

· 基础研究 ·

次声对小鼠脑组织氧化状态的影响 及姜黄素的脑保护效应观察

张元菊 王琦 李玲 牟翔 陈景藻

【摘要】目的 观察小鼠经 8 Hz/16 Hz, 130 dB 次声作用后脑超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及丙二醛(MDA)的变化,并同时观察姜黄素的脑保护作用。**方法** 选取 72 只 BALB/C 小鼠,将其随机分为空白对照组、单纯次声组及姜黄素 + 次声组(包括高、中、低剂量亚组)。姜黄素 + 次声组小鼠每日给予不同剂量的姜黄素干预,7 d 后停止给药;随后将各组小鼠置于 8 Hz 或 16 Hz, 130 dB 的次声环境中,每天持续 2 h,7 d 后处死小鼠,测定其脑组织中 SOD、GSH-Px 及 MDA 的变化情况,并进行组间结果对比。**结果** 8 Hz 次声实验部分:与空白对照组比较,单纯次声组小鼠脑组织 SOD 及 GSH-Px 活性下降,MDA 含量上升($P < 0.05$),次声 + 姜黄素中、高剂量组与单纯次声组比较,前者脑组织中 GSH-Px 及 SOD 活性上升,MDA 含量下降($P < 0.05$)。16 Hz 次声实验部分:与空白对照组比较,单纯次声组小鼠脑组织 GSH-Px 活性及 MDA 含量上升($P < 0.05$),次声 + 姜黄素中、高剂量组与单纯次声组比较,前者脑组织中 GSH-Px 活性及 MDA 含量均显著下降($P < 0.05$)。**结论** 8 Hz/16 Hz, 130 dB 次声可导致小鼠脑组织 GSH-Px、SOD 活性变化及脑组织过氧化损伤,不同频率次声对脑组织抗氧化酶的影响作用不同,姜黄素可通过抗氧化作用缓解因次声诱发的脑损伤。

【关键词】 次声; 姜黄素; 脑; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 丙二醛

The oxidation balance of the mouse brain after infrasound exposure and the preventative effects of Curcumin ZHANG Yuan-ju*, WANG Qi, LI Ling, MU Xiang, CHEN Jing-zao. * Department of Physiotherapy & Rehabilitation, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: ZHANG Yuan-ju, Email: wangqiz@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore changes in the levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) in the brains of mice after exposure to 8 Hz and 16 Hz infrasound at 130 dB, and effects of Curcumin. **Methods** BALB/C mice were given various doses of Curcumin daily for 7 d. They were then exposed to 8 Hz or 16 Hz infrasound at 130 dB 2 h per day for 7 d. The mice were then sacrificed and the expression of SOD, GSH-Px and MDA in their brains was measured. **Results** The 8Hz group showed decreased expression of GSH-Px and SOD, while MDA expression was increased in comparison to a control group. In rats which had been treated with Curcumin, expression of GSH-Px and SOD was increased, and MDA was decreased compared with the untreated mice and the controls. With 16 Hz infrasound, the expression of GSH-Px and MDA was increased in the infrasound group compared with the controls. In the mice treated with Curcumin, the expression of GSH-Px and MDA was lower than in the untreated mice. **Conclusion** Eight Hz or 16 Hz infrasound at 130 dB may induce changes in GSH-Px and SOD expression and peroxidation in the brains of mice. The effects of antioxidase depend on the frequency. Curcumin can alleviate the damage through antiperoxidation.

【Key words】 Infrasound; Curcumin; Brain; Superoxide dismutase; Glutathione peroxidase; Malondialdehyde

次声是频率为 0.000 1 ~ 20 Hz 的低频声波,在自然界及人工环境中广泛存在。高强度次声对人体具有负面效应,大脑是其最敏感的靶器官之一^[1]。相关研究表明,次声可通过诱发大鼠脑组织过氧化而使其学习、记忆功能降低^[2,3]。据此,本研究将实验小鼠暴露于 8/16 Hz, 130 dB 的次声环境中,同时给予抗氧化剂姜黄素干预,观

察小鼠脑内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的变化情况,并探讨姜黄素的脑保护机制。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物与分组

本研究共选取 BALB/C 小鼠(一种近交系小鼠,由第四军医大学动物实验中心提供)72 只,雄性,体重 20 ~ 25 g,将其随机分为 7 组。本实验分两部分独立进行,分别给予 8 Hz 或 16 Hz 次声干预。每部分均设

基金项目:全军医学科学技术“十五”计划指令性课题资助项目(01L071)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院康复与理疗科(张元菊、李玲、牟翔、陈景藻),急诊科(王琦)

