分类号： 单位代码：10114

密 级： 学 号：Dr2008019

**DBDCT 初步毒代动力学、神经毒性作用及其机制研究**

研 究 生： 葛 睿

指 导 教 师： 李青f t 教授 申 请 学 位 门 类 级 别： 医 学 博 士

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 专 | 业 | 名 | 称： 劳动卫生与环境卫生 |
| 研 | 究 | 方 | 向： 药物药理学与毒理学 |
| 所 | 在 | 学 | 院： 公共卫生学院 |

二 O 一三年 五月

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree for Doctor of Medicine**

**Preliminary Study on the Toxicokinetics and Neurotoxicity of DBDCT and its Neurotoxic Mechanism**

**Candidate: Rui Ge**

**Major: Occupational and Environmental Health Supervisor: Professor Qingshan Li**

**School of Public Health, Shanxi Medical University Taiyuan 030001, P. R. China**

**May 2013**

目 录

[摘要](#_Toc686113780) 4

**[Abstract](#_Toc686113781)** 4

[前言](#_Toc686113782) 4

[第一章](#_Toc686113783) **[DBDCT](#_Toc686113783)** [毒代动力学及组织分布研究](#_Toc686113783) 5

[引 言](#_Toc686113784) 5

[一、 生物样品中锡测定方法的确立](#_Toc686113785) 5

[1 实验材料及方法](#_Toc686113786) 5

[2 实验结果及结论](#_Toc686113787) 6

[3 实验讨论](#_Toc686113788) 7

[4 小结](#_Toc686113789) 7

[二、 大鼠单次静脉注射DBDCT的毒代动力学研究](#_Toc686113790) 7

[1 实验材料及方法](#_Toc686113791) 7

[2 实验结果及结论](#_Toc686113792) 7

[3 实验讨论](#_Toc686113793) 8

[4 小结](#_Toc686113794) 8

[三、 大鼠静脉注射DBDCT的组织分布研究](#_Toc686113795) 8

[1 实验材料及方法](#_Toc686113796) 8

[2 实验结果及结论](#_Toc686113797) 8

[3 实验讨论](#_Toc686113798) 8

[4 小结](#_Toc686113799) 9

[四、 本章小结](#_Toc686113800) 9

**[第二章 DBDCT](#_Toc686113801)**[在大鼠体内神经毒性研究](#_Toc686113801) 9

[引 言](#_Toc686113802) 9

[1 实验材料及方法](#_Toc686113803) 9

[2 实验结果及结论](#_Toc686113804) 10

[3 实验讨论](#_Toc686113805) 11

[4 本章小结](#_Toc686113806) 12

**[第三章 DBDCT](#_Toc686113807)**[诱导](#_Toc686113807)**[PC12](#_Toc686113807)**[细胞凋亡的机制研究](#_Toc686113807) 13

[引言](#_Toc686113808) 13

[一、 DBDCT对PC12细胞的损伤作用及机制研究](#_Toc686113809) 13

[1 实验材料及方法](#_Toc686113810) 13

[2 实验结果及结论](#_Toc686113811) 14

[3 实验讨论](#_Toc686113812) 17

[4 小结](#_Toc686113813) 17

[二、 DBDCT对PC12细胞凋亡信号传导通路的影响](#_Toc686113814) 18

[1 实验材料及方法](#_Toc686113815) 18

[2 实验结果及结论](#_Toc686113816) 18

[3 实验讨论](#_Toc686113817) 20

[4 小结](#_Toc686113818) 21

[三、 本章小结](#_Toc686113819) 21

[参考文献](#_Toc686113820) 22

[英文缩略词表](#_Toc686113821) 26

[综 述](#_Toc686113822) 30

[参考文献](#_Toc686113823) 33

[攻读学位期间发表论文情况](#_Toc686113824) 37

[个人简历](#_Toc686113825) 39

**DBDCT 初步毒代动力学、神经毒性作用及其机制研究**

摘要

**目的：**二-（4-氯苯甲酰异羟肟酸）二正丁基合锡（DBDCT）是一种典型的 R2SnL2

型有机锡类化合物，大量资料表明，此类有机锡化合物可致中枢神经系统损伤，但具体机制不明，有待进一步研究。本实验第一部分拟建立生物样品中锡含量的检测方法，确定DBDCT毒代动力学参数，确定大鼠暴露于毒剂量DBDCT的组织分布，并证明DBDCT可以透过血脑屏障，从而对神经系统产生影响；第二部分及第三部分拟通过动物在体实验和神经细胞体外培养两条途径研 究

DBDCT 引起神经毒性的作用，并对可能机制进行初步探讨。

**方法：**（1）建立原子荧光光谱法（AFS）检测血浆及组织匀浆中锡含量的方法，并采用AFS测定大鼠单次毒剂量（15mg/kg）静脉注射DBDCT后的毒代动力学参数及组织分布，初步判断DBDCT 是否可以通过血脑屏障产生神经系统影响；

（2）采用紫外分光光度法测定大鼠多次静脉注射DBDCT后的血清及脑组织生化指标；（3）观察大鼠多次静脉注射DBDCT前后体重的变化，并用HE染色检测主要组织脏器的病理学改变，确定主要毒性靶器官和毒性产生的可能原因；

（4）通过TUNEL和Western blot技术，研究大鼠多次静脉注射DBDCT后脑组织凋亡及凋亡相关蛋白的表达情况，初步明确DBDCT产生神经毒性的机制；（5）以PC12细胞为体外神经毒性研究对象，采用MTT法测定染毒后细胞的增殖抑制率，通过光镜、荧光染色和电镜等方法观察细胞核形态的变化，以PI/Annexin V-FITC双染检测细胞染毒后的凋亡率，DNA Ladder方法检测细胞染毒后凋亡的特异性条带，用RT-PCR法检测凋亡相关基因的表达情况，从而证实DBDCT通过诱导细胞凋亡产生神经毒性；（6）采用紫外分光光度法测定PC12细胞染毒前后caspase-3和caspase-9活性的变化；以流式细胞术测定线粒体跨膜电位（ΔΨm）及活性氧（ROS）的变化，通过Western blot分析Bax、Bcl-2、Cyt-*c*、caspase-3、caspase-9、p-JNK及p-p38等蛋白表达，进一步确证DBDCT通过多个信号转导通路诱导凋亡，产生神经毒性。

**结果：**（1）建立了定量准确，精密度高，操作方便的检测血浆及组织匀浆中锡

含量的AFS；测定了大鼠单次毒剂量静脉注射DBDCT后毒代动力学参数：分布半衰期*t*1/2α为49.977min、消除半衰期*t*1/2β为1.260min、表观分布容积*V*c为8.201(μg/mL) /(mg/kg)、曲线下面积AUC为56.073(mg/kg) min、清除率Cl 为

0.297μg/mL/min/(mg/kg)；大鼠单次毒剂量静脉注射后DBDCT可迅速分布到各组织，但锡浓度维持时间较短，肾上腺中锡浓度最高，其余组织中锡浓度相似，脑组织中能检测到少量锡元素，注射后两小时内维持0.10μg/g以上水平；（2）大鼠多次静脉注射DBDCT后，血清中AST、ALT、ALP、GGT、STB、BUN及CRE均显著升高（*p*<0.01），脑组织中SOD及GSH-Px显著降低（*p*<0.01），而MDA显著增高（*p*<0.01）；（3）大鼠多次静脉注射DBDCT后，前三周体重虽有增加，但增长缓慢，最后一周称重时体重不增反降，HE 染色后光学显微镜下观察发现，染毒组动物肝脏均被膜增厚，部分出现肝细胞嗜酸性变，核固缩等病理改变，部分脑组织也出现神经细胞结节状增生及皮质部分神经细胞变性等病理改变；（4）大鼠多次静脉注射DBDCT后对脑组织进行TUNEL染色，光学显微镜下可见染毒组大鼠大脑皮质中的细胞核大量呈现圆形和不规则形，棕染且着色深，凋亡指数AI极显著增高，从8.26±1.25%增加到30.3±1.94%

（*p*<0.01），Western blot实验结果显示染毒组蛋白Bax表达增加，蛋白Bcl-2的表达显著减少，Bax/Bcl-2比值从0.767上升至2.842，且蛋白caspase-3及caspase-9均出现显著地剪切条带；（5）MTT法测定DBDCT暴露24h后PC12细胞IC50值为4.110μmol/L，通过光镜、荧光染色和电镜观察到DBDCT染毒后PC12细胞呈现凋亡细胞所特有的形态学特征，PI/Annexin V-FITC双染显示随DBDCT染毒剂量的增大和暴露时间的延长，PC12细胞的凋亡率显著增加（*p*<0.05），琼脂糖凝胶电泳中可见凋亡特征性改变的DNA梯形带，RT-PCR实验可见凋亡相关基因caspase-3、caspase-8、caspase-9、NF-κB、Fas、Fas-L及Cty-*c*的表达均发生显著变化（*p*<0.05, *p*<0.01）；（6）PC12细胞暴露于不同染毒剂量DBDCT不同时间后，caspase-3和caspase-9的活性显著增加（*p*<0.05, *p*<0.01），随着

DBDCT染毒剂量的增加和暴露时间的延长，△Ψm显著下降，ROS的生成明显

增多，蛋白Bcl-2的表达下凋，蛋白Bax表达上调，线粒体内蛋白Cyt-*c*含量显著下降，胞质中蛋白Cyt-*c*含量明显增加，蛋白caspase-3及caspase-9均出现越来越显著地剪切条带，p-JNK和p-p38的表达逐渐增加，且均有明显量效和时效关系（*p*<0.01）。

**结论：**（1）AFS 适用于测定血液及组织样品中锡的含量，大鼠单次静脉注射

DBDCT 后血中锡浓度随时间变化符合二室模型，分布迅速，锡浓度维持时间较短，在主要组织器官中不易蓄积，DBDCT可以透过血脑屏障，因此可能对神经系统产生影响；（2）DBDCT影响大鼠体重增长和一般生长发育，改变大鼠血清中多种生化指标，表现出显著地肝脏及肾脏毒性；（3）DBDCT降低大鼠脑组织中抗氧化系统的活性，增强脑组织脂质过氧化反应，一定程度上通过诱导细胞凋亡对大鼠脑组织神经系统造成损害；（4）DBDCT能够诱导体外培养的PC12细胞株发生凋亡，作用机制可能是氧化应激及DNA损伤；Bcl-2家族、线粒体凋亡途径及MAPK信号转导通路均参与到DBDCT诱导的PC12细胞凋亡中，揭示DBDCT 通过多途径诱导神经细胞凋亡从而产生神经毒性。

**关键词：**二-（4-氯苯甲酰异羟肟酸）二正丁基合锡（DBDCT）；神经毒性；原 子荧光光谱法（AFS）；毒代动力学；细胞凋亡；信号转导通路

**Preliminary Study on the Toxicokinetics and Neurotoxicity of DBDCT and its Neurotoxic Mechanism**

**Abstract**

**Objective:** DBDCT is a typical R2SnL2 type organotin compound synthesized by our group. The central nervous system is the major toxic target organ of the organotin compounds, but the exact mechanism of their neurotoxicity still remains unclear. In the first part of this experiment, the detection method of tin in biological samples was established, the toxicokinetic parameters and the tissue distribution of DBDCT in a toxic dose were determined. And it was confirmed that DBDCT could penetrate through the blood-brain barrier and influence the central nerve system. The neurological effects in rats *in vivo* and the possible mechanisms of neurotoxicity of DBDCT *in vitro* were studied in the second and the third part of the experiment.

**Methods:** (1) The atomic fluorescence spectrometry (AFS) assay was established to detect the concentration of tin in plasma or in tissue homogenates in rats. And the toxicokinetic parameters and tissue distributions of tin after single intravenous 15mg/kg DBDCT in rats were detected using the AFS assay. These detections were used to preliminarily judge the possibility of DBDCT penetrating through the blood-brain barrier and influencing the central nerve system. (2) A series of biochemical indicators in serum and in brain tissues in rats after repeatedly intravenous injection of DBDCT were determined by UV spectrophotometric assay.

(3) The changes of the rats' body weights were observed during the exposure period of DBDCT, and the HE staining was used to observe the pathological changes in main organs after repeatedly intravenous injection of DBDCT. These detections were used to determine the main toxic target organ and possible causes of toxicity after exposure to DBDCT *in vivo*. (4) The apoptosis indexes (AI) and the expressions of apoptosis-related proteins in rats' brains were detected after repeatedly intravenous injection of DBDCT using TUNEL and Western blot techniques, which were expected to explain the possible neurotoxic mechanism after exposure to DBDCT *in vivo*. (5) The PC12 cell line was selected to study the neurotoxicity of DBDCT *in vitro*. Growth inhibitions of the PC12 cells were analyzed by MTT method. Hoechst 33258

And AO/EB staining, light and electron microscope were used to examine the nuclear changes after exposure to DBDCT. The apoptosis ratios were determined by PI/Annexin V-FITC double staining, and the specific DNA ladder-shaped strips were studied by agarose gel electrophoresis. The expression changes of apoptosis-related genes such as caspase-3, caspase-8, caspase-9, NF-κB, Fas, Fas-L and Cty-*c* were detected by RT-PCR. All the detection methods were used to confirm that the cytotoxicity and neurotoxicity exposure to DBDCT were caused by inducing apoptosis. (6) The changes of enzymatic activities of caspase-3 and caspase-9 in PC12 cells before and after exposure to DBDCT were evaluated using UV spectrophotometric method. The changes of mitochondria transmembrane potential variance (ΔΨm) and reactive oxygen species (ROS) were measured using flow cytometry. Meanwhile, the protein expressions of Bax, Bcl-2, Cyt-*c*, caspase-3, caspase-9, p-JNK and p-p38 were analyzed by western blot method to further confirm that the neuronal apoptosis induced by DBDCT was resulted through multiple signal transduction pathways.

**Results:** (1) An AFS assay was established which was proved to be accurate quantitative, high precision, operated easily to detect the concentration of tin in plasma or in tissue homogenates in rats. After single intravenous injection of toxic dose to rats, the toxicokinetic parameters of DBDCT were showed below, the distribution half life *t1/2α*and the elimination half life *t1/2β*were 49.977 min and 1.260 min separately, the apparent volume of distribution *Vc* was 8.201(μg/mL) /(mg/kg), the area under the curve was 56.073(mg/kg) min, and the clearance rate Cl was 0.297μg/mL/min/(mg/kg). After single intravenous injection of toxic dose to rats, DBDCT could be distributed quickly. The concentration of tin in adrenal gland was the highest, and the concentrations of tin in the rest tissues were similar. The tin concentrations in rats' brain were determined not less than 0.10μg/g within the first two hours after intravenous injection. (2) The levels of AST, ALT, ALP, GGT, STB, BUN and CRE in serum after repeatedly intravenous injection of DBDCT were all elevated extremely obviously (*p*<0.01). The activities of SOD and GSH-Px in brain homogenate were increased, on the other hand, the MDA levels were decreased notably (*p*<0.01). (3) Although the body weights increased in the first three weeks,

They dropped at the last week after repeatedly intravenous injection of DBDCT. After HE staining, the thickened liver capsules, eosinophilic change and karyopyknosis of liver cells were observed in liver, nodular hyperplasia of nerve cells and cell degenerations in cerebral cortex were also observed in brain. (4) After repeatedly intravenous injection of DBDCT, the nucleus of the neurons in the cerebral cortex appeared irregular shaped and were stained brown by TUNEL staining. The apoptosis index (AI) was significantly increased from 8.26±1.25% to 30.3±1.94% (*p*<0.01). After western blot assay, the protein expression of Bax increased, on the contrary, the protein expression of Bcl-2 decreased, the ratio of Bax/Bcl-2 increased from 0.767 to 2.842. The cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 were detected. (5) The IC50 of DBDCT in 24 h was 4.110μmol/L. The classic nuclear morphology characteristics were observed in PC12 cells exposed with DBDCT using fluorescent staining, light and electron microscope. The apoptosis rates determined by PI/Annexin V-FITC double staining method in PC12 cells exposed with DBDCT for different period of time showed significant statistics difference (*p*<0.05) compared with the control group. In the agarose gel electrophoresis, DNA ladder-shaped strips were also clearly observed. The results of RT-PCR indicated that the mRNA expresses of apoptosis-related genes such as caspase-3, caspase-8, caspase-9, NF-κB, Fas, Fas-L

And Cty-*c* in the PC12 cells exposed with DBDCT were obviously changed (*p*<0.05,

*P*<0.01) compared with the normal PC12 cells. (6) The enzymatic activities of caspase-3 and caspase-9 of PC12 cells exposed with different concentrations of DBDCT for different period of time increased significantly (*p*<0.05, *p*<0.01). The

△Ψm strikingly decreased which was detected by JC-1, and the generation of ROS increased exposed with different concentrations of DBDCT for different period of time. The results of western blot analysis showed the down-regulation of bcl-2 and the up-regulation of Bax. The expression of Cyt-*c* decreased in mitochondria and elevated in the cytosol. The cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 were detected. The expressions of p-JNK and p-p38 also increased. All the changes of protein expressions were dose- and time- dependent (*p*<0.05).

**Conclusions:** (1) The AFS applied to the determination of the tin concentrations in the blood and tissue samples. The concentration changes of tin in blood over time met

The two-compartment model. DBDCT distributed rapidly, but was not easy to accumulate in the major tissues and organs. It could penetrate through the blood-brain barrier, which indicates it may have neurotoxic effect. (2) DBDCT affected the increase of the body weights and the general growth and development of rats. The changes of a series of biochemical indicators in blood and in brain tissues in rats revealed that DBDCT had significant liver toxicity and kidney toxicity. (3) DBDCT reduced the activity of the antioxidant system and enhanced the lipid peroxidation in the brain tissue of rats, and to some extent, caused damage in central nerve system by inducing neuron apoptosis *in vivo*. (4) DBDCT was able to induce apoptosis in the PC12 cells cultured *in vitro*, the mechanism of which might be oxidative stress and DNA damage. The Bcl-2 family, mitochondrial apoptosis pathway and MAPK signal transduction pathway were all involved in the apoptosis in the PC12 cells induced by DBDCT, which revealed that DBDCT could cause neurotoxicity by inducing apoptosis in neuron on multi-pathways.

**Keywords:** Di-n-butyl-(4-chlorobenzohydroxamato) tin(IV) Chloride (DBDCT); Neurotoxicity; Atomic fluorescence spectrometry; Toxicokinetics; Apoptosis; Signal transduction pathway

前**言**

有机锡化合物是由锡和碳元素结合形成的金属有机化合物，分为烷基锡化合物和芳香基锡化合物两类，其大规模使用始于上世纪中期，最初主要用于塑料工业生产的稳定剂和催化剂，如作为PVC的稳定剂等，后来随着使用范围的不断扩大，各种有机锡的产量也在不断提高，在工业有机金属化合物生产中有机锡的产量排行第4。大量的有机锡化合物被用于工业、农业、各种除草剂、杀虫剂、木材制品和纺织品中的抗菌防腐剂以及海洋船只防污涂料中。此外，很多家用商品中也含有有机锡[1, 2]。在医药领域，也有大量研究致力于将有机锡化合物开发为抗肿瘤药物。随着有机锡越来越广泛的使用，其所带来的环境污染及人体损害的问题也日益引起人们的警觉。研究表明，人体可以普遍通过空气[3,

4]、饮用水[5] 、食物[6]、生活用品[7]等途径接触有机锡污染物，人体组织中也能

检测出了一定量的有机锡化合物。

大量研究资料表明，有机锡主要的病理损害部位为中枢神经系统[8-10]，在体内可以选择性作用于大脑的海马和大脑皮层区域[11]，中毒后会表现出激动、攻击行为、癫痈及低血钾症等多种临床症状，并可致死[12] 。低剂量的三甲基锡（TMT）导致动物学习能力下降、记忆能力缺失[13]。TMT暴露成年小鼠引起海马、杏仁核、梨状皮层和大脑皮层的退化和损伤[14]，影响海马CA1区的突触传递[15]。TMT暴露成年大鼠，引起一系列神经行为的改变，神经细胞的死亡，导致学习和行为表现的削弱[16]。三丁基锡（TBT）能够引起鱼脑神经细胞的损伤和神经递质的改变[17, 18]。用猕猴实验亦见到有机锡引起脑水肿[18]的毒性作用，Reubl等报道实验性急性有机锡中毒猕猴出现活动过度、震颤和共济失调等，并进一步发展至木僵、昏迷，神经病理最明显改变位于海马，有神经元变性、坏死，杏仁核、髓质、脊髓和浦肯野细胞也有轻度变性。动物实验表明，有机锡经注射和经口服进入大鼠机体后，约有50%能与血红蛋白结合，毒性症状以神经系统为主[19]。有机锡可通过血脑屏障进入脑组织蓄积从而产生严重的神经行为毒性 ，包括

学习记忆能力下降、注意力不集中、运动失调等。有报道显示，人类TMT意外中毒引起了听力衰退、躁动、精神运动过度兴奋、运动性共济失调、意识错乱、定向障碍、短时记忆紊乱、健忘症、局部或全身性的抓咬等症状[20]。体外实验发现TMT可以直接对神经元产生影响[11]，能够降低星形细胞瘤细胞ATP水平[21]，对原代星形胶质细胞处理能够抑制兴奋性氨基酸的摄取和促进兴奋性氨基酸的释放[22, 23]，对大鼠嗜铬细胞瘤细胞(PC12)和原代培养的海马神经细胞处理，引起细胞死亡和细胞核形态的改变，如染色质浓缩、DNA片段化等一系列凋亡症状。目前TMT已经被人们用作神经衰变和Alzheimer疾病研究的毒物模型[24]。

有机锡化合物的神经毒性机制可以归纳为以下几个方面：①谷氨酸

（Glu）兴奋性机制：在神经系统中，Glu是维持Ca2+平衡的重要因子，是在脑中广泛分布的一种兴奋性神经递质。Glu 和脑的多项功能紧密相关，

Nakatsu等人发现Glu在TBT的神经毒性中起着重要作用，TBT会促进Glu的释放，进而激活谷氨酸受体，导致神经细胞的死亡[25]。还有人发现TBT在极低浓度（l ppm）就会显著抑制配体和N-甲基-D-门冬氨酸受体的结合[26]，提示这可能是有机锡化合物引起学习记忆缺失等神经毒性的一项调节机制。②Stannin蛋白参与机制：Stannin蛋白是TMT神经中毒引起神经细胞凋亡的一种标志蛋白。Stannin是一种含有88个氨基酸的线粒体膜蛋白，最初从TMT 暴露处理的神经细胞中分离出来，后来的研究发现它在各类组织细胞中也有表达，包括淋巴、肾脏和神经组织，在脾脏中表达量最高，依次为海马大脑皮层、小脑、纹状体、中脑和肾脏。Stannin在不同细胞系中的表达量直接和该细胞对TMT 毒性的敏感性相关。亚细胞分离研究指出，

Stannin最先在神经细胞线粒体膜上定位，可能和线粒体介导的细胞凋亡有关[27]。但TMT神经毒性分子机制现在还没有完全弄清楚。一种可能的机制是，TMT在基因水平上改变Stannin蛋白的转录效率，从而引起凋亡的级联反应。另外一种可能的机制是TMT直接和Stannin作用，改变了Stannin的二级结构，使之与凋亡前体结合。③氧化损伤机制：大量研究证实，活性氧

介质NO、O-2 、H2O2、HO•和脂质过氧化物等均可促使细胞生长、凋亡和细胞粘连等生物反应[28]。大量的研究表明，有机锡化合物进入机体后诱导活性氧（reactive oxygen species, ROS）生成[29]，ROS的增加又会在体内诱发一系列的自由基链式反应，结果引起脂质过氧化等氧化损伤的发生 。

ROS还可以通过调节信号转导过程，调节转录因子活化、细胞凋亡等生理过程。对于Ca2+信号转导、蛋白激酶与蛋白质的磷酸化等均有一定的作用。因此，有机锡诱导产生ROS可能是导致各种细胞损伤以致凋亡的重要过程，是有机锡神经毒性机制的重要环节。

本课题组近年来在有机锡化合物毒性作用机制方面开展了连续有针对性的研究[30, 31]。针对上述问题，本课题选择DBDCT作为典型的R2SnL2型二烃基化合物为研究对象开展了以下工作：

1. 通过AFS技术研究大鼠尾静脉单次注射毒性剂量DBDCT后的毒代动力学及组织分布，确定了DBDCT的毒性靶器官，证实了DBDCT可以透过血脑屏障， 为下一步研究神经毒性产生的机制提供理论依据。

2. 研究大鼠多次静脉注射DBDCT后血清及脑组织生化指标的改变，采用

HE染色、TUNEL及Western blot等技术确定DBDCT可以产生神经系统损伤，并初步探讨可能的机制。

3. 体外培养PC12细胞模拟神经细胞，研究DBDCT诱导PC12细胞凋亡的信号传导通路。利用光镜、电镜及荧光染色检测DBDCT诱导PC12细胞凋亡的形态学变化；通过流式细胞术、琼脂糖凝胶电泳技术及RT-PCR技术证实DBDCT对PC12细胞可产生DNA损伤，升高ROS水平，降低ΔΨm，诱导凋亡发生；采用Western blot技术证实Bcl-2家族、线粒体凋亡途径及MAPK信号转导通路均参与DBDCT诱导PC12细胞凋亡的过程，阐明DBDCT通过多途径诱导神经细胞凋亡导致神经毒性。

本课题研究结果可为有机锡化合物药物的毒性评价尤其是神经毒性评价提供实验方法和依据，为有机锡类化合物的毒性防治提供科学依据 。

# 第一章 **DBDCT** 毒代动力学及组织分布研究

引 言

毒代动力学（Toxicokinetics, TK）研究是毒物安全性评价的一个极其重要的组成部分。TK是药代动力学在全身暴露评价中的延伸，为非临床毒性研究的一个组成部分，或为某一特殊设计的补充研究。在毒性试验条件下研究毒物在体内吸收、分布、排泄和清除动力学，其目的在于描述毒性试验中毒物的全身暴露和剂量与时间的关系；描述重复给药的暴露延长（extension of exposure）对代谢过程的影响，包括对代谢酶的影响（如对代谢酶的诱导或抑制）；了解毒性研究中造成的暴露量与毒理学结果之间的关系，以评价这些结果与临床安全性之间的关系；支持非临床毒性研究的动物种属选择和给药方案；结合毒性研究结果，提供有助于后续非临床毒性研究的信息；分析动物毒性表现对临床安全性评价的价值，如毒物蓄积引起的肝毒性或肾脏损害，可为后续安全性评价提供信息。因此，TK 研究可用以描述毒物体内组织分布，确立毒性靶器官，并可初步探讨毒物作用的可能机制，并为毒物的毒性预防提供新思路[32]。

有机锡化合物在于日常生活的各领域都被广泛使用，在给人类生产生活提供便利的同时，锡的污染也影响到人类的健康。锡是工作场所中有害物质必测卫生指标[33]之一。有机锡类化合物的含量测定方法包括气相色谱法（GC）[34]如气相色谱-火焰光度法（GC-FPD）[35, 36]、气相色谱与原子吸收联用（GC-AAS）[37-39]、气相色谱与微波等离子体发射光谱联用（GC-MIP-AES）[40]、气相色谱与

质谱联用（GC-MS）[41-43]；液相色谱法如高效液相色谱和质谱（HPLC-MS）联用[44, 45]、高效液相色谱和等离子体质谱（HPLC-ICP-MS）联用[46-48]等，而工作场所中Sn测定的国家标准方法是火焰原子吸收光谱法。诸多实例表明原子吸收光谱法及原子荧光光谱法才是探究有机锡类化合物中核心基团锡走向的可靠方法。而火焰原子吸收光谱法使用的乙炔-空气火焰，在测定过程中易产生二氧化锡，从而对燃烧头造成堵塞，影响测定结果。在实际工作中发现，火焰原子吸收光谱法样品消化过程麻烦，耗时很长，而且在样品消化时温度高，易生成难

溶性焦硫酸盐或二氧化锡以及未挥发尽的硫酸，都可能使检测结果偏低[49]。因此原子荧光光谱法以其定量准确、精密度高、操作方便、且样品处理过程简便成为有机锡类化合物中锡元素含量测定的最佳方法。关于有机锡类化合物毒代动力学国内外没有学者做出全面且系统的研究报道，本章拟采用AFS测定大鼠血浆及组织中的锡含量，为DBDCT毒代动力学研究补充数据，确立毒性靶器官，初步探讨其作用的可能机制，并为该类有机锡化合物的毒性预防提供新思路。

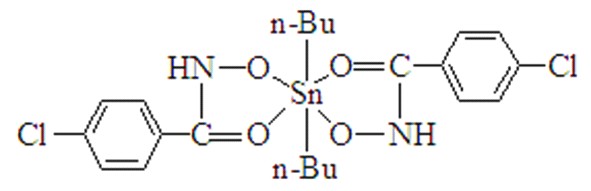


图1-1 DBDCT的化学结构

Fig. 1-1 Chemical structure of DBDCT

## 一、 生物样品中锡测定方法的确立

### 1 实验材料及方法

#### 1.1 材料、试剂及配制

##### 1.1.1 材料、试剂

DBDCT（由本课题组合成，3次重结晶，纯度≥99％，20100709）；锡标准溶液（1000μg/mL），购自阿拉丁试剂公司；氩气（Ar），99.99 %；浓盐酸、浓硝酸、浓硫酸均为优级纯；其它试剂均为分析纯，水为超纯水。

##### 1.1.2 常用溶液配制

（1）硼氢化钾溶液（15g/L）：称取15. 0g 硼氢化钾，溶于KOH溶液（2g/L）中，并定容至1000mL（此溶液现用现配）；

（2）硫脲（150g/L）-抗坏血酸（150g/L）溶液：分别称取15g硫脲和15g

抗坏血酸溶于水中并稀释至100mL（此溶液需置于棕色瓶中避光保存）；

#### 1.2 实验仪器

原子荧光光谱仪（AF-610A，北京瑞利分析仪器公司）；低速冷冻离心机

（DL-SM，长沙湘仪有限公司，长沙）；旋涡混合器（XW-SOA，上海）。

#### 1.3 血液及组织中锡的测定

##### 1.3.1 测定条件：负高压：275V；HCL 主阴极电流：80mA；HCL 辅助阴极电流：

0mA；载气：氩气；载气流量：800mL/min；原子化器温度：室温；原子化器高度：8mm；采样泵速：100r/min；采样时间：8s；注入泵速：100r/min；注入时间：18s；分析信号：峰面积；读数时间：14.0s；延时时间：2.0s；测量方式：标准曲线法；读数方式：荧光值If。反应液：15g/L硼氢化钾溶液；载流液：5%硫酸溶液。

##### 1.3.2 样品的处理与测定：精密量取0.5mL血浆样品（或准确称取组织0.6g）于锥形瓶中，加入5mL硝酸及0.5mL硫酸，放置过夜。次日置电热板上加热消化，如酸液过少，可适当补加硝酸，继续消化至冒白烟，待液体体积近1mL时取下冷却。用水将消化样品转入50mL容量瓶中，加水定容至刻度，摇匀备用。同时做空白实验。若样品液中锡的浓度超过测定范围，可用硫酸溶液稀释后测定，计算时乘以稀释倍数。同样做空白实验。

##### 1.3.3 锡标准曲线的制备

###### 1.3.3.1 锡标准应用液的配制：精密量取锡标准溶液（1000μg/mL）1mL，用硫酸

（1+9）溶液逐级稀释至 1μg/mL，为锡标准应用液。

###### 1.3.3.2 锡标准曲线的制备：分别吸取锡标准应用液 0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、

0.8、1mL于10mL容量瓶中，加硫酸（1+9）溶液定容，混匀。最终浓度分别为0. 0、5. 0、10. 0、20. 0、40. 0、60. 0、80. 0、100. 0 ng/mL。先用空白溶液测得稳定空白值，然后测定标准溶液，以荧光强度-溶液的锡浓度绘制标准曲线。

