

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

刘永彪^{1,2} 刘颖² 赵杰² 郝兴芝² 王绪² 姚思德¹

¹ (中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

² (徐州医学院肿瘤研究所 徐州 221002)

摘要 探讨超氧化物歧化酶(SOD)对电离辐射和肿瘤化疗药物对荷瘤机体正常组织损伤的保护效应及机制,测定荷瘤鼠肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肺、脑和骨髓组织的活性氧(ROS)、氧化产物丙二醛(MDA)水平和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)活性,并观察SOD对荷瘤小鼠肝脏超微结构的影响。结果表明,荷瘤小鼠受照射和化疗药物后其骨髓、肝脏、肾脏、脾脏、组织匀浆中ROS、MDA含量明显升高,而GSH-Px和CAT活性明显降低,其机制是电离辐射和化疗药物造成抗氧化酶的损伤及机体内ROS含量上升。加入SOD与对照组相比,显著降低荷瘤小鼠骨髓、肝脏、脾脏组织匀浆中ROS、MDA含量,略微升高GSH-Px和CAT活性,而对肾脏组织匀浆中ROS、MDA含量和GSH-Px和CAT活性无明显影响,同时SOD可明显减轻电离辐射对荷瘤小鼠肝细胞超微结构破坏,SOD通过直接清除自由基和保护抗氧化酶的损伤起辐射保护作用。

关键词 超氧化物歧化酶, 电离辐射, 抗肿瘤药物, 荷瘤小鼠, 活性氧, 丙二醛, 胱甘肽过氧化物酶, 过氧化氢酶

中图分类号 R811.5

抗肿瘤药物在诱导肿瘤细胞凋亡同时,也可导致机体正常组织的损伤,尤其细胞增殖速率较高或药物代谢主要途径的组织(骨髓、胃肠上皮、肾脏、肝脏等),这些毒副作用限制了抗肿瘤药物用药剂量或在获得疗效之前不得不中断治疗,将大大影响患者的疗效。机体的电离辐射损伤主要起因于水辐解产生的大量初级自由基,尤其是羟基自由基直接攻击细胞核内的DNA及细胞膜,造成DNA单链断裂和双链断裂等损伤,引发不饱和脂肪酸脂质过氧化而使细胞膜损伤、各种亚细胞结构破坏、酶活性降低或消失^[1]。超氧化物歧化酶(SOD)是机体中最重要的抗氧化酶,在清除 O_2^- 中起关键作用。因此,在电离辐射防护效应的研究中一直受到重视。抗肿瘤药物可通过刺激肿瘤细胞产生高浓度活性氧(ROS)来诱导细胞凋亡,这种作用对正常组织的损伤有时更甚。探讨了外源性抗氧化剂SOD对肿瘤化疗药物和电离辐射治疗肿瘤影响的基础上,初步揭示了SOD对正常组织的某些保护作用。本实验以荷瘤小鼠为实验对象,通过测定荷瘤小鼠肝脏、肾脏、脾脏和骨髓细胞ROS水平变化,进一步探讨了抗肿瘤药物顺铂、阿霉素(DDP、ADM)和电离辐射对这些正常器官毒副作用与ROS产生的关系,并

就外源性SOD对正常组织抗辐射损伤的分子生物学机理进行了研究。

1 材料和方法

1.1 肿瘤动物模型的建立

实验动物为健康BALB/c小鼠18只,6—8周龄,体重 (20 ± 2) g,由上海实验动物中心提供。种鼠为U14宫颈癌腹水型,由上海医药工业研究院实验动物中心提供。小鼠皮下接种肿瘤细胞后10—14d肿瘤约1cm大小时间开始进行分组实验。

1.2 动物分组

将已经形成实体瘤的荷瘤小鼠随机分为3组。

(1)对照组:不给予任何治疗;(2)单纯化疗药物组:单次腹腔注射DDP或ADM;(3)化疗药物+SOD组:单次腹腔注射DDP或ADM,次日开始腹腔注射SOD,连续应用5d,同时单纯药物化疗组腹腔注射等量生理盐水,每组动物为6只。SOD给药在用化疗药物DDP或ADM 24h后腹腔注射,剂量为 $250U \cdot mg^{-1} \cdot d^{-1}$,连续5d,用前用生理盐水稀释至 $1 \times 10^7 U/L$ 。将荷瘤小鼠随机分为3组。(1)对照组;