通讯作者:张元菊, Email: wangqiz@fmmu.edu.cn

置空白对照组(8 只)、单纯次声组(8 只)、姜黄素 + 次声组(24 只),其中姜黄素 + 次声组又进一步细分为低剂量($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)亚组、中剂量($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)亚组和高剂量($160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)亚组,本研究中的空白对照组为 2 部分实验共用。除将空白对照组小鼠每日置于次声舱中 2 h,期间不给予次声暴露外,其它各组小鼠均给予 8 Hz 或 16 Hz,130 dB 的次声暴露,每天作用 2 h,共持续 7 d,其中姜黄素 + 次声组小鼠于次声暴露前 7 d 每日灌胃给予相应剂量的姜黄素,当次声暴露开始后即停止给药。

二、实验药物与仪器设备

姜黄素购自美国 Sigma-Adrich 公司,纯度为 97%,并用生理盐水制成 10 mg/ml 的悬浮液,使用前摇匀。实验用次声压力舱及检测系统由第四军医大学、航天工业总公司第 41 所、中科院声学研究所等协作研制,压力舱系统由低频信号发生器(1110B 型,北京强度环境研究所)、功率放大器(7101 型,航天工业总公司第 702 所)和 4 个电动扬声器(YD500-8XA 型,南京电声器材公司)组成,压力舱有效面积为 1.96 m^2 ,体积为 1.92 m^3 ;检测系统主要包括次声传感器(1425 型,丹麦 B&K 公司)和次声信号数据采集分析系统;同时本研究还用到了可见光分光光度计、精密电子天平、离心机及恒温水浴箱等设备。

三、小鼠脑内 GSH-Px、SOD 活性及 MDA 含量测定

各组小鼠于次声暴露结束后,采用脱臼法处死。快速提取单侧大脑半球(左、右不限)组织,称重后加入 9 倍生理盐水,研磨制成 10% 的匀浆液。GSH-Px 活性测定:采用分光光度比色法进行常规测定。组织 GSH-Px 活力单位:规定为每 mg 组织总反应,每分钟扣除非酶反应后,使 GSH-Px 降低 $1 \mu\text{mol/L}$ 为 1 个酶活力单位。SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法测定。MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定。所用试剂盒均由南京建成生化研究所提供。

四、统计学分析

本研究所得结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 SPSS 10.0 版统计软件进行分析比较,统计学方法选用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、8 Hz 次声干预实验结果分析

单纯次声组小鼠与空白对照组比较,前者脑中 GSH-Px 及 SOD 活性下降,MDA 含量升高,组间差异有统计学意义($P < 0.05$),次声 + 姜黄素中、高剂量组与单纯次声组比较,其脑中 GSH-Px 及 SOD 活性上升,MDA 含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);而次声 + 姜黄素低剂量组与单纯次声组比较,其脑中 GSH-Px、SOD 活性及 MDA 含量差异无统计学意义($P >$

0.05)。具体结果详见表 1。

二、16 Hz 次声干预实验结果分析

单纯次声组小鼠与空白对照组比较,前者脑中 GSH-Px 活性上升,MDA 含量升高,组间差异有统计学意义($P < 0.05$);次声 + 姜黄素中、高剂量组与单纯次声组比较,前者脑中 SOD 活性变化不明显,GSH-Px 活性下降,MDA 含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);而次声 + 姜黄素低剂量组与单纯次声组比较,其脑中 GSH-Px、SOD 活性及 MDA 含量均无明显改变,差异无统计学意义($P > 0.05$)。具体结果详见表 2。

表 1 8 Hz,130 dB 次声作用 7 d 后各组小鼠脑组织 SOD、GSH-Px 及 MDA 的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	SOD (U/mg)	GSH-Px ($\mu\text{mol/L}$)	MDA (nmol/mg)
空白对照组	8	54.94 ± 9.47	34.67 ± 16.33	3.50 ± 0.85
单纯次声组	8	31.54 ± 6.56^a	15.55 ± 10.68^a	8.89 ± 1.80^a
次声 + 姜黄素低剂量组	8	33.10 ± 6.58^{ac}	16.91 ± 6.95^{ac}	8.05 ± 2.32^{ac}
次声 + 姜黄素中剂量组	8	41.47 ± 7.58^{ab}	29.11 ± 8.72^b	6.31 ± 2.34^{ab}
次声 + 姜黄素高剂量组	8	46.62 ± 6.77^{ab}	39.74 ± 11.77^b	5.06 ± 1.47^b