##### 1.3.4 测定方法的评价

###### 1.3.4.1 方法精密度实验：分别于0.5mL血浆样品或0.6g组织中加入0.02、0.1、

0.2mL的锡标准应用液混匀，得到1.0、5.0、10.0μg/L三种不同浓度的锡血液/组织样品，按血液样品的处理与测定方法操作，测定日间（5 天内）精密度。

###### 1.3.4.2 方法回收率实验：分别于0.5mL血浆样品或0.6g组织中加入0.02、0.1、

0.2mL的锡标准应用液混匀，得到1.0、5.0、10.0μg//L三种不同浓度的锡血液/组织样品，按血液样品的处理与测定方法操作，依法测定回收率。

#### 1.4 统计解析

以荧光强度为纵坐标（If），生物样品中锡浓度为横坐标（C），采用最小二乘法进行直线回归运算得回归方程，以荧光强度计算锡浓度。实验结果以均数 ±

−

标准差（x±SD）表示，用SPSS 10.0软件对数据进行统计分析，组间比较采

用单因素ANOVA方差分析，组内比较采用SNK法。统计结果以*p*<0.05为具有统计学意义。

### 2 实验结果及结论

#### 2.1 载流液浓度的选择

实验中硫酸溶液为载流液，分别考察1%、3%、5%、10%、15%及20%硫酸溶液对荧光强度的影响，实验结果如图1-2所示，酸度小于5%时荧光强度随硫酸浓度增大而增大，5%浓度时荧光强度进入平台期，而当酸度超过10%时，锡的荧光强度反而开始下降，考虑到成本和环境保护等因素，本实验选择5%硫酸作为载流液。

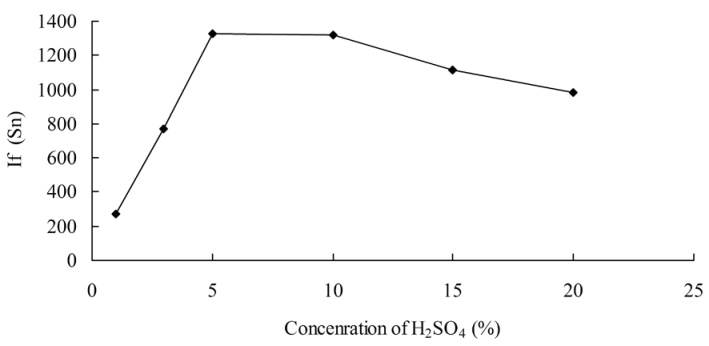


图1-2 硫酸浓度对荧光强度的影响

Fig. 1-2 the If - H2SO4 concentration curve

#### 2.2 硼氢化钾浓度的选择

实验中分别考察5、10、15、20、25、30g/L的硼氢化钾溶液对荧光强度的影响，实验结果如图1-3所示，当硼氢化钾浓度小于5 g/L时，基本检测不到荧光信号，当硼氢化钾浓度在5-15 g/L浓度范围内，荧光强度随着浓度的增加而增加，当硼氢化钾浓度在15-25 g/L范围时，荧光强度基本不变，出现平台，而当硼氢化钾溶液浓度大于25 g/L的时候，荧光强度随着浓度的增加反而减弱，因

此，实验中选用15 g/L的硼氢化钾浓度。



#### 2.3 线性范围及检出限

图1-3 硼氢化钾浓度对荧光强度的影响

Fig. 1-3 the If - KBH4 concentration curve

以荧光光度If值为横坐标，以锡的浓度C（μg/L）为纵坐标作图，拟合标准曲线为：y=1.2001x-0.934；r=0.9997，如图1-4所示；在本实验条件下，锡浓度在0-100μg/L线形范围内，分别对空白溶液进行连续12次测定，其检出限由微机软件系统按DL=3SD/b计算得出，检出限为0.84μg/L。



#### 2.4 定量方法的重现性

图1-4 原子荧光法锡标准曲线的建立

Fig. 1-4 the standard curve of Sn by AFS

定量方法的重现性以对同一样品多次测定所得的相对标准偏差（RSD%）来评价，定量方法的准确度用回收率来评价。本实验DBDCT中锡在血浆/组织浓度线性范围内的相对标准偏差均在10%以下，回收率均在93~104%之间。根据

临床生物样品测定规定，生物样品标准加入法的精密度小于15%，回收率在80-120%为合格，说明本定量方法对血浆/组织中锡浓度能以良好的精度定量，结果见表1-1及1-2。

表1-1 血浆中锡测定方法的精密度和回收率



Table 1-1 Precision and recovery data of the assay for tin in plasma by AFS

表1-2 组织中锡测定方法的精密度和回收率



Table 1-2 Precision and recovery data of the assay for tin in tissues by AFS

#### 2.5 血液及组织样品中锡浓度的定量

实验采用原子荧光光谱法对血液及组织样品中的锡浓度进行定量。选择浓硝酸及浓硫酸（10:1, v/v）混合液消解样品，选用5%硫酸作为载流液，硼氢化钾浓度为15g/L时荧光强度稳定，获得满意的消化效果。以血浆（或组织）中锡的浓度C（μg/L）为横坐标，荧光强度If为纵坐标进行直线回归，结果见表1-3，结果表明血浆（或组织）中锡的浓度在0-20.0μg/L范围内，浓度与荧光强度有良好的线性关系。

表1-3 血浆及组织中锡的回归方程



Table 1-3 Regression equations of tin in plasma or different tissue samples (n=6)

### 3 实验讨论

#### 3.1 酸度的选择

氢化物产生需要适当的酸度，不同元素形成氢化物所需要的酸度是不同的，主要取决于生成反应的稳定常数和反应速度。酸度过低则反应较缓慢且不完全；酸度过高则导致还原剂大量分解，H2 大量产生，使被测元素浓度稀释，且氢化物在原子化器中的停留时间缩短从而导致测定灵敏度下降，因此酸度选择的准确与否直接决定实验的准确度。本实验参考仪器本身的指导原则，并进行预实验，选择恰当的载流液浓度，保证实验数据准确科学[50-53]。

#### 3.2 硼氢化钾浓度选择

硼氢化钾作为体系中氢化物发生的还原剂，对方法的灵敏度、准确度和稳定性有非常大的影响，浓度过高产生过量的H2使得灵敏度降低；浓度过低氢化物难以形成。本实验参考仪器本身的指导原则，并进行预实验，选择适当的硼氢化钾浓度，保证实验数据准确科学[50-53]。

### 4 小结

从以上DBDCT中锡的检测方法结果可以确定，本研究所采用的AFS适用

于测定血液及组织样品中锡的含量。血液/组织在0-20.0μg/L范围内相对标准偏差均在10%以下，回收率均在93~104%之间，说明本定量方法仪器条件适合，定量准确，精密度高，操作方便，且样品处理过程简便，是测定生物样品中锡含量的可行方法。

## 二、 大鼠单次静脉注射DBDCT的毒代动力学研究

### 1 实验材料及方法

#### 1.1 材料、试剂及仪器同第一节

#### 1.2 实验动物

健康Wistar大鼠6只，体重180～220g，ft西医科大学实验动物中心提供。置于室温23±2℃，相对湿度50±10%，设定为每日12小时照明的饲养室内，自由饮食饮水。适应性饲养7日。静脉注射前禁食12h。

#### 1.3 给药方式及血浆样本采集

单次尾静脉注射DBDCT 15mg/kg；每只动物分别于注射前及注射后1、3、

5、15、30、45、60、120和240 min经眼眶采血500μL，将血液样品置入肝素管内混匀，3000r/min 离心10min，分离血浆，-20℃保存待测。

#### 1.4 血浆样品含量测定

按前述方法测定血浆样本中锡的浓度。

#### 1.5 血浆中锡浓度的数据解析

DBDCT中锡的全血浓度（C）-时间（t）数据依下示采用3P97程序，根据AIC值最小的原则，参考加权残差平方和(WSS)、相关系数（R）、确定系数(R2)、拟合优度(Goodness of Fit)及F检验等进行解析。

### 2 实验结果及结论

按1.5数据解析原则判定大鼠尾静脉注射后DBDCT体内处置方式符合二室模型。按二室模型、权重为1/C/C或1/C分别计算每只动物的代谢动力学参数，结果显示 *K*12，AUC，*t*1/2β等参数的数值均相近。由于实际血样中低浓度样品较

多，而选择权重为1/C/C 对低浓度数据拟合较好，故确定按二室模型、权重为

1/C/C计算毒代动力学参数。解析结果如表1-4、1-5及图1-5、1-6所示，其中分布半衰期*t*1/2α为49.977min、消除半衰期*t*1/2β为1.260min、表观分布容积*V*c 为

8.201(μg/mL) /(mg/kg)、曲线下面积AUC为56.073(mg/kg) min、清除率Cl 为

0.297μg/mL/min/(mg/kg)。

表1-4 单剂量静脉注射15mg/kg DBDCT后的血浆锡浓度-时间数据



Table 1-4 Mean plasma tin concentration-time data in rats after single 15mg/kg DBDCT injection

“\*”号为低于检测限数据，未参加毒代动力学计算



图1-5 单剂量静脉注射15mg/kg DBDCT后六只大鼠的血锡浓度-时间曲线

Fig 1-5 Plasma tin concentration-time curve after single vena caudalis of 15mg/kg DBDCT to six rats



图1-6 单剂量静脉注射15mg/kg DBDCT后的血锡浓度-时间曲线

Fig. 1-6 curve of mean plasma tin concentration-time curve in rats after single vena caudalis of 15mg/kg DBDCT

表1-5 大鼠静脉注射15mg/kg DBDCT后血浆中的DBDCT毒代动力学参数



Table 1-5 Mean toxicokinetic parameters in rats after single 15mg/kg DBDCT injection

### 3 实验讨论

#### 3.1 采样点的选择

TK 的评价是通过某些参数来反映药物全身暴露情况，目前常用的主要参数有：血药浓度曲线下面积(AUC)、达峰浓度(Cmax)、达峰时间(tmax)、半衰期(*t1/2*)。全身暴露主要以血浆或全血中毒物或代谢物AUC表示[54, 55]，为确保AUC测定的可靠性，采样时间点应满足AUC计算要求，采样时间一般要达到3个半衰期

以上，但同一动物采样次数不宜太多。由于全身暴露反映毒物浓度和体内毒物驻留时间，所以毒物Cmax及*t1/2*或tmax等参数也有一定的参考意义。对于高蛋白结合的物质最好测定血浆毒物浓度，在某些研究中测定组织毒物浓度具有特殊意义。本实验中提示DBDCT的分布半衰期*t*1/2α为49.977min、消除半衰期*t*1/2β为1.260min，因此取样时程设计为240min符合要求。

#### 3.2 静脉注射次数的选择

TK研究是安全性评价的重要手段和常规内容，不应仅限于重复给药毒性试验。单次给药毒性试验等如能进行TK试验，将会为非临床研究评价和临床研究提供更充足的信息支持，有助于降低临床试验安全性风险，有助于缩短药物研发周期[56]。考虑到DBDCT 本身获得的难易程度，本实验选择单次静脉注射评价

DBDCT的TK参数。

### 4 小结

大鼠单次静脉注射DBDCT后，血中锡浓度随时间变化符合二室模型。按二室模型、权重为1/C/C，通过3P97模型对数据进行拟合，计算毒代动力学参数，分布半衰期*t*1/2α为49.977min、消除半衰期*t*1/2β为1.260min、表观分布容积Vc 为

8.201(μg/mL) /(mg/kg)、曲线下面积AUC为56.073(mg/kg) min、清除率Cl 为

0.297μg/mL/min/(mg/kg)。

## 三、 大鼠静脉注射DBDCT的组织分布研究

### 1 实验材料及方法

#### 1.1 材料、试剂及仪器同第一节

#### 1.2 实验动物

健康Wistar大鼠36只，体重180～220g，ft西医科大学实验动物中心提供。置于室温23±2℃，相对湿度50±10%，设定为每日12小时照明的饲养室内，自由饮食饮水。适应性饲养7日。静脉注射前禁食12h。

#### 1.3 给药方式及组织样本采集

单次尾静脉注射DBDCT 15mg/kg；分别于注射后3、10、30、60、120min及24h颈椎脱臼处死动物，迅速取出心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、小肠、脂肪、肌肉、肾上腺、胸腺等组织，置于生理盐水中洗净，滤纸吸干，称重，-20℃保存，待测。每一时间点6只动物。

#### 1.4 组织样品含量测定

按前述方法测定组织样本中锡的浓度。

#### 1.5 统计解析

−

实验结果以各组织中锡浓度的均数±标准差（x ±SD）表示，用SPSS 10.0

软件对数据进行统计分析，组间比较采用单因素ANOVA方差分析，组内比较采用SNK法。统计结果以*p*<0.05为具有统计学意义。

### 2 实验结果及结论

实验结果见表1-6及图1-7，大鼠15mg/kg单次静脉注射后，DBDCT可迅速分布到各组织，3min即可在各组织器官中检测到锡元素，但锡浓度维持时间较短，多数组织仅可在120min内检测到锡元素，120min后锡元素浓度显著下降。如图1-7所示，肾上腺中锡浓度最高，其余组织中锡浓度相似。脑组织中能检测到少量锡元素，说明DBDCT可以透过血脑屏障，分布于脑内。24h后各组织器官几乎均检测不到锡元素，说明其在主要组织器官中不易蓄积。

表1-6 单剂量静脉注射15mg/kg DBDCT后的组织锡浓度-时间数据

Table 1-6 Distribution of DBDCT in tissues at different time after injection to rats (15mg/kg,

x±s, n=6)



ND为未检测到



图1-7 单剂量静脉注射15mg/kg DBDCT后的组织锡浓度-时间柱状图

Fig. 1-7 Histogram of mean plasma tin concentration-time in rats after single 15mg/kg DBDCT injection

### 3 实验讨论

#### 3.1 组织分布行为分析

前期研究表明，单次静脉注射治疗剂量DBDCT后，DBDCT分布迅速，短时间在多个组织达到峰浓度且浓度维持时间较短，24h 后各组织器官均检测不到

DBDCT，说明其在主要组织器官中不容易蓄积[57]。本实验的结果与前期研究结果相似，说明暴露于毒性剂量下，大鼠对DBDCT的处置行为与治疗剂量是处置方式相同，且DBDCT发挥治疗作用产生生物效应的物质基础与其产生毒性的物质基础相同，都是锡元素。

#### 3.2 静脉注射次数的选择

组织分布的毒代动力学研究国际协调会议ICH三方一致认为：单剂量给药的组织分布研究应作为临床前药物安全性评价的必要组成部分[58]。在以下情况应考虑多剂量给药的组织分布研究：①在单剂量给药研究中发现药物或代谢物在器官或组织中有蓄积倾向，其组织半衰期显著超过血浆半衰期，而且是毒性试验给药时间间隔两倍时，多剂量给药的组织分布研究是必要的；②在TK研究中循环系统内药物或代谢物的稳态水平显著高于单剂量给药研究时所预测的浓度，应考虑进行多剂量的组织分布研究；③单剂量组织分布实验中，药物主要分布组织产生病理变化时，应考虑进行多剂量组织分布研究，以进一步解释毒性靶器官和组织分布的关系；④具有特异性分布的靶向释放药物，多剂量给药组织分布研究是适宜的和必要的。由于本实验中以上四种情况均未产生，因此未进行多剂量静脉注射的组织分布研究。

#### 3.3 对神经系统的影响

大量实验研究结果及临床报道表明[8-10]，中枢神经系统是有机锡抗癌化合物的主要毒性作用靶器官，本实验结果也证实大鼠暴露于单次毒性剂量后，脑组 织中可以检测到锡元素，120分钟内浓度不小于0.10μg/g，提示DBDCT可以透过血脑屏障分布于脑组织中，这为后续研究DBDCT 的神经毒性提供理论基础。

### 4 小结

从以上探讨的DBDCT 中锡在各组织中分布情况来看，可以说明以下几点：

#### 4.1 单次静脉注射毒性剂量DBDCT后，其分布迅速，但锡浓度维持时间较短，其中肾上腺中锡浓度最高，其余组织中锡浓度相似。

#### 4.2 单次静脉注射毒性剂量DBDCT 后，脑组织中能检测到少量锡元素，说明

DBDCT 可以透过血脑屏障，分布于脑内。

#### 4.3 单次静脉注射毒性剂量DBDCT 24h后各组织器官几乎均检测不到锡元素，说明其在主要组织器官中不易蓄积。

## 四、 本章小结

本章建立了原子荧光光谱法测定生物样本中锡元素含量的方法，并检测了

DBDCT单次毒性剂量静脉注射后TK参数及组织分布情况，确定了DBDCT的毒性靶器官，为下一步研究毒性产生的机制提供理论依据。

# **第二章 DBDCT**在大鼠体内神经毒性研究

引 言

大量文献资料表明，有机锡类化合物的使用在给人类带来经济效益的同时，也产生了巨大的负面效应，其主要对神经系统[15, 17, 18, 59-63]、免疫系统[64-66]、生殖系统[67-75]、内分泌系统[76]、消化系统[77, 78]、血液系统[79]及粘膜[80]等多个方面产生不良影响，其中影响最为严重和明确的是神经系统和生殖系统。诸多体内试验研究结果表明，有机锡类化合物能够增加血脑屏障通透性[81]进入中枢神经系统，产生激动、攻击行为、癫痈及低血钾症等多种临床症状，并可致死，还可能导致动物学习能力下降、记忆能力缺失、神经细胞死亡等严重后果。DBDCT 作为典型的R2SnCL2型有机锡类化合物，研究其对神经系统机能的影响是十分必要的。

前期研究证实DBDCT可以透过血脑屏障，单次静脉注射DBDCT后原子荧光光谱法发现脑组织中可检测出锡元素，但24小时后基本无残留；长期毒性试验结果显示长期静脉注射给药后，受试动物出现摄食减少、精神欠佳、运动失调等症状，提示其可能有神经损伤副作用。本章拟以大鼠为实验对象，多次静脉注射染毒，研究DBDCT在整体动物实验中对体重、血清及组织中生化指标是否产生影响变化；同时通过TUNEL及Western blot法从分子水平探讨DBDCT是否产生神经毒性以及初步探讨可能的机制。

### 1 实验材料及方法

#### 1.1 材料、试剂及配制

##### 1.1.1 材料与试剂

DBDCT（由本课题组合成，3次重结晶，纯度≥99％，20100709）；血及组织生化指标检测试剂盒（南京建成生物工程研究所）；原位细胞凋亡检测试剂盒

TUNEL（天津市灏洋生物制品科技有限责任公司）；Western及IP细胞裂解液（海门碧云天生物技术有限公司）；BCA 蛋白定量试剂盒（北京普利莱基因技术有限公司）；兔抗caspase-3多克隆抗体、小鼠抗caspase-9多克隆抗体（cell signaling

technology公司）；兔抗Bax多克隆抗体及兔抗Bcl-2多克隆抗体（abcam公司）；兔/小鼠抗β-actin抗体，HRP标记ft羊抗兔/小鼠二抗，ECL试剂盒，显影液，定影液（北京康为世纪生物科技有限公司）；蛋白Marker（Ferments公司）；蛋白酶抑制剂（PMSF）、磷酸酶抑制剂、30%丙烯酰胺溶液、过硫酸铵（APS）、TrisBase、甘氨酸（Gly）、β-巯基乙醇、溴酚蓝、SDS、Tween-20均购自北京索莱宝科技有限公司；其它试剂均为分析纯，水为超纯水。

##### 1.1.2 常用溶液的配制

（1）溶剂：1, 2-丙二醇9.0 mL +乙二胺0.2 mL，以生理盐水混匀并定容至10 mL。

（2）DBDCT注射液：30.0 mg DBDCT加入上述溶剂中，室温下超声至溶液澄清，用0.22μm微孔滤膜过滤得终浓度3 mg/mL。临用前以生理盐水按体积比

1: 3稀释，现用现配。测定3批样品的pH值范围在7.0~7.5间，满足静脉注射要求。

##### 1.1.3 实验仪器

752紫外可见分光光度计（上海精密科学仪器有限公司）；低速冷冻离心机DL-SM（长沙湘仪有限公司，长沙）；旋涡混合器（XW-SOA，上海）；光学倒置显微镜（OPTEC BDS200-PH，重庆奥特光学仪器有限责任公司）；超声破碎仪

（sonics﹠Materials, NT, USA）；电泳仪（ProwerPac Basic, Bio-Rad公司）；半干转膜槽（Bio-Rad公司）；Heal Force HF super pw 超纯水系统（力康生物医疗科技集团）

#### 1.2 实验动物、分组及染毒方式

健康Wistar大鼠24只，雌雄各半，体重220～250g，ft西医科大学实验动物中心提供。置于室温23±2℃，相对湿度50±10%，设定为每日12小时照明的饲养室内，自由饮食饮水。适应性饲养7日。将动物随机分成三组，每组8 只

（雌雄各半），分别为正常对照组、溶剂对照组及5mg/kg DBDCT染毒组。尾静脉注射，间隔两天注射一次，持续30天，共注射10次。期间每周称体重一次

共5次观察动物体重变化。

#### 1.3 实验方法

##### 1.3.1 多次注射DBDCT对大鼠血生化指标的影响

最后一次注射1小时后将动物乙醚麻醉，股动脉采血5mL，静置，5000r/min离心10min分离血清，按试剂盒说明书，用紫外可见分光光度计测定以下生化指标：谷草转氨酶（AST）、谷丙转氨酶（ALT）、碱性磷酸酶（ALP）、谷氨酰转肽酶（GGT）、总胆红素（STB）、尿素氮（BUN）、肌酐（CRE）。

##### 1.3.2 多次注射DBDCT对大鼠脑组织生化指标的影响

多次注射DBDCT后实验动物股动脉放血处死，取部分脑组织匀浆，按试剂盒说明书，用紫外可见分光光度计测定其中丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶

（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）的活力等。

##### 1.3.3 多次注射DBDCT 后对大鼠主要组织脏器病理学改变的影响

多次注射DBDCT后实验动物股动脉放血处死，取脑、心、肝、脾、肺、肾、胸腺、生殖器等组织用12%甲醛溶液固定，依次经取材、脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色，最后通过光学显微镜检查病理形态学改变。

##### 1.3.4 TUNEL 法检测大鼠多次给药后脑组织凋亡情况

多次注射DBDCT后实验动物股动脉放血处死，取出脑组织固定后石蜡包埋、切片，取一组切片，按试剂盒说明书进行标记及荧光信号转化，封片，在光镜下分析结果。在40倍光学显微镜下随机选择4个视野，计数TUNEL阳性神经元细胞，以凋亡指数（apoptosis index, AI）来反映各组动物神经元细胞凋亡的状况，其中AI =视野内凋亡细胞个数/视野内所有神经细胞×100 %。

##### 1.3.5 蛋白印迹（Western blot）检测大鼠多次注射染毒后脑组织凋亡相关蛋白的表达

###### 1.3.5.1 脑组织总蛋白的提取

多次注射DBDCT后实验动物股动脉放血处死，取出脑组织，冰上小心剥去外膜，尽可能除掉血管，预冷生理盐水中洗涤2-3次，吸水纸吸干水分，以1mg脑组织：4μL裂解液（含1%蛋白酶抑制剂及1%磷酸酶抑制剂）的比例取适量脑组织，加入裂解液后于冰上超声裂解，收集匀浆液，12000rpm、4℃离心10min，取上清液，用BCA法测定蛋白浓度后-80℃保存，进行Western blot分析。

###### 1.3.5.2 Western blot实验

按照《分子克隆》所述的方法进行Western blot分析，检测大鼠脑组织Bax、Bcl-2、caspase-9及caspase-3蛋白表达情况。实验步骤包括SDS-PAGE电泳、转膜、封闭、免疫反应、化学发光、显影、定影。

###### 1.3.5.3 Western blot结果判定

目的蛋白电泳条带用adobe photoshop7.0分析软件计算灰度值，与再生后同一张膜的β-actin 蛋白灰度值相比，用相对蛋白质水平（目的蛋白灰度/β-actin 灰度）作直方图进行半定量分析。

##### 1.3.6 统计方法

−

实验结果以均数±标准差（x ±SD）表示，用SPSS 10.0软件对数据进行

统计分析，组间比较采用单因素ANOVA方差分析，组内比较采用SNK法。统计结果以*p*<0.05为具有统计学意义。

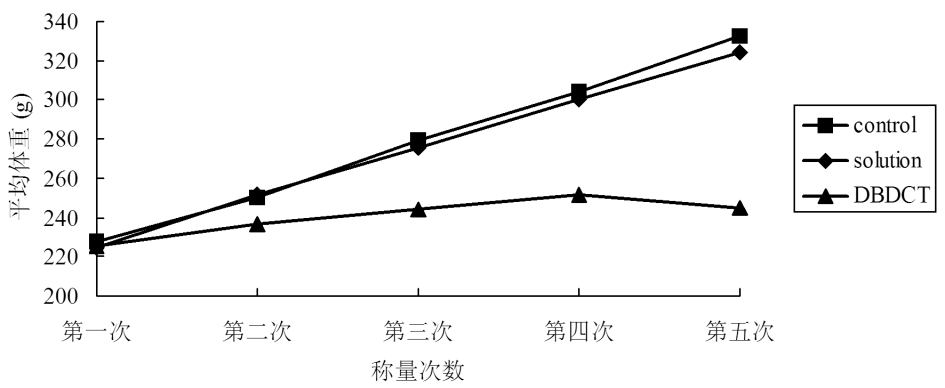
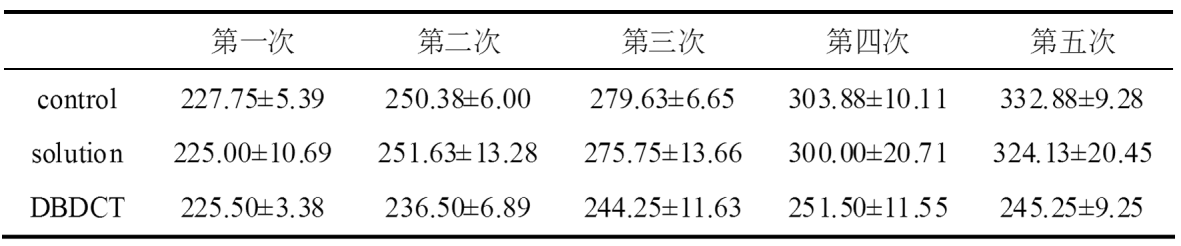
### 2 实验结果及结论

#### 2.1 多次注射DBDCT对大鼠体重及一般生长发育的影响

大鼠尾静脉注射给予DBDCT，间隔两天注射一次，持续30天，共10次。

期间每周称体重一次共5次，观察记录动物体重变化，结果显示实验期间正常对照组及溶剂对照组大鼠体重均呈增长趋势，两组间无显著差异，而DBDCT染毒组与正常对照组相比前三周体重虽有增加，但增长缓慢，而最后一次测量称重时DBDCT染毒组动物体重不增反降，与正常对照组及溶剂对照组比较有极显著差异。结果如下表2-1、图2-1。

表2-1 大鼠多次静脉注射DBDCT体重的改变



Tab. 2-1 the changes of body weight after repeatedly intravenous injection of DBDCT in rats

图2-1 大鼠多次静脉注射DBDCT体重的改变

Fig. 2-1 the changes of body weights after repeatedly intravenous injection of DBDCT in rats

#### 2.2 多次注射DBDCT对大鼠血生化指标的影响

大鼠多次静脉注射DBDCT后采血，用紫外可见分光光度计测定血清中多项生化指标，实验结果显示溶剂对照组与正常对照组相比，各项指标均未发生显著变化（*p*> 0.05），提示溶剂本身对动物无不良影响；而DBDCT染毒组与正常对照组相比，AST、ALT、ALP、GGT及STB均显著升高（*p*<0.01）；同时与正常对照组相比，DBDCT染毒组BUN及CRE也均显著升高（*p*<0.01）。结果详见表2-2及图2-2。

表2-2 大鼠多次静脉注射DBDCT血生化指标的改变

Tab. 2-2 the changes of biochemical parameters in serum after repeatedly intravenous injection of DBDCT in rats



\*\* *p*<0.01 VS control group



图2-2 大鼠多次静脉注射DBDCT血生化指标的改变

Fig. 2-2 the changes of biochemical parameters in serum after repeatedly intravenous injection of DBDCT in rats

#### 2.3 多次注射DBDCT对大鼠脑组织生化指标的影响

大鼠多次静脉注射DBDCT后取部分脑组织匀浆后，用紫外可见分光光度计测定其中多项生化指标，实验结果显示溶剂对照组与正常对照组相比，各项指标均未发生显著变化（*p*> 0.05），提示溶剂本身对动物无不良影响；而DBDCT染毒组与正常对照组相比，SOD及GSH-Px显著降低（*p*<0.01），反之MDA显著增高（*p*<0.01）。结果详见表2-3及图2-3。

表2-3 大鼠多次静脉注射DBDCT脑组织生化指标的改变

Tab. 2-3 the changes of biochemical parameters in brains after repeatedly intravenous injection of DBDCT in rats



\*\* *p*<0.01 VS control group



图2-3 大鼠多次静脉注射DBDCT脑组织生化指标的改变

Fig. 2-3 the changes of biochemical parameters in brains after repeatedly intravenous injection of DBDCT in rats

#### 2.4 多次静脉注射DBDCT 后对大鼠主要组织脏器病理学改变的影响

大鼠注射DBDCT过程中观察到DBDCT染毒组多数动物出现被毛蓬松、背部及双耳黄染，小便赤黄，体重逐渐减轻且出现腹水等现象，实验结束后处死动物，解剖后发现给DBDCT染毒组动物全部出现皮下、腹腔、脂肪及肠道黄染，多数肝脏出现弥散性点状黄斑。HE染色后光学显微镜下观察发现，DBDCT 染毒组动物肝脏均被膜增厚，部分出现肝细胞嗜酸性变，核固缩等病理改变，部分脑组织也出现神经细胞结节状增生及皮质部分神经细胞变性等病理改变，而溶剂对照组无这些病理改变出现。结果详见图 2-4。



图2-4 多次静脉注射DBDCT后肝脏（×10）及脑（×40）的病理变化

Fig 2-4 the pathological changes of the liver and brain after repeatedly intravenous injection of DBDCT in rats

#### 2.5 TUNEL 法检测大鼠多次给药后脑组织凋亡情况

TUNEL 染色后，阳性产物为细胞核中有棕黄色颗粒，着色深且细胞界限不清。大鼠多次静脉注射DBDCT后进行TUNEL染色，光学显微镜下可见正常对照组及溶剂对照组脑组织细胞核几乎无着色，而DBDCT染毒组大鼠大脑皮质中的细胞核大量呈现圆形和不规则形，棕染且着色深。统计后显示溶剂对照组与正常对照组AI无显著差异，而DBDCT染毒组与正常对照组比较AI明显增高，表现出极显著差异。结果见表2-4及图2-5、2-6。

−

表2-4 多次静脉注射DBDCT后大鼠脑组织凋亡指数的变化( x±s，n=4)

−



Table 2-4 The change of AI induced by DBDCT in brain*in vivo* ( x±s，n=4)

\*\* *p*<0.01 VS control group



图2-5 多次静脉注射DBDCT后大鼠脑组织凋亡指数的变化

Fig 2-5 the change of AI induced by DBDCT in brain *in vivo*



图2-6 多次静脉注射DBDCT后大鼠脑组织凋亡程度（TUNEL检测）(400×)

Fig 2-6 the degree of apoptosis induced by DBDCT in brain *in vivo* (the TUNEL assay) (400×)

#### 2.6 蛋白印迹（Western blot）检测大鼠多次给药后脑组织凋亡相关蛋白的表达采用Western blot方法检测DBDCT对多次静脉注射后大鼠脑组织凋亡相关

蛋白表达水平的影响，以同一张膜再生后的β-actin 为内参，用相对蛋白质水平进行半定量分析。分析结果显示，与空白对照组相比：①溶剂对照组Bax及Bcl-2的表达均未发生明显改变，而DBDCT染毒组蛋白Bax表达增加，蛋白Bcl-2 的

表达显著减少，Bax/Bcl-2比值从0.767上升至2.842；②溶剂对照组未明显表达出剪切的caspase-3及caspase-9，而DBDCT染毒组蛋白caspase-3及caspase-9出现显著地剪切条带。结果见表2-5及图2-7、2-8.

