

谷胱甘肽含量同肿瘤辐射敏感性的相关性研究

孔肇路 金一尊 沈芝芬 童顺高
(复旦大学放射医学研究所 上海 200032)

摘要 实验从细胞和动物水平研究射线对肿瘤细胞中谷胱甘肽(GSH)合成的影响,分析GSH含量同肿瘤辐射敏感性的相关性;评价GSH合成抑制剂-丁胱亚磺酰亚胺(BSO)的辐射增敏效果,探讨以外周血单核细胞中GSH含量监测肿瘤患者对射线敏感性的可行性。实验结果表明,射线可以引起肿瘤细胞中GSH含量的升高,抑制肿瘤组织中GSH的合成,可以显著增强肿瘤细胞对射线的敏感性,外周血单核细胞和肿瘤中GSH含量变化一致且与肿瘤细胞对射线的敏感性相关。

关键词 谷胱甘肽,谷胱甘肽过氧化物酶, γ 射线,丁胱亚磺酰亚胺,辐射敏感性

中图分类号 R730.53, R730.55

放射治疗恶性肿瘤,病人对射线的敏感性是影响治疗效果的重要因素,建立灵敏快速的辐射敏感性的监测指标,不仅有助于真正实现治疗的个体化,对辐射增敏药物的设计与筛选也有一定的指导作用。谷胱甘肽和其相关酶(如谷胱甘肽巯基转移酶,谷胱甘肽过氧化物酶等)是机体参与消除氧自由基的主要生物分子,被认为是肿瘤抗辐射的物质基础^[1-2],本实验着力研究GSH同肿瘤细胞辐射敏感性之间的相关性,旨在评价以外周血单核细胞中GSH含量监测肿瘤患者辐射敏感性的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验方案

对数生长期的入胃腺癌细胞SGC7901,接种于培养瓶,设空白对照组、单纯照射组(1、2、4、8Gy)、BSO给药组(10、100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 1mg mL^{-1})和BSO+照射组。

测定不同浓度BSO给药组肿瘤细胞中GSH的含量,集落形成法绘制单纯照射和BSO+照射组细胞存活曲线,以 IC_{90} (引起90%细胞死亡的照射剂量)评价不同实验组细胞辐射敏感性的差异。

单纯照射组不同剂量照射后存活的肿瘤细胞,4Gy再次照射后72h,细胞计数,以细胞存活率表征肿瘤细胞对射线的敏感性,回归分析GSH含量和细胞存活率的相关性。

荷Lewis肺癌的C57小鼠,设单纯照射组(肿瘤局部10Gy照射)和BSO+照射组,BSO使用剂

量3mmol/kg,照射前6h腹腔注射。

绘制肿瘤生长曲线,以肿瘤生长延缓比较不同处理组肿瘤组织的辐射敏感性。

照射后0、2、6、12、14、24、48、72、192h,9个时间点处死实验组和对照组动物。测定肿瘤组织中GSH含量和GSH-Px活性,绘制动态变化曲线。

检测不同实验组小鼠主要脏器GSH含量和GSH-Px活性。回归分析肿瘤组织同PMN中GSH含量的相关性。

收集临床肺癌病人肿瘤组织标本和外周血单核细胞,测定GSH含量,回归分析两者的相关性。

1.2 照射条件

Gammacell-40型低剂量率研究辐射装置,使用 ^{137}Cs γ 射线,辐照腔容积7.5L,中心最大剂量率为0.94Gy/min。

1.3 检测指标

Tietze还原酶法测定GSH含量,GSH-Px检测试剂盒购于建成生物试剂公司。

1.4 统计分析

t 检验。

2 结果

BSO作用后24h肿瘤细胞中GSH的含量列于表1^[3],随着BSO浓度的增加,肿瘤细胞中GSH含

国家“863计划”合同号2002AA2Z3104和复旦大学985计划资助项目

第一作者:孔肇路,女,1978年2月生,1999年毕业于上海医科大学,放射医学专业,博士研究生在读

通讯联系人:金一尊

收稿日期:初稿2003-07-09,修回2003-11-21

量进一步降低。对射线的敏感性显著增强(见表 2)。

Table 1 GSH content of SGC7901 cells treated with different concentration of BSO ($n=3$)

BSO/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	SGC7901
0	10.4 ± 1.2
10	8.2 ± 0.3
100	5.7 ± 1.8
1000	0.46 ± 0.1

