

裸鼯鼠心脏对 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐射耐受的初步研究

李煜^{1*}, 刘尹航^{2*}, 陈超¹

(1. 海军军医大学基础医学院实验动物学教研室, 上海 200433;

2. 上海外国语大学附属中学, 上海 200083)

[摘要] 目的 观察和分析 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐射后裸鼯鼠心脏形态结构及组织生化指标变化, 初步研究裸鼯鼠心脏在 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐射耐受方面的特性。方法 裸鼯鼠经一次性10 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线全身辐照, 分别于辐照后7 d和14 d采集裸鼯鼠心脏, 制作石蜡切片, 经HE染色后, 光学显微镜下观察其心脏显微结构; 采用动物组织生化检测试剂盒检测心脏组织丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)等指标。结果 镜检显示, 辐照后裸鼯鼠心脏组织并未出现明显的萎缩、水肿、坏死及纤维化等病变。生化检测显示, 辐照后心脏组织中的MDA含量显著上升($P < 0.01$), T-AOC、GSH和GSSG含量均呈现时间相关的递减趋势(均 $P < 0.05$)。结论 裸鼯鼠心脏对 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线具有一定程度的耐受能力, 但其具体耐受机制尚未明确。

[关键字] 裸鼯鼠; 心脏; $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线; 辐射耐受

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0415-05

癌症是威胁人类健康的重大疾病之一, 全球每年有数千万人死于癌症。目前, 放射治疗是治疗癌症的常用方法之一, 大约半数的癌症患者通过放疗手段进行治疗^[1-2]。但是, 在放疗过程中, 不可避免地癌症患者会出现相应的放疗后遗症, 放射性心脏病便是其中之一。放射性心脏病范围较广, 包括心包炎、心肌病、心肌纤维化、瓣膜病、冠状动脉疾病和传导异常等^[3-4]。放射性心脏病一旦发生, 便不可逆转, 从早期的急性心包炎向晚期动脉粥样硬化、心脏瓣膜损伤

以及心脏传导异常等转变^[5], 严重威胁人类健康。

电离辐射包括人工辐射和天然辐射。目前, 人工辐射已广泛应用于农业、工业、军事和医疗领域^[6]。天然辐射广泛地分布于人类赖以生存的自然环境, 其中, ^{60}Co 放射源产生的 γ 射线也是天然辐射的一种。因具有波长短、频率高、能量高等特点, ^{60}Co 暴露达到一定剂量就会对生物体造成DNA与RNA降解等影响, 从而使得蛋白质合成等功能丧失, 导致生物体的损伤^[7-9]。有研究报道^[10-12], 高剂量的辐射能够引起急性心包炎, 一段时间后还可能引起动脉粥样硬化加速、不良心肌重塑、传导异常和心脏瓣膜损伤等症状。目前, 虽然放射性心脏病的生物学机制日趋明确^[13], 但临床研究过程中最适实验动物的选择尚未有明确报道。

裸鼯鼠属于啮齿目, 分布于肯尼亚、埃塞俄比亚等非洲地区。1980年代后期发现, 裸鼯鼠应用于生物医学研究方面具有较多优越性^[14]。裸鼯鼠因具有对癌症的天然免疫等特性, 受到生物医学界的广泛关注。电离辐射作为诱发癌症的

[收稿日期] 2020-08-01

[基金项目] 上海市科“技术创新行动计划”实验动物研究领域项目(20140900100)

[作者简介] 李煜(1992—), 硕士, 助教, 主要从事实验动物学教学及研究工作。E-mail: 591332278@qq.com
刘尹航(2002—), 学生。