表2-5 多次静脉注射DBDCT后大鼠脑组织凋亡相关蛋白表达的变化



Table 2-5 Effect of DBDCT on the expressions of apoptosis associated proteins in the rat brains.

\*\* *p*<0.01 VS control group.



图2-7 多次静脉注射DBDCT后大鼠脑组织凋亡相关蛋白表达的变化

Fig. 2-7 Effect of DBDCT on the expressions of apoptosis associated proteins in the rat brains.



图2-8 多次静脉注射DBDCT后大鼠脑组织凋亡相关蛋白表达的变化的柱状图

Fig. 2-8 the histograms of DBDCT on the expressions of apoptosis associated proteins in the rat brains.

### 3 实验讨论

#### 3.1 给药剂量及给药时间的确定

前期实验证实DBDCT对小鼠静脉注射的LD50为21. l mg/kg，按《药理实验方法学》指导一般的给药量不超过LD50的1/10，则小鼠的最大给药剂量为2.11

mg/kg，按体表面积法计算大鼠的最大给药剂量则为4.22 mg/kg。为了便于溶液的配制，同时确保DBDCT多次静脉注射后出现毒性反应，将染毒剂量确定为 5

mg/kg。预实验中显示大鼠隔两天静脉注射一次，若稍有不慎导致药物漏出尾静脉，则对皮肤产生严重腐蚀，导致大鼠尾巴红肿、黑紫甚至断尾等现象，且注射超过10 次大量动物死亡，因此正式试验时将染毒周期设定为隔两天静脉注射

一次，共10次。

#### 3.2 血生化指标改变的意义

谷草转氨酶（AST）是转氨酶中比较重要的一种，它是医学临床上肝功能检查的指标，用来判断肝脏是否受到损害；谷丙转氨酶（ALT）也是转氨酶中比较重要的一种，血清中ALT的升高是肝脏功能出现问题的一个重要指标；碱性磷酸酶（ALP）主要用于阻塞性黄疸、原发性肝癌、继发性肝癌、胆汁淤积性肝炎等的检查，肝脏功能受损会导致其血清含量的病理性升高[82-84]；谷酰转肽酶

（GGT）存在于体能多个脏器中，肾脏内最多，其次是胰腺和肝脏，正常人血清中GGT主要来自肝脏，当肝脏受损时GGT明显升高；总胆红素（STB）是直接胆红素和间接胆红素二者的总和，总胆红素升高就是人们常说的黄疸，也是肝脏功能受损的检测指标之一[85]。以上这些指标均反映肝脏功能是否正常，而本实验结果显示多次静脉注射DBDCT后AST、ALT、ALP、GGT及STB均显著升高，证实肝脏是DBDCT的毒性靶器官之一，这与文献报道的有机锡类化合物主要影响消化系统相吻合。

血尿素氮（BUN）是评价肾功能的主要指标之一，血清中BUN含量增高提示器质性肾功能损害；肌酐（CRE）是肌肉在人体内代谢的产物，主要由肾小球滤过排出体外，临床上CRE也是评价肾功能的主要指标之一，其值高出正常值多数意味肾脏受损[86-88]。本实验结果显示多次静脉注射DBDCT后BUN和CRE均显著升高，提示DBDCT有较强的肾脏毒性。

综上所述，大量长期使用DBDCT可以对肝脏及肾脏的多项生化指标产生严重影响，这与众多文献报道的有机锡类金属化合物毒性靶器官相符，也与前期研究显示的DBDCT的组织分布相吻合。

#### 3.3 脑组织生化指标改变的意义

自由基是机体氧化反应中产生的有害化合物，具有强氧化性和细胞毒性，可使脂质过氧化，损伤细胞膜，引起炎症、肿瘤及自身免疫性疾病，并可能促使机体衰老，其在生理条件下浓度很低，而且能不断被机体的自由基清除体系所清除。生物体内存在完整的抗氧化系统，用以清除体内多余的自由基，这一系统包括VE、谷胱甘肽、VC、NO、超氧化物歧化酶（SOD），过氧化氢酶（CAT）及谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）等。

生物体抗氧化的效果或氧化损伤的程度是可以量化测定的，作为动物实验一般是测定酯质过氧化产物丙二醛（MDA）变化、以及SOD和GSH-Px的活力变化。通过上述两种酶和MDA的变化状况来判定抗氧化的效果或氧化损伤的强度。近年来有研究表明，有机锡类化合物能够引起生物机体氧化应激，导致脂质过氧化，造成组织损伤。SOD 是生物体内重要的抗氧化酶，广泛分布于各种生物体内，是生物体内清除自由基的首要物质，其活力变化可以反映机体抵抗自由基的能力；MDA 是多不饱和脂肪酸脂质过氧化的副产物，其水平反映细胞损伤的程度，是机体氧化应激水平的评估指标，当机体抗氧化系统遭破坏时，自由基产生与消除的动态平衡被打破，大量自由基无法消除，而自由基产生过多及其引发的脂质过氧化反应增高，是引起SOD、MDA变化的主要原因；GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶，它特异地催化还原型谷胱甘肽对过氧化氢的还原反应，从而起到保护细胞膜结构和功能完整的作用，是机体抗过氧化能力的指标之一[89-91]。

实验结果显示，与正常对照组相比，多次静脉注射DBDCT后SOD及GSH-Px显著降低而MDA水平明显增高，说明DBDCT可以使大鼠脑组织抗氧化酶活性降低，氧自由基生成增多，脂质过氧化产物生成增加，从而造成脑组织细胞的损害，证实脑组织也是DBDCT 的毒性靶器官之一，这也与大量文献资料及前期

组织分布研究相吻合。

#### 3.4 大鼠体重及主要组织脏器病理学改变的意义

体重的变化可以反映动物生长发育的一般状况。DBDCT 染毒后大鼠体重增加明显放缓，且随着染毒时间的延长，体重的增长幅度与正常对照组比较越发缓慢，表明DBDCT显著影响大鼠体重增长。

在静脉注射染毒过程中对实验动物的体貌特征进行逐日观察，发现正常对照组及溶剂对照组大鼠实验动物状况良好，而DBDCT染毒组多数动物逐渐观察到出现被毛蓬松、背部及双耳黄染，小便赤黄，体重逐渐减轻甚至腹水等现象，实验结束后处死动物，解剖后发现DBDCT染毒组动物全部出现皮下、腹腔、脂肪及肠道黄染，多数肝脏出现弥散性点状黄斑。将动物的主要脏器固定后进行

HE染色，结果发现，DBDCT 染毒组动物肝脏均被膜增厚，部分出现肝细胞嗜酸性变，核固缩等病理改变，部分脑组织也出现神经细胞结节状增生及皮质部分神经细胞变性等病理改变，而溶剂对照组无这些病理改变出现。其它脏器未出现显著地病理改变，这与文献报道有机锡类化合物的主要毒性靶器官是消化系统及神经系统相吻合。

#### 3.5 TUNEL的原理及意义

TUNEL（terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay）即原位末端转移酶标记技术。细胞发生凋亡时，一些DNA内切酶被激活，切断核小体间的基因组DNA，暴露出的3’-OH可以在末端脱氧核苷酸转移酶（Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT）的催化下，与脱氧核糖核苷酸和荧光素（FITC）标记的dUTP（fluorescein-dUTP）形成的衍生物结合标记，从而可以通过荧光显微镜或流式细胞仪对细胞的凋亡情况进行检测。而标记的荧光素用来自羊标记的辣根过氧化物酶（POD）的Fab段抗体识别，酶底物显色后，则可用光镜检查被染色的细胞[92-95]。

近年来TUNEL技术广泛用于细胞凋亡的研究，其优势在于灵敏度高、快速、优先标记发生凋亡的细胞，而不是坏死的细胞，且在细胞凋亡早期即可在细胞水平上进行检测，是一种用于检测细胞凋亡的敏感技术。本文采用TUNEL 技术

检测多次静脉注射后大鼠脑组织经石蜡包埋后的切片，光学显微镜下观察结果显示正常对照组及溶剂对照组脑组织细胞核几乎无着色，而DBDCT染毒组大鼠大脑皮质中的细胞核大量呈现圆形和不规则形，棕染且着色深——这是TUNEL阳性产物的典型特征。统计后显示正常对照组AI为8.26±1.25%，而DBDCT染毒组AI增加至30.3±1.94%，表现出极显著差异，说明多次静脉注射较大剂量DBDCT 可以导致脑组织细胞凋亡，这可能是其产生神经毒性的机制之一。

#### 3.6 Western blot结果分析

细胞程序化死亡或称凋亡是真核细胞死亡的最常见的形式，它是细胞维持自稳状态而具有的一种生理性自杀机制，是发生于正常细胞的一种正常死亡。不同于细胞坏死，细胞凋亡是主动过程，它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的作用，它并非病理条件下自体损伤的一种现象，而是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程。凋亡中细胞的细胞核及胞浆会产生诸如核膜皱缩、细胞核崩解这样的特征性变化。凋亡机制的调节失衡在许多病理条件下起很重要的作用，如出血、中风、心脏病、癌症、爱滋病、自身免疫缺损和中枢神经系统的退行性变等。

细胞凋亡的过程大致可分为以下几个阶段：接受凋亡信号→凋亡调控分子间的相互作用→蛋白水解酶的活化（caspase）→进入连续反应过程。凋亡调控分子包括一系列原癌基因和抑制癌基因的产生，其中Bcl-2家族起着决定性的作用。B淋巴细胞瘤-2基因，简称Bcl-2（B-cell lymphoma-2），是细胞凋亡研究中最受重视的癌基因家族之一。这一家族成员众多，如Mcl-1、NR-B、A1、Bcl-w、Bcl-x、Bax、Bak、Bad、Bim 等，它们有的有抗凋亡作用，有的起到促凋亡的作用。Bcl-2 可以抑制由多种细胞毒因素所引起的细胞凋亡，可以通过阻止线粒体Cyt-*c*的释放而发挥抗凋亡作用。同时Bcl-2的过度表达可引起细胞核谷胱苷肽（GSH）的积聚，导致核内氧化还原平衡的改变，从而降低了caspase的活性；而Bax是Bcl-2家族中促细胞凋亡的一个成员，Bax的过度表达可以使凋亡细胞明显增多。Bcl-2可与Bax形成二聚体，如果Bax相对量高于Bcl-2，则Bax同二聚体的数量增多，从而促进细胞凋亡；而如果Bcl-2 相对量高于Bax，则促进

形成Bcl-2/Bax异二聚体，并使Bcl-2同二聚体的量增多，从而抑制细胞凋亡。凋亡过程的详细机制尚未完全清楚，但已确定caspase 即半胱天冬蛋白酶在

凋亡过程中起着必不可少的作用，细胞凋亡的过程实际上是caspase不可逆有限水解底物的级联放大反应过程。线粒体是细胞生命活动控制中心，它不仅是细胞呼吸链和氧化磷酸化的中心，同时也是细胞凋亡调控中心。实验表明了Cyt-*c*从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤。释放到细胞浆的Cyt-*c*在dATP存在的条件下能与凋亡相关因子1（Apaf-1）结合，形成多聚体，并促使caspase-9与其结合形成凋亡体（apoptosome），使前体pro-caspase-9被激活成caspase-9，从而进一步激活其它的caspase如caspase-3，使其活化成剪切的caspase-3，从而诱导细胞产生凋亡。

蛋白质印迹法（Western blot）是尼尔・伯奈特（Neal Burnette）1981年在其所著的《分析生物化学》（Analytical Biochemistry）中首次命名的。其基本原理是通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的细胞或生物组织的蛋白样品进行着色，通过分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中的表达情况的信息。

本实验采用Western blot技术检测DBDCT对多次静脉注射后大鼠脑组织凋亡相关蛋白表达水平的影响，以同一张膜再生后的β-actin 为内参，用相对蛋白质水平进行半定量分析。试验结果显示，与空白对照组相比，溶剂对照组各蛋白的表达均未发生显著改变，提示溶剂对脑组织没有毒性作用，这与上述组织生化指标的变化相吻合；而DBDCT染毒组蛋白Bax表达增加，蛋白Bcl-2的表达显著减少，Bax/Bcl-2比值从0.767上升至2.842；同时多次静脉注射后的

DBDCT染毒组大鼠脑组织蛋白caspase-3及caspase-9均出现显著地剪切条带。这些结果均明确表示DBDCT多次注射可以诱导大鼠脑组织细胞凋亡，其对实验动物产生神经毒性是部分的通过诱导神经细胞凋亡导致的。

### 4 本章小结

本章以大鼠为实验对象，研究多次静脉注射染毒后DBDCT在整体动物的影响，具体可归纳为一下几点：

4.1 DBDCT 影响大鼠体重增长和一般生长发育；

4.2 DBDCT 改变大鼠血清中多种生化指标，表现出显著地肝脏及肾脏毒性；

4.3 DBDCT 降低大鼠脑组织中抗氧化系统的活性，增强脑组织脂质过氧化反应对神经系统造成损伤；

4.4 DBDCT 能够引起肝脏及脑组织病理损伤；

4.5 DBDCT 改变脑内多种凋亡相关蛋白的表达；

综上所述，DBDCT 在一定程度上通过诱导神经细胞凋亡对大鼠脑组织神经系统造成损害。

# **第三章 DBDCT**诱导**PC12**细胞凋亡的机制研究

引言

细胞凋亡（Apoptosis）是指细胞在一定生理和病理条件下，为维护内环境稳定或满足器官与组织构建的需要而自主死亡的过程[96]，它是一个高度有序的，由基因调控、一系列酶参与的主动的细胞死亡过程，细胞凋亡的同时伴有一系列特定的形态学和生化改变。细胞凋亡的信号传导途径较复杂，涉及多类蛋白的参与，自从1972年澳大利亚学者Kerr第一次提出细胞凋亡的概念[97]后，研究者们对细胞凋亡发生的途径展开了深入研究，目前己明确细胞凋亡主要通过线粒体途径、死亡受体途径及内质网应激途径三条途径发生[98, 99]。由于细胞凋亡的紊乱与众多疾病的发生密不可分，因此对细胞凋亡机制的研究一直是生命科学领域的热点之一。

大量实验研究结果表明，有机锡类化合物对神经系统有明显的毒副作用，如代表化合物TBT不但能使生物体神经系统在分子和细胞水平发生改变[100, 107]，也能影响神经递质[67, 102, 103]，甚至对动物的行为产生影响[104-106]。本文前面的实验中明确指出作为典型的R2SnCL2型有机锡化合物，DBDCT有明显的神经毒性，且整体动物水平DBDCT神经毒性是部分的通过诱导大鼠脑组织细胞凋亡产生的，本章拟采用PC12细胞为体外研究对象，通过MTT法测定对细胞存活率的影响；显微镜观察细胞形态的变化；流式细胞仪分析细胞凋亡情况及细胞周期变化；琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡的特异性条带；RT-PCR 检测凋亡相关基因的变化，以期揭示DBDCT对PC12细胞毒性作用的可能原因是由诱导细胞凋亡所致；通过测定caspase-3、caspase-8、caspase-9活性、△Ψm、ROS水平及多种信号蛋白的表达变化进一步阐释DBDCT诱导PC12细胞凋亡的信号通路，探讨

DBDCT 在体外产生神经毒性的作用机制。

## 一、 DBDCT对PC12细胞的损伤作用及机制研究

### 1 实验材料及方法

#### 1.1 材料与试剂

##### 1.1.1 细胞培养及检测相关试剂

DBDCT（由本课题组合成，3次重结晶，纯度≥99％，20100709）；大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞PC12（武汉博士德生物工程有限公司）；胎牛血清（武汉博士德生物工程有限公司）；高糖DMEM（赛默飞世尔生物化学制品有限公司）；青链霉素混合液，（含青霉素10000 U·mL-1，链霉素10000µg・mL-1）、0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液、二甲基亚砜DMSO（细胞级）、MTT、吖啶橙（AO）、溴化乙锭（EB）（北京索莱宝科技有限公司）；Hoechst 33258荧光染料（海门碧云天生物技术有限公司）；细胞DNA含量检测试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、PI单染细胞周期检测试剂盒（南京凯基生物科技发展有限公司）；反转录试剂盒（Fermentas 公司）；RT-PCR试剂盒（Roche 公司）；caspase-3、caspase-8、caspase-9、Fas、FasL、NF-κB、Cyt-*c*及β-actin引物由生工生物工程（上海）有 限公司合成；戊二醛、锇酸、乙醇、EPon812环氧树脂、醋酸铀、柠檬酸铅及其他试剂均为分析纯。

##### 1.1.2 常用溶液配制

（1）DBDCT：精密称量1.3 mg DBDCT，溶解于1mL甲醇中配制成终浓度为2400μM的母液，4℃保存，用时用DMEM高糖完全培养基稀释成所需浓度；

（2）1× 磷酸盐缓冲液PBS(0.01 M)：NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g，Na2HPO4·12H2O

3.64 g, KH2PO4 0.24 g，溶于去离子水定容至1.0 L。高温灭菌，4℃保存。

（3）MTT溶液：50 mg MTT溶于10.0 mL 0.01M PBS液中，用0.22μm微孔滤膜过滤除菌，制成5 mg·mL-1的MTT/PBS溶液。

（4）AO储备液及EB储备液：分别取20mg AO或EB，溶于100 mL PBS

液中，pH4.8-6.0，过滤，4℃避光保存。

（5）AO/EB混合液：AO及EB储备液等体积混匀，现配现用。

#### 1.2 实验仪器

立式压力蒸汽灭菌器（上海博迅实业有限公司医疗设备厂）；101-1型电热鼓风干燥箱（北京科伟永兴仪器有限公司）；HF Super PW系列超纯水系统（上海康雷分析仪器有限公司）；垂直洁净工作台（上海博迅实业有限公司医疗设备

厂）；电热恒温水浴锅（北京科伟永兴仪器有限公司）；超低温冰箱（Model 702，

thermo）；二氧化碳培养箱（Heal Force HP90，上海力申科学仪器有限公司）；全自动酶标仪（Model 680, MICROPLATE READER, Bio-Rad公司）；光学倒置显微镜（OPTEC BDS200-PH，重庆奥特光学仪器有限责任公司）；荧光显微镜

（Olympus BX-51）；透射电镜（JEDL JEM-1011 ELECTRON MICROSCOPE）；台式低速离心机（TD5A-WS，长沙湘仪离心机仪器有限公司）；流式细胞仪

（FACSCalibur, 美国BD公司）；RT-PCR仪（TL-988，西安天隆科技有限公司）；

#### 1.3 实验方法

##### 1.3.1 细胞培养

PC12细胞于含10%灭活胎牛血清，1%的双抗（100 U·mL-1青霉素及100

µg・mL-1链霉素）的DMEM高糖培养基中，恒温二氧化碳培养箱（37℃, 5%CO2）中培养，0.25%胰蛋白酶消化传代。

##### 1.3.2 MTT试验检测DBDCT对细胞存活率的影响

取对数生长期的PC12细胞，经胰酶消化后计数，调整细胞的密度为5×104个/mL，以100μL/孔接种于96孔板，分别设对照组（完全培养基组及1%甲醇溶剂组）和不同浓度实验组（0.5、1、2、3、4、6、8、10μM），每一浓度设6个平行孔，同时设无细胞的培养液孔（调零孔）。37℃，5﹪二氧化碳培养箱中染毒24h、48h、72h后，取出培养板，每孔加入MTT 20μL后，37℃继续孵育4h，弃去培养液，每孔加入DMSO 100μL，振荡使蓝紫色结晶完全溶解，全自动酶标仪490nm处测定每孔的吸光度。

按以下公式计算神经细胞抑制率：

细胞抑制率（%）= 对照组*OD*值−实验组*OD*值×100%

对照组*OD*值

按以下公式计算DBDCT对神经细胞抑制作用的IC50值：

㏒IC50 = Xm-I [ P-( 3-Pm-Pn) /4], 其中：

Xm = ㏒最大剂量；I = ㏒（最大剂量/相临剂量）；P= 阳性反应率之和；Pm =

最大阳性反应率；Pn =最小阳性反应率

##### 1.3.3 形态学观察

###### 1.3.3.1 光镜观察细胞形态变化

对照组细胞和经不同浓度DBDCT染毒组细胞，置于光学倒置显微镜下，观察细胞形态变化。

###### 1.3.3.2 荧光染色法观察细胞形态变化

1.3.3.2.1 AO/EB 染色观察细胞形态变化

常规培养细胞，细胞长满后，经胰酶消化后计数，按所需浓度稀释，取2块6孔板每孔各加一盖玻片再加2mL细胞悬液，恒温细胞培养箱（37℃, 5%CO2）中培养24h后弃去培养基换成加药培养基，药物浓度分别为0、0.25、1和4µM，每孔2mL，每个浓度设置3个复孔。恒温细胞培养箱（37℃, 5%CO2）中培养24h后，弃去培养基，用PBS清洗，弃去PBS，每孔加5μL AO/EB混合液，1mL培养基保护细胞，10 秒后取出盖玻片用吸水纸吸干液体，加一滴丙三醇，盖于载玻片，荧光显微镜下观察、拍照。

1.3.3.2.2 Hoechst33258 荧光染色观察细胞形态变化

细胞以3 x l05个/孔接种于6孔板，培养24h贴壁后，分别加入0.25、1 和

4µM浓度的DBDCT，对照组加入相同体积的正常培养基，染毒时间为24h。处理结束后，弃去培养液，以4%多聚甲醛磷酸缓冲液固定细胞30min, PBS清洗

3次，加入终浓度为5µg/mL的Hoechst33258染色液，37℃避光染色10-15min，荧光显微镜下观察细胞形态变化。

###### 1.3.3.3 透射电镜观察细胞形态变化

PC12细胞经不同浓度DBDCT处理后，以0.25%的胰酶消化，600 rpm离心

5min，弃上清（细胞碎片），再用PBS清洗，2000 rpm离心10min使细胞成团，弃上清，小心贴壁缓慢加入2.5%戊二醛固定液4℃固定1h，取出细胞团于2.5%戊二醛固定液中继续4℃固定1h，置于缓冲液中保存。制片前用1%锇酸（OsO4）固定1.5h，乙醇或丙酮梯度脱水，EPon812环氧树脂包埋，超薄切片机切片，醋酸铀和柠檬酸铅双重染色，透射电镜下观察细胞的超微结构特征。

##### 1.3.4 Annexin V-FITC双染检测细胞凋亡情况

PC12细胞用不同浓度的DBDCT染毒不同时间后，用0.25%的胰酶消化，冷

PBS清洗两次，1×binding buffer悬浮，调整细胞密度为1×106个/mL，取100mL细胞悬浮液于5 mL流式管，加入5μL Annexin V-FITC试剂和5μL PI，轻轻震摇，室温（25ºC）避光孵育15 min，每管加入400μL的1×binding buffer，1小时内采用流式细胞仪检测细胞的凋亡率。每样平行测定3次。将所得数据采用专用软件Cell Quest进行收集、储存和分析。

##### 1.3.5 细胞DNA抽提及琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡情况

PC12细胞用不同浓度DBDCT染毒不同时间后，分别收集细胞（3×105～

1×107）于离心管中，1000rpm，离心5分钟，弃上清，PBS洗两次。加细胞核裂解液500μL重悬细胞，50℃水浴，3～5小时，37℃过夜。加0.5mL平衡酚抽提，上下颠倒混匀，10, 000 rpm离心5分钟。上清移至Eppendorf管中，加0.5mL氯仿：异戊醇抽提，10000rpm离心5分钟。上清移至新Eppendorf管中，加50μL

3mol/L 乙酸钠和1mol/L 预冷的无水乙醇，上下颠倒混匀，可见白色絮状沉淀物。

-80℃放置10分钟。12000rpm，离心10分钟沉淀DNA，弃上清，70%乙醇溶液洗一次，真空抽干或倒置晾干残存液体，加100μL TE溶解，加5μL RNase，37℃水浴15分钟，用乙醇沉淀溶液一次，再加50μL TE溶解。取1.5g琼脂糖于0.5×TBE中，加热煮沸溶解，冷却至60oC，加8μmol/100mL EB，将8孔梳子放入模具，倒入电泳液（0.5×TEB），制胶。取8μL 样品加上样缓冲液2μL，1.5%琼脂糖凝胶电泳（90V, 90min），UV下观察。

##### 1.3.6 PI单染检测细胞周期变化

PC12细胞用不同浓度DBDCT染毒不同时间后，收集细胞，用冷PBS洗两次，1000 rpm离心5 min，并调整细胞浓度为1×106 /mL，用70%冷乙醇4℃固定过夜。PBS洗去固定液，加RNase A100μL，37℃水浴30 min。再加入400μL PI染色混匀，4℃避光30 min。流式细胞仪检测，计数10000个细胞，记录激发波长488 nm处红色荧光，分析细胞周期。

##### 1.3.7 RT-PCR检测DBDCT对凋亡相关基因的影响

###### 1.3.7.1 引物合成

caspase-3、caspase-8、caspase-9、Cyt-*c*、NF-κB、Fas及FasL均为与凋亡相关的基因，其上、下游引物序列见表3-1.

表3-1 RT-PCR上下游引物序列



Table 3-1 Primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis

###### 1.3.7.2 总RNA提取及cDNA合成

收集不同浓度DBDCT作用不同时间后的PC12细胞，PBS洗涤两次，转移至1.5 mL Eppendorf管内。加Trizol 1 mL室温裂解5 min，加入200µL氯仿，剧烈振荡混匀30 s，室温静置5 min, 4℃1000 rpm离心8 min. 吸取上清液500

µL，加入等体积异丙醇，充分混匀，在超低温冰袋上静置5 min。4℃10000 rpm离心10 min。弃去异丙醇，70%的冰乙醇洗涤，10000 rpm离心2 min，重复两次。室温干燥5 min，加入30µL DEPC水溶解RNA。取10µL总RNA液于0.5 mL Eppendorf管中，加入2µL随机引物，于65℃温育5 min。按顺序加入4µL 5

×反转录缓冲液，RNA酶抑制剂1µL，dNTP混合物（10 mM）2µL，反转录酶

1µL. 此反应体系的反应条件为：25℃5 min, 42℃60 min, 85℃5 min。

###### 1.3.7.3 RT-PCR扩增并检测

反应体系为20µL，内含FastStart Universal SYBR Green Master（ROX）液10µL，反转录反应物1.5µL，引物溶液（100μM的上、下游引物溶液各0.6μL，用DDW补足至80μL）8.5μL.95℃预变性10 min.95℃30 s，56℃30 s，72

℃60 s，共40个循环。扩增完毕后进行熔解曲线分析。系统自动记录荧光曲线并分析计算出Ct值，基因表达的量用2-ΔΔCt表示。为消除样品处理、逆转录和

PCR反应差异，以β-actin作为内对照，检测被测样品mRNA的完整性和可靠性。

##### 1.3.8 实验结果分析

−

以均数±标准差（x ±SD）表示，用SPSS 10.0软件对数据进行统计分

析，组间比较采用单因素ANOVA方差分析，组内比较采用SNK法。统计结果以*p*<0.05为具有统计学意义。

### 2 实验结果及结论

#### 2.1 DBDCT对PC12细胞增殖的影响

MTT法检测PC12细胞与DBDCT染毒的存活率试验显示，溶剂对照组与正常细胞对照组相比，各时间点细胞存活率均无显著差异，证明不超过1%的甲醇对于PC12细胞的生长无影响；较小浓度的DBDCT（0.5及1μM）暴露24、48、72 h后，细胞存活率与正常对照组相比也无显著差异，而较大浓度的DBDCT

（2-10μM）在各时间点都可以显著引起细胞存活率下降（*p*<0.01），抑制细胞的生长，DBDCT对PC12细胞生长抑制作用效果具有一定的时效和量效关系，按公式计算，PC12细胞暴露24、48、72小时后的IC50值分别为4.110、2.927、

2.311μmol/L. 结果见表3-2，图3-1.

表3-2 MTT法检测PC12细胞存活率



Table 3-2 Inhibition ratio(%) of DBDCT in PC12 cells

\*\* *p*<0.01 VS control group



图3-1 DBDCT对PC12细胞生长的抑制率

Fig. 3-1 Inhibition ratio(%) of DBDCT against PC12 cells

\*\* *p*<0.01 VS control group

#### 2.2 DBDCT对PC12细胞形态的影响。

##### 2.2.1 光镜观察细胞形态变化

用0.25、1、4μM的DBDCT染毒PC12细胞24 h后，光镜下（64×）观察：正常PC12细胞单层生长，大小形态均一，胞体饱满，胞膜完整，突起较长，胞质丰富，细胞间联系紧密，相互交织成簇状（a）；随着DBDCT浓度的加大，细胞数目和细胞间连接逐渐减少，胞质浓缩与胞膜破裂、胞质内容物外溢逐渐增

多（b、c）；DBDCT高剂量组细胞数目显著减少，细胞间连接中断，细胞肿胀和细胞皱缩并存，细胞附壁能力减弱，大量细胞从培养瓶上脱落下来而漂浮于培养基中（d）。结果见图3-2。



图3-2 光学显微镜下PC12细胞在不同染毒剂量DBDCT暴露24h后的形态变化（a、b、c、

d分别为DBDCT 0、0.25、1、4μM）（64×）

Fig. 3-2 Microscopic graphs (64×) of cultured PC12 cells incubation with varying concentrations of DBDCT (0, 0.25, 1, and 4μM) for 24 h (a, b, c, d).

##### 2.2.2 荧光显微镜观察细胞形态变化

###### 2.2.2.1 AO/EB 染色观察细胞形态变化

对DBDCT染毒24 h后PC12细胞用AO/EB双染荧光染色，荧光显微镜下观察，可见正常细胞显绿色，早期凋亡细胞表现为细胞核为AO染色呈黄绿色荧光，浓聚成颗粒状，位于细胞的一侧，可见细胞出芽。随着染毒剂量增加，早期凋亡细胞数量增加，晚期凋亡细胞也增多，双染后细胞显橙红色，表现为细胞核浓聚和偏移，结果见图3-3。这一实验结果初步表示DBDCT对PC12细胞增殖抑制作用可能是诱导并促进其凋亡产生的。



图3-3 荧光显微镜下PC12细胞在不同染毒剂量DBDCT暴露24h后的形态变化（a、b、c、

d分别为DBDCT 0、0.25、1、4μM）（AO/EB染色，64×）

Fig. 3-3 Morphologic changes of nucleus of apoptotic PC12 cells shown by fluorescence staining of AO/EB (64×) incubation with varying concentrations of DBDCT (0, 0.25, 1, and 4μM) for 24 h (a, b, c, d).

###### 2.2.2.2 Hoechst33258 荧光染色观察细胞形态变化

对DBDCT染毒24 h后PC12细胞用Hoechst33258核荧光染料染色，荧光显微镜下观察发现对照组细胞胞核近似圆形，边缘清晰，染色均匀（a）；而染毒组可见高亮蓝色的典型凋亡细胞，其细胞核明显固缩、凝聚和断裂，随着DBDCT染毒剂量增加，凋亡细胞明显增多（b、c、d），结果见图3-4。



图3-4 荧光显微镜下PC12细胞在不同染毒剂量DBDCT暴露24h后的形态变化（a、b、c、

d分别为DBDCT 0、0.25、1、4μM）（Hoechst33258染色，64×）

Fig. 3-4 Morphologic changes of nucleus of apoptotic PC12 cells shown by fluorescence staining of Hoechst33258 (64×) incubation with varying concentrations of DBDCT (0, 0.25, 1, and 4μM) for 24 h (a, b, c, d).

