

E838 在肿瘤放射治疗中应用的实验研究

张宇光 张辛茹 闫玉军 杨 翊 韩 英 李志旺

(中国医学科学院、中国协和医科大学放射医学研究所 天津 300192)

摘要 E838 是雌激素类辐射防护药物。实验证明: E838 对体外培养的 MCF7 乳腺癌细胞增殖有抑制作用, IC_{50} 为 $5.6\mu\text{g/mL}$, D_0 为 $3.9\mu\text{g/mL}$; 它能提高荷瘤小鼠 (H22 腹水癌、L615 白血病) 的存活时间, 对肿瘤细胞无辐射防护作用。无刺激或促进 T739 小鼠肺腺癌转移的作用, 有可能成为临床放疗的辅助药物。

关键词 E838, 细胞增殖, 肿瘤转移

肿瘤是危及人类生命的重要疾病, 随着放射治疗技术的发展与应用, 放疗在肿瘤治疗中占有重要地位。为了提高肿瘤放射治疗的效果, 国内外学者十分重视辐射增敏剂和辐射防护剂的研究, 以减少肿瘤患者受照射剂量, 减轻正常组织的放射损伤及照射所致的副反应。过去的实验证明, E838 对正常组织是一种较好的辐射防护剂。为了使 E838 能在肿瘤放射治疗中应用, 本文拟在 E838 对肿瘤细胞增殖和对肿瘤细胞作用机理方面进一步深入研究。

1 材 料 和 方 法

1.1 细胞株

1.1.1 MCF7 细胞 人乳腺癌细胞株, 引自中国医学科学院肿瘤研究所。经军事医学科学院测定, 雌激素受体阳性, 细胞呈贴壁生长, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液传代。

1.1.2 LA795 细胞 小鼠肺腺转移癌细胞, 购于天津市药物研究所。实体瘤匀浆接种于 T739 小鼠腋下。

1.1.3 H22 肝癌细胞 引自中国医学科学院基础医学研究所, 615 小鼠腹腔传代。

1.2 动物

T739 小鼠, 购于天津市药物研究所, 雌雄各半, 体重 $18\sim 20\text{g}$ 。615 小鼠, 本所动物室提供, 雌性, 体重 $28\sim 30\text{g}$ 。

1.3 照射条件

本所 ^{137}Cs 全自动封闭式 γ 射线照射源, 剂量率为 113.5cGy/min , 剂量按各实验组而定。

1.4 主要试剂

DMEM 培养基, 美国 GIBCO 公司出品, 无酚红^[1], 常规方法配制。

小牛血清, 北京市东风农场奶牛场产品, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30min 灭活, 经 DCC 法去除血清中微量雌激素后分装^[2], $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。E838, 四川省无机化学研究所合成。配制方法: (1) 体外培养: E838 用无水乙醇配成 2mg/mL 浓度的储备液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存; (2) 小鼠口服给药: E838 用生理盐

天津市“21 世纪 — 青年科学基金”资助

收稿日期: 初稿 1999-01-02, 修回 1999-05-20

水配成 $125\mu\text{g/mL}$ 浓度的悬液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存; (3) 小鼠腹腔注射: E838 用茶油配成 $250\mu\text{g/mL}$ 浓度的油剂, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 实验方法

1.5.1 E838 对 MCF7 细胞集落形成能力的影响 依药物浓度分为 2、4、6、8、 $10\mu\text{g/mL}$ 6 组和对照组 (给等量无水乙醇)。采用贴壁细胞液体培养法, 用含 15% 小牛血清的培养液将对数生长期的细胞配成 3×10^3 个 /mL 浓度的细胞悬液, 并以 2mL/皿铺于直径 35mm 的培养皿中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 恒温培养箱中培养 7d, 用 Giemsa-Wright 染色, 解剖镜下计数含 50 个细胞以上的集落数。

1.5.2 流式细胞光度术分析 E838 对 MCF7 细胞周期动力学的影响 取对数生长期的 MCF7 细胞分成对照组、E838 组、照射组和 E838+ 照射组。将 E838 组和 E838+ 照射组给予 E838 乙醇溶液, 使终浓度为 $5\mu\text{g/mL}$; 对照组和照射组加等量的无水乙醇。药物在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中作用 24h 后, 对照射组和 E838+ 照射组用 2Gy γ 射线照射, 每组分别在照射后 6、18、24、48h 收集细胞, 70% 乙醇固定待检。

