行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：

中　文：γ-輻射線引發自由基產生對抗腫瘤藥物的影響

英　文：γ-ray irradiation induced free radicals react with antineoplastic drugs

計畫編號:

主 持 人：陳建志

申請機關：台北醫學院

申請系所：醫學系生化學科

執行期限：民國 87 年 08 月 01 日起至民國 88 年 07 月 31 日

ABSTRACT

γ -ray irradiated free radicals in biological environments, sometimeleads a series of chain reaction or modification to macromolecules or small molecules. For those tumor patients, radiotherapy usually combined with chemotherapy to enhance the significance of therapeutic effects. High concentration of drugs in blood may react with free radicals induced from γ -ray irradiation. Lots of side effects produced from the combined therapy have been evaluated for the purpose of safety from the view of molecular level.

The aim of this proposal is first experimented in aqueous system to observe the products of the anti-neoplastic drugs, such as 5-FU and folinic acid under a certain dose of radiation. Secondary, to observe those reactions in the patients via serum analysis. Our results showed that the quantitative method of capillary electrophoresis was established to measure the byproducts of salicylic acid and phenylalanine reacting with hydroxyl radicals induced from either Fenton reaction or γ-irradiation.

INTRODUCTION

生物環境中不論氣相、液相或固相，游離輻射均能引發一連串化學改變，比如游離輻射能把水分子激發成氫自由基及氫氧自由基。這個分解水的效應對水溶

液系統，如很多生物系統和食物而言，引出很重要問題。水分子分解產生具有高能量或處於激發狀態的中間產物，會與水溶液中的成分進行氧化還原或自由基反應。各些成分包括有組成細胞骨骼及維持新陳代謝的分子，如醣類、蛋白質、含氮化合物、脂質、油脂、維生素、酵素和色素。

除了水分子的分解，游離輻射會直接作用在有機化合物，尤其是非水溶液系統。游離輻射直接作用在像脂肪酸的碳氫鏈上，它激發一個氫而產生一個有機自由基，這個碳氫自由基便會進行一連串化學反應。氧化酸敗便是與氧分子的過氧化作用的一個例子。

醣類如多醣類之澱粉、果膠等，對游離輻射也是非常敏感的。雙醣之蔗糖分子經放射照射後，其產物會對細胞有毒性曾被報告過。蛋白質分子中的氫受激發，經常導致α碳或半胱胺酸的硫生成自由基，進而進行一連串化學反應。其他胺基酸，如組胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸，都是游離輻射比較敏感的胺基酸。是以游離輻射誘發的化學反應，對有機化合物結構的反應，引發的食物安全、藥物安全是值得商確的。

對於腫瘤病人的治療，一般以化學治療、放射治療或兩者合併為主。為了加強效果，合併治療通常化學治療與放射治療同時進行，此刻病人的血液中化學治療藥物的濃度達到最高。由於放射線所提供的能量（5000~7000CGy/次），在血液媒介下所衍生的自由基，可能會與化學治療藥物分子發生反應。腫瘤病人的療程中常會因化學治療或放射治療產生相當多的副作用。上述自由基產生引發的反

應是否會促使藥物活性改變（變好或變壞），或是增加副作用，目前並無任何實驗證明。

Materials and Methods

γ -ray 照射，將各藥物溶於去離子水中，以 Co^{60} 放射源或直線加速器，5000-7000CGy/次為γ -ray 照射之參考值，選擇最佳時間、最佳劑量調整反應的條件。Fenton reaction 反應最終的容積為 1ml，混合 $FeCl_3$、EDTA 與 H_2O_2 以及樣品並加上 pH 7.4 phosphate buffer，並在 37°C incubator 反應。

CE（capillary electrophrosis）分離分析系統

將各抗腫瘤藥物標準品選擇最佳濃度溶於去離子水中製備成標準品溶液，利用 CE 製作各標準品之標準曲線。我們選擇 37cm, 75μm 毛細管，其產物以在 10mM borate acid (pH 10.5) running buffer, 及波長 214nm 進行分離, 以 80PSI 注射壓力分別注入不同體積之標準品溶液，以各標準品之最佳吸收波長進行分析。

