxidation, Nrf2 pathway

中国知网 https://www.cnki.net

目录

摘　要.....I
Abstract.....III
第 1 章 绪论.....1
1.1 课题研究背景和意义.....1
1.2 国内外辐射防护剂研究进展.....2
1.2.1 氨巯基类化合物.....2
1.2.2 细胞因子.....3
1.2.3 激素类.....3
1.2.4 氮氧化物类.....4
1.2.5 天然产物类.....4
1.3 天然辐射防护剂的研究概况.....4
1.3.1 多酚类化合物.....5
1.3.2 多糖类化合物.....6
1.3.3 生物碱类化合物.....7
1.3.4 皂苷类化合物.....8
1.4 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的生物活性研究进展.....9
1.5 本课题的研究路线.....11
1.6 本课题的主要研究内容.....12
第 2 章 实验材料与方法.....13
2.1 材料及仪器.....13
2.1.1 实验材料.....13
2.1.2 实验动物.....13
2.1.3 试剂与药品.....13
2.1.4 实验仪器.....14
2.2 C3G 的分离纯化及其清除自由基活性的测定.....15
2.2.1 C3G 的分离纯化.....15
2.2.2 C3G 清除自由基活性的研究.....15
2.3 C3G 对小鼠辐射防护作用的研究.....17
2.3.1 实验动物分组.....17
2.3.2 辐射模型建立.....17
2.3.3 小鼠体重变化.....18

中国知网 https://www.cnki.net

2.3.4 小鼠脏器指数的变化.....18
2.3.5 小鼠脾脏、肝脏病理学观察.....18
2.3.6 外周血象白细胞计数.....18
2.3.7 骨髓细胞微核率的测定.....18
2.3.9 小鼠氧化应激指标的测定.....19
2.4 C3G 对 Nrf2 通路影响的研究.....21
2.4.1 C3G 对 Nrf2 的核转位及抗氧化酶的蛋白表达的影响.....22
2.4.2 肝脏组织基因的相对表达量.....24
2.5 数据统计与分析.....25
第 3 章 C3G 的分离纯化及清除自由基活性的研究.....26
3.1 引言.....26
3.2 C3G 的分离纯化聚酰胺树脂纯化花色苷.....26
3.2.1 聚酰胺树脂纯化花色苷.....26
3.2.2 高效液相制备 C3G.....28
3.3 C3G 清除自由基活性的研究.....29
3.3.1 C3G 对 DPPH 自由基的清除作用.....30
3.3.2 C3G 对 ABTS 自由基的清除作用.....31
3.3.3 C3G 对超氧阴离子自由基的清除作用.....32
3.3.4 C3G 对羟自由基的清除作用.....33
3.4 本章小结.....34
第 4 章 C3G 对辐射损伤小鼠防护作用的研究.....36
4.1 引言.....36
4.2 小鼠体重变化.....36
4.3 免疫器官指数.....37
4.4 外周血象白细胞（WBC）计数.....38
4.5 骨髓嗜多染红细胞微核率的测定.....39
4.6 小鼠肝脏组织形态学变化.....40
4.7 C3G 对辐射小鼠氧化应激的影响.....41
4.7.1 C3G 对辐射小鼠血清中 T-SOD 活力的影响.....41
4.7.2 C3G 对辐射小鼠血清中 GSH 含量的影响.....42
4.7.3 C3G 对辐射小鼠血清中 CAT 活力的影响.....43
4.7.4 C3G 对辐射小鼠血清中 MDA 含量的影响.....44
4.8 本章小结.....45

中国知网 https://www.cnki.net

第 5 章 C3G 对辐射防护作用机制研究.....47
5.1 引言.....47
5.2 C3G 对 Nrf2 及抗氧化蛋白表达的影响.....48
5.2.1 C3G 对 Nrf2 核转位的影响.....48
5.2.2 C3G 对 HO-1 蛋白的影响.....49
5.2.3 C3G 对 GST 蛋白的影响.....49
5.2.4 C3G 对 NQO1 蛋白的影响.....50
5.3 C3G 对 Nrf2 及抗氧化酶基因表达的影响.....51
5.3.1 C3G 对 Nrf2 基因表达的影响.....51
5.3.2 C3G 对 HO-1 基因表达的影响.....52
5.3.3 C3G 对 GST 基因表达的影响.....53
5.3.4 C3G 对 NQO1 基因表达的影响.....54
5.4 本章小结.....56
结 论.....57
参考文献.....58
攻读硕士学位期间发表的论文及其它成果.....66
哈尔滨工业大学学位论文原创性声明和使用权限.....67
致 谢.....68

中国知网 https://www.cnki.net

第 1 章 绪论

1.1 课题研究背景和意义

电离辐射是一切能引起物质电离的辐射总称，人工辐射已遍及各个领域，不仅包括核工业，还存在与人类密切相关的农业和医疗中。例如农业照射培育新品种，医疗上的 X-射线透视，CT，肿瘤的放射治疗等。随着放射技术的发展，未来人们接触电离辐射的机会将越来越多，包括癌症病人的放射治疗，核泄漏事故的隐患以及载人航天工程中，宇航员会遭受空间环境的辐射等。电离辐射造成机体损伤，激发体内水分子或氧分子发生电离，生成大量的自由基，引起氧化应激，会造成人体功能紊乱，包括造血系统、免疫系统、生殖系统等，甚至会造成 DNA 断裂、基因突变、染色体重组、细胞死亡等。由此可见，辐射防护剂对人们来说是非常重要的。现在的抗辐射药物主要包括巯基化合物、激素、细胞因子等，其中代表药物有氨磷汀，抗辐射效果比较好，但是副作用较大，如发生头晕、呕吐、嗜睡、轻度皮疹等现象，由此限制了它在临床上的应用[1]。天然产物作为有效的辐射防护剂，具有安全、无毒、可靠等优点，有广阔的发展前景。

花色苷是花青素和糖以糖苷键结合而成的一种化合物，广泛存在于有色水果、蔬菜中，如蓝莓、树莓、紫甘蓝、紫薯等。花色苷的结构母核是 2-苯基苯并吡喃阳离子，属于类黄酮化合物。有报道证实，花色苷有良好的抗氧化活性，可有效清除自由基，提高免疫机能，减少对 DNA 的破坏[2]。目前自然界存在 21 种花色苷，其中有 6 种广泛存在于水果和蔬菜中，包括天竺葵色素、矢车菊色素、芍药色素、飞燕草色素、锦葵色素、牵牛色素，其中以矢车菊素-3-O-葡萄糖苷（Cyanidin-3-O-glucoside，简称 C3G）分布最为广泛[3]。一般来说，花色苷在酸性条件下比较稳定，但是在中性和碱性条件下很容易分解。但是，C3G 尽管在中性的条件下，也表现出极强的抗氧化活性[4]。

核因子 NF-E2 相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是外源性有毒物质和氧化应激的感受器，参与细胞抗氧化应激和外源性有毒物质的防御机制，是迄今为止发现的最为重要的内源性抗氧化应激通路之一[5]。生理状态下，Nrf2 主要存在于细胞质中，Nrf2 无法进入细胞核，抑制了 Nrf2 的转录活性，促进了 Keap1 介导的蛋白酶对 Nrf2 的降解，使其处于非活性状态；当机体受到氧化应激时，Keap1 的构象发生改变，在 Keap1-Keap1 同源

中国知网 https://www.cnki.net

二聚体分子间形成二硫键，导致 Nrf2 与 Keap1 解离，Keap1 介导的蛋白酶不再降解 Nrf2，由此 Nrf2 被激活，Nrf2 稳定性增加并转入细胞核[6]。与 Keap1 解离后的 Nrf2 通过核孔转移进入细胞核内，激活下游保护性靶基因的表达，包括抗氧化蛋白类基因和Ⅱ相解毒酶基因等，例如血红素氧合酶 1(heme oxygenase，HO-1)，NAD(P)H 苯醌脱氢酶(NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1，NQO1)，谷胱甘肽 S 转移酶(glutathione S-transferase，GST)等，激活细胞一系列防御进程，增强细胞抗氧化能力，保护组织细胞正常功能[7]。

我们之前的研究发现，蓝靛果花色苷在辐射防护中具有一定作用，由矢车菊素-3,5-二葡萄糖苷（3.81％），矢车菊素-3-葡萄糖苷（74.28％），矢车菊素-3-芸香糖苷（9.87％），天竺葵素-3-葡萄糖苷（2.36％），芍药苷 3-葡萄糖苷（7.28％）和芍药素 3-芸香糖苷（2.40％）组成[8]。由此可见，C3G 是蓝靛果花色苷复合组分中含量最多、最丰富的单体。在本研究中，我们进一步从蓝靛果花色苷中分离和纯化了 C3G，并将 C3G 的自由基清除活性与蓝靛果花色苷复合组分进行了比较。然后，我们研究 C3G 对小鼠 ^{60}Coγ辐射损伤的保护作用，并探究其可能与抗氧化酶调节有关的辐射防护机制。

1.2 国内外辐射防护剂研究进展

辐射防护剂能够减少电离辐射导致的细胞或机体损伤，目前研究开发的对辐射防护药物多达上万，主要有以下几类：氨巯基类药物、细胞因子类、激素类药物、氮氧自由基类、天然药物等。

1.2.1 氨巯基类化合物

氨巯基类化合物作为第一代的辐射防护剂，可以清除自由基、氢转移、诱导组织低氧和增强 DNA 的稳定性等[9]。常见的药物有 N-乙酰半胱氨酸（NAC）、氨乙基异硫脲（AET）等。

Gao 等人建立昆明小鼠 X 射线（4 Gy）的卵巢损伤模型。辐射前连续 7 d 对小鼠腹腔注射 300 mg/kg 的 N-乙酰半胱氨酸（NAC），研究发现，NAC 通过降低颗粒细胞的氧化应激和凋亡水平，促进颗粒细胞增殖，成功地恢复了卵巢和子宫功能，增强了胚胎着床，改善了卵泡发育，并改变了异常激素水平。总之，NAC 对电离辐射引起的卵巢衰竭具有一定的辐射保护作用[10]。

Ohta 等人建立 X 射线急性系统性损伤模型，研究氨乙基异硫脲（AET）对一氧化氮的抑制作用。辐射后 1.5 h，ICR 小鼠血清硝酸盐浓度升高，2.5 h

中国知网 https://www.cnki.net

至 3.0 h 后浓度显著高于正常水平。而 AET 抑制了照射后血清硝酸盐浓度的增加，降低了一氧化氮合酶和一氧化氮自由基的产生，有一定辐射防护作用[11]。Aktoz 等人对 Wistar 大鼠阴囊区照射辐射剂量为 20 Gy 的 X 射线，建立睾丸损伤模型，照射前 30 min 腹腔注射 200 mg/kg 的氨磷汀，研究表明氨磷汀显著缓解睾丸损伤的组织病理学，提高谷胱甘肽的水平，降低丙二醛的含量，有良好的辐射防护作用[12]。

1.2.2 细胞因子

细胞因子是由机体细胞合成和分泌的一类小分子多肽，具有多种生物学活性，如调节机体免疫、促进创伤愈合及造血调控等。

Chen 等人通过体内和体外研究发现，血小板第 4 因子（PF4）可以减少辐射引起的 DNA 损伤，抑制细胞凋亡，增强细胞活力和增殖能力。同时 PF4 可以通过增加 Bcl-2 的表达，抑制 p53 的表达来促进 DNA 损伤修复。结果发现，PF4 对急性辐射损伤的小鼠骨髓细胞有保护作用[13]。Zhang 等人研究碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）对放射性内皮功能障碍和膀胱组织学改变的影响。辐射后，使用 bFGF 处理人脐静脉细胞（HUVEC）或膀胱，结果显示，血栓调节蛋白（TM）表达降低，膀胱上皮的厚度增加，膀胱内的炎症降低。研究发现，bFGF 可有效减少膀胱内的纤维化，改善放射性诱导的膀胱内皮功能障碍[14]。

1.2.3 激素类

激素类药物是非常重要的辐射防护剂之一，它可以与体内相应受体相结合，修复机体的造血系统和免疫系统，具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、清除自由基等功能。

褪黑激素（N-乙酰-5-甲氧基色胺）是一种由血清素乙酰化和甲基化合成的修饰色氨酸。褪黑激素主要由松果体分泌，也由骨髓，免疫细胞，脑和肠道合成。褪黑激素及其代谢物具有有效的抗氧化和辐射防护特性。褪黑素在氧化应激过程中被快速消耗。这表明褪黑激素可能作为 ROS 产生时攻击机体的第一线有效保护因子。褪黑素与 ROS 相互作用而不刺激氧化还原系统。而且，褪黑激素将自由基转化成稳定的产物，保护细胞免受自由基的侵害[15]。Najafi 等研究发现，褪黑素通过抗氧化作用，减少放疗期间机体的 DNA 损伤和细胞凋亡等，缓解免疫系统的损伤，改善辐射后的不良反应和毒性[16]。

中国知网 https://www.cnki.net

1.2.4 氮氧化物类

Wang 等人研究了一种新的稳定的硝酰基硝酰基 NIT2011。结果显示，当γ射线的照射剂量为 6.5 Gy 时，第 30 天照射组的存活率为 20％。使用 0.25、0.5 和 1.0 mmol/kg 的 NIT2011 处理小鼠，第 30 天时 NIT2011 组小鼠的存活率分别为 70％，80％和 90％。研究发现，NIT2011 增加了骨髓细胞中脾脏集落数量，骨髓细胞数量和蛋白质水平，同时，它也增加了血浆中 SOD 的活性，降低 MDA 的含量[17]。Davis 等使用中国仓鼠 V79 细胞系作为研究对象，结果发现，氮氧化物 Tempol、16c、22c、23c 作为自由基辐射保护剂，增强了细胞存活率，具有一定的抗辐射作用[18]。

1.2.5 天然产物类

近几年来，天然产物作为有效的辐射防护剂，例如多酚、黄酮、生物碱等，具有安全、无毒、可靠等优点，具有显著的抗氧化活性，并且能够与自由基及产生氧化应激的物质相互作用，抗辐射效果较好，有广阔的发展前景[19]。

Xu 等人对刺梨中的黄酮类化合物（flavonoids extracted from Rosa roxburghii Tratt，FRT）的抗辐射活性进行了研究，结果表明，FRT 作为抗氧化剂，可以减少 DNA 损伤，纠正组织病理变化，促进脾结节的形成，抵抗精子畸变，保护胸腺[20]。Tiwari 等采用没食子儿茶素没食子酸酯 EGCG 对 C57BI/6 小鼠进行灌胃，1.5h 后接受 ^{60}Coγ射线辐射，结果发现，与辐射对照组相比，EGCG 能显著恢复机体造血功能，降低辐射对骨髓细胞造成的遗传损伤[21]。Liu 等人使用 Balb/c 小鼠模型探讨了黄芪多糖在 ^{60}Coγ辐射诱导中的作用。研究表明，黄芪多糖能显著减少小鼠体内丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、乳糖脱氢酶的水平。高剂量的黄芪多糖还可以减轻肝和肺的损伤[22]。陈萃等用 6.5 Gy 的 X 射线对 C57BL/6 小鼠进行全身一次性辐射，照射前七天起对小鼠腹腔注射人参皂苷 Rg1，结果发现，人参皂苷 Rg1 可以减轻 DNA 损伤，抑制自由基引起的细胞衰老，表明人参皂苷 Rg1 对辐射诱导的氧化应激具有良好的防护作用[23]。

1.3 天然辐射防护剂的研究概况

随着核工业的发展，放射技术在医学诊断及治疗中的应用日益广泛，辐射与人们的关系越来越密切。然而，辐射对机体的造血系统、免疫系统、神

中国知网 https://www.cnki.net

经系统造成的伤害是巨大的。近年来的研究表明，多酚类、多糖类、生物碱类、皂苷类化合物等天然产物活性成分能够显著清除自由基，提高机体免疫功能，对辐射造成的机体损伤有一定的保护作用。天然产物活性成分作为一种辐射防护剂，无毒副作用。但是，这种研究大都仅仅停留在体外或体内试验阶段，真正进入临床应用的产品很少，而且大部分都作为保健品为人们食用，价格昂贵。这主要是由于现阶段关于天然产物的提取和纯化非常困难等原因造成的。但是，随着分离和纯化技术的逐步提高，越来越多的天然活性成分会被分离出来，也越来越容易被分离出来，天然产物辐射防护剂的研究与开发将具有非常广阔的前景。

1.3.1 多酚类化合物

多酚类化合物是指分子结构中有若干个酚羟基的植物成分的总称。它是一类植物次级代谢产物，来源广泛，按照化学组成可分为：黄酮类、花色苷类和酚酸类等[24]。多酚类化合物中含有多个酚羟基，具有显著清除自由基的能力，减轻自由基对机体的伤害，从而起到辐射防护作用[25]。

1.3.1.1 黄酮类

黄酮类化合物泛指两个具有酚羟基的苯环(A-与 B-环)通过中央三碳原子相互连结而成的一系列化合物，其基本母核为 2-苯基色原酮。Begum 等[26]研究发现，芹菜素能降低γ射线辐射导致淋巴细胞脂质过氧化指数，增加淋巴细胞中超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)和过氧化氢酶（Hydrogen Peroxidase, CAT)的活性，表明芹菜素对辐射诱导的氧化应激具有良好的防护作用。Dixit 等人[27]对雄性 Wistar 大鼠口服大豆异黄酮 21 d，随后进行γ照射。结果发现，大豆异黄酮处理组与照射组相比存活率提高，LPO 降低，抗氧化酶的活性增强。表明异黄酮具有强大的抗氧化活性，可作为γ辐射损伤的防护剂。

1.3.1.2 茶多酚

茶多酚是茶叶中多酚类物质的总称，其主要成分为儿茶素（占 60~80%），此外还包括黄烷醇类、花色苷类、黄酮类、黄酮醇类和酚酸类等。研究表明茶多酚具有良好的抗辐射、抗氧化活性[28]。Benila 等人研究发现，EGCG 可以保护小鼠脾细胞，使其 DNA 链在辐射条件下不发生断裂，可以清除自由基，有良好的抗氧化功能，是一种有效的辐射防护剂[29]。

1.3.1.3 花色苷

花色苷是花青素和糖以糖苷键结合而成的一种化合物，广泛存在于有色

中国知网 https://www.cnki.net

水果、蔬菜中，如蓝莓、树莓、紫甘蓝、紫薯等。研究表明花色苷具有清除自由基、抗肿瘤、抗癌、抗辐射等活性，被应用于医疗保健行业中。Liu 等用蓝莓花色苷对 Spraguee-Dawley 大鼠进行灌胃，可明显降低 LEKTA 精确线性加速器照射（20 Gy）引起的肺炎症，通过调节 Bcl-2，Bax 和 Caspase-3 的表达，显着地提高细胞生存率[30]。张玉彪等人利用蓝莓花色苷对 SD 大鼠进行灌胃，7 d 后通过直线加速器对大鼠进行全胸 X-射线照射（15 Gy）。实验发现，与辐射对照组相比，蓝莓花色苷保护组谷草转氨酶（Aspartate transaminase，AST）、肌酸激酶（Creatine Kinase，CK）、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）和谷丙转氨酶（Alanine transaminase，ALT）含量显著降低，白细胞介素 1（interleukin-1，IL-1）和转化生长因子β（Transforming growth factor beta，TGF-β）表达量降低，表明蓝莓花色苷在放射性心脏损伤中可以保护器官，减轻损伤，具有抗辐射功能[31]。Reza 等用 200 mg/kg bw 桑葚提取物对 Wistar 雄鼠进行灌胃，再用 ^{60}Coγ远距放射（3 Gy 和 6 Gy）处理大鼠，结果发现，桑葚提取物可减少 MDA 含量，降低肝脏脂质过氧化物浓度，使大鼠骨髓细胞和肝细胞基因毒性和细胞毒性减轻，有明显的抗辐射效应[32]。

1.3.2 多糖类化合物

多糖是由许多单糖分子通过糖苷键连接而成的多于 20 个糖基的糖链。天然多糖按照来源可分为：植物多糖、动物多糖、微生物多糖。研究发现，很多种多糖不仅可作为人体内代谢的基本物质和能量物质，而且还具有提高机体免疫功能，抗肿瘤、抗病毒和抗辐射等活性[33]。

1.3.2.1 植物多糖

植物多糖来源广泛，研究显示，许多植物多糖具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖、抗辐射等生物活性。Zhao 等人研究了五味子多糖（schizandrae polysaccharide，SP）对 Balb/c 小鼠的辐射防护作用。结果发现，SP 可以通过保护免疫球蛋白、抑制淋巴细胞凋亡来预防免疫系统的损伤，表明 SP 可能作为一种临床和临床前应用的新型潜在药物，可减少放射治疗引起的副作用[34]。刘爱萍利用柳茶中提取的水溶性多糖对清洁级昆明种小鼠进行灌胃，再进行 X 射线（10 Gy）全身照射，结果发现，多糖处理组与辐射对照组相比，小鼠外周血白细胞、血小板数量明显增加，自由基含量减少，丙二醛（Malondialdehyde，MDA）含量降低，表明柳茶中水溶性多糖可以有效保护造血系统、免疫系统，具有辐射防护作用[35]。李刚强等人研究当归多糖对

中国知网 https://www.cnki.net

60Coγ辐射 C57BL/6J 小鼠损伤的防护作用。结果发现，当归多糖通过改变血液 microRNA 的表达，促进辐射小鼠的损伤修复[36]。

1.3.2.2 动物多糖

国内外学者从动物中提取出不同种类的多糖，尤其是海洋动物，如虾蟹动物的甲壳质，河蚌多糖、鲍鱼多糖等，具有有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、抗辐射等生物活性。Na Li 等构建了 BALB/c 雄鼠 ^{137}Cs-γ辐射（4.0 Gy）损伤模型，使用星虫多糖（Siphon worm polysaccharide，SNP）处理小鼠，研究发现，SNP 使骨髓细胞中的 DNA 增加，微核率降低，有明显的抗氧化能力和骨髓损伤保护能力[37]。刘凯丽等研究发现，星虫多糖可以清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical，DPPH）自由基和羟自由基，具有显著的抗氧化能力[38]。

