

甘氨双唑钠对离体V₇₉细胞的 放射增敏作用

郑秀龙 高建国 张洪¹ 朱勤
孟祥顺 赵芳

(第二军医大学放射医学研究室, ¹电子计算机教研室, 上海 200433)

摘要 以离体细胞克隆形成法进一步研究了甘氨双唑钠(SGDD)对乏氧V₇₉细胞的放射增敏作用。结果表明: SGDD的毒性较低, 且对乏氧细胞的毒性比有氧时强。它对有氧细胞无增敏作用, 但在乏氧情况下, 对V₇₉细胞有明显的放射增敏效果, 当SGDD在1.38 mmol/L以下时, 其SER值随浓度的增加而增高, C_{1.6} = 0.48 mmol/L(C_{1.6}代表SER为1.6时所需增敏剂的浓度), SER最大值2.3时的浓度为1.38 mmol/L, 不到ID₅₀的1/70。另外, SGDD与MISO和甲硝唑同时对比的实验, 显示SGDD的SER值大于MISO, 并大大地高于其母体化合物甲硝唑。本研究进一步证实了我们先前分子与细胞实验的结果, SGDD是一种低毒、高效, 且能选择性地增强乏氧细胞的放射敏感性的放射增敏剂, 有望成为提高肿瘤放疗效果的新药。

关键词 甘氨双唑钠, V₇₉细胞, ID₅₀, OER, SER

放射治疗的实体瘤中由于含有10%~50%的乏氧细胞, 对射线有抗拒作用^[1], 从而限制了肿瘤的放疗效果。如何提高乏氧细胞的放射敏感性, 是提高放疗效果的重要课题。第二军医大学放射医学研究室合成的甘氨双唑钠(Sodium Glycidazole 简称SGDD)^[2]已在物理化学水平、DNA分子水平及用ADC法(体内扩散盒琼脂培养法)检测细胞存活率等实验, 初步证明它有明显的放射增敏效应^[3~6]。本文采用国际通用的中国仓鼠V₇₉细胞克隆形成法^[7], 就SGDD对细胞的毒性和放射增敏效果作进一步研究。

1 材料与 方法

1.1 SGDD

由第二军医大学放射医学研究室合成, 实验时将SGDD溶于Eagle(MEM, 美国GIBCO产品)培养液内, 经超滤除菌后, 按需要稀释成不同浓度。

1.2 细胞培养

采用V₇₉-379 A细胞株(由上海放射医学研究所金一尊教授馈赠), 用含20%小牛血清(上海放射医学研究所产品)的Eagle培养液于37℃, 5%CO₂孵箱内贴壁培养至指数生长期进行试验。

1.3 毒性实验

用40 ml培养瓶接种一定量细胞, 于孵箱内单层贴壁过夜(约18 h)后, 倒去液体, 分别加入

国家科委重点资助项目

收稿日期: 初稿1994-11-25, 修改稿1995-4-10

3 ml 不同浓度的 SGDD 药液(下简称药液)。乏氧条件下的毒性试验组,则在加药后 1 h 通氮(99.999% N₂, 5 L/min)30 min, 每个浓度点设 3 个平行样品, 各试验均重复 3 次, 各组均与药液作用 2 h 后, 倒去药液, 并用新鲜培养液洗涤一次, 然后加入新鲜培养液, 置孵箱内培养一周时间。用甲醇固定, Wright 染色后, 计数克隆数。接种率均在 80% 以上。

1.4 照射试验

根据细胞受药液处理的浓度和受照剂量不同, 存活率也不同的规律, 接种不同的细胞数, 于 37℃ 贴壁过夜后, 进行试验, 各组细胞与药液均在相同条件下作用 2 h。所有照射均用 ⁶⁰Co γ 射线(剂量率为 1.20~0.99 Gy/min)进行照射。各试验点均设 3 个平行样品, 重复 3~4 次试验。

1.4.1 有氧细胞存活率的测定 按需要将每瓶接种不同的细胞数, 贴壁后倒去液体, 分别加入不含或含 SGDD 0.80 mmol/L、1.38 mmol/L 的培养液作用后, 分别照射 0~12 Gy, 换培养液培养, 计数克隆数。

1.4.2 乏氧细胞存活率的测定 按需要将每瓶接种不同的细胞数, 按上述方法, 分别加入不含或含 SGDD 0.10~1.38 mmol/L 的培养液作用后, 通氮 30 min, 分别照射 0~32 Gy, 换培养液培养, 计数克隆形成数。

