

富勒烯衍生物对自由基的清除作用及其生物学效应

孙权 蔡建明 黄越承

【摘要】富勒烯及其衍生物因其独特的化学结构和理化性质,尤其是它们强大的清除自由基的能力,引起了生物医学界研究者的极大关注,开展了大量生物学效应研究,近年来取得较大进展。在此重点探讨多种富勒烯衍生物的生物学效应,特别是对自由基清除效应的应用意义及应用前景。

【关键词】富勒烯;自由基;抗氧化效应

The ability of fullerene derivatives to eliminate free radicals and their biological effects

SUN Quan, CAI Jian-ming, HUANG Yue-cheng

(Department of Radiation Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】The unique chemical and physical properties of buckminsterfullerene (C_{60}) and its derivatives, especially the excellent ability to eliminate free radicals, have generated increasing interest for researchers in the field of biomedicine. Subsequently, considerable investigations have been conducted into the biological effects of C_{60} , and remarkable progress has been made in recent years. In this paper, we mainly review the biological effects of various C_{60} derivatives, particularly on the free radical scavenging effect and its significance in practical application.

【Key words】Fullerenes; Free radicals; Antioxidant effect

富勒烯(fullerene)又名球烯,是碳的第三种同素异构体。富勒烯自发现以来就引起了科学界对它的研究热潮,其生物学活性主要表现在与多种自由基反应获得加合物,因此被称为“自由基海绵”。由于富勒烯本身为非极性对称球形结构,水溶性很低,影响了其在生物学方面的应用。目前,解决富勒烯水溶性的方法主要以在碳笼上添加水溶性基团制备水溶性富勒烯衍生物最有前景,这方面应用基础研究也最多。随着各种富勒烯水溶性衍生物的广泛制备,其生物学活性也得到广泛重视,在此重点介绍多种富勒烯衍生物对自由基的清除效应及其在生物医学中的应用意义,并简要介绍几种富勒烯衍生物的抗人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)和抑制酶活性、抗菌活性等,概要分析富勒烯衍生物的细胞毒性、安全浓度和发展前景。

1 各种富勒烯衍生物清除自由基效应

1.1 富勒醇的自由基清除效应

多羟基富勒烯衍生物——富勒醇是较常见的

基金项目:国家自然科学基金(30770503);全军医药卫生“十一五”攻关项目(06G60)

作者单位:200433上海,第二军医大学放射医学研究室

通信作者:蔡建明(E-mail: cjm882003@yahoo.com.cn)

一种水溶性衍生物,富勒醇由于水溶性好,且比富勒烯减少了固有的毒性,所以对富勒醇的研究越来越得到重视。有学者用富勒醇进行动物实验,发现其在大鼠体内清除由硝普钠引起的一氧化氮(NO)方面有明显作用,能够保护由NO引起的过氧化氢酶、谷胱甘肽转移酶、谷胱甘肽过氧化物酶的减少,从而抑制NO的活性。实验还发现,富勒醇对由过氧化阴离子引起的氧化损伤同样有抑制作用^[1]。研究人员对三组犬小肠进行缺血再灌注实验,对照组不加药物;预防组缺血再灌注前30 min静脉注射富勒醇;治疗组缺血再灌注后立即注射富勒醇,发现预防组和治疗组血浆中产生的共轭二烯和丙二醛等脂质过氧化物比对照组上升明显减少,而对照组谷胱甘肽在30 min时升高而在60 min时下降明显,预防组和治疗组谷胱甘肽水平则没有明显变化^[2],实验结果很可能是由于富勒醇对自由基的清除引起的。蔡小青等^[3]研究富勒醇对⁶⁰Co γ 射线致小鼠损伤的防护作用,发现照射前后使用富勒醇的小鼠血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力较照射对照组明显增高,而SOD是天然的自由基清除剂,所以富勒醇很可能是通过增加自由基清除酶的活力,间接抑制自由基对机体的损伤。

