

文章编号: 1007-4627(2014) 03-0423-05

GANRA-5 对 X 射线和 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐射防护作用研究

姜林¹, 裴海龙^{2, 3}, 朱明月^{2, 3}, 刘婷婷², 徐丹², 孙放^{2, 3}, 张栩锐^{2, 3},
丁楠^{2, 3}, 胡文涛^{2, 3}, 王菊芳², 周光明²

(1. 中国工程物理研究院核物理与化学研究所, 四川 绵阳 621900;

2. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000;

3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 研究了一种新的恶唑酮类衍生物 GANRA-5 对于人胚肺细胞 MRC-5 的辐射防护作用。以 MTT 评价其对于细胞的毒性, 以 γH2AX foci 形成法检测其对于辐照后细胞中双链断裂的影响, 发现其对于受到 X 射线和 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射的细胞具有较强的辐射防护作用, 并进一步发现其能够显著清除辐照后细胞内的自由基。这些结果表明, GANRA-5 具有较低的细胞毒性, 并能够通过清除自由基发挥较强的针对 X 射线和 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子的辐射防护作用, 有望开发为高效的辐射防护药物。

关键词: GANRA-5; 辐射防护; 自由基

中图分类号: Q691.9 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.31.03.423

1 引言

近年来, 随着核技术在军事、医学、工农业、能源等领域的广泛应用以及载人航天的飞速发展, 辐射防护药物的研发再次引起了科学家们极大的兴趣。尤其在细胞因子、植物提取物以及中草药等方面, 辐射防护药物的研究已经取得了令人瞩目的成就。

田芙蓉等^[1]对 BALB/C 小鼠进行伽马射线照射后后肢注射 IL-1 β , 发现给药组外周血和肝脾中的超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽 (GSH) 活性显著升高。而 SOD 和 GSH 具有清除机体自由基的功能。Jovicic^[2]发现, IL-17 对受照射小鼠造血祖细胞的作用与小鼠的品系相关, 在小鼠受到照射后第 1 天和第 3 天, 其对骨髓粒巨噬细胞集落形成单位 (CFU-GM) 无明显作用, 在第 2 天能显著下调 CFU-GM, 此外, IL-17 还可增加 IL-12、IL-6 和 EPO 的产生。

植物提取物作为新型辐射防护药物具有毒性低、药效明确等优点。栗世如等^[3]研究了菊多酚对受辐射小鼠生殖细胞损伤的影响, 发现其能抑制精子畸形且能减轻睾丸组织的氧化损伤, 其效果优于同剂量的维

生素 C, 推测其抗辐射机制与其抗氧化活性相关。陈富柏等^[4]研究了茶多酚的辐射防护作用, 发现其能显著提高受辐射小鼠的存活水平、外周血白细胞数目和外周血 SOD 水平。中草药作为辐射防护药物的研究已有很长历史, 许多中草药已被发现具有清除自由基、提高机体免疫功能等效果。颜燕等^[5]发现灵芝能够提高受辐照小鼠的存活率、白细胞总数以及增强巨噬细胞的吞噬能力, 从而发挥辐射防护作用。史剑慧^[6]发现补肾泻肝方能显著改善受辐射小鼠的外周血象、增加骨髓有核细胞数, 对辐射造成的白细胞减少有明显的缓解作用。然而, 迄今为止, 还没有一种药物毒性较低, 同时又具有较强的辐射防护效应。

早期的研究发现恶唑酮类物质能显著抑制丙烯酸酯的聚合^[7], 我们推测其衍生物具有一定的自由基清除能力。在本研究中, 我们发现 4-(4-甲氧基-3-甲氧苯基-甲基)-2-苯基-5(4 氢)-恶唑酮 (GANRA-5) 对 X 射线和 $^{12}\text{C}^{6+}$ 造成的急性辐射损伤和细胞遗传畸变均有良好的防护效果, 具有较低的毒性和显著的辐射防护作用, 有望开发为较理想的辐射防护药物。

收稿日期: 2014-09-03; 修改日期: 2014-09-27

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2010CB834201); 国家自然科学基金资助项目 (10979062)

作者简介: 姜林 (1978-), 男, 山东威海人, 从事放射化学与辐射生物效应研究; E-mail: sangeruby@gmail.com

通信作者: 周光明, E-mail: zhougmg@impcas.ac.cn.

