

文章编号: 1007-4627(2014)01-0101-05

姜黄素对重离子辐射损伤小鼠睾丸组织的防护作用研究

赵邱越^{1, 2, 3, 4}, 王振华^{1, 2, 3}, 谢漪^{1, 2, 3}, 许帅^{1, 2, 3, 4}, 狄翠霞^{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. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 探讨姜黄素(Curcumin, 简称 Cur)对重离子辐射损伤小鼠睾丸组织的防护作用。小鼠灌胃不同剂量的 Cur 后给予 4 Gy 剂量¹²C⁶⁺离子束全身单次照射。24 h 后对小鼠睾丸组织形态学变化进行观察, 并测定丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性和过氧化氢酶(CAT)活性。结果显示: 中、高浓度 Cur 预处理组对小鼠睾丸组织的形态具有较好的保护作用; 低、中浓度 Cur 预处理组 MDA 含量显著降低($P < 0.05$); 与单纯照射组相比, 低浓度 Cur 预处理组 SOD 活性水平和中浓度 Cur 预处理组 CAT 活性水平显著提高($P < 0.05$)。结果表明: Cur 对重离子全身辐射小鼠的抗氧化系统有一定的激活效应, 对辐射损伤有一定的防护作用, 其机制可能与 Cur 清除自由基, 保护脂质和蛋白质有关。

关键词: 姜黄素; 小鼠; ¹²C⁶⁺离子; 辐射防护

中图分类号: Q691; R852.7

文献标志码: A

DOI: 10.11804/NuclPhysRev.31.01.101

1 引言

越来越多的研究表明, 辐射可以造成机体蛋白质、核酸和脂质的损伤^[1]。机体总质量 80% 为水分子, 电离辐射可通过裂解水分子, 产生大量的超氧阴离子自由基(O_2^-)、羟基自由基($\cdot OH$)等活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)自由基。大量的 ROS 会与生物膜结构中的磷脂以及酶和膜受体中的多不饱和脂肪酸侧链起脂质过氧化反应形成脂质过氧化产物如丙二醛(MDA), 此外, ROS 还可以通过对不饱和键和巯基的攻击实现对氨基酸的修饰, 甚至引起肽键断裂, 蛋白质交联聚合, 严重影响蛋白质构象与功能^[2]。

重离子是一种先进的放射治疗方法。由于在治疗肿瘤方面具有高的相对生物学效应和特殊的深度剂量分布等优势, 被誉为 21 世纪最理想的放疗用射线^[3-4]。尽管拥有诸多优点, 但重离子射线治疗靶区

肿瘤时, 对正常组织不同程度的损伤也是不可忽视的。另外, 随着航天事业的迅速发展和高科技核能在日常生活中的广泛应用, 对经常受到辐照的宇航员、科研人员和接受放射治疗的患者等人群给予一定的防护措施, 如使用辐射防护药物以保护正常机体组织免受损伤也意义重大。

姜黄素(Curcumin, 简称 Cur)是从姜黄的根茎中提取出的一种黄色脂溶性酚类色素, 其色泽稳定且毒性很低, 为二酮类化合物。研究表明: 姜黄素不仅可以保护辐射损伤的淋巴细胞^[5]、降低射线诱导的人成纤维细胞的染色体断裂^[6]、促进小鼠伤口愈合^[7]等, 同时姜黄素还具有降血脂、抗肿瘤、抗炎、利胆和抗菌等作用^[8-13]。由于姜黄素具有很强的清除 O_2^- 、 $\cdot OH$ 等活性氧自由基的能力^[14-15], 表明它可能在辐射防护方面具有一定的作用。目前, 姜黄素辐射防护作用的研究较少, 在重离子方面, 以小鼠为对象的研究尚未报道。

收稿日期: 2013-04-28; 修改日期: 2013-05-13

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(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: 赵邱越(1987-), 女, 甘肃陇南人, 在读硕士, 从事重离子辐射医学的研究; E-mail: zhaopiuyue@impcas.ac.cn

通信作者: 张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn.

