

MDA 和 SOD 在 VC、VE 对 ^{60}Co 照射家兔作用中的变化意义

梁欣, 海春旭*, 赵康涛, 刘瑞, 秦绪军

(第四军医大学预防医学系毒理学教研室, 陕西 西安 710032)

【摘要】背景与目的: 研究维生素 C(VC)、维生素 E(VE)对辐射损伤家兔的保护作用以及 SOD 和 MDA 在这一作用中的意义。材料与方法: 健康家兔 30 只, 按体质量和性别均衡随机分为 5 组, 每组 6 只。阴性对照组和阳性对照组, 均 iv 生理盐水 1 ml/kg 和 ig 处理过的花生油 1 ml/kg, 其余 3 组分别为复合实验 1、2、3 组: 分别 iv 剂量为 10、20、30 mg/kg 的 VC, 同时 ig 剂量分别为 20、40、60 mg/kg 的 VE。喂养第 3 d 阳性组及各实验组给予剂量为 4.5 Gy 的 ^{60}Co γ 线全身照射。照射后继续给药至第 5 d 后, 宰杀家兔取肝脏和腹腔静脉血后检测 SOD 和 MDA 的变化。结果: 家兔经照射后, 血清照射组 SOD 活性较正常组增加, 而给予 VC、VE 复合干预之后, 随干预剂量增加, 活性稍有降低, 但均高于正常组; 而肝脏照射组 SOD 的活性较正常组低, 给予不同剂量的干预因素后, 各组 SOD 值较照射组均增高。照射后血清 MDA 较照射有明显下降趋势, 高剂量时最低。而给予干预因素后, 肝脏 MDA 较照射组均明显降低。且中、高剂量组较低剂量组均低。结论: 照射后, 肝脏即应激性地释放 SOD 入血液, 使血液中 SOD 增高, 执行抗氧化功能, 给予干预因素后, 血液中 MDA 即降低, 因此肝脏 SOD 向血中释放减少。

【关键词】MDA; SOD; 抗氧化; 辐射损伤

中图分类号: R594

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2004)06-0341-03

Significance of Changes of SOD and MDA in Rabbits Protected by Vitamin C, Vitamin E From Injured by Irradiation

LIANG Xin, HAI Chun-Xu*, ZHAO Kang-tao, et al

(Department of Toxicology, Faculty of Preventive Medicine, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To Study the dose-effects relationship between Vitamin C(VC), Vitamin E(VE), and lipid peroxidation with the model of rabbit injured by radiation. MATERIAL AND METHODS: Chinese rabbits were chosen as the experimental animals and were randomly divided into 5 groups. They were negative control group, positive group, and trial groups of VC, VE. The trial groups contained three different dosages of VC and three different dosages of VE. Peanut oil was selected as diluent which had been gotten rid of vit E. The five groups were supplied by injection of vein with the dosages of VC 10 mg/kg, VC 20 mg/kg, VC 30 mg/kg everyday respectively. The three VE groups were supplied by gavages with the dosage of VE 20 mg/kg, VE 40 mg/kg, VE 60 mg/kg, everyday respectively too. On the third day all groups, except negative control group, were radiated by ^{60}Co with the dose of 4.5 Gy. Then they were fed as before, and on the sixth day all rabbits were killed, blood and liver were removed for the analysis of changes in catalytic activity of SOD and content of MDA by means of Auto-machine. RESULTS: After the radiation, the catalytic activities of hepatic SOD in radiation groups were higher than those in the negative control group ($P < 0.01$), and trial groups of VC and VE showed some protective effect of rabbit against radiation, and there was a dose-effect relationship between the VC, VE and radiation injury. The content of hepatic MDA in trial group was

收稿日期: 2004-02-13; 修订日期: 2004-04-25

作者简介: 梁欣(1957-), 女, 满族, 黑龙江省哈尔滨市人, 实验师, 硕士, 研究方向: 卫生毒理学与自由基毒理学。

* 通讯作者: Tel: 029-83374879, E-mail: cx-hai@mail.fmmu.edu.cn

lower than positive group ($P < 0.01$). They showed some effect of protective effects against increase of MDA, and showed the dose-effect relationship between the dosage of VC、VE and protection against injury of irradiation. **CONCLUSION:** The effect of individual use of VC、VE has protest effect of SOD catalytic activity and inhibition on MDA which exists dose-effect relationship; The antioxidation of vit.E can not protest against radiation of peripheral blood and immunological cells. When VC and VE were given to rabbits together, there was a protective effect on rabbits injured by radiation of ^{60}Co γ ray.