##### 2.2.3 透射电镜观察细胞形态变化

电子显微镜下观察：① 正常PC12细胞电子密度均匀，细胞呈长圆形，微绒毛发达，细胞核完整，较大，核质比高，核膜清晰，胞膜完整，细胞之间连接紧密（a）；②0.25μM DBDCT染毒后，镜下可见微绒毛减少，细胞整体结构完整，细胞膜及细胞核均较完整，仍可见细胞间连接，但细胞间连接松弛，出现间隙

（b）；③1μM DBDC染毒后，胞膜仍然完整，微绒毛消失，边缘变平，胞质浓缩，细胞器变化不明显，细胞质电子密度基本正常，细胞核呈现不规则，核膜高度 皱折，核染色质明显积聚、靠边、浓缩，呈断裂状，有的在核膜下形成结节或新月状团块，附在核周边。胞浆浓缩，细胞内出现大小不等的空泡（c）；④4μM DBDCT染毒后，细胞表面微绒毛消失，细胞的质膜破裂，大多数细胞器结构消失，胞浆严重空泡化，细胞核和细胞质高度浓缩成团，细胞核呈现多叶型，裂解，核膜破裂，可见凋亡小体（d）。结果见图3-5。



图3-5 电子显微镜下PC12细胞在不同染毒剂量DBDCT暴露24h后的形态变化（a、b、c、

d分别为DBDCT 0、0.25、1、4μM）（15,000×）

Fig. 3-5 Morphologic changes of PC12 cells shown by TEM (15,000×) incubation with varying concentrations of DBDCT (0, 0.25, 1, and 4μM) for 24 h (a, b, c, d).

#### 2.3 PI/Annexin V-FITC双染检测细胞凋亡情况

形态学观察初步证实DBDCT对PC12细胞的损伤作用可能是通过诱导凋亡产生的，于是进一步用PI/Annexin V-FITC测定DBDCT诱导PC12细胞的调亡，结果见表3-3，图3-6、3-7。空白溶剂作用24 h细胞总凋亡率仅为4.50%，随着DBDCT染毒剂量从0.25μM增大至1μM和4μM，总凋亡率分别增加到12.44%、17.87%和

22.14%，4μM的DBDCT对PC12暴露12 h和48 h后凋亡率由空白对照的4.50%增加到13.77%和34.94%，空白对照组和实验组之间的差异具有显著性意义（*p*<0.05，

*p*<0.01），并呈现较好的量效和时效依赖性。

表3-3 PI/Annexin V-FITC双染的细胞凋亡率



Table 3-3 Apoptosis ratio (%) induced by DBDCT in PC12 cells

\* *p*<0.05 \*\* *p*<0.01 VS control group



图3-6 PI/Annexin V-FITC双染凋亡情况

Fig. 3-6 DBDCT induced apoptosis of PC12 cells detected by PI/Annexin V-FITC double staining.



图3-7 PI/Annexin V-FITC双染凋亡的量效及时效柱状图

Fig. 3-7 The concentration-effect and time-effect histograms of apoptosis ratio(%) of DBDCT in PC12 cells

#### 2.4 细胞DNA琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡情况

PC12细胞用不同浓度DBDCT染毒不同时间后，在琼脂糖凝胶电泳中可见凋亡特征性改变DNA梯形带。结果见图3-8。电泳图还显示随着DBDCT浓度增加，DNA条带亮度增强，说明DBDCT诱导细胞凋亡效应具有剂量依赖性。当染毒剂量最大且暴露时间最长时可见DNA 全部破碎无明显梯带。



图3-8 琼脂糖凝胶电泳示DNA Ladder

Fig. 3-8 Agarose electrophoresis of DNA of PC12 cell treated with DBDCT

1. Marker; 2. Control; 3. 0.25μM-24h; 4. 1μM-24h; 5. 4μM-12h; 6. 4μM-24h; 7. 4μM-48h

#### 2.5 DBDCT对PC12细胞周期变化的影响

用不同剂量DBDCT与PC12细胞染毒不同时间后，周期变化结果见表3-4，图3-9、3-10。由表及图可见，正常生长状态下的对照组PC12细胞大多数处于G0/G1 期，S期次之，G2/M期最少。不同剂量DBDCT染毒不同时间后，各周期分布发

生变化。DBDCT可以抑制PC12细胞的S期，G0/G1期细胞增多，细胞的增殖指数下降，且随着化合物浓度和时间的增加对PC12细胞的抑制效应增加，DBDCT可能通过阻滞PC12细胞S期产生PC12细胞损伤，神经功能损伤的作用。

表3-4 PC12细胞周期的变化



Table 3-4 Changes of cell cycles induced by DBDCT in PC12 cells

\* *p*<0.05 \*\* *p*<0.01 VS control group



图3-9 流式细胞术检测PI单染后PC12细胞周期的变化

Fig. 3-9 the changes of cell cycles in PC12 cells incubation with various concentrations of DBDCT for various time periods.

图3-10 PI单染细胞周期变化的量效及时效柱状图

Fig. 3-10 the changes of cell cycles in PC12 cells incubation with various concentrations of DBDCT for various time periods.

#### 2.6 DBDCT 对凋亡相关基因的影响

用不同剂量DBDCT与PC12细胞染毒不同时间后，RT-PCR实验结果见表

3-5，图3-11、3-12、3-13.

不同剂量DBDCT对PC12细胞染毒24 h后，①caspase-3、caspase-8、NF-κB、

Fas、Fas-L的mRNA含量与对照组比较随着DBDCT染毒剂量的增大而增多

（*p*<0.01），表现出剂量依赖性；②caspase-9的mRNA在DBDCT染毒剂量较小时随浓度增加而增加，而当DBDCT染毒剂量增大到4μM时反而表达下降，但都明显大于正常对照组（*p*<0.01）；③Cyt-*c*的mRNA与对照组相比，在4μM

DBDCT作用24 h时表达极度增高（*p*<0.01），而0.25μM及1μM反而无明显变化（*p*> 0.05）。

4.0μM的DBDCT暴露不同时间后，①caspase-3的mRNA含量与对照组比较随着DBDCT暴露时间的的延长而增多（*p*<0.01）；②caspase-8、NF-κB、Fas的mRNA在4.0μM DBDCT暴露短时间时随作用时间延长而增加，而当暴露时间延长到48 h时反而表达下降，但都明显大于正常对照组（*p*<0.01）；③caspase-9、Cyt-*c*及Fas-L的mRNA含量与对照组比，在DBDCT作用24 h时表达极度增高

（*p*<0.01），而12 h及48 h时反而无明显变化（*p*> 0.05）。

表3-5 RT-PRC检测DBDCT染毒后凋亡相关基因mRNA表达的变化

Table 3-5 Effect of DBDCT on the mRNA expression levels of apoptosis-associated genes in PC12 cells.



\* *p*<0.05 \*\* *p*<0.01 VS control group.



图3-11 熔解曲线

Fig. 3-11 Melting curves of RT-PCR



图3-12 扩增曲线

Fig. 3-12 Amplification curves of RT-PCR



图3-13 RT-PCR检测凋亡相关基因mRNA表达变化的量效及时效柱状图

Fig. 3-13 The concentration-effect and time-effect histograms of DBDCT on the mRNA expression levels of apoptosis-associated genes in PC12 cells.

### 3 实验讨论

#### 3.1 体外细胞选择及DBDCT作用时间和剂量的选择

目前比较肯定的用于研究神经毒性的体外细胞模型包括原代培养的海马、皮层、基底前脑神经细胞和PC12细胞株。PC12细胞（大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞），具有神经嵴源性和神经细胞特点，与原代培养的细胞相比：较易获得，细胞的同源性使实验结果明显，且一致性较好；细胞生存时间长，可以稳定传代培养，易于观察；具有典型的神经内分泌特性，对神经生长因子有可逆的神经元显形反应，广泛用于神经系统疾病的体外研究[107, 108]，因此本实验中选用

PC12细胞作为体外研究对象，探讨DBDCT对其的影响，阐释DBDCT的神经系统影响作用。

MTT[3-(4, 5-二甲基噻唑-2) -2，5-二苯基四氮唑溴盐]比色法[109, 110]，是一种检测细胞存活和生长的方法。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能将外源性MTT还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓒（Formazan）并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。二甲基亚砜（DMSO）能溶解细胞中的甲瓒，用酶联免疫检测仪在490nm波长处测定其光吸收值，可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内，MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。该方法因其灵敏度高、经济已广泛细胞毒性试验。

本实验中采用MTT法检测不同染毒剂量DBDCT暴露不同时间对PC12 细

胞存活率的影响，实验结果显示，DBDCT染毒PC12细胞24、48、72小时后的

IC50值分别为4.110、2.927、2.311μmol/L. 由于DBDCT与PC12细胞染毒超过

24小时后，细胞营养供给不足，因此细胞的死亡不仅仅是源于DBDCT的毒性，故在后续的实验中选择24小时为染毒后的最佳观察时间，在考量DBDCT对细胞影响的时间效应关系时选择12、24、48小时为DBDCT与细胞染毒时间；另一方面由于DBDCT染毒PC12细胞24小时的IC50值为4.110μmol/L，故选用0.25、

1、4μmol/L为进一步研究时的DBDCT染毒浓度。

#### 3.2 DBDCT对PC12细胞形态的影响

1972年Kerr等基于某些细胞死亡时所特有的形态学特征，首次提出了细胞凋亡的概念，因此细胞特征性的形态变化就成为判断细胞凋亡的经典标准。通过形态学观察细胞凋亡的变化是多阶段的，首先出现的是细胞体积缩小，连接消失，与周围的细胞脱离，然后是细胞质密度增加，线粒体膜电位消失，通透性改变，Cyt-*c*从线粒体释放到胞浆，核质浓缩，[核膜](http://baike.baidu.com/view/32439.htm)核仁破碎，DNA 降解成为约180bp-200bp片段；胞膜有小泡状形成，膜内侧磷脂酰丝氨酸外翻到膜表面，胞膜结构仍然完整，最终可将凋亡细胞遗骸分割包裹为几个凋亡小体，无内容物外溢，因此不引起周围的炎症反应，凋亡小体可迅速被周围专职或非专职吞噬细胞吞噬[111]。

对于细胞凋亡的形态学检测，目前常用的方法包括光学显微镜观察、荧光显微镜和共聚焦激光扫描显微镜观察、透射电子显微镜观察。

1、光学倒置显微镜下观察：镜下可发现凋亡细胞的体积变小、变形，细胞 膜完整但出现发泡现象，贴壁细胞现皱缩、变圆、脱落。本实验中观察发现正 常细胞大小形态均一，胞膜完整，突起较长，细胞间联系紧密，相互交织成簇；随着DBDCT染毒剂量的加大，细胞数目和细胞间连接逐渐减少，胞质浓缩与胞膜破裂、胞质内容物外溢逐渐增多，甚至出现细胞间连接中断，细胞肿胀和细 胞皱缩并存，细胞附壁能力减弱，大量细胞从培养瓶上脱落而漂浮于培养基中。

2、荧光显微镜观察：一般采用细胞核染色质的形态学改变来评判细胞凋亡的进展情况。AO与EB均是高度灵敏的荧光染色剂，AO可透过正常细胞膜，

使细胞核呈绿色或黄绿色均匀荧光；而在凋亡细胞中AO使其染上致密浓染的黄绿色荧光，或黄绿色碎片颗粒；而坏死细胞黄荧光减弱甚至消失。EB 只染死细胞使之产生桔黄色荧光。二者常合用双染，从而可区分出正常细胞、凋亡细胞及坏死细胞[112-114]. Hoechst33258是与DNA非嵌入式特异结合的活性染料，主要结合在DNA的A-T碱基区，紫外光激发时发射明亮的蓝色荧光，其可以通过细胞膜，使活细胞和凋亡细胞DNA都能染色。凋亡细胞在等渗条件下对其吸收能力最强，因此蓝色荧光最强的是凋亡细胞，可以见到染色质密集的核仁、断裂的核片段呈凋亡小体，非凋亡细胞核形态正常，染色质分部均匀[115, 116]。本实验分别用AO/EB及Hoechst33258对DBDCT染毒24 h后PC12细胞染色，荧光显微镜下可见典型凋亡细胞，其细胞核明显固缩、凝聚和断裂，随着DBDCT染毒剂量增加，凋亡细胞明显增多。

3、透射电子显微镜观察，透射电镜可以看清小于0.2µm的细胞超微结构。在细胞凋亡的不同时期出现不同的超微结构变化，如在凋亡前期，细胞核内染色质高度盘绕，出现许多称为气穴现象（cavitations）的空泡结构；中期细胞核的染色质高度凝聚、边缘化；晚期则细胞核裂解为碎块，产生凋亡小体。本实验用电子显微镜观察DBDCT染毒24 h的PC12细胞，随DBDCT染毒剂量的增加，空泡现象逐渐明显，微绒毛从有到无，大量凋亡小体产生。

综上所述，DBDCT染毒后的细胞在形态学上表现出典型的凋亡特征。

#### 3.3 DBDCT诱发PC12细胞产生凋亡

细胞凋亡的生物学特征包括形态学变化和生物化学变化，后者中最为显著地变化之一就是DNA的片段化。细胞接受到凋亡信号后，细胞染色体的DNA会出现非常特异并有规律的降解，染色体DNA在内源性核酸内切酶的作用下，核小体与核小体的连接部位被切断，产生约为180-200bp的整数倍长度的DNA片段，这种降解表现在琼脂糖凝胶电泳中就呈现特异的梯状Ladder 图谱（DNA

Ladder），而坏死呈弥漫的连续图谱[117]。

磷脂酰丝氨酸（Phosphatidylserine, PS）正常情况下位于细胞膜的内侧，但在细胞凋亡的早期，PS 可翻转到细胞膜表面，暴露在细胞外环境中。Annexin V

是一种Ca2+依赖性磷脂结合蛋白，能与PS高亲和力特异性结合。将Annexin V进行荧光素（FITC）标记，以标记了的Annexin V-FITC作为荧光探针，利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生。碘化丙啶（propidine iodide, PI）是一种核酸染料，不能透过完整的细胞膜，但在凋亡中晚期的细胞和死细胞，

PI能够透过细胞膜而使细胞核红染。因此Annexin V-FITC与PI双染，就能区分早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞，而且能对凋亡进行定量分析[118, 119]。

本实验中利用琼脂糖凝胶电泳技术发现高浓度DBDCT染毒较长时间后会出现典型的梯状条带；采用PI/Annexin V-FITC双染，实验结果显示随着DBDCT暴露时间的延长和染毒剂量的增加，凋亡率逐渐上升，呈现良好的剂量效应关系和时间效应关系，证明DBDCT能有效诱导PC12细胞凋亡。

#### 3.4 DBDCT 对凋亡相关基因的影响

本实验第二章已讨论过有关caspase家族及Bcl-2家族与凋亡之间的关系。核转录因子-κB（NF-κB）是一种各种细胞中广泛存在、化学上高度保守、

具有多种调节作用的免疫反应蛋白，是NF-κB/Rel蛋白家族中的一员。研究表明，NF-κB 的功能如同胞质中第二信使，作为凋亡调节因子在细胞凋亡过程中起着重要作用，NF-κB又可以作用于凋亡执行阶段的下游效应器caspase-3，导致细胞凋亡的发生。有学者认为NF-κB是一种促凋亡因子，NF-κB的激活可以促进某些细胞系的凋亡[120]，还有国外学者研究还提出[121]，在神经细胞中适度的NF-κB活性可保护神经细胞免于氧化应激和凋亡，而NF-κB的过度活化可导致炎症级联反应。本实验结果显示NF-κB在DBDCT染毒后过度表达，可能对PC12细胞凋亡产生推动作用。

Fas及其天然配体FasL是近年来研究得最为深入的有关细胞凋亡的膜表面分子，Fas属肿瘤坏死因子受体家族，实验证实，Fas与FasL结合后，形成Fas三聚体，使Fas胞质区死亡结构域相聚成簇，继而使胞质内Fas相关死亡结构域蛋白（FADD）大量浓集，通过激活caspase级联反应，导致细胞走向凋亡[122-124]。本实验结果显示Fas与FasL结合的程度在DBDCT染毒后显著增加，可能对PC12细胞凋亡产生推动作用。

### 4 小结

体外培养PC12细胞模拟神经细胞，研究DBDCT对其影响，发现DBDCT可以明显抑制PC12细胞的增殖，24小时的IC50值为4.110μmol/L；多种显微镜观察均发现高浓度DBDCT与PC12细胞长时间染毒产生明确的形态学变化；流式细胞术及琼脂糖凝胶电泳技术提示DBDCT与PC12共孵育后可引起细胞典型的凋亡生化改变；RT-PCR实验进一步证实DBDCT对PC12细胞中多种凋亡相关基因都有显著影响。鉴于前期研究已证实DBDCT在整体动物模型中可以部分的通过诱导脑组织细胞凋亡产生神经毒性，本实验结果亦揭示DBDCT在体外依然可以通过诱导凋亡对神经细胞产生损伤。

## 二、 DBDCT对PC12细胞凋亡信号传导通路的影响

### 1 实验材料及方法

#### 1.1 实验材料与试剂

DBDCT（由本课题组合成，3次重结晶，纯度≥99％，20100709）、细胞及其培养试剂同第一节；Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒及caspase-3、caspase-9 分光光度法检测试剂盒（南京凯基生物科技发展有限公司）；线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)及Western及IP细胞裂解液（海门碧云天生物技术有限公司）；活性氧检测试剂盒及BCA蛋白定量试剂盒（北京普利莱基因技术有限公司）；胞质和线粒体蛋白质提取试剂盒及非干扰型蛋白质浓度定量试剂盒（生工生物工程（上海）有限公司）；兔抗caspase-3多克隆抗体、小鼠抗caspase-9多克隆抗体、兔抗Cyt-*c*多克隆抗体、兔抗p38/p-p38多克隆抗体、兔抗JNK/p-JNK多克隆抗体（cell signaling technology公司）；兔抗Bax多克隆抗体及兔抗Bcl-2多克隆抗体（abcam公司）；兔/小鼠抗β-actin抗体，HRP标记ft羊抗兔/小鼠二抗，ECL试剂盒，显影液，定影液（北京康为世纪生物科技有限公司）；30%丙烯酰胺溶液、过硫酸铵（APS）、TrisBase、甘氨酸（Gly）、β-巯基乙醇、溴酚蓝、SDS、Tween-20 均购自北京索莱宝科技有限公司；其他试剂均为分析纯。

#### 1.2 实验仪器

细胞培养相关仪器同第一节；流式细胞仪（FACSCalibur, 美国BD公司）；超声破碎仪（sonics﹠Materials, NT, USA）；电泳仪（ProwerPac Basic, Bio-Rad公司）；半干转膜槽（Bio-Rad公司）。

#### 1.3 实验方法

##### 1.3.1 细胞培养及给药分组处理方式同第一节

##### 1.3.2 Annenxin V-FITC法检测细胞凋亡率方法同第一节。

##### 1.3.3 caspase-3及caspase-9活性测定

PC12细胞在浓度的DBDCT暴露不同时间后，用0.25%的胰酶消化，冷PBS清洗两次，2000 r/min离心5 min，收集细胞约5×106个，加入含0.5μl DTT的50μL预冷Lysis Buffer吹打细胞，置冰上裂解60 min，其间涡旋震荡3次，每次10s，4℃10000r/min离心5 min，收集上清液备用；用BCA蛋白定量试剂测定上清液的蛋白浓度，调整蛋白浓度为2μg/μL，96孔板每孔取50μL含100μg蛋白的上清液及50μL 2×reaction buffer（含0.5μl DTT），并分别加入5μl caspase-3或caspase-9 substrate，37℃避光孵育4 h，以50μL Lysis Buffer + 50μL 2×reaction buffer为空白对照；酶标仪测405 nm处吸光度值，通过计算OD给药组

/OD空白对照组的倍数来确定DBDCT组caspase-3或caspase-9的活化程度。

##### 1.3.4 线粒体跨膜电位（△Ψm）测定

PC12细胞与不同浓度DBDCT暴露不同时间后，用0.25％胰蛋白酶消化，

1000rpm离心收集细胞，PBS漂洗两次，加入1mL培养基重悬，加入1mL JC-1染色工作液，于37℃孵育20 min，其后用JC-1染色缓冲液洗涤两次，洗去未结合的染色剂，并用JC-1染色缓冲液重悬细胞，经流式细胞仪定量检测JC-1单体和聚合物荧光强度。

##### 1.3.5 细胞内活性氧（ROS）水平检测

PC12细胞与不同浓度DBDCT暴露不同时间后，用0.25％胰酶消化，1000

rpm离心收集细胞，PBS漂洗两遍，将DCFH-DA用无血清培养液稀释为10μM

后直接加入1×106个细胞中，继续在37℃，CO2培养箱避光孵育细胞60min，

然后缓冲液洗涤细胞两次去除细胞外可能的荧光物质以降低背景。以流式细胞术定量检测2’，7’-二氯荧光黄（DCF）荧光强度，呈现绿色荧光的DCF的激发波长为488 nm，发射波长为525nm。

##### 1.3.6 蛋白印迹（Western blot）检测多种信号蛋白的表达

###### 1.3.6.1 细胞总蛋白的提取

将处于对数生长期的PC12细胞接种于75cm2培养瓶中，贴壁后分别用不同浓度的DBDCT暴露不同时间，同时用空白溶剂作为对照。收集不少于1×l07个细胞，1000rpm离心5min，冰PBS冲洗两次，加入3～5倍体积冰浴预冷的细胞裂解缓冲液（内含1%蛋白酶抑制剂及1%磷酸酶抑制剂）于冰上裂解细胞匀浆细胞，收集匀浆液，12000rpm、4℃离心10min，取上清液，用BCA法测定蛋白浓度后-80℃保存，进行Western blot分析。

###### 1.3.6.2 细胞线粒体蛋白及胞浆蛋白的提取

将处于对数生长期的PC12细胞接种于75cm2培养瓶中，贴壁后分别用不同浓度的DBDCT暴露不同时间，同时用空白溶剂作为对照。收集不少于1×l07个细胞，用冷PBS洗涤细胞两次（每次3000 rpm离心5 min），加入1mL胞质提取Buffer（使用前，每mL胞质提取Buffer加入1μL蛋白酶抑制剂，5μL磷酸酶抑制剂和1μL DTT），超声破碎细胞，每次30 S，3～4次，每次间隔1 min，置于冰上冷却。将匀浆液转移至冷的离心管中，最大转速涡旋剧烈振荡15s，放置冰上10～15min，于4℃, 3000rmp离心10 min，弃沉淀。取上清转移至新冷离心管中，于4℃，12000rpm离心30 min以沉淀线粒体，上清转至新管中，为胞浆蛋白，-80℃冷冻保存。取沉淀，加入0.1mL胞质提取Buffer，涡悬震荡洗涤30秒，4℃，13000rpm离心10 min，去上清。在沉淀中加入0.1ml冷的线粒体溶解Buffer（使用前，每ml线体粒溶解Buffer加入1μL蛋白酶抑制剂，5μL磷酸酶抑制剂和1μL DTT）。冰上放置30分钟，再涡悬震荡30秒，4℃，13000rpm离心10 min，得到的上清即为线立体蛋白。用非干扰型蛋白质浓度定量试剂盒测定蛋白浓度后进行Western blot分析。

###### 1.3.6.3 Western blot实验

按照《分子克隆》所述的方法进行Western blot分析，实验步骤包括

SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、免疫反应、化学发光、显影、定影。

###### 1.3.6.4 Western blot结果判定

目的蛋白电泳条带用adobe photoshop7.0分析软件计算灰度值，与再生后同一张膜的β-actin 蛋白灰度值相比，作直方图进行半定量分析。

##### 1.3.7 统计方法

−

实验结果以均数±标准差（x ±SD）表示，用SPSS 10.0软件对数据进

行统计分析，组间比较采用单因素ANOVA方差分析，组内比较采用SNK法。统计结果以p<0.05为具有统计学意义。

### 2 实验结果及结论

#### 2.1 Annenxin V-FITC法检测细胞凋亡率

实验结果同第一节，空白溶剂作用24 h细胞总凋亡率仅为4.50%，随着

DBDCT染毒剂量从0μM增大至0.25、1和4μM，总凋亡率分别增加到12.44%、

17.87%和22.14%，4μM的DBDCT对PC12作用12 h、24h及48 h后凋亡率由空白对照的4.50%分别增加到13.77%、22.14%及34.94%，空白对照组和染毒组之间的差异具有显著性意义（*p*<0.05, *p*<0.01），并呈现较好的量效和时效依赖性，证实随DBDCT暴露时间的延长及染毒剂量的增加，PC12细胞出现明显凋亡，DBDCT通过诱导凋亡对PC12细胞产生损伤。

#### 2.2 caspase-3、caspase-9 活性测定

实验结果显示，不同剂量DBDCT对PC12细胞染毒不同时间后，caspase-3及caspase-9活性与对照组相比均显著升高（*p*<0.05, *p*<0.01）。详见表3-6，图3-14。

表3-6 DBDCT染毒后PC12细胞caspase-3及caspase-9活性变化



Table 3-6 Changes of activities of caspase-3 and caspase-9 induced by DBDCT in PC12 cells

图3-14 caspase-3及caspase-9活性变化的量效及时效柱状图

Fig. 3-14 The concentration-effect and time-effect histograms of activities of caspase-3 and caspase-9 of DBDCT in PC12 cells

#### 2.3 线粒体跨膜电位（△Ψm）测定

DBDCT（终浓度分别为0、0.25、1、4μM）暴露24 h后，PC12细胞红绿荧光比值比对照组明显降低（*p*<0.01），表明DBDCT降低PC12细胞△Ψm与剂量呈负相关。4μM DBDCT分别处理12、24、48 h后，PC12细胞红绿荧光比值比对照组明显降低（*p*<0.01），表明DBDCT降低PC12细胞△Ψm与时间也呈负相关。结果见表3-7，图3-15。

表3-7 DBDCT染毒后PC12细胞△Ψm变化

Table 3-7 Changes of△Ψm induced by DBDCT in PC12 cells

\* *p*<0.05 \*\* *p*<0.01 VS control group. Data were expressed by setting the fluorescence in control conditions as 100%.





图3-15 △Ψm变化的量效及时效柱状图

Fig. 3-15 The concentration-effect and time-effect histograms of△Ψm of DBDCT in PC12 cells

#### 2.4 细胞内活性氧（ROS）水平检测

不同浓度DBDCT与PC12细胞作用不同时间后，绿色荧光与对照组相比明显增加，且随染毒剂量增大及暴露时间延长，绿色荧光强度增大，表明DBDCT提高PC12细胞ROS水平与剂量及时间均呈正相关。在最大剂量4μM作用最长时间48 h后，ROS水平有所下降，可能是由于细胞损伤过重死亡导致。结果见表3-8，图3-16、3-17。

表3-8 DBDCT染毒后PC12细胞ROS生成的变化



Table 3-8 Changes of ROS generation induced by DBDCT in PC12 cells

\*\* *p*<0.01 VS control group. Data were expressed by setting the fluorescence in control conditions as 100%.



图3-16 ROS生成变化的量效关系

Fig. 3-16 The concentration-effect of ROS generation induced by DBDCT in PC12 cells



图3-17 ROS生成变化的时效关系

Fig. 3-17 The time-effect of ROS generation induced by DBDCT in PC12 cells

#### 2.5 蛋白印迹(Western blot)检测多种信号蛋白的表达

采用Western blot方法检测DBDCT对凋亡相关蛋白表达水平的影响，以同一张膜再生后的β-actin 为内参，进行半定量分析，用相对蛋白质水平（目的蛋白灰度/β-actin 灰度）显示，结果分列如下：

##### 2.5.1 DBDCT对Bax及Bcl-2蛋白的影响：随着DBDCT染毒剂量和暴露时间的增加，与空白对照组相比，染毒蛋白Bcl-2的表达下凋，蛋白Bax表达上调，且有明显量效和时效关系，不同染毒剂量DBDCT作用24 h后，Bax/Bcl-2蛋白比值从0.81上升的3.54，4μM DBDCT作用不同时间后，Bax/Bcl-2蛋白比值从0.52上升的4.97；结果详见表3-9，图3-18、3-19。



图3-18 DBDCT染毒对PC12细胞Bax和Bcl-2表达的影响

Fig. 3-18 Effect of DBDCT on the expression levels of Bax and Bcl-2 in PC12 cells.

表3-9 DBDCT染毒对PC12细胞Bax和Bcl-2表达的影响



Tab 3-9 Effect of DBDCT on the expression levels of Bax and Bcl-2 proteins in PC12 cells.

\* *p*<0.05, \*\* *p*<0.01 VS control group.



图3-19 DBDCT染毒对PC12细胞Bax和Bcl-2表达影响的量效及时效柱状图

Fig. 3-19 The concentration-effect and time-effect histograms of DBDCT on the expression levels of Bax/Bcl-2 in PC12 cells

##### 2.5.2 DBDCT对Cyt-*c*蛋白的影响：随着DBDCT作用浓度和作用时间的增加，与空白对照组相比，染毒组线粒体内蛋白Cyt-*c*含量显著下降，胞质中蛋白Cyt-*c*含量明显增加，表现出明显的量效和时效关系（*p*<0.01），结果详见表3-10，图3-20、3-21（结果处理时将control组调整为1）。



图3-20 DBDCT染毒对PC12细胞Cyt-*c*表达的影响

Fig. 3-20 Effect of DBDCT on the expression levels of Cyt-*c* in PC12 cells.

表3-10 DBDCT染毒对PC12细胞Cyt-*c*表达的影响



Tab 3-10 Effect of DBDCT on the expression levels of Cyt-*c* in PC12 cells.

\* *p*<0.05, \*\* *p*<0.01 VS control group.



图3-21 DBDCT染毒对PC12细胞Cyt-*c*表达影响的量效及时效柱状图

Fig. 3-21 The concentration-effect and time-effect histograms of DBDCT on the expression levels of Cyt-*c* in PC12 cells

##### 2.5.3 DBDCT对caspase家族蛋白的影响：随着DBDCT染毒剂量和暴露时间的

增加，与空白对照组相比，染毒组蛋白caspase-3及caspase-9均出现越来越显著地剪切条带；结果详见表3-11，图3-22、3-23。



图3-22 DBDCT染毒对PC12细胞caspase家族表达的影响

Fig. 3-22 Effect of DBDCT on the expression levels of caspase-3 and caspase-9 in PC12 cells.

表3-11 DBDCT染毒对PC12细胞caspase家族表达的影响



Tab 3-11 Effect of DBDCT on the expression levels of caspase-3 and caspase-9 in PC12 cells.

\* *p*<0.05, \*\* *p*<0.01 VS control group.



图3-23 DBDCT染毒对PC12细胞caspase家族表达影响的量效及时效柱状图

Fig. 3-23 The concentration-effect and time-effect histograms of DBDCT on the expression levels of caspase-3 and caspase-9 in PC12 cells

##### 2.5.4 DBDCT对MAPK家族蛋白的影响：随着DBDCT染毒剂量和暴露时间的

增加，与空白对照组相比，染毒组蛋白p-JNK和p-p38的表达逐渐增加，表现

出明显的量效和时效关系（p<0.01）。结果详见表3-12，图3-24、3-25、3-26。



图3-24 DBDCT染毒对PC12细胞p-JNK和p-p38表达的影响

Fig. 3-24 Effect of DBDCT on the expression levels of p-JNK and p-p38 in PC12 cells.

表3-12 DBDCT染毒对PC12细胞p-JNK和p-p38表达的影响



Tab 3-12 Effect of DBDCT on the expression levels of p-JNK and p-p38 in PC12 cells.

\* *p*<0.05, \*\* *p*<0.01 VS control group.

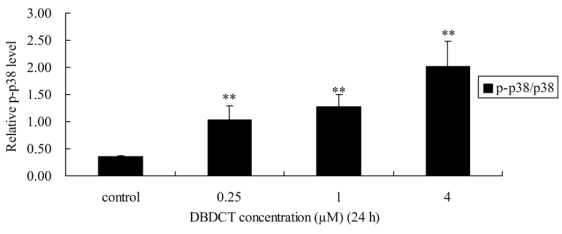


图3-25 DBDCT染毒对PC12细胞p-JNK和p-p38表达影响的剂量效应柱状图

Fig. 3-25 The concentration-effect histogram of DBDCT on the expression levels of p-JNK and p-p38 in PC12 cells



图3-26 DBDCT染毒对PC12细胞p-JNK和p-p38表达影响的时间效应柱状图

Fig. 3-26 The time-effect histogram of DBDCT on the expression levels of p-JNK and p-p38 in PC12 cells.

