

文章编号: 1007-4627(2010)02-0192-05

# 两种保护剂对 C 离子诱导小鼠急性肝损伤的应答\*

张录卫<sup>1, 2, 3</sup>, 张红<sup>1, 2, 3, #</sup>, 刘阳<sup>1, 2, 3, 4</sup>, 郝冀方<sup>1</sup>, 赵卫平<sup>1, 2, 3</sup>

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 甘肃省重离子束辐射医学应用基础重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

3 中国科学院重离子辐射生物医学重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

4 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 比较了 N-乙酰半胱氨酸(NAC)及乙酰左旋肉毒碱(ALCAR)对<sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 离子照射小鼠的损伤效应, 并探讨了其可能的作用机制。利用 4 Gy 剂量的<sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 离子束对预先给予 NAC(100 mg/kg)和 ALCAR(100 mg/kg)保护的昆明小鼠进行单次全身照射。随后检测肝组织中总抗氧化能力(TAC)、DNA 单链断裂和细胞凋亡率。结果显示, 与照射对照组相比, 提前给予 NAC 和 ALCAR 均极显著地增强了肝组织的抗氧化能力( $P < 0.001$ ), 减轻了<sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 离子导致的肝组织中 DNA 断裂( $P < 0.001$ )和细胞凋亡( $P < 0.001$ )。此外, 还发现 ALCAR 组抗重离子辐照损伤的能力显著地高于 NAC 组( $P < 0.05$ )。实验结果提示了 NAC 和 ALCAR 可通过抵御组织内的氧化胁迫, 阻止 DNA 链的断裂和细胞的凋亡, 实现对 C 离子辐照损伤的保护效应。而且 ALCAR 比 NAC 可能更适合作为有潜力、有希望的抗 C 重离子辐射药物。

**关键词:** N-乙酰半胱氨酸; 乙酰左旋肉毒碱; <sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 离子; 小鼠; 辐射防护

**中图分类号:** Q256; Q279; Q274; Q37 **文献标识码:** A

## 1 引言

N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)由 L-半胱氨酸加上乙酰基形成, 是合成谷胱甘肽的前提物质<sup>[1]</sup>。30 年来作为一种黏液溶剂应用于多种呼吸系统疾病。其后又发现 NAC 在艾滋病、癌症、重金属中毒、酒精肝、心脏病以及帕金森病等方面均有广泛的治疗作用<sup>[2]</sup>。乙酰左旋肉毒碱(Acetyl-L-Carnitine hydrochloride, 简称 ALCAR)是目前公认的线粒体营养素。近年来, 国际上对于 ALCAR 的研究日益增多, 随着对其功能的进一步了解, ALCAR 的研究领域已经从治疗线粒体疾病扩大到抗衰老和治疗神经性疾病方面<sup>[3]</sup>。但关于 NAC 及 ALCAR 的抗辐射作用目前尚无定论。在空间辐射生物学领域中, 大量研究证实, 具有高传能线密度(LET)的重离子与低 LET 的射线(X 和  $\gamma$  等)相比,

穿过生物体时所致损伤相对复杂且难以修复<sup>[4, 5]</sup>, 因此, 寻求低毒、高效的抗重离子辐射药物具有重要的现实意义。本实验采用预先给予小鼠 NAC 和 ALCAR, 观察重离子照射后肝组织中总抗氧化能力(TAC)、DNA 单链断裂及细胞凋亡的变化, 拟探讨 NAC 及 ALCAR 抗 C 重离子照射的保护效应及可能的保护机制。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

健康昆明种雄性小鼠 48 只, 体质量为(20 ± 2) g, 由兰州生物制品研究所提供。随机分成 6 组, 每组 8 只, 饲养适应环境 3 d 后进行实验, 饲养环境温度(20 ± 2) °C, 正常昼夜节律, 无强光、噪音刺激, 动物可自由地进食和饮水。

\* 收稿日期: 2009-07-03; 修改日期: 2009-10-10

\* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2010CB834202); 国家自然科学基金重点项目(10835011); 甘肃省重大科技专项项目(0702NKDA045; 0801NKDA001); 兰州市-中国科学院科技攻关项目(07-2-07)

