

WR-2721 对辐射所致脂类过氧化的影响 I

全身照射小鼠组织中脂类过氧化值

周 浔 方允中 仲伟强

(军事医学科学院放射医学研究所)

摘要 500~2000 rad 照射后第3天,小鼠的肝、脑、肾、心与骨髓细胞的脂类过氧化物(LPO)水平随照射剂量增加而增加,但腹腔注射 WR-2721 可使 LPO 显著降低。850 rad 照射后10天内,小鼠的肝、脑、肾、睾丸与骨髓细胞的 LPO 增加量随照射后时间不同而有所差异,但 WR-2721 均可抑制 LPO 的生成,其抑制作用在一定时间范围内,随照射后时间的延长而递增。

关键词: LPO, WR-2721, TBA, 小鼠, 组织。

引 言

脂类过氧化可引起生物膜中磷脂结构的变化,导致生物大分子的损伤与细胞代谢的广泛性障碍,因此,辐射损伤时是否发生脂类过氧化物物质变化,一直是值得探讨的问题。体外辐照使动物组织与细胞器部分发生脂类过氧化已有报道^[1~3],但全身照射后的动物组织中脂类过氧化物(简称 LPO)水平的变化却无一致的结论。为了探讨这个问题,我们曾测定了全身照射后大鼠组织中 LPO,观察到 γ 射线照射可引起大鼠组织脂类过氧化加强^[4],但是全身照射小鼠是否可得到类似结果却未进行研究。WR-2721[S-2-(3-氨基基胺)乙基硫代磷酸]是一种具有较高效价的辐射防护药。如果它能减轻辐射所致脂类过氧化物,不仅有助于探讨全身照射后动物组织脂类是否发生过氧化的问题,而且对阐明该药物的作用机制也有参考意义。为此,我们观察了 WR-2721 对照射小鼠组织脂类过氧化的影响。

实 验 方 法

实验1 选取上海种小白鼠,年龄为两个月,体重 20~25 g 雄性,分为给药组与不给药组。每组再分为不照射、及照射 500、1000、1500 与 2000 rad 等 5 组。两组在相同的实验条件下,用 ^{60}Co γ 线照射不同剂量,剂量率为 60.51 rad/min,给药组在照前 20 分钟给每只鼠腹腔注射 WR-2721 10 mg。

在照后第3天,将小鼠断头致死。取出肝、脑、肾和心、用冰冷 0.9% NaCl 溶液(下简称盐水)冲洗,除去残存血液。拭干后称取一定量组织,剪碎置玻璃匀浆器中,加入冰冷 1.15% KCl 溶液,研磨成 10%组织匀浆。制备骨髓细胞悬液时,先取出小鼠股骨,剥除软组织,然后用冰冷盐水从剪碎股骨中冲洗出骨髓细胞。离心后取出沉淀的细胞,加入盐水使成一定体积的悬液,进行细胞计数,并进一步制成匀浆。

LPO 测定^[5~8],取组织匀浆 0.1~0.2 ml,加入 8.1%十二烷基硫酸钠(SDS) 0.2 ml, 0.2 M

乙酸盐缓冲液(PH 3.5) 1.5 ml, 0.8% 硫代巴比土酸(TBA)水溶液 1.5 ml, 并加水至 4.0 ml。置于 95℃ 水浴中加热 60 分钟。冷却后再加水 1.0 ml, 然后加正丁醇-吡啶(15:1, v/v)混合液 5.0 ml, 振荡 1 分钟。在 3000 r.p.m 离心 10 分钟。取出上层有机溶液相, 于 532 nm 处测定光密度。以 1,1,3,3-四乙氧丙烷(TEP)作为检测丙二醛(MDA)的标准。取 5 n mol TEP 按同法操作测定光密度。按下列计算组织中 LPO 值。

$$\text{LPO}(\text{n mol MDA}/100 \text{ mg 蛋白质}) = 5 \times \frac{f}{F} \times \frac{1}{0.1 \times \text{匀浆量}(\text{ml})} \times \frac{1}{\text{每克组织中蛋白质}(\text{mg})} \times 100$$