1.3.2.3 微生物多糖

研究发现，许多微生物多糖都有明显的辐射防护作用。Lee 等人在斑马鱼模型中研究褐藻发酵产生的多糖对γ辐射的防护作用。结果发现，乳酸菌多糖可以提高斑马鱼的存活率，减少体内死亡细胞数，降低斑马鱼中活性氧和一氧化氮的产生，有良好的辐射防护和抗氧化的生物活性[39]。他们同时研究了短乳杆菌发酵的卡巴氏菌多糖的辐射防护作用[40]。研究发现，这种多糖显著增强了β-照射后脾细胞的存活率，减少了 DNA 损伤和活性氧簇的产生，调节 p53，Bax 和 Bcl-2 的表达水平，具有辐射防护的作用。

1.3.3 生物碱类化合物

生物碱是存在于自然界的一类含氮的有机化合物，有似碱的性质，有复杂的环状结构和显著的生物活性，是中草药的有效成分之一。某些生物碱具有抗肿瘤、抗炎、抗辐射、抗高血压等生物活性，在医疗保健方面有着巨大的潜力。

1.3.3.1 苦参碱

苦参碱作为传统的中药之一，是一种主要的生物碱的代表，它的临床应用较为广泛，有抗病毒，抗肿瘤，抗炎症，抗辐射等生物活性，不良反应较小，还可以提高机体免疫功能[41]。Li Hongbo 等观察苦参碱对 ^{192}Ir 低剂量照射的人骨髓造血功能及细胞凋亡的影响。结果发现，人员经过 ^{192}Ir 照射后，骨髓细胞均见形态异常，苦参碱治疗后各异常指数趋于正常，表明苦参碱有抗辐射，改善机体骨髓造血机能的功能[42]。Chen 等用 X 射线（10 Gy）单次照射 SD 大鼠腹部，12 h 后对大鼠腹腔注射苦参碱，研究发现，苦参碱可缓

中国知网 https://www.cnki.net

解胃肠道反应，减少急性辐射下肠道的病理形态变化，修复肠粘膜，可作为放射性肠炎防护剂[43]。

1.3.3.2 川芎嗪

川芎嗪，是川芎中主要的活性生物碱，有广泛的药理活性，可以清除自由基、增强造血机能、抗肿瘤、抗氧化，其中，清除自由基功能最显著，尤其是对羟自由基、超氧阴离子自由基有直接的清除作用[44]。彭洁等建立 ^{60}Coγ辐射（5 Gy）BABL/c 小鼠损伤模型，在照射前后腹腔注射川芎嗪（130 mg/kg），研究发现，川芎嗪使 SOD 和 GSH 含量升高，显著降低辐射引起的肾脏损伤[45]。Hong Zheng 等用 ^{60}Coγ全身照射 C57BL/6 小鼠，研究发现，川芎嗪处理组与辐射对照组相比，DNA 损伤减轻，细胞凋亡和炎症因子减少，表明川芎嗪的抗辐射作用和抗氧化作用显著，是一种良好的天然辐射防护剂[46]。P Guo 等人研究发现，川芎嗪可以促进 IL-6 和 IL-8 基因在骨髓中的表达，减轻 ^{60}Coγ辐射产生的伤害，增加外周血白细胞数和脾脏指数，增强机体免疫功能，具有辐射防护作用[47]。

1.3.4 皂苷类化合物

皂苷是苷元为三萜或螺旋甾烷类化合物的一类糖苷，大部分分布在高等植物中，也有少量存在于海洋植物中。许多中草药如人参、桔梗、刺五加等都含有皂苷，研究表明，皂苷具有祛痰止咳、抗菌抗癌、抗氧化、增进 DNA 修复，提高机体免疫功能的生物活性。下面主要介绍一下人参皂苷和刺五加皂苷。

1.3.4.1 人参皂苷

人参是一种抗肿瘤的天然草本药物，有很多药理和生物活性，人参皂苷是人参中主要的药理活性成分，有很强的抗氧化和抗辐射作用，可以有效抑制细胞凋亡。Kim 等用高丽参提物对 C56BL/6 小鼠进行腹腔注射，4 d 后在 15 Gy 的 X 射线下照射。结果发现，高丽参提取物可以缓解辐射诱导的肝损伤，有效减少细胞凋亡，可以作为抗辐射的功能食品[48]。Raghavendran 等在急性 SD 大鼠癫痫模型中研究了高丽参对 X 射线辐射诱发的呕吐的预防作用。研究发现，高丽参提取物保护大鼠免受 X 射线造成的损伤，改善大鼠的进食行为[49]。

1.3.4.2 刺五加皂苷

刺五加，又称刺拐棒，为五加科植物刺五加，刺五加皂苷是刺五加的主要活性成分，在根茎叶中均存在。研究证明，刺五加皂苷可以清除自由基，

中国知网 https://www.cnki.net

提高 SOD 水平，减轻辐射对机体造成的损害，增强免疫功能[50]。李勇等创建 X 射线（2 Gy）昆明小鼠损伤模型，研究刺五加皂苷对其的防护作用。结果发现，刺五加皂苷能增强小鼠免疫系统功能和造血系统功能，显著恢复 SOD、谷胱甘肽过氧化酶（Glutathione peroxidase，GSH-Px）水平，具有抗辐射和抗氧化的作用[51]。郝述霞等建立 SPF 级昆明小鼠γ射线损伤模型，研究发现，刺五加皂苷可以有效清除自由基，其能力高于枸杞多糖和螺旋藻，具有很好的辐射防护作用[52]。

1.4 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的生物活性研究进展

花色苷是自然界最重要的水溶性色素之一，是花青素与糖通过糖苷键形成的类黄酮类化合物，基本结构为 C6-C3-C6 环，即两个芳香环和一个含氧杂环，随着 C6-C3-C6 核上取代基、形成共振结构的能力及所处的环境因素，而呈现出千差万别的色泽[53]。基本结构如图 1-1 所示。

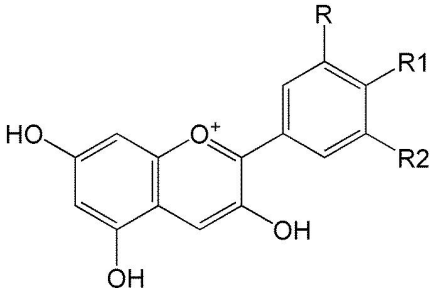


图 1-1 花色苷的基本结构

自然界已知的花色苷有 22 大类，食品中重要的 6 类包括矢车菊色素、牵牛色素、飞燕草色素、芍药色素、天竺葵色素和锦葵色素[54]。其中，矢车菊素-3-O-葡萄糖苷在自然界中分布最为广泛。基本结构如 1-2 所示。

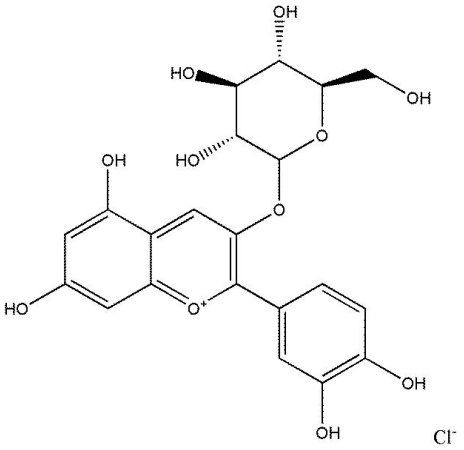


图 1-2 C3G 的基本结构

中国知网 https://www.cnki.net

许多研究表明，矢车菊素-3-O-葡萄糖苷对人体有许多保健功能，如抗氧化、抗辐射、保护心脏、抗肿瘤、保护肝脏、降血糖、降脂减肥、改善记忆力、治疗胃溃疡、预防和治疗哮喘、保护视力、抗衰老、保护心血管疾病等。Guo 等人建立雄性 C57BL/6J 肥胖小鼠模型和遗传性糖尿病 db/db 小鼠模型，连续 5 周对其灌胃 C3G。结果表明，C3G 降低空腹血糖水平并增强胰岛素敏感性，减少脂肪组织的增加，改善肥胖相关的炎症和代谢紊乱[55]。Tsuda 等人研究发现，C3G 缓解高脂膳食引起高血糖症和高胰岛素症，降低肿瘤坏死因子的水平，减少脂肪组织的增加，有效预防糖尿病和肥胖[56]。余仁强等人建立 SD 大鼠肥胖模型，连续 5 周以 100 mg/kg C3G 灌胃 SD 大鼠。结果发现，C3G 可以抑制肥胖大鼠内脏脂肪组织的堆积，抑制体重的增加，改善糖脂质代谢紊乱，缓解机体炎症反应，增加胰岛素敏感性[57]。

Guerra 等人研究发现 C3G 可以缓解黄曲霉毒素 B1（AFB1）对人肝癌细胞系 HepG2 和人结肠癌细胞系 CaCo-2 产生的细胞毒性和致癌性，抑制由两种真菌毒素引起的 ROS 的产生和细胞凋亡，减少 DNA 片段化，结果显示 C3G 有良好的自由基清除能力[58]。Tsuda 等人发现 C3G 显著抑制脂质过氧化，清除活性氧自由基，降低 MDA 含量[59]。李晔等人研究 C3G 对重金属镉造成的脂质过氧化和氧化应激的缓解作用。研究发现 C3G 可以缓解重金属镉引起的 SD 大鼠体重下降，使其 MDA 含量降低，提高 SOD 活力，清除自由基，缓解脂质过氧化，有一定的保护作用[60]。

Reddy 等人研究发现，C3G 对 COX-1 和 COX-2 酶都有一定的抑制作用，抑制率（100 μg/mL）分别为 59%和 78%，可以抑制脂质过氧化。实验表明 C3G 对乳腺，结肠，胃，中枢神经系统和肺的肿瘤细胞都有一定抑制作用[60]。Chen 等人研究发现籼稻中的 C3G 可以治疗各种癌细胞，包括乳腺癌细胞 HS578T、胃癌细胞 AGS、人肝癌细胞 SKHep-1 和 Huh-7、人宫颈癌细胞 HeLa 以及鼠肺癌细胞 LLC 等多株癌细胞系，降低 CDK-1，CDK-2，细胞周期蛋白 B1 和细胞周期蛋白 D1 的蛋白质水平，并呈量效依赖关系，抑制癌细胞生长[61]。Wang Qing 等人研究表明 C3G 可以增强 THP-1 巨噬细胞的细胞核受体的表达和转录活性，包括 PPARγ和 LXRα，具有一定的抗炎特性[62]。

中国知网 https://www.cnki.net

1.5 本课题的研究路线

本课题的研究路线如图 1-3 所示。

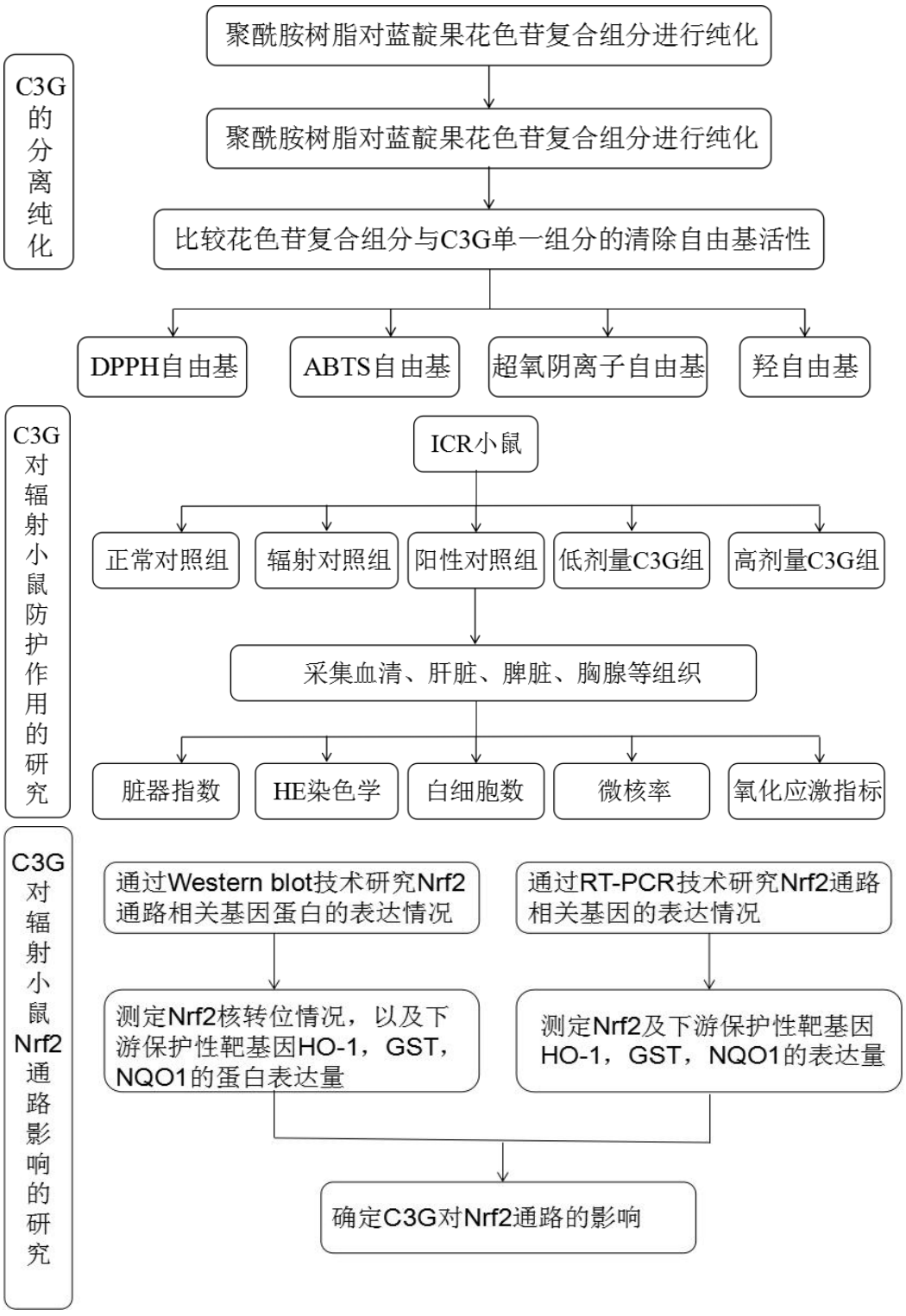


图 1-3 本课题的研究路线

中国知网 https://www.cnki.net

1.6 本课题的主要研究内容

本课题中，我们从蓝靛果花色苷复合组分中，进一步分离纯化出矢车菊素-3-O-葡萄糖苷（C3G），并通过建立体外抗氧化应激体系，将 C3G 的清除自由基的活性与蓝靛果花色苷复合组分进行了比较。同时建立动物辐射损伤模型，研究了 C3G 的体内辐射防护作用，并研究其可能与抗氧化酶调节有关的辐射防护机制。主要包括以下几个方面：

（1）首先采用聚酰胺树脂大孔树脂对蓝靛果花色苷复合组分进行分离纯化，采用 pH 示差法测定花色苷纯度，收集纯度最高的洗脱液组分进行冻干。测定 C3G 标品的高效液相分析图，根据其出峰时间，利用制备液相技术对纯化后的花色苷进行分离，得到 C3G 单一组分。

（2）比较蓝靛果花色苷复合组分、C3G 单一组分以及抗坏血酸三者对 ABTS 自由基清除活性、DPPH 自由基清除活性、羟基自由基清除活性和超氧阴离子自由基清除活性。

（3）建立 ^{60}Coγ射线辐射损伤小鼠模型，随机分为 5 组，即正常对照组、辐射对照组、阳性对照组、低剂量 C3G 处理组和高剂量 C3G 处理组。通过测定脏器指数、白细胞数、微核率、SOD 活性、CAT 活性、GSH 含量、MDA 水平等指标，评价 C3G 对辐射诱导小鼠氧化损伤的防护作用。

（4）通过 Western blot 和 RT-PCR 技术，探究 C3G 对小鼠的辐射防护机制。研究总 Nrf2、核内 Nrf2、HO-1、GST、NQO1 的基因表达量及蛋白表达量的变化，揭示 C3G 对辐射诱导的机体氧化损伤的防护机制。

中国知网 https://www.cnki.net

第 2 章 实验材料与方法

2.1 材料及仪器

2.1.1 实验材料

实验中所用的蓝靛果花色苷原料为实验室之前自制[8]。

2.1.2 实验动物

实验动物选用 ICR 雄鼠，由哈尔滨医科大学实验动物中心提供，体重为 20±2 g。

2.1.3 试剂与药品

实验中所用主要试剂及材料如表 2-1 所示。

表2-1 实验中主要的试剂与材料

试剂名称	规格	生产厂家
无水乙醇	分析纯	天津市天力公司
色谱甲醇	色谱级	美国天地公司
ABTS	分析纯	美国 Biosharp 公司
DPPH	分析纯	美国 Sigma 公司
T-SOD 试剂盒	分析纯	南京建成生物工程研究所
CAT 试剂盒	生物纯	南京建成生物工程研究所
MDA 试剂盒	分析纯	南京建成生物工程研究所
GSH 试剂盒	分析纯	南京建成生物工程研究所
苏木精	分析纯	碧云天生物技术公司
伊红染液	分析纯	碧云天生物技术公司
全蛋白提取试剂盒	分析纯	沈阳万类生物公司
核蛋白和浆蛋白提取试剂盒	分析纯	沈阳万类生物公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	分析纯	沈阳万类生物公司
SDS - PAGE 电泳液（干粉）	分析纯	沈阳万类生物公司
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	分析纯	沈阳万类生物公司
ECL 发光液	分析纯	沈阳万类生物公司
预染蛋白分子量标准	分析纯	加拿大 Fermentas 公司

中国知网 https://www.cnki.net

表 2-1（续表）

试剂名称	规格	生产厂家
PVDF 膜	分析纯	美国 Millipore 公司
脱脂奶粉	食品级	伊利公司
Nrf2 抗体	分析纯	沈阳万类生物公司
HO-1 抗体	分析纯	沈阳万类生物公司
GST 抗体	分析纯	北京博士德公司
NQO1 抗体	分析纯	北京博士德公司
羊抗兔 IgG-HRP	分析纯	沈阳万类生物公司
内参抗体 Histone H3	分析纯	沈阳万类生物公司
内参抗体 β-actin	分析纯	沈阳万类生物公司
TRNzol A^+试剂盒	分析纯	天根生化科技有限公司
合成第一链 cDNA 试剂盒	分析纯	美国 GeneCopoeia 公司
RT-PCR 试剂盒	分析纯	北京全式金生物技术有限公司

2.1.4 实验仪器

实验中所用的主要仪器如表 2-2 所示。

表2-2 实验所用主要仪器与设备

仪器名称	型号	生产厂家
紫外分光光度计	TU-1900	北京通用分析仪器有限公司
高效制备液相	EasyChrom V2.0	北京华博科技有限公司
高效液相分析色谱仪	Agilent-1100	美国 Agilent 公司
旋转蒸发仪	SB-2000	SB 日本东京理化公司
循环水多用真空泵	SHZ-95B	美国 Sartorius 公司
电子天平	BSA224S	美国 Sartorius 公司
pH 计	PB10	美国 Sartorius 公司
真空冷冻干燥机	Scientz-N	宁波新芝生物科技公司
水平摇床	WD-9405B	北京六一公司
微量移液器	Proline	苏州 BIOHIT 公司
电泳仪	DYY-7C	北京六一公司
转移槽	DYCZ-40D	北京六一公司
双垂直蛋白电泳仪	DYCZ-24DN	北京六一公司
凝胶成像系统	WD-9413B	北京六一公司
超速冷冻离心机	H-2050R	湖南湘仪公司
酶标仪	ELX-800	美国 BIOTEK 公司
电热恒温培养箱	DH36001B	天津泰斯特公司
RT-PCR 仪	LineGene 9600	杭州博日科技有限公司

中国知网 https://www.cnki.net

2.2 C3G 的分离纯化及其清除自由基活性的测定

2.2.1 C3G 的分离纯化

2.2.1.1 聚酰胺树脂纯化花色苷

（1）聚酰胺树脂的预处理：将购买的 60-80 目的聚酰胺在 95%乙醇浸泡，用蒸馏水洗至无乙醇，沥干，5% NaOH 浸泡，10%醋酸浸泡，蒸馏水洗涤至中性，使用 200 目筛子筛去碎的聚酰胺，备用。

（2）样品的处理：将蓝靛果花色苷复合组分在蒸馏水中充分溶解，HCl 将 pH 调至 3.0 左右。

（3）将预处理的聚酰胺树脂装至层析柱（7 cm×30 cm）中，将样品缓慢而均匀的滴加到树脂顶端，待其吸附饱和。

（4）蒸馏水将杂质洗脱，去除杂质后，从 12 个助体积（BV）颜色突然加深，开始收集洗脱液。依次用 10%、30%、50%、70%乙醇进行分级洗脱，洗脱液进行真空浓缩，冷冻干燥，使用 pH 示差法测量花色苷纯度。

2.2.1.2 高效液相制备 C3G 单一组分

（1）高效制备液相条件

色谱柱：安捷伦 ZORBAX ODS 色谱柱（21.2 mm×25 cm）；柱温：25 ℃；流速：5 mL/min；进样体积：200 μL；样品浓度：50 mg/mL；流动相 A：含 0.4% (v/v)冰醋酸的水溶液；流动相 B：甲醇；等度洗脱：40% B；紫外检测波长：254 nm。多次收集洗脱液。旋蒸浓缩甲醇后，冷冻干燥得到固体粉末，利用高效液相分析色谱仪测定 C3G 纯度。

