

参 考 文 献

- [1] Cercek, L. et al.: *Biophysik*, **10**, 187, 1973.
[2] Cercek, L. et al.: *Brit. J. Cancer*, **33**, 359, 1976.
[3] Takaku, F. et al.: *Brit. J. Cancer*, **36**, 810, 1977.
[4] Kreutzman, H. et al.: *Brit. J. Cancer*, **37**, 797, 1978.
[5] Pritchard, J. A. V. et al.: *Brit. J. Cancer*, **38**, 339, 1978.
[6] Bagshawe, K. D. et al.: *Brit. J. Cancer*, **35**, 701, 1977.
[7] Cercek, L. et al.: *Europ. J. Cancer*, **13**, 903, 1977.
[8] Mitchell, H. et al.: *Brit. J. Cancer*, **41**, 772, 1980.
[9] Balding, P. et al.: *Brit. J. Cancer*, **41**, 73, 1980.
[10] 丰美福等:《细胞生物学杂志》, 1980年, 第3期, 第30页。
[11] Dickison, J. P. et al.: *Brit. J. Cancer*, **27**, 99, 1973.
[12] Dickison, J. P. et al.: *Brit. J. Cancer*, **28**, Suppl. 1, 224, 1973.
[13] Ørjasæter, H. et al.: *Brit. J. Cancer*, **40**, 628, 1979.
[14] 董志伟等:《生物科学参考资料》, 11, 97, 1978.

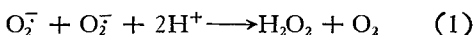
[本文于1982年6月17日收到]

超氧化物歧化酶的辐射失活与自由基作用关系的研究*

李益新 方允中 刘智峰

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

超氧化物自由基 O_2^- , 是生物体内有氧代谢的产物, 也是有氧条件下, 电离辐射与生物体作用所产生的活性自由基之一, 它是造成氧的毒性和对辐射损伤增强作用的主要原因。1969年, McCord 和 Fridovich^[1] 从牛红细胞中发现了超氧化物歧化酶 (E. C. 1. 15. 1. 1), 简称 SOD, 该酶能够催化超氧化物自由基的歧化反应:



所以 SOD 具有清除 O_2^- 自由基的能力, 从而在防御氧的毒性, 抗辐射损伤以及预防衰老等方面起着重要作用。近十几年来, 对 SOD 的作用机制、结构与功能的关系, 生物学意义和临床应用等方面的研究, 越来越受到生物物理学家, 生物化学家, 放射生物学和放射医学工作者的重视。

SOD 亦是生物大分子, 在离体照射条件下, 同样会受到辐射作用而发生活性下降、理化性质与结构的改变^[2]。研究 SOD 的辐射失活效应, 自由基与 SOD 的作用关系, 以及自由基清除剂对 SOD 辐射失活的保护, 具有理论上和实用上的意义, 同时也是研究酶的结构与功能的一种手段, 迄今尚未见有关这方面的报道。

在本研究中, 我们所用超氧化物歧化酶活力测定的新方法——化学发光法^[3]。具有灵敏度高, 特异性较强, 分析快速, 用样品量少等优点, 更重要的是, 化学发光法是直接根据自由基反应发光的原理建立的^[4]。应用化学发光法研究 SOD 与自由基作用关系, 已取得较为满意的结果。

材 料 和 方 法

铜锌超氧化物歧化酶根据 McCord 和 Fridovich^[1] 的方法从牛血中提取并纯化, 制得冰冻干燥固体粉末, 经酶学方法和理化性质鉴定为匀一性纯酶, 比活力为 3,000 活力单位/毫克蛋白。实验中用 pH 7.8, 0.05M 磷酸钾缓冲液(含 0.1mM EDTA)溶解成不同浓度, 其实际浓度根据 $O. D_{258}$ 值, 按该波长处的毫克分子消光系数 $\epsilon_{1cm}^{mM} = 10.3^{[5]}$ 计算。

黄嘌呤氧化酶, 根据 Massey^[6] 法从牛奶中制备得粗品, 活性略低于 Sigma 公司产品, 贮存于 60% 饱和度的硫酸铵溶液中。用前摇匀, 吸取乳浊液, 以每分钟 4,000 转离心 10 分钟, 弃