作者简介: 张录卫(1979-), 男(汉族), 甘肃文县人, 硕士, 从事辐射生物学效应研究; E-mail: zhanglw@impcas.ac.cn

# 通讯联系人: 张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

## 2.2 照射条件

重离子照射是在中国科学院近代物理研究所的兰州重离子研究装置(HIRFL)的浅层肿瘤治疗终端上进行的,采用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束。经束流管道镍窗、电离室、空气后抵达受照动物,能量为 95.6 keV/u, LET 值为 26.9 keV/ $\mu\text{m}$ , 吸收剂量率 1 Gy/min, 用空气电离室监测剂量,照射剂量 4 Gy。

## 2.3 实验处理

实验动物处理分为 6 个组,即正常对照组(C)、单纯照射组(IR)、NAC 预防组(NAC+TR)、ALCAR 预防组(ALCAR+IR)、单纯 NAC 用药组(NAC)和单纯 ALCAR 用药组(ALCAR)。正常对照组中的受试动物腹腔注入与药物施用量等体积的生理盐水(0.85%),其后不经过任何照射处理;单纯照射组中受试动物仅接受全身单次照射处理;NAC 预防组中受试动物腹腔一次注入 NAC(100 mg/kg, 溶解在生理盐水中,剂量参考 liu et al<sup>[6]</sup>)后,再进行单次照射处理;ALCAR 预防组中受试动物腹腔一次注入 ALCAR(100 mg/kg, 溶解在生理盐水中,剂量参考 Ohsawa et al<sup>[7]</sup>)后,再进行单次照射处理;单纯 NAC 及 ALCAR 组的受试动物仅接受等量一次腹腔注射。

## 2.4 TAC 的检测

小鼠接受 $^{12}\text{C}^{6+}$ 照射后 2 h,采用颈椎脱臼法处死小鼠,快速取出肝组织,加入预冷的磷酸盐缓冲液(PBS),冰浴中制备成 10%的匀浆液,低温离心(4000 rotations/min, 4 °C, 15 min),上清液用于测定 TAC,并严格按照试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书进行操作。用考马斯亮兰 G-250 法定量组织中总蛋白。

## 2.5 DNA 单链断裂的检测

采用碱性单细胞凝胶电泳技术进行测定。在 Hartmanne 等<sup>[2]</sup>描述的方法基础上稍作改动,制备单细胞悬浮液并调节每张载玻片的细胞数为  $10^3$ — $10^4$  个;在含高离子浓度去污剂裂解液中裂解 2 h;碱性条件下解旋 20 min,电泳 30 min(300 mA, 25 V);0.4 mol/l 三羟甲基氨基甲烷(Tris, pH 值为 7.5)中和。以上操作在低温、弱光下进行。从每张

片子上随机挑选 50 个细胞,用 Image-Pro Plus 5.0 专业图像分析软件检测 DNA 尾部迁移距离。

## 2.6 细胞凋亡率分析

将新鲜组织用眼科剪尽量剪碎,用 200 目筛过滤。PBS 洗涤两次后用 75%冷乙醇在 4 °C 冰箱固定 24 h 以上。离心除去固定液,加碘化丙啶(PI)染色液 0.5 ml(含 0.3 mg/ml RNAase, 20 g/ml PI),常温避光染色 30 min 后, FASCan 型流式细胞仪(美国)检测,激发光波长为 488 nm,每个样品测定 10000 个细胞。采用分析软件 FlowJo 7.1 计算出凋亡细胞的百分比。

## 3 结果

### 3.1 NAC 及 ALCAR 对受照小鼠肝组织中 TAC 的影响

如图 1 所示,与正常对照组相比, $^{12}\text{C}^{6+}$ 照射显著地降低了小鼠肝组织中 TAC 的活性( $P < 0.001$ )。与单纯照射组相比,预先给予 NAC 和 ALCAR 明显地提高了小鼠肝组织的 TAC 程度( $P < 0.001$ ),但在 ALCAR 用药组中 TAC 略高于 NAC 用药组( $P > 0.05$ )。而仅给予 NAC 和 ALCAR 组肝组织中 TAC 的变化与正常对照组间没有显著性的统计学差异,表明 NAC 和 ALCAR 本身不造成正常小鼠肝组织中抗氧化能力的明显变化。