1.5 与 MISO 及甲硝唑放射增敏效果的比较试验

为了能在相同条件下比较 SGDD 与 MISO 及其母体化合物甲硝唑(metronidazole)的放射增敏效果, 选用了 MISO 的 C_{1.0} 浓度 0.3 mmol/L, 3 种增敏剂分别采用 0.3 mmol/L 的药物浓度, 按上述方法和条件进行实验。

1.6 数据处理

本研究均采用 IBM-386 兼容计算机, 对实验数据处理分析, 绘制细胞存活曲线, 计算参数及 t 检验。

2 结 果

2.1 SGDD 的毒性

图 1 表示不同浓度 SGDD 在有氧和乏氧条件下对细胞存活率的影响。其对细胞存活率抑制 50% 的药物浓度 (ID₅₀) 和 95% 可信限, 在有氧和乏氧下分别为 35.70 (31.95~39.90) 和 23.50

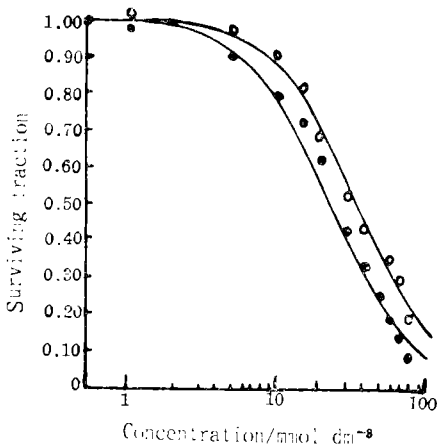


Fig 1. Cytotoxicity of SGDD on V₇₉ cells
(○) in air
(●) in N₂

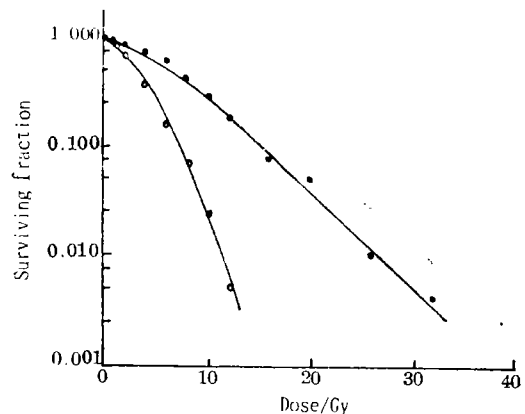


Fig 2. Survival curves for γ-irradiated V₇₉ cells
(○) under aerobic condition
(●) under hypoxic condition

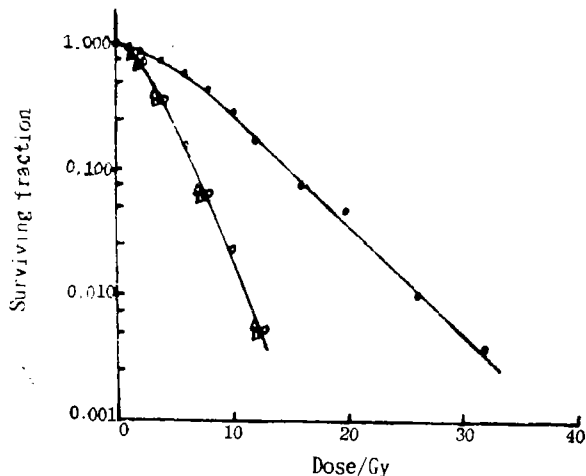


Fig 3. Effect of SGDD on the surviving fraction of V₇₉ cells under aerobic conditions

(●) in N₂ (○) in air
(△) in air + 0.80 mmol/L SGDD
(▲) in air + 1.38 mmol/L SGDD

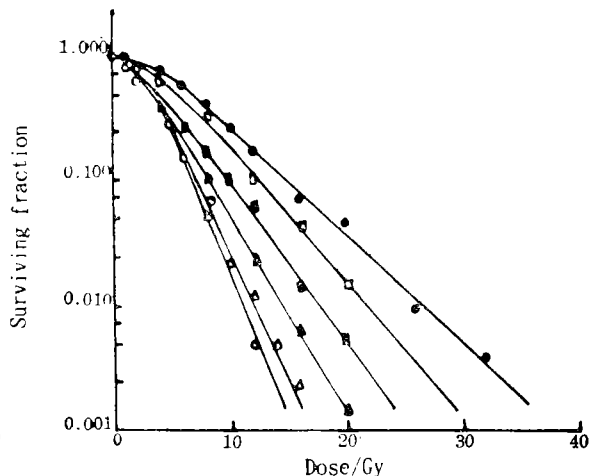


Fig 4. Effect of SGDD on the surviving fraction of V₇₉ cells under hypoxic condition