1.5.3 E838 对 615 小鼠 H22 腹水癌的影响 将 16 只 615 小鼠按雌雄各半随机分成 4 组, 即对照组、E838 组、照射组和 E838+ 照射组, 每组 4 只。抽取传代 615 小鼠腹水, 用生理盐水配成 2×10^7 个 /mL 浓度的细胞悬液, 以每只 0.2mL 接种于供鼠腹腔。在接种后第 1、3、5d 分别为供体 E838 和 E838+ 照射组小鼠口服给药 0.2mL/次, 对照组和照射组每只小鼠分别给等量生理盐水。接种后第 6d 对单纯照射和 E838+ 照射两个供体组小鼠全身照射 5Gy γ 射线, 照毕, 将 4 组供体小鼠分别抽取腹水, 并用生理盐水配成 5×10^7 个 /mL 浓度的细胞悬液, 以每只小鼠 0.2mL 接种于相应的受体小鼠腹腔, 每组 8 只。记录各组受体小鼠的存活时间。

1.5.4 E838 对小鼠 L615 白血病的影响 实验方法基本同上, 所不同的是将 L615 白血病小鼠的脾脏匀浆后, 用生理盐水配成 1×10^6 个 /mL 浓度的细胞悬液, 接种于各组小鼠右腋下。记录各组受体小鼠的存活时间。

1.5.5 E838 对 T739 小鼠 LA795 肺腺癌转移的影响 将 72 只 T739 小鼠按雌雄各半随机分成对照组和 E838 组。取传代的 T739 小鼠腋窝皮下实体瘤, 置匀浆器内加适量生理盐水匀浆数次, 将细胞悬液稀释至 2.5×10^6 /mL 浓度, 以每只小鼠 0.2mL 于右腋下接种, 接种后次日每天腹腔给药一次, 连续 5d (对照组 0.1mL/只茶油, E838 组 0.1mL/只 E838 油剂)。在接种后第 9、10、14、18d 分别取 8~10 只小鼠肺组织, Bouin's 液固定, 3d 后解剖, 镜下观察每个肺叶表面肿瘤结节数及大小。I 级: 单个小的转移灶 1~5 个 (直径均在 1mm 以下); II 级: 小的转移灶在肺内分布弥散, 6~10 个或单个中等转移灶 (直径在 1~2mm 之间); III 级: 小的转移灶呈广泛分布 (几乎所有肺叶), 或存在几个大的转移灶 (直径在 2mm 以上)^[3]。

2 实验结果

2.1 E838 对 MCF7 细胞集落形成能力的影响

计数各实验组 MCF7 细胞形成的集落数, 并依 E838 浓度与 MCF7 细胞存活分数的关系得出剂量 - 存活曲线 (见图 1)。E838 对 MCF7 细胞有一定程度的抑制作用, 并显示出对浓度的依赖关系, 其 IC_{50} 为 $5.6\mu\text{g/mL}$, D_0 为 $3.9\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 E838 对 MCF7 细胞周期动力学的影响

通过流式细胞光度术 DNA 单参数分析, 计算机拟合并计算各期所占比例如表 1 所示。

Tab.1 Variation of cell cycle parameters with time following E838 and 2Gy irradiation of MCF7 cells (% cells)

Time/h	Control			E838			Irradiation(R)			E838+R		
	G ₁	S	G ₂ M	G ₁	S	G ₂ M	G ₁	S	G ₂ M	G ₁	S	G ₂ M
6	49	17	34	39	6	55	40	16	43	42	7	52
18	51	16	33	40	7	52	38	15	47	41	9	50
24	47	9	44	47	11	42	38	16	46	36	9	55
48	44	10	45	40	11	49	41	15	44	34	9	57

