

小鼠受 100 rad 照射后组织荧光产物含量和 硒谷胱甘肽过氧酶活性的变化

陈 媛 周 玖 齐凤菊 孔 华

(第一军医大学)

摘要 本文中实验测定了 100 rad 受照小鼠肝、脾和睾丸组织的荧光产物含量以及肝和脾组织的 Se-GSHPx 活性。与对照组相比,在照后的 15 天内肝荧光产物的含量无明显变化;在照后 7 天至 15 天脾荧光产物含量明显增加($P < 0.01$);睾丸除照后 3 天降低外($P < 0.05$),在观察的 7 天内无明显变化。从照后 1 天至 5 天肝 Se-GSHPx 活性增高($P < 0.05$),到照后 7 天有恢复趋势;脾 Se-GSHPx 活性在照后 3 天明显升高($P < 0.01$),照后 5 天和 7 天转为降低($P < 0.05$)。

关键词 辐射致的脂质过氧化作用;荧光产物;硒谷胱甘肽过氧酶。

前 言

辐射所致的细胞核酸损伤常与膜的损伤有联系,以及脂质过氧化作用所致的膜损伤参与了辐射对 DNA 的合成抑制。因此脂质过氧化作用在辐射损伤中具有一定的意义^[1]。以往本室只作了整体致死剂量照射后不同组织脂质过氧化作用的研究^[2~4],而对低剂量照射后组织脂质过氧化作用的研究不多。

硒谷胱甘肽过氧酶(Se-GSHPx)是机体抗脂质过氧化酶性保护系统的主要成分之一,其作用在于分解由脂质过氧化作用不断产生的脂氢过氧化物和抗氧化剂 VE 协同地中断和终止脂质过氧化作用^[5]。我们曾较系统地观察了不同致死量照射后组织 Se-GSHPx 活性变化的特点^[6],但对低剂量受照动物组织 Se-GSHPx 活性变化尚未见报道。为此本文对 100 rad 受照小鼠的肝、脾和睾丸组织的脂质过氧化物(荧光产物)含量和 Se-GSHPx 活性进行了测定。

实验条件和方法

1. 实验动物和照射条件

ICR 纯系小鼠 72 只,雌性 34 只,雄性 38 只。体重 18~22 g。分成正常组及照后 1、3、5、7、15 天组。每组 12 只,除 15 天组为雌性 4 只雄性 8 只外,其余各组皆为雌雄各半,睾丸荧光产物各测定组为 6 只。照射条件为开放式 ^{60}Co γ 线源,距源 50 cm,剂量率为 120 rads/min,总剂量为 100 rads。

2. 实验方法

小鼠在照射后不同时间断头处死,取固定部位肝(左叶)150~200 mg,两侧睾丸和全脾。所取组织剪碎后加 pH 7.4 5 mM 磷酸盐生理盐水缓冲液 2 ml,用超声波粉碎器粉碎,4,000 转/min 离心 5 分钟,吸取上清液 40 μl 作 Se-GSHPx 活性测定,其余部分作荧光色素测定。

(1) Se-GSHPx 活性测定 主要按 Paglia 等^[7]法。酶活性以每克组织每分钟氧化 NADPH 微克分子数($\mu\text{mole NADPH}/\text{min}/\text{gm}$ 组织)表示。

(2) 荧光产物含量测定 按 Fleleher 等^[8]的方法稍加改良。上述悬液离心后, 吸出上清液留用, 沉淀物加 5 ml 氯仿甲醇液(2:1), 在 45℃ 水浴中保温 1 分钟。在旋涡混合器上混合 1 分钟, 然后加入上清液内, 再混合 1.5 分钟, 4,000 转/min 离心分离氯仿层。每 ml 氯仿提取液加 0.1 ml 甲醇, 用荧光分光光度计(日立 MPF-4 型)测定荧光强度。测定前样品先在强紫外光下照 30 秒以破坏提取液中干扰色素(维生素 E 等)。

肝、脾和睾丸的氯仿甲醇提取的荧光产物的最大激发光分别为 350、358 和 310 nm, 最大发射光为 430、420 和 405 nm。测定时激发光和发射光的狭缝置于 10 处, 放大倍数分别为 0.32、1.5 和 0.32。以硫酸奎宁溶于 0.1 N H_2SO_4 (0.1 $\mu g/ml$) 为标准, 氯仿甲醇液作为空白对照, 组织荧光产物量以每克组织相当多少微克分子硫酸奎宁的荧光强度($\mu mole$ 硫酸奎宁/gm 组织)表示。

结果和讨论

1. 肝、脾和睾丸荧光产物含量的变化

由表 1 可见肝在照后的 15 天内与对照组相比, 荧光产物含量无明显变化, 脾的荧光产物含量在照后 3 天起有增加的趋势, 但无统计学意义, 从照后第 7 天至观察的 15 天则显示明显的增加($P < 0.01$)。睾丸的变化除照后第 3 天有一次性降低($P < 0.05$)外, 在观察的 7 天内皆无明显变化。