* 本文曾在 1982 年全国放射生物学与放射病临床、实验治疗专题会上宣读。

去上清,将浅棕色沉淀物用 pH7.8, 0.05M 磷酸钾缓冲液溶解。

牛肝过氧化氢酶, Sigma 公司产品, 比活力为 11,000 Sigma 单位/毫克蛋白。用上述同样缓冲液溶解, 现配现用。

次黄嘌呤为英国 Light 公司产品。luminol (3-氨基邻苯二甲酰肼) 为英国 Aldrich 公司产品。每次作化学发光测量前新鲜配制成 0.1mM 的混合液。其余试剂都为分析纯。

缺氧照射实验中, 预先用氮气 (纯度为 99.9%) 驱除缓冲液中的空气, 压力 0.5kg/cm², 时间约 30 分钟, 配制成照射样品溶液后再在液面上方充满 N₂ 气, 盖紧瓶塞, 然后照射。SOD 残存活力的测定与有氧条件下相同。

照射源为 ⁶⁰Co γ 射线, 照射剂量为 2, 4, 6, 8, 10 万拉德, 剂量率为 1519.72 拉德/分钟。

化学发光测量在 LKB Wallac 1250 型发光仪上进行, 详细测量过程及 SOD 活力计算见前次报告^[3]。

紫外吸收光谱在日立 557 型双光束双波长分光光度计上测量。

结果与讨论

一、SOD 浓度对辐射失活的影响

图 1 和图 2 分别显示了在空气中和 N₂ 气中不同浓度的 SOD 溶液的辐射失活与照射剂量的关系。表 1 列出相应的 D₃₇ 和 G (失活) 值。D₃₇ 是指辐射过程中, 酶活力下降至原来的

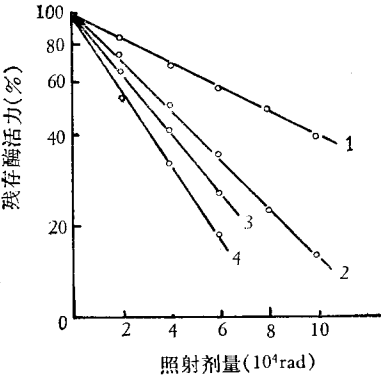


图 1 空气中不同浓度 SCD 的辐射失活
1:0.5mg/ml 2:0.1mg/ml 3:0.05mg/ml 4:0.02mg/ml

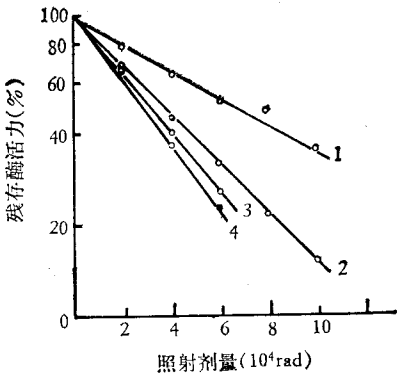


图 2 N₂ 气中不同浓度 SOD 的辐射失活
1:0.5mg/ml, 2:0.1mg/ml, 3:0.05mg/ml, 4:0.02mg/ml

37% 时的照射剂量, 这是衡量样品对辐射敏感程度的指标。G (失活) 值是指每吸收 100eV 的辐射能量所造成的失活的酶分子数。D₃₇ 可以从残存酶活力对照射剂量作图中求出, 而 G (失活) 值则根据下式计算^[7]:

G (失活) = (9.65 × 10¹¹ × C) / (D₃₇ × M.W) (2)

式(2)中 C 为照射样品的浓度, 以每毫升的克数表示, D₃₇ 以拉德表示, M.W 为生物样品的分子量, SOD 的 M.W 为 33,000。

从图 1 及 2 中可以看出, SOD 的残存活力随照射剂量增加而成指数下降。SOD 的浓度不同, 对辐射的敏感性不同, 随着浓度减小, D₃₇ 值减小, 即辐射敏感性增强。G (失活) 值也随浓度减小而减小, 这在空气中和 N₂ 气中都可以观察到, 说明辐射失活是属于间接作用的类型^[7]。

表 1 不同浓度 ECD 照射的 D₃₇ 和 G (失活) 值

| SOD 浓度 (mg/ml) | D ₃₇ (万拉德) | | G (失活) 值 | |
|-------------------|-----------------------|-------------------|----------|-------------------|
| | 空气中 | N ₂ 气中 | 空气中 | N ₂ 气中 |
| 0.02 | 3.4 | 4.0 | 0.017 | 0.015 |
| 0.05 | 4.3 | 4.3 | 0.034 | 0.034 |
| 0.10 | 5.5 | 5.0 | 0.053 | 0.058 |
| 0.50 | 10.4 | 9.4 | 0.140 | 0.156 |

