

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00963

富 H₂ 溶液对人肾小管上皮细胞辐射损伤的防护作用

郭佳铭¹, 杨彦勇¹, 刘 文¹, 高 福¹, 蔡建明¹, 赵华林², 李百龙^{1*}

1. 第二军医大学海军医学系舰船辐射医学教研室, 上海 200433

2. 潍坊市食品药品检验检测中心, 潍坊 261205

[摘要] **目的** 探讨富 H₂ 溶液对人肾小管上皮细胞(HK-2 细胞)辐射损伤的防护效应及机制。**方法** 将 HK-2 细胞分为 4 组:对照组、H₂ 组、照射组和照射加 H₂ 组。对照组和照射组细胞加入 5 mL 无 H₂ 的 PBS 溶液, H₂ 组和照射加 H₂ 组细胞则加入等量饱和 H₂ 溶液, 孵育 10 min 后将照射组和照射加 H₂ 组利用⁶⁰Co γ 射线以 6 Gy 剂量照射 325 s, 随即用比色法测定细胞丙二醛(MDA)含量变化; 37℃ 条件下与羟苯基荧光素(HPF)荧光探针孵育 15 min 后测定细胞内羟自由基(·OH)水平; 照射后 24 h 用流式细胞仪检测细胞凋亡情况; 照射后每天计数各组细胞克隆形成以反映各组细胞存活率, 观察 10 d。**结果** 富 H₂ 溶液可以提高 HK-2 细胞经 6 Gy 照射后第 10 天的细胞存活率($P < 0.05$), 并且能明显减少照射后 24 h 细胞凋亡水平($P < 0.01$); 富 H₂ 溶液还可以降低受照细胞的 MDA 水平($P < 0.05$)以及 ·OH 水平($P < 0.05$)。**结论** 富 H₂ 溶液对⁶⁰Co γ 射线导致的 HK-2 细胞辐射损伤有较好的防护作用。

[关键词] 富氢溶液; 辐射损伤; 抗氧化剂; HK-2 细胞**[中图分类号]** R 818.05**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2014)09-0963-05

Protective effects of hydrogen-rich saline against γ-ray irradiation-induced injury in kidney epithelial HK-2 cells

GUO Jia-ming¹, YANG Yan-yong¹, LIU Wen¹, GAO Fu¹, CAI Jian-ming¹, ZHAO Hua-lin², LI Bai-long^{1*}

1. Department of Warship Radiation Medicine, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Center for Food and Drug Control of Weifang, Weifang 261205, Shandong, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effects and mechanism of hydrogen-rich saline against γ irradiation-induced injury in kidney epithelial HK-2 cells. **Methods** HK-2 cells were divided into 4 groups: the control group, the hydrogen-treated group, the irradiated group, and the irradiation plus hydrogen-treated group. The hydrogen-treated group and the irradiation plus hydrogen-treated group were pretreated with 5 mL hydrogen-rich solution while the control group and the irradiated group with 5 mL non-hydrogen PBS for 10 min, then the irradiated group and the irradiation plus hydrogen-treated group were simultaneously treated with γ-irradiation (6 Gy) for 325 s. The malondialdehyde (MDA) changes were determined by colorimetric method, and the hydroxyl radicals(·OH) were examined after being incubated with HPF for 15 min at 37℃. Flow cytometry was used to observe the apoptosis rates of HK-2 cells 24 h after irradiation, and the cell survival was examined by clonogenic assay every 24 h until the 10th day. **Results** Hydrogen-rich saline significantly improved the survival of HK-2 cells at the 10th day after 6 Gy irradiation($P < 0.05$), and significantly decreased the apoptosis rates of HK-2 cells ($P < 0.01$). It was also found that hydrogen-rich saline significantly down-regulated MDA level ($P < 0.05$) and ·OH level in irradiated HK-2 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Hydrogen-rich saline has a protective effect against γ-irradiation-induced injury in HK-2 cells.