（2）液相色谱分析条件：仪器：Agilent 1100；色谱柱：C-18 分析型色谱柱（4.6×250 mm，粒径为 5 μm）；柱温：25 ℃；流速：0.5 mL/min；进样体积：10 μL；流动相 A：含 0.4% (v/v)冰醋酸的水溶液；流动相 B：甲醇；等度洗脱：30% B；紫外检测波长：254 nm。

称取一定含量的样品，分别配制 0.6 mg/mL、0.5 mg/mL、0.4 mg/mL、0.3 mg/mL、0.2 mg/mL 一系列浓度梯度的矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的水溶液，进行 HPLC 分析，绘制标准曲线。

2.2.2 C3G 清除自由基活性的研究

2.2.2.1 DPPH 自由基清除活性测定

精确配制浓度为 0.05 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液（0.02g DPPH 干粉溶于

中国知网 https://www.cnki.net

100 mL 无水乙醇中），现用现配，棕色试剂瓶保存；配制不同浓度的样品溶液，包括蓝靛果花色苷复合组分、C3G 单一组分和抗坏血酸。浓度为：0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL；向试管中加入 1.9 mL 的 DPPH 乙醇溶液及 0.1 mL 不同浓度样品溶液，避光反应 5 min 后，517 nm 处测定吸光度 Ai；等体积乙醇代替样品，1.9 mL 的 DPPH 乙醇溶液＋0.1 mL 无水乙醇，测得吸光值 A_0；等体积乙醇代替 DPPH，1.9 mL 无水乙醇+0.1 mL 样品溶液，测得本底吸光值 A_{i0}。

根据以下公式计算清除率[63]。

$$DPPH\text{ 自由基清除率}(\%) = \frac{[A_0 - (A_i - A_{i0})]}{A_0} \times 100\% \quad (2\text{-}1)$$

式中 A_0——乙醇溶液与混合后的吸光度（参照）；

A_i——样品与 DPPH 溶液混合后的吸光度；

A_{i0}——样品本底吸光度。

2.2.2.2 ABTS 自由基清除活性测定

ABTS 母液的配制：准确称取 0.0384 g ABTS+，滴入蒸馏水并定容至 10 mL；精确称量 0.0134 g 过硫酸钾，用蒸馏水溶解定容至 10 mL；按照 1:1 的比例将两种试剂混合，避光放置 12 h，得到 ABTS+储备液。稀释使 ABTS+储备液在 30 ℃、734 nm 波长下的吸光度为 0.70±0.02，即 A_0。配制不同浓度的样品溶液，包括蓝靛果花色苷复合组分、C3G 单一组分和抗坏血酸。浓度为：0.02、0.03、0.04、0.08、0.12、0.16 mg/mL；取 0.1 mL 不同浓度样品溶液与 ABTS 工作液 1.4 mL 漩涡振荡器混匀，室温下，置于暗处反应 6 min 后，测定 734 nm 吸光度 A_i。

$$ABTS\text{ 自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\% \quad (2\text{-}2)$$

2.2.2.3 超氧阴离子自由基清除活性测定

配制 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液：3.028 g 溶于 450 mL 蒸馏水中，加 HCl 调至 pH 为 8.20，再用蒸馏水定容至 500 mL。配制 1.5 mmol/L 的邻苯三酚溶液的 HCl 溶液。配制不同浓度的样品溶液，包括蓝靛果花色苷复合组分、C3G 单一组分和抗坏血酸。浓度为：0.2、0.5、1、1.5、2、3 mg/mL。移取 200 μL 不同浓度的样品溶液，加入 5.7 mL Tris-HCl 缓冲液中，最后加入邻苯三酚溶液 0.1 mL，漩涡震荡，混匀后在 320 nm 波长下，至反应进行 6 min，记录吸光度值 A_i；对照管：200 μL 花色苷+5.7 mL Tris-HCl+0.1 mL 蒸馏水，与上述方法一致，测定吸光值 A_{i0}。空白管：200 μL 蒸馏水+5.7 mL Tris-HCl+0.1 mL 邻苯三酚溶液，与上述方法一致，测定吸光值 A_0。按照式 2-3 测量超氧

中国知网 https://www.cnki.net

阴离子自由基清除率。

$$超氧阴离子自由基清除率(\%) = \left[1 - \frac{A_i - A_{i0}}{A_0}\right] \times 100\% \quad （2\text{-}3）$$

2.2.2.4 羟自由基清除活性测定

配制 9 mmol/L 水杨酸溶液，0.0622 g 水杨酸溶于 50 mL 95%乙醇中；配制 9 mmol/L 硫酸亚铁溶液，0.1252 g 溶于 50 mL 蒸馏水中；配制 8.8 mmol/L H_2O_2：22 μL H_2O_2 溶于 25 mL 蒸馏水中；配制不同浓度的样品溶液，包括蓝靛果花色苷复合组分、C3G 单一组分和抗坏血酸。浓度为：0.03、0.06、0.16、0.3、0.4、0.5 mg/mL；1 mL 样品+1 mL 水杨酸+1 mL 硫酸亚铁+1 mL H_2O_2，震荡，37 ℃水浴 30 min，反应结束后，在 510 nm 处测定吸光度 A_i。1 mL 样品+1 mL 水杨酸+1 mL 硫酸亚铁+1 mL 蒸馏水，震荡，37℃水浴反应 30 min，510 nm 处测定吸光度 A_{i0}。1 mL 蒸馏水+1 mL 水杨酸+1 mL 硫酸亚铁+1 mL 过氧化氢，震荡，37℃水浴反应 30 min，510 nm 处测定吸光度 A_0。

$$羟自由基清除率（\%）= \left[1 - \frac{A_i - A_{i0}}{A_0}\right] \times 100\% \quad （2\text{-}4）$$

2.3 C3G 对小鼠辐射防护作用的研究

2.3.1 实验动物分组

健康 ICR 雄鼠（7~8 周龄），体重为 20±2 g，购于哈尔滨医科大学实验动物中心，给予常规动物饲料喂养。小鼠饲料购自北京科澳协力饲料有限公司。所有实验动物同室分笼饲养，遵循 12 h 光照 12 h 黑夜的循环标准。实验室适应性喂养一周后开始实验。实验期间小鼠自由饮水和自由采食。

具体分组如下：正常对照组、辐射对照组、阳性对照组（辐射前腹腔注射 200 mg/kg bw 氨磷汀）、C3G 低剂量处理（50 mg/kg bw）+辐射组、C3G 高剂量处理（150 mg/kg bw）+辐射组。每组 10 只小鼠，所有实验小鼠的饲养条件相同，自由进食进水。

2.3.2 辐射模型建立

空白对照组、辐射对照组和阳性对照组分别灌胃生理盐水，其他组则灌胃相同体积不同浓度的 C3G 溶液，每天一次，均在清晨空腹灌胃，连续灌胃 14 d 后，除正常对照组外，其余各组小鼠进行 $^{60}Co\gamma$全身辐射，皮源距 97.5 cm，吸收剂量率 1 Gy/min，总吸收剂量 5 Gy。阳性对照组小鼠辐射前半个小时腹腔注射氨磷汀（200 mg/kg bw）。小鼠辐射后，断水断粮 24 h，眼球取血后

中国知网 https://www.cnki.net

断颈处死、解剖，进行多项指标的测定。

2.3.3 小鼠体重变化

灌胃的 14 d 中，每隔 1 d 对小鼠的体重进行记录，以小鼠体重为纵坐标，灌胃天数为横坐标，绘制体重变化曲线。

2.3.4 小鼠脏器指数的变化

C3G 处理及辐射结束后，断水断粮，24 h 后，各组小鼠经眼球取血后，脱臼处死，迅速解剖取出脾脏、肝脏、心脏、胸腺和脑组织，用预冷的生理盐水漂洗，除去血污，用滤纸擦干分别称重，液氮预冻后，-80℃冰箱保存各组织。按照式 2-5 计算脏器指数。

$$\text{脏器指数}=\text{脏器重量}/\text{小鼠体重}\times 100\% \qquad (2\text{-}5)$$

2.3.5 小鼠脾脏、肝脏病理学观察

取小鼠肝脏、脾脏，放入 10%甲醛溶液中固定 48 h 后，常规石蜡包埋、切片，厚度为 5 μm 左右。苏木精-伊红（HE）染色后，组织切片于 100 倍和 400 倍光学显微镜下观察形态变化。

2.3.6 外周血象白细胞计数

首先配制白细胞稀释液，冰醋酸 1.5 mL 和 1%龙胆紫 1 mL，加蒸馏水定容到 100 mL。小鼠经眼球取血后，立即取出 20 μL 血液，加入到 380 μL 白细胞稀释液中，混匀后，静置 2~3 min，待细胞悬液变至棕褐色，吸取上清液，滴入计数池内，低倍镜下计数。白细胞计数按式 2-6 计算。

$$\text{白细胞数}（\times 10^9/\text{L}）=4\text{ 个大方格中所有的白细胞数}/4\times 10^7\times\text{稀释倍数} \qquad (2\text{-}6)$$

2.3.7 骨髓细胞微核率的测定

将小鼠股骨剔除肌肉组织，剪去股骨两段，使用 2 mL 注射器吸取牛血清，插入股骨中间，将骨髓冲入离心管中，敲打均匀后，1000 r/min 离心 10 min。弃去多余上清液，留下约 0.5 mL 上清液，与剩余沉淀物混匀，滴一滴于载玻片上，推片长度约为 2~3 cm。推片晾干后，放入充满甲醛的平皿中固定 15 min，晾干后，滴加瑞士-吉姆萨染液 2~3 滴覆盖整个标本图片，染色 1~2 min，再滴加等量的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 6.4~6.8），轻轻晃动玻片，与瑞

中国知网 https://www.cnki.net

士-吉姆萨染液充分混匀，染色 3~5 min。最后用水缓慢冲洗，晾干。在低倍镜下选择细胞完整、分散均匀的区域，再在油镜下观察计数。多染红细胞（PCE）呈灰蓝色，正染红细胞（NCE）呈桔黄色，典型的微核为单个，圆形，边缘光滑整齐，呈紫红色或蓝紫色。微核率按照式 2-7 计算。

微核率（‰）=含有微核的 PCE 数/1000　　（2-7）

2.3.9 小鼠氧化应激指标的测定

小鼠经眼球取血后，将血液在 4 ℃静置后，3000 r/min 离心 15 min，取上清液，测定小鼠血清中抗氧化防御系统，包括 SOD、CAT、GSH、MDA 活性的测定，研究 C3G 对辐射诱导氧化损伤的防护作用。根据南京建成生物工程研究所生产的试剂盒，对以下指标进行测定。

2.3.9.1 总超氧化物歧化酶（T-SOD）活性的测定

按照南京建成试剂公司 T-SOD 试剂盒说明书测定 T-SOD 活性，测定步骤如下表 2-3：

表 2-3 血清中 T-SOD 活力的测定步骤

试剂	测定管	对照管
试剂一应用液（mL）	1.0	1.0
样品（μL）	20	
双蒸水（μL）		20
试剂二（mL）	0.1	0.1
试剂三（mL）	0.1	0.1
试剂四应用液（mL）	0.1	0.1
漩涡混匀器混匀后，置 37 ℃恒温水浴 40 min		
显色剂（mL）	2	2
混匀，室温放置 10 min，于波长 550 nm 处，双蒸水调零，测定吸光值。		

计算血清中 T-SOD 水平的公式如下：

$$T-SOD(U/mL)=\frac{A_1-A_2}{A_1}\div 50\%\times V\times W \qquad (2\text{-}8)$$

式中 A_1—对照管吸光度；

A_2—样品管吸光度；

V—反应体系的稀释倍数；

W—样品测试前的稀释倍数。

中国知网 https://www.cnki.net

2.3.9.2 过氧化氢酶（CAT）活性的测定

过氧化氢酶（CAT）可以分解 H_2O_2，可通过加入钼酸铵而迅速中止，在 405 nm 处测定吸光值，计算 CAT 活力。测定血清中 CAT 活力的具体步骤见表 2-4。

表 2-4 血清中 CAT 活力的操作步骤

试剂	对照管	测定管
血清（mL）		0.1
试剂一（37℃预温）（mL）	1.0	1.0
试剂二（37℃预温）（mL）	0.1	0.1
混匀，37 ℃水浴准确反应 1 min		
试剂三（mL）	1.0	1.0
试剂四（mL）	0.1	0.1
血清（mL）	0.1	
混匀，波长 405 nm，双蒸水调零，测定吸光值。		

计算血清中 CAT 水平的公式如下：

$$CAT（U/mL）=(A_1-A_2)\times 271\times\frac{1}{60\times B}\times W \quad (2\text{-}9)$$

式中 A_1—对照管吸光度；

A_2—样品管吸光度；

B—取样量；

W—样品测试前的稀释倍数。

2.3.9.3 还原型谷胱甘肽（GSH）活性的测定

还原型谷胱甘肽（GSH）可与二硫代二硝基苯甲酸（DTNB）反应，生成一种黄色化合物，可在 405 nm 下测定吸光值，具体操作步骤见表 2-5。

表 2-5 血清中 GSH 水平的操作步骤

试剂	空白管	标准管	测定管
试剂一（μL）	100		
20 μmol/L GSH 标准品（μL）		100	
上清液（μL）			100
试剂二（μL）	100	100	100
试剂三（μL）	25	25	25
混匀，静置 5 min，酶标仪测定各孔吸光度值			

中国知网 https://www.cnki.net

计算血清中 GSH 水平的公式如下：

$$GSH（\mu mol/L）=(A_1-A_2)/(A_3-A_4)\times Cs\times W \quad （2\text{-}10）$$

式中 A_1—样品管吸光度；

A_2—对照管吸光度；

A_3—标准管吸光度；

A_4—空白管吸光度；

Cs—标准品浓度（μmol/L）；

W—样品测定前稀释倍数。

2.3.9.4 丙二醛（MDA）的测定

丙二醛（MDA）是过氧化脂质降解产物，可与硫代巴比妥酸（TBA）缩合，形成红色产物，在 532 nm 处有最大吸收峰。因底物为硫代巴比妥酸（TBA），所以称 TBA 法。血清中 MDA 含量的操作步骤见表 2-6。

表 2-6 血清中 MDA 含量的操作步骤

试剂	空白管	标准管	测定管	对照管
10 nmol/mL 标准品（mL）		0.1		
无水乙醇（mL）	0.1			
测试样品（mL）			0.1	0.1
试剂一（mL）	0.1	0.1	0.1	0.1
混匀（摇动几下试管架）				
试剂二应用液（mL）	3	3	3	3
试剂三应用液（mL）	1	1	1	
50%冰醋酸（mL）				1
旋涡混匀器混匀，试管口用保鲜膜扎紧，刺一小孔，95 ℃水浴 40 min，取出后流水冷却，532 nm 处，双蒸水调零，测定各管吸光值。				

计算血清中 MDA 水平的公式如下：

$$MDA（\mu mol/L）=(A_1-A_2)/(A_3-A_4)\times Cs\times W \quad （2\text{-}11）$$

式中 A_1—样品管吸光度；

A_2—对照管吸光度；

A_3—标准管吸光度；

A_4—空白管吸光度；

Cs—标准品浓度（μmol/L）；

W—样品测定前稀释倍数。

中国知网 https://www.cnki.net

2.4 C3G 对 Nrf2 通路影响的研究

2.4.1 C3G 对 Nrf2 的核转位及抗氧化酶的蛋白表达的影响

2.4.2.1 总蛋白质提取

将裂解液置于室温融化，与 1%的 PMSF 混合备用。加入裂解样本，使用低温冷冻离心机，12000 rpm，4 ℃，离心 10 min，收集上清液，即为所得的蛋白质抽提物。

2.4.2.2 核蛋白提取

取适量组织，尽可能切成非常细小的碎片，加入 200 μL 细胞浆蛋白抽提试剂 A 与 10 μL 细胞浆蛋白抽提试剂 B，并加入 PMSF 和 DTT 至其终浓度为 1 mM，充分匀浆，匀浆需在冰浴 15 min。12000 rpm，4 ℃离心，上清液即为抽提到的部分细胞浆蛋白。将沉淀用预冷的 PBS 洗 3 次，1000 rpm，离心 10 min，弃上清。将 20 μL 细胞沉淀加入 200 μL 细胞浆蛋白抽提试剂 A，其中添加了 PMSF 和 DTT。剧烈震荡 5 s，冰浴 15 min。加入 10 μL 细胞浆蛋白抽提试剂 B，震荡 5 s，12000 rpm，4 ℃离心 5 min，取上清即为细胞浆蛋白。在沉淀中加入 50 μL 细胞核蛋白抽提试剂 C（添加了 PMSF 和 DTT）。剧烈震荡 15~30 s 后，冰浴，每隔 2 min 再涡旋 30 s，共 30 min。12000 rpm，4 ℃离心，取上清即为细胞核蛋白。

2.4.2.3 蛋白质定量

由沈阳万类生物公司的 BCA 试剂盒说明书进行蛋白质定量。

2.4.2.4 SDS-PAGE

先制备聚丙烯酰胺凝胶，再制备蛋白上样液，用 5×Loading Buffer 和 PBS 稀释蛋白样品，沸水浴 5 min 后制样备用。上样 20 μL，其中含 40 μg 蛋白。最后进行 SDS-PAGE：拔出梳子后，注入电泳液，每孔加入 20 μL 电泳上样液，最后加入 5 μL 蛋白 Marker，调整电流最大，电压 80 V，恒压电泳 2.5 h。

2.4.2.5 转印

电泳结束后，将凝胶的浓缩胶部分及分离胶的底部切掉，将剩余的整块胶至转印缓冲液内浸泡 10 min；在转印夹负极一侧铺满形成“海绵-滤纸-膜-胶-滤纸-海绵”的“三明治”形状。铺好后，夹紧转印夹，插入转印槽内，注入转印缓冲液，调整电流至最大，电压 80 V，转印 1.5 h。

2.4.2.5 封闭

转印结束后取出 PVDF 膜，浸入 TBST 中，摇床摇动 5 min。倒掉 TBST，

中国知网 https://www.cnki.net

将 PVDF 膜浸入脱脂奶粉溶液中，摇床缓慢摇动 1 h。

2.4.2.6 孵育一抗

将抗体工作液倒入杂交袋中，放入 PVDF 膜，封口后 4 ℃进行抗体孵育。

2.4.2.7 孵育二抗

将二抗工作液倒入杂交袋中，放入漂洗好的 PVDF 膜，封口后 37 ℃进行抗体孵育 45 min。

2.4.2.8 ECL 底物发光

孵育二抗后的 PVDF 膜从杂交袋中取出，浸入 TBST 中，摇床摇动 5 min，重复此步骤 6 次。将 ECL 化学发光试剂 A、B 等体积混合备用。用滤纸吸干水分后，洒上 ECL 发光液，静置反应 5 min。用另一张保鲜膜覆盖其上，用玻璃棒赶出多余的液体，然后转入暗盒中，在暗室进行曝光。

2.4.2.9 抗体剥脱

取出 PVDF 膜，浸入蒸馏水中，置于摇床 5 min，重复 2 次。倒掉蒸馏水，加入剥脱液，完全覆盖 PVDF 膜，置于摇床 15 min。倒掉剥脱液，用蒸馏水冲洗，加入再蒸馏水，置于摇床 10 min，重复 2 次。

2.4.2.10 封闭

将 PVDF 膜浸入 TBST 中，置于摇床 5 min。倒掉 TBST，将 PVDF 膜浸入脱脂奶粉溶液中，置于摇床 1 h。

2.4.2.11 孵育内参抗体

将工作液倒入杂交袋中，放入 PVDF 膜封口，4 ℃下进行抗体孵育。

2.4.2.12 孵育二抗

从杂交袋中取出孵育内参后的 PVDF 膜，浸入 TBST 中，摇床摇动 5 min，重复此步骤 4 次。将二抗工作液倒入杂交袋中，放入漂洗好的 PVDF 膜中封口后，37 ℃孵育。

2.4.2.13 ECL 底物发光

取出孵育二抗后的 PVDF 膜，浸入 TBST 中摇动 5 min，重复此步骤 6 次。将 ECL 化学发光试剂 A、B 等体积混合。将 PVDF 背面的水分用吸干，平铺到保鲜膜上，均匀的洒上 ECL 发光液，静置反应 5 min。用另一张保鲜膜覆盖其上，用玻璃棒赶出多余的液体，然后转入暗盒中，在暗室进行曝光。

2.4.2.14 结果分析

将胶片进行扫描，用凝胶图象处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)分析目标条带的光密度值。

中国知网 https://www.cnki.net

2.4.2 肝脏组织基因的相对表达量

2.4.2.1 肝脏组织总 RNA 的提取

按照 TRNzol A$^+$试剂盒说明书进行肝脏组织总 RNA 的提取。

RNA 完整性检测：琼脂糖凝胶电泳，观察 RNA 有无降解。

取少量 RNA 稀释将稀释后的 RNA 加入石英比色皿中，用 ddH_2O 调零，采用紫外分光光度计测定 260 nm 及 280 nm 波长处的 OD 值。根据公式 2-12 计算 RNA 的浓度。根据 $OD_{260\ nm}$ 与 $OD_{280\ nm}$ 的比值分析 RNA 的纯度，其值在 1.7~2.0 的样品表明纯度较好。

RNA 的浓度（μg/μL）=（$OD_{260\ nm}-OD_{280\ nm}$）× n × 0.04 $\mu g/\mu L$ （2-12）

式中，n—稀释的倍数。

2.4.2.2 cDNA 的合成

准备 RNA-Primer 预混液，按照表 2-7 内容将试剂加入无 RNase 的反应管中，补水至终体积 13 μL。轻柔预混液，短暂离心，在 65 ℃下水浴 10 min，随后置于冰上保存。