上式中 f 为组织匀浆光密度; F 为标准(TEP)光密度。组织中蛋白质含量按 Lowry 法^[7]测定。

实验 2 实验方法与实验 1 相同, 实验动物分为给药组与不给药组, 并再分为不照射与照射 850 rad 两小组。在照后 12 小时及第 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 天, 分别将小鼠断头致死, 取出肝、脑、肾、睾丸和骨髓细胞, 测定 LPO 及蛋白质。

实 验 结 果

1. 不同剂量照射后小鼠组织中 LPO 的变化

小鼠经 500~2000 rad 全身照射后第 3 天, 组织中蛋白质含量, 除骨髓细胞随照射剂量增加而显著下降(即照射 2000 rad 与未照射比较)外, 其它组织均无明显影响。

500、1000、1500 与 2000 rad 照后第 3 天, 小鼠的肝、脑、肾、心与骨髓细胞等组织的 LPO 均较未照射的小鼠有显著增加(表 1)。其中肝组织分别增加 98.0、177.9、246.8 和 315.7%; 脑

表 1 WR-2721 对小鼠经不同剂量照射后第 3 天组织中 LPO 的影响
Table 1 Effect of WR-2721 on lipid peroxide in various tissues of mice the 3rd day after the exposure of different doses

	组 织 Tissue	LPO(n mol MDA/100 mg 蛋白质 protein)±SEM(n=5)				
		0	500 rad	1000 rad	1500 rad	2000 rad
对 照 Control	肝 Liver	232.0±19.2	459.4±41.0	644.8±50.4	804.8±107.4	964.6±85.6
	脑 Brain	174.6±22.7	288.3±36.6	366.8±36.8	369.2±35.3	431.0±24.8
	肾 Kidney	184.4±10.5	295.2±33.9	327.0±24.9	342.6±15.4	394.6±23.8
	心 Heart	164.2±13.2	282.0±30.1	399.0±30.6	420.6±41.5	426.0±30.2
	骨髓细胞 Bone marrow cells	34.0±3.6	154.0±21.3	361.0±50.2	664.8±113.4	1243.4±100.2
WR-2721	肝 Liver	222.2±25.2	278.8±21.2**	409.2±43.6*	735.8±95.5	800.2±95.9
	脑 Brain	174.6±10.4	213.4±61.8	270.6±25.9*	331.0±38.5	370.4±37.8
	肾 Kianey	184.4±15.8	234.0±36.2	260.8±28.0	312.6±37.7	335.6±48.2
	心 Heart	164.5±23.0	223.4±32.1	279.0±26.8*	361.4±40.9	369.2±37.2
	骨髓细胞 Bone marrow cells	32.1±3.0	49.2±11.4**	163.0±28.9**	467.0±44.2*	838.8±73.1*

注: 与对照比较, *P<0.05 **P<0.01. Compared with control group *P<0.05 **P<0.01

表 2 小鼠经 γ 射线 850 rad 全身照射后组织中蛋白质含量的变化

Table 2 Change of protein contents in various tissues of mice irradiated with 850 rad

组 织 Tissue	照后天数 Post-irradiation time (day)	蛋白质 protein (mg/g tissue) M $\pm$ SEM	
		Control	WR-2721
肝 Liver	0-7	149.2 $\pm$ 4.6(75)	153.9 $\pm$ 4.9(70)
	8-10	138.9 $\pm$ 6.5(29)	144.6 $\pm$ 6.3(29)
脑 Brain	0-4	150.5 $\pm$ 4.4(55)	152.7 $\pm$ 4.5(44)
	5-8	143.7 $\pm$ 6.2(40)	142.0 $\pm$ 5.0(36)
	9-10	139.5 $\pm$ 4.3(19)	157.9 $\pm$ 9.1(27)
肾 Kidney	0-5	154.3 $\pm$ 4.5(65)	155.8 $\pm$ 5.6(59)
	7-10	145.0 $\pm$ 4.1(39)	145.6 $\pm$ 8.3(28)
睪丸 Testis	0-2	155.1 $\pm$ 3.9(35)	155.9 $\pm$ 4.2(34)
	3-5	146.4 $\pm$ 6.2(30)	150.4 $\pm$ 3.8(30)
	7-9	134.9 $\pm$ 3.8(30)	145.5 $\pm$ 8.8(30)
	10	126.3 $\pm$ 4.6(9)	138.4 $\pm$ 5.1(9)
骨髓细胞 Bone marrow cells	0	119.2 $\pm$ 3.7(10)	118.3 $\pm$ 5.1(10)
	0.5-1	118.4 $\pm$ 3.7(15)	121.4 $\pm$ 7.1(15)
	2	105.8 $\pm$ 3.2(10)	117.0 $\pm$ 6.9(10)
	3	97.5 $\pm$ 3.9(10)	104.5 $\pm$ 6.9(10)
	4	94.7 $\pm$ 3.2(10)	102.8 $\pm$ 6.5(10)
	5	85.0 $\pm$ 7.7(10)	94.4 $\pm$ 4.2(10)
	7	78.6 $\pm$ 8.5(10)	89.9 $\pm$ 7.4(10)
	8	79.4 $\pm$ 8.0(10)	88.3 $\pm$ 6.8(10)
	9	70.4 $\pm$ 7.6(9)	80.2 $\pm$ 6.8(9)
	10	66.3 $\pm$ 5.0(9)	76.3 $\pm$ 7.5(9)

