

# 电离辐射对动物机体几个主要酶系作用的研究(一)

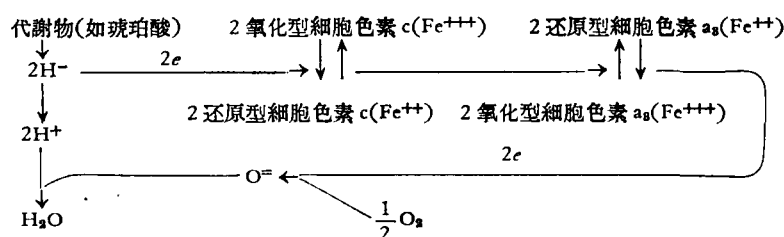
## ——电离辐射对小白鼠肝脏呼吸酶(细胞色素氧化酶及琥珀酸氧化酶系)的作用

黄大有 陶其敏 刘庚年 周永瑩 陈珊珊\*

1. 以 LD<sub>50</sub> X 射线全身外照射正常小白鼠, 在照射后 2, 8, 15, 40 小时, 3 1/2 日, 4 日, 4 1/2 日, 5 1/2 日, 6 日, 7 日及 8 日分别观察肝匀浆内细胞色素氧化酶及琥珀酸氧化酶系活力的改变。
2. 细胞色素氧化酶系在上述时间内均未发现任何明显的抑制或激活。
3. 琥珀酸氧化酶系则在照射组照射后 3 1/2 日出现活力增强的高峰, 重复实验亦得到基本相同的結果。
4. 对肝脏琥珀酸氧化酶系活力在照射后未发生抑制并有增高的机制进行了讨论。

细胞色素氧化酶(细胞色素 a<sub>3</sub>)及琥珀酸脱氢酶为动物机体两个重要的呼吸酶。前者为以铁叶啉为辅基的酶, 后者为一种硫氢基酶(-SH Enzyme), 二者皆存在于细胞的微粒体上。细胞色素氧化酶广泛分布于动物的各种细胞内<sup>[1]</sup>。琥珀酸脱氢酶在动物体内则大量存在于肾、肝、心肌、脑、睾丸、骨骼肌、肺、肾上腺及甲状腺内, 在视网膜组织内, 亦有一定活力<sup>[2,3]</sup>。

细胞色素氧化酶主要的作用为催化还原型细胞色素 c(Fe<sup>++</sup>) 被氧化变为氧化型细胞色素 c(Fe<sup>+++</sup>), 亦即细胞色素氧化酶由还原型细胞色素 c 获取电子, 并将此电子传递给分子氧, 使分子氧变为 O<sup>=</sup>, 而与来自代谢物(底物)的 H<sup>+</sup> 结合成 H<sub>2</sub>O, 其作用方式如下:



琥珀酸脱氢酶与细胞色素氧化酶系统连接后构成了琥珀酸氧化酶系, 其连接方式根据近年见解<sup>[4]</sup>为:

琥珀酸 → 琥珀酸脱氢酶 → (?) → 细胞色素 b → X 因子 (Slater 氏因子) → 细胞色素 c<sub>1</sub> → 细胞色素 c → 细胞色素 a<sub>3</sub> → O<sub>2</sub>.

在上述反应式中, 三羧循环中间产物琥珀酸经琥珀酸脱氢酶变为反丁烯二酸及 2H, 后者则通过电子传递系统与分子氧结合成水。

由上得知, 细胞色素氧化酶及琥珀酸氧化酶系为生物氧化的重要机构, 而前者为机体的重要电子传递体。因此, 在观察电离辐射生物效应方面, 研究此二种酶系的反应已得到广泛的重

\* 本文作者黄大有、陶其敏、周永瑩和陈珊珊系北京医学院附属人民医院内科教研组的, 刘庚年系放射科教研组的。

視<sup>[5-7]</sup>。有关这方面研究的总的結果虽然指出了电离輻射对上述二种酶的活力无显著的影响,但由于观察的时间、放射剂量以及实验条件的不同,故在結果上亦非完全一致。

