

下苯环上的电子云发生改变, 正电荷的氟离子攻击苯环上的 1 或者 2 的位置, 发生亲电反应, 显而易见, 1 位比 2 位在受到 R 基团的作用后更富含电子, 也就是更容易发生亲电反应, 因此 1 位的标记物要比 2 位的多很多。

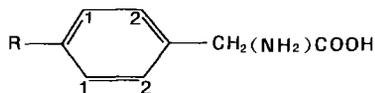


图 3 典型氨基酸氟标记结构示意图

本研究中使用的高效液相层析条件无法鉴别和分离这些异构体, 虽然多种异构体的生物学行为可能类似, 但有必要逐个分离研究。

志谢 本研究是在日本 Sasagawa 医学奖学金的资助下完成的, 在此对日本财团和日中医学协会表示诚挚的感谢

参 考 文 献

1 Tomiyoshi K, Amed K, Muhammad S, et al. Synthesis of isomers of

¹⁸F-labeled amino acid radiopharmaceutical: position 2- and 3-L-¹⁸F-alpha-methyltyrosine using a separation and purification system. Nucl Med Commun, 1997, 18(2): 169-175.

2 Ehrenkafer RE, Potocki JF, Jewett DM, et al. Simple synthesis of F-18-labeled 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: concise communication. J Nucl Med, 1984, 25(3): 333-337.

3 Jager PL, Vaalburg W, Pruim J, et al. Radiolabeled amino acids: basic aspects and clinical applications in oncology. J Nucl Med, 2001, 42(3): 432-445.

4 Inoue T, Koyama K, Oriuchi N, et al. Detection of malignant tumors: whole-body PET with fluorine-18 alpha-methyl tyrosine versus ¹⁸F-FDG-preliminary study. Radiology, 2001, 220(1): 54-62.

5 Kaasinen V, Nurmi E, Bruck A, et al. Increased frontal [¹⁸F]fluorodopa uptake in early Parkinson's disease: sex differences in the prefrontal cortex. Brain, 2001, 124(6): 1125-1130.

6 Hamacher K. Phase-transfer catalysed synthesis of 4-s-β-D-glucopyranosyl-4-thio-D-glucopyranose (Thiocellobiose) and 2-s-β-D-glucopyranosyl-2-thio-D-glucopyranose (Thiosphorose). Carbohydrate Res, 1984, 128(2): 291-295.

(收稿日期: 2005-09-20)

·实验核医学·

富勒烯及其衍生物在核生物医学领域应用的研究现状

倪瑾 蔡建明 吴秋业

【摘要】 富勒烯及其衍生物是一类具有独特物理化学特性的化合物, 在生物医学领域有广泛的应用前景。介绍该类化合物的合成及制备, 富勒烯笼外配合物的抗 HIV 病毒、断裂 DNA 和清除自由基等生物学活性, 以及富勒烯金属包合物在核医学诊断中的应用研究。

【关键词】 烯炔类; 生物学标记; 诊断显像; 富勒烯

【中图分类号】 R817.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)02-0072-04

The research status of empty and metallofullerene derivatives for biological applications

NI Jin¹, CAI Jian-ming¹, WU Qiu-ye²

(1. Department of Radiation Medicine, 2. Department of Organic Chemistry; Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Fullerenes are a class of compounds with unique chemical and physical properties, which potential uses can be explored in the biological medicine field. The review reports the synthesis and preparation of the compounds; the biological effects of empty fullerenes in anti-HIV, DNA cleavage, radical scavenger and recent aspects of metallofullerene as nuclear radiomedicine for diagnosis and treatment of diseases.

【Key words】 Alkenes; Biological markers; Diagnostic imaging; Fullerene

1985 年 Smalley 等发现了富勒烯(fullerene)这一类结构独特的化合物分子, 富勒烯分子的球形中空

结构使得它能在球的内外表面都可以进行反应, 从中得到各种功能的富勒烯衍生物, 如富勒烯包合物、富勒烯骨架掺杂的杂笼富勒烯和富勒烯笼外配合物。其中, 金属包含于 C₆₀(指碳原子数为 60 的富勒烯, 也有 C₈₂ 型等)笼内部的用 M@C₆₀ 表示, 金属和 C₆₀

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30200069)

作者单位: 1. 200433 上海, 第二军医大学放射医学教研室(倪瑾, 蔡建明); 2. 第二军医大学药学院有机化学教研室(吴秋业)

通讯作者: 蔡建明(E-mail: cjm882003@yahoo.com.cn)

