

SOD对肿瘤细胞凋亡影响和抗氧化损伤的研究：

SOD对荷瘤小鼠正常组织氧化损伤的保护效应

刘永彪^{1,2} 刘颖² 赵杰² 郝兴芝² 王绪² 姚思德¹

¹(中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

²(徐州医学院肿瘤研究所 徐州 221002)

摘要 探讨超氧化物歧化酶(SOD)对电离辐射和肿瘤化疗药物对荷瘤机体正常组织损伤的保护效应及机制,测定荷瘤鼠肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肺、脑和骨髓组织的活性氧(ROS)、氧化产物丙二醛(MDA)水平和谷胱苷肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)活性,并观察SOD对荷瘤小鼠肝脏超微结构的影响。结果表明,荷瘤小鼠受照射和化疗药物后其骨髓、肝脏、肾脏、脾脏、组织匀浆中ROS、MDA含量明显升高,而GSH-Px和CAT活性明显降低,其机制是电离辐射和化疗药物造成抗氧化酶的损伤及机体内ROS含量上升。加入SOD与对照组相比,显著降低荷瘤小鼠骨髓、肝脏、脾脏组织匀浆中ROS、MDA含量,略微升高GSH-Px和CAT活性,而对肾脏组织匀浆中ROS、MDA含量和GSH-Px和CAT活性无明显影响,同时SOD可明显减轻电离辐射对荷瘤小鼠肝细胞超微结构破坏,SOD通过直接清除自由基和保护抗氧化酶的损伤起辐射保护作用。

关键词 超氧化物歧化酶, 电离辐射, 抗肿瘤药物, 荷瘤小鼠, 活性氧, 丙二醛, 胱苷肽过氧化物酶, 过氧化氢酶

中图分类号 R811.5

抗肿瘤药物在诱导肿瘤细胞凋亡同时,也可导致机体正常组织的损伤,尤其细胞增殖速率较高或药物代谢主要途径的组织(骨髓、胃肠上皮、肾脏、肝脏等)这些毒副作用限制了抗肿瘤药物用药剂量或在获得疗效之前不得不中断治疗,将大大影响患者的疗效。机体的电离辐射损伤主要起因于水辐解产生的大量初级自由基,尤其是羟基自由基直接攻击细胞核内的DNA及细胞膜,造成DNA单链断裂和双链断裂等损伤,引发不饱和脂肪酸脂质过氧化而使细胞膜损伤、各种亚细胞结构破坏、酶活性降低或消失^[1]。超氧化物歧化酶(SOD)是机体中最重要的抗氧化酶,在清除O₂⁻中起关键作用。因此,在电离辐射防护效应的研究中一直受到重视。抗肿瘤药物可通过刺激肿瘤细胞产生高浓度活性氧(ROS)来诱导细胞凋亡,这种作用对正常组织的损伤有时更甚。探讨了外源性抗氧化剂SOD对肿瘤化疗药物和电离辐射治疗肿瘤影响的基础上,初步揭示了SOD对正常组织的某些保护作用。本实验以荷瘤小鼠为实验对象,通过测定荷瘤小鼠肝脏、肾脏、脾脏和骨髓细胞ROS水平变化,进一步探讨了抗肿瘤药物顺铂、阿霉素(DDP、ADM)和电离辐射对这些正常器官毒副作用与ROS产生的关系,并

就外源性SOD对正常组织抗辐射损伤的分子生物学机理进行了研究。

1 材料和方法

1.1 肿瘤动物模型的建立

实验动物为健康BALB/c小鼠18只,6—8周龄,体重(20±2)g,由上海实验动物中心提供。种鼠为U14宫颈癌腹水型,由上海医药工业研究院实验动物中心提供。小鼠皮下接种肿瘤细胞后10—14d肿瘤约1cm大小时间开始进行分组实验。

1.2 动物分组

将已经形成实体瘤的荷瘤小鼠随机分为3组。(1)对照组:不给予任何治疗;(2)单纯化疗药物组:单次腹腔注射DDP或ADM(3)化疗药物+SOD组:单次腹腔注射DDP或ADM,次日开始腹腔注射SOD,连续应用5d,同时单纯药物化疗组腹腔注射等量生理盐水,每组动物为6只。SOD给药在用化疗药物DDP或ADM 24h后腹腔注射,剂量为250U·mg⁻¹·d⁻¹,连续5d,用前用生理盐水稀释至1×10⁷U/L。将荷瘤小鼠随机分为3组。(1)对照组;

江苏省教委自然科学基金(98KJD320014)部分资助

第一作者:刘永彪,男,1963年8月出生,1999年在苏州大学获硕士学位,副教授,副主任医师,放射医学肿瘤学专业,现为中科院上海应用物理研究所在职博士

收稿日期:初稿2003-10-13,修回2003-12-23

(2) 单纯照射组:采用直线加速器 X 线全身照射,并予等量生理盐水;(3) 照射给药组:在每次照射前 2h 腹腔注射 SOD。

1.3 给药方法及照射条件

1.3.1 抗肿瘤药物用药剂量 DDP= 2.5mg kg⁻¹ 1.88·鼠重(kg),阿霉素(ADM)=1.25mg kg⁻¹ 1.88·鼠重(kg)。均腹腔注射给药,医用直线加速器(Siemens,USA),6MV X 线对小鼠进行全身照射,源皮距 100cm,剂量率 1Gy/min,剂量分割 5Gy/1Gy/5d(每天照射一次,每次 1Gy,连续 5d)。