【KEY WORDS】 SOD; MDA; radiation injury; antioxidation

超氧化物歧化酶(Super oxide dismutase, SOD)是一种广泛存在于动植物、微生物中的金属酶,它催化超氧阴离子自由基 O_2^- 发生歧化反应^[1],从而清除 O_2^- 。目前国内对SOD的研究主要集中在应用及与应用直接相关的基础理论的研究上,涉及到化学、生物、医药、日用化工、食品诸领域^[2]。近年来的研究表明SOD在维持生物体内 O_2^- 的产生与消除的动态平衡中起重要作用^[3,4],它能防御氧毒性,增强机体抗辐射损伤能力,还可预防衰老,在一些疾病如肿瘤、炎症及自身免疫疾病等的治疗中有良好的疗效。而在SOD的抗衰老、抗辐射、抗炎和抗癌及其作用机制、吸收机制研究方面已取得很大进展。丙二醛(MDA)是过氧化脂质的降解产物,通过检测MDA的含量可以判断脂质过氧化反应的程度。通过对维生素C(VC)、维生素E(VE)在辐射损伤家兔模型保护作用中SOD和MDA的变化研究,了解VC、VE在家兔辐射氧化损伤中的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料 970CRT型荧光分光光度计(上海分析仪器总厂),722光栅分光光度计(山东高密仪器厂),

1.2 试剂 磷钨酸(AR 上海化学试剂公司)配成100 g/L的水溶液,硫代巴比妥钠(AR, 上海试剂二厂)与1:1的冰醋酸配成6.7 g/L的溶液,正丁醇(AR, 天津泰兴试剂厂)用水饱和,Triton(上海试剂有限公司)配成3 ml/L的水溶液,氯化硝基四氮唑兰(上海前进农场试剂厂)配成0.98 mmol/L的水溶液,盐酸羟胺(天津化学试剂厂)配成6 mmol/L的水溶液,VE针剂(0.4 g/ml, 陕西西安制药厂产品),VE(Sigma产品),食用花生油(青岛嘉里植物油有限公司产品)经脱除VE处理。VC溶液分别用生理盐水配制25、50、75 ml/L的溶液,VE溶液分别用脱除VE的花生油配制成20、40、60 g/L的溶液。

食用花生油脱出VE的处理:取2 500 ml食用花生油,在分液漏斗中,加等容积的无水乙醇与油充分混合、萃取5 min后静置,收集下层油液,如此重复

操作3次后,油中VE基本除去,然后在260℃条件下加热120 min,除去油中残余乙醇及VE,冷却后作为配置VE的溶液,灌胃量按1 ml/kg灌胃。

1.3 实验动物 家兔30只(一级动物),雌雄各半,1.7~2.7 kg,3月龄(由第四军医大学实验动物中心提供)。

1.4 实验方法

1.4.1 分组与处理 将家兔按体质量和性别均衡随机分为5组,每组6只。阴性对照组和阳性对照组,均iv生理盐水1 ml/kg和ig处理过的花生油1 ml/kg。其余3组分别为复合实验1组、复合实验2组、复合实验3组:iv VC的剂量分别为10、20、30 mg/kg,同时ig给予VE的剂量分别为20、40、60 mg/kg。每组雌雄分开喂养,自由摄食,饮水;喂养第3 d阳性组及各实验组给予剂量为4.5 Gy的 ^{60}Co γ 线全身照射。处理前12 h停喂饲料,不停水。照射后继续给药至第5 d后,乙醚麻醉家兔,剖腹取肝脏和腹腔静脉血后检测SOD和MDA的变化。