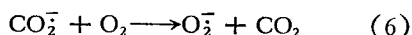
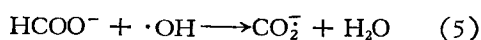
SOD 的水溶液在辐射中首先产生的活性自由基是原子氢 H[·], 水合电子 e_{aq}⁻, 羟自由基 ·OH, 在有氧气存在下, 前两种活性物质与 O₂ 反应:



实际上,通过反应(3)和(4),有氧条件下照射主要产生了 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基。SOD本身具有清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力,但这种能力与浓度有关。当SOD浓度很低,而照射剂量率比较高时, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 不能被完全有效地除掉,也会与 $\cdot\text{OH}$ 自由基一起进攻SOD,所以在0.02mg/ml浓度下, $D_{37}(\text{O}_2) < D_{37}(\text{N}_2)$,当用0.01mg/ml的SOD照射时,结果更为明显。而当SOD浓度较高时(如0.1mg/ml和0.5mg/ml), $D_{37}(\text{O}_2) > D_{37}(\text{N}_2)$ 表明这时在空气中照射,主要攻击来自 $\cdot\text{OH}$,而在 N_2 气照射,还要考虑 H^{\cdot} 和 e_{aq}^{-} 的作用。

二、自由基清除剂对辐射失活的影响

图3比较了在空气中照射前不加清除剂(O),单独加入50mM甲酸钠(F),单独加入20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的过氧化氢酶(C)和同时加入两者(F+C)时对SOD辐射失活的作用,SOD浓度为0.1mg/ml。在2万到8万拉德照射剂量范围内,F保护了90%左右的酶活力,而且几乎不随剂量而变;C对SOD的保护作用远不如F来得明显;同时加入F和C与单独使用F对SOD活力保护的效果十分相近。活力保护作用的大小可以用保护效率来衡量,保护效率为 $(A_a - A_0)/A_0$,其中 A_0 和 A_a 分别表示在同一照射剂量下,未加或加入某种试剂后残存酶活力的百分数。以照射8万拉德为例,O,C,F和F+C四种不同处理方式,残存酶活力百分数分别为24,31,85和87,对应的活力保护效率为0,0.29,2.54和2.63。由此可见F对SOD活力保护作用是C的8倍。甲酸钠是 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除剂,可以发生下列反应:



也就是说,在有氧条件下,照射前溶液中加入甲酸钠,使 $\cdot\text{OH}$ 转变成 $\text{O}_2^{\cdot-}$,这时 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的产率接近6,即每吸收100eV的能量,可以产生6个 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。而 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 可以被SOD清除,所示甲酸钠显示了良好的保护作用。另一种 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除剂,二甲亚砜(DMSO),也观察到对SOD辐射失

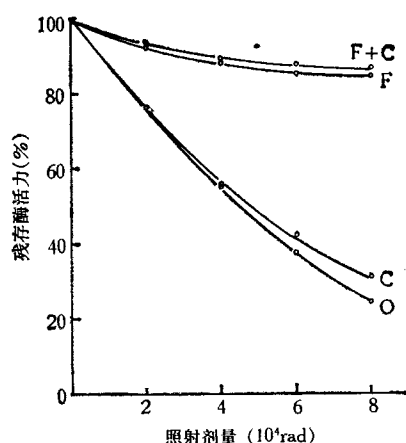


图3 自由基清除剂对SOD辐射失活的保护作用
(O, C, F, F+C所表示意义见上文)

活的保护作用。

三、辐射对SOD的紫外吸收光谱的影响

图4是在空气中照射对SOD溶液紫外吸收光谱的影响。随着照射剂量增加,SOD溶液的紫外吸收也增加,这在 N_2 气中照射也同样观察到。造成这种增色效应的原因之一,可能是在辐射作用下,SOD的天然构型发生了变化,趋向于更加无序的状态,使某些生色基团游离或暴露出来,这一推断,从照射引起的SOD的园二色图谱的变化可以得到证实^[2]。

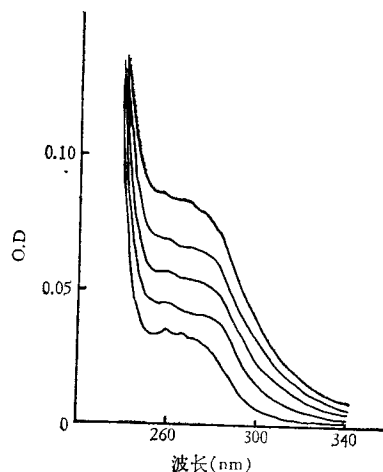


图4 辐射对SOD紫外图谱的影响

(由下向上分别代表0,2,4,6,8万拉德照射后,
SOD浓度0.1mg/ml)

