

X射线致小鼠急性损伤的观察

何火聪¹ 吴君心¹ 苏颖¹ 潘剑茹² 郑光进² 刘树滔²

¹ (福建医科大学教学医院 福建省肿瘤医院 福州 350014)

² (福州大学生物工程研究所 福州 350002)

摘要 本研究用6 Gy X射线对小鼠进行全身一次性照射,分别在照射后1、3和7 d经颈椎脱臼处死,测定小鼠外周血红、白细胞数量,胸腺指数和脾脏指数,骨髓嗜多染红细胞微核形成率以及肝脏抗氧化水平。结果表明:照射24 h后,小鼠外周血白细胞数量急剧降低,胸腺指数和脾脏指数下降,骨髓嗜多染红细胞微核形成率增加,肝脏脂质过氧化水平上升。放射7 d后,胸腺指数稍有回升,骨髓红细胞微核形成率和肝脏脂质过氧化水平略为降低,其它指标随时间变化损伤程度持续增加。

关键词 X射线,辐射损伤,小鼠

中图分类号 Q691.5, Q554+9, Q691.5, Q852.7

恶性肿瘤是当前严重影响人类健康、威胁人类生命的主要疾病之一,放射治疗是杀灭肿瘤的行之有效的,承担着2/3肿瘤病人的治疗。但是电离辐射可使细胞内的水辐解产生活性氧自由基(ROS)如超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$),过氧化氢(H_2O_2),羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和二氧化氮($\cdot\text{NO}_2$)^[1]。这些活性氧可使DNA链断裂、脂质过氧化、蛋白质修饰从而使细胞损伤,活性氧还会在细胞内产生多种信号传导通路,若不消除,最终会导致组织的物理和化学损伤^[2-4]。细胞内储备有抗氧化酶和分子,这些抗氧化系统包括低分子量抗氧化剂如谷胱甘肽和各种抗氧化酶如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶^[5]。内源抗氧化酶被视为细胞防御ROS侵袭的第一道防线,维护正常的氧化还原平衡和生化过程,辐射会使其活力减弱^[6,7]。辐射导致的淋巴和造血系统的破坏是产生败血症和死亡的主要原因。因此从不同角度加深对急性放射损伤病理过程的认识,对于提高放射病的治愈率有重要意义。

本实验以X射线为放射源,对小鼠进行6 Gy的全身放射,通过观察小鼠造血系统和肝脏抗氧化指标的变化,建立了小鼠在放射后一周内急性损伤的模型,以期为X射线治疗恶性肿瘤提供参考数据。

1 材料

雄性C57BL/6小鼠,上海斯莱克实验动物有限

责任公司繁殖,清洁级。体重为18—21 g。自由饮水和进食,饲料为专用辐照料。定时排风。照射前饲养3 d无异常。实验动物质量合格证号为SCXK(沪)2007-0005。SOD试剂盒、MDA试剂盒、GSH-Px试剂盒、T-AOC试剂盒购自南京建成生物工程研究所,其余试剂均为分析纯或生化试剂,所用水均为高纯水。RM2135型切片机(德国LEICA公司);OlympusBH-2型光学显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 辐照

将试验用C57BL/6小鼠随机分为正常对照组($n=5$)和辐射对照组($n=15$),X射线6 MeV(IEC 61217)全身一次性照射6 Gy(照射野为15 cm×15 cm,源皮距100 cm,剂量率300 cGy/min,德国西门子加速器),照射后普通喂养,分别在照射后1、3和7 d处死。

2.2 小鼠外周血红、白细胞变化

照射后第1、3和7 d,从小鼠眼眶取血,分别用白细胞稀释液和生理盐水稀释后,用普通光学显微镜进行红、白细胞计数。

2.3 胸腺和脾脏指数

照射后第1、3和7 d,用颈椎脱臼法处置小鼠,

福建省卫生教育联合攻关项目(WKJ2008-2-47-1)、国家自然科学基金(30800285)资助

第一作者:何火聪,男,1973年3月出生,2004年毕业于福州大学,获得硕士学位,主管技师

通讯作者:吴君心,Email: junxinwu@126.com

收稿日期:初稿2011-09-15,修回2011-10-10

称重后, 摘取小鼠的胸腺和脾脏, 用滤纸吸干残血后, 称重 (mg), 分别除以小鼠体重 (g), 得到胸腺指数和脾脏指数。

2.4 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

照射后第 1、3 和 7 d, 处置动物后, 分离出股骨, 除净周围组织, 用 4—5 mL 生理盐水冲洗出骨髓, 直至骨头变白, 1 500 r/min 离心 10 min 离心, 去上清, 加入 30 μ L 灭活小牛血清, 混匀, 吸取 20 μ L, 常规制备骨髓涂片, 甲醇固定, 吉瑞氏染料染色, 油镜下观察, 以高倍镜粗检, 选取分散均匀、染色良好、完整清晰的嗜多染红细胞群, 在油镜下观察微核的出现率。每只小鼠计数 1 000 个嗜多染红细胞 (PCE) 以上, 观察含有微核的嗜多染红细胞数, 微核率以千分率 (‰) 表示。一个嗜多染红细胞中出现一个或多个微核, 仍按一个细胞计数。

