

· 研究论文 ·

螯合剂 BPCBG 对铀的促排效果和 防护铀致人肾小管上皮细胞损伤的作用

暴一众, 王 丹, 胡昱兴, 徐爱红, 孙梅贞, 陈红红*

(复旦大学放射医学研究所, 上海 200032)

摘要: 从动物和细胞水平观察螯合剂 N, N' -1, 2-亚乙基双[N -(2, 3-二羟基苯基)甘氨酸 (BPCBG) 对铀的促排效果, 以及对铀致人肾近曲小管上皮细胞 (HK-2) 损伤的保护作用。大鼠腹腔注射 (ip) 醋酸铀酰后立即肌肉注射 (im) 不同剂量的 BPCBG, 采用 ICP-MS 方法测定 24 h 的尿铀排出量和肾、骨中铀蓄积量。人肾近曲小管上皮 HK-2 细胞染铀 24 h 后给予不同剂量的 BPCBG 作用 24 h, 采用 ICP-MS 方法检测细胞内铀含量。不同剂量醋酸铀酰染毒 HK-2 细胞后立即或延迟 24 h 给予 BPCBG 作用 24 或 48 h, 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞存活率, 采用 CB 微核法观察 BPCBG 对铀致染色体损伤的影响, 采用 DCFH-DA 荧光探针法检测 BPCBG 对铀诱导细胞内氧自由基生成的影响。以上实验均以 DTPA- CaNa_3 作对照。结果表明, BPCBG (60、120 和 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 使 24 h 尿铀排出量较铀中毒对照组明显增加约 37%~61%, 肾、骨中铀蓄积量降低至中毒对照组的 41%~31% 和 86%~42%, 促排效果随给药剂量增加而明显增强。HK-2 细胞铀染毒后延迟 24 h 给予 10~250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPCBG 作用 24 h, 使细胞内铀含量较铀染毒组显著降低约 55%~60%, 并能明显提高铀染毒 HK-2 细胞的存活率, 显著降低铀诱导的微核形成, 有效抑制铀诱导的细胞内氧自由基的产生。DTPA- CaNa_3 虽能明显降低大鼠肾铀蓄积量和细胞内铀含量, 但促排效果显著低于 BPCBG, 且对铀致细胞损伤无保护作用。以上动物和细胞实验均证明 BPCBG 是有效的铀促排剂, 明显优于 DTPA- CaNa_3 , 并具有清除铀诱导细胞内氧自由基产生的作用, 可以保护铀致肾细胞损伤, 值得进一步研究。

关键词: 螯合剂; 铀; HK-2 细胞; 氧自由基

中图分类号: R962

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 11-1308-06

Effect of the chelator BPCBG on the decorporation of uranium *in vivo* and uranium-induced damage of human renal tubular epithelial cells *in vitro*

BAO Yi-zhong, WANG Dan, HU Yu-xing, XU Ai-hong, SUN Mei-zhen, CHEN Hong-hong*

(Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: This study is to assess the efficacy of BPCBG on the decorporation of uranium (VI) and protecting human renal proximal tubular epithelial cells (HK-2) against uranium-induced damage. BPCBG at different doses was injected intramuscularly to male SD rats immediately after a single intraperitoneal injection of $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Twenty-four hours later uranium contents in urine, kidneys and femurs were measured by ICP-MS. After HK-2 cells were exposed to $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$ immediately or for 24 h followed by BPCBG treatment at different doses for another 24 or 48 h, the uranium contents in HK-2 cells were measured by ICP-MS, the cell survival was assayed by cell counting kit-8 assay, formation of micronuclei was determined by the cytokinesis-block (CB) micronucleus assay and the production of intracellular reactive oxygen species (ROS) was detected by 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) oxidation. DTPA- CaNa_3 was used as control.

收稿日期: 2011-04-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30970870).

