

·研究简报·

辐射增敏剂作用下 SGC7901 细胞内 GSH 含量变化与受照射剂量关系的初步研究

孔肇路 金一尊 沈芝芬

(复旦大学放射医学研究所 上海 200032)

摘要 研究了辐射增敏剂丁胱亚磺酰亚胺(BSO)作用下胃腺癌细胞(SGC)内谷胱甘肽(GSH)含量与照射剂量间的关系。实验观察到胃癌细胞内 GSH 含量有呈照射剂量依赖性升高的趋势,而用 BSO 预处理后的细胞,GSH 含量迅速降低且变化不受照射剂量的影响。

关键词 谷胱甘肽, 照射, 丁胱亚磺酰亚胺, γ 谷氨酰半胱氨酸合成酶

中图分类号 R730.53, R730.55

在恶性肿瘤放射治疗过程中,肿瘤对射线耐受性是妨碍疗效提高的一个重要原因,用辐射增敏药物克服耐受性是可行的途径之一,了解肿瘤细胞辐射条件下生物学特性的变化及其内在原因将指导我们寻找低毒高效的放疗增敏剂。内源性谷胱甘肽含量增加被认为是肿瘤抗辐射的作用机制之一^[1,2],本实验研究了辐照剂量与肿瘤细胞存活率及存活细胞内谷胱甘肽含量变化之间的关系以及给予 GSH 合成抑制剂—丁胱亚磺酰亚胺作用后细胞内源性 GSH 的改变及其原因,并探讨 BSO 用于放疗的可行性。

1 材料和方法

1.1 细胞

1.1.1 SGC7901 细胞 购于中国科学院细胞研究所。生长于含 10%小牛血清的 RPMI1640 的培养液中,37℃,5% CO₂ 条件下培养。0.25%胰酶消化传代,实验用对数生长期的胃癌细胞。

1.2 照射条件

Gammacell-40 型低剂量率研究辐射装置,使用¹³⁷Cs γ 射线,辐照腔容积 7.5L,中心最大剂量率为 0.94Gy/min,照射剂量分别为 1、2、4、8Gy。

1.3 细胞内 GSH 含量检测

用 Tietze^[3]还原酶法。

1.4 BSO 作用剂量的确定

96 孔培养板,2500 细胞/孔,接种 48h 后加入不同浓度的药物(培养液配制的 BSO 溶液)培养 72h 后用 MTT 法测定细胞生长抑制率,直线回归法推算 IC₅₀。

1.5 实验方案

BSO 用培养液稀释至 1mg/mL。细胞选择传代后 72h 的 SGC 细胞。单纯照射组:分别给

高等学校博士学科点专项科研(9841)资助

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

收稿日期:初稿 2001-12-01, 修回 2002-01-17

予 1、2、4、8Gy 剂量的照射。照射加给药组:照射前 6h 将稀释好的 BSO 加到细胞培养瓶中,使其与细胞作用。照射条件同单纯照射组,同时设空白照射组和空白给药组。

1.6 观察

照射后肿瘤细胞中 GSH 含量的动态变化和两组细胞(单纯照射组和照射加给药组)存活状况的变化。

2 结果

2.1 生长期

正常条件下生长的 SGC7901 细胞在贴壁后即刻细胞内 GSH 含量最高,进入对数生长期后细胞中 GSH 含量逐渐降低,如图 1 所示。

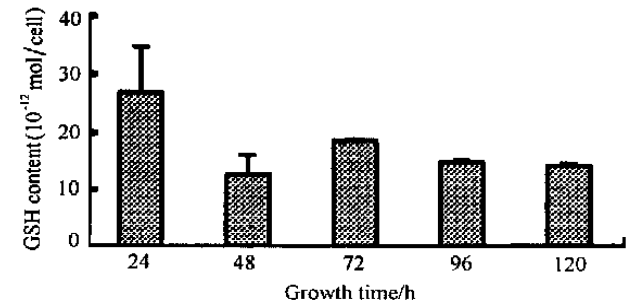


Fig.1 Change in glutathione content in SGC 7901 cells under normal conditions($n=6$)