Western blot实验结果表明，随DBDCT染毒剂量增大及暴露时间延长，多

个凋亡相关蛋白的表达都发生显著改变（*p*<0.05, *p*<0.01），证实DBDCT从多通路诱导PC12细胞凋亡。

### 3 实验讨论

#### 3.1 DBDCT 对线粒体跨膜电位（△Ψm）的影响

大量研究表明线粒体与细胞凋亡密切相关，线粒体膜屏障功能的破坏是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件，发生在细胞核凋亡特征（染色质浓缩、

DNA断裂）出现之前。△Ψm 是电子传递过程中所释放的能量将基质内的质子泵出线粒体内膜外，从而在线粒体内膜两侧产生的电化学梯度。线粒体内外膜之间含有与细胞凋亡密切相关的蛋白质如Cyt-*c*及凋亡诱导因子（apoptosis inducing factor, AIF），它们的释放需要△Ψm的改变，而一旦△Ψm崩溃，则凋亡相关蛋白大量释放，细胞凋亡不可逆转[125-127]。

JC-1是一种广泛用于检测△Ψm的理想荧光探针。JC-1有单体和多聚体两种存在状态，在△Ψm较高时，JC-1聚集在线粒体的基质（matrix）中，形成聚合物（J-aggregates），可以产生红色荧光；在△Ψm较低时，JC-1 不能聚集在线粒体的基质中，此时JC-1 为单体（monomer），可以产生绿色荧光。常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件。通过JC-1从红色荧光到绿色荧光的转变可以很容易地检测到细胞膜电位的下降，同时也可以用JC-1从红色荧光到绿色荧光的转变作为细胞凋亡早期的一个检测指标[128, 129]。

本实验结果显示DBDCT与△Ψm变化呈现剂量效应及时间效应负相关，说明随着DBDCT染毒剂量的增加和暴露时间的延长，△Ψm显著下降，可以导致细胞凋亡不可逆转的发生。

#### 3.2 DBDCT 对细胞内活性氧（ROS）水平的影响

活性氧自由基（ROS）包括超氧阴离子、过氧化氢及轻自由基等，主要在细胞线粒体内产生。正常生理条件下，机体ROS的产生和清除保持动态平衡，因此细胞内氧化还原状态也维持相对稳定。当机体受到外界各种氧化因子的刺激，体内化学性质活泼的自由基就大量产生甚至超出清除限度，此时过量的自由基与体内的生物大分子如蛋白质、核酸等发生反应，造成生物大分子失活和生物膜脂质过氧化，导致细胞功能障碍、变性坏死。大量研究表明内源性ROS的增多可导致细胞凋亡的发生[130]。其引起细胞凋亡最重要的途径是诱发DNA 损伤，

ROS也能激活caspases级联反应，导致细胞凋亡。

DCFH-DA 是迄今为止最常用、最灵敏的细胞内活性氧检探针。本身没有荧光的DCFH-DA可穿过细胞膜进入细胞，在胞内转化生成DCFH。在ROS存在的条件下，DCFH被氧化生成荧光物质DCF，绿色荧光强度与细胞内活性氧水平成正比。

本研究结果表明DBDCT暴露可导致PC12细胞中ROS水平的明显升高，存在一定的剂量效应和时间效应关系，推测DBDCT对PC12细胞线粒体造成损伤。与PI/Annenxin V-FITC双染凋亡率结果结合分析，ROS水平与凋亡率的变化趋势总体上保持一致，都表现为随DBDCT染毒剂量的增加和暴露时间的延长而升高。第二章体内实验结果也证实DBDCT可有效导致大鼠脑组织DNA损伤和氧化损伤，且两者呈现明显的相关性，因此研究者认为DBDCT导致的氧化损伤是其导致DNA损伤的可能原因。

#### 3.3 Bcl-2和Bax参与DBDCT诱导的PC12细胞凋亡

Bcl-2家族蛋白在调节神经系统细胞凋亡中起到重要作用[131, 132]。Bcl-2家族蛋白根据其结构和功能可分为两类，其一是像Bcl-2一样具有抑制凋亡作用抑制凋亡蛋白，例如Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-w和Mcl-1；其二具有促进凋亡功能的蛋

白，包括 Bax、Bak、Bok、Bcl-XS、Bim、Bid、Bad、DP5/Hrk、Puma、Noxa

等[133, 134]。细胞是否产生凋亡主要取决于Bcl-2 家族中各类蛋白的平衡。

原癌基因Bcl-2（B细胞淋巴瘤/白血病-2，B cell lymphoma/lewkmia-2）是一种26 kDa的细胞内膜相关蛋白，1984年Tsujimoto由淋巴瘤病人的B淋巴细胞中首次发现[135]，1986年Cleary等[136]克隆出其cDNA. Bcl-2是目前最受关注的凋亡相关基因之一。Bcl-2 蛋白定位于线粒体膜、内质网和核膜孔周围，已有实验证明其的大量表达能够抑制多种因素引起的细胞凋亡[137]，如阻止细胞毒素刺激后由于Cyt-*c*从线粒体释放而诱发的caspase级联反应及凋亡[138]。此外Bcl-2虽然本身不表现抗氧化功能，但可间接增加细胞内内源性抗氧化剂（例如：GSH 或SOD）的活性和水平[139]。因此，bcl-2的过表达能够抑制ROS的生成，抑制脂质过氧化[140-143]。

Bax（Bcl相关X蛋白, Bcl-associated X protein）是bcl-2的同源基因表达产物，具有促进凋亡作用，可以形成线粒体穿透性转移孔，而Cyt-*c*可以从此孔中释放入胞浆并与Apaf-1结合，参与caspase9的激活从而激活caspase级联通路导致细胞凋亡[144]。Bax还可与bcl-2接合形成异二聚体，从而破坏它们的细胞保护作用，诱导Cyt-*c*从线粒体内的释放[145, 146]。Bax和Bcl-2表达量的比值可决定细胞是否发生凋亡。在凋亡刺激信号作用下，Bax/Bcl-2比值高的细胞较Bax/Bcl-2 比值低的细胞更易发生凋亡。

本实验发现随DBDCT 染毒剂量的增加和暴露时间的延长，ROS 水平增高，

Bax/Bcl-2比值增高，这很有可能是DBDCT造成神经细胞凋亡的原因之一。

#### 3.4 线粒体途径在DBDCT诱导PC12细胞凋亡中的作用

Newmeyer 通过对无细胞体系的研究表明，仅在线粒体匀浆存在时细胞核才可能出现凋亡样改变，从而发现线粒体在凋亡进程中的重要作用[147]。前面讨论中已经指出在细胞凋亡的三条途径中，线粒体途径起到关键作用。Cyt-*c* 从线粒体渗透性转移孔释放入胞质后，首先在dATP/ATP存在的条件下与APaf-1结合形成凋亡复合体，进而聚集并活化pro-caspase-9，活化的caspase-9能进一步活化caspase-3，最终导致凋亡的发生[148]。

Caspase（半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶，cysteinyl aspartate specific

proteinase）是一组存在于细胞质中具有类似结构的蛋白酶，能够在靶蛋白的特异天冬氨酸残基部位进行切割。Caspases 的活化是凋亡过程中重要且不可逆转的，在正常生理条件下，caspases 家族蛋白通常以无活性的前体形式存在，根据其pro-domains的大小分为long pro-domains（包括caspase-1、2、4、5、9、11、

13)和short pro-domains（包括caspase-3、6、7、14）两类，前者被称为initiator

caspases而后者则被称为effector caspases[149]。凋亡过程中最为重要的是caspase-3，是caspases家族中最重要的凋亡执行者（executioner），在凋亡的执行阶段，负责对全部或部分关键性蛋白进行酶切（激活或灭活）。

本实验结果表明，随DBDCT染毒剂量的增加和暴露时间的延长，线粒体内Cyt-*c*含量下降，胞质中Cyt-*c*含量增加，且caspase-3及caspase-9均出现越来越显著地剪切活化条带。又有研究表明，DNA 损伤诱导的细胞凋亡绝大部分是通过依赖线粒体的信号通路来实现的。因此推测本实验条件下，DBDCT激活PC12细胞的线粒体途径，引起的ROS过度生成、损伤细胞DNA是造成神经细胞凋亡的原因之一。

#### 3.5 MAPK家族在DBDCT诱导PC12细胞凋亡中的作用

丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinases, MAPK）属于丝氨酸/苏氨酸（Ser/Thr）蛋白激酶，广泛存在于所有真核生物细胞的胞浆内，通过对Ser/Thr的双重磷酸化修饰将上游信号传递至下游，是真核生物信号传递网络中的重要途径之一，对基因表达、细胞周期运行和细胞质功能具有重要调控作用。目前在真核细胞中已确定的MAPK信号通路包括以下五条：细胞外调节蛋白激酶（ERK1/2）通路、*c*-Jun氨基末端激酶（JNK）通路、p38 通路、ERK3/ERK4通路及ERK5通路，不同的MAPK信号通路执行着不同的生理功能，其中，ERK主要传递多肽类丝裂原刺激的细胞内信号，与细胞增殖反应关系密切；而 JNK与p38则主要介导应激刺激及细胞因子导致的细胞凋亡、分化及炎性反应的重要细胞内信号转导途径。

JNK信号转导通路是MAPK通路的一重要分支，它在细胞周期、生产、凋

亡和细胞应激等多种生理和病理过程中起重要作用。当酪氨酸和苏氨酸残基发生磷酸化后，JNK可被激活。JNK可以受各种各样的细胞外刺激（如生长因子、细胞因子、热休克、高渗透压、紫外线照射等）而激活。JNK 激活能通过激活内源性通路，使Bcl-2和Bcl-XI活化，参与促凋亡分子的释放（如从线粒体释放Cyt-*c*），从而导致caspase的激活和细胞凋亡[150-152]。

p38MAPK是1993年发现的一类MAPK信号通路，存在于胞浆中，是信号从细胞表面转导到细胞核内的重要传递着，可以在各种刺激如应激（热休克、紫外线照射、缺血再灌注等）、细胞因子（如IL-1、TNF-α等）及G蛋白偶联受体等的作用下被磷酸化激活，激活后胞浆中的p38MAPK移位到细胞核，从而可以参与转录调控、细胞骨架重排、细胞因子生成及细胞凋亡。在神经系统中，

p38MAPK 通路参与神经细胞的存活、分化和发育过程，但其最主要的功能体现在炎性反应和诱导凋亡中[153-155]。

本实验结果表明，随DBDCT染毒剂量的增加和暴露时间的延长，p-JNK和p-p38的表达显著增加，因此推测本实验条件下，DBDCT激活PC12细胞的MAPK信号传导通路，也是造成神经细胞凋亡的原因。

### 4 小结

体外培养PC12细胞模拟神经细胞，研究DBDCT诱导PC12细胞凋亡的信号传导通路。实验结果表明随DBDCT染毒剂量的增加和暴露时间的延长，△Ψm显著下降、ROS水平的明显升高、Bax/Bcl-2比值增高、线粒体内Cyt-*c*含量下降、胞质中Cyt-*c*含量增加、caspase-3及caspase-9均出现越来越显著地剪切活化条带、且p-JNK和p-p38的表达显著增加，揭示DBDCT可通过增加脂质过氧化、破坏Bcl-2家族蛋白表达平衡、损伤细胞线粒体功能等诱发线粒体凋亡途径导致细胞凋亡，同时MAPK信号通路也参与其中。

## 三、 本章小结

本章以PC12细胞为研实验对象，研究其在DBDCT不同染毒剂量及不同暴露时间后细胞及分子水平的变化，具体可归纳如下：

1. DBDCT抑制PC12细胞的增殖，24小时的IC50值为4.110μmol/L；

2. DBDCT明显改变PC12细胞的形态，诱导产生凋亡样形态变化；

3. 流式细胞术、琼脂糖凝胶电泳技术及RT-PCR技术均证实DBDCT对PC12

细胞有明确的诱导凋亡作用；

4. DBDCT可对PC12细胞DNA产生明显损伤、升高ROS水平，推测氧化应激及DNA损伤均可能是凋亡发生的诱因；

5. DBDCT可导致PC12细胞Bax/Bcl-2比值上升，表明Bcl-2家族参与了

DBDCT诱导的PC12细胞凋亡；

6. DBDCT暴露可导致PC12细胞胞质中Cyt-*c*水平的升高、caspase-9及caspase-3活化，表明Cyt-*c*、caspase-9和caspase-3在DBDCT诱导的PC12细胞凋亡中起到了重要作用。

7. DBDCT暴露可导致PC12细胞中p-JNK和p-p38表达增高，提示MAPK家族也参与到DBDCT诱导PC12细胞凋亡的过程之中。

主要结论

1、本研究建立了测定血液及组织样品中锡含量的原子荧光光谱法。血液/组织在

0-20.0μg/L范围内相对标准偏差均在10%以下，回收率均在93~104%之间，说明本定量方法仪器条件适合，定量准确，精密度高，操作方便，且样品处理过程简便，是测定生物样品中锡含量的可行方法。

2、通过AFS测定大鼠单次静脉注射DBDCT后的毒代动力学参数，实验结果表明，血中锡浓度随时间变化符合二室模型，其中分布半衰期*t*1/2α为49.977min、消除半衰期*t*1/2β为1.260min、表观分布容积*V*c为8.201(μg/mL) /(mg/kg)、曲线下面积AUC为56.073(mg/kg) min、清除率Cl为0.297μg/mL/min/(mg/kg)。

3、以AFS测定大鼠单次静脉注射毒性剂量DBDCT后的组织分布，结果表明

DBDCT 分布迅速，但锡浓度维持时间较短，其中肾上腺中锡浓度最高，其余组织中锡浓度相似；24h 后各组织器官几乎均检测不到锡元素，其在主要组织器官中不易蓄积；脑组织中能检测到少量锡元素，120分钟内浓度不小于0.10μg/g，表明DBDCT可以透过血脑屏障，分布于脑内，为下一步研究其神经毒性提供理论依据。

4、本实验以大鼠为体内研究对象，探讨多次静脉注射后DBDCT对整体动物的影响，主要表现为影响大鼠体重增长和一般生长发育；改变大鼠血清中多种生化指标，表现出显著地肝脏及肾脏毒性；降低大鼠脑组织中抗氧化系统的活性，增强脑组织脂质过氧化反应，对神经系统造成损伤；能够引起肝脏及脑组织病理损伤；改变脑内多种凋亡相关蛋白的表达，说明DBDCT在一定程度上通过诱导神经细胞凋亡对大鼠脑组织神经系统造成损害。

5、本实验以PC12细胞为体外研实验对象，探讨DBDCT不同浓度染毒及不同时间暴露后对PC12细胞及分子水平的影响，实验结果显示具体可归纳如下：抑制PC12细胞的增殖，24小时的IC50值为4.110μmol/L；明显改变PC12细胞的形态，诱导产生凋亡样形态变化；流式细胞术、琼脂糖凝胶电泳技术及RT-PCR技术均证实DBDCT对PC12细胞有明确的诱导凋亡作用。

6、本实验采用分子生物学经典研究手段探讨DBDCT诱导神经细胞凋亡的可能机制，结果揭示：DBDCT可对PC12细胞的DNA产生明显损伤、升高ROS水平，推测氧化应激及DNA损伤均可能是凋亡发生的诱因；DBDCT暴露可引起PC12细胞中Bax/Bcl-2比值上升，证实Bcl-2家族参与了DBDCT诱导的PC12细胞凋亡；DBDCT导致暴露可PC12细胞Cyt-*c*从线粒体内释放入胞质，也诱发caspase-9及caspase-3活化，证实线粒体凋亡途径在DBDCT诱导的PC12细胞凋亡中起关键作用；DBDCT暴露可导致PC12细胞中p-JNK和p-p38表达增高，提示MAPK家族也参与到DBDCT诱导PC12细胞凋亡的过程之中。

参考文献

[1] Kannan K, Tanabe S, Tatsukawa R. Occurrence of butyltin residues in certain foodstuffs． Bull Environ Contam Toxico, 1995, 55: 510-516

[2] J B Nielsen, J Strand. Butyltin compounds in human liver． Environmental Research Section A, 2002, 88: 129-133

[3] E Tessier, D Amouroux, OFX Donard. Volatile organotin compounds (butylmethyltin) in three European estuaries (Gironde, Rhine, Scheldt). Biogeochemistry, 2002, 59: 161-181

[4] Sarah Maillefer, Corinne R. Lehr, William R. Cullen. The analysis of volatile trace compounds in landfill gases, compost heaps and forest air. Applied Organometallic Chemistry, 2003, 17(3): 154-160

[5] Abdel-Dah Sadiki, David T. Williams. A study on organotin levels in Canadian drinking water distributed through PVC pipesa. Chemosphere, 1999, 38(7): 1541-1548

[6] S Takahashi, H Mukai, S Tanabe, K Sakayama, T Miyazaki, H Masuno[.](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749199000688) Butyltin residues in livers of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. Environmental Pollution, 1999, 106(2): 213-218

[7] 江桂斌. 国内外有机锡污染研究现状. 卫生研究, 2001, 30(1): 1-3

[8] John D. Robertson, Sten Orrenius. Role of mitochondria in toxic cell death. Toxicology, 2002, (181-182): 491-496

[9] Scott M. Jenkins, Kimberly Ehmanb, Stanley Barone Jr. Strcture-activity comparison of organotin species: dibutyltin is a developmental neurotoxicant in vitro and in vivo. Developmental Brain Research. 2004, 151: 1-12

[10] William R. Mundy, Theresa M. Freudenrich. Apoptosis of cerebellar granule cells induced by organotin compounds found in drinking water: Involvement of MAP kinases. NeuroToxicology. 2006, 27: 71-81

[11] Philbert M. A., M. L. Billingsley, K. R. Reuhi. Mechanisms of injury in the central nervous system. Toxicol pathol, 2000, 28(l): 43-53

[12] Snoeij N. J., A. H. Penninks, W. Seinen. Biological activity of organotin compounds-an overview. Environ Res, 1987, 44(2): 335-353

[13] Riley A. L., R. J. Dacanay, J. P. Mastro Paolo. The effeets of trimethyltin chloride on the acquisition of long delay conditioned taste aversion learning in the rat. Neurotoxicology, 1984, 5(2): 291-295

[14] A. W. Brown, W. N. Aldridge, B. W. Street, R. D. Verschoyle. The behavioral and neuropathologic sequelae of intoxication by trimethyltin compounds in the rat. Am J pathol, 1979, 97(l): 59-82

[15] Katharina Krüger, Victoria Diepgrond, Maria Ahnefeld, Christina Wackerbeck, Michael Madeja, Norbert Binding, Ulrich Musshoff. Blockade of glutamatergic and GABAergic receptor channels by trimethyltin chloride. Br J pharmacol, 2005, 144(2): 283-292

[16] Moser VC. Rat strain-and gender-related differences in neurobehavioral screening: acute trimethyltin neurotoxicity. J Toxicol Environ Health, 1996, 47(6): 567-586

[17] Zhenghong Zuo, Jiali Cai, Xinli Wang, Bowen Li, Chonggang Wang, Yixin Chen. Acute administration of tributyltin and trimethyltin modulate glutarnate and N-methyl-D-aspartate receotor signaling pathway in Sebastiscus marmoratus. Aquat Toxicol, 2009, 92(l): 44-49

[18] Jiliang Zhang, Zhenghong Zuo, Rong Chen, Yixin Chen, Chonggang Wang. Tributyltin exposure causes brain damage in Sebastiscus martnoratus. Chemosphere, 2008, 73(3): 337-343

[19] Makoto Ema, Katsuhiro F.. Developmental of dibutyltin dichloride in cynomolgus monkeys. Reproductive Toxicology. 2006, 9, 1-8

[20] 王佩丽, 陈卫杰, 任引津. 急性三烷基锡中毒的研究进展. 劳动医学, 2000, 17(1): 38-39

[21] R. Besser, G. Krämer, R. Thümler, J. Bohl, L. Gutmann, H. C. Hopf. Acute trimethyltin limbic- cerebellar syndrome. Neurology, 1987, 37(6): 945-950

[22] Eyer C. L., C. Rio, J. R. Smith. Trimethyltin reduces ATP levels and MTT reduction in the LRM55 rat astroeytoma cell line. In Vitr Mol Toxicol, 2000, 13(4): 263-268

[23] Aschner M., M. Garmon, H. K. Kimelberg. Interactions of trimethyltin (TMT)

With rat primary astroeyte cultures: altered uptake and efflux of rubidium,

L-glutamate and D-aspartate. Brain Res, 1992, 582(2):181-185

[24] Dawson R., Jr. T. A. Patterson, B. EPPler. Endogenous exeitatory amino acid release from brain slices and astroeyte cultures evoked by trimethyltin and other neurotoxic agents. Neuroehem Res, 1995, 20(7): 847-858

[25] C. A Kassed, T. L Butler, M. T Navidomskis, M. N Gordon, D Morgan, K. R Pennypacker. Mice expressing human mutant presenilin-1 exhibit decreased activation of NF-kappaB p50 in hippocampal neurons after injury. Brain Res Mol BrainRes, 2003, 110(l): 152-157

[26] Yusuke Nakatsu, Yaichiro Kotake, Kazuya Komasaka, Hiroko Hakozaki, Ryota Taguchi, Toshiaki Kume, Akinori Akaike, Shigeru Ohta. Glutamate excitotoxicity is involved in cell death caused by tributyltin in cultured rat cortical neurons. Toxicol Sci, 2006, 89(l): 235-242

[27] Konno N., Masashi T., Ken N., Yang Liu. Effeet of tributyltin on the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the mouse brain. Arch Toxicol, 2001.75(9): 549-554

[28] Collin E. Davidson, Brian E. Reese, Melvin L. Billingsley, Jong K. Yun. Stannin, a protein that localizes to the mitochondria and sensitizes NIH-3T3 cells to trimethyltin and dimethyltin toxicity. Mol Pharmacol, 2004, 66(4): 855-863

[29] Poh Loh Kok, Hong Huang Shan, De Silva Ranil, H. Tan, Benny K.; Zhun Zhu, Yi. Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. Curr Alzheimer Res, 2006, 3(4): 327-337

[30] Yunlan L., Jinjie L., Qingshan L. Mechanisms by Which the Antitumor Compound Di-n-Butyl-Di-(4- Chlorobenzohydroxamato) Tin(IV) Induces Apoptosis and the Mitochondrial- Mediated Signaling Pathway in Human Cancer SGC-7901 Cells. Mol. Carcinogen, 2010, 49: 566-581

[31] Li Tang, Yun-lan Li, Rui Ge, Qing-shan Li. Oxidative stress in di-n-butyl-di-(4-chlorobenzohydroxamato) tin (IV) -induced hepatotoxicity determined by proteomic profiles. Toxicology Letters, 2012, 213: 167-173

[32] 袁守军. 当前新药毒代动力学(TK)的研究概况与不足. 毒理学杂志, 2007,

21(4): 297-298

[33] 中华人民共和国国家职业卫生标准GBZ 2-2002. 工作场所有害因素职业接触限值.

[34] 周群芳, 江桂斌. 气相色谱法在有机锡化合物形态分离与定中的应用. 分析科学学报, 2002, 18(3): 240-246

[35] 赵孔祥, 赵云峰, 付武胜, 吴永宁. 气相色谱-脉冲火焰光度法测定水产品中有机锡的研究. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(2): 130-135

[36] NIEA T504.30B毒性化学物质有机锡类化合物于纺织品之检测方法-气相层析法(GC/PFPD或GC/FPD). [S]

[37] W. M. R. Dirkx, R. Łobński, F. C. Adams. Speciation analysis of organotin by GC-AAS and GC-AES after extraction and derivatization. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry. 1995, 17: 357-409.

[38] 徐福正, 江桂斌, 韩恒斌. 气相色谱与原子吸收联用及其在有机锡化合物形态分析中的应用. 分析化学, 1995, 11: 1308-1312

[39] 黄国兰, 孙红文, 戴树桂. 巯基棉预富集、气相色谱-原子吸收联用技术测定水样中丁基锡化合物. 中国环境科学, 1997, 17(3): 283-286

[40] C. Carlier-Pinasseau, G. Lespes, M. Astruc. Determination of butyl- and phenyltin compounds in sediments by GC-FPD after NaBEt4 ethylation. Talanta, 1997, 44(7): 1163-1171

[41] 李艳明, 胡勇杰, 刘金华, 郭玉良, 王桂琴. 气相色谱质谱法测定纺织助剂中的有机锡. 色谱, 2011, 29(4): 353-357

[42] 李英, 李彬, 刘丽, 张琛, 吴景武, 刘志红, 李心恬. 气相色谱-质谱法同时测定聚氯乙烯塑料制品中的10种有机锡化合物. 色谱, 2009, 27(1): 69-73

[43] 付善良, 张莹, 肖家勇, 李拥军, 丁利, 颜鸿飞. 在线凝胶渗透色谱-气相色谱-质谱法测定茶叶中多种有机锡化合物残留. 分析测试技术与仪器, 2010, 16(4): 262-264

[44] 徐琴, 牛增元, 叶曦雯, 孙银峰, 汤志旭. 液相色谱-质谱法对电子电气产品塑料部件中有机锡的测定. 分析测试学报, 2009, 28(11): 1270-1274

[45] X Wang, H Jin, L Ding, H Zhang, H Zhang, C Qu. A Yu. Organotin speciation in textile and plastics by microwave-assisted extraction HPLC–ESI-MS. Talanta, 2008, 75(2): 556-563

[46] O Saida, A Furesi, M P Usai. Analytical methods HPLC-ICP-MS for organotin quantification in coastal sediment of Sardinia. Toxicology Letter, 2011, 205(supp): 134-135

[47] Z Yu, J Sun, M Jing, X Cao, F Lee, X Wang. Determination of total tin and organotin compounds in shellfish by ICP-MS. Food Chemistry, 2010, 119(1): 364-367

[48] 荆淼, 于振花, 王小如, 黎先春, 陈登云. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱技术测定海水中锡化学形态. 分析化学, 2008, 8(2): 235-237

[49] GBZ/T 160. 22-2004. 工作场所空气中锡及其化合物的测定方法[S]．

[50] 牛晓梅. 工作场所空气中锡L-半胱氨酸-原子荧光测定法. 职业与健康, 2011, 27(7): 773-774

[51] 丛梅梅, 边疆, 张丽薇, 郭淑英. HG-AFS同时测定供水材料浸泡液中痕量锡和锑. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(7): 1500-1501

[52] 朱力, 刘裕婷. 氢化物-原子荧光光谱法连续测定饮料中的砷、锡、锑. 环境与职业医学, 2009, 26(5): 519-521

[53] 张钦龙, 高舸. 氢化物发生原子荧光光谱法测定工作场所空气中锡. 中国测试, 2009, 35(1): 122-124

[54] Igarashi T, Sekido T. Case studies for statistical analysis of toxicokinetic data. Regul Toxicol Pharmacol, 1996, 23(3): 193-208.

[55] Van Bree J. Application of sparse sampling approaches in rodent toxicokinetics: prospective view. Drug Inf J, 1994, 28: 263-279

[56] 王庆利. 新药非临床研究与评价中应关注的问题. 中国新药杂志, 2012, 21(6): 592-595

[57] 李云兰. 二-4-氯苯甲酰异羟肟酸-二正丁基合锡（DBDCT）的药代动力学和抗癌作用机制研究: [博士学位论文]. ft西: ft西医科大学, 2008

[58] Sjöberg P. Toxicokinetics in preclinical safety assessment-views from the Swedish medical products agency. Drug Inf J, 1994, 28: 151-157

[59] M. J. Saary, R. A. House. Preventable exposure to trimethyl tin chloride: a case report. Occup Med(Lond), 2002, 52(4): 227-230

[60] Izabela Figiel, Anna Fiedorowicz. Trimethyltin-Evoked Neuronal Apoptosis and Glia Response in Mixed Cultures of Rat Hippocampal Dentate Gyrus: A New Model for the Study of the Cell Type-Specific Influence of Neurotoxins. Neurotoxicology, 2002, 23(l): 77-86

[61] 刘慧刚, 许立红. 三丁基锡毒性作用生物标记研究进展. 中华预防医学杂志, 2005, 39(4): 288-289

[62] Hesham S. elsabbagh, Said. Z. moussa, Osama S. el-tawil. Neurotoxicologic sequelae of tributyltin intoxication in rats. Phamacol Res, 2002, 45(3): 201-206

[63] 吕华东, 林麒. 有机锡污染及其毒性作用研究现状. 海峡预防医学杂志, 2007, 13(3): 27-29

[64] J. G. Vos, A. De Klerk, E. I. Krajnc, H. Van Loveren, J. Rozing. Immunotoxicity of Bis(tri-n-butyltin) oxide in the rat: Effects on thymus-dependent immunity and on nonspecific resistance following long-term exposure in young versus aged rats. Toxicol Appl pharmacol, 1990, 105(l): 144-155

[65] H Tryphonas, G Cooke, D Caldwell, G Bondy, M Parenteau, S Hayward, O Pulido. Oral (gavage), in utero and post-natal exposure of Sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride: Part II: effects on the immune system. Food Chem Toxicol, 2004, 42(2): 221-235

[66] Margaret M. Whalen, Bommanna G. Loganathan. Butyltin Exposure Causes a Rapid Decrease in Cyclic AMP Levels in Human Lymphocytes. Toxicol Appl Pharmac, 2001, 171(3): 141-148

[67] Ítalo Braga de Castro, Carlos Augusto Oliveira de Meirelles, Helena Matthews-Cascon, Cristina de Almeida Rocha-Barreira, Pablo Penchaszadeh, Gregório Bigatti. Imposex in endemic volutid from Northeast Brazil (Mollusca: Gastropoda). Braz. arch. biol. Technol, 2008, 51(5): 1065-1069

[68] Toshihiro Horiguchi, Hiroaki Shiraishi, Makoto Shimizu, Masatoshi Morita.

Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, Thais clavigera. J Environ Monit, 1999, 1(3): 233-238

[69] I. M. Davies, A. Minchin, B. Bauer, M. J. H. Harding, D. E. Wells. QUASIMEME laboratory performance study of the biological effects of tributyltin (imposex and intersex) on two marine gastropod molluscs. J Environ Monit, 1999, 1(3): 233-238

[70] Jiliang Zhang, Zhenghong Zuo, Yixin Chen, Yang Zhao, Shuai Hu, Chonggang Wang. Effect of tributyltin on the development of ovary in female cuvier (Sebastiscus marmoratus). Aquat Toxicol, 2007, 83(3): 174-179

[71] M. M. Santos, J. Micael, A. P. Carvalho, R. Morabito, P. Booy, P. Massanisso, M. Lamoree, M. A. Reis-Henriques. Estrogens counteract the masculinizing effect of tributyltin in zebrafish. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2006, 142(l-2): 151-155.

[72] Chonggang Wang, Yang Zhao, Ronghui Zheng, Xin Ding, Wei Wei, Zhenghong Zuo, Yixin Chen. Effects of tributyltin, benzo[a] pyrene, and their mixture on antioxidant defense systems in Sebastiscus marmoratus. Bull Environ Contam Toxicol, 2005, 75(6): 1214-1219

[73] Yohei Shimasaki, Takeshi Kitano, Yuji Oshima Suguru Inoue, Nobuyoshi Imada, Tsuneo Honjo. Tributyltin causes masculinization in fish. Environ Toxicol Chem, 2003, 22(l): 141-144

[74] Brian G. McAllister, David E. Kime. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (Danio rerio). Aquat Toxicol, 2003, 65(3): 309-316

[75] Zhaobin Zhang, Jianying Hu, Huajun Zhen, Xiaoqin Wu, Chong Huang. Reproductive Inhibition and Transgenerational Toxicity of Triphenyltin on Medaka (Oryzias latipes) at Environmentally Relevant Levels. Environmental Seience and Technology, 2008, 42(21): 8133-8139

[76] 梁淑轩, 孙汉文. 有机锡的环境污染及监测方法研究进展. 环境与健康杂志, 2004, 21(6): 425-427

[77] 栗学军, 朱健. 二月桂酸二丁基锡对大鼠肝脏毒性作用. 中国公共卫生, 2006, 22(4): 451-452.