*通讯作者 Tel: 86-21-64437130, Fax: 86-21-64048043, E-mail: hhchen@shmu.edu.cn

It was found that BPCBG at dosages of 60, 120, and 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ resulted in 37%–61% increase in 24 h-urinary uranium excretion, and significantly decreased the amount of uranium retention in kidney and bone to 41%–31% and 86%–42% of uranium-treated group, respectively. After HK-2 cells that had been pre-treated with $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$ for 24 h were treated with the chelators for another 24 h, 55%–60% of the intracellular uranium was removed by 10–250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of BPCBG. Treatment of uranium-treated HK-2 cells with BPCBG significantly enhanced the cell survival, decreased the formation of micronuclei and inhibited the production of intracellular ROS. Although DTPA- CaNa_3 markedly reduced the uranium retention in kidney of rats and HK-2 cells, its efficacy of uranium removal from body was significantly lower than that of BPCBG, and it could not protect uranium-induced cell damage. It can be concluded that BPCBG effectively decorporated the uranium from $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$ -treated rats and HK-2 cells, which was better than DTPA- CaNa_3 . It could also scavenge the uranium-induced intracellular ROS and protect against the uranium-induced cell damage. BPCBG is worth further investigation.

Key words: chelating agent; uranium; HK-2 cell line; reactive oxygen species

铀是重要的核燃料和核武器的装料, 近年来还用于贫铀武器的制备以及核恐怖活动。一旦发生人体铀内污染事故, 目前临床上尚无有效的治疗药物, 寻找高效低毒的铀促排螯合剂一直为世界各国所重视。多年来利用仿生化学原理, 根据微生物铁转运体中含邻苯二酚类 (CAM) 和羟基吡啶酮类 (HOPO) 螯合基团的化学结构, 研究人员设计合成了一系列 CAM 类和 HOPO 类螯合剂用于锕系核素的促排效果筛选。国内研究报道 CAM 类螯合剂 8102、7601 和 811 对大鼠急性铀中毒有很好的促排效果^[1, 2]; 美国 Durbin 等研究发现 CAM 类螯合剂 5-LICAM (S)、HOPO 类螯合剂 3, 4, 3-LI (1, 2-HOPO) 和 5-LIO (Me-3, 2-HOPO) 亦有很好的排铀作用^[3–5], 但均仍处于实验室研究阶段。近年来, 复旦大学放射医学研究所合成了一系列双分子取代氨烷羧酸型螯合剂, 已报道它们促排铀的效果和构效关系^[6, 7], 其中 *N, N'*-1, 2-亚乙基双[*N*-(2, 3-二羟基苯甲基)]甘氨酸 (BPCBG, 图 1) 对放射性铀的促排效果最佳。本研究拟进一步观察 BPCBG 对大鼠急性铀中毒的促排效果, 并与目前临床使用的广谱核素促排药 DTPA- CaNa_3 进行比较。由于肾脏是铀的化学毒性的靶器官, 急性铀中毒时可产生严重肾功能衰竭, 肾近曲小管上皮细胞是损伤最严重的部位。因此, 本研究采用铀染毒人肾近曲小管上皮细胞 (HK-2) 为模型, 进一步观察 BPCBG 对细胞内铀的促排作用以及铀致细胞损伤的保护作用, 并初步探讨其作用机制。