注: 骨髓细胞蛋白质, 以 mg/10⁷ 个细胞数括弧内为动物数。

与未照射比较, *P<0.05, **P<0.01.

(1) protein contents in bone marrow cell, expressed as mg/10⁷ cells.

(2) Within parenthesis are animal numbers.

(3) As compared with unirradiated group, *P<0.05, **P<0.01.

肝: 除照后 12 小时及第一天, LPO 增加量与未照射组比较, 差别不显著外, 照后 2~10 天均明显增加, 其中第 3 天和第 9 天或第 10 天出现峰值, 而且随照后的时间延长而增高(图 1)。

WR-2721 除对 850 rad 照射后 12 小时的小鼠肝组织 LPO 量影响不明显外, 其余照后 1~10 天均较未给药照射组有明显的抑制作用, 其中以第 3 天、第 9 天与第 10 天抑制程度最大。

脑: 照射后 12 小时 LPO 增加 14.7%, 与未照射的小鼠比较, 差别不显著。但第 1 天至第 10 天分别显著或非常显著增加。其峰值出现于第 4 天与第 9 天(图 2)。

WR-2721 对照后 12 小时的 LPO 产量仅抑制 5.9%。但其后 1~10 天中, 除第 2 天不显著外,

组织增加 65.1、110.2、113.3 和 146.8%; 肾组织增加 60.0、77.3、85.7 和 113.9%; 心肌增加 71.7、142.9、156.1 和 159.4%; 骨髓细胞增加 352.9、961.7、1855.2 和 3557.0%。LPO 水平的增加与照射剂量似有平行关系。给予 WR-2721 的小鼠受照下第 3 天, 虽然 LPO 也有显著增加, 但与未给药(照射)组比较均受到不同程度的抑制而减少, 其中肝 LPO 分别减少 39.4、36.5、5.0 和 17.1%, 脑: 26.0、26.3、10.4 和 14.1%; 肾: 20.8、20.3、8.8 和 15.0%; 心: 20.8、30.1、14.1 和 13.4%; 骨髓细胞: 68.1、54.9、25.3 和 31.0%。由此可知, 辐射所致骨髓细胞 LPO 产量高于其它组织, 而 WR-2721 对其抑制率也较高, 其次为肝、脑、心和肾。但 WR-2721 对组织中脂类过氧化产生的抑制程度随着照射剂量的增加而减弱。

2. 照射后不同时间小鼠组织中 LPO 的变化

850 rad 照射后 1~10 天小鼠肝、脑、肾与睪丸等组织的蛋白质含量均无显著变化, 但骨髓细胞中蛋白质含量却随照射时间延长与未照射相比较而有显著下降(表 2)。而且照射后第 5~10 天, 给予 WR-2721 组的骨髓细胞中蛋白质含量显著低于非照射组。

850 rad 照射后小鼠组织中 LPO 有时相性变化, 但 WR-2721 对 LPO 的产生却显示明显的抑制作用, 由于各种组织中 LPO 变化不同, 其 WR-2721 抑制程度也各有差异。现分别将其结果简述如下:

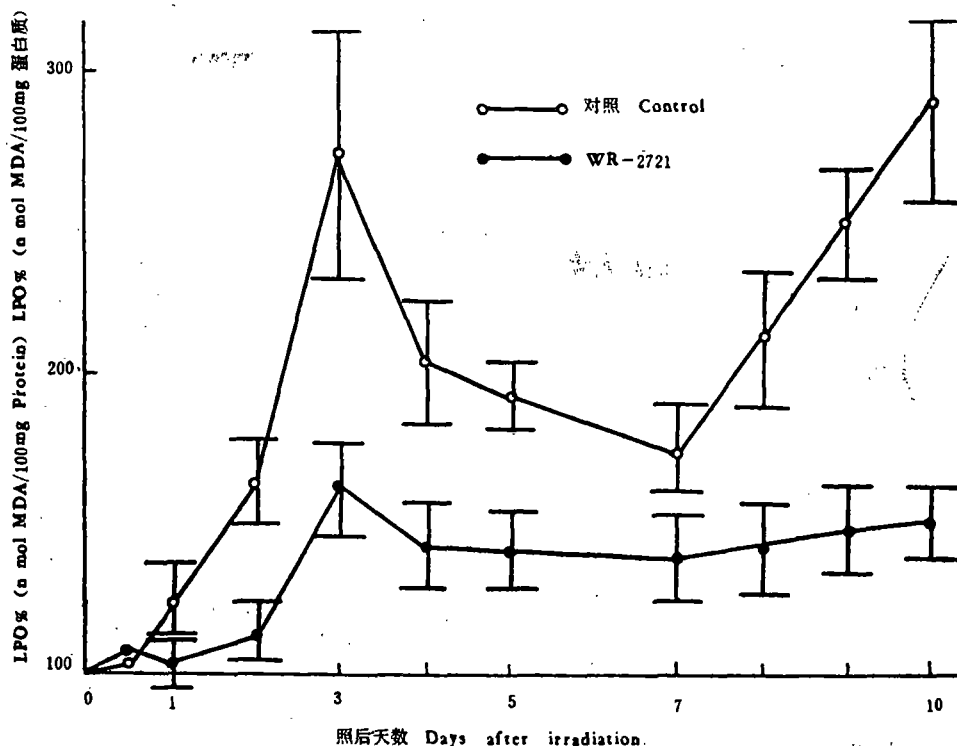


图 1 WR-2721 对受 850 rad 照射小鼠肝组织 LPO 的影响

Fig.1 Effect of WR-2721 on lipid Peroxide values in liver of irradiated mice(850 rad)

其余各天对 LPO 产量抑制均显著或非常显著。

肾：除照后 12 小时及第 1 天，LPO 增加量较未照射组无显著差别外，其后各天均较未照射组显著增加，其中 3~5 天及 8~9 天差别明显(图 3)。

给予 WR-2721 照后 12 小时与第 1 天 LPO 产量抑制不明显。但第 2~10 天较未给药组有显著或非常显著的抑制作用。

睾丸：照后 LPO 增加量与未照射比较，差别均非常显著(图 4)。

给予 WR-2721 除对照后 12 小时及 1 天 LPO 产量抑制不显著外，其余各天均较未给药照射组有显著或非常显著的抑制作用。

骨髓细胞：照射后 12 小时与第 1~10 天，LPO 水平分别增加 55.9、236.0、485.7、907.7、1315.5、1818.6、2467.7、3922.2、6544.7 和 10264.2%(图 5)。

若将 LPO 产量对数与照后时间作图，则呈直线回归(图 6)。

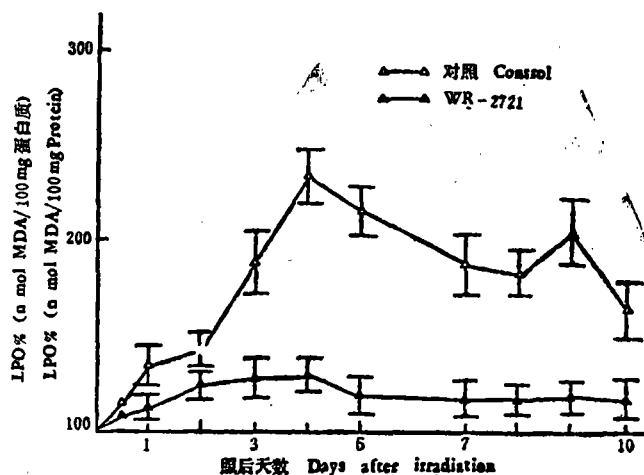


图 2 WR-2721 对 γ 射线 850 rad 全身照射小鼠脑组织脂类过氧化值的影响

Fig.2 Effect of WR-2721 on lipid Peroxide values in brain of irradiated mice (850 rad)

