

二乙基硫辛酰胺在小鼠引起组织低氧与其抗辐射作用的关系

吴德政 刘力力 刘东平 (军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100800)

提要 用微型 O_2 电极直接测定小鼠皮下组织 O_2 张力和 iv 中性红测定脾血流量的方法研究了抗辐射有效剂量(55 及 110 mg/kg)的二乙基硫辛酰胺(DELA)对组织 O_2 张力及血流供应的影响。结果证明它不仅降低皮下组织的 O_2 张力, 同时也明显降低脾的血流供应, 因而可导致脾组织低 O_2 , 它引起的组织低 O_2 效应呈剂量依赖关系。在时相上也与抗辐射有效时间相一致。因此本文提出了 DELA 通过降低辐射敏感器官组织 O_2 张力而提高机体辐射抗性的作用机制。

关键词 辐射防护剂; 二乙基硫辛酰胺; 皮下组织低氧; 脾血流量

二乙基硫辛酰胺(以下简称 DELA)是一种新型的抗辐射药, 在小鼠和狗具有较好的抗辐射作用, 可以明显提高全身照射致死剂量动物

的活存率, 对造血组织也有较好的防护作用。局部照射时对皮肤的辐射损伤也有一定的防护效果。临床放疗病人的试用结果表明, 本药在人体也具有一定的抗辐射作用, 且副作用很小, 有一定的实用前途。为此我们对 DELA 的抗辐射机制进行了研究。

实 验 方 法

选用 LACA 系 ♂ 小鼠, 70-75 日龄, 体重 $31.0 \pm (SD) 1.8 g$, 随机分为给药组或对照组。DELA 各剂量组均 ip 给药, 给药前、后分别测定小鼠后肢皮下组织的 O_2 张力及脾血流量的动态变化。

组织 O_2 张力的测定 小鼠以戊巴比妥钠

麻醉, 仰卧固定。将装入皮下针头内的微型 Clark O_2 电极刺入后肢腹侧皮下, 连续记录给药前后皮下组织 O_2 张力的动态变化。 O_2 电极的制作和详细测定方法同前文⁽¹⁾。 O_2 张力变化以相对值(ΔpO_2)表示, 即以给药前的组织 O_2 张力为 100%, 给药后不同时间测得的 O_2 张力值均以相当于给药前值的%表示。

脾血流量的测定 小鼠 iv 中性红后测定脾染料分布量的方法判定脾血流量⁽²⁾。即于 ip DELA 后 10, 20 及 30 min, 迅速由尾静脉 iv 0.25% 中性红 25 ml/kg, 5 min 后立即用颈椎脱臼法杀死, 取出脾脏, 按每 500 mg 脾加入酸化的 40% 乙醇(pH=4) 20 ml, 制成匀浆, 于 18-20°C 放置过夜。次日以 2400 × g 离心 20 min, 吸取上清液, 用 72 型分光光度计于 540 nm 处测消光值。结果以每 g 脾组织所含中性红的 μg 量表示。中性红含量降低示脾血流量的减少。

抗辐射效价的测定 以全身致死剂量照射时, 除观察小鼠 30 d 活存率外, 还观察对造血组织(脾和骨髓)的防护作用。小鼠全身照射 750 rad 后 d 8, 于尾静脉取血计数 WBC 总数; 然后取脾用 Bouin 氏液固定, 24 h 后肉眼计数脾表面凸起的内源性造血灶。此外, 还取出一侧股骨测定骨髓的 DNA 含量。方法参照文献⁽³⁾加以改进, 用 10 ml 0.005 M $CaCl_2$ 溶液冲出股骨内的骨髓, 于 4°C 放置 3 h, 离心后弃去上清液, 在沉淀物中加入 0.2 N $HClO_4$ 5 ml, 充分混合后置 90°C 水浴中水解 30 min, 冷却后过滤, 滤液在 268 nm 处测 UV 吸收。比较对照组及给药组的 WBC 总数、脾重、脾造血灶数及骨