Table 2 Determine cells radiosensitivity by clone formation assay ($n=3$)

Treated with	IC_{90}/Gy
Irradiation alone	3.44 ± 0.25
$10\mu\text{g mL}^{-1}$ BSO+irradiation	2.8 ± 0.4
$100\mu\text{g mL}^{-1}$ BSO+irradiation	2.0 ± 0.35
1mg mL^{-1} BSO+irradiation	0.56 ± 0.1

不同剂量照射后存活的肿瘤细胞,测定其 GSH 含量并予以 4Gy 的再次照射,回归分析显示 GSH 含量肿瘤细胞辐射敏感性相关(见图 1)。

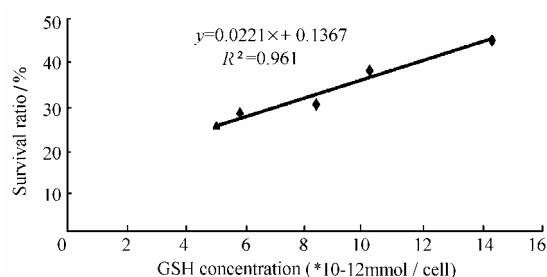


Fig.1 The correlation between GSH content and cell radiosensitivity ($n=3$)

10Gy 局部照射后,小鼠肿瘤组织中 GSH-Px 活性升高,而 GSH 含量出现瞬时升高—下降—升高—下降的反复过程;照射前腹腔注射 BSO 可以显著抑制肿瘤 GSH 合成,减弱 GSH-Px 活性变化的幅度,表明 GSH-Px 活性的变化是照射引起 GSH 含量变化所致(见图 2 和图 3)。

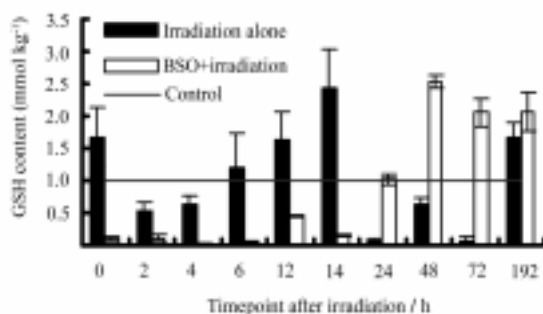


Fig.2 The change of intracellular GSH content after irradiation ($n=3$)

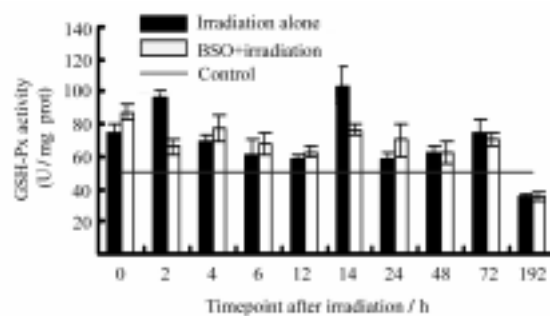


Fig.3 The change of GSH-Px activity after irradiation ($n=3$)

照射后逐日量取肿瘤的长径(a)和短径(b),依 $v=ab^2/2$ 计算肿瘤体积绘制肿瘤生长曲线(见图 4)。局部照射引起肿瘤暂时缩小,照射前腹腔注射 BSO,降低辐照时肿瘤组织中 GSH 含量,可以增加肿瘤缩小的程度且生长减缓,肿瘤倍增时间较单纯照射组延长 6d。

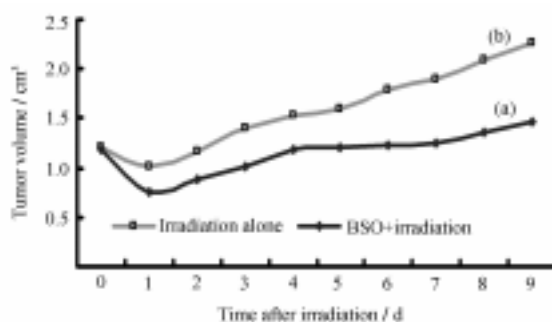


Fig.4 Growth curve of Lewis lung cancer treated with irradiation or BSO+irradiation

