

超氧化物歧化酶与阿米福汀对小鼠 急性放射损伤预防作用的比较

潘剑茹¹ 郑光进¹ 何火聪² 吴君心² 苏颖² 刘树滔¹ 饶平凡¹

¹ (福州大学生物工程研究所 福州 350002)

² (福建医科大学教学医院福建省肿瘤医院 福建 350014)

摘要 本研究建立了小鼠全身放疗的损伤模型,以比较预给药超氧化物歧化酶(SOD)和阿米福汀对小鼠放射治疗损伤的防护效果。C57BL/6小鼠用6 Gy X射线进行全身一次性照射,在放射后24 h处死,测定小鼠外周血红、白细胞数量,胸腺指数和脾脏指数,以及肝脏抗氧化活力。结果表明:与放疗对照组相比,放疗前给药SOD组对放疗鼠的外周血白细胞数量和胸腺指数有显著的保护作用,使之分别增加66.7%和19.1%。测得放疗前给药阿米福汀对放疗鼠的外周血白细胞数量和脾脏指数有显著的保护作用,使之分别增加106.9%和22.6%。此外,与放疗对照组相比,放疗前给药SOD对放疗鼠的肝脏抗氧化能力也有显著提高,可使肝脏的MDA水平下降12.7%,SOD活力增加10.8%,T-AOC活力增加45.0%,放疗前给药阿米福汀可使放疗鼠肝脏的MDA水平下降22.3%。

关键词 超氧化物歧化酶,阿米福汀,辐射损伤,防护作用,小鼠

中图分类号 Q691.9, Q554+9, Q691.5, R852.7

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行之有效手段,约70%肿瘤病人需要放射治疗。但因放疗产生的活性氧自由基的原发反应与继发反应导致的辐射损伤副作用大,严重削弱了机体局部和整体的抵抗力,患者往往会因为这些副作用的发生而被迫中断放疗。

阿米福汀又名WR-2721,是人工合成的巯基类化合物,其脱磷酸后变成活性代谢产物WR-1065,其分子内的氢-硫键很容易断裂生成氢原子,可以清除自由基。与癌组织相比,阿米福汀在正常组织中蓄积更快更多。因此,阿米福汀能选择性地保护正常组织^[1,2]。1999年阿米福汀被批准用于头颈癌放疗,但会引起患者的口干,头晕、恶心、呕吐、等不良反应^[3]。

超氧化物歧化酶(Superoxidase dismutase, 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或过氧化

氢酶的作用下进一步生成水(H_2O)和氧气^[4]。哺乳动物细胞中有3种SOD,一种是存在于细胞质和细胞核中的Cu, Zn-SOD;一种是存在于线粒体中的Mn-SOD;还有一种是主要存在于细胞外的EC-SOD。SOD可以保护细胞使其在新陈代谢过程中免受活性氧(ROS)毒害,是药理学中重要的酶,具有预防所有涉及氧化损伤的潜能^[5-8]。早在70年代中期,人们就发现Cu, Zn-SOD具有防辐射作用^[9],此后,有研究发现注射Cu, Zn-SOD能减轻小鼠和猪因急性辐射造成的皮肤损伤^[10,11]。刘永彪等^[12]也研究发现,注射SOD,对荷瘤小鼠的正常组织具有辐射防护作用。

本实验建立了小鼠一次性全身放疗的损伤模型,比较阿米福汀和SOD对小鼠造血系统急性辐射损伤的防护效果,以期为两者在临床放射防护方面的应用提供参考数据。

1 实验材料和方法

雄性C57BL/6小鼠,上海斯莱克实验动物有限

福建省自然科学基金(2012J01132)项目、福州大学科技发展基金(2012-XQ-23)、国家自然科学基金(31071497)项目和福建省卫生教育联合攻关项目(WKJ2008-2-47)资助

