

姜黄素干预对无机砷暴露小鼠急性肝脏损伤的拮抗作用

王欣, 董丹丹, 邢晓越, 李炜, 李冰

(中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, “砷生物学作用评价及砷中毒防治”辽宁省重点实验室, 辽宁沈阳 110001)

摘要: 目的 观察姜黄素干预对无机砷暴露所致急性肝脏损伤的拮抗作用。方法 实验小鼠自由饮用不同浓度 (10 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L) 亚砷酸钠 (NaAsO_2) 6 周, 再分别给予姜黄素灌胃干预 (200 mg/kg 和 600 mg/kg, 每周 2 次), 分别测定小鼠血清 ALT 和 AST 活力, 全血和肝脏 GSH 含量以及肝脏 MDA 含量。结果 与单纯染毒组小鼠相比, 姜黄素干预组血清 ALT 和 AST 活力显著下降, 全血和肝脏 GSH 含量显著升高, 且肝脏 MDA 含量显著降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 姜黄素干预对无机砷暴露小鼠的急性肝脏毒性和氧化损伤具有一定的拮抗作用。

关键词: 姜黄素; 亚砷酸钠; 肝脏; 氧化应激

中图分类号: R995 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2012)06-0411-04

Antagonistic effect of curcumin on inorganic arsenic-induced acute liver injuries in mice

WANG Xin, DONG Dan-dan, XING Xiao-yue, LI Wei, LI Bin

(Liaoning Provincial Key Laboratory of Arsenic-related Biological Effect Assessment and Arsenic Poisoning Prevention and Control, Department of Occupational Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **Objective** Survey the antagonistic effect of curcumin on inorganic arsenic-induced acute liver injuries. **Methods** Sixty Kunming female mice were divided into 10 groups, 9 groups were exposed different doses of arsenic (10 mg/L, 50 mg/L and 100 mg/L NaAsO_2) contained water by drinking freely for 6 weeks, one group only given water. Different dosages of curcumin (200 mg/kg and 600 mg/kg) were given by gastric perfusion twice a week, then determine the activities of serum ALT and AST, MDA content of liver, GSH content in whole blood and liver, and liver GSH-Px activity. **Results** Compared with arsenic exposure groups, the risen serum ALT and AST activities of curcumin groups showed significantly decreased ($P < 0.01$), the liver content of MDA was significantly reduced ($P < 0.01$), while the whole blood GSH and liver GSH contents were significantly elevated ($P < 0.01$). **Conclusion** The results suggested that curcumin has a certain some antagonistic effect on oxidative damage of liver induced by arsenic in mice.

Key words: curcumin; sodium arsenite; liver; oxidative stress

无机砷及其化合物在工业生产中具有广泛的用途。而长期慢性砷中毒可导致皮肤癌、肺癌、肝癌和膀胱癌等全身性的多系统损害^[1], 是国际癌症研究组织 (IARC) 确认的人类致癌物^[2]。研究已经明确, 肝脏是砷代谢、毒性和致癌性的主要靶器官^[3]。天然提取物多酚类物质姜黄素 (curcumin) 已被证实能够对砷暴露大鼠产生有效的神经保护作用, 并与其极强的抗氧化作用密切相关^[4]。本研究试图观察姜黄素干预对无机砷暴露小鼠急性肝脏毒性和氧化损伤的拮抗作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

收稿日期: 2012-07-30

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81172611)

作者简介: 王欣 (1985—), 女, 硕士研究生, 从事金属中毒的防治研究。

通讯作者: 李冰, E-mail: libing@mail.cmu.edu.cn。

选择健康昆明种雌性小鼠 60 只, 每组 6 只, 由中国医科大学实验动物中心提供。动物室温度控制在 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, 照明时间为每日 (12 ± 2) h, 相对湿度为 50% ~ 60%, 小鼠级别为普通清洁级。饲料由中国医科大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (辽) 2003-0009。实验动物使用许可证号: SYXK (辽) 2003-0013。

单纯染毒组用亚砷酸钠 (NaAsO_2 , 分析纯, 上海分析试剂厂产品) 染毒。用蒸馏水配制成含砷 10 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L 浓度的水溶液, 且 24 h 新鲜配制。染毒期间各实验组小鼠以自由饮水方式饮用含砷水。干预组在染毒同时给予干预因素姜黄素 (国药集团化学试剂有限公司, 产品批号: F20100521), 剂量分别为 200 mg/kg 和 600 mg/kg, 用 1% 羧甲基纤维素钠配制, 每周 2 次灌胃, 染毒时间为 6 周。对照组和单纯染砷组小鼠以生理盐水灌