<http://www.npr.ac.cn>

2 材料与方法

2.1 GANRA-5

4-(4-甲氧基-3-甲氧基苯基-甲基)-2-苯基-5 (4氢)-恶唑酮(GANRA-5)的合成按照Bassi的方法^[7], GANRA-5的纯度大于95%, 质谱分析确定其结构, [¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm) 2.53 (s, 3 H), 3.97 (s, 3 H), 7.12 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H), 7.20 (s, 1 H), 7.53 (m, 2 H), 7.61 (m, 2 H), 8.14 (m, 3 H)]。

2.2 细胞培养

人胚肺成纤维细胞MRC-5来自于中国科学院上海细胞库^[8]。细胞培养于含10%胎牛血清(GE Healthcare HyClone, 美国)的MEM(Sigma-Aldrich, 美国)培养基中, 培养基中还添加100单位/mL的青霉素(Sigma-Aldrich, 美国)和100 mg/mL的链霉素(Sigma-Aldrich, 美国), 细胞培养于饱和湿度的37 °C恒温CO₂培养箱中。

2.3 辐照

所有的细胞辐照实验均在细胞贴壁后且处于对数生长期时进行。细胞的X射线辐照采用美国Faxitron公司生产的RX-650型柜式X射线辐照仪进行, 工作电压为100 kVp, 剂量率为1.2 Gy/min。每次照射前以德国Diados所产T11003型辐射剂量计进行剂量标定。所有样品辐照都在室温下进行。

细胞的¹²C⁶⁺离子辐照在兰州重离子研究装置(HIRFL)辐照终端进行, 使用LET为80 keV/ μ m的¹²C⁶⁺离子束, 剂量率为1 Gy/min, 用空气电离室进行剂量监测。所有样品照射都在室温下进行。

2.4 噻唑兰比色法(MTT)测定细胞活力

细胞活力使用常规MTT法测定^[9]。(1) 96孔板每个孔中种入6000个MRC-5细胞;(2) 96孔板中的细胞培养过夜然后换入含有不同浓度药物的培养基;(3) 48 h之后, 20 μ L MTT溶液(5 mg/mL)加至每孔后孵育4 h;(4) 弃去培养上清后每孔中加入150 μ L二甲基亚砜(DMSO)并摇匀;(5) 测定560 nm处的吸光值。只含有培养基的孔作为调零孔。

2.5 γ H2AX的免疫荧光分析

免疫荧光分析方法参照Cowell等^[10]的文献, 照射后的细胞在4%多聚甲醛中固定15 min后在预

冷的甲醇中再固定20 min, 与0.5% Triton-X 100孵育1 min, 用5%脱脂牛奶封闭1 h后细胞与鼠抗 γ H2AX (Upstate Biotechnology, 美国)单克隆抗体在室温孵育2 h, 以PBST洗涤三遍后再与IgG二抗(Molecular Probes, 美国)在室温孵育1 h, 以PBST洗涤5遍, 细胞核以4', 6-二脒基-2-苯基咪唑(DAPI)进行复染并制片, 在荧光显微镜下(Nikon, 日本)观察并拍照, 每个样品计数至少100个细胞并计算平均焦点数目。

2.6 自由基产额的测定

自由基产额以DCF-DA法测定^[11], MRC-5细胞种于 ϕ 60 mm培养皿中, 当细胞长至70%融合时进行给药处理, 然后在室温下给予不同剂量的辐照, 辐照后马上加入10 μ mol/L的DCF-DA孵育10 min, 然后以胰酶消化回收细胞, 洗涤后重悬于PBS, 在荧光显微镜下观察并拍照。

2.7 统计分析

所有数据以“平均数 \pm 标准误差”($\bar{x} \pm SE$)表示, 显著性采用Student's *t*-test进行检验, $P < 0.05$ 视为有显著性差异。

3 结果

3.1 GANRA-5具有较低的细胞毒性

GANRA-5的溶剂为DMSO, 我们首先用MTT法测定了GANRA-5对MRC-5细胞的毒性。如图1所示, 随着GANRA-5浓度的增高, 细胞活力逐渐增

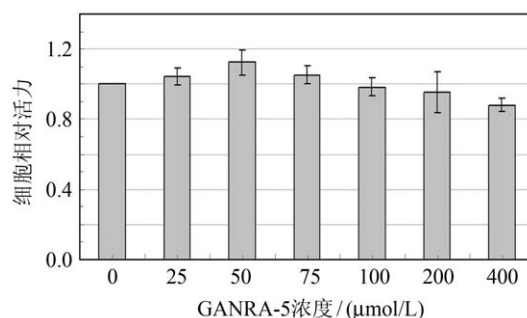


图 1 GANRA-5 对于 MRC-5 细胞的毒性

加, 在50 μ mol/L时达到顶峰(与对照相比 $P < 0.05$), 然后开始下降, 在浓度为400 μ mol/L时下降到(88.2 \pm 3.6)% (与对照相比 $P < 0.05$), 这表明GANRA-5的半致死剂量远高于400 μ mol/L, 即

其对于MRC-5的毒性极低。我们选择100 $\mu\text{mol/L}$ 的GANRA-5进行下游辐射防护实验,此浓度下细胞活力相比如对照为 $(98.5 \pm 5.3)\%$ 。

3.2 GANRA-5对受到X射线和 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照的细胞都具有防护效应

我们用MTT法测定了100 $\mu\text{mol/L}$ 的GANRA-5对于受到X射线和 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照的MRC-5细胞的保护作用。如表1所列,处于对照培养基和含DMSO培养基中的MRC-5细胞在受到2 Gy X射线照射后细胞活力显著下降($P < 0.05$),然而,2 Gy X射线辐射并未造成受到GANRA-5处理后的MRC-5细胞活力的显著下降(相比于未照射细胞 $P > 0.05$),在X

射线照射之后,受到GANRA-5处理的MRC-5细胞活力显著高于对照组和DMSO组($P < 0.05$)。在受到80 $\text{keV}/\mu\text{m}$ $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射的MRC-5细胞中,我们得到相似的结果,即处于对照培养基和DMSO培养基中的细胞在受到2 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后细胞活力显著下降($P < 0.05$),而给予GANRA-5处理的细胞在照射后其细胞活力并未显著下降($P > 0.05$),与受到同样照射的处于对照培养基和DMSO培养基中的MRC-5细胞相比,GANRA-5处理后的细胞活力显著高于前两者($P < 0.05$)。这些结果表明GANRA-5对于受到X射线和 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐射的MRC-5细胞都起到了辐射防护作用。

表1 GANRA-5对受到X射线和 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射的MRC-5细胞活力的影响*

组别	X射线		$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子	
	0 Gy	2 Gy	0 Gy	2 Gy
Ctrl	1	0.695±0.082	1	0.741±0.018
DMSO	0.865±0.045	0.758±0.099	0.929±0.031	0.797±0.045
GANRA-5	0.989±0.076	0.953±0.059	0.976±0.046	0.934±0.048

* Ctrl代表对照培养基, $P < 0.05$ 视为有显著差异。

3.3 GANRA-5能显著抑制辐照后细胞内的DNA双链断裂

作为细胞核内最重要DNA损伤,DNA双链断裂(DSB)水平在细胞受到辐射后的命运决定中发挥重要作用,甚至与肿瘤的发生密切相关。组蛋白2A变体H2AX是在DNA双链断裂修复中最早被磷酸化的底物,其焦点($\gamma\text{H2AX foci}$)的数量和大小可以通过免疫荧光技术检测得到,且与一定范围内的辐射剂量相关^[12]。此研究中我们采用 $\gamma\text{H2AX foci}$ 法检测GANRA-5对于辐照后细胞损伤水平的影响。如

表2所示,经0.5 Gy X射线照射1 h后,处于对照培养基中的MRC-5细胞内的 $\gamma\text{H2AX foci}$ 数量显著上升($P < 0.05$),然而在培养基中加入100 $\mu\text{mol/L}$ 的GANRA-5后,细胞内的 $\gamma\text{H2AX foci}$ 水平显著下降($P < 0.05$),且于未照射细胞相比无显著性差异($P > 0.05$)。在受到80 $\text{keV}/\mu\text{m}$ 的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照后1 h的MRC-5细胞中得到了相似的结果,遭受80 $\text{keV}/\mu\text{m}$ 的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照的MRC-5细胞中 $\gamma\text{H2AX foci}$ 数量显著上升($P < 0.05$),在培养基中添加100 $\mu\text{mol/L}$ 的GANRA-5后,细胞内的 $\gamma\text{H2AX foci}$ 水平显著下降。

表2 GANRA-5对受到X射线和 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射的MRC-5细胞中 $\gamma\text{H2AX foci}$ 水平的影响*

组别	X射线		$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子	
	0 Gy	0.5 Gy	0 Gy	0.5 Gy
Ctrl	0.577±0.137	9.647±0.721	3.990±0.212	8.220±0.358
DMSO		5.617±0.520		3.717±0.424
GANRA-5		2.827±0.402		1.813±0.237

