

照射后小鼠组织和血清中丙二醛含量的变化

杜泽吉 孙国器 苏燎原

(苏州医学院, 苏州 215007)

摘要 采用荧光分光光度法测定了小鼠组织和血清中丙二醛的含量变化。① 3.0 Gy 照射后 12—24 h 时, 丙二醛含量最高, 随后逐渐下降; ② 不同剂量(0—4.0 Gy)照射后 24 h 时, 丙二醛含量和照射剂量呈正相关, 即丙二醛的含量可很好地反映出机体的损伤情况; ③ Vit E 对辐照后小鼠氧化损伤具有保护作用, 250 $\mu\text{g/g}$ 重体的 Vit E 用量是抗氧化作用的最佳用量。

关键词 辐射, 组织, 丙二醛, 维生素 E

在电离辐射引发的生物损伤的间接作用中, 由水的辐解而产生的几种自由基起着重要作用。这些自由基具有很高的化学活性, 可和邻近的生物大分子发生化学反应, 造成组织损伤。其中脂质过氧化反应是自由基攻击细胞膜上的多聚不饱和脂肪酸(PUFA)而引发的一系列链锁反应, 最终产物有丙二醛(MDA)。因此测定 MDA 的含量, 在一定程度上可以反映体内脂质过氧化损伤的程度。Vit E 是一种抗氧化剂, 具有清除自由基和阻止脂质过氧化的作用, 它能否在辐射损伤中发挥保护作用, 目前尚未见报道。因此观察辐照后 MDA 的时相变化、MDA 的剂量效应关系, 以及 Vit E 的抗损伤作用, 对深入研究辐射损伤和防护具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 照射条件和实验动物

采用 ^{60}Co γ 射线, 剂量率为 1.0 Gy/min, 动物为昆明种小白鼠(系我院动物中心提供), 体重 20 ± 3 g, 雄性, 每组 5 只, 动物分组采取完全随机化法。辐照后 MDA 含量随时间的变化, 采用一次照射 3.0 Gy, 在辐照后不同时间, 测定 MDA 含量。

1.2 Vit E 的给药量及给药方式

Vit E 为厦门鱼肝油厂生产的胶丸, 每丸含 Vit E 10 mg, 用纯植物油配成 2 mg/ml、10 mg/ml 和 20 mg/ml 三种浓度。动物分为 6 组: 第 1 组为对照组, 第 2 组为植物油对照组(溶剂对照组), 第 3 组为照射对照组(一次全身照射 4.0 Gy), 第 4 组为 Vit E 50 $\mu\text{g/g}$ 体重组, 第 5 组为 Vit E 250 $\mu\text{g/g}$ 体重组, 第 6 组 Vit E 500 $\mu\text{g/g}$ 体重组。给药组的动物在照前 5 d 每天灌胃 0.5 ml 相应的制剂, 并在最后一次给药后 3 h 照射(后四组照射), 剂量 4.0 Gy, 于照后 24 h, 取组织进行 MDA 含量测定。

1.3 荧光分光光度测定法

本实验采用改进的微量荧光法^[1]。荧光分光光度计为日本 HITACHI 650-60 型。激发光(Ex)波长为 515 nm, 发射光(Em)波长为 553 nm。主要步骤如下: 取组织, 用生理盐水冲洗, 制备 20% 的组织匀浆。离心(2000 rpm, 8 min)后, 取 20 μl 上清, 加 4 ml 1/12 mol/L 的 H_2SO_4 , 0.5 ml 10% 的磷钨酸混匀后放置 5 min, 再离心(3000 rpm, 10 min)。去上清, 再重复沉淀一次。最后在沉

淀中加入 4 ml 双蒸水, 1 ml TAB-冰乙酸液(0.67%的硫代巴比妥酸与等体积乙酸混合), 充分悬浮后, 在 100 °C 水浴中加热 60 min。以室温自来水快速冷却后, 加 5 ml 正丁醇, 振荡萃取 2 min, 3000 rpm 下离心 10 min, 取上层有机相测荧光强度。标准管是以 50 μ l 10 nmol/L 的四乙氧基丙烷 (TEP), 直接加双蒸水和 TBA 溶液, 其余步骤同样品管。以相对于标准的相对荧光强度值(RF)来表示所测样品的 MDA 含量。

