

低剂量电离辐射对小鼠腹腔巨噬细胞 CuZn SOD 活性的影响

金顺子¹ 何淑梅² 刘树铮¹

¹ 吉林大学卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

² 吉林大学第一医院干部病房 长春 130021)

摘要 采用 MTT 法观察了低剂量电离辐射对小鼠腹腔巨噬细胞铜锌超氧化物歧化酶(CuZn SOD)活性的影响,同时用较大剂量作为对照,观察两者的不同之处,而且还利用印迹杂交方法观察了 CuZn SOD 的 mRNA 水平变化。结果表明,从转录水平上低剂量电离辐射可导致小鼠腹腔巨噬细胞 CuZn SOD mRNA 水平下降,而 CuZn SOD 活性却无明显改变;较高剂量电离辐射使小鼠腹腔巨噬细胞 CuZn SOD 活性在照射后 8—12h 明显增强。

关键词 电离辐射, CuZn SOD, 小鼠腹腔巨噬细胞, mRNA

中图分类号 R811, R146

电离辐射对机体的原发作用,是以自由基理论为基础的。电离辐射对生物体构成损伤除直接作用外,还有间接作用,即通过水的原发辐射分解产物或化合物分子均裂产生的自由基对生物大分子造成损伤,其中 $\cdot\text{OH}$ 攻击生物大分子包括 DNA,其毒性最强。此外,自由基还可攻击生物膜引起脂质过氧化,从而引起细胞损伤^[1]。关于电离辐射产生的自由基对机体影响,国内外已有很多报道^[2,3],但对免疫系统的研究报道较少。因为机体的多数细胞含水量很高,细胞内含有大量水分子。因此,考虑自由基在生物体的作用与影响,测定有关的酶具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性昆明小鼠,体重 $20 \pm 2\text{g}$,购自本校实验动物部。动物可分为假照射组、2Gy 和 0.075Gy 照射后不同时间组。

1.2 照射条件及实验分组

国产 X·S·S·205(FZ)型固定式 X 射线深部治疗机,电压 200kV,电流 10mA,滤板 0.5mmCu+1.0mmAl。单次低剂量照射(0.075Gy),靶皮距 247.3cm,剂量率为 12.5mGy/min,单次较高剂量照射(2Gy),靶皮距 56cm,剂量率为 0.287Gy/min。

0.075Gy 和 2Gy X 射线照射后不同时间组动物,在不同时间照射,同时断头处死。测 mRNA 水平时 15 只动物的腹腔巨噬细胞合并为 1 个样品,测蛋白水平时 3 只动物的腹腔巨噬细胞合并为 1 个样品,每组 4 个样品。

1.3 腹腔巨噬细胞的收集

断头处死小鼠,剪开腹部皮肤,避开血管,向腹腔内注入约 5mL PBS,轻揉腹部约 1min,腹

国家自然科学基金(39570188)资助

第一作者:金顺子,女,1965 年 7 月 8 日出生,1988 年毕业于白求恩医科大学,环境医学系放射生物学专业,副教授,医学博士

收稿日期:初稿 2001-12-26, 修回 2002-02-04

膜开一小口,用吸管吸出腹腔液,离心洗涤 1 次。

1.4 CuZn SOD mRNA 表达检测

- 采用 Northern 杂交法测定,操作步骤如下:
- (1) 异硫氰酸胍一酚一步法抽提总 RNA^[4]:使用前 RNA 用紫外分光光度计测定 RNA 纯度及含量,A₂₆₀与 A₂₈₀比值在 1.8—2.0 之间,基本上无蛋白质污染。RNA 经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳后,28S 与 18S 区带清晰集中,28s 与 18s 比值>2,表明 RNA 样品未降解。
- (2) 进行 RNA 甲醛变性电泳、转膜。
- (3) 用[α-³²P]d CTP 标记探针:采用随机引物法标记 DNA 探针,按 Random primer DNA labeling kit (Promega)说明书要求操作。
- (4) 杂交:用 6×SSC 浸湿尼龙膜 5min,将膜放入杂交袋中,加入 20mL 预杂交液,42℃反应 2—4 h,开杂交袋一角,重新加入 15mL 杂交液(含变性后探针的预杂交液),42℃杂交 16—24h。
- (5) 洗膜:用 2×SSC,0.5% SDS 室温漂洗 10min,重复 1 次;0.5×SSC,0.5% SDS 于 65℃漂洗 15min,重复 1 次;0.2×SSC,0.5% SDS 于 65℃漂洗 15min,重复数次,0.1×SSC 室温漂洗 2min,以除去 SDS,用吸水纸吸干尼龙膜上的水滴。
- (6) 将尼龙膜封好后于曝光盒中,于室温下曝光 4 h 或过夜后,用激光扫描仪扫描显像。另用 GAPDH(看家基因的一种)作内参照,激光扫描仪(PhosphorImages, MD, USA)将目的基因与 GAPDH 之间比值作为该样本目的基因的表达水平。为比较方便,以假照组为 100%,将各时间点的表达值换算为假照组的 % 值。