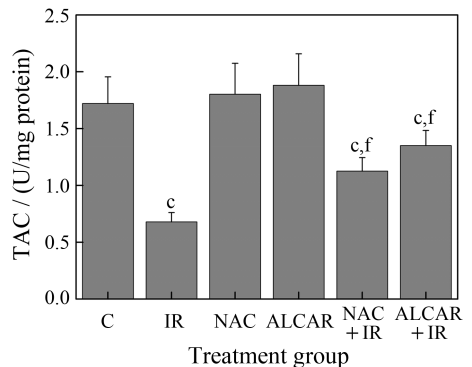


图 1 NAC 及 ALCAR 对 C 离子辐照后小鼠肝组织中 TAC 的影响

c 与对照组相比,  $P < 0.001$ ; 与单纯照射组相比,  $f P < 0.001$ 。

### 3.2 NAC 及 ALCAR 对受照小鼠肝组织中 DNA 单链断裂的影响

图 2 显示,与正常对照组相比, $^{12}\text{C}^{6+}$ 照射显著地诱导了小鼠肝细胞 DNA 单链断裂比例的增高( $P$

<0.001)。在 NAC 预防组中 DNA 单链的断裂程度与正常对照相比仍有显著性的差异 ( $P < 0.05$ )，但 NAC 的使用极其显著地降低了肝组织 ( $P < 0.001$ ) 中由  $^{12}\text{C}^{6+}$  离子诱导的 DNA 单链断裂。与单独照射组相比，ALCAR 的使用极其显著地抑制了 DNA 单链断裂 ( $P < 0.001$ )，而且与 NAC 预防组

相比，ALCAR 对 DNA 单链的保护作用更为明显 ( $P < 0.05$ )。此外，在单纯使用 NAC 和 ALCAR 组中，DNA 的变化与正常对照组中没有统计学差异，表明 NAC 及 ALCAR 本身不造成肝细胞中 DNA 的单链断裂。

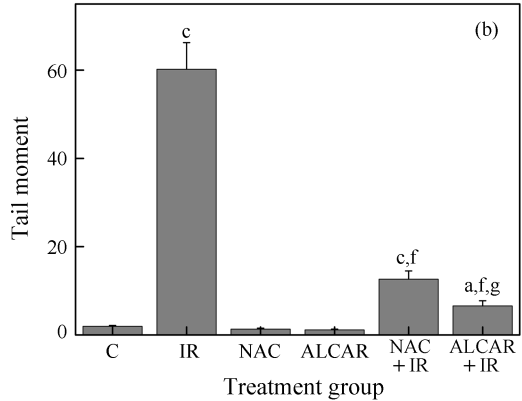
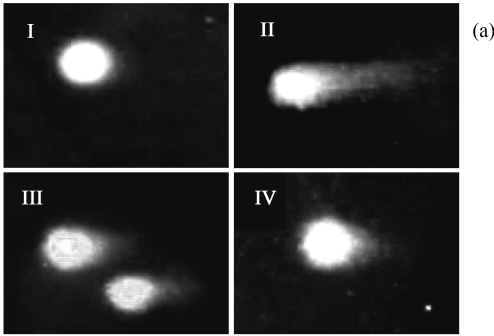


图 2 NAC 及 ALCAR 对受照小鼠肝组织中 DNA 单链断裂的影响

(a) I 正常对照组, II 单纯照射组, III NAC 预防组, IV ALCAR 预防组; (b) 与对照组相比, a)  $P < 0.05$ , c)  $P < 0.001$ ; 与单纯照射组相比, f)  $P < 0.001$ ; 两药物处理组间相比, g)  $P < 0.05$ 。

### 3.3 NAC 及 ALCAR 对受照小鼠肝组织中细胞凋亡的影响

如图 3 所示，在小鼠的肝组织中， $^{12}\text{C}^{6+}$  照射组中的细胞凋亡百分比与正常对照组的相比有极其明显的增高 ( $P < 0.001$ )。而给予 NAC 和 ALCAR 均极其显著地降低了肝组织中由  $^{12}\text{C}^{6+}$  离子诱导的细胞凋亡百分比 ( $P < 0.001$ )，而且 ALCAR 较 NAC 抑制肝细胞凋亡的能力更强 ( $P < 0.01$ )。此外，NAC

