

WR-2721 对辐射所致脂类过氧化的影响 II 照射小鼠肝与脑亚细胞各部分脂类过氧化值

周 浔 方允中

(军事医学科学院放射医学研究所)

摘要 小鼠经 850 rad 照射后第 1、3、5、7 和 10 天, 肝与脑的亚细胞各部分脂类过氧化率均有不同程度的增高, 如微粒体 > 线粒体 > 胞核。其峰值出现于照射后第 3 天或第 5 天。腹腔注射 WR-2721 可使照射后亚细胞各部分的脂类过氧化程度显著减轻。

关键词 亚细胞器, 胞核, 线粒体, 微粒体, 多不饱和脂肪酸, LPO。

引 言

在前文中^[1~2], 我们报道了, 全身照射确可引起大鼠与小鼠的组织匀浆中脂类过氧化作用, 且可被抗放药物 WR-2721 所抑制。然而在组织匀浆中存有胞核、胞浆、线粒体、微粒体等细胞器, 其中质膜以及各种细胞器膜所含的脂类都可能发生脂类过氧化, 其产物也可能进入胞浆中。为了观察全身照射对动物组织的亚细胞部分脂类过氧化的差异以及 WR-2721 的效应, 我们在亚细胞水平上对辐射所致脂类过氧化作了进一步的研究。

材 料 和 方 法

1. 实验动物选择与处理

选用 9 周龄, 体重 25 g 左右上海种雄性小鼠若干只。除了 10 只不照射和 5 只给与 WR-2721 不照射作为正常对照外, 其它小鼠均全身一次照射 850 rad。照射源为 ^{60}Co , 剂量率为 59.85 rad/min。

2. 肝与脑匀浆制备

在照射后第 1、3、5、7 和 10 天, 任取 5~10 只小鼠断头致死。取出新鲜的肝与脑组织用冰冷的生理盐水冲洗, 以除去剩存血液, 吸干后称取一部分剪碎, 置于玻璃匀浆器中, 加入冰冷的 0.25 M 蔗糖溶液, 使成 10%(W/V) 匀浆。

3. 亚细胞各部分的分离

取肝或脑组织匀浆 5~10 ml, 用差速离心法^[3~4], 在 0~4℃ 条件下分离亚细胞各部分。采用日立 20 PR-520 型自动冰冻离心机, 分离胞核与线粒体。采用日立 80 P-7 型制备用超速离心机, 分离微粒体与可溶部分。

(1) 胞核 取 10% 匀浆 5~10 ml, 加入冰冷的 0.34 M 蔗糖溶液 5~10 ml, 以 700 g 离心 15 分钟, 所得沉淀物作为胞核部分。

(2) 线粒体 取分离细胞核后的上清液体, 以 8500 g 离心 10 分钟, 沉淀物为线粒体部分。

(3) 微粒体 取分离线粒体后的上清液, 以 100000 g 离心 60 分钟, 沉淀物为微粒体部分。

(4) 可溶部分 即分离微粒体后的上清液。将分离的核、线粒体与微粒体分别用冰冷的 0.25 M 蔗糖溶液制备成混悬液, 并取组织匀浆及可溶部分等样品, 分别进行脂类过氧化物(LPO)与蛋白质的测定。

4. LPO 测定

取 10% 肝、脑组织匀浆 0.1~0.2 ml 与细胞核、线粒体、微粒体的混悬液以及可溶部分各 0.2~0.4 ml, 按前文测定 LPO^[2]。

5. 蛋白质测定

将 10% 肝、脑组织匀浆稀释 20 倍, 核、线粒体、微粒体及可溶部分稀释 5 倍, 各取 0.25~0.50 ml, 按 Lowry 法测定蛋白质含量。

实 验 结 果

1. 肝匀浆与细胞器的脂类过氧化值(表 1)