胃,共6周。对照组小鼠饮用蒸馏水,各组均饲以普通饲料。

1.2 方法

1.2.1 小鼠一般状况观察 染毒期间每天观察小鼠的一般状况,记录小鼠饮水量,每周测量并记录小鼠体重。在染毒终结前 24 h 小鼠禁食,染毒终点,分别测量并记录各组小鼠体重和肝脏的脏器系数。

1.2.2 血清 ALT 和 AST 活力测定 采用南京建成公司试剂盒(赖氏法),直接取血清样品进行测定,ALT、AST 活力单位为 IU/L。

1.2.3 肝脏 MDA 含量测定 采用南京建成公司试剂盒(TBA 法),使用 5% 肝组织匀浆 0.1 ml 按照操作表测定,单位为 nmol/mg prot。

1.2.4 全血 GSH 含量测定 染毒终点称重后,眼球取血。取全血 50 μ l 加双蒸水 550 μ l,溶血后取 500 μ l 和 1.67% 偏磷酸 750 μ l 摇匀,沉淀后离心 3 000 r/min,5 min,取上清 500 μ l 加 0.3 mol/L Na_2HPO_4 2 ml,0.04% DTNB 250 μ l,摇匀显色,在波长 412 nm 下测分光光度值 G 。溶血后取 100 μ l 加 Drabkin 2.1 ml,在波长 540 nm 下测分光光度值 H 。GSH 含量 (mg/gHb) = $G \times 9.64/H$ 。

1.2.5 肝脏 GSH 含量测定 取肝组织,用 0 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水漂洗,滤纸吸干水分,称重,按组织:5% 三氯乙酸 (0 $^{\circ}\text{C}$) = 1:5 的比例制取匀浆,3 000 r/min,离心 15 min,收集上清待测,采用南京建成公司试剂盒法进行测定。最终结果用肝脏样品的重量 (g) 进行校正,单位为 nmol/g tissue。

1.3 统计学分析

采用 SPSS16.0 建立数据库并进行统计分析。结果表示为 $\bar{x} \pm s$ 。各组间的比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。满足方差齐性时,两两比较采用最小显著差值法 (least-significant difference, LSD); 不满足方差齐性时,两两比较采用 Dunnett's T3 法。 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义,方差齐性检验水准定为 0.1。

2 结果

2.1 染毒小鼠一般情况

所有 60 只小鼠用 NaAsO_2 处理 6 周,均存活且没有明显的系统毒性,小鼠生长良好,毛发光滑,行走无异常,活动灵敏,反应敏捷,饮食正常,大便成形。每周记录染毒小鼠的体重情况,可见小鼠体重随时间增长而增加,不同组别小鼠体重间无明显差异,单纯染毒组小鼠和干预组小鼠间饮水量、肝脏脏器系数也均未见显著差异。

2.2 姜黄素干预对砷暴露小鼠血清 ALT 和 AST 活力的影响

由表 1 可见,10 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L NaAsO_2 单纯染毒组与对照组小鼠相比,血清 ALT 和 AST 活力均显著升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 给予 200 mg/kg 和 600 mg/kg 姜黄素干预组小鼠与相同剂量 NaAsO_2 染毒的单纯染毒组小鼠相比,血清中 ALT 和 AST 活力显著下降,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 除 100 mg/L NaAsO_2 + 600 mg/kg 姜黄素干预组小鼠与 100 mg/L NaAsO_2 + 200 mg/kg 姜黄素干预组小鼠比较血清中 ALT 活力有显著下降,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) 外,其余 10 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L NaAsO_2 染毒的 200 mg/kg 和 600 mg/kg 姜黄素干预组之间血清 ALT 和 AST 活力差异均无统计学意义。

表 1 姜黄素干预对砷暴露小鼠血清 ALT 和 AST 活力的影响 ($n=6$) IU/L

组别	水砷浓度 (mg/L)	ALT	AST
对照组	0	43.03 $\pm$ 3.19	59.05 $\pm$ 7.37
单纯染毒组	10	83.35 $\pm$ 6.90*	87.51 $\pm$ 14.51*
	50	114.30 $\pm$ 8.25* ^a	103.22 $\pm$ 19.74*
	100	131.06 $\pm$ 5.10* ^{ab}	133.72 $\pm$ 25.92* ^{ab}
姜黄素干预组 1 (200 mg/kg)	10	58.49 $\pm$ 9.95* ^{##}	63.69 $\pm$ 7.46 ^{##}
	50	85.79 $\pm$ 4.81* ^{##a}	85.04 $\pm$ 2.82* ^{##a}
	100	106.39 $\pm$ 3.09* ^{##ab}	109.44 $\pm$ 20.95* ^{ab}
姜黄素干预组 2 (600mg/kg)	10	56.02 $\pm$ 4.77* ^{##}	63.23 $\pm$ 4.40 ^{##}
	50	79.40 $\pm$ 6.04* ^{##a}	79.59 $\pm$ 4.03* ^{##a}
	100	95.83 $\pm$ 4.00* ^{##@ab}	101.37 $\pm$ 9.92* ^{##ab}

