

水溶性印迹壳聚糖对贫铀致细胞毒性的解毒作用

张晓菲^{1,2}, 李超³, 赵长琦^{1*}, 刘丽宏^{2*}

(1. 北京师范大学生命科学学院, 北京 100875; 2. 中国人民解放军第二炮兵总医院药剂科, 北京 100088;
3. 中国医药集团总公司四川抗菌素工业研究所, 四川 成都 610052)

摘要: 利用印迹技术提高壳聚糖螯合铀的性能, 探讨水溶性印迹壳聚糖是否能对贫铀 (depleted uranium, DU) 染毒细胞有解毒作用。首先筛选对铀酰离子 (UO_2^{2+}) 螯合率高的印迹壳聚糖, 再以人肾近端小管上皮细胞株 (HK-2) DU ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 染毒为模型, 实验组加入壳聚糖 ($400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和阳性对照组加入二乙烯三胺五乙酸 (DTPA, $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 与 DU 共同作用下培养细胞。3 个 Cu^{2+} 印迹壳聚糖对 DU 螯合量超过 $49 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, 明显高于相应的非印迹壳聚糖; MTT 测定 DU 污染组的细胞存活率为 57.3%, 加入 Cu^{2+} 印迹戊二醛交联羧甲基壳聚糖 Cu-P-CMC 的实验组和 DTPA 螯合剂保护组的细胞存活率升高至 88.7% 和 72.6%, 细胞内 DU 蓄积量明显减少, 细胞膜损伤和 DNA 损伤减轻, 并且 Cu-P-CMC 解毒效果优于 DTPA; 透射电镜超微观察到, 加入壳聚糖后的 DU 被壳聚糖螯合形成多个绒球, 聚簇成串状或大团簇状, 这种螯合物难进入细胞内而使细胞内 DU 蓄积量大大减少, 因此缓解了 DU 对细胞的毒性。

关键词: 贫铀; 铀螯合剂; 印迹壳聚糖; 解毒; 人肾近端小管上皮细胞

中图分类号: R818.03

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 05-0513-08

Detoxication effect of water-soluble imprinted cross-linked chitosan on depleted uranium induced toxicity to renal cells

ZHANG Xiao-fei^{1,2}, LI Chao³, ZHAO Chang-qi^{1*}, LIU Li-hong^{2*}

(1. College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

2. Department of Pharmacy, the Second Artillery General Hospital, PLA, Beijing 100088, China;

3. China National Pharmaceutical Group Corporation, Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu 610052, China)

Abstract: To investigate whether a series of water-soluble cross-linked chitosan derivatives synthesized in the guide of imprinting technology could be used as a uranium chelating agent to protect cells exposed to depleted uranium (DU), the imprinted chitosan derivatives with high UO_2^{2+} chelating ability were screened, and cell model of human renal proximal tubule epithelium cells (HK-2) exposed to DU ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was built, chitosan derivatives ($400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was added to test group and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA, $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was added to positive control group. The results showed that three Cu^{2+} imprinted chitosan derivatives had higher uranium chelating ability ($>49 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) than chitosan and non-imprinted chitosan derivatives. Compared to the cells exposed to DU only, survival of cells in group added chitosan derivatives rose up significantly (increased from 57.3% to 88.7%, and DTPA to 72.6%), and DU intracellular accumulation decreased, membrane damage and DNA damage also eased. Among the imprinted chitosan derivatives, Cu^{2+} imprinted penta dialdehyde cross-linked carboxymethyl chitosan (Cu-P-CMC) was the best, and better than DTPA. From ultrastructure observation, the DU precipitates of test group added Cu-P-CMC were most grouped in a big hairy clusters in a string together outside cells. It is possible that the DU-chitosan derivatives precipitates are too big to enter into

收稿日期: 2010-11-12.

基金项目: 全军“十一五”科技攻关课题 (2006203003).

*通讯作者 Tel: 86-10-66343250, Fax: 86-10-62076963, E-mail: hongllh@yahoo.com.cn

cells, and from this way, the DU uptake by cells decreased so as to detoxication.

Key words: depleted uranium; uranium chelating agent; imprinted chitosan; detoxication; human renal proximal tubule epithelium cell

海湾战争后贫铀 (depleted uranium, DU) 的危害引起各国关注, 贫铀具有重金属化学毒性以及放射性核素的辐射损伤。对战后人员的调查及大量体内铀毒性实验都指出, 急性铀中毒以肾小管和肾小球损伤导致的急性肾衰竭为特征^[1]。我国《急性铀中毒诊断标准》GBZ108-2002 规定, 铀中毒诊断以检验肾损伤为标准。肾脏是包括铀在内的许多重金属化学毒作用的靶器官, 也是主要的蓄积和损伤器官。进入体内的贫铀主要以铀酰离子 UO_2^{2+} 形式存在, 经血液分布到各组织, 在肾脏大量浓集, 最终导致急性肾损伤, 虽然大部分铀可通过尿液排出体外, 但肾脏功能遭到破坏, 还有小部分铀长期滞留于肾近端小管上皮细胞, 有潜在的辐射损伤^[1, 2]。铀中毒后最好的救治办法是第一时间服用铀促排剂。目前研究较多的邻苯二酚类、氨基酸类及羟基双膦酸类等化合物促排效果虽好但螯合特异性差, 会造成体内某些必须的金属离子缺失, 并且有一定肝肾毒性^[3-5]。因此目前还没有找到较理想的高效低毒的促排剂。

本研究利用离子印迹技术提高壳聚糖螯合贫铀能力, 使壳聚糖具有缓解贫铀对细胞的毒性的作用。壳聚糖及其衍生物对许多重金属离子包括铀有良好的吸附螯合性能^[6], 生物相容性好, 无毒副作用, 在医药领域也有很广泛的应用, 现已证实壳聚糖及其衍生物有降脂、提高免疫力、助消化等功能^[7, 8], 还可作为医药用膜及药物控释材料^[9]。本研究利用离子印迹技术对壳聚糖进行交联修饰, 形成一系列有特定印迹空穴、螯合铀效率高的低聚水溶性壳聚糖衍生物, 使其特异地与 UO_2^{2+} 形成稳定的螯合物, 进行铀螯合率测定; 通过人肾近端小管上皮细胞 (human renal proximal tubule epithelium cells, HK-2) 铀中毒模型评价其体外药效和作用机制, 同时研究贫铀急性毒性及评价和筛选贫铀中毒治疗药物, 对今后预防与治疗贫铀中毒有一定的指导意义。

材料与方法

壳聚糖衍生物的制备 原料壳聚糖的黏均相对分子质量 (M_v) 为 1.65×10^5 , 脱乙酰度 (D.D.) 95.0%, 经金属离子印迹 (Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^{2+})、交联 (乙二醇/戊二醛交联剂, etha/penta dialdehyde)、脱印迹模板、羧

甲基化 (carboxymethyl)、氢化 (hydrogenated) 等修饰后 H_2O_2 氧化降解形成低聚水溶性交联壳聚糖衍生物, 非印迹类 8 个: E/P-CTS、E/P-H-CTS、E/P-CMC 及 E/P-H-CMC, 印迹类 24 个 (分别 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Ag^{2+} 印迹各 8 个): Cu/Ag/Pb-E/P-CTS、Cu/Ag/Pb-E/P-H-CTS、Cu/Ag/Pb-E/P-CMC 及 Cu/Ag/Pb-E/P-H-CMC。低聚壳聚糖经 Sephadex G-25 凝胶柱, 收集分子量最高的几个组分, 并制成冻干粉。高效凝胶渗透色谱法 (high performance gel permeation chromatography, HPGPC) 测定壳聚糖样品的相对分子质量, 非交联的壳聚糖平均分子量 900, 交联的低聚壳聚糖平均分子量 1 500~2 500。印迹交联壳聚糖与铀酰离子结合模式见图 1。

贫铀溶液制备^[10] $\text{UO}_2(\text{Ac})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (购自 SPI-CHEM, USA) 用蒸馏水配制 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{UO}_2(\text{Ac})_2$ 储液。DU 细胞培养液现配现用, 将 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{UO}_2(\text{Ac})_2$ 储液与 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 溶液 (1:1) 充分混匀 15 min 形成铀酰 ($\text{UO}_2^{2+}\text{-HCO}_3^-$) 溶液, 再用含 1% FCS 的 DMEM/F12 稀释至所需浓度。

细胞培养及实验分组 取永生化正常人肾近端小管上皮细胞株 HK-2 (购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心), 置于含 $50 \text{ ku} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素、 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-谷氨酰胺和 10% 胎牛血清 (FCS) 的 DMEM/F12 培养液中, 5% CO_2 、37 °C 孵箱中孵育, 2~3 天传代 1 次。实验中含 DU 培养基为含 1% FCS 的 DMEM/F12。分组: HK-2 细胞长满后, 更换培养基, DU 污染组含 DU ($500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 壳聚糖保护组在 DU 污染同时分别加入壳聚糖衍生物至终质量浓度 500、400、300、200 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 阳性螯合剂二乙烯三胺五乙酸 (diethylenetriaminepentaacetic acid, DTPA) 保护组在 DU 污染同时加入 DTPA ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 此浓度下 DTPA 细胞存活率高于 90%), 正常对照组为正常培养基培养。

ICP-MS 测定贫铀螯合量 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DU 溶液 1 mL 加入水溶性壳聚糖样品 2 mg, 24 h 后加入乙醇沉淀壳聚糖 24 h, 离心取上清液, 浓 HNO_3 消化后用 1% HNO_3 稀释, 电感耦合等离子质谱系统 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) ELAN DRC-II 测定 DU 浓度。检测条件: 雾化气流 $0.98 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 辅助气流 $1.898 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 等离子气

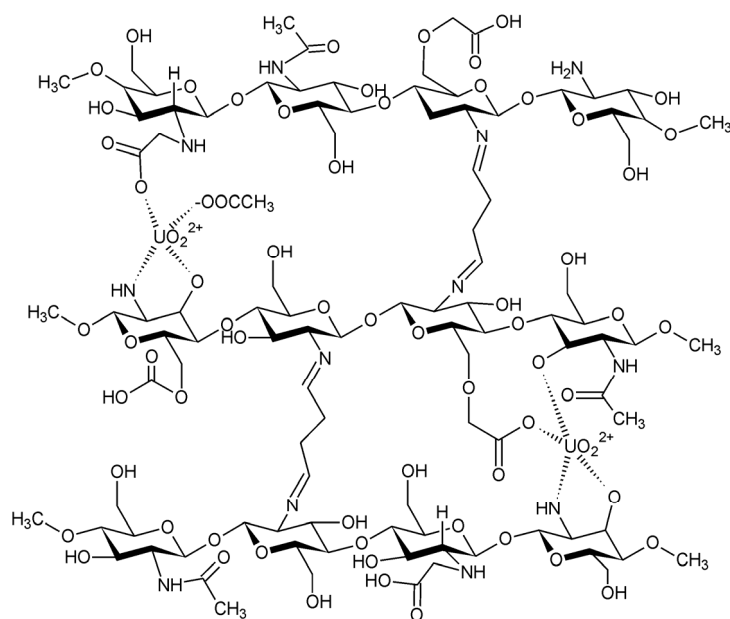


Figure 1 Ion imprinted cross linked chitosan chelating UO_2^{2+}

流 $1\,598\,\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 扫描方式单点跳峰, 驻留时间 $50\sim 100\,\text{ms}$, 样品提升量 $1\,\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 仪器分辨率 $0.7\sim 0.9\,\text{a}$. 计算壳聚糖对 DU 的螯合量。