表 2-7 RNA-Primer 预混液

组分	用量
Total RNA	4 μg
60 μM Oligo(dT)$_{18}$	1 μL
250 μM Random Primer	1 μL
Rnase-free Water	补水至 13 μL

准备逆转录反应液，按照表 2-8，将不同的试剂组分加入准备的 RNA-Primer 预混液中，至终体积为 25 μL。

表 2-8 cDNA 合成体系

组分	用量(μL)
RNA-Primer Mix	13
5×RT reaction Buffer	5
25mM dNTP	1
25 U/μL RNase Inhibitor	1
200 U/μL M-ML V RTase	1
Rnase-free Water	4

中国知网 https://www.cnki.net

将上述溶液混合后，短暂离心，置于 37 ℃温育 60 min。再于 85 °C 下加热 5 s。最终得到的 cDNA 产物，-80 °C 保存使用。

2.4.2.2 RT-PCR 扩增反应

本实验以β-actin 为内参，对目的基因进行 PCR 扩增。将 cDNA 和处理好的引物依照表 2-9 所示的 PCR 扩增反应体系进行反应，使用时要彻底化冻、混匀。

PCR 扩增反应体系如表 2-9 所示。

表 2-9 PCR 扩增反应体系

组分	用量(μL)
cDNA	2
Forward Primer(10 μmol/L)	0.4
Reverse Primer (10 μmol/L)	0.4
Passive Reference Dye I (50×)	0.4
2xTaq™ TOP Green qPCR SuperMix	10
ddH_2O	6.8

根据 7300 系统设定反应条件，如表 2-10 所示。并做溶解曲线来确定合成产物的专一性。PCR 结束后，根据扩增仪各反应孔的数值，以β-actin 为内参，利用公式 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 计算最后目的基因的相对表达量。

表 2-10 PCR 扩增反应条件

步骤	温度(°C)	时间(s)	循环数
预变性	94	30	1
变性	94	5	45
退火	60	30	45

2.5 数据统计与分析

本文采用 Originpro8.5 软件绘制相关图表，原理图及相关化学结构为 Chemdraw 软件绘制，扫描电镜图及原子力显微镜图为专用仪器导出。所有实验数据都以平均值±标准差表示。

中国知网 https://www.cnki.net

第 3 章　C3G 的分离纯化及清除自由基活性的研究

3.1 引言

氧化应激是指机体在受到外界的有害刺激时，体内高活性分子如活性氧自由基（ROS）产生过多，机体氧化系统和抗氧化系统失衡，过量的 ROS 不能得以清除，从而导致组织损伤。电离辐射对机体造成损伤主要包括两种途径：一是直接作用于生物大分子如 DNA、RNA、蛋白质等，导致细胞乃至组织、器官的损伤[64]。如溶酶体蛋白酶从溶酶体腔到胞质溶胶，导致细胞死亡；DNA 单链断裂或双链断裂也可引起细胞的损伤甚至死亡。二是间接作用于生物体内的水分子，激发大量自由基，与体内其他物质作用引起细胞凋亡，继而损伤造血系统，免疫系统，神经系统等，造成机体损伤[65]。因此，使用具有抗氧化、清除自由基能力的辐射防护剂可以减轻辐射诱导的氧化损伤，衡量一个物质的抗氧化能力具有十分重要的意义。

花色苷广泛存在于自然界蔬菜和水果的一种水溶性色素，其具有抗炎、抗氧化、预防心脑血管疾病和糖尿病的功效。本实验室前期研究发现蓝靛果花色苷具有良好的抗辐射活性，从中鉴定出 7 种单体组分，其中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷（Cyanidin-3-O-glucoside，C3G）是蓝靛果花色苷复合组分中含量最多、活性最强的花色苷单体[63]。目前常用的天然产物的分离纯化方法主要包括大孔树脂柱层析法、聚酰胺柱层析法、膜分离及高速逆流层析等。

本章首先通过聚酰胺柱层析结合高效液相制备色谱技术分离纯化蓝靛果花色苷复合组分，制备得到 C3G 单一组分。通过比较蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸的 ABTS 自由基清除活性、DPPH 自由基清除活性、羟基自由基清除活性和超氧阴离子自由基清除活性，进一步探究 C3G 抗氧化应激能力。通过上述研究，为进一步研究 C3G 抗辐射、抗氧化应激等活性及机制研究提供实验基础和理论依据。

3.2 C3G 的分离纯化

3.2.1 聚酰胺树脂纯化花色苷

聚酰胺树脂是近年来在天然产物分离领域广泛应用的一种分离树脂。主要用于黄酮类化合物分离纯化，其特点为分辨率强，灵敏度高，操作简单[66]。

中国知网　https://www.cnki.net

由于聚酰胺基团上的O、N原子具有很强的电负性，在酸性条件下可与质子结合形成正电荷基团，而黄酮类和多酚类化合物富含酚羟基，可以形成带负电的阴离子，所以可通过静电吸引力形成氢键缔合产生吸附。而化合物中羟基的数目与位置、溶剂与化合物或溶剂与聚酰胺形成氢键的缔合力大小都会影响氢键的吸附强度。因此，聚酰胺树脂对黄酮、多酚类化合物有很好的吸附效果，通过不同洗脱剂的洗脱可实现这些物质的分离[67, 68]。

将蓝靛果花色苷复合组分的样品溶液缓慢加入装有聚酰胺的层析柱中，待样品溶液完全吸附，吸附饱和，以蒸馏水洗脱出些许水溶性杂质后，至观察紫色条带随着蒸馏水而流下，收集洗脱液。然后通过真空蒸发浓缩乙醇提取物，并通过冷冻干燥获得花色素苷粉末。冻干后利用pH示差法测定花色苷纯度。在缓冲溶液中，花色苷的结构随pH值改变而改变，其颜色也随之改变。当pH=1时，花青素的结构转变为2-苯基苯并吡喃，pH=4.5时，花青素的结构转变为无色的甲醇假碱。其结构的转变是pH的函数，而干扰物的特征光谱是不随pH值的改变而发生变化。通过pH示差法计算出花色苷纯度，洗脱液乙醇的浓度对花色苷纯度的影响如图3-1所示。

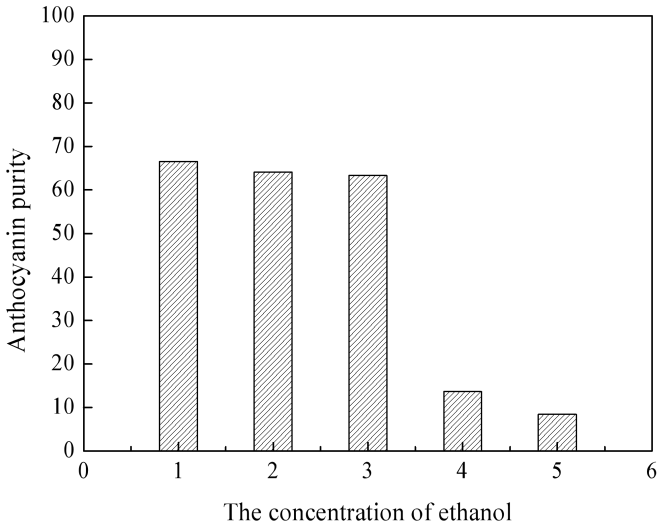


图3-1 洗脱液乙醇的浓度对花色苷纯度的影响

注：1：0；2：10%；3：30%；4：50%；5：70%

由图3-1可见，样品在水的洗脱下，0-11 BV均无太深的颜色，收集在一起，从12 BV开始颜色突然加深，开始收集。再依次用10%、30%、50%、70%乙醇洗脱，每一个梯度的流分收集到一起。通过pH法计算，乙醇浓度为0%、10%、30%时，花色苷纯度较高，为65%左右，当乙醇浓度为50%、70%时，花色苷纯度非常低，为10%。

中国知网 https://www.cnki.net

3.2.2 高效液相制备 C3G

从植物中发现结构新颖且具有药理活性的天然产物，并进一步开发成新药，是人类疾病预防和治疗的重要渠道之一，也是国际天然产物领域关注的研究方向[69]。采用高效率，高分辨率，多功能的分离技术是开展天然产物研究的关键环节之一。近十几年来，制备型高效液相色谱是天然产物化学研究中应用最普遍、最有效和发展最快的分离纯化方法之一。它是一种使用高负载，高分辨率制备色谱柱的高纯度分离色谱分离方法，对极性和非极性、离子型和非离子型、小分子和大分子、热稳定性和热不稳定性化合物均具有较好的分离效果[70]。根据分离化合物的性质可配备不同类型的检测器，如紫外检测器(UV)、蒸发光散射检测器(ELSD)、二极管阵列检测器(DAD)，能够满足不同的分离需求[71]。

以 40%甲醇-60%甲酸水溶液(0.4%)作为流动相，柱温 25 ℃，检测波长为 254 nm，流速为 5 mL/min，上样量为 200 μL，多次收集洗脱液。通过多次制备收样，收集一定量的花色苷洗脱液，浓缩旋蒸甲醇后，冷冻干燥得到固体粉末，对其进行高效液相分析。取 0.5 mg 冻干样品溶解于 1 mL 蒸馏水中，使其通过滤膜，作为待测液。流速为 0.5 mL/min，以 30%甲醇-70%甲酸水溶液(0.4%)作为流动相，柱温为 25 ℃，检测波长为 254 nm。根据 C3G 标品与样品待测液的出峰时间相对应，即 C3G 为 25 min 左右出峰，可判断为同一种物质。图 3-2 为高效液相制备的 C3G 在 254 nm 检测波长下的高效液相分析结果。C3G 标准品与纯化后的样品在 254 nm 波长下出峰时间一致，且峰形较为单一。

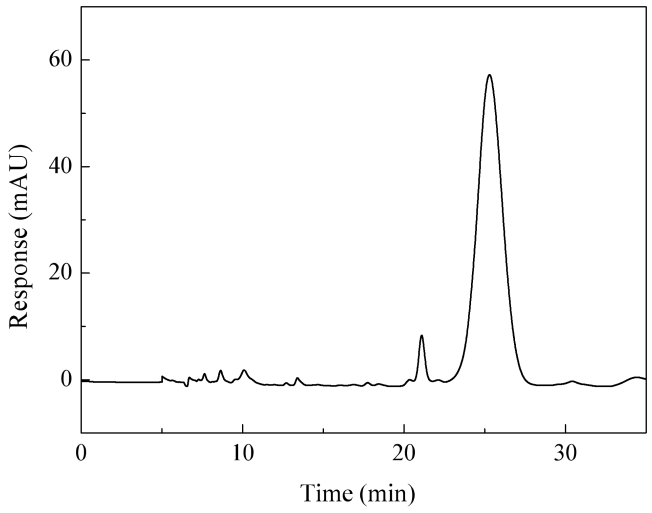


图 3-2 高效液相制备的 C3G 样品 HPLC 分析

中国知网 https://www.cnki.net

配制 0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL、0.6 mg/mL 等一系列浓度梯度的 C3G 标品，通过微孔滤膜后，待测。高效液相分析的条件与高效液相制备样品待测液条件一致，即流速为 0.5 mL/min，以 30%甲醇-70%甲酸(0.4%)-水作为流动相，柱温为 25 ℃，检测波长为 254 nm。测得 C3G 的标准曲线如图 3-3 所示。

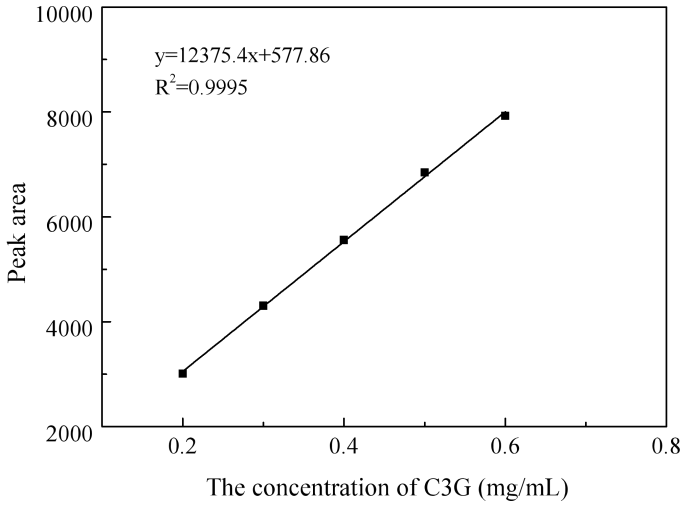


图 3-3 C3G 的标准曲线

由图 3-3 可见，在所研究的浓度范围内，C3G 的浓度与峰面积呈现良好的线性关系。线性方程如下。

$$y = 12375.4x + 577.86 \quad (3\text{-}1)$$

式中 x—C3G 单一组分的浓度（mg/mL）；

y—峰面积。

随着 C3G 单一组分浓度的增加，峰面积也呈线性增长。相关系数 R^2=0.9995，相关性很好。根据峰面积与浓度的关系，计算得出提纯后样品中 C3G 纯度，纯度为 95.74%。

3.3 C3G 清除自由基活性的研究

自由基是一种没有和其他电子配对的电子，主要包括两种，非生理自由基和生理自由基，非生理自由基在机体内可以迅速传递，引发自由基链式反应，常见的稳定的非生理自由基包括 DPPH 自由基和 ABTS 自由基。生理自由基由机体自身产生，对机体伤害极大，包括羟基自由基和超氧自由基等。本研究通过研究 C3G 体外清除自由基的活性，为 C3G 作为辐射诱导的氧化损伤防护剂作理论依据。

中国知网 https://www.cnki.net

3.3.1 C3G 对 DPPH 自由基的清除作用

在有机溶剂中，DPPH 是一种稳定的自由基，在 517 nm 处有最大吸收，当存在抗氧化剂时，它与 DPPH 自由基的单个电子成对时，使 517 nm 处的吸收值减弱或消失，形成紫色到黄色的脱色过程，其下降程度可反映抗氧化剂的自由基清除能力[72]。DPPH 自由基是非生理自由基，它是用化学方法来评价天然产物体外抗氧化能力的重要指标之一。

蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除作用测定结果如图 3-4 所示。实验结果表明，蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对 DPPH 自由基均具有显著的清除作用，且呈浓度依赖关系。样品 25~400 μg/mL 浓度范围内，蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除率急剧增加。在 400~500 μg/mL 的浓度范围内，蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除率增加缓慢，趋于平缓。随着样品浓度的增加，对 DPPH 自由基清除率呈线性增加趋势，C3G 的清除能力略小于同浓度的抗环血酸。浓度 500 μg/mL 时，蓝靛果花色苷复合组分对 DPPH 自由基清除率为 85%，C3G 对 DPPH 自由基清除率为 92%，抗坏血酸对 DPPH 自由基清除率为 96%。在这个浓度范围内，抗坏血酸则表现出比前两者更强的 DPPH 自由基清除率。蓝靛果花色苷复合组分对 DPPH 自由基的清除作用 EC50 值为 134.90±2.13 μg/mL，C3G 对 DPPH 自由基的清除作用 EC50 值为 86.51±1.08 μg/mL 及抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除作用 EC50 值为 65.38±1.94 μg/mL。

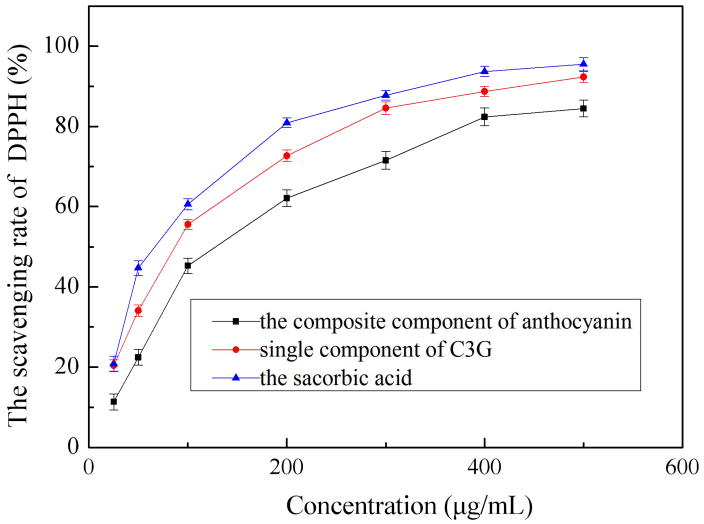


图 3-4 蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对·DPPH 的清除作用

中国知网 https://www.cnki.net

在 10~500 μg/mL 浓度范围内，蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸均随着样品浓度增加，DPPH 自由基的清除率迅速上升，C3G 对 DPPH 自由基清除效果显著高于蓝靛果花色苷复合组分，抗坏血酸的清除 DPPH 自由基能力略高于前两者。

3.3.2 C3G 对 ABTS 自由基的清除作用

ABTS 自由基清除率的测定常用于衡量植物中的活性物质的抗氧化能力。稳定的 ABTS 自由基阳离子具有稳定的蓝绿色发色团，在 734 nm 波长处有最大吸收峰，当 C3G 存在时，ABTS 自由基与之反应，自由基混合物的吸光值下降，下降程度代表了 C3G 对 ABTS 自由基的清除能力[73]。ABTS 可以快速有效的测定化合物的自由基清除能力。蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对 ABTS 自由基的清除作用测定结果如图 3-5 所示。

实验结果表明，蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对 ABTS 自由基均具有显著的清除作用，且呈浓度依赖关系。当样品浓度为 20 μg/mL 时，三者对 ABTS 自由基的清除率相差不大。当样品浓度在 20~160 μg/mL 的范围内，蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对 ABTS 自由基的清除率直线增加。随着样品浓度的增加，对 ABTS 自由基的清除率呈线性增加趋势，C3G 的清除能力大于同浓度的抗环血酸。在这个浓度范围内，C3G 则表现出比前两者更强的 ABTS 自由基清除率。蓝靛果花色苷复合组分对 ABTS 自由基的清除作用 EC50 值为 66.19±1.13 μg/mL，C3G 对 ABTS 自由基的清除作用 EC50 值为 39.31±1.78 μg/mL 及抗坏血酸对 ABTS 自由基的清除作用 EC50 值为 52.21±2.04 μg/mL。

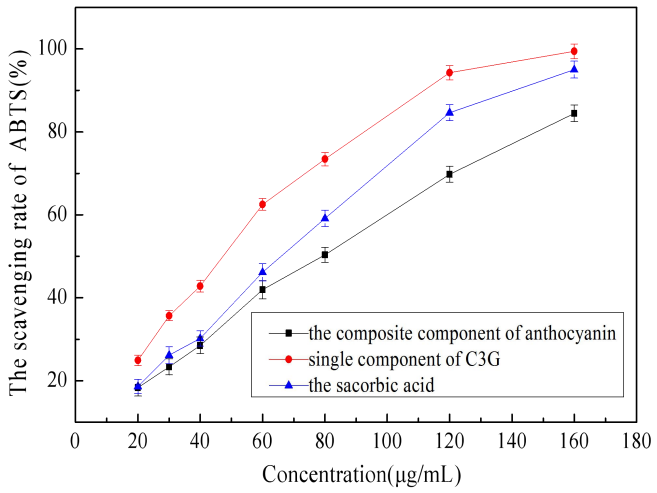


图 3-5 蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对 ABTS·的清除作用

中国知网 https://www.cnki.net

在 20~160 μg/mL 浓度范围内，随着样品浓度升高，ABTS 自由基清除率逐渐升高。由图中可以看出，ABTS 自由基清除能力依次为：C3G>抗坏血酸>蓝靛果花色苷复合组分，当样品浓度为 160 μg/mL 时，C3G 的 ABTS 自由基清除率接近 100%，高于抗坏血酸，而蓝靛果花色苷复合组分的 ABTS 自由基清除率仅为 84.5%。

3.3.3 C3G 对超氧阴离子自由基的清除作用

电离辐射等外界刺激会诱导机体产生大量的超氧阴离子自由基，具有一定的潜在毒性，大量的积聚会破坏细胞 DNA。超氧阴离子自由基还是许多其他 ROS 的前体，可引起脂质和蛋白质的氧化损伤，导致机体各种病理现象，损害生物机体功能[74]。超氧阴离子自由基是体内的氧化酶产生的，在一定数量内不会对机体造成一定的危害。而过量的超氧阴离子自由基损伤机体的抗氧化防御系统，破坏脂质、蛋白质、DNA 等大分子，诱发各种疾病。在本研究中，采用邻苯三酚自氧化法测定超氧阴离子自由基的清除能力。

蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对·O_2^-自由基的清除率测定结果如图 3-6 所示。样品 0.2~2 mg/mL 浓度范围内，蓝靛果花色苷复合组分和 C3G 对·O_2^-自由基的清除率急剧增加。当二者浓度大于 2 mg/mL 时，他们对·O_2^-自由基的清除率增加缓慢。当抗坏血酸的浓度范围是 0.2~1 mg/mL，抗坏血酸分对·O_2^-自由基的清除率增加较快。当抗坏血酸浓度大于 1 mg/mL 时，对超氧阴离子自由基的清除作用基本保持不变。实验结果表明，蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对·O_2^-自由基均具有显著的清除作用，且呈浓度依赖关系。随着样品浓度的增加，对·O_2^-自由基清除率呈线性增长趋势，C3G 的清除能力小于同浓度的抗环血酸。浓度 3 mg/mL 时，蓝靛果花色苷复合组分对·O_2^-自由基清除率为 80%，C3G 对·O_2^-自由基清除率为 93%，抗坏血酸对·O_2^-自由基清除率几乎为 100%。在这个浓度范围内，抗坏血酸则表现出比前两者更强的·O_2^-自由基清除率。蓝靛果花色苷复合组分对·O_2^-自由基的清除作用 EC50 值为 1.06±0.93 mg/mL，C3G 对·O_2^-自由基的清除作用 EC50 值为 0.52±1.28 mg/mL 及抗坏血酸对·O_2^-自由基的清除作用 EC50 值为 0.3±1.04 mg/mL。

