

C₆₀ 一氮芥对正常组织的氧化损伤防护效应

周强¹, 刘永彪^{2*}

(1. 嘉兴市第一医院肿瘤科, 浙江 嘉兴 314000; 2. 江苏省人民医院放疗科, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 检测 C₆₀ 一氮芥在 Lewis肺癌荷瘤小鼠各器官中总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX)、丙二醛 (MDA) 含量, 并探讨其对动物正常器官的氧化损伤的保护效应。方法 通过一系列加成反应所合成的一种 C₆₀ 一氮芥, 以 Lewis肺癌荷瘤小鼠为研究对象, 动物模型成功建立后, 48 只荷瘤鼠随机分为 8 组: 生理盐水组 (NS 组)、C₆₀ 组、氮芥组、C₆₀ 一氮芥组、NS+辐射组、C₆₀ +辐射组、氮芥 +辐射组、C₆₀ 一氮芥 +辐射组, 化学比色法测定组织匀浆 GSH-PX 活力, T-SOD 和 MDA 含量。结果 C₆₀ 一氮芥、氮芥降低小鼠骨髓中 GSH-PX 活力 (P<0.05), 降低了小鼠肝脏、骨髓中 T-SOD 活力 (P<0.05), 提高了小鼠骨髓、肝脏中 MDA 含量 (P<0.05), 但 C₆₀ 一氮芥组与氮芥组比较所受的毒性损伤较小 (P<0.05), 同时 C₆₀ 降低了小鼠骨髓中 MDA 含量 (P<0.05); 在电离辐射条件下, C₆₀ 一氮芥、氮芥显著降低了小鼠脑、肝、脾、肾、骨髓中 GSH-PX 活力、T-SOD 活力, 提高了 MDA 含量 (P<0.05), 但 C₆₀ 一氮芥组与氮芥组比较所受的毒性损伤较小 (P<0.05); C₆₀ 组小鼠骨髓中的 GSH-PX、T-SOD 活力较 NS 组高 (P<0.05), C₆₀ 组小鼠骨髓、脾脏中的 MDA 含量较 NS 组低 (P<0.05), 其余各组织组间比较无明显差异。结论 C₆₀ 一氮芥较氮芥对动物各正常器官的氧化损伤和辐射损伤具有保护作用。其机制可能是通过药物在机体内的生物分布和 C₆₀ 能够清除自由基减少脂质过氧化反应和保护抗氧化酶的损伤起辐射保护的途径实现的。

关键词: C₆₀ 一氮芥; 谷胱甘肽过氧化物酶; 丙二醛; 总超氧化物歧化酶; 自由基; 辐射防护

中图分类号: R734 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2065(2010)07-0477-04

富勒烯 (fullerene) 是由一系列不同数目的碳原子组成的一类物质的总称, C₆₀ 是富勒烯家族的成员之一, 直径约为 1 nm, 是目前作为药物载体研究的主流纳米材料之一, 被应用于作为制作新型药物因子的模板和对其生物性能的研究, 包括抗病毒、抗氧化、趋药性和神经保护功能^[1]。研究表明: 富勒烯及其衍生物没有致癌作用, 也没有急性中毒和遗传毒性^[2-3], 但富勒烯及其衍生物的毒性研究还刚刚开始, 尚不能作任何肯定的结论。

氮芥是最早应用于临床肿瘤治疗的一类烷化剂。C₆₀ 一氮芥是利用 C₆₀ 和氮芥加热条件下通过一系列加成反应所合成的一种 C₆₀ 一化疗药物复合物。本实验通过研究 C₆₀ 一氮芥对各器官超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX)、MDA 含量, 初步探讨其在 Lewis肺癌荷瘤小鼠中对动物正常器官的辐射生物学效应^[4-5]。

1 材料和方法

1.1 实验动物 健康、雄性、6 周龄 C₅₇ BL 纯系小鼠, 体重 (20±2) g 由北京中国药科院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 C₆₀ 一氮芥由中国医学科学院上海应用物理研究所纳米生物研究室李文新教授课题组合成, 纯度 >99%, 不溶于水。C₆₀ 为武汉大学三维碳族材料有限公司产品, 纯度 >99%, 不溶于水。

1.3 水溶性药物制备 称取 9.93 mg C₆₀ 一氮芥与 1.165 mg PVP (聚乙烯吡咯烷酮) 溶于 100 ml 氯仿, 超声震荡, 溶解得一橙黄色液体, 利用真空旋转抽滤机旋转蒸发至干, 加 100 ml 双蒸水溶解得一橙黄色澄清溶液, 此溶液即为溶解的 C₆₀ 一氮芥溶液 (该方法由中国医学科学院上海应用物理研究所纳米生物研究室李文新教授课题组提供)。分别称取 C₆₀ 7.20 mg 氮芥 2.93 mg 以同种方式制得 C₆₀ 溶液、氮芥溶液。