MTT 法测定细胞存活率 壳聚糖衍生物对细胞毒性测定: 采用 96 孔板 (细胞数 $5\times 10^3/\text{孔}$), 细胞 70% 融合后更换含壳聚糖衍生物 200 、 400 、 800 及 $1\,600\,\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基培养 $48\,\text{h}$; DU 对细胞毒性测定: DU 细胞毒性浓度依赖性 (DU 63 、 125 、 250 、 500 及 $1\,000\,\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 培养 $24\,\text{h}$, 时间依赖性 DU ($500\,\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 培养 0 、 12 、 16 、 20 及 $24\,\text{h}$; 壳聚糖衍生物解毒测定: 培养基中含 DU ($500\,\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 同时加入壳聚糖衍生物至终质量浓度 100 、 200 、 300 、 400 及 $500\,\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, DTPA 对照组加入至终质量浓度 $50\,\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 培养 $24\,\text{h}$. MTT 法: 去培养基后 PBS 清洗 3 遍, 更换新鲜培养基 $150\,\mu\text{L}$, 加入 $5\,\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT $10\,\mu\text{L}$, $37\,^{\circ}\text{C}$ 孵育 $4\,\text{h}$, 小心吸净上清液, 加入 DMSO $150\,\mu\text{L}$, 酶标仪 (Bio-Rad 550 型) 于 $570\,\text{nm}$ 吸收波长处测定吸收度值, 计算细胞存活率。

细胞内贫铀含量测定 以细胞数 $1\times 10^5/\text{孔}$ 接种于 6 孔板, 细胞 70% 融合后按实验分组更换含 DU ($500\,\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与壳聚糖衍生物 ($400\,\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 培养基培养 $24\,\text{h}$, PBS 清洗 3 遍, 收集细胞, 取细胞悬液 $400\,\mu\text{L}$ 加浓硝酸消化后 $1\%\,\text{HNO}_3$ 稀释, ICP-MS 测定样品 DU 含量。另取细胞悬液 $100\,\mu\text{L}$, 进行蛋白定量测定 (BCA 法蛋白定量检测)。细胞内 DU 含量最终以 $\mu\text{g}\,(\text{DU})\cdot\text{mg}^{-1}(\text{protein})$ 表示。

细胞内膜损伤测定 测定酶外溢 (膜损伤导致

酶漏出), 以培养液中各种酶的活力反映膜完整性。以细胞数 $1\times 10^5/\text{孔}$ 接种于 6 孔板, 细胞 70% 融合后按实验分组更换不同培养基, $24\,\text{h}$ 后 $37\,^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡 ($60\,\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 培养 $20\,\text{min}$, 取培养混合物, 分析乳酸脱氢酶 (LDH, 胞浆酶)、碱性磷酸酶 (AKP, 肾小管上皮细胞刷状缘标志酶)、酸性磷酸酶 (ACP, 溶酶体酶)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST, 线粒体酶) 和 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (NAG, 溶酶体酶), 采用比色法测定, 按试剂盒说明书操作。

细胞氧化损伤测定 测定抗氧化酶水平反映细胞氧化损伤, $1\%\,\text{Triton-X}\,100$ 的 DMEM/F12 $37\,^{\circ}\text{C}$ 裂解细胞 $30\,\text{min}$, 测定裂解液中超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 及总蛋白含量。

细胞凋亡测定 流式细胞术: 收集处理 $24\,\text{h}$ 的各组细胞, PBS 洗涤, $75\%\,\text{酒精}$ 固定 $24\,\text{h}$ 后, PBS ($4\,^{\circ}\text{C}$) 洗去固定剂并加入 RNase A, PI 单染, 细胞流式仪测定 M_1 期比率反映细胞凋亡。DNA 琼脂糖凝胶电泳: 收集处理 $24\,\text{h}$ 的各组细胞, 采用凋亡 DNA 梯状带 (DNA laddering) 提取试剂盒 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司) 提取 DNA, $1.5\%\,\text{琼脂糖凝胶电泳}\,1.5\,\text{h}$, 观察 DNA 碎片条带。

透射电镜超微结构观察 收集细胞, $0.1\,\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS ($\text{pH}\,7.2$) 缓冲液洗涤 3 遍, $3\%\,\text{戊二醛}$ ($0.1\,\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 配制) $4\,^{\circ}\text{C}$ 下固定 $24\,\text{h}$, PBS 洗去固定液, $1\%\,\text{锇酸}$ 固定 $1\,\text{h}$, 丙酮液梯度脱水树脂包埋, 超薄切片机切取 $0.05\,\mu\text{m}$ 超薄切片粘贴在预先覆有支持膜

的铜网上,经醋酸铀-枸橼酸铅染色,透射电镜下观察细胞超微结构。

数据处理 所有实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析 (one-way-ANOVA) 和 Dunnett t 检验 (SPSS15.0 统计分析软件) 处理数据。

结果

1 不同印迹及修饰结构的壳聚糖衍生物对贫铀的螯合效果

壳聚糖、非印迹交联壳聚糖与印迹交联壳聚糖对 DU 的螯合量有显著差异 (表 1)。交联壳聚糖螯合量远高于未交联壳聚糖;与非印迹壳聚糖相比,以 Cu^{2+} 为模板的印迹壳聚糖的螯合量高,大部分比相应的非印迹壳聚糖有提高,而以 Ag^+ 和 Pb^{2+} 为模板的印迹壳聚糖螯合能力却大大下降;未氢化的席夫碱结构优于氢化的结构,羧甲基化交联壳聚糖优于普通交联壳聚糖。

Table 1 Chelating depleted uranium (DU) capacity of water-soluble chitosan and its derivatives. The DU chelating capacity for 24 h was measured by ICP-MS. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs CTS; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs corresponding non imprinted cross-linked chitosan

Template	Chelating DU / μg (DU)· mg^{-1} (chitosan)			
	Non	Cu^{2+}	Ag^+	Pb^{2+}
CTS	12.9 ± 2.4	—	—	—
E-CTS	$48.2 \pm 5.2^{**}$	$42.4 \pm 3.5^{**}$	10.0 ± 1.2	34.7 ± 3.3
E-H-CTS	$36.7 \pm 1.9^{**}$	$38.0 \pm 4.0^{**}$	8.7 ± 0.9	30.8 ± 2.4
E-CMC	$29.5 \pm 3.8^{**}$	$34.1 \pm 3.3^{**\Delta}$	9.9 ± 2.5	19.3 ± 2.0
E-H-CMC	$34.3 \pm 5.4^{**}$	$30.0 \pm 2.8^{**}$	15.0 ± 1.3	32.0 ± 4.0
P-CTS	$40.2 \pm 4.3^{**}$	$49.4 \pm 3.7^{**\Delta}$	13.7 ± 3.2	40.2 ± 2.5
P-H-CTS	$34.6 \pm 5.0^{**}$	$49.1 \pm 5.3^{**\Delta\Delta}$	17.0 ± 1.4	20.8 ± 1.1
P-CMC	$47.3 \pm 2.3^{**}$	$49.6 \pm 2.1^{**\Delta\Delta}$	16.9 ± 0.4	39.1 ± 0.8
P-H-CMC	$40.5 \pm 4.2^{**}$	$41.8 \pm 5.3^{**}$	17.7 ± 1.5	30.6 ± 2.8

2 Cu^{2+} 印迹壳聚糖细胞毒性及对贫铀损伤细胞的保护作用

对 DU 螯合量较高的 3 个化合物 Cu-P-CTS、Cu-P-H-CTS 和 Cu-P-CMC, 采用 MTT 法测定其细胞毒性,在 1 600、800、400 和 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下,48 h 内平均细胞存活率分别是 (76.5 $\pm$ 3.5)%、(87.5 $\pm$ 2.5)%、(96.5 $\pm$ 3.5)% 和 (98.0 $\pm$ 2.0)%,细胞毒性很低。

DU 对细胞的毒性呈浓度-时间依赖性,24 h 内随 DU 浓度增高 (63、125、250、500 和 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),细胞存活率显著下降 (IC_{50} 为 537 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),细胞内的铀蓄积量显著升高 (图 2A);随 DU (500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

作用时间的延长,细胞存活率降低,细胞内铀蓄积量显著升高 (图 2B)。细胞存活率与细胞 DU 蓄积量呈反比。DU 污染同时加入 Cu-P-CTS、Cu-P-H-CTS 或 Cu-P-CMC 后,细胞存活率显著回升,都在 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最高,DTPA 有一定的保护缓解 DU 毒性作用,50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时效果最好,但 75 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞存活率显著下降,可能与 DTPA 本身细胞毒性较大有关 (图 2C)。

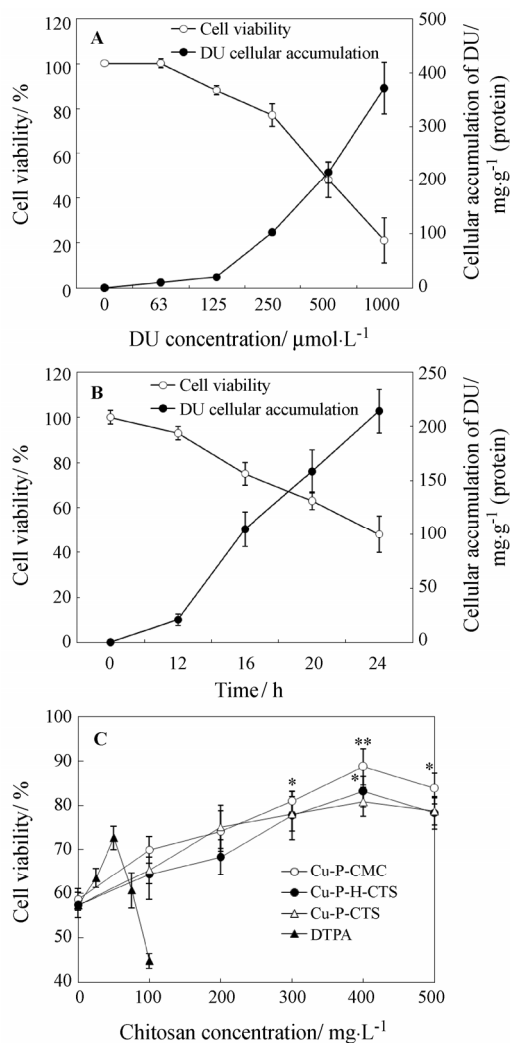


Figure 2 Cell viability and cellular accumulation of DU in HK-2 cells were detected by MTT and ICP-MS. A: Administration of DU in different concentrations for 24 h; B: At different times after administration of DU (500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); C: The viability of cell protected by different concentrations of CTS and DTPA after exposed to DU (500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 24 h. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DTPA (50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) group

