

离体与整体照射对大鼠红细胞嘌呤核苷磷酸化酶活力与红细胞膜脂质过氧化值的影响

康 鑫 方允中 陈吉中

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

摘要 本文报道离体和整体照射对大鼠红细胞嘌呤核苷磷酸化酶活力及红细胞膜脂质过氧化值的影响。其结果为: 将大鼠抗凝血离体照射 0, 10, 50 和 100 Gy 以及全身照射 8.5 Gy 后第 1、3、5 d, 该酶活力下降而膜脂质过氧化值却增加。作者推测, 照射后酶活力的变化和脂质过氧化作用有关。

关键词 离体照射, 全身照射, 红细胞嘌呤核苷磷酸化酶, 脂质过氧化

引 言

Rappoport 和 Fritz^[1]曾观察到全身照射可使大鼠红细胞嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)活力下降, 而且下降程度与辐射损伤轻重有关。方允中和刘智峰证实了 Rappoport 和 Fritz 的实验结果, 并进一步观察到从受照射大鼠红细胞中提纯的 PNP 某些理化性质发生了改变, 表明其结构已发生损伤^[3]。他们怀疑其机制或许是照射后的异常物质损伤了 PNP。近年来, 辐射生化学者的兴趣渐趋于 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{LOO}\cdot$ 对蛋白质的作用^[4,5], 如酵母乙醇脱氢酶的失活及牛血清白蛋白的断裂等^[6,7]。根据自由基生物学近年来的研究进展, 脂质过氧化产物 $\text{LO}\cdot$, $\text{LOO}\cdot$ 及 LOOH 可能会损伤重要生物大分子。为了进一步探究照射后大鼠红细胞 PNP 活力下降是否可能与红细胞膜脂类过氧化的增高有关, 我们比较观察了离体与整体照射后大鼠红细胞 PNP 活力与红细胞膜脂质过氧化的变化。

材 料 和 方 法

1. 实验动物, 照射条件与生化试剂

实验动物为雄性 Wistar 大鼠, 体重 250 ± 20 g。 ^{60}Co γ -射线离体照射大鼠抗凝血, 剂量为 0、10、50 和 100 Gy, 剂量率 8.878 Gy/min。距源中心距离为 100 cm。

全身照射大鼠 8.5 Gy, 剂量率 1.408 Gy/min, 距源中心距离 150 cm。

鸟嘌呤及鸟嘌呤核苷为 B.D.H 产品, 硫代巴比妥酸(TBA)购自北京化工厂, 四乙氧基丙烷(MDA)为 Sigma 产品。

2. 离体和全身照射后样品的测试

(1) 样品来源及处理 从 Wistar 大鼠的眼眶取血, 以肝素抗凝, 离心后, 取出红细胞, 用生理盐水洗涤三次, 离体照射时, 在红细胞中加入等量 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 、磷酸盐缓冲液(pH 7.4), 混合, 均分为四份, 分别照射不同剂量后, 37℃水浴 30 min, 各取出 0.1 ml, 加 2 ml 双蒸水,

用于测定红细胞 PNP 活力, 其它用于提取红细胞膜。

全身照射大鼠后 1、3、5 d, 分别取血, 提取红细胞膜, 用于测定红细胞膜脂质过氧化, 取 0.1 ml 肝素抗凝血, 用于测定红细胞 PNP 活力。

(2) 红细胞膜的提取 按 Dodge 等^[8]方法, 稍加改动, 全血用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 磷酸缓冲液洗涤两次, 按 1:20 加入冰冷的含有 $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ EDTA 的 $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中, 搅拌 5 min, 静置 30 min 后, 以 15000 r/min , 离心 40 min, 弃去上清液, 将沉淀用低渗磷酸盐缓冲液洗一次, 放置 4°C 待用。一般放置时间不得超过 3 d, 红细胞膜蛋白含量用 Lowry 法^[9]测定, 以牛血清白蛋白为标准。

(3) 红细胞 PNP 活力测定 用 Rappoport-Fritz 法^[1]测定酶活力。酶活力单位规定为在本实验条件下, 100 mg 蛋白质的红细胞中 PNP 促使鸟嘌呤核苷释放鸟嘌呤的微克分子数。酶活力的测定步骤如下: 按样品处理手续制备成溶血液。溶血 30 min, 取 0.5 ml 溶血, 加 $114 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 0.5 ml 鸟嘌呤核苷, 在 37°C 水浴中温育 1 h, 以加入鸟嘌呤核苷的时间作为酶促反应的开始, 并以加入 0.5 ml 15% 高氯酸作为终止时间, 以 0.5 ml 鸟嘌呤和 0.5 ml 水为对照。保温后, 离心 10 min, 取 0.5 ml 上清液, 加 2 ml 水, 1.0 ml 饱和碳酸钠和 1.0 ml 酚试剂摇匀, 37°C 水浴中温育 20 min, 在 721 型分光光度计 660 nm 处测定光密度值, 根据以鸟嘌呤作为标准得出的曲线, 计算鸟嘌呤释放量, 并用常规方法, 测出血红蛋白含量, 从而可得出 PNP 活力。

