

## 二乙基硫辛酰胺抗辐射作用的生化机制

夏寿莹 沈倍奋 徐惠英 沈付生 毛慧生

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100800)

**提要** DELA ip 后能使小鼠肝糖原、血液乳酸和丙酮酸含量下降, 但[乳酸]/[丙酮酸]比值与正常值比较无明显差别, 提示机体似无缺 O<sub>2</sub> 现象. DELA 能引起细胞内源性 cAMP 升高, 抑制 TdR 激酶活性和 DNA 合成, 从而使辐射损伤受限, 修复能力增强. 糖代谢和核酸代谢改变的综合效应提高了机体对辐射的抗性.

**关键词** 抗辐射药; 二乙基硫辛酰胺; 糖代谢; 核酸代谢; 环磷酸腺苷

前文<sup>(1)</sup>报告了新辐射防护剂二乙基硫辛酰胺(DELTA)的代谢特点及其意义, 讨论机体如何处理药物. 本文研究 DELA 如何作用于机体, 影响糖代谢和核酸代谢的某些环节以及细胞内“第二信使”环磷酸腺苷(cAMP)含量的变化, 对 DELA 的抗辐射作用的生化机制提出初步看法.

## 方 法

**药物** DELA 由本所合成, 层析纯, 溶于油酸乙酯和蓖麻油(2:1)的混合液中, 11 mg/ml, ip 2.2 mg/鼠.

**动物** LACA 小鼠, ♀, 体重 20—26 g, 同批实验体重之差不大于 4 g.

## 糖代谢

1. 用比色法测定糖原<sup>(2)</sup>, 丙酮酸<sup>(3)</sup>和乳酸<sup>(4)</sup>.

2. 丙酮酸和葡萄糖消耗速率的测定 小鼠给药后取出组织, 用等渗盐溶液(NaCl 130 mM, KCl 12.8 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.65 mM, 磷酸缓冲液 5 mM, pH 7.4)制成匀浆, 分别与外加的丙酮酸溶液或葡萄糖溶液在 Warburg 呼吸仪中在充 O<sub>2</sub> 条件下振荡保温, 测定丙酮酸等的消耗速率.

## 核酸代谢

1. [<sup>3</sup>H]TdR 参入 DNA

1.1 体内参入 小鼠 ip DELA 后 15 min, 再 ip [<sup>3</sup>H]TdR 20 μCi, 1 h 后剖取骨髓和脾脏, 置 5% 三氯醋酸中匀浆, 离心, 去上

清液, 沉淀中加 1 ml 5% 三氯醋酸, 90°C 加热 20 min, 离心, 取 0.2 ml 上清液, 加乙二醇乙醚 2 ml, PPO-POPOP 甲苯闪烁液 4 ml 计数.

1.2 体外参入 取正常小鼠股骨 6 根, 用 7 ml Hanks 液冲骨髓, 制成均匀的细胞悬液, 分成 3 份, 每份 2 ml. 第 1 份按二苯胺法测定 DNA 含量; 第 2 份作参入试验的正常对照, 第 3 份加入 DELA. 在第 2 和第 3 份中各加 [<sup>3</sup>H]TdR 50 μl (0.1 μCi), 于 37°C 振荡保温 1 h, 离心, 洗涤, 消化和测量放射性如上.

2. TdR 激酶的测定 以小鼠骨髓细胞匀浆的 12000 × g 冷冻离心上清液为酶源, 保温基质含: [<sup>3</sup>H]TdR 5 μCi, 2 μM, ATP 2.5 μM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 μM, Tris 125 mM, pH 7.9 总容量 0.5 ml, 加匀浆上清液 0.1 ml, 37°C 保温 15 min, 于 100°C 灭活 2 min, 900 × g 离心, 取上清液用层析法分离 dTMP 并测量其放射性, 以 nmol/mg 蛋白质表示 dTMP 生成量<sup>(5,6)</sup>.

**cAMP 含量测定** 小鼠 ip DELA 后按时断头, 迅速取出肝与脾, 放干冰中冻结, 切成小块, 称取 30—50 mg, 投入 1 N 过氧酸中, 按蛋白质结合法测定<sup>(7)</sup>.

## 结 果 和 讨 论

**对糖代谢的影响** 鉴于不少辐射防护剂的作用机制是由于造成组织缺 O<sub>2</sub>. 从而改变了机体的辐射敏感性, 首先对此问题进行探讨. 小鼠 ip DELA 2.2 mg 后 15 min (最适有效时间) 和 4 h (基本失效时间) 采血, 测乳酸和丙酮酸含量, 并计算 [乳酸]/[丙酮酸] 比值, 同时测定肝糖原含量. 结果见表 1.