小鼠经 850 rad 全身照射后其肝组织匀浆与亚细胞各部分 LPO 水平均较未照射的增加。而且给予 WR-2721 后, 可使脂类过氧化程度减轻, 从而显示它对 LPO 产量的抑制作用。

(1) 肝匀浆 照射后第 1、3、5、7、10 天均显著增加。其峰值出现于第 3 天和第 10 天。给予 WR-2721 可使照射后各天的 LPO 产量增加程度下降。除照射后第 1 天该药物抑制不明显

表 1 WR-2721 对 γ 射线 850 rad 照射小鼠肝亚细胞部分脂类过氧化的影响
Table 1 Effect of WR-2721 on lipid peroxide level in hepatic subcellular fraction of mice at various times after whole-body irradiation (850 rads)

组 别 Group	照射后(天数) Post-irradiation time (day)	LPO (n mol MDA/100 mg Protein) M $\pm$ SEM				
		组织匀浆 Tissue homogenates	胞 核 Nuclear fraction	线 粒 体 Mitochondrial fraction	微 粒 体 Microsomal fraction	可溶部分 Soluble fraction
对 照 Control	0	226.0 $\pm$ 14.8(10)	80.0 $\pm$ 14.6(5)	91.1 $\pm$ 10.6(5)	277.0 $\pm$ 21.5(10)	294.4 $\pm$ 47.7(5)
	1	285.7 $\pm$ 64.8(10)	90.0 $\pm$ 13.5(5)	138.7 $\pm$ 14.1(9)	487.4 $\pm$ 30.8(9)	386.2 $\pm$ 35.6(5)
	3	615.8 $\pm$ 87.6(10)	95.8 $\pm$ 19.0(7)	185.9 $\pm$ 15.5(10)	646.7 $\pm$ 37.5(10)	488.8 $\pm$ 38.5(5)
	5	442.0 $\pm$ 23.2(10)	104.6 $\pm$ 15.6(6)	155.6 $\pm$ 24.9(8)	536.2 $\pm$ 33.4(8)	565.2 $\pm$ 28.8(5)
	7	399.0 $\pm$ 28.9(10)	95.0 $\pm$ 8.6(5)	152.1 $\pm$ 25.1(6)	345.3 $\pm$ 19.3(6)	
	10	659.5 $\pm$ 42.9(9)	84.0 $\pm$ 12.4(5)	148.3 $\pm$ 27.1(6)	285.3 $\pm$ 14.9(6)	584.2 $\pm$ 50.1(5)
WR- 2721	0	225.8 $\pm$ 19.0(5)	66.0 $\pm$ 3.6(5)	91.8 $\pm$ 17.2(5)	269.4 $\pm$ 21.4(5)	297.0 $\pm$ 42.3(5)
	1	232.3 $\pm$ 49.5(10)	67.2 $\pm$ 9.8(5)	94.0 $\pm$ 9.6(9)	284.5 $\pm$ 37.0(9)	261.4 $\pm$ 28.4(5)
	3	365.9 $\pm$ 34.6(10)	68.1 $\pm$ 8.4(7)	97.4 $\pm$ 11.1(10)	316.2 $\pm$ 19.9(10)	327.0 $\pm$ 38.7(5)
	5	317.3 $\pm$ 25.8(10)	67.6 $\pm$ 5.4(6)	96.3 $\pm$ 12.3(8)	389.0 $\pm$ 40.0(9)	280.8 $\pm$ 16.2(5)
	7	310.6 $\pm$ 25.9(10)	66.6 $\pm$ 9.9(5)	95.5 $\pm$ 14.7(6)	262.6 $\pm$ 34.4(6)	
	10	342.1 $\pm$ 23.3(9)	68.6 $\pm$ 15.7(5)	92.5 $\pm$ 10.6(6)	268.1 $\pm$ 21.3(6)	307.2 $\pm$ 40.0(5)

数据为平均值 $\pm$ 标准误。()内为动物数。与未给药组比较, *P<0.05 **P<0.01

(1) Within parenthesis are mice numbers.