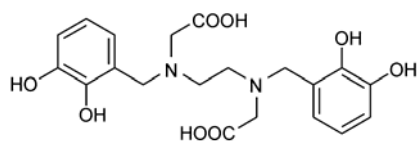


Figure 1 Chemical structure of BPCBG

材料与方法

受试化合物与主要试剂 BPCBG 由本所合成, 其化学名为 *N, N'*-1, 2-亚乙基双[*N*-(2, 3-二羟基苯甲基)]甘氨酸, 相对分子质量为 420。该化合物为淡黄色粉末, 纯度为 98%, 临用前用去离子水、8% NaHCO_3 溶解配成溶液, pH 为 6~7。该化合物的结构确证和合成方法见文献[6]。DTPA- CaNa_3 采用临床使用的 25% 的水针剂 (由本所委托上海复旦复华药业有限公司配制)。醋酸铀酰 [$\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 色谱纯, 美国 Chem-Impex 公司] 用去离子水配制成 40 和 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的工作液。DMEM/F12 (1:1) 细胞培养基 (HyClone) 购自美国 Thermo Fisher (北京) 公司; 胎牛血清 (Gibco) 和 0.25% 胰蛋白酶-EDTA (Gibco) 购自美国 Invitrogen 公司; 细胞松弛素 (Cyt-B) 购自美国 Sigma 公司; CCK-8 试剂盒和活性氧检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司。

主要实验仪器 细胞培养箱和 X-7 电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS) 为美国 Thermo 公司产品, ICP-MS 测定生物样品中铀含量的主要工作条件: 等离子体功率 1 300 W, 雾化气流速 0.85 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 采样深度 110 步, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^{238}U , 计数达 60 Mcps, 质量分析室压力 2×10^{-7} mbar (1 bar = 100 kPa); SynergyMx 多功能酶标仪为美国 BioTek 公司产品。

实验动物、细胞及其培养 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 37 只, 体重 170~200 g, 由复旦大学实验动物中心提供。人肾近曲小管上皮细胞系 (HK-2) 购自上海麦莎生物科技有限公司, 用含 10% 胎牛血清、100 $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素的 DMEM/F12 (1:1) 完全培养基, 培养于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中。

大鼠铀促排实验 大鼠按体重随机分为 6 组, 每

组 5~14 只。给药组大鼠于腹腔注射 (ip) 醋酸铀酰 (100 $\mu\text{g}/\text{只}$) 后立即肌肉注射 (im) 螯合剂, BPCBG 的给药剂量分别为 60、120 和 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (螯合剂/铀摩尔比分别为 45~53、90~105 和 450~525), DTPA- CaNa_3 的给药剂量为 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (螯合剂/铀摩尔比约为 500)。铀中毒对照组腹腔注射醋酸铀酰后立即肌肉注射等体积生理盐水, 同时设置正常对照组, 仅肌肉注射等体积生理盐水。将大鼠置于代谢笼中, 一鼠一笼, 自由摄食和饮水。收集铀中毒后 24 h 尿液, 同时处死大鼠取二侧肾脏和股骨; 加入浓硝酸/高氯酸组成的混合酸, 置石墨电热板上消化处理后, 采用 ICP-MS 测定尿、肾和骨样品中的铀含量。将测得的各处理组样品的数值减去正常对照组的本底值, 再乘以稀释倍数, 换算成尿铀排出量和组织中铀蓄积量。

细胞内铀的促排 采用 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铀酰染毒 HK-2 细胞 24 h 后换液, 分别加入含 10、50 和 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPCBG (螯合剂/铀摩尔比分别约为 8.8、44 和 220) 的新鲜培养液继续培养 24 h, 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTPA- CaNa_3 作为阳性对照, 空白对照组不加入醋酸铀酰和螯合剂, 铀染毒组只加入醋酸铀酰, 其余操作同给药组。螯合剂作用 24 h 后收集细胞、计数, 加入一定量的碱性裂解液使细胞裂解后, 采用 ICP-MS 检测样品中的铀含量, 将测得的各处理组的数值减去空白对照组的本底值, 再乘以稀释倍数和除以细胞数, 换算成细胞内铀含量/ 10^6 个细胞。

微核检测 取 1×10^4 个对数生长期的 HK-2 细胞接种于 35 mm 培养皿中培养过夜, 加入含 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铀酰的培养液染毒 HK-2 细胞 24 h 后, 给予 50 和 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPCBG 和 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTPA- CaNa_3 继续培养 48 h, 同时设置空白对照组和铀染毒组, 然后加入含 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cyt-B 的新鲜培养液作用约 26 h。弃培养液、PBS 洗 2 次, 细胞用甲醇-冰醋酸 (9:1) 固定 15 min, Giemsa 染色后置显微镜下观察计数 500~1 000 个双核细胞, 计算微核发生率。微核率 (%) = (微核数/双核细胞数) $\times 100\%$ 。