先前对致死剂量照射小鼠脾和小肠荧光产物含量的测定^[3]表明, 1,000 rad 照后两种组织从第 3 天开始即有明显增加, 并以第 3 天为最明显, 到照后第 7 天显示恢复倾向。本实验用低剂量 100 rad 照射后肝和睾丸的荧光产物含量无明显变化, 而脾从照后第 3 天开始即有增加的趋势, 至照后第 7 天与 15 天则明显增加($P < 0.01$)。与 1,000 rad 相比较, 只是荧光产物明显增加的时间后延和增加幅度较小。结果说明, 在荧光产物反映辐射脂质过氧化作用上, 各组织的反应是不同的。而脾是敏感组织, 即使只是 100 rad 照射也有明显的变化。

表 1 100 rads 照后不同时间小鼠肝、脾、睾丸荧光产物含量(μmol 硫酸奎宁/gm 组织)的变化($\bar{x} \pm SE$)

Table 1 The changes in the contents of the fluorescent products in liver, spleen and testis of mice at various times postirradiation with 100 rads (μmol guanine sulfate/gmtissue)($\bar{x} \pm SE$)

组别	肝($\times 10^{-3}$)	脾($\times 10^{-4}$)	睾丸($\times 10^{-3}$)
Groups (Days post irradiation)	Livers($\times 10^{-3}$)	Spleen($\times 10^{-4}$)	Testis($\times 10^{-3}$)
对照组 Control	0.24 $\pm$ 0.02(12)	0.63 $\pm$ 0.04(10)	0.36 $\pm$ 0.03(5)
1 天组	0.25 $\pm$ 0.03(12)	0.59 $\pm$ 0.13(12)	0.32 $\pm$ 0.02(6)
3 天组	0.25 $\pm$ 0.02(12)	0.83 $\pm$ 0.09(12)	0.29 $\pm$ 0.01(6) $D < 0.05$
5 天组	0.20 $\pm$ 0.01(12)	0.72 $\pm$ 0.10(12)	0.34 $\pm$ 0.03(6)
7 天组	0.23 $\pm$ 0.03(12)	0.92 $\pm$ 0.08(12)	0.35 $\pm$ 0.02(6)
		$P < 0.01$	
15 天组	0.22 $\pm$ 0.01(12)	1.10 $\pm$ 0.06(12)	
		$P < 0.01$	

注: () 内系实验动物数, 下同。

(N) = no. of animals

(2) 肝、脾 Se-GSHPx 活性的变化

由表 2 可见, 肝从照后第 1 天起直至照后第 5 天, 酶活性都有明显的增高, 照后第 7 天显示恢复倾向。100 rad 照后肝 SeGSHPx 活性变化的规律与 500 rad 照射的^[6]基本相似, 只是增高持续的时间较短和增高的幅度较小。脾 SeGSHPx 活性在照后第 3 天有一明显的升高($P < 0.01$), 第 5 天、第 7 天转为降低($P < 0.05$), 与 500 rad 照后 1 至 7 天酶活性都增高^[6]完全不同, 这可能是脾 SeGSHPx 对 100 rad 照射反应的特点。

机体抗氧化损伤保护系统的主要特点是, 当机体受到氧化损伤应激时组织通过增加 GSHPx 活性, 除去应激产生的毒性产物(脂氢过氧化物), 而其中肝脏是去除脂过氧化物的中心器官^[9]。本实验从肝 SeGSHPx 活性的增加说明, 100 rad 受照的机体已受到脂质过氧化损伤的应激, 尽管肝本身的荧光产物含量在照后无明显的变化, 以及脾荧光产物在照后第 7 和第 15 天的增高和脾 SeGSHPx 活性在照后第 3 天的一过性升高, 也都说明机体受到脂质过氧化损伤。问题是, 睾丸组织含有高不饱和脂肪酸, 而脂肪酸的不饱和度与脂质过氧化的速率正相关, 但反映脂质过氧化作用的荧光产物在睾丸组织, 在照后的 7 天内均未见增加, 这可能是由于测定方法的不同, 文献中大多数采用测定丙二醛的硫代巴比妥法。丙二醛是脂氢过氧化物的分解产物, 荧光产物是丙二醛与含氨基化合物交联作用所形成的荧光发色团希夫氏碱, 它们的溶解度和被机体代谢和排泄的途径都是不同的。我们曾对受 1,000 rad 照后小鼠肝脏的丙二醛和荧光产物进行过测定, 发现在照后第 3 至第 7 天丙二醛明显增加, 但在同一时期内荧光产物则无明显的变化。本实验低剂量照射即使肝 SeGSHPx 活性有明显升高, 而反映脂质过氧化作用的荧光产物含量则无变化, 可能也是这个原因。但脾荧光产物在照后第 7 天与 15 天则有明显增加, 可能是脾在反映荧光产物含量上较其它组织敏感, 至于其原因以及脾 SeGSHPx 活性的动态变化的意义, 还有待于进一步深入研究。

