

大蒜辣素对辐射引起的免疫损伤防护作用的研究

王鑫^{1,2} 吴瑕² 朱晓鑫³

(1. 哈尔滨工业大学化工学院, 黑龙江哈尔滨 150090;

2. 东北农业大学成栋学院, 黑龙江哈尔滨 150030;

3. 东北农业大学资源与环境学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要 构建 γ 射线辐射模型,考察了辐射对小鼠免疫系统损伤研究的最佳剂量,并研究了大蒜辣素对 γ 射线辐射引起的小鼠免疫系统损伤的防护效果。结果表明 γ 射线对小鼠进行照射的最佳剂量为5Gy。照射前补充大蒜辣素后,以小鼠碳廓清指数、血清溶血素含量、脾指数、DTH足跖增厚程度为免疫系统指标,16mg/kg·d的剂量组可以有效地防护由于 γ 射线辐射造成的免疫系统损伤。

关键词 大蒜辣素 辐射 免疫系统

Study on protective effects of allicin on immune injury caused by radiation

WANG Xin^{1,2}, WU Xia², ZHU Xiao-xin³

(1. College of Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China;

2. College of Cheng Dong, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

3. College of Resources & Environmental, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract γ -ray radiation model was constructed, radiation damage of the immune system of mice on the optimum dose and the allicin of radiation-induced immune injury of the protective effect were studied. The results showed that the best dose of γ -ray irradiation of mice was 5Gy. Added allicin before irradiation, carbon clearance index, serum hemolysin concentration, spleen index, DTH plantar thickening of the degree as the immune system of indicators, and 16mg/kg·d dose groups can be an effective protective for immune system due to radiation damage.

Key words allicin, radiation, immune system

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)02-0313-04

大蒜辣素是大蒜中的主要生物活性物质,化学名称为二烯丙基硫代亚磺酸酯。国内外对大蒜辣素功能的研究主要集中在抗肿瘤^[1-2]、抗癌、抑菌方面,研究表明,大蒜辣素可以抑制白血病细胞系 HL60 和 U937 的生长并诱导其凋亡^[3],对肝癌细胞 HepG2^[4]、胃癌细胞 cyclin E^[5] 和人鼻咽癌 KB 细胞^[6] 均具有促凋亡的作用。大蒜辣素还具有广泛的抗菌作用,例如抑制白色念珠菌^[7],并在保护人体巨噬细胞^[8]、抑制炎症细胞^[9]和促进药物^[10]在人体内的发挥等方面有着很好的效果。人类生存环境中面临的各种辐射种类日益增多,辐射剂量日益增大,大蒜辣素在抗辐

射方面的功能,国内外报道得还很少,本文首先探讨了 γ 射线辐射小鼠的最佳辐射研究剂量,并进一步研究了大蒜辣素对于 γ 射线辐射引起的小鼠免疫系统损伤的防护效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大蒜辣素纯化物 实验室制备,纯度 73%; γ 射线辐射仪 黑龙江省农科院提供;昆明种小白鼠 雄性,体重 18~22g,哈尔滨肿瘤医院动物实验中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 辐射对免疫系统损伤模型构建的方法 正常小鼠 120 只,空白、1、3、5Gy 辐射剂量的小鼠各 30 只,辐射剂量及剂量率设计如表 1。辐射后的小鼠,分别进行三部分实验,其中碳廓清实验、脾指数测定

收稿日期: 2010-01-27

作者简介: 王鑫(1984-),男,助教,研究方向:生物活性物质的功能性。

表2 不同辐射剂量对免疫系统损伤各指标的影响($\bar{x} \pm s.d.$)

免疫损伤指标	辐射剂量(Gy)			
	空白组(NC)	1	3	5
校正廓清指数	5.45 ± 0.98	4.88 ± 0.90 ^a	4.18 ± 1.04 ^b	3.89 ± 1.07 ^b
血清溶血素(HC ₅₀)	48.68 ± 15.23	10.46 ± 3.34 ^b	2.09 ± 0.89 ^b	1.92 ± 0.83 ^b
脾指数(mg/g)	3.58 ± 0.31	2.46 ± 0.33 ^b	1.66 ± 0.15 ^b	1.48 ± 0.17 ^b
足跖肿胀度(mm)	0.55 ± 0.19	0.61 ± 0.17	0.56 ± 0.19	0.19 ± 0.11 ^b
小鼠存活有效天数(d)	30	30	30	27.4