1.4.2 血清SOD的测定 取非抗凝血上清液30 μl ,加入75 mmol/L的 $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 缓冲液2 ml和3 mol/L的Triton X-100 0.1 ml;混匀后再加入0.98 mmol/L的NBT 0.1 ml和6 mmol/L的 $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$;经过10 min的37℃的水浴震荡后,加入2 ml甲酸混匀,然后用722光栅分光光度计测出其A值。

1.4.3 荧光分光光度法测MDA 肝脏加入生理盐水(2.0 ml/g肝脏),用电动玻璃匀浆器匀浆(1 000 r/min),研杵上下移动10次,离心(1 000 r/min)后,取样品上清液50 μl 后,加入0.04 mol/L的 H_2SO_4 4 ml和100 g/L磷钨酸500 μl 并摇匀,2 000 r/min离心5 min后弃上清,再加入0.04 mol/L的 H_2SO_4 2 ml和100 g/L磷钨酸300 μl ,同上法摇匀并离心,弃上清后加双蒸水1 ml和6.7 g/L TBA 1 ml并摇匀,100℃水浴煮沸1 h,冷却后加入水饱和正丁醇4 ml并震荡抽提1 min后离心,然后用荧光分光光度计测上清的A值。血清样品50 μl 同上法检测血清MDA的变化。

1.5 实验结果处理 用方差分析。

2 结果

2.1 血清 SOD 的变化 照射后, 血清 SOD 活性较正常组增加 ($P < 0.01$), 而给予 VC、VE 复合干预之后, 低剂量组较阳性组稍高, 而干预剂量增加后, 活性稍有降低, 但均高于正常组 ($P < 0.01$)。见图 1。

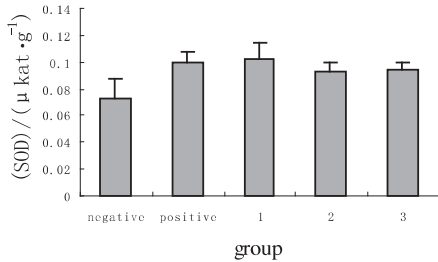


图 1 VC、VE 对 ⁶⁰Co 照射家兔血清 SOD 的影响

Figure 1 Effect of vitamin C, vitamin E on SOD activity of blood in rabbit

2.2 血清 MDA 的变化 照射组 MDA 含量较正常组稍高, 给予各剂量组的干预因素后, MDA 有明显下降趋势 ($P < 0.05$) 高剂量时最低。见图 2。

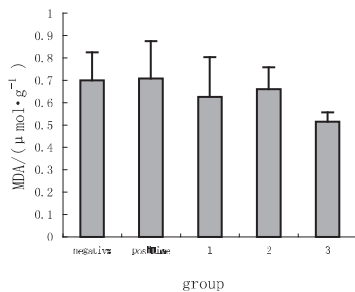


图 2 VC、VE 对 ⁶⁰Co 照射家兔血清 MDA 的影响

Figure 2 Effect of vitamin C, vitamin E on blood MDA in rabbit

2.3 肝脏 SOD 活力的变化 照射组 SOD 活性较正常组低, 给予不同剂量的干预因素后, 各组 SOD 值较照射组均增高, 但随剂量增加而活力降低。见图 3。

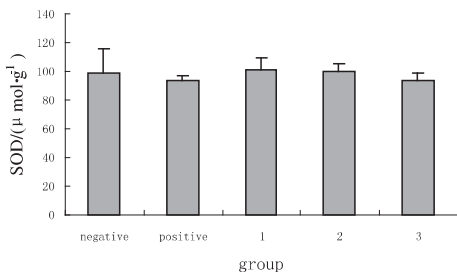


图 3 VC、VE 对 ⁶⁰Co 照射家兔肝脏 SOD 的影响

Figure 3 Effect of vitamin C on SOD activity of liver in rabbit

2.4 肝脏 MDA 的变化 照射组 MDA 较正常组降低 ($P < 0.05$), 给予干预因素后, MDA 较照射组均明显降低 ($P < 0.05$)。中、高剂量组较低剂量组均低。见图 4。