NMR 分析

反應物溶解於含有 0.01M DCl 的 D_2O 中。在 proton(^1H-) NMR(500MHz)的系統中，紀錄有關 non-或部分有標定 D 的 H_2O 訊號之化學位移。利用 chemical concept 的 SecInfo^R 軟體分析 C^{13}1D 圖譜，當作標準圖。關於 C/H correlation 以 HMQC 或 HMBC 來鑑定。關於 H/H correlation 以 COSY 來分析。

Results and Discussion

自由基生成產物分析分離--毛細管電泳分離模式建立

利用Fenton reaction所產生的 hydroxyl radical 與phenylalanine 作用並使用毛細管電泳分析分離可測得自由基產4.78% *o*-tyrosine, 18.13% *p*-tyrosine, 24.69% *m*-tyrosine , 45.51% L-dopamine (Fig. 1) 生成。CE 精密性極佳的分離分析法其最重要的評估標準是波峰面積 (peak area) 的再現性 (reproducibility)。而常使用的高壓液相層析法 (HPLC) 精密性<1%，而毛細管電泳法其精密性 >1% (1.8%)。故毛細管電泳法的效率較高壓液相層析法高。毛細管電泳為一微量分析技術 (micro-analytical technique)，需要使用孔徑窄小的毛細管，此外所有毛細管容積皆在 10^{-6} 升 (microliter) 範圍，而樣品容積範圍在 10^{-9} 升 (nanoliter)或以下; 相對而言，高壓液相層析法的樣品容積範圍在 10^{-6} 升 (microliter)。且毛細管電泳法的波峰面積具有較高壓液相層析法低的訊息干擾 (signal-to-noise)。毛細管電泳法具有此多種優點，故此篇論文建立以毛細管電泳法系統，應用於測量自由基產物生成。

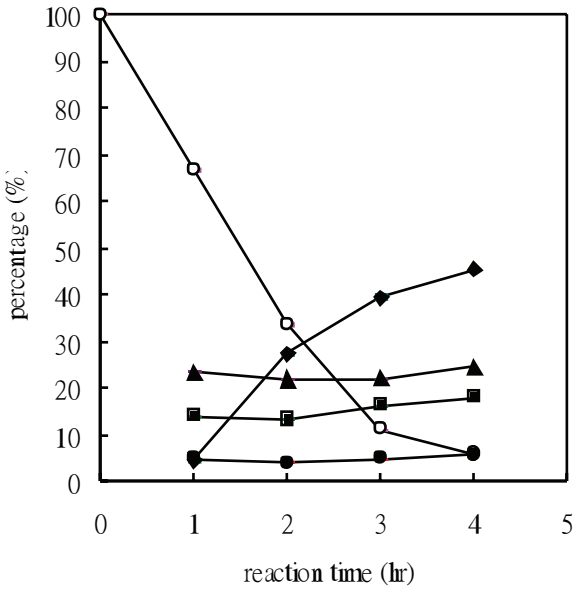
γ-ray 所引發的自由基生成

利用 phenylalanine 與 salicylic acid 予以照射 570 Gy Co^{60}γ-ray irradiation ，利用毛細管電泳來分析分離其產物。其產生的 hydroxyl radical 與 phenylalanine 作用並使用毛細管電泳分析分離可測得自由基產物在不同 pH 值之下變化，例如在 pH 7.0 時，產生 1.11pmole *o*-tyrosine, 0.82 pmole*p*-tyrosine,0.87 pmole *m*-tyrosine (Fig. 2) 生成。salicylic acid 與γ-ray irradiation 產生的 hydroxyl radical 作用生成 0.47 pmole 2,3-DHB

(2,3-dihyroxybenzoate) (Fig. 3)確實會生成自由基，且可被偵測知。

γ-ray 所引發的自由基對抗腫瘤藥物

利用毛細管電泳來分析分離與γ-ray irradiation 產生的 hydroxyl radical與抗腫瘤藥物作用，使其抗腫瘤藥物的量減少。5-FU 減少 44%、folinic acid 減少



40.6% ，但其生成物為何仍待進一步結構分析。

Fig. 1 Separation of the hydroxylated products of 1mM Phenylalanine from Fenton reaction by Capillary Electrophoresis. (○) phenylalanine, (▲) m-tyrosine, (■) p-tyrosine, (◆) L-dopamine, (●) o-tyrosine.