1.4 动物模型制备 取生长良好的 Lewis 肺癌荷瘤小鼠的肿瘤组织 (肿瘤 (g) 生理盐水 (ml) 为 1:3 的比例匀浆), 制备成细胞密度 2×10⁶ /ml 的细胞悬液, 采用 4 号细针注射于 C₅₇ BL 纯系小鼠左侧腹股沟, 每只注射 0.2 ml。一般于注射 7 天后可见小鼠腹股沟处肿块长出。

1.5 动物处理 动物模型成功建立后, 48 只荷瘤鼠随机分为 8 组: NS 组、C₆₀ 组、氮芥组、C₆₀ 一氮芥

*通信作者, E-mail: yongbiaoli@yahoo.com.cn

组、NS+辐射组、C₆₀+辐射组、氮芥+辐射组、C₆₀-氮芥+辐射组, 各组分别给予相应药物 0.025 mmol/kg NS组和 NS+辐射照射组则给予 NS 0.5 ml腹腔给药, 连续给药 5天。其中 NS+辐射组和 C₆₀+辐射组在给药开始时, 同时给予钴₆₀机 γ射线体外照射, 照射剂量为 1.5 Gy, 连续照射 3天。于第 6天活杀小鼠。

1.6 测定方法 化学比色法测定组织匀浆 GSH-PX活力、T-SOD和 MDA含量^[5-6]。

1.7 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间

比较采用 F检验和 t检验; P<0.05认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 C₆₀-氮芥对小鼠器官 GSH-PX的影响 C₆₀-氮芥组、氮芥组、C₆₀组与 NS组比较, 小鼠骨髓中 GSH-PX活力均有所下降 (P<0.05), 但 C₆₀-氮芥组与氮芥组相比较, GSH-PX活力降低的程度较轻 (P<0.05)。其余各组组间比较无明显差异。见表 1。

表 1 C₆₀-氮芥对小鼠器官 GSH-PX活力的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s \times 10^3$ U/g)

组别	脑	肝	肾	脾	骨髓
NS组	139.2±26.7	113.0±18.8	73.9±9.8	71.3±10.1	157.9±25.4
C ₆₀ 组	140.3±30.7	104.8±21.9	78.3±6.8	82.3±11.4	137.2±23.0*
氮芥组	126.0±18.6	107.8±13.0	75.7±11.6	71.9±9.4	30.6±11.3*
C ₆₀ -氮芥组	111.1±33.3	91.2±13.5	80.7±9.1	70.0±13.1	62.2±21.2*▲#

与 NS组比较: * P<0.05; 与 C₆₀组比较: ▲ P<0.05; 与氮芥组比较: # P<0.05

2.2 C₆₀-氮芥对小鼠器官 T-SOD活力的影响 C₆₀-氮芥组、氮芥组分别与 NS组、C₆₀组比较, 小鼠肝脏、骨髓中 T-SOD活力显著降低 (P<0.05), C₆₀组小鼠肝脏 T-SOD活力较 NS组高 (P<0.05), 但

C₆₀-氮芥组与氮芥组相比无显著性差异; C₆₀-氮芥降低了小鼠脾脏中的 SOD活力 (P<0.05), 其余各组织组间比较无明显差异。见表 2。

表 2 C₆₀-氮芥对小鼠器官 T-SOD活力的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s \times 10^3$ U/g)

组别	脑	肝	肾	脾	骨髓
NS组	226.2±35.0	410.1±33.1	94.1±9.1	51.0±10.4	86.1±10.4
C ₆₀ 组	215.0±45.1	441.6±19.1*	109.4±8.4	57.3±9.1	88.8±11.9
氮芥组	188.5±29.2	327.7±37.6*▲	96.0±17.0	56.8±9.4	55.6±10.5*▲
C ₆₀ -氮芥组	194.3±28.5	328.0±19.3*▲	105.0±10.1	45.3±13.1#	50.3±12.5*▲