本研究初步探讨姜黄素对重离子辐射损伤小鼠的保护作用。通过分析睾丸组织病理学变化,测定小鼠睾丸组织的脂质过氧化产物MDA含量和抗氧化酶SOD活性、CAT活性,研究姜黄素的抗辐射效应及可能机制,为重离子辐射防护研究提供一定的参考依据。

2 材料和方法

2.1 材料

昆明雄性小鼠42只,体重18~20 g,购于兰州大学医学院实验动物中心。正常昼夜节律,自由进食和饮水。

2.2 仪器及试剂

NP-T型生物组织自动脱水机、NP-B型生物组织包埋机、NP-B(L)生物组织自动包埋机(冷台)和NP-P型生物组织摊片烤片机(湖北孝感市诺普电子科技有限责任公司),LEICA HM325石蜡切片机(德国莱卡仪器公司),姜黄素(sigma公司)被5%羧甲基纤维素钠(Carboxymethylcellulose sodium, CMC)(科密欧化学试剂有限公司)溶剂溶解^[16-17]。超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(测总SOD)购于南京建成生物工程研究所。脂质氧化(MDA)检测试剂盒和过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒购于碧云天生物技术研究所。

2.3 实验动物处理

昆明小鼠随机分为7组:对照组(Control group,简称C组)、单纯姜黄素处理组(Drug group,简称D组)、单纯重离子全身照射组(Irradiated group,简称IR组)、照射+溶剂组(Irradiated group+ Solvent,简称IR+Sol组)、低浓度药物+照射组(Low dose+irradiated group,简称L+IR组)、中浓度药物+照射组(Middle dose+irradiated group,简称M+IR组)以及高浓度药物+照射组(High dose+irradiated group,简称H+IR组)。低、中、高药物浓度分别为:50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg,单纯姜黄素处理组浓度为200 mg/kg。对照组给予等量溶剂灌胃,每组6只,参照文献^[18],连续灌胃3 d,1次/d,每次0.2 ml,最后一次给药8 h后,进行重离子辐照。

2.4 辐照处理

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射在兰州重离子加速器研究装置(Heavy Ion Research Facility in Lanzhou, HIRFL)的深层肿瘤治疗终端上进行。坪区照射,初始能量为235 MeV/u,照射剂量为4 Gy,剂量率为1 Gy/min,全身单次照射。

2.5 样品取材及处理

照射24 h后,采用颈椎脱臼法处死小鼠。取出左侧睾丸组织用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE染色,切片厚4 μm 。

2.6 睾丸组织中MDA含量、SOD活性、CAT活性测定

小鼠右侧睾丸组织用预冷的生理盐水制成10%的均浆(冰上进行),测定MDA含量、SOD活性和CAT活性,指标测定严格按照试剂盒说明书进行。组织蛋白浓度用BCATM Protein Assay Kit(Pierce Protein Research Products)测定。

2.7 数据统计分析

所有数值表示为平均数 \pm 标准差(means \pm SD),用 t 检验分析比较各组实验结果的差异。SPSS13.0统计软件进行分析,以 $P < 0.05$ 作为具有显著性差异的标准。

3 结果

3.1 睾丸组织的病理学变化

如图1小鼠睾丸组织HE结果所示,C和D组小鼠的睾丸曲细精管排列规则,各级生精细胞(精原细胞,初级精母细胞,次级精母细胞和精子细胞)排列紧密有序,胞浆丰富;IR组和IR+Sol组小鼠的曲细精管排列逐渐疏松,生精小管内细胞排列紊乱,层次减少甚至消失;低、中、高浓度药物预处理组小鼠的睾丸曲细精管与IR组和IR+Sol组相比有所改善,小管内生精细胞数量增加,可分辨出各级生精细胞,虽然L+IR组睾丸组织内生精小管细胞层次有所增加,但效果不如M+IR组和H+IR组明显。

3.2 姜黄素对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐射小鼠睾丸组织中MDA水平和SOD, CAT活性的影响

