

细菌 SOD 对小鼠的辐射防护作用

胡 天 喜

(华东师范大学, 上海)

摘要 本文研究了细菌超氧化物歧化酶(b-SOD)对 8 Gy γ 射线照射小鼠的辐射防护作用。结果表明, 辐照前后注射过 b-SOD 的小鼠, 其存活率分别提高 50% 和 30%。辐照前注射 b-SOD 还可提高骨髓细胞和脾脏淋巴细胞的 DNA 合成率, 降低细胞膜的脂质过氧化和结构损伤。同时还对 b-SOD 的辐射防护作用的机理作了讨论。

关键词 γ 辐射, 存活率, DNA 合成, 脂质过氧化, 细菌超氧化物歧化酶

电离辐射损伤生物机体的原发过程之一是射线引起机体中水分子的电离和激发, 产生多种活性中间产物, 尤其是毒性很强的活性氧。如何在原发反应阶段清除自由基和活性氧, 抑制继发反应的产生, 是放射生物学和放射医学的重要研究课题。

McCord 和 Fridovich^[1]从牛血红细胞中分离出超氧化物歧化酶(Cu-Zn-SOD), 它具有清除超氧化阴离子自由基(O_2^-)的作用。这一发现为早期辐射防护的研究奠定了理论基础。因为 O_2^- 可被 SOD 歧化为 H_2O_2 ($2 O_2^- + 2 H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$), H_2O_2 也是强的氧化剂, 所以 SOD 和过氧化氢酶(CAT)相结合, 防辐射效果就更佳。已有不少报道^[2-6]证实了这一理论的正确性。

以往用于辐射防护研究的 SOD, 几乎都是从人、牛、猪等真核生物的血液中提取而来的, 属于 Cu-Zn-SOD。从海洋发光细菌(Photobacterium Phosphoreum)中分离提取出 Fe-SOD, 初步研究表明, 它与 Cu-Zn-SOD 一样, 也有辐射防护作用^[6,7]。本文将深入地研究它的辐射防护效果。

材 料 和 方 法

材料 昆明种小鼠, 雄性, 体重 20 g 左右, 购自上海生物制品研究所, 用作存活率试验的四批, 共 152 只; 作组织匀浆自发发光和骨髓、脾脏淋巴细胞 ^3H 掺入试验的 120 只。人血购自上海市中心血站。b-SOD 由本校朱文杰老师从发光细菌中提取得到。

仪器 用 FJ-2100 型液体闪烁计数器测定放射性和组织匀浆的发光; 721 型分光光度计测人红细胞的溶血量。

试验方法 照射前或照射后每只小鼠尾静脉注入 0.2 ml b-SOD, 100 IU (166 μ g/ml), 对照组和单纯照射组注入同量的生理盐水, 记录照后 17 d 和 30 d 的存活率。每天称体重, 照后 1、3、5、7 和 15 d 杀鼠取脾称重, 求出脾重和体重的比率。并进行以下试验:

(1) ^3H -TdR 掺入细胞 按文献[8]的方法, 测定照后 1、3、5、7、10 和 15 d 的细胞 DNA 合成量的变化。同一只小鼠既取骨髓细胞, 又取脾脏淋巴细胞。用 7 号针头从股骨中冲洗出骨髓细胞, 经 4 号针头过滤, 将细胞悬浮于 RPMI 1640 培养液中。用 6 号针头多点穿刺洗净的、置于 RPMI 1640 培养液中的脾脏, 并挤压之, 使脾淋巴细胞外溢, 直至脾脏变白, 经 4 号针头

过滤。两种细胞都调整至 2×10^6 个/ml。骨髓细胞, 加入 $3.7 \times 10^4 \text{ Bq/ml } ^3\text{H-TdR}$ 后 38°C 培养 3 h, 淋巴细胞则需加植物血凝素 (PHA) 和 $3.7 \times 10^4 \text{ Bq/ml } ^3\text{H-TdR}$, 38°C 培养 24 h。滤膜法收集细胞, 液体闪烁计数器测放射性强度。