注 a 与同行 NC 组相比 $P < 0.05$ b 与同行 NC 组相比 $P < 0.01$ 空白组与各辐射剂量组小鼠数量均为 10 只。
 为第一部分,血清溶血素测定、DTH 足跖增厚法指标的测定为第二部分,小白鼠存活率为第三部分,为防止每一部分实验之间互相影响,所以每一部分均采用不同批次小白鼠。且分别从免疫分子、免疫细胞、免疫器官三方面对各种辐射剂量引起的免疫系统损伤进行综合考虑。根据以上测定指标确定辐射引起的免疫系统损伤的最佳辐射剂量。

表1 辐射剂量及剂量率设计表

辐射剂量(Gy)	辐射剂量率(Gy/min)	距辐射源距离(cm)	辐射时间(min)
1	0.19	300	6.1
3	0.57	170	6.1
5	0.95	145	6.1

1.2.2 大蒜辣素对辐射引起的免疫损伤防护模型构建的方法 正常小鼠 100 只,空白、辐射空白、高、中、低剂量大蒜辣素给药组的小鼠各 20 只,辐射剂量为 5Gy。辐射前,对高、中、低剂量给药组分别灌胃 16、8、4mg/kg·d 的大蒜辣素,灌胃时间为 2 周,空白和辐射空白则灌胃生理盐水。辐射后的小鼠,分别进行两部分实验,其中碳廓清实验、脾指数测定为第一部分,血清溶血素测定、DTH 足跖增厚法指标的测定为第二部分。研究大蒜辣素对辐射引起的免疫系统损伤的防护作用。

1.2.3 碳廓清指数的测定方法 于辐射后第 3d,小鼠尾静脉注射生理盐水稀释 3 倍的印度墨汁,按每 10g 体重 0.1mL 计算。待墨汁注入立即计时,注入墨汁后 2、10min,分别从内眦静脉丛取血 20 μ L,并将其加到 2mL Na₂CO₃ 溶液中。用 721 分光光度计在 600nm 波长处测光密度值(OD),以 0.1% Na₂CO₃ 溶液作空白对照。将小鼠处死,取肝脏和脾脏,用滤纸吸干脏器表面血污,称重,计算公式如下:

$$a = \text{体重} / (\text{肝重} + \text{脾重}) \times K^{1/3} \quad \text{式(1)}$$

$$K = (\lg OD_2 - \lg OD_1) / (T_2 - T_1) \quad \text{式(2)}$$

式中 a—校正的吞噬指数;K—未经校正的吞噬指数;OD₂—脉注入碳粒 T₂ 时的吸光度值;OD₁—静脉注入碳粒 T₁ 时的吸光度值。

采用 SPSS 13 软件对数据进行 t 检验,以吞噬指数表示小鼠碳廓清的能力。

1.2.4 血清溶血素含量的测定方法 照射当天,小鼠腹腔注射稀释的 SRBC 0.2mL(约 1 × 10⁸ 个 SRBC)进行免疫,4d 后小鼠眼眶取血,分离出血清并用生理盐水稀释 500 倍。取 1mL 稀释血清加入试管中,然后加入 0.5mL 10% SRBC(约 1 × 10⁹ 个 SRBC)悬浮液置于冰浴中,再加入 1mL 豚鼠血清,随即移置于 37℃ 水浴中保温 10min,保温结束后,放入冰浴中终

止反应 2000r/min 离心 10min,取上清液 1mL 与 3mL 都氏试剂混合,静置 10min。在 540nm 处比色,以不加血清的空白管做对照,测定吸光值,按下式计算半数溶血值(HC₅₀):

$$HC_{50} = \text{样品的吸光度} / \text{SRBC 半数溶血时的吸光度} \times \text{稀释倍数} \quad \text{式(3)}$$

SRBC 半数溶血时的吸光度测定方法:取 0.25mL SRBC(约 1 × 10⁹ 个 SRBC)用都氏试剂稀释至 4mL 摇匀后静止 10min,离心取上清液在 540nm 处比色。

