

紫外光照射下富勒醇对细胞的防护作用

李宇国¹ 倪瑾² 韩玲² 赵群芬¹ 高福² 李晴暖¹ 徐晶莹¹ 李文新¹

¹ (中国科学院上海应用物理研究所纳米生物医药研究室 上海 201800)

² (第二军医大学放射医学教研室 上海 200438)

摘要 为了解紫外辐射下富勒烯衍生物富勒醇对细胞的生物效应,利用四唑盐比色实验(MTT)法研究了富勒醇对紫外辐照细胞的存活率影响,紫外辐照细胞时富勒醇对细胞超氧化物歧化酶(SOD)和氧化产物丙二醛(MDA)的影响,同时比较了C₆₀-PVP对紫外辐照细胞的辐射生物效应。结果表明,富勒醇能够有效的防护紫外辐射对细胞造成的损伤,其机理可能是富勒醇能够吸收紫外辐照产生的自由基,使细胞膜不被紫外辐照损伤。

关键词 富勒烯,紫外辐照,辐射保护

中图分类号 O644

富勒烯被喻为吸收“自由基的海绵”,它的很多衍生物具有清除自由基的特性。在各种各样的富勒烯衍生物中,多羟基化合物富勒醇(C₆₀(OH)_x)是一种重要水溶性衍生物。其分子结构保留着一半的共轭双键(约10—15个π电子组成的共轭体系),与其前体富勒烯分子相比大大降低了它的毒性。其分子结构上共存有适中电子亲和性基团和烯丙基结构,可有效地清除·OH和O₂·,该特点可使其在生物体系中作为自由基清除剂和水溶性抗氧化剂^[1]。目前,对富勒烯的细胞生物效应的研究主要集中在光辐射生物效应上,大量的研究工作揭示,在可见光照射下,富勒烯具有很强的光致毒性^[2,3]。对于紫外光照射下的保护作用鲜见报导^[4,5]。紫外辐射可以产生自由基等活性物种,目前研究的紫外防护剂,如磷酸化的氨巯基化合物WR-2721、半胱胺和青霉素胺等可以清除自由基^[6]、猝灭单线态氧分子物种,并可与该过程的激发态分子反应,在体外有显著的防护紫外辐射的作用。本实验研究了富勒醇在紫外光辐照下对细胞的生物效应,并与C₆₀-PVP对细胞的紫外防护作用进行了比较,进一步阐明了富勒醇对紫外防护作用的机制。

1 材料和仪器

1.1 材料

L02人肝细胞株,由上海第二军医大学海军医

学系航海医学教研室馈赠;富勒烯,武汉武大三碳簇材料有限公司产品,纯度>99.9%;RPMI1640,美国Gibco BRL公司;新生小牛血清,杭州四季青公司;MTT(溴化四甲基唑),Sigma产品;二甲亚砜,分析纯,上海化学试剂一厂;胰蛋白酶(EC3.4.21.4),Difco产品;其它试剂均为分析纯试剂;SOD,MDA和·OH,O₂·测定试剂盒,南京建成生物有限公司产品。

1.2 主要实验仪器

CO₂恒温孵箱(SHEL-LAB, Japan);紫外灯(上海泰诺电器厂,20W);752紫外分光光度计(日立);电动匀浆器(TEFLON, USA);超低温离心机(UNIVERSAL 32R, Germany);精密数显酸度计(PHS-3TC, 上海天达仪器厂);酶联检测仪(DG5031型,南京华东电子集团医疗装备有限责任公司)。

2 实验方法

2.1 C₆₀(OH)_x(富勒醇)的制备

根据文献[3]中C₆₀(OH)_x的合成方法并稍作修改,合成了C₆₀(OH)_x(x大约为18—22)具体实验步骤如下:

在100mL含C₆₀的饱和苯溶液中,加入2mL 4mol/L的NaOH,并用1.5mL 10%的四丁基氢氧化铵作为相转移催化剂,在加热下加入10mL 30%的

国家自然科学基金(30200069和19975066)资助

第一作者:李宇国,男,1973年10月出生,2003年在中国科学院上海应用物理研究所获理学博士学位,纳米药物和核药物专业,助研

收稿日期:初稿 2004-04-30,修回 2004-09-03

H_2O_2 , 继续加热回流, 直至苯溶液由紫色变为无色。同时, 水溶液由无色变为棕黄色, 相分离, 得到棕黄色 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x\text{O}_y$ 溶液。用甲醇使 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x\text{O}_y$ 沉淀, 加水使沉淀溶解, 再加入甲醇沉淀, 离心去掉甲醇, 反复几次, 直至甲醇溶液的 $\text{pH} \leq 8$ 。将干燥得到的固体加水溶解, 水解 24h 后, 用甲醇沉淀并干燥得到棕黑色固体 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 。通过红外光谱验证, 所得产物与报道相一致。