2.5 肝脏抗氧化指标分析

照射后第 1、3 和 7 d, 处置动物后, 取肝脏, 以生理盐水制成 10% 匀浆, 用南京建成的试剂盒测定肝中 SOD 和 MDA, 采用 Micro-BCA 试剂盒测定蛋白含量。

2.6 统计学处理

采用 Excel 软件进行统计处理, 作标准差计算、 t 检验等。以 $p > 0.05$ 为相差无显著性。

3 结果和分析

3.1 小鼠外周血红、白细胞变化

从图 1 可以看出, 全身照射对小鼠外周血中的白细胞数影响很大, 放射后 24 h, 白细胞数就下降了 90% 以上, 并且随着时间的推移, 白细胞数持续下降, 放射后 7 d, 白细胞数仅为正常小鼠白细胞数的 3% 左右 (见图 1) ($p < 0.05$)。

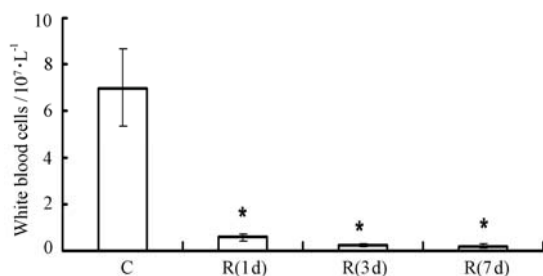


Fig.1 White blood cells count in irradiated mice sacrificed at 1, 3 and 7 d after whole body irradiation with absorbed dose of 6 Gy. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. ($n=5$, compared with the control group, * $p < 0.05$)

与白细胞相比, 小鼠的红细胞对射线耐受性比较高, 辐照后 24 h, 红细胞数下降了 30% 左右 ($p < 0.05$), 辐照后 7 d, 红细胞数也仅下降了 36% 左右 (见图 2)。

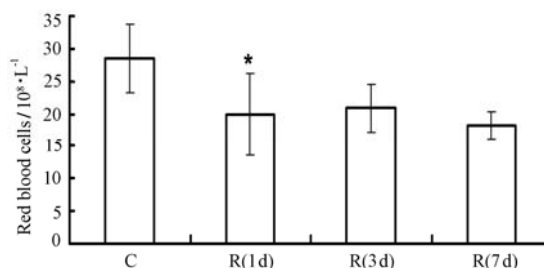


Fig.2 Red blood cells count in irradiated mice sacrificed at 1, 3 and 7 d after whole body irradiation with absorbed dose of 6 Gy. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. ($n=5$, compared with the control group, * $p < 0.05$)

3.2 胸腺和脾脏指数

作为造血系统的重要器官, X 射线会造成胸腺和脾脏损伤, 如图 3 和图 4 所示。照射后 24 h, 胸腺指数下降了 31%, 照射后 3 d, 胸腺指数下降了 70%, 照射后 7 d, 胸腺指数有所回升, 达到正常对照组的 48% (见图 3) ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。脾脏辐射损伤后, 脾脏指数在照射后 7 d 持续降低, 照射后 24 h, 脾脏指数下降了 44%, 照射后 7 d, 胸腺指数下降了 68% (见图 4) ($p < 0.01$)。

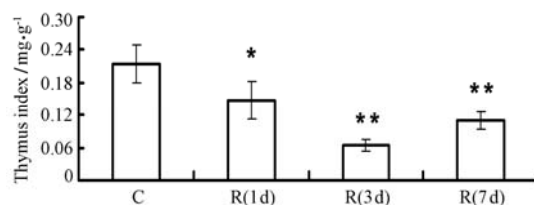


Fig.3 Thymus index in irradiated mice sacrificed at 1, 3 and 7 d after whole body irradiation with absorbed dose of 6 Gy. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. ($n=5$, compared with the control group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

