

^{60}Co 照射后小鼠肝脏金属硫蛋白含量的动态变化

潘爱华 张瑞钧 茹炳根*

(航天医学工程研究所,北京)

提 要

小鼠经不同剂量 ^{60}Co 照射后,用 HPLC 结合 AAS 和 ELISA 方法检测第 1, 5, 15, 27 天小鼠肝脏中金属硫蛋白两种亚型——MT-I 和 MT-II 的变化发现,照射后第 1, 5 天 MT-I 增加 10—20 倍, MT-II 增加 40—60 倍;而且 600Rad 照射较 400Rad 照射增加更明显,第 15 天后趋于正常。

电离辐射可引起生物体损害,这是多年来已知的事实。电离辐射引起的生物学效应,是一个非常复杂的过程。一般认为,它可直接作用于具有生物活性的分子,直接引起损伤;也可通过水的原发产物($\text{H}\cdot$, $\text{OH}\cdot$, H_2O_2 等)间接对生物大分子作用,引起损伤。由于机体的细胞含水量很高,一般达 70% 以上,细胞内生物大分子是存在于含大量水分子的环境之中,因此间接作用,即通过原发辐射产物(主要是自由基)对生物大分子损伤的产生有重要意义。已知一些金属蛋白质(包括金属酶)和一些金属离子,特别是锌,能减弱或消除辐射对机体引起的损伤。金属硫蛋白(Metallothioneins, MTs)是一类低分子量(约 6500 道尔顿)、富含半胱氨酸(约占分子中氨基酸总数的 30%)的金属结合蛋白。哺乳动物体内分离出来的 MTs 一般有两种亚型, MT-I 和 MT-II。它的主要功能是参与体内微量元素(如 Zn, Cu 等)的运输、贮存和代谢^[1,2],以及细胞分化调控^[3],并具有重金属解毒功能^[4]。最近,体外细胞培养实验结果表明:金属硫蛋白能抑制脂质过氧化反应,消除自由基,特别是羟基自由基^[5-7]。但动物整体实验,目前仅发现 Shiraishi 等^[8]用测锌含量的方法间接地测定 X 线(1000 Rad)照射后大鼠(仅三只)肝脏金属硫蛋白变化的初步结果,

发现经 1000Rad X 线照射后,大鼠肝脏中 MTs 的含量显著增加。因此,我们设计了该实验以研究高能电离辐射引起机体金属硫蛋白(分别测 MT-I 和 MT-II)含量变化的动态过程,不同照射剂量引起变化的程度,同时了解 MTs 含量变化与辐射损伤恢复的关系,以进一步研究辐射损伤机理,为寻找新型辐射防护剂提供新的研究途径。

材 料 和 方 法

(一) 实验动物

LACA 雄性小鼠 120 只,体重 20 ± 2 克, 70 日龄。

(二) 主要试剂和仪器

1. 标准 MT-I 和 MT-II (北京大学生物系制备)。
2. CdCl_2 (分析纯,北京化工厂产品); Tris 为 Sigma 产品。
3. 高效液相色谱仪, Varian LC 5060; 阴离子交换柱, DEAE-5PW, Protein-TSK, 7.5 mm \times 7.5cm, Waters 公司。
4. 原子吸收光谱仪, HITACHI 180-50。
5. 酶标读数仪, Dynatech Minireader II。

* 北京大学生物系。

(三) 实验步骤

1. ^{60}Co 照射 将小鼠分成 A, B, C 三组, 每组 40 只。A 组为对照组, B 组动物 400Rad ^{60}Co 照射 (军事医学科学院放射医学研究所钴源室), C 组照射 600Rad。

2. 小鼠肝脏金属硫蛋白含量的测定^[9] 于照后第 1, 5, 15, 27 天分别取 A 组动物 6 只, B, C 组动物各 8 只。将动物断头处死, 迅速分离肝脏, 称重, 加入二倍重量 4℃ 预冷的 pH8.6, 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液, 立即进行匀浆, 4℃ 下, 16000r/m 离心 20 分钟。取上清 50 μl , 加入 425 μl pH 8.6, 0.01mol/L Tris 缓冲液, 再加入 25 μl 1000ppm CdCl_2 溶液, 混匀后室温下静置 15 分钟, 沸水浴 2 分钟后立即冷却, 15000r/m 离心 5 分钟。至此, 样品处理完毕。