中国知网 https://www.cnki.net

图 3-6 为蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对·O_2^-自由基的清除率的测定结果。

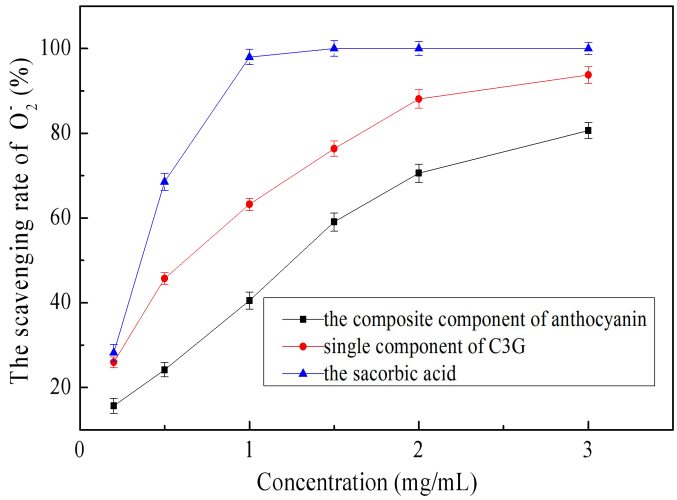


图 3-6 蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对·O_2^-的清除作用

不同的样品对·O_2^-的清除活性随着样品浓度的增加而增大，呈浓度依赖关系。当浓度达到 1 mg/mL 时，抗坏血酸对·O_2^-的清除率几乎达到 100%，此后，浓度继续增加，清除率基本不会再变化。C3G 对·O_2^-自由基清除活性则明显高于蓝靛果花色苷复合组分，结果表明，C3G 清除自由基能力显著增强。

3.3.4 C3G 对羟自由基的清除作用

羟自由基是 ROS 中对生物体危害最大、毒性最强的一种自由基，对活细胞中各种分子均有严重的损伤作用。它可以结合 DNA 中的核苷酸，导致 DNA 双链断裂，产生基因突变，甚至引发癌变，同时也是脂质过氧化过程的引发剂。此外，羟自由基非常活跃，几乎能够破坏细胞中的所有分子，发生各种不同类型的反应，对细胞和机体有高度的破坏性，对核酸、脂质及蛋白质等生命活性物质造成一定程度的氧化损伤，引起细胞结构功能的损伤[75]。

蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对·OH 的清除率比较见图 3-7。实验结果表明，蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对·OH 自由基均具有显著的清除作用，且呈浓度依赖关系。当样品浓度为 30 mg/mL 时，C3G 和抗坏血酸对·OH 自由基的清除率相差不大，而蓝靛果花色苷复合组分对·OH 自由基的清除能力略小于前两者。当样品浓度在 30~500 mg/mL 的范围内，蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对·OH 自由基的清除率均直

中国知网 https://www.cnki.net

线增加。随着样品浓度的增加，对·OH 自由基的清除率呈线性增加趋势，C3G 的清除能力大于同浓度的抗环血酸。蓝靛果花色苷复合组分对·OH 自由基的清除作用 EC50 值为 175.19±1.72 mg/mL，C3G 对·OH 自由基的清除作用 EC50 值为 75.6255±1.41 mg/mL 及抗坏血酸对·OH 自由基的清除作用 EC50 值为 97.38±1.65 mg/mL。

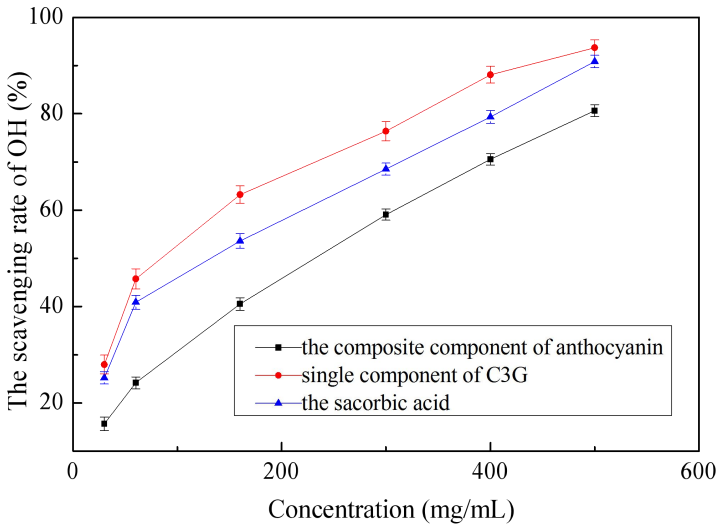


图 3-7 蓝靛果花色苷复合组分、C3G 及抗坏血酸对·OH 的清除作用

与蓝靛果花色苷复合组分相比，C3G 对·OH 的清除能力显著升高，并呈现浓度依赖关系。500 mg/mL 浓度下，C3G 与抗坏血酸对·OH 的清除率均达到 90%以上，且均大于蓝靛果花色苷复合组分对·OH 的清除能力。

3.4 本章小结

（1）本章采用聚酰胺树脂以及制备液相技术对蓝靛果花色苷复合组分分离纯化。研究了聚酰胺树脂下洗脱液中乙醇的浓度对花色苷分离纯化效果的影响。其中，乙醇浓度为 0%、10%、30%时，花色苷纯度较高，为 65%左右，当乙醇浓度为 50%、70%时，花色苷纯度低至 10%。

（2）高效液相制备的条件是：40%甲醇-60%甲酸水溶液(0.4%)作为流动相，柱温 25 ℃，检测波长为 254 nm，流速为 5 mL/min，上样量为 100 μL，多次收集样品溶液。经过分离纯化，得到 C3G，进行高效液相分析，高效液相分析的条件为：30%甲醇-70%甲酸水溶液(0.4%)作为流动相，柱温 25 ℃，检测波长为 254 nm。根据 C3G 标品与样品待测液的出峰时间相对应，即 C3G

中国知网 https://www.cnki.net

为 25 min 左右出峰，可判断为同一种物质。C3G 标准品与纯化后的样品在 254 nm 波长下出峰时间一致，且峰形较为单一。有标准曲线可知，在所研究的浓度范围内，C3G 的浓度与峰面积呈现良好的线性关系。经过 C3G 标准曲线计算，发现其纯度=95.74%。

（3）花色苷具有良好的清除自由基的能力。本章主要比较了蓝靛果花色苷复合组分、C3G 以及抗坏血酸三者对非生理自由基和生理自由基的清除效果，主要包括 ABTS 自由基清除活性、DPPH 自由基清除活性、羟基自由基清除活性和超氧阴离子自由基，结果发现 C3G 与蓝靛果花色苷复合组分相比，有较强的清除自由基的能力。其中，C3G 对 ABTS 自由基和羟自由基的清除能力高于阳性对照——抗坏血酸。

（4）C3G 对自由基具有较好的清除作用且清除能力随着浓度的增加而呈现明显的量效关系，证明 C3G 是一种良好的天然产物抗氧化剂和辐射防护剂。

中国知网 https://www.cnki.net

第 4 章 C3G 对辐射损伤小鼠防护作用的研究

4.1 引言

电离辐射对机体造成巨大的损害，它作用于生物大分子，如蛋白质、脂质、DNA、RNA 等，导致细胞功能紊乱，机体酶系活性降低甚至丧失，DNA 损伤断裂，进而导致机体病变。电离辐射对机体产生非特异性刺激，还作用于体内的水分子，使其发生电离，从而产生自由基，引起细胞凋亡、坏死，导致氧化应激的增加，机体代谢紊乱，引起免疫系统、造血系统、神经系统等功能障碍[76]。

机体拥有自身的抗氧化体系，包括抗氧化酶系，如 T-SOD、CAT 等，和非酶类抗氧化物质，如 GSH 等，这些系统可以有效地缓解氧化应激造成的损伤、功能紊乱等，体内的自由基被清除而不过量，使机体处于氧化还原的平衡状态。如果自由基产生过多，抗氧化酶系无法维持自由基平衡，造成氧化应激损伤[77]。电离辐射产生大量的自由基，产生 DNA 链断裂、脂质过氧化，酶系变性等，如果不能及时清除，可能会导致机体产生病变。因此，理想的辐射防护剂应该对抗氧化体系有一定的保护作用。

本章研究主要是建立 ^{60}Coγ辐射损伤模型，分为 5 组，分别为正常对照组、辐射对照组、阳性对照组、低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）和高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）。辐射前腹腔注射氨磷汀（200 mg/kg）作为阳性对照组。通过研究小鼠体重、脏器指数、外周血白细胞数、微核数，肝脏组织形态学变化分析以及 T-SOD 活力、GSH 活力、CAT 活力和 MDA 含量等指标的测定进一步揭示 C3G 对辐射损伤小鼠的防护作用。

4.2 小鼠体重变化

各组实验小鼠每两天在灌胃前称量体重并记录。每天对小鼠灌胃不同剂量的 C3G，连续 14 d，在灌胃的 14 d 里，空白对照组、辐射对照组、阳性对照组和 C3G 处理组的小鼠生长状态良好。

中国知网 https://www.cnki.net

小鼠体重变化见图 4-1。

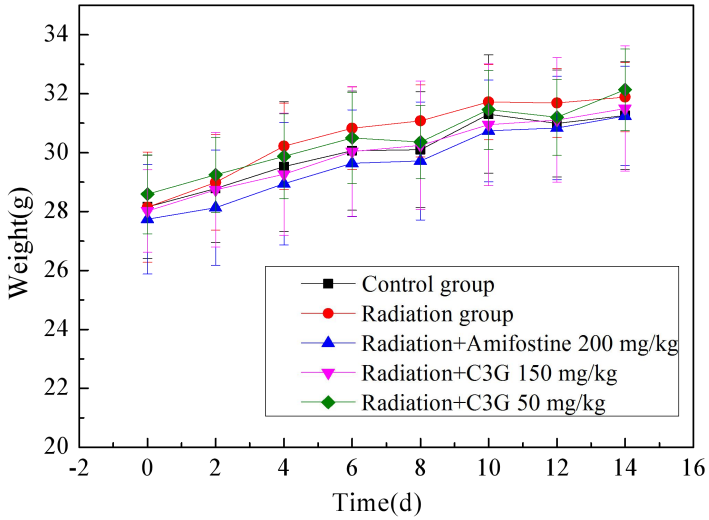


图 4-1 小鼠体重变化

由图 4-1 可知，小鼠在第一周体重增长较快，第二周呈缓慢增长趋势。最终，小鼠体重基本在 32 g 左右。辐射前，C3G 给药组与其他实验组的小鼠体重无显著性差异，说明 C3G 没有产生急性和亚急性毒性。

4.3 免疫器官指数

外周免疫器官和中枢免疫器官主要指的是动物体内的免疫器官，胸腺是动物体内非常重要的中枢免疫器官，另外，它也是胸腺 T 细胞发育及分化的主要场所，它可以介导细胞免疫，同时还可以调节机体的免疫功能。胸腺和脾脏是小鼠体内重要的免疫器官之一，这些脏器指数的数值能够体现小鼠是否出现免疫系统的功能紊乱。辐射可以引起免疫系统的紊乱，免疫功能障碍是辐射引起的最常见的疾病。免疫系统的损害可以反应出机体真正的健康状态。所以，免疫系统的防护是辐射防护最重要的工作之一。对机体给予 C3G，可以缓解辐射造成的免疫系统的损伤。胸腺和脾脏对辐射有显著的敏感性。使用 ^{60}Coγ辐射 ICR 小鼠后，其胸腺和脾脏发生明显萎缩，胸腺形态变形，发黑，质量明显减轻。称量各组小鼠脾脏和胸腺，根据公式计算免疫器官指数。

中国知网 https://www.cnki.net

C3G 对免疫器官指数的影响见表 4-1。

表 4-1 C3G 对免疫器官指数的影响

组别	脾脏指数（mg/g）	胸腺指数（mg/g）
正常对照组	3.34±0.52	2.58±0.12
辐射对照组	1.28±0.27$^{\#}$	0.54±0.15$^{\#}$
阳性对照组	1.77±0.01$^{*\#}$	2.11±0.12$^{*\#}$
低剂量（50mg/kg bw）C3G 组	1.74±0.03$^{*\#}$	1.37±0.04$^{*\#}$
高剂量（150mg/kg bw）C3G 组	2.14±0.02$^{*\#}$	1.94±0.04$^{*\#}$

注：表中数据表示为实验平均值±标准差（n=10）；#与正常对照组存在显著性差异，$P<0.05$；*与辐射对照组存在显著性差异，$P<0.05$。

由表 4-1 可见，辐射对照组的脏器指数明显低于正常对照组，脾脏指数和胸腺指数分别为 1.28±0.27 mg/g 和 0.54±0.15 mg/g，这说明辐射对小鼠的免疫系统造成了严重的损伤。而 C3G 预处理组的脏器指数都有一定程度的回升，但是较正常对照组还是有一定差异，说明辐射对免疫系统造成的损伤是不可逆的。但 C3G 对小鼠的免疫器官都有一定的保护作用，可以降低辐射造成的损伤。辐射前半小时腹腔注射氨磷汀（200 mg/kg bw），可以缓解辐射对小鼠造成的损伤，脾脏指数和胸腺指数有所增加。而灌胃不同剂量的 C3G 组小鼠脾脏指数和胸腺指数均有一定的提升。这说明，氨磷汀和 C3G 都能在一定程度上缓解免疫系统的损伤，改善小鼠的免疫造血器官的功能，缓解电离辐射对机体的损伤作用。

4.4 外周血象白细胞（WBC）计数

辐射极易造成造血系统的损害。造血干细胞对辐射具有高度敏感性，包括红细胞、白细胞和血小板，白细胞是机体防御系统的重要组成部分。造血干细胞可以产生各种不同的血细胞，也是各种血细胞的原始细胞，维持机体造血机能[77]。造血干细胞对辐射的敏感性很高，辐射后，造血干细胞急剧减少，导致各种成熟血细胞来源匮乏，继而使白细胞减少，导致造血功能急剧下降。外周血白细胞数能够较好的反映受辐照小鼠造血系统以及血液系统的受损情况，其中，白细胞的减少是造血系统伤害的典型指标。

中国知网 https://www.cnki.net

C3G 对外周血象白细胞数（WBC）的影响见图 4-2。

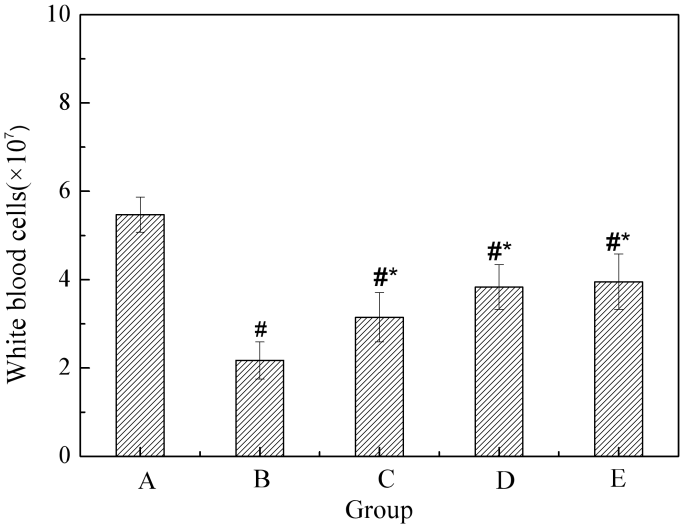


图 4-2 C3G 对外周血象白细胞数的影响

注：#与正常对照组存在显著性差异，$P<0.05$；*与辐射对照组存在显著性差异，$P<0.05$。

由图 4-2 可见，小鼠经 $^{60}Co\gamma$辐射后，白细胞数相对正常对照组显著降低，白细胞数为（2.17±0.42）×10^7个，这表示辐射损伤模型成功建立，而 $^{60}Co\gamma$对小鼠白细胞造成了极大的损伤，使小鼠的造血机能受到严重损害。阳性对照组、低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）、高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）分别为(3.15±0.56）×10^7个、（3.83±0.51）×10^7个、（3.95±0.63）×10^7个。辐射前腹腔注射氨磷汀，可减轻白细胞数降低的程度。与辐射对照组相比，C3G 处理组的白细胞数明显升高，表明 C3G 和氨磷汀对辐射造成的造血系统的损伤有一定保护作用，缓解辐射对造血系统造成的损害。但是，C3G 不同剂量预处理组和阳性对照组的白细胞数均未能恢复至正常水平，这说明辐射对机体造血系统造成的损伤是不可逆的，C3G 和氨磷汀均不能使造血系统恢复至正常水平。

4.5 骨髓嗜多染红细胞微核率的测定

微核是由有丝分裂后期丧失着丝粒的染色体断片产生的。这些断片或染色体在分裂过程中行动滞后，在分裂末期不能进入主核，便形成了主核之外的核块。当子细胞进入下一次分裂间期时，它们便浓缩成主核之外的小核，即形成了微核。骨髓嗜多染红细胞微核率的大小与骨髓 DNA 的损伤程度呈正相关。一般用微核率的大小反映辐射引起的染色体损伤的程度[78]。C3G 对

中国知网 https://www.cnki.net

骨髓嗜多染红细胞微核率的影响见图 4-3。

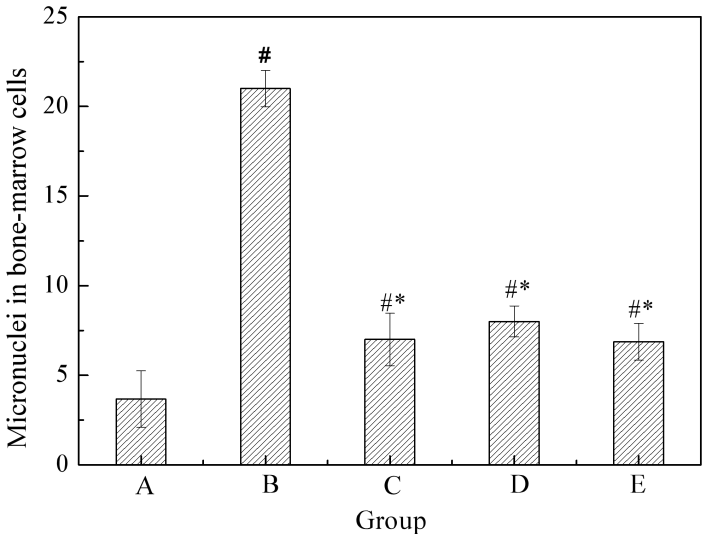


图 4-3 C3G 对骨髓嗜多染红细胞微核率的影响

注：#与正常对照组存在显著性差异，$P<0.05$；*与辐射对照组存在显著性差异，$P<0.05$。

由图可知，与正常对照组相比，辐射使小鼠微核率显著增加，表明辐射对小鼠骨髓造成严重的损伤。与辐射对照组相比，阳性对照组和 C3G 不同剂量处理组均使骨髓微核率显著降低，并随剂量增加而降低明显，表明 C3G 对骨髓 DNA 有保护作用。

4.6 小鼠肝脏组织形态学变化

HE 染色 400 倍光镜下观察小鼠的肝组织形态的变化见图 4-4。小鼠经过 ^{60}Coγ辐射后，小鼠肝脏形态受到破坏。如图 4-4a)所示，正常对照组小鼠肝组织形态正常，肝小叶结构清晰，肝索排列整齐，紧密。间质窄。肝细胞大小适中，胞浆均质红染，肝细胞核大小适中，边界清晰。辐射组肝组织如图 4-4b）所示，肝小叶结构尚清晰，肝索排列整齐。间质增宽。肝细胞弥漫性肿胀，体积增大。肝细胞胞浆疏松淡染，可见少量空泡形成。肝细胞核轻度增大，边界尚清晰，有明显病变。阳性对照组如图 4-4c）所示，与辐射对照组相比，水肿轻微减少，而不同剂量 C3G+辐射组小鼠的肝脏组织水肿减少并不明显，高剂量组如图 4-4e）所示，与正常对照组并无显著性差异。