(2) As compared with control group, *P<0.05, **P<0.01.

外, 其它各天的抑制作用均显著或非常显著。

(2) 胞核 照射后第 1、3、5、7、10 天 LPO 水平增加, 其中以第 5 天增加非常显著, 而其它天均不显著。WR-2721 可使第 5 天 LPO 天增加程度显著降低, 但对其它天的效应不显著。

(3) 线粒体 照射后第 1、3、5、7、10 天, 其 LPO 水平显著增加, 其中以第 3 天增加最高。WR-2721 可使照射后肝线粒体 LPO 产量受抑制, 而且除第 10 天外, 均显著或非常显著。

(4) 微粒体 照射后第 1、3、5、7 天, 其 LPO 水平显著增加。第 10 天略有增加。给予 WR-2721 可抑制照射后的肝微粒体 LPO 产量增加程度, 其中以第 1、3、5 天抑制非常显著。

(5) 可溶部分 照射后第 1 天, 其 LPO 水平增加 31.1%, 第 3 天 66.0%, 第 5 天 91.9% 和第 10 天 98.0%。LPO 水平似随照射后时间延长而增加, 与未照射的动物相比较, 差异显著或非常显著。WR-2721 对可溶部分 LPO 水平增加程度的抑制, 均达到显著和非常显著水平。

2. 脑匀浆与亚细胞各部分脂类过氧化值(表 2)

(1) 脑匀浆 照射后第 1、3、5、7、10 天, 其 LPO 水平显著增加, 其峰值出现于第 5 天。WR-2721 可抑制 LPO 产量的增加。与未给药的动物比较, 差异显著或非常显著。

(2) 胞核 照射后 1—10 天脑细胞核 LPO 水平显著增加。但 WR-2721 可抑制其 LPO 产量, 与未给药的比较, 除第 3 天与第 5 天的差异显著外, 其它各天均不显著。

(3) 线粒体 照射后 1—10 天脑线粒体 LPO 水平增加, 与未照射相比较均非常显著。给予 WR-2721, 可抑制 LPO 产量, 与未给药动物比较, 除第 1 天和第 10 天外, 其它各天差异显著或非常显著。

(4) 微粒体 照射后 1~7 天脑微粒体 LPO 水平显著增加, 其中以第 5 天增加最高。第 10 天

表 2 WR-2721 对 γ 射线 850 rad 照射小鼠脑亚细胞部分脂类过氧化的影响
Table 2 Effect of WR-2721 on lipid peroxide level in subcellular fraction of brain in mice irradiated with 850 rads