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与对应水砷浓度单纯染毒组比较,## $P < 0.05$,### $P < 0.01$;与姜黄素干预组 1 (200 mg/kg) 中的对应水砷浓度染毒组比较,@ $P < 0.01$;与所在组内 10 mg/L 水砷浓度染毒组比较,a $P < 0.01$;与所在组内 50 mg/L 水砷浓度染毒组比较,b $P < 0.01$ 。

2.3 姜黄素干预对砷暴露小鼠全血和肝脏 GSH 含量的影响

由表 2 可见,50 mg/L 和 100 mg/L NaAsO_2 单纯染毒组小鼠与对照组小鼠相比全血和肝脏 GSH 含量均显著降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 给予 200 mg/kg 和 600 mg/kg 姜黄素干预组小鼠与相同剂量 NaAsO_2 染毒的单纯染毒组小鼠相比,全血和肝脏 GSH 含量均显著升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 除 10 mg/L NaAsO_2 + 600 mg/kg 姜黄素干预组小鼠与 10 mg/L NaAsO_2 + 200 mg/kg 姜黄素干预

组小鼠比较, 全血 GSH 含量有显著下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) 外, 其余 10 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L NaAsO₂ 染毒的 200 mg/kg 和 600 mg/kg 姜黄素干预组小鼠之间, 全血和肝脏 GSH 含量均无显著差异。

2.4 姜黄素干预对砷暴露小鼠肝脏 MDA 含量的影响

由表 2 可见, 10 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L NaAsO₂ 单纯染毒组小鼠与对照组小鼠相比肝脏 MDA 含量显著增高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 除 10 mg/L NaAsO₂ + 200 mg/kg 和 10 mg/L NaAsO₂ + 600 mg/kg 姜黄素干预组小鼠与 10 mg/L NaAsO₂ 单纯染毒组小鼠相比肝脏 MDA 含量差异无统计学意义外, 其他给予 200 mg/kg 和 600 mg/kg 姜黄素干预组小鼠与相同剂量 NaAsO₂ 染毒的单纯染毒组小鼠相比, 肝脏 MDA 含量显著降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 除 50 mg/L NaAsO₂ + 600 mg/kg 姜黄素干预组小鼠与 50 mg/L NaAsO₂ + 200 mg/kg 姜黄素干预组小鼠比较肝脏 MDA 含量有显著下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) 外, 10 mg/L 和 100 mg/L NaAsO₂ 染毒的 200 mg/kg 和 600 mg/kg 姜黄素干预组小鼠之间差异无统计学意义。

表 2 姜黄素干预对砷暴露小鼠全血和肝脏 GSH 及肝脏 MDA 含量的影响 ($n = 6$)

组别	水砷浓度 (mg/L)	全血 GSH (mg/gHb)	肝脏 GSH (nmol/g tissue)	肝脏 MDA (nmol/mg prot)
对照组	0	2.83 ± 0.43	320.86 ± 15.95	1.33 ± 0.17
单纯染毒组	10	3.01 ± 0.17	319.24 ± 13.60	2.25 ± 0.35**
	50	1.92 ± 0.22**a	258.26 ± 10.94**b	4.53 ± 0.22**b
	100	1.62 ± 0.11**a	241.04 ± 6.18**bc	5.86 ± 0.40**bd
姜黄素干预组 1 (200 mg/kg)	10	2.28 ± 0.06***	300.20 ± 7.12***	1.77 ± 0.31
	50	2.18 ± 0.04***	277.51 ± 5.08***b	2.46 ± 0.65***a
	100	1.96 ± 0.33***	256.23 ± 3.72***bd	3.52 ± 0.71***bd
姜黄素干预组 2 (600 mg/kg)	10	2.10 ± 0.09***@	305.67 ± 6.36***	2.01 ± 0.57*
	50	2.22 ± 0.09***	279.94 ± 5.31***b	1.88 ± 0.38###@
	100	2.12 ± 0.18***	254.82 ± 2.55*##bd	3.90 ± 0.72***bd