采用 SPSS 13 软件对数据进行 t 检验,以 HC₅₀ 表示小鼠血清溶血能力。

1.2.5 脾指数测定方法 于辐射后第 3d,称量小鼠体重,将小鼠处死,取脾脏,用滤纸吸干脏器表面血污,称重,公式如下:

$$\text{脾指数} = \text{脾重量(g)} / \text{体重(g)} \times 1000 \quad \text{式(4)}$$

采用 SPSS 13 软件对数据进行 t 检验。

1.2.6 迟发性变态反应程度的测定方法 小鼠用 2%(v/v)SRBC 腹腔或静脉免疫,每只鼠注射 0.2mL(约 1 × 10⁸ 个 SRBC)。免疫 4d 后,测量左后足跖部厚度,然后在测量部位皮下注射 2%(v/v)SRBC,每只鼠 20 μ L(约 1 × 10⁸ 个 SRBC),注射后于 24、48h 分别测量左后足跖部厚度,同一部位测量三次,取平均值。

采用 SPSS 13 软件对数据进行 t 检验。以前后足跖厚度的差值来表示 DTH 的程度。

1.2.7 小白鼠存活率的测定方法 观察小鼠 30d 的存活率。

2 结果与分析

2.1 引起免疫系统损伤的辐射剂量的选择

2.1.1 不同辐射剂量对碳廓清指数的影响 如表 2 所示,小鼠受到不同剂量组射线照射后,随着辐射剂量的增加,反映巨噬细胞吞噬功能的校正碳廓清指数明显降低,说明 γ 射线对小鼠的巨噬细胞吞噬功能造成了伤害,其中 3、5Gy 剂量组统计学差异极显著。

2.1.2 不同辐射剂量对血清溶血素的影响 如表 2 所示,小鼠受到照射后,B 淋巴细胞活化产生具有抗体能力的血清溶血素生成明显低于正常对照组,且随着辐射剂量的增加,溶血素的生成量逐渐下降,说明 γ 射线对小鼠的血清溶血素生成能力造成了伤害,其中 1、3、5Gy 剂量组差异统计学极显著。

2.1.3 不同辐射剂量对脾指数的影响 脾指数作为脏器指数之一,可在一定程度上反映免疫系统受损情况。如表 2 所示,小鼠受照射后,由于脾脏细胞大量死亡,脾脏重量明显减轻,脾指数降低,且随着辐

表3 大蒜辣素对辐射小鼠碳廓清指数的影响($\bar{x} \pm sd$)

免疫损伤指标	空白组(NC)	辐射空白组(RC)	4mg/kg · d	8mg/kg · d	16mg/kg · d
校正廓清指数	5.62 ± 1.09	4.09 ± 1.16 ^a	4.11 ± 1.01	4.37 ± 1.61	4.82 ± 0.93 ^b
血清溶血素(HC ₅₀)	48.68 ± 15.23	1.89 ± 0.73 ^a	1.94 ± 0.81	3.01 ± 1.61 ^c	3.22 ± 1.52 ^c
脾指数(mg/g)	3.43 ± 0.38	1.66 ± 0.15 ^a	1.63 ± 0.22	1.71 ± 0.18	2.38 ± 0.37 ^b
足跖厚度差值(mm)	0.55 ± 0.20	0.19 ± 0.11 ^a	0.17 ± 0.12	0.40 ± 0.13	0.62 ± 0.21 ^b

注 ^a 与同行 NC 组相比, $P < 0.05$ ^b 与同行 RC 组相比, $P < 0.05$ ^c 与同行 RC 组相比, $P < 0.01$; NC 和 RC 组与大蒜辣素各不同剂量给药组所用小鼠数量均为 10 只。

射剂量的增加, 脾指数也明显随之降低, 各照射组小鼠脾指数与正常对照组相比, 1、3、5Gy 剂量组统计学差异极显著。

2.1.4 不同辐射剂量对迟发性变态反应程度的影响

SRBC 可刺激 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞, 当再以 SRBC 攻击时, 即可见攻击部位出现迟发性变态反应。小鼠受到照射后, 由于 SRBC 可刺激的 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞的能力减弱, 足跖肿胀度明显降低。