1.2 富勒烯羧基类衍生物的自由基清除效应

羧酸类富勒烯衍生物是另一种较常被研究的富勒烯衍生物,目前技术相对成熟,研究相对较多的就是富勒烯丙二酸衍生物 C_3 。Dugan 等^[4] 研究 C_3 的抗氧化和神经保护作用时发现其具有清除过氧化阴离子和 H_2O_2 的作用,还可以抑制脂质过氧化反应,从而对由激发毒性、凋亡和代谢不充分条件下引起的神经细胞损伤起保护作用;同时还发现,对于甲基-苯基-吡啶离子和 6-羟基多巴胺诱发的中脑多巴胺能神经细胞退化, C_3 也有很好的保护作用。Ali 等^[5] 发现 C_3 对过氧化物的反应并不是所谓的“清除”作用,而是类似生物体内的 SOD,通过对过氧化物的歧化作用,来保护机体免受过氧化物的伤害;用 C_3 治疗缺乏 MnSOD 基因表达的小鼠,发现被治疗小鼠的存活率为对照组的 3 倍,这有可能是因为 C_3 具有与 SOD 类似的作用,部分代替了 MnSOD 功能的结果。

1.3 富勒烯氨基类衍生物的自由基清除效应

富勒烯氨基类衍生物的种类较多,可以在富勒烯上加甘氨酸、丙氨酸、谷光甘肽等,由于氨基酸类富勒烯衍生物毒性相对较小,水溶性也较好,所以对其生物学效应研究也更有意义。众所周知,自由基引起的损伤中,以超氧负离子 (O_2^-) 和 OH 的氧化作用最强。有学者报道了一种合成 α -丙氨酸富勒烯的方法,并采用分光光度法和化学发光法研究其清除超氧负离子 (O_2^-) 和羟基自由基 (OH) 的活性,发现其自由基的清除率随着该 α -丙氨酸富勒烯浓度的升高而增强^[6]。Hu 等^[7] 报道了合成 β -丙氨酸富勒烯的方法及其的研究发现, β -丙氨酸富勒烯在体内和体外对 H_2O_2 引起的小鼠嗜铬细胞瘤细胞凋亡都具有一定的抑制作用;研究还发现,谷光甘肽富勒烯衍生物对氧化应激引起的小鼠嗜铬细胞瘤细胞的凋亡具有类似的抑制氧化作用^[8]。

1.4 富勒烯磺酸基类衍生物的自由基清除效应

磺酸类富勒烯是另一种水溶性富勒烯衍生物,常见的为富勒烯六丁基磺酸钠 [C_{60} -($CH_2CH_2CH_2CH_2SO_3Na$)₆, FC_6S], 该化合物细胞毒性较低,也具有清除自由基的抗氧化作用。2000 年, Hsu 等^[9] 报道了该化合物在 10~100 mmol/L 时可保护血浆免于 Cu^{2+} 诱发的过氧化反应,降低氧化产物的水平。自由基能够诱发脂质过氧化反应,从而破坏血管,造成动脉粥样硬化, FC_6S 对于血浆

脂质的过氧化有明显的抑制作用,其机制可能为 FC_6S 与脂蛋白连接在溶液中捕获自由基而防止血浆脂质的过氧化。研究还发现,该富勒烯衍生物对由低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 引起的动脉粥样硬化同样有保护作用,其机制可能也是通过抑制 LDL 产生的氧化应激反应实现的^[10]。还有学者研究 FC_6S 对小鼠大脑中动脉缺血引起的神经损伤的保护作用发现,当 FC_6S 用药剂量达到 10~100 ng/g 时,局部梗死灶面积减小;还发现血浆中扩血管物质 NO 水平升高,乳酸脱氢酶水平减少^[11]。Yang 等^[12] 用沙鼠做类似实验,得到了相同的结果,推测其可能与该磺酸类富勒烯衍生物清除缺氧引起细胞损伤时产生的自由基有关。