表 2 100 rad 照后不同时间小鼠肝、脾 Se-GSHPx 活性(nmol NADPH/分/克组织)的变化($\bar{x} \pm SE$)

Table 2 The changes in the Se-GSHPx activities in liver and spleen of mice at various times post irradiation with 100 rads (n mol NADPH/min/gm tissue) ($\bar{x} \pm SE$)

组 别 Groups (Days post irradiation)	肝 Livers	脾 Spleen
对照组 Control	9.60 $\pm$ 0.92(10)	4.60 $\pm$ 0.26(10)
1 天组	12.11 $\pm$ 0.68(12) $P < 0.05$	
3 天组	12.44 $\pm$ 0.72(12) $P < 0.05$	5.53 $\pm$ 0.17(12) $P < 0.01$
5 天组	13.13 $\pm$ 0.85(12) $P < 0.05$	3.96 $\pm$ 0.16(12) $P < 0.05$
7 天组	11.02 $\pm$ 0.64(12)	3.90 $\pm$ 0.19(12) $P < 0.05$

注 ()内系实验动物数。下同
(N) = no. of animals

结 语

低剂量 100 rad 照射可使小鼠脾荧光产物含量(照后 7、15 天)增加和肝 SeGSHPx 活性(照后 1、3、5 天)增高。说明这样小的照射剂量对机体已足以引起明显的脂质过氧化损伤, 以及机体对这样小的损伤也能产生应激反应, 同时说明脂质过氧化损伤在低剂量辐射损伤中也具有重要作用。与致死剂量照射相比较, 低剂量照射各组织在荧光产物含量和 SeGSHPx 活性的变化上有各自的特点。结果表明, 肝 SeGSHPx 活性和脾荧光产物含量是研究低剂量辐射致的脂质过氧化损伤的敏感指标。对低剂量照射脂质过氧化作用的研究必将有助于对辐射损伤机理的了解。

参 考 文 献

- [1] 陈 媛, 周 玫, 中华放射医学与防护杂志, 4(6), 63(1984).
[2] 陈 媛, 周 玫, 齐凤菊, 孔 华, 高云林, 中华放射医学与防护杂志, 4(2), 27(1984).
[3] 陈 媛, 孔 华, 高云林, 中华放射医学与防护杂志, 4(1), 33(1984).
[4] 周 玫, 陈 媛, 齐凤菊, 孔 华, 黄文伟, 潘正尧, 受照小鼠肝, 脾和小肠丙二醛含量及硒谷胱甘肽过氧酶活性的变化, 中华放射医学与防护杂志(付印中).
[5] 陈 媛, 周 玫, 生命的化学, 3(6), 16(1983).
[6] 周 玫, 陈 媛, 齐凤菊, 黄文伟, 潘正尧, 组织对辐射脂质过氧化应激反应的特点及其产生的原因, 辐射研究与辐射工艺学报(付印中).
[7] D. E. paglia and W. N. Valentive, J. Lab. Clin. Med., 70(1), 158(1976).
[8] B. L. Fletcher, C. J. Dillar, A. L. Tappel, Anal. Biochem. 52(1), 1(1973).
[9] 周 玫, 陈 媛, 生理科学进展, 15(4), 348(1984).

(1985 年 5 月 2 日 收到)

THE CONTENTS OF THE FLUORESCENT PRODUCTS AND THE ACTIVITIES OF THE SE-DEPENDENT GLUTATHIONE PEROXIDASE (Se-GSHPx) IN THE TISSUES OF MICE IRRADIATED WITH LOWER DOSE

Chen yuan Zhou Mei Ti Fengju Hong Hua

(the first medical college of PLA Guang hou)

ABSTRACT The Contents of the fluorescent products and the Se-GSHPx activities of Liver, spleen and testis of mice irradiated with 100rads were determined. There were no changes in the contents of the fluorescent products of liver in our test; there was significantly increased in spleen on the 7th and 15th days post irradiation ($p < 0.01$); except for decrease on the 3rd day ($p < 0.05$), the contents of the fluorescent products in testis didn't show any changes in all times tested. The seGS-HPX activities were increased in liver from the 1st to the 5th days after irradiation ($P < 0.05$), and had a tendency to restore on the 7th day; the enzyme activities were increased markedly in spleen on the 3rd day post exposure ($P < 0.01$); then turned to decrease on the 5th and the 7th days ($P < 0.05$).

KEY WORDS Radiation-induced lipoperoxidation; fluorescent Product; Se-dependent glutathione peroxidase;