[Key words] hydrogen-rich saline; radiation injuries; antioxidants; HK-2 cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(9):963-967]

随着核辐射在军事、医疗和能源等方面的广泛应用, 人类受照射的概率大大增加, 核辐射潜在风险越来越高。大剂量电离辐射除造成胃肠道^[1]、造血系统^[2]、性腺^[3]等辐射敏感器官损伤之外, 还可以导

[收稿日期] 2014-01-22 **[接受日期]** 2014-05-08**[基金项目]** 国家自然科学基金(81072241). Supported by National Natural Science Foundation of China(81072241).**[作者简介]** 郭佳铭, 硕士生. E-mail: smmguojiaming@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871149, E-mail: libailong2013@163.com

致肾脏损伤及其功能障碍^[4-5]。另外,腹部肿瘤患者在大剂量放疗时极易导致放射性肾炎,其机制主要是电离辐射作用于肾脏细胞尤其是肾小管上皮细胞(HK-2细胞),通过直、间接作用导致细胞损伤进而产生一系列病理改变,最终致使肾脏功能衰竭^[5-6]。然而,对于放射性肾脏损伤尚无有效治疗手段,重在预防^[7-8],因此寻找高效、低毒的辐射防护剂对于放射性肾炎的防治具有重大意义。

2007年Ohsawa等^[9]报道,氢气(H₂)具有选择性清除羟自由基(·OH)和过氧化亚硝基阴离子(ONOO⁻)的生物活性,显示较强的抗氧化效应。本课题组前期研究发现,富H₂溶液对整体动物及细胞具有较好的辐射防护效果,并能减轻免疫系统、生殖系统、造血系统和心肌组织的辐射损伤^[10-13]。国外学者也报道氢气可减轻放射性肺损伤^[14],但是关于富H₂溶液对放射性肾脏损伤的防护作用的研究还未见报道。本研究以HK-2细胞为研究对象,观察饱和富H₂溶液对HK-2细胞的辐射防护效果,初步探讨富H₂溶液的辐射防护作用机制,为新型辐射防护剂的研究提供理论和实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 HK-2细胞购自上海拜力生物科技有限公司,Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒购自上海碧云天公司, MEM培养基和胎牛血清购自美国PAA公司。2-[6-(4'-羟基)苯氧基-3H-占吨醇-3-on-9-yl]-苯甲酸[羟苯基荧光素(HPF)荧光探针]购自日本Daiichi公司。流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司,使用奥林巴斯BX60荧光显微镜进行观察,用第二军医大学辐照中心⁶⁰Co辐射源进行照射。

1.2 富H₂溶液的制备 采用特种装置,先将磷酸盐缓冲液(PBS)内充入纯H₂,在加压仓内高压(0.4 MPa)下放置4 h以上,以便使H₂充分溶解,使其达到饱和状态。利用液体H₂浓度测试电极(Biogas Analyzer Systems-1000, Mitleben, 日本)进行浓度测试,检测发现制备的富H₂溶液中H₂达到过饱和浓度(0.814 mmol/L)。

1.3 HK-2细胞处理与照射 HK-2细胞用含10%胎牛血清的MEM培养基,在37℃、5% CO₂及饱和湿度的细胞培养箱中培养。将对数生长期的HK-2

细胞分为对照组、H₂组、照射组和照射加H₂组。细胞照射前,H₂组和照射加H₂组细胞离心后各加入5 mL的富H₂溶液,对照组和照射组加入等量无H₂的PBS溶液,孵育10 min后,照射组和照射加H₂组分别同时给予6 Gy ⁶⁰Co γ射线照射,照射时间为325 s。细胞照射后继续培养,用于后续实验。

1.4 细胞克隆形成实验 各组细胞照射后,进行计数,将细胞悬液以200个细胞/孔的密度加入至每孔含有2 mL MEM培养液的6孔板中。每天观察细胞的生长情况,当细胞集落生长到一定程度时(肉眼可见克隆时,本实验为第10天)终止培养。甲醇固定10 min,吉姆萨应用液染色20 min,流水洗净,空气干燥后进行克隆计数分析。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡 采用Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。照射后24 h,将细胞制成5×10⁶/mL的细胞悬液,PBS洗2次弃上清,加入50 μL PBS重悬。每50 μL体系加入1.5 μL Annexin V-FITC 温室避光孵育15 min,再加入2 μL PI,5 min后上机检测^[10]。

