

文章编号: 1005-0523(2004)01-0143-04

水溶性 C₆₀ 衍生物对小鼠胸腺细胞的生长影响研究

金亚旭¹, 黄晓东²

(华东交通大学 1. 基础科学学院; 2. 科研处, 江西 南昌 330013)

摘要: 采用邻苯三酚自氧化法测定了富勒醇、C₆₀-β 丙氨酸两种水溶性 C₆₀ 衍生物对邻苯三酚自氧化的抑制率及对超氧阴离子自由基(O₂⁻)的清除率。利用 MIT 比色法考察了富勒醇、C₆₀-β 丙氨酸对小鼠胸腺细胞的生长影响, 实验结果表明这两种水溶性 C₆₀ 衍生物都有利于细胞活性的增强。

关键词: 水溶性 C₆₀ 衍生物; 超氧阴离子自由基; MIT 比色法; 邻苯三酚自氧化

中图分类号: O621.3

文献标识码: A

0 引言

自 1990 年 Kratschmer 等^[1] 在实验室合成及纯化得到宏观量 C₆₀ 以来, 对 C₆₀ 在各个领域的研究迅速的得到开展。众多科学家预言 C₆₀ 将在生物学以及生命领域起到重要作用。但由于 C₆₀ 为非极性分子, 而生物体系的生命活动几乎都处于水环境中, 使得 C₆₀ 研究受到很大限制。最近, 随富勒醇、C₆₀ 氨基酸等水溶性富勒烯衍生物的合成, 使 C₆₀ 在生物学领域的研究和应用成为可能, 并引起国内外很多学者的广泛关注。1993 年 Tokuyama 等^[2] 发现羧酸富勒烯对 DNA 具有选择性切割作用。Schinazi 等^[3] 则发现二酰胺二酸二苯基富勒烯对被爱滋病病毒(HIV)急、慢性感染的细胞具有抗病毒活性。但至今 C₆₀ 及其衍生物对细胞生长的作用研究报道很少^[2, 4]。

作者所在的课题组最近报道了水溶性 C₆₀-β 丙氨酸衍生物清除超氧阴离子自由基(O₂⁻)及对小鼠胸腺细胞生长影响的研究结果^[5], 但未进一步报道富勒醇的研究结果, 以及这两种衍生物在保护细胞能力方面的差异和机理。C₆₀ 衍生物对细胞生长影响的研究是以它们对自由基的清除为基础的。生命

过程中的自由基反应处于动态平衡之中, 过多的自由基将会导致细胞损伤、病变和非正常死亡, 是多种疾病的发病根源。超氧阴离子自由基是十分重要的一类自由基, 并可以经过一系列反应生成其它氧自由基。因此, 研究富勒烯衍生物对 O₂⁻ 的清除具有十分重要的意义。

本文在采用邻苯三酚自氧化法进行这两类水溶性 C₆₀ 衍生物对超氧阴离子自由基的清除活性研究基础上, 进一步采用 MIT 法研究了它们对体外培养的小鼠胸腺细胞的生长影响, 探讨了 C₆₀ 对细胞生长影响的可能因素。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司; 96 孔细胞培养板为 NUNC 公司产品; 邻苯三酚, 噻唑蓝(MIT)购自上海伯奥公司; 胎牛血清由杭州四季青生物工程有限公司提供; C₆₀ 购自武汉大学。实验中所用其他试剂均为分析纯。所有溶液配制均采用三蒸水。

1.1.2 实验动物

收稿日期: 2003-06-28

作者简介: 金亚旭(1979-), 男, 湖北天门人, 讲师。

ICR 小鼠由浙江省医学科学院提供, 6—8 周龄, 体重 18—20 g.

1.1.3 主要仪器

752 型紫外光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂); BH-2 倒置显微镜(Olympus 公司); CO₂ 细胞培养箱(Forma Scientific 公司); DG3022 型酶联免疫检测仪(ELISA)(华东电子管厂).

1.2 方法

1.2.1 水溶性 C₆₀ 衍生物的合成

富勒醇的合成按文献^[6]的方法, C₆₀-β 丙氨酸的合成按文献^[7]的方法. 元素分析、¹H NMR、FT-IR 分析测试结果与文献值非常吻合, 表明得到了富勒醇和 C₆₀-β 丙氨酸两种水溶性 C₆₀ 衍生物.

