

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.17.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210611.0903.002.html\(2021-06-11\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210611.0903.002.html(2021-06-11))果糖对 γ 射线照射 V79 细胞的辐射保护作用*

胡静, 郑越

(解放军总医院医疗保障中心药剂科, 北京 100853)

[摘要] **目的** 探讨果糖对 γ 射线照射的中国仓鼠肺成纤维细胞(V79 细胞)的保护作用及其可能的保护机制。**方法** 根据实验方法将 V79 细胞分为对照组、辐射组和果糖组,对照组不做特殊处理,辐射组使用辐射处理,果糖组则在辐射组基础上加用果糖处理。采用克隆形成率实验、实验细胞的活力测定(MTS)法和台盼蓝排除法 3 种方法对果糖的保护作用进行研究,测定超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性,用二乙酸钠二氯荧光素(DCFH-DA)测定活性氧(ROS)水平。**结果** 与辐射组比较,果糖组 V79 细胞存活率提高,且与暴露于辐射前后的果糖添加时间无关。此外,与辐射组比较,果糖组 SOD 活性升高,ROS 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 果糖具有体外抗辐射活性,其通过提高细胞 SOD 活性和降低 ROS 水平来实现细胞保护作用。

[关键词] 果糖;辐射保护剂;V79 细胞;超氧化物歧化酶;过氧化氢酶**[中图分类号]** R965.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)17-2885-04Radioprotective effect of fructose on γ -irradiated V79 cells*

HU Jing, ZHENG Yue

(Department of Pharmacy, PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

[Abstract] **Objective** This study aimed to investigate the protective effect of fructose on γ -ray-irradiated Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cells) and its possible protective mechanism. **Methods** According to the experimental method, V79 cells were divided into the control group, the radiation group and the fructose group. The control group was not treated with special treatment, the radiation group was treated with radiation, and the fructose group was treated with fructose on the basis of the radiation group. Clone formation method, MTS method and trypan blue exclusion method were used to study the protective effect of fructose, the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured, the level of reactive oxygen species (ROS) was measured with dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). **Results** Compared with the radiation group, the survival rate of V79 cells in the fructose group increased regardless of the fructose addition time before and after exposure to radiation. Besides, compared with the radiation group, the activity of SOD in the fructose group increased, the level of ROS decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Fructose has anti-radiation activity in vitro, which achieves cell protection by increasing cell SOD activity and reducing ROS level.

[Key words] fructose; radioprotectant; V79 cells; superoxide dismutase; catalase

电离辐射是一种电磁波或粒子,当它通过物质时,能够产生离子,并立即引起生物组织的化学变化。一定时间后这些改变可能导致细胞损伤,最终也可能导致细胞或生物体死亡^[1]。这些细胞损伤对可能遭受军事、太空旅行的电离辐射暴露人群,以及接受放疗的癌症患者和核电行业的工作人员至关重要^[2]。有报道认为,活性氧(ROS)是电离辐射引起的细胞损伤的介质,因此,调节这些物质的化合物在保护细胞免受辐射损伤方面可能具有重要意义。近年,研究人员已

经投入了大量精力开发具有抗氧化作用的化学辐射保护剂,这些保护剂可以在进入放射性污染场所之前服用^[3-5]。然而,现有的辐射保护剂的辐射防护作用不够持久,毒性与其在细胞保护剂量下的使用有关,且在暴露于辐射前使用最有效^[2]。虽然适用于部分临床情况,例如放疗患者,但仍然无法应用于各种紧急情况。目前,阿米福汀是被美国食品药品监督管理局批准的放射性保护药物^[6],仍需要开发更多的保护剂。果糖是传统中药方剂四物汤中的主要活性成分,

* 基金项目:全军医学科技青年培育计划拔尖项目(16QNP079)。

作者简介:胡静(1979—),主管药师,本科,主要从事临床药理学研究。

已被证实能保护小鼠免受 γ 射线辐射^[7]。果糖通过阻止参与氧化还原循环的谷胱甘肽二硫化物外流,有效地防止呋喃妥因诱导的氧化应激而不产生细胞毒性^[8],通过抑制铁氧化来保护氧化剂诱导的细胞损伤,对氰化物、寡霉素、过氧化叔丁醇、甲萘醌和胱胺的毒性具有良好的防护作用,而果糖也是临床常用的化学放射保护剂的重要成分之一^[9]。所有这些都表明果糖可能是一种潜在的辐射防护剂,本文将初步探讨果糖的辐射防护作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

