

文章编号: 1007-4627(2012)01-0109-05

GANRA 类药物的抗辐射效应研究

朱明月, 裴海龙, 叶文凌, 张亚楠, 丁楠, 王菊芳, 李文建, 周光明

(中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 以昆明小鼠为实验模型, 连续进行 GANRA 类药物灌胃 3 d 后, 使用 8 Gy 100 kVp 的 X 射线进行辐照处理, 然后对血象、脏器指数、小鼠存活率、肝脏中丙二醛(MDA)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)活性等参数进行了统计分析。结果表明: (1) 药物灌胃对小鼠存活率没有影响。辐照后, 小鼠存活率显著下降, 存活率下降至 50% 所需时间分别为: 照射对照组 20 d、DMSO 组 9 d、1[#] 药物组 29 d、5[#] 药物组 24 d; (2) 药物灌胃对小鼠脏器指数没有明显影响, 辐照后的对照组和 DMSO 组小鼠的肝脏指数、脾脏指数升高, 药物组的脏器指数低于照射对照组和 DMSO 组; (3) 辐照导致各实验组的 MDA 水平升高、SOD 活性下降, 但是 5[#] 药物的 SOD 活性高于 DMSO 组、MDA 水平低于 DMSO 组; (4) 药物灌胃对小鼠血象没有产生明显毒性效应; 辐照后各实验组小鼠的白细胞等都显著下降。从上述实验结果可以看出, GANRA 类 1[#] 和 5[#] 药物具有抗辐射作用, 其机制可能与 GANRA 类药物的自由基清除能力有关。

关键词: GANRA 类药物; 辐射保护效应; 动物实验

中图分类号: Q691.9 **文献标志码:** A

1 引言

近年来, 随着肿瘤放疗的普及和核技术应用的迅速发展, 对抗辐射药物的研发越来越受到人们的重视。自由基作为辐射诱导产生的活性分子, 介导辐射对 DNA 等靶分子的损伤, 一直是化学辐射防护剂的主要靶标^[1]。

GANRA 类药物是一类人工合成的荧光染料, 其羟甲基衍生物(1[#])和羧基羟甲基(5[#])的化学结构提示其具有清除自由基的能力, 因而可能具有辐射防护的作用。但迄今国内外还没有这方面的报道。本研究首次从动物水平研究了 GANRA 类药物的毒性、抗辐射效应及其机理。

2 材料与方法

2.1 材料

昆明种小白鼠, 二级清洁动物, 由兰州大学医学院提供。GANRA 类 1[#] 药物和 5[#] 药物分别由中

国科学院理化研究所合成, 纯度为 97%, 药物均用 DMSO(Sigma 公司)溶解, 配制成 20 mg/mL 溶液。

2.2 方法

昆明种小鼠(雌雄各半)体重为(18.0±2)g, 随机均分为两批, 每批再随机分为 4 组, 分别为对照组、DMSO 组、1[#] 药物组、5[#] 药物组, 每组 16 只小鼠。对照组给予蒸馏水灌胃, 其他各组分别给予对应药物灌胃。每次灌胃 0.1 mL(DMSO 组给予相同体积的 DMSO 进行灌胃), 给药量为每次 100 mg/kg 体重, 连续灌胃 3 d, 最后一次给药 2 h 后, 每组随机分出 8 只小鼠接受 100 kVp X 射线 8 Gy 全身照射, 剂量率为 1.38 Gy/min。辐照后常规饲养, 第一批小鼠用于行为观察, 以及存活率和脏器指数的统计; 第二批小鼠在辐照后第 3 天处死, 用于检测血象、肝脏组织中丙二醛(MDA)的含量和超氧化物歧化酶(SOD)的活性。

收稿日期: 2011-06-01; 修改日期: 2012-01-21

基金项目: 中国科学院百人计划资助项目(0760140BRO); 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB834201)

作者简介: 朱明月(1984—), 女, 河北唐山人, 硕士研究生, 从事辐射生物学效应研究; E-mail: zhumingyuerain@163.com

通讯联系人: 周光明, E-mail: zhougm@impcas.ac.cn

2.3 脏器指数的测定^[2]