2.2 细胞实验方法

细胞实验采用 L02 细胞。每次实验前, 将指数生长期的 L02 细胞用 0.25% 胰酶消化, 调整细胞数为 $4 \times 10^4/\text{mL}$, 加入 96 孔板内, 每孔 $150 \mu\text{L}$, 培养 48h, 进行实验。富勒醇与细胞作用时间为 4h。实验结束后, 用 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗去富勒醇, 加入不含富勒醇的新鲜培养液, 继续培养 72h, 用 MTT 法测定细胞的存活率。设不光照不加富勒醇组作为空白对照组。紫外光辐照条件均为: 20W 的紫外灯, 距离细胞 40cm 辐照。实验数据的统计用 ORIGIN 软件中的标准误差处理。测定不同浓度的富勒醇存在下, 紫外辐射 5min 后 L02 细胞的存活率。富勒醇的终浓度为 0.70mg/mL 时, 不同紫外光照时间下 L02 细胞的存活率, 并在光镜下观察、拍照。

细胞存活率 = (实验组 OD 值 / 空白对照组 OD 值) $\times 100\%$

2.3 富勒醇对紫外辐射的 L02 细胞的 MDA 和 SOD 的影响

细胞数为 $4 \times 10^6/\text{培养皿}$, 每组实验三个培养皿。0.70mg/mL 的富勒醇作用 4h 后紫外照射 6min, 光照结束后洗去富勒醇, 放置 0.5h 后将细胞刮下, 用生理盐水调细胞浓度为 $1 \times 10^{10}/\text{L}$, 取细胞悬液 1mL。4°C 下离心 10min (1500r/min), 去上清, 再加入 1mL 匀浆介质 (pH7.4, 0.01mol/L 的蔗糖, 0.01mol/L 的 Tris-HCL, 0.0001mol/L 的 EDTA-2Na), 低温下离心 10min (4000r/min), 在冰水中用电动匀浆器低速匀浆使细胞破碎, 将细胞裂解液以 4000r/min 离心 10min, 取适量上清液进行 SOD 和 MDA 测定。

2.4 C_{60} -PVP 对紫外辐射下的细胞的作用

按照文献[7]的方法制得 C_{60} -PVP: 将 0.8mg 的 C_{60} 溶于 1mL 的甲苯中, 再将 100mg 的 PVP 溶于 2mL 的三氯甲烷中, 两者混合后在真空中蒸发。

之后加入 2mL 的水, 超声后生成浅黄色的溶液, 即为 C_{60} -PVP 溶液, C_{60} 浓度为 0.4mg/mL。

采用 2.2 中的实验方法测定不同浓度的 C_{60} -聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 对 L02 细胞的紫外防护作用。

3 结果

3.1 富勒醇的浓度对紫外辐射 L02 细胞存活率的影响

富勒醇的浓度分别为 1.50、0.70、0.12、0.07、0.00mg/mL 时对紫外辐射 L02 细胞存活率的影响曲线见图 1。由存活率曲线可知, 在富勒醇浓度为 0.70mg/mL 以上时, 在该辐照条件下的紫外辐照对细胞只有很少的杀伤。

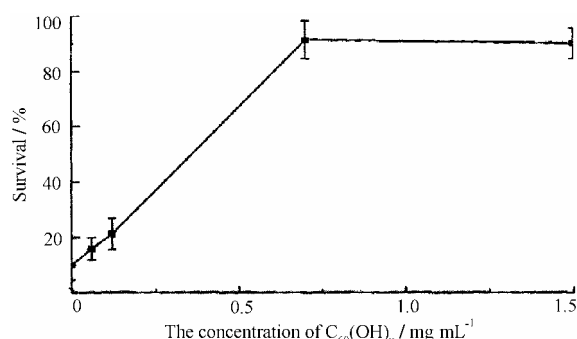


Fig.1 Effects of $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ concentration on survival rate of L02 cells under UV irradiation