与 NS组比较: * P<0.05; 与 C₆₀组比较: ▲ P<0.05; 与氮芥组比较: # P<0.05

2.3 C₆₀-氮芥对小鼠器官 MDA含量的影响 C₆₀-氮芥组、氮芥组与 NS组、C₆₀组比较小鼠骨髓中的 MDA含量显著提高 (P<0.05), 同时 C₆₀组的小鼠骨髓中 MDA含量与 NS组比较有所降低 (P<0.05),

C₆₀-氮芥组与氮芥组小鼠骨髓中 MDA含量相比无显著性差异; C₆₀-氮芥组与 NS组、C₆₀组、氮芥组比较小鼠脾脏中的 MDA含量显著提高 (P<0.05)。其余各组织组间比较无明显差异。见表 3。

表 3 C₆₀-氮芥对小鼠器官 MDA含量的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s \times 10^3$ U/g)

组别	脑	肝	肾	脾	骨髓
NS组	12.7±2.6	27.5±2.2	14.2±4.3	7.5±1.6	7.1±1.7
C ₆₀ 组	13.1±2.1	30.0±5.5	14.0±3.5	8.3±1.0	5.4±1.4*
氮芥组	12.5±0.9	29.2±2.5	14.6±2.7	7.6±2.1	12.2±2.8*▲
C ₆₀ -氮芥组	12.9±2.5	27.0±6.5	15.7±4.7	13.6±2.6*▲#	9.5±2.0*▲

与 NS组比较: * P<0.05; 与 C₆₀组比较: ▲ P<0.05; 与氮芥组比较: # P<0.05

2.4 C₆₀-氮芥对小鼠器官 GSH-PX辐射抗性的影响 在电离辐射条件下, C₆₀-氮芥组、氮芥组与 NS组、C₆₀组比较, 小鼠脑、肝、脾、肾、骨髓中 GSH-PX

活力均有所降低 (P<0.05), 但 C₆₀-氮芥组与氮芥组相比较, 小鼠脑、肝、脾、骨髓中 GSH-PX活力下降的程度均有所降低 (P<0.05); C₆₀组小鼠骨髓中的

GSH-PX活力较 NS组高 ($P < 0.05$), 其余各组织组间比较无明显差异。见表 4。

表 4 电离辐射下 C_{60} -氮芥对小鼠器官 GSH-PX 活力的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s \times 10^3 U/g$)

组别	脑	肝	肾	脾	骨髓
NS+辐射组	39.4±8.8	49.8±5.2	26.1±3.9	27.4±4.8	34.0±7.5
C_{60} +辐射组	38.3±8.3	49.5±9.2	25.3±4.3	28.7±5.7	40.7±5.8*
氮芥+辐射组	28.3±7.6*▲	36.4±9.5*▲	18.6±5.2*▲	18.5±5.1*▲	22.6±4.7*▲
C_{60} -氮芥+辐射组	32.5±7.8*▲#	42.3±8.7*▲#	20.3±4.8*▲	22.6±6.7*▲#	28.6±5.0*▲#

与 NS+辐射组比较: * $P < 0.05$; 与 C_{60} +辐射组比较: ▲ $P < 0.05$; 与氮芥+辐射组比较: # $P < 0.05$

2.5 C_{60} -氮芥对小鼠器官 T-SOD 活力辐射抗性的影响 在电离辐射条件下, C_{60} -氮芥组、氮芥组与 NS 组、 C_{60} 组比较, 小鼠脑、肝、脾、肾、骨髓中 T-SOD 活力有所降低 ($P < 0.05$), 但 C_{60} -氮芥组与氮

芥组相比较, 小鼠脑、肝、骨髓中 T-SOD 活力降低程度较轻 ($P < 0.05$); C_{60} 组小鼠骨髓中的 T-SOD 活力较 NS 组高 ($P < 0.05$), 其余各组织组间比较无明显差异。见表 5。

表 5 电离辐射下 C_{60} -氮芥对小鼠器官 T-SOD 活力的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s \times 10^3 U/g$)

组别	脑	肝	肾	脾	骨髓
NS+辐射组	166.2±11.4	352.4±49.4	79.0±10.7	49.3±5.7	29.0±4.8
C_{60} +辐射组	169.3±10.8	365.5±58.7	73.6±8.8	48.5±4.1	35.8±4.2*
氮芥+辐射组	125.6±9.8*▲	241.2±40.2*▲	58.4±7.3*▲	36.1±3.8*▲	22.6±3.9*▲
C_{60} -氮芥+辐射组	144.5±10.3*▲#	280.5±51.2*▲#	61.2±6.9*▲	38.6±3.6*▲	26.4±4.1*▲#