及 ALCAR 单独用药组中细胞凋亡百分比的变化与正常对照组中没有显著性差异，表明 NAC 及 ALCAR 本身并不造成肝细胞凋亡。

## 4 讨论

随着空间辐射生物学的不断发展，重离子作为对宇航员威胁最大的宇宙射线之一，已经成为评估人类空间飞行辐射危险的重要对象<sup>[8]</sup>。此外，在重离子治疗癌症的过程中，离子通路上的低剂量能量沉积对正常组织的损伤仍不可忽略。大量的研究结果证实，重离子束可导致正常机体细胞 DNA 单、双链断裂<sup>[9, 10]</sup>、染色体畸变<sup>[11]</sup>、不可逆的细胞毒性损伤<sup>[7]</sup>以及生命周期缩短等。本实验表明，4 Gy  $^{12}\text{C}^{6+}$  照射导致了小鼠肝组织中总的抗氧化能力的下降，这说明小鼠体内氧化还原状态出现了紊乱，而且机体的应激抗氧化防御体系难以维持体内平衡的氧化还原状态，从而可能会致使大量自由基在体内积累。另外，在本实验中， $^{12}\text{C}^{6+}$  离子辐照也直接或间接地诱导了小鼠肝细胞的 DNA 链断裂及凋亡。在前期的研究中，还发现了 C 重离子对小鼠生殖细胞周期的干扰、对小鼠免疫系统的破坏以及对小鼠空间记忆的影响等损伤毒害效应，这些结论也

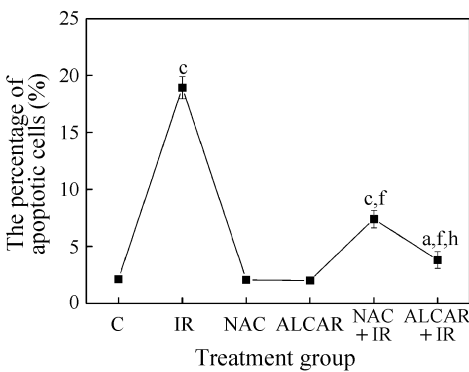


图 3 NAC 及 ALCAR 对受照小鼠肝组织中细胞凋亡的影响 (%， $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

与对照组相比, a)  $P < 0.05$ , c)  $P < 0.001$ ; 与单纯照射组相比, f)  $P < 0.001$ ; 两药物处理组间相比, h)  $P < 0.01$ 。

提示人们关注对重离子辐照防护研究的必要性。

NAC 的抗辐射作用目前大多以离体实验为基础, 以传统的中子、X 射线以及  $\gamma$  射线等为研究对象, 针对重离子开展的研究、信息甚少。为此本实验探讨了 NAC 抗 C 离子辐射的保护效应。实验结果显示, NAC 提高了机体组织内的抗氧化能力, 从而改善了辐照所致的脂质过氧化损伤, 抑制了 C 离子辐照产生的基因毒性, 维护机体 DNA 免受或减缓损伤, 也有效地阻止了 C 离子辐照导致的机体细胞凋亡。

ALCAR 作为左旋肉毒碱的一种天然形态, 是存在于体内的一种自然物质, 在人体内参与一系列重要的代谢反应, 包括参与三磷酸腺苷供能<sup>[12]</sup>、保持线粒体内乙酰 CoA/CoA 比值稳定<sup>[13]</sup>、发挥次级抗氧化防御屏障作用<sup>[14]</sup>、从而维持膜和细胞的稳定性<sup>[15]</sup>。实验结果表明, ALCAR 通过增加肝组织内的 TAC、减轻 DNA 断裂和细胞凋亡的方式从而达到对 C 离子所致损伤的作用。

在本实验中, 就 NAC 和 ALCAR 对 C 重离子辐照的防护效果而言, ALCAR 抗重离子损伤的能力显著地高于 NAC 的。本实验结果表明, NAC 和 ALCAR 都显著地提高了肝组织的抗氧化能力, 而且两者之间并无统计学差异。在以往的研究中发现, ALCAR 作为线粒体营养素能够刺激产生三磷酸腺苷, 从而减轻了由线粒体功能障碍引起的细胞凋亡<sup>[16]</sup>。此外, ALCAR 还可增强 DNA 的修复功能<sup>[17]</sup>。因此, 本文推测 ALCAR 的抗重离子辐射能力强于 NAC 的原因可能在于 ALCAR 在清除自由基, 防止机体氧化损伤的基础之上, 亦启动了其他重要的修复途径。

综合上述结论, NAC 和 ALCAR 通过抵御肝组织内的氧化胁迫, 阻止肝细胞 DNA 单链的断裂和凋亡, 均能有效地抵御 C 重离子诱导的肝组织损伤。因此, 本文认为 ALCAR 和 NAC 可能成为有潜力、有希望的抗 C 重离子辐射药物。