(4) 红细胞膜脂质过氧化物测定^[10] 取 0.1 ml 细胞膜悬液 (3 mg/ml), 加入 0.2 ml 8.1% 十二烷基磺酸钠, 1.5 ml pH 3.5 的 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 乙酸缓冲液, 1.5 ml 0.8% 硫代巴比妥酸水溶液, 加水至 4.0 ml, 95°C 水浴 60 min, 冷却后加 1.0 ml 水及 5.0 ml 正丁醇-吡啶 (15:1 v/v) 混合液, 振荡, 以 30 Gy/min, 离心 10 min, 取上层有机溶剂相, 在 721 型分光光度计 532 nm 处测定光密度值, 以 5 nmol 四乙氧基丙烷为标准管取代膜悬液进行上述操作, 脂质过氧化值计算方法如下:

$$\text{膜中丙二醛量 (nmol/mg 膜蛋白)} = \frac{\text{测定管 OD}_{532}}{\text{标准管 OD}_{532}} \times 5 \times \frac{1}{0.3}$$

实 验 结 果

1. 离体照射对大鼠红细胞 PNP 活力及红细胞膜脂质过氧化物的影响

大鼠肝素抗凝血, 经 0、10、50 和 100 Gy 照射后, 37°C 温育 1 h, 其红细胞 PNP 活力下降。以未照射大鼠的酶活力测定值为 100%, 计算出照射后酶活力的抑制百分数分别为 1、2.3、8.2 和 13.24% (如图 1)。而红细胞膜脂质过氧化物的产量随着剂量的增加而增加 (见图 2)。

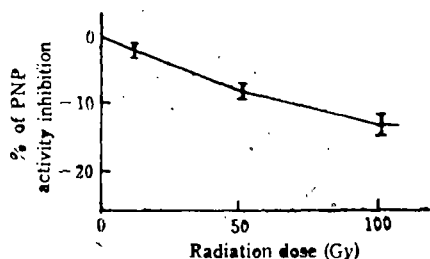


Fig 1. Effect of γ -irradiation on erythrocyte PNP activity in vitro.

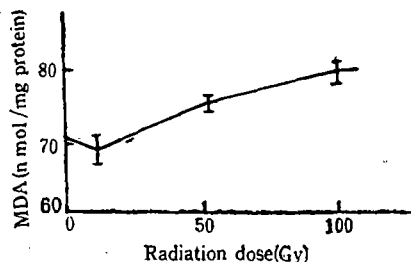


Fig 2. Effect of γ -irradiation on erythrocyte membrane lipid peroxidation in vitro.

2. 全身照射对大鼠红细胞 PNP 活力及膜脂质过氧化物的影响

8.5 Gy 全身照射后第 1、3、5 d, 酶活力依次下降, 以未照射大鼠的酶活力测定值为 100% 计算照射后酶活力抑制的百分数分别为 8.06、68.57 和 79.34%。其中以照射后第 3 d 和第 5 d 下降程度与正常值相比较, 差别显著, 但后二者下降程度之间无显著差别。(表 1)

Tab 1. Changes of erythrocyte PNP activity and membrane lipid peroxide in rats after whole body irradiation with 8.5 Gy

Day after irradiation	Lipid peroxide (nmol MDA/mg protein)	Activity (u/100 mg protein)	PNP % inhibition
0	30.04±3.32(8)	71.75±17.42(8)	0
1	35.31±8.93(8)	69.96±12.43(8)	8.06
3	53.28±13.28*(7)	22.55±7.17*(7)	68.57
5	42.42±4.32*(8)	14.82±8.97*(8)	79.34

Estimated value, mean±SD *: Compared with unirradiated, $P<0.01$

依照表 1, 照射后 1、3、5 d 大鼠的红细胞膜脂质过氧化值较照射前分别增加 17.54、77.36、41.21%, 其中以照射后第 3、5 d 的脂质过氧化值增加显著, 但这两组值间却无显著差别, 其增高值与 PNP 活力下降存在着相应的关系。