如表 2 所示, 1、3Gy 剂量组的足跖肿胀度差异不显著, 而 5Gy 剂量组辐照后, 差异极显著。

2.1.5 不同辐射剂量对小白鼠存活率的影响 如表 2 所示, 小鼠受照射后, 1、3Gy 剂量组 30d 内小鼠无死亡, 而 5Gy 剂量组有个别小鼠死亡, 由此可看出, 1、3、5Gy 剂量组, 都不会对小鼠产生半数致死效应。其对免疫系统所造成的损伤都具有可恢复性。

综上所述, 以 1、3、5Gy 辐射剂量的 γ 射线分别照射小白鼠。辐照后的小白鼠与对照组相比, 碳廓清指数、血清溶血素含量及脾指数均有明显差异, 且统计学显著。而 DTH 足跖增厚程度, 只有 5Gy 辐射剂量组差异显著。将以上指标综合考虑, 确定 5Gy γ 射线为辐射对免疫系统的损伤研究的最佳剂量。

2.2 大蒜辣素对辐射引起的免疫系统损伤的防护作用

2.2.1 大蒜辣素对辐射小鼠碳廓清指数的影响 如表 3 所示, 小鼠受到 5Gy γ 射线照射后, 反映巨噬细胞吞噬功能的校正廓清指数值明显降低, 照射前补充大蒜辣素组的校正廓清指数均比照射组有所增加, 且随着大蒜辣素浓度的增加, 校正廓清指数逐渐增加, 其中 16mg/kg · d 剂量组与照射组相比, 差异显著。

2.2.2 大蒜辣素对辐射小鼠血清溶血素含量的影响

小鼠受到照射后, B 细胞活化产生抗体能力的血清溶血素生成明显低于正常对照组, 溶血素的生成量仅为正常组的 4% 左右, 补充大蒜辣素纯化物质后血清溶血素的生成量比照射对照组有所升高, 且随着大蒜辣素浓度的增加, 血清溶血素的含量有所增加, 其中 8、16mg/kg · d 血清溶血素升高明显, 有统计学意义, 见表 3。

2.2.3 大蒜辣素对辐射小鼠脾指数的影响 小鼠受到 5Gy 剂量组辐照后, 小鼠脾指数的影响明显降低, 补充大蒜辣素纯化物质后, 小鼠脾指数比照射对照组有所升高, 其中 16mg/kg · d 小鼠脾指数升高明显, 有统计学意义, 见表 3。

2.2.4 大蒜辣素对辐射小鼠迟发性变态反应程度的

影响 小鼠受 5Gy 剂量组辐照后, 由于 SRBC 可刺激 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞的能力减弱, 足跖肿胀度明显降低, 补充大蒜辣素纯化物质后, 足跖肿胀度比照射对照组有所升高, 其中 16mg/kg · d 升高明显, 有统计学意义, 见表 3。

3 结论与讨论

3.1 5Gy 为 γ 射线辐射对小鼠免疫系统损伤研究的最佳剂量。

3.2 小鼠受到 5Gy 剂量 γ 射线辐射后, 与空白对照组相比, 小鼠碳廓清指数、血清溶血素含量、脾指数、DTH 足跖增厚程度都有明显降低, 补充大蒜辣素纯化物质后, 与辐射对照组相比, 各项指标都有所升高, 其中 16mg/kg · d 剂量组升高明显, 有统计学意义。

由此可见, 16mg/kg · d 剂量的大蒜辣素纯化物质可起到对辐射引起的免疫系统损伤的防护作用, 但其对血液系统及其骨髓造血系统的抗辐射作用还需进一步的研究, 另外其抗辐射作用的机理也需进一步的验证。由于大蒜辣素的刺激性, 高剂量 (25mg/kg · d) 可以引起小鼠竖毛和厌食等现象的发生, 应限制其高剂量的应用。但是相信随着微胶囊等掩蔽技术的日益成熟, 大蒜辣素在人类抗辐射保健食品中的作用会越来越来大。