细胞存活率测定 取 2×10^5 个对数生长期的 HK-2 细胞接种于 35 mm 培养皿中培养过夜, 加入 100、300、600 和 900 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同浓度的醋酸铀酰分别与 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPCBG 和 DTPA- CaNa_3 共同作用 HK-2 细胞 48 h, 同时设置空白对照组和铀染毒组。以上各实验组细胞经胰酶消化、计数后, 取 6×10^3 个细胞接种于 96 孔板中, 设置 4 个平行孔, 培养 24 h 后每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL 再培养 4 h, 在多功能酶标仪

(BioTek) 上于 450 nm 处测定每孔的吸收度 (A) 值。同时将不同数量 ($2\times 10^3\sim 10\times 10^3$) 的细胞接种于 96 孔板中, 培养 5~6 h 待细胞贴壁后加入 CCK-8 溶液 10 μL 再培养 4 h, 测定其 A 值, 建立细胞数与 A 值的标准曲线。将各实验组所得 A 值换算成存活细胞数, 计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = [(实验组存活细胞数/接种细胞数)/(对照组存活细胞数/接种细胞数)] $\times 100\%$ 。

细胞内氧自由基 (ROS) 检测 取对数生长期的 HK-2 细胞, 按细胞数 $6\times 10^3/\text{孔}$ 接种于 96 孔板中。600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铀酰和螯合剂共同作用 HK-2 细胞 48 h, 或醋酸铀酰预先染毒 24 h 后再加入螯合剂作用 24 h, BPCBG 的浓度为 50 和 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, DTPA- CaNa_3 的浓度为 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。螯合剂处理后, 加入 DCFH-DA 使其终浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 置细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清培养液洗涤细胞 3 次后, 采用多功能酶标仪 (BioTek) 在 488 nm 激发波长、525 nm 发射波长处检测荧光强度, 计算细胞内 ROS 生成量。细胞内 ROS 量 (为空白对照组的%) = (各实验组的荧光强度/空白对照组的荧光强度) $\times 100\%$ 。

统计学分析 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 11.5 统计软件进行多组间比较 (单因素方差分析) 和两组间比较 (t 检验)。

结果

1 BPCBG 对铀中毒大鼠的促排效果

大鼠腹腔注射醋酸铀酰 (100 μg 铀/只) 后立即分别肌肉注射 BPCBG (60、120 和 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 以及 DTPA- CaNa_3 (600 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$), BPCBG 各组大鼠的 24 h 尿铀排出量显著增加, 比中毒对照组增加约 37%~61%, 肾、骨中铀蓄积量明显降低, 分别比中毒对照组降低约 59%~69% 和 14%~58%, 随给药剂量增加促排效果明显增强。DTPA- CaNa_3 (600 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 能使 24 h 尿铀排出量较中毒对照组增加约 23%, 肾铀蓄积量较中毒对照组明显降低约 51%, 但均显著低于 BPCBG (120 和 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的效果, 且骨铀蓄积量未见明显下降反而略有上升。见表 1。

2 BPCBG 对铀染毒 HK-2 细胞的促排效果

10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铀酰染毒 HK-2 细胞 24 h 后, 加入 10、50 和 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BPCBG 作用 24 h, 结果显示, 10、50 和 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPCBG 可使细胞内铀含量较铀染毒对照组显著降低约 55%~60% ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但三者间无显著差别。250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTPA-

Table 1 Efficacy of uranium removal from rats by promptly injected BPCBG. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 24 h-uranium control; $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$, $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.01$ vs DTPA- CaNa_3 -treated group