中国知网 https://www.cnki.net

HE 染色 400 倍光镜下观察小鼠的肝组织形态的变化见图 4-4。

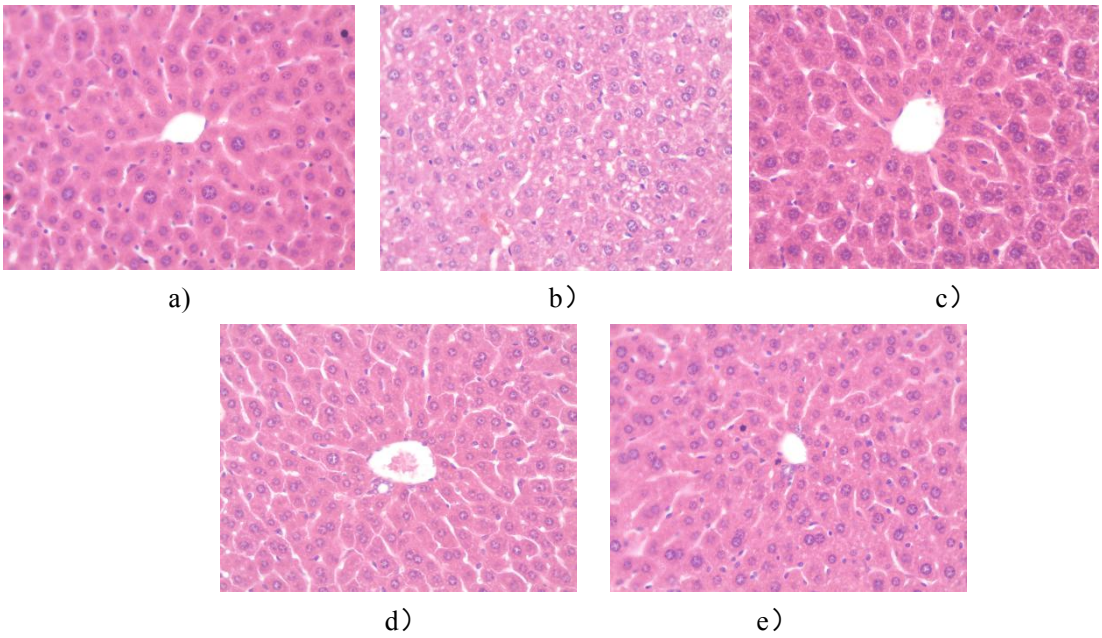


图 4-4 C3G 对辐射小鼠肝组织形态学变化的影响

a)正常对照组，b)辐射对照组，c)阳性对照组，d)低剂量 C3G（50 mg/kg b.w.）组，e)高剂量 C3G（150 mg/kg b.w.）组

4.7 C3G 对辐射小鼠氧化应激的影响

4.7.1 C3G 对辐射小鼠血清中 T-SOD 活力的影响

通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧化阴离子自由基，后者氧化羟胺形成亚硝酸盐，有显色剂存在时，溶液呈现紫红色，用可见分光光度计测其吸光度。当被测样品中含有 SOD 时，则对超氧阴离子自由基有专一的抑制作用，减少亚硝酸盐的含量，吸光值较小。超氧化物歧化酶（T-SOD）是机体中的一种极其重要的酶，在体内抗氧化平衡中起着至关重要的作用，可以清除超氧阴离子自由基·O_2^-，保护细胞不受损伤。体内 T-SOD 的活力体现了机体内源性抗氧化酶对机体的保护作用。辐射前对小鼠灌胃天然产物，有利于激活体内 T-SOD 的水平，清除过量自由基，改善辐射引起的氧化应激对机体造成的伤害。在本实验中，根据南京建成生物工程研究所 T-SOD 试剂盒，对小鼠血清中的 T-SOD 活力进行测定。

中国知网 https://www.cnki.net

小鼠血清中的 T-SOD 活力结果如表 4-2。

表 4-2 C3G 对小鼠血清中 T-SOD 活力的影响

组别	T-SOD 活力（U/mL）
正常对照组	216.08±16.49
辐射对照组	126.95±11.09#
阳性对照组	153.58±11.27*#
低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）	162.11±5.17*#
高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）	180.10±10.43*#

注：表中数据表示为实验平均值±标准差（n=10）；#与正常对照组存在显著性差异，$P<0.05$；*与辐射对照组存在显著性差异，$P<0.05$。

由表 4-2 可知，小鼠经过辐射后，其血清中的 T-SOD 活力与正常对照组相比明显降低，表明辐射对机体的抗氧化酶体系造成了严重的损伤，破坏了小鼠体内的氧化还原的平衡，其原因可能是辐射引起小鼠体内蛋白质变性从而引起酶活力的改变。相比之下，低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）和高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）组小鼠血清中的 T-SOD 活力均有一定程度的提升，这说明 C3G 对于小鼠自身的抗氧化系统有一定的保护作用，可以保护机体不受氧化应激的损伤。而辐射前半小时腹腔注射氨磷汀（200 mg/kg）也使 T-SOD 活力明显提高，说明 C3G 和氨磷汀对小鼠 T-SOD 活力有很好的保护作用，而 C3G 的效果好于氨磷汀。

4.7.2 C3G 对辐射小鼠血清中 GSH 含量的影响

谷胱甘肽（GSH）是体内重要的抗氧化剂和自由基清除剂，电离辐射可使细胞 GSH 含量降低，随后引发的自由基的释放，促使细胞发生凋亡[79]。GSH 是细胞内重要的抗氧化剂之一，是 GSH-Px 和 GST 两种酶类催化分解氢过氧化物所必需的底物，可以调节细胞增殖，提高酶活性，对维持细胞内重要的生物功能[80]。GSH 对外源性的刺激有一定的解毒效果，抵抗氧化应激对机体造成的损伤。GSH 是一种潜在的凋亡早期激活信号实验中表明了 C3G 对辐射诱导的氧化应激的损伤有一定改善作用。

中国知网 https://www.cnki.net

GSH 含量结果如表 4-3 所示。

表 4-3 C3G 对血清中 GSH 含量的影响

组别	GSH 活力（μmol/L）
正常对照组	39.58±4.72
辐射对照组	17.02±4.60#
阳性对照组	26.72±3.88*#
低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）	28.48±3.37*#
高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）	31.91±3.19*#

注：表中数据表示为实验平均值±标准差（n=10）；#与正常对照组存在显著性差异，$P<0.05$；*与辐射对照组存在显著性差异，$P<0.05$。

由表 4-3 可知，与正常对照组相比，辐射组小鼠血清中 GSH 含量明显降低，说明辐射对小鼠造成氧化应激，产生大量过氧化物，机体通过 GSH-Px 催化清除过氧化物，导致 GSH 过度消耗。低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）和高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）组小鼠血清中的 GSH 含量明显高于辐射组小鼠，但较正常对照组相比，不同剂量 C3G 组小鼠血清中的 GSH 含量仍较低，这说明辐射对小鼠造成的氧化应激损伤是不可逆的，在一定程度上，C3G 不能使辐射损伤的小鼠完全恢复到正常状态。另外，实验结果也表明 C3G 具有一定的抗氧化应激作用，具有辐射防护作用，可以在一定程度上清除自由基，可以抑制过氧化物的产生，降低 GSH 过度消耗，减小辐射引起的氧化应激损伤。

4.7.3 C3G 对辐射小鼠血清中 CAT 活力的影响

过氧化氢酶（CAT）是过氧化物酶系的代表，是生物防御体系的关键酶之一。CAT 在各种生命体内广泛存在，它能够促使 H_2O_2 分解生成 O_2 和 H_2O，从而使细胞免受过氧化氢的毒害。过氧化氢浓度越高，CAT 对其分解越快[81]。CAT 主要存在于动物的肝脏细胞及红细胞中，生物活性很强。实验测定小鼠血清中 CAT 的活力，研究 C3G 对辐射引起的氧化应激的保护作用。

中国知网 https://www.cnki.net

表 4-4 为各组小鼠的血清的 CAT 活力。

表 4-4 C3G 对小鼠血清中 CAT 活力的影响

组别	CAT 活力（U/mL）
正常对照组	118.20±7.46
辐射对照组	74.97±8.19$^{\#}$
阳性对照组	92.98±4.92$^{*\#}$
低剂量（50 mg/kg bw）C3G 组	108.57±7.84$^{*\#}$
高剂量（150 mg/kg bw）C3G 组	117.02±6.10*

注：表中数据表示为实验平均值±标准差（n=10）；#与正常对照组存在显著性差异，P<0.05；*与辐射对照组存在显著性差异，P<0.05。

由上表可知，与正常对照组相比，辐射对照组小鼠的血清中 CAT 活力显著降低。与辐射对照组相比，低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）和高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）组小鼠血清中的 CAT 活力显著上升（P<0.05）。而阳性对照组的小鼠血清中 CAT 活力也有一定程度的提高，这说明 C3G 和氨磷汀均可以加快 H_2O_2 分解生为 O_2 和 H_2O，使细胞免受过氧化氢的毒害。其中，高剂量的 C3G 对辐射小鼠的保护作用是最好的，与正常对照组小鼠没有显著差异，实验结果表明，^{60}Coγ辐射导致小鼠体内的 CAT 活力大大降低，而 C3G 可以有效地提高 CAT 活力，对辐射引起的对抗氧化酶系统的氧化应激损伤有一定程度的保护作用。

4.7.4 C3G 对辐射小鼠血清中 MDA 含量的影响

机体经过外界刺激后产生大量的活性氧自由基，抗氧化酶活性降低，机体被过量的自由基所侵害，可引发一系列脂质过氧化反应，其氧化最终产物是丙二醛（MDA）[82]。若机体自由基过量，引起机体氧化应激损伤，攻击细胞膜中的不饱和脂肪酸，导致脂质过氧化，形成脂质过氧化物 MDA。MDA 可破坏细胞膜的通透性，产生细胞毒性，引发细胞结构和功能损伤，导致细胞死亡，它反映了机体脂质过氧化的程度[83]。因此，降低组织中的 MDA 的含量对于辐射防护具有重要意义。MDA 可反应出自由基的含量，同时可间接反应出自由基对机体的损害程度。

中国知网 https://www.cnki.net

小鼠血清中 MDA 的含量见表 4-5。

表 4-5 C3G 对小鼠血清中 MDA 含量的影响

组别	MDA 含量（nmol/mL）
正常对照组	5.20±3.46
辐射对照组	11.23±4.9$^{\#}$
阳性对照组	9.80±6.72$^{*\#}$
低剂量（50 mg/kg bw）C3G 组	8.57±4.32$^{*\#}$
高剂量（150 mg/kg bw）C3G 组	6.08±7.35*

注：表中数据表示为实验平均值±标准差（n=10）；#与正常对照组存在显著性差异，P<0.05；*与辐射对照组存在显著性差异，P<0.05。

由表 4-5 所示，与正常对照组相比，小鼠受到 ^{60}Coγ辐射后，辐射对照组小鼠血清中的 MDA 含量明显升高，表明辐射对小鼠机体造成了严重的损伤，受到氧化应激损伤，发生脂质过氧化反应。与辐射对照组相比，辐射前半小时腹腔注射氨磷汀（200 mg/kg）和不同剂量 C3G 组小鼠的 MDA 含量都明显降低，而高剂量（150 mg/kg bw）C3G 组小鼠血清中的 MDA 含量与正常对照组小鼠没有显著性差异，这说明，C3G 很好地保护了辐射组小鼠的各组织细胞，可以很好地抑制小鼠辐射损伤后过氧化物的产生，对辐射防护具有重要的意义。

4.8 本章小结

本章通过对小鼠以 ^{60}Coγ进行辐射，建立辐射损伤模型，通过灌胃 C3G 花色苷单一组分，研究 C3G 对辐射诱导的小鼠氧化应激的损伤的保护作用。结果显示：

（1）通过对正常对照组小鼠和辐射对照组小鼠的相关指标进行测定及比较，较正常对照组，辐射对照组小鼠的免疫脏器指数显著降低，骨髓细胞微核率显著减少，小鼠血清中的抗氧化酶的活性会降低，脂质过氧化产物 MDA 水平升高，肝脏组织形态学发生明显异常改变，肝脏损伤较为严重，说明本次实验的辐射模型建立成功。

（2）C3G 能够缓解辐射引起的氧化损伤，对小鼠没有急性和亚急性毒性，主要通过以下途径发挥辐射防护效果：C3G 有效地提高小鼠的免疫器官指数，改善小鼠肝脏形态学变化，增加小鼠外周血象白细胞数，降低微核率，

中国知网 https://www.cnki.net

在一定程度上缓解辐射引起的氧化应激的损伤。

（3）通过研究机体抗氧化体系，结果发现，C3G 可以提高小鼠自身的抗氧化酶活性，显著提高小鼠血清中 T-SOD，CAT 的活性，增加 GSH 水平，降低脂质过氧化物 MDA 的含量，从而降低辐射诱导的诱导的氧化应激对细胞及组织造成的损伤。其中，高剂量（150 mg/kg bw）C3G 组小鼠血清中的 CAT 活力和 MDA 含量恢复至正常状态。

中国知网 https://www.cnki.net

第 5 章 C3G 对辐射防护作用机制研究

5.1 引言

机体应对自由基的损害时，形成了一系列的氧化应答系统，当机体内存在过量的 ROS 时，机体自身激发一系列的抗氧化保护蛋白，缓解机体受到的氧化应激的损害。这一协调反应是由这些抗氧化反应元件来调控的。核因子-红细胞 2 相关因子 2（Nrf2）是启动抗氧化应答元件（ARE）的转录因子，Nrf2 通过与 ARE 相互作用来调节下游抗氧化蛋白和 II 相解毒酶[84]。Nrf2 是外源性有毒物质和氧化应激的感受器。Nrf2-ARE 途径是迄今为止发现的最重要的内源性抗氧化应激途径之一。它在抗氧化应激中起着重要的作用，调节 GSH 的合成和抗氧化酶的表达。这些酶在辐射防护中起着重要作用[85]。下游抗氧化酶主要包括超氧化物歧化酶（SOD）和血红素加氧酶-1（HO-1），其他酶编码下游 II 相解毒酶如谷胱甘肽-S-转移酶（GSTs）和醌氧化还原酶 1（NAD（P）H 醌氧化还原酶 1，NQO1）等[86]。

生理状态下，Nrf2 在细胞质中与它的抑制蛋白果蝇肌动蛋白结合蛋白 Kelch (Kelch-like ECH2 associated protein 1，keap1)结合，在细胞质中无法发挥转录活性，当机体受到 ROS 攻击时，Keap1 与 Nrf2 解偶联，转移至细胞核，识别并结合 ARE，启动下游一系列抗氧化蛋白及二相解毒酶的表达，提高机体抗氧化应激能力[87]。相关研究表明，通过增加 Nrf2-Keap1 途径中许多细胞保护蛋白的表达来增强抗氧化应激活性。辐射可能会产生自由基，导致严重的氧化应激和对身体功能的严重损害。因此，我们推断 Nrf2 在体内和体外的放射保护中起着至关重要的作用。在正常情况下，Nrf2 通过与 Keap1 结合保留在细胞质中。然而，当诱导氧化应激时，诱导物释放来自 Keap1 的 Nrf2，使得 Nrf2 逐渐积累在细胞核核积累中。然后 Nrf2 激活抗氧化酶基因的转录和表达。因此，我们选择 Nrf2 作为我们当前研究的模型机制。

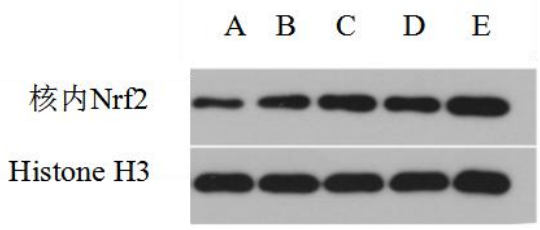
本研究的第 3 章和第 4 章的结果表明，C3G 具有很强的清除自由基功能，在小鼠体内表现出显著的抗氧化应激、辐射防护的能力。Nrf2 在很多组织中表达，尤其是肝脏等体内解毒组织。为了研究 C3G 的辐射防护机制，本章采用荧光定量 PCR 和 western blot 生物学技术，提取肝脏组织中的蛋白质及 RNA，测量 Nrf2 通路及下游的抗氧化酶系和二相解毒酶的表达，研究 C3G 对 Nrf2 核转位的影响，初步探讨 C3G 对小鼠辐射防护作用的机制。

中国知网 https://www.cnki.net

5.2 C3G 对 Nrf2 及抗氧化蛋白表达的影响

5.2.1 C3G 对 Nrf2 核转位的影响

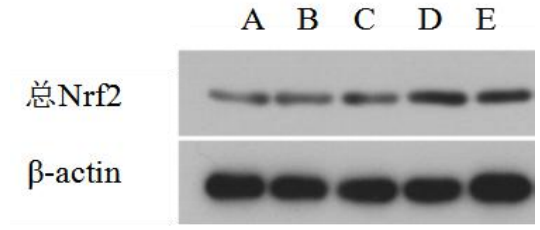
Nrf2 在众多的组织和细胞中都有表达，在 ARE 调节的抗氧化基因表达中发挥很重要的作用。Nrf2 本身不具有抗氧化作用，在正常生理条件下，Nrf2 以非活化的形式位于细胞质中，与 Keap1 紧密结合，它们固定在胞浆结合蛋白上，阻止 Nrf2 转运到细胞核中。当机体有外源性刺激时，发生氧化损伤，激活 Nrf2 的活性并促使 Nrf2-Keap1 解离。然后 Nrf2 转移到核中并在核内积累。C3G 对核内 Nrf2 蛋白表达的影响见图 5-1。



A：正常对照组；B：辐射对照组；C：阳性对照组；D：低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）；E：高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）

图 5-1 C3G 对核内 Nrf2 基因表达的影响

由 5-1 可知，与正常对照组相比，辐射组小鼠的核内 Nrf2 基因表达量显著增强，这说明辐射导致小鼠受到氧化应激的损伤，激活 Nrf2，使 Nrf2 在细胞质中解离，转移到细胞核内。辐射前半小时在小鼠体内腹腔注射氨磷汀，小鼠核内 Nrf2 蛋白表达量增强，这说明氨磷汀有助于激活 Nrf2。低剂量 C3G 和高剂量 C3G 组中的小鼠核内 Nrf2 蛋白表达量较前三组小鼠显著增强。这说明 C3G 能够诱导 Nrf2 的核转移，缓解氧化应激对小鼠的损害。



A：正常对照组；B：辐射对照组；C：阳性对照组；D：低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）；E：高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）

图 5-2 C3G 对总 Nrf2 蛋白表达的影响

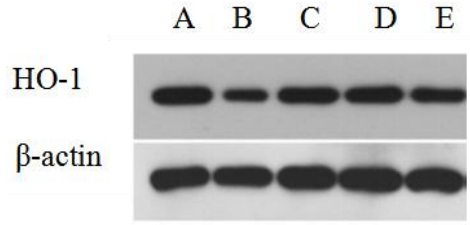
由图 5-2 所示，与正常对照组相比，辐射对照组小鼠的总 Nrf2 蛋白表达

中国知网 https://www.cnki.net

量显著升高，这说明辐射组小鼠受到氧化应激损伤后，机体启动自我保护体系，激活 Nrf2 蛋白表达。对小鼠进行 C3G 处理后，核内 Nrf2 进行积聚，逐渐增多，高剂量 C3G 处理组中的 Nrf2 核内积聚比低剂量 C3G 处理组多。总 Nrf2 表达量也随之升高。这表明 C3G 能促进照射后 Nrf2 由胞质向胞核的转移，启动了 Nrf2-ARE 信号通路进而引发抗氧化基因的表达，显著提高辐射防护的效果。

5.2.2 C3G 对 HO-1 蛋白的影响

HO-1 是血红素降解的限速酶，催化胆红素，CO 和铁的形成。HO-1 及胆红素和 CO 共同起着抗氧化，抗炎和抗细胞凋亡的作用，广泛参与细胞的抗氧化应激损伤，是体内最重要的内源性保护系统之一[88]。Nrf2 可以调控 HO-1 的表达，它与 HO-1 蛋白上的抗氧化元件结合，缓解氧化应激对机体造成的损伤。C3G 对 HO-1 蛋白表达的影响见图 5-3。



A：正常对照组；B：辐射对照组；C：阳性对照组；D：低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）；E：高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）

图 5-3 C3G 对 HO-1 蛋白表达的影响

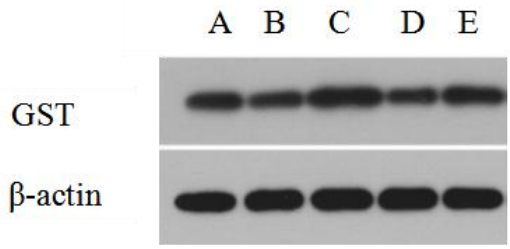
由图 5-3 所知，辐射对照组小鼠的 HO-1 蛋白表达量较正常对照组显著降低，这说明辐射对机体造成严重的氧化应激损伤。而阳性对照组和不同剂量 C3G 组在一定程度上上调了 HO-1 蛋白的表达水平，表明 C3G 和氨磷汀对小鼠的抗氧化能力有较好的保护作用。HO-1 是 Nrf2 通路下游的抗氧化酶，实验结果表明，C3G 使 HO-1 蛋白表达量增加，有一定的抗氧化作用。

5.2.3 C3G 对 GST 蛋白的影响

谷胱甘肽巯基转移酶(GSTs)是体内生物转化最重要的Ⅱ相代谢酶之一，是细胞抗损伤、抗癌变的主要解毒系统。GSH 是体内重要的抗氧剂和自由基清除剂，在抗氧化防御体系中有重要作用[89]。GST 能催化 GSH 与化学物质的亲电子基团结合，其表达量对维持 GSH 氧化还原状态和保护机体免于氧化

中国知网 https://www.cnki.net

应激是至关重要的。C3G 对 GST 蛋白表达的影响见图 5-4。



A：正常对照组；B：辐射对照组；C：阳性对照组；D：低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）；E：高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）

图 5-4 C3G 对 GST 蛋白表达的影响

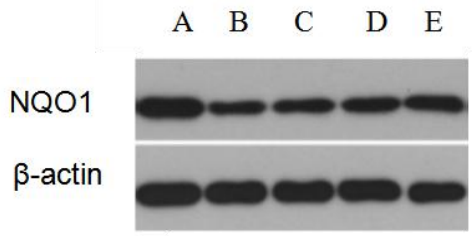
由图 5-4 所知，辐射对照组小鼠的 GST 基因的表达量略低于正常对照组，这说明辐射对机体造成了严重的损伤。辐射前半小时腹腔注射氨磷汀组（200 mg/kg）的小鼠的 GST 基因量显著增强，说明氨磷汀对于机体抗氧化防御体系有很好的保护作用。分别用低剂量（50 mg/kg bw）的 C3G 和高剂量（150 mg/kg bw）C3G 处理小鼠，研究发现，小鼠体内的 GST 蛋白表达量较辐射对照组显著增强，高剂量组的 GST 蛋白表达量与正常对照组基本无异。但是，阳性对照组的 GST 的表达量比不同剂量 C3G 处理组高，这说明，氨磷汀在一定程度上能很好地保护机体不受氧化应激的侵害。GST 是 Nrf2 通路下游的二相解毒酶，我们的实验结果表明，C3G 激活了 Nrf2 通路，使 Nrf2 向核内转移，上调了 GST 蛋白表达量，激活抗氧化应激通路，使机体的抗氧化应激能力增强。