(2) 器官匀浆的自发化学发光 (SCL) 照后 1、3、7 和 12 d, 活杀小鼠, 取出肝、脑、肾、心、肺, 用磷酸钾缓冲液清洗以后, 吸去粘附的水份, 称重。加入预冷的 1 ml 0.15 mol/L KCl 溶液到 300 mg 的器官中, 在匀浆器中制备组织匀浆。2000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 ml 到液闪瓶中, 加入 3 ml 0.15 mol/L KCl, 5 ml 0.15 mol/L 磷酸钾缓冲液, 37°C 保温 30 min。在液体闪烁计数器中按非符合相加的方式测量各个脏器匀浆的 SCL, 发光强度以脉冲/分 (cpm) 表示。每一脏器有 3 只鼠的试验, 即有 3 个重复数据。

(3) 红细胞的溶血 取肝素抗凝的人血, 3000 r/min 离心 10 min, 弃白细胞和血浆层, 用等渗的生理盐水悬浮沉淀的红细胞。再离心清洗两次。用 10 倍体积的等渗生理盐水稀释红细胞, 混匀, 然后分装于 $1.5 \times 10 \text{ cm}$ 的平底试管中, 每管 5 ml。分成对照组、单纯对照组、照前加 SOD 组及照后加 SOD 组等 4 组, 每组皆有复管。进行辐照处理。照过的样品置于 4°C 冰箱中, 每天摇匀一次, 至照后第 3 d 取出, 3000 r/min 离心, 取上清液, 在分光光度计 420 nm 处比色, 测出光密度 (O. D. 值)。按照下式计算相对溶血量

$$\text{相对溶血量} = \frac{\text{O.D.处理} - \text{O.D.对照}}{\text{O.D.对照}} \times 100\%$$

结 果

1. 存活率及体重和脾重的变化

(1) 存活率 8 Gy (剂量率 0.85 Gy/min) γ 射线照射以后, 未注射过 SOD 的小鼠, 11—17 d 全部死亡 (虽然四批试验中死亡的日期各有差异); 照射前 1.5 h 和照射后 0.5 h 注射过 100 IU SOD 的小鼠, 在此期间的存活率分别达 75% 和 52%, 30 d 的存活率分别为 50% 和 30%。可见 b-SOD 具有明显的辐射防护作用, 尤其是照前注射的更为明显。

(2) 体重和脾重 超致死剂量 γ 射线照射以后, 引起小鼠的新陈代谢严重紊乱, 出现放射病: 毛发易脱落、眼和皮肤充血、精神萎靡、活动迟钝、饮食减少甚至停食, 体重逐渐下降, 由 20 g 下降到 15 g 以下时很容易死亡。相反, 对照组小鼠的体重则与日俱增, 30 d 时由 20 g 升为 38 g。照射前注射过 SOD 的小鼠, 照后 5 d, 体重连续下降, 由 20 g 降为 15 g, 5—17 d 内有所回升, 而后又慢慢下降, 直至 30 d, 存活的小鼠体重可恢复到照前的水平。照后注射 SOD 小鼠, 5 d 内体重连续下降, 5—20 d 内保持在低的体重态, 20 d 以后所有恢复, 存活者体重也可恢复到照前的水平。

各脏器重量变化中以脾脏最明显, 照后第 1 d (不论是否注射过 SOD), 重量就降低到对照组的 2/3; 照后 15 d, 注过 SOD 的, 脾重为对照组的 25%, 单纯照射的脾重只有对照组的 20%, 从脾重和体重的比值来看, b-SOD 也显示有辐射保护作用 (见图 1)。