1.2.2 水溶性 C₆₀ 衍生物对 O₂⁻ 的清除

采用改进的邻苯三酚自氧化法^[8]测定富勒醇(15.85 mg/ml)和 C₆₀-β 丙氨酸(21.81 mg/ml)两种水溶性 C₆₀ 衍生物对邻苯三酚自氧化速率的抑制率和对 O₂⁻ 自由基的清除率. 在试管中加入 pH=8.2 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 4.5 ml, 样品加入量按表 1 中数据. 25°C 下恒温 20 min, 然后加入预热的 45 mmol/L 邻苯三酚溶液(空白管用 10 mmol/L HCl 代替). 迅速摇匀并倒入比色皿中, 在 325 nm 下, 每隔 30 sec 测定吸光度值一次. 考察了不同浓度样品对 O₂⁻ 自由基的清除活性. 样品对 O₂⁻ 自由基的清除率(S%)可用下式计算:

$$S\% = (V_{0, \text{空白}} - V_{0, \text{样品}}) / V_{0, \text{空白}} \times 100\%$$

其中, V₀ 表示反应速率, 其值为实验测得的样品在不同时刻的吸光度值(A)对时间(t)作图得到的直线斜率. 而样品对邻苯三酚自氧化速率的抑制率(I%)的计算公式如下:

$$I\% = (V_{0, \text{空白}} - V_{0, \text{样品}}) / V_{0, \text{样品}} \times 100\%$$

1.2.3 小鼠胸腺淋巴细胞的制备

小鼠断颈处死后, 无菌取胸腺, 经 200 目钢网过筛, 以含 5% 胎牛血清的 Hanks 液制成单个细胞悬液, 1500 rpm 离心 10 分钟. 将细胞重新悬浮于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液中, 台盼蓝计数, 活细胞 > 95%, 调整细胞浓度为 4 × 10⁶/ml.

1.2.4 淋巴细胞增殖反应

按 Mosmann 法^[9]改进, 96 孔细胞培养板, 每孔 200 μl 内含 100 μl 4 × 10⁶/ml 胸腺细胞, 不同浓度样品(均过滤灭菌) 100 μl, 于 37°C, 含 5% CO₂, 相对湿度 95% 的自动细胞培养箱中培养 72 小时. 取出培养板, 每孔加入 10 μl 5 mg/ml MIT 溶液, 继续培养 4

小时. 每孔吸弃上清, 加入 100 μl 二甲亚砜(DMSO), 微型振荡器上轻轻振荡, 酶联免疫检测仪测定 490 nm 处光吸收值(OD₄₉₀). 用不加细胞只加培养液的空白孔作本地对照. 实验中得到的每个数据为三个平行实验获得的平均值.

2 结果

2.1 水溶性 C₆₀ 衍生物对 O₂⁻ 自由基的清除活性

采用邻苯三酚自氧化法分别测定了富勒醇和 C₆₀-β 丙氨酸两种水溶性 C₆₀ 衍生物样品在五个不同浓度下的吸光度值(A)随时间(t)的变化关系, 实验结果显示, 在一定的时间范围内, 样品的吸光度值(A)与时间(t)呈良好的线性关系, 由此可得到各直线斜率 V₀, 从而计算出不同浓度的样品对邻苯三酚自氧化的抑制率 I% 及对 O₂⁻ 自由基的清除率 S%, 计算结果见图 1, 2 所示.

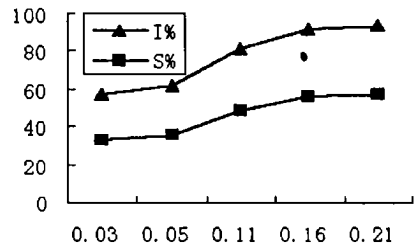


图 1 清除活性与富勒醇浓度之间的关系

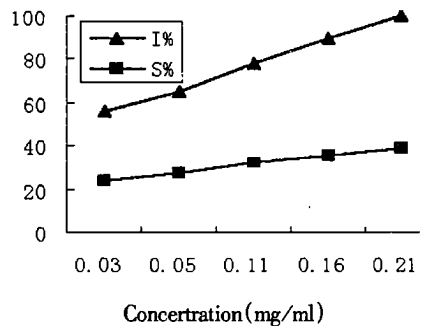


图 2 清除活性与 C₆₀-β 丙氨酸浓度之间的关系

由图 1, 2 的实验结果可以看出富勒醇和 C₆₀-β 丙氨酸两种水溶性 C₆₀ 衍生物对 O₂⁻ 自由基均有较为显著的清除作用, 清除率在一定浓度范围内随样品各自浓度的增大而增强. 同样, 富勒醇和 C₆₀-β 丙氨酸对邻苯三酚自氧化速率均有较强的抑制作用, 抑制率在一定浓度范围内也随着各样品浓度的增大而增强.