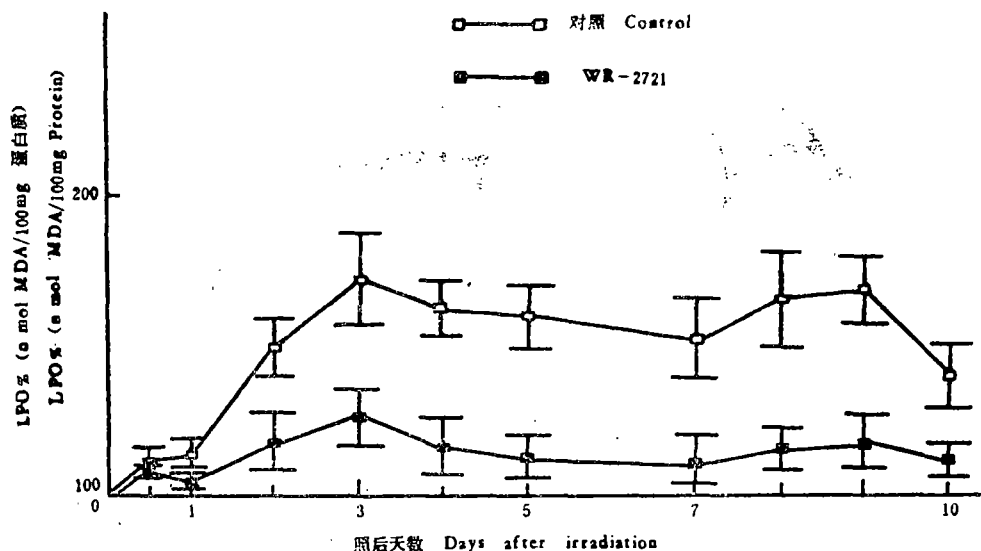


图 3 WR-2721 对 γ 射线 850 rad 全身照射小鼠肾组织脂类过氧化值的影响
Fig.3 Effect of WR-2721 on lipid Peroxide values in kidney of irradiated mice (850 rad)

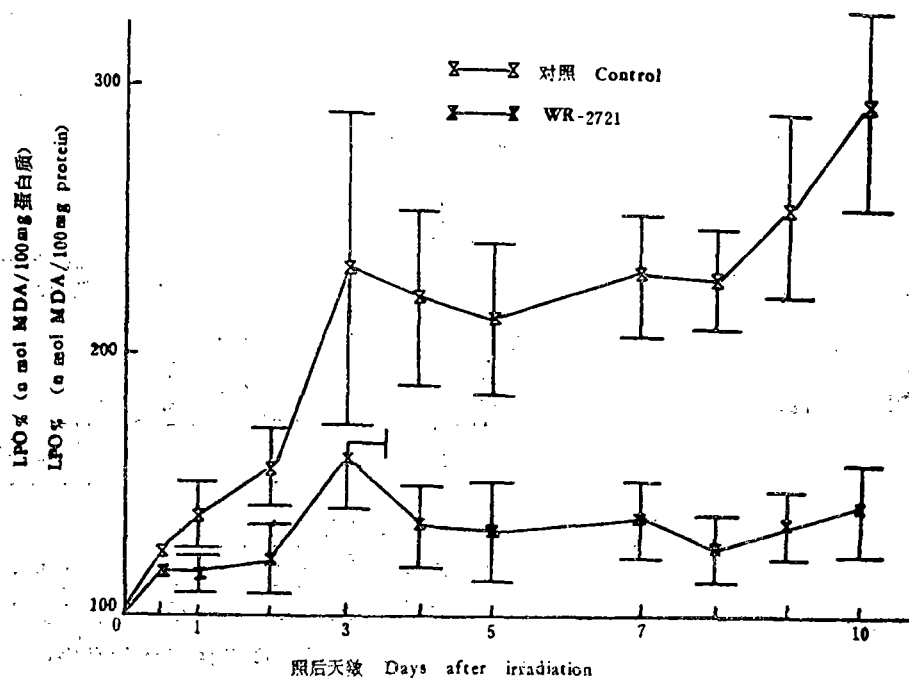


图 4 WR-2721 对 γ 射线 850 rad 全身照射小鼠睾丸组织脂类过氧化值的影响
Fig.4 Effect of WR-2721 on lipid Peroxide values in testis of irradiated mice(850 rad)