DMEM 细胞培养基和新生牛血清(NBS)购自新西兰 Invitrogen 公司。胰蛋白酶购自美国 Amresco 公司。果糖(纯度大于 99.5%)购自中国药品生物制品检定所(北京)。二乙酸二氯荧光素(DCFH-DA)购自瑞士 Fluka 公司。

1.1.2 细胞

实验使用中国仓鼠肺成纤维细胞(V79 细胞),将细胞培养于 25 cm² 培养瓶中,加入含 10% NBS 的 DMEM,青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μ g/mL,置于 5% CO₂、温度 37 $^{\circ}$ C 的培养箱中培养。根据实验方法分为对照组、辐射组和果糖组,对照组不做特殊处理,辐射组使用辐射处理,果糖组则在辐射组基础上使用果糖处理。

1.2 方法

1.2.1 辐射

辐照前 12 h 以适当的数量接种细胞,使细胞贴壁,室温下,以钴-60 源照射,剂量率 0.216 Gy/min。辐照后立即更换培养基。

1.2.2 克隆形成率实验

采用 V79 细胞单层培养法测定果糖的抑制细胞毒性和放射保护作用。选择每个培养皿细胞的数量,使 50~100 个菌落在特定处理后能够存活。将固定数量的细胞置于含有 2 mL 培养基的 35 mm 培养皿中,在添加不同浓度的果糖之前,让细胞贴壁 12~16 h。用预热的新鲜培养基(对照培养皿)或含药物培养基代替原培养基,再过 24 h 后,辐射培养皿,再用热的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 1 次,然后将细胞培养在 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 温育 3 d。所得的菌落用无水甲醇固定,吉姆萨染色,只计数超过 50 个细胞的菌落,细胞存活率用溶媒处理(培养基)对照的百分比表示。

1.2.3 实验细胞的活力测定(MTS)分析

细胞在 96 孔板上以 3×10^3 个细胞/孔的密度生长。培养 12 h 后,向细胞加入不同浓度(0、10、50、250、500 μ g/mL)的果糖,并在 37 $^{\circ}$ C 下将细胞再培养 24 h。孵育后,对细胞进行辐射,然后在照射细胞 48 h 后,加入 20 μ L MTS 溶液,在 37 $^{\circ}$ C 下再孵育 4 h。使用 VictorTM1420 酶标仪(芬兰 Wallac 公司)读取 490 nm

处吸光度。同理,相同方法测定了用果糖预处理 12 h 及后处理 48 h 的细胞暴露于辐射后活力变化。

1.2.4 台盼蓝排除法

将细胞培养在 25 cm² 的培养瓶中,培养 12 h 后,将不同浓度的果糖加入细胞中,细胞在 37 $^{\circ}$ C 再孵育 24 h。培养后,对细胞进行照射。照射 48 h 后,台盼蓝染色后进行细胞计数。将细胞悬浮液与相当体积的 0.4% 台盼蓝溶液混合,随后在光学显微镜下进行检测。细胞活力用存活细胞占细胞总数的百分比来表示。同理,相同方法测定了用果糖预处理 12 h 及后处理 48 h 的细胞暴露于辐射后活力变化。

1.2.5 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性的测定

测量 CAT 活性的方法按照文献^[10-11]描述。将细胞提取物添加到 3 mL 含 10 mmol/L H₂O₂ 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液中(pH 7.8),并立即在 240 nm 下测量。CAT 活性以每克蛋白质单位(U/mg)表示。

1.2.6 ROS 测定

用二乙酸二氯荧光素(DCFH-DA)检测 ROS。直接向培养基中加入 DCFH-DA 工作液 10 μ mol/L,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。然后用胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(EDTA)去除细胞,用流式细胞仪测量荧光增强的细胞数量。在测定果糖对 ROS 水平的影响时,细胞在照射前 24 h 暴露于果糖中,48 h 后用 DCFH-DA 染色。在 488 nm 和 525 nm 处读取吸光度(Ex 485 nm 和 Em 535 nm)。比较 3 组 2',7'-二氯荧光素(DCF)水平。