注:与空白对照组比较, $^a P < 0.05$;与单纯次声组比较, $^b P < 0.05$;与次声 + 姜黄素高剂量组比较, $^c P < 0.05$

表 2 16 Hz,130 dB 次声作用 7 d 后各组小鼠脑组织 SOD、GSH-Px 及 MDA 的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	SOD (U/mg)	GSH-Px ($\mu\text{mol/L}$)	MDA (nmol/mg)
空白对照组	8	51.67 ± 14.48	40.55 ± 13.63	2.41 ± 0.59
单纯次声组	8	42.80 ± 12.37	94.00 ± 20.29^a	4.41 ± 1.10^a
次声 + 姜黄素低剂量组	8	45.69 ± 7.71	84.06 ± 22.04	3.74 ± 1.71^a
次声 + 姜黄素中剂量组	8	52.65 ± 16.18	70.15 ± 21.31^b	3.07 ± 1.20^b
次声 + 姜黄素高剂量组	8	57.20 ± 14.27	58.06 ± 16.91^b	2.43 ± 0.84^b

注:与空白对照组比较, $^a P < 0.05$;与单纯次声组比较, $^b P < 0.05$

讨 论

目前相关研究发现,次声可引发大鼠脑皮质组织过氧化,从而造成脑组织损伤,如大鼠在 8 Hz,130 dB 次声环境下暴露 14 d 后,其脑皮质 GSH-Px 活性、MDA 含量明显升高^[3];实验小鼠经 90 dB 次声作用 14 d 后,其学习能力降低,电镜观察发现其脑皮质神经细胞出现脂褐素增多及线粒体肿胀^[2]。据此,本课题选择抗氧化剂姜黄素作为研究对象并同时观察其对次声性脑损伤的治疗效应。

姜黄素是从植物姜黄中提取的一种植物多酚,对人体安全性较高,具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗辐射等多种药理作用^[4],其中抗脂质过氧化、抗自由基损伤等作用已得到证实。有研究表明,姜黄素可抑制机体自由基生成并加强其清除^[5,6],能抑制缺血再灌注大鼠脑组织 MDA 及亚硝酸盐含量的升高^[7],同时它还可以影响与氧化、抗氧化有关的酶类而发挥强大的抗氧化作用,以保护生物大分子免遭自由基毒性攻击,从而保护机体组

织功能^[8]。姜黄素对体内多种抗氧化有关酶类均有显著影响,如给予心肌缺血性损伤(由去甲肾上腺素诱发)大鼠姜黄素干预,可使其黄嘌呤氧化酶、髓过氧化物酶活性降低,SOD、CAT、GSH-Px、谷胱甘肽转硫酶活性升高, O_2^- 、脂质过氧化物含量降低,从而减轻去甲肾上腺素引起的大鼠心肌缺血性损伤^[8]。在关于铅神经毒性的防护研究中,姜黄素可使大鼠脑皮质、海马等部位的SOD、CAT活性升高,脂质过氧化物水平降低^[9,10]。

SOD和GSH-Px是脑组织内重要的抗氧化酶类,如SOD能催化 O_2^- 生成 O_2 和 H_2O_2 ;而GSH-Px能催化还原型谷胱甘肽对 H_2O_2 或过氧化物的还原反应,具有保护细胞生物膜及血红蛋白的作用^[10]。MDA是脂质氧化的终产物之一,临床实验研究通常用其代表机体的自由基水平^[11,12],其含量的高低与SOD和GSH-Px活性密切相关。

在正常情况下,体内氧化-抗氧化反应处于动态平衡中,其中很重要的原因之一是酶促反应具有可调节性,当抗氧化酶的相应底物浓度上升时,抗氧化酶则被更多激活,其活性也相应升高,反之亦然^[12]。本研究结果显示,16 Hz、130 dB次声作用使小鼠脑组织中GSH-Px活性及MDA含量升高,说明其脑组织内发生了过氧化反应。

8 Hz次声作用后小鼠脑组织SOD及GSH-Px活性下降,这和崔芳等^[13]研究报道结果一致。SOD及GSH-Px活性的降低不能简单地认为是抗氧化反应的减弱。因为在底物浓度剧增的情况下,所有抗氧化酶短时间内迅速被激活,其活性就不会继续升高,甚至会出现消耗性降低。判断机体氧化反应是增强还是减弱,还需同时观察组织的氧化状况。本实验中小鼠脑组织MDA含量增高,表明其脑组织发生了过氧化反应;SOD及GSH-Px活性下降则可能是脑组织过氧化的表现。从另一方面分析,酶的活性受机体众多因素影响,如分子构型、空间构象、pH值等。8 Hz次声也可能通过其生物谐振作用直接或间接影响SOD及GSH-Px的酶活性,而这也可能是次声促使脑组织过氧化的重要原因之一。