2 实验结果

2.1 3.0 Gy 照射后不同时间小鼠组织、血清中 MDA 含量

从表 1 中可看出, 正常小鼠组织中, 肾上腺和睾丸中 MDA 含量明显高于脾和小肠, 而血清则居中。在照射即刻, 以上各组织和血清中 MDA 含量变化不明显, 而辐照后 12—24 h, 其 MDA 含量急剧上升。从辐照后第 2 d 开始, MDA 含量有所下降, 到辐照后第 6 d, MDA 含量基本回复到正常水平。

Tab 1. MDA level of tissues and serum at different time after 3.0Gy irradiation

Time after irradiation/d	RF(M $\pm$ S)				
	Testis	Spleen	Intestine	Adrenal gland	Serum
0	186.4 $\pm$ 19.2	16.9 $\pm$ 4.3	19.1 $\pm$ 7.4	413 $\pm$ 29.4	79.9 $\pm$ 22.4
0.5	295.8 $\pm$ 29.6 ⁽²⁾	24.6 $\pm$ 6.9 ⁽¹⁾	60.5 $\pm$ 17.7 ⁽²⁾	461.7 $\pm$ 35.0 ⁽¹⁾	226.2 $\pm$ 63.1 ⁽²⁾
1.0	279.4 $\pm$ 5.8 ⁽²⁾	22.2 $\pm$ 2.5 ⁽¹⁾	52.3 $\pm$ 10.0 ⁽²⁾	548.3 $\pm$ 22.0 ⁽¹⁾	272.8 $\pm$ 69.6 ⁽²⁾
2.0	262.2 $\pm$ 44.7 ⁽¹⁾	17.1 $\pm$ 2.6	58.4 $\pm$ 8.7 ⁽¹⁾	524 $\pm$ 22.1 ⁽¹⁾	263.2 $\pm$ 50.4 ⁽¹⁾
3.0	210 $\pm$ 31.3	17.9 $\pm$ 4.5	36.6 $\pm$ 7.4 ⁽¹⁾	578.7 $\pm$ 22.7 ⁽¹⁾	197.2 $\pm$ 64.7 ⁽¹⁾
4.0	229.4 $\pm$ 40.3	17.4 $\pm$ 4.1	44.1 $\pm$ 8.7 ⁽¹⁾	603.7 $\pm$ 27.1 ⁽²⁾	84.3 $\pm$ 14.0
6.0	209.2 $\pm$ 36.4	18.3 $\pm$ 1.9	37.9 $\pm$ 6.7	534 $\pm$ 43.3 ⁽¹⁾	71.8 $\pm$ 16.6

⁽¹⁾P<0.05 ⁽²⁾P<0.01(compared with "0 day" group)

2.2 不同剂量 γ 射线辐照后 24 h, 组织和血清中 MDA 含量变化

从表 2 中可看出, 0.5 Gy γ 射线照射就可引起睾丸、脾、小肠、及血清(p<0.05)中 MDA 的含量升高; 随着剂量的增大, MDA 含量也逐渐升高, 尤以血清中 MDA 升高明显。

Tab 2. MDA level of tissues and serum at 24 h after different doses of irradiation

Dose /Gy	RF (M $\pm$ S)				
	Testis	Spleen	Intestine	Adrenal gland	Serum
0	181.8 $\pm$ 30.5	17.5 $\pm$ 2.1	17.1 $\pm$ 5.0	402 $\pm$ 32.8	80.7 $\pm$ 27.7
0.5	187.8 $\pm$ 12.7	19.0 $\pm$ 4.0	26.3 $\pm$ 5.3 ⁽¹⁾	433 $\pm$ 17.0	133.4 $\pm$ 17.4 ⁽¹⁾
1.0	193.4 $\pm$ 15.7 ⁽¹⁾	20.6 $\pm$ 2.3 ⁽¹⁾	32.1 $\pm$ 4.7 ⁽¹⁾	450 $\pm$ 18.7 ⁽¹⁾	208.4 $\pm$ 89.2 ⁽¹⁾
3.0	279.4 $\pm$ 5.8 ⁽²⁾	22.2 $\pm$ 2.5 ⁽¹⁾	52.3 $\pm$ 10.0 ⁽²⁾	448.3 $\pm$ 22.0	272.8 $\pm$ 69.6 ⁽²⁾
4.0	285.8 $\pm$ 19.8 ⁽²⁾	24.3 $\pm$ 4.0 ⁽²⁾	34.0 $\pm$ 5.6 ⁽¹⁾	692.7 $\pm$ 10.8 ⁽¹⁾	307.3 $\pm$ 31.9 ⁽²⁾