参考文献

- [1] Herman - Antosiewicz A, Singh SV. Signal transduction pathways leading to cell cycle arrest and apoptosis induction in cancer cells by Allium vegetable-derived organosulfur compounds [J]. MutatRes 2004, 555(1-2): 121-131.
- [2] Wu X, Kassie F, Mersch - Sundermann V. Induction of apoptosis in tumor cells by naturally occurring sulfur-containing compounds [J]. MutatRes 2005, 589(2): 81-100.
- [3] Talia Miron. Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis through the Mitochondrial pathway in HL60 and U937 cells [J]. Journal of Nutritional Biochemistry 2008, 19: 524-535.
- [4] 燕丹. 大蒜辣素致肝癌细胞 HepG2 凋亡研究 [J]. 时珍国医国药 2008, 19(12): 3055-3057.
- [5] 梁卫江. 大蒜油对胃癌细胞 cyclin E 表达的抑制作用 [J]. 南方医科大学学报 2007, 27(8): 1241-1243.
- [6] Ya - Ping Yang. Allicin induces apoptosis, cell cycle arrest and microtubule disassembly in human nasopharyngeal carcinoma KB cells [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2009, 18: 114-120.
- [7] Mao Mao An. Allicin enhances the oxidative damage effect of

(下转第 318 页)

表5 皋茶水提物灌胃对小鼠全身状态的影响

组别	动物数(n)	器官系统	观察方法	动物表现
空白对照组	20	中枢和运动	行为	未见行为变化及躁动不安等表现
			异常运动	未见抽搐、震颤、共济失调、强迫运动等表现
		神经系统	对刺激的反应	未见烦躁易怒、冷漠等表现
			神经反射	正常
			肌张力	未见僵硬或松弛表现
		自主神经系统	瞳孔	未见缩小或扩大
			分泌物	未见流涎、流泪
			鼻	未见分泌物
		呼吸系统	呼吸及频率	未见急促或过慢
		心血管系统	心前区触诊	未见心动过速或缓慢
			大便	未见腹泻、便秘
		胃肠系统	腹部形态	未见胀气、收缩
			大便硬度、形态	呈椭圆形灰褐色颗粒
		泌尿生殖系统	阴唇、乳腺(雌鼠)	未见肿胀
			会阴部(雌鼠)	洁净
		皮肤、毛色	颜色、完整性	未见充血、紫绀、苍白,有1只小鼠出现竖毛现象,其余均正常
		眼	眼睑	未见下垂
		其他	眼球	未见凸出、震颤等现象
一般状态	未见姿势异常、消瘦等现象			
皋茶水提物组	20	中枢和运动	行为	未见行为变化及躁动不安等表现
			异常运动	未见抽搐、震颤、共济失调、强迫运动等表现
		神经系统	对刺激的反应	未见烦躁易怒、冷漠等表现
			神经反射	正常
			肌张力	未见僵硬或松弛表现
		自主神经系统	瞳孔	未见缩小或扩大
			分泌物	未见流涎、流泪
			鼻	未见分泌物
		呼吸系统	呼吸及频率	未见急促或过慢
		心血管系统	心前区触诊	未见心动过速或缓慢
			大便	未见腹泻、便秘
		胃肠系统	腹部形态	未见胀气、收缩
			大便硬度、形态	灌胃后24h内,有16只小鼠排出棕黑色软粪便,24h以后粪便逐渐恢复正常,呈灰褐色,颗粒状成形粪便
		泌尿生殖系统	阴唇、乳腺(雌鼠)	未见肿胀
			会阴部(雌鼠)	洁净
		皮肤、毛色	颜色、完整性	未见充血、紫绀、苍白,有2只小鼠出现竖毛现象,其余均正常
		眼	眼睑	未见下垂
		其他	眼球	未见凸出、震颤等现象
一般状态	未见姿势异常、消瘦等现象			

表6 皋茶水提物灌胃对小鼠死亡情况的影响

组别	死亡分布情况														死亡率(%)
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	
空白组(雌)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0
空白组(雄)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0
药物组(雌)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0
药物组(雄)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0

注 /表示无小鼠死亡。

(上接第315页)

amphotericin B against *Candida albicans*[J].International Journal of Antimicrobial Agents 2009 33 258-263.
 [8] Seong-Jun Cho. Allicin a major component of garlic ,inhibits apoptosis of macrophage in a depleted nutritional state[J]. Nutrition 2006 22 :1177-1184.
 [9] Alon Lang. Allicin inhibits spontaneous and TNF- α induced

secretion of proinflammatory cytokines and chemokines from intestinal epithelial cells[J]. Clinical Nutrition ,2004 ,23 :1199-1208.
 [10] Yoav Manaster. Allicin and disulfiram enhance platelet integrin α IIb β 3 - fibrinogen binding [J].Thrombosis Research , 2009 ,124 :477-482.