江苏省教委自然科学基金(98KJD320014)部分资助

第一作者:刘永彪,男,1963年8月出生,1999年在苏州大学获硕士学位,副教授,副主任医师,放射医学肿瘤学专业,现为中国科学院上海应用物理研究所读博士

收稿日期:初稿 2003-10-13,修回 2003-12-23

(2) 单纯照射组:采用直线加速器 X 线全身照射,并给予等量生理盐水;(3) 照射给药组:在每次照射前 2h 腹腔注射 SOD。

1.3 给药方法及照射条件

1.3.1 抗肿瘤药物用药剂量 DDP= 2.5mg kg^{-1} 1.88·鼠重 (kg), 阿霉素 (ADM) = 1.25mg kg^{-1} 1.88·鼠重 (kg)。均腹腔注射给药, 医用直线加速器 (Siemens, USA), 6MV X 线对小鼠进行全身照射, 源皮距 100cm, 剂量率 1Gy/min, 剂量分割 5Gy/1Gy/5d (每天照射一次, 每次 1Gy, 连续 5d)。

1.4 化学比色法测定荷瘤鼠肝脏、脾脏、肾脏、心脏和骨髓组织的 ROS、MDA 水平和 GSH-Px、CAT 活性

1.4.1 动物处理 荷瘤小鼠治疗结束后次日, 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 立即取出其肝脏、脾脏、肾脏、心脏, 置于预先配制预冷的匀浆介质中, 同时取其股骨, 用匀浆介质冲洗收集骨髓细胞。取骨髓细胞悬液, 离心 10min (1500 r/min), 去上清液, 加入匀浆介质调细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$, 取细胞悬液 1mL, 4°C 下离心 10min (1500r/min), 去上清, 再加入 1mL 匀浆介质, 在冰水中用电动匀浆器低速匀浆使细胞破碎, 将细胞裂解液以 4000r/min 离心 10min, 取适量上清液进行各项指标测定。取肝脏、脾脏、肾脏组织块约 1g 放入冰冷的生理盐水中漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 再称重, 放入试管中。用量筒量取预冷的匀浆介质, 量为组织块重量的 9 倍倒入试管中。在冰水中用电动匀浆器高速匀浆使组织细胞破碎。将组织匀浆于 4°C 离心 10min (4000r/min)。取适量上清液进行各项指标测定。

1.4.2 CAT 测定 严格按试剂盒说明书进行试剂配制, 均现用现配。取各标本 20 μL 加入比色皿底部, 将已预热至 25°C , OD 值在 0.5—0.55 之间的底物溶液 3mL 用 5mL 移液器快速冲入比色皿中, 240nm 处立即测定吸光度, 记下 OD1 值, 比色皿不

取出, 1min 后立即再测定一次吸光度, 记下 OD2 值。

CAT 活力 = $\log (\text{OD1}/\text{OD2}) \times 2.303/60\text{s} \times \text{稀释倍数} \times \text{组织蛋白含量}$

1.4.3 组织蛋白含量测定 用考马斯亮蓝法, ROS、MDA 水平和 GSH-Px 活性的测定严格按试剂盒操作步骤并且我们常规应用的方法^[2,3]。

1.5 肝脏电镜标本制备

实验结束后次日, 采用颈椎脱臼法杀死小鼠后, 立即取出小鼠肝脏置于培养皿中, 用刀片切取约 1mm×1mm 大小放入预冷的 2.5%戊二醛中固定, 2%锇酸后固定, 梯度乙醇脱水, 马铃薯葡萄糖琼脂 (PDAP) 浸透, 包埋后超薄切片, 行柠檬酸铅染色后置透射电镜 (HA-60, Japan) 下观察。