从表 1 可见给药后 15 min 血液乳酸、丙

Table 1. Effect of ip DELA on carbohydrate metabolism *in vivo*,  $\bar{x} \pm SD$  (number of mice)

	Before DELA	15 min	4 h
Liver glycogen(mg/g tissue)	23.8±0.3 (18)	4.1±0.5*** (14)	20.2±0.3* (18)
Blood lactic acid(mmol/l)	2.27±0.15(18)	1.11±0.07***(14)	1.89±0.18*( 8)
Blood pyruvic acid(μmol/l)	91±2 (18)	47±2*** (14)	83±10* ( 8)
[Lactic acid]/[pyruvic acid]	24.9±1.7 (18)	23.7±3.1* (14)	22.7±0.6 ( 8)

\*  $P > 0.05$ , \*\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.01$

酮酸和肝糖原含量都明显下降, 4 h 后回升。

在体内糖代谢的某些氧化还原型代谢物常与  $NAD^+ - NADH$  系统处于平衡状态:

[氧化型基质] [NADH]/ [还原型基质] [NAD<sup>+</sup>] =  $K/[H^+]$ , 如果反应平衡常数和 pH 已知, 即可从氧化型和还原型代谢物的浓度比值来推测 [NADH]/[NAD<sup>+</sup>]. 一般组织的氧化还原电位可通过 [α-甘油磷酸盐]/[二羟基丙酮磷酸盐]和[苹果酸盐]/[草酰乙酸盐]的比值测定, 但以血液[乳酸盐]/[丙酮酸盐]的比值最为常用. 由于乳酸和丙酮酸在体内扩散很快, 不与血液成分结合, 而在红细胞内又无细胞色素氧化酶, 所以血液中乳酸和丙酮酸的克分子浓度比值能够代表组织中的相应比值<sup>(8,9)</sup>.

DELA 虽能使血内乳酸和丙酮酸含量下降, 但无论在药物有效时期和失效时期的 [乳酸]/[丙酮酸]比值都与正常值相差甚微, 说明机体似乎没有缺 O<sub>2</sub> 现象。

此外, 取鼠脾匀浆与外加的丙酮酸和葡萄糖在充 O<sub>2</sub> 条件下振荡保温, 观察到 ip DELA 后 15 min 的鼠脾对丙酮酸和葡萄糖的三次平均消耗速率依次为 15.0 μg/mg/h 和 6.7 μg/mg/h, 而正常组则依次为 13.9 μg/mg/h 和 4.2 μg/mg/h, 给药组对底物的消耗速率增加, 但统计差别不显著. 虽然这里所用的组织与表 1 不同, 整体试验和离体试验条件不同, 但内

源性丙酮酸和糖原含量下降和外源性丙酮酸葡萄糖消耗速率增加在代谢方向上是一致的. 作者也曾用肝匀浆进行上述试验, 但由于内源性糖原的干扰, 实验误差大, 未获满意结果。

**对 DNA 合成的影响** 小鼠 ip DELA 后不同时间 [<sup>3</sup>H]TdR 参入骨髓, 脾脏 DNA 的情况见表 2. 在给药后 15 min, [<sup>3</sup>H]TdR 参入骨髓 DNA 受到暂时性抑制, 药后 4 h 即开始恢复, 12 h 接近正常. 脾脏 DNA 合成抑制的时间较长, 但 24 h 也恢复至正常值的 102%.

DELA 对离体骨髓细胞的 DNA 合成也有抑制作用, 在 2 ml 骨髓细胞悬液中加入 DELA 25 μg, 1 h 后 [<sup>3</sup>H]TdR 的参入率为 68±5 cpm/μg DNA, 而正常组则为 107±7 cpm/μg DNA (均 6 鼠). 当药量增大至 100 μg 时, 加药组的参入率为 56±2 cpm/μg DNA (5 鼠) 而正常组为 100±8 cpm/μg (5 鼠), 两组相比, 统计差别非常显著, 而且药量大时抑制重, 表明 DELA 对骨髓细胞似有直接保护作用<sup>(11)</sup>.