1.5 CuZn SOD 蛋白活性的测定

采用 MTT 法测定^[5],结果以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 0.075Gy 和 2Gy X 射线照射对小鼠腹腔巨噬细胞 CuZn SOD 活性的影响

从表 1 中可看出,0.075Gy X 射线照射后 8h 小鼠腹腔巨噬细胞 CuZn SOD 的活性有升高趋势,但无统计学意义,其他时间点 CuZn SOD 的活性无明显变化,而 2Gy X 射线照射后小鼠腹腔巨噬细胞 CuZn SOD 的活性随着时间的推移逐渐增强,在 8、16、24h 时其活性明显高于假照组($p < 0.01$),然后逐渐回降。

Tab.1 Time course changes of the CuZn SOD activity in peritoneal macrophages in mice after WBI with 0.075Gy or 2Gy X rays

Time /h	SOC/U ·μL ⁻¹	
	0.075Gy	2Gy
Sham	38.76±6.23	30.83±2.72
4	30.22±2.69	39.17±2.92
8	62.94±19.28	57.66±1.92 ⁽¹⁾
16	34.71±2.47	119.08±22.58 ⁽¹⁾
24	33.46±4.45	63.26±2.34 ⁽¹⁾
48	37.55±3.74	39.01±1.19
72	27.93±3.49	46.61±2.19

$\bar{x} \pm s, n = 4, \quad ^{(1)}p < 0.01 \text{ vs sham irradiation}$

Tab.2 Changes in the mRNA level of CuZn SOD in peritoneal macrophages in mice after WBI with 0.075Gy X rays

Time/h	mRNA _{SOD} /mRNA _{GAPDH}
Sham	0.450
1	0.322
2	0.412
4	0.282
8	0.165
16	0.194
24	0.630
48	0.206

2.2 0.075Gy X 射线照射对 CuZn SOD m RNA 水平的影响

图 1 为 Northern 杂交的电泳带,通过激光扫描仪,测灰度值即可得到表 2 的数据。从表 2 可看出,0.075Gy X 射线照射后 4—16h 明显下降,24h 小鼠腹腔巨噬细胞 CuZn SOD m RNA 水平有升高趋势,但其幅度不超过 2 倍,而 48h 再度下降。



Fig.1 Results of northern blotting

3 讨论

自由基在生物体内普遍存在,它参与炎性白细胞杀伤机制,对 ATP 的合成与分解也有作用;自由基通过影响细胞内第 2 信使水平,协助完成细胞内的信息传递。超氧化物歧化酶(SOD)能有效地清除氧自由基从而抑制脂质过氧化反应,并能稳定细胞膜。实验证明,SOD 或过氧化氢酶(CAT)均可引起细胞增殖抑制和凋亡^[6],说明 SOD 清除 O₂^{-·}中断细胞间的信息联络。在正常条件下,O₂^{-·}可被 SOD 催化生成 H₂O₂ 和 O₂,再由 GSH-Px 和 CAT 分解成 H₂O。

电离辐射可通过水的辐解反应产生自由基,这属于外界因素在生物体内诱导自由基生成的途径;生物体或细胞在有氧代谢的过程中,也在不断地生成自由基,可称为内源性自由基^[1]。为了自身保护的需要,生物在长期进化中形成了一系列清除自由基的酶类,这些酶被统称为抗氧化酶系,如过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽转硫酶和超氧化物歧化酶。一旦机体产生的自由基超出了自身清除能力,则可通过对 DNA、生物膜以及蛋白质的损伤,而影响细胞的功能。电离辐射对机体的原发作用中自由基和活性氧的形成有重要意义。近年来的研究表明,辐射生物效应涉及活性氧的作用,这些活性氧主要攻击生物膜,引发脂质过氧化作用,产生脂质过氧化物,而 SOD 是防御自由基对机体损害的主要酶类之一。有关电离辐射对 CuZn SOD 活性的影响已有报道^[7,8],但有关电离辐射对巨噬细胞 CuZn SOD 活性的报道甚少。

