

硒抗辐射损伤作用的探讨*

向 荣 王 鼎 年

(重庆医科大学核医学教研室,重庆 630046)

提 要

小鼠分次腹腔注射 1.5mg Se/kg 后,用 ^{60}Co 6.0Gy 一次照射,观察硒对血及肝脏亚细胞组分线粒体 GSHPx 活性, LPO 含量改变和 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的影响,以及在不同时间血和肝的 GSHPx 活性变化。并对不同剂量硒对 LPO 形成的影响进行了研究。结果表明,给硒及 ^{60}Co 照射后小鼠体内的 GSHPx 活性显著增高;硒表现一定的抗辐射损伤作用和对损伤机体的恢复作用。另一方面,当给硒量在 0.5mg/kg 以上时,随着硒浓度的增加, LPO 也增加,存在剂量效应关系。

关键词 硒,辐射损伤,谷胱甘肽过氧化物酶,脂质过氧化物

辐射对机体损伤的机理之一是通过间接作用即自由基而引起,而膜上的不饱和脂肪酸是自由基作用的靶物质之一。辐射对 DNA 的损伤也可导致碱基过氧化物的产生,特别是生成胸腺嘧啶脱氧核苷酸过氧化物^[1]。硒能在机体中对多种形式的氧化损害,包括辐射损伤,起保护作用。目前已知这种作用大多由谷胱甘肽过氧化物酶(GSHPx)所中介,这就为研究硒抗辐射损伤作用的途径提供了新的线索。本文对硒与机体抗氧化剂 GSHPx 活性和脂质过氧化物(LPO)形成在辐射损伤中的关系,以及给硒剂量增高时对机体毒性作用的表现等进行了探讨。

材料与方 法

一、材料 Na_2SeO_3 , Merck 产品;硫代巴比妥酸(TBA),上海试剂二厂产;四乙氧基丙烷(TEP),Aldrich 产品;二巯基双硝基丙甲酸(DTNB),军事医学科学院产品; $^3\text{H-TdR}$,上海原子能研究院产品,比放 18.5 M Bq/ml。

动物选用对射线敏感的 BALB/C 小鼠^[2],雄性,体重 20~25g。

二、方 法

1. 硒对辐射所致死亡率的影响 50只小鼠分成2组, I组为给硒及辐照组, II组为辐照组。于实验开始的第1, 3, 5, 6, 7, 8, 10天 I组各腹腔注射 1.5mgSe/kg 的 Na_2SeO_3 溶液, 共7次, II组给等量的生理盐水。于第6天将动物置弧形塑料盒分列的方格内, ^{60}Co 一次照射, 剂量率 0.622Gy/min, 总剂量 7.0Gy, 观察20天死亡率。

2. 硒抗辐射损伤作用与 GSHPx、LPO 及 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的关系 64只小鼠随机分成4组: A组为给硒及 ^{60}Co 辐照组, B组为给硒组, C组为 ^{60}Co 辐照组, D组为对照组。A, B组同上给 1.5 mgSe/kg, 共7次, C, D组给等量生理盐水。 ^{60}Co 辐照同前法于实验第6天进行, 总剂量为 6.0Gy。于实验第10天(照后第4天), 每鼠腹腔注射 18.5kBq/g 体重 $^3\text{H-TdR}$, 3h 后戊巴比妥麻醉, 摘除眼球从眼眶取血 0.6—1.0ml 于抗凝管中, 3000r/min \times 10min 离心, 血浆留作 LPO 测定。同时取血 10 μ l 加

* 本文曾在 1990 年国际应用生物无机化学学术会议交流。

入 1ml 0.2mol/L 磷酸缓冲液中作全血 GSHPx 活性测定用。然后打开胸腹腔,以生理盐水经心脏灌注至肝脏呈灰白色,取肝组织适量,滤纸吸干后称重,匀浆后,以差速离心法进行肝亚细胞组分分离,各组分中加 0.2ml 0.2mol/L 磷酸缓冲液供测定 LPO, GSHPx 及 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率的分布用。具体方法如下:

(1) $^3\text{H-TdR}$ 掺入试验 取 0.1ml 各亚细胞组分液以 1mol/L KOH 50—60°C 消化 1—2h, 放冷, 加闪烁液 8ml, 避光放置后测放射性。

