

文章编号: 1007-4627(2013)01-0079-05

二烯丙基二硫对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照损伤小鼠的保护作用研究

许帅^{1, 2, 3, 4}, 张红^{1, 2, 3}, 刘阳^{1, 2, 3}, 马晓飞^{1, 2, 3, 4}

- (1. 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;
2. 中国科学院重离子束辐射生物学重点实验室, 甘肃 兰州 730000;
3. 甘肃省重离子束辐射医学应用基础重点实验室, 甘肃 兰州 730000;
4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 研究大蒜素重要活性成分二烯丙基二硫 (Diallyl disulfide, 简称DADS) 对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照损伤小鼠的保护作用。利用 4 Gy 剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对不同浓度 DADS 预处理的雄性昆明小鼠进行单次全身照射。随后检测骨髓细胞微核率和肝组织中丙二醛 (MDA) 含量、蛋白质总巯基含量、总抗氧化能力 (T-AOC) 及谷丙转氨酶 (ALT) 活性。结果显示, 与单纯照射组相比, 低浓度 DADS 预处理组骨髓细胞微核率和肝组织 ALT 活性均显著降低 ($p < 0.001$), 而肝组织 T-AOC 明显增强 ($p < 0.05$); 中浓度 DADS 预处理组肝组织中 MDA 含量和蛋白质总巯基含量均显著减少 ($p < 0.05$)。结果提示, DADS 通过抑制氧化应激, 有效地保护了脂质、蛋白质和遗传物质免受 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照引起的损伤。

关键词: 二烯丙基二硫; $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子; 辐射防护

中图分类号: Q 691; R 818 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.30.01.079

1 引言

重离子束治癌有诸多优点: 重离子辐射末端形成 Bragg 峰, 可使射线剂量主要集中在肿瘤组织区^[1]; 有较好的相对生物学效应^[2]及对肿瘤具有良好的局部控制率^[3-4]。重离子束作为目前最有效的放疗射线, 得到越来越多的应用。尽管拥有许多放疗优点, 但重离子射线对正常组织也有损伤作用。另外, 由于载人航天事业的发展, 航天员也会受到空间高能重离子照射损伤。作为一种电离辐射, 重离子辐射也是直接和间接对生物体造成损伤, 其间接损伤是使生物体内生成大量自由基。相对直接损伤, 间接损伤的危害往往起着主导作用^[5-7]。为保证重离子束治疗效果的同时尽可能降低其对正常组织的损伤, 以及降低航天员所受空间重离子照射损伤, 探索削弱电离辐射造成的间接损伤的措施具有重要意义。

二烯丙基二硫 (Diallyl disulfide, 简称 DADS), 是

一种脂溶性的有机硫化合物, 也是大蒜素的活性成分之一, 有清除自由基、提高细胞抗氧化能力之功效^[8-9]。DADS 对多种疾病有预防和治疗作用, 在放疗方面可能具有辐射保护和辐射增敏等双重效应^[10]。此外, 大蒜是一种天然植物, 毒性小、廉价及使用便利, 有利于广泛应用。目前对 DADS 的抗辐射作用研究较少, 且仅限于常规射线的研究, 在重离子方面的研究尚未见报道。

本实验初步探讨了 DADS 对重离子辐照损伤小鼠的保护作用。通过统计其骨髓细胞微核率, 测定肝脏组织的 ALT 活性、MDA 含量、蛋白总巯基含量和 T-AOC, 从细胞和分子水平上研究 DADS 的辐射损伤小鼠的保护作用及可能机制。

2 材料与方法

DADS 购于 Sigma 公司。ALT 试剂盒、MDA 试剂盒、总巯基试剂盒及 T-AOC 试剂盒购自于南京建城生

收稿日期: 2012-03-26 修改日期: 2012-04-20

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(973计划)(2010CB834202); 国家自然科学基金项目(10835011); 甘肃省重大科技专项项目(0702NKDA045, 0806RJYA020); 中国科学院西部之光人才培养计划项目(XB106012)