给予 WR-2721 对照后各组 LPO 产量均有非常显著的抑制。骨髓细胞 LPO 产量受抑制与睾丸组织类似, 但抑制程度高于后者, 并随照后的时间延长而增强。两者的 LPO 产生量的对数亦与照后时间呈直线相关。其相关直线与未给药照射组相关直线之间差别非常显著。

讨 论

OH 自由基、单重态氧($^1\text{O}_2$)、超氧化物自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)等活性氧可引发不饱和脂肪酸过氧化,但抗氧化剂可抑制 LPO 的生成,在正常生理情况下, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 不断地从代谢反应中产生,也不断地被体内因素如维生素 E 及超氧化物歧化酶等作用下清除掉,从而使机体受到保护^[8-10]。我们在大鼠和小鼠的实验中,观察到正常组织中存在 LPO,但其水平都很低,一般不会达到损伤组织的程度。在某些病理情况下,LPO 的生成与清除失去了平衡,其水平可能增高。

全身照射后动物组织中 LPO 是否增加曾有过争论。Kergonou^[3]指出,整体照射可引起大鼠组织中脂类过氧化,我们也得到类似结果。在本实验中,我们又观察到小鼠受照后也可发生组织脂类过氧化,

并证实辐射防护剂-WR-2721 可使脂类过氧化大为减轻。这些结果可以确证 γ 射线可引起动物的某些组织发生脂类过氧化,但其出现时间和轻重程度表明其机制不仅与原发作用有关,而且在相当大的程度上与继发作用有关。在原发作用中,电离辐射除通过直接作用破坏生物膜中不饱和脂肪酸外,尚可通过水辐解产生的自由基引发脂类过氧化。继发作用比原发作用复杂,如引发脂类过氧化的自由基也可来自异常的生化反应^[10]。此外,还可能与其它因素造成 LPO 的生成。由于各组织中清除自由基的能力与抗氧化剂含量的变化,既受辐射损伤作用的影响,又受内在因素的制约。因此,不同的组织中 LPO 水平的变化遂出现明显差异。

肝、肾、心和脑被认为是辐射不敏感的组织,但有的学者不同意这种论点,其理由是某些生化代谢异于正常。在我们的实验中,观察到照射后这些组织中 LPO 异常增加,也是一些佐证。但对其机制,尚未见深入研究。我们推想,既然辐射损伤的发展使这些组织的生化代谢发生变化,则 $\cdot\text{OH}$ 、 $^1\text{O}_2$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的生成就可能增加,其它因素如 ADP-F_2^+ 细胞色素 P 450、NADPH 酶系的引发脂类过氧化作用可能加强,抗氧化剂的浓度也可能下降^[11]。这些都会造成 LPO 水平增加。按理在 LPO 的损伤作用下,这些组织中生物膜及其它生物大分子,如核酸也会受到破坏,但其组织结构并未发现明显变化。我们认为,这可能与这些组织的修复能力较强有关。已知照射后脂类合成能力增强,这些组织中生物膜中磷脂虽因脂类过氧化遭到破坏,但可能通过膜结合酶所作用的一个循环过程而被重建^[12]。在此意义上,这些组织确是辐射不敏感,但从脂类过氧化反应来看,它们应属于“敏感”组织。

骨髓与睾丸均属于辐射敏感组织。照射后产生脂类过氧化的机制基本上与肝、肾、心、脑相同。但其细胞结构与功能是有差异的,即使为同一类细胞,也可能处于不同细胞分裂周期,因而