在笼外表起反应应用 $M C_{60}$ 表示。元素周期表中的大多数金属均能以某种方式与富勒烯作用生成稳定化合物。富勒烯分子像一个大笼子将碱土金属分子关在其中, 这种结构有利于阻止金属原子与生物机体细胞接触, 降低重金属对机体的毒性^[1]。

1 富勒烯及其衍生物的生物代谢

富勒烯的生物代谢尚在研究之中^[2]。Tabata 等^[3]用 ^{125}I 标记的 C_{60} -聚乙烯乙二醇在纤维肉瘤小鼠体内的分布, 发现富勒烯衍生物可以通过血脑屏障, 最后全部分布在小鼠肌肉和体毛中, 且注射后一周仅有 2.4% 的富勒烯衍生物随粪便排出, 其余均滞留于体内。Qingnuan 等^[4]对 ^{99m}Tc 标记的 $C_{60}(OH)_x(O)_y$, 在小鼠和新西兰兔体内的生物代谢进行了研究, 结果发现 $^{99m}Tc-C_{60}(OH)_x(O)_y$ 能迅速输送到小鼠体内各个组织中, 颅骨和肝脏摄取最快, 但不能透过血脑屏障; 血液清除较慢, 能长时间保持浓度, 48h 内仍在骨组织保持着较高浓度; 除脑以外的其他器官都有部分标记物滞留, 肾肝及肠道中的放射性浓集度较高, 提示了 $^{99m}Tc-C_{60}(OH)_x(O)_y$ 可能经由肾或消化道排泄。对新西兰兔的 SPECT 检查支持上述小鼠的研究结果。富勒烯衍生物的体内分布及生物代谢与所连接的配基有关, 配基不同, 与组织的亲和性也各有差异。

2 中空富勒烯衍生物的生物活性及医学应用

2.1 抑制酶活性

最初认识到富勒烯类化合物可以用于生物医药是在 20 世纪 90 年代初。Simon 等^[5]报道, C_{60} 的 2-氨基乙基二苯基单琥珀酰亚胺衍生物 p, p-bis(2-aminoethyl)-diphenyl- C_{60} monosuccinimide 对人类免疫缺陷病毒蛋白酶 (human immunodeficiency virus protease, HIVP) 有抑制作用。David 等^[6]报道了类似的发现。HIV 是艾滋病的病原体, 主要感染人类 CD_4 T 淋巴细胞, HIVP 对 RNA 逆转录和病毒蛋白质的合成有很重要的催化功能, 是抗病毒药物的主要抑制对象。已知 HIVP 的活性中心近似一个圆柱体, 两边线形排列着疏水氨基酸和两个亲水的催化底物: 肽链断裂的天冬氨酸 (Asp25, Asp125)。Sijbesma 和 Rajagopalan 等^[7,8]发现, 某些 C_{60} 衍生物 (见图 1) 的分子直径与 HIVP 的活性中心接近, 并且由于两者共有的疏水性而可以紧密结合。除疏水静

电作用外, 还发现一些 2 价的金属富勒烯可以通过金属原子与天冬氨酸形成盐桥而增加结合力。图 1 的两种中空衍生物对急、慢性感染 HIV 的 H9 细胞和球形单核血细胞均有抗病毒作用, 且无毒性; 而特异的抗 HIV 药物 3-叠氮脱氧胸苷仅对急性感染有效, 并具有毒性。除 HIVP 外, C_{60} 对半胱氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶也有抑制作用。近年来又不断有新型化合物合成, 其中有部分表现出较好的抗艾滋病病毒的活性^[9,10]。

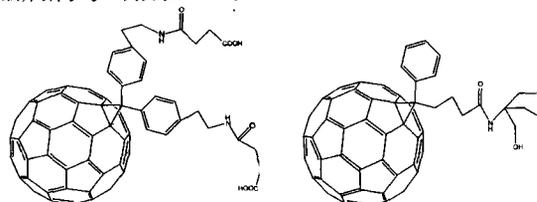


图 1 两种中空富勒烯衍生物结构示意图

2.2 切割 DNA

DNA 链的完整性和连续性是细胞正常生长的物质基础。 C_{60} 可以和单链 DNA、双链 DNA 或带“发夹”结构的双链 DNA 发生作用, 在光照条件下, DNA 链上的鸟嘌呤(G)处可发生选择性断裂。对于这种现象, 多数人认为, C_{60} 在接受光照时通过能量转移, 氧分子转变成单线态氧而破坏 DNA 链; 也有人认为与单线态氧无关, 而是因为 C_{60} 经光照后, 激发到三重态, 并与 DNA 链直接作用产生自由基而切割 DNA。无论是基于哪种理论, C_{60} 的这种作用给肿瘤治疗带来了新的途径^[11-14]。