* 数值为平均每个细胞中 $\gamma\text{H2AX foci}$ 数目, Ctrl为对照培养基, $P < 0.05$ 视为差异显著。

3.4 GANRA-5 通过清除自由基发挥辐射防护作用

自由基是辐射导致细胞损伤的重要因素，我们随后检测了遭受 X 射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照的 MRC-5 细胞中自由基的产额。如图 2(a) 所示，2 Gy X 射线辐照后处于对照培养基和 DMSO 培养基组中的 MRC-5 细

胞中自由基产额明显上升，然而添加了 GANRA-5 后相比未照射组细胞自由基产额无显著上升。如图 2(b) 所示，受到 $80\text{ keV}/\mu\text{m}$ 的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照后的 MRC-5 细胞中自由基产额显著上升，然而 GANRA-5 处理组中自由基产生水平显著低于对照组和 DMSO 组，且在辐照后 1 h 恢复至对照水平。

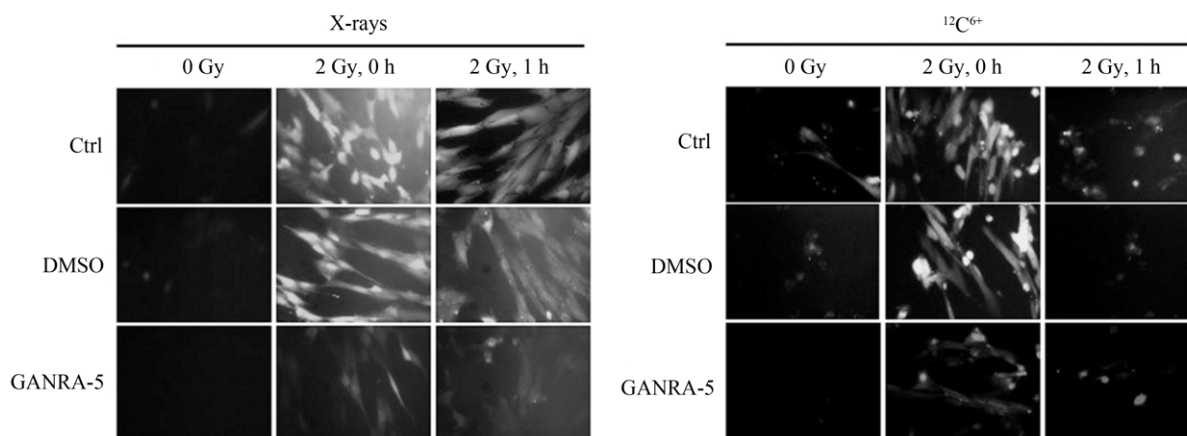


图 2 GANRA-5 能显著抑制辐照后细胞内的自由基产生

Ctrl 为对照培养基。

4 讨论

随着核技术的广泛应用，相关从业人员接触到电离辐射的机会越来越多。尤其是福岛核事故的爆发，更使得辐射安全成为辐射生物学界的重要课题。有鉴于此，辐射防护和相关治疗药物的研究与开发就显得非常重要。早在 20 世纪 50 年代，人们就发现了抗辐射代表药物硫醇类化合物 WR-2721 (氨磷汀)，其可以对各种正常组织提供广泛的细胞保护作用，已被 FDA 认可的放疗保护制剂。但其毒性较大，在服用后能诱发 Stevens-Johnson 综合症及中毒性表皮坏死松懈症等多种毒性反应^[13]。故筛选出毒性较低而辐射防护效果较好的药物就显得极为必要。

本研究中，我们发现恶唑酮衍生物 GANRA-5 对人正常胚肺细胞具有低毒性和高辐射防护效应，其辐射防护效应在低 LET 的 X 射线和高 LET 的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照下都极为显著，推测这可能与其苯环上羰基官能团及羟官能团的强自由基清除能力有关。细胞代谢活动和外界辐射能产生大量的活性氧集团、自由基以及活性中间体，它们可以导致广泛的生理和病理效应^[14-15]，活性氧集团对于某些生理学过程是必须的，

然而多余的自由基也能通过靶向生物大分子如 DNA 而造成细胞死亡^[16]。在研究中，我们发现 GANRA-5 是一种极有应用前景的细胞辐射防护剂，其具有极低的细胞毒性，能够显著抑制辐照后细胞中 DNA 双链断裂的产生，并通过清除自由基而起到辐射防护效果。我们的实验结果证明 GANRA-5 是一种极有前途的新型辐射防护药物。