2.2 对照组

对照组 SGC7901 细胞辐照后 24、72h 细胞中 GSH 含量 2 次达到峰值且峰值呈照射剂量依赖性增加,但第 1 次峰值较高(8Gy 组除外),未照射组 SGC 细胞未见 GSH 含量的增高。此后,随着生长时间的推移, GSH 含量逐渐降低,如图 2 所示。

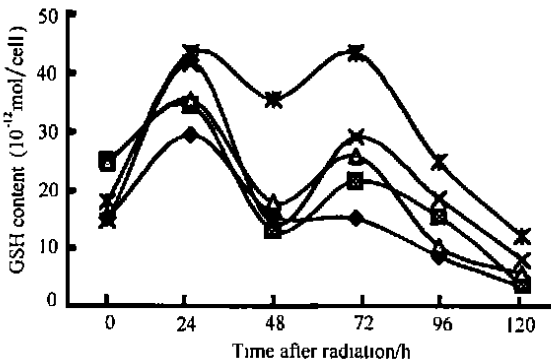


Fig.2 Change in glutathione content in SGC 7901 cells irradiated with different doses($n=6$)

◆. 0Gy, ■. 1Gy, △. 2Gy, ×. 4Gy, *. 8Gy

2.3 用药组

BSO 用药组 SGC7901 细胞,各组(包括未照射组)细胞中 GSH 含量均在 24h 后降至正常值的 5%左右,且在长时间(1 周)内维持在此水平,但 8Gy 照射组细胞内 GSH 含量变化不同,仍呈现出一定的周期性变化,如图 3 所示。

2.4 辐照前给予 BSO, 大多数情况下可以增强肿瘤细胞对射线的敏感性, 如表 1 所示。

Tab.1 Survival comparison among the different test groups (BSO+ radiation / radiation alone) (n=4)

Gy	24h	48h	72h	96h	144h
0	1	1	1	1	1
1	1.123	0.629	0.203	0.859	0.969
2	1.426	0.957	0.416	1.154	1.128
4	1.421	1.02	0.448	1.054	1.1
8	0.623	0.88	0.14	0.425	0.364

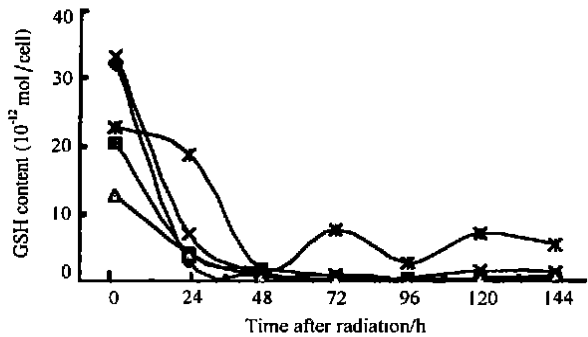


Fig. 3 Change in glutathione content in SGC 7901 cells irradiated with different doses after treatment 1mg/mL BSO(n=4)

◆. 0Gy, ■. 1Gy, △. 2Gy, ×. 4Gy, ☆. 8Gy

3 讨论

GSH 是细胞自我保护系统的重要物质之一,也是 DNA 合成中不可缺少的小分子巯基化合物,具有消除氧自由基、维持细胞内正常的氧化还原环境和蛋白质的结构与功能等多方面的作用。它广泛存在于真核细胞中,并在胞浆中合成,仅 10%左右移至线粒体中。影响 GSH 合成的因素主要包括半胱氨酸(Cysteine, Cys)的供给和合成限速酶 γ 谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ glutamylcysteine synthetase, GCS)的活性。前者主要来源于养料,而后者由重链轻链两个亚单位组成,重链决定酶的催化功能,氧化损伤、细胞因子刺激、热休克、抗氧化剂、重金属离子及进入生长周期等多种因素都能引起 GCS 重链转录、或 mRNA 稳定性的增加,从而反映为胞浆中 GSH 含量的升高^[4,5]。