2.2 水溶性 C₆₀ 衍生物对小鼠胸腺细胞的生长影响

实验中分别加入不同浓度的富勒醇和 C₆₀-β 丙氨酸两种水溶性 C₆₀ 衍生物样品, 进行 MIT 比色

分析,实验结果如图3,4所示.

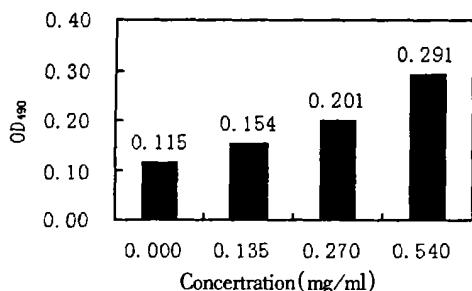


图3 OD₄₉₀值与富勒醇浓度之间的关系

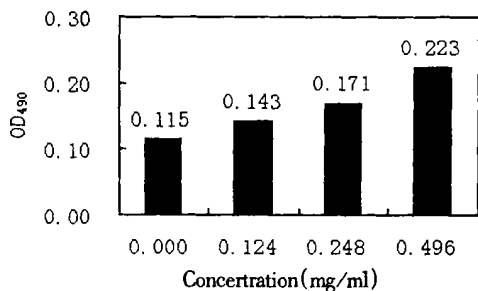


图4 OD₄₉₀值与 C₆₀-β丙氨酸浓度之间的关系

由图3,4可见,随体系中富勒醇和 C₆₀-β丙氨酸样品浓度的增加,体系的光吸收值(OD₄₉₀)也随之增大.由于酶联免疫检测仪在 490 nm 波长出的吸收值(OD₄₉₀)间接反映了体系中活细胞的数量,并且在一定细胞数范围内,OD₄₉₀与细胞数成正比.因此图1,2结果表明,在一定浓度范围内富勒醇和 C₆₀-β丙氨酸样品具有明显的延长细胞寿命,保护细胞的作用,并且样量越多,其作用越显著.

3 讨论

有关 C₆₀衍生物清除 O₂⁻ 自由基的机理是一个复杂的问题,目前尚无定论.下面提出我们初步的看法.

物质的性质与结构有着不可分割的联系. C₆₀衍生物能清除 O₂⁻ 自由基,显然与其结构有关. C₆₀是缺电子多烯烃,而 O₂⁻ 自由基既可失去电子,又可获得电子,因而两者可能发生电子转移.即 C₆₀中残留的 C=C 双键与 O₂⁻ 自由基产生单电子转移,形成新的负离子自由基,至使自由基链反应受阻. C₆₀衍生物对 O₂⁻ 自由基的清除以打开一个 C=C 双键,只消耗一个 O₂⁻ 的方式进行,因为若加成两个 O₂⁻ 会因为空间位阻大而难以进行.从元素分析的结果来看,富勒醇带有 10 个以上的羟基, C₆₀-β丙氨酸的修饰基团在 9~10 个之间,因此后者的残留

双键更多.而 C=C 双键的多少显然会影响各衍生物与 O₂⁻ 自由基作用的效果.可以认为, C=C 双键越多,则清除作用越明显.因此,可以预料 C₆₀衍生物的清性能与空间位阻效应、残余双键等多种因素有关,这方面的研究尚待进一步深入.

我们的实验结果表明,富勒醇和 C₆₀-β丙氨酸两种水溶性 C₆₀衍生物对超氧阴离子自由基均有一定的清除作用,而且两者的清除作用基本相似.当我们把不同浓度的两种样品分别加入到原代培养的细胞溶液中后,它们同样发挥其较强的清除自由基作用及抗氧化活性,使细胞代谢产生的活性氧自由基得到及时的清除,从而降低了氧毒性对细胞的损伤.实验观察得到的结果就是经过 72 小时的体外培养后,细胞数量与对照组相比有较为明显的增加,而且,样品浓度越大,其清除自由基能力越强,细胞数量增加得越多.对细胞的这种保护作用富勒醇略优于 C₆₀-β丙氨酸.当然抗氧化剂并不是加得越多越好,过多的外源物质无疑会影响到细胞的正常生理活性,但就我们的实验结果来看,体系中样品浓度仍在细胞的承受范围内.