(●) in N₂ (○) in air
(□) in N₂ + 0.01 mmol/L SGDD
(■) in N₂ + 0.26 mmol/L SGDD
(▲) in N₂ + 0.80 mmol/L SGDD
(△) in N₂ + 1.38 mmol/L SGDD

(21.02~26.26) m mol dm⁻³, 显示它对乏氧细胞的毒性比有氧时大, 相差非常显著 ($p < 0.01$), 这就表明它对瘤内乏氧细胞有选择性的杀死作用。而对正常有氧组织细胞毒性损伤作用较小, 有利于肿瘤治疗。

2.2 氧增比 (Oxygen Enhancement Ratio, OER) 的测定

曾用通氮乏氧的方法, 作过 DNA 分子水平和细胞水平辐射增敏作用的研究^[5,6], 为了验证原先乏氧条件是否适用于本实验, 因此又观察了有氧和乏氧条件下对受照细胞存活率 (Surviving Fraction, SF) 的影响, 所测得的细胞存活率与剂量关系的实验数据, 经按常用的“多靶单击”, “带初斜率多靶单击”及“ α 、 β 方程”三种数学模型^[8] 进行曲线拟合分析, 并经残差平方和计算后, 认为本实验以“多靶单击模型”较合适, 以下均采用此模型, 结果如图 2。经统计算得 OER 值为 2.6, 与文献报道相近^[1], 从而表明本文所用的乏氧系统和通氮时间是适用于检测 药物放射增敏效果的试验条件。

2.3 SGDD 的放射增敏作用

图 3 为 SGDD 对有氧 V₇₉ 细胞的放射生物效应, 从图 3 可见, SGDD 在无毒浓度 0.80 mmol/L 和 1.38 mmol/L 时, 对受照有氧细胞存活作用与单纯有氧细胞受照后的存活曲线无明显差别 ($p > 0.05$)。表明 SGDD 在 1.38 mmol/L 以下, 对有氧细胞无增敏作用; 然在乏氧条件下, SGDD 对受照细胞却有明显的放射增敏效应, 即 SGDD 在 1.38 mmol/L 以下时, 其 SER(D₀ 比) 值随 SGDD 浓度的增加而增高 (图 4、表 1)。其 C_{1.0} 为 0.48 mmol/L。若以 SGDD 的浓度对 SER 作图如图 5, 也显示出放射增敏效果与浓度的依赖关系。当 SGDD 浓度为 1.38 mmol/L 时, 其最大 SER 值为 2.3。

2.4 SGDD 与 MISO 和甲硝唑放射增敏作用的比较

MISO 是国际公认的放射增敏剂代表物, 常用作新增敏剂的比较标准^[9]。为了能与之比较,

Tab 1. Survival curve parameters obtained for V_{79} cells irradiated under hypoxic condition in the presence of various SGDD concentrations ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Conc./mmol·dm ⁻³	n	D ₀ /Gy	D _q /Gy	SER
0.00	2.24 ± 0.12	4.94 ± 0.04	3.98 ± 0.18	
0.10	2.37 ± 0.12	3.98 ± 0.07	3.44 ± 0.25	1.26 ± 0.04
0.26	1.86 ± 0.13	3.38 ± 0.22	2.10 ± 0.39	1.46 ± 0.11
0.50	2.18 ± 0.13	2.97 ± 0.01	2.32 ± 0.12	1.66 ± 0.01
0.80	1.86 ± 0.15	2.80 ± 0.11	1.73 ± 0.04	1.76 ± 0.06
1.38	2.82 ± 0.13	2.13 ± 0.07	2.20 ± 0.04	2.32 ± 0.05

SER: the ratio of D₀(N₂) to D₀(N₂+SGDD)

n: extrapolated number

D₀: negative inverse of final slope of the log of survival

D_q = D₀ Ln n

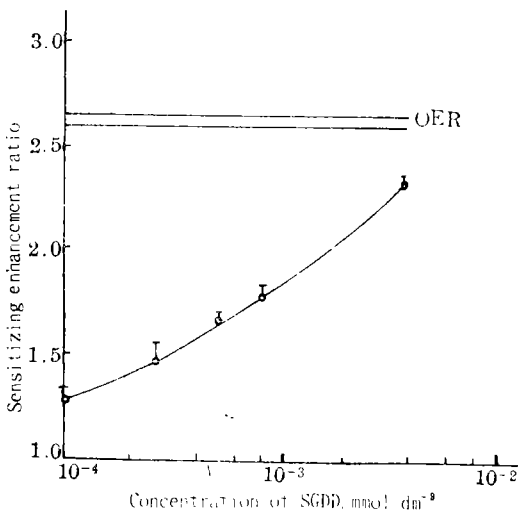


Fig 5. Sensitizing enhancement ratio for γ -irradiated hypoxic V_{79} cells related to SGDD concentration