⁽¹⁾P<0.05; ⁽²⁾P<0.01 (compared with normal group)

2.3 Vit E 对辐照后小鼠血清中 MDA 含量的影响

结果表明, 溶剂组和正常对照组间差别无显著性(P>0.05), 说明植物油对 MDA 的产生无任何影响; 连续应用 5 d, 3 种 Vit E 用量对辐照后小鼠血清中 MDA 的产生都有抑制作用, 和

照射对照组相比, P 值均小于 0.01; Vit E 组中, 250 $\mu\text{g/g}$ 体重组的抑制作用明显大于 50 $\mu\text{g/g}$ 体重组 ($P < 0.01$); 而 500 $\mu\text{g/g}$ 体重组的作用与 250 $\mu\text{g/g}$ 体重组的作用基本一致。所以 Vit E 对小鼠血清中 MDA 产生抑制作用的最佳用量为 250 $\mu\text{g/g}$ 体重(结果见表 3)。

Tab 3. Effect of Vit E on MDA level of mice serum after 4.0 Gy irradiation

Group	No. of animals	RF ($M \pm S$)
1	6	87.6 $\pm$ 20.7
2	6	85.9 $\pm$ 21.0
3	5	289.0 $\pm$ 27.2
4	5	210.6 $\pm$ 17.4
5	5	112.6 $\pm$ 12.3
6	5	141.2 $\pm$ 17.5

3 讨 论

体内的一些正常生理过程都涉及到自由基的作用,如吞噬、细胞分裂、免疫保护等^[2,3],这些自由基在体内存在的清除系统[SOD、Vit E、Vit C、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)等]的作用下,可及时地得到清除,使体内自由基的产生和清除达到动态平衡,不会引起组织损伤。但当某种因子作用于机体,破坏了这种平衡,而自由基清除系统的功能又未能及时地代偿性增强,体内就会产生过多的自由基,这些活性基团就可通过一系列化学反应,引发组织损伤^[4]。

Slater^[5]认为,体内自由基的产生主要有二种方式,其一是由过渡金属和酶催化的一系列氧化还原反应,如 NADPH 的氧化和血红蛋白的氧化都伴有 O_2^- 的产生;其二是由电离辐射产生的,如水的辐射产物 $\text{OH}^\cdot$ 、 $\text{H}^\cdot$ 等。脂质过氧化是自由基引发损伤的主要途径,一旦前者被引发,新产生的自由基造成的损伤为总自由基损伤的 90%^[6]。生物膜上富含多聚不饱和脂肪酸,由于其结构的特殊性,使之易于被自由基所氧化,通过连锁扩增反应,产生一系列次生的自由基。脂质过氧化的结果,导致:①膜结构的破坏(PUFA 的氧化分解);②脂质过氧化代谢产物的增加,如醛类、酮类、烯炔类等,其中 MDA 是产额最高的,毒性最大的脂质过氧化代谢产物,它可和蛋白质分子、脂质分子或 DNA 分子的氨基结合,产生以 MDA 介导的带有荧光的大分子交联物(Schiff 碱)^[7]。MDA 也参与了老化、致癌和自身免疫病的发生过程。造成组织匀浆中 MDA 水平升高的原因很多,但自由基诱发的脂质过氧化是 MDA 产生的重要来源。所以测定 MDA 含量,对于了解机体的损伤情况具有重要意义。