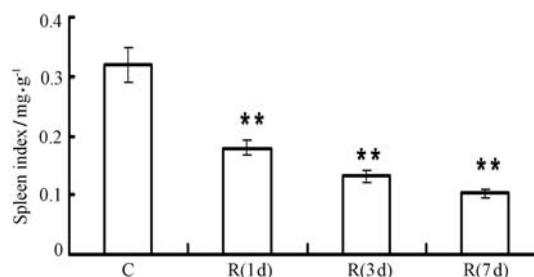


Fig.4 Spleen index in irradiated mice sacrificed at 1, 3 and 7 d after whole body irradiation with absorbed dose of 6 Gy. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. ($n=5$, compared with the control group, ** $p < 0.01$)

3.3 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

如图 5 所示, X 射线照射导致了小鼠骨髓红细胞微核率的显著上升, 照射后 24 h, 红细胞微核率是正常组的 4 倍以上, 而后微核率随时间缓慢下降, 但在照射后 7 d, 微核率仍为正常组的 3 倍以上 ($p<0.05, p<0.01$)。

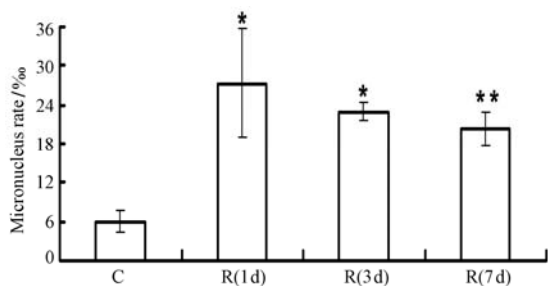


Fig.5 Micronucleus rate of polychromatic erythrocytes in bone marrow of irradiated mice sacrificed at 1, 3 and 7 d after whole body irradiation with absorbed dose of 6 Gy. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. ($n=5$, compared with the control group, * $p<0.05$, ** $p<0.01$)

3.4 肝脏抗氧化指标

从图 6 中可以看出, 小鼠的肝脏脂质过氧化水平在 X 射线全身照射后 24 h 显著升高, 随后随时间开始下降, 照射后 7 d 恢复至接近正常组水平。小鼠肝脏的 SOD 活力在照射后 3 d 内下降不明显, 但在照射后 7 d 显著下降, 为正常组的 73% 左右 (见图 7) ($p<0.05$)。

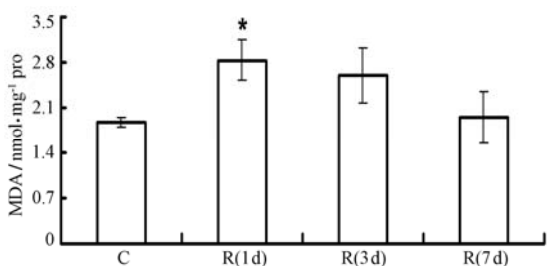


Fig.6 MDA in the liver of irradiated mice sacrificed at 1, 3 and 7 d after whole body irradiation with absorbed dose of 6 Gy. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. ($n=5$, compared with the control group, * $p<0.05$)

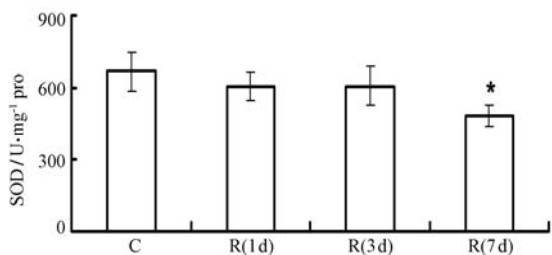


Fig.7 SOD activity in the liver of irradiated mice sacrificed at 1, 3 and 7 d after whole body irradiation with absorbed dose of 6 Gy. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. ($n=5$, compared with the control group, * $p<0.05$)

4 讨论

胸腺和脾脏是免疫系统的重要组成部分, 对辐射很敏感。辐射使脾脏指数和胸腺指数明显降低, 意味着免疫功能受损。骨髓细胞对辐射也很敏感, 辐射会导致其染色体畸变和红细胞微核率增加。本研究结果表明: 小鼠经 6 Gy X 射线照射后, 在 24 h 后就可产生显著的急性辐射损伤, 表现为外周血白细胞数量急剧降低, 胸腺指数和脾脏指数下降, 骨髓红细胞微核形成率增加, 照射后一周, 外周血白细胞数量、脾脏指数和胸腺指数随时间变化损伤程度持续增加, 但骨髓红细胞微核形成率略有降低, 这表明机体对急性辐射损伤有一定的自我修复能力 (见图 1—图 5)。

