

扇贝多肽对 ^{60}Co 辐射损伤小鼠的保护作用 Δ 苗千里¹, 朱莉², 陈雪红³, 韩彦波³, 王跃军⁴, 孙谧⁴, 杜卫³, 王春波^{3*}

(1. 解放军 404 医院, 山东 威海, 264200; 2. 青岛大学医学院附属医院, 山东 青岛, 266003;

3. 青岛大学医学院, 山东 青岛, 266003; 4. 中国水产研究院黄海水产研究所, 山东 青岛, 266005)

摘要: 采用生物化学方法研讨扇贝多肽(PCF)对小鼠 ^{60}Co 辐射损伤的保护作用。结果表明, PCF 能显著升高 ^{60}Co 辐射小鼠胸腺系数和脾系数; 提高组织匀浆中 SOD 和 GSH-Px 活性, 降低 ROS 和 MDA 含量, 同时提高总抗氧化能力, 且 PCF 的作用呈剂量依赖性。提示 PCF 具有一定的抗辐射作用, 这可能与其抗氧化及能提高机体免疫功能有关。

关键词: 扇贝多肽; ^{60}Co 辐射; 小鼠; 抗氧化

中图分类号: R931.74 R979.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-3461(2005)01-0028-05

Protective effects of polypeptides from *Chlamys farreri* on mice irradiated by ^{60}Co γ -rayMIAO Qian-li¹, ZHU Li², CHEN Xue-hong³, HAN Yan-tao³, WANG Yue-jun⁴, SUN Mi⁴, DU Wei³, WANG Chun-bo³

(1. The 404th Hospital of PLA, Weihai 264200, China; 2. The Affiliate Hospital of Qingdao Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China; 3. Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, China; 4. Yellow Sea Fisheries Reserch Institute, Qingdao 266071, China)

Abstract: Polypeptide from *Chlamys farreri* (PCF) have showed protective effect on mice irradiated by ^{60}Co γ -ray *in vivo*. In present study, the changes of the antioxidative enzyme activities, lipid peroxidation and total antioxidative capacity (T-AOC) in different organs of mice after ^{60}Co irradiation were detected by using biochemical methods. Increased endogenous peroxidation and decreased contents of T-AOC as well as decreased activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were observed after ^{60}Co irradiated mice. Intraperitoneal administration of PCF significantly increased the spleen and thymus indices, decreased the lipid peroxidation, increased T-AOC and the activities of SOD and GSH-Px in all organs tested in ^{60}Co irradiated mice.

Key words: polypeptide from *Chlamys farreri*; ^{60}Co radiation; mice; antioxidation

扇贝多肽(polypeptide from *Chlamys farreri*, PCF)是近年来从栉孔扇贝中提取的一种具有生物活性的水溶性八肽。初步研

究表明, 该多肽具有抗氧化活性, 能清除羟自由基和超氧阴离子, 有延缓皮肤自然老化的作用^[1]; 抑制紫外线辐射损伤的 Hela 细胞^[2]

Δ 青岛市科技局资助项目(No. 04-2-HH-69)

* 通讯作者: Tel: 0532-2991202, Fax: 0532-2991009; E-mail: cbwang666@126.com.cn

和人表皮成纤维细胞凋亡^[3];可明显减轻 UVA、UVB 对小鼠皮肤的损伤作用^[4,5];提高免疫细胞活性,对紫外线及⁶⁰Co 辐射损伤的免疫细胞有保护作用^[6,7]。本课题以⁶⁰Co 射线照射小鼠造成损伤模型,研究 PCF 对动物的抗⁶⁰Co 辐射作用。

1 材料和方法

1.1 材料

扇贝多肽:纯度>96%,课题组用 HPLC 分离提纯,Mr=879,去离子水配制成 20% 的母液,过滤除菌,4℃ 保存备用。

1.2 试剂

蛋白、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总抗氧化能力(T-AOC)、活性氧(ROS)检测试剂盒(南京建成生物工程公司)。尼尔雌醇(山东新华制药有限公司)。

1.3 实验用动物:

雄性昆明种小鼠(18~20g), (河南省实验动物中心,动物编号:医动字第 41026)。

1.4 实验方法

1.4.1 分组设计:小鼠在标准室温(24℃)和湿度(60%)条件下饲养 7d 后,随机分 6 个组(每组 10 只):对照组,⁶⁰Co 模型组,PCF 组(包括 1,0.1,0.01g·kg⁻¹3 个剂量组,腹腔注射给药)和尼尔雌醇阳性对照组(灌胃剂量为 2mg·kg⁻¹)。对照组和⁶⁰Co 模型组小鼠给予生理盐水 20mL·kg⁻¹。每日 1 次,连续给药 1 个月后,除对照组外,其它各组均以 FCC-7000 型同中心回旋式⁶⁰Co 治疗仪单次全身均匀照射,强度为 6Gy,剂量率为 0.65Gy·min⁻¹。照射后继续给药,剂量同前,3 天后进行实验。

1.4.2 实验项目和指标检测

1.4.2.1 全血细胞分析仪计数小鼠外周血白细胞

各组小鼠眼眶取血,血液以 EDTA-2Na

小鼠处死后取其胸腺和脾脏,称重,计算胸腺系数和脾脏系数。

1.4.2.3 透射电镜观察小鼠胸腺细胞超微结构的改变

将胸腺组织用 1% 锇酸后固定 30min。PBS 洗涤后入梯度乙醇脱水,Epon-812 包埋。作超薄切片,铀和铅双重染色,透射电镜观察胸腺细胞超微结构的改变。

1.4.2.4 按检验试剂盒内说明测定小鼠脑、胸腺、肝、脾、肺组织中 SOD,GSH-Px 活性,MDA,ROS 含量及 T-AOC。

1.4.2.5 油镜下检测小鼠骨髓细胞微核率

股骨涂片,甲醇固定,Giemsa 染色,每只小鼠计数 1 000 个嗜多染红细胞中的微核数,并计算出微核率。

1.4.2.6 油镜下检测小鼠骨髓细胞染色体畸变率

秋水仙素注射到小鼠腹腔,处死后股骨涂片,甲醇固定,Giemsa 染色,每只小鼠观察 100 个细胞中期分裂相并记录染色体畸变数目,以百分率(%)表示。

1.5 统计分析

SPSS 软件对结果进行单因素方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 PCF 对⁶⁰Co 辐射小鼠的胸腺、脾脏系数的影响

⁶⁰Co 射线辐射后小鼠的胸腺、脾脏系数均低于对照组(见表 1)。

表 1 PCF 对⁶⁰Co 辐射小鼠胸腺、脾脏系数的影响
($\bar{x} \pm s$, mg·g⁻¹)

组别	胸腺系数	脾脏系数
对照组	37.01±4.60	55.03±9.25
⁶⁰ Co 模型组	8.16±5.02##	13.58±7.62##
小剂量 PCF 组	14.21±3.21*	25.12±3.25**
中剂量 PCF 组	20.03±4.02**	35.68±2.57**
大剂量 PCF 组	31.45±3.14**	46.58±5.54**
尼尔雌醇组	12.28±2.04**	16.78±1.67**

2.2 PCF 对⁶⁰Co 辐射小鼠外周血白细胞总数的影响

⁶⁰Co 单次照射后第 3 天,血液中的白细胞数量明显下降,由正常的 11278 ± 2456 个/ mm^3 降为 740 ± 102 个/ mm^3 ($P < 0.01$)。PCF 各用药组的白细胞和⁶⁰Co 模型组小鼠的白细胞相比较,差异无统计学意义。

2.3 PCF 对⁶⁰Co 辐射小鼠不同脏器的

SOD、GSH-Px、T-AOC、MDA、ROS 的影响

⁶⁰Co 模型组小鼠的脑、胸腺、脾、肝和肺的 SOD、GSH-Px 活性及 T-AOC 明显降低,而 MDA、ROS 含量则明显升高,与对照组比较,差异显著。各 PCF 组小鼠各组织中 SOD、GSH-Px 活性及 T-AOC 随 PCF 剂量的增高而增高,MDA、ROS 含量则随 PCF 剂量的增高而下降(见表 2、3、4、5、6)。