与 NS+辐射组比较: * $P < 0.05$; 与 C_{60} +辐射组比较: ▲ $P < 0.05$; 与氮芥+辐射组比较: # $P < 0.05$

2.6 C_{60} -氮芥对小鼠器官 MDA 含量辐射抗性的影响 在电离辐射条件下, C_{60} -氮芥组、氮芥组与 NS 组、 C_{60} 组比较, 小鼠脑、肝、脾、肾、骨髓中 MDA 含量有所提高 ($P < 0.05$), 但 C_{60} -氮芥组与氮芥组

相比较, 小鼠脾、骨髓中 MDA 含量提高程度较轻 ($P < 0.05$); C_{60} 组中小鼠脾、骨髓中的 MDA 含量较 NS 组低 ($P < 0.05$), 其余各组织组间比较无明显差异。见表 6。

表 6 电离辐射下 C_{60} -氮芥对小鼠器官 MDA 含量的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s \times 10^3 U/g$)

组别	脑	肝	肾	脾	骨髓
NS+辐射组	15.3±2.4	29.3±7.6	9.8±1.8	10.5±2.2	11.4±2.6
C_{60} +辐射组	14.4±2.1	28.3±6.2	8.6±1.5	5.2±1.3*	7.3±2.1*
氮芥+辐射组	18.4±3.2*▲	36.9±7.8*▲	12.8±2.3*▲	10.5±2.2*	19.0±4.7*▲
C_{60} -氮芥+辐射组	17.1±2.5*▲	36.0±4.5*▲	11.5±1.9*▲	7.3±2.9*▲#	15.4±1.9*▲#

与 NS+辐射组比较: * $P < 0.05$; 与 C_{60} +辐射组比较: ▲ $P < 0.05$; 与氮芥+辐射组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

靶向药物治疗的目的在于提高药效和降低药物毒性。药物通过与药物载体的结合, 可以选择性的进入靶组织, 从而导致药物在靶细胞或甚至是靶细胞的特定区域高浓度聚集, 提高药效, 降低药物对正常组织的毒性作用。目前, 被研究的药物载体的种类很多, 一般可以分为三大类: 微颗粒载体、可溶性载体、细胞载体^[6]。纳米颗粒载体即为一种微颗粒载体。纳米粒子是一种介于原子团组与宏观物质之间的一种物质状态。由于它的特殊性质, 所以纳米粒子具有一定的体积效应、表面效应、量子尺寸效

应和量子隧道效应^[7]。

在本实验中, 我们通过测定各用药组小鼠正常器官组织 MDA、SOD、GSH-PX 活力, 来反映各组小鼠正常器官组织细胞的细胞损伤程度和器官清除自由基的能力, 从而间接反映出各用药组药物对机体正常器官的损伤程度, 也就是毒性作用的高低。

实验结果表明, C_{60} -氮芥对小鼠骨髓、肝、脾有一定的损伤作用, 但对骨髓的损伤与氮芥对骨髓的损伤相比明显降低, 而对肝脏的损伤与氮芥相比则无明显差异, 对脾脏损伤则比氮芥要高。同时, C_{60} 对骨髓有一定的保护作用。

由于 C_{60} 、 C_{60} -氮芥不溶于水, 所以在本实验中

利用 PVP 这种多聚乙烯粉末将其包裹后经过一系列溶解过程得到溶于水的 C_{60} 和 C_{60} -氮芥溶液。这种溶液中的 C_{60} -PVP 复合体、 C_{60} -氮芥-PVP 复合体的直径约为 200 nm。经腹腔给药后,这两种复合体都容易被肝脏中的枯否细胞和脾脏中的单核-巨噬细胞系统吞噬,从而造成 C_{60} -氮芥在这些器官中聚集,对这些器官损伤加重。有文献指出,药物与纳米颗粒结合后,经系统给药,在体内迅速分布,然后被巨噬细胞系统所吞噬,即使给予 PEG 剂量也不能完全清除他们在肝脏和脾脏的分布。由于骨髓也富含内皮网状细胞和巨噬细胞,所以可以摄取一定量的 C_{60} 和 C_{60} -氮芥。国内李宇国等^[8]也发现一种水溶性 C_{60} 衍生物 $C_{60}(\text{OH})_x$ 在小鼠体内主要分布于骨、肝、脾、骨髓。水溶性的 C_{60} 及其衍生物是一种强效自由基清除剂是早有定论的。在骨髓中聚集的 C_{60} ,由于其可以降低内源性自由基对骨髓的损伤,所以表现出对骨髓具有一定的保护作用。至于 C_{60} -氮芥对骨髓的作用,我们考虑是因为 C_{60} -氮芥具有 C_{60} 和氮芥两种活性基团,且氮芥对骨髓的损伤作用超过 C_{60} 对骨髓的保护作用,因而表现出 C_{60} -氮芥对骨髓有一定的损伤,但与氮芥对骨髓的损伤相比损伤程度降低。 C_{60} -氮芥对脑组织影响不大是因为其可能不能通过血-脑屏障。对肾脏组织影响较小可能与其在肾脏中代谢较快有关。