1.4 化学比色法测定荷瘤鼠肝脏、脾脏、肾脏、心脏和骨髓组织的 ROS、MDA 水平和 GSH-Px、CAT 活性

1.4.1 动物处理 荷瘤小鼠治疗结束后次日,采用颈椎脱臼法处死小鼠,立即取出其肝脏、脾脏、肾脏、心脏,置于预先配制预冷的匀浆介质中,同时取其股骨,用匀浆介质冲洗收集骨髓细胞。取骨髓细胞悬液,离心 10min(1500 r/min),去上清液,加入匀浆介质调细胞浓度为 1×10⁷/mL,取细胞悬液 1mL,4℃ 离心 10min(1500r/min),去上清,再加入 1mL 匀浆介质,在冰水中用电动匀浆器低速匀浆使细胞破碎,将细胞裂解液以 4000r/min 离心 10min,取适量上清液进行各项指标测定。取肝脏、脾脏、肾脏组织块约 1g 放入冰冷的生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干,再称重,放入试管中。用量筒量取预冷的匀浆介质,量为组织块重量的 9 倍倒入试管中。在冰水中用电动匀浆器高速匀浆使组织细胞破碎。将组织匀浆于 4℃ 离心 10min(4000r/min)。取适量上清液进行各项指标测定。

1.4.2 CAT 测定 严格按试剂盒说明书进行试剂配制,均现用现配。取各标本 20μL 加入比色皿底部,将已预热至 25℃,OD 值在 0.5—0.55 之间的底物溶液 3mL 用 5mL 移液器快速冲入比色皿中,240nm 处立即测定吸光度,记下 OD1 值,比色皿不

取出,1min 后立即再测定一次吸光度,记下 OD2 值。

CAT 活力=log(OD1/OD2)×2.303/60s×稀释倍数×组织蛋白含量

1.4.3 组织蛋白含量测定 用考马斯亮蓝法,ROS、MDA 水平和 GSH-Px 活性的测定严格按试剂盒操作步骤并且我们常规应用的方法^[2,3]。

1.5 肝脏电镜标本制备

实验结束后次日,采用颈椎脱臼法杀死小鼠后,立即取出小鼠肝脏置于培养皿中,用刀片切取约 1mm×1mm 大小放入预冷的 2.5%戊二醛中固定,2%锇酸后固定,梯度乙醇脱水,马铃薯葡萄糖琼脂(PDAP)浸透,包埋后超薄切片,行柠檬酸铅染色后置透射电镜(HA-60,Japan)下观察。

1.6 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间显著性差异用 *t* 检验。

2 结果

2.1 SOD 对 DDP 引起荷瘤小鼠正常组织 ROS、MDA 水平及 GSH-Px、CAT 活力水平变化的影响

DDP 治疗组荷瘤鼠骨髓细胞和肝脏、脾脏组织匀浆中 ROS 和 MDA 明显高于未治疗组($p < 0.01$),肾脏组织匀浆中 ROS、MDA 水平无明显变化,差异不显著($p > 0.05$)。SOD 对荷瘤鼠用 DDP 后正常组织的 ROS 和 MDA 水平的影响,DDP+SOD 组荷瘤鼠的骨髓细胞中以及肝脏、脾脏组织匀浆中 ROS、MDA 水平较单纯 DDP 化疗组明显降低,肾脏未见变化,结果见表 1。DDP 化疗组荷瘤鼠骨髓、肝脏和脾脏组织匀浆中 GSH-Px 和 CAT 活性与未治疗组比较明显降低($p < 0.01$ 和 $p < 0.05$),而肾脏组织匀浆中 GSH-Px 和 CAT 活性无明显变化,结果见表 2。

Table 1 The effect of DDP on content of ROS and MDA in normal tissues of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Organism	ROS(U/ mgprot or 10 ⁶ cells)			MDA(nmol/ mgprot or 10 ⁶ cell)		
	Control	DDP	DDP+SOD	Control	DDP	DDP+SOD
Liver	49.89±5.25	67.54±5.46 ⁽²⁾	52.47±6.38 ⁽⁴⁾	8.04±1.12	11.54±1.38 ⁽¹⁾	9.26±1.35 ⁽³⁾
Kidney	22.95±2.52	24.42±3.25	24.90±3.76	3.61±0.86	3.64±0.58	3.94±0.86
Spleen	26.24±2.32	9.63±3.94 ⁽²⁾	29.45±3.74 ⁽⁴⁾	5.37±2.11	8.15±1.04 ⁽¹⁾	6.07±1.46 ⁽⁴⁾
Marrow	10.36±1.88	15.04±2.48 ⁽²⁾	12.17±2.55 ⁽⁴⁾	2.04±0.30	6.34±0.92 ⁽²⁾	4.04±0.30 ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$ (vs control). ⁽³⁾ $p < 0.05$, ⁽⁴⁾ $p < 0.01$ (vs DDP)