如图2~4所示,与C组相比,IR组的MDA含量

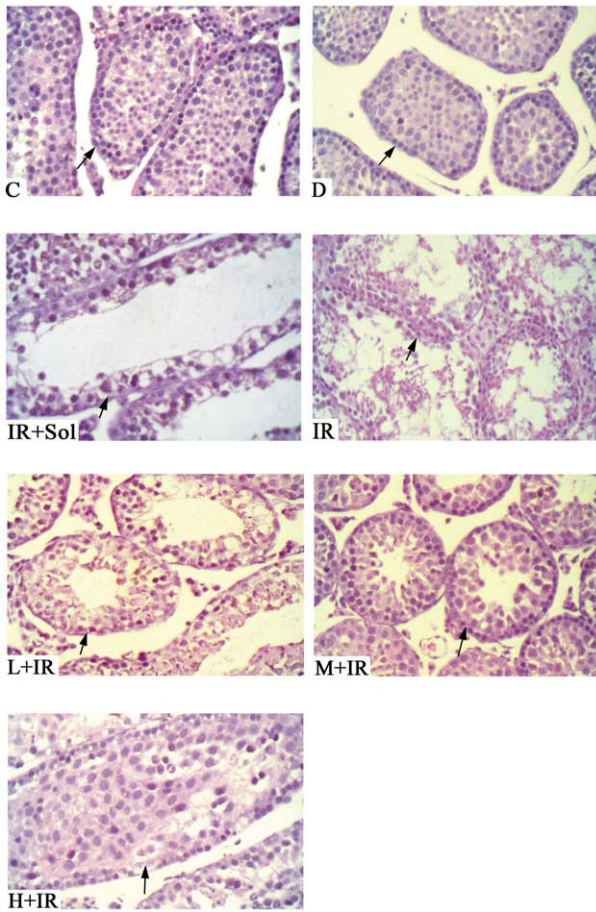


图 1 (在线彩图) 睾丸组织形态变化(×400)

显著性提高($P < 0.01$), 同时, IR 组的 SOD, CAT 活性明显下降, 具有极显著差异($P < 0.01$); C 组与 D 组相比, D 组中 MDA 含量有所下降, 无显著性差异($P > 0.05$), 同时, 在这两组的研究中 SOD, CAT 活性也无显著性差异($P > 0.05$); IR 组与 IR+Sol 组的 MDA, SOD, CAT 相比, 均无显著性差异($P > 0.05$), 说明溶剂不影响 MDA 含量和 SOD, CAT 活性的结果; 在药物预处理组和 IR 组的 MDA 含量的相关比较中, L+IR 组和 M+IR 组的 MDA 含量显著降低($P < 0.05$); H+IR 组的 MDA 含量降低更为显著($P < 0.01$)。在药物预处理组和 IR 组的 SOD, CAT 活性相关研究中, L+IR 组的 SOD 活性水平显著提高($P < 0.05$), M+IR 组和 H+IR 组的 SOD 活性水平提高更为显著($P < 0.01$)。同样, L+IR 组的 CAT 活性水平有所提高, 但无显著性差异($P > 0.05$); 但 M+IR 组的 CAT 活性水平提高显著($P < 0.05$); H+IR 组的 CAT 活性水平提高程度更为显著($P < 0.01$)。

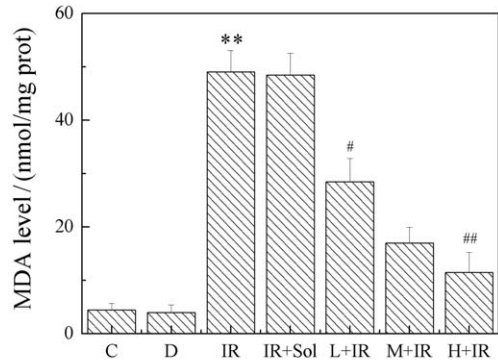


图 2 Cur 对¹²C⁶+ 辐照小鼠睾丸组织中 MDA 含量的影响
** $P < 0.01$ 与对照组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 与单纯照射组相比。

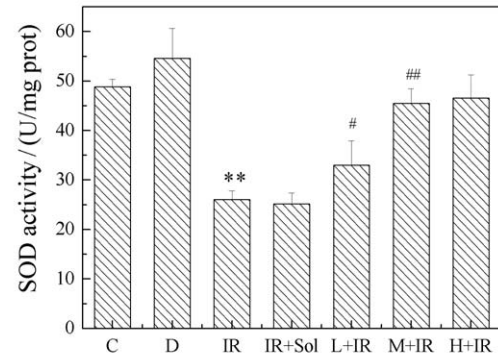


图 3 Cur 对¹²C⁶+ 辐照小鼠睾丸组织中 SOD 活性的影响
** $P < 0.01$ 与对照组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 与单纯照射组相比。