本文旨在进一步較系統地观察全身半致死量X射线外照射对小白鼠肝脏細胞色素氧化酶及琥珀酸氧化酶系在照射后不同时间内的影响,并对其发生变化的原因,提出討論。

## 一、实验材料及方法

### 1. 动物选择及准备工作

分别取体重20—25克的瑞士种及昆明种正常雄性小白鼠各一批作为实验对象。每批动物皆喂以混合食<sup>1)</sup>。两批动物分别各取90只进行X射线半致死剂量(400伦)全身外照射(220千伏,15毫安,滤板Cu 0.5毫米 + Al 1.0毫米,照射时间10分32秒)。并将两批各按10组一分分为9组,准备在照射后不同时间进行酶活力测定。动物在进行测定前12小时以内,除水份外,皆停止喂食。

### 2. 照射组动物测定酶活力的时间安排

(1) 瑞士种小白鼠:取30只不經照射的小白鼠分批测定肝脏酶活力(对照组)。經照射的9组小白鼠分别在照射后15小时,40小时,3 $\frac{1}{2}$ 日,4日,4 $\frac{1}{2}$ 日,5 $\frac{1}{2}$ 日,6日,7日及8日进行肝脏細胞色素氧化酶及琥珀酸氧化酶系的测定。

(2) 昆明种小白鼠:取8只不經照射的小白鼠测定肝脏酶活力(对照组)。經照射的9组小白鼠分别在照射后2,8,15及40小时,3 $\frac{1}{2}$ 日,4 $\frac{1}{2}$ 日,5 $\frac{1}{2}$ 日,6日及8日测定肝脏琥珀酸氧化酶系的活力。并在照射后2及8小时测定肝脏細胞色素氧化酶的活力。在分别测定照射组动物的琥珀酸氧化酶系活力的同时,再测定正常小白鼠2只以資对照。

### 3. 肝脏細胞色素氧化酶活力的测定

用击头法杀死动物,立即剖取肝脏,洗去附着血液,称重,用冰冷双蒸蒸馏水在匀浆器内磨成10%的肝匀浆,并将匀浆置冰浴内备用。另以扭力天秤称取一定量重的肝脏在105℃左右烘干,用以求得干重。按施奈德尔(Schneider)及頗特(Potter)法<sup>[10]</sup>测定匀浆中細胞色素氧化酶的活力,以抗坏血酸做細胞色素c的还原剂。测定时向瓦尔堡(Warburg)呼吸瓶内加入10%肝匀浆0.5毫升,0.25 M磷酸缓冲液(pH为7.3)0.3毫升,1 $\times 10^{-4}$  M細胞色素c<sup>2)</sup>1.0毫升。支管内加0.25 M抗坏血酸(pH为7.3,用2N NaOH配制新鮮的)0.2毫升。测定条件以空气为气相,水浴温度37℃,搖速100/分,振幅6厘米。测定每个样品15分鐘的氧吸收量,再按組織干重計算其 $Q_{O_2}$ 值。

### 4. 琥珀酸氧化酶系活力的测定

制备肝匀浆法及测定条件与前同。按施奈德尔及頗特法<sup>[10]</sup>测定,测定时向呼吸瓶内加10%肝匀浆0.5毫升,0.5 M磷酸缓冲液(pH为7.3)0.5毫升,1 $\times 10^{-4}$  M細胞色素c 0.8毫升。支管内加入0.25 M琥珀酸钠(pH为7.3)0.2毫升。测定肝匀浆20分鐘的氧吸收量,再按組織干重計算其 $Q_{O_2}$ 值。

## 二、实验結果

半致死量X射线外照射对小白鼠肝脏細胞色素氧化酶活力的影响:在照射后不同时间(自15小时至第8日)分批测定肝匀浆細胞色素氧化酶的活力与正常小白鼠的結果比較,如表1a

1) 混合食內含:高粱粉36.36%,玉米粉36.36%,豆餅粉16.16%,麦麸皮8.08%,食盐1.42%,魚肝油1.62%。

2) 細胞色素c系北京大学生物系生物试剂厂供应,比純度为76%。

及图 1 所示。实验结果说明照射组的酶活力除在 15 小时及第 7 日稍有降低外,余均无明显异常,且该两次酶活力之降低与正常值比较其机率( $P$ 值)均大于 0.05,均无显著差异性。为了探讨在照射后 15 小时以前此酶活力的改变,又以昆明种小白鼠进行补充实验,其结果见表 1b。由表 1b 得知,照射后 2 小时的酶活力与正常值对比其机率  $> 0.05$ ,无明显差异;照射后 8 小时虽较正常值稍高(机率 = 0.05),但与同时的正常对照结果相比较,则相差无几。因之,总的情况表明半致死量 X 射线外照射小白鼠,在 8 日以内各个阶段基本上未引起肝脏细胞色素氧化酶系活力的明显变化。