在本研究中,发现16 Hz次声作用可引起脑组织GSH-Px活性上升,预防性使用中、高剂量姜黄素能使其活性降低;而8 Hz次声作用引起脑组织SOD、GSH-Px活性下降,预防性使用中、高剂量姜黄素则使其活性上升,最终结果是促使脑组织内氧化-抗氧化反应平衡,使脑组织内MDA含量下降。姜黄素具有广泛的药理作用,其作用机制涉及体内上百种分子,包括酶、炎性介质、调节因子等,它可能通过特殊的途径影响抗氧化酶活性,从而间接调节组织氧化-抗氧化平衡。如已有研究表明,姜黄素可增加大鼠体内SOD活性^[14],提高微粒体细胞色素P450(Cyt P450)总量及谷胱甘肽转硫酶活性而发挥抗氧化作用^[15];而CytP450、谷胱甘肽转硫酶与GSH-Px关系密切。本实验结果显示了姜黄素具有良好

的抗自由基及抗氧化功能,更重要的是对组织氧化-抗氧化反应的调节作用,能有效缓解次声引发的脑损伤,但其中具体的作用机制目前还不清楚,有待进一步研究。

在8 Hz次声实验中,发现姜黄素的效应在一定范围内随其剂量增加而加强。次声+姜黄素高剂量组与低剂量组间的疗效差异具有统计学意义($P < 0.05$),但次声+姜黄素中、高剂量组间差异无统计学意义($P > 0.05$),其中原因可能与小鼠的消化吸收能力及个体差异较大有关,这也提示本研究在剂量、药物浓度或给药方面有待改进;而在16 Hz次声实验部分,未能观察到姜黄素的剂量依赖效应。因此综上所述,本研究并不能明确得出姜黄素治疗效应的剂量依赖关系,但可以明确的是:在预防性用药的方式下,低剂量姜黄素起不到良好的疗效,而增加剂量亦不会有明显副作用发生。

参 考 文 献

- [1] 陈景藻. 次声的产生及生物学效应//中国人民解放军总后勤部编. 医药卫生科学技术进展. 北京: 军事医学科学出版社, 1997: 194-197.
- [2] 王斌, 陈景藻, 易南. 不同声强8 Hz次声对小鼠学习能力的影响. 第四军医大学学报, 1997, 18: 442-445.
- [3] 叶琳, 龚书明, 陈耀明, 等. 次声作用对大鼠大脑皮层脂质过氧化的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24: 360-362.
- [4] Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. Crit Rev Food Sci Nutr, 2004, 44: 97-111.
- [5] Reddy AC, Lokesh BR. Studies on spice as antioxidants in the inhibition of peroxidation of rat liver microsomes. Mol Cell Biochem, 1992, 111: 117-124.
- [6] Balasubramanyam M, Koteswari AA, Kumar RS, et al. Curcumin induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications. J Biosci, 2003, 28: 715-721.
- [7] 石晶, 陶沂, 胡晋红, 等. 姜黄素对缺血再灌注大鼠脑组织SOD、MDA和亚硝酸盐含量的影响. 第二军医大学学报, 1999, 20: 386-387.
- [8] Manikandan P, Sumitra M, Aishwarya S, et al. Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischemia in rats. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36: 1977-1990.
- [9] Shukla PK, Khanna VK, Khan MY, et al. Protective effect of curcumin against lead neurotoxicity in rat. Hum Exp Toxicol, 2003, 22: 653-658.
- [10] 王学敏. 其它氧化体系//周爱儒. 生物化学. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 159-161.
- [11] 陈勤. 抗衰老研究实验方法. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 485.
- [12] 赵宝昌. 酶促反应动力学//周爱儒. 生物化学. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 54-64.
- [13] 崔芳, 任雨笙, 李玲, 等. 不同声强8 Hz次声作用对大鼠GSH-Px、SOD活性及MDA含量的影响. 第四军医大学学报, 1999, 20: 743-744.
- [14] 石晶, 陶沂, 田亚平. 姜黄素对鼠体内SOD活性和MDA含量的影响. 中国药理学通报, 1997, 13: 249-252.
- [15] 李侠, 陈炳卿, 宋其林. 姜黄素对大鼠肝CytP450系统及谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响. 卫生毒理学杂志, 1997, 11: 293-295.

(修回日期: 2006-08-20)

(本文编辑: 易 浩)