髓 DNA 含量, 作为评定抗辐射效价的标准。

局部照射时以引起 50% 小鼠产生中度脱毛反应的半数脱毛剂量(HRD₅₀)进行评价。

结 果

DELA 对皮下组织 O_2 张力的影响 用 40 只小鼠分别观察了对照及给药后皮下组织 O_2 张力的动态变化, 结果列于表 1。10 只对照小鼠 ip 生理盐水或油酸乙酯(DELA 的溶剂)后 30 min 内 O_2 张力无明显降低, ΔpO_2 最低值为 $93 \pm 8\%$ 。DELA 28 mg/kg 组 8 只小鼠有 3 只在给药后可见较明显的 O_2 张力降低, ΔpO_2 于给药后 10-15 min 开始下降, 最低值为药前水平的 $37 \pm 17\%$, 持续时间较短, 于注药后 40-50 min 即恢复至给药前水平, 其余 5 只小鼠注药后 O_2 张力均无明显变化, 最低值平均为 $93 \pm 16\%$; 8 只鼠的平均最低值为 $72 \pm 33\%$ 。最适有效剂量 55 mg/kg 组 15 只小鼠给药后可见明显 O_2 张力下降, 于注药后 10 min 即开始, 15 min 后处于较低水平, 以后继续下降, 30 min 内最低值平均为 $39 \pm 24\%$ 。1 h 后仍停留于较低水平($44 \pm 21\%$)。110 mg/kg 时组织 O_2 张力下降更甚, 7 只小鼠在给药后 10 min 全部下降至很低(平均为 $36 \pm 22\%$), 30 min 内最低值为 $26 \pm 20\%$, 30 min 后有回升趋势, 其中仅 2 只小鼠在给药后 1 h 恢复至药前水平, 其余 5 只仍停留于较低水平, 平均值为药前水平的 $54 \pm 32\%$ 。上述 DELA 组小鼠在组织 O_2 张力明显降低时, 皮肤粘膜外观色泽正常, 无紫绀或其他缺 O_2 征象。

从表 1 可见剂量越大, 组织 O_2 张力下降速

Tab 1. Influence of ip DELA on subcutaneous tissue O_2 tension (pO_2 %). $\bar{x} \pm SD$

| DELA (mg/kg) | Mice | Time (min) after DELA | | | | | | | | | |
|-----------------|------|-----------------------|----------|---------|---------|----------|----------|---------|---------|---------|--|
| | | 0 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 40 | 50 | 60 | |
| 0 | 10 | 100 | 97 ± 9 | 98 ± 11 | 97 ± 7 | 100 ± 16 | 111 ± 20 | — | — | — | |
| 28 | 8 | 100 | 101 ± 20 | 90 ± 25 | 80 ± 28 | 88 ± 36 | 85 ± 25 | 82 ± 26 | 82 ± 30 | 90 ± 36 | |
| 55 | 15 | 100 | 90 ± 24 | 69 ± 32 | 55 ± 29 | 46 ± 25 | 47 ± 26 | 47 ± 17 | 42 ± 17 | 44 ± 21 | |
| 110 | 7 | 100 | 36 ± 22 | 35 ± 24 | 38 ± 24 | 40 ± 19 | 55 ± 19 | 57 ± 19 | 48 ± 25 | 54 ± 32 | |

Tab 2. Correlation between DELA-induced tissue hypoxia and the radioprotective effect in mice

| DELA (mg/kg) | pO ₂ of subcutaneous tissue ⁽¹⁾ (%) | Radioprotective effect Skin protection (DRF) ⁽²⁾ | Survival rate ⁽³⁾ (%) |
|--------------|---|---|----------------------------------|
| 0 | 98 | — | 15 |
| 28 | 90 | — | 22 |
| 55 | 69 | 1.10 | 62 |
| 110 | 35 | 1.14 | 70 |

(1) Compared with pre-drug level. (2) Dose reduction factor calculated on the basis of 50% hair reaction dose. (3) After 850 rad total body irradiation

度越快,最低值也更低。将 O₂ 张力的变化与抗辐射效价进行比较时发现, ΔpO₂ 与对皮肤辐射损伤的防护效价,以及对整体的防护效价,均存在着相关关系。从表 2 中可以看出,55 mg/kg 组药后 10-15 min (相当于最适有效防护时间)的 ΔpO₂ 为 69±31%,对皮肤辐射损伤的 DRF (剂量减低系数)为 1.10; 110 mg/kg 组的 ΔpO₂ 为 26±20%,其 DRF 为 1.14。大剂量组 O₂ 张力降低幅度大,效价也较高,但效价的增长似乎与 ΔpO₂ 的减少不成比例。这提示皮肤组织(特别是毛囊)与皮下组织 O₂ 张力的变化可能不完全一致,或者还存在着其他影响效价的因素。此外,组织 O₂ 张力降低和整体的防护效价也有较好的相应关系。28 mg/kg 组 O₂ 张力降低不明显,对整体的防护效价也较差,55 及 110 mg/kg 组药后 O₂ 张力明显降低,对整体的防护效价也较好,存活率分别提高 47% 及 55%,其中 110 mg/kg 组 ΔpO₂ 最低,提高存活率也较多。这一结果提示皮下组织 O₂ 张力的降低情