[78] 朱舜. 急性有机锡中毒58例. 中国劳动卫生职业病杂志, 2006, 24(10): 623-624

[79] 唐小江, 黄建勋. 三甲基氯化锡引发低血钾症动物模型的研究. 中国职业医学, 2001, 28(1): 6-8

[80] 王春华, 梁友信. 二月桂酸二丁基锡对职业接触工人健康的影响. 蚌埠医学院学报, 1997, 22(2): 118-119

[81] Hara K, Yoshizuka M, Fujimoto S. Toxic effects of bis (tributyltin) oxide on the synthesis and secretion of zymogen granules in the rat exocrine pancreas. Arch Histol Cytol, 1994, 57(3): 201-212

[82] Kawahara T, Cader S, Douglas D, Nourbakhsh M, Pu C, Kneteman M, Lewis J, Churchill T, Yagita H, Kneteman N. Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor and Anti-Death Receptor Agonistic Antibody: a Novel Combination Therapy for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma: 1935. Transplantation, 2012, 94: 635

[83] Nayak Sunil, Baghel R. P. S, Nayak Anju. Effect of heat treated rock phosphate without and with Phytase instead of Dicalcium Phosphate on serum enzyme activity and mineral concentration in starter chicks. Journal of Animal Research, 2012, 2(1): 61-66

[84] K. Zahra, M. A. Malik, M. S. Mughal, M. Arshad, M. I. Sohail. Hepatoprotective role of extracts of momordica charantial in acetaminophen-induced toxicity in rabbits. The Journal of Animal & Plant Sciences, 2012, 22(2): 273-277

[85] 郭宏, 周晓燕, 王雪, 翟木绪. 高尿酸血症对非酒精性脂肪肝肝损害程度的影响. 中华临床医师杂志, 2012, 6(11): 2974-2977

[86] Yi Shao, Zhi-Jie Shen, Yi-Yong Zhu, Xiao-Wen Sun, Jun Lu, Shu-Jie Xia. Fluid-electrolyte and renal pelvic pressure changes during ureteroscopic lithotripsy. Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies, 2012, 21(4): 302-306

[87] Ling Ye, Ken-Tye Yong, Liwei Liu, Indrajit Roy, Rui Hu, Jing Zhu, Hongxing Cai, Wing-Cheung Law, Jianwei Liu, Kai Wang, Jing Liu, Yaqian Liu, Yazhuo Hu,

Xihe Zhang, Mark T. Swihart, Paras N. Prasad. A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. Nature Nanotechnology, 2012, 7: 453-458

[88] Ru-Ping Lee[a](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1016319012000419), Chung-Jen Lee[b](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1016319012000419), Yi-Maun Subeq, Tai-Chu Peng, Fwu-Lin Yang, Bang-Gee Hsu. Erythropoietin ameliorates severe hemorrhagic shock-induced serum proinflammatory cytokines and biochemical changes in spontaneously hypertensive rats. [Tzu Chi Medical Journal](http://www.sciencedirect.com/science/journal/10163190), 2012, 24(2): 46-50

[89] Zeng M, Li Y, Jiang Y, Lu G, Huang X, Guan K. Local and systemic oxidative stress status in chronic obstructive pulmonary disease patients. Can Respir J. 2013, 20(1): 35-41.

[90] Guilin Cheng, Wei Guo, Lu Han, Erlei Chen, Lingfang Kong, Lili Wang, Wenchao Ai, Naining Song, Haishan Li, Huiming Chen. Cerium oxide nanoparticles induce cytotoxicity in human hepatoma SMMC-7721 cells via oxidative stress and the activation of MAPK signaling pathways. [Toxicology in Vitro](http://www.sciencedirect.com/science/journal/08872333), 2013, 27(3): 1082-1088

[91] Qiu J, Li W, Feng S, Wang M, He Z. Transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates cerebral ischemia and reperfusion injury by inhibiting neuronal apoptosis, oxidative stress and nuclear factor-κB expression. International Journal of Molecular Medicine, 2013, 31(1): 91-98

[92] Agrawal Anant MS, Godar Dianne E. Simultaneous Detection and Semiquantification of DNA Damage in Normal and Apoptotic Cells: Triple-Immunofluorescent Labeling Using DAPI, Antibodies, and TUNEL. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2012, 20(4): 402-409

[93] Sharma R, Masaki J, Agarwal A. Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay. Methods Mol Biol, 2013, 927: 121-136

[94] D. A. Paduch, A. Bolyakov, J. Kiper, J. Bazarnik. Men older than 34 have increased risk of sperm chromatin damage in ejaculated sperm as measured using tunel assay. Fertility and Sterility, 2012, 98(3 Suppl): S242

[95] D. Paduch, A. Bolyakov, J. Kiper, J. Bazarnik, A. Mehta, M. Goldstein. Rejection treshholds and seasonal variability of epifluorescent sperm tunel assay.

Fertility and Sterility, 2012, 98(3 Suppl): S24[9](http://www.fertstert.org/article/S0015-0282(12)01640-8/abstract)

[96] J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239-257

[97] John F. R. Kerr, Clay M. Winterford, Brian V. Harmon. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer, 1994, 73(8): 2013-2026

[98] R. V. Rao, H. M. Ellerby, D. E. Bredesen. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Cell Death and Differentiation, 2004, 11: 372-380

[99] D. Sanges, V Marigo. Cross-talk between two apoptotic pathways activated by endoplasmic reticulum stress: differential contribution of caspase-12 and AIF. Apoptosis, 2006, 11: 1629-1641

[100] Satomi Mizuhashi, Yuji Ikegaya, Norio Matsuki. Cytotoxicity of tributyltin in rat hippocampal slice cultures. Neuroscience Research, 2000, 38(1): 35-42

[101] Satomi Mizuhashi, Yuji Ikegaya, Nobuyoshi Nishiyama, Norio Matsuki. Cortical Astrocytes Exposed to Tributyltin Undergo Morphological Changes In Vitro. The Japanese Journal of Pharmacology, 2000, 84(3): 339-346

[102] Lucio G, Costa. Inhibition ofγ-[3H] aminobutyric acid uptake by organotin compounds in vitro. Toxicology and Applied Pharmacology, 1985, 79(3): 471-479

[103] Ryoji Kurita, Katsuyoshi Hayash, Keiichi Torimitsu, Osamu NIWA. Continuous Measurement of Glutamate and Hydrogen Peroxide Using a Microfabricated Biosensor for Studying the Neurotoxicity of Tributyltin. Analytical sciences, 2003, 19(12): 1581-1585

[104] Makoto Ema, Takafumi Itami, Hironoshin Kawasaki. Behavioral effects of acute exposure to tributyltin chloride in rats. Neurotoxicology and Teratology, 1991, 13(5): 489-493

[105] Makoto Ema, Takafumi Itami, Hironoshin Kawasaki. Changes of Spontaneous Motor Activity of Rats After Acute Exposure to Tributyltin Chloride. Drug and Chemical Toxicology, 1991, 14(1-2): 161-171

[106] Anna Teiling Gårdlund, Trevor Archer, Kiki Danielsson, Helena Lindström, Johan Luthman. Effects of prenatal exposure to tributyltin and trihexyltin on

Behaviour in rats. Neurotoxicology and Teratology, 1991, 13(1): 99-105

[107] T. J. Shafer, W. D. Atchison. Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma(PC12) cells: amodelforneurotoxicologicalstudies. Neurotoxicology, 1991, 12(3): 473-492

[108] JoAnne McLaurin, Rivka Golomb, Anna Jurewicz, Jack P. Ante, Paul E. Fraser. Inositol Stereoisomers Stabilize an Oligomeric Aggregate of Alzheimer AmyloidβPeptide and Inhibit Aβ-induced Toxicity. J Biol Chem, 2000, 275(24): 18495-18502

[109] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安, 世界图书出版公司, 2003: 134-144

[110] 房德芳, 王明艳. MTT法及AO/EB荧光染色法分析斑蝥酸钠对HepG2的生长抑制的研究. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(2): 41-42

[111] 曹越. 细胞凋亡的形态学和生物化学特征与基因调控. 青海医学院学报, 2003, 24(1): 44-46

[112] 路艳艳, 杨锦蓉, 王菁. AO/ EB染色法及流式细胞术检测DMF诱导人肝细胞凋亡. 浙江预防医学, 2007, 19(6): 11-14

[113] Kun-zhong ZHANG, Jian-hua XU, Xiu-wang HUANG, Li-xian WU, Yu SU, Yuan-zhong CHEN. Curcumin synergistically augments bcr/abl phosphorothioate antisense oligonucleotides to inhibit growth of chronic myelogenous leukemia cells. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(1): 105-110.

[114] 李国庆, 王三英, 雷小勇, 张琍. MIF抑制剂HA对胃癌细胞株BGC-823 增殖和凋亡的影响. 南华大学学报·医学版, 2009, 37(1): 32-35

[115] 王萍, 宋世震. 氯化锰致PC12细胞凋亡作用及其机制. 中国工业医学杂志, 2008, 21(4): 225-228

[116] 郭丽萍, 王坚, 蒋雨平, 宗鸿亮, 王秋雁, 郭鹏, 顾建新. 胰岛素可抵抗MPP+诱导的PC12细胞的凋亡. 中国临床神经科学, 2004, 12(2): 143-146

[117] 赵吉清, 林海, 吴强, 等. 缺氧PC12细胞中JAK1/STAT1、STAT3介导的信号通路变化. 第三军医大学学报, 2009, 31(5): 391-393

[118] Carsten Scaffidi, Simone Fulda, Anu Srinivasan, Claudia Friesen, Feng Li, Kevin J. Tomaselli, Klaus-Michael Debatin, Peter H. Krammer, Marcus E. Peter. Two

CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. The EMBO Journal, 1998, 17: 1675-1687

[119] Vermes István, Haanen Clemens, Steffens-Nakken Helga, Reutelingsperger Chris. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexine V. Journal of Immunological Methods, 1995, 184(1): 39-51

[120] Vijay R Baichwal, Patrick A Baeuerle[.](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982206000467) Apoptosis: Activate NF-κB or dieCurrBiol, 1997, 7(2): R94-R96

[121] Frank Lezoualc'h, Yutaka Sagara, Florian Holsboer, Christian Behl. High Constitutive NF-κB Activity Mediates Resistance to Oxidative Stress in Neuronal Cells. J Neurosci, 1998, 18(9): 3224-3232

[122] 康敏, 钟德君, 李鹏, 李郁. Fas/FasL信号传导通路对NAFLD大鼠肝细胞凋亡的影响. 重庆医学, 2011, 7: 633-635

[123] Haiyan Wang, Mingzhang Ao, Jiayi Wu, Longjiang Yu. TNFαand Fas/FasL pathways are involved in 9-Methoxycamptothecin-induced apoptosis in cancer cells with oxidative stress and G2/M cell cycle arrest. Food and Chemical Toxicology, 2013, 55: 396-410

[124] Qing Li, Yiping Wang, Yi Wang, Qing Zhou, Ke Chen, Yuan Min Wang, Wei Wei, Yuan Wang. Distinct different sensitivity of Treg and Th17 cells to Fas-mediated apoptosis signaling in patients with acute coronary syndrome. Int J Clin Exp Pathol. 2013, 6(2): 297-307

[125] Kazuomi Sato, Yuji Minai, Hiroyuki Watanabe. Effect of monochromatic visible light on intracellular superoxide anion production and mitochondrial membrane potential of B16F1 and B16F10 murine melanoma cells. Cell Biology International, online

[126] N. Kim, M. O. Ripple, R. Springett. Measurement of the Mitochondrial Membrane Potential and pH Gradient from the Redox Poise of the Hemes of the bc1 Complex. Biophysical Journal, 2012, 102(5): 1194-1203

[127] Linda L. Wu, Darryl L. Russell, Robert J. Norman, Rebecca L. Robker. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Cumulus-Oocyte Complexes Impairs Pentraxin-3 Secretion, Mitochondrial Membrane Potential (ΔΨm), and Embryo

Development. Molecular Endocrinology, 2012, 26(4): 562-573

[128] Jun Ma, Lei Zhang, Shanshan Li, Shulin Liu, Cui Ma, Weiyang Li, J. R. Falck, Vijay L. Manthati, D. Sudarshan Reddy, Meetha Medhora, Elizabeth R. Jacobs, Daling Zhu. 8, 9-Epoxyeicosatrienoic acid analog protects pulmonary artery smooth muscle cells from apoptosis via ROCK pathway. Experimental Cell Research, 2010, 316: 2340-2353

[129] Xiao-juan Zhu, Yan Shi, Jun Peng, Cheng-shan Guo, Ning-ning Shan, Ping Qin, Xue-bin Ji, Ming Hou. The effects of BAFF and BAFF-R-Fc fusion protein in immune thrombocytopenia. Blood, 2009, 114(26): 5362-5367

[130] Czarna M, Jarmuszkiewicz W. Role of mitochondria in reactive oxygen species generation and removal; relevance to signaling and programmed cell death. Postepy Biochem, 2006, 52(2): 145-56

[131] Rizwan S. Akhtar, Jayne M. Ness, Kevin A. Roth. Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1644(2-3): 189-203

[132] Charles A. Harris, Eugene M. Johnson, Jr. BH3-only Bcl-2 Family Members Are Coordinately Regulated by the JNK Pathway and Require Bax to Induce Apoptosis in Neurons. The Journal of Biological Chemistry, 2001, (41): 37754-37760

[133] Reed JC. Bcl-2 family proteins. Oncogene, 1998, 17(25): 3225-3236

[131] Gross A., McDonnell J. M., Korsmeyer S. J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes & Dev., 1999, 13(15): 1899-1911

[135] Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11; 14) chromosome translocation. Science, 1984, 224(4656): 1403-1406

[136] Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14; 18) translocation. Cell, 1986, 47(1): 19-28

[137] David S. Goodsell. The Molecular Perspective: Bcl-2 and Apoptosis. The Oncologist June, 2002, 7(3): 259-260

[138] Yang J., Liu X., Bhalla K., Caryn Naekyung Ki[m](http://www.sciencemag.org/content/275/5303/1129.short), Ana Maria Ibrad[o](http://www.sciencemag.org/content/275/5303/1129.short), Jiyang Ca[i](http://www.sciencemag.org/content/275/5303/1129.short), Tsung-I Pen[g](http://www.sciencemag.org/content/275/5303/1129.short), Dean P. Jones, Xiaodong Wang. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science, 1997, 275(5303): 1129-1132

[139] Hildeman D. A., Mitchell T., Aronow B., Sara Wojciechowski, John Kappler, Philippa Marrack. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. PNAS, 2003, 100(25): 15035-15040

[140] Kim H. E., Yoon S. Y., Lee J. E., Won-Seok Choi[a](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X01954464), Byung K. Jin[b](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X01954464), T. H. Oh[c](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X01954464), George J. Markelonis[c](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X01954464), Sang-Yearn Chun[a](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X01954464), Young J. Oh[a](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X01954464). MPP(+) downregulates mitochondrially encoded gene transcripts and their activities in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 286(3): 659-665

[141] Howard S., Bottino C., Brooke S., Elise Cheng, Rona G. Giffard, Robert Sapolsky. Neuroprotective effects of bcl-2 overexpression in hippocampal cultures: interactions with pathways of oxidative damage. Journal of Neurochemistry, 2002, 83(4): 914-923

[142] Chen D. F., Schneider G. E., Martinou J. C., Susumu Tonegawa. Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. Nature, 1997, 385(6615): 434-439

[143] Bogdanov M. B., Ferrante R. J., Mueller G., Louis E. Ramos[a](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394099000476), Jean-Claude Martinou[c](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394099000476), M. Flint Bea[l](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394099000476). Oxidative stress is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. Neurosci Lett, 1999, 262(1): 33-36

[144] Nutt L. K., Chandra J., Pataer A., Bingliang Fang, Jack A. Roth, Stephen G. Swisher, Roger G. O'Neil, David J. McConkey. Bax-mediated Ca2+ Mobilization Promotes Cytochrome c Release during Apoptosis. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(23): 20301-20308

[145] Putcha G. V., Deshmukh M., Johnson Jr E. M. BAX Translocation Is a Critical Event in Neuronal Apoptosis: Regulation by Neuroprotectants, BCL-2, and Caspases. The Journal of Neuroscience, 1999, 19(17): 7476-7485

[146] Finucane D. M., Bossy-Wetzel E., Waterhouse N. J., Thomas G. Cotter, Douglas

R. Green. Bax-induced Caspase Activation and Apoptosis via Cytochrome c Release

From Mitochondria Is Inhibitable by Bcl-xL. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(4): 2225-2233

[147] Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC. Cell-free apoptosis in Xenopus egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. Cell, 1994, 79(2): 353-364

[148] X. D. Wang. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev., 2001, 15: 2922-2933

[149] Vincent Cryns, Junying Yuan. Proteases to die for. Genes Dev., 1998, 12(11): 1551-1570

[150] Hongjun Du[a](http://www.pnas.org/content/110/6/2377.short), Xufang Sun, Monica Guma, Jing Luo, Hong Ouyang, Xiaohui Zhang, Jing Zeng, John Quach, Duy H. Nguyen, Peter X. Shaw, Michael Karin, Kang Zhang. JNK inhibition reduces apoptosis and neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. PNAS, 2013, 110(6): 2377-2382

[151] Bokyung Sung, Sahdeo Prasad, Jayaraj Ravindran, Vivek R. Yadav, Bharat B. Aggarwal. Capsazepine, a TRPV1 antagonist, sensitizes colorectal cancer cells to apoptosis by TRAIL through ROS–JNK–CHOP-mediated upregulation of death receptors. Free Radical Biology and Medicine, 2012, 53(10): 1977-1987

[152] Giulia Benedetti, Lisa Fredriksson, Bram Herpers, John Meerman, Bob van de Water, Marjo de Graauw. TNF-α-mediated NF-κB survival signaling impairment by cisplatin enhances JNK activation allowing synergistic apoptosis of renal proximal tubular cells. Biochemical Pharmacology, 2013, 85(2): 274-286

[153] Karin J. Jensen, Farshid S. Garmaroudi, Jingchun Zhang, Jun Lin, Seti Boroomand, Mary Zhang, Zongshu Luo, Decheng Yang, Honglin Luo, Bruce M. McManus, Kevin A. Janes[.](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312812004234) An ERK-p38 Subnetwork Coordinates Host Cell Apoptosis and Necrosis during Coxsackievirus B3 Infection. Cell host and microbe, 2013, 13(1): 67-76

[154] Y Liu, J Ge, Q Li, L Gu, X Guo, ZG Ma, YP Zhu. Anisomycin Induces Apoptosis of Glucocorticoid Resistant Acute Lymphoblastic Leukemia CEM-C1 Cells via Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases p38 and JNK. Neoplasma, 2013, 60(1): 101-110

[155] Bangmin Liu, Zhe Jian, Qiang Li[,](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584912002237) Kai Li, Zhiyong Wang, Ling Liu, Lingzhen Tang, Xiuli Yi, Hua Wang, Chunying Li, Tianwen Gao[.](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584912002237) Baicalein protects Human melanocytes from H2O2-induced apoptosis via inhibiting mitochondria-dependent caspase activation and the p38 MAPK pathway. Free Radical Biology and Medicine, 2012, 53(2): 183-193

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 英文缩略词表 |  |
| 缩略符号 | 英文全称 | 中文全称 |
| ALT | Glutamate-pyruvate transaminase | 谷丙转氨酶 |
| ALP | Alkaline phosphatase | 碱性磷酸酶 |
| AO/EB | Acridine orange/ ethylene dibromide | 吖啶橙-二溴乙烷 |
| APS | Ammonium persulfate | 过硫酸铵 |
| AST | Glutamic-oxal(o)acetic transaminase | 谷草转氨酶 |
| AUC | Area under concentration-time curve | 血药浓度-时间曲线下面积 |
| BUN | Blood urea nitrogen | 血尿素氮 |
| Cl | Clearance rate | 清除率 |
| CRE | Serum creatinine | 血清肌酸酐 |

DBDCT

Di-*n*-butyl-(4-chlorobenzohy- droxamato) tin (IV) Chloride

二-（对氯苯甲酰异羟肟酸）-二正丁基合锡

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| DEME | Dulbecco's minimal essential Medium | Dulbecco 最低必需培养基 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲基亚砜 |
| DTT | dithiothreitol | 二硫苏糖醇 |
| FCM | Flow cytometry | 流式细胞术 |
| GGT | Amino Acid γ-Glutamyltrans-ferase | 谷氨酰转肽酶 |
| GSH-Px | Glutathione peroxidase | 谷胱甘肽过氧化物酶 |
| IC50 LD50 | 50%inhibiting concentration  Median lethal dose | 半数抑制浓度  半数致死量 |
| MDA | Malonic dialdehyde | 丙二醛 |
| MTT | Thiazolyblautetrazolium bromide | 四甲基偶氮唑盐 |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis | 聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| PC12 | Rat pheochromocytoma cell line | 大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞 |
| PI | Propichium iodide | 碘化丙啶 |
| RE | Relative error | 相对误差 |
| ROS | Reactive oxygen species | 活性氧 |
| RSD | Relative standard deviation | 相对标准偏差 |

RT-PCR

Reverse transcription-polymerase chain reaction

反式逆转录聚合酶链反应

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| SD | Standard deviation | 标准偏差 |
| SDS | Sodium dodecyl sulphate | 十二烷基磺酸钠 |
| SOD | Superoxide dismutase | 超氧化物歧化酶 |
| STB | Serum total bilirubin | 总胆红素 |
| *t1/2* | Half life | 半衰期 |
| TEMED | tetramethylethylenediamine | 四甲基乙二胺 |
| TK | toxicokinetics | 毒代动力学 |
| *V*c | Apparent volume of distribution | 表观分布容积 |
| ΔΨm | Mitochondrial transmembrane potential | 细胞线粒体跨膜电位 |

# 综 述

**有机金属类抗肿瘤药物的研究进展**

癌症是严重危害人类健康的主要疾病之一，是仅次于心血管系统疾病的人类第二大死因[1]。按照世界卫生组织披露的癌症发展趋势预计，到2015 年全年

预计死于癌症的人数将高达900万人。癌症治疗常用的手段包括手术治疗、放疗、化疗及生物治疗，其中化疗是治疗癌症的重要手段之一，20世纪60年代末，顺铂(II)抗癌作用的发现及临床应用，金属配合物的药用性引起了人们的广泛关注，开辟了金属配合物抗癌药物研究的新领域[2]。随着人们对金属配合物药理作用认识的进一步深入，新的高效低毒具有抗癌活性的金属化合物不断被合成出来，该领域的研究范围也变得十分广泛，取得了许多令人鼓舞的成果，成为当前和今后研究的热点。其中，包括某些有机铂类化合物、有机锡配合物、有机锗配合物、茂钛衍生物、多酸化合物等。本文就不同金属类抗癌药物的研究进展进行了综述。

一、铂类抗癌药物

20世纪60年代，美国科学家Rosenberg[3]在研究直流电场对大肠杆菌生长的影响时，首次观察到铂化合物能抑制细胞生长的现象，从而揭开了此类独特构型的抗肿瘤药物发展的序幕。1971 年顺氯氨铂（Cisplatin, DDP）进入临床试验，1978 年正式上市，成为第一代用于临床的铂类化合物；经过十几年的筛选和临床试验，1986 年卡铂（Carboplatin, CBP）于英国上市，成为第二代铂类药物；1995年奈达铂（Nedaplatin, 254-S）在日本上市，1996年奥沙利铂（草酸铂, Oxaliplatin, OXA）在德国上市，这是第三代铂类抗癌化合物的代表。铂类抗癌化合物从发现至今历时40余年，先后筛选了数千种类似的化合物，超过28

种进行临床试验，其中不足10种获得上市，而得到较临床广泛应用的仅为3种。

1、铂类抗癌药物发展概况

当第一个铂类化合物顺铂以平面四方形这样的简单结构被发现有抗肿瘤作用后，科学家就开始不懈努力对其进行结构改造，以达到降低毒性、克服耐药

性、扩展抗瘤谱的目的。经过40余年的研究，衍生出以下几类铂类化合物：⑴顺铂类药物：如 DDP、SKI2503R、Nedaplatin；⑵卡铂类药物，含环丁二羧酸基团（CBDCA）：如CBP、DWA2114R、Enloplatin、NK121、Zeniplatin；⑶含环己二胺（DACH）类：如OXA、L-NDDP；⑷四价铂化合物：如Iproplatin、Ormaplatin、JM216等。

1.1第一代铂类抗癌药——顺铂（Cisplatin, DDP）

顺铂[cis-二氯二氨合铂（Ⅱ）]，[cis-dichlorodiammineplatinum(II)]的俗称，其抗癌作用是美国生理学家Rosenberg于1965年偶然发现的。其结构特点为简单的平面四方形无机化合物，反式无抗肿瘤活性。DDP 在人体内药代动力学符合二室模型，T1/2α=25～49min，T1/2β=58～73hrs，血浆蛋白结合率高且为不可逆性结合，结合铂无抗肿瘤活性，有抗瘤活性的非结合铂在体内半衰期短。DDP 于

1978年首先在美国批准临床使用至今已超过30年，但仍是目前应用最广泛的药物之一：现已公认含铂类方案是晚期非小细胞肺癌的首选方案，亦是小细胞肺癌的主要组方之一；DDP 是头颈癌单药有效率最高的药物之一，5-氟尿嘧啶与

DDP 是头颈癌化疗的标准方案之一；铂类（DDP、CBP）一直是治疗睾丸癌（尤其是非精原细胞性）、卵巢癌的主要治疗药物，过去20多年中，使青年人的睾丸癌的死亡率从100%下降到10%；与其它化疗药联合是侵袭性膀胱癌、骨肉瘤、食管癌、胃癌等标准化疗方案，现在临床采用的联合化疗方案中，70%~80%的方案以顺铂为主药或有顺铂参与配伍[4]。

1.2第二代铂类抗癌药——卡铂（Caboplatin, CBP）

虽然顺铂在治疗癌症临床中表现了较好的效果，但水溶性小，易使肿瘤细胞产生获得性耐药性，有很强的毒副作用，因此人们开发了第二代铂类抗癌化合物，如卡铂等。

卡铂[1, 1-环丁二羧酸二氨合铂（Ⅱ）]，或称碳铂是20世纪80年代由美国施贵宝（Squibb- BristolMyer）公司、英国癌症研究所以及Johnson Matthey公司合作开发的第二代铂类抗癌药物。其结构上以亲水性的1, 1-环丁二羧酸取代DDP分子上的两个氯离子，化学稳定性好，水溶性增加，溶解度比DDP高16倍，毒

副作用低于顺铂[1]。与DDP比较，CBP有以下特点：肾、耳、神经毒性明显降低，剂量限制性毒性为骨髓抑制，毒性呈剂量依赖性；与非铂类抗癌药物无交叉耐药性，但DDP存在明显的交叉耐药性（交度达90%），且具有与DDP相同的抗肿瘤谱，两者疗效相近。CBP 已在临床广泛应用，可以与多种抗癌药物联合使用，对于非小细胞肺癌、小细胞肺癌、卵巢癌（上皮来源）等可作为首选方案的组成部分，有研究推荐CBP用于食管癌、头颈癌、宫颈癌、生殖细胞瘤、侵袭性膀胱癌等。临床推荐剂量为300～400mg/㎡或AUC=5～8。

1.3第三代新型铂类抗癌药物——奥沙利铂（Oxaliplatin, OXA）

奥沙利铂（Oxaliplatin）[反式-1-1, 2-二胺基环已烷草酸合铂]，是由美国施贵宝（Squibb- BristolMyer）与Serok公司开发的第三代铂类化合物。作为第一个上市的二氨基环己烷（DACH）作为载铂配体的一类铂配合物，它不仅改善了顺铂及卡铂的毒副作用，而且扩大了它们的活性谱，对许多耐顺铂或卡铂的细胞株或瘤株具有活性。由于OXA含有的DACH基团，空间位阻作用较强，虽作用机制与DDP类似，但表现出与DDP不同的抗瘤活性，即与DDP无交叉耐药性。目前已有大量临床研究显示：OXA与5-Fu/CF的联合方案已成为结、直肠癌的辅助、姑息化疗的一线方案之一（如OXA联合5-Fu和亚叶酸钙(LV)等即

FOLFOX方案），对比原标准方案Mayo方案疗效提高，副反应降低，目前欧美正在进行含OXA的结、直肠癌术前辅助化疗方案的临床试验[5, 6]；OXA与5-Fu/CF的联合方案亦成为目前胃癌化疗最有效的方案之一[7-12]；含OXA的方案可以为晚期肝癌患者带来病情局部控制和生存获益[13]；欧洲以法国Levi教授为首的研究协作组正在进行时辰化疗方案的临床研究，其中包括CBP、OXA等药物，根据其已完成的临床试验发现病人可耐受更高的化疗剂量，达到更好的疗效；采用OXA联合用药治疗铂类耐药的进展期卵巢癌，获得较理想的治疗结果[14, 15]；OXA对非霍奇金淋巴瘤、转移性乳腺癌、小细胞肺癌亦有一定疗效[16]。此外，奈达铂（Nedaplatin）、络铂（又称乐铂、洛巴铂，Lobaplatin）等也

均为第三代铂类抗癌化合物的代表。

1.4第四代铂类抗癌化合物

四价铂类配合物、双核和多核铂类配合物被发现具有特殊的抗癌活性。另外人们已经研制合成出亲脂性、具有口服活性、多核以及具有空间位阻的金属铂类抗癌配合物。如JM216、环铂（Cycloplatin）、三核铂化合物（BBR3464）等都是最新合成的其它新型铂类抗癌金属配合物[17]。中国学者杨旭清在近百名科学家的共同协助下，研制出新型抗癌药物双环铂，能在人体内高度选择性杀死癌细胞，而不伤害正常的组织，副作用是顺铂的1/22[18]。国内楼丽广与刘伟平课题组合作，设计合成和评价了一系列铂类配合物，发现了几个有开发前景的新型铂类候选药物，包括奥沙利铂的衍生物舒铂的衍生物羧桥双核铂配合物，这些化合物均获得了国家发明专利授权[19]并先后进入临床试验。上述铂类化合物结构如图1。



1顺铂DDP

2卡铂CBP

3奥沙利铂OXA

4奈达铂

5乐铂

2、铂类抗癌药物作用机制

目前研究认为：铂类化合物抗癌主要在于其类似双功能基烷化剂，通过破坏DNA产生细胞毒作用，因此DNA是此类化合物作用的关键靶点。以OXA为例，在细胞内通过其代谢产物与DNA交联，形成DNA复合物，进而终止肿瘤细胞的复制，导致细胞凋亡。OXA诱导肿瘤细胞的凋亡是通过损伤其DNA、抑制DNA和RNA合成及触发机体的免疫学反应来完成的。在细胞内，OXA能诱导DNA链内交联[20]、DNA链间交联[21, 22]及DNA-蛋白质分子间交联[21]3种类

型的交联作用，从而使DNA链局部纽结或解旋，阻止DNA聚合酶推进，致使

DNA 复制、转录失败，造成肿瘤细胞死亡。其中链内交联占大部分，链间交联的形成不到 5％。由此可见铂化合物是一类周期非特异性抗癌药物。

除上述主要机制外，OXA还可以抑制DNA合成；通过与转录因子结合、抑制RNA聚合酶、参与核小体组蛋白DNA复合物机制从而抑制信使RNA合成[23]；导致肿瘤产生免疫性死亡[24]。