3.2 紫外光照时间对富勒醇防护的 L02 细胞存活率的影响

图 2 为富勒醇存在下不同紫外辐照时间的细胞存活率曲线。0.7mg/mL 富勒醇条件下, 紫外辐照 30min, 细胞存活率仍然在 77% 以上。

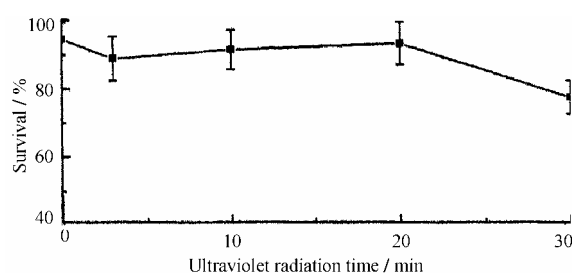


Fig.2 Effects of UV irradiation time on survival rate of L02 cells with 0.7mg/mol $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$

3.3 光镜观察下的紫外辐射细胞图象

图 3 和图 4 分别为富勒醇存在和不存在时, 紫外辐射 10min 后 L02 细胞, 培养 72h 后光学显微镜下的观察图片。

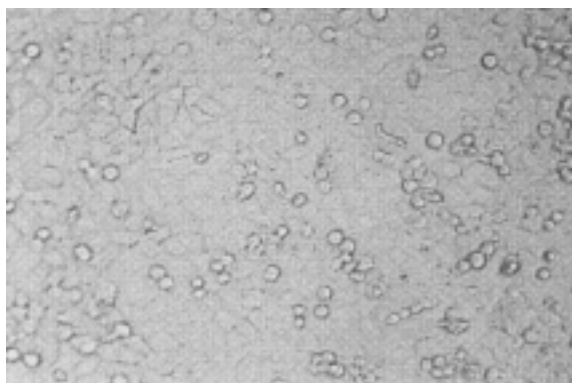


Fig.3 L02 cells with $C_{60}(OH)_x$ under UV irradiation

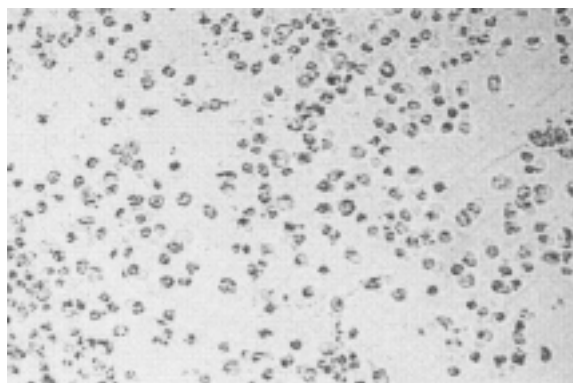


Fig.4 L02 cells without $C_{60}(OH)_x$ under UV irradiation

加入富勒醇的细胞 72h 后, 细胞生长正常, 圆形的细胞为正处于分裂期的细胞 (见图 3)。紫外组细胞几乎全部为碎片状的死亡细胞 (见图 4)。细胞坏死一般是由于细胞受到的损伤特别严重, 如细胞的膜破损, 基因组的严重破坏等。由此可见, 在该无富勒醇的辐照条件下, 细胞基本全部被杀死, 但加入富勒醇后, 细胞受到保护。

3.4 C_{60} -PVP 对紫外辐射下的细胞的作用

加入 C_{60} -PVP 的细胞在紫外线照射后的存活率与对照组的存活率几乎相同, 说明在紫外照射下 C_{60} -PVP 对细胞无保护作用 (数据不再列出)。

3.5 富勒醇对紫外辐射的 L02 细胞的 MDA 和 SOD 的测定

3.5.1 MDA 的测定 辐射产生的氧自由基攻击生物膜中的不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化作用, 并因此形成脂质过氧化物, 如醛基(丙二醛)、酮基、羟基等。表 1 为不同实验条件下 L02 细胞的 MDA 生成量。由表 1 可知, 加入 $C_{60}(OH)_x$ 后, 紫外辐照后细胞的 MDA 的生成量显著减少, 从而防止了细胞在紫外辐照后细胞膜的损伤。

Table 1 MDA in L02 cells_x under different conditions

Group	MDA(nmol/10 ⁶ cells)
UV	22.0±7.22
UV+ $C_{60}(OH)_x$	4.90±2.32
$C_{60}(OH)_x$	2.39±1.98
Blank control	2.45±1.31