本实验结果表明,0.075Gy X 射线照射后小鼠腹腔巨噬细胞 CuZn SOD 的活性无明显变化,而 2Gy X 射线照射后小鼠腹腔巨噬细胞 CuZn SOD 的活性随着时间的推移逐渐增强,在 8、16、24h 时其活性明显高于假照组($p<0.01$),然后逐渐回降至假照水平。我室以往的资料表明,低剂量电离辐射使 CD₄ 单阳性细胞的辅助功能和 CD₈ 单阳性细胞抑制功能增高,而且流式细胞术检测凋亡不但未增多甚至减少。只有当剂量超过 0.5Gy 时胸腺细胞凋亡才出现剂量依赖性增加,在 0.5Gy 以上及以下胸腺细胞凋亡反应不同,表现为 J 型剂量效应曲线。因此,当 2Gy X 射线照射时小鼠腹腔巨噬细胞中的氧自由基增多,直接激活 CuZn SOD 活性,此时 CuZn SOD 活性增强可能是对较大剂量电离辐射形成 ROI 的防御性反应。同时发现,0.075 Gy X 射线照射后小鼠腹腔巨噬细胞 CuZn SOD mRNA 水平有所下降。由于 CuZn SOD 的底

物是氧自由基,因而间接提示低剂量电离辐射对于小鼠腹腔巨噬细胞的自由基产生可能不但没有促进作用。相反,可能还有抑制作用,因而导致 CuZn SOD 转录下降,体现了生物体的节能原则。

参 考 文 献

- 1 刘树铮主编. 医学放射生物学, 北京:原子能出版社, 1998, 13—19
LIU S Z. Medical Radiobiology, Beijing: Atomic Energy Press, 1998, 13—19
- 2 Marklund S. Radiation Res, 1984, **100**(1):115—123
- 3 Kumar K. Pharmac ther, 1988, **39**(1—3):301—309
- 4 Chomczynski P, Sacchi N. Anal Biochem, 1987, **162**: 156—159
- 5 庞战军,周玫,陈瑗著. 自由基医学研究方法. 人民卫生出版社, 2000, 120—121
PANG Z J, ZGOU M, CHEN Y. Medical Research Methods of Free Radicals. People's Health Press, 2000, 120—121
- 6 Burdon R H, Gill V. Free Radic Res Comm, 1993, **19**(3):203—213
- 7 孙铁华,龚守良,张铭等. 白求恩医科大学学报, 1996, **22**(2):111—112
SUN T H, GONG S L, ZHANG M *et al.* J N Bethune Univ Med Sci, 1996, **22**(2):111—112
- 8 孙铁华,龚守良,张铭等. 辐射防护, 1996, **16**(6):449—452
SUN T H, GONG S L, ZHANG M *et al.* Radiat Prot, 1996, **16**(6):449—452

THE EFFECTS OF LOW DOSE IONIZING RADIATION ON THE ACTIVITY OF CuZn SOD IN PERITONEAL MACROPHAGES OF MICE

JIN Shunzi¹ HE Shumei² LIU Shuzheng¹

¹(The MH Radiobiology Research Unit, Jilin University, Changchun 130021)

²(Department of Cadre First Hospital, Jilin University, Changchun 130021)

ABSTRACT To observe the effects of low dose radiation(LDR) on the activity of the CuZn superoxide dismutase (CuZn SOD) in the peritoneal macrophages of mice, we used blot hybridization and MTT methods to detect the changes of this enzyme in the peritoneal macrophage of mice irradiated with 0.075Gy of X rays at both the mRNA level and the protein level (activity). The results showed that after irradiation with LDR the CuZn SOD mRNA expression in the macrophages increased, but the CuZn SOD activity had no noticeable change. However from 8 to 24h after irradiation with 2Gy, the CuZn SOD activity in the macrophages increased obviously.

KEYWORDS Ionizing radiation, Mouse Peritoneal macrophage, CuZn SOD, mRNA

CLC R811, R146