

研究工作

甲 2 巨球蛋白对电离辐射引起人血中 O_2^- 自由基释放的影响

刘 莉 金为翘

(上海医科大学放射医学研究所, 上海 200032)

提 要

本实验用 ^{60}Co γ 线照射正常人新鲜全血, 观察电离辐射对多形核白细胞(PMN) 释放超氧化物阴离子自由基 (O_2^-) 的影响, 以及人血甲 2 巨球蛋白 ($\alpha_2\text{M}$) 制剂对辐射引起的 PMN 释放 O_2^- 的作用。结果表明: 正常人新鲜全血照射 (5—20 Gy) 后 1h, PMN 释放 O_2^- 的量较不照射组增高 ($P < 0.01$), 红细胞中超氧化物歧化酶 (SOD) 的活力较不照射组降低 ($P < 0.01$)。照前 1h 加入人血 $\alpha_2\text{M}$ 制剂 (每 ml 全血中加入 138.5 单位) 能有效地降低 PMN 的 O_2^- 释放量, 提高红细胞中 SOD 的活力。离体实验结果提示 $\alpha_2\text{M}$ 治疗辐射损伤作用可能与其抑制过多的 O_2^- 产生有关。

关键词 多形核白细胞, 甲 2 巨球蛋白, 超氧化物阴离子自由基

体外人多形核白细胞 (PMN) 受 ^{60}Co γ 线照射 (0.3—30 Gy) 后, PMN 释放超氧化物阴离子自由基 (O_2^-) 增加^[1]。但是 Turcu 等报道^[2], 大鼠 PMN 经体外 20Gy 照射后, 其吞噬时吸收的氧气量减少, 一般认为 PMN 释放 O_2^- 的增加反映为吸收氧的增加。为了澄清这个问题, 本实验观察了正常人新鲜全血在 ^{60}Co γ 线照射下 PMN 释放 O_2^- 的情况, 并同时了解对红细胞中超氧化物歧化酶 (SOD) 活力的影响。

甲 2 巨球蛋白 ($\alpha_2\text{M}$) 是机体内广谱的蛋白酶抑制剂, 它又具有防辐射损伤作用^[3]。临床上应用人血 $\alpha_2\text{M}$ 制剂于急慢性放射性皮肤溃疡^[4], 也获得治疗效果。为了解 $\alpha_2\text{M}$ 对辐射引起的 PMN 释放 O_2^- 有否抑制作用, 本实验中还用入血 $\alpha_2\text{M}$ 制剂在照射前 1 小时加入人血中, 观察它对辐射引起的 PMN 释放 O_2^- 有无影响, 对红细胞中 SOD 有无保护作用。

材 料 与 方 法

1. PMN 释放 O_2^- 的测定

PMN 分离^[5] 取人新鲜外周血 3ml, 加入等量 2% 右旋糖酐 (分子量 10 万, 国产), 37℃ 水浴静置 40min, 取上层悬液轻加于细胞分离液密度梯度表上层 (下层液密度 1.110, 上层液密度 1.077), 500g 离心 20min, 取下层粒细胞层环状物, 用预冷的 Hank's 液洗二次, 如有少量红细胞, 用低渗液破溶, 制成细胞悬液。经高倍镜检查, PMN 量大于 95%, 台酚兰检查结果表明细胞存活率为 95% 以上。

O_2^- 测定^[6] PMN 悬液 (1.0×10^6 个), 100 μmol 氧化型细胞色素 c (Sigma 公司, VI 级) 0.5ml, 伴刀豆素 A (上海医科大学基础部生化教研室提供) 0.2mg, 用 Hank's 液调至总体积 1.5ml, 37℃ 水浴培养 15min, 冰浴冷却。400g 离心 10min, 取上清液测 550nm 的光吸

收。

2. 红细胞中 SOD 活力测定^[7]

采用邻苯三酚自氧化法,抑制 50% 自氧化率的为 6.2 酶活力单位,即以黄嘌呤-细胞色素 c 体系的 50% 抑制率的酶量为 1 酶活力单位。

3. 辐射对 PMN 释放 O₂⁻ 的影响

取上海市中心血站某正常人的新鲜全血,分成 12 管,每管 3ml,随机分成四组: 0Gy、5Gy、10Gy、20Gy 组,用上海市肿瘤医院⁶⁰Co γ 源治疗仪,37℃ 恒温照射,剂量率为 0.891 Gy/min。照后 1h 测定 PMN 释放 O₂⁻ 的量和红细胞中 SOD 活力。