2.3 吸收自由基

自由基是一类含有不成对电子的原子、原子团或分子的总称。在病理状态下, 如缺血、缺氧等, 机体产生的大量自由基会损伤 DNA, 是细胞凋亡、坏死的主要诱因。

富勒烯表面有大量的共价双键, 很容易被自由基侵袭, 有人将其称为“自由基海绵”, 是目前最有效的自由基清除剂。有报道称富勒烯最多可以吸收 34 个甲基自由基^[15]。正是由于这一特性, 羧基化或者羧基化的富勒烯具有抗氧化和神经保护作用。Dugan 等^[16]报道, 用羧基化富勒烯治疗超氧化歧化酶基因编码缺失的肌萎缩侧索硬化症转基因小鼠模型, 治疗组不仅症状比对照组晚出现 10d 以上, 而且生存期增加了 8d 以上。关于 C_{60} 吸收自由基和保护神经细胞的作用原理尚未明确, 由于富勒烯衍生物所接的官能团结构数量各异, 再加上细胞、个体

处理方式不同, 会直接影响富勒烯衍生物与有机体生物膜的相互作用, 包括细胞膜的通透能力及接受自由基的能力等结果, 导致不同研究小组得出迥然不同的结论, 因此经过适当化学修饰的富勒烯能真正阻止神经细胞凋亡发生而用于神经性退化及紊乱、脑梗死以及延缓衰老等临床治疗方面尚需时日^[17]。

3 包含金属富勒烯衍生物的生物活性及核生物学应用

笼内金属富勒烯的最大特征是: ①全部由碳原子组成的分子表面积大($\geq 200\text{A}^2$); ②笼内空间大(直径为 7~8A), 至少能容纳 3 个镧系原子; ③笼内金属离子的解离系数 K 几乎为零, 降低笼内金属富勒烯的毒性和代谢率; ④维持分子整体不带电的中性状态; ⑤笼表面碳原子易发生化学反应生成新衍生物; ⑥笼内金属富勒烯能从小鼠体内排出。与其他方法不同的是, 这一系列特性保证它们能将金属原子带入体内用于医学诊断和治疗, 尤其是作为造影剂的新材料, 有望较大程度地提高组织的分辨率^[18]。

CT 造影剂大多以可溶性碘为主, MRI 造影剂以含 Gd 的顺磁性化合物为主, SPECT 检查中绝大部分使用了含 ^{99m}Tc 的放射性药物。由于造影剂或放射性药物的分子结构和化学毒性, 大剂量使用会使患者产生副作用, 诸如过敏、呼吸不畅以致休克死亡等严重后果。因此, 低毒高效的造影剂已经成为临床应用的强烈需求。有研究表明, 如果增加造影剂的“成球形”, 比如选择一些非平面结构的分子会大大降低毒性; 另外有人注意到用大量的亲水性取代基团来保护疏水苯环也可以降低毒性; 造影剂最好能在血库中滞留较长时间, 在血液中扩散速度较慢, 从而在 0.5h 内通过成像快速诊断诸如中风等疾病。富勒烯金属衍生物和碘化衍生物作为造影剂和放射性药物显示了良好前景。

3.1 CT 造影剂

碘对 X 射线有高衰减作用, 在 CT 图像上表现为高密度, 增加了碘分布区与周围组织的密度对比度。Wharton 等^[19]通过六碘丙二酰胺与富勒烯反应制成高度碘基化的 C_{60} 分子, 为血管造影创造了一种全新技术。这一化合物能在血流中滞留 1h, 并且没有表现出明显毒性。这一技术使得废除导管注入成为可能。与普通的造影剂相比, 含碘富勒烯衍生物的球形结构降低了黏度, 有利于随血液快速进

入组织; 两边各带有 3 个碘原子的苯环可以被富勒烯的中心封闭, 减弱了与血浆蛋白之间共同的疏水作用, 减少与血浆蛋白的结合, 增加机体的耐受; 由于含有 6 个碘原子, 药物的用量将大大降低, 减少了过敏等不良反应的发生率。

3.2 MRI 造影剂

在临床 MRI 中, 30% 以上的诊断需用造影剂, 用来缩短成像时间、提高成像对比度和清晰度。已经进入临床应用的有钆-二亚乙基三胺五乙酸(Gd-DTPA) 及其类似物。但是, 目前使用的螯合物仍然容易在体内代谢后释放出少量的毒性放射性元素, 对机体有害。

