

60Co γ射线辐射对裸鼠肾脏、肺脏以及骨骼肌的影响

张静远^{1*}, 张倩倩^{1*}, 赵懿宁², 杨 蓉¹, 张成财¹, 贺辰固², 袁 征^{3#}, 崔淑芳^{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. 上海市杨浦区精神卫生中心医技科, 上海 200090;

3. 军事科学院军事医学研究院实验动物中心, 北京 100071)

[摘要] 目的 观察⁶⁰Co γ射线辐射后裸鼠肾脏、肺脏和骨骼肌组织形态结构变化和相应组织氧化应激指标变化。方法 裸鼠经全身一次性 10 Gy ⁶⁰Co γ射线辐射, 分别于辐射后 7 d 和 14 d 采集裸鼠肾脏、肺脏和腓肠肌, 制作石蜡切片, 经 HE 染色后, 光学显微镜下观察肾脏、肺脏和骨骼肌形态结构; 采用动物组织生化检测试剂盒检测肾脏、肺脏和腓肠肌组织丙二醛 (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 辐射后裸鼠肾脏、肺脏和骨骼肌均无明显病理改变。辐射后肾脏组织中的 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$), GSH 含量先显著升高 ($P < 0.05$), 后显著降低 ($P < 0.05$), GSSG 和 T-AOC 未出现显著变化 ($P > 0.05$); 肺脏组织 MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$), GSH、GSSG 和 T-AOC 随时间延长先降低后升高 ($P < 0.05$); 骨骼肌中 MDA 的含量显著上升 ($P < 0.01$), 而 GSH 和 GSSH 的含量随时间的延长先降低后升高 ($P < 0.01$), T-AOC 在辐射后 7 d 出现明显下降 ($P < 0.01$), 14 d 时仍然维持 7 d 水平。结论 裸鼠肾脏、肺脏和骨骼肌在高剂量⁶⁰Co γ射线辐射后表现出一定程度的耐受能力, 具体耐受机制有待深入研究。

[关键词] 裸鼠; 肾脏; 肺脏; 骨骼肌; ⁶⁰Co γ射线

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)06-0513-06

[收稿日期] 2020-10-10

[基金项目] 国家青年自然科学基金(31702075); 上海市“科技创新行动计划”实验动物研究领域项目(20140900100); 军队实验动物专项课题(SYDW[2016]009)

[作者简介] 张静远(1992—), 女, 硕士, 助教, 主要从事实验动物学教学及研究工作。

E-mail: 457541734@qq.com

张倩倩(1996—), 女, 本科, 助教, 主要从事实验动物教学及研究工作。E-mail: zqqxina@163.com

*共同第一作者

[通信作者] 崔淑芳(1968—), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 实验动物资源开发与疾病动物模型研究。

E-mail: youngstar_sf@163.com

袁 征(1972—), 男, 从事实验动物科研管理工作。E-mail: yuanzheng001@126.com

#共同通信作者

裸鼠 (naked mole rat) 属于哺乳纲啮齿目豪猪亚目滨鼠科裸鼠属裸鼠种, 原产于非洲, 以植物的根茎为食^[1-2]。裸鼠长期生活在地下 2 m 的洞穴中, 视力几乎丧失, 依靠身体与嘴两侧的触毛感受周围的环境。裸鼠具有抗肿瘤、抗衰老、耐低氧及耐疼痛等特性, 近年来已引起各国科研工作者的广泛关注^[3]。

电离辐射对生物体的影响是目前生物医学研究领域的热点之一。研究显示, 辐射能够引发生物体多个组织的损伤, 如 γ 射线辐射后 ICR 小鼠出现骨髓铁沉积现象^[4]; BALB/c 小鼠胸腔辐射模拟可导致肺功能细胞大量坏死, 肺脏严重纤维化^[5]; 7 Gy 辐射 C57BL/6J 小鼠后, 诱发原发性结肠炎症及严重的功能障碍^[6]。本课题组前期研究发现, 裸鼠在活体水平具有天然的辐射耐受

能力^[7]，肾脏、肺脏和骨骼肌作为机体内的重要器官和组织，在内环境稳定以及生命活动中发挥着重要作用。因此，本实验以裸鼠为研究对象，检测辐射后肾脏、肺脏和骨骼肌的组织学变化，以及氧化应激指标变化，初步探讨辐射对裸鼠的影响，以期为后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

18月龄健康雄性裸鼠21只，由海军军医大学实验动物中心生产，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。实验组裸鼠给予全身一次性⁶⁰Co γ射线辐射，辐射剂量率为1.163 Gy/min，辐射时间为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上海碧云天生物技术有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 肾脏、肺脏和骨骼肌组织切片的制备与观察 分别取对照组、辐射后7 d 和14 d 实验组各3只裸鼠，腹腔注射0.3% 戊巴比妥钠麻醉，迅速取下腓肠肌，打开腹腔，取出肾脏、肺脏，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 肾脏、肺脏和骨骼肌组织氧化应激指标检测 分别取对照组、辐射后7 d 和14 d 实验组各4只裸鼠，腹腔注射0.3% 戊巴比妥钠麻醉，迅速取下腓肠肌，打开腹腔，取出肾脏、肺脏。剪取0.1 g组织制备匀浆，经40 μm孔径筛网研磨过滤后加入1 mL裂解液，12 000 × g，4 ℃离心10 min，取上清液用于检测丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、谷胱甘肽(glutathione, GSH) 和氧化型谷胱甘肽(oxidized

glutathione, GSSG) 含量，检测步骤参照试剂盒说明书。

1.5 统计学处理

采用SPSS17.0统计软件进行分析处理。各实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用Graphpad Prism 5.0软件对数据进行分析作图。多组比较先进行方差分析，再采用Bonferroni法进行两两比较， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织学观察

2.1.1 肾脏 光学显微镜下观察发现，对照组肾脏细胞清晰完好，肾小球未见病变，基底膜完整（图1A）。辐射后7 d 及14 d，镜下可见肾脏细胞大小正常，未出现炎性反应和明显的水肿、坏死等病变（图1B、C）。

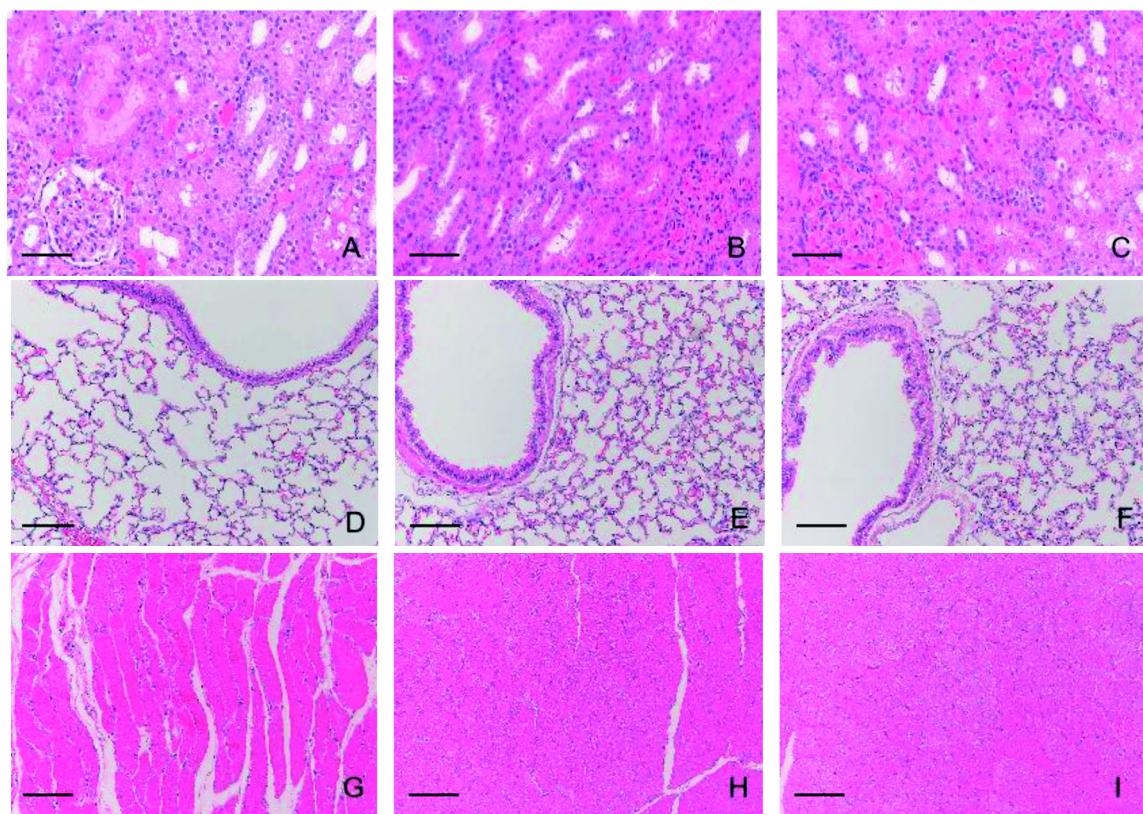
2.1.2 肺脏 光学显微镜下观察发现，对照组裸鼠肺脏组织肺泡结构清晰，肺泡大小正常（图1D）。辐射后未出现肺泡腔渗出液和出血、成纤维细胞增生、肺组织局灶性实变等病变，但偶见肺泡间隔轻微增厚，少量炎性细胞浸润（图1E、F）。

2.1.3 骨骼肌 光学显微镜下观察发现，对照组裸鼠骨骼肌形态结构完整，肌纤维呈细条状整齐平行排列（图1G）。辐射后肌纤维呈圆形或多边形，细胞核位于周边；肌纤维相互平行排列，聚集成束，其周围包有结缔组织，即肌束膜；大小不等的肌束聚集在一起构成肌肉，其周围包有致密的结缔组织，即肌外膜；均未见肌纤维萎缩、坏死或者纤维化（图1H、I）。

2.2 氧化应激指标检测

2.2.1 肾脏 肾脏组织中MDA含量在辐射后7 d 明显高于对照组（ $P < 0.01$ ），辐射后14 d 较对照组、辐射后7 d 有明显升高（ $P < 0.01$ ）。T-AOC与GSSG含量在辐射后未见明显变化。GSH含量在辐射后7 d 较对照组明显升高（ $P < 0.05$ ），辐射后14 d 较对照组、辐射后7 d 明显降低（ $P < 0.05$ ）（表1）。

2.2.2 肺脏 肺脏组织中的MDA含量在辐射后7 d 明显高于对照组（ $P < 0.05$ ），辐射后14 d 较对照组、辐射后7 d 有明显升高（ $P < 0.005$ ）。



A、D 和 G 为对照组；B、E 和 H 为辐射后 7 d；C、F 和 I 为辐射后 14 d；标尺 = 100 μm。

图 1 ^{60}Co γ辐射后不同时间裸鼹鼠肾脏 (A~C)、肺脏 (D~F)、骨骼肌 (G~I) 组织学观察

Figure 1 Histopathological observation on the kidney (A-C), lung (D-F) and skeletal muscle (G-I) tissues of naked mole rats at different time points after ^{60}Co γ radiation

T-AOC 在辐射后 7 d、辐射后 14 d 均低于对照组 ($P < 0.005$, $P < 0.01$)。GSH 含量在辐射后 7 d 与对照组相比明显降低 ($P < 0.005$)，辐射后 14 d 较对照组、辐射后 7 d 有显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。GSSG 含量在辐射后 7 d 与对照组相比明显降低 ($P < 0.05$)，辐射后 14 d 较对

照组、辐射后 7 d 有明显升高 ($P < 0.01$) (表 1)。
2.2.3 骨骼肌 骨骼肌中 MDA 含量在辐射后 7 d 明显高于对照组 ($P < 0.01$)，辐射后 14 d 明显低于辐射后 7 d ($P < 0.01$)，但仍明显高于对照组 ($P < 0.01$)。T-AOC 在辐射后 7 d 和 14 d 均明显低于对照组 ($P < 0.01$)。GSH 和 GSSG 含量在辐射

表 1 ^{60}Co γ射线辐射对裸鼹鼠肾脏、肺脏、骨骼肌氧化应激指标的影响

Table 1 Effects of ^{60}Co γ-ray radiation on indicators of oxidative stress in kidney, lung and skeletal muscle of naked mole rats

器官或组织	组 别	MDA /($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	T-AOC/($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)	GSH/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	GSSG /($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)
肾脏	对照组 ($n=4$)	5.642 ± 0.409	0.528 ± 0.039	1.572 ± 0.107	0.786 ± 0.133
	辐射后 7 d ($n=4$)	13.350 ± 2.261**	0.573 ± 0.039	2.203 ± 0.210*	1.102 ± 0.245
	辐射后 14 d ($n=4$)	35.736 ± 4.289***##	0.495 ± 0.048	1.165 ± 0.734**#	0.583 ± 0.065
肺脏	对照组 ($n=4$)	2.240 ± 0.200	0.444 ± 0.020	10.428 ± 0.216	5.218 ± 0.205
	辐射后 7 d ($n=4$)	2.732 ± 0.185*	0.294 ± 0.010***	8.961 ± 0.141***	4.453 ± 0.205*
	辐射后 14 d ($n=4$)	6.039 ± 0.167***##	0.324 ± 0.022**	12.653 ± 0.223**#	6.322 ± 0.215***##
骨骼肌	对照组 ($n=4$)	2.721 ± 0.023	0.597 ± 0.007	9.603 ± 0.010	4.802 ± 0.019
	辐射后 7 d ($n=4$)	5.820 ± 0.025**	0.441 ± 0.025**	2.95 ± 0.061**	1.475 ± 0.015**
	辐射后 14 d ($n=4$)	3.719 ± 0.017***##	0.444 ± 0.025**	10.76 ± 0.031***##	5.38 ± 0.029***##

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.005$ ；与辐射后 7 d 比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.005$ 。

后 7 d 与对照组相比明显降低 ($P < 0.01$)，辐射后 14 d 均明显高于对照组、辐射后 7 d ($P < 0.01$) (表 1)。

3 讨论

在人类生存环境中，辐射无处不在，除天然辐射外，工业核污染、医疗放射以及日常生活中的电器辐射，均可对人类造成不同程度的辐射损伤^[8-9]。其中，天然辐射和医疗放射是造成人类辐射损伤的主要辐射来源，当辐射达到一定剂量，会产生急性放射病，导致器官损伤，细胞癌变概率增加^[10]。因此，开展辐射损伤防治研究具有重要的现实意义。

目前辐射相关的研究主要围绕小鼠、大鼠和小型猪等。王敏等^[11]研究发现，昆明小鼠在受到 5 Gy X 射线全身辐射后，会发生肾小球肿胀，肾小管和集合管上皮细胞空泡化、凋亡、坏死。周中林等^[12]研究发现，C57BL/6 小鼠在受到 6 Gy ^{60}Co γ 一次性全身辐射后，肺组织网状结构不清晰，肺泡间隔断裂，部分肺泡融合。陈超等^[17]研究发现，小鼠在经少量多次辐射之后，骨组织骨髓腔内红骨髓减少，间质细胞炎性浸润。在本研究中，裸鼠经过 ^{60}Co γ 射线 10 Gy 一次性全身辐射后，镜下可见肾脏细胞大小正常，未出现炎性反应以及明显的肿胀、凋亡、坏死等病变；肺组织肺泡结构清晰，肺泡大小正常，仅偶见肺泡间隔轻微增厚，有少量炎性细胞浸润，未出现肺泡腔渗出液和出血、成纤维细胞增生、肺组织局灶性实变等病变；未观察到骨骼肌纤维萎缩、坏死和纤维化，间质细胞炎性浸润等变化。结果表明辐射对裸鼠肾脏、肺脏和骨骼肌影响较小，提示受到辐射刺激后的裸鼠肾脏、肺脏和骨骼肌仍然能够维持良好的稳定性。与小鼠以及其他实验动物构建的辐射损伤模型相比，裸鼠这一独特的生物学特性或可为后期辐射损伤防治研究提供参考。

辐射损伤效应除表现在组织学，还表现在分子水平上，主要表现为化学键破坏诱发的水分子、DNA、蛋白质等电离。水分子在电离时可产生活性氧簇和活性氮自由基，改变细胞正常氧

化过程而损害健康^[13-14]。脂质过氧化的终产物 MDA 是机体受到氧化损伤的重要标志^[15]。本研究中辐射后裸鼠肾脏、肺脏和骨骼肌中 MDA 含量均明显升高 ($P < 0.01$)，表明氧化自由基在裸鼠体内迅速积累，发生明显的氧化应激反应。GSSG 和 GSH 是机体内重要的抗氧化和自由基清除剂，正常情况下机体以 GSH 形式存在为主，GSH 含量是衡量机体抗氧化能力大小的重要指标^[16-17]。辐射后裸鼠肺脏、骨骼肌中 GSH 和 GSSH 水平在 7 d 时出现明显降低，提示抗氧化物质消耗；但与小鼠的情况^[18]不同的是，裸鼠 GSH 和 GSSH 水平在辐射后 14 d 出现明显回升，表明裸鼠可能在受到氧化应激损伤后，通过提高体内抗氧化产物表达水平来提高裸鼠耐受辐射的能力。裸鼠肾脏 GSH 水平在辐射后 7 d 时显著增高，14 d 显著下降；GSSG 没有发生显著变化，较肺脏和骨骼肌而言，裸鼠肾脏能迅速提高抗氧化能力来抵抗氧化损伤。T-AOC 反映的是机体总体的抗氧化能力，其数值的高低反映机体抗氧化能力的强弱^[16]。与对照组相比，辐射后裸鼠肾脏 T-AOC 在没有明显变化，肺脏 T-AOC 在辐射 7 d 后水平明显降低，但在 14 d 已经回升并接近对照组，骨骼肌 T-AOC 在 14 d 仍然维持 7 d 水平，提示裸鼠机体有较强的抗氧化能力恢复力，帮助机体抵抗辐射损伤。

综上所述，辐射后裸鼠肾脏、肺脏和骨骼肌发生明显的氧化应激反应，但在组织学观察时并未发现相应的病理损伤。一方面表明裸鼠对辐射具有一定程度的耐受能力，另一方面也表明裸鼠体内还存在其他尚未明确的过氧化清除机制，这为后续研究裸鼠耐辐射机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Triplett JC, Tramutola A, Swomley A, et al. Age-related changes in the proteostasis network in the brain of the naked mole-rat: implications promoting healthy longevity[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(10):2213-2224. doi: 10.1016/j.bbadi.2015.08.002.
- [2] Tian X, Azpurua J, Hine C, et al. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat[J]. *Nature*, 2013, 499(7458):346-349. doi:10.1038/

- nature 12234.
- [3] 赵善民, 崔淑芳. 裸鼹鼠生物学特性的研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(5):400-405.
- [4] Zhang XH, Xing XH, Liu HW, et al. Ionizing radiation induces ferroptosis in granulocyte-macrophage hematopoietic progenitor cells of murine bone marrow[J]. Int J Radiat Biol, 2020, 96(5):584-595. doi:10.1080/09553002.2020.1708993.
- [5] Li Y, Zou L, Yang X, et al. Identification of lncRNA, microRNA, and mRNA-associated CeRNA network of radiation-induced lung injury in a mice model[J]. Dose Response, 2019, 17(4): 1559325819891012. doi:10.1177/1559325819891012.
- [6] Li Y, Dong JL, Xiao HW, et al. Gut commensal derived-valeric acid protects against radiation injuries[J]. Gut Microbes, 2020, 11(4):789-806. doi:10.1080/19490976.2019.1709387.
- [7] 陈超, 从薇, 杨文静, 等. 裸鼹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] 周平坤. 核辐射对人体的生物学危害及医学防护基本原则[J]. 首都医科大学学报, 2011, 32(2):171-176.
- [9] 王磊, 石中玉, 王安, 等. 4 Gy γ 射线对 Balb/c 小鼠睾丸辐射损伤效应的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(4): 470-474.
- [10] 王家富. 医学中电离辐射对人体的危害[J]. 吉林医学, 2010, 31(12):1687-1687.
- [11] 王敏, 俞诗源, 刘小媛, 等. X 射线辐射对小鼠肾组织结构和血清肌酐与尿素氮含量的影响[J]. 动物学杂志, 2014, 49(4):476-482.
- [12] 周中林, 廉明晓, 郭丽萍, 等. LW-AFC 对 ^{60}Co 射线辐射损伤小鼠预防作用的初步研究[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(10):840.
- [13] Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification[J]. Chem Biol Interact, 2014, 224: 164-175. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016.
- [14] 珠娜, 郝云涛, 张亭, 等. 核桃低聚肽对 ^{60}Co 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] 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. doi:10.3390/ijms140817168.
- [16] Forman HJ. Glutathione — From antioxidant to post-translational modifier[J]. Arch Biochem Biophys, 2016, 595: 64-67. doi:10.1016/j.abb.2015.11.019.
- [17] 李倩, 李焱, 周铜水. 新鲜丹参根酸水解产物及其抗氧化活性研究[J]. 安徽医药, 2017, 21(10):1785-1789.
- [18] 龚睿, 蔡周权, 谢晨, 等. 丹参酮抗小鼠辐射损伤实验研究[J]. 中国药业, 2019, 28(15):8-10.