3 Cu^{2+} 印迹壳聚糖对人肾近端小管上皮细胞内贫铀蓄积的影响

DU 污染细胞后细胞内 DU 含量与细胞存活率呈反比 (图 2A 和 2B),加入壳聚糖衍生物后可使细胞内

DU 含量显著降低, 细胞存活率显著升高, 其中 Cu^{2+} 印迹壳聚糖 Cu-P-H-CTS 和 Cu-P-CMC 比相应的非印迹壳聚糖 P-H-CTS 和 P-CMC 更显著地降低 DU 蓄积及提高细胞存活率 ($P < 0.01$), 并且优于阳性螯合剂 DTPA 和其他壳聚糖衍生物 (表 2)。

Table 2 Effects of chitosan and its derivatives on DU cellular accumulation and cell viability in HK-2 cells. DU: $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; DTPA: $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; CTS, P-CTS, P-H-CTS, P-CMC, Cu-P-CTS, Cu-P-H-CTS, Cu-P-CMC: $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The level of DU cellular accumulation was measured by ICP-MS, and normalized by the protein content of cells on each specimen determined by the BCA method with bovine serum albumin as standard. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DU group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs DU + corresponding non imprinted cross-linked chitosan group

Group	DU cellular accumulation $/\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (protein)	Cell viability /%
DU	214.2 ± 20.2	57.3 ± 2.9
DU + DTPA	$179.4 \pm 15.8^{**}$	$72.6 \pm 2.7^{**}$
DU + CTS	$191.1 \pm 24.4^{*}$	$70.7 \pm 3.9^{**}$
DU + P-CTS	$142.9 \pm 20.0^{**}$	$82.7 \pm 3.0^{**}$
DU + P-H-CTS	$170.8 \pm 13.9^{**}$	$78.1 \pm 6.6^{**}$
DU + P-CMC	$145.3 \pm 19.7^{**}$	$80.2 \pm 4.3^{**}$
DU + Cu-P-CTS	$149.1 \pm 28.2^{**}$	$80.8 \pm 3.3^{**}$
DU + Cu-P-H-CTS	$140.9 \pm 12.1^{**\Delta\Delta}$	$83.1 \pm 3.5^{**\Delta\Delta}$
DU + Cu-P-CMC	$129.5 \pm 17.0^{**\Delta\Delta}$	$88.7 \pm 4.1^{**\Delta\Delta}$

4 Cu^{2+} 印迹壳聚糖减轻贫铀导致的细胞内膜损伤

细胞内各种酶的漏出反映了细胞内膜的损伤程度 (表 3): 与对照组比较, DU 污染组的 LDH、AKP、ACP 和 NAG 漏出都显著增高, DU 导致细胞内膜损伤, 使细胞内酶大量漏出; Cu-P-CTS、Cu-P-H-CTS、Cu-P-CMC 和 DTPA 螯合剂保护组与 DU 污染组比较, LDH、AKP、ACP 和 NAG 漏出都有所降低, AST 差异不显著。

5 Cu^{2+} 印迹壳聚糖减轻贫铀导致的细胞氧化损伤

重金属能促进活性氧自由基的产生, 消耗抗氧

化酶, 而且重金属蓄积到一定程度会抑制抗氧化酶活性。DU 污染组的 SOD 和 GSH-PX 水平低于对照组, 而加入保护剂组的 SOD 和 GSH-PX 水平明显回升 (表 4)。

Table 4 Changes of antioxidase content in HK-2 cells exposed to DU and Cu^{2+} imprinted chitosan derivatives for 24 h. GSH-PX and SOD in cells were measured and normalized by the protein content of cells on each specimen, determined by the BCA method with bovine serum albumin as standard. DU: $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Cu-P-CTS, Cu-P-H-CTS, Cu-P-CMC: $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; DTPA: $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DU group; $\Delta P < 0.05$ vs DU + DTPA group

Group	GSH-PX/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$	SOD/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$
Blank	$207 \pm 28^{**}$	$20.1 \pm 1.2^{*}$
DU	124 ± 45	18.4 ± 1.9
DU + DTPA	$168 \pm 50^{**}$	$21.8 \pm 1.6^{**}$
DU + Cu-P-CTS	$169 \pm 42^{**}$	$22.9 \pm 1.2^{**}$
DU + Cu-P-H-CTS	$159 \pm 46^{**}$	$24.1 \pm 2.6^{**\Delta}$
DU + Cu-P-CMC	$180 \pm 39^{**\Delta}$	$22.8 \pm 2.1^{**}$

6 Cu^{2+} 印迹壳聚糖减缓贫铀导致的细胞凋亡及 DNA 损伤

流式细胞仪测定结果 (图 3) 显示, DU 导致细胞 M_1 期增高至 51.2%, 而 Cu-P-CTS、Cu-P-H-CTS 和 Cu-P-CMC ($400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 及 DTPA ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 可显著减少 M_1 期细胞, 分别是 27.1%、25.9%、22.0% 和 33.2%。DNA 琼脂糖凝胶电泳结果可见, DU 污染组有明显 DNA 碎片形成的拖尾; 而正常对照组为大分子量完整的 DNA, 无拖尾或梯状 DNA 片段; DTPA 螯合剂保护组也仍有明显 DNA 拖尾; 而加入 Cu^{2+} 印迹壳聚糖 Cu-P-CTS、Cu-P-H-CTS 及 Cu-P-CMC ($400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 组 DNA 拖尾显著减轻, 且 Cu-P-CMC ($400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 组无明显拖尾 (图 4)。

