

富氢水对电离辐射引起胸腺细胞损伤的影响

张俊伶 薛晓蕾 李源 樊赛军

【摘要】目的 探讨富氢水对6 Gy照射小鼠胸腺细胞内活性氧水平、细胞凋亡及DNA损伤程度的影响。**方法** 实验分为对照组、6 Gy照射组、6 Gy照射+富氢水组；对照组和6 Gy照射组小鼠照射前10 min灌胃正常饮用水0.5 ml，6 Gy照射+富氢水组小鼠灌胃富氢水0.5 ml，照射后连续灌胃，给予小鼠正常饮用水和富氢水7 d，于照射后4、7、15 d处死小鼠获取胸腺细胞。采用流式细胞术检测胸腺细胞内活性氧水平、凋亡细胞比例及磷酸化组蛋白H2AX(γ -H2AX)平均荧光强度。**结果** 与对照组的小鼠比较，6 Gy照射组小鼠在照射后4、7、15 d胸腺细胞中的活性氧水平升高，早期凋亡细胞[Annexin V阳性、碘化丙啶(PI)阴性]和晚期凋亡细胞(Annexin V阳性、PI阳性)的细胞比例明显增加， γ -H2AX平均荧光强度增加。与6 Gy照射组小鼠相比，6 Gy照射+富氢水组小鼠的胸腺细胞中活性氧水平下降，早期凋亡和晚期凋亡的细胞比例降低，细胞内 γ -H2AX平均荧光强度则是下降的，差异均具有统计学意义。**结论** 富氢水可以有效减轻电离辐射引起的胸腺细胞损伤，为富氢水作为辐射损伤防护剂提供了实验依据。

【关键词】 辐射，电离；活性氧；细胞凋亡；DNA损伤；富氢水；胸腺细胞

Effects of hydrogen-rich water on radiation-induced thymus injury Zhang Junling, Xue Xiaolei, Li Yuan, Fan Saijun. Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China
Corresponding author: Fan Saijun, Email: fansaijun@irm-cams.ac.cn

【Abstract】 Objective The apoptosis and DNA damage of thymus cells in mice with total body irradiation of 6 Gy were investigated to determine the effect of hydrogen-rich water on reactive oxygen species (ROS). **Methods** A total of 15 mice were divided into three groups, namely, un-irradiated control group, 6 Gy irradiation group, and 6 Gy + hydrogen-rich water group. Up to 0.5 ml of hydrogen-rich water was administered to the mice in 6 Gy + hydrogen-rich water group 10 min before irradiation, which was provided once a day within 7 days after irradiation, and the other two groups were administered water instead. Thymus cells were collected at 4, 7, and 15 days after irradiation. Levels of ROS, apoptosis, and mean fluorescence intensity (MFI) of phosphorylated histone H2AX (γ -H2AX) were detected by flow cytometry. **Results** ROS levels, early (Annexin V-positive and propidium iodide (PI)-negative) and late apoptotic (Annexin V-positive and PI-positive) cells, and MFI of γ -H2AX increased in the thymus of mice irradiated with 6 Gy compared with those in the un-irradiated control group. By contrast, the levels of ROS, apoptotic cells, and MFI of γ -H2AX significantly declined in the thymus of mice administered with 6 Gy + hydrogen-rich water compared with those in the irradiated mice. **Conclusion** Hydrogen-rich water exerted a promising protective effect on radiation-induced thymus injury. Therefore, hydrogen-rich water is a potential radioprotective agent.

【Key words】 Radiation, ionizing; Reactive oxygen species; Apoptosis; DNA damage; Hydrogen-rich water; Thymus cells

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.05.001

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81112721); 国家自然科学基金青年项目(81402633); 中国医学科学院放射医学研究所发展基金(1524, 1544)

作者单位: 300192, 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室

通信作者: 樊赛军(Email: fansaijun@irm-cams.ac.cn)

电离辐射可以引起机体免疫系统损伤, 0.5 Gy以上的照射剂量就能引起免疫系统抑制, 半数致死剂量以上的照射则可以导致免疫系统的全面抑制。胸腺是免疫系统中重要的中枢免疫器官之一, 是淋巴细胞分化发育成熟的重要场所, 对周围免疫器官

