

- Curr Biol*, 7:94.
- [10] Muller, M., 1993, *EMBOJ*, 12:4221.
- [11] Tamura, T. et al., 1995, *Nature*, 376:596.
- [12] Shuai, K. et al., 1993, *Nature*, 366:580.
- [13] Shuai, K. et al., 1994, *Cell*, 76:821.
- [14] Heim, M. H., Kerr, I. M., Stark, G. R., 1995, *Science*, 267:1347.
- [15] Wen, Z., Zhong, Z., Darnell, J. E., 1995, *Cell*, 82:241.
- [16] Guarente, L., 1995, *Trends Biochem Sci*, 20:517.
- [17] Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V. R., et al., 1992, *Science*, 258:1808.
- [18] Sadowski, H. B., Schuai, K., Darnell, J. E. et al., 1993, *Science*, 261:1739.
- [19] Horvath, C. M., Stark, G. R., Kerr, I. M. et al., 1996, *Mol Cell Biol*, 16:6957.
- [20] Chin, Y. E. et al., 1997, *Mol Cell Biol*, 17:5328.
- [21] Pfeffer, L. M. et al., 1997, *Science*, 276:1418.
- [22] Barinaga, M., 1998, *Science*, 280:5360.

## 水溶性 C<sub>60</sub>与 C<sub>60</sub>衍生物的生物学效应研究进展\*

杨新林 程福永 朱鹤孙

(北京理工大学材料科学研究中心 北京 100081)

C<sub>60</sub>是一种由 60 个碳原子组成和稳定的原子簇,是 1996 年 Nobel 化学奖得主 Kroto 等人于 1985 年首先发现的<sup>[1]</sup>。它是继金刚石和石墨之后发现的碳元素的第三种同素异形体,由 12 个五边形和 20 个六边形组成的类似英式足球的球笼结构,60 个碳原子位于球体的 60 个顶点,每个碳原子采用 SP<sup>2</sup> 杂化,以两个单键和一个双键与另三个碳原子共价结合,在球体内外表面形成超共轭大 π 键<sup>[2]</sup>。C<sub>60</sub>不溶于水,在苯、甲苯、己烷、吡啶中有一定的溶解度。

随着 C<sub>60</sub>合成方法的突破<sup>[3]</sup>,以及水溶性的 C<sub>60</sub>制备与新的 C<sub>60</sub>衍生物的合成方法的不断产生<sup>[4]</sup>,其生物学效应的研究有了较大的进展。国内一些单位也相继开展了此方面工作。水溶性 C<sub>60</sub>的生物学效应主要是由光激发产生高量子产额的单线态氧等对生物的影响,其效应表现出广泛性和非选择性的特点。为叙述方便起见,本文从对生物酶活性的抑制、对 DNA 的选择性剪切作用、对细胞生长的影响、C<sub>60</sub>的作用机理以及应用前景等有关方面对近几年来国内外的研究工作作一评述。

### 一、对生物酶活性的抑制

最先发现 C<sub>60</sub>衍生物的生物学效应是它对人艾滋病 I 型病毒的蛋白酶(HIV-1 protease,

HIVP)的抑制作用。HIVP 是治疗人艾滋病的一个靶酶,其活性部位形状似一个一端开口的圆筒,几乎全由疏水的氨基酸线性排列组成。明显的例外是其中有两个具有催化作用的天冬氨酸。它们可以催化水进攻底物,使底物的肽键断裂。Friedman 等推测,由于疏水性的 C<sub>60</sub>分子直径同 HIVP 的活性部位的圆筒直径近似,因此 C<sub>60</sub>及其衍生物和 HIVP 的活性部位之间可能会产生强烈的疏水相互作用,从而抑制 HIVP 的活性。他们利用 DOCK3 程序建立了 C<sub>60</sub>衍生物和 HIVP 形成的复合物的模型,并通过物理化学分析证实了这一设想。在此基础上他们合成了一种称之为二酰胺基二酸二苯基 C<sub>60</sub>的水溶性化合物,并测得它对 HIVP 的抑制常数 K<sub>i</sub>为 5.3 μmol/L,为上述理论推导提供了实验依据<sup>[5,6]</sup>。随后 Toniolo 等报道一种 C<sub>60</sub>的多肽衍生物也能抑制 HIVP 的活性<sup>[7]</sup>。

除 HIVP 外,C<sub>60</sub>衍生物也能抑制其他酶的活性。Ando 等发现,在光照条件下,羧酸 C<sub>60</sub>衍生物对半胱氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶有抑制作用,而对组织蛋白酶 D、酰基-辅酶 A 胆固醇酰基转移酶(acyl-CoA cholesterol acyltrans-

\* 国家自然科学基金资助项目(批准号 59702009)。

ferase)、双酰甘油酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase)、固醇生物合成酶系统以及 HIV 逆转录酶则几乎没有作用<sup>[8]</sup>

## 二、对 DNA 的选择性剪切作用

Tokuyama 等发现一种水溶性羧酸 C<sub>60</sub> 衍生物能够引起 DNA 在特定位点发生断裂。将具有超螺旋结构的 pBR 322 质粒 DNA 和羧酸 C<sub>60</sub> 一起温育,进行不光照和 300-W 荧光灯垂直光照处理,然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。结果表明,在光照条件下,通过共价键闭合的超螺旋 DNA 变成带缺口的环状或线状双螺旋 DNA。具有类似羧酸结构但不含 C<sub>60</sub> 环的化合物或不溶于水的另一羧酸 C<sub>60</sub> 均不产生上述的断裂效应,而不光照条件下也未发现 DNA 的变化,说明 C<sub>60</sub> 环、水溶性和光激发三者缺一不可。进一步用 3'-<sup>32</sup>P 标记的含 182 对碱基的 DNA 片段研究发现,DNA 的断裂具有明显的选择性,断裂只发生在鸟嘌呤 G 上<sup>[9]</sup>。如果在 C<sub>60</sub> 分子上加上合适的识别区,C<sub>60</sub> 对 DNA 的断裂效应将更具有选择性。Boutorine 等人合成了水溶性的寡聚核苷酸 C<sub>60</sub>,然后分别用含该寡聚核苷酸互补序列的双螺旋 DNA、三螺旋 DNA 和带发夹结构的三螺旋 DNA 为研究对象,它们的 5'-端均用  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP 和 T4 聚核苷酸激酶标记上<sup>32</sup>P 同位素。用 100W 氙灯(滤掉波长小于 310nm 的光)光照后,在聚丙烯凝胶电泳上测定。结果发现,断裂只发生在三种 DNA 上离 C<sub>60</sub> 较近的鸟嘌呤上,断裂方向在双螺旋 DNA 中同寡聚核苷酸 C<sub>60</sub> 链方向相反,在三螺旋 DNA 结构中则与之平行<sup>[10]</sup>。An 等也得到类似的结论<sup>[11]</sup>。

## 三、对细胞生长的影响

Tokuyama 等将水溶性的羧酸 C<sub>60</sub> 衍生物加到体外培养的 HeLa S3 细胞中,发现在黑暗中培养 3 天对细胞生长没有影响,但用 6-W 荧光灯垂直照射 2 次(24h 一次,每次 1h)后,对

细胞生长则具有明显的抑制作用,其效果达到细胞毒试剂丝裂霉素 C 的 1%<sup>[9]</sup>。Chiang 等也证明水溶性多羟基 C<sub>60</sub> 能够抑制非正常或疾病细胞的生长<sup>[12]</sup>。国内钱凯先等人用脂质体将 C<sub>60</sub> 包埋使之成为水溶性,研究它在光照下对 HeLa 细胞生长的影响。发现光照强度为 4000Lx 时,C<sub>60</sub> 对 HeLa 细胞有显著的光致杀伤效应,生化测定证实膜蛋白巯基含量减少、膜脂过氧化,同时观察到膜流动性降低、超微结构被破坏<sup>[13]</sup>。最近,Okuda 等报道一种水溶性的 C<sub>60</sub> 衍生物能够抑制大肠杆菌的生长<sup>[14]</sup>,Tsuchiya 等报道 C<sub>60</sub> 的 PVP 水溶液抑制体外培养的小鼠中脑细胞的增殖与分化,受孕小鼠腹腔注射 C<sub>60</sub> 的 PVP 水溶液会严重影响胚胎的形态尤其是头区的发育<sup>[15]</sup>。

上述研究表明 C<sub>60</sub> 或其衍生物对细胞生长具有抑制或杀伤作用。而另一些研究则得到不同的结论。Tsuchiya 等发现 C<sub>60</sub> 的 PVP 水溶液能够促进大鼠肢芽细胞的软骨形成<sup>[16]</sup>。Li 等发现,在用 570nm,800mW 激光照射与 C<sub>60</sub> 脂质体融合的 HeLa 细胞达 10min 时,加 C<sub>60</sub>-脂质体的 HeLa 细胞密度是空白对照的两倍,显示了 C<sub>60</sub> 对 HeLa 细胞生长的促进作用。作者对于这一结果的解释是,与激光照射血卟啉衍生物类似,只有当激光强度超过某种阈值并且有合适的照射时间时癌细胞才会被杀死,否则将会促进其生长<sup>[17]</sup>。我们的实验结果也表明,在一定的光照条件(100W 碘钨灯垂直距离 30cm 照射 10min 或 30min)下,用 PVP 法水溶化的 C<sub>60</sub> 对人白血病 HL60 细胞的生长也有明显的促进作用<sup>[18]</sup>。Scrivens 等利用制成的 C<sub>60</sub> 水悬液对体外培养的人上皮角质细胞和成纤维细胞进行研究,将 C<sub>60</sub> 和细胞在含 MCDB 153-LB 的溶液中培养 48 小时,然后用 [<sup>3</sup>H] 胸腺嘧啶法测定细胞增殖率,发现 C<sub>60</sub> 对细胞没有任何作用<sup>[19]</sup>。Sijbesma 等与 Schinazi 等发现几种水溶性的羧酸 C<sub>60</sub> 只抑制受急性 HIV-1 病毒感染的人外周血单个核细胞(PBMC)的生长,对未感染的 PBMC、H9、Vero 和 CEM 等 4 种细胞则没有

毒性作用<sup>[6,20,21]</sup>。

#### 四、C<sub>60</sub>的作用机理

C<sub>60</sub>及其衍生物在起作用时大都需要光的诱导。因此,C<sub>60</sub>及其衍生物常常被称为光敏分子。事实上,由于C<sub>60</sub>独特的分子结构使其具有特殊的光物理性质。C<sub>60</sub>在紫外及可见光区均有较强的吸收,在光的激发下,很容易形成单线态(<sup>1</sup>C<sub>60</sub>),而单线态衰减的主要方式则是通过系统间过渡(Intersystem crossing,ISC)成为三线态(<sup>3</sup>C<sub>60</sub>)<sup>[22]</sup>。对于C<sub>60</sub>的光敏作用机理,一种观点认为与单线态氧的生成有关<sup>[9,10]</sup>。其理由有:(1) 三线态(<sup>3</sup>C<sub>60</sub>)可以通过能量转移使氧分子(O<sub>2</sub>)成为单线态氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>),而且这是一个非常高效的过程<sup>[22]</sup>;(2) 在C<sub>60</sub>、羧酸C<sub>60</sub>及其他衍生物的水溶液中都已检测到单线态氧<sup>[9,23,24]</sup>,以及(3) 重水中羧酸C<sub>60</sub>对DNA的断裂效应较水中更显著<sup>[9]</sup>,而单线态氧在重水中具有更长的寿命<sup>[25]</sup>。然而An等却得到相反的结论<sup>[11]</sup>。他们对C<sub>60</sub>-寡聚核苷酸和曙红-寡聚核苷酸的DNA断裂活性进行了比较,发现曙红-寡聚核苷酸在重水中比在水中效果更好,而C<sub>60</sub>-寡聚核苷酸在两种溶剂中的效果没有差异。同时<sup>1</sup>O<sub>2</sub>的强淬灭剂NaN<sub>3</sub>能抑制曙红-寡聚核苷酸的作用,对C<sub>60</sub>-寡聚核苷酸则没有效果。他们由此断定C<sub>60</sub>对DNA的选择性断裂作用与<sup>1</sup>O<sub>2</sub>无关,而可能通过诸如电子转移与鸟嘌呤直接进行反应。黄文栋等人发现,C<sub>60</sub>经光激发后对人红细胞膜蛋白中几种重要的氨基酸有明显的破坏作用,并氧化膜蛋白的巯基和膜中不饱和脂肪酸。NaN<sub>3</sub>并不能消除C<sub>60</sub>的影响而超氧化物歧化酶(SOD)却能够部分抑制C<sub>60</sub>的作用,表明溶液中可能存在氧自由基,电子顺磁共振(ESR)分析也证实了这种推论。他们因此提出C<sub>60</sub>的光敏作用不仅包含单线态氧机制,也存在氧自由基机制<sup>[26]</sup>。最近,我们实验室利用氧自由基的光敏探针光敏精(Lucigenin)和光子计数器,直接测定了C<sub>60</sub>及5种衍生物的水溶液中的氧自