1.6 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间显著性差异用 t 检验。

2 结果

2.1 SOD 对 DDP 引起荷瘤小鼠正常组织 ROS、MDA 水平及 GSH-Px、CAT 活力水平变化的影响

DDP 治疗组荷瘤鼠骨髓细胞和肝脏、脾脏组织匀浆中 ROS 和 MDA 明显高于未治疗组 ($p < 0.01$), 肾脏组织匀浆中 ROS、MDA 水平无明显变化, 差异不显著 ($p > 0.05$)。SOD 对荷瘤鼠用 DDP 后正常组织的 ROS 和 MDA 水平的影响, DDP+SOD 组荷瘤鼠的骨髓细胞中以及肝脏、脾脏组织匀浆中 ROS、MDA 水平较单纯 DDP 化疗组明显降低, 肾脏未见变化, 结果见表 1。DDP 化疗组荷瘤鼠骨髓、肝脏和脾脏组织匀浆中 GSH-Px 和 CAT 活性与未治疗组比较明显降低 ($p < 0.01$ 和 $p < 0.05$), 而肾脏组织匀浆中 GSH-Px 和 CAT 活性无明显变化, 结果见表 2。

Table 1 The effect of DDP on content of ROS and MDA in normal tissues of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Organism	ROS(U/ mgprot or 10^6 cells)			MDA(nmol/ mgprot or 10^6 cell)		
	Control	DDP	DDP+SOD	Control	DDP	DDP+SOD
Liver	49.89 $\pm$ 5.25	67.54 $\pm$ 5.46 ⁽²⁾	52.47 $\pm$ 6.38 ⁽⁴⁾	8.04 $\pm$ 1.12	11.54 $\pm$ 1.38 ⁽¹⁾	9.26 $\pm$ 1.35 ⁽³⁾
Kidney	22.95 $\pm$ 2.52	24.42 $\pm$ 3.25	24.90 $\pm$ 3.76	3.61 $\pm$ 0.86	3.64 $\pm$ 0.58	3.94 $\pm$ 0.86
Spleen	26.24 $\pm$ 2.32	9.63 $\pm$ 3.94 ⁽²⁾	29.45 $\pm$ 3.74 ⁽⁴⁾	5.37 $\pm$ 2.11	8.15 $\pm$ 1.04 ⁽¹⁾	6.07 $\pm$ 1.46 ⁽⁴⁾
Marrow	10.36 $\pm$ 1.88	15.04 $\pm$ 2.48 ⁽²⁾	12.17 $\pm$ 2.55 ⁽⁴⁾	2.04 $\pm$ 0.30	6.34 $\pm$ 0.92 ⁽²⁾	4.04 $\pm$ 0.30 ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$ (vs control). ⁽³⁾ $p < 0.05$, ⁽⁴⁾ $p < 0.01$ (vs DDP)

Table 2 The effect of SOD with DDP on GSH-Px and CAT in normal tissues of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Organism	GSH-Px(U/ mg prot or 10^6 cells)			CAT(nmol/ mg prot or 10^6 cell)		
	Control	DDP	DDP+SOD	Control	DDP	DDP+SOD
Liver	62.39 $\pm$ 6.45	46.23 $\pm$ 5.18 ⁽²⁾	65.18 $\pm$ 7.42 ⁽⁴⁾	587.24 $\pm$ 63.45	364.55 $\pm$ 41.53 ⁽²⁾	475.84 $\pm$ 54.35 ⁽⁴⁾
Kidney	41.75 $\pm$ 5.32	38.76 $\pm$ 4.50	42.54 $\pm$ 3.64	261.87 $\pm$ 32.05	243.92 $\pm$ 25.64	271.88 $\pm$ 45.32
Spleen	27.83 $\pm$ 3.84	21.21 $\pm$ 3.19 ⁽¹⁾	29.84 $\pm$ 3.48 ⁽⁴⁾	52.80 $\pm$ 6.37	41.42 $\pm$ 5.44 ⁽¹⁾	50.64 $\pm$ 6.19 ⁽³⁾
Marrow	17.36 $\pm$ 2.24	12.52 $\pm$ 1.74 ⁽²⁾	19.16 $\pm$ 2.42 ⁽³⁾	36.67 $\pm$ 5.12	24.17 $\pm$ 3.56 ⁽²⁾	31.67 $\pm$ 4.46 ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$ (vs control). ⁽³⁾ $p<0.05$, ⁽⁴⁾ $p<0.01$ (vs DDP)