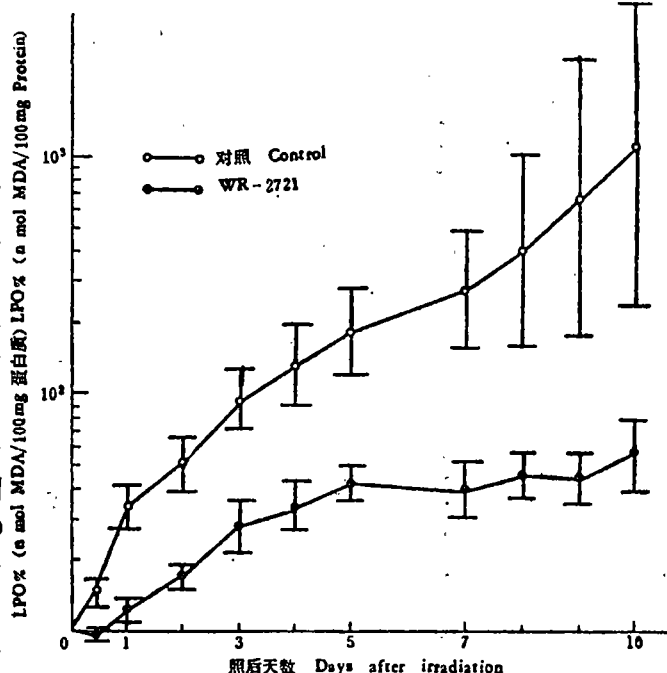


图5 WR-2721对 γ 射线850 rad全身照射小鼠骨髓细胞脂类过氧化值的影响

Fig.5 Effect of WR-2721 on lipid Peroxide values in bone marrow cells of irradiated mice (850 rad)

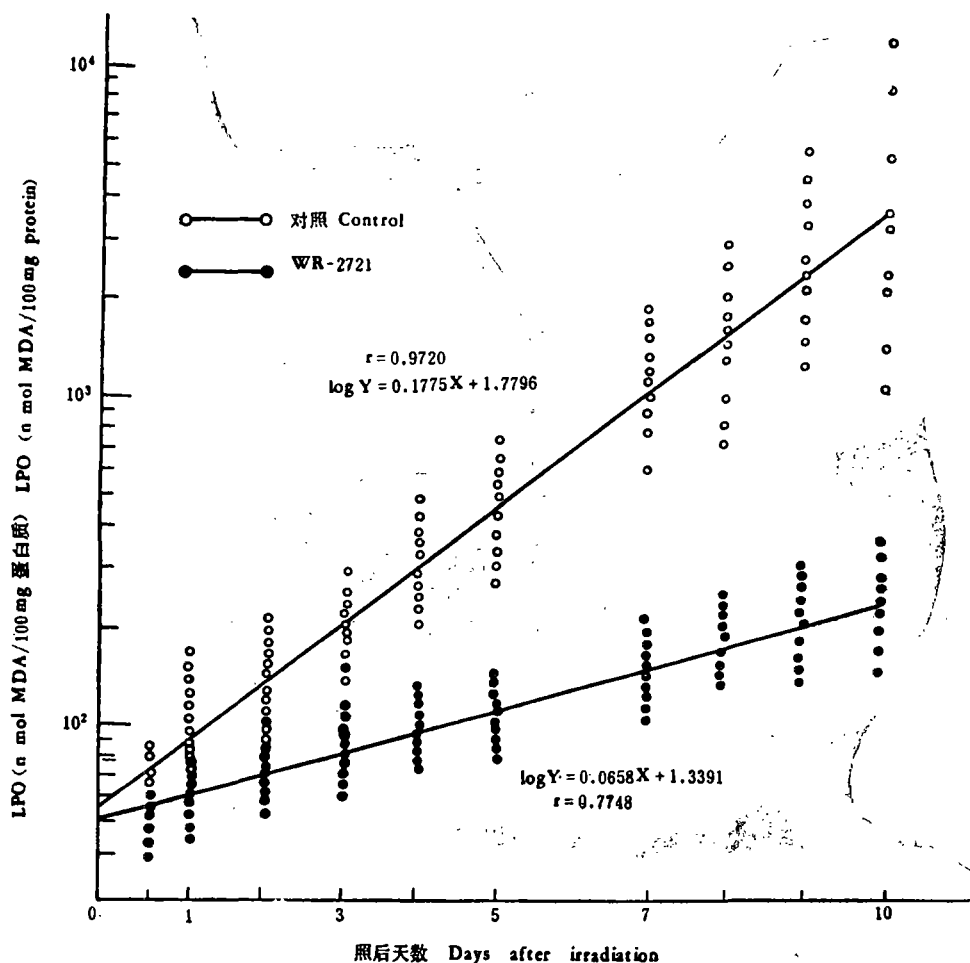


图6 WR-2721 对 γ 射线 850 rad 全身照射小鼠骨髓细胞脂类过氧化值的影响。

Fig.6 Regression line for lipid Peroxide level in bone marrow cells of irradiated mice with or without administration of WR-2721 and the days after 850 rad irradiation