2. DNA 的代谢合成的变化

(1) 骨髓细胞 8 Gy γ 射线照射以后第 1 d, 小鼠骨髓细胞的 DNA 代谢合成就受到严重的抑制, $^3\text{H-TdR}$ 掺入到细胞中极微, 只及对照组的 0.44%; 照前加入 SOD 和照后加入 SOD, $^3\text{H-TdR}$ 掺入量也受到严重的抑制, 但比单纯照射组高, 分别为对照组的 1.52% 和 1.05%。照后第 3 d, 照前注射 SOD 的, $^3\text{H-TdR}$ 掺入率有所增加, 至第 5 d 可达对照组的 55.5%, 单纯照射组

则只有 0.59%。照后注射 SOD 的, 增加的幅度则较小。这种变化的趋向, 在 2 Gy 剂量下尤为明显(见表 1)。

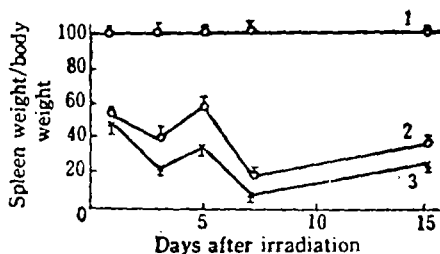


Fig 1. Effects of γ ray and b-SOD on mice body weight and their spleen weight ($n=3$)
(1) control, (2) SOD + irradiation
(3) PBS + irradiation

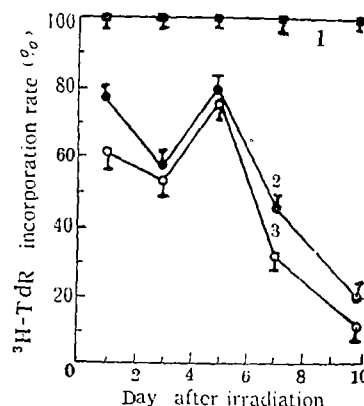


Fig 2. Effects of γ ray and b-SOD on DNA synthesis of spleen's lymphocytes in mice ($n=3$)
(1) control (2) SOD + irradiation
(3) PBS + irradiation

Tab 1. Effects of γ -ray and b-SOD on ^3H -TdR incorporating rate of myeloid cells in mice ($\bar{X} \pm \text{SD}$)

The day after irradiation	Low dosage group			High dosage group			
	Control	2 Gy	SOD + 2 Gy	Control	8 Gy	SOD + 8 Gy	8 Gy + SOD
1	19916.4 ± 2208.5	800.4 ± 128.7	1909.7 ± 160.1	56186.7 ± 3296.7	247.7 ± 41.9	854.7 ± 195.9	589.7 ± 38.2
3	—	—	—	28456.0 ± 3095.2	714.0 ± 1.362	1451.0 ± 241.8	221.0 ± 22.4
	—	—	—	100%	2.51%	5.09%	0.78%
5	12954.3 ± 648.5	1055.1 ± 91.5	10876.9 ± 170.2	42941.0 ± 3147.9	252.3 ± 54.3	23825.8 ± 1709.1	6500.0 ± 648.7

(2) 脾脏淋巴细胞 8 Gy γ 射线照射后第 1 d, 脾脏淋巴细胞的 DNA 合成量下降, 单纯照射组和照前注射 SOD 组分别为对照组的 60.99% 和 77.08%; 照后第 3 d, 下降更为明显; 至第 5 d 有所回升; 5—10 d 内连续下降, 至第 7 d 分别为对照组的 33.56% 和 45.87%。照前注射 SOD 的小鼠, ^3H -TdR 掺入率始终高于单纯照射组(见图 2)。