(2) LPO 测定按大碱石子法^[3]。

(3) GSHPx 活性测定根据夏奕明改进的方法^[4]。

(4) 蛋白定量用考马氏亮蓝 G250 法^[5]。

(5) 统计方法用完全随机方差分析。

3. 硒抗辐射损伤作用中 GSHPx 活性的动态变化 小鼠 120 只, 分组、给硒剂量和时间、照射条件、样品收集处理及 GSHPx 活性测定等同上。但在照后 1, 4, 8, 13, 18 天, 分次每组

随机取小鼠 5 只测 GSHPx 活性, 观察不同时间的动态变化。

4. 给硒剂量与 LPO 形成的关系 小鼠 40 只分成 4 组, 各组分别经腹腔注射 1.0, 0.5, 0.1, 0 mgSe/(kg·d) (Na_2SeO_3), 连续 7 天, 第 8 天时测血浆及肝各亚细胞组分 LPO, 方法同前。

结 果

一、硒对辐照小鼠死亡率的影响 经 ^{60}Co 7.0Gy 照射后 20d 死亡率观察结果, 给硒组存活率 28%, 不给硒的 II 组存活率 20%, 前者稍高于后者, 但两者无明显差异。

二、硒对辐照小鼠机体中 GSHPx 活性及 LPO 形成的影响 给硒和 ^{60}Co 辐照后, 血及肝细胞线粒体 GSHPx 活性改变见表 1, LPO 形成的变化见表 2。

三、硒及 ^{60}Co 辐照对 $^3\text{H-TdR}$ 掺入肝亚细胞组分的影响 $^3\text{H-TdR}$ 掺入抑制实验结果见表 3。

表 1 给硒和 ^{60}Co 辐照后 GSHPx 的变化

Table 1 The change of GSHPx after ^{60}Co irradiation and Se treatment

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D	P 值 P value			
	Se+ ^{60}Co	Se	^{60}Co	control	A-C	A-D	B-D	C-D
Whole blood	15.3±2.9	12.9±1.7	13.4±3.0	19.3±2.3	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01
Liver mitochon fraction	315±45	222±28	237±39	157±21	<0.05	<0.01	<0.05	<0.05

n = 16 \bar{x} ±SD 酶单位: 全血 U/ml, 线粒体 U/mg 蛋白
enzyme unit: whole blood U/ml, mitochondrion U/mg protein

表 2 给硒和 ^{60}Co 辐照后 LPO 含量变化

Table 2 The change of LPO after ^{60}Co irradiation and Se treatment

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D	P 值 P value			
	Se+ ^{60}Co	Se	^{60}Co	control	A-C	A-D	B-D	C-D
Plasma	12.6±4.0	13.6±3.6	16.9±3.7	13.8±2.3	<0.01	>0.05	>0.05	<0.05
Liver: Nuclear fraction	117.4±5.3	115.7±5.9	125.1±9.2	110.6±12.1	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01
Lysosomal fraction	108.1±17.6	89.6±17.3	91.4±17.8	59.1±10.3	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01
Mitochon. fraction	217.4±26.2	130.8±38.7	155.1±41.8	27.9±10.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Microsomal fraction	48.7±11.5	39.3±8.2	39.7±7.9	24.5±6.9	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

n = 16, \bar{x} ±SD LPO 单位: 血浆 nmol/ml, 组织 nmol/mg 蛋白
LPO unit: plasma nmol/ml, tissue nmol/mg protein

表3 给硒及⁶⁰Co照射后对³H-TdR掺入肝亚细胞组分比率¹⁾的影响
 Table 3 The effect of Se and ⁶⁰Co irradiation on incorporation rate¹⁾
 of ³H-TdR to liver subcellular fractions

	A组 Group A Se± ⁶⁰ Co	B组 Group B Se	C组 Group C ⁶⁰ Co	D组 Group D control	P值 P value			
					A-C	A-D	B-D	C-D
Nuclear fraction	87%	92%	72%	100%	<0.05	<0.05	<0.05	<0.01
Lysosomal fraction	83%	95%	80%	100%	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01
Mitochon. fraction	75%	83%	70%	100%	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Microsomal fraction	55%	74%	56%	100%	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

1) 以对照组的掺入比率为 100%
 The incorporation rate of control group is referred to as 100%