E838 合并照射处理的 MCF7 细胞 G₂M 期比例持续升高, 而单纯 E838 和单纯照射两组 G₂M 期细胞在 6~18h 内比例升高。表明 E838 和辐射主要作用于细胞周期的 G₂M 期, 使细胞有丝分裂受到抑制, E838 合并照射对细胞抑制更明显。

2.3 E838 对小鼠移植性肿瘤的影响

通过受体小鼠的存活时间来反映 4 组供体小鼠经不同处理后, 肿瘤活细胞的数量。

2.3.1 E838 对 615 近交系小鼠 H22 腹水癌的影响 对照组的小鼠平均生存 15.06 ± 0.44 d, E838、照射组、E838 合并照射治疗组的小鼠, 生存天数分别延长 16.375 ± 0.7 、 17.875 ± 0.53 、 16.375 ± 0.18 d。此种延长在统计学处理时, 只有单纯照射组和对照组有显著性差别 ($p<0.05$)。615 小鼠存活曲线见图 2。

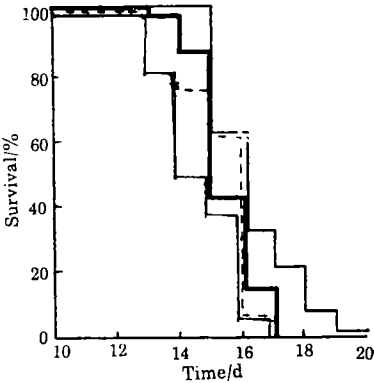
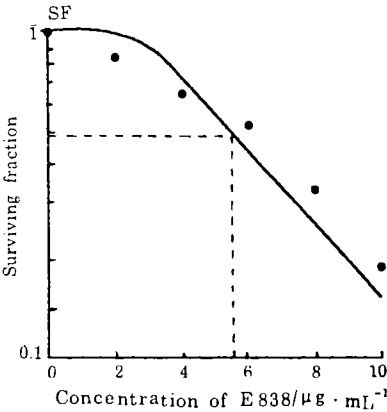


Fig.1 Survival of MCF7 cells after various doses of E838

Fig.2 Inhibition of H22 tumor bearing mice by E838 and irradiation in vivo
— Control, - - E838, ▲ Irradiation, - - E838+R

2.3.2 E838 对 615 近交系小鼠 L615 白血病的影响 对照组的小鼠平均生存 6.79 ± 0.24 d. E838、照射组、E838 合并照射治疗组的小鼠, 生存天数分别延长 7.26 ± 0.26 、 8.16 ± 0.42 、 9.26 ± 0.44 d, 3 个实验组受体小鼠的存活时间均有所延长, E838 合并照射组与对照组有高度显著性差别, 其存活曲线见图 3。

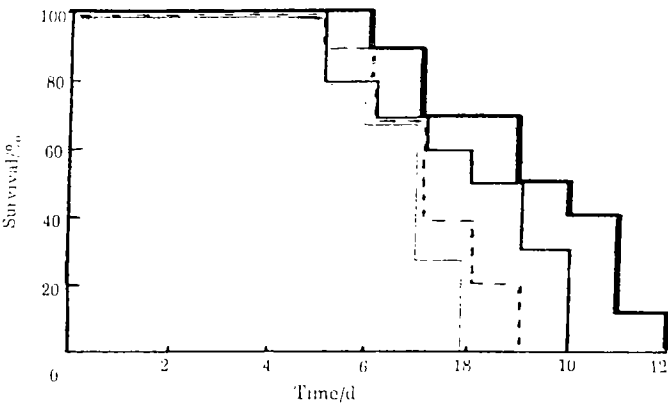


Fig.3 Inhibition of L615 tumor bearing mice by E838 and irradiation in vivo
— Control, - - E838, — Irradiation, - · - E838+R

2.3.3 E838 对 T739 小鼠肺腺癌转移的影响 通过两组肺腺癌转移实验的比较，结果如表 2 所示。在本实验剂量内，E838 无刺激和促进肺肿瘤转移的作用。

Tab.2 The level and rate for metastatic carcinoma of lung of E838

Time/d	E838			Control		
	9	10	14	9	10	14
No.of animal	8	10	10	8	10	9
The level of metastasis						
-	7	0	0	6	0	0
+	1	6	0	2	6	0
++	0	4	3	0	4	3
+++	0	0	7	0	0	6
No. of metastasis	1	10	10	2	10	9
The rate of metastasis/%	12.5	100	100	33.3	100	100