Effects of ^{60}Co γ -ray Radiation on Kidney, Lung and Skeletal Muscle Tissues of Naked Mole Rats

ZHANG Jingyuan^{1*}, ZHANG Qianqian^{1*}, ZHAO Yining²,

YAGN Rong¹, ZHANG Chengcail¹, HE Chenjiong², YUAN Zheng^{3#}, CUI Shufang^{1#}

(1. Department of Laboratory Animal Science, School of Basic Medical Sciences, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Medical Technology, Yangpu District Mental Health Center, Shanghai 200090, China;

3. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

*These two authors contributed equally.

#Correspondence to: CUI Shufang, E-mail: youngstar_sf@163.com

YUAN Zheng, E-mail: yuanzheng001@126.com

[Abstract] **Objective** To observe and analyze the changes of the kidney, lung, and skeletal muscle morphology and the related indicators of oxidative stress in naked mole rats after total body irradiation with ^{60}Co γ -rays. **Methods** After 7 d and 14 d of total body radiation with ^{60}Co γ -rays at a one-time dose

of 10 Gy, the kidney, lung and gastrocnemius muscle samples of naked mole rats were collected. The microstructures of the samples were observed under an optical microscope after HE staining. Indicators such as malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (T-AOC), glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were detected with the corresponding biochemical test kits.

Results Microscopic examination showed that there were no obvious pathological changes in the kidney, lung and skeletal muscle tissues of the naked mole rats after the designed irradiation. Biochemical examination showed that the content of MDA in kidney increased significantly after radiation ($P<0.01$), the content of GSH was significantly increased at first and then declined ($P<0.05$), and the contents of GSSG and T-AOC did not change dramatically ($P>0.05$). The content of MDA in lung was significantly increased ($P<0.05$), and the contents of GSH, GSSG and T-AOC decreased at first and then increased over time ($P<0.05$). The content of MDA in skeletal muscle was significantly increased ($P<0.01$), while the contents of GSH and GSSH decreased firstly and then increased over time ($P<0.01$). The content of T-AOC decreased significantly on the 7th day after irradiation ($P<0.01$), and was maintained till the 14th day. **Conclusion** The kidney, lung and skeletal muscle of naked mole rats showed a certain degree of tolerance to ^{60}Co γ -ray radiation, and the specific tolerance mechanism is worthy of further study.

[Key words] Naked mole rats; Kidney; Lung; Skeletal muscle; ^{60}Co γ -rays

致谢本刊支持单位

2020年，本刊得到了全国各地实验动物科研机构和技术企业的大力支持，谨致谢忱！

具体名单（排列不分先后）如下：

广东省实验动物监测所	南方医科大学实验动物中心	广州中医药大学实验动物中心
苏州大学动物实验中心	大连医科大学实验动物中心	西安交通大学医学院实验动物中心
上海西普尔·必凯实验动物有限公司	新疆实验动物研究中心	山东省实验动物中心
上海交通大学医学院实验动物科学部	扬州大学比较医学中心	浙江中医药大学动物实验研究中心
广东省医学实验动物中心	浙江省实验动物中心	海军军医大学实验动物中心
上海斯莱克实验动物有限责任公司	河南省实验动物中心	哈尔滨兽医研究所
中国科学院上海药物研究所实验动物室	南通大学实验动物中心	杭州师范大学实验动物中心
上海市实验动物质量监督检验站	复旦大学药学院	华东农业大学实验动物中心

《实验动物与比较医学》编辑部

2020年12月