## 参考文献 (References):

- [1] O'Malley Y Q, Reszka K J, Spitz D R, *et al.* American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology, 2004, (287): 94.
- [2] Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, *et al.* Mutagenesis, 2004, **19**(1): 51.
- [3] Yamasoba T, Someya S, Yamada C, *et al.* Hearing Research, 2007, **226**(1-2): 185.
- [4] Blakely E A, Chang P Y. Advances in Space Research, 2007, **40**(9): 1307.
- [5] Ballarini F, Alloni D, Facchetti A, *et al.* Advances in Space Research, 2007, **40**(9): 1392.
- [6] Liu Y, Zhang H, Zhang L W, *et al.* European Journal of Pharmacology, 2007, **575**(1-3): 142.
- [7] Ohsawa M, Miyata S, Carlsson A, *et al.* European Journal of Pharmacology, 2008, **588**(2-3): 213.
- [8] Durante M, Kronenberg A. Advances in Space Research, 2003, **35**(2): 180.
- [9] Giustranti C, Rousset S, Balanzat E. Biochimie, 2008, **82**(1): 79.
- [10] Wada S, Kobavashi Y, Funayama T, *et al.* Journal of Radiation Research, 2002, Suppl: s153.
- [11] Zhang H, Duan X, Yuan Z G, *et al.* Mutation Research, 2006, **595**(1-2): 37.
- [12] Sayed-Anmed M M, Mansour H H, Gharib O A, *et al.* Journal of the Egyptian National Cancer Institute, 2004, **16**(4): 237.
- [13] Calabrese V, Scapagnini C, Catalano F, *et al.* Neurochemical Research, 2001, **26**(2): 167.
- [14] Adriani W, Rea M, Baviera M, *et al.* Psychopharma, 2004, **176**: 296.
- [15] Mollica M P, Iossa S, Soboll S, *et al.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2001, **58**: 477.
- [16] Pillich R T, Scarsella G, Risuleo G. Experimental Cell Research, 2008, **306**(1): 1.
- [17] Hagen T M, Weher C M, Ames B N. Annals of the New York Academy of Sciences, 1998, **85**: 214.

# Response of Two Protective Agents to Acute Injury Induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ Ions in Mouse Liver<sup>\*</sup>

ZHANG Lu-wei<sup>1, 2, 3</sup>, ZHANG Hong<sup>1, 2, 3, #</sup>, LIU Yang<sup>1, 2, 3, 4</sup>, HAO Ji-fang<sup>1</sup>, ZHAO Wei-ping<sup>1, 2, 3</sup>

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2 *Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China;*

3 *Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

4 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)*

**Abstract:** The present study was to evaluate the effect and mechanism of N-acetylcysteine(NAC) and Acetyl-L-Carnitine hydrochloride(ALCAR) against  $^{12}\text{C}^{6+}$  ion beams on acute injury in the mouse liver. Pretreated with NAC (100 mg/kg) and ALCAR(100 mg/kg), Kun-Ming mice were exposed to whole-body irradiation with the dose of 4 Gy. Mice were killed 2 h after irradiation, and then the liver tissues were quickly removed. TAC was measured by using chemical reagent kits, and DNA-single strand breaks were determined by single cell gel electrophoresis, and the percentage of cell apoptosis were assayed by flow cytometry method. The results showed that NAC and ALCAR pretreatment significantly enhanced TAC( $P < 0.001$ ), alleviated DNA-single strand breaks( $P < 0.001$ ) and cell apoptosis( $P < 0.001$ ) of the liver tissues. Moreover, ALCAR-mediated radioprotection induced by  $^{12}\text{C}^{6+}$  ions is stronger than that of NAC ( $P < 0.05$ ). The data suggests that NAC and ALCAR both can ameliorate acute injury caused by  $^{12}\text{C}^{6+}$  ions in mice. In this study, NAC and ALCAR exert their radioprotective effect by virtue of resisting oxidative stress, enhancing TAC, alleviating DNA-single strand breaks as well as cell apoptosis. Furthermore, the data imply that NAC and ALCAR may be suitable and promising as radioprotective drug against carbon heavy ions.

**Key words:** N-acetylcysteine; Acetyl-L-Carnitine hydrochloride;  $^{12}\text{C}^{6+}$  ion; mouse; radioprotection

\* **Received date:** 3 Jul. 2009; **Revised date:** 10 Oct. 2009

\* **Foundation item:** Major State Basic Research Development Program (973 Program) of China (2010CB834202); Key Project of National Natural Science Foundation of China(10835011); Key Scientific Technology Research Project of Gansu Province (0702NKDA045, 0801NKDA001); Scientific Technology Research Project of Lanzhou-Chinese Academy of Sciences (07-2-07)

# **Corresponding author:** Zhang Hong, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn