

N-乙酰半胱氨酸对碳离子照射小鼠急性损伤的保护效应

刘阳^{1,2} 张红^{1,3} 张录卫^{1,3} 赵卫平^{1,2} 武振华^{1,3}

¹ (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

² (中国科学院研究生院 北京 100049)

³ (甘肃省重离子束辐射医学应用基础重点实验室 兰州 730000)

摘要 探讨了N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射小鼠损伤的保护效应及可能的作用机制。预先给予昆明小鼠NAC(200mg/kg),后进行 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束4Gy的单次全身照射。照射后2h处死小鼠,取肝、肺组织,用化学法检测组织中超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)的活性,谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量及脂质过氧化产物丙二醛(Malondialdehyde, MDA)水平;用碱性单细胞凝胶电泳法检测DNA单链断裂;用流式细胞术检测组织细胞凋亡率。与照射对照组相比,提前给予NAC可极显著地减轻 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子导致的肝、肺组织中DNA断裂($p<0.001$)和细胞凋亡($p<0.001$),并显著地提高组织中GSH的含量;NAC还明显地抑制了肺组织中碳离子辐照所致的MDA水平增高($p<0.01$)并显著地诱导了组织中SOD活性的升高($p<0.01$)。提示NAC可通过抵御组织内的氧化作用,合成、补充GSH的含量,阻止DNA链的断裂和细胞的凋亡,实现对碳离子辐照损伤的保护效应。

关键词 N-乙酰半胱氨酸, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子, 小鼠, 抗辐射损伤

中图分类号 Q691, R818, R915

重离子束因其独有的生物物理特性,成为临床肿瘤治疗最理想、最具前途的放疗射线^[1],然而随之而来的放射治疗副作用也逐渐成为国内外科研及医疗工作者关注的热点。另外,随着空间辐射生物学的不断发展,重离子作为对宇航员威胁最大的宇宙射线之一,已经成为评估人类空间飞行辐射危险的重要对象^[2]。大量研究结果证实,重离子束可导致正常机体细胞DNA单、双链断裂^[3,4]、染色体畸变^[5]、不可逆的细胞毒性损伤^[6]以及生命周期缩短等。因此,寻求安全、高效的抗重离子辐射损伤药物具有重要的现实意义。N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)传统上作为一种粘液溶解剂应用于多种呼吸系统疾病。近几年,被报道在艾滋病、癌症、重金属中毒、酒精肝,心脏病以及帕金森病等方面均有广泛的治疗作用^[7]。但关于NAC的抗辐射作用目前尚无定论,并且这些工作大多以离体实验为基础,以传统的中子、X射线以及 γ 射线等为研究对象,针对重离子开展的研究、信息甚少。本实验采用预先给予小鼠NAC,观察重离子照射后肝、肺组织中超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)和谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量、DNA单链

断裂及细胞凋亡的变化,拟探讨NAC对碳重离子照射的保护作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康昆明种雄性小鼠32只,体质量为(20 $\pm$ 2)g,由兰州生物制品研究所提供。随机分成4组,每组8只。实验动物饲养适应环境3d后进行实验,饲养环境温度为(20 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$,正常昼夜节律,无强光、噪音刺激,动物可自由的进食和饮水。

1.2 照射条件

重离子照射在中国科学院近代物理研究所的兰州重离子辐照装置实验室(Heavy ion radiation facility laboratory, HIRFL)装置生物辐照终端进行,束流为 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束。经束流管道镍窗、电离室、空气后抵达受照动物,能量为80.55MeV,LET为35.5KeV/ μm ,吸收剂量率1Gy/min,用空气电离室监测剂量,照射剂量为4Gy。

1.3 实验处理

实验动物处理分为4个组,即正常对照组

国家自然科学基金资助项目(1075151)、甘肃省重大科技专项项目(O702NKDA045)、兰州市科技攻关项目(07-2-07)、中国科学院西部之光项目(O760160XB0)资助