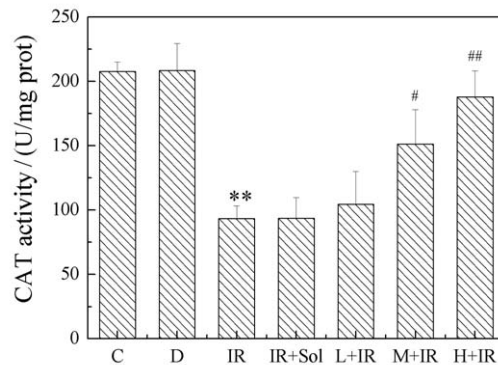


图 4 Cur 对¹²C⁶+ 辐照小鼠睾丸组织中 CAT 活性的影响
** $P < 0.01$ 与对照组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 与单纯照射组相比。

4 讨论

辐射不仅对生物体自身产生影响, 还会损伤其生殖细胞内的遗传物质。睾丸是雄性生殖细胞分化、生长、发育和成熟的场所。睾丸具有生精和内分泌双功能, 如发生病变, 会导致亲代不可逆的生精阻滞、

生殖能力异常和子代遗传缺陷或畸形^[19-20]。HE 组织切片结果显示：与 C 组相比，IR 组各级生精细胞显著减少，曲细精管间隙增大，说明重离子辐照可以引起睾丸组织的形态学损伤。不同浓度的姜黄素预处理，可使辐照所造成的损伤有所缓解。表明姜黄素对睾丸组织具有保护作用。

为进一步深入研究，对睾丸组织的多不饱和脂肪酸的过氧化和抗氧化酶活性进行了测定。结果显示，4 Gy 剂量¹²C⁶⁺束照射后MDA含量上升，说明辐射引起的过多自由基可导致多不饱和脂肪酸的脂质过氧化反应，形成代谢产物MDA，继而破坏正常细胞的功能，此外，4 Gy 剂量¹²C⁶⁺束照射可以引起睾丸组织的SOD，CAT活性下降，说明机体的应激抗氧化防御系统被激活，难以维持正常的氧化平衡状态，导致大量的ROS在体内聚集，从而损伤蛋白质。姜黄素通过清除过多的自由基，提高SOD，CAT活性等抗氧化酶活性，抑制脂质的过氧化，减轻辐射对组织的损伤，降低正常组织的损伤。另外，C组和D组相比，发现姜黄素几乎无毒，这与Bishnoi等^[21]和Chainani^[22]研究相一致。在辐射防护方面，姜黄素的保护机制可能不是由单一机制所决定，而是通过调节不同基因和蛋白质表达的多种机制协同作用的结果^[23]。姜黄素提高细胞内抗氧化物酶活性，清除辐射诱导自由基这一途径，则是多种机制里的主要途径之一^[24]。

综上所述，本研究证实了姜黄素可以改善辐射损伤的睾丸组织形态学变化，提高SOD，CAT抗氧化物酶活性，降低脂质过氧化损伤，具有良好的抗辐射、清除自由基的能力，而且在药理学上毒性小。姜黄素在抗辐射药物研发方面具有很大的潜力，有可能成为抗辐射药物。