E-mail: liuyinhang_27@163.com

* 共同第一作者

[通信作者] 陈超(1987—), 本科, 讲师, 研究方向: 人类疾病动物模型研究。E-mail: chencao_8713@aliyun.com

因素之一,是致癌模型建立的常用方式。裸鼹鼠虽然对癌症天然免疫,但是否对电离辐射具有耐受目前尚未见报道。在前期的预实验中,本课题组对裸鼹鼠进行了不同剂量的 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线一次性全身照射,并对其存活率进行统计。结果显示,10 Gy 组裸鼹鼠 30 d 存活率为 50%。因此,本研究通过观察裸鼹鼠经 10 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照后的心脏组织结构及生化指标变化,初步探讨裸鼹鼠心脏的辐射耐受能力,为后续研究其耐受特性的分子机制提供依据,为临床治疗放射性心脏病提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

18 月龄健康雄性裸鼹鼠 21 只,由本教研室生产,饲养于屏障设施[SYXK(沪)2017-0004]。

1.2 实验动物分组与实验处理

21 只裸鼹鼠随机分为 2 组,分别为对照组 7 只和实验组 14 只。实验组裸鼹鼠给予一次性全身 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照,辐射剂量率为 1.163 Gy/min,辐照时间为 8.6 min,总辐射剂量为 10 Gy,由海军军医大学辐照中心完成。

1.3 主要仪器设备及试剂

自动组织脱水机、包埋机、转轮式切片机、染色机、封片机和倒置荧光显微镜等均购自徕卡显微系统(上海)贸易有限公司;生化检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 心脏组织切片的制备与观察

分别取对照组、 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照后 7 d 和 14 d 实验组各 3 只裸鼹鼠,通过腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠对动物进行麻醉,迅速打开胸腔,取其心脏,置于通用型中性组织固定液中固定 24 h。经脱水、透明、包埋、切片、染色、封固等步骤完成 HE 染色组织切片的制备,光学显微镜下观察。

1.4.2 心脏组织氧化应激水平检测 分别取对照组、辐照后 7 d 和 14 d 实验组各 4 只裸鼹鼠,通过腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠对动物进行麻醉,迅速打开胸腔,取其心脏,剪取 0.1 g 心脏组织,经 40 μm 孔径筛网研磨过滤后加入 1 mL 裂解液,12 000 $\times g$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,取上清液用于检测丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量,检测步骤参照试剂盒说明书。

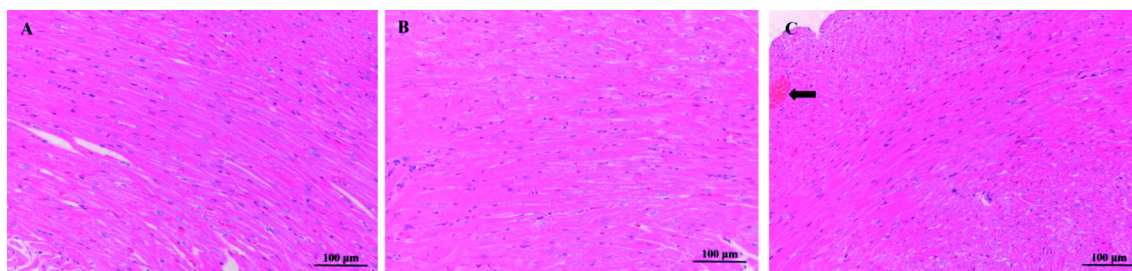
1.5 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 Graphpad Prism 5.0 软件对数据进行分析。多组计量数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察

光学显微镜下观察,对照组心肌细胞大小正常,呈短柱状,有分支和横纹,心肌细胞间结构正常,心肌纤维排列整齐致密(图 1A)。 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照后 7 d 及 14 d,镜下可见心肌纤维排列紧密,心肌细胞大小正常,未出现明显的萎缩、水肿、坏死及纤维化等病变(图 1B、C),但偶见小灶心肌血管充血(图 1C)。



A 为对照组, B 为辐照后 7 d, C 为辐照后 14 d (箭头示血管充血),均为 HE 染色结果。

图 1 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照后不同时间裸鼹鼠心脏组织病理学观察

Figure 1 Histopathological observation on the heart tissues of naked mole rats at different time after $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray irradiation