DELA 对 TdR 激酶也有抑制作用, 在测定骨髓细胞 TdR 激酶活性的保温基质中分别加入 50, 100, 200 μg DELA, 观察到 dTMP 生成量由正常的 132 nmol/mg 蛋白质依次下降至 113, 106, 97 nmol/mg 蛋白质. TdR 激酶是 DNA 合成过程中的关键性限速酶, 此酶

Table 2. Effect of DELA on incorporation of [<sup>3</sup>H]TdR into DNA *in vivo*  $\bar{x} \pm SD$  (number of mice)

Time after ip	Bone marrow (cpm/mg tissue)		Spleen (cpm/mg tissue)	
	Normal	DELA	Normal	DELA
15 min	193±14(15)	130±15***(15)	202±29(14)	124±25***(15)
4 h	218±32(15)	180±21** (12)	275±24(14)	162±26***(13)
12 h	184±24( 9)	175±24* ( 9)	292±36( 9)	176±29***( 9)

\*  $P > 0.05$ , \*\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.01$

Table 3. Effect of cAMP on incorporation of [<sup>3</sup>H]TdR into DNA of bone marrow and spleen.  $\bar{x} \pm SD$  (number of experiments)

	cAMP	Time of sampling	[ <sup>3</sup> H]TdR incorporated (cpm/mg) Normal	[ <sup>3</sup> H]TdR incorporated (cpm/mg) Experimental
Bone marrow	7 mg/mouse, ip	15 min	268 ± 23(6)	209 ± 22*(6)
Spleen	" "	15 min	247 ± 17(6)	194 ± 23*(6)
Bone marrow	0.5 mg/ml, <i>in vitro</i>	1 h	130 ± 11(8)	116 ± 14**(8)

\*  $P > 0.05$ , \*\*  $P < 0.05$

Table 4. Inhibition of TdR kinase activity of bone marrow cells *in vitro* by cAMP.  $\bar{x} \pm SD$

cAMP added (mmol)	Number of experiments	dTMP formed (nmol/mg protein)
0	8	13.0 ± 0.6*
5	7	12.1 ± 0.5*
10	6	11.5 ± 0.6*
20	6	10.3 ± 0.6**

\*  $P > 0.05$ , \*\*  $P < 0.05$

活性的变化与细胞周期的变化有密切关系<sup>(10)</sup>。本所赵林普等证明 DELA 能使小鼠骨髓细胞周期由 9 h 延长至 11 h, 上述结果和细胞周期的变化是吻合的。

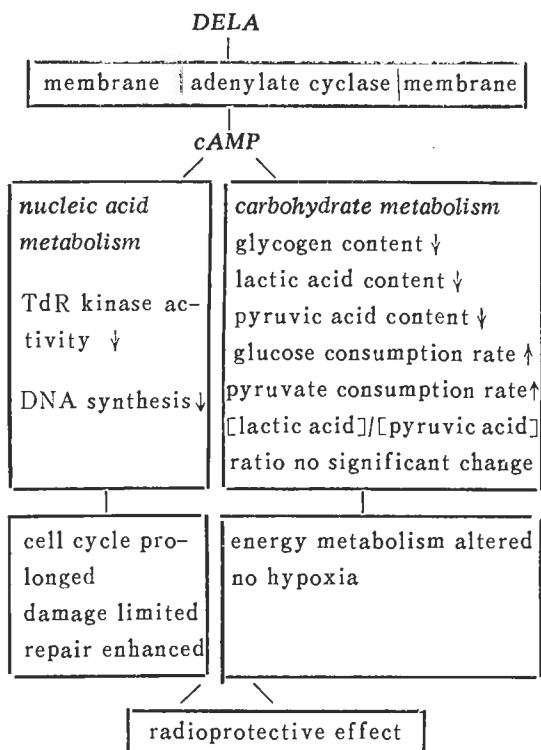


Fig 1. Diagram of mechanism of radioprotection of DELA

**对肝脾细胞内源性 cAMP 含量的影响** 观察了小鼠 ip DELA 后肝脾内源性 cAMP 含量的相应变化。每组 12 鼠, 在 ip 后 15 min, 肝 cAMP 含量为  $1.24 \pm 0.16$  pmol/mg 组织 (正常值  $0.95 \pm 0.07$  pmol/mg 组织); 脾 cAMP 含量为  $2.08 \pm 0.30$  pmol/mg 组织 (正常值  $1.61 \pm 0.20$  pmol/mg 组织), 肝脾 cAMP 含量升高 30% 左右, 差别显著。cAMP 能活化蛋白激酶, 从而使磷酸化酶活化, 促进糖原分解, 因此肝脏 cAMP 含量升高和表 1 中肝糖原下降是一致的。