的发育和正常功能的发挥有重要作用^[1]。胸腺是对电离辐射十分敏感的免疫器官,因此,在辐射防护中增强对免疫系统,特别是胸腺的辐射防护显得非常重要。由于人体中水分约占体重的70%,因此,电离辐射产生的大量活性氧可造成正常结构的破坏,进而引起组织器官的损伤^[2]。富氢水中氢的含量非常高,氢气穿透力强,能够非常容易地进入细胞内,选择性地中和羟基自由基等活性氧成分,将活性氧还原成水并排出体外,因此具有强大的抗氧化能力。本研究旨在观察富氢水对电离辐射引起的胸腺细胞损伤的防护作用,为进一步开发富氢水作为安全、无不良反应的辐射防护剂及其他防护剂的溶解载体提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;细胞凋亡检测试剂盒、固定破膜试剂盒、Accuri C6 流式细胞仪购自美国 BD 公司;磷酸化组蛋白 H2AX (phosphorylated histone H2AX, γ -H2AX) 抗体购自美国 CST 公司;异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的山羊抗兔抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验动物

无特定病原体级 C57BL/6 雄性小鼠 15 只,体质量 21~23 g, 8~10 周龄,购自北京维通利华实验动物有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。小鼠饲养于我所实验动物中心。

1.3 实验分组及给药方式

本实验中小鼠共分 3 组,每组 5 只,其中,对照组:未照射,灌胃给予正常饮用水;6 Gy 照射组:6 Gy 全身照射,灌胃给予正常饮用水;6 Gy 照射+富氢水组:6 Gy 全身照射,灌胃给予富氢水。小鼠照射前 10 min 灌胃给予正常饮用水或富氢水 0.5 ml,照射后继续灌胃给予正常饮用水或富氢水 7 d,每天 1 次,每次 0.5 ml。照射后 4、7、15 d 处死小鼠获取胸腺细胞。

1.4 胸腺细胞获取分离

将小鼠的胸腺组织放置于装有 5 ml PBS 的一次性平皿内,用两片磨砂玻片的带磨砂头研磨胸腺组织,直至将胸腺内细胞全部磨出,过滤获取胸腺细胞悬液并计数。

1.5 胸腺细胞内活性氧检测

取 1×10^6 个细胞,加入 500 μ l 活性氧检测探针(无血清 1640 培养基与探针的比例为 3000:1),于 37°C 水浴锅内孵育 30 min 后,1500 r/min,离心 5 min,离心半径 25 cm,弃去上清后用 PBS 洗涤 3 次以洗去多余未结合探针,最后加入 100 μ l PBS 将细胞悬起,采用流式细胞仪检测 FITC 通道平均荧光强度。

1.6 胸腺细胞内凋亡细胞比例检测

取 1×10^6 个细胞,1500 r/min,离心 5 min,离心半径 25 cm,去上清后加入细胞凋亡检测试剂盒内 1 \times Binding buffer 试剂 100 μ l,以及 Annexin V 试剂和碘化丙啶(propidium iodide, PI)试剂各 5 μ l,室温避光孵育 15 min,再加入 1 \times Binding buffer 试剂 100 μ l,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.7 胸腺细胞内 DNA 损伤检测

取 1×10^6 个细胞,1500 r/min,离心 5 min,离心半径 25 cm,后弃上清,按照固定破膜试剂盒内的操作说明对胸腺细胞进行固定破膜。固定破膜结束后,加入 γ -H2AX 抗体 0.5 μ l,室温下孵育 1 h,加入 1 ml PBS 后 1500 r/min,离心 5 min,离心半径 25 cm,弃上清,洗掉未结合的抗体;加入 FITC 标记的山羊抗兔二抗,室温下孵育 30 min,加入 1 ml PBS,1500 r/min,离心 5 min,离心半径 25 cm,弃上清,最后加入 100 μ l PBS 将细胞悬起,采用流式细胞仪检测 FITC 通道平均荧光强度。

1.8 统计学方法

采用 Prism 软件对数据进行处理,计量资料以均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示,两两比较采用 Welch's 校正 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 富氢水对辐照小鼠胸腺细胞中活性氧的影响