4. α₂M 对辐射引起的 PMN 释放 O₂⁻ 的影响

取上海市中心血站某正常人的新鲜全血,分成 18 管,每管 3ml,随机分成非照射组、照射组与照射保护组。照前 1h,非照射组和照射组各加入生理盐水 0.3ml,照射保护组(根据临床上应用人血 α₂M 制剂总有效剂量换算为每 ml 血中 α₂M 浓度应为 138.5 单位)加入 0.3ml 人血 α₂M 制剂(上海市中心血站提供)。照射条件和测定项目与以上所述相同。

实验结果

1. ⁶⁰Co γ 线照射人血对 PMN 释放 O₂⁻ 的影响

表 1 不同辐射剂量对 PMN 释放 O₂⁻ 和红细胞中 SOD 活力的影响

Table 1 The effects of different radiation dose on O₂⁻ released from PMNs and SOD activities in red cells

辐射剂量 Radiation dose (Gy)	PMN 释放 O ₂ ⁻ 的量 O ₂ ⁻ released from PMNs [nmol/ (10 ⁶ PMNs × 15min)] $\bar{X} \pm SD$	红细胞中 SOD 活力 SOD activities in red cell (U/100mgHb) $\bar{X} \pm SD$
0(n = 3)	8.471 ± 0.293	504.9 ± 13.02
5(n = 3)	10.086 ± 0.307 ¹⁾	448.4 ± 25.63 ¹⁾
10(n = 3)	9.960 ± 0.497 ¹⁾	430.8 ± 14.66 ¹⁾
20(n = 3)	10.833 ± 0.503 ¹⁾	337.2 ± 20.76 ¹⁾

1) 与 0Gy 组比较, P < 0.01。
Compared with 0 Gy group, P < 0.01。

表 1 显示正常人新鲜全血经 ⁶⁰Co γ 线照射后 1h,在照射剂量为 5—20Gy 范围内,PMN 释放 O₂⁻ 的量都比不经照射组高 (P < 0.01),红细胞中 SOD 活力都比不经照射组低,而且辐射后红细胞中 SOD 活力减少与 PMN 释放 O₂⁻ 增加之间存在着负相关关系 (r = -0.9194, P < 0.05)。

2. α₂M 对辐射引起的 PMN 释放 O₂⁻ 的抑制作用

(1) α₂M 制剂对正常血液的影响

表 2 α₂M 制剂对正常人血 PMN 释放 O₂⁻ 和 SOD 活力的影响

Table 2 Influence of α₂M preparation on O₂⁻ released from PMNs and SOD activities in normal human blood

	PMN 释放 O ₂ ⁻ 量 O ₂ ⁻ released from PMNs [nmol/(10 ⁶ PMNs × 15min)] $\bar{X} \pm SD$	红细胞中 SOD 活力 SOD activities in red cell (U/100mgHb) $\bar{X} \pm SD$
正常人血 + 0.9%NaCl Normal human blood + 0.9%NaCl	7.614 ± 0.32	636.5 ± 25.0
正常人血 + α ₂ M ¹⁾ Normal human blood + α ₂ M ¹⁾	6.828 ± 0.44	608.3 ± 62.8

1) 每 ml 血中加入 138.5 单位。
138.5 (unit/ml blood) was added,

在人血中加入 α₂M 制剂 (138.5 U/ml 全血),PMN 释放 O₂⁻ 量以及红细胞中 SOD 活力和加入相同体积的生理盐水组比较,无显著性差异 (P > 0.1),详见表 2。

(2) α₂M 制剂对 5,10,20Gy 照射人血的作用

表 3 显示 5,10Gy 照射前 1h 给予 α₂M 制剂 (138.5U/ml 全血),PMN 释放 O₂⁻ 的量和照射组比较明显下降 (P < 0.01),红细胞中 SOD 活力明显提高 (P < 0.001)。20Gy 照射前 1h 给予 α₂M 制剂 (138.5U/ml 全血),PMN 释放 O₂⁻ 的量和照射组比较也明显下降 (P < 0.01),但红细胞中 SOD 活力却不增加。