四、给硒和辐照后血和肝中 GSHPx 活性的动态变化
 给硒和辐照后 GSHPx 活性的动态变化分别见图 1 及图 2。从结果可见给硒辐照组和辐照组，在照后血和肝中 GSHPx 活性先是明显升高，之后分别在第 4 和第 8 天左右开始低于正常。随后又逐渐回升，至 18 天时基本恢复正常。但给硒辐照组较辐照组的活性高且回升迅速，而下降的程度则不如辐照组低。

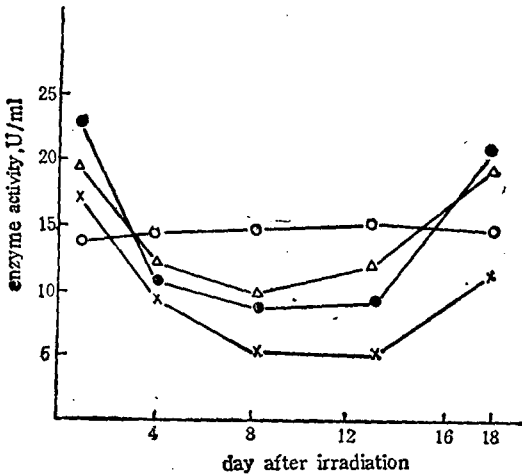


图1 给硒或未给硒小鼠经⁶⁰Co 6.0Gy 全身辐照后不同时间血中 GSHPx 活性的变化

Fig 1 The change of GSHPx activity in the blood of Se treated or untreated mouse, at different times after ⁶⁰Co irradiation (⁶⁰Co 6.0 Gy whole body exposure)

—●— Se+⁶⁰Co
 △—△ Se
 ×—× ⁶⁰Co
 ○—○ Control

五、给硒剂量增加与 LPO 形成的关系

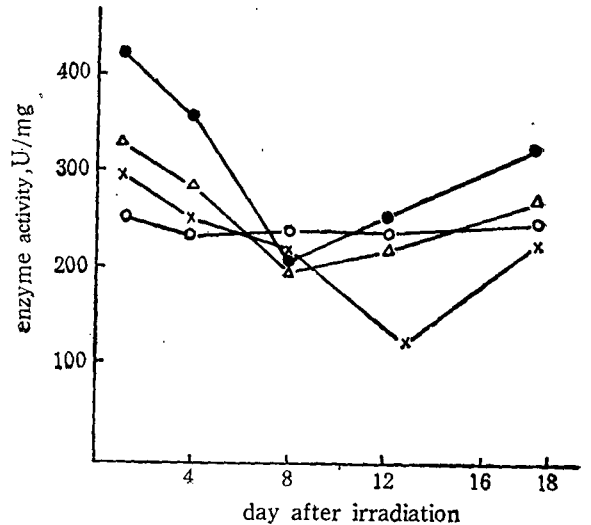


图2 给硒或未给硒小鼠经⁶⁰Co 6.0Gy 全身辐照后不同时间肝中 GSHPx 活性的变化

Fig 2 The change of GSHPx activity in the liver of Se treated or untreated mouse, at different times after ⁶⁰Co irradiation (⁶⁰Co 6.0 Gy whole body exposure)

—●— Se+⁶⁰Co
 △—△ Se
 ×—× ⁶⁰Co
 ○—○ Control

当给硒量在 0.5 mg/kg 以上时，给硒剂量增加，组织中 LPO 含量也增大；其结果见表 4。

讨 论

GSHPx 是一个硒依赖酶，能代谢各类重要的有机过氧化物，包括 DNA 过氧化物和 LPO。Hutchinson 曾报道有生物活性的核制剂稀溶

表4 不同剂量硒对 LPO 含量的影响

Table 4 The effect of Se at different doses on LPO

	I 组 Group I 1.0mgSe	II 组 Group II 0.5mg Se	III 组 Group III 0.1mgSe	IV 组 Group IV control	P 值 P value			
					I-III	I-IV	II-IV	III-IV
Plasma	10.50±1.1	10.0±1.6	8.4±1.6	8.6±2.0	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05
Liver:								
Nuclear fraction	61.4±2.8	47.3±5.6	46.2±2.1	42.5±2.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Lysosomal fraction	62.1±3.3	57.5±5.0	40.1±3.0	37.2±3.6	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05
Mitochon. fraction	63.5±5.5	51.2±11.4	37.6±5.9	38.1±5.0	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05
Microsomal fraction	71.3±5.5	53.1±5.6	48.7±4.6	41.1±2.6	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