1.6 MDA含量测定 收集各组细胞,裂解并高速离心后取适量上清液,应用比色法检测MDA。根据试剂盒说明书计算MDA含量。

1.7 细胞内·OH水平的测定 各组细胞照射前加入HPF(终浓度为10 μmol),用6 Gy γ射线照射后,37℃孵育15 min。荧光显微镜下观察并拍照。用IPLabSpectrum图像分析软件(版本4.0,美国Scanalytics公司)对单个细胞中的HPF平均荧光强度进行定量分析。每次实验各剂量组随机选取5个不同的视野,随机检测50个细胞的荧光强度值^[10]。

1.8 统计学处理 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS13.0软件进行统计学分析,组间比较采用方差齐性的成组t检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 富H₂溶液增加HK-2细胞照射后存活率 照射后第10天计数各组细胞克隆形成率,结果显示:照射加H₂组HK-2细胞克隆形成率明显高于照射组(图1),差异具有统计学意义($P < 0.05$),说明富H₂溶液对HK-2细胞有一定的辐射防护作用。

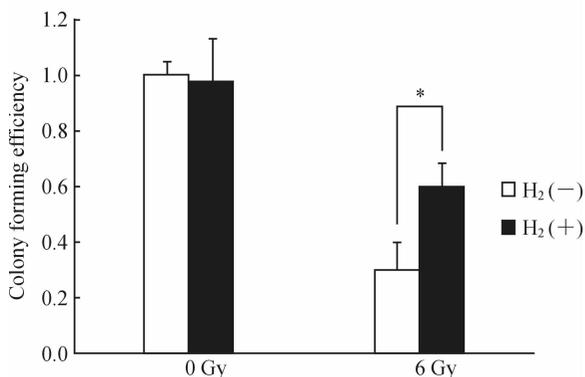


图1 富H₂溶液明显提高HK-2细胞照射后克隆形成率

Fig 1 Hydrogen-rich saline notably enhanced the cloning efficiency of irradiated HK-2 cells

* $P < 0.05$; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.2 富H₂溶液降低辐射诱导的HK-2细胞凋亡
照射后24 h,检测各组的细胞凋亡水平。结果显示,两照射组的细胞凋亡率高于对照组及H₂组,而照射加H₂组的细胞凋亡率明显低于照射组,具有统计学差异($P < 0.01$,图2),表明富H₂溶液能减轻辐射诱导的细胞凋亡。

2.3 富H₂溶液降低脂质氧化产物MDA MDA可以间接反映辐射对生物脂质的损伤,照射加H₂组HK-2细胞的MDA水平明显低于照射组,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图3),说明富H₂溶液降低了辐射诱导的MDA水平,提示其具有抗氧化作用。