表 1a X 射线(LD<sub>50</sub>)全身外照射小白鼠(瑞士种)对肝匀浆细胞色素氧化酶活力的影响\*

		动物数	细胞色素氧化酶活力 [ $Q_{O_2}$ ]			$t$ 值	机率 ( $P$ )
			均数 (M)	标准差 (S.D.)	标准误 (S.E.)		
照射后	正常对照	30	32.34	5.24	0.97		
小时	日						
15		10	27.89	4.03	1.30	1.62	$> 0.05$
40		9	32.68	3.89	1.29	0.02	$> 0.50$
	3 ½	6	31.28	2.73	1.11	0.73	$> 0.05$
	4	6	34.24	5.30	2.10	0.82	$> 0.05$
	4 ½	9	33.84	4.43	1.47	0.87	$> 0.05$
	5 ½	9	31.92	3.42	1.14	0.28	$> 0.50$
	6	8	32.25	4.30	1.50	0.05	$> 0.50$
	7	3	26.46	5.06	3.10	1.66	$> 0.05$
	8	3	31.60	1.99	1.20	0.48	$> 0.50$

\* 实验工作在 1959 年 7 月进行。

表 1b X 射线(LD<sub>50</sub>)全身外照射小白鼠(昆明种)对肝匀浆细胞色素氧化酶活力的影响\*

		动物数	细胞色素氧化酶活力 [ $Q_{O_2}$ ]			$t$ 值	机率 ( $P$ )	同时所进行之正常对照	
			均数 (M)	标准差 (S.D.)	标准误 (S.E.)			动物数	酶活力 [ $Q_{O_2}$ ] 均数
照射后, 小时	正常对照	10	60.57	±5.32	±1.70				
2		6	57.46	±6.10	±2.10	1.15	$> 0.05$	2	54.33
8		5	65.05	±2.50	±1.12	2.16	=0.05	2	65.00

\* 实验工作在 1960 年 2 月进行。

半致死量外照射对小白鼠肝脏琥珀酸氧化酶系活力的影响:用瑞士种小白鼠进行实验的结果(表 1a 及图 2)说明,自照射后 40 小时至 5 ½ 日期间琥珀酸氧化酶系的活力较正常对照组有所增加,其增加的高峯在 3 ½ 日 ( $t$  值 = 3.26,  $P < 0.01$ )。在照射后 4 ½ 日亦有较显著的增高 ( $t$  值 = 2.71,  $P < 0.01$ )。为了进一步明确实验结果的可靠性,用昆明种小白鼠进行了实验重复,并得到了与前基本相同的结果,在照射后 3 ½ 日亦同样出现了琥珀酸氧化酶系活力的显著增加 ( $t$  值 = 4.70,  $P < 0.01$ ),在照射后第 5 ½ 日及第 6 日酶活力亦有增强 ( $t$  值分别为 3.33 及 2.82,  $P$  值分别为  $< 0.01$  及 0.05),其变化过程见表 3 及图 3。

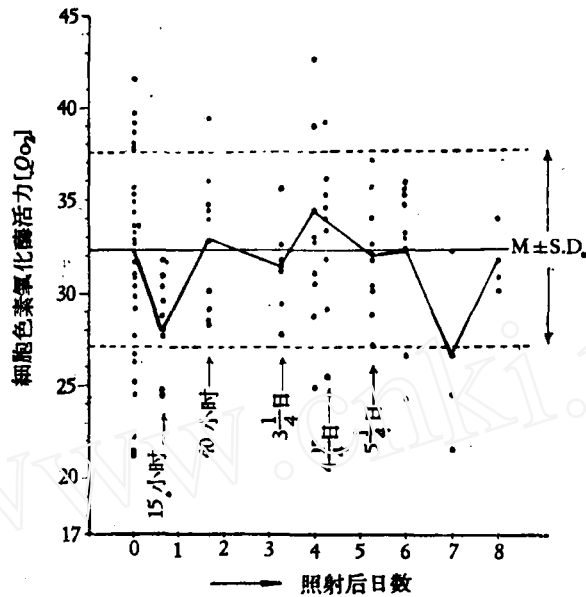


图1 X射线外照射(LD<sub>50</sub>)小白鼠(瑞士种)对肝匀浆细胞色素氧化酶活力的影响(1959.7.)