5.2.4 C3G 对 NQO1 蛋白的影响

NQO1 是一种调节细胞内物质处于氧化还原状态的黄素酶。NQO1 可以催化醌类物质发生还原反应，且以 NAD(P)H 为受体，使其失去两个电子，形成氧化产物，其中不含有单电子还原产物半醌及自由基等物质，对机体的外源性刺激引起的氧化应激反应具有一定的保护作用[90]。NQO1 作为 Nrf2 通路下游重要的二相解毒酶，是衡量 C3G 是否激活 Nrf2 通路进行辐射防护作用的重要指标。所以，测量 NQO1 的表达量对于研究 C3G 通过 Nrf2 通路进行辐射防护，具有重要意义。

中国知网 https://www.cnki.net

C3G 对 NQO1 蛋白表达的影响见图 5-5。



A：正常对照组；B：辐射对照组；C：阳性对照组；D：低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）；E：高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）

图 5-5 C3G 对 NQO1 蛋白表达的影响

由图 5-5 所示，正常对照组小鼠的 NQO1 蛋白表达量最高，小鼠接受辐射后，NQO1 蛋白含量显著降低，这说明小鼠体内产生大量自由基等有害物质，破坏小鼠体内平衡。腹腔注射氨磷汀（200 mg/kg）后，小鼠体内的 NQO1 蛋白表达量显著增强。C3G 处理小鼠后，NQO1 的蛋白表达量较辐射对照组小鼠的表达量显著提高，高剂量 C3G 组小鼠的 NQO1 的表达量比低剂量 C3G 组小鼠的表达量高，甚至达到与正常对照组的蛋白表达量几乎无差异，这说明 C3G 通过激活 Nrf2 通路的下游的二相解毒酶，使机体免受辐射引起的氧化应激损伤。

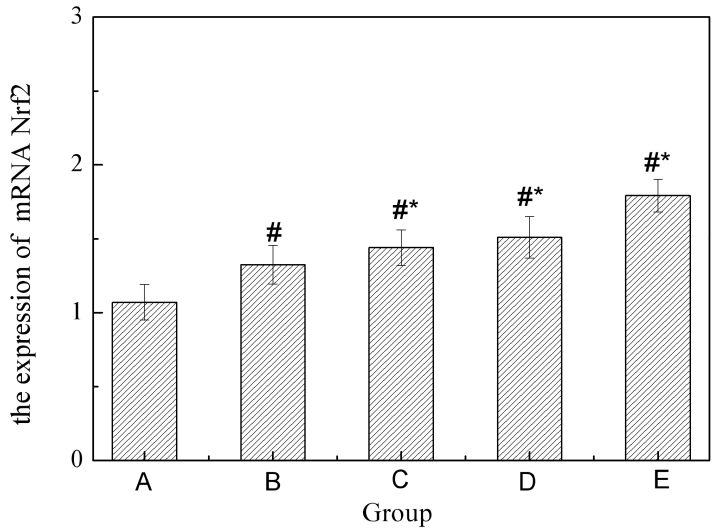
5.3 C3G 对 Nrf2 及抗氧化酶基因表达的影响

5.3.1 C3G 对 Nrf2 基因表达的影响

我们提取小鼠肝脏组织的 RNA，反转录成 cDNA，进行 RT-PCR 的指标测定。由图 5-6 可以看出，正常对照组的 Nrf2 比较低，机体受到外源性刺激时，Nrf2 蛋白的表达量有所增加，这说明小鼠机体自身有一定的对氧化应激的防御作用，促进 Nrf2 通路的激活以及下游抗氧化酶和二相解毒酶的表达。与辐射对照组相比，辐射前半小时注射氨磷汀并没有促进 Nrf2 通路，这说明氨磷汀没有激活 Nrf2 的作用。C3G 不同剂量处理组的小鼠 Nrf2 蛋白表达量明显升高，这说明 C3G 促进了 Nrf2 蛋白的表达，使其从细胞浆中解体，转移至细胞核中，促进下游抗氧化酶和二相解毒酶的表达，保护机体不受辐射引起的氧化应激损伤。

中国知网 https://www.cnki.net

图 5-6 为 C3G 对总的 Nrf2 基因表达的影响。



A：正常对照组；B：辐射对照组；C：阳性对照组；D：低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）；E：高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）

注：#与正常对照组存在显著性差异，$P<0.05$；*与辐射对照组存在显著性差异，$P<0.05$。

图 5-6 C3G 对 Nrf2 基因表达的影响

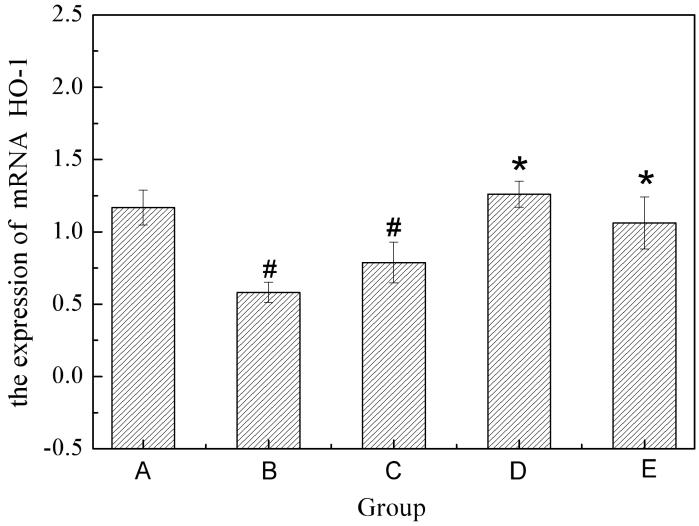
Zhang 等人通过 H_2O_2 诱导胰岛β细胞（INS-1）发生氧化应激，发生细胞自噬，再利用杨梅提取物中的花色苷处理细胞，研究发现，花色苷可以明显减少氧化应激介导的自噬性细胞死亡。杨梅中的花色苷激活了抗氧化转录因子 Nrf2，上调血红素加氧酶-1（HO-1）的基因表达来降低细胞凋亡来保护胰岛β细胞（INS-1）[91]。NazimaBashir 等人建立 Wistar 大鼠镉中毒模型，灌胃葡萄籽原花青素（GSP）100 mg/kg，研究葡萄籽原花青素（GSP）对镉致肾氧化应激的毒性的保护作用并阐明其可能的机制。结果发现，GSP 可以抑制 Cd 诱导的氧化损伤，抑制肾脏中 ROS 的产生。此外，GSP 通过修饰 Keap1 隔离 Nrf2 并与活性巯基基团反应，下调 Keap1 活性，将 Nrf2 转移到核中，可以增加 Nrf2 的表达活性，从而激活肾组织中的抗氧化活性。同时，组织病理学和超结构观察也证明 GSP 有效保护肾脏免受 Cd 引起的氧化损伤。这些发现表明，GSP 通过 Cd 致中毒大鼠 Nrf2 途径的激活来改善肾功能障碍和抗氧化应激活性[92]。

5.3.2 C3G 对 HO-1 基因表达的影响

C3G 对 HO-1 蛋白表达的影响见图 5-7。由图 5-7 可以看出，小鼠经 $^{60}Co\gamma$

中国知网 https://www.cnki.net

辐射后，HO-1 基因的表达量明显降低，表明机体受到严重的氧化应激损伤，辐射前半小时腹腔注射氨磷汀（200 mg/kg）组的小鼠的 HO-1 的基因表达量明显升高，这说明氨磷汀可以很好的保护小鼠不受氧化应激的损伤。不同剂量 C3G 处理组的小鼠也使 HO-1 的基因表达量显著升高，说明 C3G 对小鼠抗氧化应激能力有很好的保护作用。



A：正常对照组；B：辐射对照组；C：阳性对照组；D：低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）；E：高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）

注：#与正常对照组存在显著性差异，$P<0.05$；*与辐射对照组存在显著性差异，$P<0.05$。

图 5-7 C3G 对 HO-1 基因表达的影响

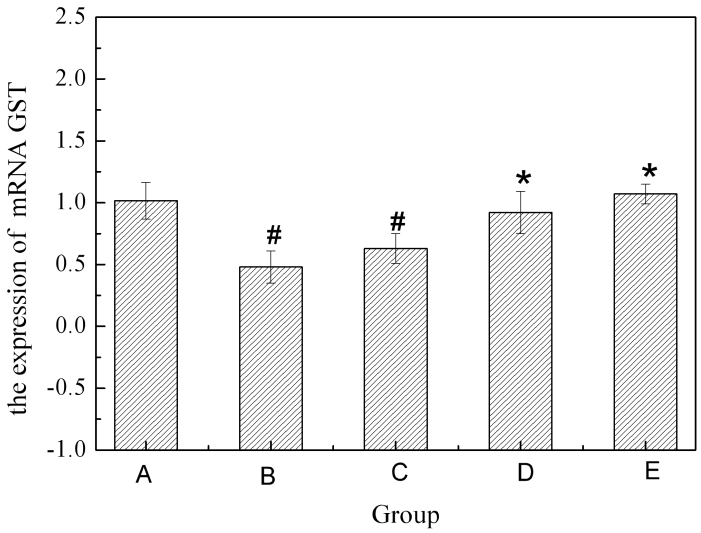
李梅等人建立顺铂致 HK-2 细胞氧化应激损伤模型，研究五味子乙素对其氧化损伤的保护作用及其机制。结果表明，经五味子乙素处理后，细胞活力呈剂量依赖性显著提高，五味子乙素显著抑制顺铂诱导的细胞内 ROS 水平升高，并发现，五味子乙素可以诱导 Nrf2 核转位，并且其下游抗氧化酶基因 HO-1 的 mRNA 表达水平也显著增加。研究表明，五味子乙素可以激活 Nrf2/ARE 通路，减轻顺铂致肾细胞的氧化应激损伤作用[93]。ANUPAM 等人研究发现 HO-1 催化反应的副产物如铁，胆绿素，胆红素和一氧化碳在介导细胞具有一定的保护作用，内源性 HO-1 基因或靶向基因 HO-1 过表达，可以作为诱导剂，治疗和预防各种氧化应激产生的损伤[94]。

5.3.3 C3G 对 GST 基因表达的影响

由图 5-8 可知，与正常对照组相比，辐射使小鼠体内的 GST 表达量显著降低，表明辐射对小鼠造成氧化应激，产生大量的过氧化物。辐射对照组小

中国知网 https://www.cnki.net

鼠 GST 的基因表达量为 0.5，与辐射对照组相比，辐射前半小时腹腔注射氨磷汀（200 mg/kg）组的小鼠的 GST 的基因表达量显著升高，表明 C3G 在一定程度上调节 GST 的表达量，使机体免受氧化应激损伤。与辐射对照组相比，不同剂量 C3G 处理组的小鼠的 GST 的基因表达量显著增加，高剂量 C3G 处理组的小鼠的 GST 基因表达量甚至于正常对照组相差无异，表明 C3G 对小鼠具有非常显著的抗氧化应激的作用。



A：正常对照组；B：辐射对照组；C：阳性对照组；D：低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）；E：高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）

注：#与正常对照组存在显著性差异，$P<0.05$；*与辐射对照组存在显著性差异，$P<0.05$。

图 5-8 C3G 对 GST 基因表达的影响

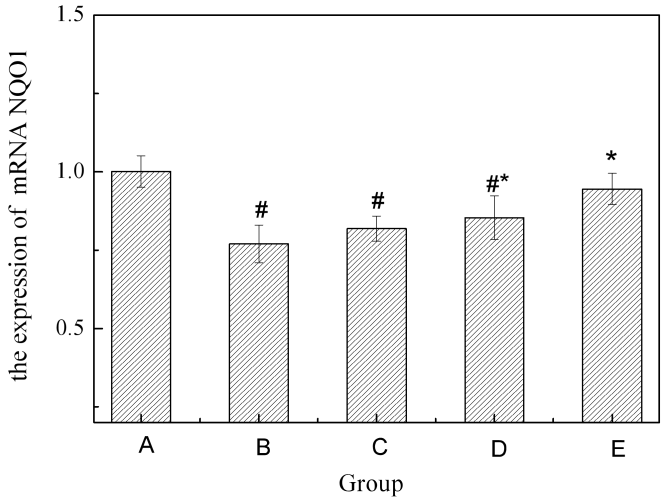
Jae 等人研究表明桔梗中的 Nrf2 介导的抗氧化酶如 c-谷氨酰半胱氨酸合成酶（c-GCS），血红素加氧酶-1（HO-1），NAD（P）H 醌氧化还原酶 1（NQO1）和谷胱甘肽-S-转移酶（GST）在 HepG2 细胞中的表达。这些结果表明，桔梗通过激活 Nrf2 介导的抗氧化酶来抑制二甲基亚硝胺（DMN）诱导的肝纤维化[95]。李娅楠研究发现大米蛋白可以降低大鼠体内氧化应激水平，激活 Nrf2 抗氧化通路，促进 Nrf2 的核转运，提高 GST 等抗氧化基因的表达水平。

5.3.4 C3G 对 NQO1 基因表达的影响

Ma 等人研究胆固醇氧化代谢产物 27-羟基胆固醇（27-OHC）在细胞中引起的毒性及其机制。通过 Western blot 和 RT-PCR 研究细胞中的 Nrf2，HO-1，NQO1 基因及蛋白的表达情况，并通过免疫细胞化学和共聚焦显微镜进行

中国知网 https://www.cnki.net

Nrf2 的定位。结果表明，胆固醇代谢物 27-OHC 对细胞有毒性，27-OHC 剂量依赖性地增加细胞内活性氧水平，下调 HO-1，NQO1 等基因和蛋白水平的表达，细胞质中的 Nrf2 向核内转移，通过调节 Nrf2 信号通路对氧化损伤起作用[96]。Paul 等人对 ARE 进行了深入分析，无论是从这些元件的序列需求和涉及其调控的蛋白质复合物的角度来看，NQO1 顺式元件在 ARE 功能中具有不可或缺的作用。细胞暴露于氧化应激，使细胞受到严重的氧化应激损伤，导致 Nrf2 在细胞质中解离，转移至细胞核中，在细胞核内累积，并将该因子聚集至抗氧化元件 ARE 中，所以，测量 NQO1 的基因表达量对于 Nrf2 是否调控了 ARE 抗氧化元件具有重要意义[97]。



A：正常对照组；B：辐射对照组；C：阳性对照组；D：低剂量 C3G 组（50 mg/kg bw）；E：高剂量 C3G 组（150 mg/kg bw）

注：#与正常对照组存在显著性差异，$P<0.05$；*与辐射对照组存在显著性差异，$P<0.05$。

图 5-9 C3G 对 NQO1 基因表达的影响

由图 5-9 所示，与正常对照组相比，辐射对照组的小鼠的 NQO1 蛋白表达量显著降低。与辐射对照组相比，辐射前半小时腹腔注射氨磷汀的小鼠的 NQO1 的基因表达量显著提升，表明氨磷汀对氧化应激造成的损伤有很好的保护作用。与辐射对照组相比，不同剂量 C3G 处理组的 NQO1 的基因表达量大幅度提高，说明 C3G 可以调节 Nrf2 通路的二相解毒酶 NQO1 的基因表达，对辐射有很好的防护作用，使细胞不受氧化应激损伤。与正常对照组相比，高剂量 C3G 处理组的小鼠的 NQO1 基因表达量几乎无差异，说明 C3G 对小鼠的抗氧化应激的效果很好。

中国知网 https://www.cnki.net

5.4 本章小结

本章通过建立 ^{60}Coγ辐射小鼠损伤模型，采用 Western blot 和 RT-PCR 技术，从分子水平探讨 C3G 对 ^{60}Coγ诱导的小鼠肝脏组织的辐射损伤的防护作用机制，结论如下：

（1）提取小鼠细胞核蛋白及胞浆蛋白，通过 Western blot 测量小鼠肝脏中的核内 Nrf2、总的 Nrf2、HO-1、GST、NQO1 的蛋白表达情况。结果发现，辐射后，核内 Nrf2 的蛋白表达减少，HO-1、GST、NQO1 的蛋白表达降低，而不同剂量 C3G 处理组小鼠的核内 Nrf2 的蛋白表达增加，总的 Nrf2 蛋白表达增加，同时，HO-1、GST、NQO1 的蛋白表达增加，这表明，C3G 可以促进 Nrf2 的入核转运，激活下游抗氧化蛋白及二相解毒酶的表达，对辐射对小鼠造成的氧化应激损伤具有保护作用。

（2)提取各组小鼠的 RNA，利用 RT-PCR 技术测量小鼠肝脏中总的 Nrf2、HO-1、GST、NQO1 的基因表达情况。与辐射对照组相比，不同剂量 C3G 处理组小鼠的总 Nrf2 基因表达增加，同时，HO-1、GST、NQO1 的基因表达增加，这些结果进一步表明通过 Nrf2 通路，调控下游抗氧化蛋白及二相解毒酶的基因表达，对小鼠的辐射损伤有一定的保护作用。

（3）通过 Western blot 和 RT-PCR 测量小鼠肝脏组织的 Nrf2、HO-1、GST、NQO1 的蛋白和基因的表达情况，发现二者的结果相一致，这进一步表明 C3G 主要是通过上调 Nrf2 通路相关调控因子的蛋白表达水平，激活 Nrf2 通路，缓解辐射对小鼠造成的氧化应激损伤。

中国知网 https://www.cnki.net

结 论

本研究以矢车菊素-3-O-葡萄糖苷（C3G）为研究对象，对其分离纯化、体外抗氧化和辐射防护机制进行了较为系统性的研究，得到如下主要结论：

（1）采用聚酰胺树脂、制备液相技术分离纯化蓝靛果花色苷复合组分，得到 C3G 单一组分，并通过高效液相分析仪对其进行纯度测定。制备样品纯度为 95.74%。

（2）C3G 具有良好的清除 ·OH 自由基和 $\cdot O_2^-$自由基的能力，且呈现明显的量效关系，表明 C3G 具有一定的抗氧化活性，是一种良好的天然产物抗氧化剂。

（3）建立小鼠体内 ^{60}Coγ辐射损伤模型，研究 C3G 对辐射诱导小鼠氧化应激损伤的防护作用。研究发现，经 ^{60}Coγ辐射后，小鼠体内的免疫器官萎缩，肝脏损伤明显，抗氧化酶的水平降低。C3G 能够显著提高小鼠血清中抗氧化酶 T-SOD、CAT 的活性，增加内源抗氧化物 GSH 水平，降低脂质过氧化物 MDA 的含量。此外，C3G 可有效地提高辐射小鼠的免疫器官指数，改善小鼠肝脏形态学变化，增加小鼠外周血象白细胞数降低骨髓细胞微核率。结果表明，C3G 可以有效的抑制辐射诱导氧化应激对细胞及组织造成的损伤。

（4）C3G 对小鼠辐射防护作用的机制为：C3G 上调 Nrf2 基因和蛋白表达，促进 Nrf2 的入核转运，激活下游抗氧化蛋白及二相解毒酶 HO-1、GST 及 NQO1 的基因和蛋白表达，激活 Nrf2 通路，从而抑制辐射对小鼠造成的氧化应激损伤。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

[1] 刘红艳, 刘建功, 党旭红, 等. 辐射防护剂和治疗剂的研究进展[J]. 核化学与放射化学, 2016,38(6): 321-326.

[2] Fan Z L, Wang Z Y, Zuo L L, et al. Protective Effect of Anthocyanins From Lingonberry on Radiation-Induced Damages[J]. International Journal of Environmental Research & Public Health, 2012,9(12): 4732-4743.

[3] Escribano-Bailón Ma T, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo J C. Anthocyanins in Cereals[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1054(1): 129-141.

[4] Tsuda T, Ohshima K, Kawakishi S, et al. Oxidation Products of Cyanidin-3-O-β-glucoside with a Free Radical Initiator[J]. Lipids, 1996, 31(12): 1259-1263.

[5] Yu X, Kensler T. Nrf2 as a Target for Cancer Chemoprevention[J]. Mutation Research/fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2005, 591(1): 93-102.

[6] Makabe S, Takahashi Y, Watanabe H, et al. Fluvastatin Protects Vascular Smooth Muscle Cells Against Oxidative Stress through the Nrf2-Dependent Antioxidant Pathway[J]. Atherosclerosis, 2010, 213(2): 377-384.

[7] Xiang M, Namani A, Wu S, et al. Nrf2: Bane or Blessing in Cancer?[J]. Journal of Cancer Research & Clinical Oncology, 2014, 140(8): 1251-1259.

[8] Zhao H. In-Vitro Free Radical Scavenging Activities of Anthocyanins from Three Berries[J]. Journal of Medicinal Plant Research, 2011, 6(1): 7036-7042.

[9] Copp R R, Peebles D D, Soref C M, et al. Radioprotective Efficacy and Toxicity of a New Family of Aminothiol Analogs[J]. International Journal of Radiation Biology, 2013, 89(7): 485-492.

[10] Gao W, Liang J X, Ma C, et al. The Protective Effect of N-Acetylcysteine on Ionizing Radiation Induced Ovarian Failure and Loss of Ovarian Reserve in Female Mouse[J]. BioMed Research International, 2017, 2017(8): 1-9.

[11] Ohta S, Matsuda S, Gunji M, et al. The Role of Nitric Oxide in Radiation Damage[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007, 30(6): 1102-1107.

[12] Aktoz T, Caloglu M, Yurut-Caloglu V, et al. Histopathological and Biochemical Comparisons of the Protective Effects of Amifostine and L-Carnitine against Radiation-Induced Acute Testicular Toxicity in Rats[J]. Andrologia, 2017, 49(11): 51-62.