由基。结果发现光照可激发C<sub>60</sub>水溶液产生氧自由基,而C<sub>60</sub>衍生物则不能,提示C<sub>60</sub>的光敏作用确实涉及氧自由基,其衍生物则可能通过其他的途径(杨新林等,自然科学进展,1999,9:729-732)。然而,Sato等最近表明,C<sub>60</sub>的单丙二酸和二丙二酸加成产物(MMA C<sub>60</sub>及DMA C<sub>60</sub>)对血管内皮依赖性松弛的抑制效应很可能是通过产生氧自由基来实现的<sup>[27,28]</sup>。值得注意的是,多羟基C<sub>60</sub>(富勒醇)不但不能生成氧自由基,相反却能清除水溶液体系中的超氧阴离子自由基和羟基自由基2种活性氧自由基<sup>[12,29]</sup>。由此可见,C<sub>60</sub>光敏作用可能涉及多种机理,包括单线态氧、氧自由基、电子转移,而且不能排除其他的未知的过程。

有关C<sub>60</sub>对细胞的作用机理中,C<sub>60</sub>是否进入细胞起作用?如进入细胞,它的细胞内受体是什么?这是十分值得探讨的问题。Scrivens等将<sup>14</sup>C-标记的C<sub>60</sub>水悬液加到人上皮角质细胞中,用无血清的MCDB 153-LB作培养液,培养4小时后清洗细胞,换上新鲜的培养液,在不同时间测细胞融合产物的效率,发现C<sub>60</sub>在11小时内仍与细胞结合。C<sub>60</sub>与细胞表面的作用可能是通过C<sub>60</sub>分子或相关小颗粒的扩散作用来实现的<sup>[19]</sup>。尽管Kotelnikova等证实水溶性的C<sub>60</sub>氨基酸和多肽衍生物都能够透过脂质体的脂双分子层并协助金属离子的跨膜运输<sup>[30]</sup>,迄今并无C<sub>60</sub>或其衍生物进入细胞的直接证据。目前我们已得到国家自然科学基金资助,将就C<sub>60</sub>对细胞的作用机理进行较为深入的研究。

#### 五、应用前景

研究表明,C<sub>60</sub>及其衍生物作为一种新型材料,在生物学和医学上具有广泛的潜在的应用前景。Yamakoshi等将C<sub>60</sub>的PVP溶液与绵羊红细胞在37℃下置于PBS中30分钟,以PVP溶液和毛地黄皂苷作对照,然后将细胞离心,在550nm处测上清液的光密度值,未发现C<sub>60</sub>对红细胞有溶血作用<sup>[31]</sup>,而且C<sub>60</sub>不会促