●—● 照射组肝匀浆细胞色素氧化酶活力变化曲线

表2 X射线(LD<sub>50</sub>)全身外照射小白鼠(瑞士种)对肝匀浆琥珀酸氧化酶系活力的影响\*

		动物数	琥珀酸氧化酶系活力[QO <sub>2</sub> ]			t 值	机率(P)
			均数(M)	标准差(S.D.)	标准误(S.E.)		
正常对照		31	13.30	±2.5	±0.45		
照射后							
小时	日						
15		10	12.80	±2.7	±0.86	0.52	>0.50
40		10	17.32	±3.9	±1.24	0.31	>0.50
	3 1/4	5	21.39	±6.8	±2.34	3.26	<0.01
	4	7	16.31	±4.5	±1.73	1.77	>0.05
	4 1/4	9	18.19	±5.2	±1.73	2.71	<0.01
	5 1/4	8	15.00	±5.0	±1.76	0.94	>0.50
	6	6	12.86	±2.1	±0.72	0.52	>0.50
	7	3	10.53	±2.6	±1.53	1.84	>0.05
	8	3	10.71	±1.8	±1.06	1.96	>0.05

\* 实验工作在1959年7月进行。

表3 X射线(LD<sub>50</sub>)全身外照射小白鼠(昆明种)对肝匀浆琥珀酸氧化酶系活力的影响\*

		动物数	琥珀酸氧化酶系活力[QO <sub>2</sub> ]			t 值	机率(P)
			均数(M)	标准差(S.D.)	标准误(S.E.)		
正常对照		8	33.65	±5.15	±1.83		
照射后							
小时	日						
2		6	38.82	±3.67	±1.53	2.17	=0.05
8		5	39.52	±5.60	±2.50	1.89	>0.05
15		6	31.96	±3.37	±1.16	0.78	>0.05
40		5	37.61	±3.07	±1.37	1.73	>0.05
	3 1/4	8	43.43	±2.83	±1.00	4.70	<0.01
	4 1/4	8	35.55	±3.54	±1.25	0.86	>0.05
	5 1/4	6	41.46	±3.28	±1.47	3.33	<0.01
	6	7	40.24	±3.77	±1.45	2.82	<0.05
	8	8	31.61	±4.18	±1.48	0.86	>0.05

\* 实验工作在1960年2月进行。

### 三、討 論

巴隆(Barron)曾报告以100—900伦照射大白鼠,在照射后4小时内,其肝、脾、肾、肾上腺及睾丸的组织呼吸降低,需-SH酶参加的氧化过程亦有降低<sup>[11]</sup>.累梅(LeMay)报告以400伦或800伦对大白鼠进行全身外照射,在照射后2小时内鼠肾匀浆之琥珀酸氧化酶系、琥珀酸脱氢酶及细胞色素氧化酶均无明显变化.他同时观察鼠肾切片的细胞呼吸不论加否底物(琥珀酸或丙酮酸)与正常对照组之间亦无明显差异<sup>[5]</sup>.菲舍尔(Fischer)等报告以800伦全身外照射大白鼠后立即观察肝及脾匀浆中细胞色素氧化酶、三磷酸腺苷酶及乳酸脱氢酶的活力,发现它们均无改变.但脾匀浆之琥珀酸氧化酶系活力在照射后一周以内(尤以照射后第二天)有所降低,此种降低可被照射前或照射后注射L-半胱氨酸所防止<sup>[8]</sup>.艾希韦耳(Ashwell)及希克曼(Hickman)发现,在照射后较长时间內,小白鼠脾中琥珀酸氧化酶系无明显改变,但未进行照射后数日内的实验观察<sup>[7]</sup>.