[13] Chen J J, Gao Y, Tian Q, et al. Platelet Factor 4 Protects Bone Marrow

中国知网 https://www.cnki.net

Mesenchymal Stem Cells from Acute Radiation Injury[J]. British Journal of Radiology, 2014, 87(1040): 201-214.

[14] Zhang S, Qiu X, Zhang Y, et al. Basic Fibroblast Growth Factor Ameliorates Endothelial Dysfunction in Radiation-Induced Bladder Injury[J]. Biomed Research International, 2015, 2015(22): 967-971.

[15] R J Reiter D T, T S Herman, C R Thomas J r. Melatonin as a Radioprotective Agent: a Review[J]. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 2004, 59(3): 639-653.

[16] Reiter R J, Tan D X, Burkhardt S. Reactive Oxygen and Nitrogen Species and Cellular and Organismal Decline: Amelioration with Melatonin[J]. Mechanisms of Ageing & Development, 2002, 123(8): 1007-1019.

[17] Wang H, Jia Y, Peng G, et al. Synthesis, Radioprotective Activity and Pharmacokinetics Characteristic of a New Stable Nitronyl Nitroxyl Radical-NIT2011[J]. Biochimie, 2013, 95(8): 1574-1581.

[18] RM D, AL S, W D, et al. A Novel Nitroxide is an Effective Brain Redox Imaging Contrast Agent and in Vivo Radioprotector[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2011, 51(3): 780-790.

[19] Hosseinimehr S J. Flavonoids and Genomic Instability Induced by Ionizing Radiation[J]. Drug Discovery Today, 2010, 15(21): 907-918.

[20] Xu P, Cai X, Zhang W, et al. Flavonoids of Rosa Roxburghii Tratt Exhibit Radioprotection and Anti-Apoptosis Properties via the Bcl-2(Ca(2+))/ Caspase-3/PARP-1 Pathway[J]. Apoptosis An International Journal on Programmed Cell Death, 2016, 21(10): 1125-1143.

[21] Tiwari M, Dixit B, Parvez S, et al. EGCG, a Tea Polyphenol, as a Potential Mitigator of Hematopoietic Radiation Injury in Mice[J]. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 2017, 88(14): 203.

[22] Liu Y, Liu F, Yang Y, et al. Astragalus Polysaccharide Ameliorates Ionizing Radiation-Induced Oxidative Stress in Mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 68(7): 209-214.

[23] 陈萃, 孙可, 耿珊, 等. 人参皂苷 Rg1 对辐射致造血干/祖细胞衰老的影响及其机制[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(11): 1604-1609.

[24] 李辉, 王振宇, 白海娜. 多酚类化合物电离辐射防护研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(14): 384-388.

[25] 唐瑶, 陈洋, 曹婉鑫. 多酚类化合物的分类、来源及功能研究进展[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(3): 32-34.

[26] Begum N, Prasad N R. Apigenin, a Dietary Antioxidant, Modulates Gamma

中国知网 https://www.cnki.net

Radiation-Induced Oxidative Damages in Human Peripheral Blood Lymphocytes[J]. Biomedicine & Preventive Nutrition, 2012, 2(1): 16-24.

[27] Dixit A K, Bhatnagar D, Kumar V, et al. Antioxidant Potential and Radioprotective Effect of Soy Isoflavone against Gamma Irradiation Induced Oxidative Stress[J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1): 197-206.

[28] Liang J, Yan H, Puligundla P, et al. Applications of Chitosan Nanoparticles to Enhance Absorption and Bioavailability of Tea Polyphenols: A Review[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 69(2): 286-292.

[29] Richi B, Kale R K, Tiku A B. Radio-Modulatory Effects of Green Tea Catechin EGCG on pBR322 Plasmid DNA and Murine Splenocytes against Gamma-Radiation Induced Damage[J]. Mutation Research/genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis, 2012, 747(1): 62-70.

[30] Liu Y, Tan D, Tong C, et al. Blueberry Anthocyanins Ameliorate Radiation-Induced Lung Injury through the Protein Kinase RNA-Activated Pathway[J]. Chemico-biological interactions, 2015, 242: 363-371.

[31] 张玉彪, 柳云恩, 佟昌慈, 等. 蓝莓花色苷对放射性心脏损伤的保护机制研究[J]. 临床急诊杂志, 2014, 5(11): 647-650.

[32] Targhi R G, Homayoun M, Mansouri S, et al. Radio Protective Effect of Black Mulberry Extract on Radiation-Induced Damage in Bone Marrow Cells and Liver in the Rat[J]. Radiation Physics & Chemistry, 2017, 130(4): 297-302.

[33] 张淑杰, 康玉凡. 天然活性多糖研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 8(2): 14-18.

[34] Zhao L M, Jia Y L, Ma M, et al. Prevention Effects of Schisandra Polysaccharide on Radiation-Induced Immune System Dysfunction[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 76(3): 63-69.

[35] 刘爱萍. 植物多糖抗辐射效果的 Meta 分析及柳茶抗辐射损伤实验研究[D]: 兰州大学, 2014, 22-41.

[36] 李刚强, 徐利民. 当归多糖对辐射损伤小鼠血液中 microRNA 作用的研究[J]. 西北药学杂志, 2017, 45(2): 163-167.

[37] Na L, Xianrong S, Yuming L, et al. Isolation, Characterization, and Radiation Protection of Sipunculus Nudus L. Polysaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 83(5): 288-296.

[38] 刘凯丽, 贾瑞博, 李燕, 等. 星虫多糖提取工艺优化及其抗氧化作用研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(8): 115-119.

[39] Lee W W, Kang N, Kim E A, et al. Radioprotective Effects of a Polysaccharide Purified from *Lactobacillus* Plantarum-Fermented Ishige

中国知网 https://www.cnki.net

Okamurae against Oxidative Stress Caused by Gamma Ray-Irradiation in Zebrafish in Vivo Model[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 28(5): 83-89.

[40] Lee W W, Ahn G, Lee B J, et al. Radio-Protective Effect of Polysaccharides Isolated from Lactobacillus Brevis-Fermented Ecklonia Cava[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 52(1): 260-266.

[41] 舒婷婷. X 射线照射联合苦参碱对肝癌 HepG2 细胞人宫颈癌基因-1 及相关基因表达的影响[D]: 兰州大学, 2015: 25-30.

[42] 李红波, 肖扬, 蒋祖军, 等. 苦参碱对受$^{(192)}$Ir 照射人员骨髓造血功能及细胞凋亡的影响[J]. 广东医学, 2012, 33(1): 129-131.

[43] 陈延群, 孙建湘, 李章展, 等. 复方苦参注射液对大鼠急性放射性小肠炎的防护作用[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(10): 1129-1132.

[44] 赵敏玲. 川芎嗪对长波紫外线诱导人皮肤成纤维细胞衰老的拮抗作用及其机制研究[D]: 广州中医药大学, 2015: 34-38.

[45] 彭洁, 李文丽, 李玉亮, 等. 辐射所致小鼠肾脏氧化损伤及川芎嗪的保护作用[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(16): 3064-3067.

[46] Zheng H, Wang S, Zhou P, et al. Effects of Ligustrazine on DNA Damage and Apoptosis Induced by Irradiation[J]. Environmental Toxicology & Pharmacology, 2013, 36(3): 1197.

[47] Guo P, Wang S. Effect of Ligustrazine on IL - 6 and IL - 18 Gene Expression in Bone Marrow Cell of Blood Deficiency Mice Induced by Radiation[J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2013, 23(2): 51-59.

[48] Kim H G, Jang S S, Lee J S, et al. Panax Ginseng Meyer Prevents Radiation-Induced Liver Injury via Modulation of Oxidative Stress and Apoptosis[J]. Journal of Ginseng Research, 2016, 51(8): 13-19.

[49] Balaji Raghavendran H R, Rekha S, Cho H K, et al. Ginsenoside Rich Fraction of Panax Ginseng C.A. Meyer improve feeding behavior following radiation-induced pica in rats[J]. Fitoterapia, 2012, 83(6): 1144-1150.

[50] 陈晓辉. 类风湿性关节炎小鼠模型的制备及刺五加皂苷 E 对其治疗作用的研究[D]: 苏州大学, 2015: 23-34.

[51] 陈月, 王宝贵, 等. 刺五加皂苷的抗辐射损伤作用[J]: 《吉林大学学报(医学版)》, 2005, 31 (3): 423-425.

[52] 郝述霞, 佟鹏, 王春燕, 等. 5 种天然植物提取物清除自由基和茶多酚抗辐射作用研究[J]. 中国职业医学, 2011, 38(1): 30-32.

[53] De P-TS. Molecular Mechanisms Involved in the Cardiovascular and Neuroprotective Effects of Anthocyanins[J]. Archives of Biochemistry &

中国知网 https://www.cnki.net

Biophysics, 2014, 559(5): 68-74.
[54] Fossen T, Rayyan S, Holmberg M H, et al. Acylated Anthocyanins from Leaves of Oxalis Triangularis[J]. Phytochemistry, 2005, 66(10): 1133-1140.
[55] Guo H, Xia M, Zou T, et al. Cyanidin-3-glucoside Attenuates Obesity-Associated Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in High-Fat Diet-Fed and Db/Db Mice via the Transcription Factor FoxO1[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2012, 23(4): 349-360.
[56] Tsuda T, Horio F, Uchida K, et al. Dietary cyanidin-3-O-beta-D-glucoside rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice[J]. Journal of Nutrition, 2003, 133(7): 2125-2130.
[57] 余仁强. 矢车菊素-3-葡萄糖苷对肥胖大鼠体重、血脂、血清炎症因子及胰岛素抵抗的影响[D]: 大连医科大学, 2014: 8-12.
[58] Guerra M C, Galvano F, Bonsi L, et al. Cyanidin-3-O-β-glucopyranoside, a Natural Free-Radical Scavenger against Aflatoxin B1- and Ochratoxin A-Induced Cell Damage in a Human Hepatoma Cell Line (Hep G2) and a Human Colonic Adenocarcinoma Cell Line (CaCo-2)[J]. British Journal of Nutrition, 2005, 94(2): 211-220.
[59] Tsuda T, Shiga K, Ohshima K, et al. Inhibition of Lipid Peroxidation and the Active Oxygen Radical Scavenging Effect of Anthocyanin Pigments Isolated from Phaseolus Vulgaris L[J]. Biochemical Pharmacology, 1996, 52(7): 1033-1039.
[60] 李晔, 蔺怀, 张倩茹, 等. 矢车菊素-3-葡萄糖苷对重金属镉胁迫后大鼠氧化损伤的缓解作用[J]. 生态学杂志, 2016, 35(5): 1358-1363.
[61] Chen P N, Chu S C, Chiou H L, et al. Cyanidin-3-glucoside and Peonidin-3-glucoside Inhibit Tumor Cell Growth and Induce Apoptosis in Vitro and Suppress Tumor Growth in Vivo[J]. Nutrition & Cancer, 2005, 53(2): 232-243.
[62] Wang Q, Xia M, Liu C, et al. Cyanidin-3-O-β-glucoside Inhibits iNOS and COX-2 Expression by Inducing Liver X Receptor Alpha Activation in THP-1 Macrophages[J]. Life Sciences, 2008, 83(5): 176-184.
[63] 赵海田. 蓝靛果花色苷结构表征及对辐射诱导氧化损伤防护机制[D]: 哈尔滨工业大学, 2012: 1-22.
[64] Lachumy S J, Oon C E, Deivanai S, et al. Herbal Remedies for Combating Irradiation: a Green Anti-Irradiation Approach[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2013, 14(10): 5553-5565.
[65] 段雅彬. 黑果枸杞对辐射损伤小鼠的保护作用及机制研究[D]: 青海大学,

中国知网 https://www.cnki.net

2016: 3-4.

[66] Fu B, Liu J, Li H, et al. The Application of Macroporous Resins in the Separation of Licorice Flavonoids and Glycyrrhizic Acid[J]. Research & Practice of Chinese Medicines, 2005, 1089(1-2): 18-24.

[67] 闫征, 王四维, 李春阳. 聚酰胺树脂分离纯化黑米中矢车菊素-3-葡萄糖苷工艺研究[J]. 粮食与饲料工业, 2016,12(4): 31-36.

[68] 方小燕. 聚酰胺树脂在分离纯化黄酮中的应用研究[J]. 海峡药学, 2013,25(5): 41-42.

[69] 徐静. 红树林微生物天然产物化学研究[M]. 科学出版社, 2015: 1-7.

[70] Latif Z, Sarker S D. Isolation of Natural Products by Preparative High Performance Liquid Chromatography (Prep-HPLC)[J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 864 (864): 255-274.

[71] Cabanne C, Raedts M, Zavadzky E, et al. Evaluation of Radial Chromatography Versus Axial Chromatography, Practical Approach[J]. Journal of Chromatography B, 2007, 845(2): 191-199.

[72] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity[J]. Lwt-Food Science and Technology, 1995, 28(1): 25-30.

[73] Miller N J, Rice-Evans C A. Factors Influencing the Antioxidant Activity Determined by the ABTS Radical Cation Assay[J]. Free Radical Research Communications, 1997, 26(3): 195-199.

[74] Ray G, Husain SA. Oxidants, Antioxidants and Carcinogenesis[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2002, 40(11): 1213-1232.

[75] Aruoma OI. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1998, 75(2): 199-212.

[76] Aqil F, Gupta A, Munagala R, et al. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Anthocyanin/Ellagitannin-Enriched Extracts from Syzygium Cumini L. (Jamun, the Indian Blackberry)[J]. Nutrition & Cancer, 2012, 64(3): 428-438.

[77] 左丽丽. 狗枣猕猴桃多酚的抗氧化与抗肿瘤效应研究[D]: 哈尔滨工业大学, 2013: 8-14.

[78] Song M Y, Ku S K, Jin S H. Genotoxicity Testing of Low Molecular Weight Fucoidan from Brown Seaweeds[J]. Food & Chemical Toxicology, 2012, 50(3-4): 790-796.

[79] Armstrong J S, Steinauer K K, Hornung B, et al. Role of Glutathione

中国知网 https://www.cnki.net

Depletion and Reactive Oxygen Species Generation in Apoptotic Signaling in a Human B Lymphoma Cell Line[J]. Cell Death and Differentiation, 2002, 9(3): 252.

[80] Zdarilová A, Rajnochová S A, Chytilová K, et al. Polyphenolic Fraction of Lonicera Caerulea L. Fruits Reduces Oxidative Stress and Inflammatory Markers Induced by Lipopolysaccharide in Gingival Fibroblasts[J]. Food & Chemical Toxicology, 2010, 48(6): 1555-1561.

[81] 姚磊. 大豆抗氧化多糖制备表征及对辐射诱导氧化应激抑制作用[D]: 哈尔滨工业大学, 2014: 81-88.

[82] Ping X, Junqing J, Junfeng J, et al. Radioprotective Effects of Troxerutin against Gamma Irradiation in Mice Liver[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2011, 12(10): 2593-2596.

[83] Chandrasekharan D K, Kagiya T V, Nair C K K. Radiation Protection by 6-Palmitoyl Ascorbic Acid-2-Glucoside: Studies on DNA Damage in Vitro, ex Vivo, in Vivo and Oxidative Stress in Vivo[J]. Journal of Radiation Research, 2009, 50(3): 203-212.

[84] Klaassen C D, Reisman S A. Nrf2 the Rescue: Effects of the Antioxidative/Electrophilic Response on the Liver[J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 2010, 244(1): 57.

[85] Dreger H, Westphal K, Weller A, et al. Nrf2-dependent Upregulation of Antioxidative Enzymes: a Novel Pathway for Proteasome Inhibitor-Mediated Cardioprotection[J]. Cardiovascular Research, 2009, 83(2): 354-361.

[86] Kobayashi A, Ohta T, Yamamoto M. Unique Function of the Nrf2-Keap1 Pathway in the Inducible Expression of Antioxidant and Detoxifying Enzymes[J]. Methods in Enzymology, 2004, 378(1): 273.

[87] 李航, 段惠军. Nrf2/ARE 信号通路及其调控的抗氧化蛋白[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(3): 300-303.

[88] Li H, Ren Y Z, Liu S X, et al. Effects of tBHQ on the Oxidative Stress and the Expression of Nrf2 in Kidneys of Diabetic Mice[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2009, 25(10): 1341-1345.

[89] Harvey C J, Thimmulappa R K, Singh A, et al. Nrf2-regulated Glutathione Recycling Independent of Biosynthesis is Critical for Cell Survival during Oxidative Stress[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2009, 46(4): 443.

[90] Kaspar J W, Jaiswal A K. Antioxidant-Induced Phosphorylation of Tyrosine 486 Leads to Rapid Nuclear Export of Bach1 that Allows Nrf2 to Bind to the Antioxidant Response Element and Activate Defensive Gene Expression[J].

中国知网 https://www.cnki.net

Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(1): 153-162.

[91] Zhang B, Buya M, Qin W, et al. Anthocyanins from Chinese Bayberry Extract Activate Transcription Factor Nrf2 in β cells and Negatively Regulate Oxidative Stress-Induced Autophagy[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2013, 61(37): 8765.

[92] Nazima B, Manoharan V, Miltonprabu S. Grape Seed Proanthocyanidins Ameliorates Cadmium-Induced Renal Injury and Oxidative Stress in Experimental Rats through the Up-Regulation of Nuclear Related Factor 2 and Antioxidant Responsive Elements[J]. Biochemistry & Cell Biology-biochimie Et Biologie Cellulaire, 2015, 93(3): 210-226.

[93] 李梅, 金晶, 李佳, 等. 五味子乙素激活 Nrf2/ARE 通路对顺铂致 HK-2 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 药学学报, 2012, 5(11): 1434-1439.

[94] Agarwal A, Nick H. Renal Response to Tissue Injury: Lessons from Heme Oxygenase-1 GeneAblation and Expression[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2000, 11(5): 965-973.

[95] Choi J H, Jin S W, Kim H G, et al. Platycodi Radix Attenuates Dimethylnitrosamine-Induced Liver Fibrosis in Rats by Inducing Nrf2-Mediated Antioxidant Enzymes[J]. Food & Chemical Toxicology, 2013, 56(2): 231-239.

[96] Ma W W, Li C Q, Yu H L, et al. The Oxysterol 27-Hydroxycholesterol Increases Oxidative Stress and Regulate Nrf2 Signaling Pathway in Astrocyte Cells[J]. Neurochemical Research, 2015, 40(4): 758-766.

[97] Nioi P, Mcmahon M, Itoh K, et al. Identification of a Novel Nrf2-Regulated Antioxidant Response Element (ARE) in the Mouse NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 Gene: Reassessment of the ARE Consensus Sequence[J]. Biochemical Journal, 2003, 374(2): 337-348.

中国知网 https://www.cnki.net

攻读硕士学位期间发表的论文及其它成果

1. 刘力源，陈敏，赵海田，姚磊. 天然产物抗辐射活性研究进展. 食品科学. 已录用.

中国知网 https://www.cnki.net

中国知网 https://www.cnki.net

致　谢

两载光阴弹指间，而今将别于母校，过往点滴，忆上眉梢，思绪难平，临别寥寥数语，已敬谢一路以来伴我成长的恩师和亲友。

首先特别感谢我的恩师——赵海田老师，他不仅是我学术的启蒙人，在我生活中也给予了很大的帮助！感谢赵老师，谢谢您一直以来对我的耐心指导，从开学到毕业，您一直在我的身边，每次我遇到了困难，您都会帮助我、指导我一起解决，您都倾注了大量的心血！感谢赵老师的妻子——姚磊师母，温柔地在我身边鼓励我，每到节日，总会和赵老师一起，带我们度过节日，使不在父母身边的我们也能感受到父母的温暖！感谢杨鑫老师，谢谢您一直以来的谆谆教导和悉心培养。您作为整个实验室的大家长，为我们的实验提供了很多便利的条件，经常督促我们的实验进展，把我们当成自己的孩子一样，总是尽自己最大的能力为我们解决实验上的一切难题！让我们不忘初心，砥砺前行。

在此，我还要感谢实验室的小伙伴们，和我一起度过了愉快的两年的研究生生活。感谢智康康师兄，作为实验室的大师兄，像个大哥哥一样，无论是生活还是实验上，都为我指明前进的方向！感谢程建军师兄在我投文章的时候给予了无尽的帮助，总是不厌其烦的帮助我！感谢王嘉诚师兄、赵倩玉师姐、谢天娇师姐、李佳琪师姐，在我的科研生活中给我的无私帮助，你们教会了我很多知识和技能。感谢我的小伙伴陈敏、何凝和陈攀，感谢陈敏总是在我最无助的时候伸出援助之手，跟我在寝室愉快地玩耍；感谢何凝像个大姐姐一样，在我遇到问题的时候疏导我，给予我最大的帮助；感谢陈攀，作为我们小伙伴中唯一的男性同胞，帮我倒蒸馏水，还带我们过六一儿童节！感谢孙莹师妹、李旭东师弟、秦昭师妹、张贤尽师妹、王占花师妹、刘秀师妹、王炜师弟，感谢你们带给了我很多欢笑和快乐，只是遗憾在一起的学习时间太短暂。

感谢我的室友们张笑和老欣悦，感谢我们两年的朝夕相处，一起度过了很多难忘的时刻，毕业了大家的身边都有了喜欢的人，希望我们都越来越幸福。

感谢我的父母，我的男朋友刘砚耕，我的闺蜜王宁，对我细心地关照，给予我理解，给我做好多美食，带我释放压力，在我难过的时候陪在我身边，迷茫的时候支持我，你们的爱是我前进的力量！

本课题承蒙国家自然科学基金（31571798，31401618）、黑龙江省自然科学基金基金（C2016033）及哈尔滨学术带头人项目（NO.2014RFXXJ113）资助，特此致谢。

中国知网　https://www.cnki.net