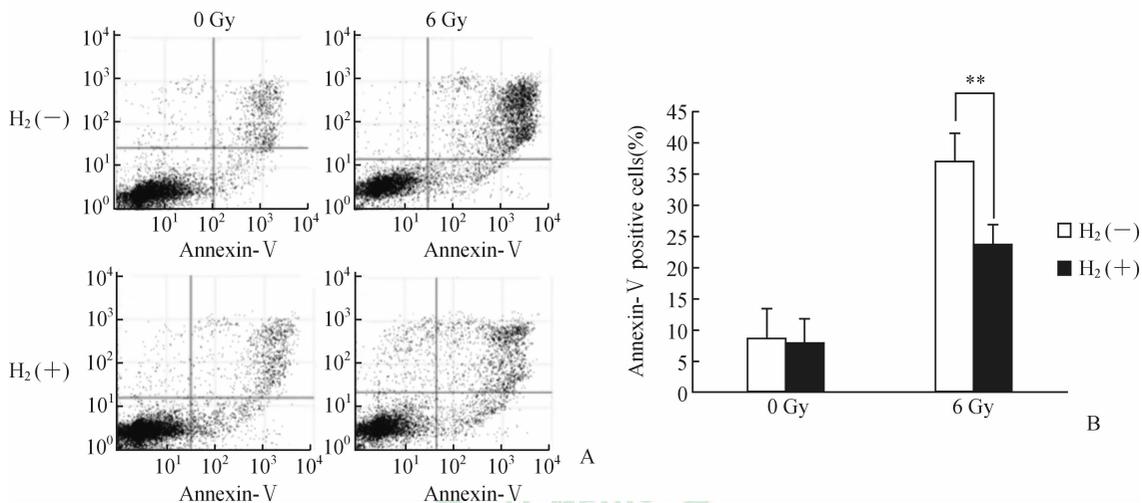


图2 富H₂溶液抑制辐射诱导的HK-2细胞凋亡

Fig 2 Hydrogen-rich saline inhibited irradiation-induced apoptosis of HK-2 cells

A: Descriptive outcome; B: Quantitative outcome. ** $P < 0.01$; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

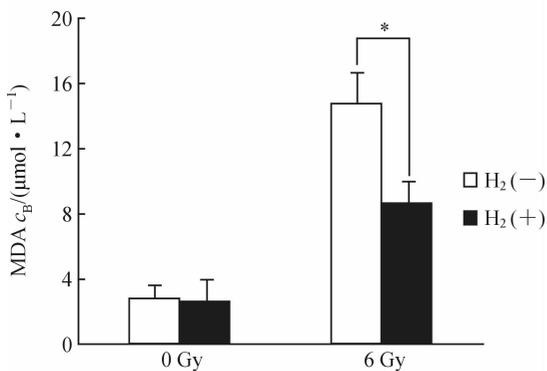


图3 富H₂溶液能减少辐射导致的MDA的产生

Fig 3 Hydrogen-rich saline decreased malondialdehyde (MDA) production induced by irradiation

* $P < 0.05$; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.4 富H₂溶液可以清除HK-2细胞中辐射诱导的·OH γ射线照射可诱导·OH的产生,而照射期间用富H₂溶液孵育细胞,明显降低了HK-2细胞中辐射诱导的·OH的水平($P < 0.05$,图4)。

3 讨论

关于富H₂溶液对放射性肾损伤的防护作用的研究方面,本课题之前未见国内外报道。本研究以HK-2细胞为研究对象,观察了饱和富H₂溶液对HK-2细胞的辐射防护效果,并且初步探索了其辐射防护作用机制,具有重要的科学意义。

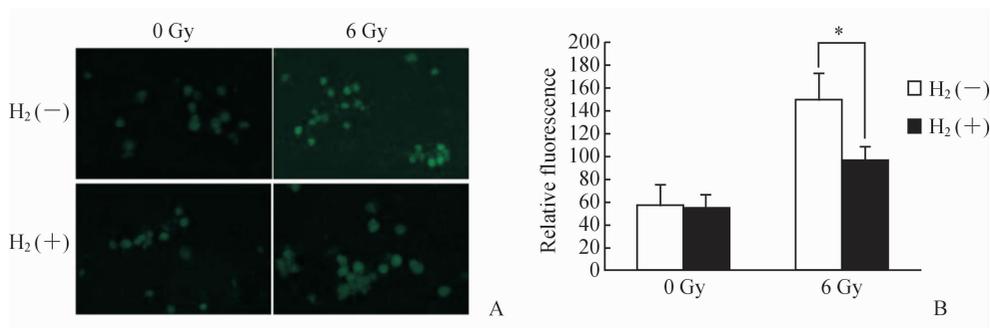


图 4 富 H₂ 溶液降低 HK-2 细胞中辐射诱导的 ·OH 水平

Fig 4 Hydrogen-rich saline decreased ·OH level in HK-2 cells induced by irradiation

A: Descriptive outcome; B: Quantization outcome. * $P < 0.05$; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

过去大部分学者一直认为 H₂ 是一种生理惰性气体,像氮气一样不与体内任何物质发生反应^[15-16]。然而近年来研究发现,H₂ 可以清除体内的细胞毒性氧自由基^[9]。有关富 H₂ 溶液对小鼠造血干细胞、胃肠道细胞、肺细胞等的辐射防护效应研究结果支持其辐射防护效果^[12,14,17]。同时,人体肠道细菌不断地产生 H₂ 并在血液中循环,说明少量 H₂ 对人体无毒副作用。H₂ 是易燃气体,具有一定的危险性,将其溶于各种溶剂中再予以使用则解决了这一问题。

电离辐射对机体的损伤主要分为直接损伤和间接损伤,尤以间接损伤占据主导地位,通过水等的辐射产物(如 ·OH 等)引起生物大分子的损伤,辐射损伤中 60%~70%是由于 ·OH 所致^[9,18]。因而辐射防护的重点主要是针对间接损伤,即通过清除辐射产生的自由基,提高机体的抗辐射能力,从而保护机体组织和器官免受伤害。电离辐射作用于机体之后,产生诸如超氧阴离子(O₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)、·OH 及一氧化氮(NO)等活性氧自由基(ROS)或活性氮自由基(RNS)等,从而对生物大分子造成损伤^[11],这是间接辐射损伤的核心机制。鉴于此,针对电离辐射损伤的发生机制,寻找高效、低毒、使用方便的自由基清除剂,是探索新型辐射防护剂的有效途径,是目前国内外辐射防护领域的重要研究思路之一。

我们通过富 H₂ 溶液对 HK-2 细胞的防护实验发现,在 6 Gy 照射时,照射加 H₂ 组于照射后 10 d HK-2 克隆形成率较照射组有明显升高($P < 0.05$)。Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞早期凋亡率分析结果也发现,照射加 H₂ 组较照射组 HK-2 细胞早期凋亡率降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

这些结果表明富 H₂ 溶液可以减轻 HK-2 细胞的辐射损伤,增加其存活率;而前期研究发现,富 H₂ 溶液对机体其他组织细胞有较为明确的辐射损伤防护效应^[12-15,19-20],提示富 H₂ 溶液对肾脏辐射损伤的改善可能有一定的积极作用。

生物脂质是 ROS 的主要攻击目标之一,脂质氧化物如 MDA、硫代巴比妥酸反应物(thiobarbituric acid reactive substances, TBARs)等的增多反映出脂质受到氧化损伤^[21]。HK-2 细胞受照射后 MDA 显著增高,但是在照射前给予富 H₂ 溶液处理,细胞内的 MDA 水平显著降低。说明富 H₂ 溶液可以有效降低辐射诱导的脂质过氧化产物,即减轻生物脂质的氧化反应。细胞膜和大多数细胞器均具有膜结构,其中主要组成部分是脂质,本结果说明富 H₂ 溶液可以有效减轻生物脂质的辐射损伤,从而保证其生物学功能的正常发挥。

HPF 是 Setsukinai 等合成的一种选择性极高的测定 ·OH 的新型荧光探针,它选择性地、剂量依赖式地与 ·OH 发生特异性反应,生成一种强荧光复合物,能够抵抗光诱导的自动氧化反应;而且,HPF 不与 O₂⁻、H₂O₂、单线态氧等其他活性氧发生反应^[22],这些优点更有利于快速、准确地定量分析细胞内的 ·OH^[11]。本研究发现,照射组和照射加 H₂ 组经 6 Gy 剂量照射后,照射加 H₂ 组的 HPF 荧光强度明显低于照射组,提示富 H₂ 溶液可以降低照射后 HK-2 细胞内的 ·OH 含量。因此我们认为富 H₂ 溶液通过及时清除辐射引起的自由基与阻断氧化效应,减轻辐射引起的一系列生物学损伤,从而对受照射细胞发挥保护作用。