2.2 心脏生化指标检测结果

如表 1 显示, 辐照后 7 d 心脏组织中 MDA 含量显著高于对照组 ($P < 0.01$), $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照后 14 d 较辐照后 7 d 显著降低 ($P < 0.01$), 但仍显著高于对照组 ($P < 0.01$)。心脏组织 T-AOC 在

辐照后 7 d 未有显著降低, 但在辐照后 14 d 显著低于对照组 ($P < 0.05$) 和辐照后 7 d 组 ($P < 0.05$)。心脏组织 GSH 与 GSSG 含量均在辐照后 7 d 和辐照后 14 d 显著降低 ($P < 0.01$), 且辐照后 14 d 组含量显著低于辐照后 7 d 组 ($P < 0.01$)。

表 1 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照对裸鼹鼠心脏氧化应激水平的影响

Table 1 Effect of $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray radiation on oxidative stress in the heart of naked mole rats

指 标	对照组 (n=4)	辐照后 7 d (n=4)	辐照后 14 d (n=4)
MDA/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	5.261 $\pm$ 0.113	8.335 $\pm$ 0.156**	7.187 $\pm$ 0.114***
T-AOC/(mmol $\cdot$ g $^{-1}$)	0.435 $\pm$ 0.009	0.428 $\pm$ 0.008	0.413 $\pm$ 0.009**
GSH/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	12.494 $\pm$ 0.112	10.402 $\pm$ 0.017**	7.458 $\pm$ 0.061***
GSSG/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	6.247 $\pm$ 0.014	5.201 $\pm$ 0.011**	3.729 $\pm$ 0.065***

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与辐照后 7 d 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

电离辐射虽然对肿瘤具有一定程度的治疗作用, 但其引发的放射性并发症也一直严重威胁着人类的健康。心脏作为对电离辐射较为敏感的器官, 在经过电离辐射后, 通常情况下会出现与辐射剂量和辐射时间具有相关性和依赖性的病变。王升晔等^[15]报道小鼠心脏在经过电离辐射后呈现出心脏广泛纤维增厚、心脏微血管和内皮细胞减少等病变, 辐射能导致心肌纤维排列紊乱, 心肌细胞出现水样变性等。另有研究发现, 在局部心脏辐射几个月后, 可以观察到心肌血管周围间质胶原沉积增加, 并逐渐恶化^[16-18]。大鼠在经过全身高剂量辐射后, 心脏微血管密度显著降低^[19]。此外, 有报道显示, 经过辐射后, 不仅心脏微血管密度会改变, 其部分功能亦发生改变^[20]。本研究中, 经过一次性 10 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照后, 裸鼹鼠心肌纤维排列紧密, 心肌细胞大小正常, 仅偶见小灶心肌血管充血, 未出现心肌纤维广泛增厚、排列严重紊乱、间质细胞炎性浸润和纤维化等病变, 表明裸鼹鼠心脏组织结构未受辐射的明显影响。

辐射对于细胞的损伤, 一方面是通过对其直接生化修饰进行影响, 另一方面则是通过分解细胞水分子产生活性氧簇和活性氮自由基, 促使机体产生氧化应激反应, 从而间接损伤组织结构^[14,21]。正常情况下, 对于体内存在的自由基,