C_{60} 是典型的缺电子烯烃,具有很强的亲电子亲和能力,而自由基离子和自由基都是带有正电子的氢离子或羟基。因此, C_{60} 与自由基离子或自由基很容易发生结合反应,这也是 C_{60} 能够清除自由基的化学结构基础^[9]。一般认为, C_{60} 与自由基反应是以 $C=C$ 双键的多重加成反应为主。由于 C_{60} 具有这种强效的清除自由基特性,被称为“自由基海绵”。利用 C_{60} 及其衍生物降低脑缺血再灌注中的脑组织受损程度,就是利用 C_{60} 能够强效清除自由基的这种特性^[10]。

本部分实验结果显示: C_{60} 十辐照组骨髓、脾组织中的 T-SOD 值高于单纯辐照组,MDA 值则低于单纯辐照组; C_{60} 十辐照组骨髓中 GSH-PX 测定值高于单纯辐照组,脾组织中 GSH-PX 则无明显差异;肝脏、脑、肾组织各测定值均无明显差异。之所以出现这样的结果,我们考虑:① γ 射线照射机体后,机体组织产生大量的自由基,而 C_{60} 能够清除自

由基,所以 C_{60} 十辐照组器官脂质过氧化水平较单纯辐照组为低。②在上文中我们已经讨论过, C_{60} 进入体内后,主要分布于肝、脾、骨髓, C_{60} 清除自由基活动也主要发生在这几种器官内。③ C_{60} 虽然也聚集在肝脏组织中,但肝脏组织为对射线敏感性相对较低的组织,产生的自由基较少,因而两组动物的肝组织中的 GSH-PX 活力、T-SOD、MDA 含量未显示明显差异。④ C_{60} 对脑组织无明显影响是因为不能通过血-脑屏障,对肾脏无明显影响可能是因为肾脏代谢过快,同时肾脏也是对射线敏感性较低的器官。

参考文献:

- [1] Braden BC, Gokhbaum FA, Chen BX, et al. X-ray crystal structure of an anti-Buckminsterfullerene antibody Fab fragment: biomolecular recognition of C_{60} [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(22): 12193-12197.
- [2] Nelson MA, Damann FE, Bowden GT, et al. Effect of acute and subchronic exposure of topically applied fullerene extract on the mice skin [J]. Toxicol In Health, 1993, 9(4): 623-630.
- [3] Shinohara N, Matsumoto K, Endoh S, et al. In vitro and in vivo genotoxicity tests on fullerene C_{60} nanoparticles [J]. Toxicol Lett, 2009, 191(2-3): 289-296.
- [4] 刘永彪,刘颖,赵杰,等. SOD 对肿瘤细胞凋亡影响和抗氧化损伤的研究: I. SOD 与 DDP、ADM、VP16 合用对肿瘤细胞凋亡的影响 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2004, 22(2): 114-122.
- [5] 刘永彪,刘颖,赵杰,等. SOD 对肿瘤细胞凋亡影响和抗氧化损伤的研究: II. SOD 对荷瘤小鼠脾淋巴细胞的辐射防护效应 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2004, 22(3): 165-170.
- [6] Lisa BP. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery [J]. Biogel Technology, 1995, 116(1): 1-9.
- [7] 沈星灿,何锡文,梁宏. 纳米粒子特性与生物分析 [J]. 分析化学, 2003, 31(7): 880-885.
- [8] 李宇国,黄旋,张晓东,等. ^{67}Ga 标记 C_{60} 衍生物 $C_{60}(\text{OH})_x$ 的生物分布研究 [J]. 核医学, 2003, 26(5): 393-396.
- [9] Sena N, Tokiwa H, Miyata N. Mutagenicity of the fullerene C_{60} -generated singlet oxygen dependent formation of lipid peroxides [J]. Carcinogenesis, 1996, 17(10): 2163-2169.
- [10] Huang SS, Tsai SK, Chih CL, et al. Neuroprotective effect of hexafluorobutylated C_{60} on rats subjected to focal cerebral ischemia [J]. Free Radic Biol Med, 2001, 30(6): 643-649.

收稿日期: 2010-02-09 修回日期: 2010-05-11

本文编辑: 王卿