照射剂量、组织敏感性和组织细胞内的 PUFA 的含量决定了辐照后 MDA 的水平。睾丸、脾、小肠都是高敏感组织,睾丸中 PUFA 含量高,可能使得小鼠睾丸中的 MDA 水平远大于脾;肾上腺受辐照后,一方面是由于照射引起腺体内脂质过氧化反应,致使 MDA 增加;同时其髓质的肾上腺素在匀浆中极易被空气的氧所氧化,产生一系列自由基反应,最后也导致 MDA 含量的升高。因此在本研究中,肾上腺 MDA 的含量不仅反映了射线作用后腺体内的脂质过氧化反应所致的损伤,可能也反映了腺体内肾上腺素的水平,结合我们已做的工作(待发表),认为后者似占主导地位。辐照后,肾上腺髓质功能激活,肾上腺素合成量增加,并随剂量增大肾上腺素合成和分泌量也增大。本研究显示出,3.0 Gy 辐照后 12 h,肾上腺 MDA 水平即明显增加,以后一直持

续在较高水平,直到辐照后6d时才有回复的趋势,这和致死剂量照射后肾上腺髓质功能的变化规律基本一致。血清中MDA,一部分来自血细胞的破坏,另一部分则来自全身各个组织,通过血液循环而到达血液中。所以测定血清中MDA水平的变化,可很好地反映整个机体的损伤情况。从理论上讲,照射剂量的大小决定了自由基产生的多少,进而决定了自由基反应产生的MDA含量,这和本研究结果是一致的。0.5 Gy照射就可引起MDA的升高,说明MDA含量测定对于检测辐射损伤具有一定的敏感性。照射后初期,随脂质过氧化物的产生,MDA逐渐升高,12—24 h时达到最大以后,机体表现出对它的清除作用,使之在组织、血清中含量有所下降,这就决定了照射后MDA随时间变化规律。

体内自由基清除系统有酶类和非酶类,Vit E是后者中最重要的一种,它是脂溶性的,是细胞膜中含有的物质之一,对维持膜结构和稳定性具有重要意义。Vit E的作用主要是清除自由基,阻断脂质过氧化、增强GSH-Px和CAT的活性。在临床上Vit E已被应用于治疗由自由基引起的损伤和疾病。Richard等人^[8,9]认为,Vit E在抗氧化过程中本身被消耗而减少,而相反的观点^[10]认为,Vit E可通过GSH和Vit C的还原作用而再生。从本文可以看出,在一定范围内,Vit E用量和抗氧化作用呈正相关,超过需要量,其抗氧化并不随之明显增强,反映了Vit E的抗氧化作用具有一个坪值。

MDA是脂质过氧化的代谢产物,具有致癌作用,它在辐射致癌的机制中起到多大作用,尚待深入研究。Vit E的抗氧化作用是显著的,但并不能无限地清除自由基,这就需要从自由基清除的其它途径,来研究不同药物间的协同作用,以期达到最好的抗氧化效果。

本文得到了李建祥先生和陈颖女士的大力帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 翁玉椿等. 细胞生物学杂志, 1985, 7: 142
- 2 Bruce M C et al.. Environ. Res., 1986, 39: 299
- 3 Dean R F Br. J. Cancer, 1987, 55(Suppl): 39
- 4 Chiu D et al., Semin. Hematol., 1989, 26: 257
- 5 Slater T F. Br. J. Cancer, 1987, 55(Suppl): 5
- 6 Tate R M et al.. Am. Rev. Respir. Dis., 1982, 126: 802
- 7 Brain E et al.. Gerontology, 1989, 35: 45
- 8 Richard C et al.. Crit. Care. Med., 1990, 18: 4
- 9 Bertrand Y et al.. Intensive Care. Med., 1989, 15: 87
- 10 Niki E. Br. J. Cancer, 1987, 55(Suppl): 153

LEVEL OF MALONDIALDEHYDE IN TISSUES AND SERUM OF IRRADIATED MICE

Du Zeji Sun Guoqi Su Liaoyuan

(Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

ABSTRACT The fluorospectrophotometric measurement was used to determine changes of malondialdehyde (MDA) level in mice tissues and serum after irradiation, and to assess the protective effect of Vitamin E on damage induced by free radicals. The results indicated: 1. The highest MDA level took place at 24 h after 3.0 Gy irradiation; 2. MDA level in tissues and serum was better elevated with the increase of irradiation dose; 3. Vit E had a effect on reducing MDA level, the most suitable dose of Vit E is 250 µg/g body weight of mice.

KEYWORDS Irradiation, Tissue, Malondialdehyde, Vitamin E