参考文献：

- [1] LIU Yang, LONG Jing, ZHANG Luwei, *et al.* ADV SPACE RES, 2011, **47**: 55.
- [2] XIA Shouxuan, CHEN Jiawei, JIN Cuizhen, *et al.* Radiation Biology[M]. Beijing: Military Medical Science Publishing House, 1998: 26.
(夏寿萱, 陈家佩, 金崔珍, 等. 放射生物学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998: 26.)
- [3] WU Zhenhua, ZHANG Hong, YANG Rong, *et al.* Nucl Phys Rev, 2011, **28**(1): 109. (in Chinese)
(武振华, 张红, 杨荣, 等. 原子核物理评论, 2011, **28**(1): 109.)
- [4] XIAO Guoqing, ZHANG Hong, LI Qiang, *et al.* Nucl Phys Rev, 2007, **24**(2): 85. (in Chinese)
(肖国青, 张红, 李强, 等. 原子核物理评论, 2007, **24**(2): 85.)
- [5] SRINIVASAN M, RAJENDRA PRASAD N, MENON VP. Mutat Res, 2006, **611**(1/2): 96.
- [6] BI Xinling, GU Jun, MI Qingsheng. Chinese Journal of Dermatovenereology of Integrated Traditional and Western Medicine, 2003, **2**(2): 130. (in Chinese)
(毕新岭, 顾军, 米庆胜. 中国中西医结合皮肤性病杂志, 2003, **2**(2): 130.)
- [7] JAGETIA G C, RAJANIKANT G K. J Surg Res, 2004, **120**(1):127.
- [8] GOEL A, KUNNUMAKKARA A B, AGGARWAL B B. Biochem Pharmacol, 2008, **75**: 787.
- [9] MOLINA-JIJON E, TAPIA E, ZAZUETA C, *et al.* Free Radic Biol Med, 2011, **51**(8): 1543.
- [10] MOUZAOU S, RAHIM I, DJERDJOURI B. Int Immunopharmacol, 2012, **12**(1): 302.
- [11] AMBEGAOKAR S S, WU L, ALAMSHAHI K, *et al.* Neuro Endocrinol Lett, 2003, **24**(6): 469.
- [12] SIDHU G S, SINGH A K, THALLOOR D, *et al.* Wound Repair Regen, 1998, **6**(2): 167.
- [13] NEGI P S, JAYAPRAKASHA G K, JAGAN M R L, *et al.* J Agric Food Chem, 1999, **47**(10): 4297.
- [14] TODA S, MIYASE T, ARICHI H, *et al.* Chem Pharm Bull (Tokyo), 1985, **33**(4): 1725.
- [15] REDDY A C, LOKESH B R. Mol Cell Biochem, 1994, **137**(1): 1.
- [16] JAGETIA G C, RAJANIKANT G K. J. Sury Res, 2004, **120**(1): 127.
- [17] BISHNOI M, CHOPRA K, KULKARNI S K. Pharmacol Biochem Behav, 2008, **88**(4): 511.
- [18] ZHU Mingyue, PEI Hailong, YE Wenling, *et al.* Nucl Phys Rev, 2012, **29**(1): 109. (in Chinese)
(朱明月, 裴海龙, 叶文凌, 等. 原子核物理评论, 2012, **29**(1): 109.)
- [19] WONG W Y, THOMAS C M, MERKUS H M, *et al.* Fertil Steril, 2000, **74**(5): 930.
- [20] ZHANG Luwei, LIU Yang, ZHANG Hong, *et al.* Nucl Phys Rev, 2011, **28**(3): 337. (in Chinese)
(张录卫, 刘阳, 张红, 等. 原子核物理评论, 2011, **28**(3): 337.)
- [21] BISHNOI M, CHOPRA K, KULKARNI S K. Pharmacol Biochem Behav, 2008, **88**(4): 511.
- [22] CHAINANI W N. J Altern Complement Med, 2003, **9**(1): 161.
- [23] VARALAKSHMI C H, ALI A M, PARDHASARADHI B V, *et al.* Int Immunopharmacol, 2008, **8**(5): 688.
- [24] AKTAS C, KANTER M, KOCAK Z. Toxicol Ind Health, 2012, **28**(9): 852.

Study on Protective Effect of Curcumin against the Irradiation Damage of Testis in Mice Induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ Ion Beams

ZHAO Qiuyue^{1, 2, 3, 4}, WANG Zhenhua^{1, 2, 3}, XIE Yi^{1, 2, 3}, XU Shuai^{1, 2, 3, 4},
DI Cuixia^{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. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The protective effect of Curcumin (Cur) against the irradiation damage of testis in mice induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams was studied. Male Kung-Ming mice were exposed to whole body uniformly irradiated with $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams at 4 Gy after pretreated with Cur of different concentration. Then histological alterations were observed. Moreover, malonaldehyde (MDA) level, superoxide dismutase (SOD) activity and catalase (CAT) activity were also measured at 24 h after irradiation. The result showed that middle and high dose Cur pretreated have a good protective effect. Compared with irradiated group, MDA level decreased dramatically in the group of pretreatment with low and middle dose Cur ($P < 0.05$). On the contrary, SOD activity in the pretreated group with low dose Cur significantly increased ($P < 0.05$). Similarly, CAT activity in the pretreated group with middle dose Cur significantly increased ($P < 0.05$). Data suggested that Cur could activate antioxidant system of testis in mice induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams, it have some protective effect to radiation damage. The mechanism may involve in its scavenging reactive oxidant species and then protecting lipid and protein capability.

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

Received date: 28 Apr. 2013; **Revised date:** 13 May 2013

Foundation item: National Basic Research Program of China (2010CB834202); National Natural Science Foundation of China (10835011); Scientific Technology Research Projects 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>