

新型抗氧化肽 SS31 体外辐射防护作用 及其机制的初步研究

邹佳¹ 杨伟志² 王清清¹ 付洁¹
董立厚¹ 向慎思¹ 高新¹ 孙云娟¹ 宋海峰¹

¹ (军事医学科学院放射与辐射医学研究所药理毒理研究室 北京 100850)

² (同济大学附属上海第十人民医院骨科 上海 200072)

摘要 为探讨新型抗氧化剂 SS31 在体外对细胞的辐射防护作用和初步机制,用 ^{60}Co γ 射线照射细胞,用不同浓度的 SS31 对细胞进行干预,观察照射后细胞的增殖、生存状态、细胞内 ROS 水平和线粒体膜电位的改变,并将药物干预组和阴性对照组进行比较。结果发现:7.5 Gy 的 γ 射线照射后 24–72 h,细胞增殖活性显著降低;48 h 内细胞凋亡和坏死比率显著增加,并伴随胞内 ROS 增长、线粒体膜电位下降和细胞周期阻滞。SS31 能明显改善这些反应,药物干预组与阴性对照相比有统计学差异。通过本实验,观察到了 SS31 具有明显的体外辐射防护作用,提示其有潜力作为一种新型的辐射防护剂。

关键词 SS31, 抗氧化, 辐射防护

中图分类号 Q691, R961

水的辐解产生的活性氧自由基(主要为 $\cdot\text{OH}$, O_2 和 H_2O_2)是辐射生物效应产生的主要原因,其对细胞内核酸、蛋白质等生物大分子都有很强的氧化损伤作用^[1]。近年来抗氧化剂在辐射防护中的应用逐渐受到重视,金属络合物^[2]、多糖^[3,4]、酚类^[5]、维生素^[6]和超氧化物歧化酶(SOD)^[7]等活性氧清除剂都被证明有辐射防护效应。但它们大多有分子量大,透膜性差等特点。而目前唯一被批准上市的辐射防护药物 WR-2721 因为较高的毒性而又被限制了应用^[8]。

SS31 是一种具有靶向线粒体保护作用的新型肽类化合物,由碱性氨基酸和芳香氨基酸相互交替组成(H-D-Arg-Dmt-Lys-phe-NH₂)。之前的体内外研究表明,SS31 具有毒性小、活性高、易透过细胞膜等特点,尤其是 SS31 能靶向定位于线粒体内膜,有效清除线粒体的活性氧(ROS),从而达到保护线粒体,进而保护细胞的作用^[9,10]。在多种缺血-再灌注疾病,如心肌梗塞、脑卒中、单侧输尿管梗阻以及器官移植等动物模型中,SS31 均显示出很好的器官保护药效^[11–14]。但 SS31 是否对辐射损伤有保护

作用,其作用机理究竟为何,迄今仍未见相关报道。本研究在体外对 SS31 的抗辐射活性进行了研究,并初步探讨了其抗辐射的作用机理。

1 实验材料与方法

1.1 材料与仪器

中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞株由本实验室保存。细胞增殖试剂盒(3-4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, MTS)购自 Promega 公司; 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)、氢化乙锭(adihydroethidium, HE)和碘化丙啶(Propidium iodide, PI)购自 Sigma-Aldrich。Annexin-V/PI 试剂盒购自南京凯基公司; 罗丹明 123 (Rhodamine 123, RH123) 购自同仁化学公司; 流式细胞仪购自 BD Bioscience。

1.2 实验方法

1.2.1 SS31 处理细胞 CHO 细胞培养于含 10%胎

“十一五”国家科技重大专项“重大新药创制”项目(2009ZXJ09001-028)资助

第一作者: 邹佳, 女, 1980 年 6 月出生, 2011 年 6 月于军事医学科学院放射与辐射医学研究所获药理学博士学位, 从事新药药效研究, 助理研究员; 共同第一作者: 杨伟志, 男, 1973 年 5 月出生, 2008 年于第二军医大学骨科获医学博士学位, 主治医师

通讯作者: 宋海峰, Email: songhf@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 初稿 2012-04-16, 修回 2012-07-20