第一作者:潘剑茹,女,1977年1月出生,2002年于福州大学获得硕士学位,副研究员,现为福州大学分析化学专业在职博士研究生

通讯作者:饶平凡, Email: pfrao@fzu.edu.cn

收稿日期:初稿 2011-11-15, 修回 2011-12-28

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 h 无异常。实验动物质量合格证号为 SCXK (沪)2007—0005, 动物实验条件合格证号为 SYXK (军)2007—031。阿米福汀购自湖南美罗银河生化制药有限公司, Cu, Zn-SOD (来源于猪血) 购自大田华灿生物科技有限公司。SOD 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒和总抗氧化能力 (T-AOC) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 蛋白含量测定试剂盒购自美国 Thermo 公司, 其余试剂均为分析纯或生化试剂, 所用水均为高纯水。

1.1 放射和分组

将试验用 C57BL/6 小鼠随机分为正常对照组 (C)、放疗对照组 (R)、放疗前连续 16 d 腹腔注射 0.5 mL 2 kU/mL SOD 组 (S) 和放疗前 0.5 h 腹腔注射阿米福汀组 (200 mg/kg 体重) (A), 其中 S 组给药剂量根据前期实验制定, A 组给药剂量根据参考文献[13]制定。每组 6 只, X 射线 6 MeV (IEC 61217) 全身一次性照射, 剂量率为 285 cGy/min, 6 Gy, 源皮距为 100 cm。照射后普通喂养, 在放疗后 24 h 处死。

1.2 小鼠外周血红、白细胞数量变化

放疗后 24 h, 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。

1.3 胸腺和脾脏指数

放疗后 24 h, 用颈椎脱臼法处置小鼠, 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。

1.4 肝脏抗氧化指标分析

放疗后 24 h 处置动物, 取肝脏以生理盐水制成 10% 匀浆, 采用 Micro-BCA 试剂盒测定蛋白含量, 用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定肝中 SOD 活力、MDA 水平和 T-AOC 活力。

1.5 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。

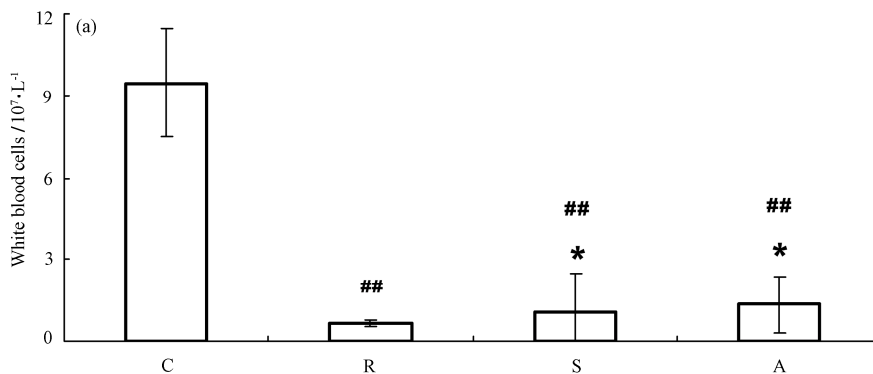
2 结果和分析

2.1 小鼠外周血红、白细胞数量变化

从图 1 中可以看出, 全身照射后的小鼠外周血中的白细胞数显著下降 ($p < 0.01$), 仅为正常小鼠 (C 组) 白细胞数的 4% 左右, 放疗前预先给药 SOD (S 组) 或阿米福汀 (A 组) 的小鼠与单纯放疗组 (R 组) 相比, 白细胞数都有显著提升 ($p < 0.05$), 阿米福汀的效果要强于 SOD (见图 1(a))。相比之下, 小鼠外周血中的红细胞数对放射不敏感, R 组的红细胞数仅比 C 组小鼠的红细胞数降低 17% 左右, 放疗前预先给药 SOD 或阿米福汀, 都能提高小鼠外周血红细胞数, 两者效果相当 (见图 1(b))。

2.2 胸腺和脾脏指数

从图 2 中可以看出, 作为造血系统的重要器官, 与 C 组相比, R 组小鼠的胸腺和脾脏经 X 射线放疗后受损严重 ($p < 0.01$), 放疗前给药 SOD 或阿米福汀都可使小鼠胸腺指数和脾脏指数有所上升。与 R 组相比, S 组小鼠的胸腺指数显著提高 ($p < 0.05$), A 组小鼠的胸腺指数虽也有提高但无显著差异, 两者对小鼠脾脏的保护效果却与此相反, A 组小鼠的脾脏指数显著提高 ($p < 0.05$), S 组小鼠的脾脏指数虽也有提高但无显著性差异。