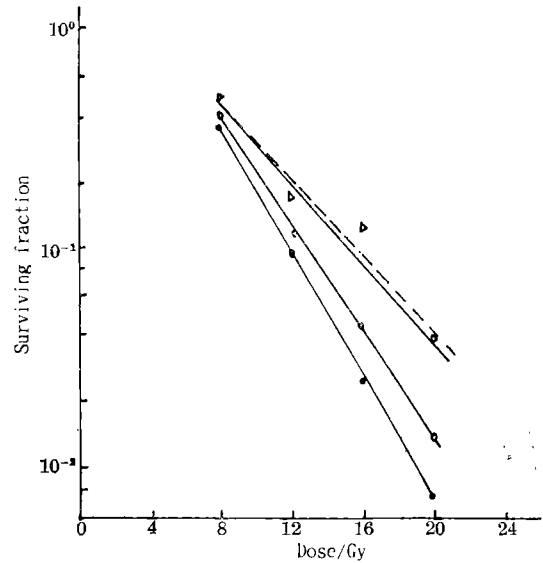


Fig 6. Effect of 0.3 mmol/L drugs on the surviving fraction of irradiated hypoxic V_{79} cells
 (●) SGDD (○) MISO
 (△) metronidazole
 (---) control without drugs

选用了与 MISO C_{1.6} 相同药物浓度 (0.3 mmol/L)^[10], 同时在相同条件下进行放射增敏作用的对比试验, 结果见图 6。照射剂量与细胞存活率间呈线性负相关 ($r = -0.9527 \sim -0.9985$)。图 6 中除甲硝唑的 SER 为 1.07 无明显增敏作用外, SGDD 的 SER 为 1.75 ± 0.08 大于 MISO 的 1.53 ± 0.09 , 说明 SGDD 的放射增敏效果明显高于 MISO ($p < 0.05$), 并大大地高于甲硝唑 ($p < 0.01$)。

3 讨 论

乏氧细胞放射增敏剂在临床上的应用应减小有氧与乏氧细胞对辐射敏感性的差异, 因此需要比较 SGDD 对有氧与乏氧细胞放射效应的差别。图 3 表明它对有氧细胞无影响, 但对乏氧细胞则有明显的放射增敏效应, 且与药物浓度有明显的依赖关系 (图 4、5, 表 1), 它在最高浓度

1.38 mmol/L 时的 SER 值(2.3)仍低于 OER 值(2.6)。SGDD 作用后的乏氧细胞的 SER 值与氧效应的 OER 值间的差别,可用相对敏化效应(Relative Sensitizing Efficiency, RSE)来表示^[11]。计算方法如下:

$$RSE = [(SER - 1)/(OER - 1)] \times 100\%$$

当 RSE = 100% 时,表示药物的增敏比达到氧的效果;若 RSE = 0% 时,显示无放射增敏作用,据此,计算了不同浓度 SGDD 的 RSE 值,结果如图 7,从相对敏化效应亦可看出,随 SGDD 浓度的增加而增高,其增高的幅度与 MISO 类同,也比其母体化合物甲硝唑高得多^[10],最高可达氧效应的 83% 左右。

若比较一下,受照乏氧细胞经 SGDD 处理达到 RSE = 50% 所需的浓度(0.5 mmol/L),及其对正常有氧细胞存活率抑制 50% 的药物浓度 ($ID_{50} = 35.70$ mmol/L) 时,不难看出,只需使用不到正常有氧细胞 ID_{50} 的 1/70 浓度,即可达到 50% 的氧效应,表明 SGDD 的放射增敏效果是很高的。

此外,还进一步通过 SGDD 与 MISO 和甲硝唑的同时对比实验,结果在相同浓度下也证实了 SGDD 的放射增敏效应高于 MISO ($p < 0.05$),并大大地高于甲硝唑(图 6),为便于比较,现将 SGDD 与 MISO 和甲硝唑的放射增敏作用及毒性等数据列于表 2。达到 50% RSE 时所需的药物浓度,SGDD 也低于 MISO,只有甲硝唑的 8%。当存活率降至 75%,即 ID_{25} 时,SGDD 的毒性也比 MISO 低。