1.3 统计学处理

采用 Origin Pro7.5 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 V79 细胞的辐射敏感性

存活分数与辐射剂量的函数关系表明细胞对 γ 射线敏感,克隆形成率实验允许 SF2 的特性(2 Gy 存活分数)为 (0.58 ± 0.03) Gy,见图 1。

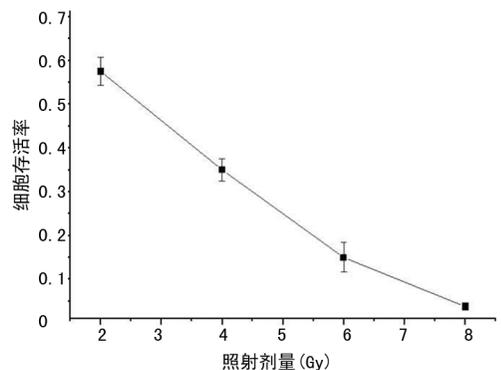


图 1 不同剂量 γ 射线照射后 V79 细胞的存活率

2.2 果糖对细胞存活的保护作用

在果糖存在的情况下,测量 2 Gy 照射后细胞克

隆形成存活率,结果显示即使在 1 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的高浓度下,果糖也没有表现出细胞毒性。在辐射前用不同浓度的果糖处理细胞 24 h,并测定不同果糖处理浓度的存活率,结果显示果糖的保护作用不同程度地依赖于果糖浓度。在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的低浓度下,与对照组比较,果糖组细胞存活率提高。果糖浓度从 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提升至 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞存活率也逐渐提高,在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到稳定,见图 2、3。

与辐射组比较,果糖组存活细胞均增多,且这种保护作用与暴露于辐射前后的果糖添加时间无关。MTS 法和台盼蓝排除法也证实了果糖对电离辐射的防护作用。用 MTS 法和台盼蓝排除法测定辐射后 48 h 细胞存活率,结果表明果糖组 V79 细胞存活率较对照组提高,见图 4~6。

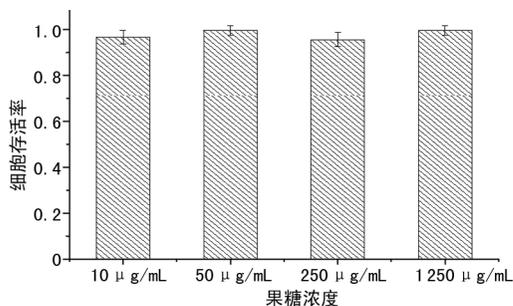
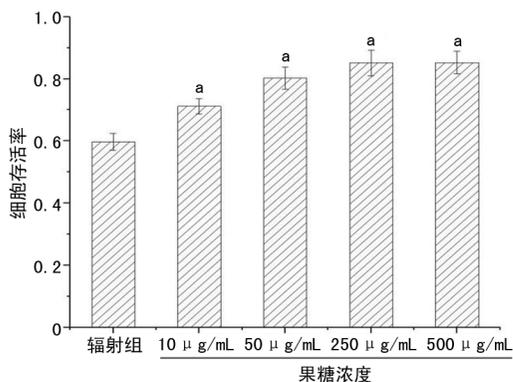
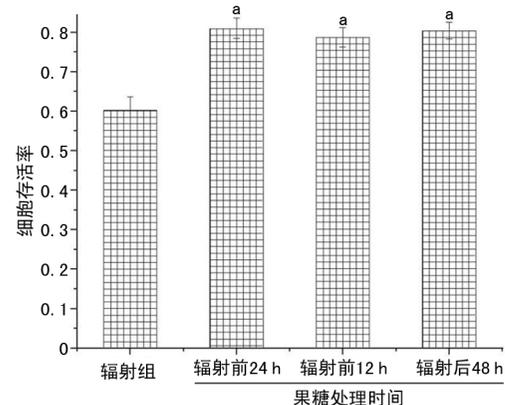