2.2 SOD 对 ADM 引起荷瘤小鼠正常组织 ROS、MDA 水平及 GSH-Px、CAT 活力水平变化的影响

ADM 治疗组荷瘤鼠骨髓细胞和肝脏组织匀浆中 ROS 和 MDA 明显高于未治疗组 ($p<0.01$), 肾脏和脾脏组织匀浆中 ROS 和 MDA 水平无明显变化, 差异不显著 ($p>0.05$)。SOD 对荷瘤鼠用化疗药物后正常组织的 ROS 和 MDA 水平的影响。

ADM+SOD 组荷瘤鼠的骨髓细胞中以及肝脏、脾脏组织匀浆中 ROS、MDA 水平较单纯 ADM 化疗组均明显降低, 肾脏未见变化, 结果见表 3。ADM 化疗组荷瘤鼠骨髓细胞和肝脏组织匀浆中 GSH-Px 和 CAT 活性与未治疗组比较明显降低 ($p<0.01$ 和 $p<0.05$), 但肾脏和脾脏组织匀浆中酶活性无明显变化, 结果见表 4。

Table 3 The effect of SOD on ROS and MDA contents in normal tissues of the tumor-bearing mice treated by ADM ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Organism	ROS(U/ mg prot or 10^6 cells)			MDA(nmol/ mg prot or 10^6 cell)		
	Control	ADM	ADM+SOD	Control	ADM	ADM+SOD
Liver	49.53 $\pm$ 5.89	61.44 $\pm$ 5.24 ⁽¹⁾	51.32 $\pm$ 3.64 ⁽³⁾	7.64 $\pm$ 1.56	12.33 $\pm$ 1.18 ⁽²⁾	9.28 $\pm$ 0.97 ⁽⁴⁾
Kidney	24.36 $\pm$ 3.11	27.56 $\pm$ 3.40	24.65 $\pm$ 2.33	3.15 $\pm$ 0.61	3.53 $\pm$ 0.59	3.63 $\pm$ 0.24
Spleen	25.20 $\pm$ 3.29	31.85 $\pm$ 4.70	23.25 $\pm$ 2.78 ⁽⁴⁾	5.49 $\pm$ 1.86	6.08 $\pm$ 1.53	5.69 $\pm$ 0.84
Marrow	8.56 $\pm$ 1.24	12.36 $\pm$ 1.96 ⁽¹⁾	11.63 $\pm$ 1.69 ⁽³⁾	2.56 $\pm$ 0.47	5.55 $\pm$ 0.83 ⁽²⁾	3.65 $\pm$ 0.48 ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$ (vs control). ⁽³⁾ $p<0.05$, ⁽⁴⁾ $p<0.01$ (vs ADM)**Table 4 The effect of SOD with ADM on GSH-Px and CAT in normal tissues of tumor-bearing mice** ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Organism	GSH-Px (U/ mg prot or 10^6 cells)			CAT(nmol/ mg prot or 10^6 cell)		
	Control	ADM	ADM+SOD	Control	ADM	ADM+SOD
Liver	64.26 $\pm$ 5.24	43.87 $\pm$ 5.05 ⁽²⁾	62.45 $\pm$ 7.23 ⁽³⁾	538.50 $\pm$ 61.39	341.8 $\pm$ 43.12 ⁽²⁾	464.55 $\pm$ 53.42 ⁽⁴⁾
Kidney	43.75 $\pm$ 5.30	40.28 $\pm$ 4.45	45.26 $\pm$ 5.38	249.31 $\pm$ 42.78	225.92 $\pm$ 36.57	257.63 $\pm$ 38.24
Spleen	29.74 $\pm$ 3.52	26.60 $\pm$ 2.9	35.34 $\pm$ 2.35 ⁽³⁾	56.32 $\pm$ 6.31	52.42 $\pm$ 5.97	64.36 $\pm$ 5.84 ⁽⁴⁾
Marrow	16.48 $\pm$ 2.63	13.74 $\pm$ 4.95 ⁽¹⁾	21.26 $\pm$ 2.34 ⁽⁴⁾	34.55 $\pm$ 4.61	25.77 $\pm$ 3.45 ⁽²⁾	30.45 $\pm$ 4.14 ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$ (vs control). ⁽³⁾ $p<0.05$, ⁽⁴⁾ $p<0.01$ (vs ADM)