牛血清的 RPMI1640 培养基中, 培养二三代后消化细胞, 将细胞分别悬浮于 SS31 浓度为 100 nmol/L、200 nmol/L 和 500 nmol/L, 胎牛血清含量为 2% 的 1640 中, 与阴性(不含 SS31 的 1640)对照和正常对照比较, 进行细胞增殖活性检测; 另用 SS31 浓度为 500 nmol/L 的 1640 悬浮细胞, 与阴性(不含 SS31 的 1640)对照和正常对照比较, 检测细胞凋亡、胞内 ROS、线粒体膜电位和细胞周期改变。细胞增殖活性按公式: 增值活性 (%) = (1 - (各组实测 OD - 空白对照 OD) / 空白对照 OD) × 100%, 计算。

1.2.2 细胞照射与照射后培养 细胞接受 ^{60}Co γ 射线一次性照射, 剂量率 213 cGy/min。照射后按 6×10^4 /孔接种于 96 孔或 6 孔版中, 继续于 37℃, 5% 培养箱中孵育 4 h, 待细胞贴壁后更换完全培养基。

1.2.3 细胞增殖活性检测 采用 MTS 法检测。细胞经 7.5 Gy ^{60}Co γ 射线照射后接种于 96 孔板, 照射后 48 h 按 1:5 体积比于培养上清中加入 MTS 并继续培养 3.5 h, 分光光度计于 492 nm 检测各孔 OD 值。每一浓度做 4 个平行孔并做空白对照。

1.2.4 细胞凋亡检测 照射后 24、48、72 h 收集悬浮和贴壁的细胞, PBS 清洗 2 次后, 调整细胞密度为 2×10^6 /mL。按试剂盒说明加入结合缓冲液 500 μL , 随后加入 Annexin V-FITC 和 PI 混匀, 于避光处孵育 15 min, 立即上机检测, 收集细胞 200 个, 激发波长为 488 nm, 其中 FITC 发绿色荧光, PI 发红色荧光, 发射波长为 530 nm。

1.2.5 细胞内 ROS 检测 细胞内的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 用 DHE 检测, 50 mmol/L 染料保存于 -20℃, 使用时用 PBS 稀释为终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$; 细胞内的 H_2O_2 用 DCFH-DA 检测, 5 mg DCFH-DA 溶解于 2 mL 无水乙醇中保存于 -20℃, 使用时用 PBS 稀释 50 倍; 细胞标记和染色方法同凋亡检测。

1.2.6 线粒体膜电位检测 0.4 mg Rh123 探针溶解于 1 mL DMSO 中保存于 -20℃, 使用时稀释 20 倍; 细胞标记和染色方法同凋亡检测。

1.2.7 细胞周期检测 细胞 70% 乙醇固定过夜后离心去上清, 加入 0.01% RNaseA 100 μL , 37℃ 水浴 30 min, PBS 洗涤一次后加入 PI 50 mg/mL 于 4℃ 避光孵育 30 min, 其余方法同凋亡检测。

1.3 数据处理

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据间比较显著性差异采用 t 检验。

2 实验结果

2.1 SS31 对照射后细胞增殖活性的影响

照射后 24–72 h, 细胞增殖活性变化见图 1。可见在观察时间窗内, 受照射的各组细胞增殖活性均受到不同程度损害, 以阴性对照(损伤未给药)为甚, 在 72 h 内细胞增殖活性为 52.8%–60.8%; 而 100–500 nmol/L 的浓度范围下, SS31 能有效提高细胞的增殖活性, 并呈现出一定的剂量-效应关系。在 500 nmol/L 浓度时, 细胞增殖活性可达到阳性对照的 84.3%–94.2%。

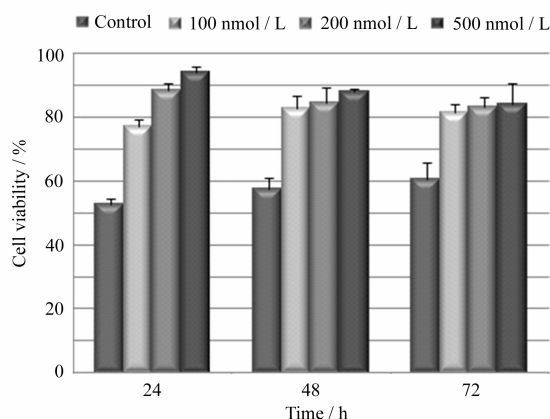


Fig.1 Viability of irradiated (IR) cells intervened by SS31 (n=4)