如图 1 所示,6 Gy 照射的小鼠胸腺细胞在照射后 4、7、15 d 活性氧水平都明显升高,而且随着时间的增加活性氧水平有下降的趋势。与单独 6 Gy 照射的小鼠相比,给予富氢水的受照小鼠的胸腺细胞的活性氧水平明显降低,但是在照射后 4 和 15 d 仍然比对照组小鼠高,只有照射后 7 d 活性氧水平低于对照组,提示富氢水能够有效降低辐照引起的细胞内活性氧水平升高。

2.2 富氢水对辐照小鼠胸腺细胞凋亡的影响

如图 2 所示,6 Gy 照射小鼠胸腺细胞在照射

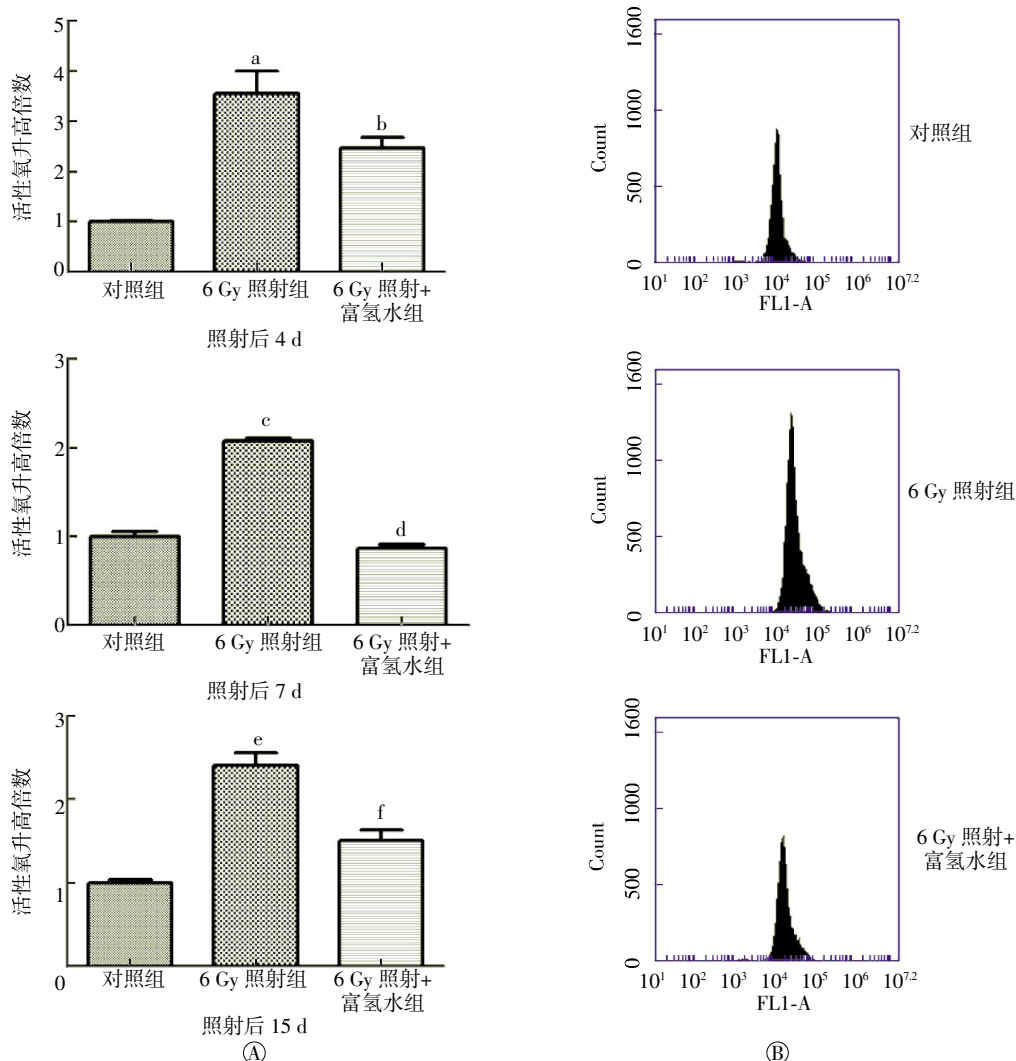


图1 富氢水对受照射小鼠胸腺细胞内活性氧水平的影响 图中, A: 富氢水对受照射后 4、7、15 d 小鼠胸腺细胞活性氧的影响; B: 照射后 4 d 代表性的活性氧变化流式示意图。其中, B 图中纵坐标 count 代表细胞数目, 横坐标 FL1-A 代表检测活性氧水平的发射光接收通道。与对照组比较, a: $t=5.607, P<0.05$; c: $t=16.080, P<0.05$; e: $t=8.946, P<0.05$; 与 6 Gy 照射组比较, b: $t=2.142, P<0.05$; d: $t=20.580, P<0.05$; f: $t=4.622, P<0.05$ 。

Fig.1 Effects of hydrogen-rich water on reactive oxygen species in thymus of irradiated mice

后 4、7、15 d 早期凋亡细胞 (Annexin V 阳性、PI 阴性)和晚期凋亡细胞(Annexin V 阳性、PI 阳性)百分比增加; 与单独 6 Gy 照射的小鼠相比, 给予富氢水的受照小鼠的胸腺细胞中早期凋亡和晚期凋亡细胞的百分比下降, 早期凋亡细胞百分比在照射后 4 和 15 d 仍然比对照组小鼠高, 只有在照射后 7 d 细胞凋亡水平低于对照组, 提示富氢水能够减轻辐照引起的胸腺细胞凋亡。