照射前溶液中加入C,增色效应仍然存在见图5所示。单独加入F,增色效应随之消失,

紫外图谱基本复原,见图 6。同时加入 F + C,紫外图谱就完全复原。

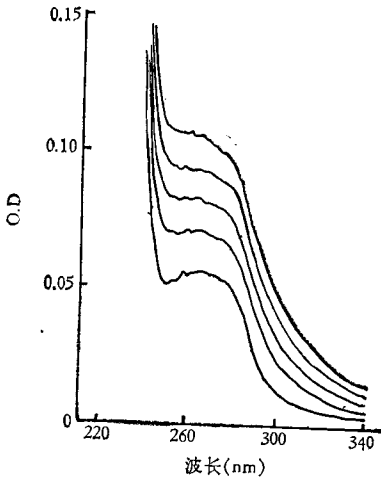


图 5 照射前加入过氧化氢酶对 SOD 紫外图谱的影响
(由下向上,分别代表 0, 2, 4, 6, 8 万拉德照射后,
SOD 浓度 0.1mg/ml)

这种紫外图谱增色效应的消除与酶活力保护之间的关系,既反映了酶的结构与活性之间的对应关系,同时也进一步证明:在消除增色效应和保护酶活力方面,甲酸钠起了主要作用,从而说明在本实验条件下,造成 SOD 辐射失活的主要因素是 $\cdot\text{OH}$ 自由基。过氧化氢酶对 SOD 活力所显示的微弱保护作用,可能与辐射中产生的 H_2O_2 引起 SOD 失活有关^[8]。此问题的深入研究尚待继续进行。

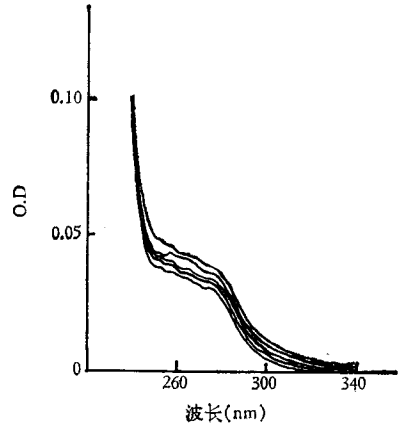


图 6 照射前加入甲酸钠对 SOD 紫外图谱的影响
(由下向上,分别表示 2, 4, 6, 0, 8 万拉德照射后,
SOD 浓度 0.1mg/ml)

参 考 文 献

- [1] McCord, J. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049, 1969.
- [2] 方允中, 刘智峰, 李益新: « γ 射线离体照射对铜锌超氧化物歧化酶理化性质的影响»(待发表)
- [3] 李益新, 方允中: «生物化学与生物物理进展», **2**, 59 1983.
- [4] Hodgson, E. K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **430**, 182, 1976.
- [5] Rotilio, C. et al.: *Biochemistry*, **11**, 182, 1972.
- [6] Massey, V. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 1682, 1969.
- [7] Dertinger, H. et al.: *Molecular Radiation Biology*, (Etd. Springer-Verlag) Berlin, 1969.
- [8] Robert, C. et al.: *Biochem. J.*, **139**, 43, 1974.

[本文于 1982 年 8 月收到]

染色质的激光辐照诱变效应

李振刚 苏代荣 吴秋莺 林飞平 胡沛然

(中国科学技术大学生物系, 合肥)

一、前 言

激光辐照能否诱发遗传物质的变异, 国内外的研究结果极不一致, 值得进一步探讨。

1969 年 S. Fine^[1] 等用红宝石激光 (694.3 nm) 照射多种植物, 认为没有诱变效应, 而 M. W. Bern 等^[2] 用染料激光辐射 (473, 526, 532,

540, 556, 562nm) 活细胞染色体, 发现有双光子效应, 并指出这是被染色体中的组蛋白所吸收。随后, S. M. Zubkva (1978) 及 A. V. Konstantinov (1979) 报道红光段激光 (632.8nm) 能提高染色质的结构-机能状态, 以及恢复有丝分裂活性。

国内, 1976 年中山大学遗传组报道^[3], 用