我们的实验结果,证明肝脏细胞色素氧化酶的活力对半致死量外照射的反应与前述学者的实验结果一致.但肝脏琥珀酸氧化酶系活力在照射后有所增加,其增加与细胞色素氧化酶无关,已由本实验及其他学者的报告得到证明.沙皮罗(Шапиро)报告<sup>[12]</sup>高致死量电离辐射作用于动物机体后,在2日以内可以引起机体严重的生化、生理、甚至形态学的改变,对小白鼠来说,照射反应最激烈的阶段为照射后第4—5日.因此半致死量X射线外照射小白鼠,在照射后3½日出现琥珀酸氧化酶系的改变在时间上与剧烈的放射反应阶段是一致的.

根据电离辐射作用于机体内H<sub>2</sub>O的结果,可产生OH·自由基及HO<sub>2</sub>·自由基,这些自由基具有强的氧化作用,而可使-SH酶(例如琥珀酸脱氢酶)的SH基被氧化,

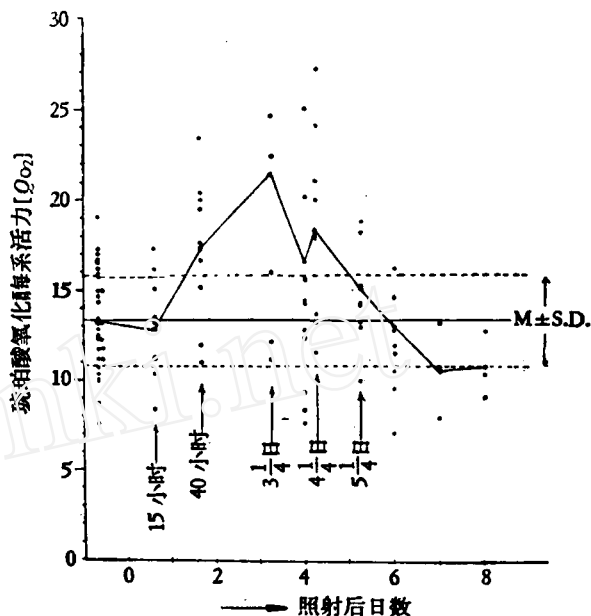


图2 X射线(LD<sub>50</sub>)全身外照射(瑞士种)对肝脏琥珀酸氧化酶系活力之影响(1959.7.)

●—● 照射组肝与浆琥珀酸氧化酶系活力的变化曲线

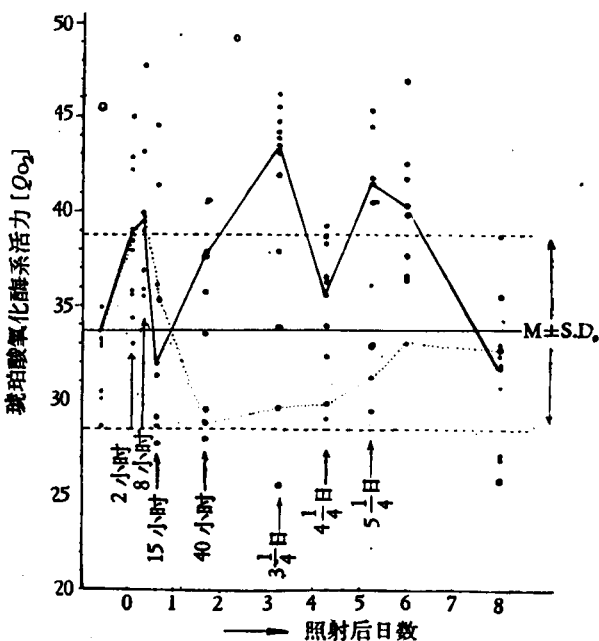


图3 X射线(LD<sub>50</sub>)全身外照射小白鼠(昆明种)对肝脏琥珀酸氧化酶系活力之影响(1960.2.)