将标准 MT-I 和 MT-II 溶于 pH8.6, 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液中, 按前述样品处理方法分别进行镉饱和、加热、离心后, 分别取 100 μl 溶液 (含不同量 MT-I 和 MT-II) 通过高效液相色谱仪进行检测, 采用阴离子交换柱 (DEAE-5PW, Protein-TSK, 7.5mm \times 7.5cm, Waters) 用 Tris-HCl 缓冲液为平衡液, 通过盐的直线梯度进行解析; 流速为 1.0ml/min 室温下操作。用 254nm 检测, 分部收集洗脱液测 ELISA 及 Cd 的原子吸收光谱。根据 HPLC 图谱上 MT-I 或 MT-II 的峰面积作出标准工作曲线。然后进行待测样品的检测, 取 100 μl 样品 (如前述处理好的) 注入 HPLC 进样口, 洗脱条件同前。分部收集洗脱液, 测 AAS 和 ELISA 以确定 MT-I 和 MT-II 峰的位置。根据峰面积从标准曲线中查出 MT-I 和 MT-II 的含量, 再按以下方法计算出每克肝组织 MTs 的含量。

3. 计算 MTs (MT-I 和 MT-II) 的含量^[9]

μg MTs/克肝组织

$$= \frac{\mu\text{g MTs} \times 2\text{ml/克肝组织}}{0.1\text{ml}} \times 1.05 \times 10$$

式中: μg MTs 可通过 HPLC 峰面积根据标准工作曲线查出; 2ml/克肝组织表示匀浆时肝脏组织稀释倍数; 0.1ml 为注入 HPLC 的样

品体积; 1.05 为在用镉饱和时的稀释系数 (950 μl 样品/ml); 10 为上样前的稀释倍数。

结果与讨论

小鼠在 ^{60}Co 两个不同剂量 (400 和 600Rad) 照射后, 肝脏中 MT-I 和 MT-II 含量迅速增

表 1 ^{60}Co 照射后小鼠肝脏 MTs 含量 (μg /克肝组织) 的变化

分组	照射后第 1 天	
	MT-I	MT-II
A (对照)	未测出	未测出
B (400 Rad)	134 \pm 49.8* (n = 8)	976 \pm 130.8 (n = 8)
C (600 Rad)	251 \pm 43.9 (n = 8)	984 \pm 107.4 (n = 7)
分组	照射后第 5 天	
	MT-I	MT-II
A (对照)	未测出	未测出
B (400 Rad)	207 \pm 36.3* (n = 8)	375 \pm 179.8* (n = 8)
C (600 Rad)	306 \pm 29.9 (n = 8)	763 \pm 322.4 (n = 7)

* $P < 0.01$ (和 C 组比较)。

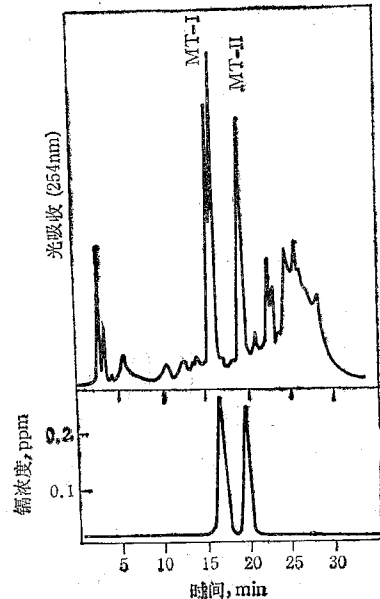


图 1 镉诱导小鼠肝脏匀浆上清的 HPLC 层析图 小鼠预先用 CdCl_2 分别于第 1, 2, 4 天皮下注射, 每只 50 μg /天, 第 5 天处死小鼠, 取肝脏匀浆, 离心后取上清进行测定