从表 1 和图 2 可见, 整体照射下, 小鼠骨髓细胞和脾脏淋巴细胞对射线都很敏感, 其中骨髓细胞更为敏感。因为骨髓细胞中含有大量的造血干细胞和母细胞, 这些细胞有旺盛的细胞分裂能力。据放射生物学研究可知, 分裂细胞对射线最敏感。脾脏作为贮血器官, 造血功能占次要地位, 分裂细胞相对较少。受辐照后, 两类细胞 DNA 合成能力的下降是细胞间期死亡和细胞 DNA 代谢功能衰退的综合表现。正因为两个器官的造血功能不一, 故恢复能力也不相同。仍保持活力的骨髓细胞能恢复增殖, 所以照后 10—15 d 幸存者 ^3H -TdR 掺入量逐渐恢复, 而脾脏淋巴细胞由于间期死亡、分裂中止, 致使脾脏萎缩及重量锐减。

3. 细胞膜的脂质过氧化和结构损伤

(1) 脂质过氧化 受照射后, 小鼠各脏器匀浆的自发化学发光明显增强, 它反映了细胞膜和

Tab 2. Effects of γ ray and SOD on SCL of the tissue homogenates in mice (n=2)

Organs	Test models	relative CL intensity			
		1 d	3 d	7 d	12 d
Liver	control	1.00	1.00	1.00	1.00
	SOD + ir.	2.67	0.28	0.45	1.51
	ir.	0.74	1.41	0.15	1.24
Brain	control	1.00	1.00	1.00	1.00
	SOD + ir.	1.54	1.10	0.92	1.09
	ir.	1.13	2.15	1.08	1.12
Kidney	control	1.00	1.00	1.00	1.00
	SOD + ir.	1.12	1.92	0.40	0.62
	ir.	0.73	3.45	0.30	0.40
Heart	control	1.00	1.00	1.00	1.00
	SOD + ir.	1.06	1.48	0.21	0.53
	ir.	0.58	2.79	1.18	0.57
Lung	control	1.00	1.00	1.00	1.00
	SOD + ir.	1.18	0.20	0.49	0.70
	ir.	0.67	6.08	0.47	0.84

组织中脂质过氧化加剧^[10]。脂质过氧化是辐射引发的自由基所启动的。SOD 能清除自由基, 降低和阻止脂质过氧化而起保护作用。肝、脑、肾、心、肺的匀浆, 照后第 3 d 的 SCL 普遍增强, 而注射过 SOD 的小鼠, SCL 普遍下降(见表 2)。从表 2 可见, 这种变化是波动型的, 它反映了机体中氧化和抗氧化的两个过程的竞争。从中也可看到 SOD 的辐射防护作用。

(2) 红细胞的辐射溶血 因小鼠取血量的限制, 本试验使用了人血红细胞。红细胞经 25 kGy γ 射线照射以后, 随着时间的推移, 细胞膜渐渐出现损伤现象, 表现于细胞内血红蛋白往外渗漏。膜损伤愈重, 外渗的血红蛋白愈多, 经离心后上清液的颜色愈深, 分光光度测到 O.D. 值愈大。照前或照后向红细胞悬液中加入 b-SOD, 可以不同程度地降低辐射溶血。照前加的效果极大地优于照后加; 高浓度的 SOD 优于低浓度, 其中 400 IU 的两组, 相对溶血量低于对照组, 这表明它不仅能抑制辐射溶血, 而且还能抑制贮存过程中红细胞的自氧化溶血(见表 3)

Tab 3. Effects of b-SOD on haemolysis of man erythrocytes by irradiation

Test groups	Control	Ir.	SOD + Ir.			Ir. + SOD		
			400 iu	100 iu	30 iu	400 iu	100 iu	30 iu
O. D. Value	1.2	6.0	0.28	1.4	2.8	0.6	2.33	4.5
Relative leakage (%)	0	400	-77.0	16.7	133.3	-50	94.2	275.0

红细胞膜辐照后溶血是膜结构损伤的表现, 而膜结构的损伤则是辐照引发的自由基去启动膜的链式过氧化的结果。辐射诱发的自由基包括了 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 , SOD 清除了 $O_2^{\cdot-}$, 阻断了继发的损伤反应, 从而可以降低红细胞的溶血量。