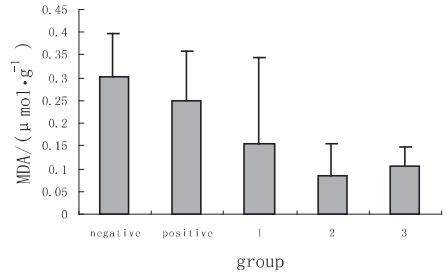


图 4 VC、VE 对 ⁶⁰Co 照射家兔肝脏 MDA 的影响

Figure 4 Effect of vitamin C, vitamin E on hepatic MDA of rabbit

击中靶分子, 靶分子发生电离与激发产生自由基, 从而导致细胞生物膜、DNA 大分子、蛋白质以及一系列小分子的糖脂损伤, 最终导致多种自由基对细胞的功能和结构损伤^[5]。VE 和 VC 都是机体的抗氧化剂。在抗氧化过程中, 通过抗坏血酸自由基和其它产物如过氧化氢、活性氧等协同维生素 E 的还原作用^[6]。目前, VE 的抗氧化作用是医学邻域的热点问题^[7], VC、VE 对辐射引起的生物学损伤的相互协同作用还鲜有报道, 本文以家兔为实验对象, 采用 4.5 Gy 的 ⁶⁰Co γ 线进行照射, 通过测定超氧化物歧化酶 (SOD) 催化活性和过氧化损伤产物丙二醛 (MDA) 含量变化, 以验证 VE 和 VC 在抗氧化过程中的协同作用。

实验结果显示, 血液中 SOD 活性在加入干预因素后, 活性除低剂量组外, 均有不同程度的降低, 而在肝脏中, SOD 的变化恰恰相反, 各干预组活性值均有升高; 肝脏是人体最大的解毒器官, 其含 SOD 的量也很高, 经过 ⁶⁰Co γ 线照射后, 肝脏 SOD 值即降低, 而给予抗氧化剂干预后, SOD 值即恢复, 表明肝脏对辐射造成的氧化损伤非常敏感, 会立即释放 SOD 入血液, 执行抗氧化损伤的功能, 亦可能是首先受损的脏器之一。而血液则是辐射损伤中的“快反部队”, 损伤立即产生 SOD 对辐射造成的氧化损伤作出反应, 给予抗氧化干预后, 肝脏对 SOD 即回落。结果中亦可以看见, 低剂量时 SOD 活性仍然很高, 可能由于抗氧化保护不够, 仍然需要自身的应激来对抗氧化损伤; 同样肝脏低剂量时 SOD 值高, 也说明该剂量级对抗氧化损伤的能力可能不能达到要求, 大剂量的抗氧化剂才是抗辐射损伤的关键。

肝脏和血清中, 干预各组的 MDA 值均较辐射对照组低 ($P < 0.05$), 说明联合抗氧化剂对辐射损伤造成的抗氧化剂效果很明显; 结合 SOD 值的变化, 血清照射组 SOD 和 MDA 值均高, 是由于机体系统的应激所致, 低剂量的抗氧化剂并没有起明显作用; 而肝脏 SOD 值不高, MDA 亦不高, 表明在抗氧化损伤的过程是多个抗氧化剂联合作用的过程, 亦表明肝脏强大

(下转 346 页)

3 讨论

放射线对细胞生物化学损伤的主要是: 电离辐射

3 讨论

胃癌的发生源于多基因异常, 抑癌基因的缺失和(或)突变是导致胃癌发生的重要原因。*P53*、*P16* 基因都是非常重要的抑癌基因。*P53* 蛋白控制与细胞周期相关的基因的表达^[3], 在 DNA 受到损伤时, *P53* 蛋白在细胞核内积累, 将细胞周期阻滞于 G₁ 期, 使 DNA 进行修复; 如 DNA 修复失败, 则启动细胞凋亡。*P16* 蛋白作为细胞周期的抑制因子, 通过抑制 cyclin 与 cdk4/cdk6 结合而阻止 Rb 蛋白磷酸化, 进而抑制一些与细胞增殖相关的基因的表达, 最终抑制细胞增殖^[4]。本实验在细胞水平单独和联合应用野生型抑癌基因 *P53*、*P16*, 观察单独和联合应用 *P53*、*P16* 基因的抑癌作用的大小, 以探索抑癌基因治疗胃癌的可能性和大小。