颈椎脱臼处死小鼠，解剖摘取肝脏、脾脏和胸腺，用滤纸吸干残血，分析天平称重，各脏器指数的计算公式如下：

$$\text{肝脏指数} = \text{肝脏重量(g)} / \text{体重(g)},$$

$$\text{脾脏指数} = \text{脾脏重量(g)} / \text{体重(g)},$$

$$\text{胸腺指数} = \text{胸腺重量(g)} / \text{体重(g)}.$$

2.4 血象分析

小鼠尾部取血 40 μL ，EDTA 抗凝，于中国科学院兰州分院卫生院检验科检验。

2.5 肝脏组织中 MDA 含量及 SOD 活性的测定

颈椎脱臼处死小鼠，取出肝脏组织，用生理盐水制成 10% 的匀浆，进行各指标测定。MDA 和 SOD 的测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所，指标测定按照试剂盒说明书进行。用全波段分光光度计(Multiskan)测定每项指标的吸光值，各指标的计算公式如下：

肝脏中 MDA 含量(单位 nmol/mg 蛋白) = (测定管 OD - 测定空白管 OD) / (标准管 OD - 标准空白管 OD) $\times 10$ nmol/mL / 所测样品蛋白含量(mg/mL)。

肝脏中总 SOD 活性(单位 U/mg 蛋白) = (对照管 OD - 测定管 OD) / 对照管 / 50% \times 反应液总体积(μL) / 取样量(μL) \times 样品测试前稀释倍数 / 所测样本蛋白含量(mg/mL)。

2.6 统计分析

t 检验分析比较各组实验结果的差异，以 $P < 0.05$ 为差异性显著的标准。

3 结果与分析

3.1 脏器指数的检测

经过分析处理后得到各组小鼠的体重、肝脏指数、脾脏指数和胸腺指数等的平均值(见表 1)，照射后脏器指数变化率见表 2。

从表中可以看出，单独药物组小鼠的体重与对照相比并无显著性差异，说明服用药物对体重改变没有影响。与未照射对照组相比，受 8 Gy 照射的对照组和 DMSO 处理组的肝脏指数(对照组 $P = 0.008$ ，DMSO 组 $P = 0.033$)、脾脏指数(对照组

表 1 GANRA 类药物对脏器辐射敏感性的影响*

分组	辐照 /Gy	体重 /g	肝脏指数 ($\times 10^{-2}$)	脾脏指数 ($\times 10^{-3}$)	胸腺指数 ($\times 10^{-3}$)
对照	0	30.41	6.80**	3.79*	2.00
DMSO	0	27.21	6.33#	2.18	1.20
1# 药物	0	26.90	5.88	2.78	2.05
5# 药物	0	27.28	7.05	3.98	1.96
照射对照	8	19.07	8.79	10.15	1.19
DMSO	8	19.85	9.20	7.36	1.95
1# 药物	8	22.57	6.78*#	2.27*	1.32
5# 药物	8	19.03	6.68**#	2.75*	1.36

* * $P < 0.05$ 与对照组 8 Gy 的比较；** $P < 0.01$ 与对照组 8 Gy 的比较；# $P < 0.05$ 与 DMSO 8 Gy 的比较。

表 2 辐照后脏器指数变化率

分组	肝脏指数 增加率(%)	脾脏指数 增加率(%)	胸腺指数 降低率(%)
照射对照	29	167	40
DMSO	45	237	-62
1# 药物	15	-18	35
5# 药物	-5	-30	30

$P = 0.019$ ，DMSO 组 $P = 0.063$) 都显著升高。受照射的药物灌胃治疗组与受照射的对照组和 DMSO 组相比，肝脏指数(1# 药物与照射对照组 $P = 0.011$ ，1# 药物与 DMSO 组 $P = 0.049$ ，5# 药物与照射对照组 $P = 0.009$ ，5# 药物与 DMSO 组 $P = 0.044$)、脾脏指数(1# 药物与照射对照组 $P = 0.016$ ，1# 药物与 DMSO 组： $P = 0.066$ ；5# 药物与照射对照组 $P = 0.012$ ，5# 药物与 DMSO 组 $P = 0.079$) 都显著降低，与未辐射的对照组和 DMSO 组的一致($P > 0.05$)，说明药物可以有效保护辐射对肝脏、脾脏的损伤。胸腺是非常敏感的器官，但是，在未受照射的一批小鼠中，DMSO 灌胃后，胸腺指数显著低于对照组($P = 0.074$)，而药物组的胸腺指数与对照组没有差异(1# 药物 $P = 0.473$ ，5# 药物 $P = 0.470$)，表明药物对胸腺的毒性很小。辐照后，对照组和药物组的胸腺指数下降，但药物组略高于对照组($P > 0.05$)。

3.2 存活

药物灌胃的小鼠未辐照组 30 d 存活率(1# 药物 87.5%，5# 药物 88.9%) 与对照组小鼠相比无差异

(见图 1)，DMSO 组只有 66.7%，提示 GANRA 类药物对小鼠毒性极小，而且可以缓解 DMSO 的毒性。在辐照后第 20 天对照鼠的存活率下降到 50%，DMSO 组是在第 9 天、1# 药物组是在第 29 天，5# 药物组是在第 24 天。另外，辐照后 DMSO 组、1# 药物、5# 药物组 30 d 存活率均为 50%，高于对照组(37.5%)。

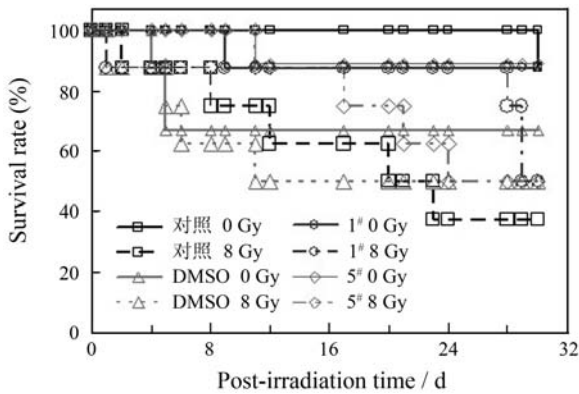


图 1 GANRA 类药物灌胃小鼠存活曲线

3.3 血象变化

经过分析处理后得到各组小鼠的白细胞数、淋巴细胞数、中值细胞数和中性粒细胞数等的平均值列在表 3，照射后血细胞数目变化率列在表 4。

如表 3 所示，未辐照时，DMSO 组的 4 种血细胞数目均明显低于对照组和药物组，表明药物可以缓解 DMSO 的毒性。照射后，小鼠外周血白细胞、淋巴细胞、中值细胞(即嗜酸、嗜碱及单核细胞之和)、中性粒细胞数目都明显降低，各照射组均显著低于对应各未照射组，差异有统计学意义($P < 0.001$)。5# 药物组的外周血白细胞、淋巴细胞、中值细胞略高于对照组(白细胞 $P = 0.321$ ，淋巴细胞 $P = 0.302$ ，中值细胞 $P = 0.033$)，表明 5# 药物能削弱辐照引起的血细胞数降低(见表 4)。

3.4 肝脏组织中 MDA 含量及 SOD 活性的测定

如图 2 所示，未辐照的 DMSO 组、药物组肝脏中的 MDA 都显著高于对照组，表明 DMSO 本身可

表 3 GANRA 类药物对血象的影响*

分组	照射 /Gy	白细胞数 ($\times 10^9$ cells/L)	淋巴细胞数 ($\times 10^9$ cells/L)	中值细胞数 ($\times 10^8$ cells/L)	中性粒细胞数 ($\times 10^8$ cells/L)
对照	0	10.72#	7.50#	6.33	25.83
DMSO	0	6.96	4.70	4.40	18.20
1# 药物	0	13.15##	9.48##	10.25##	35.75##
5# 药物	0	11.11##	7.33#	6.86#	31.00#
照射对照	8	2.26***	1.36***	1.29***	7.71***
DMSO	8	2.59***	1.57***	1.86***	8.29***
1# 药物	8	2.20***	1.33***	1.33***	7.33***
5# 药物	8	2.45***	1.50***	1.88***	7.63***

* *** $P < 0.001$ 与相应组 0 Gy 的比较；# $P < 0.05$ 与 DMSO 0 Gy 的比较；## $P < 0.01$ 与 DMSO 0 Gy 的比较。

表 4 辐照后外周血细胞数目变化率

分组	白细胞数目降低率/(%)	淋巴细胞数目降低率/(%)	中值细胞数目降低率/(%)	中性粒细胞数降低率/(%)
对照	78	81	79	70
DMSO	62	66	57	54
1# 药物	83	85	87	79
5# 药物	77	79	72	75

后 $P = 0.210$)，表明 5# 药物可以缓解 DMSO 的作用。辐照后，对照组和 5# 药物组的 MDA 水平都略有增加，而 DMSO 组和 1# 药物组的 MDA 水平未见明显增加。

如图 3 所示，未辐照的 DMSO 组肝脏中的 SOD 活性略有下降($P = 0.131$)，1# 药物组与对照组的相当，5# 药物组高于对照组，表明 GANRA 药物可以提高 SOD 的活性，且 5# 药物更为显著。对于每一个实验组，尽管辐射都降低了 SOD 的活性，但 5# 药物组的 SOD 活性显著要高于其他 3 组(5#