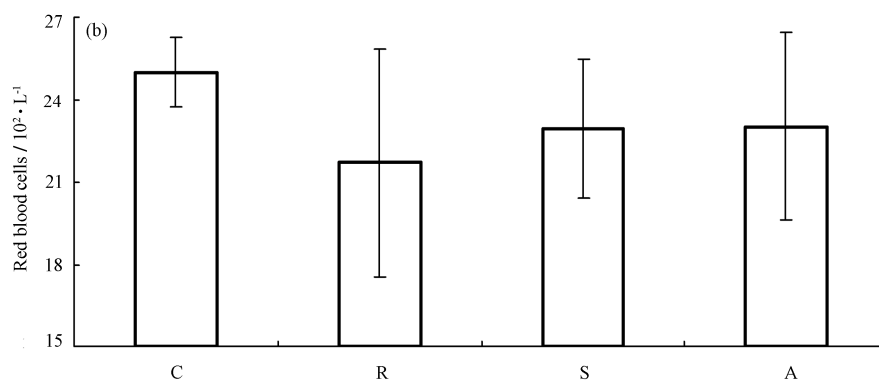


Fig.1 White blood cells and red blood cells count in irradiated mice sacrificed at 24h after whole body irradiation with absorbed dose of 6 Gy. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. ($n=6$, compared with control group, $^{##}p<0.01$, compared with solo radiation group, $^{*}p<0.05$)

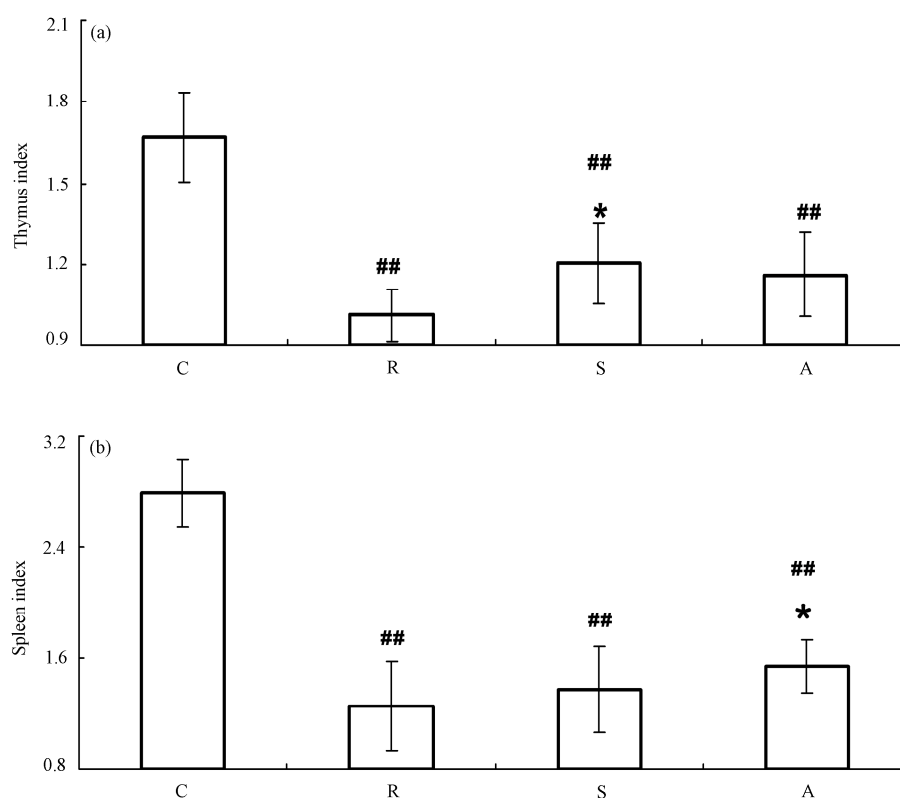


Fig.2 Thymus index and spleen index in irradiated mice sacrificed at 24h after whole body irradiation with absorbed dose of 6 Gy (a) Thymus index; (b) Spleen index. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. ($n=6$, compared with control group, $^{##}p<0.01$, compared with solo radiation group, $^{*}p<0.05$)