表 2 PCF 对⁶⁰Co 辐射小鼠后脑组织中 SOD、GSH-Px、T-AOC、MDA、ROS 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)	GSH-Px ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)	T-AOC ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)	MDA ($\text{mol} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$)	ROS ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)
对照组	71.24 ± 6.32	284.39 ± 8.54	2.64 ± 0.12	4.02 ± 0.78	401.25 ± 12.33
⁶⁰ Co 模型组	52.31 ± 5.32	$128.97 \pm 11.23^{**}$	$0.98 \pm 1.11^{\#}$	$10.25 \pm 0.63^{**}$	$505.24 \pm 17.25^{**}$
小剂量 PCF 组	$72.42 \pm 2.35^*$	$214.25 \pm 4.25^{**}$	$2.87 \pm 1.47^{**}$	$5.54 \pm 0.08^{**}$	$422.28 \pm 19.82^*$
中剂量 PCF 组	$83.17 \pm 3.54^{**}$	$298.34 \pm 10.14^{**}$	$7.58 \pm 2.14^{**}$	$3.92 \pm 0.01^{**}$	$356.04 \pm 18.00^*$
大剂量 PCF 组	$132.25 \pm 8.35^{***}$	$345.61 \pm 11.15^{**}$	$12.30 \pm 3.20^{**}$	$2.54 \pm 0.02^{**}$	$303.01 \pm 15.03^*$
尼尔雌醇组	$70.58 \pm 1.61^*$	$289.63 \pm 10.17^*$	$121.00 \pm 0.02^*$	$9.96 \pm 0.52^*$	$498.87 \pm 18.57^*$

表 3 PCF 对⁶⁰Co 辐射小鼠后胸腺组织中 SOD、GSH-Px、T-AOC、MDA、ROS 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)	GSH-Px ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)	T-AOC ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)	MDA ($\text{mol} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$)	ROS ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)
对照组	69.42 ± 3.69	271.22 ± 9.63	3.01 ± 0.97	5.06 ± 1.20	389.00 ± 13.20
⁶⁰ Co 模型组	$50.25 \pm 2.64^{\#}$	$135.24 \pm 8.74^{**}$	$1.25 \pm 0.05^{\#}$	$8.79 \pm 0.06^{**}$	$476.96 \pm 15.48^{**}$
小剂量 PCF 组	$68.36 \pm 5.24^*$	$235.04 \pm 8.65^{**}$	$2.81 \pm 0.05^{**}$	$4.52 \pm 0.25^{**}$	$389.25 \pm 8.00^*$
中剂量 PCF 组	$79.85 \pm 5.68^{**}$	$310.02 \pm 12.404^{**}$	$3.68 \pm 0.00^{**}$	$4.02 \pm 0.07^{**}$	$372.54 \pm 18.20^*$
大剂量 PCF 组	$85.14 \pm 2.71^{**}$	$345.68 \pm 16.39^{**}$	$4.07 \pm 0.06^{**}$	$3.52 \pm 0.10^{**}$	$342.98 \pm 13.01^*$
尼尔雌醇组	$49.69 \pm 2.06^*$	$155.63 \pm 11.47^*$	$121.00 \pm 0.08^*$	$8.79 \pm 1.21^*$	$486.26 \pm 19.64^*$

表 4 PCF 对⁶⁰Co 辐射小鼠后肝组织中 SOD、GSH-Px、T-AOC、MDA、ROS 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)	GSH-Px ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)	T-AOC ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)	MDA ($\text{mol} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$)	ROS ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)
对照组	89.3 ± 0.35	312.10 ± 3.75	4.05 ± 0.03	3.94 ± 0.25	394.32 ± 15.64
⁶⁰ Co 模型组	$62.35 \pm 0.21^{\#}$	$159.36 \pm 7.21^{**}$	$1.27 \pm 0.55^{\#}$	$11.9 \pm 0.10^{**}$	$632.11 \pm 7.01^{**}$
小剂量 PCF 组	$78.52 \pm 9.24^*$	$300.53 \pm 12.78^{**}$	$3.94 \pm 12.31^{**}$	$3.09 \pm 0.07^{**}$	$417.52 \pm 12.08^*$
中剂量 PCF 组	$100.01 \pm 11.05^{**}$	$358.99 \pm 11.25^{**}$	$4.35 \pm 0.80^{**}$	$2.54 \pm 0.16^{**}$	$365.20 \pm 10.25^*$
大剂量 PCF 组	$178.36 \pm 9.36^{**}$	$400.35 \pm 18.25^{**}$	$4.99 \pm 0.18^{**}$	$1.65 \pm 0.03^{**}$	$325.01 \pm 13.24^*$
尼尔雌醇组	$63.90 \pm 0.87^*$	$168.60 \pm 6.07^*$	$1.40 \pm 0.01^*$	$12.10 \pm 1.32^*$	$640.11 \pm 7.98^*$