参考文献:

- [1] Kratschmer W, Lamb L D. A new form of carbon[J]. Nature, 1991, 347: 354~358.
- [2] Tokuyama H. Photoinduced biochemical activity of fullerene carboxylic acid[J]. J Am Chem Soc, 1993, 115: 7918~7919.
- [3] Schinazi R, Hill C L. Synthesis and virucidal activity of a water-soluble derivatized C₆₀ fullerene [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1993, 37: 1707~1710.
- [4] Li W, Qian K, Chen W X. Water soluble C₆₀-liposome and the biological effect of C₆₀ to human cervix cancer cells[J]. Chin Phys Lett, 1999, 11: 207~210.
- [5] 孙涛,金亚旭,陈万喜. 水溶性 C₆₀-β丙氨酸衍生物清除超氧阴离子自由基及对小鼠胸腺细胞生长影响的研究[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(8): 1267~1269.
- [6] 孙大勇,刘子阳,郭兴华,余益民,周雨,刘淑莹. C₆₀(OH)_x 的简便合成及性质[J]. 高等学校化学学报, 1999, 17: 19~20.
- [7] Gan L B, Luo C P, Xu L B, Zhou D J, Huang C H, Zhao S K. Water-soluble fullerene derivatives synthesis and characterization of β-alanine C₆₀ adduct [J]. Chin Chem Lett, 1999, 5: 275~278.
- [8] 谢卫华,姚菊芳,袁勤生. 邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的改进[J]. 医药工业, 1988, 19: 217~220.
- [9] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival[J]. J Immuno Methods, 1983, 65: 55~63.

Study on the Effect of Water-soluble C₆₀ Derivatives on the Mouse Thymus Cells Growth

JIN Ya-xu¹, HUANG Xiao-dong²

(1.School of Natural Science; 2. Office of Scientific Research, East China Jiaotong University, Nanchang 330013, China)

Abstract: The scavenging activities of two water-soluble C₆₀ derivatives, fulleranol and β-alanine C₆₀ adduct, on superoxide anion free radical were studied by modified pyrogallol auto-oxidation method at 25°C, in a total volume of 4.5 ml, buffered with pH 8.2 50 mmol/L Tris-HCl. The experimental results indicate that these two water-soluble C₆₀ derivatives are all good free radical scavengers, and the scavenging efficiencies become much higher with the concentrations of C₆₀ derivatives. The effects of water-soluble C₆₀ derivatives on the mouse thymus cells growth were also investigated, and the experimental data show that fulleranol and β-alanine C₆₀ adduct could enhance cells' activities and prolong their life span.

Key Words: water-soluble C₆₀ derivatives; superoxide anion free radical; MTT colorimetric analysis; mouse thymus cells

(上接第 142 页)

[2] Anderson D, Holovka J, J. Polym. Sci. Chem. A-1, 1966, 4, 1689~1702.

[3] Grassie N, Meguchar R, Eur. Polym. J. 1972, 8, 257~269.

[4] Mohanty D, Hedrich T, Cohetz K, Polym. Prepr. 1982, 23(1), 284~302.

[5] Takekoshi T, Wirth J, Heath D, J. Polym. Sci. Chem. Ed, 1980, 18, 3069~3082.

[6] Verborget J, Marvel C, J. Polym. Sci. Chem. Ed, 1974, 12, 651

~667.

[7] Matsuo S, Shigera, Manufacture of modified polycyanoanylethers, JP. 62 275 124 [87 275 124].

[8] Liao Weilin(廖维林), Zhang Jiali(章家立), Wang Sheng(王生), Cui Goudi(崔国娣) Acta Polymerica Sinica(高分子学报) 1998, (3), 287~292.

[9] Zerbi G, Xiampelli F, Zamboni V, J. Polym. Sci. Chem. 1964, C7, 141~152.

[10] Kobayashi M, Tsumura K, Tadokoro H, J. Polym. Sci. 1968, A2, 6, 1493~1506.

Studies on Poly(Cyanoanylether) Modified By Phenolphthalein

ZHANG Jia-li, HUANG Xiao-dong, WANG Wei

(Department of Chemistry&Engineering, East China Jiaotong University, Nanchang 330013, China)

Abstract: The modified polycyanoanylethers were prepared by reaction of phenolphthalein, resorcinol and 2,6-difluorobenzonitrile by using the method of random copolycondensation. They were characterized with IR, WAXD, DSC and TG, etc. The results showed that the degree of regularity of the PCE would decrease with increasing of content of phenolphthalein increasing. When phenolphthalein was 40%, the copolycondensation was amorphous. The results of DSC were accordance with that of WAXD. The experiment still showed that the solubility of the modified polycyanoanylethers was greatly improved.

Key words: poly(cyanoanylether); resorcinol; phenolphthalein; copolycondensation modification