第一作者:刘阳,女,1978年7月出生,中国科学院近代物理研究所博士研究生,主要从事辐射生物学研究工作

通信联系人:张红

收稿日期:初稿2008-06-23,修回2008-07-16

(Control group), 单纯照射组 (Irradiated group), NAC 预防组 (NAC + irradiated group), 单纯 NAC 组 (NAC group)。正常对照组中的受试动物每日一次腹腔注入与 NAC 施用量等体积的生理盐水 (0.85%) 连续 7d, 其后不经过任何照射处理; 单纯照射组中的受试动物仅接受全身单次照射处理; NAC 预防组中的受试动物每日一次连续 7d 腹腔注入 NAC (200mg/kg, 溶解在生理盐水中) 后, 最后一次给药 1h 后, 再进行单次照射处理; 单纯 NAC 组的受试动物仅接受每日一次连续 7d 的 NAC (200mg/kg) 腹腔注射。

1.4 SOD 酶活性、MDA 及 GSH 含量的检测

小鼠接受 $^{12}\text{C}^{6+}$ 照射后 2h, 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 解剖, 快速取出肝和肺组织, 加入磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 冰浴中制备成 10% 的匀浆液, 低温离心 (4000 r/min, 4℃, 15min), 其上清液用于测定 SOD 活性, MDA、GSH 及总蛋白含量。SOD 活性、MDA 及 GSH 含量测定分别按照试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 说明书进行操作。组织中总蛋白定量用考马斯亮兰 G-250 法。

1.5 DNA 单链断裂的检测

采用碱性单细胞凝胶电泳技术进行测定。在 Hartmann 等^[8]描述的方法上稍作改动, 制备单细胞悬浮液并调节每张载玻片的细胞数为 $10^3 \sim 10^4$ 个; 在含高离子浓度去污剂裂解液中裂解 2 h; 碱性条件下解旋 20min, 电泳 30min (300mA, 25V); 0.4mol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, pH 7.5) 中和。以上操作

均在低温、弱光下进行。每张片子随机挑选 50 个细胞, 用 Image-Pro Plus5.0 专业图象分析软件 (USA) 检测 DNA 尾部迁移距离。

1.6 细胞凋亡率分析

将新鲜组织用眼科剪尽量剪碎, 用 200 目筛过滤。PBS 洗涤 2 次后用 75% 冷乙醇在 4℃ 冰箱固定 24 h 以上。离心除去固定液, 加碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 染色液 0.5mL (含 0.3 mg/mL RNAase, 20μg/mL PI), 常温避光染色 30min 后, FASCan 型流式细胞仪 (USA) 检测, 激发光波长为 488nm, 每个样品测定 10000 个细胞。采用分析软件 FlowJo 7.1 (CA) 计算出凋亡细胞的百分比。

1.7 数据统计分析

所有数值表示为均数±标准差, 各组均数采用单因素方差分析, 采用 SPSS 11.5 统计软件和 Origin7.0 绘图软件。

2 结果

2.1 NAC 对受照小鼠肝、肺组织中 SOD 活性、MDA 及 GSH 含量的影响

如表 1 所示, 与正常对照组相比, $^{12}\text{C}^{6+}$ 照射显著地降低了小鼠肝组织中 SOD 的活性 ($p < 0.001$) 和 GSH 的含量 ($p < 0.05$), 增加了 MDA 的含量 ($p < 0.05$)。与单纯照射组相比, 预先给予 NAC 提高了小鼠肝组织的 SOD 活性, 降低了 MDA 的含量, 但均未表现出统计学差异。然而, GSH 的含量在 NAC 的作用下则有显著增加 ($p < 0.05$)。

Table 1 Effect of NAC administration on SOD activity, MDA and GSH contents induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ irradiation in the liver of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Groups	SOD(U / mg protein)	MDA(nmol / mg protein)	GSH(μmol / mg protein)
C	2.39±0.53	1.78±0.14	2.72±0.77
IR	1.68±0.08 ^b	3.06±0.92 ^a	1.28±0.20 ^a
NAC+IR	1.80±0.23 ^b	2.70±0.83	2.59±0.65 ^c
NAC	2.47±0.50	1.85±0.19	2.39±0.60