作者简介: 许帅(1981-), 男, 湖南耒阳人, 在读硕士, 从事生物物理学研究, E-mail: xushuai10@impcas.ac.cn

通信作者: 张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>

物工程研究所, BCA 试剂盒购于 Thermo 公司。

2.1 实验动物

健康雄性昆明小鼠 56 只, 标准体重 18~22 g, 由兰州大学医学院实验动物中心提供。随机分为 7 组, 每组 8 只。饲养适应环境 3 d 后进行实验, 饲养环境温度 18~25 °C, 无各种强烈刺激因素干扰, 正常昼夜节律, 动物自由饮食饮水。

2.2 照射条件

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射在中国科学院近代物理研究所兰州重离子加速器研究装置 (HIRFL) 的深层肿瘤治疗终端上进行。坪区照射, 能量为 250 MeV, 剂量吸收率为 1 Gy/min, 照射剂量为 4 Gy (空气电离室检测剂量)。照射方式为单次全身照射。

2.3 实验处理

实验小鼠分为 7 组: 对照组 (Control group, 简称 C)、单纯药物组 (Simply drug group, 简称 S)、单纯照射组 (Irradiated group, 简称 IR)、溶剂+照射组 (Oil+irradiated group, 简称 O+IR)、低浓度药物+照射组 (Low dose+irradiated group, 简称 L+IR)、中浓度药物+照射组 (Middle dose+irradiated group, 简称 M+IR) 以及高浓度药物+照射组 (High dose+irradiated group, 简称 H+IR)。低、中、高浓度药物各为 10 mg/kg DADS, 20 mg/kg DADS 及 40 mg/kg DADS。DADS 用花生油溶解稀释。实验前连续腹腔注射给药 3 天, 每天一次。末次给药后第 2 天进行照射。

2.4 骨髓细胞微核试验

照射 48 h 后, 颈椎脱臼法处死小鼠, 取出股骨, 用注射器吹出骨髓液置于玻片上制成涂片。涂片自然风干后加甲醇固定 5~10 min, 放入 Giemsa 应用液中染色 15~20 min, 立即用蒸馏水冲洗晾干, 镜检。每只小鼠计数 1000 个嗜多染红细胞中的微核细胞数。

2.5 ALT, MDA, T-AOC 及蛋白质总羰基量检测

照射 48 h 后, 颈椎脱臼法处死小鼠迅速取出肝脏, 用预冷的生理盐水制成 10% 的组织匀浆液 (冰上进行), 4 °C 下 3500 rotations/min 离心, 取上清液分别测试 ALT, MDA, T-AOC 及蛋白质总羰基含量, 测试方法严格按照试剂盒说明书进行。组织蛋白浓度用 BCA 试剂盒测定。

2.6 数据统计分析

所有数值表示为平均数 ± 标准差 (means ± SD), 各组数据采用单因素方差检验。用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 取 $p < 0.05$ 代表显著的统计学差异。

3 结果

3.1 DADS 对辐照小鼠骨髓细胞微核率的影响

如表 1 所示, 与对照组相比, 4 Gy 单纯照射组骨髓细胞微核率显著上升 ($p < 0.001$)。与单纯照射组相比, DADS 预处理组骨髓细胞微核率均明显降低 ($p < 0.001$), 且呈现药物浓度依赖效应。单纯药物组与对照组相比, 无显著性差异 ($p > 0.05$), 表明药物不引起小鼠骨髓细胞微核率的增加。溶剂+照射组与单纯照射组之间无显著性差异 ($p > 0.05$), 提示溶剂不影响微核实验结果。

表 1 DADS 对辐照小鼠骨髓微核率的影响
($n = 8$, means ± SD)*

组别	剂量/(mg/kg)	细胞数	微核数	微核率(%)
C	0	8000	9	1.1±0.4
S	40	8000	10	1.2±0.5
IR	0	8000	169	21.1±2.3 ^a
O+IR	0	8000	159	19.9±1.5
L+IR	10	8000	137	17.1±2.4 ^b
M+IR	20	8000	124	15.5±1.9 ^b
H+IR	40	8000	112	14.0±2.1 ^b