3、铂类抗癌药物毒性及防护

3.1肾毒性及防护

铂类药物的肾毒性主要是铂元素在肾脏中的沉积引起，其中以顺铂的肾毒性最严重并与用药的剂量有关，损伤部位主要在近曲小管，而少累及远曲小管和肾小球，其主要机制可能是在于脂质过氧化反应增强，线粒体损伤尤为明显，也有研究指出其产生肾毒性与诱导肾小管细胞凋亡密切相关[25-27]。对铂制剂肾毒性的防护壳采用以下方法：（1）水化疗法，此方法可减轻但不能完全防止肾毒性的发生；（2）含巯基化合物如Amifostine，在II期临床试验中显示具有保护肾功能的效用，但有一过性低血压副作用；（3）降低肾脏中OCT2基因SLC22A2的表达或竞争性抑制转运体OCT2[28, 29]。

3.2神经系统毒性及防护

铂类药物的神经毒性可分为中枢性和外周性，中枢损害多表现为：听力损害、视觉紊乱、癫痫发作、视乳头水肿、视神经炎等，周围性损害常表现为：“手套”、“脚袜”样感觉减退或异常。顺铂的神经毒性主要表现为神经末梢障碍，上下肢体麻木感，感觉迟钝，视神经乳头水肿和球后视神经炎；卡铂的神经毒性较小；而第三代铂制剂如奥沙利铂神经毒性反应受剂量影响，主要表现在外周感觉神经，如肢体末端感觉障碍，急性毒性还表现为口周感觉迟钝，急性喉痉挛[30, 31]。铂类药物的神经毒性不能用DDTC、Amifostine预防或减轻，避免喝冷饮或呼吸冷空气，减少外界刺激，可减少不良反应的发生率；补充钙镁离子，用以螯合可螯合草酸盐，避免或减轻OXA 对神经膜通道的影响，从而减少神经

毒性[32]；此外也可以考虑使用一些营养神经药物，如维生素B1、维生素B6等，或者补充谷胱甘肽均可以改善中毒症状[33, 34]。

3.3耳毒性

耳毒性属于神经系统毒性范畴，DDP治疗过程中可出现累积而不可逆的听力损伤，常表现为高频部分听力（4000～8000Hz）下降，高频听力丧失约占 30～

50％，语音听力丧失占15～20％。OXA 亦有潜在耳毒性[34]。

3.4血液系统毒性

DDP 的血液毒性主要是骨髓抑制，最常见是贫血、次为血小板下降，白细胞降低较轻，白细胞减少的发生率27%; CBP血液毒性强于DDP，不仅会发生白细胞减少，同时引起血小板减少的发生率也较高；OXA 的血液毒性小，特别是中性粒细胞和血小板减少的发生率相对较小[35, 36]。目前认为OXA引起的血液毒性可不作处理。但出现相对严重的血液毒性，应适当推迟下一疗程的治疗，并采取相应的药物治疗措施。铂类药物引起的白细胞或其他血液指标降低可用升白细胞药物治疗[34]。

3.5胃肠反应

铂类药物的消化道反应主要是恶心、呕吐、腹泻和腹痛等，其中顺铂的呕吐反应最强烈，发生率 100.0%；卡铂的胃肠道反应较顺铂要轻微而少见，多为

Ⅰ～Ⅲ度，Ⅳ度很少发生；相对而言奥沙利铂的消化道反应最轻，在单药治疗时达到Ⅲ～Ⅳ级毒性反应的发生率分别为10%[37]。目前认为其机制主要是催吐感受器、呕吐中枢兴奋或铂类诱导肠中嗜铬细胞释放5-HT刺激迷走神经从而激活呕吐中枢。目前临床已常规使用HT3拮抗剂（如昂丹司琼、格拉司琼、雷莫司琼等）联合激素做DDP用前预防性药物，极大地减轻了急性呕吐症状，但对于迟发性呕吐仍缺乏有效手段。另外，铂类药物对肝脏的毒性较为少见且较轻微，可以使用如葡醛内酯、联苯双酯、谷胱甘肽等预防，停药同时使用保护肝脏药物即可好转。

3.6其它

DDP使用过程中，有出现高血压及牙龈出现重金属线（类似铅线）的报道。少数人对铂化合物过敏。

4、铂类抗癌药物耐药机制及应对策略

目前研究仍未完全解释铂类抗癌化合物的耐药发生机制，人们认同的耐药机制有下述几种：

4.1细胞解毒机制

主要指细胞内含丰富的巯基的还原型谷胱甘肽（GSH）与铂或铂-DNA 络合物结合，从而减少或防止链间交联，降低了DDP的毒性，同时GSH可能有调节DNA修复的作用。对此，已开发出γ-GCS抑制剂BSO，在细胞实验中预处理耐药细胞株后再予DDP，观察到细胞毒作用增强，但有动物实验显示经BSO预处理后对DDP敏感性影响很小[38]。

4.2 DNA修复增强

产生耐药最重要的途径是相关的DNA修复，包括错配修复（MMR）或者核苷酸剪切修复（NER）。DNA修复功能缺陷的细胞株对DDP高度敏感。目前在多个DDP耐药株细胞中观察了DNA修复的增强。一般认为铂-DNA损伤的清除是通过核苷酸剪切修复，研究还发现EGFR信号传导对DDP-DNA损伤的修复具有抑制作用。DNA修复蛋白XPE、DNA损伤识别蛋白（与HMG蛋白有同源性）可能与此机制有关。目前使用Ara-C(Cytarabine)、Hydroxyurea（羧基脲）、

Gemcitabine 等作为此类机制的抑制剂[39-41]。

4.3 DNA损伤的耐受性提高

错配修复缺陷使细胞失去检测DNA配对错误的能力，于是无法激活阻止细胞周期及诱发凋亡的信息通路，或通过复制旁路耐克服铂-DNA 交联障碍。此机制主要在DDP、CBP中观察到，而与OXA耐药无关。有研究发现某些原癌基因如：Ha-ras、Her2-neu、bcl-2 的表达，以及抑癌基因突变的细胞株敏感性低。二、有机锡及其配合物

1849年，E. Frankland 发现了第一个有机锡化合物二乙基二碘化锡（Et2SnI2）

[41,42]，此后的第三年，C. Lowich 通过卤代烷烃与锡－钠合金反应得到了这个化

合物。从此，一个独特的研究领域—有机锡化学逐渐形成[43]。自上世纪70 年代

Crowe 等[44]发现有机锡化合物能抑制小鼠肿瘤生长以来，现已发现对乳腺癌

MCF-7、结肠癌WiDr及CoLo205、黑色素瘤B16、纤维细胞瘤3T3、白血病P388、

P815及L1210、宫颈癌HeLa等有明显的体外活性，并对小鼠结肠癌26等有体内活性，有研究者认为有机锡化合物的抗癌活性要比目前临床使用的顺铂高100倍以上。有机锡化合物的合成及抗肿瘤活性研究成为继顺铂之后又一研究热点。

1、有机锡化合物的结构与抗癌活性

有机锡化合物是至少含有一个锡-碳键的金属有机化合物，共计4个系列，它们的化学通式为RnSnX4-n，其中R为烷基或芳香基基团，X为阴离子基团、氯化物、氧化物、氟化物、氢氧化物或者硫醇盐，n数在1~4之间，并相应地简称为单、二、三、四烃基有机锡化合物。有机锡化合物的结构具有多样化的特点，而不同结构的有机锡化合物在物理、化学及生物性质上表现出很大差异。到1989年，美国国家癌症研究所（NCI）对2000多种有机锡化合物进行了抗癌活性测定，结果表明，不论锡的配位数如何，二烃基锡衍生物比其相应的单烃基、三烃基及四烃基衍生物在抗白血病方面更具有活性。因此，二烃基锡抗癌活性研究十分活跃[45, 46]。

1.1类似顺铂（Cisplatin）结构的有机锡化合物

DDP 是现在仍使用在临床一线的金属抗癌化合物，但由于其毒性较大、水溶性低且癌细胞易对其产生耐药性，人们希望通过寻找新的金属类配合物达到降低毒性，提高抗癌活性的目的。Leonard 等发现铂类化合物必须具有顺卤基团构型才有抗癌活性。1980年A. J. Crowe等发现与顺氯氨铂、四氯二氨合铂结构相似，也具有顺卤基团构型的二烃基二卤化锡（Ⅳ）配合物对P388淋巴细胞性白血病有明显的抑制作用[47]。受试化合物的活性以寿命延长率表示，即用给药后动物的存活时间（T）与未给药动物的存活时间（C）的比值来衡量，若T/C＞120%，可认为该化合物具有活性。化合物的使用剂量为6.5～400mg/kg时，T/C值为123-180%不等，有机基团R为乙基和苯基，X为溴的配合物，比同类化合物具有更高的活性。虽然这些配合物的T/C 值比顺铂（200%）低，且不具广谱抗癌

活性，如对B16黑素瘤，L1210白血病，Lewis肺癌，CDF1乳腺癌等均无抑制作用[48]，但是，它们的肾毒性低于顺铂，且I. Haiduc[49]发现Et2SnCl2·Pbi 和

Ph2SnCl2对肾腺癌有很好的抑制作用，其T/C值分别为218%和173%。此类配合物的配体绝大多数是双齿配体，这是为了保证形成的配合物具有同顺铂类似的含顺式两个卤素的八面体结构。A. J. Crowe等通过研究其合成的约155个有机锡化合物的构效关系发现：具有顺卤基团构型的有机锡配合物只有当Sn-N键键长大于2.39Å才有活性。

1.2类似卡铂（Carboplatin）结构的有机锡化合物

1989年，M. Gielen[50-52]等合成了一系列类似于CBP的含有Sn-O键的有机锡化合物并对其抗癌活性进行了研究，结果发现其对L1210白血病并抑制作用，但对MFC-7和WiDr却有优于顺铂的活性。通过比较一系列2, 6-吡啶二羧酸二烃基锡[C5H3N(COO) 2SnRR']化合物，得出结论：当RR’为正丁基(n-Bu)时化合物生物活性最高[53-55]，这与前面提到的与顺铂结构类似的二乙基和二苯基有较高活性不同，提示不同的有机锡化合物可能与DNA 的作用模式不同。

1.3含生物活性分子的有机锡化合物

为提高有机锡化合物的抗癌活性，人们将具有生物活性的分子或药物分子作为配体，引入到配合物中期望发挥协同抗癌作用，这已成为抗癌有机锡化合物合成的另一努力方向。1982 年，R. Barbieri[56]等发现甘氨酰甘氨酸的有机锡衍生物R2SnL2具有抗癌活性。1985年，F. Huber[57]等发观胱氨酸、青霉胺的有机锡衍生物R2SnL2对P388淋巴白血病有较好抑制作用，并发现三烃基锡氨基酸的衍生物，以及含S的氨基酸类衍生物，如6-巯基嘌吟和3-Thiopropanoic acid的二烃基锡衍生物也具有—定的抗P388淋巴白血病的活性。万嘉铸、胡盛志等发现将抗癌药物5-氟尿嘧啶(5-Fu)和Et2SnCl2Phen反应制得的Et2SnCl (Phen)(5-Fu)，可以显著增强原产品的抗癌活性[58,59]。2003年，M. Nath 等用内源性氨基酸和多肽为配体合成的新型有机锡二肽衍生物表现出低毒高效的抗癌活性[60]。1995-2004 年，李青ft课题组[61-66]将芳香异羟肟酸作为配体引入有机锡合成得到了多个系列的有机锡芳香异羟肟酸类化合物，并对其进行了体外、体内活性测

试。研究发现有些化合物不仅对P388淋巴白血病的抗癌活性明显优于国内外已合成的活性最高化合物，而且这些新化合物对HL-60白血病、K-562红白血病、HCT-8结肠癌、BGC-823胃癌、KB鼻咽癌、Bel-7402肝癌、A-549肺癌和艾氏腹水癌等人体癌症有显著效果，显示了高效广谱抗癌活性

2、有机锡化合物抗癌活性的机制

一般认为顺铂类化合物的抗癌机制是配合物脱去两个Cl后，金属铂与癌细胞的DNA中含氮碱基作用，形成配合物阻止DNA的复制[67]。所以起先人们认为有机锡化合物的抗癌作用主要取决于 R2Sn++[68]，是由二烃基衍生物水解后的

R2Sn++与肿瘤细胞的DNA作用达到抗癌目的，然而随着研究工作的深入，发现有机锡在抗癌活性方面可能存在多种作用机制。

李青ft等[69]通过研究二乙基邻菲咯啉二氯锡(IV)与单核苷酸作用发现，首先作用于DNA的磷酸基，并导致DNA构象改变，然后其邻菲咯啉配体嵌入到DNA中使DNA解旋断裂，这提示有机锡化合物的作用机制与顺铂可能不同。

R. Barbieri等人用119Sn Mossbauer谱研究了R2SnCl2（R=Me, Ph）与单核苷酸和

DNA在生理条件下的相互作用，发现此类配合物仅与单核苷酸和DNA的磷酸根结合。体外诸多研究提示有机锡化合物可以改变钙离子通道使细胞钙超载，细胞破裂坏死，胞内高浓度钙离子还可诱导细胞凋亡[70]；ATP合酶（F-ATP离子通道）是有机锡的作用靶点，有机锡药物可影响ATP合成使细胞最终因缺乏能量死亡[71]；二丁基锡和三丁基锡可选择性破坏某些细胞器，并可抑制神经酰氨的代谢过程，以及影响IP3诱导的细胞内钙离子的转移，最终抑制膜信号介导的DNA合成[72]诱导细胞凋亡[73]；二丁基锡和三丁基锡还可以激活MAPK（有丝分裂原蛋白激酶）系统导致细胞死亡[74]。

有机锡化合物的抗癌作用机制至今尚无定论。但可以肯定，它与铂类化合物的作用机制是完全不同的。

3、有机锡化合物抗癌活性的影响因素

Atassi[75]等人研究表明水溶性是影响有机锡化合物的抗癌活性的一个重要因素。实验表明[76]，大多数离子型有机锡化合物的抗癌活性优于顺铂，二烃基

锡特别是二丁基锡的离子型有机锡化合物对乳腺癌和结肠癌细胞的抑制率都比较高，然而孙丽娟等的研究提示，有的离子型化合物活性比其母体化合物高有的则相反[77]，这说明溶解度不是影响有机锡化合物抗癌活性的唯一因素。

吴文娟等[78]对抗肿瘤药物二乙基二氯化锡配合物(Et2SnCl2L)(L=phen, Pphen, DMphen, TMPhen)的电子结构和分子性质进行理论研究。采用量子化学密度泛函法进行计算，结果表明配合物通过两种方式与Et2SnCl2L (L=phen) DNA结合，一是静电结合，可用静电作用能(Ee)表示氯原子和金属锡原子间的静电作用强度；二是插入结合，配合物的LUMO 轨道的能量（εL）插入配体的电荷(QL)以及插入配体的配位键长(Sn-N)等对配合物与DNA的作用有显著影响。结论表明，Ee值越大，εL 值越小，配位键长(Sn-N)越长，以及配体带有越多的正电荷，对配合物的抗癌活性越有利。另外，有机锡的水解稳定性[79]，亲水性和亲脂性对有机锡的 生物活性也有很大的影响[80]。

有机锡化合物的抗癌活性主要取决于烃基，配体尤其是在水解、输送过程中也将产生一定的影响。现有许多文献报道，将配体与有机锡化合物配位后，配合物的生物活性比原配体的生物活性大大提高[81]。综上可以推断，烃基的种类、有机锡配合物水溶性和脂溶性的比值、配体的生物活性、锡原子上电子云密度、有机锡配合物的结构等诸多因素均可以影响有机锡化合物的抗癌活性。

4、有机锡化合物的毒性

研究表明，有机锡类化合物可以在多方面产生毒性影响：

4.1有机锡化合物对神经系统的影响

关于有机锡化合物的神经毒性研究最多的是三甲基锡（TMT），其靶器官是边缘系统和小脑，大量体内实验表明，TMT 主要影响中枢神经系统的功能，选择性作用于大脑的海马和大脑皮层区域[82]，引起激动、攻击行为、癫痫及低血钾症等多种临床症状，严重时可致死[83]。低剂量的TMT导致动物学习能力下降、记忆能力缺失[84]。成年小鼠暴露于TMT可以引起海马、杏仁核、梨状皮层和大脑皮层的退化和损伤[85]，影响海马CA1区的突触传递[86]。成年大鼠暴露与TMT则引起一系列神经行为改变、神经细胞死亡，导致学习和行为表现的削弱[87-89]。

人类TMT意外中毒引起了听力衰退、躁动、精神运动过度兴奋、运动性共济失调、意识错乱、定向障碍、短时记忆紊乱、健忘症、局部或全身性的抓咬等症状[90, 91]。体外实验发现TMT可以直接对神经元产生影响[82]，能够降低星形细胞瘤细胞ATP水平[92]，能够抑制原代星形胶质细胞兴奋性氨基酸的摄取，促进其释放[93, 94]，能引起PC12细胞及原代培养的海马神经细胞的死亡和细胞核形态的改变，如染色质浓缩，DNA片段化等一系列凋亡症状[95, 96]。目前TMT已经被人们用作神经衰变和Alzheime:疾病研究的毒物模型[97]。三乙基锡主要为髓鞘毒作用，易致髓鞘水肿而致白质脑病；三苯基锡有神经毒性作用及肝毒性[98]。

O'Bryan[99]等发现高剂量的二月桂酸二丁基锡可使脑内聚氨如精氨、亚精氨水平升高，从而干扰神经元突触的功能，表现出神经毒性。本文着重对DBDCT的神经毒性及机制进行了初步探讨。

4.2有机锡化合物对生殖系统的影响

有机锡类化合物最早发现的毒性就是生殖系统毒性。大量的研究证实三丁基锡能够引起软体动物生殖逆向改变，从而使得种群中雌性个体比例下降，最终导致种群衰退。有机锡化合物能引起贝类性畸变，雌性激素转化为雄性激素，导致雌性减少雄性增加[100]。氯化二丁基锡剂量超过0.05μg/kg即能引起妊娠小鼠体重下降，导致小鼠子宫、阴道结构损坏和出血，活胎率下降，死胎率和畸形率增加；胎儿性比失调，雌性减少，雄性增加；雌性胎儿对氯化二丁基锡比雄性敏感，其死胎率和畸形率与氯化二丁基锡剂量之间存在明显的剂量-效应关系[101]。有机锡化合物能抑制哺乳动物钙元素的吸收，对胎儿骨骼的正常发育产生一定的毒性和抑制作用而导致其发育异常[101]。氯化二丁基锡还可以引起大鼠胚胎植入率降低，植入后胚胎成活率明显下降[102]。

4.3有机锡化合物对免疫系统的影响

多数有机锡化合物具有免疫毒性。TBT 对哺乳动物的胸腺细胞、淋巴细胞等均有明显损害作用。大鼠接触三丁基氧化锡、TBT、TMT 后，胸腺、脾重量明显减轻，免疫能力也显著下降[103-106]. Tryphonas等[107]研究发现TBT使大鼠自然杀伤细胞、T淋巴细胞和血清IgM、IgG水平均发生变化，同时观察到胸腺

萎缩，证明TBT对哺乳动物体液免疫和细胞免疫均有影响。

4.4有机锡化合物对消化系统的影响

有机锡进入人体后，在肝脏和血液中浓度分布较高，主要经肝微粒体酶脱烷基而代谢转化，最后大部分经肾脏和消化道排除[108]。二烃基锡化合物主要引起胆管和肝脏损害；氯化三丁基锡对鱼体肝脏、胰脏细胞产生影响[109]；三苯基锡也引起肝脏的损害[110]。孙淑云等[111]研究发现，二巯基辛基锡可引起血清

GGT和LDH活性升高及肝细胞病理形态学方面的改变。有机锡可选择性的影响肝脏某些药物代谢酶的活性[112]。

4.5有机锡化合物对其他系统的影响

有机锡化合物可以影响系统内分泌，影响人体性激素[113]、甲状腺激素[109]等的代谢和分泌；有机锡化合物对粘膜和皮肤有强刺激作用[114]；有机锡化合物还可以降低血钾及血钠水平[115]。

三、有机锗化合物

锗具有明显的抗肿瘤与消炎活性，其他还有很多类型的有机锗化合物，大多具有抗肿瘤，消炎，免疫复活和杀菌等生物效应。有机锗132和螺锗等具有明显的抗肿瘤活性，且毒性低，尤其是没有骨髓毒性这一优点，在防治肿瘤和辅助放化疗等方面很有潜力，已经进入临床试用阶段。

1、有机锗化合物发展概况

有机锗化合物具有抗癌活性最早是在1927年提出的，当时报道了其对对肝癌、肺癌、胃癌等血管丰富部位的癌症的治疗作用。1968 年，日本学者浅井一彦等从人参药效与有机锗含量的相关性出发，首次合成了具有广药理活性的水溶性有机锗化合物-β-羧乙基锗倍半氧化物（Ge-132），引起医药界广泛兴趣[116]，

1971年浅井又发现药物Ge-132[Ge(CH2CH2COO) 2O3]具有广谱抗癌活性[117]，这使得有机锗络合物抗癌活性方面的研究取得很大的发展。1974年Rice等人合成出具有抗癌活性的螺环锗化合物（简称螺锗），并对其进行了生物活性研究，1982 年Slavik等人报道螺锗具有抑制各种肿瘤增殖的活性，它是治疗白血病的有效药物，现已运用于临床。随着合成手段的进一步提高，国内外学者又先后合成

一系列有机锗化合物，如羟基锗化合物、螺锗及其衍生物、有机锗倍半氧化物、有机锗倍半硫化物、氨基酸锗倍半氧化物、呋喃三甲基锗、介吗川类有机锗化合物等，并就它们的生物活性、作用机理、药代动力学和毒理学等进行了广泛研究，对有机锗化合物的理论研究和开发利用的研究也越来越多[118]。如1990年，上海建材学院高绍仪等和第二军医大学赵法芨等分别研究了氨基酸锗氧化物的抗肿瘤活性及毒性[119]。1991年，上海第二军医大学的李传毅研究了它对小鼠B淋巴细胞产生抗体的调节作用[119]。1993 年，北京大学张树功等合成和实验了对

-（N, N-二甲氨基（苯基锗倍半氧化物的抗肿瘤作用[120]，1994 年唐博恒等观察到锗酵母对黄曲霉素B1诱发肝癌有抑制作用[121]。1995年，澳大利亚Meikle等使用锗发生器实现对乳房瘤的显像[122]。1996年，程棕等用图像细胞分析技术研究了Ge-132对人乳癌细胞株BCaP-37的生物学作用[123]。1997年，大连辽宁师范大学王寅等研究了有机锗对巨噬细胞激活与磷脂代谢转换的影响。1998 年，西安医科大学陈静宏等研究了有机锗GeM10对体外培养黑色素瘤细胞DNA合成的抑制作用。2000 年，河南省职业病防治研究所文春河等研究了有机锗对矽肺鼠血清超氧化物岐化酶、脂质过氧化水平及肝Kupffer细胞功能的影响[124, 125]。2001年，北京有色金属研究总院李贺成研究了有机锗SK-818治疗慢性乙肝的安全有效性。近年来，日本方面关于锗的医疗用途及临床实验报道很多，美国等着重有机锗防癌抗癌作用的研究[126-128]。

2、有机锗化合物抗癌的可能机制

据国内外报道，有机锗化合物可能通过以下机制发挥抗癌效应[119, 129, 130]：⑴抑制DNA、RNA和蛋白质的合成：螺锗对体内、外多种癌细胞株均有直接细胞毒作用；⑵增强机体的免疫功能：Ge-132可以刺激T淋巴细胞产生淋巴因子，进而活化巨噬细胞变成细胞毒巨噬细胞并激活自然杀伤细胞从而发挥杀伤癌细胞活性，使免疫功能低下患者的免疫力逐步恢复正常；⑶抗突变作用：研究表明Ge-132能抵抗射线诱发的大肠杆菌B/rWP2trp的抗突变作用；⑷自由基清除作用：Nakamura等（1987）研究证实，Ge-132体外即具有对活性氧类的清除作用，防止活性氧对细胞产生损伤作用，从而具有抗肿瘤的作用；⑸生物电位

学说：癌细胞的生物电位高于正常细胞，因而它可以迅速增殖。有机锗化合物中的锗原子可产生电荷转移和游离基，自由电子可从高电位癌细胞夺取氢离子，从而降低癌细胞电位，阻止它的繁殖。

有机锗抗癌药物之所以能震惊医学界，主要是因其具有较强的抗癌活性的 同时还具有较低的毒副作用。因此，开发新型有机锗抗癌药物具有重要的意义。四、钯(II)配合物

印度学者Puthraya等[131]较早系统研究近20组钯(II)配合物Pd(2,2’-联吡啶bipy) (为氨基酸根Aa) +对L1210白血病细胞、P388淋巴细胞、S180肉瘤细胞的抑制活性。Kuduk-Jaworska等[132]报道了二氯二（2,2’-二甲基-4-硝基）吡啶合钯(II)或氯桥联2,2’-二甲基-4-硝基合钯(II)双核配合物对A549、SW707、T47D、HCV29T等细胞的抑制活性。巴西达斯克鲁泽斯大学的研究人员经过13年的努力，成功开发出一种含有钯原子的有机化合物。动物实验表明，这种有机-金属化合物能够有效地治疗癌症和防止癌细胞转移。研究人员使60只白鼠患上死亡率最高、扩散最快的一种乳腺癌后，用上述化合物对它们进行治疗。结果，80％白鼠的肿瘤缩小，有的甚至完全消失。目前，一些钯配合物已进入了临床实验阶段。

钯与铂配合物具有相似或相同的结构特征，即金属离子均采取dsp2杂化轨道方式与配体键合，形成平面四边形结构。由于二者结构的一致性，因此表现出相近或相似的化学性质。钯(II)配合物对多种肿瘤细胞有抑制作用，其与DNA作用方式可视为“准药物分子-靶标”机制的简单模型，可与核苷酸或碱基等生命小分子共价键合，同时钯(II)配合物也可以诱导癌细胞凋亡，因此，钯(II)配合物可能是继铂类抗癌化合物后的又一类新的潜在抗癌药物[133]。

五、钌配合物

钌类配合物是国际上公认的最具发展潜力的抗肿瘤药物[134]，是继铂之后最有希望成为活性高、毒性低的金属之一[135]。目前已有上百种钌的配合物被合成出来。Keppler小组[136-143]在20世纪80年代中后期展开了对无机钌配合物抗肿瘤研究，1987年合成了ICR，在体内的抗肿瘤试验显示对P388白血病的最佳T/C值达194，对Walker256肉瘤的最佳T/C值达230。另外还对B16黑色素瘤、

Scroma180腹水癌、Ehrlich腹水癌、MAC15A直肠癌以及鼠结肠癌都有很好的效果。而且在试验过程中并没有发现有神经毒性、肝毒性和骨髓抑制等损害

[144]. Alessio于1998年合成的NAMFA是第一个进入临床的钌配合物[134]。它对肺癌、MCa乳腺癌等的转移表现出特别的活性，但在杀死原发性肿瘤细胞方面的能力较差，在体外也不表现出活性。KP1019是继NAMFA之后第二种进入临床试验的钌配合物[134]，对原发性直肠癌和Lewis肺癌显示出突出的活性，对P388体系的最佳T/C值为160，对Stockholm腹水癌的最佳T/C值为250。已于2006年完成了Ⅰ期临床试验，它能通过线粒体途径诱导细胞凋亡，抑制某些耐顺铂 的肿瘤的生长，且体内和体外实验中都未产生耐药性，也没有很严重的副作用。

大量研究表明，钌类化合物产生抗肿瘤效应的机制在于与DNA以非共价方式进行结合，而非共价结合则包含较多的结合方式如：静电作用、插入结合和与DNA的大小沟的表面结合等。

近年来钌配合物作为新的抗癌药物引起了人们的广泛兴趣。钌配合物的低毒性，使开发新的钌抗肿瘤药物具有十分重要的意义和广阔的应用前景。

六铜配位化合物

早在1912年，德国就用一种由铜的氯化物和蛋黄素组成的混合物来治疗患有面部癌的病人，这一治疗的成功说明铜化合物具有抗癌功能。1913 年在利物浦大学进行的研究工作说明，通过向皮下和静脉内注射铜盐和胶体铜可以软化或消除移植在老鼠体内的癌瘤。1930 年，在法国的研究工作表明，通过注射胶体铜转移并消除了肿瘤组织。最近在美国进行的研究工作表明，通过服用适量各种各样铜的络合物来治疗实性肿瘤会明显抑制肿瘤的生长和转移，因而就提高了生存的机率。尹富玲等[145]报道利用二水氯化铜，2, 2’-联吡啶和去甲基斑蝥酸钠合成了桥联配体双核铜配合物，用X射线单晶衍射测定了该配合物为三斜晶系，配合物中两个铜原子呈六配位的拉长畸变八面体构型，生物活性测试表明，该配合物具有较强的体外对HL260人白血病细胞、BGC832人胃癌细胞及

Bel7402人肝癌细胞这3种癌细胞系都具有比去甲基斑蝥酸钠、去甲基斑蝥酸根合桥联双含铜(II)有更强的抑制作用。

2009年7月新华社报道，墨西哥国立自治大学（UNAM）化学系科学家研制出以金属为基础的新药，并已通过实验室和活体证明这些药具有良好的抗癌效果。这种新药取名为“Casiopeina”，它是一种铜配位化合物。动物试验显示，这种以铜为基础的药物具有抗癌效果，虽然药物在使用时表现出非常强烈的毒性，可是经过15 天治疗后它在动物体内的血液化学水平就会恢复正常。

研究表明铜络合物并不会消灭癌细胞，只是将它们转化为正常细胞。在癌症可能要诱发的条件下，铜络合物可以抑制或妨碍癌细胞的发展。铜的金属有机络合物很早就被证实具有辐射保护和恢复功能，它们能够快速恢复免疫能力，并能迅速地从辐射引发的组织变化中恢复过来。发挥这一功能的组织机构似乎与铜络合物的某种减活超氧化物能力相关。此外，因为辐射能够破坏人体内天然铜酶之间的链接，所以用适量药性铜络合物来补充这些酶可以恢复已经丧失的组织修复能力。用铜络合物来治疗癌症，尤其是治疗那些化疗患者、偶尔进行辐射的人以及经常遨游太空的宇航员是很有效的。

七、钛类抗癌配合物

钛的化合物是人们较早研究的非铂类金属抗癌药物。Budotitane

[(CH3CH2O) 2(benzoylacetonato) 2TiⅣ]是第一个进入临床研究的过渡金属抗肿瘤药物[146]。1979年，Kopf 发现二氯二茂钛（Ⅳ）具有抗肿瘤活性[134]，现已进入Ⅱ期临床试验。它可用于胃肠癌、肾癌和乳腺癌等肿瘤的临床使用，但对脑癌和头颈部癌却无作用。Keppler在1982年首先发现二乙氧基・双（1-苯基- 1,3-丁二酮）合钛（Ⅳ）（Budotitane）具有抗癌活性，于1986年在德国进入Ⅰ期结肠癌的临床试验，现已完成Ⅱ期临床研究，它对腹水癌和固体肿瘤有很好的活性，在治疗结肠癌方面比5-氟尿嘧啶的疗效还要好。目前国内外对其作用机制进行了大量研究，其在生理条件下顺氯离去后形成的金属活性中心与DNA形成链内或链间交链，使DNA 的复制发生障碍，从而发挥其抗肿瘤作用。

前景与展望

目前的金属类抗癌药物虽为数众多，但真正应用于临床且效果很好的广谱抗癌药物还十分有限，并存在不同程度的毒副作用。为了合成出抗癌活性高，

毒性低且没有耐药性的金属抗癌药物，人们已经开始打破传统抗癌药物顺铂结构的限制，开辟了抗癌药物研究的新领域。这些表现在以下几个方面

（1）以金属铂为中心离子，设法通过采用不同性质的载铂配体与铂离子进行作用，研制合成出亲脂性、具有口服活性、多核以及具有空间位阻的金属铂类抗癌配合物；

（2）研究者们在改变配体的同时，不仅仅束缚在金属铂的配合物的抗癌活性的研究，使抗癌药物的研究向更宽广的领域发展；

（3）在进行金属药物研究的同时，人们也在努力探索致癌和抗癌的机理，设计和合成出新型结构的高效、广谱、低毒、持续时间长的金属抗癌化合物。

随着对金属配合物的抗癌机理以及其构效关系的进一步认识，人们必将合成出更多的高效低毒的金属配合物

参考文献

[1] 商丹, 张朝平. 金属抗癌药物的研究现状. 贵州大学学报(自然科学版), 2005, 22(1): 69-74.