2.2 SS31 对照射细胞内 ROS 水平的影响

照射后细胞内 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的浓度与荧光强度成正比, 照后 48 h 内, 胞内两种 ROS 的荧光强度如表 1 和表 2 所示。结果可见辐照后 4 h, 阴性对照 (IR) 组细胞两种荧光强度均迅速上升, 并随时间推移而累积; SS31 给药组的荧光强度则显著下降, 与 IR 组有统计意义差别 ($p < 0.05$), 证明 SS31 对两种主要 ROS 均有很好的抑制作用 ($n=3$)。

Table 1 Levels of $\text{O}_2^{\cdot-}$ in cells after irradiation

(DHE as fluorescent probe, $n=3$)

Time after IR / h	Normal	IR	IR+SS31
0	102±10	114±6	97±3*
4	99±3*	109±5	106±4
24	103±4**	141±15	114±13*
48	109±6***	187±27	132±30*

Note: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. IR group.

Table 2 Levels of H ₂ O ₂ in cells after irradiation (DCFH-DA as fluorescent probe, n=3)			
Time after IR/h	Normal	IR	IR+SS31
0	104±2	118±23	98±19
4	112±10*	152±30	119±6*
24	104±3**	159±41	116±14*
48	106±6***	204±49	144±32*

Note: *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. IR group.

2.3 SS31 对照射后细胞生存状态的影响

照射后 24–48 h, 流式细胞术检测的细胞生存状态见图 2。γ 射线能使凋亡和坏死细胞比例显著增

长, 而 SS31 可有效抑制细胞的死亡。在照射后 24 h, 药效表现以抑制细胞凋亡为主; 而照射后 48 h, 药效以抑制细胞坏死为主 ($n=3$)。

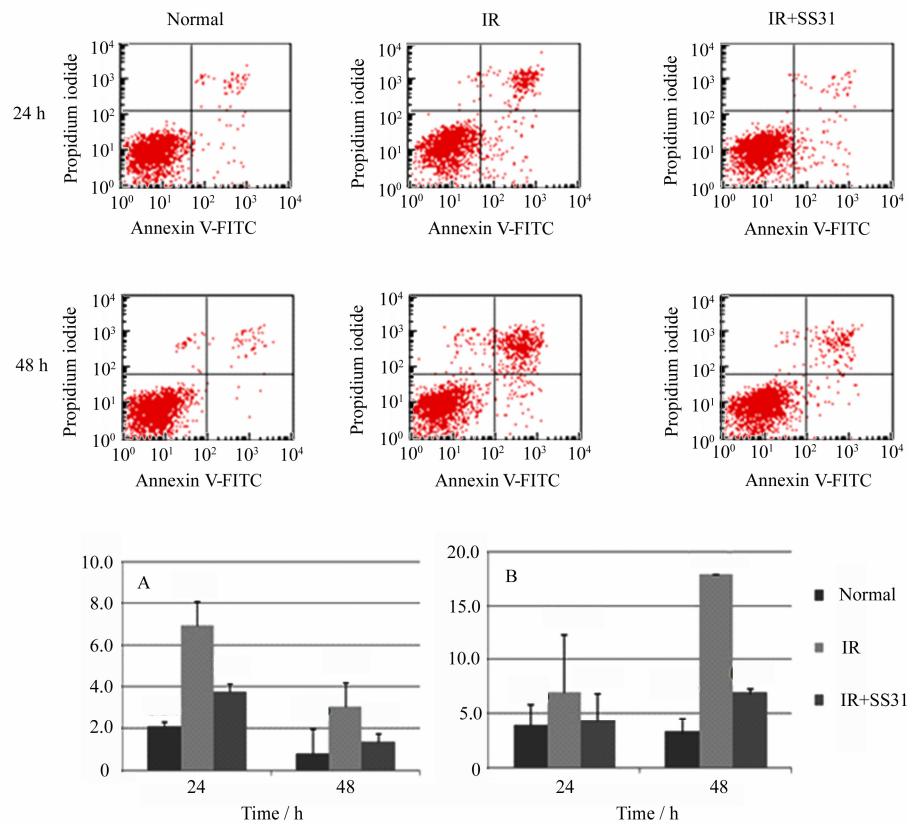


Fig.2 Radiation-induced apoptotic cells are inhibited by SS31($n=3$): A: Annexin V+, PI- cells; B: Annexin V+, PI+ cells

2.4 SS31 对照射后细胞线粒体功能的影响

将线粒体膜电位($\Delta\psi$) 作为线粒体膜稳定性和活性的指标, 用罗丹明 123 (Rhodamine 123, Rh123) 荧光探针进行标记, 并用流式细胞术进行测量。当

线粒体膜去极化, 导致线粒体功能障碍时, $\Delta\psi$ 会显著下降甚至崩解, 从而引起荧光强度减弱; 而 SS31 给药组, 线粒体膜电位崩解程度显著减轻, 如表 3 所示 ($n=3$)。

Table 3 Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) after irradiation($n=3$)			
Time after IR / h	Normal	IR	IR+SS31
4	339±43	297±87	329±59
24	354±22**	210±24	304±46*
48	533±99***	328±39	486±87**

Note: *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. IR group.

2.5 SS31 对照射后细胞周期的影响

用 PI 作为探针,通过细胞内 DNA 含量的测定,来检测 SS31 对辐照后细胞周期的干预。结果表明,

辐照后 48 h 内,细胞 S 期和 G2/M 期阻滞显著增加, G1 期细胞含量减少,而 SS31 可有效干预此种周期变化,其检测到的图形与正常组更为相近(图 3)

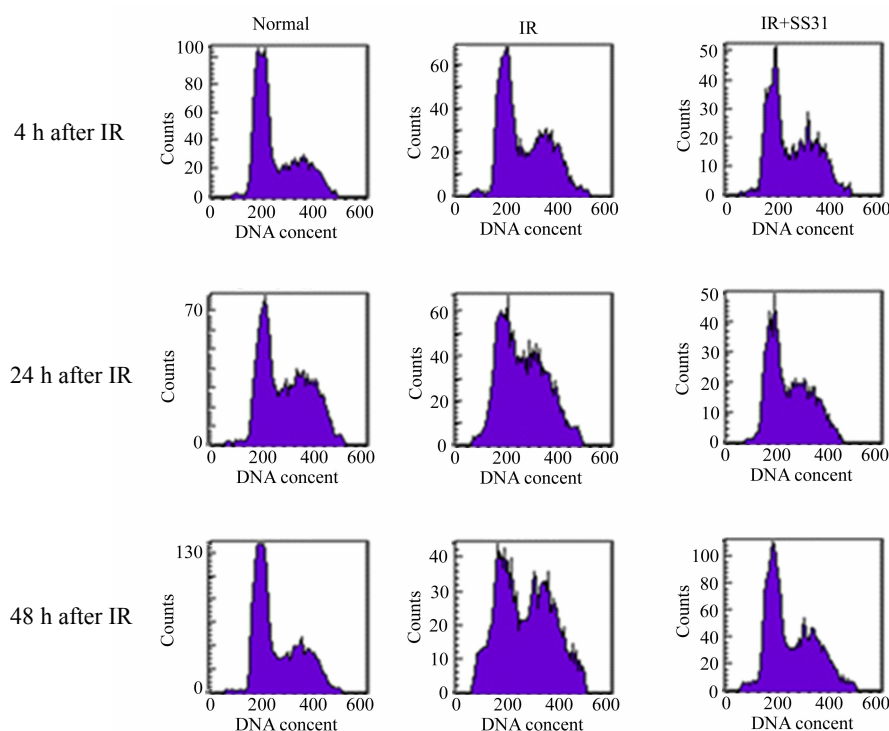


Fig.3 SS31 interfered with cell cycle post irradiation

3 讨论

作为一种新型肽类化合物,之前的研究已经表明 SS31 可轻易透过细胞膜,并靶向定位于线粒体内膜 (Inner mitochondrial membrane, IMM) 上;在与线粒体孵育 2 min 后,线粒体内 SS31 的浓度即可达到线粒体外的 1000–5000 倍,并且这种通透性不依赖于线粒体膜电位^[15]。此外,SS31 还具有活性高,毒性小,稳定性佳的特点。初步的药代动力学结果表明,SS31 在常温水溶液中可稳定保存 6 个月,通过静脉、皮下、腹腔和鞘内注射等多种方式对动物给药都不影响其药效^[16-18]。

由于线粒体是辐射间接损伤的主要靶点,我们初步推测 SS31 很可能借由对线粒体的保护细胞的辐射损伤;结合其低毒性和高活性等特征,则提示 SS31 有很大潜力成为一种新型的抗辐射药物。据此,本研究分别从细胞增殖活性、生存状态、胞内 ROS 水平、线粒体功能和细胞周期几方面,初步观察了 SS31 对辐照细胞的干预。