图 2 不同浓度果糖对 V79 细胞毒性的影响



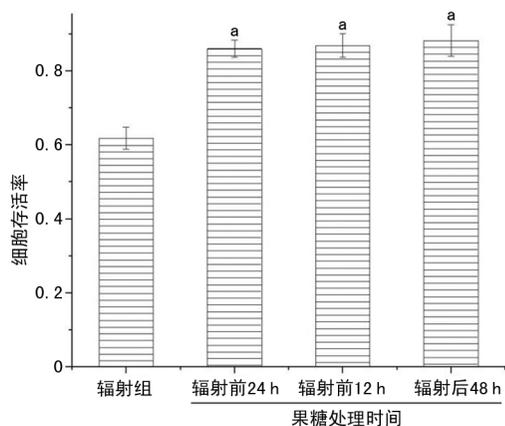
^a: $P < 0.05$, 与辐射组比较。

图 3 不同浓度果糖对 V79 细胞存活率的影响



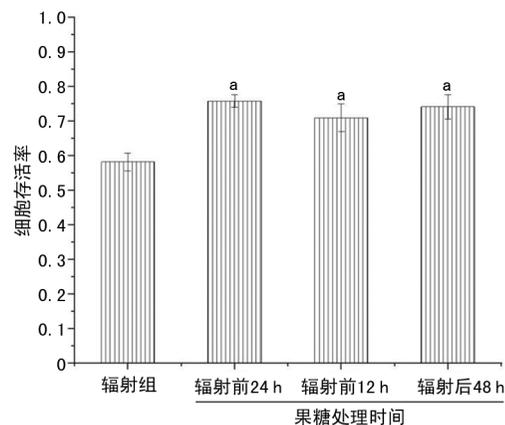
^a: $P < 0.05$, 与辐射组比较。

图 4 不同处理时间对 V79 细胞存活率的影响



^a: $P < 0.05$, 与辐射组比较。

图 5 MTS 法测定不同处理时间对 V79 细胞存活率的影响

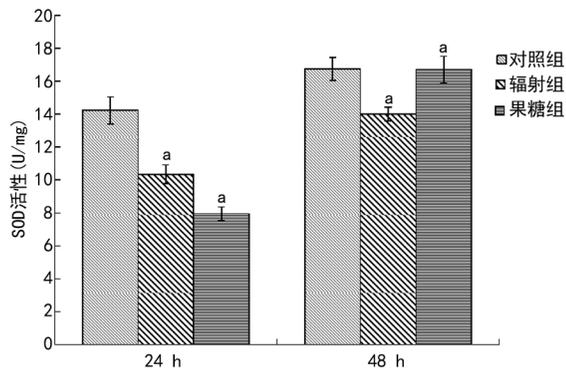


^a: $P < 0.05$, 与辐射组比较。

图 6 台盼蓝排除法测定不同处理时间对 V79 细胞存活率的影响

2.3 果糖对 SOD 和 CAT 活性的影响

辐射组在辐射 24、48 h 的 SOD 活性均低于对照组,果糖组 SOD 活性在辐射 24 h 明显降低,而在辐射 48 h 明显增加。24、48 h 后,对照组和果糖组 CAT 活性有明显差异,而辐射组和果糖组 CAT 活性基本一致,见图 7、8。

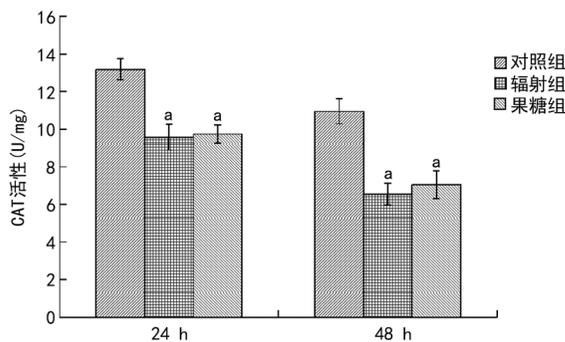


^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 7 果糖对 SOD 活性的影响

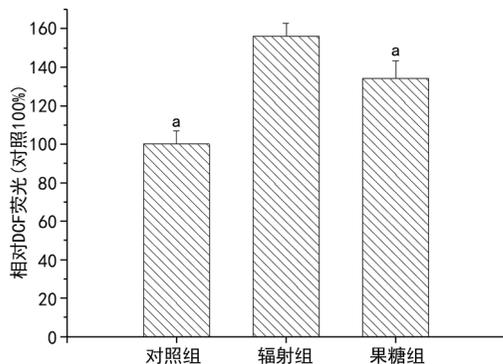
2.4 果糖对 DCF 荧光的影响

与对照组比较,辐射组 DCF 荧光增强,果糖组 DCF 荧光强度较辐射组降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 9。