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与对应水砷浓度单纯染毒组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与姜黄素干预组 1 (200 mg/kg) 中的对应水砷浓度染毒组比较, @ $P < 0.05$; 与所在组内 10 mg/L 水砷浓度染毒组比较, a $P < 0.05$, b $P < 0.01$; 与所在组内 50 mg/L 水砷浓度染毒组比较, c $P < 0.05$, d $P < 0.01$ 。

3 讨论

肝脏是人体的重要解毒器官, 抵御有毒化学物质、酒精、病毒性感染或代谢超负荷等的侵袭。砷是一种确定的人类致癌物, 可引起皮肤、肝脏、膀胱和

肺等多器官癌症^[5]。虽然无机砷在人体内的代谢过程存在于大多数器官, 但主要在肝脏中进行^[6]。在慢性砷中毒患者中, 普遍可发现肝功能异常和血清转氨酶 ALT, AST 和 ALP 等增高的现象, 甚至可出现门脉高压和肝纤维化等症状^[7]。而小鼠长期饮用含高砷水, 4~6 周可见肝细胞膜损伤、脂肪变性和点状坏死, 15 周可见纤维化等肝脏形态学病理改变^[8]。姜黄素是从姜黄根茎中提取的一种酚类化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤和神经保护以及皮肤损伤治疗等多种广泛的生物学作用, 因此其对机体的抗氧化保护和机制一直受到普遍关注^[9]。近年来许多研究显示姜黄素具有较显著的保肝作用。ALT、AST 能敏感提示肝损伤程度; MDA 作为脂质过氧化产物之一, 可以反映体内脂质过氧化的水平, 间接反映细胞氧化损伤程度。GSH 是体内重要的抗氧化剂, 参与防御、解毒及损伤修复, 在对砷的解毒过程中发挥了主要作用^[10]。实验表明姜黄素对四氯化碳引起的肝损伤具有保护作用, 姜黄素干预后血中 ALT 和 AST 含量及肝脏中 MDA 含量与 CCl₄ 染毒组相比显著下降^[11]。姜黄素对肝损伤和肝纤维化动物模型具有保护作用, 能够降低氧化应激损伤^[12]。本实验结果也显示, 姜黄素干预对饮水砷暴露造成的小鼠血清 ALT、AST 活力升高、全血和肝脏 GSH 含量下降, 以及肝脏 MDA 含量增高等具有明显的拮抗作用。提示姜黄素也可以减低饮水砷暴露诱导的肝脏毒性和氧化损伤, 从而对无机砷暴露引发的肝脏损伤具有一定的保护作用。本研究为使用膳食化合物来对抗或缓解砷诱导的慢性损伤的可能性和可行性提供实验依据。

参考文献:

- [1] Heck JE, Chen Y, Grann VR, *et al.* Arsenic exposure and anemia in Bangladesh: a population-based study [J]. *Occup Environ Med*, 2008, 50: 80-87.
- [2] International Agency for Research on Cancer (IARC). Some drinking water disinfectants and contaminants, including arsenic [J]. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 2004, 84: 269.
- [3] Ng JC, Wang J, Shraim A. A global health problem caused by arsenic from natural sources [J]. *Chemosphere*, 2003, 52 (9): 1353-1359.
- [4] Yadav RS, Chandravanshi LP, Shukla RK, *et al.* Neuroprotective efficacy of curcumin in arsenic induced cholinergic dysfunctions in rats [J]. *Neurotoxicology*, 2011, 32 (6): 760-768.
- [5] De Vizcaya-Ruiz A, Barbier O, Ruiz-Ramos R, *et al.* Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic [J]. *Mutat Res*, 2009, 674: 85-92.

(下转第 418 页)

需要结合以下方面考虑: 其一, 微核率增高不是确定的疾病终点事件, 吸烟、饮酒等个人生活模式以及其他化学物接触都可能引起微核计数异常; 其二, 对氯乙烯接触水平的接触评估资料来自对研究对象工种、工作时间和相应工作车间的环境检测资料, 没有个体采样获得的接触资料, 因此可能会产生接触错分, 引起偏倚; 此外, 个体间 DNA 对致癌物损伤的敏感性存在差异, 还需要开展更广泛人群的探索研究。

总之, 在我国现行的氯乙烯职业卫生标准下, 职业性氯乙烯接触能够造成遗传物质的损伤。氯乙烯接触引起的基因毒性需要进一步研究确证, 对氯乙烯接触评估资料的进一步完善, 以获得更加确凿的剂量-反应关系数据和更确切的职业接触限值。

参考文献:

- [1] Fenech M, Morley A A. Measurement of micronuclei in lymphocytes [J]. *Mutat Res*, 1985, 147 (1-2): 29-36.
- [2] Kirsch-Volders M, Fenech M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes [J]. *Mutagenesis*, 2001, 16 (1): 51-58.
- [3] Gaylor D, Ryan L, Krewski D, *et al.* Procedures for calculating benchmark doses for health risk assessment [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 1998, 28 (2): 150-164.
- [4] Filipsson A F, Sand S, Nilsson J, *et al.* The benchmark dose method—review of available models, and recommendations for application in health risk assessment [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2003, 33 (5): 505-542.
- [5] Piersma A H, Janer G, Wolterink G, *et al.* Quantitative extrapolation of in vitro whole embryo culture embryotoxicity data to developmental toxicity in vivo using the benchmark dose approach [J]. *Toxicol Sci*, 2008, 101 (1): 91-100.
- [6] Sun Y, Sun D, Zhou Z, *et al.* Estimation of benchmark dose for bone damage and renal dysfunction in a Chinese male population occupationally exposed to lead [J]. *Ann Occup Hyg*, 2008, 52 (6): 527-533.
- [7] Bolognesi C, Perrone E, Landini E. Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy [J]. *Mutagenesis*, 2002, 17 (5): 391-397.
- [8] Fenech M, Holland N, Chang W P, *et al.* The human micronucleus project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans [J]. *Mutat Res*, 1999, 428 (1-2): 271-283.
- [9] Ishikawa H, Yamamoto H, Tian Y, *et al.* Evidence of association of the CYP2E1 genetic polymorphism with micronuclei frequency in human peripheral blood [J]. *Mutat Res*, 2004, 546 (1-2): 45-53.
- [10] Da C A, McArthur A G, Silva C C, *et al.* Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident [J]. *Mutat Res*, 1994, 313 (1): 57-68.
- [11] Di Giorgio C, De Meo M P, Laget M, *et al.* The micronucleus assay in human lymphocytes: screening for inter-individual variability and application to biomonitoring [J]. *Carcinogenesis*, 1994, 15 (2): 313-317.
- [12] Lucero L, Pastor S, Suarez S, *et al.* Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells [J]. *Mutat Res*, 2000, 464 (2): 255-262.
- [13] Pastor S, Gutierrez S, Creus A, *et al.* Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells [J]. *Mutagenesis*, 2001, 16 (6): 539-545.
- [14] Qiu Y L, Wang W, Wang T, *et al.* Genetic polymorphisms, messenger RNA expression of p53, p21, and CCND1, and possible links with chromosomal aberrations in Chinese vinyl chloride-exposed workers [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17 (10): 2578-2584.
- [15] Gehring P J, Watanabe P G, Park C N. Risk of angiosarcoma in workers exposed to vinyl chloride as predicted from studies in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1979, 49 (1): 15-21.
- [16] Simonato L, L'Abbe K A, Andersen A, *et al.* A collaborative study of cancer incidence and mortality among vinyl chloride workers [J]. *Scand J Work Environ Health*, 1991, 17 (3): 159-169.
- [7] Drobná Z, Walton FS, Harmon AW, *et al.* Interspecies differences in metabolism of arsenic by cultured primary hepatocytes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 245: 47-56.
- [7] Xu Y, Wang Y, Zheng Q, *et al.* Clinical manifestations and arsenic methylation after a rare subacute arsenic poisoning accident [J]. *Toxicol Sci*, 2008, 103: 278-284.
- [8] Xie Y, Trouba KJ, Liu J, *et al.* Biokinetics and subchronic toxic effects of oral arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid in v-Ha-ras transgenic (Tg.AC) mice [J]. *Environ Perspect*, 2004, 112: 1255-1263.
- [9] Jutta L, Silke M, Jürgen B. Nuclear factor- κ B-related factor 2 prevents alcohol-induced fulminant liver injury [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134: 1159-1168.
- [10] Maiti S, Chatterjee AK. Effects on levels of glutathione and some related enzymes in tissues after an acute arsenic exposure in rats and their relationship to dietary protein deficiency [J]. *Arch Toxicol*, 2001, 75: 531-537.
- [11] Fu Yumei, Zheng Shizhong, Lin Jianguo, *et al.* Curcumin protects the rat liver from CC14-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation [J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 73: 399-409.
- [12] Bruck R, Ashkenazi M, Weiss S, *et al.* Prevention of liver cirrhosis in rats by curcumin [J]. *Liver Int*, 2007, 27: 373-383.

(上接第 413 页)