7 Cu^{2+} 印迹壳聚糖对细胞形态及超微结构的影响

正常对照组 HK-2 细胞生长良好, 排列整齐, 呈

Table 3 Enzyme leakage from HK-2 cells exposed to DU and Cu^{2+} imprinted chitosan derivatives for 24 h. LDH (lactate dehydrogenase), NAG (N-acetyl- β -glucosaminidase), AKP (alkaline phosphatase), ACP (acid phosphatase) or AST (aspartate aminotransferase) in culture media was detected. DU: $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Cu-P-CTS, Cu-P-H-CTS, Cu-P-CMC: $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; DTPA: $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DU group; $\Delta P < 0.05$ vs DU + DTPA group

Group	LDH/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	NAG/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	AKP/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	ACP/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
Blank	$127.8 \pm 13.2^{**}$	$1.7 \pm 0.5^{**}$	$26.2 \pm 2.7^{**}$	$42.1 \pm 5.1^{*}$	$5.5 \pm 1.1^{*}$
DU	667.3 ± 44.9	3.8 ± 0.7	73.3 ± 9.1	57.6 ± 7.9	7.0 ± 0.9
DU + DTPA	$343.4 \pm 29.8^{**}$	$2.7 \pm 0.5^{**}$	$39.4 \pm 5.8^{**}$	53.3 ± 7.4	6.7 ± 1.1
DU + Cu-P-CTS	$354.7 \pm 30.1^{**}$	$2.2 \pm 0.8^{**}$	$42.1 \pm 4.1^{**}$	$52.4 \pm 4.9^{*}$	$5.9 \pm 1.2^{*}$
DU + Cu-P-H-CTS	$379.9 \pm 45.9^{**}$	$2.0 \pm 0.5^{**\Delta}$	$48.6 \pm 7.2^{**\Delta}$	$48.2 \pm 6.1^{*\Delta}$	8.9 ± 1.5
DU + Cu-P-CMC	$301.2 \pm 28.2^{**\Delta}$	$2.1 \pm 0.8^{**\Delta}$	$40.9 \pm 5.2^{**}$	54.3 ± 7.2	$5.7 \pm 0.9^{*\Delta}$

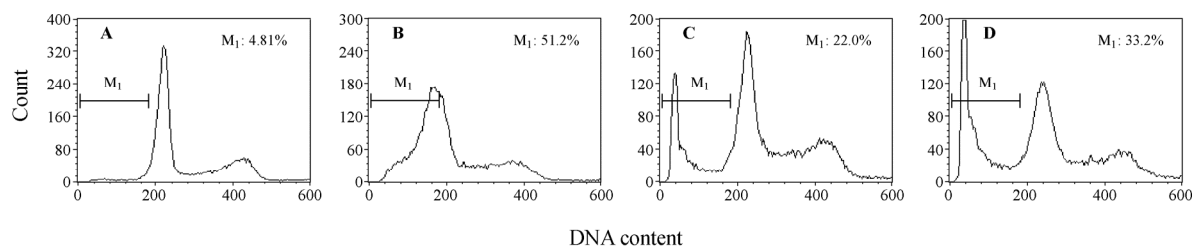


Figure 3 Flow cytometry analysis of cell apoptosis according to DNA content of human renal proximal tubule epithelium cells (HK-2) after exposed to Cu^{2+} imprinted chitosan derivatives and DU for 24 h using PI staining. HK-2 cells were treated with $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DU (B), $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DU and $400 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu-P-CMC (C), $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DU and $50 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DTPA (D) for 24 h compared with normal control (A)

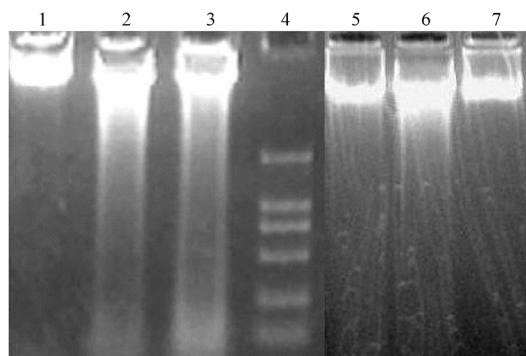


Figure 4 DNA damage of human renal proximal tubule epithelium cells (HK-2) determined by DNA laddering, after exposed to DU and Cu^{2+} imprinted chitosan derivatives. 1: Blank control; 2: DU ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 3: DU ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + DTPA ($50 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); 4: Marker; 5: DU ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + Cu-P-CMC ($200 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); 6: DU ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + Cu-P-CMC ($300 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); 7: DU ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + Cu-P-CMC ($400 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

圆形贴壁状; DTPA 螯合剂保护组细胞状态良好, 与正常对照组比较无明显差异。受 DU 作用 24 h 后, 细胞多破碎死亡, 存活细胞多呈悬浮状态, 贴壁率降低, 排列紊乱, 生长不良, 可见培养基中有黑色絮状沉淀物。DTPA 螯合剂保护组细胞比 DU 中毒组细胞状态明显转好, 并随螯合剂浓度增大细胞状态变好, 沉淀有所减少。

透射电镜观察 (图 5), DU 污染组: DU 可通过胞吞进入细胞, DU 沉淀在细胞内, 蓄积到一定程度后细胞崩解; 细胞内线粒体肿胀、嵴消失; 溶酶体内有 DU 沉淀, 沉淀可破坏溶酶体; DU 沉淀成针状晶体, 部分聚簇成单个小球团。壳聚糖保护组: 细胞内 DU 沉淀减少, DU 沉淀成绒球状, 少量形态小的沉淀进入细胞内, 但大多绒球状小团簇又聚集成生长链和网状大团簇, 分布在细胞外, 根据交联壳聚糖的结构特点成链网状, 这种沉淀应该是印迹交联壳聚糖螯合 DU 后的复合物, 这种复合物大多在细胞外, 很难通过胞吞进入细胞内。