* a $p < 0.001$ 相对于 C 组, b $p < 0.001$ 相对于 IR 组。

3.2 DADS 对辐照小鼠肝组织中 MDA 的影响

如图 1 所示, 与对照组相比, 单纯照射组中 MDA 含量显著增加 ($p < 0.001$)。与单纯照射组相比, 低浓度药物+照射组中 MDA 含量有所下降但无显著性差异

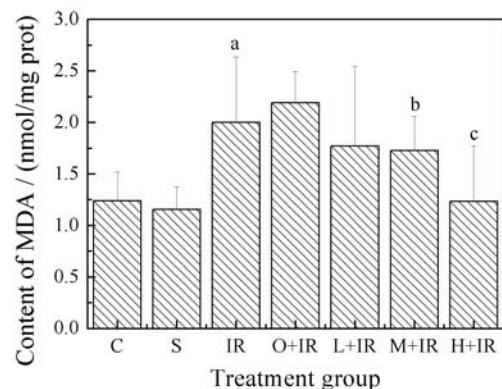


图 1 DADS 对辐照小鼠肝组织中 MDA 水平的影响
a $p < 0.001$ 相对于 C 组, b $p < 0.05$, c $p < 0.001$ 相对于 IR。

($p > 0.05$); 中浓度药物+照射组有显著性差异($p < 0.05$); 但高浓度药物+照射组肝组织中MDA含量降低更显著($p < 0.001$)。单纯药物组与对照组之间无显著性差异($p > 0.05$), 表明药物不引起肝细胞脂质过氧化。溶剂+照射组与单纯照射组相比无显著性差异($p > 0.05$), 提示溶剂不影响MDA含量的测定结果。

3.3 DADS对辐照小鼠肝组织中蛋白质总羰基含量的影响

如图2所示, 与对照组相比, 单纯照射组蛋白质总羰基含量显著增加($p < 0.001$)。与单纯照射组相比, 低浓度药物+照射组蛋白质总羰基含量有所下降, 但无显著性差异($p > 0.05$); 中浓度药物+照射组及高浓度药物+照射组肝组织蛋白质总羰基含量显著降低($p < 0.05$)。单纯药物组与对照组之间无显著性差异($p > 0.05$), 表明药物不造成蛋白质羰基化损伤。溶剂+照射组与单纯照射组相比无显著性差异($p > 0.05$), 提示溶剂不影响蛋白质总羰基含量测定结果。

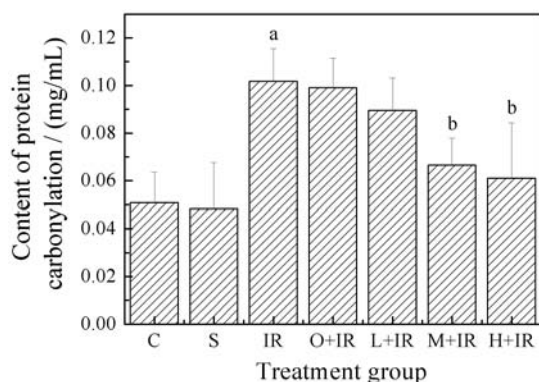


图2 DADS对辐照小鼠肝组织中总羰基含量的影响
a $p < 0.001$ 相对于C组, b $p < 0.05$ 相对于IR组。

3.4 DADS对辐照小鼠肝组织中T-AOC的影响

如图3所示, 与对照组相比, 单纯照射组T-AOC显著下降($p < 0.001$)。与单纯照射组相比: 低浓度药物+照射组、中浓度药物+照射组T-AOC显著增加($p < 0.05$); 高浓度药物+照射组T-AOC增加更加显著($p < 0.001$)。单纯药物组与对照组之间无显著性差异($p > 0.05$), 表明药物在正常情况下不会提升肝细胞的T-AOC。溶剂+照射组与单纯照射组相比无显著性差异($p > 0.05$), 提示溶剂不影响T-AOC的实验结果。