Group	n	Ligand dosage / $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$	Uranium content at 24 h / μg		
			Urinary excretion	Kidney retention	Bone retention
24h-uranium control	14	—	16.36 ± 3.39	7.83 ± 2.59	20.31 ± 2.47
BPCBG	5	60	$22.42 \pm 5.46^*$	$3.27 \pm 1.49^{**}$	$17.43 \pm 1.74^*$
	8	120	$24.94 \pm 5.55^{***\Delta}$	$2.64 \pm 0.29^{***\Delta\Delta}$	$11.71 \pm 1.63^{***\Delta\Delta\Delta}$
	5	600	$26.33 \pm 2.87^{***\Delta\Delta}$	$2.49 \pm 0.10^{***\Delta\Delta}$	$8.61 \pm 2.36^{***\Delta\Delta\Delta}$
DTPA- CaNa_3	5	600	20.10 ± 1.18	$3.82 \pm 0.84^{**}$	22.21 ± 6.13

CaNa_3 也呈现出明显的排铀效果 ($P < 0.05$), 使细胞内铀含量降低约 52% (图 2)。

3 BPCBG 对铀诱导 HK-2 细胞微核形成的影响

$600 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铀染毒 HK-2 细胞 72 h 可诱导微核率形成达 16.9%, 显著高于空白对照组 ($P = 0.000$)。铀染毒细胞 24 h 后给予 50 和 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPCBG, 可使微核率分别较铀染毒对照组显著下降约 42% 和 52% (均 $P = 0.001$), $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTPA- CaNa_3 仅使微核率下降约 15% ($P > 0.05$), 与铀染毒对照组比较无明显差异, 未显示对铀致染色体损伤的保护作用。见表 2。

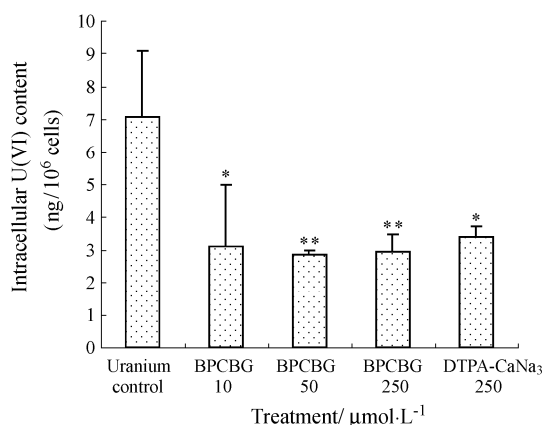
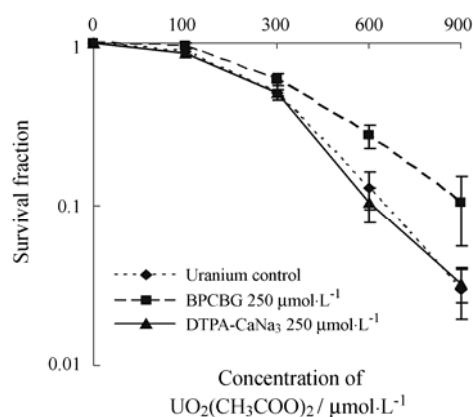
4 BPCBG 对铀抑制 HK-2 细胞增殖的影响

铀染毒 HK-2 细胞 48 h, 染铀剂量从 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

增加至 $900 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率随铀染毒剂量增加而显著下降。铀染毒后立即加入 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPCBG 作用 48 h 后, 能显著提高 600 和 $900 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铀染毒细胞的存活率 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。相同浓度的 DTPA- CaNa_3 则无效。见图 3。

5 BPCBG 对铀诱导 HK-2 细胞内 ROS 产生的影响

由表 2 可见, $600 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铀染毒 HK-2 细胞 48 h 后诱导 HK-2 细胞内 ROS 显著增加, 约为空白对照组的 2.7 倍。染铀后立即加入整合剂或延迟 24 h 加入整合剂, 50 和 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPCBG 均能显著抑制铀诱导的 ROS 生成, ROS 较染铀组分别降低约 19%~36% 和 18%~32%, 随药物浓度增加抑制作用有增加趋势。而 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTPA- CaNa_3 无清除 ROS 的作用。