以加剧肝脏的氧化损伤；但是 5# 药物组的 MDA 水平低于 DMSO 组(未照射 $P = 0.122$ ，照射

药物 8 Gy 与对照组 8 Gy $P=0.074$, 5[#] 药物 8 Gy 与 DMSO 组 8 Gy $P=0.027$), 这表明 5[#] 药物能显著提高肝脏组织中 SOD 活性。

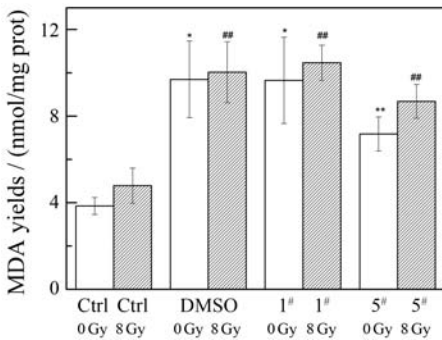


图 2 肝脏组织中 MDA 含量

对照组: * $P<0.05$ 与对照组 0 Gy 的比较; ** $P<0.01$ 与对照组 0 Gy 的比较; ## $P<0.01$ 与对照组 8 Gy 的比较。

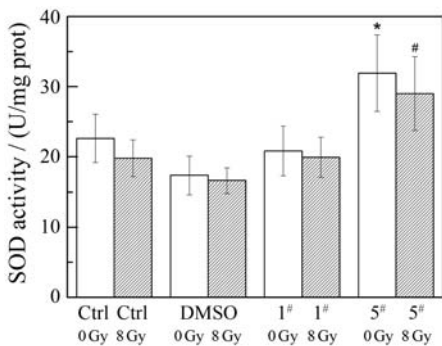


图 3 肝脏组织中 SOD 的活性

对照组: * $P<0.05$ 与 DMSO 0 Gy 的比较; # $P<0.05$ 与 DMSO 8 Gy 的比较。

4 总结

GANRA 类药物的化学结构提示它具有清除自由基和抗辐射作用, 本研究采用动物模型首次对 GANRA 类药物的抗辐射效果及其机理进行了初步探讨。首先, 观察了 8 Gy X 射线照射后小鼠的存活情况, 结果显示辐照后小鼠存活率下降到 50% 所需要的时间分别为: 对照组 20 d、DMSO 组 9 d、1[#] 药物组 29 d、5[#] 药物组 24 d; 其次, 由于胸腺、脾脏和肝脏等对辐射十分敏感^[3], 我们对辐射后脏器指数进行了检测。数据显示照射后对照组和 DMSO 组的肝脏、脾脏指数都显著升高, 而药物组的脏器指数显著低于对照组, 与未辐射的对照组相当。再者, 机体的造血系统由于更新活跃和增殖旺盛, 具有很高的辐射敏感性^[4], 因此血象变化是辐射损伤

评价的常用指标^[5]。实验结果表明, 经过照射后小鼠外周血白细胞、淋巴细胞、中值细胞、中性粒细胞数目明显降低, 但是 5[#] 药物组的白细胞、淋巴细胞、中值细胞却明显高于照射对照组。最后, 肝脏 MDA 的水平反映了辐射诱导的自由基对生物膜造成过氧化损伤的程度^[6]; SOD 是机体内重要的抗氧化酶^[7], 能够有效清除体内超氧阴离子等活性氧自由基^[8], 对机体的氧化还原平衡起着至关重要的作用^[9]。实验结果(如图 2 和 3)显示, 5[#] 药物可以显著提高肝脏的 SOD 活性、降低辐射导致的氧化损伤。上述实验结果从小鼠存活率、脏器指数、血象、SOD 活性等多个方面证明了 GANRA 类药物具有良好的抗辐射效果, 而且 5[#] 药物优于 1[#] 药物。

另外, 从未辐照组的实验结果来看, 1[#] 药物、5[#] 药物灌胃小鼠的 30 d 存活率分别为 87.5% 和 88.9%, 高于 DMSO 组(66.7%), 与对照组的存活率(87.5%)相当; 脏器指数和对照组、DMSO 组的差异不明显; 血象高于 DMSO 组, 与对照组一致; 1[#] 药物的 MDA 水平和 SOD 活性与 DMSO 组的一致, 5[#] 药物却可以显著提高 SOD 活性、降低 MDA 水平。