2 富勒烯衍生物的其他生物学效应

富勒烯除具有清除自由基的功能外,其在抗 HIV 和抑制酶活性及抗菌活性等方面均有一定作用。在抗 HIV 方面, Mashino 等^[13] 用多种富勒烯衍生物进行实验,发现其作用机制不仅是抑制 HIV 蛋白酶活性,而且可能对 HIV 反转录酶的活性也有抑制作用;同时还对与 HIV 类似的丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 进行实验发现,富勒烯衍生物对 HCV 反转录酶具有相似的抑制作用。杨新林等^[14] 用三丙二酸富勒烯进行实验,以具有限制性内切酶 Hind III 和 EcoR I 单一酶活性的 pEGFP-N1 超螺旋质粒为底物,发现加入三丙二酸富勒烯后其酶切产物显著减少;后又以该质粒为模板进行聚合酶链反应扩增,在体系中加入三丙二酸富勒烯后产物也明显减少。同时还发现三丙二酸富勒烯的作用存在浓度依赖性。在抗菌活性方面, Tsao 等^[15] 对葡萄球菌、链球菌、肠球菌、肺炎克雷伯杆菌、大肠杆菌、绿脓杆菌和伤寒沙门菌等分别进行实验,发现富勒烯衍生物对革兰阳性菌的抑制效果明显,而对革兰阴性菌抑制效果则不明显。

3 富勒烯及其衍生物的细胞毒性

富勒烯虽然有很强的抗氧化活性,但其在光的诱导下可产生氧自由基,还可以对 DNA 进行切割,故很多人怀疑其应用于人体内会产生细胞毒性,加速细胞死亡。Lee 等^[16] 报道了富勒烯在水中同样能在光的诱导下产生单线态氧等自由基,但富勒烯的聚集物在水中却基本不能在光诱导下产生自由

基,因此分析富勒烯的光诱导产生自由基的能力与其弥散度有关。国内也有报道,用不同富勒烯衍生物对人体 Hela 细胞进行光诱导实验,发现不同富勒烯衍生物的光诱导毒性不同,考虑其光诱导毒性可能与富勒烯添加基团的数量和结构有关。同时实验也发现,在富勒烯衍生物光诱导产生细胞毒性的过程中,确实有活性氧的参与^[17]。Usenko 等^[18]用富勒烯对斑马鱼的胚胎细胞进行实验发现,在避免光照的情况下,暴露在 0.1~0.15 $\mu\text{g/g}$ 富勒烯下的斑马鱼胚胎细胞死亡率、畸形鳍和心包炎的发生率明显减少,而暴露在 0.25 $\mu\text{g/g}$ 富勒烯的斑马鱼胚胎细胞死亡率在光照和黑暗中无差别;同时暴露在谷胱甘肽前体(N-acetylcysteine, NAC)和富勒烯的斑马鱼胚胎细胞死亡率和心包炎发生率减少,但畸形鳍发生率变化不明显。加入谷胱甘肽阻滞剂后,能增加富勒烯对细胞的敏感性。其 DNA 实验也证实富勒烯能诱导细胞产生氧化应激反应。Fenoglio 等^[19]报道,吸入碳纳米颗粒(包括富勒烯颗粒)的实验动物肺部会产生炎症反应及纤维化反应,类似于吸入其他毒性微粒引起的氧化应激反应,但没有实验证据证明该碳纳米颗粒可以使机体直接产生自由基。Sayes 等^[20]用富勒烯纳米颗粒悬液进行实验发现,在富勒烯纳米颗粒悬液内人体上皮成纤维细胞和肝癌细胞 $\geq 5 \times 10^8$ 时暴露 48 h 后,会有细胞毒性产生,损伤机制为脂质过氧化反应,主要为活性氧自由基对细胞膜引起的损害,而细胞 DNA 和线粒体则没有明显损伤。还有报道,羧酸类富勒烯衍生物进入细胞内,并在光诱导下对细胞质膜和线粒体膜产生损伤,其机制可能是该富勒烯衍生物导致的局部钙浓缩^[21]。Han 等^[22]通过改进的方法提高富勒烯的水溶性后对 Madin-Darby 犬肾细胞进行细胞毒性实验发现,当富勒烯 $>70 \text{ mg/L}$ 时,24 h 后细胞死亡率为 100%; 33 mg/L 时,病死率为 50%; $<10 \text{ mg/L}$ 时,对细胞死亡率基本无影响。

