

微波对小白鼠超氧化物歧化酶和 脂质过氧化物的影响

梁明山

张文艳

(四川大学生物系 成都 610064)

(昆明医学生物研究所)

摘要 低剂量(915兆赫)的微波照射小白鼠后,用NBT光化还原法测知脾脏的SOD活性降低;聚丙烯酰胺凝胶电泳PAGE测知SOD的电泳图谱发生了变化;脂质过氧化物增加。经恢复饲养,SOD的活性持续下降,脂质过氧化物含量持续增高,但降低和增加的趋势于第11天后趋于稳定,而SOD的电泳图谱却不能恢复到对照水平。本研究表明低剂量的微波照射对小白鼠的SOD具有明显的损伤作用,并使有害于机体的脂质过氧化物增加。

关键词 小白鼠 微波照射 超氧化物歧化酶 脂质过氧化物

许多研究表明,电离辐射、紫外线等外界因素都能导致机体产生脂质过氧化物和自由基。曹锡清报道了脂质过氧化物能自发地或通过链式反应产生自由基,损伤机体^[1]。超氧化物歧化酶(SOD)的主要作用是清除超氧阴离子自由基($\cdot O_2^-$)和抑制脂质过氧化物的产生,从而对机体起保护作用。吕勇友和江汉保等人分别报道了微波能治疗肿瘤和用于雄性避孕^[2-3]。但机体经微波照射后,是否象电离辐射和紫外线一样会诱发脂质过氧化物生成,受照机体的SOD活性及电泳行为是否受到影响,国内未见报道。本文于1988年5—10月,对此进行了研究,目的为给微波的合理应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 昆明小白鼠,雄性,年龄10—12周,体重25—30克,健康,未交配。

将小白鼠分为5组,每组3只。A组为对照;B、C、D、E为照射组。照射方法与参考文献[4]相同。用圆型辐射仪在离小白鼠体表5cm距离下对每只进行整体均匀照射。微波频率:915兆赫,连续波,每次照射3分钟,照射后小白鼠的腹腔温度上升3.6—4.0℃(用热电偶测温计测量腹腔温度,精确度为 $\pm 0.3^\circ\text{C}$)。

共照射两次,每次间隔24小时。待第二次照射后,各照射组恢复饲养的天数如下: B组1天; C组5天; D组11天; E组16天。以上各组按实验要求的时间断颈处死后,在4℃分别取其脾脏,冰箱存放备用。

1.2 方法

1.2.1 SOD酶活测定 依照Beauchamp C. et al. [4]的NBT光化还原法进行,取备用脾脏,用0.9%NaCl液洗去污血后,计量各脾脏的重量。A组1.3克; B组1.3克; C组0.6克; D组1.3克; E组0.8克。在4℃条件下,以每克脾脏加入0.05mol/L, pH7.8磷酸缓冲液5ml,分别加入相应体积的此缓冲液,用Potter玻璃匀浆器于水浴中匀浆,离心(13000rpm, 4℃, 20min)。取上清液测定其SOD活性。

测定SOD酶活反应液的总体积为3ml,内含50mmol/L pH7.8磷酸缓冲液, 13mmol/L甲硫氨酸, 75 $\mu\text{mol/L}$ NBT, 100nmol/L EDTA, 200 μl 上清液, 2 $\mu\text{mol/L}$ 核黄素(最后加入)。混匀后,将反应管置于距4×8W荧光灯下30cm处照射20分钟后测定各反应管混合液的 $A_{560\text{nm}}$ 吸收值。空白对照除不含样品液外,其他组分与测定液相同。

1.2.2 SOD 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分析 制胶方法和电泳条件均按参考文献[4]方法进行,但染色条件稍有改变。电泳样品与测 SOD 活性样品相同。各组样品的点样量均为 $6\mu\text{l}$ (约 $50\mu\text{g}$ 蛋白质)。电泳结束后的凝胶板按以下次序进行 SOD 的活性染色。

首先将凝胶板浸泡在 $2.45 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ NBT 液中,在暗处浸泡 35 分钟后,转入含有 $2.8 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 四甲基乙二胺, $2.8 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 核黄素、 $3.6 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 磷酸缓冲液 (pH7.8)、 $1.0 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ KCN 的混合液中,在暗处继续浸泡 30 分钟。最后浸于含有 $1.0 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ EDTA、 $5 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 磷酸缓冲液 (pH7.8) 的混合液中、于距 $4 \times 8 \text{W}$ 荧光灯 30cm 处照射 30 分钟后观察显色结果。

1.2.3 脂质过氧化物的测定 按参考文献[5]方法测定脂质过氧化物。备用脾脏用 0.9%NaCl 洗去污血后,计量各组的重量;A 组 1.5 克、C 组 0.3 克、D 组 1.5 克、E 组 0.6 克。水浴中用 Pottor 玻璃匀浆器按 1.5 克样品加入 9ml 庚烷-异丙醇 (1:1 V/V) 混合液,分别匀浆并离心 (4°C , 4000g, 10 分钟)。将上清液转入刻度离心管中,分别加入 1/10 体积的蒸馏水,充分振荡后静置,待两相分层后吸取庚烷层,如此重复一次。于庚烷中分别加入 5 倍于庚烷体积的乙醇,混匀后测定其 $A_{233\text{nm}}$ 吸收值,用庚烷-异丙醇-乙醇 (1:1:5 V/V) 混合液作空白对照。

2 结果

SOD 酶活测定结果(见表 1)。

表 1 SOD 酶活的测定结果*

组别	A	B	C	D	E
$A_{560\text{nm}}$	0.065	0.100	0.144	0.183	0.183

* 三次测定的平均值

根据 NBT 光化还原法测定 SOD 酶活的原理, $A_{560\text{nm}}$ 吸收值越大,酶活越低(表 1)。结果表明,对照组 A 的酶活大于经微波照射、经