机体具有一定的清除机制, 即机体抗氧化防御机制。该机制包括以 GSH、过氧化氢酶等为代表的低分子量抗氧化剂, 能够将氧化因子经过一系列反应最终转化为水和氧气^[22-23]。当机体受到电离辐射时, 自由基大量产生, 超出了机体清除机制的承受能力, 因此会引起机体的氧化损伤。而机体受到氧化损伤最直接的重要标志, 就是脂质过氧化的终产物 MDA 大量增加。研究发现, 将小鼠进行 6 Gy 剂量 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后, 其心脏组织中 MDA 显著增加^[24]。作为机体内重要的抗氧化和自由基清除剂, GSH 在机体中主要以两种形式存在, 分别为 GSSG 和还原型 GSH, 但机体正常情况下主要以还原型 GSH 形式存在^[25], 且自身会维持还原型 GSH 和 GSSG 的动态平衡, 以更好保证生物体内抗氧化和清除行为的进行; 而受到不同条件刺激时, 该动态平衡将进行自身调整以应对外部刺激。如左丽丽等^[24]研究发现, 小鼠在经过 6 Gy 剂量 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后, 其心脏组织中 GSH 含量显著降低。T-AOC 反映的是机体总体的抗氧化能力, 其数值的高低表明机体抗氧化能力的强弱^[26]。在本研究中, 经过一次性 10 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后, 裸鼹鼠心脏组织中 MDA 含量显著增加, T-AOC、GSH 和 GSSG 含量均显著降低, 与文献报道结果相符, 表明裸鼹鼠心脏组织在辐射后发生明显的氧化应激, 且心肌过氧化损伤显著。

综上所述, 虽然裸鼹鼠心脏组织中的 MDA

含量呈现升高趋势, T-AOC、GSH 和 GSSG 含量均呈现时间相关的递减趋势, 但在组织学观察时并未发现相应病变。一方面表明了裸鼯鼠心脏组织确实具有一定程度的辐射耐受能力, 另一方面也说明裸鼯鼠心脏组织中还存在其他尚未明确的抗氧化修复机制或其他辐射耐受机制, 这为后续的裸鼯鼠辐射耐受机制的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Barton MB, Jacob S, Shafiq J, et al. Estimating the demand for radiation therapy from the evidence: A review of changes from 2003 to 2012[J]. *Radiat Ther Oncol*, 2014, 112:140-144.
- [2] Delaney G, Jacob S, Featherstone C, et al. The role of radiation therapy in cancer treatment: Estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines[J]. *Cancer*, 2005, 104:1129-1137.
- [3] Boerma M, Hauer-Jensen M. Potential targets for intervention in radiation-induced heart disease[J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(11):1405-1412.
- [4] Andratschke N, Maurer J, Molls M, et al. Late radiation induced heart disease after radiotherapy. Clinical importance, radiobiological mechanisms and strategies of prevention[J]. *Radiother Oncol*, 2011, 100(2):160-166.
- [5] Taunk NK, Haffty BG, Kostis JB, et al. Radiation-induced heart disease: Pathologic abnormalities and putative mechanisms[J]. *Front Oncol*, 2015, 5:39.
- [6] 吕宗鑫. 对电离辐射与电磁辐射区别的探讨[J]. *低碳世界*, 2019, 9(1):22-23.
- [7] 陈超, 丛薇, 杨文静, 等. 裸鼯鼠与小鼠抗辐射能力比较研究[J]. *实验动物与比较医学*, 2019, 39(6):479-483.
- [8] Li M, Zhao DH, Wang JS. Research progress on antiradiation drugs[J]. *Pract Pharm Clin Remed*, 2017, 20(12):1435-1440.
- [9] 韦瑀龙, 蓝晓庆. 中药钴 60 辐照灭菌的应用研究进展[J]. *海峡药学*, 2019, 31(8):4-7.
- [10] Heidenreich PA, Kapoor JR. Radiation induced heart disease: Systemic disorders in heart disease[J]. *Heart*, 2009, 95(3):252-258.
- [11] Martinou M, Gaya A. Cardiac complications after radical radiotherapy[J]. *Semin Oncol*, 2013, 40(2):178-185.
- [12] Mill WB, Baglan RJ, Kurichety P, et al. Symptomatic radiation-induced pericarditis in Hodgkin's disease[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1984, 10(11):2061-2065.
- [13] 于兰, 万海涛, 王刚, 等. 放射性心脏病研究进展[J]. *中国放射医学与防护杂志*, 2016, 36(6):475-480.
- [14] 珠娜, 郝云涛, 张亭, 等. 核桃低聚肽对⁶⁰Co γ 射线照射小鼠氧化损伤保护作用的实验研究[J]. *中国预防医学杂志*, 2019, 20(3):212-216.
- [15] 王升晔, 封巍, 程国平, 等. 单次高剂量放疗对小鼠心脏的病理学改变及机制探讨[J]. *心电与循环*, 2019, 38(5):395-399.
- [16] Boerma M, Zurcher C, Esveltdt I, et al. Histopathology of ventricles, coronary arteries and mast cell accumulation in transverse and longitudinal sections of the rat heart after irradiation[J]. *Oncol Rep*, 2004, 12(2):213-219.
- [17] Schultz-Hector S. Radiation-induced heart disease: Review of experimental data on dose response and pathogenesis[J]. *Int J Radiat Biol*, 1992, 61(2):149-160.
- [18] Sridharan V, Tripathi P, Sharma S, et al. Roles of sensory nerves in the regulation of radiation-induced structural and functional changes in the heart[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014, 88(1):167-174.
- [19] Baker JE, Fish BL, Su J, et al. 10 Gy total body irradiation increases risk of coronary sclerosis, degeneration of heart structure and function in a rat model[J]. *Int J Radiat Biol*, 2009, 85(12):1089-1100.
- [20] Boerma M, Kruse JJ, van Loenen M, et al. Increased deposition of von Willebrand factor in the rat heart after local ionizing irradiation[J]. *Strahlenther Onkol*, 2004, 180(2):109-116.
- [21] 冯艳群, 李路, 田树泰, 等. 玫瑰茄多糖对电离辐射小鼠抗氧化应激能力的影响[J]. *特产研究*, 2013, 35(3):51-53.
- [22] Desouky, Ding N, Zhou G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation[J]. *Rad Res App Sci*, 2015, 8(2):247-254.
- [23] Giardi MT, Touloupakis E, Bertolotto D, et al. Preventive or potential therapeutic value of nutraceuticals against ionizing radiation-induced oxidative stress in exposed subjects and frequent fliers [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(8):17168-17192.
- [24] 左丽丽, 富校轶, 高永欣, 等. 狗枣猕猴桃多酚对⁶⁰Co γ 射线辐射防护作用的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 22:344-353.
- [25] Forman HJ. Glutathione—From antioxidant to post-translational modifier[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 595:64-67.
- [26] 袁带秀, 袁志忠, 李中正, 等. 对 D- 半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用研究[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(12):2968-2970.