辐射敏感性大有差异。这两种组织在照射后均发生病理形态学上的改变,如萎缩,坏死等。按湿重组织细胞中 LPO 水平计算,已较正常增加。若按活存细胞数或 DNA 为基数计算 LPO 含量,则可能由于细胞数或 DNA 的大幅度减少而显示更大程度的增加。总之,由于破坏程度的增高及修复能力的下降或消失,加剧了脂类过氧化的恶性循环,可能是骨髓与睾丸组织细胞的辐射敏感性与 LPO 水平增高的主要原因。

WR-2721 是一种胺烷基硫代磷酸化合物^[13~15],扩散到细胞内,在脱磷酸酶等催化下可使分子中硫磷酸盐分解形成-SH 基化合物,抑制自由基反应,从而降低了脂类过氧化,保护生物膜与生物大分子,并减轻了机体辐射损伤,尤其是继发性损伤。它对组织中 LPO 生成的抑制程度之所以与照射后各组织 LPO 水平与峰值的变化以及时间的久长而相应增强,可能与上述机制有关,但要从亚细胞水平与分子水平阐明其机制,尚需要作相应的研究。

参 考 文 献

- [1] E. D. Wills and A. E. Wikinson, Radiat. Res., 31,732(1967),

- [2] A. A. Barber and K. M. Wilbur, *Radiat. Res.*, 10,167(1959).
[3] J. F. Kagonou, P. Bernard, M. Braquet and G. Rocquet, *Biochimie*, 63,1555(198).
[4] 周浔, 仲伟强, 方允中, 中华放射医学与防护杂志(待发表), 1985
[5] ハ木国夫, 临床検査 23(2), 115(1979).
[6] H. Ohkawa, *Anal. Biochem.*, 95,351 (1979).
[7] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951)
[8] 周浔, 国外军事医学资料(放射医学), 15(2), 57(1983).
[9] W. Boes, in "Biological and Clinical Aspect of Superoxide and Superoxide Dismutase" edited by W. H. Bannister and J. V. Bannister, Eiseviery North-Holland p. 1, 1980.
[10] M. U. Dianzoni and G. Ugazio, in "Biochemical Mechanisms of Liver Injury" edited by T. F. Slater, Academic Press, New York, p. 669, 1978.
[11] E. A. Dawes and E. D. Wills, *Int. J. Radiat. Biol.*, 22(1),23,(1972).
[12] D. F. H. Wallach, *The Plasma Membrane*, 145,(1972).
[13] 童曾寿, 杜寅孝, 药学报, 16(4), 302(1981).
[14] J. W. Harris and T. L. Phillips, *Radiat. Res.*, 46,362(1971).
[15] G. O Phillips, D. M. Power and M. Sewart, *Radiat. Res.*, 46,236(1971).

(1984年9月7日收到)

EFFECT OF WR-2721 ON LIPID PEROXIDATION

INDUCED BY IONIZING RADIATION

1. LIPID PEROXIDES IN TISSUES OF WHOLE-BODY IRRADIATED MICE

Zhou Xun Fang Yunzhong Xhong Weiqiang

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

ABSTRACT On the 3rd day after the irradiation of 500—2000 rad, the lipid peroxides(LPO) level in liver, brain, heart and bone marrow of mice were elevated with the increase of irradiation dose, but markedly depressed by the intraperitoneal injection of WR-2721 as well. The contents of LPO in liver, brain, kidney, testis and bone marrow in mice were varied with different days following the exposure of 850 rad, but on the same condition, the inhibitory effect exerted by the administration of WR-2721 was progressively increased.

KEY WORDS LPO(lipid peroxide); WR-2721[S-2-(3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid]; TBA(Thiobarbituric acid); mice; tissue.