2.3 肝脏抗氧化指标

从图 3 中可以看出, 与 C 组相比, 经 X 射线全身照射过的小鼠的肝脏脂质过氧化水平显著上升 ($p<0.01$), SOD 活力显著下降 ($p<0.01$), T-AOC 活力也显著下降 ($p<0.01$)。与 R 组相比, 放疗前给药 SOD 或阿米福汀都能显著降低小鼠肝脏的

MDA 水平 ($p<0.05$), 其中阿米福汀的作用要强于 SOD (见图 3(a)); 预给药 SOD 可显著提高小鼠肝脏的 SOD 活力 ($p<0.05$), 预给药阿米福汀虽略能提高小鼠肝脏的 SOD 活力但无显著性 (见图 3(b)); 预给药 SOD 可显著提高小鼠肝脏的 T-AOC 活力 ($p<0.05$), 预给药阿米福汀则无效 (见图 3(c))。

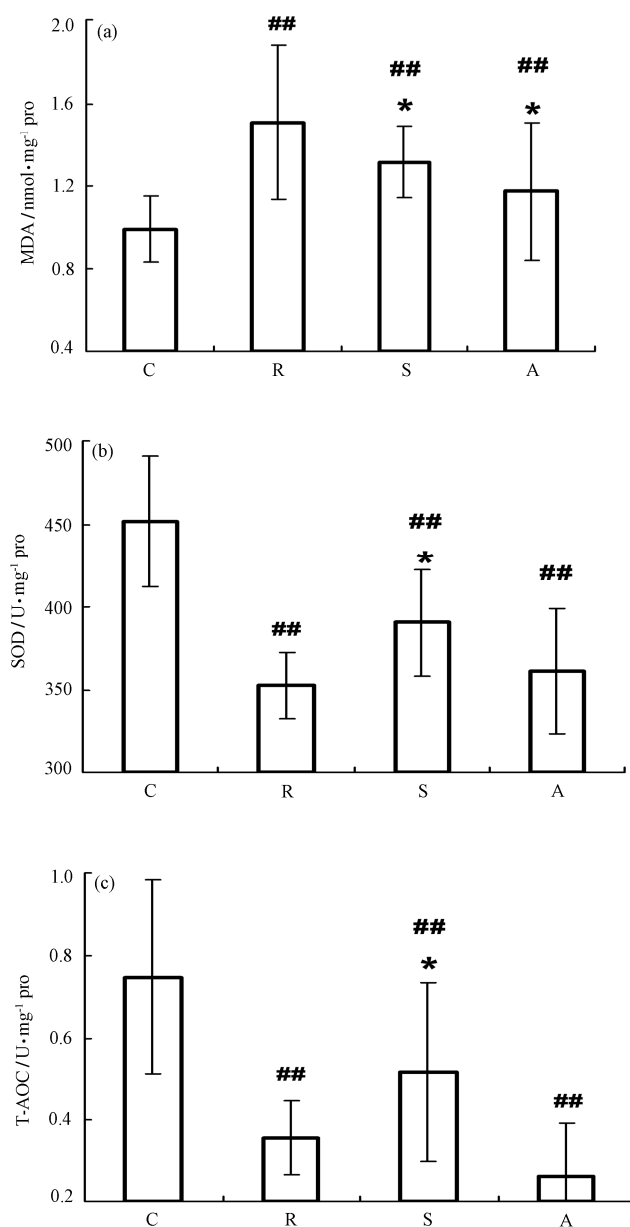


Fig.3 Antioxidant activity in the liver of irradiated mice sacrificed at 24 h after whole body irradiation with absorbed of 6 Gy. (a) MDA; (b) SOD activity (c) T-AOC activity. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. ($n=6$, compared with control group, ^{*} $p<0.05$, compared with solo radiation group, ^{##} $p<0.01$, compared with solo radiation group, ^{*} $p<0.05$)