**cAMP 对核酸代谢的调节作用** 观察了小鼠 ip cAMP 后 [<sup>3</sup>H]TdR 体内参入骨髓细胞 DNA 的情况, 同时也观察了 cAMP 对 [<sup>3</sup>H]TdR 参入离体骨髓细胞 DNA 的影响。结果在这两种条件下 cAMP 都有抑制作用(表 3)。

在试管中 cAMP 对骨髓细胞匀浆上清液中的 TdR 激酶也有抑制作用, 其抑制程度与 cAMP 浓度成正比(表 4)。

根据以上实验结果: 1) 肝脏内源性 cAMP 的升高和糖原的下降相一致; 2) ip cAMP 后 15 min 小鼠骨髓脾脏的 DNA 合成率下降; 3) cAMP 在体外能抑制 [<sup>3</sup>H]TdR 参入骨髓细胞 DNA; 4) cAMP 能抑制 TdR 激酶的活性, 可以认为 DELA 是通过 cAMP 来影响核酸代谢和糖代谢的。

**对 DELA 作用机制的初步看法** 综上所述, 作者初步认为 DELA 的作用可能是通过靶组织细胞膜上的腺苷环化酶, 使细胞内源性 cAMP 含量升高, 进而引起糖原、乳酸和丙

酮酸等含量下降。从乳酸和丙酮酸的浓度比值判断, 抗辐射作用似乎不是由于缺  $O_2$  所引起。从整体给药后的离体组织消耗丙酮酸的速率增加这一事实看, DELA 可能促进了丙酮酸的氧化, 改变了能量代谢。

DELA 引起的内源性 cAMP 升高抑制了 TdR 激酶活性, 影响了 DNA 合成。DNA 合成的暂时抑制使细胞分裂周期延长, 细胞的辐射损伤不致迅速扩大, DNA 合成所需的前体可以节省下来, 并使细胞在下次分裂前有足够时间和原料去修复辐射损伤。核酸代谢和糖代谢改变的综合效应, 降低了机体的辐射敏感性, 增强了机体的辐射抗性从而发挥防护作用(图 1)。

### 参 考 文 献

1 夏寿萱、徐惠英、陈能乾、沈倍奋. 中国药理学报. 1982年6月; 3(2):136

- 2 Hassis WZ, Abraham S. Determination of glycogen and starch. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in enzymology*, vol 3. 1st ed. NY: Academic Press, 1957:35
- 3 Rindi G, Ferrani G. *Experientia* 1956 Oct; 12(10):398
- 4 Pryce JD. *Analyst* 1969 Dec; 94(1125):1151
- 5 Adams RLP. *Exp Cell Res* 1969 Jul; 56(1):49
- 6 Weissman SM, Smellie RMS, Paul J. *Biochim Biophys Acta* 1960 Dec; 45(1):101
- 7 首都医院、军事医学科学院、中国科学院原子能研究所. 环磷酸腺苷的蛋白质结合测定法. 放射免疫分析及其他放射体外测定方法 1975年资料汇编. 北京: 原子能出版社, 1976:228
- 8 Lelièvre P, Liebecq C. Metabolic effects of sulfur-containing radioprotective agents. In: Bacq ZM, ed. *Sulfur-containing radioprotective agents*. 1st ed. Oxford: Pergamon Press, 1975: 222
- 9 Hohorst HJ, Krentz FH, Reim M. *Biochem Biophys Res Commun* 1961 Mar; 4(3):163
- 10 Stubblefield E, Murphree S. *Exp Cell Res* 1967 Dec; 48(3):652

*Acta Pharmacologica Sinica* 1982 Sep; 3(3): 193—196

## BIOCHEMICAL MECHANISM OF RADIOPROTECTION BY DIETHYL-LIPOAMIDE

XIA Shou-xuan, SHEN Bei-fen, XU Hui-ying, SHEN Fu-sheng, MAO Hui-sheng  
(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800*)

**ABSTRACT** After ip DELA into mice, the contents of liver glycogen, blood lactic acid and blood pyruvic acid decreased drastically at the time of optimal radioprotection, but the blood [lactic acid]/[pyruvic acid] ratio remained unchanged as compared with those of normal controls. In addition, DELA raised the contents of endogenous cAMP of spleen and liver, inhibited the activity of TdR kinase

and diminished the incorporation of [ $^3H$ ]TdR into DNA of bone marrow cells. The radioprotective action is attributed to the overall effects of these changes in carbohydrate and nucleic acid metabolism rather than to hypoxia.

**KEY WORDS** radioprotective agent; diethylipoamide; carbohydrate metabolism; nucleic acid metabolism; cAMP