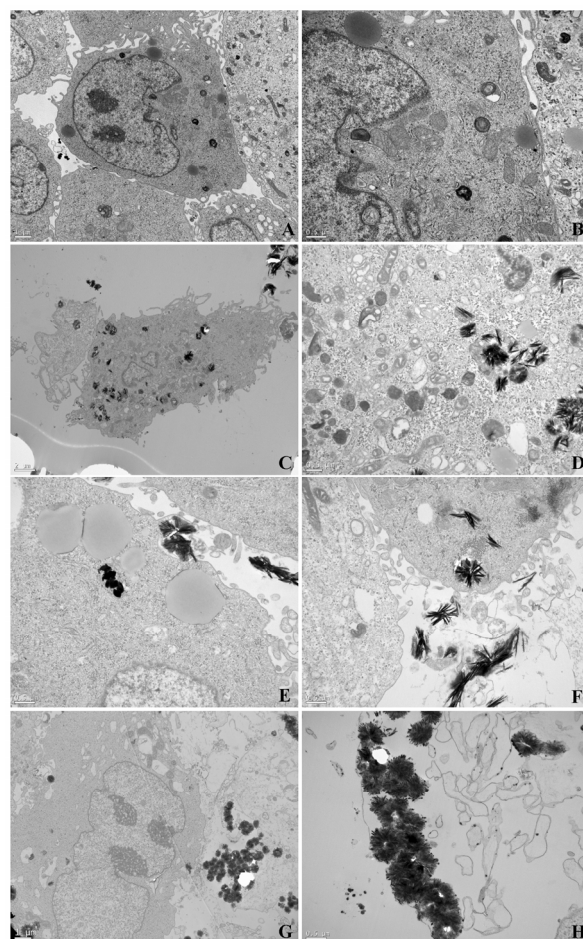


Figure 5 Transmission electron microscopy (TEM) observation of ultrastructure of human renal proximal tubule epithelium cells (HK-2) exposed to DU and Cu^{2+} imprinted penta dialdehyde cross-linked carboxymethyl chitosan (Cu-P-CMC) for 24 h. A, B: Normal control; C, D, E, F: DU ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); G, H: DU ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + Cu-P-CMC ($400 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). DU group: DU precipitates were observed, outside or inside the cells (C), concentrated in lysosomes and damaged lysosomes and mitochondria (D). DU formed thin needle-shaped structures either isolated or grouped in a cluster reaching $1 \mu\text{m}$ diameter, swallowed by cells and mainly concentrated in vesicles (E, F). DU + Cu-P-CMC group: the DU precipitates, different from those in DU group, become larger, dozens of cluster grouped long strings or big clusters outside cells (H), which were more difficult to enter into cells (G), of course there were some small DU precipitates inside the cells

讨论

本研究中采用印迹技术指导螯合剂类药物的合成, 目的在于得到最优的 UO_2^{2+} 螯合结构。实验结果证明 Cu^{2+} 印迹交联壳聚糖对 UO_2^{2+} 的螯合量比其他壳聚糖有显著提高 (表 1), 这与其结构密切相关: 交联后的壳聚糖为网状结构, 比单链的壳聚糖分子量更大、重复单元更多、具有更多的螯合基团, 能更稳定地螯合 UO_2^{2+} ; 3 种不同模板印迹中, Cu^{2+} 印迹后的交联壳聚糖螯合 UO_2^{2+} 能力增强, 因为 Cu^{2+} 和 U^{6+} 的离子半径同为 $7.3 \times 10^{-11} \text{ m}^{[11]}$, 与壳聚糖配位结构也相同, 这使得 Cu^{2+} 留下的印迹“空穴”适合并稳定的螯合 UO_2^{2+} 离子交联剂为戊二醛的 (Cu-P-系列) 螯合效果强于乙二醛 (Cu-E-系列), 戊二醛交联的空间结构灵活性更强, 可能使印迹的“空穴”结构更易形成; 非氢化席夫碱结构和羧甲基化修饰能使螯合效果增强, 其中羧甲基化增加了起螯合作用的 -OH 的数量从而增强了螯合能力。

本研究表明, DU 对 HK-2 细胞的毒性明显, 主要表现在 DU 蓄积于细胞内造成的溶酶体、线粒体和细胞膜的损伤, 还能造成氧化损伤和 DNA 损伤, 且 DU 细胞毒性与细胞内 DU 蓄积相关。随 DU 浓度增高和时间延长细胞内 DU 蓄积增多, DU 蓄积量越高细胞存活率越低。胞吞是 DU 进入细胞的主要途径之一^[12], 透射电镜下观察到胞吞 DU 现象而且细胞内多包含 DU 的吞噬泡, 并且 DU 可进入溶酶体蓄积并导致溶酶体消散, 线粒体出现肿胀和嵴消失。肾小管细胞酶的漏出程度与观察到的这些胞器损伤程度相符, DU 导致胞浆酶 (LDH) 漏出严重反映细胞膜损伤, 亚细胞组分内酶 (NAG、ACP、AKP) 大量漏出则反映更严重的细胞器损伤, 溶酶体酶的外漏进一步导致了细胞代谢紊乱和细胞损伤, 最终导致细胞消散坏死。DU 能促进体内活性氧自由基的产生, 自由基可直接导致蛋白质、DNA 及多糖类的结构和功能受损。Pourahmad 等^[13]指出 DU 在细胞内消耗 GSH, 消耗同时 GSH 氧化 U (VI) 导致活性氧自由基生成, 自由基导致溶酶体膜脆性泄漏和线粒体损伤。本研究中 DU 导致细胞内抗氧化酶 GSH-PX 和 SOD 水平降低, 并且造成 DNA 损伤。自由基消耗抗氧化酶, GSH-PX 和 SOD 清除自由基诱发的脂质过氧化物以保护细胞膜结构。DU 污染组细胞 M_1 期明显增高, DNA 电泳有明显拖尾, 说明生成了大量小分子量 DNA, DU 产生的自由基对 DNA 损伤显著。对 DU 损伤机制的研究