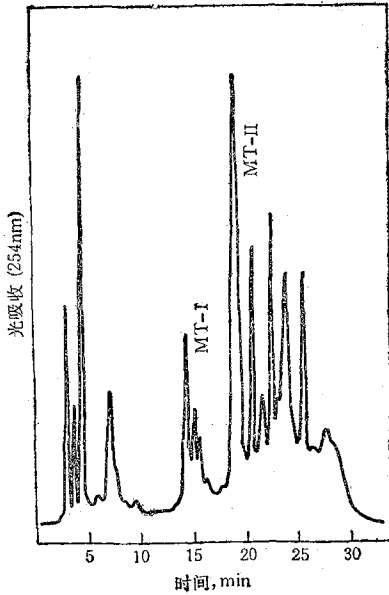


图2 400Rad ⁶⁰Co 照射后第一天小鼠肝脏匀浆上清的 HPLC 层析图

加,而且二者增加的速率有所不同,见表1。这与用金属诱导 MTs 产生的情况有所不同,象 Cd 诱导一般以 MT-I 增加明显,见图1。而辐射诱导 MTs 产生时 MT-II 增加更显著,见图2和图3。图2和图3分别为400Rad和600Rad ⁶⁰Co 照射后第一天的情况。

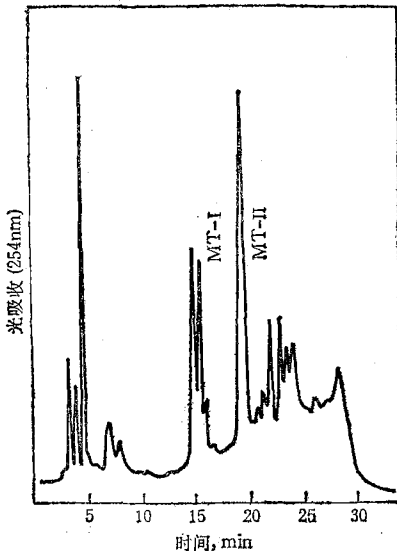


图3 600Rad ⁶⁰Co 照射后第一天小鼠肝脏匀浆上清 HPLC 层析图

已有实验表明, MTs 在重金属解毒中起非常重要的作用^[10]; 而体外细胞培养实验则证

明, MTs 是自由基的清除剂^[11,12]。由于目前尚未见报道用直接测 MTs 的方法来研究它在机体受辐射后的动态变化过程,也尚未发现在研究 MTs 的功能时,将 MT-I 和 MT-II 进行比较研究。我们应用 HPLC 结合 AAS 和 ELISA 的方法检测小鼠在受 ⁶⁰Co 照射后肝脏中 MT-I 和 MT-II 变化的动态过程。结果提示, MTs 的不同亚型有可能在机体对抗不同损伤中分别承担不同的任务。象 MT-I 主要参与重金属解毒作用,而 MT-II 则在辐射损伤后,在促进细胞及机体的恢复方面起到更为重要的作用。不同辐射剂量引起 MTs 增加的量也有差别,600Rad 照射较400Rad 照射时 MTs 量增加更多,见表1。动态观察辐射后小鼠肝脏 MTs 的变化,照后第五天 MT-I 量较第一天有所增加,而 MT-II 则逐渐降低,但无论 MT-I 还是 MT-II, 照射后第十五天已降至正常水平。