况,可能也反映了其他重要器官 O₂ 张力的变化,所以不仅和局部组织的防护效价相关,同时和整体的防护效价也有较好相关。为此我们又研究了和造血机能有关的脾组织给药前后血流供应的变化,以间接反映其 O₂ 张力的改变情况。

DELA 对脾血流量的影响 用 141 只小鼠,分批进行实验,随机分组,每组 10-15 只小鼠,对照组不给药,其余各组 ip DELA 55 mg/kg。各组小鼠分别于给药后 10, 20 及 30 min iv 中性红,5 min 后杀死取脾,测中性红,结果列于表 3。各组一般重复 3 次,结果一致,从表 3 可见,ip 有效剂量的 DELA 后,脾重仅有轻微下降,10 min 后为对照的 96%; 20 min 时最低,为对照的 84%; 30 min 又趋恢复(为 95%)。而相应时间脾脏中性红含量的下降却非常显著,注药后 10 min 仅为对照的 4%。20 min 回升为 32%,30 min 仍为 34%。上述结果表明 DELA 可使小鼠的脾血流量显著降低,因而减少了局部组织 O₂ 的供应,造成脾组织的低 O₂ 状态。

为了说明脾血流量下降与抗辐射效价的相关性,还观察了照前 10 min 小鼠 ip DELA 55 mg/kg 对造血组织的防护作用,并和相应时间的脾血流量减低%作了比较,结果证明二者间存在较好的相关。给药后 10 min 脾血流量降低为正常的 4%,相应条件下对脾组织的防护效价也较高,给药组照后 d 8 的脾重及脾结节数均较对照组明显增高,且外周 WBC 数及骨髓 DNA 量也较对照组明显增高(表 4)。

Tab 3. Influence of DELA (55 mg/kg) on splenic blood flow as revealed by the decrease of neutral red content in spleen. $\bar{x} \pm SD$

| Time (min) after DELA | Mice | Spleen weight (mg) | (%) | Neutral red content in spleen (μg/g) | (%) |
|-----------------------|------|--------------------|-----|--------------------------------------|-----|
| 0 | 45 | 123±37 | 100 | 73±30 | 100 |
| 10 | 45 | 118±23 | 96 | 3±5 | 4 |
| 20 | 21 | 103±21 | 84 | 23±11 | 32 |
| 30 | 30 | 117±16 | 95 | 25±16 | 34 |

Tab 4. Relation between DELA-induced reduction of splenic blood flow and radioprotective effect.

 $\bar{x} \pm SD$, * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

| | Splenic blood flow (%) | Spleen weight (mg) | WBC (/mm ³) | Number of blood forming colony/spleen | Bone marrow DNA content/femur (OD value) |
|---------|------------------------------|--------------------------|----------------------------|---|--|
| Control | 100 | 29 ± 5 | 1580 ± 968 | 4 ± 4 | 0.28 ± 0.10 |
| DELA | 4 | 42 ± 17** | 2710 ± 1020** | 19 ± 17*** | 0.98 ± 0.46 |

在时相上脾血流量的降低以注药后 10 min 作用最强, 20-30 min 时有回升趋势, 但仍处于较低水平, 这与该药的抗辐射有效时间范围, 10 min 效价最高, 其后效价下降, 但在 1 h 内仍继续有效, 基本一致. 参见表 5.

讨 论

应用 O₂ 电极直接测定整体动物皮下组织 O₂ 张力的动态变化, 是研究药物对组织 O₂ 张力影响的极好方法, iv 中性红染料后 5 min 内, 绝大部分染料均停留在血循环内, 通过测定某一器官内染料的分佈量可以反映该器官的血液循环状态, 故是定量测定小鼠脾血流量的较好方法. 血流量的减低和组织 O₂ 张力的下降情况是一致的, 所以脾血流量的减低可以间接反映脾组织 O₂ 张力降低的程度⁽⁴⁾. 本文采用上述两种方法证明了 DELA 不仅可降低皮下组织的 O₂ 张力同时又可降低脾的血流供应, 因而造成脾组织的低 O₂ 状态. 这一药物引起的组织低 O₂ 与剂量大小呈依赖关系, 而且在时相上与抗

辐射有效时间相一致, 证明 DELA 在机体内可通过减低重要辐射敏感器官组织的血流供应, 造成组织低 O₂, 从而提高机体辐射抗性的作用机制. 给药后 10, 20 及 30 min 脾的血流供应分别减低为对照的 4%, 32% 及 34%, 而皮下组织相应时间 O₂ 张力降低的平均值为 90%, 55% 及 47%, 表明 DELA 对脾脏的作用明显强于皮下组织. 这提示给药后机体内不同组织器官的 O₂ 张力变化情况, 在量的方面可能并不完全相同, 因而, 不同组织器官表现的抗辐射效价高低也不一致.