3 讨论

本研究结果表明,小鼠经 6 Gy X 射线放疗后 24 h,其造血系统和肝脏就会产生急性造血系统损伤,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,肝脏 MDA 水平上升, SOD 活力降低和 T-AOC 活力降低。放疗前给药 SOD 或阿米福汀对小鼠急性造血系统和肝脏损伤都有保护作用,但互有短长。与放疗对照组相比,放疗前给药 SOD 可使放疗鼠的外周血白细胞数量增加 66.7% ($p<0.05$),红细胞数量增加 5.7% (无显著性),胸腺指数增加 19.1% ($p<0.05$),脾指数增加 9.5%

(无显著性)(见图 1 和图 2);放疗前给药阿米福汀可使放疗鼠的外周血白细胞数量增加 106.9% ($p<0.05$),红细胞数量增加 6.0% (无显著性),胸腺指数增加 15.0%(无显著性),脾指数增加 22.6% ($p<0.05$)(见图 1 和图 2)。此外,与放疗对照组相比,放疗前给药 SOD 可使放疗鼠肝脏的 MDA 水平下降 12.7% ($p<0.05$), SOD 活力增加 10.8% ($p<0.05$), T-AOC 活力增加 45.0% ($p<0.05$)(见图 3);放疗前给药阿米福汀可使放疗鼠肝脏的 MDA 水平下降 22.3% ($p<0.05$), SOD 活力增加 2.5% (无显著性),对 T-AOC 活力则没有保护作用(见图 3)。

放疗损伤是由自由基引起的,MDA 水平的高低间接反映了机体自由基水平的高低。阿米福汀和SOD都具有清除自由基的能力。阿米福汀通过脱磷酸后变成活性代谢产物WR-1065,WR-1065分子的氢-硫键断裂生成氢原子,清除自由基^[1]。SOD则是通过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),过氧化氢再由过氧化物酶或过氧化氢酶分解生成水(H_2O)和氧气^[5]。两者作用机制的差异导致了它们对辐射防护效果的差异。阿米福汀分子量小,容易进入细胞,可消除细胞内外自由基,SOD受其分子量限制,难以进入细胞,只能消除细胞间的自由基,无法对细胞内的自由基产生作用。因此,阿米福汀降低MDA水平的作用要强于SOD。SOD不仅是一种重要的抗氧化酶,其酶活力也是抗氧化系统的一个重要指标,预给药SOD可显著提高受照机体自身的SOD活力,阿米福汀则没什么效果。T-AOC活力代表体内酶性和非酶性抗氧化物的总体水平,直接反映机体抗氧化酶的活力。预给药SOD对受照机体抗氧化系统有显著的保护作用,阿米福汀不仅无效甚至还使之受损更严重。

相比而言,SOD对小鼠急性造血系统损伤的整体保护效果要强于阿米福汀,其作为一种酶,一种催化剂,其消除自由基的同时无需自我消耗,因此作用时间长,且其提取工艺简单,基本无毒性,但难以进入细胞,给药周期长,这使其应用效果受到制约。阿米福汀是目前临床使用最多的放疗防护剂,分子量小,容易进入细胞,但阿米福汀是通过自我消耗来消除自由基,作用时间短,必须在放疗前30 min内给药才有效果,且其为人工合成化合物,使用成本较高,而且具有较大的毒性。下一步本研究将对SOD的分子结构进行改造,使其能进入细胞,以观察其分子结构与辐射保护效应的相关性。