将有助于解毒药物的发现和评价。

相对 DU 污染组, 加入 Cu^{2+} 印迹交联壳聚糖螯合剂后细胞内 DU 含量减少, 细胞活力升高。电镜观察到细胞内 DU 沉淀也相对减少, 且 DU 晶体明显不同于 DU 污染组。单纯 DU 污染后 DU 沉淀成针状晶体, 多个晶体聚集成单个小团簇, 而加入壳聚糖螯合剂的 DU 为非晶体状而多形成绒球状团簇, 且小团簇又聚集成成长链状和网状大团簇, 根据交联壳聚糖的结构特点成链网状, 应该是印迹交联壳聚糖螯合 DU 后的复合物呈现的长链和大团簇, 这种复合物相对更难通过胞吞进入细胞内, 从而使 DU 细胞内蓄积减少导致细胞损伤减轻, 细胞内酶漏出减少也验证了这一点。除了螯合性能, 水溶性壳聚糖还有一定的清除自由基和抗氧化能力^[14], DU 污染后导致的 GSH-PX 和 SOD 水平降低在加入壳聚糖后都有明显的回升, 而且 SOD 水平高于对照组和 DTPA 组; 壳聚糖保护组的 DNA 梯状带无明显拖尾, 减轻了 DU 对 DNA 的损伤, 这必然与壳聚糖螯合 DU 减少细胞内 DU 相关, 但在一定程度上壳聚糖本身清除自由基和抗氧化也起到了作用。本研究中采用较高 DU 浓度以达到细胞急性 DU 中毒, 使壳聚糖的有效浓度较高 (在 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 也与合成的壳聚糖本身分子量较大 (约 2 000) 相关, 相对其他类型的铀促排剂, 壳聚糖本身属于无毒、安全、生物相容性好的医用辅料, 安全性更强, 动物水平和临床应用的可能更大。

研究表明 Cu^{2+} 印迹交联壳聚糖螯合 DU 能力强, 细胞毒性小, 对 DU 染毒 HK-2 细胞有解毒保护作用, 可减少 DU 进入细胞蓄积, 并且具有一定的清除活性氧自由基作用, 减少其对细胞的毒性则有望成为临床的新型铀螯合剂, 具体的药物作用机制需进一步研究, 仍需动物在体水平的实验验证, 也需要进一步优化药物合成中交联度和重复单元的控制。目前仍在研究解决的问题还有此类壳聚糖在体内的代谢以及在体内的解毒机制是否和体外一致等。

References

- [1] Ribera D, Labrot F, Tisnerat G, et al. Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects [J]. Rev Environ Contam Toxicol, 1996, 146: 53-89.
- [2] Diamond GL. Biological consequences of exposure to soluble forms of natural uranium [J]. Radiat Prot Dosimetry, 1989, 26: 23-33.
- [3] Sanchez DJ, Gomez M, Domingo JL, et al. Relative efficacy

- of chelating agents on excretion and tissue distribution of manganese in mice [J]. *J Appl Toxicol*, 1995, 15: 285–288.
- [4] Domingo JL. Developmental toxicity of metal chelating agents [J]. *Reprod Toxicol*, 1998, 12: 499–510.
- [5] Stradling GN, Moody JC, Gray SA, et al. The efficacy of DTPA treatment after deposition of thorium nitrate in the rat lung [J]. *Hum Exp Toxicol*, 1991, 10: 15–20.
- [6] Varma AJ, Deshpande SV, Kennedy JF. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review [J]. *Carbohydr Polym*, 2004, 55: 77–93.
- [7] Deuchi K, Kanauchi O, Imasato Y. Decreasing effect of chitosan on the apparent digestibility by rats fed a high fat diet [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58: 1613–1616.
- [8] Saiki I, Murata J, Nakajima M, et al. Inhibition by sulfated chitin derivatives of invasion through extracellular matrix and enzymatic degradation by metastatic melanoma cells [J]. *Cancer Res*, 1990, 50: 3631–3637.
- [9] Liu W, Sun SJ, Zhang X, et al. Self-aggregation behaviour of alkylated chitosan and its effect on the release of a hydrophobic drug [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2003, 14: 851–859.
- [10] Prat O, Berenguer F, Malard V, et al. Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity [J]. *Proteomics*, 2005, 5: 297–306.
- [11] Shannon, RD. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides [J]. *Acta Cryst A*, 1976, 32: 751–767.
- [12] Muller D, Houpert P, Cambar J, et al. Role of the sodium-dependent phosphate co-transporters and of the phosphate complexes of uranyl in the cytotoxicity of uranium in LLC-PK1 cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 214: 166–177.
- [13] Pourahmad J, Ghashang M, Ettehadi HA, et al. A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity [J]. *Environ Toxicol*, 2006, 354–359.
- [14] Xie WM, Xu PX, Liu Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives, bioorganic & medicinal [J]. *Chem Lett*, 2001, 11: 1699–1701.