给小鼠吸入低 O₂ 空气(含 O₂ 10%, 7% 或 4.6%)后, 脾的 O₂ 张力分别降低为正常的 36%, 27% 或 10%, 其抗辐射效价也成比例的增高, 相应的 DRF 为 1.24, 1.73 和 1.96. 给予 5-HT 或对氨基苯丙酮后, 也可使脾的 O₂ 张力分别降低为 53% 和 35%, 相应的 DRF 为 1.77 和 1.74. 他们发现将脾的相对 O₂ 张力值 X (当 X < 1 时) 对抗辐射效价 (Y = 1/DRF) 作图时, 可获得近似直线关系. 因此认为 5-HT 的抗辐射机制主要为通过造成脾脏组织低 O₂ 所致⁽⁵⁾. 别人^(2, 6) 也证实了上述的假设. 关于含 S 抗辐射药的作用机制是否与组织低 O₂ 有关, 研究较少. WR-2721 可引起明显的周围血管扩张和血压下降, 因而有可能导致组织低 O₂, 推测 WR-2721 的抗辐射机制可能与引起组织低 O₂ 有关, 但无直接证据⁽⁷⁾. DELA 为另一类型的含 S 抗辐射药, 本文证明组织低 O₂ 是 DELA 产生抗辐射作用的重要环节, 这将为其他含 S 抗辐射药的作用原理提供线索.

Tab 5. Correlation between duration of drug action on splenic blood flow and radioprotective effect.

| Time (min) after DELA | Splenic blood flow (%) | Survival rate (%) after 850 rad total body irradiation |
|-----------------------------|------------------------------|--|
| 0 | 100 | 0 |
| 10 | 4 | 60 |
| 20 | 32 | — |
| 30 | 34 | 45 |

参 考 文 献

- 1 吴德政、刘力力、刘东平。待发表。
- 2 Горелова НВ, Антипов ВВ, Васин МВ. *Радиобиология* 1977 Май-июнь; 17 (3) : 414
- 3 Cole LJ, Ellis ME. *Radiat Res* 1957 Nov; 7 (5) : 508
- 4 Ehrly AM, Schroeder W. Oxygen pressure value in the ischemic muscle tissue of patients with chronic occlusive arterial disease. In: Silver IA, Erecinska M, Bicher HI, eds. *Oxygen transport to tissue-III. Advances in experimental medicine and biology*; vol 94. 1st ed. NY: Plenum Press, 1978 : 401-5
- 5 Hasegawa AT, Landahl HP. *Radiat Res* 1967 Jul; 31 (3) : 389
- 6 Streffer C. Studies on the mechanism of 5-hydroxytryptamine in radioprotection of mammals. In: Locker A, Flemming K, eds. *Radioprotection chemical compounds biological means*. 1st ed. Basel: Birkhauser, 1977 : 71-7
- 7 Yuhas JM. Systemic factors affecting the radioprotective effectiveness of phosphorothioates. *Ibid* 1977 : 63-70

Acta Pharmacologica Sinica 1983 Dec; 4 (4) : 283-287

RELATIONSHIP BETWEEN DIETHYL LIPOAMIDE (DELA)-INDUCED TISSUE HYPOXIA AND RADIATION-PROTECTIVE EFFECT IN MICE

WU De-zheng, LIU Li-li, LIU Dong-ping

(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800*)

ABSTRACT Subcutaneous tissue O_2 tension and splenic blood flow were determined by O_2 microelectrode and dye (neutral red)-distribution technique. DELA at radioprotective dose levels (55 and 110 mg/kg) decreased both subcutaneous tissue O_2 tension and blood supply to spleen resulting in tissue hypoxia. The DELA-induced tissue hypoxia was dose-dependent and followed the same time course

as the radioprotective effect.

These results suggest that the tissue hypoxic effect of DELA is responsible for its radioprotective action.

KEY WORDS radiation-protective agent; diethyl lipoamide; hypoxia in subcutaneous tissue; splenic blood flow