**Figure 2** Efficacy of uranium removal from HK-2 cells by delayed BPCBG administration. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs uranium control group**Figure 3** Effect of BPCBG on cell survival of uranium-treated HK-2 cells**Table 2** Effect of BPCBG on uranium-induced micronuclei formation and ROS production in HK-2 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs normal control group; $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.001$ vs uranium control group

Group	Ligand dosage/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Micronuclei frequency/%	Intracellular ROS (% of control)	
		24 h uranium + 48 h ligand	(Uranium+ligand) 48 h	24 h uranium + 24 h ligand
Normal control	—	6.0 ± 0.1	1	1
Uranium control	—	$16.9 \pm 0.2^{***}$	2.72 ± 0.08	2.77 ± 0.04
BPCBG	50	$9.7 \pm 0.1^{\Delta\Delta\Delta}$	$2.20 \pm 0.09^{\Delta}$	$2.27 \pm 0.02^{\Delta}$
	250	$8.1 \pm 0.5^{\Delta\Delta\Delta}$	$1.73 \pm 0.11^{\Delta}$	$1.89 \pm 0.01^{\Delta}$
DTPA- CaNa_3	250	14.2 ± 2.4	2.64 ± 0.07	2.69 ± 0.03

讨论

新螯合剂 BPCBG 通过线型骨架将 2 个 CAM 类螯合基团和 2 个羧酸基团相连接, 以利于与铜系核素螯合形成最适合的“空穴”、提高促排效果。作者前期研究已发现^[6, 7], BPCBG 对放射性钍有很好的促排效果, 大鼠静脉注射 (iv) ^{234}Th 后立即肌肉注射 (im) BPCBG $500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于 $1.19\text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$), 48 h 尿 ^{234}Th 排出量达中毒量的 51%, 肝、骨蓄积量比 ^{234}Th 中毒组降低约 71% 和 93%。本研究动物实验结果表明, 降低 BPCBG 的给药剂量为排 ^{234}Th 有效剂量的 5% ($60\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)、10% ($120\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 50% ($600\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 时, 对钍中毒大鼠亦具有较好的促排效果, 明显优于 DTPA- CaNa_3 , 24 h 尿钍排出量比钍中毒对照组增加约 37%~61%, 肾、骨中钍蓄积量降低约 59%~69% 和 14%~58%, 随给药剂量增加促排效果明显增强; 而 DTPA- CaNa_3 ($600\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 使肾钍蓄积量较中毒对照组明显降低约 51%, 尿钍排出量增加约 23%, 骨钍蓄积量反而有所增加, 可能与 DTPA 螯合钍后引起钍在体内组织中的再分布有关。Durbin 等^[3]研究报道, CAM 类螯合剂 5-LICAM (S) 降低骨钍效果最好, 大鼠静脉注射钍中毒后立即腹腔注射 (ip) 螯合剂 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (螯合剂/钍摩尔比为 91:1), 可使骨钍蓄积量较钍中毒对照组明显降低约 49%, 肾钍蓄积量显著降低约 62%, 尿钍排出量较钍中毒对照组增加约 35%, 但是该化合物的毒性较高。HOPO 类螯合剂 3, 4, 3-LI (1, 2-HOPO) 和 5-LIO (Me-3, 2-HOPO) 降低肾钍效果最佳, 可使大鼠肾钍蓄积量较钍中毒对照组显著降低约 81% 和 84%, 但未能降低骨钍蓄积量, 尿钍排出量较钍中毒对照组分别增加约 7% 和 20%。由此可见, BPCBG 的排钍作用有其自身的特点, 能同时显著降低肾、骨中钍蓄积量, 提高尿钍排出量。