2.3 照射对荷瘤鼠正常组织中 ROS、MDA 含量影响

荷瘤小鼠受照射后其骨髓细胞、肝脏、脾脏细胞匀浆中 ROS、MDA 较未治疗组明显升高 ($p<0.01$), SOD 对受照荷瘤小鼠正常组织中 ROS、

MDA 含量和抗氧化酶活性的影响 照射给药组荷瘤小鼠骨髓、肝脏和脾脏组织细胞匀浆中 ROS、MDA 含量较单纯照射组明显下降 ($p<0.01$), 结果见表 5。

Table 5 The effect of SOD on contents of ROS and MDA in normal tissues of tumor-bearing mice after radiation ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Organism	ROS(U/ mg prot or 10 ⁶ cells)			MDA(nmol/ mg prot or 10 ⁶ cell)		
	Control	Radiation	Radiation+SOD	Control	Radiation	Radiation+SOD
Liver	52.54±6.42	72.28±8.54 ⁽¹⁾	54.60±5.19 ⁽³⁾	7.32±0.82	12.30±1.42 ⁽¹⁾	7.62±4.84 ⁽³⁾
Kidney	25.24±2.53	30.64±4.25	28.36±3.24	2.68±0.59	3.56±0.46	4.66±4.30
Spleen	22.42±3.18	41.96±5.15 ⁽¹⁾	24.39±2.82 ⁽³⁾	5.47±1.14	8.34±1.21 ⁽¹⁾	5.51±4.31 ⁽²⁾
Marrow	11.82±1.52	15.12±2.26 ⁽¹⁾	12.24±1.66 ⁽³⁾	3.25±0.47	8.83±0.85 ⁽¹⁾	3.15±0.63 ⁽³⁾

⁽¹⁾ $p<0.01$ (vs control), ⁽²⁾ $p<0.05$, ⁽³⁾ $p<0.01$ (vs radiation)

荷瘤小鼠受 X 线照射后其骨髓细胞、肝脏、脾脏细胞匀浆中 GSH-Px、CAT 较未治疗组明显降低 ($p<0.01$ 和 $p<0.05$), 而荷瘤小鼠肾脏组织匀浆中各指标在照射前后均无明显变化, 照射给药组荷瘤小

鼠骨髓、肝脏和脾脏组织细胞匀浆中 GSH-Px、CAT 活性较照射对照组明显升高 ($p<0.01$ 和 $p<0.05$), 而各组小鼠肾脏组织中各项指标无明显变化, 结果见表 6。

Table 6 The effect of SOD on GSH-Px and CAT in normal tissues of tumor-bearing mice after radiotherapy ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Organism	GSH-Px(U/ mg prot or 10 ⁶ cells)			CAT(nmol/ mg prot or 10 ⁶ cell)		
	Control	Radiation	Radiation+SOD	Control	Radiation	Radiation+SOD
Liver	63.38±7.54	42.08±5.14 ⁽²⁾	58.33±5.46 ⁽⁴⁾	563.45±65.84	355.27±48.66 ⁽²⁾	454.63±54.38 ⁽⁴⁾
Kidney	38.67±4.36	34.94±3.45	35.52±5.21	276.36±38.16	234.45±36.58	261.88±42.74
Spleen	23.84±3.15	16.44±2.36 ⁽¹⁾	22.15±3.36 ⁽⁴⁾	45.72±3.76	24.61±2.63 ⁽²⁾	37.25±4.64 ⁽⁴⁾
Marrow	15.27±5.42	11.29±3.92 ⁽²⁾	18.54±3.60 ⁽³⁾	37.55±46.68	27.18±34.97 ⁽²⁾	28.09±3.37 ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$ (vs control), ⁽³⁾ $p<0.05$, ⁽⁴⁾ $p<0.01$ (vs radiation)