●—● 照射组肝与浆琥珀酸氧化酶系活力的变化曲线

●...○ 同时对照组肝与浆琥珀酸氧化酶系活力的变化曲线

● 照射组个体酶活力数值 ○ 正常对照个体酶活力数值

因而酶的活力可以遭受破坏<sup>[13]</sup>,但此种明显的抑制在提纯的纯酶水溶液被照射后才会发生<sup>[14]</sup>,而存在于机体内的酶受到照射后并无明显的抑制<sup>[5,8]</sup>。馬斯(Maass)及舒伯特(Schubert)<sup>[15]</sup>报告用5或20千伏照射肝浸液或肝匀浆后,立即测定各种酶(包括琥珀酸脱氢酶及琥珀酸氧化酶系)的活力,并与未照射的肝浸液或匀浆的酶活力对照比较,结果不能发现有任何抑制。他们发现用5000伦照射谷氨酸脱氢酶纯酶水溶液后,其活力被抑制达95%,但如事先在纯酶水溶液中加入不同浓度的鼠肝匀浆后,则可得到相应程度的保护,亦即加入鼠肝匀浆浓度越大时,射线的抑制作用越小。是以说明在动物机体内,确实存有防护酶遭受电离辐射抑制的一种机构。本实验在观察过程各阶段中均未发现琥珀酸氧化酶系遭受抑制,亦符合于上述论点。

照射后小白鼠肝脏琥珀酸氧化酶系活力之增加,需要考虑到除了细胞色素氧化酶以外的各个环节,首先是琥珀酸脱氢酶。琥珀酸脱氢酶的激活可能通过下列几个途径发生:(1)受照射动物组织细胞结构的破坏,使酶与底物发生接触而导致酶活力的增加;(2)酶的天然抑制物受到电离辐射的影响而减少,结果导致酶活力的增强。例如草酰乙酸对琥珀酸脱氢酶有强烈的竞争性抑制作用<sup>[16-18]</sup>;(3)电离辐射作用于机体后,在中枢神经系统的影响下,垂体及其他内分泌腺体的功能改变,造成组织细胞内酶活力的改变。例如机体接受全身外照射后,甲状腺<sup>I<sup>131</sup></sup>吸收率增加,而甲状腺激素有激活琥珀酸氧化酶系的作用;(4)其他途径。不论通过上述何种途径,引起琥珀酸氧化酶系活力的增加,皆非电离辐射时原始反应的结果。当然,在整个酶系中的其他各个环节的变化还需进一步研究。

刘玉贞、李新富、杜静华等曾对本工作给予技术协助,于此表示感谢。

### 参 考 文 献

- [1] Paul, K. G., in Sumner & Myrback, *The Enzymes*, Academic Press, N. Y., Vol. II, Pt. 1, p. 357, 1951.
- [2] Elliott, K. A. C., & Greig, M. E., *Biochem. J.*, **32**: 1407, 1938.
- [3] Breusch, F. L., *Biochem. Z.*, **295**: 101, 1938.
- [4] Dixon, M., & Webb, E. C., *Enzymes*, Longmans, Green & Co. 1st Ed., p. 519, 1958.
- [5] LeMay, M., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y., **77**: 337, 1951.
- [6] Thomson, J. F., et al., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y., **80**: 268, 1952.
- [7] Ashwell, G., & Hickman, J., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **80**: 407, 1952.
- [8] Fischer, M. A., et al., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y., **83**: 266, 1953.
- [9] Powell, W. F., & Pollard, E., *Radiation Res.*, **2**: 109, 1955.
- [10] Schneider, W. C., & Potter, V. R., *J. Biol. Chem.*, **149**: 217, 1943.
- [11] Barron, E. S. G., *Effects of X-Rays on Tissue Metabolism*, CH-3654, 1946.
- [12] Шпанго, Н. И., 见 Кузин, А. М., *放射生物学概论*(苏少泉等译),第1版,124页,科学出版社,1958.
- [13] Barron, E. S. G., & Johnson, P., *Arch. Biochim. Biophys.*, **48**: 149, 1954.
- [14] Barron, E. S. G., *J. Gen. Physiol.*, **32**: 537, 1949.
- [15] Maass, H., & Schubert, G., *Proceedings of the Second United Nations international conference on the peaceful uses of Atomic Energy*, Vol. **22**: 449, 1958.
- [16] Das, N. B., *Biochem. J.*, **31**: 1124, 1937.
- [17] Pardee, A. B., & Potter, V. R., *J. Biol. Chem.*, **176**: 1085, 1948.
- [18] Swingle, K. F., et al., *J. Biol. Chem.*, **145**: 581, 1942.