表 5 PCF 对⁶⁰Co 辐射小鼠后脾组织中 SOD, GSH-Px, T-AOC, MDA, ROS 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD (kU · g ⁻¹)	GSH-Px (kU · g ⁻¹)	T-AOC (kU · g ⁻¹)	MDA (mol · L ⁻¹ · g ⁻¹)	ROS (kU · g ⁻¹)
对照组	66.30 ± 0.32	285.39 ± 7.28	2.66 ± 0.09	4.36 ± 1.00	399.65 ± 10.20
⁶⁰ Co 模型组	46.38 ± 1.98 [#]	143.69 ± 14.20 ^{##}	1.02 ± 0.98 [#]	13.65 ± 1.02 ^{##}	521.30 ± 11.02 ^{##}
小剂量 PCF 组	50.68 ± 2.14 [*]	224.63 ± 7.89 ^{**}	2.56 ± 1.12 ^{**}	7.21 ± 0.51 ^{**}	400.30 ± 2.35 [*]
中剂量 PCF 组	77.24 ± 1.20 ^{**}	284.32 ± 11.40 ^{**}	3.02 ± 0.68 ^{**}	5.98 ± 1.03 ^{**}	365.24 ± 8.95 [*]
大剂量 PCF 组	88.21 ± 3.11 ^{**}	325.14 ± 10.02 ^{**}	3.98 ± 0.05 ^{**}	3.12 ± 1.40 ^{**}	301.28 ± 9.00 [*]
尼尔雌醇组	47.36 ± 0.52 [*]	150.24 ± 8.90 [*]	0.89 ± 0.12 [*]	13.32 ± 0.65 [*]	536.32 ± 12.37 [*]

表 6 PCF 对⁶⁰Co 辐射小鼠后脾组织中 SOD, GSH-Px, T-AOC, MDA, ROS 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD (kU · g ⁻¹)	GSH-Px (kU · g ⁻¹)	T-AOC (kU · g ⁻¹)	MDA (mol · L ⁻¹ · g ⁻¹)	ROS (kU · g ⁻¹)
对照组	80.30 ± 1.25	299.30 ± 6.32	2.52 ± 0.04	4.22 ± 0.25	399.32 ± 20.10
⁶⁰ Co 模型组	61.20 ± 1.47 [#]	158.64 ± 9.65 ^{##}	1.11 ± 0.08 [#]	11.30 ± 0.23 ^{##}	525.51 ± 13.96 ^{##}
小剂量 PCF 组	73.32 ± 6.21 [*]	279.32 ± 11.02 ^{**}	2.79 ± 0.09 ^{**}	7.35 ± 0.16 ^{**}	400.57 ± 12.05 [*]
中剂量 PCF 组	86.22 ± 2.05 ^{**}	312.17 ± 10.22 ^{**}	4.00 ± 0.24 ^{**}	4.02 ± 0.78 ^{**}	350.64 ± 10.10 [*]
大剂量 PCF 组	131.21 ± 6.04 ^{**}	365.48 ± 12.31 ^{**}	10.11 ± 1.20 ^{**}	2.98 ± 1.74 ^{**}	298.36 ± 12.80 [*]
尼尔雌醇组	62.30 ± 0.98 [*]	170.23 ± 6.38 [*]	0.98 ± 0.01 [*]	12.00 ± 0.35 [*]	526.30 ± 19.54 [*]

2.4 PCF 对⁶⁰Co 辐射后小鼠骨髓细胞微核的影响

高于对照组, 差异非常显著。PCF 组小鼠骨髓细胞的微核率同模型组比较, 差异无统计学意义(见表 7)。

⁶⁰Co 模型组小鼠骨髓细胞的微核率明显

表 7 PCF 对⁶⁰Co 辐射后小鼠骨髓细胞微核的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	对照组	⁶⁰ Co 模型组	小剂量 PCF 组	中剂量 PCF 组	大剂量 PCF 组	尼尔雌醇组
微核率	1.2 ± 0.04	20.2 ± 0.36 ^{##}	19.65 ± 1.10 ^{##}	19.87 ± 0.21 ^{##}	20.02 ± 1.20 ^{##}	19.85 ± 0.31 ^{##}

2.5 PCF 对⁶⁰Co 辐射后小鼠骨髓细胞染色体畸变的影响

变率明显高于对照组, 差异非常显著。PCF 组小鼠骨髓细胞的染色体畸变率同模型组比较, 差异无统计学意义(见表 8)。

⁶⁰Co 模型组小鼠骨髓细胞的染色体畸

表 8 PCF 对⁶⁰Co 辐射后小鼠骨髓细胞染色体畸变的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	对照组	⁶⁰ Co 模型组	小剂量 PCF 组	中剂量 PCF 组	大剂量 PCF 组	尼尔雌醇组
畸变率	1.7 ± 0.67	42.5 ± 6.87 ^{##}	39.12 ± 1.58 ^{##}	39.24 ± 0.56 ^{##}	41.02 ± 1.32 ^{##}	39.42 ± 0.72 ^{##}