2.4 透视电镜下 SOD 对电离辐射对荷瘤鼠肝脏细胞超微结构特征的影响

(1) 未治疗组:可观察到明细胞和暗细胞两种肝细胞,胆管无胆汁淤积,血管内皮细胞连续无肿胀,可见大量脂滴和糖原,肝细胞胞核呈圆形无皱缩,胞浆内粗面内质网无脱颗粒现象,线粒体无肿胀,脊突明显(见图 1)。

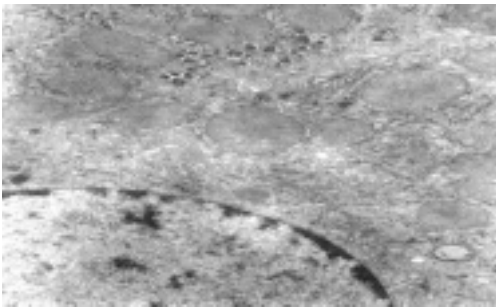


Fig.1 Ultrastructure of normal liver in cell

(2) 单纯照射组:毛细胆管无胆汁淤积,但血管内皮细胞肿胀,不连续,肝细胞核皱缩明显,胞浆内粗面内质网扩张,有脱颗粒现象,线粒体轻微肿胀(见图 2)。

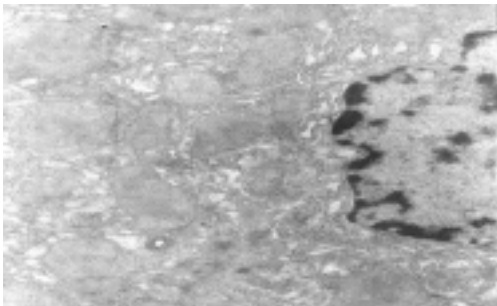


Fig.2 Ultrastructure of liver cell radiation group

(3) 照射用药组:毛细胆管无胆汁淤积,血管内皮细胞肿胀不明显,细胞核呈圆形无皱缩,胞浆中粗面内质网脱颗粒不明显,线粒体无肿胀,(见图 3)。

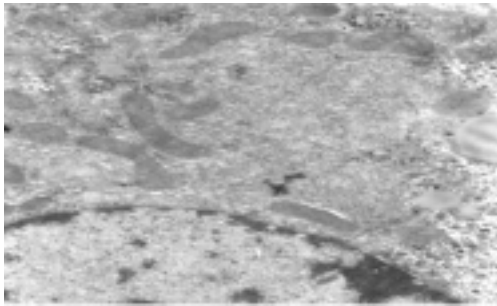


Fig.3 Ultrastructure of liver cell in radiation+SOD group

3 讨论

ROS 包括氧的单电子还原产物超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$)、双电子还原产物过氧化氢 (H_2O_2)、三电子还原产物羟自由基 ($\cdot OH$)、单线氧 ($^1O_2^*$) 和一氧化氮等, ROS 对细胞增殖和凋亡的影响呈浓度依赖性, 高浓度的氧自由基抑制细胞生长促进凋亡, 而相对低浓度的氧自由基则充当内部信号分子诱导细胞分裂和增殖^[4], 并且细胞对 ROS 的反应也因细胞种类的不同存在很大差异^[5]。各种抗氧化酶是最重要的防御体系, 包括 SOD、CAT、GSH-PX 等, 其次机体内一些复合物起到阻断自由基反应的作用如 GSH、VitC、VitE 等, 因此作为代谢产物的少量 ROS 的存在是正常细胞的生理过程, 但是 ROS 一旦生成过量过快细胞的氧化还原平衡就受到破坏, 本实验结果表明荷瘤鼠腹腔灌注 DDP、ADM 后第 5 日骨髓细胞抑制及肝脏、脾脏损伤可能与其 ROS 及其脂质过氧化产物 MDA 升高有关。ADM 是蒽环类抗生素, 当机体内线粒体电子传递链上的电子从 NADPH 传递到 ADM 时, ADM 中的醌环单电子还原为半醌, 而半醌发生氧化反应的能障很低, 可直接启动 O_2 的单电子还原产生 $O_2^{\cdot-}$, 此外 ADM 自由基本身可直接与 H_2O_2 反应产生 $\cdot OH$, 这些又可激发脂质过氧化作用加重对细胞损伤。