Note: ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.001$ vs C; ^c $p < 0.05$ vs IR. C: Control group, IR: Irradiated group, NAC+IR: NAC + irradiated group, NAC: NAC group

表 2 显示, 在小鼠肺组织中, $^{12}\text{C}^{6+}$ 单纯照射组较正常对照组 SOD 活性 ($p < 0.05$) 及 GSH 含量 ($p < 0.01$) 明显地降低, MDA 含量则显著增高 ($p < 0.001$); 预先给予 NAC 预防组较单纯照射组 SOD 活性 ($p < 0.05$) 和 GSH 含量 ($p < 0.01$) 均有显

著性增加, 而 MDA 含量则呈显著性降低 ($p < 0.01$)。而预先给予 NAC 预防组组织中 SOD 活性、GSH 和 MDA 的含量的变化与正常对照组间没有显著性差异, 表明 NAC 本身不造成正常小鼠肝、肺组织中氧化和抗氧化能力的明显变化。

Table 2 Effect of NAC administration on SOD activity, MDA and GSH contents induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ irradiation in the lung of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Groups	SOD(U / mg protein)	MDA (nmol / mg protein)	GSH (μmol / mg protein)
C	8.77 $\pm$ 1.09	2.90 $\pm$ 0.99	2.46 $\pm$ 0.45
IR	6.14 $\pm$ 0.88 ^a	6.66 $\pm$ 1.35 ^c	0.91 $\pm$ 0.27 ^b
NAC+IR	10.41 $\pm$ 1.84 ^d	4.08 $\pm$ 0.44 ^e	2.17 $\pm$ 0.57 ^e
NAC	8.93 $\pm$ 0.78	3.55 $\pm$ 0.79	2.33 $\pm$ 0.33

Note: ^a $p<0.05$, ^b $p<0.01$, ^c $p<0.001$ vs. C; ^d $p<0.05$, ^e $p<0.01$ vs IR. C: Control group, IR: Irradiated group, NAC+IR: NAC + irradiated group, NAC: NAC group

2.2 NAC 对受照小鼠肝、肺组织中 DNA 单链断裂的影响

图 1 显示, 在小鼠的肝、肺组织中, $^{12}\text{C}^{6+}$ 照射组中的 DNA 单链断裂程度与正常对照组的相比均有极其明显地增高 ($p<0.001$)。尽管在 NAC 预防组中 DNA 单链的断裂程度与正常对照相比仍有显著性的差异 ($p<0.05$), 但 NAC 的使用的确极其显著地降低了肝组织 ($p<0.001$) 和肺组织 ($p<0.001$) 中由 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子诱导的 DNA 单链断裂。此外, 单纯 NAC 组中 DNA 的变化与正常对照组中没有统计学差异, 表明 NAC 本身不造成肝、肺细胞中 DNA 的单链断裂。

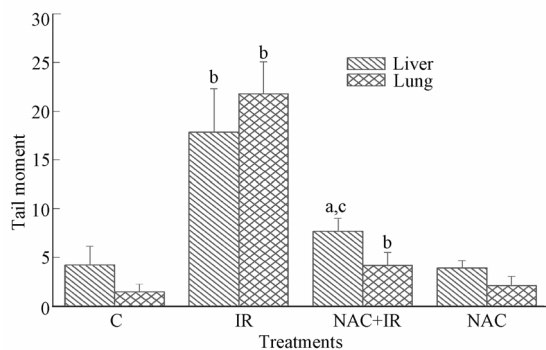


Fig.1 Effect of NAC administration on DNA single-strand breaks induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ irradiation in the liver and lung of mice

Note: ^a $p<0.05$, ^b $p<0.001$ vs. C; ^c $p<0.001$ vs IR. C: Control group, IR: Irradiated group, NAC+IR: NAC + irradiated group, NAC: NAC group

2.3 NAC 对受照小鼠肝、肺组织中细胞凋亡的影响

如表 3 所示, 在小鼠的肝、肺组织中, $^{12}\text{C}^{6+}$ 照射组中的细胞凋亡百分比与正常对照组的相比均有极其明显的增高 ($p<0.001$)。而给予 NAC 则极其显著地降低了肝和肺组织中由 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子诱导的细胞凋亡百分比 ($p<0.001$)。此外, NAC 预防组中细胞凋亡百分比的变化与正常对照组中没有显著性差异, 表明 NAC 本身不造成肝、肺中组织的细胞凋亡。

Table 3 Effect of $^{12}\text{C}^{6+}$ irradiation and NAC administration on cell apoptosis in the liver and lung of mice

Groups	The percentage of apoptotic cells in total cells / %	
	Liver	Lung
C	1.27 $\pm$ 0.07	7.40 $\pm$ 0.21
IR	6.42 $\pm$ 0.28 ^a	32.20 $\pm$ 0.63 ^a
NAC+IR	3.85 $\pm$ 0.42 ^{a,b}	14.97 $\pm$ 0.50 ^{a,b}
NAC	1.42 $\pm$ 0.09	7.49 $\pm$ 0.33

Note: ^a $p<0.001$ vs. C; ^b $p<0.001$ vs IR. C: Control group, IR: Irradiated group, NAC+IR: NAC + irradiated group, NAC: NAC group

3 讨论

大量研究证实, 具有高传能线密度 (Line energy transfer, LET) 的重离子与低 LET 的射线 (X、 γ 等) 相比, 穿过生物体时所导致损伤相对复杂且难以修复^[9,10]。本实验表明, 碳重离子照射导致了小鼠肝、肺组织 SOD 活力的抑制, GSH 的消耗以及 MDA 水平的增高。这说明碳重离子辐照严重地造成了小鼠细胞的毒性损伤, 尽管机体有应激抗氧化防御以维持体内失衡的氧化还原状态, 但重离子照射仍然导致了大量自由基的积累, 从而造成小鼠肝、肺组织的脂质过氧化损伤。另外, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照也直接或间接地诱导了小鼠肝、肺细胞的 DNA 链断裂及凋亡, Pathak 等^[11]在离体 V79 细胞中也观察到了重离子作用下的 DNA 损伤及凋亡现象。这些结果说明重离子具有较高的细胞致死效应, 也提示了开展防护研究是非常必要的。

本实验室前期研究结果表明, NAC 对 X 射线造成的小鼠损伤具有良好的防护效果^[12], 而 Abt 等^[13]则发现 NAC 在离体淋巴细胞中对 X 射线的防护作用不大。因此, 至今 NAC 具有怎样的辐射保护功效仍然无法定论。另一方面, 目前关于 NAC 抗重离子辐射的研究和报道尚少, 为此本实验探讨了 NAC 对碳离子辐射的保护效应以及可能存在的保护机制。实验结果显示, 在小鼠肝、肺组织中 NAC 均高效地阻止了 DNA 损伤、细胞凋亡, 同时提高了 GSH 含量, 这表明 NAC 有可能成为有潜力、有

希望的抗碳重离子辐射药物。另外,本实验还观察到,NAC抑制MDA含量增长的能力在肺组织中较肝组织更为强大,说明NAC抵御自由基攻击的能力在肺组织中更为突出,其原因可能在于NAC在肺组织中更为显著地诱导了抗氧化酶及非酶系统水平的表达,这解释与本实验中SOD酶活性及GSH含量变化的结果相吻合。

在本实验中我们看到NAC仅在肺组织中显著地刺激了抗氧化酶转录及表达水平的增强,而肝中却未见此变化,表明NAC在肝和肺组织中的抗辐射途径是略有差异的。因此认为NAC所发挥的辐射保护作用可能是由多条途径共同协助完成。其中包括了:NAC作为自由基清除剂直接抑制碳离子辐照诱导的细胞氧化损伤,从而降低组织中MDA的含量;NAC作为GSH合成的前体,促进GSH的生物合成^[14],提高机体组织内GSH含量,从而间接增强机体抗辐照损伤的能力;NAC抑制了碳离子辐照产生的基因毒性,维护机体DNA免受或减缓损伤;NAC有效地阻止了碳离子辐照导致的机体细胞凋亡。总之,NAC能够高效地阻遏受照小鼠的急性损伤,并且其抗辐射保护机制在肝、肺组织中略有差异,但所发挥的抗辐射作用均是由多条途径参与完成,从而达到对碳离子辐照损伤的保护效应。因此,本文为NAC运用于太空重离子辐射防护及临床放射医疗防护提供了有价值的理论依据。

参考文献

- 1 刘建香,苏旭. 中华放射医学与防护杂志, 2003, **23**(1): 65-67
- 2 LIU Jianxiang, SU Xu. Chin J Radiol Med Prot, 2003, **23**(1): 65-67
- 3 Durante M, Kronenberg A. Adv Space Res, 2003, **35**(2): 180-184
- 4 Giustranti C, Rousset S, Balanzat E. Biochimie, 2008, **82**(1): 79-83
- 5 Wada S, Kobavashi Y, Funayama T, *et al.* J Radiat Res, 2002, Suppl: s153-156
- 6 Zhang H, Duan X, Yuan ZG, *et al.* Mutat Res, 2006, **595**(1-2): 37-41
- 7 Zhang H, Zhang X, Yuan ZG, *et al.* J Radiat Res, 2006, **47**(2): 131-134
- 8 Kelly G S. Altern Med Rev, 1998, **3**(2): 114-127
- 9 Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, *et al.* Mutagenesis, 2004, **19**(1): 51-59
- 10 Blakely E A, Chang P Y. Adv Space Res, 2007, **40**(9): 1307-1319
- 11 Ballarini F, Alloni D, Facoetti A, *et al.* Adv Space Res, 2007, **40**(9): 1392-1400
- 12 Pathak R, Dey S K, Sarma A, *et al.* Mutat Res, 2007, **635**(1-2): 58-68
- 13 LIU Y, ZHANG H, ZHANG L W, *et al.* Eur J Pharmacol, 2007, **575**(1-3): 142-148
- 14 Abt G, Vaghef H, Gebhart E, *et al.* Mutat Res, 1997, **384**(10): 55-64
- 15 De flora S, Izzotti A, D'Agostini F, *et al.* Carcinogenesis, 2001, **22**(7): 999-1013

The protective effects of N-acetylcysteine on acute injury induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ ions in mice

LIU Yang^{1,2} ZHANG Hong^{1,3} ZHANG Luwei^{1,3} ZHAO Weiping^{1,2} WU Zhenhua^{1,3}

¹ (Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

² (Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

³ (Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT The present study was designed to evaluate the effect and mechanism of N-acetylcysteine (NAC) against from acute injury of mice exposed to $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams. Pretreated with NAC (200mg/kg) Kun-Ming mice were exposed to whole-body irradiation of 4Gy and were killed at 2h after irradiation, and then their liver and lung tissues were quickly treated for further experiment. The Superoxide dismutase (SOD) activity, glutathione (GSH) content and malondialdehyde (MDA) level were measured by chemical method and DNA-single strand breaks were determined by single cell gel electrophoresis meanwhile the percentage of cell apoptosis were assayed by flow cytometry method. In comparison with the respective control, NAC pretreatment can significantly alleviate DNA-single strand breaks ($p<0.001$), cell apoptosis ($p<0.001$) and obviously enhance GSH content in the liver and lung tissues. Moreover, NAC can prominently inhibit the increment of MDA level ($p<0.01$) induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams and can augment SOD activity ($p<0.01$) in the lung.

KEYWORDS N-acetylcysteine, $^{12}\text{C}^{6+}$ ions, Mice, Anti-radiation damage

CLC Q691, R818, R915