3 讨 论

理想的辐射防护剂应对肿瘤细胞无放射保护作用，也不应刺激肿瘤细胞的生长。E838 基本可以满足此条件，它不仅对中度放射病疗效显著，可减轻照射动物造血干细胞的损伤，使骨髓有核细胞数升高，而且对体外培养的人乳腺癌，雌激素受体阳性的肿瘤细胞的增殖有抑制作用，其 IC₅₀ 为 5.6μg/mL，D₀ 值为 3.9μg/mL，但这种抑制作用较对雌激素受体阴性的肿瘤细胞略弱一些。E838 对体外悬浮培养的小鼠淋巴细胞白血病 L1210 细胞作用的 IC₅₀ 为 3.42μg/mL，D₀ 值为 3.62μg/mL。通过流式细胞光度术细胞周期分析表明，E838 阻断细胞于 G₂M 期，使细胞的有丝分裂延迟，使其增殖受到抑制。由于 G₂M 期细胞增多，则可提高体外培养细胞的辐射敏感性。E838 还可影响肿瘤细胞的能量代谢，加速肿瘤细胞的崩溃。

E838 合并照射可明显延长荷 615 白血病小鼠的存活时间；在 E838 对 615 小鼠 H22 腹水性肝癌的动物整体实验中，E838 及 E838 合并照射组小鼠的平均存活时间较对照组略有延

长,此种延长无统计学意义,显然, E838 对 615 小鼠 H22 腹水性肝癌和 L615 白血病均无辐射保护作用。E838 对荷瘤鼠间的疗效差别,可能是由于肿瘤的辐射敏感性是一种极为复杂的问题,它与瘤细胞的种类,细胞增殖周期及氧合状态也可能与给药的时机、剂量、药物在肿瘤组织中的浓度,维持时间等诸多因素有关。另外, E838 是雌激素类药物,受体内代谢过程的影响较多,由于目前 E838 药源有限,此实验药物用量及方式参考其他同志的实验,未能对整体动物给药的诸条件进行较系统的研究。有文献^[4,5]报道,雌激素类药物对肿瘤的转移有促进作用,这就给 E838 在临床肿瘤治疗中应用带来一些疑虑,在本实验剂量范围内 ($25\mu\text{g}/\text{d}\times 5\text{d}$),无刺激和促进肿瘤转移的作用。因此, E838 还仅是一种较理想的辐射防护剂,并能在肿瘤放疗中增加其疗效,它有可能成为肿瘤放疗中新的辅助治疗药物,值得进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Yolande Berthois, John A Katzenellenbogen, Benita S Katzenellenbogen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(8):2496~2500
- 2 Terryl Riss, David A Sirbasku. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 1989, 25(2):136~142
- 3 高 进, 钱书森, 李宝贵等. *中华肿瘤杂志*, 1986, 8(4):256~258
- 4 Philippa Darbre, Jean Yates, Sally Curtis *et al.* *Cancer Res*, 1983, 43(1):349~354
- 5 Philippa Darbre, Sally Curtis, R J B King. *Cancer Res*, 1984, 44(7):2790~2793

THE RESEARCH OF E838 IN TUMOR RADIOTHERAPY

ZHANG Yuguang ZHANG Xinru YAN Yujung YANG Yi HAN Ying LI Zhiwang

(*Institute of Radiation Medicine, CAMS Tianjin 300192*)

ABSTRACT E838 is a better radioprotector that is derivative of estrogen. E838 inhibits cell proliferation of MCF7 cell line in vitro, D_0 is $3.9\mu\text{g}/\text{mL}$, IC_{50} is $5.6\mu\text{g}/\text{mL}$. It also inhibits the growth of tumor bearing mice that extend the living time and enhance the effect of radiotherapy. Up till now, E838 haven't been found the effect of stimulate and promote tumor metastasis. E838 has the possibility as an auxiliary medicine using in radiotherapy of tumors.

KEYWORDS E838, Cell proliferation, Metastatic carcinoma