组别 Group	照射天数 Post-irradiation time (day)	蛋白质 LPO(n mol MDA/100 mg protein) M $\pm$ SEM				
		组织匀浆 Tissue homogenates	胞核 Nuclear fraction	线粒体 Mitochondrial fraction	微粒体 Microsomal fraction	可溶部分 Soluble fraction
对 照 Control	0	176.4 $\pm$ 11.6(10)	69.4 $\pm$ 5.7(5)	78.8 $\pm$ 6.3(10)	267.4 $\pm$ 16.9(10)	196.2 $\pm$ 24.0(5)
	1	238.7 $\pm$ 33.1(10)	88.4 $\pm$ 10.4(5)	116.7 $\pm$ 17.0(9)	380.7 $\pm$ 27.6(9)	256.2 $\pm$ 33.7(5)
	3	335.4 $\pm$ 29.6(10)	93.1 $\pm$ 12.1(7)	132.5 $\pm$ 21.8(10)	394.3 $\pm$ 22.2(10)	342.6 $\pm$ 23.1(5)
	5	384.0 $\pm$ 24.6(10)	97.5 $\pm$ 11.3(6)	150.6 $\pm$ 20.1(8)	425.5 $\pm$ 41.1(8)	455.0 $\pm$ 63.9(5)
	7	334.1 $\pm$ 26.1(10)	97.8 $\pm$ 18.9(5)	120.3 $\pm$ 21.2(6)	342.1 $\pm$ 24.1(6)	—
	10	290.6 $\pm$ 22.9(9)	88.0 $\pm$ 12.6(5)	104.0 $\pm$ 11.6(6)	285.1 $\pm$ 11.3(6)	350.2 $\pm$ 28.8(5)
WR- 2721	0	181.6 $\pm$ 24.4(5)	68.0 $\pm$ 6.2(5)	79.4 $\pm$ 11.0(5)	264.8 $\pm$ 24.3(3)	199.6 $\pm$ 33.3(5)
	1	205.6 $\pm$ 20.7(10)	73.4 $\pm$ 14.3(5)	81.4 $\pm$ 8.0(9)	331.7 $\pm$ 23.8(9)	199.8 $\pm$ 20.2(5)
	3	234.0 $\pm$ 18.4(10)	68.8 $\pm$ 9.5(7)	95.5 $\pm$ 7.5(10)	273.9 $\pm$ 13.3(10)	259.6 $\pm$ 32.1(5)
	5	218.4 $\pm$ 15.2(10)	68.2 $\pm$ 11.5(6)	97.0 $\pm$ 14.5(10)	278.7 $\pm$ 25.7(8)	275.6 $\pm$ 17.0(5)
	7	215.6 $\pm$ 14.1(10)	70.0 $\pm$ 4.7(5)	83.8 $\pm$ 12.5(6)	269.1 $\pm$ 12.8(6)	—
	10	216.2 $\pm$ 14.6(9)	71.2 $\pm$ 13.3(5)	81.2 $\pm$ 9.8(6)	265.1 $\pm$ 15.5(6)	257.8 $\pm$ 22.4(5)

数据为平均值 $\pm$ 标准误()内为动物数。与未给药组比较 *P<0.05, **P<0.01。

(1) Within parenthesis are mice numbers.

(2) As Compared with control group. *P<0.05, **P<0.01.

仅略有增加。WR-2721可抑制照射后LPO产量,其中以第1天、第3天、第5天与第7天抑制显著或非常显著。

(5)可溶部分 照射后第1、3、5、10天,其LPO水平显著增加,而WR-2721却可使其LPO产量抑制,而且与未给药的比较,差异显著或非常显著。

讨 论

生物膜的辐射效应主要为膜的脂蛋白结构损伤。其机制的关键在于脂类过氧化,但是脂类过氧化不仅决定于电离辐射的外在因素,而且还受内在因素的影响,如抗氧化剂的种类和浓度以及有关酶类的作用等^[5,6],各种组织及其细胞器中内在因素不尽相同,如肝细胞的内质网混合功能氧化酶活性高于脑。因此,经850 rad照后,小鼠肝与脑的匀浆及亚细胞各部分LPO水平增加的程度与WR-2721的抑制效应均有明显的差异。

照射后小鼠肝与脑的亚细胞各部分的LPO水平均有不同程度的增加,但肝匀浆及某些细胞器LPO含量较脑为高,而WR-2721对肝与脑LPO产量的抑制两组之间却差异不大。我们推测,这可能与肝脏对辐射的敏感性较脑为高,而抗氧化剂与酶体系的保护作用较后者为低有关。WR-2721对肝与脑的LPO产量的抑制可能与抗氧化剂和酶体系无关^[7,8]。

照射后肝与脑组织匀浆中可溶部分的LPO水平随着照后的时间增加而越高于微粒体。这可能是脂质过氧化反应的终产物丙二醛(MDA)从亚细胞扩散到胞浆中。可溶部分LPO的增加原因还可能是肝脑以外的组织被射线诱发释放的脂类过氧化产物,通过血液循环进入肝脑,汇集至可溶部分^[9,10]。