从实验结果可以看出, 实验中所用的药物溶剂 DMSO 有一定的毒性, 而 GANRA 类药物本身毒性非常低, 不但缓解了 DMSO 的毒性, 而且显著提高机体抗氧化性, 发挥辐射保护作用, 这更加说明 GANRA 类药物在抗辐射、清除自由基方面具有显著的疗效。在下一步深入研究 GANRA 类的药物抗辐射机理, 我们将优化药物溶剂及灌胃方式, 拟采用乳剂给药, 以期得到更好的实验结果。

综上所述, 本研究证实了 GANRA 类 1[#] 和 5[#] 药物毒性低和抗辐射效果好, 在抗辐射药物研发方面具有一定潜力。但是, GANRA 类药物的最佳给药剂量、药物溶剂、给药方式及抗辐射机制等还有待于进一步研究。GANRA 对受照动物的血象变化, 还需要进行连续检测, 观察血象的恢复情况。

参考文献 (References):

- [1] XU Bingxin, XIAO Chengrong, ZHENG Sixin, *et al.* Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection, 2002, **2**(22): 1(in Chinese).
(徐冰心, 肖成荣, 郑思新, 等. 中华放射医学与防护杂志,

- 2002, **2**(22): 1.
- [2] OGAI V B, NOVOSELOVA E G, CHERENKOV D A, *et al.* Radiats Biol Radioecol, 2003, **43**(5): 531.
- [3] DARENSKAIA N G, NASONOVA T A, KOROTKEVICH A O, *et al.* Radiats Biol Radioecol, 2003, **43**(4): 396.
- [4] WIDEL M, JEDRUS S, LUKASZCZYK B, *et al.* Radiat Res, 2003, **159**(6): 713.
- [5] LIANG Li, LI Qian, WANG Ting, *et al.* Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2004, **20**(5): 14 (in Chinese).
(梁莉, 李谦, 王婷, 等. 中药药理与临床, 2004, **20**(5): 14.)
- [6] SRIVASTAVA M, CHANDRA D, KALE R K. Int J Radiat Biol, 2003, **79**(9): 733.
- [7] AGRAWAL A, CHOUDHARY D, UPRETI M, *et al.* Mol Cell Biochem, 2001, **223**(1/2): 71.
- [8] WEI Shihua, LIU Qian. Nuclear Physics Review, 2008, **25**(4): 402 (in Chinese).
(魏世华, 刘倩. 原子核物理评论, 2008, **25**(4): 402.)
- [9] LIANG Jianping, WEI Zengquan, ZHANG Li, *et al.* Nuclear Physics Review, 1998, **15**(2): 110 (in Chinese).
(梁剑平, 卫增泉, 张力, 等. 原子核物理评论, 1998, **15**(2): 110.)

Study on Radioprotective Effects of GANRA-like Medicine

ZHU Ming-yue, PEI Hai-long, YE Wen-ling, ZHANG Ya-nan, DING Nan,

WANG Ju-fang, LI Wen-jian, ZHOU Guang-ming

(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: After three days of medicine administrated, Kunming mice were exposed to 8 Gy of 100 kVp X-rays. Hemogram, viscere, survival, MDA yields and SOD activity were examined. Results shows that, (1) Survival of medicine-administrated mice were similar to the control group. After irradiation, survival dropped significantly. It took 20 days for the control group to reach to 50% survival, while 9 days for DMSO group 29 days for 1[#] drug group, and 24 days for 5[#] drug group. (2) The medicine per se had no obvious impacts on visceral indexes. Liver index and spleen index of the control group and DMSO group were elevated after irradiated, while those of medicine-administrated group did not change much. (3) The groups treated by DMSO and 1[#] drug had high yield of MDA, but low activity of SOD. Compared with DMSO group, 5[#] drug had high SOD activity while low MDA level. Irradiation increased MDA level but decreased SOD activity of every group, However, 5[#] drug still showed higher SOD activity and lower MDA level than DMSO group. (4) The medicine did not show distinctive contributions to variation of hemogram. In summary, our results demonstrated that GANRA-like 1[#] and 5[#] medicine had radioprotective effects and their mechanisms might be related to the scavenging ability of free radicals.

Key words: GANRA-like medicine; radioprotective; animal model

Received date: 21 Jun. 2011; **Revised date:** 1 Nov. 2011

Foundation item: Hundred Talents Program of Chinese Academy of Sciences(O760140BRO); Major State Basic Research Development Program of China(973 Program)(2010CB834201)

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