2.3 富氢水对辐照小鼠胸腺细胞 DNA 损伤的影响

如表 1 所示, 6 Gy 照射小鼠胸腺细胞在照射后 4、7、15 d 代表 DNA 损伤的 γ -H2AX 平均荧光强度增加; 与单独 6 Gy 照射的小鼠相比, 给予富氢水的受照小鼠的胸腺细胞 γ -H2AX 平均荧光强度

表 1 富氢水对受照小鼠胸腺细胞 γ -H2AX 平均荧光强度的影响($\bar{x}\pm s_x$)

Table 1 Effects of hydrogen-rich water on DNA damage in thymus of irradiated mice (mean fluorescence intensity of γ -H2AX)($\bar{x}\pm s_x$)

组别	照射后时间		
	4 d	7 d	15 d
对照组	10 093±286	10 562±554	12 780±197
6 Gy 照射组	15 574±1615 ^a	14 748±810 ^c	15 495±1286 ^e
6 Gy 照射+富氢水组	13 876±1743 ^b	12 836±1246 ^d	12 437±805 ^f

注: 表中, γ -H2AX: 磷酸化组蛋白 H2AX。与对照组比较, a: $t=7.472, P<0.05$; c: $t=9.059, P<0.05$; e: $t=4.666, P<0.05$; 与 6 Gy 照射组比较, b: $t=1.226, P>0.05$; d: $t=2.876, P<0.05$; f: $t=4.507, P<0.05$ 。

