

电离辐射对人皮肤成纤维细胞中超氧阴离子自由基浓度和超氧化物歧化酶与组织蛋白酶D活力的影响

乐敏 刘莉 王荷英 何介薇

(上海医科大学放射医学研究所, 上海 200032)

摘要 ^{60}Co γ 射线 10~40 Gy 照射正常人皮肤成纤维细胞, 1h 后, 细胞释放超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)量显著增高, 其增高与照射剂量呈正相关。细胞超氧化物歧化酶(SOD)活力明显下降, 且与照射剂量呈负相关。组织蛋白酶 D 活力显著增高, 其增高与照射剂量呈正相关。在辐照 0~40 Gy 范围内, 细胞释放 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 量与细胞 SOD 活力呈负相关, 而细胞释放 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 量与细胞组织蛋白酶 D 活力呈正相关。

关键词 辐射效应, 细胞, 自由基, SOD, 组织蛋白酶 D

放射性皮肤溃疡难以愈合, 其机理目前尚不太清楚。为了探讨电离辐射是否会引发皮肤组织细胞内产生自由基系统、细胞自由基的产生与细胞抗超氧阴离子自由基的酶-超氧化物歧化酶(SOD)活力改变的关系; 以及这些变化与细胞溶酶体内蛋白水解酶(组织蛋白酶 D)活力改变的关系, 本文观察了正常人皮肤成纤维细胞经 ^{60}Co γ 射线 10 Gy~40 Gy 照射后, 细胞超氧阴离子自由基释放量、SOD 活力与组织蛋白酶 D(cathepsin D)活力的改变, 以进一步了解电离辐射对机体皮肤损伤的机理。

1 材料和方法

1.1 正常人皮肤成纤维细胞的培养

参照 Kruse 氏^[1]方法, 培养材料为 4~6 个月水囊引产胎儿(引产后 6 h 内使用)的大腿内侧皮肤。原代培养用含 20% 小牛血清-Eagles 培养液。传代时用含 10% 小牛血清-Eagles 培养液。4~5 d 传代一次。取第 20 代细胞用作实验。

1.2 照射条件

上海市肿瘤医院 ^{60}Co 治疗机, 钴源与细胞间距离为 60 cm, 剂量率 0.818 Gy/min, 照射时 37°C 水浴恒温。

1.3 细胞释放 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 测定

参照 Babior 氏^[2]方法。成纤维细胞用 0.25% 胰酶消化后, 取 1×10^6 细胞悬浮在 1 ml 无酚红 Hank's 液中, 37°C 下保温 5 min, 加 500 μl 氧化型细胞色素 C(Sigma), 以 37°C 水浴孵育 15 min, 用冰浴冷却后, 2000 rpm 离心 15 min, 取上清液测 A 550 nm。根据摩尔消光系数 $\epsilon = 2.1 \times 10^4 \text{cm}^2/\text{mmol}$ 算得 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 释放量。

收稿日期: 初稿 1994-10-26, 修改稿 1994-12-14

1.4 细胞 SOD 活力测定^[8]

细胞经 0.25% 胰酶消化后, 取 1×10^6 细胞加 500 μl 0.1 mol pH 8.0 Tris-HCl, -20°C 冻融 3 次, 取 50 μl 细胞破碎液加 500 μl 无水乙醇、300 μl 氯仿, 14,000 rpm 4°C 离心 30 min, 取上层液体用邻苯三酚自氧化法测 SOD 活力。

1.5 细胞组织蛋白酶 D 活力测定

参照 Barrett 氏^[4]法, 取细胞破碎液 200 μl , 在酸性缓冲液(0.2 mol/L 盐酸缓冲液 pH 3.5) 用牛血红蛋白作底物, 以酚试剂显色, 测 A 600 nm。用酪氨酸作标准, 计算酶活力单位。蛋白含量用 Folin-phenol 法测定。每毫克蛋白样品中的酶在每分钟时间内水解底物使释出 1 mmol 酪氨酸时的活力被定为 1 毫单位(mu)。

1.6 数据处理

数据以均值 \pm S.D. 表示。用 t 检验进行显著性测定及相关检验。

2 实验结果

不同辐照剂量对细胞释放 O_2^- 量、SOD 活力、组织蛋白酶 D 活力的影响见表 1。从表中可见: 在 10 Gy~40 Gy 照射剂量范围内, 细胞在照后 1 h, 各照射组细胞释放 O_2^- 量都显著高于对照组 ($p < 0.001$), 细胞 SOD 活力在各照射组明显低于对照组 ($p < 0.05$), 而细胞组织蛋白酶 D 活力在

Tab 1. Effect of different doses irradiation on the concentration of O_2^- activity of SOD and cathepsin D in cultured fibroblasts

Dose/Gy	O_2^- concentration (sample number 4) / nmol/ 10^6 cell	Activity of SOD (sample number 3) / u/ 10^6 cell	Activity of cathepsin D (sample number 4) / mu/ 10^6 cell
0	2.884 ± 0.042	13.3 ± 1.1	186.55 ± 3.63
10	$4.148 \pm 0.54^{(3)}$	$10.6 \pm 0.6^{(1)}$	$241.28 \pm 3.79^{(3)}$
20	$5.295 \pm 0.010^{(3)}$	$8.4 \pm 0.9^{(2)}$	$281.60 \pm 5.53^{(3)}$
40	$5.616 \pm 0.006^{(3)}$	$5.7 \pm 0.4^{(3)}$	$278.03 \pm 4.58^{(3)}$

⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$, ⁽³⁾ $p < 0.001$ (compared with 0Gy group)

照后各剂量组也显著高于对照组 ($p < 0.001$)。在辐照 0~40 Gy 范围内, 细胞释放 O_2^- 量与照射剂量呈正相关 ($r = 0.9131$, $p < 0.001$), 细胞 SOD 活力与照射剂量呈负相关 ($r = -0.9842$, $p < 0.05$); 细胞组织蛋白酶 D 活力与照射剂量呈正相关 ($r = 0.8295$, $p < 0.001$)。细胞释放 O_2^- 量与细胞 SOD 活力呈负相关 ($r = -0.9684$, $p < 0.01$), 而细胞释放 O_2^- 量与细胞组织蛋白酶活力呈正相关 ($r = 0.9918$, $p < 0.01$), 细胞释放 O_2^- 量、SOD 活力和组织蛋白酶 D 活力在细胞接受 γ 射线照射剂量 10 Gy 与 20 Gy、40 Gy 之间则无显著性差异。

3 讨 论

电离辐射使细胞某些成分如 DNA 和膜等遭到破坏。已经证明电离辐射引起的染色体断裂与 O_2^- 、 H_2O_2 等的的作用有关^[5]。本实验观察到细胞受辐照后在 O_2^- 量增高的同时, 细胞 SOD 活力下降, 且两者呈负相关。超氧化物歧化酶能催化超氧阴离子自由基的歧化反应。在辐照后细胞 SOD 活力下降, 酶的理化性质和结构都发生了改变。造成细胞 SOD 辐射失活的主要因素是 $\cdot\text{OH}$ 自由基。

本实验中细胞 SOD 活力下降可能是因辐射使 H_2O 发生射解, 产生过多的 $\cdot OH$; 也可能与辐射产生过多 O_2^- , 而 O_2^- 与 H_2O_2 在铁盐存在下反应生成较多 $\cdot OH$ 自由基有关。由于 SOD 可清除细胞产生的 O_2^- , 因此当辐射使 SOD 失活, 导致 O_2^- 得不到及时清除, 使 O_2^- 堆积而引起细胞一系列的变化。

组织蛋白酶 D 是门冬氨酸类蛋白水解酶之一, 它主要存在于所有哺乳动物细胞的溶解体中, 它的活力可反映溶酶体内蛋白水解酶的活力, 其功能参与细胞自我分解及组织间的自我消化, 故对细胞内外蛋白分解代谢起着极为重要的作用^[6]。已经证实, 大剂量照射后机体血浆中组织蛋白酶 D 活力增高^[7]。本实验又观察到细胞经照射后, 其释放 O_2^- 量增高的同时, 组织蛋白酶 D 活力也升高, 且两者有正相关关系。推测在辐射引起细胞释放 O_2^- 量增高的过程中也有门冬氨酸类蛋白酶参与。至于辐照后细胞组织蛋白酶 D 活力的改变与细胞 O_2^- 释放之间是否存在因果关系, 尚待进一步实验证实。

由于辐射所致的细胞损伤效应是一个复杂的过程, 除细胞本身结构和功能的改变外还涉及许多有关细胞生长或抑制因子的作用。本实验只是从辐射引起皮肤细胞释放 O_2^- 量、SOD 和组织蛋白酶 D 活力改变, 以及它们之间可能存在的相互关系方面, 探讨了辐射引起人皮肤成纤维细胞的损伤机理。

参 考 文 献

- 1 Kruse P F. in: Tissue Culture. Academic Press New York and London, 1973: 43
- 2 Babior B M, Kipnes R S, Carnutte J T. J. Clin. Invest., 1973, 52: 741
- 3 翁其亮等. 生物化学与生物物理进展, 1986, 3: 51
- 4 Barrett A J et al. Biochem. J., 1967, 104: 601
- 5 莫简主编, 医用自由基生物学导论, 人民卫生出版社, 1989
- 6 Barrett A J. in: Proteases, In Mammalian Cells and Tissues Elsevier/North-Holland. 1977; 209
- 7 Jin W Q et al. Nuclear Sci. Tech., 1990, 1(3): 187

RADIATION EFFECTS ON THE CONCENTRATION OF SOD AND CATHEPSIN D ACTIVITIES IN CULTURED SKIN FIBROBLASTS

Le Min Liu Li Wang Heying He Jiewei

(Shanghai Institute of Radiation Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

ABSTRACT Human skin fibroblasts were irradiated with ^{60}Co γ -ray 10 Gy~40 Gy. After one hour, the concentration of O_2^- increased significantly, the activity of SOD in cultured fibroblasts decreased markedly, and the activity of cathepsin D increased significantly. These changes related with the dose, when the radiation dose with the range of 0~40 Gy, the concentration of O_2^- related with the activity of SOD and cathepsin D in cultured skin fibroblasts.

KEYWORDS Radiation effect, Cell, Free radical, SOD, Cathepsin D