a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 8 果糖对 CAT 活性的影响



a: $P < 0.05$, 与辐射组比较。

图 9 果糖对 DCF 荧光的影响

3 讨论

四物汤是由地黄、当归、川芎、芍药组成的传统经典名方,在我国已有一千多年的应用历史^[12],其具有造血、增强细胞免疫和放射防护等作用^[13]。果糖是四物汤的主要成分,已证实其在部分坏死和凋亡的细胞模型中具有细胞保护作用^[14]。然而,果糖是否具备保护细胞免受放射性损伤的能力还不得而知。本文报道了在 γ 射线照射下果糖对 V79 细胞具有辐射防护作用,并采用了 3 种方法检验,取得了一致性结果。

对于细胞保护机制,首先考虑通过增加糖酵解活性和产生三磷酸腺苷来介导^[15],笔者认为果糖也可以通过作用于其他部位来提供保护。众所周知,ROS 在辐射损伤过程中损害了细胞关键成分,如 DNA、蛋白质和脂类,从而导致细胞死亡,并最终导致组织的物理和化学损伤。针对活性氧的保护路径,已经发现多种抗氧化防御机制。这些抗氧化防御系统包括:(1)金属螯合物,如铜蓝蛋白和转铁蛋白,能够通过抑制 Fenton 或其他金属催化反应来防止 ROS 的形成;(2)低分子量抗氧化剂,如抗坏血酸,谷胱甘肽和生育酚;(3)ROS 相互作用的酶,如 SOD、CAT 和谷胱甘肽过氧化物酶^[16]。因此,本实验通过测定分析 SOD、CAT 活性及 ROS 水平,阐释了果糖对细胞的保护机制可能是通过刺激抗氧化酶来发挥其有效的抗氧化剂作用。

综上所述,果糖通过刺激 SOD 活性和降低 ROS 水平对 V79 细胞产生一定的抗辐射保护作用,其确切

机制及电离辐射导致细胞死亡的机制尚有待深入研究,以期开发新的辐射保护剂提供数据支撑。

参考文献

- [1] 陈慧峰,谭斯文,闫雪华,等. 不同剂量电离辐射对人外周血淋巴细胞 DNA 损伤修复相关基因转录水平的影响[J]. 中国辐射卫生, 2020, 29(1):7-12.
- [2] 马继飞,赵博兰,徐建军. 职业性放射性疾病的预防[J]. 劳动保护, 2020, 68(6):75-77.
- [3] AGBELE A T, FASORO O J, FABAMISE O M, et al. Protection against ionizing radiation-induced normal tissue damage by resveratrol: a systematic review[J]. Eurasian J Med, 2020, 52(3):298-303.
- [4] SHABEED D, KESHAVARZ M, SHIRAZI A, et al. Evaluation of the radioprotective effects of melatonin against ionizing radiation-induced muscle tissue injury [J]. Curr Radiopharm, 2019, 12(3):247-255.
- [5] NUSZKIEWICZ J, WOZNIAK A, SZEWCZYK-GO LEC K. Ionizing radiation as a source of oxidative stress-the protective role of melatonin and vitamin D[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(16):5804.
- [6] RANGANATHAN K, SIMON E, LYNN J, et al. Novel formulation strategy to improve the feasibility of amifostine administration [J]. Pharm Res, 2018, 35(5):99.
- [7] RAMIREZ-CAHERO H F, ANGELES V L M. Effect of gamma radiation on sugars and vitamin C: radiolytic pathways[J]. Food Chemistry, 2018, 245(15):1131.
- [8] LV T, GU Y, BI J, et al. Fructose 1,6-bisphosphate as a protective agent for experimental fat grafting[J]. Stem Cells Transl Med, 2019, 8(6):606-616.
- [9] ELSINGHORST A, TIKEKAR R V. Generation of oxidative species from ultraviolet light induced photolysis of fructose[J]. Food Chemistry, 2014, 154(1):276-281.
- [10] 朱梅菊,毛泽华,郭红英,等. 石菖蒲及 α -细辛醚对疲劳运动大鼠学习记忆的影响及其机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(4):306-311.
- [11] 姚鹏梅,刘倩倩,金婷,等. 原花青素 B2 通过抑制 NLRP3 活性减轻过氧化氢对 H9c2 细胞的损伤[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(11):1552-1557.