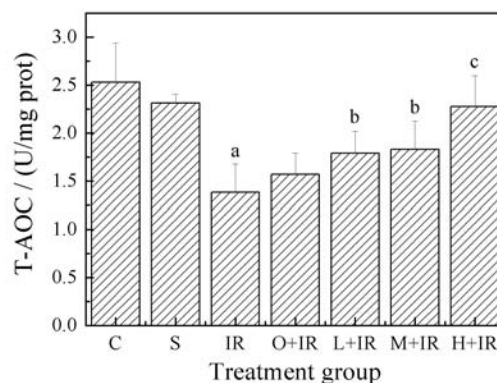


图3 DADS对辐照小鼠肝组织中T-AOC的影响
a $p < 0.001$ 相对于C组, b $p < 0.05$, c $p < 0.001$ 相对于IR组。

3.5 DADS对辐照小鼠肝组织中ALT活性的影响

如图4所示, 单纯照射组与对照组相比, ALT活性显著增加($p < 0.001$)。与单纯照射组相比, DADS预处理组ALT活性均显著降低($p < 0.001$), 且呈现浓度依赖性。单纯药物组与对照组之间无显著性差异($p > 0.05$), 表明药物不引起肝细胞ALT活性变化。溶剂+照射组与单纯照射组之间无显著性差异($p > 0.05$), 提示溶剂不影响ALT活性的实验结果。

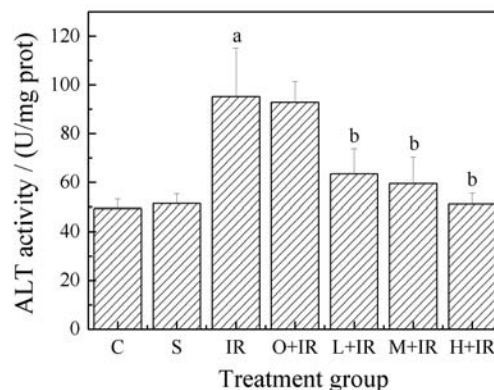


图4 DADS对辐照小鼠肝组织中ALT活性的影响
a $p < 0.001$ 相对于C组, b $p < 0.001$ 相对于IR组。

4 讨论与结论

实验结果显示, $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照对小鼠造成了损伤。给予DADS预处理显著地降低了 $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照引起的损伤。DADS起到这一保护作用的主要原因是提高了细胞的T-AOC。T-AOC与两个体系有关, 一个是酶体系(如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽还原酶等), 另一个是非酶体系(如胡萝卜素、维生素C、维生素E等)。显然, 在本实验中DADS是通过提高抗氧化酶

的活性而提升细胞的 T-AOC。这已被有关实验所证实^[8-9]。

重离子辐射对染色体造成的损伤高于常规射线所造成的损伤^[11]。DADS 通过提高细胞 T-AOC, 消除了¹²C⁶⁺辐照所产生的大量自由基, 减少了碱基、核糖及磷酸等由于氧化损伤而造成的 DNA 链的断裂^[12]。这不但可以增加细胞在受到辐照后的存活率^[13], 还能减少染色体畸变, 有利于减轻辐照引起的后遗症。DADS 减轻脂质及蛋白质的氧化损伤, 可以维持细胞结构与功能的完整性, 尤其是保护线粒体膜的完整性, 可以避免正常细胞发生凋亡^[14]。此外, 蛋白质分解代谢增加会导致肝组织 ALT 活性急剧成倍增加^[15-16], 增加肝脏功能的负荷。实验中 DADS 至少部分是依赖其抗氧化作用, 减少了蛋白质的降解, 从而下调了 ALT 活性。对肝脏可能有一定的保护作用。

单纯给予 DADS 处理, 骨髓细胞微核率, 肝组织中 MDA 含量、蛋白质总巯基含量和 ALT 活性等具有检测损伤意义的各项指标均无明显变化。说明 DADS 在本实验中没有对小鼠产生损伤或损伤极小。

综上所述, DADS 通过提升细胞的 T-AOC, 降低了氧化应激反应, 有效地保护了脂质、蛋白质和遗传物质免受¹²C⁶⁺辐照引起的损伤。而且 DADS 毒性低, 是一种潜在的抗重离子辐射药物。

参考文献 (References):