动物实验显示外周血单核细胞中 GSH 含量同肿瘤组织 GSH 含量正相关(见图 5)。

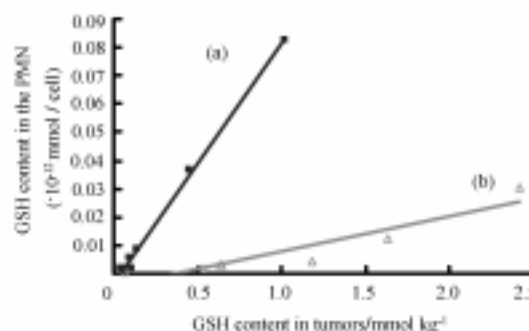


Fig.5 The correlation between GSH content in tumor and in PMN (a) $r=0.998$, $n=6$, data from mice treated with irradiation alone, (b) $r=0.928$, $n=6$, data from mice treated with BOS+irradiation

测定照射后 24h 肿瘤组织和主要脏器 GSH 含量和 GSH-Px 活性,数据显示肿瘤局部射线引起肿瘤组织、肝、肺和外周血单核细胞中 GSH 含量下降,照射前给予 BSO 处理可以造成 GSH 含量的进一步下降;单纯照射组和 BSO+照射组动物主要脏器的

GSH-Px 活性无明显差异（见表 3 和表 4）。

Table 3 GSH content s in tissue samples from mice under different treatments (n=10, mmol kg⁻¹)

Tissue	Control	Treated with irradiation alone	Treated with BSO+irradiation
Tumor	0.999±0.08	0.5343±0.0423 ⁽²⁾	0.1128±0.02 ⁽³⁾
Lung	0.826±0.79	0.5974±0.1	0.1599±0.089 ⁽³⁾
Heart	0.279±0.22	0.6331±0.12 ⁽²⁾	0.5504±0.1
Liver	4.419±0.99	1.4343±0.27 ⁽²⁾	1.0425±0.34 ⁽³⁾
Spleen	1.295±0.6	1.376±0.21	0.36±0.1 ⁽³⁾
Renal	0.029±0.01		
Muscle	0.585±0.52		
PMN ⁽¹⁾	1.137±0.73	0.02671±0.0008 ⁽²⁾	0.008509±0.0113 ⁽³⁾

Note: ⁽¹⁾ 10⁻¹²mol/cell, ⁽²⁾ p<0.05 versus control, ⁽³⁾ p<0.05 versus mices treated with irradiation alone

Table 4 GSH-Px activity in tissue samples from mice under different treatments (n=10, U/mg prot)

Tissue	γ-ray alone	BSO+γ-ray
Lung	78.39±20.97	55.81±27.03
Heart	48.95±12.17	74.86±43.2
Liver	56.23±14.37	59.35±14.35
Spleen	47.15±2.89	50.17±8.23

临床标本也显示肿瘤组织和外周血单核细胞中 GSH 含量正相关 (p<0.1, n=7 见图 6)。

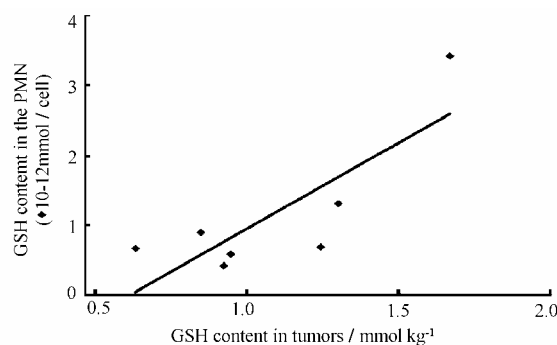


Fig. 6 The correlation between GSH content in tumor and in PMN r=0.811, n=7, Data from patients

3 讨论

前期细胞水平研究表明 BSO 是一种低毒性的 GSH 合成抑制剂^[3], 10mg/mL 的 BSO 对肿瘤细胞的增殖无明显影响。而 BSO 对肿瘤细胞中 GSH 合

成的抑制随 BSO 浓度的增加而增强, 所以我们离体实验部分在 10—1000μg/mL 的无毒浓度范围内选择了 3 个可以不同程度引起 GSH 合成抑制的工作剂量 ;照射前 24h 给予 BSO 作用充分抑制肿瘤细胞中 GSH 的合成, 以便比较不同 GSH 含量条件下肿瘤细胞辐射敏感性的差异。在整体实验部分我们仍然采用了照射前 6h 腹腔注射 BSO, 以避免药物排泄的干扰。