[2] Galanski Markus, Jakupec Michael A., Keppler Bernhard K. Update of the Preclinical Situation of Anticancer Platinum Complexes: Novel Design Strategies and Innovative Analytical Approaches. Current Medicinal Chemistry, 2005, 12(18): 2075-2094(20).

[3] Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Platinum complexes [J]. Nature, 1965, 205, 668-670.

[4] 刘伟平等. 治疗癌症的铂族金属配合物[J]. 药学进展, 2001, 25(1): 27-31.

[5] Kouroussis C, Souglakos J, Kakolyris S, et al. Oxaliplatin in combination with infusional 5-fluorouracil and leucovorinevery 2 weeks as first-line treatment in patients with advanced colorectal cancer: A Phase II Study. Oncol, 2001, 61(1): 36-41．

[6] CarratoA, Gallego J, Diaz-Rubio E. Oxaliplatin: results in colorectal carcinoma. Crit Rev oncol Hemat, 2002, 44(1): 29-44．

[7] De VitaF, Orditura M, MatanoE, et al. A phasestudy of biweeklyoxaliplatin plus infusional 5-fluorouracil and folinicacid( FOLFOX-4) as first-line treatment of advanced gastric cancer patients. Br J Cancer, 2005, 92(9): 1644-1649．

[8] Nardi M, Azzarello D, Maisano R, et al. FOLFOX-4 regimen as first-line chemotherapy in elderly patients with advanced gastric cancer: a safety study. J Chemother, 2007, 19(l): 85-89．

[9] 金懋林, 陈强, 程凤歧, 等. 奥沙利铂联合亚叶酸钙和5-氟尿嘧啶治疗晚期胃癌的研究. 中华肿瘤杂志, 2003, 25(2): 172-174．

[10] Oh SY, Kwon HC, Seo BG, et al. A phase II study of oxaliplatin with low dose leucovorin and bolus and continuous infusion 5-fluorouracil (modified FOLFOX-4) as first line therapy for patients with advanced gastric cancer. Acta Oncol, 2007, 46(3): 336-341．

[11] Louvet C, AndreT, Tigaud JM, et al. Phase study of oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in locally advanced or metastatic gastric cancer patients. J Clin Oncol, 2002, 20(23): 4543-4548．

[12] 刘磊, 李梅. 晚期胃癌的化疗新进展. 华西医学, 2007, 22(2): 430-431．

[13] 杨朝旭, 秦叔逵. 奥沙利铂治疗原发性肝癌的临床研究进展. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15(9): 845-855．

[14] 尹如铁, 王丹青, 谢聪, 等. 奥沙利铂在卵巢癌治疗中的研究进展. 华西药学杂志, 2009, 24(4): 433-436．

[15] 王新林, 王湘辉. 多西紫杉醇联合奥沙利铂治疗复发性卵巢癌. 中国医药指南, 2011, 9(32): 335-337．

[16] 邵棋, 李苏宜. 吉西他滨联合奥沙利铂方案的临床研究进展. 肿瘤防治研究, 2008, 35(4): 297．

[17] 柴晓华等. 金属药物研究新进展. 化学试剂, 2008, 30(2): 99-104.

[18] 杨旭清, 金祥林, 宋勤华. 超分子抗癌药物双环铂的结构研究. 中国科学, 2010, 40(5): 485-491.

[19] Mingjin Xie, Weiping Liu, Liguang Lou, et al. Unusual Dimeric Chemical

Structure for a Carboplatin Analogue as a Potential Anticancer Complex. Inorg. Chem., 2010, 49(13): 5792-5794.

[20] Faivre S, Chan D, Salinas R, et al. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. Biochem Pharmacol, 2003, 66(2): 225-237．

[21] Zwelling LA, Anderson T, Kohn KW. DNA-protein and DNA interstrand cross-linking by cis-and trans-platinum (Ⅱ) diamminedichloride in L1210 mouse leukemia cells and relation to cytotoxicity. Cancer Res, 1979, 39(2 Pt 1): 365-369．

[22] Woynarowski JM, Faivre S, Herzig MC, et al. Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. Mol Pharmacol, 2000, 58 (5): 920-927．

[23] Todd RC, Lippard SJ. Inhibition of transcription by Platinum antitumor compounds. Metallomics, 2009, 1(4): 280-291．

[24] Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, et al. Immunogenic death of colon Cancer cells treated with oxaliplatin. Oncogene, 2010, 29(4): 482-491.

[25] TafaniM, Cohn JA, Karpinich NO, et al. Regulation of intracellular pH mediates Bax activation in Hela cells treated with staurosporine or tumornecrosis factoralpha. J BiolChem, 2002, 277: 49569-49576.

[26] Park MS, De Leon MD, Devarajan P. Cisplatin induced apoptosis in LLC-PKl cells via activation of mitochondrial pathways. Am Soc Nephrol, 2002, 13: 858-865.

[27] 周栋, 孙伟. 顺铂肾毒性发病机制及其防治的研究近况. 中国中西医结合肾病杂志, 2004, 5(10): 617-618.

[28] Filipski K. K., Loos W. J., Verweij J., et al. Interaction of cisplatin with the human organic cation transporter 2. Clin Cancer Res, 2008, 14(12): 3875-3880. [29] Filipski K. K., Mathijssen R. H., Mikkelsen T. S., et al. Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotosicity. Clin Pharmacol Ther, 2009, 86(4): 396-402.

[30] 敖睿, 刘浩, 潘海霞. FOLFOX4方案对肿瘤患者外周神经传导速度的影响. 实用医院临床杂志, 2010, 7(3): 65-66.

[31] Argyriou A A, Polychronopoulos P, Iconomou G, et al. A review on oxaliplatin-inducedperipheralnervedamage. CancerTreatRev, 2008,

34(4):368-377．

[32] Kurniali P C, Luo L G, Weitberg A B. Role of calcium/magnesium infusion in oxaliplatin-based chemotherapy for colorectal cancer patients. Oncology, 2010, 24(3): 289-292.

[33] 孙波, 王叔世, 成健. 谷胱甘肽联合钙镁合剂预防澳沙利铂周围神经毒性临床观察. 中国医学创新, 2012, 9(29): 28-29.

[34] 金雪梅. 铂类药物的毒性作用与预防措施. 现代医药卫生, 2010, 26(21): 3294-3295.

[35] Tournigand C, AndréT, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. J Clin Oncol, 2004, 22(2): 229-237．

[36] Pieck AC, Drescher A, Wiesmann KG, et al. Oxaliplatin-DNA adduct formation in white blood cells of cancer patients. Br J Cancer, 2008, 98(12): 1959-1965．

[37] Zafar SY, Marcello JE, Wheeler JL, et al. Treatment-related toxicity and supportive care in metastatic colorectal cancer. J Support Oncol, 2010, 8(1): 15-20．

[38] 苏忠兰, 王宏伟, 吴迪, 等. α-生育酚对永生化人角质形成细胞内谷胱甘肽生成的影响及其机制研究. 中国美容医学, 2009, 18(12): 1769-1771.

[39] Arnould S, Hennebelle I, Canal P, et al. Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. Eur J Cancer, 2003, 39(1): 112-119．

[40] Liu Z, Qiu M, Tang QL, et al. Establishment and biological characteristics of oxaliplatin-resistant human colon cancer cell lines. Chin J Cancer, 2010, 29(7): 661-667．

[41] Zhao Q, Zhang H, Li Y, et al. Anti-tumor effects of CIK combined with oxaliplatin in human oxaliplatin-resistant gastric Cancer cells in vivo and in vitro. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29(1): 118-131．

[41] C. Lowich, Liebigs Ann. Chem. 1852(84): 308.

[42] E. Frankland, Liebigs Ann. Chem. 1849(71): 171.

[43] E. Frankland, J. Chem. Soc. 1850(2): 267.

[44] CroweA J, Smith P J, AtassiG, et al. Investigations into the antitumour activity of

Organotin compounds. I. Diorganotin dihalide and di-pseudohalide complexes. Chem Biol Interact, 1980, 32(1-2): 171-178.

[45] V. L. Narayanan, M. Nasr, K. D. Paull, NATO ASI Series, Series H: Cell Biology, 1990, (37): 201

[46] V. L. Narayanan, Developments in Pharmacology. 1983, (3): 5

[47] A. J. Crowe, P. J. Smith, G. Atassi, Inorg. Chim. Acta. 1984(93): 179

[48] Crowe AJ, et al. Inorg Chim Acta, 1984, 93: 179

[49] I. Haiduc, C. Silvestru, Coord. Chem. Rev. 1990(99): 253

[50] M. Gielen, M. Melotte, G. Atassi, R. Willem, Tetrahedron. 1989(45): 1219

[51] M. Gielen, C. Vanbellinghen, J. Gelan, R. Willem, Bull. Soc. Chim. Belg. 1988(97): 873

[52] M. Gielen, M. Acheddad, B. Mahieu, R. Willem, Main Group Met. Chem. 1991(14): 73

[53] M. Gielen, A. El Khloufi, M. Biesemans, R. Willem, J. Meunier-Piret, Polyhedron. 1992(11): 1861

[54] A. J. Crowe, Metal-based Antitumor Drugs. 1989(1): 103

[55] M. Gielen, M. Acheddad, E. R. T. Tiekink, Main Group Met. Chem. 1993(16): 367

[56] R. Barbieri, L. Pellerito, G. Ruisi, et al. Inorg. Chim. Acta. 1982(66): L39

[57] F. Huber, G. Roge, L. Carl, et al. J. Chem, Soc. Dalton. Trans. Inorg. Chem. (1972-1999) 1985, 523

[58] J Wan, J. Huang, L. Huang, D. Shi, S. Hu. Inorg. Chim. Acta. 1988(152): 67

[59] S. Hu, D. Shi, T. Huang, J. Wan, Z. Huang, J. Yang, C. Xu. Inorg. Chim. Acta. 1990(173): 3

[60] M. Nath, S. Pokharia, X. Song, et al. Appl. Organomet. Chem. 2003(17): 305

[61] Q. S. Li, P. Yang, Chinese J. Struct. Chem. 1996(15): 163

[62] Q. S. Li, P. Yang, Y. N. Tian, et al. Synthesis and Reaction in Inorg. and Met. -Org. Chem. 1996, 26(4): 561

[63] Q. S. Li, P. Yang, E. B. Hua, C. R. Tian. J. Coord. Chem. 1996(40): 227

[64] Q. S. Li, M. F. C. G. da Silva, J. H. Zhao, A. J. L. Pombeiro. J. Organomet. Chem.

2004(689): 4584

[65] A. J. L. Pombeiro, Q. S. Li, L. G. Han, M. F. C. G. da Silva, Port. Pat. Appl., 2004, 19

[66] Q. S. Li, M. F. C. G. da Silva, A. J. L. Pombeiro, Chem. -A Eur. J. 2004(10): 1456

[67] Sherman, S. E., Gibson, D., Lippard. S. J. Science. 1985(230): 412

[68] Ruisi G, Silvestri A, Barbieri R, et al. Inorg Biochem, 1985, 25, 229

[69] 李青ft, 杨频, 田燕妮, 等. 二正丁基锡(IV) -邻菲咯啉-单核普酸混配配合物的合成与表征. 化学学报, 1997, 55: 370-374

[70] A. Gennari, R. Bleumink, B. Vivani, et al. Toxicol. Appl. Pharmacol, 2000, (169): 185

[71] Von Ballmoos, Christoph, The ion channel of F-ATP synthase is the target oftoxic organotin compounds. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004, 101(31): 11239-11244

[72] A. Yasuaki, Biomed. Res. Trace Elem, 1993, (4): 129

[73] A. Gennari, R. Bleumink, B. Vivani, et al. Toxicol. Appl. Pharmacol., 2002, (181): 27

[74] F. Barbieri, M. Viale, F. Sparatore, et al. Anticancer Drugs, 2002, (13): 599 [75] ATASSI G. Rev, Si, Ge, Sn, Pb Comp., 1985, 8(23): 219-227.

[76] CONG Xue-qing, FANG Xiao-Niu, XIE Qing-Lan. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38-42.

[77] SUN Li-juan, SONG Xue-Qing. Chemical Journal of Chinese Universities, 2004, 25: 646-650.

[78] 吴文娟, 方丹青, 陈任宏等. 抗肿瘤有机锡配合物的电子结构和构效关系研究. 广东药学院学报, 2006, 22(3): 233-238

[79] Gielen M. Organotin compounds and their therapeutic potiential: a report from the Organometallic chemistry Department of the free university of Brussels. Appl. organometal. Chem. 2002, 16: 481-496

[80] Buck B, Mascioni A, Que L, Suguru Inoue, Nobuyoshi Imada, Tsuneo Honjo. Dealkylation of organotin compounds by biological dithiols: toward the chemistry of

Organotin toxicity. J. Am. Chem. Soe., 2003, 125: 13316-13317

[81] Singh HL, Varshneys, Varshney AK. Organotin(IV) complexes of biologically active schiff bases derived from heterocyclic ketones and sulpha drugs. Appl. organometal. Chem., 1999, 13(9): 637-641

[82] Philbert M. A., M. L. Billingsley, K. R. Reuhi. Mechanisms of injury in the central nervous system. Toxicol pathol, 2000, 28(l): 43-53

[83] Snoeij N. J., A. H. Penninks, W. Seinen. Biological activity of organotin compounds-an overview. Environ Res, 1987, 44(2): 335-353

[84] Riley A. L., R. J. Dacanay, J. P. Mastro Paolo. The effeets of trimethyltin chloride on the acquisition of long delay conditioned taste aversion learning in the rat. Neurotoxicology, 1984, 5(2): 291-295

[85] A. W. Brown, W. N. Aldridge, B. W. Street, et al. The behavioral and neuropathologic sequelae of intoxication by trimethyltin compounds in the rat. Am J pathol, 1979, 97(l): 59-82

[86] Katharina Krüger, Victoria Diepgrond, Maria Ahnefeld, et al. Blockade of glutamatergic and GABAergic receptor channels by trimethyltin chloride. Br J pharmacol, 2005, 144(2): 283-292

[87] Moser VC. Rat strain-and gender-related differences in neurobehavioral screening: acute trimethyltin neurotoxicity. J Toxicol Environ Health, 1996, 47(6): 567-586

[88] Stanton M. E., K. F. Jensen, C. V. Piekens. Neonatal exposure to trimethyltin disrupts spatial delayed alternation learning in preweanling rats. Neurotoxicol Teratol, 1991, 13(5): 525-530

[89] Riley A. L., R. J. Dacanay, J. P. Mastro Paolo. The effeets of trimethyltin chloride on the acquisition of long delay conditioned taste aversion learning in the rat. Neurotoxicology, 1984, 5(2): 291-295

[90] M. J. Saary, R. A. House. Preventable exposure to trimethyl tin chloride: a case report. Occup Med(Lond), 2002, 52(4): 227-230

[91] R. Besser, G. Krämer, R. Thümler, et al. Acute trimethyltin limbic- cerebellar syndrome. Neurology, 1987, 37(6): 945-950

[92] Eyer C. L., C. Rio, J. R. Smith. Trimethyltin reduces ATP levels and MTT reduction in the LRM55 rat astroeytoma cell line. In Vitr Mol Toxicol, 2000, 13(4): 263-268

[93] Aschner M., M. Garmon, H. K. Kimelberg. Interactions of trimethyltin (TMT) with rat primary astroeyte cultures: altered uptake and efflux of rubidium, L-glutamate and D-aspartate. Brain Res, 1992, 582(2): 181-185

[94] Dawson R., Jr. T. A. Patterson, B. EPPler. Endogenous exeitatory amino acid release from brain slices and astroeyte cultures evoked by trimethyltin and other neurotoxic agents. Neuroehem Res, 1995, 20(7): 847-858

[95] Izabela Figiel, Anna Fiedorowicz. Trimethyltin-Evoked Neuronal Apoptosis and Glia Response in Mixed Cultures of Rat Hippocampal Dentate Gyrus: A New Model for the Study of the Cell Type-Specific Influence of Neurotoxins. Neurotoxicology, 2002, 23(l): 77-86

[96] Barbara Viviani, Emanuela Corsini, Corrado L. Galli, [Marina Marinovich](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X9898406X). Glia Increase Degeneration of Hippocampal Neurons through Release of Tumor Necrosis Factor-α. Toxicology and Applied Pharmacology, 1998, 150(2): 271-276

[97] C. A Kassed, T. L Butler, M. T Navidomskis, et al. Mice expressing human mutant presenilin-1 exhibit decreased activation of NF-κB p50 in hippocampal neurons after injury. Mol Brain Res, 2003, 110(l): 152-157

[98] 黄志芳, 急性有机锡中毒性脑病临床分析. 杭州医学高等专科学校学报, 2003, 24(1): 23-24.

[99] O'Bryan MK, Zini A, Cheng CY, Peter N Schlege. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression corelation with sperm motility. Fertil Steril, 1998, 70(6): 1143-1147．

[100] 王永芳. 有机锡化合物的污染及其毒性. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(3): 244-247.

[101] 阿那尼, 黄玉瑶. 氯化二丁基锡对雌小鼠的生殖毒性. 环境科学学报, 2000, 20(6): 746-750.

[102] Rice CD. Immunotoxicity in channel catfish, ictalurus punc-tatus, following

Acute exposure to tributyltin. Arah Environ Contam Toxicol, 1995, 25(4): 464-470.

[103] Whalen MM, Loganathan BG, Kannan K. Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro. Environ Res, 1999, 81(2): 108-116.

[104] Whalen MM, Loganathan GB. Butyltin exposure causes a rapid decrease in cyclic AMP levels in human lymphocytes. Toxicol Appl Pharmac, 2001, 171(3): 141-148

[105] De Santiage A, Aguilar Santelises M. Organotin compounds decrease in vitro survival, proliferation and differentiation of normal human Blymphocytes. Hum Exp Toxicol, 1999, 18(10): 619-620

[106] 石孝洪, 魏世强. 有机锡化合物的环境化学行为及效应. 重庆大学学报, 2003, 26(7): 104-107

[107] McAllister B. G, D. E. Kime. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (Danio rerio). Aquat Toxicol, 2003, 65(3): 309-316

[108] 朱舜. 急性有机锡中毒58例. 中国劳动卫生职业病杂志, 2006, 24(10): 623-624

[109] 赖关朝. 有机锡对甲状腺激素水平影响的初步探讨. 中国职业医学, 1999, 26(6): 27-28

[110] 梁淑轩, 孙汉文. 有机锡的环境污染及监测方法研究进展. 环境与健康杂志, 2004, 21(6): 425-427

[111] 孙淑云, 李涛. 二巯基辛基锡的毒性试验. 卫生毒理学杂志, 1997, 11(3): 203

[112] 郭新彪, 大野泰雄. 有机锡化合物对初培养肝细胞药物代谢酶活性的影响. 卫生毒理学杂志, 1996, 10(3): 173

[113] Heidrich DD, Steckelbroedk S, Klingmuller D. Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. Steroids, 2001, 66(10): 763-769

[114] 王春华, 梁友信. 二月桂酸二丁基锡对职业接触工人健康的影响. 蚌埠医学院学报, 1997, 22(2): 118-119

[115] 唐小江, 黄建勋. 三甲基氯化锡引发低血钾症动物模型的研究. 中国职业医学, 2001, 28(1): 6-8

[116] Kumano N. Antitumor effect of the organoganium compound Ge-132 on the Lewis Lung Carcinoma(3LL) in C57 BL/6 mice. Tohoka J Exp Med, 1985, 13(6): 97

[117] Asai K, Okikawa H. Synthesis of the enantiomer of 4-substituted ylactones with known absolute configuration. JP 4627690, 1971

[118] 王鲁, 莫宁. 有机锗药理毒理及应用研究进展. 广西科学, 1998, 5(4): 294-299

[119] 上海市微量元素学会. 全国第一届着研讨会资料汇编. 上海市营养学会, 1990

[120] 全国锗研究联络组. 全国第二届锗研讨会论文集. 江苏扬州, 1993

[121] 唐博恒, 莫卓寿等. 高锗酵母的研究. 解放军预防医学杂志, 1994, 12(34): 179-183

[122] Meikle SR, Bailey D. L, *et al*. Simulteneous emission and transmission measurements for attenuation correction in whole-body. PET J Nucl Med, 1995, 36(9): 1680-1688

[123] 程棕, 何更生等. Ge-132对人乳癌细胞株BCaP-37的生物学作用. 微量元素与健康研究, 1996, 31(1): 3-5

[124] 杨康林等. 有机锗化合物的合成及生物活性. 广东微量元素科学, 2000, 7(5): 7-13

[125] 陈兆和等. 有机锗（Ge-132)研究概况. 华南药讯, 2000, 30(2): 45-53

[126] 唐任寰, 胡少文. 锗元素与抗肿瘤药物(I). 微量元素与健康研究, 1997, 14(2): 51-52

[127] 杨康林, 李新生. 几种新型锗修饰药物衍生物的合成及其抗癌活性. 应用化学, 2004, 21(1): 101-103.

[128] 上官国强, 李雪, 赵灿. 有机锗蒽醌酰胺和有机锗萘酚酯倍半氧化物的合成及对体外培养癌细胞的抑制作用. 济宁医学院学报, 2009, 32(2): 77-80.

[129] 王夔. 生命科学中的微量元素. 中国剂量出版社, 1996: 790-814

[130] 唐任寰, 胡少文. 锗元素与抗肿瘤药物（Ⅰ）. 微量元素与健康研究, 1997, 14(2): 51-52

[131] Puthraya KH, Srivastava TS, Amonkar AJ, *et al*. Some potential anticancer palladium (II) complexes of 2, 2'-bipyridine and amino acids. Inorg Biochem, 1986, 26: 45-54.

[132] Kuduk-Jaworska J, Puszko A, Kubiak M, *et al*. Synthesis, structural, physico-chemical and biological properties of new palladium (II) complexes whith 2, 6-dimethyl-4-nitropyridine. Inorg Biochem, 2004, 98: 1447-1456.

[133] 高恩君, 程卯生, 王克华. 钯(II)配合物抗癌活性研究进展. 中华医药杂志, 2006, 6(2): 406-407.

[134] 柴晓华, 王飞利, 黄洁, 等. 金属药物研究新进展. 化学试剂, 2008, 30(2): 99-104.

[135] 刘杰, 计亮年. 金属钌配合物的抗肿瘤活性及其作用机理. 化学进展, 2004, 16(6): 969-973.

[136] Keppler B K, Henn M, Juhl U M, *et al*. New ruthenium complexes for the treatment of cancer. Progress in Clinical Biochemistry and Medicine. Springer-Ver-lag Berlin Heidelberg, 1989, 10: 41-69

[137] Keppler B K, WEHE D, ENDRES H, *et al*. Synthesis, antitumor activity, and X-ray structure of bis(imidazolium)(imidazole) pentachlororuthenate(Ⅲ), (ImH) 2(RuImCl5). Inorg Chem, 1987, 26: 844-846.

[138] Keppler B K, RUPP W, JUHL U M. Synthesis, molecular structure, and tumor-inhibiting properties of imidazolium trans- bis (imidazole) tetrachlororuthenate (Ⅲ) and its methyl-substituted derivatives. Inorg Chem, 1987, 26: 4366-4370

[139] Keppler B K, LIPPONER K G, STENZEL B, *et al*. In Metal Complexes in Cancer Chemo therapy (ed. Keppler B K) [M]. Weinheim: V CH V erlagsgesellschaft, 1993: 187-220.

[140] LIPPONER K G, VOGEL E, KEPPLER B K. Synthesis, characterization and solution chemistry of trans-indazoliumtet-rachlorobis (indazole) ruthenate (Ⅲ), a new anticancer ruthenium complex. IR, UV, NMR, HPLC investigations and antitumor

Activity. Crystal structures of trans-1-methyl-indazoliumtetrachlorobis- (1-methylindazole) ruthenate (Ⅲ) and its hydrolysis product trans-monoaquatrichlorobis-(1-methyl-indazole) -ruthenate(Ⅲ). Metal-Based Drugs, 1996, (3):243-260.

[141] PETI W, PIEPER T, SOMMER M. Synthesis of tumor-inhibiting complex salts containing the anion trans-tetra-chlorobis(indazole) ruthenate(Ⅲ) and crystal structure of the tetraphenylphosphonium salt. Eur J Inorg Chem, 1999, 1999: 1551-1555.

[142] PIPPER T, SOMMER M, GALANSKI M. [RuCl3ind3] and [RuCl2ind4]: Two new Ruthenium complexes derived from the Tumor-inhibiting RuⅢcompound HInd (OC-6-12) -[RuCl4ind2] (ind=indazole). Inorg Allg Chem, 2001, 627: 261-265.

[143] GALEANO A, BERGER M R, KEPPLER B K. Antitumor activity of some ruthenium derivatives in human colon cancer cell lines in vitro. Arzneim-Forsch/Drug Res, 1992, 42(1): 821-824.

[144] VILAPLANA R, ROMERO M A, SALAS J M. Synthesis, structure and antitumour properties of a new 1, 2-propylenediaminetetraacetate-Ruthenium (Ⅲ). Compound Metal-Based Drugs, 1995, (2): 211-219.

[145] 尹富玲, 申佳, 邹佳嘉, 等. 2, 2’-联吡啶和去甲基斑蝥酸根桥联双核铜(II)配合物的合成、结构表征及抗癌活性的研究. 化学学报, 2003, 61(4): 556-561.

[146] 徐刚, 崔玉波, 崔凯, 等. 非铂类金属抗肿瘤药物的研究进展. 化学进展, 2006, 18(1): 107-113.

# 攻读学位期间发表论文情况

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **序**  **号** | **论文题目** | **作者** | **刊物名称，年，卷**  **（期）：起止页码** | **收录**  **情况** |
| 1 | Apoptosis induced neurotoxicity of Di-n-butyl-di-(4-chlorobenzohydroxa mato)Tin (IV) via mitochondria-mediated pathway in PC12 cells. | Rui Ge, Wen-Hua Ma,  Yun-Lan Li, Qing-Shan  Li\*. | Toxicology in Vitro, 2013, 27(1),  92–102. | SCI |
| 2 | Oxidative stress in di-n-butyl-di-(4-chlorobenzohydroxa mato)tin (IV)-induced hepatotoxicity determined by proteomic profiles. | Li Tang, Yun-lan Li, Rui Ge, Qing-Shan  Li\* | Toxicology Letters, 2012, 213: 167-173. | SCI |
| 3 | Protective effects of farrerol against hydrogen peroxide-induced apoptosis in human endothelium-derived EA.hy926 Cells. | Li Jiankuan, Ge Rui, Tang Li, Li Qingshan\*. | Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, doi: 10.1139/cjpp-2013-  0008. | SCI |

致 **谢**

回首五年的学习和生活，我的每一步成长无不渗透着老师、家人、同学和朋友的关心、鼓励和帮助。借此论文完成之际，我谨向我的导师李青ft教授以及所有给予我帮助、关心我成长的人们表示诚挚的谢意。

本论文是在李青ft导师的热情关怀和精心指导下完成的，在此我首先向我的导师李青ft教授表示由衷的感谢和深深的敬意。从课题的立题至论文的完成过程均浸透着导师的汗水和心血，导师渊博的知识、严谨认真的科学态度、敏锐的学术思维、高效的工作作风、热情宽广的胸怀永远是我学习的楷模。五年来，导师经常在百忙之中询问课题研究进展，并给予及时的引导、热情的鼓励和积极的支持，他的谆谆教诲将使我受益终生，我也真心希望在未来的日子里能更多地回报师恩！深深感谢师母韩玲革教授在文献检索方面提供的帮助，在生活方面给予的温馨关怀和照顾。

感谢医学实验中心张华屏、窦岩等老师在分子生物学实验中给予的指导和帮助；感谢公共卫生学院张勤丽、刘海芳老师在毒代动力学检测时的指导和无私帮助。他们优秀的科研习惯和严谨的工作作风使我受益匪浅，在此祝愿他们事业顺利，家庭幸福！

感谢李云兰、梁泰刚、冯秀娥、张丽锋、李建宽、唐莉、刘恩荔等同门及课题组班树荣老师、赵成孝老师给予的关心和帮助，有了他们的无私帮助，实验才得以顺利完成。

感谢多年来培育我成长，支持我不断进取的父母！感谢自始至终给予我理解和帮助的爱人，他们是我的精神支柱和力量源泉。

最后，本论文的完成受到了国家“重大新药创制”科技重大专 项

（2009ZX09103-104）、国家自然科学基金资助项目（No. 30973603, 30772682）、

ft西省青年科技研究基金（No.2007021035）、ft西回国留学人员科研资助项目

（No.2010-54）、ft西医科大学08博士启动基金及ft西省优秀青年学术带头人、

ft西省高等教育科学技术创新团队计划、ft西医科大学青年基金（No.02201123）等基金的大力支持，在此表示感谢。

拼搏的岁月里充满艰辛，然而更有一份难得的欣慰和快乐，多年的追求中，良师益友的指导和帮助将激励我在今后的人生道路上迈上一个更高的境界，所有的教诲与关爱会在我的记忆深处永远珍藏。

# 个人简历

姓名：葛睿性别：女

籍贯：河北省徐水市出生日期：1979年8 月

**工作学习经历：**

1997.9～2002.6中国药科大学学士

2002.9～2005.6中国药科大学硕士

2005.7～今ft西医科大学药学院中药学教研室任教

2008.9～2013.6 ft西医科大学攻读博士研究生

**研究方向：**抗高血压药物及神经系统保护药物的作用及机制**在学期间参与的科研项目：**

1、国家自然基金（81274132）：基于caspase依赖性线粒体信号转导通路抑制血管内皮细胞凋亡探讨罗布麻总黄酮抗血栓作用机理。 第四参与人。

2、国家自然基金（81172938）：具有调控VSMC增殖信号通路的新型二氢黄酮类小分子的构建及其调控机制研究。第五参与人。

3、国家自然基金（81101687）：新型凯林内酯类香豆素的小分子构建及逆转肿瘤MDR作用研究。第三参与人。

4、国家自然基金（81072987）：基于次生代谢相关基因表达谱的党参道地性形成的遗传机制研究。第四参与人。

5、国家自然基金（30873372）：党参遗传多样性及与道地性品质相关的分子标记。第四参与人。

6、国家自然基金（30772682）：有机锡抗癌化合物DBDCT中枢神经系统毒性作用机制。第三参与人。

7、ft西医科大学青年基金（02201123）：双向电泳结合MALDI-TOF-MS/MS寻找有机锡化合物DBDCT的神经毒性靶蛋白。申请人

**在学期间发表的主要论文**

1、Rui Ge, Wen-Hua Ma, Yun-Lan Li, Qing-Shan Li\*. Apoptosis induced neurotoxicity of Di-n-butyl-di-(4-chlorobenzohydroxamato) Tin (IV) via mitochondria-mediated pathway in PC12 cells, Toxicology in Vitro, 2013, 27(1), 92–102. (IF=2.775)

2、Li Tang, Yun-lan Li, Rui Ge, Qing-Shan Li\*. Oxidative stress in

Di-n-butyl-di-(4-chlorobenzohydroxamato) tin (IV) -induced hepatotoxicity determined by proteomic profiles. Toxicology Letters, 2012, 213: 167-173. (IF=3.230)

3、Li Jiankuan, Ge Rui, Tang Li, Li Qingshan\*. Protective effects of farrerol against

Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human endothelium-derived EA. hy926 Cells. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, published online, doi: 10.1139/cjpp-2013-0008. (IF=1.953)

4、张志勇，葛睿，刘恩荔，高建平\*. 日本毛连菜降血糖作用的实验研究. 中国

实验方剂学杂志, 2012, 18(12)

5、张丽锋，葛睿，平耀东，李青ft\*. 呋喃二烯复乳的制备及体内外评价. 《2009年中国药学大会暨第九届中国药师周论文集》.