文献[6]的实验表明部分肿瘤细胞能对低剂量辐射产生适应性反应,从而提高了肿瘤细胞对射线的抗性。电离辐射的直接效应是引起细胞中氧自由基的增加,损伤核及膜成分。GCS 转录增加,GSH 含量升高修复氧化损伤是辐射应激反应的一个组成部分,这可能也是细胞对射线产生耐受的一个重要原因。我们在实验中观察到部分细胞由于损伤严重而碎裂死亡,在存活细胞中则发现 GSH 含量的升高,且受照射剂量越大,存活细胞中 GSH 含量越高,峰值越大。照射后存活的细胞内 GSH 含量的波动也反映了生存环境及自身调节机制对 GSH 合成的制约。总体而言,辐照后细胞中 GSH 水平要高于正常细胞,促使细胞对射线的抗性增加。

有实验报道^[5]大鼠肝组织大部分切除后再生 12h GSH 含量、GCS 活性及 GCS 重链 mRNA 稳定性升高,我们的实验也观察到传代后的细胞 GSH 含量急速升高,但目前就 GSH 含量与细胞周期间的关系尚无一致的看法。

BSO 是一种 GCS 抑制剂,能耗竭细胞中的 GSH,它本身毒性很低,水溶性好,实验所用的剂量完全观察不到对细胞存活和生长增殖的影响,用药后的细胞在整个观察时间内 GSH 维持在很低的水平,从而降低细胞受照射后的存活率,但在高剂量照射下,肿瘤细胞存活率明显降低,但存活细胞内 GSH 含量仍然很高,即使是在用 BSO 处理以后,后者也保持了一个较高的含量,此时肿瘤细胞内是新的 GSH 合成方式抑或是抑制的靶酶合成增多对抗了 BSO 的作用值得进一步实验研究明确。

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
ZHENG X L, JIN Y Z, SHEN Y. Sensitizer for cancer therapy, Shanghai :Shanghai Reference Publisher of Science and Technology , 1996, 165—166

2 张胜本,张连阳. 肿瘤化学治疗敏感性与抗药性,四川:四川科学技术出版社,1995,3—4
ZHANG S B, ZHANG L Y. Tumor chemotherapeutic sensitivity and drug—resistance. Si Chuan :Si Chuan science and technology publisher, 1995, 3—4

3 Tietze F. Anal Biochem. 1969, **27**(3):502—510

4 Wei W, Nazzareno B. Pharmacol Reviews, 1998,**50**(3):335—352

5 LU S S. FASEB, 1999,**13**(10):1169—1180

6 王菊芳,李文建,周光明等. 辐射研究与辐射工艺学报,2000, **18**(1):35—39
WANG J F, LI W J, ZHOU G M *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2000, **18**(1):35—39

THE PRELIMINARY STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN
GLUTATHIONE CONTENT IN HUMAN SGC7901 CELL LINE
PRETREATED WITH RADIOSENSITIZER
AND ITS SUFFERED RADIATION DOSE

KONG Zhaolu JIN Yizun SHEN Zhifen

(Shanghai Institute of Radiation Medicine, Fudan university, Shanghai 200032)

ABSTRACT In this paper, the change of glutathione (GSH) content in the X ray irradiated human stomach cancer cell line SGC7901 which were pretreated with buthionine sulfoximine (BSO) were studied. The results showed that the GSH content in these cells decreased rapidly and the change was independent to the radiation dose. On the contrary, there was a trend for the un—pretreated control cells that the GSH level in the cancer cells rose alone with the increase of radiation dose.

KEYWORDS Glutathione, Irradiation, Buthionine sulfoximine, γ glutamylcysteine synthetase

CLC R730.53, R730.55