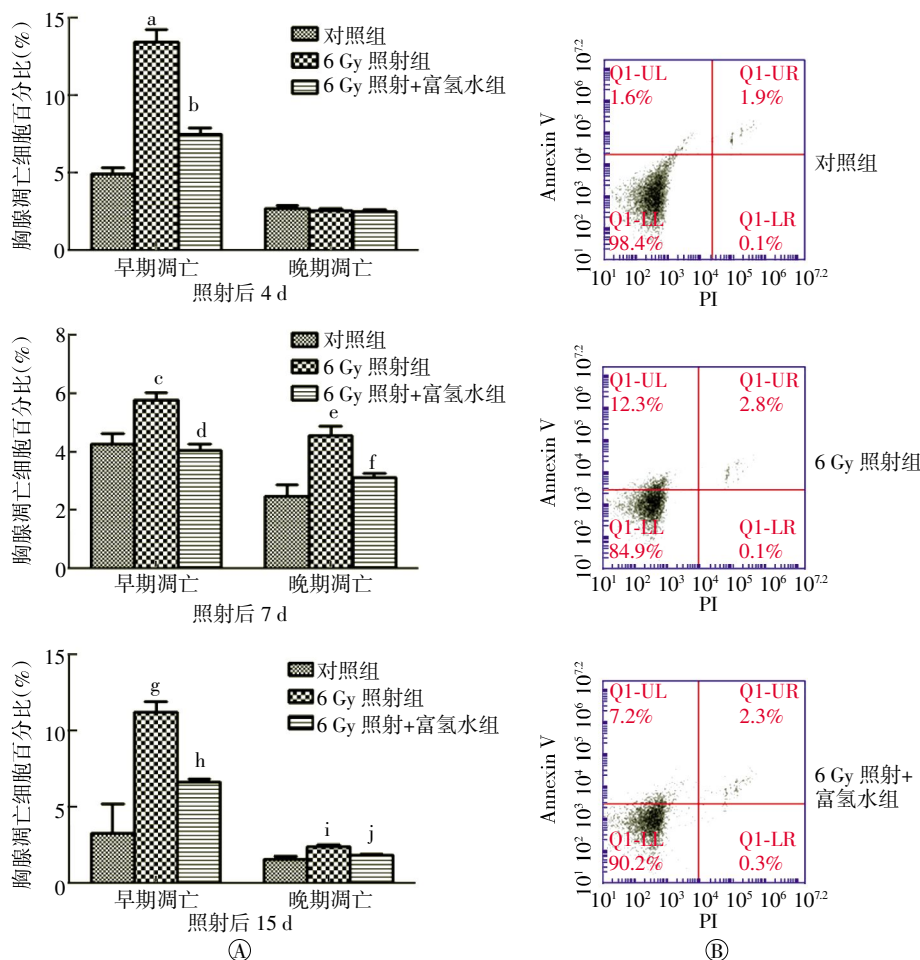


图2 富氢水对受照小鼠胸腺细胞凋亡的影响 图中, A: 富氢水对照射后4、7、15 d小鼠胸腺细胞早期凋亡和晚期凋亡的影响; B: 照射后15 d代表性的细胞凋亡变化流式示意图。其中, PI: 碘化丙啶。与对照组比较, a: $t=9.454, P<0.05$; c: $t=3.363, P<0.05$; e: $t=4.105, P<0.05$; g: $t=44.75, P<0.05$; i: $t=8.146, P<0.05$; 与6 Gy照射组比较, b: $t=6.588, P<0.05$; d: $t=5.068, P<0.05$; f: $t=4.114, P<0.05$; h: $t=9.677, P<0.05$; j: $t=4.855, P<0.05$ 。

Fig.2 Effects of hydrogen-rich water on apoptosis in thymus of irradiated mice

下降,照射后4和7 d仍然比对照组小鼠高,只有在照射后15 d γ -H2AX 平均荧光强度接近于对照组,提示富氢水能够降低辐照引起的胸腺细胞DNA损伤。

3 讨论

国内外已有研究结果显示,氢气可选择性地与活性氧中的羟自由基发生特异性反应,有效减轻氧压力导致的大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤,减轻电离辐射引起的小鼠生殖系统损伤、造血系统损伤以及减少胸腺淋巴瘤的形成^[3-7]。然而氢气对辐照引起的胸腺损伤是否具有防护作用尚无报道。本研究选取了细胞内活性氧、细胞凋亡及DNA损伤3个能够反映电离辐射直接效应与间接效应的指标,探究富氢水对胸腺电离辐射损伤的防护作用。研究结

果显示,在接受单独6 Gy照射后的4、7和15 d,胸腺细胞均出现不同程度的损伤,细胞内活性氧水平升高,早期凋亡和晚期凋亡细胞比例明显增加,照射后7 d,早期凋亡细胞百分比下降,晚期凋亡细胞百分比升高, γ -H2AX 平均荧光强度增加。具体表现在如下3个方面:①细胞内活性氧水平在照射后4 d较高,照射后7和15 d低于照射后4 d,提示随着照射后时间的延长,机体清除自由基的机制部分恢复,体内活性氧水平下降,这也与之前研究的照射后骨髓细胞内活性氧变化一致^[8]。与单独6 Gy照射的小鼠相比,给予富氢水的受照小鼠的胸腺细胞的活性氧水平明显降低,但是在照射后4和15 d仍然比对照组小鼠高,只有在照射后7 d活性氧水平低于对照组。造成这些结果的原因可能是由于本研究中给予小鼠富氢水7 d,故在第7天时