尽管离体实验显示 GSH 含量同肿瘤细胞的放疗敏感性显著相关, 同 Suzuki 等的实验结论一致^[4], 整体实验中也观察到降低肿瘤组织中 GSH 含量可以增强肿瘤对射线的敏感性。但是总体上实验样本数较少, 进一步研究 GSH 含量同肿瘤敏感性的相关性需要借助 GSH 含量不同的多种肿瘤细胞株和其它有效的调节 GSH 含量的手段 ;动物和临床数据显示肿瘤组织同外周血单核细胞中 GSH 含量正相关, 为以外周血单核细胞中 GSH 含量评价肿瘤病人对射线的敏感性提供了左证。

实验观察到离体和整体水平射线作用后肿瘤细

胞中 GSH 含量会出现不同程度的升高^[3], 所不同的是, 离体条件下, 细胞中 GSH 含量在照射后 24h 升至峰值并在数日内维持在一个较高的水平, 而整体条件下 GSH 含量变化较为复杂, 反复上升下降。目前已知影响 GSH 合成的最主要因素包括半胱氨酸的供给和合成限速酶 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (GCS) 的活性^[5], 前者主要来源于营养供应, 同射线关系不大, 所以我们推测照射引起肿瘤细胞中氧自由基迅速增加, GCS 活性随之升高最终引起 GSH 含量的增加; 离体条件下我们观察到照射后 24h GSH 含量的增加是 GCS 活性逐渐升高的结果; 而整体实验初期观察到的 GSH 含量增加可能是细胞线粒体受损, 部分 GSH 释放到胞浆的结果, 后期的 GSH 含量变化则是 GCS 活性变化和机体自身调节的综合结果, 检测上述条件下 GCS 的 mRNA 和蛋白含量的变化将有助于明确放射引起的 GSH 含量变化的原因。

总体上看, GSH 影响是肿瘤细胞辐射敏感性的生物小分子, 也是辐射增敏药物设计的重要靶点, 其合成抑制剂 BSO 在离体和整体水平均显示了良好的辐射增敏效果; 由于血检是临床常规的检查项目, 分离血液单核细胞测定 GSH 含量以评价肿瘤患

者对射线的敏感性并不增加对患者的损伤, 具有一定的可行性。

参考文献

- 1 郑秀龙, 金一尊, 沈瑜. 肿瘤治疗增敏药. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1996. 165-166
ZHEN Xiulong, JIN Yizun, SHEN Yu. Sensitizer for Cancer Therapy, Shanghai: Shanghai reference Publisher of Science and Technology, 1996. 165-166
- 2 夏寿萱. 放射生物学, 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 237-257
XIA Shouxuan. Radiobiology, Beijing: Science Publisher of Military Medicine, 1998. 237-257
- 3 孔肇路, 金一尊, 沈芝芬. 辐射研究与辐射工艺学报, 2002, 20(3): 216-219
KONG Zhaolu, JIN Yizun, SHEN Zhifen. J Radiat Res Radiat Process, 2002, 20(3): 216-219
- 4 Suzuki Y, Kondo Y, Himeno S *et al.* Prost ate, 2000, 43(2): 144-149
- 5 Wei W, Nazzareno B. Pharmacol Reviews 1998, 50(3): 335-352

A Research on the correspondence between GSH content and cancer radiosensitivity

KONG Zhaolu JIN Yizun SHEN Zhifen TONG Sungao

(The institute of radiation medicine at Fudan University, Shanghai 200032)

ABSTRACT The present study aims to analyze the correspondence between intracellular glutathione (GSH) content and tumour cells sensitivity to γ -rays, to investigate the influence of irradiation on GSH synthesis and to evaluate the feasibility of monitoring patients radiosensitivity by determining GSH in peripheral monocyto. In this experiments, buthionine sulfoximine (BSO), a GSH synthase inhibitor used to adjust intracellular GSH content, was observed its radiosensitization effect in vivo and in vitro. The results indicated that irradiation increased GSH synthase, BSO enhanced cells sensitivity to γ -ray by exhausting intracellular GSH, GSH in PMN could be an useful biochemical parameter to monitor patients sensitivity to irradiation.

KEYWORDS Glutathione, Glutathione peroxidase, γ -rays, Buthionine sulfoximine, Radiosensitization

CLC R730.53, R730.55