细胞水平及动物体内的许多研究表明^[1-5], 单独运用病毒或非病毒载体的正常的外源抑癌基因 *P53*、*P16* 具有明显的抑制肿瘤的效果, 本实验与文献结果相一致。逆转录病毒载体介导的野生型 *P53*、*P16* 基因, 均可抑制胃癌细胞 HGC27 的生长, 促进细胞凋亡。对 *P53*、*P16* 基因联合共转染与单独转染进行比较, 发现共转染可显著抑制胃癌细胞 HGC 的生长, 并促进凋亡。*P53*、*P16* 基因具有协调增强作用, 此种协同作用的机制可能与两种基因通过不同途径在细胞

周期中共同起负调控作用有关。总之, 通过本实验观察抑癌基因 *P53*、*P16*, 以及 *P53* 与 *P16* 联合对胃癌细胞系的转基因治疗效果, 可能为今后人类胃癌基因治疗提供有意义的实验资料。

参考文献:

- [1] Jin X, Nguyen D, Zhang WW, *et al.* Cell cycle arrest and inhibition of tumor cell proliferation by the p16INK4 gene mediated by an adenovirus vector[J]. *Cancer Res*, 1995, 15: 3 250-3 253
- [2] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, A Laboratory Manual(2nd ed) [M]. Cold Spring Laboratory Press, New York, 1989.
- [3] Nielsen LL, Lipari P, Dell J, *et al.* Adenovirus-mediated p53 gene therapy and paclitaxel have synergistic efficacy in models of human head and neck, ovarian, prostate and breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4: 835-846.
- [4] Schmidt EE, Ichimura K, Reifenger G, *et al.* CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas[J]. *Cancer Res*, 1994, 54: 6 321-6 324.
- [5] Wang TJ, Huang MS, Hong CY, *et al.* Comparisons of tumor suppressor p53, p21, and p16 gene therapy effects on glioblastoma tumorigenicity in situ[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287: 173-180.

(上接 343 页)

的抗氧化功。

综上所述, 在氧化损伤的防护过程, 是一个复杂的过程, 抗氧化亦是多种类抗氧化剂的联合作用过程, 其中大剂量是关键。

参考文献:

- [1] Hai CX. Investigation of Synergistic action of antioxidants and the traditional Chinese medicine[A]. In: National foundation committee CSTA Life Science and Biotechnology [M]. Beijing publishing Co. of CSTA, 1998. 324-327.
- [2] Hai CX, Zhang WQ, Gong SM, *et al.* Effect of antioxidant of vitamin A, vitamin C and vitamin E in microsomal model Department life science in NNSF[A]. In: The first seminar of younger's biologic academic <NNSFC> [M]. Beijing: publishing Co. of Chinese Agriculture, 1993. 149-150.
- [3] Tian SL, Bing WG, FenBiao, *et al.* Transformation of the

content of free radical and lipld. peroxidation in vivo of rat irradiated by X-ray[J]. *Baiqien medical university*, 1995, 21(3): 252-254.

- [4] Qian PP, Cheng SQ, Guo JS, *et al.* Effect of vitamin C and vitamin E on unenzymic Glycation and peroxidate action in rat with diabetes[J]. *Med Res*, 2000, 29(4): 226-228.
- [5] Sun CP. An Introduction of Free Radical's Biology [M]. Beijing: publishing Co. of Chinese scientific and technological university, 1994. 04.
- [6] Eberlein KB, Fesq H, Abeck D, *et al.* Systemic vitamin C and vitamin E do not prevent photoprovocation test reactions in polymorphous light eruption[J]. *Photodermatol photoimmunol Photomed*, 2000, 16(2): 50-52.
- [7] Umegaki K, Sano M, Suzuki K, *et al.* Increases in 4-hydroxynonenal and hexanal in bone marrow of rats subjected to total body X-ray irradiation: association with antioxidant vitamins[J]. *Bone Marrow Transplant*, 1999, 23(2): 173-179.