微粒体中不饱和脂肪酸含量较线粒体为多,而且存在细胞色素P450-NADPH氧化酶、ADP-Fe³⁺等酶体系与非酶体系产生的活性氧可引发脂类过氧化^[11~12]。线粒体中产生活性氧的条件不及微粒体,但它清除超氧化物自由基的能力高于微粒体,因为它除含有铜锌超氧化物歧化酶外,尚含有锰超氧化物歧化酶^[11]。也许由于这些原因,照射后微粒体LPO增加高于线粒体。WR-2721对线粒和微粒体LPO抑制作用是类似的,但随照射后不同时间的LPO增加程度而有所不同。关于其药理机制尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 周浔,仲伟强,方允中,中华放射医学与防护杂志(付印中)1985
- [2] 周浔,方允中,仲伟强,(辐射研究与辐射工艺学报)3,4:16(1985)
- [3] R. M. C. Waweson, Biochem. J., 84, 497(1962).
- [4] G. H. Hogeboom in "Methods in Enzymology (S. P. Colowick and N. O. Kaplan eds.)" Vol. 1 p. 16, Academic Press, New York. (1955).
- [5] P. B. McCay and J. Lee. Poyer, "The Enzyme of Biological Membranes" (edited by A. Martonose) Vol. 4, 239, Plenum Press, New York & London, (1976).
- [6] E. D. Wills and J. Rotblat, Int. J. Radiat. Biol., 8, 551(1964).
- [7] A. H. Maddy, Int. Rev. Cytol., 195, 265(1966).
- [8] A. W. T. Konings and S. K. Oosterloo, Radiat. Res., 81, 200(1980).
- [9] I. R. Politzer, G. W. Griffin and J. L. Laseter, Chemicobiol. Interact., 3, 73 (1971).
- [10] Z. Placer, A. Veselkova and R. Rath., Experientia, 21, 19(1965).
- [11] I. Fridovich, Ann. Rev. Biochem., 44, 147(1975).
- [12] M. Tien, T. M. Svingen and S. D. Aust., Federation Proc., 40, 179(1981).

(1984年9月7日收到)

EFFECT OF WR-2721 ON LIPID PEROXIDATION INDUCED BY IONIZING RADIATION

II. LIPID PEROXIDES IN SUBCELLULAR FRACTIONS OF LIVER AND BRAIN OF WHOLE-BODILY IRRADIATED MICE

Zhou Xun Fang Yunzhong

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences)

ABSTRACT There was a variety of increasing rates of lipid peroxidation in subcellular fractions of liver and brain in mice on the 1st, 3rd, 5th, 7th and 10th day after the irradiation of 850 rad, as shown in the following sequence: microsome > mitochondria > nucleus. The peak values appeared on the 3rd or 5th day. Intraperitoneal injection of WR-2721 gave an inhibitory effect on the LPO formation in subcellular fraction of liver and brain.

KEY WORDS Subcellular fraction; Mitochondria; Microsome; Polyunsaturated acid; LPO(lipid peroxide).

关于召开第三次全国辐射研究学术会议的第一次通知

为了交流自 1982 年召开的第二次全国辐射研究学术会议以来我国辐射研究工作者在辐射研究领域取得的成果和经验,我学会决定于 1986 年第四季度在北京召开第三次全国辐射研究学术会议,并委托军事医学科学院放射医学研究所主办这次会议。这次会议将就辐射研究的各个方面进行学术交流,从基础研究直到在工、农、医、国防和环境等各个方面的应用研究。

经学会理事商议,本次会议将着重就下列五个方面进行学术交流:

- (1) 辐射化学基础。
- (2) 辐射物理和剂量学
- (3) 体外细胞的放射生物学
- (4) 辐射的遗传效应和致癌效应
- (5) 整体放射生物学:肿瘤和正常组织

我们希望全国各地的辐射研究工作者,按上述五方面,积极准备论文和报告,把这次会议开好。