$n = 10$, $\bar{x} \pm SD$. LPO 单位: 血浆 nmol/ml, 组织 nmol/mg 蛋白 LPO unit: plasma nmol/ml, tissue nmol/mg protein

液被射线辐照时可被 GSH 所保护^[6]。也有报道含-SH 基团化合物可保护被辐照的 DNA。近来对 GSHPx, LPO 和自由基研究的不断深入, 为进一步研究硒的抗辐射损伤和恢复机制提供了有利条件^[7,8]。

实验中 ^{60}Co 7.0Gy 对给硒小鼠一次性辐照后, 20 天存活率与单纯辐照组无显著差异。但在此之前我们曾用昆明种小鼠同样剂量辐照的 20 天存活率, 给硒者存活率为 9/11, 不给硒者仅为 5/11。此实验结果所以无差异, 可能是 BALB/C 小鼠对射线较敏感, 该辐照剂量偏大所致^[2]。

从血和肝线粒体组分中可见各实验组的 GSHPx 活性均较对照组明显升高, 即硒或辐照均可引起 GSHPx 活性明显升高^[9], 以给硒辐照组升高更为明显。其升高的可能原因是由于辐照后大量的自由基和 LPO 生成, GSHPx 作为自由基清除剂和抗氧化酶, 故活性反应性增加以增强机体的抗氧化能力, 阻断自由基引发的 LPO 生成。但也不能忽视由于辐照造成组织损伤, RBC 被破坏使 GSHPx 释放而导致其增高的可能^[1]。

从表 2 可见血浆中 ^{60}Co 辐照组 LPO 含量明显高于其它 3 组, 而给硒辐照组, 给硒组与对照组比较无明显差异。这说明硒和硒依赖的 GSHPx 能使因辐照而产生的 LPO 减少, 在一定程度上反映了硒在辐射损伤中的抗氧化性质。从各亚细胞组分看, 核组分 LPO 改变与血

浆相似, 这表明硒也可稳定 DNA 和 RNA 使之不易产生过氧化物^[1]。各实验组中溶酶体、线粒体、微粒体组分 LPO 值显著高于对照组。文献报告 GSHPx 主要存在于细胞液(75%)和线粒体(25%)中, 而溶酶体和微粒体几乎没有 GSHPx^[11,12]。而且溶酶体膜含的类脂、胆固醇和糖类较其他亚细胞成分多, 照后易发生脂质过氧化作用而形成 LPO^[13]。

在 ^3H -TdR 掺入实验中各实验组的分布均较对照组低。但核和线粒体组分在给硒辐照组中掺入比率明显高于辐照组 ($P < 0.05$)。说明硒的抗辐射损伤作用主要表现在核和线粒体, 而对溶酶体和微粒体不太明显, 这也与前面的结果相一致。

在观察 GSHPx 活性动态变化的同时, 我们将给硒受照小鼠在照后 23 天内作了 7 次尾血 WBC 计数, 结果见图 3。

在 1~4 天 GSHPx 活性均增高, 其原因已如前述, 但以后 4—13 天左右由于血细胞大量减少, 机体代偿功能还未恢复, 因而 GSHPx 低于正常, 这从血象变化也可得到支持。照后 13—23 天为机体恢复期, 给硒辐照组 GSHPx 18 天达到正常, WBC 23 天恢复正常, 但不给硒的辐照组则恢复缓慢得多。从 GSHPx 活性的动态变化可推论, 在辐照初期硒具有使机体免受辐射损伤的保护作用, 在后期可能有促使机体的恢复作用, 其恢复作用机制尚不清楚。这样可以设想给放射治疗病人适量硒作为辅助措

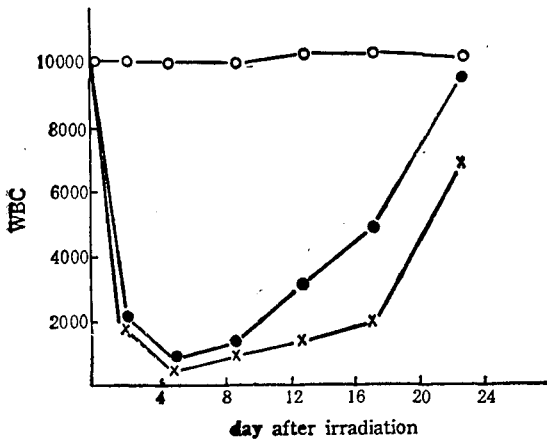


图3 给硒或未给硒小鼠经⁶⁰Co 6.0Gy 全身辐照后不同时间外周血 WBC 计数的变化

Fig 3 The WBC count change in peripheral blood of Se treated or untreated mouse, at different times after ⁶⁰Co irradiation (6.0 Gy whole body exposure)