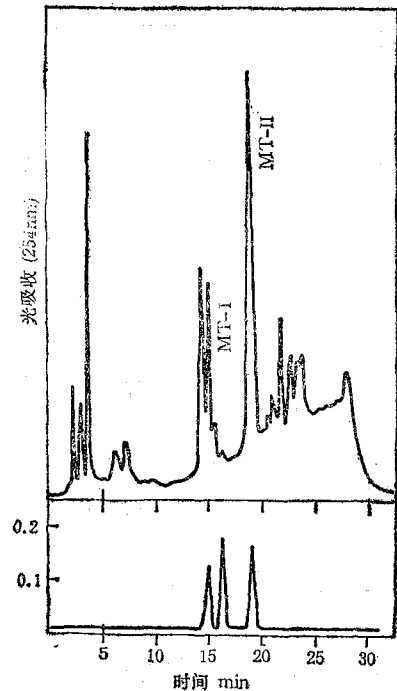


图4 600 Rad ⁶⁰Co 照射后第五天小鼠肝脏匀浆上清 HPLC 及 AAS 图
下面曲线图的纵坐标为镉浓度, ppm

将图4与图1比较,可见图4中, Cd 的原子吸收峰有三个, MT-I 处两个峰,其中一个峰位置在16.6min处,与图1中 MT-I 峰位置

一致。但前面一个峰 (15.3 min) 及 MT-II 处的峰 (19.3 min) 的面积要比 16.6 min 处峰面积大得多,而 Cd 的含量却相差无几,与以上峰面积不成比例。体外细胞培养研究 MTs 在抗辐射中的作用已表明^[13,14], MTs 是自由基、特别是羟基自由基的清除剂。预先用锌加入细胞培养基中,可诱导 MTs 的大量合成,再对细胞进行辐射发现,该细胞的抗辐射能力较未经锌处理的细胞明显增强,而且能高效产生 MTs 的细胞,其抗 X 线损伤的能力大于一般细胞。一般认为^[15],在清除自由基时,金属从 MTs 上脱落,金属结合部位的巯基受到破坏,但它可很快被还原型谷胱甘肽修复。但目前仍缺乏整体水平上的直接证明。

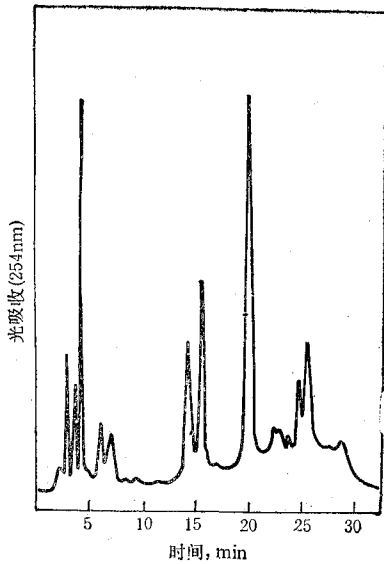


图5 对照组小鼠肝脏匀浆上清的 HPLC 层析图
未测出 MT-I 和 MT-II

HPLC 图谱分析发现,在 MT-I 和 MT-II 峰的前后分别出现一个与之相消涨的峰,见图 1,图 4 和图 5。图 5 中 15.4min 和 19.8min 处分别有一吸收峰,收集这两部分洗脱液测 Cd 的

AAS 和 ELISA,结果没检测出 MTs,但经重金属 (图 1) 和辐射诱导后 (图 4), MT-I 和 MT-II 显著增加,而原来的两个峰降得很低或消失。这一结果提示,是否在体内存在一种在功能上与 MTs 相拮抗的物质 (蛋白或多肽),两者共同构成一个调控体系以完成复杂的功能。

本实验的结果表明,小鼠肝脏金属硫蛋白含量的动态变化与辐射的剂量和作用后的时间有明显相关,说明金属硫蛋白在辐射损伤和损伤后修复机制中的重要作用。因此,它有可能成为机体受辐射和辐射损伤程度的检测指标,也为新型辐射防护剂的寻找和辐射损伤机制的研究提供新的研究途径。

参 考 文 献

- [1] Danielson, K. G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1982, 79, 2301.
- [2] Savino, W. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, 1984, 32, 942.
- [3] Lebeau, M. M. et al.: *Nature*, 1985, 313, 709.
- [4] Beach, L. R. and Palmiter, R. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1981, 78, 2110.
- [5] Thornalley, P. J. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 1985, 827, 36.
- [6] Micheal, A. D. et al.: *Pro. Soc. Exp. Bio. Med.*, 1987, 185, 107.
- [7] Schorpp, M. et al.: *Cell*, 1984, 81, 1053.
- [8] Shiraishi, N. et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1986, 85, 128.
- [9] Lois, D. L. and Curtis, D. K.: *Anal. Biochem.*, 1986, 153, 305.
- [10] Durnam, D. M. and Palmiter, R. D.: *Mol. Cell. Biol.*, 1984, 4(3), 484.
- [11] Bakka, A. et al.: *Experientia*, 1982, 38, 381.
- [12] Karin, M.: *Cell*, 1985, 41, 9.
- [13] Bakka, A. and Webb, M.: *Biochem. Pharmacol.*, 1981, 30, 721.
- [14] Schorpp, M. et al.: *Cell*, 1984, 37, 861.
- [15] Thornalley, P. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 1985, 827, 36.

[本文于 1988 年 9 月 5 日收到]