临床应用顺铂时肾脏毒性常见, 但在本实验中并未观察到 DDP 可诱导荷瘤鼠肾脏组织匀浆 ROS 和 MDA 水平升高, 可能与未达到一定累积药物剂量有关, 这将需进行深入研究。骨髓细胞是最主要的超氧或其它氧化代谢产物来源^[6], 这也正是绝大部分抗肿瘤药物都可造成骨髓细胞抑制的原因。

实验结果还表明化疗药物不仅可引起荷瘤小鼠正常组织细胞内 ROS 生成增加, DDP 和 ADM 还可导致包括骨髓细胞、肝脏、脾脏组织细胞抗氧化酶活性降低, 细胞表达抗氧化酶如 SOD、GSH-Px、CAT 可保护细胞免受氧化损伤^[3], 这些酶活性下降进一步加重细胞氧化还原状态失调, 导致机体组织细胞氧化损伤, 最终可发生临床严重药物副反应。外源性 SOD 在荷瘤小鼠化疗药物后应用可明显降低骨髓细胞、肝脏、脾脏的 ROS 和 GSH 水平, 并且可明显提高这些组织 GSH-Px 和 CAT 活性, 表明 SOD 可通过直接清除细胞内过多 ROS, 还可通过提高其它抗氧化酶活性而协同清除化疗药物产生的过量 ROS, 从而避免正常器官氧化损伤, 减少药物毒副作用。

电离辐射对生物体可产生直接作用, 同时可通

过间接作用使水分子电离和激发将能量转移到生物大分子, 由此继发产生自由基等活性物质使生物大分子发生辐射损伤。荷瘤鼠经直线加速器 X 线全身照射后, 其正常器官包括骨髓细胞、肝脏和脾脏组织细胞中 ROS 及 MDA 水平明显较未照射组增高, 说明荷瘤鼠正常器官照射损伤与组织细胞 ROS 及自由基连锁反应产物增加有关, 而且骨髓细胞、肝脏和脾脏组织中其它抗氧化酶 GSH-PX、CAT 活性明显下降, 表明荷瘤鼠受照后正常组织不仅自由基产生增加, 并且清除自由基能力下降, 更进一步加重内源性自由基产生和清除平衡的失衡, 其后果就是机体内积累的自由基损伤骨髓、肝脏和脾脏细胞内重要的生物大分子, 造成细胞功能和组织形态学改变, 临床上即可表现为骨髓抑制、肝脏功能异常等。但荷瘤鼠受照后肾脏组织中各项指标与受照前比较无明显变化, 这可能与抗氧化酶在不同组织细胞内的分部和含量不同有关, 一般氧化代谢活跃的部位其抗氧化酶的活性越高, 另外不同部位的抗氧化酶对电离辐射的敏感性也不同, 本实验结果也表明肝脏和骨髓细胞中抗氧化酶活性较高, 而肾脏中较低。通过透射电镜观察到受照荷瘤小鼠肝脏超微结构发生明显变化, 肝细胞胞核皱缩, 胞浆粗面内质网扩张并脱颗粒, 线粒体轻微肿胀, 而保护性应用 SOD 后肝脏受损明显减轻, 表现为细胞核无皱缩, 内质网不扩张, 脱颗粒不明显, 这是 SOD 抗电离辐射所致肝脏氧化损伤的基础。

文献[7]报道 X 射线照射肺上皮细胞 72h 后给予 Zn-SOD 或 Mn-SOD 酶, 可通过增高细胞内 SOD 含量减少肺上皮细胞死亡, 表明了辐射导致 SOD 失活在辐射损伤中的重要作用。Mn-SOD 基因转染中国仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞不仅表现出对 ROS 损伤的保护作用, 而且具有明显的辐射抗性作用^[8], 而国内孙娟等^[9]通过转染 Mn-SOD 对电离辐射诱发 CHO 细胞凋亡的影响, 更深入地研究了 SOD 对辐射诱导细胞凋亡调控机制。总之, 这些细胞水平的研究证明了 Mn-SOD 可保护细胞的辐射损伤。本部分实验荷瘤鼠照射前腹腔灌注 SOD 可明显降低受照荷瘤鼠骨髓细胞、肝脏和脾脏中 ROS、MDA 含量, 并提高 GSH-PX 和 CAT 活性, 结果表明外源性 SOD 不仅通过直接清除电离辐射产生的 $O_2^{\cdot-}$, 又减少了 $O_2^{\cdot-}$ 进一步转变为 $\cdot OH$ 及脂质化产物 MDA 的机会, 而且使其它抗氧化酶活性在 SOD 的保护下得以提高, 通过协同作用来保护机体正常器官, 尤其氧化代谢活跃的组织器官辐射损伤。

参考文献

- 1 Ushakova T, Melkonyan H, Nikonova L, *et al.* Free Radic Biol Med, 1999, **26**(5): 887-891
- 2 刘永彪, 刘颖, 赵杰, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2004, **22**(2):114-122
LIU Yongbiao, LIU Ying, ZHAO Jie, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2004, **22**(2):114-122
- 3 刘永彪, 刘颖, 赵杰, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2004, **22**(3):165-170
LIU Yongbiao, LIU Ying, ZHAO Jie, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2004, **22**(3):165-170
- 4 Yoshikawa T, Kokura S, Tainaka K. Cancer Res, 1993, **53**(10): 2326-2329
- 5 Burdon R H. Free Radic Biol Med, 1995, **18**(4): 775-794
- 6 Jose M M, Francisca M, Sanchez J. J Bioche Cell Biol, 2000, **32**(1): 157-170
- 7 Zwacka R M, Dudus L, Epperly M W, *et al.* Hum Gene Ther, 1998, **9**(7): 1381-1386
- 8 Hirose K, Longo D L, Oppenheim J J, *et al.* FASEB J, 1993, **7**(2): 361-368
- 9 孙娟, 陈瑗, 周玫, 等. 生物化学与生物物理学报, 1998, **30**(1): 26-30
SUN Juan, CHEN Yuan, ZHOU Mei, *et al.* Acta Biochim Biophys Sin, 1998, **30**(1): 26-30

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

LIU Yongbiao^{1,2} LIU Ying² ZHAO Jie² HAO Xingzhi² WANG Xu² YAO Side¹

¹ (Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

² (The Xu Zhou Medical University, Xuzhou 221002)

ABSTRACT In order to investigate protection effects of SOD on the oxidized damage of normal tissues induced in chemotherapeutic drug and irradiated tumor-bearing mice, the contents of ROS and MDA, the activation of GSH-Px and CAT in liver, kidney, spleen and bone marrow have been determined. The effect of SOD on the ultra-structure of liver cell has been evaluated. It has been found that chemotherapeutic drug and irradiation can increase the contents of ROS and MDA and decrease activation of GSH-Px and CAT. And SOD can decrease contents of ROS and MDA and increase the activation of GSH-Px and CAT slightly for liver, spleen, marrow, but for kidney there is no significant change while SOD can reduce the damage of ultra-structure of liver. It can be inferred that SOD have some protection effects on the normal tissue of tumor-bearing mice via scavenging free radicals and activate anti-oxidative enzymes after TBI and drugs injection.

KEYWORDS Superoxide dismutase, Ionizing radiation, Antitumor drugs, Tumor-bearing mice, Reactive oxygen species, Malondialdehyde, Glutathione peroxidases, Catalase

CLC R811.5