讨 论

在离体实验条件下, 电离辐射作用于红细胞悬液中的水分子产生的自由基可损伤大鼠红细胞 PNP, 造成该酶活力下降并引发了红细胞膜脂质过氧化, 在脂质过氧化过程中产生的 $LO^{\cdot}$, $LOO^{\cdot}$ 及 $LOOH$ 中, 以 $LO^{\cdot}$ 损伤生物大分子的可能性最大^[11], 我们推测, 红细胞膜的脂质过氧化可能会加重 PNP 的损伤, 使酶活力下降程度更为严重。

在整体实验条件下, 大鼠红细胞 PNP 活性下降的机制比较复杂, 我们的看法是: (1) 大鼠红细胞 PNP 对辐射比较敏感。其分子结构易于被自由基攻击而受损伤或损伤后不易恢复。方允中与刘智峰^[2]曾观察到整体照射时小鼠 PNP 活力没有变化, 而且照射后该酶的理化性质也没有改变, 而大鼠 PNP 活力及理化性质却发生了变化, 表明该酶对辐射敏感性低于大鼠 PNP。(2) 大鼠红细胞寿命为几十天, 虽然照射后红细胞寿命缩短, 但照射后 3—5 d 内 PNP 活力下降显然不能用红细胞寿命缩短来解释。红细胞内无合成和分解蛋白质的酶, 因此, 酶活力下降也不是酶合成能力降低与分解增强所致。方允中和刘智峰^[2]认为异常物质损伤了 PNP, 我们的实验结果支持这种看法, 这些异常物质可能是活性氧。从大鼠 PNP 活力变化随照射后时间延长而增加的现象来看, 照射瞬间产生的活性氧固然起到损伤的作用, 但在很大程度上似来自内源性活性氧, 根据生物体内自由基产生与清除的机制, 可以认为照射后内源性活性氧产生增加或清除能力可能下降。照射后超氧化物歧化酶活性下降是活性氧清除能力下降的主要原因^[12], 虽然活性氧产生是否增加尚无直接证据, 但根据红细胞膜脂质过氧化增加的结果, 可以推测, 活性氧引发脂类过氧化过程中 $LO^{\cdot}$, $LOO^{\cdot}$, 及 $LOOH$ 一定增加, 其中 $LO^{\cdot}$ 活性较高, 其损伤酶分子的可能性最大^[11], 照射后红细胞膜脂质过氧化不仅是活性氧损伤 PNP 造成酶活力下降的间接证据, 还可能是其直接佐证之一。这些推测尚待进一步实验证实。

参 考 文 献

- [1] D. A. Rappoport and R. R. Fritz, Radiat. Res., 21, 5(1964).

- [2] 方允中, 刘智峰, 实验生物学报, 15, 13(1982).
[3] 方允中, 刘智峰, 实验生物学报, 15, 97(1982).
[4] M. Quintiliani, Int. J. Radiat. Biol., 50, 573(1986).
[5] R. L. Willson, H. Sies (Ed): Oxidative Stress, Academic Press, London, 1985.
[6] H. Schussler and K. Schilling, Int. J. Radiat. Biol., 45, 267(1984).
[7] S. P. Wolff and R. T. Dean, Biochem. J., 234, 399(1986).
[8] J. T. Dodge, C. Mitchell and D. J. Hanahan, Arch. Biochem. Biophys., 100, 199(1963).
[9] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
[10] H. Ohkawa, Anal. Biochem., 95, 351(1979).
[11] 方允中, 生物物理学报, 3, 424(1987).
[12] 方允中, 刘智峰, 李益新, 科学通报, 29, 943(1984).

(稿件收到日期: 1988 年 6 月 8 日)

EFFECT OF GAMMA IRRADIATION ON ERYTHROCYTE PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE ACTIVITY AND ERYTHROCYTE MEMBRANE LIPID PERO- XIDATION IN VITRO AND IN VIVO

Kang Xin, Fang Yunzhong and Chen Jizhong

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

ABSTRACT The effect of ionizing irradiation on erythrocyte purine nucleoside phosphorylase and erythrocyte membrane lipid peroxidation have been comparatively studied in vitro and in vivo.

After irradiation of the heparinized rat blood with 0, 10, 50, and 100 Gy and during the different days following the whole-body exposure to 8.5 Gy, PNP activities decreased whereas erythrocyte membrane lipid peroxidation increased. These results are seemly shown the relationship existing between erythrocyte PNP activity and membrane lipid peroxidation.

KEY WORDS Radiation in vitro. Whole-body irradiation. Erythrocyte purine nucleoside phosphorylase. Lipid peroxidation