本研究采用钍染毒肾近曲小管上皮 HK-2 细胞的方法, 首次从细胞水平进一步观察螯合剂对肾细胞内钍的促排效果, 同时探讨 BPCBG 对钍致细胞增殖性死亡和染色体损伤的保护作用。结果显示, 10、50 和 $250\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPCBG (螯合剂/钍摩尔比分别为 8.8、44 和 220) 延迟 24 h 给药可使细胞内钍排出量比钍染毒对照组增加约 55%~60%, 三者间无明显差别, 但当螯合剂/钍摩尔比从 8.8 增加到 44 时, 排钍效果有增加趋势, 此后增加给药剂量排钍效果趋于稳定。比较动物实验和细胞实验的排钍效果发现, BPCBG 能显著降低大鼠肾钍蓄积量, 亦能显著降低

HK-2 细胞内钍的蓄积量; DTPA- CaNa_3 仅能明显降低大鼠肾钍蓄积量, 亦能显著降低 HK-2 细胞内钍蓄积量, 但均低于 BPCBG 的效果。由此可见细胞实验的结果与动物实验结果相吻合, 表明采用肾近曲小管上皮 HK-2 细胞进行排钍效果实验是可行的, 同时提示观察螯合剂对不同钍蓄积靶器官的促排效果应采用相应的细胞系进行研究。

本实验还观察到, BPCBG 可显著降低钍诱导 HK-2 细胞的微核形成, 提高钍染毒细胞的存活率, 对钍致肾细胞损伤具有明显的保护作用。研究其作用机制发现, BPCBG 能显著抑制钍诱导的细胞内 ROS 的生成, 与其化学结构中含有邻苯二酚基团密切相关。作者以前的实验也证实, 含邻苯二酚基团的螯合剂具有清除超氧阴离子自由基和抑制辐射脂质过氧化作用, 可以有效防护 ^{234}Th 内照射所致的损伤, 增进疗效^[8, 9], 而 DTPA- CaNa_3 为氨羧酸型螯合剂, 无清除细胞内 ROS 的作用, 亦未能保护钍致肾细胞的损伤。有研究报道, 抗氧化剂 DMSO 对贫钍诱发的人支气管上皮 BEAS-2B 细胞损伤具有较好的防护作用, 能有效清除贫钍诱发的细胞内活性氧的产生, 明显拮抗贫钍所致的细胞氧化损伤、膜损伤、DNA 损伤和基因突变, 防护贫钍诱发细胞恶性转化 (致癌性)^[10]。因此, 研究的铜系核素促排螯合剂既能加速核素自体内排出, 同时又保护核素致细胞损伤, 是救治核素内污染最为有效的方法。

由于体外细胞培养用于药效研究具有用药量少、低污染、简便快速等优点, 又可同时观察促排效果和对细胞损伤的保护作用, 作为初筛方法值得推广应用。

以上动物和细胞实验均证实 BPCBG 对钍中毒亦具有较好的促排效果, 明显优于 DTPA- CaNa_3 , 并具有清除钍诱导细胞内氧自由基产生的作用, 保护钍致肾小管上皮细胞损伤, 是一个值得进一步深入研究的钍、钍促排剂。

致谢: 感谢中国科学院上海原子核研究所李玉兰老师对本研究工作的大力支持。

References

- [1] Liu S, Luo M, Chen G, et al. Efficacy of chelating agents for treatment of acute uranium intoxication in rats [J]. Radiat Prot (辐射防护), 1995, 15: 186-189.
- [2] Liu S, Luo M, Chen G, et al. Efficacy of lower dose 8102 in removing uranium from rats [J]. J Shanghai Med Univ (上海医科大学学报), 1996, 23: 275-277.