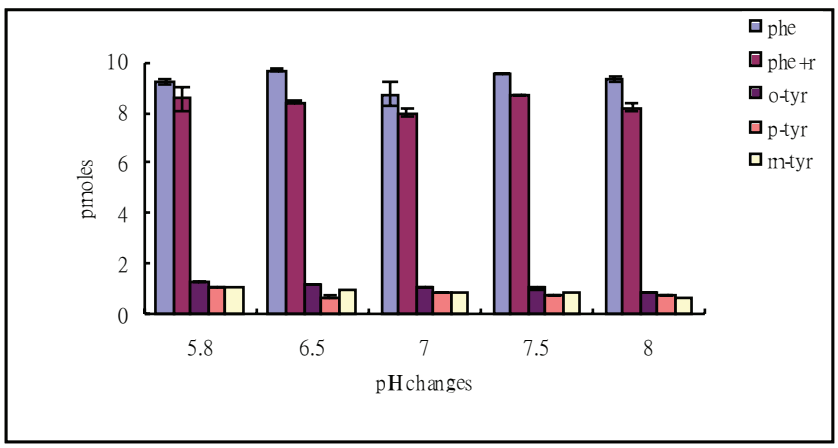
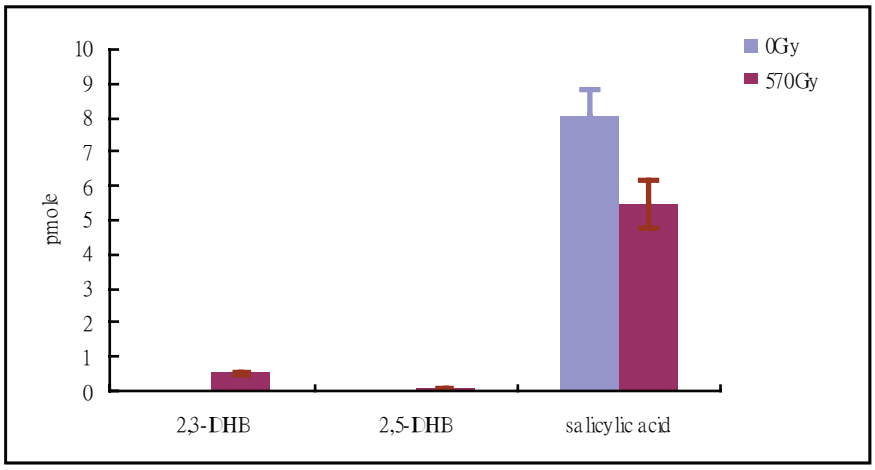


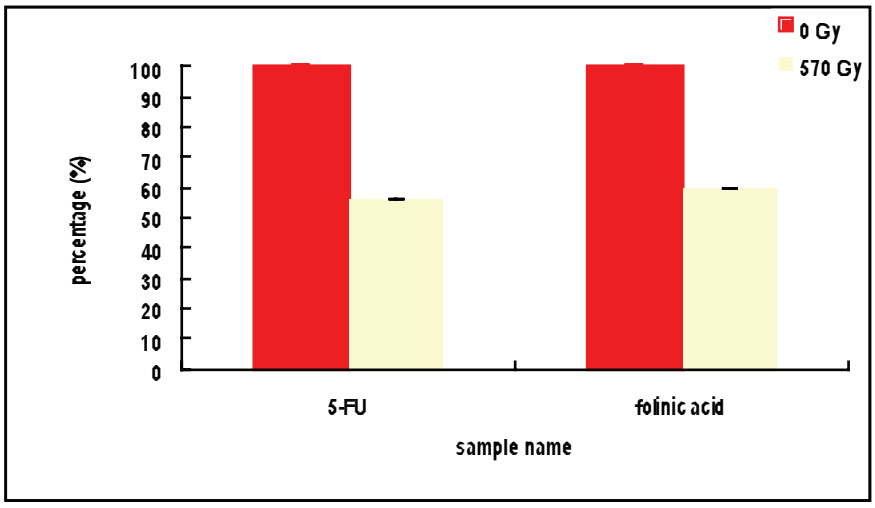
Fig. 2 Analysis of the hydroxylation of 1mM Phenlyalanine induced by the570 Gy γ-iraadiation by CE.

Fig. 3 Hydroxylation of 1mM salicylic acid by the γ-irradiation ,



dose: 570 Gy; which were separated by CE.

Fig. 4 1mM anti-neoplastic drugs react with the γ-irradiation ,



dose: 570 Gy; which were separated by CE.