暴露于电离辐射会导致活性氧的产生, 活性氧中有超氧阴离子、羟基自由基、单态氧和氢过氧化物等。这些自由基会与细胞关键组分如 DNA、RNA、蛋白质和细胞膜等起反应, 导致细胞功能紊乱和死亡^[8,9]。MDA 含量可反映体内自由基反应的程度, 同时也间接反映细胞损伤的程度^[10]。超氧化物歧化酶 (SOD) 是一种十分重要的胞内酶, 它能催化体内不同来源的超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 生成氧气 (O_2) 和过氧化氢 (H_2O_2), 过氧化氢可在过氧化物酶 (CAT) 或过氧化氢酶的作用下进一步生成水 (H_2O) 和氧气, 有保护生化系统免受超氧阴离子自由基毒性的作用^[11]。SOD 活性的升高体现了机体的清除自由基速度加快。因此, SOD 活力大小可在一定程度上反映机体自由基清除系统的状况。本研究结果表明, 经 6 Gy X 射线照射的小鼠, 在 24 h 后肝脏脂质过氧化水平显著上升, SOD 活力下降。随后的一周内, 肝脏脂质过氧化水平缓慢回落, SOD 活力却持续下降, 表明随着时间的推移, 机体内自由基含量逐渐下降, 但机体内源的 SOD 可能因辐射而产生的损害不仅无法修复, 而日渐加剧; 也有可能是 SOD 被机体消耗而导致活力下降。

由此可见, 本研究建立了小鼠接受 6 Gy 全身照射后一周内急性损伤的模型, 为进一步深入研究影响辐射损伤的病理发展过程提供了实验依据, 下一步将使用该损伤模型来筛选新型放射防护剂。

参考文献

- 1 Takeshita K, Fujii K, Anzai K, et al. In vivo monitoring of hydroxyl radical generation caused by X-ray irradiation of rats using the spin trapping/EPR technique. *Free Radic Biol Med*, 2004, **36**(9): 1134-1143
- 2 邵春林, 齐藤真弘, 余增亮. DNA 双链断裂的组成与自由基清除效能的关系. *物理化学学报*, 2000, **16**(2):

- 184-187
SHAO Chunlin, Saito Masahiro¹, YU Zengliang. Relationship between the Constitutes of DNA double strand breaks and scavenging capacity. *Acta physico-Chimica Sinica*, 2000, **16**(2): 184-187
- 3 Barbisan L F, Scolastici C, Miyamoto M, *et al.* Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Genet Mol Res*, 2003, **2**(3): 295-308
- 4 Wells P G, Bhuller Y, Chen C S, *et al.* Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, **207**(2): S354-S366
- 5 钱李仁, 黄越承, 蔡建明. 几类自由基清除剂的抗辐射作用研究进展. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2009, **27**(6): 321-325
QIAN Liren, HUANG Yuecheng, CAI Jianming. The research progress of several kinds of free radical scavengers. *J Radiat Res Radiat Process*, 2009, **27**(6): 321-325
- 6 Sun J, Chen Y, Li M, *et al.* Role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance. *Free Radic Biol Med*, 1998, **24**(4): 586-593
- 7 Jagetia G C, Reddy T K. Modulation of radiation-induced alteration in the antioxidant status of mice by naringin. *Life Sci*, 2005, **77**(7): 780-794
- 8 Riley P A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*, 1994, **65**(1): 27-33
- 9 Weiss J F. Pharmacologic approaches to protection against radiation-induced lethality and other damage. *Environ Health Perspect*, 1997, **105**(6): 1473-1478
- 10 Chae H J, Chae S W, Kang J S, *et al.* Effect of ionizing radiation on the differentiation of ROS 17/2.8 osteoblasts through free radicals. *J Radiat Res (Tokyo)*, 1999, **40**(4): 323-335
- 11 McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969, **244**(22): 6049-6055

Observation of acute radiation damage on mice exposed to X-rays

HE Huocong¹ WU Junxin¹ SU Yin¹ PAN Jianru² ZHENG Guangjin² LIU Shutao²

¹(Fujian Provincial Tumor Hospital, Teaching Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350014, China)

²(Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

ABSTRACT Mice were whole-body exposed to X-rays with absorbed dose of 6 Gy and sacrificed on the 1st, 3rd and 7th day by cervical dislocation after irradiation, respectively. The number of red blood cells and white blood cells in peripheral blood, the index of thymus and spleen, the micronucleus rate of bone marrow polychromatic erythroblasts (PCE) and the level of antioxidant of liver were determined. It was observed that white blood cells decreased, the index of thymus and spleen also decreased meanwhile both of the micronucleus rate of bone marrow PCE and level of lipid peroxidation of liver increased at 24 h after irradiation. However, the index of thymus was up slightly on the 7th day after irradiation, while the PCE and the level of lipid peroxidation of liver got down slightly. The other index of injured mice increased continually with time.

KEYWORDS X-rays, Radiation damage, Mouse

CLC Q691.5, Q554+9, Q691.5, Q852.7