讨 论

本研究从存活率、脾重/体重之比、骨髓细胞和淋巴细胞 DNA 代谢合成、组织匀浆的自发光化学发光及红细胞的溶血等方面考察了 b-SOD 的辐射防护作用。由结果可知, b-SOD 是一种

较佳的抗氧化酶, 辐射防护效果较好, 其中存活率上高于汪家贵等^[5]报道的 CuZn-SOD. 据报道, SOD 在血液中的半衰期为 6 min, 而且照前注入 SOD 还存在辐射失活的问题, 加之已经过 10 多个半衰期, 其量已极微, 尚有良好的防护作用, 值得深入探讨。

选用细胞 DNA 合成、组织匀浆的超弱化学发光及红细胞的辐射溶血三项指标的目的, 在于考察辐射对两个主要的生物靶分子——DNA 和脂膜的影响。结果表明, 两个靶分子对辐射都是高度敏感的。机体具有损伤的修复能力, DNA 合成和 SCL 随时间的推移出现波动性变化, 反映了损伤与修复的矛盾斗争, 最后损伤占了主导地位, 导致机体不可逆损伤, 乃至死亡。

虽然 b-SOD 有较佳的辐射防护作用, 但它毕竟是原核生物的蛋白质, 用于动物或人身上是否有组织相容性问题尚待研究。从注射过 b-SOD 的小鼠第 1 d 精神萎靡、食欲不振、活动迟钝来看, 似乎有免疫反应。如果能与动物血中提取的 Cu-Zn-SOD 一样, 不存在宿主的相容性问题, 那么 b-SOD 可以进行大规模的发酵生产, 不受血源限制, 应用的前景是广阔的。

本研究承许建营、何雄、高志芹、孙承忠、叶慧等同志及朱文杰老师的帮助, 上海农科院钴源室代照动物, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 McCord J M, Fridovich I. J. Biol. Chem., 1969, 244: 6049
- 2 Petkau A, Chelack M S, Biochem. Biophys. Acta, 1976, 433: 455
- 3 Petkau A, Chelack M S, Int. J. Radiat. Biol., 1976, 29(3): 297
- 4 Nordenson I, Heredias, 1978, 89:163
- 5 汪家贵, 汪涛, 王洪云, 王明锁, 朱浴宇. 辐射防护, 1984, 4: 309
- 6 曹汉民, 胡天喜, 华燕, 季铃妹. 辐射研究与辐射工艺学报, 1990, 8(1): 1
- 7 胡天喜, 周小荣. 辐射研究与辐射工艺学术论文集, 上海医科大学出版社, 上海: 1990: 80-83
- 8 胡天喜, 夏嘉治. 核技术, 1986, 9: 40
- 9 李益新, 方允中. 生物化学与生物物理进展, 1983, 2: 59
- 10 Cadenas E, Sies H. Method in Enzymology, vol 105, Academic press, INC (London) Ltd. 1984: 221-231

(稿件收到日期: 1991 年 3 月 13 日)

RADIOPROTECTIVE EFFECTS OF BACTERIAL SUPEROXIDE DISMUTASE ON MICE

Hu Tianxi

(East China Normal University, Shanghai)

ABSTRACT The radioprotective effects of bacterial superoxide dismutase (b-SOD) on the mice irradiated by 8 Gy γ -ray were investigated. The results showed that when b-SOD was injected before and after irradiation, the survival fraction of mice is increased 50% and 30% respectively. The former treatment could increase the DNA synthesis of the myeloid cells and spleen's lymphocytes, decrease the LPO of tissue homogenates and the haemolysis of erythrocytes significantly. The mechanism that b-SOD can drop the radiation injury of the mice was discussed.

KEYWORDS γ -radiation, Survival fraction, Bacterial superoxide dismutase (b-SOD), Radioprotective effects