在笼内金属富勒烯衍生物中, $\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_x$ 具有较好对比效果的 MRI 造影剂。它是基于检测人体暴露于横向磁场时水分子内质子的弛豫时间, 造影剂可以增强成像组织比如转移肿瘤的分辨率。与现今的 MRI 造影剂相比, $\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_x$ 因为自身的球形结构能包裹 Gd 原子, 能有效地防止 Gd 与细胞接触。同时这种化合物的结构极为稳定, 即使在体内复杂的生化环境中也不会分解释放 Gd 离子。日本大冢公司制药公司已获得 $\text{Gd}@\text{C}_{82}$ 作为 MRI 用造影剂的专利。核磁共振散射显示, 富勒烯 Gd 金属衍生物在 40℃ 时的弛豫时间是现今常见 MRI 造影剂如 Gd-DTPA 等的 5 倍。其原因可能不仅在于 Gd 原子的作用, 还可能是处于富勒烯球形表面的以氢键结合的水分子中的氢原子延长了弛豫时间。Bolskar、Toth 和 Xenogiannopoulou 等^[20-22]最近还作了一项关于 $\text{Gd}@\text{C}_{60}\text{C}(\text{COOCH}_2\text{CH}_3)_2]_{10}$ 、 $\text{Gd}@\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 及 $\text{Dy}@\text{C}_{82}$ 等衍生物的研究工作。作为 MRI 造影剂, 这些化合物溶解性更好, 不分布在网状内皮组织, 为合成更多的富勒烯为基础的化合物提供了很好的方向。

3.3 放射性药物和示踪剂

在核医学的放射性药物和示踪剂方面, 富勒烯金属包合物也有许多潜在的用途。通常的临床放射性药物是用纳克或毫克级特异性放射性金属元素与药物螯合后注入体内, 达到诊断和治疗的目的。由于螯合键的存在, 有毒的放射性金属元素避免了直接与机体组织如血液等接触, 但这些化合物在体内代谢动力学相当不稳定, 有毒放射性金属元素释放到血液中的量尽管极少, 但也会对机体造成副作用。相比之下, 金属富勒烯抗代谢作用和它

的高度稳定性, 可望成为体内传输放射性金属的更好的替代物。目前, 研究较多的富勒烯金属元素是钬(^{166}Ho)。Watanabe 等^[23]发现, $^{166}\text{Ho}@C_{82}(\text{OH})_x$ 注入小鼠体内后, 约有 20%~30% 的能保持活性, 生成足够的 ^{166}Ho , 达到示踪或放射诊断的目的。该化合物进入机体 1h 后基本上滞留于血液, 然后逐渐进入骨组织, 最后聚积在肝脏, 首个 5 日清除率约为 20%。Cagle 等^[24]合成的 $^{166}\text{Ho}@C_{82}(\text{OH})_x$ 证实了在体内用笼内金属富勒烯衍生物分子作为放射示踪剂的可能, 其某些特性, 如在血内滞留时间长达 1h、能被机体全部清除以及无急性毒性等表现, 都引起研究者的极大兴趣。

理论上, 富勒烯金属示踪剂所包含的重金属在中子激发/灭活的过程中一直保证在笼状结构内, 这在核医学的诊断和治疗中尤为重要, 因为这样可以保证激发量大且避免了有毒金属在体内释放。但这方面的尝试结果尚不稳定, 还有很多问题有待解决, 比如如何防止金属元素的猝灭等。

综上所述, 富勒烯及其衍生物由于自身的球形结构、高度稳定性和对组织细胞的低毒性而极有希望成为放射医学和核医学的一种新型检查试剂。当然, 此项研究仍在起步阶段, 富勒烯衍生物的合成产量有限, 价格昂贵, 限制了研究速度; 其次, 富勒烯在机体内代谢的确切途径依然没有定论; 而富勒烯本身的光动力活性和切割 DNA 的生物活性, 作为放射诊断用药是否会对正常的组织造成损伤依然是需要考虑的问题。