—○— Se + ⁶⁰Co
 ×—× ⁶⁰Co
 ○—○ Control

施可以减轻辐射反应。

我们发现小鼠随着给硒量的增加,组织中 LPO 含量也随着增加,这是一个大家感兴趣的有关硒毒性反应的问题。为此,在预试验和正式实验中用 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 mgSe/(kg·d) 的 Na₂SeO₃, 连续 7 次, 第 10 天测定 LPO 值, 结果表明当给硒量在 0.5mg/kg 以上时, LPO 量即随着增加, 呈现“剂量效应”关系。3.0mg/kg 时肉眼可见肝脏肿胀, 边缘变钝, 表面有散在小灰白点, 其中少数小鼠出现肝萎缩、腹水等急性肝坏死症状。1.5mg/kg 以上时光镜下可见肝细胞小片状坏死。1.0mg/kg 以上时此种损害加重, 其中以线粒体最为明显。对

线粒体的损害, 直接影响了 GSHPx 导致 LPO 升高, 这可能就是前面提到的亚细胞线粒体组分 LPO 升高的原因。

硒的生物效应与给硒的化学形式、剂量、间隔时间及是否与其他物质合并使用等因素密切相关, 这早为许多学者所证实。在我们实验中, 0.5mg/kg 连续 7 天给硒与 1.5mg/kg 基本隔天给硒, 两者所致 LPO 增加, 在有些组分中前者比后者大。可见毒性反应不仅与给硒剂量有关而且与给硒时间长造成体内蓄积也有关。

综上所述, 硒具有一定的抗辐射损伤和对机体的恢复作用, 且在一定程度上是通过 GSHPx 发挥作用的。但是硒的作用与毒性剂量很接近(特别表现为肝损害的毒性反应)^[10, 14, 15]。这对研究硒的作用机制及其应用是一个不可忽视的问题。

参 考 文 献

- 1 Batist G. *Biochem Pharma*, 1986; 35(4): 601
- 2 Staats J. *Can Res*, 1985; 45: 945
- 3 大诚石子. *最新医学*, 1987; 33(4): 660
- 4 夏奕明. *卫生研究*, 1987; 16(4): 29
- 5 Bradform M M. *Analy Biochem*, 1976; 72: 248
- 6 Hutchinson F. *Radiat Res*, 1961; 14: 721
- 7 Gower J D. *Free Radical Biol Med*, 1988; 5: 95
- 8 Bégin M E. *J Nation Can Inst*, 1988; 80(3): 188
- 9 Leboeuf R A. *Pro Soci Exper Biol Med*, 1985; 180: 348
- 10 Shamberger R J. *Biochemistry of Selenium*, New York: Plenum Press, 1983: 294
- 11 Meyer S A. *J Nutr*, 1983; 113: 394
- 12 Hawker W C. *J Inorganic Biochem*, 1985; 25: 77
- 13 Huijbers WAR. *Radiat Res*, 1979; 78: 502
- 14 Oldfield J E. *J Nutr*, 1987; 117: 2002
- 15 Koller L D. *Can J Ces Res*, 1986; 50(3): 297

[本文于1990年6月22日收到, 1991年3月4日修回]

EFFECT OF SELENIUM ON RADIATION INJURY

Xiang Rong Wang Dingnian

(Dept. of Nuclear Medicine Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 630046)

Abstract

After ⁶⁰Co irradiation 6.0Gy and/or administration of selenium (1.5 mg Se/Kg, Selen-
 (continued on page 376)

Hz), 而 β - ^{31}P 谱峰趋于消失, 表明 ADP 的 β - PO_4 的端基络合和解络也是快速可逆的. AMP 的络合, 其 α - ^{31}P 谱峰基本上没有位移, 但谱峰大大加宽(半峰宽 400Hz). 分子体积较小的 Pi (磷酸根) 与 $[\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_8(\text{SPh})_9]^{-3}$ 的络合, 使得其 ^{31}P 谱峰往低磁场方向仅移动 0.42 ppm (窄峰).