参考文献

- Joseph L J, Bhartiya U S, Raut Y S, *et al.* Radioprotective effect of ocimum sanctum and amifostine on the salivary gland of rats after therapeutic radioiodine exposure [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2011, **26**(6): 737-743
- Fu P, Murley J S, Grdina D J, *et al.* Induction of cellular antioxidant defense by amifostine improves ventilator-induced lung injury [J]. *Crit Care Med*, 2011, **39**(12): 2711-2721
- Rades D, Fehlauer F, Bajrovic A, *et al.* Serious adverse effects of amifostine during radiotherapy in head and neck cancer patients [J]. *Radiother Oncol*, 2004, **70**(3): 261-264
- Buettner G R. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011, **11**(4): 341-346
- Epperly M W, Gretton J E, Sikora C A, *et al.* Mitochondrial localization of superoxide dismutase is required for decreasing radiation cellular damage [J]. *Radiat Res*, 2003, **160**(5): 568-578
- Valko M, Rhodes C J, Moncol J, *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer [J]. *Chem Biol Interact*, 2006, **160**(1): 1-40
- Robbins M E, Zhao W. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review [J]. *Int J Radiat Biol*, 2004, **80**(4): 251-259
- Zhao W, Diz D I, Robbins M E. Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury [J]. *Br J Radiol*, 2007, **80**(1): 23-31
- Belikova N A, Glumac A, Rafikov R, *et al.* Radioprotection by short-term oxidative preconditioning: role of manganese superoxide dismutase [J]. *FEBS Lett*, 2009, **583** (21): 3437-3442
- Zhang X, Epperly M W, Kay M A, *et al.* Radioprotection in vitro and in vivo by minicircle plasmid carrying the human manganese superoxide dismutase transgene [J]. *Hum Gene Ther*, 2008, **19**(8): 820-826
- Veldwijk M R, Herskind C, Sellner L, *et al.* Normal-tissue radioprotection by overexpression of the copper-zinc and manganese superoxide dismutase genes [J]. *Strahlenther Onkol*, 2009, **185**(8): 517-523
- 刘永彪, 刘颖, 赵杰, 等. SOD对肿瘤细胞凋亡影响和抗氧化损伤的研究: IV. SOD对荷瘤小鼠正常组织氧化损伤的保护效应[J]. *辐射研究与辐射艺学报*, 2004, **22**(5): 297-302
- LIU Yongbiao, LIU Ying, ZHAO Jie, *et al.* The studies of effect on tumor cell apoptosis of SOD and its anti-oxidation effect IV. The protection effects of SOD on oxidized damage of normal tissue with tumor-bearing mice with SOD [J]. *J Radiat Res Radiat Process*, 2004, **22**(5): 297-302
- Donkor I O, Zhou X, Schmidt J, *et al.* Synthesis and radioprotective effects of adamantyl substituted 1, 4-dihydropyridine derivatives [J]. *Bioorg Med Chem*, 1998, **6**(5): 563-568

Investigating preventive effects of superoxide dismutase and amifostine on acute radiation injury of mice

PAN Jianru¹ ZHENG Guangjin¹ HE Huocong²
WU Junxin² SU Ying² LIU Shutao¹ RAO Pingfan¹

¹ (Institute of Biotechnology Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

² (Fujian Provincial Cancer Hospital Teaching Hospital of Fujian Medical University, Fujian 350014, China)

ABSTRACT The radiation injury models of mice were established and the preventive effects of superoxide dismutase (SOD) compared with amifostine from radiation damage were investigated. C57BL/6 mice were whole-body irradiated with 6 Gy X-rays and sacrificed by cervical dislocation at 24 h after irradiation. The red blood cells and white blood cells counts in peripheral blood, thymus index, spleen index, and hepatic antioxidant activity were determined, respectively. The results show that compared with the group received irradiation only, SOD pretreatment has significant effect on white blood cells counts meanwhile thymus index is significantly elevated by 19.1%. Amifostine pretreatment has also significant effect on white blood cells counts and spleen index is significantly elevated by 22.6%. In addition, SOD pretreatment can significant protect hepatic antioxidant activity and decrease malondialdehyde (MDA) level by 12.7% in irradiated while the total anti-oxidizing capability (T-AOC) is up by 45.0%. However, amifostine treatment could only remarkably decreased MDA level by 22.3%.

KEYWORDS Superoxidase dismutase, Amifostine, Radiation injury, Radio-protective effect, Mouse

CLC Q691.9, Q554+9, Q691.5, R852.7