使血浆凝聚<sup>[32]</sup>。说明它可能成为一种血液相容性较好的生物医用材料。由于C<sub>60</sub>的衍生物大都具有抗爱滋病毒病毒的活性以及较低的细胞毒性,它们可能用于血和血产品中爱滋病毒病毒的灭活,更高效的此类化合物正在寻找之中<sup>[6,20,21]</sup>,由于C<sub>60</sub>是一个可充填的中空笼形球且抗辐射和化学腐蚀,如果把其他原子装填进去,就会具有某些特殊性能,比如,如果把放射性原子植入C<sub>60</sub>中,可以应用在医疗造影检查中,跟踪病人的血流或进行医疗成象;一些水溶性C<sub>60</sub>衍生物如富勒醇等在体外具有强烈的自由基清除效应,因此有可能成为新的医用生物活性氧清除剂<sup>[12,20]</sup>,多种C<sub>60</sub>衍生物在一定光照条件下对体外癌细胞与非正常细胞的生长具有抑制或杀伤作用<sup>[9,12,13]</sup>,静脉注射C<sub>60</sub>-聚乙二醇(C<sub>60</sub>-PEG)水溶液至皮肤癌荷瘤小鼠体内并光照肿瘤部位,肿瘤生长受到明显抑制而正常皮肤组织却不被伤害<sup>[33]</sup>,表明其成为一类新型光敏抗癌药物的可能性;此外,C<sub>60</sub>的氯化物在光照下具有杀虫效应,可以作为杀虫剂<sup>[34]</sup>。

当然,C<sub>60</sub>在生物学领域的研究尚处于探索阶段,还存在许多困难和问题,随着对C<sub>60</sub>的性质、合成等方面的研究进一步深入,它在生物学领域的研究和应用将会越来越广泛。

## 摘 要

本文对近几年来有关C<sub>60</sub>及其衍生物的生物学效应的研究作了较为系统的评述,包括对生物酶活性的抑制、对DNA的选择性剪切作用、对细胞生长的影响、C<sub>60</sub>及其衍生物的作用机理以及应用前景等5方面的内容。

## 参 考 文 献

- [1] Kroto, H. W. et al., 1985, *Nature*, **318**: 162-163.
- [2] 郭志新等, 1998, *化学进展*, **10**: 1-15.
- [3] Krätschmer, W. et al., 1990, *Nature*, **347**: 354-358.
- [4] 杨新林等, 1998, *材料导报*, **12**: 1-3.
- [5] Fridman, S. H. et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**: 6506-6509.
- [6] Sijbesma, R. et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**: 6510-6512.
- [7] Toniolo, C. et al., 1994, *J. Med. Chem.*, **37**: 4558-4562.
- [8] Ando, R. et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**: 1174.
- [9] Tokuyama, H. et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**: 7918-7919.
- [10] Bourtine, A. S. et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**: 2462-2465.
- [11] An, Y. Z. et al., 1996, *Tetrahedron*, **52**: 5179-5189.
- [12] Chiang, L. Y. et al., 1995, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1283-1384.
- [13] 钱凯先等, 1997, *生物化学与生物物理进展*, **24**: 237-241.
- [14] Okuda, K. et al., 1996, *Proceedings of the 10th Meeting of the Japanese Society for Fullerenes*, PP277-279.
- [15] Tsuchiya, T. et al., 1996, *FEBS Lett.*, **393**: 139-145.
- [16] Tsuchiya, T. et al., 1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206**: 885-894.
- [17] Li, W. Z. et al., 1994, *Chin. Phys. Lett.*, **11**: 207-210.
- [18] 任丽亚等, 1997, '96 中国材料研讨会论文集 III-1, 生物及环境材料, 北京: 化学工业出版社, pp372-374.
- [19] Scrivens, W. A. et al., 1994, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**: 4517-4518.
- [20] Schinazi, R. F. et al., 1993, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**: 1707-1710.
- [21] Schinazi, R. F. et al., 1995, *Proc. Electrochem. Soc.*, **10**: 696-698.
- [22] Arbogast, J. W. et al., 1991, *J. Phys. Chem.*, **95**: 11-12.
- [23] Orfanopoulos, M. and Kambourakis, S., 1995, *Tetrahedron Lett.*, **36**: 435-438.
- [24] Hamano, T. et al., 1997, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 21-22.
- [25] Merkel, P. B. and Kearns, D. R., 1972, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**: 7244.
- [26] 黄文栋等, 1996, *生物化学杂志*, **12**: 483-487.
- [27] Satoh, M. et al., 1997, *Gen. Pharmac.*, **29**: 345-351.
- [28] Satoh, M. et al., 1997, *Eur. J. Pharmac.*, **327**: 175-181.
- [29] 孙大勇等, 1997, *科学通报*, **42**: 836-840.
- [30] Kotelnikova, R. A. et al., 1996, *FEBS Lett.*, **389**: 111-114.
- [31] Yamakoshi, Y. N. et al., 1994, *J. Chem.*

*Soc. Chem. Commun.*, 517-518.