表3 α_2M 制剂¹⁾对5,10,20Gy 照射人血 PMN 释放 O_2^- 和 SOD 活力的作用

Table 3 The effects of α_2M preparation on O_2^- released from PMNs and SOD activities induced by 5, 10, 20 Gy radiation

剂 量 Dose (Gy)	组 别 Group	PMN 释放 O_2^- 量 O_2^- released from PMNs [nmol/(10^6 PMNs $\times$ 15min)] $\bar{x} \pm SD$	红细胞中 SOD 活力 SOD activities in red cell (U/100mgHb) $\bar{x} \pm SD$
5	非照射组 Non-radiation	7.614 $\pm$ 0.293	488.0 $\pm$ 35.8
	照射组 Radiation	8.619 $\pm$ 0.258 ¹⁾	424.4 $\pm$ 16.5 ¹⁾
	α_2M 保护组 α_2M protection	7.710 $\pm$ 0.284 ²⁾	471.6 $\pm$ 16.9 ²⁾
10	非照射组 Non-radiation	8.642 $\pm$ 0.495	631.1 $\pm$ 42.4
	照射组 Radiation	10.084 $\pm$ 0.805 ¹⁾	402.2 $\pm$ 60.1 ¹⁾
	α_2M 保护组 α_2M protection	9.940 $\pm$ 0.405 ²⁾	532.6 $\pm$ 43.3 ²⁾
20	非照射组 Non-radiation	5.845 $\pm$ 0.263	420.9 $\pm$ 38.2
	照射组 Radiation	6.682 $\pm$ 0.255 ¹⁾	335.6 $\pm$ 13.5 ¹⁾
	α_2M 保护组 α_2M protection	6.137 $\pm$ 0.126 ²⁾	320.5 $\pm$ 33.7

1) $P < 0.01$ (与非照射组比较)。

$P < 0.01$ (compared with non-radiation group).

2) $P < 0.001$ (与照射组比较)。

$P < 0.001$ (compared with radiation group).

3) α_2M 加入量为每 ml 血中 138.5 单位(每组样本数为 6)。

138.5 (Unit/ml blood) α_2M was added (sample numbers 6).

表4 α_2M 制剂中杂蛋白对 PMN 释放 O_2^- 的影响

Table 4 Influence of other proteins in α_2M preparation on O_2^- released from PMNs

	PMN 释放 O_2^- 量 O_2^- released from PMNs [nmol/(10^6 PMN $\times$ 15min)] $\bar{x} \pm SD$
10Gy + 0.9%NaCl ($n = 3$) 10Gy + 0.9%NaCl	10.17 $\pm$ 0.209
10Gy + 杂蛋白 ¹⁾ ($n = 3$) 10Gy + other proteins	10.23 $\pm$ 0.246
10Gy + 纯 α_2M ¹⁾ ($n = 3$) 10Gy + pure α_2M	9.58 $\pm$ 0.212 ²⁾

1) 每 ml 全血中 1mg 蛋白浓度。

1mg protein conc. per ml blood was added.

2) $P < 0.05$ (与 0.9% NaCl 组比较)。

$P < 0.05$ (compared with 0.9% NaCl group).

(3) α_2M 制剂与提纯 α_2M 的作用比较

把经聚丙烯酰胺凝胶电泳后呈一条带的提

纯 α_2M 与人血 α_2M 制剂作比较,在 10Gy 照

射前 1h 各加入相同活力(抑制蛋白水解酶)单

位 (138.5U/ml 全血)的纯化 α_2M 与人血 α_2M

制剂,其结果指出两组的 PMN 释放 O_2^- 量与

红细胞中 SOD 活力,均无显著性差异。

表 4 显示 $\alpha_2\text{M}$ 制剂中其它杂蛋白 (1mg/ml 全血) 对 10Gy 照射后 PMN 释放 O_2^- 无抑制作用 ($P > 0.5$), 而加入相同蛋白量的纯化 $\alpha_2\text{M}$ 对 10Gy 照射后 PMN 释放 O_2^- 有抑制作用 ($P < 0.05$)。