参 考 文 献

- Nakamura E, Isobe H. Functionalized fullerenes in water. The first 10 years of their chemistry, biology, and nanoscience. *Acc Chem Res*, 2003, 36(11): 807-811.
- Stephen RW. Biological aspects of fullerenes. In: Karl MK, Rodney SR. Fullerenes: chemistry, physics and technology. New York: John Wiley Sons, 2000. 437-465.
- Tabata Y, Murakami Y, Ikada Y. Photodynamic effect of polyethylene glycol modified fullerene on tumor. *Jpn J Cancer Res*, 1997, 88(11): 1108-1116.
- Qingman L, Yan X, Xiaodong Z, et al. Preparation of $(^{99m}\text{Tc}-\text{C}(60)(\text{OH})_x)$ and its biodistribution studies. *Nucl Med Biol*, 2002, 29(6): 707-710.
- Simon HF, Dianne LD, Rint PS, et al. Inhibition of the HIV-1 Protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 6506-6509.
- David IS, Stephen RW, Raymond FS. Anti-human immunodeficiency virus activity and cytotoxicity of derivatized buckminsterfullerenes. *Bioorg Med Chem Lett*, 1996, 6(11): 1253-1256.
- Sijbesma R, Srdanov G, Wudl F, et al. Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 6510-6512.
- Rajagopalan P, Wudl F, Schinazi RF, et al. Pharmacokinetics of a water-soluble fullerene in rats. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(10): 2262-2265.
- Zhu Z, Schuster DI, Tuckerman ME. Molecular dynamics study of the connection between flap closing and binding of fullerene-based inhibitors of the HIV-1 protease. *Biochemistry*, 2003, 42(5): 1326-1333.
- Marchesan S, Da Ros T, Spalluto G, et al. Anti-HIV properties of cationic fullerene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15(15): 3615-3618.
- Tatiana DR, Ester V, Giampiero S, et al. Design, synthesis and biological properties of fulleropyrrolidine derivatives as potential DNA photoprobes. *J Supramol Chem*, 2002, 2(1,3): 327-334.
- Yu L, Yan-Li Zh, Yong Ch, et al. A Water-soluble β -cyclodextrin derivative possessing a fullerene tether as an efficient photodriven DNA-cleavage reagent. *Tetra Lett*, 2005, 46: 2507-2511.
- Arimondo PB, Moreau P, Boutorine A, et al. Recognition and cleavage of DNA by rebeccamyacin- or benzopyridoquinoxaline conjugated of triple helix-forming oligonucleotides. *Bioorg Med Chem*, 2000, 8(4): 777-784.
- Imahori H, Fukuzumi S. Porphyrin and fullerene-based photovoltaic devices. *Advanced Functional Materials*, 2004, 14(6): 525-536.
- Krusic PJ, Wasserman E, Keizer PN, et al. Radical reactions of C_{60} . *Science*, 1991, 254(5035): 1183-1185.
- Dugan LL, Turetsky DM, Du C, et al. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(17): 9434-9439.
- Corona-Morales AA, Castell A, Escobar A, et al. Fullerene and ascorbic acid protect cultured chromaffin cells against levodopa toxicity. *J Neurosci Res*, 2003, 71(1): 121-126.
- Shuying Liu, Shuqing Sun, Recent progress in the studies of endohedral metallofullerenes. *J Organometal Chem*, 2000, 599: 75-86.
- Wharton T, Wilson LJ. Highly-iodinated fullerene as a contrast agent for X-ray imaging. *Bioorg Med Chem*, 2002, 10(11): 3545-3554.
- Bolskar RD, Benedetto AF, Husebo LO, et al. First soluble $M@C_{60}$ derivatives provide enhanced access to metallofullerenes and permit *in vivo* evaluation of $Gd@C_{60}C(COOH)_2$ as a MRI contrast agent. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(18): 5471-5478.
- Toth E, Bolskar RD, Borel A, et al. Water-soluble gadofullerenes: toward high-relaxivity, pH-responsive MRI contrast agents. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(2): 799-805.
- Xenogiannopoulou E, Couris S, Koudoumas E, et al. Nonlinear optical response of some isomerically pure higher fullerenes and their corresponding endohedral metallofullerene derivatives: $C_{82}-C_{2v}$, $Dy@C_{82}(I)$, $Dy_2@C_{82}(I)$, $C_{92}-C_{2v}$ and $Er_2@C_{92}(IV)$. *Chem Phys Lett*, 2004, 394(1): 14-18.
- Watanabe S, Ishioka NS, Shimomura H, et al. Synthesis of hydrophilic endohedral ^{133}Xe -fullerenol with high yield. *JAERI (Japan Atomic Energy Research Institute) Review*, 2004, 25(11): 248-249.
- Cagle DW, Kennel SJ, Mirzadeh S, et al. *In vivo* studies of fullerene-based materials using endohedral metallofullerene radiotracers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(9): 5182-5187.