- [3] Durbin PW, Kullgren B, Ebbe SN, et al. Chelating agents for uranium (VI): 2. Efficacy and toxicity of tetradentate catecholate and hydroxypyridinonate ligands in mice [J]. Health Phys, 2000, 78: 511-521.
- [4] Paquet F, Chazel V, Houpert P, et al. Efficacy of 3, 4, 3-LI (1, 2-HOPO) for decorporation of Pu, Am and U from rats injected intramuscularly with high-fired particles of MOX [J]. Radiat Prot Dosimetry, 2003, 105: 521-525.
- [5] Abergel RJ, Durbin PW, Kullgren B, et al. Biomimetic actinide chelators: an update on the preclinical development of the orally active hydroxypyridonate decorporation agents 3, 4, 3-LI (1, 2-HOPO) and 5-LIO (Me-3, 2-HOPO) [J]. Health Phys, 2010, 99: 401-407.
- [6] Yang Z, Sun M, Ni Z, et al. Synthesis of bimolecule substituted phenols and their effect on rats for removal of radiothorium [J]. Chin J Radiol Med Prot (中华放射医学与防护杂志), 1997, 17: 178-181.
- [7] Yang Z, Sun M, Ni Z, et al. Structure activity relationship study of chelating agents of double molecular substituted phenols amino carboxylic acid for decorporated radiothorium [J]. Chin J Radiol Med Prot (中华放射医学与防护杂志), 1999, 19: 183-185.
- [8] Chen H, Hu Y, Zhang Y, et al. Studies of phenolic chelating agents on free radical scavenging activities and inhibitory action in radiation-induced lipid peroxidation [J]. J Radiat Res Radiat Proces (辐射研究与辐射工艺学报), 1999, 17: 209-213.
- [9] Chen HH, Luo MC, Sun MZ, et al. Decorporating efficacy of catecholaminocarboxylate chelating agents for thorium-234 and protective effects on associated radiation injury [J]. Int J Radiat Biol, 2005, 81: 309-318.
- [10] Huang B, Long Y, Li Z, et al. Hereditary toxicity of depleted uranium and protection of DMSO in BEAS-2B cells [J]. Pract Prev Med (实用预防医学), 2009, 16: 639-642.

《现代药物与临床》2012 年征订启事

《现代药物与临床》(原《国外医药·植物药分册》, 2009 年起更名)是由天津药物研究院、中国药学会共同主办的医药科技期刊。双月刊, 国内外公开发行。

本刊以报道国内外药物研究的新进展与新技术, 以及药物在临床应用方面的最新动态为主要内容, 为新药研发、生产人员, 以及临床医生与药剂师合理用药提供有益的参考。报道内容涵盖了药物的基础研究和临床研究各学科, 设置“综述与专论”、“实验研究”、“临床研究”、“未来药物”、“药事管理”、“知识产权”、“药物经济学”等栏目。读者对象主要针对大专院校、科研院所、制药企业、医院、药品监督管理部门从事现代药物生产、研究、应用与管理的各级人员, 以及各级医师、药师等。

本刊创始于 1980 年, 近年来陆续被国外检索系统, 如美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、美国《剑桥科学文摘》、英国《全球健康》和波兰《哥白尼索引》收录。同时一直被中国期刊全文数据库、中国核心期刊(遴选)数据库和中国学术期刊(光盘版)等国内检索系统收录。2010 年本刊被评为天津市一级期刊。

本刊为双月刊, 单月 30 日出版, 大 16 开, 封面铜板纸彩色覆膜, 内页全用铜版纸, 每册 80 页, 每期定价 15 元, 全年 90 元。自办发行, 请直接与编辑部联系订阅。

现有少量《国外医药·植物药分册》1996~2008 年年度合订本, 每年一本, 每本(年)80 元(含邮资); 2006~2008 年年度合订本, 每本(年)90 元(含邮资)。《现代药物与临床》2009~2011 年年度合订本, 每本(年)100 元。

本刊开通了在线投稿、审稿和稿件查询系统, 欢迎投稿, 欢迎订阅!

编辑部地址: 天津市南开区鞍山道 308 号, 邮编: 300193

电话: (022) 23006823, 电子信箱: dc@tiprpress.com

网址: www.tiprpress.com 或 www.中草药杂志社.中国