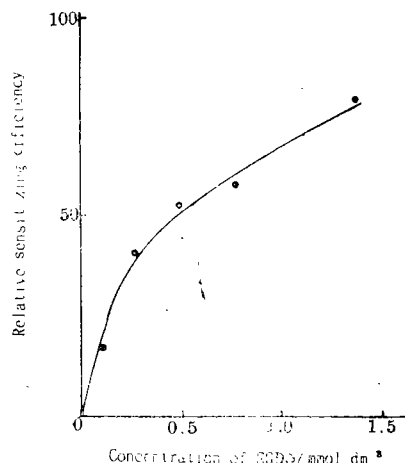


Fig 7. Dependence of relative sensitizing efficiency for hypoxic V_{79} cells on SGDD concentration

Tab 2. SGDD compared with MISO and metronidazole in radiosensitizing efficiency and toxicity

	SGDD	MISO	metronidazole
SER at same experimental condition (0.3 mmol/L)	1.75	1.58	1.07
Concentrations	0.50	0.60 ^a	5.84 ^b
RSE attain 50%/mmol L ⁻¹			
ID_{25} /mmol L ⁻¹	20	11 ^c	

^a from ref. 12, ^b from ref. 13, ^c from ref. 14

不仅如此,SGDD 对乏氧细胞的毒性亦比有氧强 ($p < 0.01$),而对有氧细胞无增敏作用,说明肿瘤放疗时对正常有氧组织不会增加放射损伤效应。以往试验业已证明它有亲肿瘤作用^[15]。因此,本研究进一步肯定了先前研究的结果^[3~6],表明 SGDD 是一种低毒、高效并能选择性地增强乏氧细胞放射敏感性的新型放射增敏剂,有助于提高临床肿瘤的放疗效果。

参 考 文 献

- 1 郑秀龙等主编. 肿瘤放射治疗增敏药物的研究与应用, 上海: 上海医科大学出版社, 1990: 1~9
- 2 Zheng Xiulong et al. Chemical Abstracts, 1991, 114(23): 228919
- 3 林念芸, 郑秀龙等主编. 肿瘤放射治疗增敏药物的研究与应用, 上海: 上海医科大学出版社, 1990: 70~72

- 4 左志华等. 中国科学院辐射化学开放研究实验室年报, 1991~1992, 51~53
- 5 Yang Lixi et al. *Chin. J. Biochem. & Biophys.*, 1988, 21(4): 331
- 6 杨立锡等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1987, 5(1): 33
- 7 丁立等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1991, 9(2): 99
- 8 李冬华等. 中华放射医学与防护杂志, 1982, 2(6): 5
- 9 Murayama C et al. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1983, 44(5): 497
- 10 Adams G E et al. *Radiat. Res.*, 1976, 67: 9
- 11 Denekamp J et al. *Radiat. Res.*, 1974, 60: 119
- 12 Asquith J C et al. *Radiat. Res.*, 1974, 60: 108
- 13 Asquith J C et al. *Br. J. Radiol.*, 1974, 47: 474
- 14 Adams G E et al. *Int J. Radiat. Biol.*, 1979, 35: 151
- 15 郑秀龙等. 第二军医大学学报, 1989, 10(2): 115

RADIOSENSITIZING EFFICIENCY OF SODIUM GLYCIDIDAZOLE ON V_{79} CELLS IN VITRO

Zheng Xiulong Gao Jianguo Zhang Hong Zhu Qin Meng Xiangshun
Zhao Fang

(2nd Military Medical University, Shanghai 200433)

ABSTRACT Radiosensitizing effect of sodium glycididazole (SGDD) on the hypoxic V_{79} cells by standard in vitro colon formation method has been further studied. The results showed its toxicity was low. Its ID_{50} in cells under hypoxic and aerobic condition were 23.5 and 35.7 mmol/L respectively. These indicated that SGDD showed more toxicity under hypoxic than that aerobic condition ($p < 0.01$). SGDD did not produce any radiosensitizing effect under air condition, however, irradiation under hypoxic SGDD showed radiosensitization and its SER increased as a function of drug concentration below 1.38 mmol/L. Its $C_{1.6}$ was 0.48 mmol/L. Its maximum SER was 2.3 at 1.38 mmol/L. Comparison of radiosensitizing effect of SGDD versus MISO and its mother compound (metronidazole) under the same experimental condition, SER for SGDD, MISO and metronidazole were 1.75, 1.53 and 1.07 at 0.3 mmol/L respectively. SGDD showed more radiosensitizing efficiency than MISO and much greater than metronidazole. This study further confirms our previous results i.e. SGDD is a hypoxic radiosensitizer with low toxic, high efficiency and selectively enhances the radiosensitivity of hypoxic cells for tumor radiotherapy.

KEYWORDS Sodium glycididazole, V_{79} cells, ID_{50} , OER, SER

This work was supported by National Scientific Committee Foundation