(下转第 2893 页)

- port[J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19:1014.
- [7] KASPRZAK A, ADAMEK A. Mucins; the old, the new and the promising factors in hepatobiliary carcinogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6):1288.
- [8] ALMANDIL N B, TAHA M, GOLLAPALLI M, et al. Indole bearing thiazole analogs: synthesis, β -glucuronidase inhibition and molecular docking study[J]. *BMC Chem*, 2019, 13(1):14.
- [9] 翟润. 1 743 例胆石病流行病学调查及危险因素分析[J]. *中国卫生产业*, 2017, 14(32):153-154.
- [10] 虞名旭, 林型城, 徐定银, 等. 规则性肝段/肝叶切除术对复杂性肝内胆管结石患者结石清除率、并发症及复发率的影响[J]. *数理医药学杂志*, 2020, 33(6):791-793.
- [11] LU H, YANG H, WU L, et al. A novel prognostic model for diagnosing atypical bile duct hyperplasia in patients with intrahepatic lithiasis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(17):e15364.
- [12] 周朦静, 陈兰英, 胡宏辉, 等. 白头翁皂苷 B4 对脂多糖诱导的急性肺损伤的保护作用研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(6):664-670.
- [13] YI G, LI H, LIU M, et al. Soybean protein-derived peptides inhibit inflammation in LPS-induced RAW264. 7 macrophages via the suppression of TLR4-mediated MAPK-JNK and NF-kappa B activation[J]. *J Food Biochem*, 2020, 44(8):e13289.
- [14] ZHAO L, YANG R, CHENG L, et al. Epithelial-mesenchymal transitions so bile duct epithelial cells in primary hepatolithiasis[J]. *J Korean Med Sci*, 2010, 25(7):1066-1077.
- [15] TIAN W, PIAO X M, YIN C R, et al. Adventitious root cultures of *Oplopanax elatus* inhibit LPS-induced inflammation via suppressing MAPK and NF-B signaling pathways[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2019, 55(9):766-775.
- [16] DLOUHA D, PROCHAZKOVA I, ERETOVA Z, et al. Influence of lipoprotein apheresis on circulating plasma levels of miRNAs in patients with high Lp(a)[J]. *Atheroscler Suppl*, 2019, 40:12-16.
- [17] 陈赛男, 谭迎, 肖筱婵, 等. TLR4 基因敲除对脓毒症小鼠急性肝损伤的影响[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(11):1425-1428.
- [18] SOCHA B M, ŁADA P, SZCZEPANSKA A A, et al. The influence of experimentally induced endometritis on the PPAR expression profile in the bovine endometrium[J]. *Theriogenology*, 2018, 122:74-83.
- [19] 程笑, 杨滢霖, 李伟瀚, 等. 秦皮甲素减轻脂多糖刺激小鼠急性肾损伤和炎性反应的作用及其机制[J]. *中国药学(英文版)*, 2020, 29(5):322-332.
- [20] 唐乾利, 黄欣, 俞渊, 等. 环境湿度对兔胆石症模型建造的影响[J]. *右江民族医学院学报*, 2013, 35(6):749-751.

(收稿日期:2020-12-18 修回日期:2021-05-13)

(上接第 2888 页)

- [12] ZUO H L, ZHANG Q R, CHEN C, et al. Molecular evidence of herbal formula: a network-based analysis of Si-Wu decoction[J]. *Phytochem Anal*, 2021, 32(2):198-205.
- [13] 刘霞, 李凡, 宋屿璠, 等. 四物汤药理及临床研究进展[J]. *中西医结合研究*, 2020, 12(6):392-395.
- [14] 安磊, 王珂, 孙雨辰, 等. 雪莲果中菊淀粉型低聚果糖的神经保护作用[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(10):34-39.
- [15] 张晶, 李昊, 师建辉, 等. 果糖与代谢性疾病[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(4):735-740.
- [16] 杨蕾, 凌玲, 郁多男. 红细胞抗氧化机制的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2020, 49(8):13-16.

(收稿日期:2020-12-24 修回日期:2021-04-12)