3.5.2 SOD 的测定 SOD 在生命机体中的抗氧化损伤作用在于它能高效率清除 $O_2^{\cdot-}$, 从而有效降低对机体毒性更强的 $\cdot OH$, 因此 SOD 被称作一线抗氧化剂。表 2 为不同条件下 L02 细胞的 SOD 测试数据, 可见细胞受到紫外辐照后, UV 和 UV+ $C_{60}(OH)_x$ 组的 SOD 活性都显著降低, 富勒醇并没有激发细胞内的抗氧酶活性的升高, 这说明富勒醇对紫外辐射细胞的防护并不是通过激活细胞内的抗氧化酶活性而起作用的。

Table 2 SOD in L02 cells under different conditions

Group	SOD(nitrides unit /10 ⁶ cells)
UV	0.28±0.24
UV+ $C_{60}(OH)_x$	0.54±0.29
$C_{60}(OH)_x$	1.16±0.36
Blank control	1.08±0.41

4 讨论

富勒醇作为富勒烯的一种重要的水溶性衍生物, 可以作为抗氧化剂, 吸收 $\cdot OH$ 和 $O_2^{\cdot-}$ 等自由基。但对于富勒醇的研究主要集中在其光学毒性上^[2,3], 对于其紫外防护作用鲜见报导。本文实验数据中, 富勒醇的浓度对紫外辐射 L02 细胞存活率曲线和紫外光照时间对富勒醇防护的 L02 细胞存活率曲线以及光镜观察下的紫外辐射细胞图象都显示, 富勒醇对紫外辐射细胞具有很强的防护效果。

另外, C_{60} -PVP 的实验结果表明, 单纯的 C_{60} 并没有紫外防护作用。富勒醇和 C_{60} -PVP 的紫外吸收谱图如图 5 和 6 所示。紫外吸收图谱说明, 富勒醇和 C_{60} -PVP 对紫外都有一定程度的吸收, 且

C₆₀-PVP 的紫外吸收图谱远比富勒醇的紫外吸收图谱要强,但却没有防护紫外的作用。利用产生 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的试剂盒测得 C₆₀-PVP 对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 没有吸收,而富勒醇对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的吸收很强。由此推断两者的差别主要在于对紫外辐射产生的自由基的吸收,而不是富勒醇对紫外线的简单吸收。

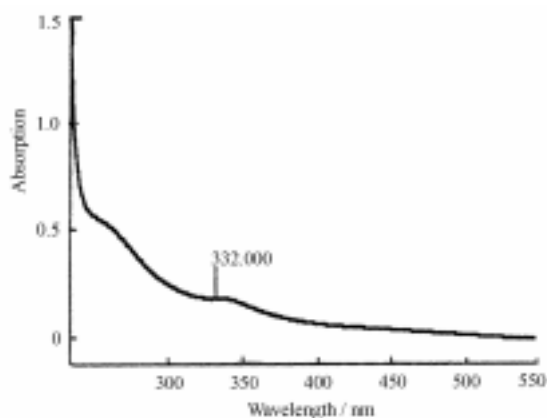


Fig.5 The UV absorption spectrum of 0.02mg/mL C₆₀-PVP

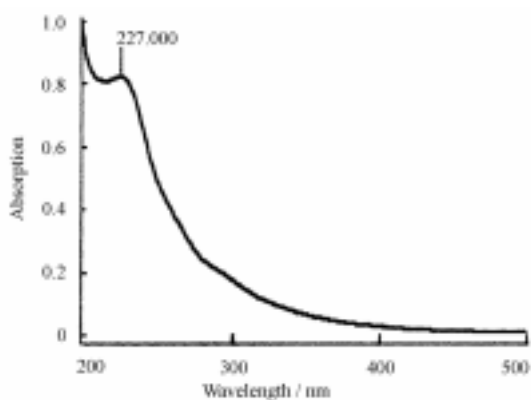


Fig.6 The UV absorption spectrum of 0.10mg/mL C₆₀(OH)

本文中MDA和SOD的数据表明,加入C₆₀(OH)_x后,紫外辐照后细胞的MDA的生成量显著减少,从而防止了细胞在紫外辐照后细胞膜的损伤。而SOD的活性并没有明显升高。细胞受到紫外辐射后的一些关键事件是在细胞膜发生的^[8],只要保护好细胞膜不受紫外辐射损伤,也就保护了细胞在受到紫外损伤而造成的死亡。通过以上的实验数据可知,富勒醇对细胞的紫外辐射防护作用并不是发生细胞内,而是在细