- [1] KRAFT G. Prog Part Nucl Phys, 2000, **45**(Suppl): S473.
- [2] TAKIGUCHI Y, MIYAMOTO T, NAGAO K, *et al.* Radiat Med, 2007, **25**: 272.
- [3] MIYAMOTO T, YAMAMOTO N, NISHIMURA H, *et al.* Radiother Oncol, 2003, **66**: 127.
- [4] KOTO M, MIYAMOTO T, YAMAMOTO N, *et al.* Radiother Oncol, 2004, **71**: 147.
- [5] CHAPMAN J D, REUVERS A P, BORSA J, *et al.* Radiat Res, 1973, **56**: 291.
- [6] ROOTS R, OKADA S. Radiat Res, 1975, **64**: 306.
- [7] LIU Qing, HE Xiaoqing, LIU Yongsheng, *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 2008, **377**(3): 775.
- [8] PEDRAZA-CHAVERR J, GONZALEZ-OROZCO A E, MALDONADO P D, *et al.* Eur J Pharmacol, 2003, **473**(1): 71.
- [9] NAHDIA A, HAMMAMIA I, BRASSE-LAGNELB C, *et al.* Nutrition Research, 2010, **30**: 85.
- [10] XU Shuai, ZHANG Hong, LIU Yang. Nuclear Physics Review, 2012, **29**(3): 294(in Chinese).
(许帅, 张红, 刘阳. 原子核物理评论, 2012, **29**(3): 294.)
- [11] RITHIDECH K N, SUPANPAIBOON W, HONIKEL L, *et al.* Advances in Space Research, 2007, **40**: 491.
- [12] XIA Shouxuan. Radiobiology[M]. Beijing: Military Medicine Science Press, 1998: 22-35(in Chinese).
(夏寿萱. 放射生物学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998: 22-35.)
- [13] FRANKENBERG -SCHWAGER M, FRANKENBERG D. International Journal of Radiation Biology, 1990, **58**(4): 569.
- [14] LI T, ITO K, SUMI S, *et al.* Cancer Chemother Pharmacol, 2009, **63**: 873.
- [15] ROSEN F, ROBERTS N R, NICHOL C A. J Biol Chem, 1959, **234**: 476.
- [16] ROSEN F, HARDING H R, MILHOLLAND R J, *et al.* J Biol Chem, 1963, **238**: 3725.

Protective Effect of Diallyl Disulfide against the Irradiation Damage in Mice Induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ Ion Beams

XU Shuai^{1, 2, 3, 4}, ZHANG Hong^{1, 2, 3}, LIU Yang^{1, 2, 3}, MA Xiao-fei^{1, 2, 3, 4}

(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. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The radioprotective effect of Diallyl disulfide (DADS) on $^{12}\text{C}^{6+}$ ion irradiation was studied. Pretreated with DADS of different concentration, male Kung-Ming mice were exposed to whole body irradiation with dosage of 4 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ ion. The animals were sacrificed after irradiation. Then the bone marrow cells micronucleus rate, malondialdehyde (MDA) levels, content of protein carbonylation, total antioxidant capacity (T-AOC) and alanine aminotransferase (ALT) activity were measured. As compared with those in irradiated group, the ratio of micronucleus cells in marrow and the hepatic ALT activity in the pretreatment group with low dose DADS decreased significantly ($p < 0.001$). Similarly, the content of protein carbonylation and the levels of MDA dropped dramatically in the group with middle dose DADS treatment ($p < 0.05$). On the contrary, the hepatic T-AOC increased markedly in the group of pretreatment with low dose DADS ($p < 0.05$). The results showed that DADS protect lipid, protein and genetic material from $^{12}\text{C}^{6+}$ ion irradiation by right of resisting oxidative stress.

Key words: diallyl disulfide; $^{12}\text{C}^{6+}$ ion; radioprotection

Received date: 26 Mar. 2012; **Revised date:** 20 Apr. 2012

Foundation item: National Basic Research Program of China (2010CB834202); National Natural Science Foundation of China (10835011); Scientific Technology Research Project of Gansu Province (0702NKDA045, 0806RJYA020); Western Light Talents Training Program of Chinese Academy of Sciences (XB106012)

Corresponding author: ZHANG Hong, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>