综上所述,富 H₂ 溶液对 HK-2 细胞具有较好的辐射防护作用,其作用机制可能与氢气清除自由基

以及抗氧化活性有关,提示富 H₂ 溶液有可能成为放射性肾损伤的新型防护剂,具有较大应用前景。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 王文亭,李建远. 电离辐射对雄性生殖健康影响研究进展[J]. 中国保健营养,2013,23:3421.
- [2] 周美娟,郑莉,丁振华. 辐射对造血系统的影响[J]. 国外医学放射医学核医学分册,2004,28:139-142.
- [3] 马晓飞,张红. 小肠电离辐射损伤研究进展[J]. 原子核物理评论,2010,27:323-326.
- [4] 高林峰,王洪复. 电离辐射所致肾损伤引起的骨代谢异常的机制探讨[J]. 辐射研究与辐射工艺学报,2006,24:303-307.
- [5] 高林峰,王洪复,朱飞鹏. 电离辐射肾损伤病理特点及其机理研究[J]. 中华放射医学与防护杂志,2004,24:430-432.
- [6] 袁玉兰,杨品清. 放射性肾损伤[J]. 哈尔滨医科大学学报,1984(3):144-146.
- [7] Harada T, Kono S. [Radiation nephritis]. Nihon Naika Gakkai Zasshi,1999,88:1463-1466.
- [8] Krochak R J, Baker D G. Radiation nephritis. Clinical manifestations and pathophysiologic mechanisms[J]. Urology,1986,27:389-393.
- [9] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. Nat Med,2007,13:688-694.
- [10] Yang Y, Li B, Liu C, Chuai Y, Lei J, Gao F, et al. Hydrogen-rich saline protects immunocytes from radiation-induced apoptosis[J]. Med Sci Monit,2012,18:BR144-BR148.
- [11] Chuai Y, Gao F, Li B, Zhao L, Qian L, Cao F, et al. Hydrogen-rich saline attenuates radiation-induced male germ cell loss in mice through reducing hydroxyl radicals[J]. Biochem J,2012,442:49-56.
- [12] Qian L, Cao F, Cui J, Huang Y, Zhou X, Liu S, et al. Radioprotective effect of hydrogen in cultured cells and mice[J]. Free Radic Res,2010,44:275-282.
- [13] Qian L, Cao F, Cui J, Wang Y, Huang Y, Chuai Y, et al. The potential cardioprotective effects of hydrogen in irradiated mice[J]. J Radiat Res,2010,51:741-477.
- [14] Terasaki Y, Ohsawa I, Terasaki M, Takahashi M, Kunugi S, Dedong K, et al. Hydrogen therapy attenuates irradiation-induced lung damage by reducing oxidative stress[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2011,301:L415-L426.
- [15] Fontanari P, Badier M, Guillot C, Tomei C, Burnet H, Gardette B, et al. Changes in maximal performance of inspiratory and skeletal muscles during and after the 7.1-MPa Hydra 10 record human dive[J]. Eur J Appl Physiol,2000,81:325-328.
- [16] Hong S K, Bennett P B, Shiraki K, Lin Y C, Claybaugh J R. Mixed-gas saturation diving[J]. Comp Physiol,2011:1023-1045.
- [17] Qian L, Cao F, Cui J, Huang Y, Zhou X, Liu S, et al. Radioprotective effect of hydrogen in cultured cells and mice[J]. Free Radic Res,2010,44:275-282.
- [18] Ward J F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability[J]. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol,1988,35:95-125.
- [19] Chuai Y, Shen J, Qian L, Wang Y, Huang Y, Gao F, et al. Hydrogen-rich saline protects spermatogenesis and hematopoiesis in irradiated BALB/c mice[J]. Med Sci Monit,2012,18:BR89-BR94.
- [20] Jiang Z, Xu B, Yang M, Li Z, Zhang Y, Jiang D. Protection by hydrogen against gamma ray-induced testicular damage in rats[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol,2013,112:186-191.
- [21] Yurkova I, Shadyro O, Kisel M, Brede O, Arnhold J. Radiation-induced free-radical transformation of phospholipids: MALDI-TOF MS study[J]. Chem Phys Lipids,2004,132:235-246.
- [22] Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima H J, Naganano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species[J]. J Biol Chem,2003,278:3170-3175.