亚甲蓝是较为温和的人工染料 ($E_{\text{pH}}^0 \approx 0.01\text{V}$), 在生化实验中常用作离体实验时的电子载体. 在 DMF- H_2O 介质中, ATP, ADP, AMP 和 Pi 分别与 $[\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_8(\text{SPh})_9]^{-z}$ ($z = 3, 2, 1$) 的络合, 都能加快其络合物与等当量的亚甲蓝之间的氧化还原反应速率, 加快的程度为 $\text{ATP} > \text{Pi}$, $\text{ADP} > \text{AMP}$. 表明腺苷酸化合物都能活化原子簇中的电子, 驱动电子从原子簇向电子受体的输出.

在 DMF- H_2O 介质中, ATP, ADP 和 Pi 分别与 $[\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_8(\text{SPh})_9]^{-z}$ ($z = 3, 2, 1$) 的络合, 使其与亚铁螯合剂邻菲罗林的反应变得较为迟缓, 对原子簇中的铁起了屏蔽作用. 其屏蔽大小为 $\text{Pi} > \text{ATP} > \text{ADP}$. AMP 基本上没有表现出屏蔽作用. 由于 AMP 中的 α - PO_4 紧靠着核糖, 具有更大的空间位阻, 所以 AMP 与原子簇的络合是松散的. 由于络合物中的铁受到了 ATP 等配体的屏蔽, 而在络合物与亚甲蓝的氧化还原反应中, ATP 等配体又分别都能加快原子簇与亚甲蓝之间的反应速率, 这

表明其相应的络合物有可能是通过有机硫配体或共轭的磷酸根基团而传递电子的.

ATP 和 $[\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_8(\text{SPh})_9]^{-3}$ 的络合, 使得其磷酰键的伸缩振动频率由 900cm^{-1} 红移至 884cm^{-1} , ADP 与该原子簇的络合, 使得其磷酰键的伸缩振动频率由 915cm^{-1} 红移至 901cm^{-1} . 表明原子簇与腺苷酸化合物的络合, 对其磷酰键有一定程度的活化作用. 在不同水含量的 DMF- H_2O (pH7.0) 介质中, 在 48h 内, $[\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_8(\text{SPh})_9]^{-z}$ ($z = 3, 2, 1$) 与 ATP 的络合, 在无电子传递时, 没有促进 ATP 的水解. 用 H_2O_2 为氧化剂, 氧化上述络合物时, 也没有促进 ATP 的水解. 从分子结构模型可看出, 由于双立方烷原子簇中的苯硫酚配体的空间障碍, ATP 只可能以其 γ - PO_4 端基络合在原子簇中的铁上, 可能由于端基络合对 ATP 的磷酰键活化不够, 从而在有没有电子传递时都没有促进 ATP 的水解.

化学模拟研究表明, ATP 等腺苷酸化合物通过其端基磷酸根与双立方烷原子簇中的铁络合, 增加其配位场和配位数, 具有活化原子簇中的电子之功能.

参 考 文 献

- 1 曾定. 固氮生物学. 厦门: 厦门大学出版社, 1987: 266—268

[本文于1991年5月17日收到, 7月13日修回]

(continue from page 373)

ite), the activity of glutathion peroxidase (GSHPx), the rate of lipid peroxide (LPO) formation and the incorporation of ^3H -TdR in the subcellular fractions of mouse liver and blood were studied. The results showed that the blood and liver mitochondrial GSHPx rose in the 1—4th days, dropped to subnormal level in the 5—12th days and then recovered in the 13—18th days. Se treatment had a markedly protecting effect to mouse on this change. It was also found that the LPO contents of blood and liver subcellular fractions were elevated significantly by ^{60}Co irradiation and small doses of Se had an inhibiting action on such an elevation. These results were supported by the experiment of incorporation rate of ^3H -TdR in liver cell. However attention should be paid to a dose-effect relationship between the protecting effect and the toxicity of Se. It was found that when the dose of Se was over 0.5mg/Kg, the more Se was given the more LPO was formed.

Key words Selenium, Radiation injury, Glutathion peroxidase, Lipid peroxide