细胞内活性氧水平较低,而7 d后小鼠没有再饮用富氢水,从而导致照射后15 d活性氧水平高于照射后7 d。②早期凋亡细胞百分比在照射后4 d较高,照射后7和15 d则低于照射后4 d,照射后7 d达到最低;而晚期凋亡细胞百分比在照射后7 d达到最高,照射后4和15 d无明显区别,提示照射后7 d较多细胞进入晚期凋亡进而死亡,受损伤的细胞进入凋亡程序而被机体清除。与单独6 Gy照射的小鼠相比,给予富氢水的受照小鼠的胸腺细胞中早期和晚期凋亡细胞百分比降低,早期和晚期凋亡细胞在照射后4和15 d仍然比对照组小鼠高,照射后7 d低于对照组,与活性氧水平呈现一致趋势,提示给予小鼠富氢水的时间越长可能对胸腺起到更好的辐射防护作用。③H2AX是组蛋白家族成员之一,DNA双链断裂后可以诱导位于139位丝氨酸C端保守区域内的H2AX磷酸化形成 γ -H2AX,因此 γ -H2AX的形成一直作为DNA双链断裂的标志物^[9-10]。本研究结果表明,6 Gy照射后 γ -H2AX平均荧光强度明显增加,但在照射后4、7和15 d γ -H2AX平均荧光强度变化不大,无明显的时间依赖性。而与单独6 Gy照射的小鼠相比,给予富氢水的受照小鼠 γ -H2AX平均荧光强度明显降低,说明富氢水可以非常好地降低辐射诱导的DNA损伤。

总之,富氢水对重要的中枢免疫器官胸腺具有较好的辐射损伤防护作用,笔者在前期进行的动物30 d照射生存率实验也提示富氢水能够显著延长受照小鼠平均生存天数(未发表数据),提示富氢水能够有效减轻电离辐射引起的包括胸腺在内的机体损伤。今后,本实验室将深入研究富氢水对不同照射剂量引起的组织器官损伤的防护作用和相应作用机

制,进一步探讨富氢水的辐射防护功能,为开发富氢水作为辐射防护剂及其他防护剂的溶解载体提供重要的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Miller JF. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes[J]. *Immunol Rev*, 2002, 185(185): 7-14.
- [2] 张俊伶,路璐,李德冠,等. 基因芯片表达分析4 Gy γ 射线对小鼠骨髓c-kit阳性细胞影响. *国际放射医学核医学杂志*, 2015, 39(2): 116-120.
- [3] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic Oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13(6): 688-694.
- [4] Qian L, Shen J, Chuai Y, et al. Hydrogen as a new class of radioprotective agent[J]. *Int J Biol Sci*, 2013, 9(9): 887-894.
- [5] Zhao L, Zhou C, Zhang J, et al. Hydrogen protects mice from radiation induced thymic lymphoma in BALB/c mice[J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(3): 297-300.
- [6] Chuai Y, Gao F, Li B, et al. Hydrogen-rich saline attenuates radiation-induced male germ cell loss in mice through reducing hydroxyl radicals[J]. *Biochem J*, 2012, 442(1): 49-56.
- [7] Chuai Y, Shen J, Qian L, et al. Hydrogen-rich saline protects spermatogenesis and hematopoiesis in irradiated BALB/c mice[J]. *Med Sci Monit*, 2012, 18(3): BR89-BR94.
- [8] Wang Y, Liu L, Pazhanisamy SK, et al. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(2): 348-356.
- [9] Pouliliou S, Koukourakis MI. Gamma histone 2AX(γ -H2AX) as a predictive tool in radiation oncology[J]. *Biomarkers*, 2014, 19(3): 167-180.
- [10] Gerić M, Gajski G, Garaj-Vrhovac V. γ -H2AX as a biomarker for DNA double-strand breaks in ecotoxicology[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2014, 105(105): 13-21.

(收稿日期: 2015-07-24)