研究结果表明,在 7.5 Gy 的 γ 射线照射下,SS31 在 100–500 nmol/L 浓度范围内对细胞都有明显的保护作用。药效之一表现为显著提升细胞的增殖能力,

尤其当药物浓度在 200 nmol/L 以上时,对细胞的保护效果明显。SS31 的抗辐射药效,主要源于它对细胞内 ROS 的清除和对线粒体的保护能力,以及对后续细胞死亡途径的干预。 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 为辐射产生 ROS 的主要产物,它们虽然氧化能力较弱,却能通过 Fenton 反应生成活性极高的羟自由基($OH^{\cdot}$),对细胞造成损害^[19]。本研究中,使用了 DHE 和 DCFH-DA 两种荧光探针,分别对细胞内常见的两种 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 进行标记。其中 DHE 被细胞内 $O_2^{\cdot-}$ 氧化为发绿色荧光的 EB, DCFH-DA 被 H_2O_2 氧化为发红色荧光的 DCF^[20];检测两种荧光含量,即可判断出细胞内 ROS 产生的水平。结果发现,SS31 在照射后 4–48 h 有效降低胞内 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的水平,并有效阻止了线粒体膜电位的崩解。

细胞接受照射后,为有足够的时间修复损伤,往往会进入某个周期阻滞。而一部分抗氧化剂对细胞的保护作用可以体现在对细胞周期的改变上^[21]。之前文献报道, N_2O 衍生物类抗氧化剂改变照射后细胞的周期调控,调节 DNA 修复。其主要表现为增加 G2/M 期细胞周期的比例,使细胞产生 G2/M 期的阻滞^[22]。抗氧化剂此种调节能力原因不明,但推测此类阻滞可以为细胞 DNA 的修复赢取时间。

因此, 本试验检测了 SS31 对细胞周期的干预, 研究发现辐照后的 CHO 细胞出现了显著的 S 期和 G2/M 期阻滞, 尤其在照射后 48 h 为甚。与之相比, 经过 SS31 孵育的细胞却很少出现阻滞, 流式细胞术获得的图形与正常组的更为接近, 这与 N₂O 类药物特点有很大不同。不同抗氧化剂对不同细胞周期阻滞干预的特点、其中干预的通路和原理目前还有待进一步研究证实, 但有一点可以肯定, 即本实验中 SS31 可直接减少辐射对细胞的损伤, 从而减少进入周期阻滞的细胞比率。

综上所述, 本实验证明抗氧化肽 SS31 确实有潜力成为一种新型的抗辐射药物, 其作用机制与强大的 ROS 清除能力和线粒体保护相关, 本研究所获得的结果为阐明 SS31 的成药性, 以及将 SS31 推入临床前研究打下良好基础。研究中发现的一些现象或结果仍有待开展深入探索, 包括分子水平的 SS31 线粒体趋靶作用机制、辐照后细胞早期时相性变化以及 ROS 以外其它氧化反应(如 N 自由基和脂质过氧化)机制等, 为更全面地揭示 SS31 肽对辐射损伤防护作用机制奠定基础。

参考文献:

- 1 吴德昌. 放射医学(第一版). 北京: 军事医学科学出版社, 2001
- 2 WU Dechang. Radiation medicine(1st edition). Beijing: Military Medical Science Press, 2001
- 3 Sato M, Bermner I. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radiacal Bio Med*, 1993, **14**(3): 325-337
- 4 Choedhury M N, Alam A K, Dafader N C, *et al.* Radiation processed hydrogel of poly (vinyl alcohol) with biodegradable polysaccharides. *Biomed Mater Eng*, 2006, **16**(3): 223-228
- 5 Lang X, Li M, Jia B, *et al.* Experimental research of the effect of polysaccharides in semen Ziziphis Spinose and Ziziphis Spinosae on enhancing the immune function of mice injured by radiation [Article in Chinese]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 1991, **16**(6): 366-368
- 6 Muller W, Streffer C, Zamboglou N. Effects of a combined treatment with X-rays and phenols on preimplantation mouse embryos in vitro. *Radiat Environ Biophys*, 1981, **19**(4): 247-258
- 7 CAI L, Koropatnick J, Cherian M G. Roles of vitamin C in radiation-induced DNA damage in presence and absence of copper. *Chem Biol Interact*, 2001, **137**(1): 75-88
- 8 Perkau A. Role of superoxide dismutase in modification of radiation injury. *Br J Cancer Suppl*, 1987, **8**: 87-95
- 9 Valeyrie A L, Poulalhon N, Fagot J P, *et al.* Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis induced by amifostine during head and neck radiotherapy. *Radiother Oncol*, 2008, **87**(2): 300-303
- 10 Hazel H S. Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants. *AAPS J*, 2006, **8**(2): E227- E283
- 11 Szeto H H. Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury. *Antioxid Redox Signal*, 2008, **10**(3): 601-619
- 12 Sung H C, Hazel H S, Eunhee K, *et al.* A novel cell-permeable antioxidant peptide, SS31, attenuates ischemic brain injury by down-regulation CD36. *J Bio Chem*, 2007, **282**(7): 4634-4642
- 13 Yasunori M, Jie C, Surya V S, *et al.* A novel cell-permeable antioxidant peptide decreases renal tubular apoptosis and damage in unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, **295**(5): F1545-1553
- 14 Carter E A, Bonab A A, Goverman J, *et al.* Evaluation of the antioxidant peptide SS31 for treatment of burn-induced insulin resistance. *Int J Mol Med*, 2011, **28**(4): 589-594
- 15 Calkins M J, Manczak M, Mao P, *et al.* Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 2011, **20**(23): 4515-4529
- 16 Zhao K, Zhao G M, Wu D, *et al.* Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death and reperfusion injury. *J Biol Chem*, 2004, **279**(33): 34682-90
- 17 Sung H C, Hazel H S, Eunhee K, *et al.* A novel cell-permeable antioxidant peptide, SS31, attenuates ischemic brain injury by down-regulation CD36. *J Bio Chem*, 2007, **282**(7): 4634-4642
- 18 Petri S, Kiaei M, Damiano M, *et al.* Cell-permeable peptide antioxidant as a novel therapeutic approach in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 2006, **98**(4): 1141-1148
- 19 Song W, Shin J, Lee J, *et al.* A potent opiate agonist protects against myocardial stunning during myocardial ischemia and reperfusion in rats. *Coron Artery Dis*, 2005, **16**(6): 407-410
- 20 Hazel H S. Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury. *Antioxid Redox Signal*, 2008, **10**(3): 601-619
- 21 朱茂祥, 杨陟华, 龚诒芬, 等. 辐射诱发细胞内活性氧

- 增高与DNA氧化损伤研究. 辐射研究与辐射工艺学报, 2001, **19**(4): 270-274
- ZHU Maoxiang, YANG Zhihua, CONG Yifen, *et al.* Studies on increase of intracellular reactive oxygen species and oxidative DNA damage in ^{60}Co γ -ray irradiated BEF2D cells. J Radiat Res Radiat Process, 2001, **19**(4): 270-274
- 21 Rothstein E C, Lucchesi P A. Redox control of the cell cycle: A radical encounter. Antioxid Redox Signal, 2005, **7**(5-6): 701-703
- 22 Cakir Y, Ballinger S W. Reactive species-mediated regulation of cell signaling and the cell cycle: The role of MAPK. Antioxid Redox Signal, 2005, **7**(5-6): 726-740

An *in vitro* preliminary study of the radio-protective properties of antioxidant peptide SS31

ZOU Jia¹ YANG Weizhi² WANG Qingqing¹ FU Jie¹

DONG Lihou¹ XIANG Shensi¹ GAO Xin¹ SUN Yunjuan¹ SONG Haifeng¹

¹(Department of Pharmacology and Toxicology, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

²(Department of Orthopedics, Shanghai Tenth People's hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China)

ABSTRACT In order to research the radio-protective properties of a new antioxidant peptide, SS31 *in vitro*, cells were irradiated by ^{60}Co γ -rays and incubated with SS31 in different concentration. Cell viability, mitochondrial membrane potential, cell living rate and ROS generation were investigated and compared with that of control group. After irradiation with 7.5 Gy γ -rays, SS31 could reduce the cell injury significantly while cell viability decreased and apoptotic rate increased definitely, with higher ROS generation, mitochondrial membrane potential collapsing and cell cycle arrest if without intervention by use of SS31. Compared with the control group, SS31 intervention group showed statistical difference. This study has been revealed that SS31 has potency to reduce acute radiation injury and thereby act as a new radio-protective agent.

KEYWORDS SS31, Antioxidants, Radiation protection

CLC Q691, R961