在下一步的研究中我们拟在动物水平进行 GANRA-5 的毒性和辐射防护效应检测，并研究其具体分子作用机理，以期早日进入临床应用。

参考文献:

- [1] TIAN Furong, ZENG Guiying, GU Xiaogang, *et al.* Journal of the Fourth Military Medical University, 2001, **22**(1): 51. (in Chinese)
(田芙蓉, 曾桂英, 谷小刚, 等. 第四军医大学学报, 2001, **22**(1): 51.)
- [2] JOVICIC G, BUGARSKI D, PETAKOV M, *et al.* Growth Factors, 2004, **19**(1): 61.
- [3] LI Shiru, ZHONG Jinyi. Journal of Health Toxicology, 2000, **14**(4): 204. (in Chinese)
(栗世如, 钟进义. 卫生毒理学杂志, 2000, **14**(4): 204.)

- [4] CHEN Fubai, WU Weipei. *Jorunal of Chinese Medicinal Materials*, 2004, **27**(9): 664. (in Chinese)
(陈富柏, 伍炜培. *中药材*, 2004, **27**(9): 664.)
- [5] YAN Yan, XU Jianhua, LV Shibo, *et al.* *Chinese Journal of Public Health*, 2002, **18**(10): 1221. (in Chinese)
(颜燕, 徐建华, 吕实波, 等. *中国公共卫生*, 2002, **18**(10): 1221.)
- [6] SHI Jianhui, XU Xiaoping. *Chinese International Journal of Medicine*, 2002, **2**(2): 100. (in Chinese)
(史剑慧, 许小平. *中华国际医学杂志*, 2002, **2**(2): 100.)
- [7] BASSI D A, DEULOFEU V, ORTEGA F A F. *J Am Chem Soc*, 1953, **75**(1): 171.
- [8] JACOBS J P, JONES C M, BAILLE J P. *Nature*, 1970, **227**(5254): 168.
- [9] THIRUNAVUKKARASU C, WATKINS S, HARVEY S A K, *et al.* *J Hepatol*, 2004, **41**(4): 567.
- [10] COWELL I G, SUNTER N J, SINGH P B, *et al.* *Plos One*, 2007, **2**(10): e1057.
- [11] DEGLI ESPOSTI M. *Methods*, 2002, **26**(4): 335.
- [12] CHEN Liping, ZHU Xiaonian, CHEN Wen. *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*, 2011, **23**(2): 148. (in Chinese)
(陈丽萍, 朱小年, 陈雯. *癌变, 畸变, 突变*, 2011, **23**(2): 148.)
- [13] VALEYRIE-ALLANORE L, POULALHON N, FAGOT J P, *et al.* *Radiother Oncol*, 2008, **87**(2): 300.
- [14] LI P F, DIETZ R, VON HARSDORF R. *Circulation*, 1997, **96**(10): 3602.
- [15] LI P F, DIETZ R, VON HARSDORF R. *FEBS Lett*, 1999, **448**(2/3): 206.
- [16] YU B P. *Physiol Rev*, 1994, **74**(1): 139.

Radioprotective Effects of GANRA-5 to X-rays and $^{12}\text{C}^{6+}$

JIANG Lin¹, PEI Hailong^{2, 3}, ZHU Mingyue^{2, 3}, LIU Tingting², XU Dan², SUN Fang^{2,3},
ZHANG Xurui^{2, 3}, DING Nan^{2, 3}, HU Wentao^{2, 3}, WANG Jufang², ZHOU Guangming²

(1. *Institute of Nuclear Physics and Chemistry, Chinese Academy of Engineering Physics, Mianyang 621900, Sichuan, China;*

2. *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

3. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: The radio-protective effects on human embryonic lung fibroblast MRC-5 of an oxazolone derivative named GANRA-5 were studied. MTT test was used to evaluate the toxicity and γH2AX foci assay was used to test the influence of GANRA-5 on the DSB (double-stranded break) formation after irradiation. It is found that GANRA-5 exhibited low toxicity and high radio-protective effects on MRC-5 cells against both X-ray and $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam. It is also found that it can act as a scavenger of free radicals. These results suggest that GANRA-5 is a promising radioprotectant.

Key words: GANRA-5; radio-protection; free radical

Received date: 3 Sep. 2013; **Revised date:** 27 Sep. 2013

Foundation item: National Basic Research Program of China(973 Program) (2010CB834201); National Natural Science Foundation of China (10979062)

Corresponding author: ZHOU Guangming, E-mail: zhougm@impcas.ac.cn.

<http://www.npr.ac.cn>