这些结果说明,富勒烯衍生物对细胞的毒性与细胞内抗氧化的状态、光线性质和光照条件、化合物的浓度及离散度有关,需要在开展生物学应用研究时进行具体分析,消除其毒性影响。此外, Foley 等^[23]用荧光显微技术和放射标记技术观察,发现富勒烯不仅能穿越细胞膜进入细胞体内,而且容易在细胞体内线粒体周围聚集。这对富勒烯及其衍生物的细胞毒性的作用部位提出了新的疑问,但

目前这方面报道较少,有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Mirkov SM, Djordjevic AN, Andric NL, et al. Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullerene, C60(OH)₂₄[J]. Nitric Oxide, 2004, 11(2): 201-207.
- [2] Lai HS, Chen WJ, Chiang LY. Free radical scavenging activity of fullerene on the ischemia-reperfusion intestine in dogs[J]. World J Surg, 2000, 24(4): 450-454.
- [3] 蔡小青,李宇国,吴胜伟,等.富勒醇对⁶⁰Co γ 射线致小鼠损伤的防护作用[J].中华放射医学与防护杂志,2004,24(6): 520-522.
- [4] Dugan LL, Lovett EG, Quick KL, et al. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2001, 7(3): 243-246.
- [5] Ali SS, Hardt JL, Quick KL, et al. A biologically effective fullerene (C60) derivative with superoxide dismutase mimetic properties[J]. Free Radic Biol Med, 2004, 37(8): 1191-1202.
- [6] Sun T, Xu Z. Radical scavenging activities of alpha-alanine C60 adduct[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(14): 3731-3734.
- [7] Hu Z, Guan W, Wang W, et al. Synthesis of beta-alanine C60 derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells[J]. Cell Biol Int, 2007, 31(8): 798-804.
- [8] Hu Z, Liu S, Wei Y, et al. Synthesis of glutathione C60 derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells[J]. Neurosci Lett, 2007, 429(2-3): 81-86.
- [9] Hsu HC, Chiang yy, Chen WJ, et al. Water-soluble hexasulfobutyl [60] fullerene inhibits plasma lipid peroxidation by direct association with lipoprotein[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2000, 36(4): 423-427.
- [10] Lee YT, Chiang LY, Chen WJ, et al. Water-soluble hexasulfobutyl [60] fullerene inhibit low-density lipoprotein oxidation in aqueous and lipophilic phases[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 2000, 224(2): 69-75.
- [11] Huang SS, Tsai SK, Chih CL, et al. Neuroprotective effect of hexasulfobutylated C60 on rats subjected to focal cerebral ischemia[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 30(6): 643-649.
- [12] Yang Dy, Wang MF, Chen IL, et al. Systemic administration of a water-soluble hexasulfonated C60(FC₆₀S)₆ reduces cerebral ischemia-induced infarct volume in gerbils[J]. Neurosci Lett, 2001, 311(2): 121-124.
- [13] Mashino T, Shimotohno K, Ikegami N, et al. Human immunodeficiency virus-reverse transcriptase inhibition and hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibition activities of fullerene derivatives[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 15(4): 1107-1109.
- [14] 杨新林,陈哲,孟宪梅,等.三丙二酸富勒烯对 DNA 限制性内切酶和 Taq DNA 聚合酶活性的抑制作用[J].科学通报,2007,