胞外吸收紫外辐射产生的自由基,从而保护了细胞在紫外辐照后细胞膜不受损伤。Elisabetta等^[4]报道了C₃-三甲基二羧酸C₆₀衍生物通过影响细胞的粘附能力保护上皮细胞由紫外辐射引起的细胞凋亡。Fumelli等^[5]报道羧酸C₆₀能够保护人角化细胞不被紫外辐射诱导凋亡。以上文献也都提出富勒烯衍生物对紫外辐射细胞的防护机制与其吸收紫外辐照产生的自由基有关。

5 结论

富勒醇在紫外辐照下对细胞具有保护作用,其机理可能是由于富勒醇能够吸收紫外辐照产生的自由基。通过本文的研究,对于富勒烯衍生物的紫外防护作用机制有了进一步的了解,为富勒烯衍生物在生物医药方面的应用提供了一定的实验依据。

参考文献:

- 1 Chiang L Y, LU F J, Huang H C, *et al.* J Chem Soc Chem Commun, 1995, (12): 1283-1284
 - 2 Hidetoshi Tiluyama, Shigeru Yamago, Eiichi Nakamura. J Am Chem Soc. 1993, **115**(17): 7918-7919
 - 3 Nakajima N, Nishi C, Li F M, *et al.* Fullerene Sci Technol, 1996, **4**(1): 1-19
 - 4 Elisabetta S, Benedetto N, Daniela M, *et al.* FEBS, 1999, **454**: 335-340
 - 5 Fumelli Cristiana, Marconi Alessandra, Salvioli Stefano, *et al.* Journal of Investigative Dermatology. 2000, **115**(5): 835-841
 - 6 Van den Broeke L T, Beijersbergen Van Henegouwen G M J. J Photochem Photobiol. B: Biol, 1993, **17**: 279
 - 7 Yamakoshi Yoko Nakajima, Yagami Takeshi, Fukuhara Kiyoshi. J Chem Soc Chem Commun, 1994, (4): 517-518
 - 8 丁振华, 范建中. 紫外辐射生物学与医学, 北京: 人民军医出版社, 2000. 92-93
- DENG Zhenhua, FAN Jianzhong. The Biology and Medicine of UV Radiation, The Publishing Company of People Military Medical, BeiJing, 2000, 92

The effect of fullerols under UV on cell

LI Yuguo¹ NI Jin² HAN Ling² ZHAO Qunfen¹ GAO Fu² LI Qingnuan¹ XU Jingying¹ LI Wenxin¹

¹ (Lab of Nanoscale Biomedicine, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

² (Radiation Medicine Department, Second military Medical University, Shanghai 200438)

ABSTRACT The UV radioprotective effect of fullerols, which was compared with the effect of C₆₀-PVP, was studied using cultured L02 cells. The cell survivals were determined by MTT method, SOD and MDA also were studied with chemistric colorimetry. The results showed that fullerols can effectively protect cells from damage induced by UV irradiation. The mechanism could be associated with the ability of fullerols to behave as an antioxidant compound, then fullerols protected cell membrane from damage by UV radiation.

KEYWORDS Fullerene, Ultraviolet radiation, Radioprotective.

CLC O644

勘 误

本刊2004年第5期发表的题为“聚N-异丙基丙烯酰胺包覆Fe₃O₄磁导向纳米粒子的制备和表征”的文章中,由于作者原因,造成图4(第295页)有误。正确的图4应该为:

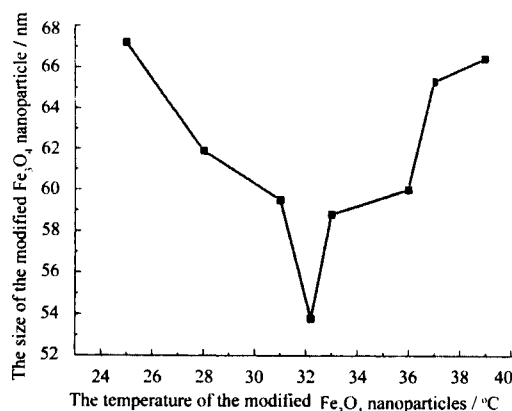


Fig.4 Variation of the PNIPAM-modified Fe₃O₄ nanoparticle size with temperature

特此更正, 谨致歉意。