Preliminary Study on Heart Tolerance to $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray Radiation in Naked Mole Rats

LI Yu^{1*}, LIU Yinhang^{2*}, CHEN Chao¹

(1. Department of Laboratory Animal Science, School of Basic Medical Sciences, Naval Medical University, Shanghai 200433, China;
2. Shanghai Foreign Language School, Shanghai 200083, China)

* These two authors contributed equally.

Correspondence to: CHEN Chao, chenchao_8713@aliyun.com

[Abstract] **Objective** To observe and analyze the changes of cardiac morphology and biochemical indexes in naked mole rats after $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray radiation, and to preliminarily study the characteristics of $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray radiation tolerance in naked mole rats heart. **Methods** The naked mole rats were generally radiated by the single 10 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray, and then their hearts were collected after 7 days and 14 days respectively. After paraffin section and hematoxylin eosin (HE) staining, the microstructure of naked mole rat heart was observed under an optical microscope, and the pathological analysis was carried out. The malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (T-AOC), glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) contents in heart tissues were detected by biochemical test kit. **Results** Microscopic examination showed that there was no obvious atrophy, edema, necrosis and fibrosis in the heart tissues of naked mole rats after irradiation. According to the biochemical test, the content of MDA in heart tissues increased significantly after irradiation ($P<0.01$), and the T-AOC, GSH and GSSG contents decreased significantly with time (all $P<0.05$). **Conclusion** The heart of naked mole rats can tolerate $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray to some extent, but the specific mechanism of tolerance is not clear.

[Key words] Naked mole rat; Heart; $^{60}\text{Co}\gamma$ -rays; Radiation tolerance