不同天数恢复饲养后的 B、C、D、E 组。照射组 SOD 酶活的降低是持续的,在恢复饲养到第 16 天其活性才达到稳定。

SOD 的 PAGE 分析结果(见图 1 和表 2)。

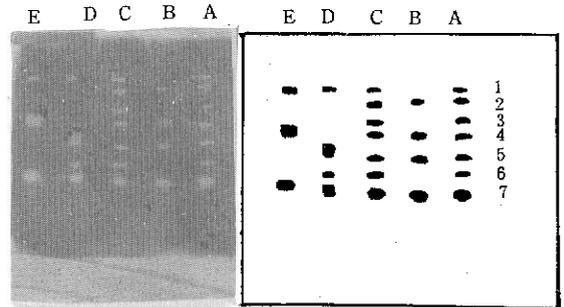


图 1 SOD 的 PAGE 图谱

表 2 SOD 的 PAGE 图谱酶带的 R_f 值

R_f 值 / 酶带	组别	A	B	C	D	E
1		0.470	0.470	0.470	0.470	0.470
2		0.540		0.540	0.540	
3		0.625	0.625	0.625	0.638	
4		0.710	0.710	0.720		0.736
5		0.687		0.790		
6		0.860		0.875		
7		0.900	0.900	0.886	0.884	0.884

照射组脾脏的脂质过氧化物的测定结果(见表 3)。结果表明,照射组的脂质过氧化物也呈明显的上升趋势,待恢复饲养到第 11 天后才基本达到稳定,但此时期内的共轭二烯的含量却是对照组的 12.85 倍。

3 讨论

微波是一种频率高,波长短,能量大、穿透力强的电磁波。小白鼠经微波照射时,体内产生自由基。自由基在体内不能马上猝灭,使多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化作用,导致受照射小白鼠脾脏内的脂质过氧化物显著增加。

表 3 脂质过氧化物的测定结果*

组 别	A	B	C	D	E
A_{233nm}	0.125	0.244	0.948	1.612	1.601
共轭二烯含量 $C = \frac{A_{233nm}}{e \cdot L}$ (克分子浓度)	5.68×10^{-7}	1.11×10^{-6}	4.31×10^{-6}	7.30×10^{-6}	7.30×10^{-6}

* 三次测定的平均值

微波还具有热效应,使受照射小白鼠体温升高 3.6—4.0℃。但 SOD 是一种对热稳定的酶, SOD 酶活性的显著降低,可认为不是由于体温的升高,而是由于微波照射致使小白鼠体内产生自由基的攻击,导致 SOD 酶蛋白结构损伤的结果,受照射小白鼠 SOD 的 PAGE 图谱的变化就是证明。受照射小白鼠在恢复饲养到第 5 天时,电泳图谱与对照一致,其机理有待进一步研究。照射组在第 5 天至第 11 天期间, SOD 的电泳图谱与对照组的电泳图谱又明显不同,我们认为可能是脂质过氧化物链式反应产生自由基有一个滞留时间,到第 5 天以后因链式反应产生大量的自由基,使 SOD 蛋白质结构遭到损害。本研究与 Beauchamp 等报道^[7]相符。

本研究表明,受微波照射小白鼠的脂质过氧化物和 SOD 的酶活,在恢复饲养达 11 天以后,达到了稳定状态。表明自由基清除剂 SOD 抑制脂质过氧化物的产生也达到了平衡状态,此时的机体虽然能生存,但却处于一种受损伤

状态。所以微波在医疗、男性节育等方面要能合理应用,还存在许多急待研究的问题,否则对人体健康会造成不良影响。

致谢 四川大学生物系动物教研室游育信老师提供实验动物;无线电系陈代珠老师为研究进行微波处理,特表谢意。

参 考 文 献

- 1 曹锡清, 脂质过氧化对细胞与机体的作用. 生物化学与生物物理进展, 1986, (2): 17—22.
- 2 江汉保, 任华翼, 陈代珠. 微波抑制生精作用的研究. 四川大学学报(自然科学版), 1979, (4): 56—78.
- 3 吕勇友. 微波辐射的细胞生物效应及其在肿瘤治疗中的作用. 生理科学进展, 1984, 15(1): 62—67.
- 4 Beauchamp C., I. Fridovich. Superoxide Dismutase Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Anal. Biochem.*, 1971, 44: 276—287.
- 5 奥列霍维奇等编著(苏)(袁厚积, 赵邦悌合译). 现代生物化学方法, 第 1 版. 北京: 人民出版社, 1980. 54—56.
- 6 梁明山, 谭卫东. 微波辐射整体小白鼠对肝脏 DNA 的影响. 四川大学学报(自然科学版), 1992, 29(4): 585—588.

EFFECTS OF MICROWAVE IRRADIATION ON SUPEROXIDE DISMUTASE AND LIPID PEROXIDE PRODUCTS IN MICE

LIANG Mingshan

(Department of Biology, Sichuan University Chengdu 610064)

ZHANG Wenyan

(Kunming Institute of Medical Science)

ABSTRACT In this experiment, the mice were irradiated by the low dose microwave, then we detected the activity of superoxide dismutase (SOD) in the spleen of the mice with NBT photoreduction

method. We discovered that SOD PAGE patterns changed and lipid peroxide products (LPO) increased. During the recovery process, the SOD activities decreased continuously, the LPO increased continuously, on the eleventh day after the irradiation, the changes have become stable. But the SOD PAGE patterns did not recover to control level. The results show the physiological and biochemical function of mice can be damaged by low dose microwave irradiation.

Key words Mice Microwave irradiation SOD Lipid peroxide products