- 52(4): 399-403.
- [15] Tsao N, Luh TY, Chou CK, et al. In vitro action of carboxyfullerene [J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 49(4): 641-649.
- [16] Lee J, Fortner JD, Hughes JB, et al. Photochemical production of reactive oxygen species by C60 in the aqueous phase during UV irradiation[J]. Environ Sci Technol, 2007, 41(7): 2529-2535.
- [17] 乔新歌, 黄成, 银亚冰, 等. 几种不同结构富勒烯衍生物对 HeLa 细胞的光诱导毒性[J]. 北京理工大学学报, 2007, 27(6): 556-559.
- [18] Usenko CY, Harper SL, Tanguay RL, et al. Fullerene C60 exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 229(1): 44-55.
- [19] Fenoglio I, Tomatis M, Lison D, et al. Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity?[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 40(7): 1227-1233.
- [20] Sayes CM, Gobin AM, Ausman KD, et al. Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation [J]. Biomaterials, 2005, 26 (36): 7587-7595.
- [21] Yang X, Chen L, Qiao X, et al. Photo-induced damages of cytoplasmic and mitochondrial membranes by a [C60]fullerene malonic acid derivative[J]. Int J Toxicol, 2007, 26(3): 197-201.
- [22] Han B, Karim MN. Cytotoxicity of aggregated fullerene C60 particles on CHO and MDCK cells [J]. Scanning, 2008, 30 (2): 213-220.
- [23] Foley S, Crowley C, Smahli M, et al. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 294(1): 116-119.
- (收稿日期: 2008-07-17)

脑胶质瘤辐射敏感性相关基因的研究进展

王洗 刘强

【摘要】 脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的肿瘤, 其生长方式呈浸润性生长, 手术中难以切除干净, 易发生病灶残留从而引起术后复发, 影响患者预后。术后放疗是一项重要的治疗手段, 但脑胶质瘤对射线的敏感程度直接影响放疗疗效。综述了脑胶质瘤辐射敏感性相关基因研究的现状和进展。

【关键词】 脑胶质瘤; 辐射耐受性; 基因表达调控; 基因, p53; NF-κB

The progress of radiosensitive genes of human brain glioma

WANG Xi¹, LIU Qiang²

(1. Department of Neurology, Tianjin Harbour Hospital, Tianjin 300456, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

【Abstract】 Human gliomas are one of the most aggressive tumors in brain which grow infiltratively. Surgery is the mainstay of treatment. But as the tumor could not be entirely cut off, it is easy to relapse. Radiotherapy plays an important role for patients with gliomas after surgery. The efficacy of radiotherapy is associated with radio sensitivity of human gliomas. This paper makes a summary of current situation and progress for radiosensitive genes of human brain gliomas.

【Key words】 Brain glioma; Radiosensitivity; Gene expression regulation; Gene, p53; NF-κB

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的肿瘤, 占复发脑瘤的 35%~45%^[1], 其标准治疗方案是切除术后辅助放疗, 但由于存在辐射抵抗, 胶质瘤放疗的效果并不理想。现就目前研究较多的脑胶质瘤辐射敏感性相关基因作一综述。

1 p53 基因

p53 基因突变会促使多种肿瘤的发生、发展, 与脑胶质瘤的形成、发展有很大的关联, 所不同的是仅有一部分脑胶质瘤中有突变的 p53 基因; 另一部分并没有突变, 只是功能的失活。与其他肿瘤相反, p53 基因的突变或低表达, 往往预示着脑胶质瘤患者的预后较好^[2]。静止期细胞 p53 蛋白的量很

作者单位: 1. 300456, 天津港口医院神经内科(王洗); 2. 300192 天津, 中国医学科学院放射医学研究所(刘强)

通信作者: 刘强 (E-mail: lq6688@yahoo.com.cn)