讨 论

5—20 Gy 辐射人全血, 1h 后其 PMN 释放 O_2^- 量比不经照射组高。此结果与 Sasagawa^[1] 等人报道的相一致。Turcu^[2] 报道, 大鼠 PMN 经 20Gy 照射, 1h 内 PMN 吞噬时吸氧量减少。这可能为大鼠 PMN 经照射后死亡所引起, 也可能与大鼠 PMN 辐射敏感性有关。本实验测定的是每个活 PMN 细胞释放的 O_2^- 量, 这就消除了由细胞辐射致死所产生的误差。

$\alpha_2\text{M}$ 是生物体内存在的广谱蛋白酶不可逆抑制剂。在动物实验中体内注射 $\alpha_2\text{M}$ 后可减轻辐射损伤^[3,4]。我们在实验中观察到, 在照射 5—10Gy 前加入人血 $\alpha_2\text{M}$ 制剂能有效地抑制辐射引起的 PMN 释放 O_2^- 量的增加并提高红细胞中 SOD 活力。当照射剂量为 20Gy 时, $\alpha_2\text{M}$ 制剂可抑制 PMN 释放 O_2^- , 但对红细胞中 SOD 下降并无保护作用。这可能是由于辐

射剂量较大时, 红细胞中 SOD 失活主要是由于水射解产物 $\cdot\text{OH}$ 引起的直接损伤。推测 $\alpha_2\text{M}$ 抑制了 O_2^- , 而对 $\cdot\text{OH}$ 却无抑制作用。

由于人血 $\alpha_2\text{M}$ 制剂中含有杂蛋白, 因此对 $\alpha_2\text{M}$ 制剂进行了提纯。把人血 $\alpha_2\text{M}$ 制剂与提纯的 $\alpha_2\text{M}$ 作比较, 在加入相同的活力单位时, 对抑制辐射引起的 PMN 释放 O_2^- , 两者无显著性差异, 而人血 $\alpha_2\text{M}$ 制剂的其它杂蛋白对辐射引起 O_2^- 的增加无抑制作用。这进一步说明 $\alpha_2\text{M}$ 抑制了由辐射引起的 PMN 释放 O_2^- 的增加, 因此 $\alpha_2\text{M}$ 的抗辐射机制可能与抑制过多的 O_2^- 有关。

参 考 文 献

- 1 Sasagawa S et al. *Radiation effects research foundation*, Technical report 15—85, A Cooperative Japan—United States Research Organization, 1986; 1—12
- 2 Turcu G et al. *Int J Radiat Biol*, 1967; 12:45.
- 3 Hanna M G et al. *Science*, 1967; 157:1458
- 4 翁志根等. 中华放射医学与防护杂志, 1981; 1(6): 33
- 5 Lizuka T et al. *J Bio Chem*, 1985; 260(22):12049
- 6 Babior B M et al. *J Clin Invest*, 1973; 52:741
- 7 翁其亮等. 生物化学与生物物理进展, 1986; (3): 51
- 8 Olinescu A et al. *Arch Roum Path Exp Microbiol*, 1980; 39(2):121

[本文于 1989 年 9 月 22 日收到]

THE EFFECTS OF α_2 -MACROGLOBULIN AGAINST SUPEROXIDE ANION RADICAL INDUCED BY IRRADIATION IN HUMAN BLOOD

Liu Li Jin Weiqiao

(Radiation Medicine Institute, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

ABSTRACT

Peripheral blood of healthy volunteers was irradiated with ^{60}Co in order to study the effects of radiation on superoxide anion radical (O_2^-) generation and the inhibitory effects of α_2 -macroglobulin ($\alpha_2\text{M}$) blood preparation. It was found that one hour after irradiation, the amount of O_2^- released from polymorphonuclear leukocytes (PMNs) was more than that of the non-irradiated group ($P < 0.01$) and the activities of superoxide dismutase (SOD) in red cells decreased ($P < 0.01$). When $\alpha_2\text{M}$ (138.5 U/ml blood) were added one hour before irradiation, the amount of O_2^- released from PMNs were reduced and the activities of SOD in red cells were preserved. These results suggest that one reason of $\alpha_2\text{M}$ against radiation may be related to inhibition of O_2^- released from PMNs.

Key words polymorphonuclear leukocyte, α_2 -macroglobulin, superoxide anion radical