[32] Lander, L. M. et al., 1995, *Langmuir*, 11, 375-376.

[33] Tabata, Y. et al., 1997, *Jpn. J. Cancer Res.*, 88, 1108-1116.

[34] Cataldo, F., 1994, *Carbon*, 32, 437-443.

## 荧光原位杂交技术及其应用

陈乐真 张杰\*

(解放军总医院病理科 北京 100853 \*上海市第五人民医院病理科 上海 200240)

荧光原位杂交技术(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)是近年来生物学领域发展起来的一项新技术。其运用细胞遗传学和分子生物学的原理,作为细胞生物学和分子生物学之间的桥梁,已被广泛用于遗传疾病、肿瘤研究及临床诊断和治疗监测,有着广泛的应用前景。FISH技术问世于70年代后期,曾多用于染色体异常的研究,近年来随着FISH所应用的探针种类的不断增多,特别是全Cosmid探针及染色体原位抑制杂交技术的出现,使FISH技术不仅在细胞遗传学方面,而且还广泛应用于肿瘤学研究,如基因诊断、基因定位等。原有的同位素原位杂交技术存在着较多缺点,诸如每次检测均需重新标记探针、已标记的探针表现出明显的不稳定性、需要较长时间的曝光时间和对环境的污染等。与之比较FISH则具有①操作简便,探针标记后稳定,一次标记后可使用二年。②方法敏感,能迅速得到结果。③在同一标本上,可同时检测几种不同探针。④不仅可用于分裂期细胞染色体数量或结构变化的研究,而且还可用于间期细胞的染色体数量及基因改变的研究。本文就FISH技术特点及其应用作综述。

### 一、FISH的技术特点

FISH选用的标本可以是分裂期细胞染色体也可以是间期细胞。间期细胞可以是冰冻切片,也可以是细胞滴片或印片。生物素(Biotin),地高辛(digoxigenin),dinitrophenyl

(DNP), aminoacetyl fluorene (AAF)等均可用于探针标记。前两者较为常用,通常采用切口平移法(Nick translation)或随机引物法(Random Primer)对探针标记。在已知探针DNA结构及序列情况下也可采用PCR或RNA逆转录法标记探针。通常用于Biotin标记的探针应大于1000bp以上,这样标记易成功,这是由于DNA中dTTP含量<20%,小于1kb以下的探针,不易标记成功。对较小的探针可采用PCR技术来标记。如探针是具有重复序列的DNA或粘粒、YAC探针,在杂交液中加入用超声破碎的人体胎盘组织DNA或CotDNA,以阻断探针和染色质之间非特异性的结合。荧光信号在高压汞灯产生的短波激发光下常引起荧光信号淬灭,为防止淬灭的发生,可将DAPI或PI稀释于P-phenylenedimine的甘油缓冲液中<sup>[1]</sup>。任何荧光显微镜均可用于观察FISH信号,但对单拷贝探针的信号需要质量较好的荧光显微镜。如采用双色或多色滤光片可以同时观察FITC、Texas-Red等多种颜色的FISH信号,不论是染色体还是单拷贝基因的FISH信号均可用高度敏感和高分辨率的彩色胶片摄取,也可通过CCD(charge coupled device)的照相系统或Laser scanning confocal imaging system(激光扫描共焦成像系统)将摄取的信号储存在计算机内,经软件处理后,将信号显示在荧光屏上。由于有多种方法标记DNA探针,故一次杂交可以同时观察多个探针的信号,如两个不同的探针分别用Biotin和Digoxigenin标记,杂交后用avidin-FITC和抗-Dig-Texas-Red分别