3 讨论

长期过量的辐射将导致机体产生一系列损伤, 包括氧化应激损伤, 造血系统的功能异常, 免疫功能障碍及细胞 DNA 链断裂、基因突变、染色体重组、细胞转化和细胞死亡

等^[8,9]。辐射可通过多种因素诱导细胞凋亡, ⁶⁰Co 辐射机体能产生大量的自由基和活性氧(ROS), 从而启动组织细胞的脂质过氧化, 使 MDA 含量升高, 进而加重细胞的损伤^[10]; 辐射也可使组织细胞的 SOD、GSH-

Px 活性降低,使细胞的总抗氧化能力降低^[11]。本研究探讨了扇贝多肽对⁶⁰Co 辐射小鼠胞、胸腺、肝脏、脾脏和肺抗氧化系统的影响,检测结果显示:PCF 可提高上述组织中 SOD、GSH-Px 活性和 T-AOC,降低 MDA 和 ROS 的含量。提示 PCF 能抑制⁶⁰Co γ -射线诱导的脂质过氧化反应和自由基的产生,提高组织细胞的抗氧化酶活性,从而减轻了⁶⁰Co 辐射所致的氧化损伤。淋巴细胞是对辐射最敏感的细胞群体之一^[12],PFC 可使胸腺、脾脏系数升高,提示 PFC 可抗⁶⁰Co 辐射而保护胸腺和脾脏,可提高肿瘤化疗患者的免疫力。

辐射对血液和骨髓造血系统的影响是放射生物学研究的一个十分重要的领域。但 PFC 并不能抑制⁶⁰Co 辐射所致的白细胞总数下降,对辐射引起的造血系统损伤没有保护作用。微核实验是诊断辐射损伤的重要生物学指标和诊断依据^[13],但 PFC 不能对抗⁶⁰Co γ -射线的致微核和染色体畸变作用,这可能与照射剂量及动物种属有关。

参考文献

- [1] Packer G, Ashmun RA, Cleveland. Cytokines suppress apoptosis independent of increases in reactive oxygen levels [J]. *Immunol*, 1996, 156: 2792.
- [2] Sies H, Sharov VS, Klotz LO, et al. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite mediated oxidations [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 27812.
- [3] Ding BX, Wang CB. Inhibitory effect of polypeptide

from *Chlamys farreri* on UVB-induced apoptosis and DNA damage in normal human dermal fibroblasts *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003; 24(10): 1096.

- [4] Wang CB, Yao RY, Liu ZT, et al. Protective effects of polypeptide from *Chlamys farreri* on hairless mice damaged by ultraviolet A [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002; 23: 813.

- [5] Wang CB, Ding BX, Guo SB. Polypeptide from *Chlamys farreri* protects mitochondria in human dermal fibroblasts irradiated by ultraviolet B *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003; 24(7): 692.

- [6] 刘晓萍,王玉贞,韩彦强.扇贝多肽在体外对免疫细胞活性的影响及其抗紫外线的氧化损伤作用[J]. *海洋与湖沼*, 2001; 32(4): 414.

- [7] 王玉贞,刘晓萍,姚如水.扇贝多肽对⁶⁰Co 辐射损伤的胸腺细胞影响作用的研究[J]. *中国海洋药物*, 2001; 20(6): 20.

- [8] 夏寿萱.放射生物学[M].北京:军事医学科学出版社, 1998: 2.

- [9] Omar BA, Floers SC, McCord JM. Superoxidase dismutase: pharmacological developments and applications [J]. *Adv Pharmacol*, 1992, 23: 109.

- [10] 蒋建伟,严玉霞,杨红.甲酸铜对辐射损伤的抑制作用[J]. *暨南大学学报*, 1999, 20(4): 10.

- [11] Wong YC, Wang XP, Lu YC, et al. Microdetermination of lipid peroxidation in cells and cell membrane [J]. *J Cytobiol*, 1985, 7: 142.

- [12] Boonstra A, Savelkoul H. The role of cytokines in ultraviolet-B induced immunosuppression [J]. *Eur Cytokine Netw*, 1997, 8(2): 117.

- [13] 张清林.人淋巴细胞微核实验进展[J]. *国外医学卫生学分册*, 1991, 4: 211.

(收稿日期: 2004-07-15)

欢迎订阅《中国海洋药物》杂志