

乙双吗啉对人肺腺癌细胞系 SPC-A-1 的辐射增敏特性

林万敏 马承武 罗祖玉 范文林* 陈一新 梁 杰*

(复旦大学)

摘要 乙双吗啉(AT₁₇₂₇)是我国自行合成的哌嗪二酮类抗肿瘤药物,它的放射增敏性近年来引起了各方面的关注。本文以人肺腺癌细胞系 SPC-A-1 为材料,用体外细胞集落形成法研究了乙双吗啉在乏氧条件下的辐射增敏性,结果表明当药物浓度为 0.15 mmol/L 时,增敏比为 1.33。对现有资料进行分析,提出乙双吗啉可能以某种方式作用于乏氧的肿瘤细胞。

关键词 乙双吗啉(AT₁₇₂₇); SPC-A-1 细胞; 细胞毒; 乏氧细胞辐射增敏剂; 增敏比(SER)。

前 言

乙双吗啉(AT₁₇₂₇)是由任云峰^[1]等在 ICRF 154 的基础上合成的一个新药。作为治肿瘤药物,近年来对它进行了从体外,体内直到临床的研究^[2-4]。在进一步将乙双吗啉与放射合用时,一些作者发现,无论是动物试验(蒋国良,个人通讯),还是临床观察^[5],其作用都比单用放射强。但是,这种疗效的提高,究竟是两种因子的单纯相加,还是乙双吗啉在杀灭一部分细胞的同时,提高了另一部分存活细胞的放射敏感性?乙双吗啉有没有可能成为放射生物学家和放射治疗学家心目中的乏氧细胞辐射增敏剂?这一问题已引起了人们的关注。目前还未见到在体外乏氧细胞上进行的工作,本文报导对这一问题进行研究的初步结果。

材 料 和 方 法

(1) 细胞系 采用上海市胸科医院建成的人肺腺癌细胞 SPC-A-1。细胞贴壁生长,培养基为 RPMI 1640,含 20% 小牛血清及青、链霉素各 100 单位/ml,卡那霉素 50 单位/ml。传代后三天,细胞进入指数生长期,用胰酶消化细胞,并用培养基稀释成一系列浓度供用。

(2) 乙双吗啉 由任云峰提供,结晶干粉。实验前即刻用二甲亚砜(DMSO)在 37℃ 水浴中溶解药物,经振荡成悬液,再用培养基稀释至所需浓度。

(3) 射线源 采用 Philips X 射线深部治疗机,220 kV, 15 mA,滤片为 1 mmAl + 0.5 mmCu。剂量率为 1.14 Gy/min。

(4) 氮气 用上海吴泾化工厂生产的高纯氮,含量不少于 99.999%,PO₂ ≤ 10 ppm。

本研究以细胞形成集落数作为检测受药物或射线处理后细胞存活的指标,参照了在以前的工作中所建立的较为稳定的培养方法^[6]。简述之,即经过一系列处理的细胞,最后植入 φ6 塑料培养皿,在 37℃、5% CO₂ 和饱和湿度的条件下培养 10 天。细胞集落经甲醇-冰醋酸固定后,用 Giemsa 染色、计数。细胞的相对集落形成率或存活率由处理组细胞的集落形成率除以对照组细

* 生物物理专业五年级本科生

胞的集落形成率得到。每一实验点接种 3—5 个培养皿, 每条曲线由 2 次以上的实验重复取得。

整个实验包括两部分。第一部分是乙双吗啉的细胞毒试验, 即慢性毒性试验和急性毒性试验。前者是为了确定在急性毒性试验和增敏实验中, 当药物与细胞的短时急性作用结束后, 在以后的培养期间, 培养基中残留的药物浓度对最后结果的影响程度, 从中可推算出为了排除这种干扰所需的稀释倍数。本研究采用的药物浓度为 0—0.02 mmol/L, 培养时间为 10 天。后者则是模拟在增敏作用中, 药物与细胞的作用过程, 从中可选择合适的增敏浓度。本研究中药物作用为 2 小时, 随后将细胞悬液稀释到药物慢性毒性可以忽略的程度, 定量接种、培养。选用的药物浓度为 0—0.5 mmol/L。

实验的第二部分是乙双吗啉的增敏试验。根据急性实验结果, 在悬液中加入选定浓度的药物, 然后将悬液置于摇床上进行振荡使它们充分作用。1 小时后, 向悬液中通入高纯氮气, 通氮时间为半小时。然后在继续振荡和通氮的条件下进行辐照, 经过辐照的悬液稀释成一定的细胞浓度和慢性毒性可以忽略的药物浓度, 加入到培养皿中开始培养, 在上述整个过程中, 药物和细胞接触的时间总和为 2 小时左右, 与急性毒性试验条件一致。实验中通过氮气是为了造成细胞的乏氧环境。业已证实, 当细胞不断振荡时, 以 0.5 升/瓶·分的流量通入高纯氮, 30 分钟后, 瓶内气体达到平衡, 可以满足乏氧要求^{[6][7]}。

实验数据根据多靶一击模型(Multi-target one-hit model), 即 $S = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$, 用实验室自编的程序在 Commodore-64 微机上进行拟合处理。药物的增敏特性用增敏比(Sensitivity Enhancement Ratio, SER)表示。SER = $D_0(\text{对照组})/D_0(\text{处理组})$ 。

结 果

乙双吗啉对 SPC-A-1 细胞的慢性毒性和急性毒性试验的结果见图 1 和图 2。曲线的形状类似汉防甲己素对 SPC-A-1 细胞的毒性曲线^[6], 即随着药物浓度的增加, 曲线的斜率趋向增大。从图 1 可知, 当乙双吗啉的浓度小于 0.001 mmol/L 时, 相对集落形成率大于 90%, 我们以 0.001 mmol/L 作为急性毒性试验和增敏实验中残留药物浓度允许的上限。根据图 2 中 2 小时急性毒性试验结果, 我们选定对细胞毒性较低的 0.05 mmol/L(相对集落形成率为 84%)和有一定毒性的 0.15 mmol/L(相对集落形成率为 54%)作为增敏实验的浓度。图 2 中的虚线是 1.5 小时的急性毒性试验, 其作用将在讨论部分说明。

表 1 在三种不同条件下辐照的 SPC-A-1 细胞的存活率—剂量曲线参数

Table 1 Survival-dose curve parameters of SPC-A-1 cells irradiated under three different conditions

组 别 Groups	参 数 Parameters	平均致死剂量 mean lethal dose D_0 (Gy)	外推值 N Extrapolation number N
通 氮 In N_2		2.32	1.26
通氮 + 0.05 mmol/L 乙双吗啉 In N_2 + 0.05 mmol/L		2.21	1.42
通氮 + 0.15 mmol/L 乙双吗啉 In N_2 + 0.15 mmol/L		1.74	1.74

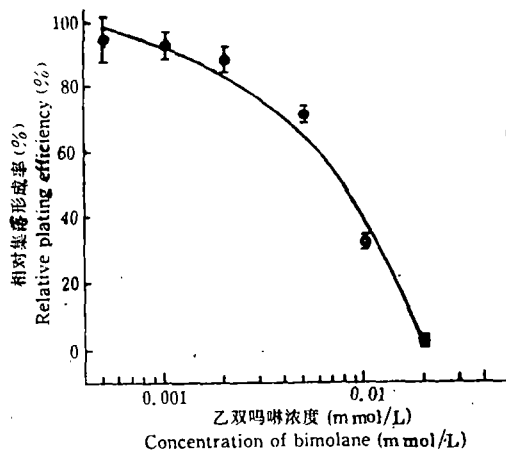


图 1 乙双吗啉对 SPC-A-1 细胞的慢性毒性, 竖线表示 $\bar{x} \pm SE$

Fig. 1 Chronic cytotoxicity of bimolane on SPC-A-1 cells. The bar is $\bar{x} \pm SE$

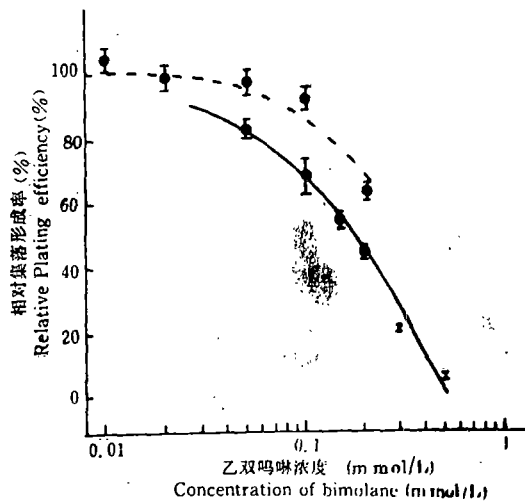


图 2 乙双吗啉对 SPC-A-1 细胞的急性毒性
Fig. 2 Acute cytotoxicity of bimolane on SPC-A-1 cells

--- 1.5 小时 one and half an hour
— 2 小时 two hours

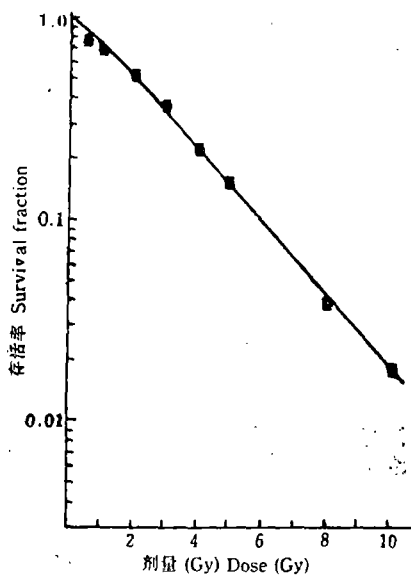


图 3 在氮气中辐照的 SPC-A-1 细胞的存活率—剂量曲线, 竖线表示 $\bar{x} \pm SE$

Fig. 3 Survival-dose curve of SPC-A-1 cells irradiated in N_2 . The bar is $\bar{x} \pm SE$.

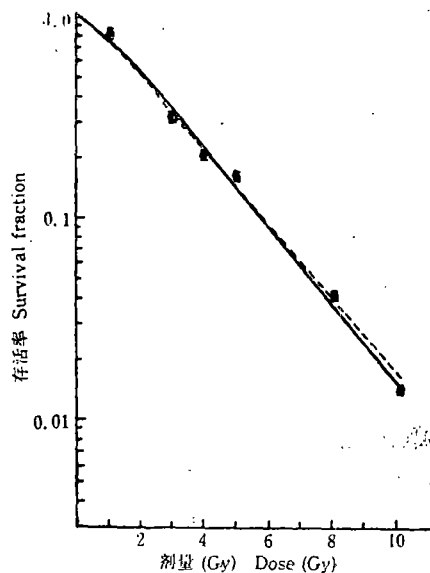


图 4 在氮气(---)和氮气加 0.05 mmol/L 乙双吗啉(—)中辐照的 SPC-A-1 细胞的存活率—剂量曲线

Fig. 4 Survival-dose curves of SPC-A-1 cells irradiated in N_2 (---) and in $N_2 + 0.05 \text{ mmol/L bimolane}$ (—)

图 3 显示了 SPC-A-1 细胞在乏氧条件下的存活率—照射剂量曲线。以这一条曲线为对照, 图 4 和图 5 分别表示了在 0.05 mmol/L 和 0.15 mmol/L 浓度的乙双吗啉作用 2 小时的条件下, 乏氧的 SPC-A-1 细胞的存活率—照射剂量曲线。根据计算机拟合结果, 这三条曲线的参数见表 1。

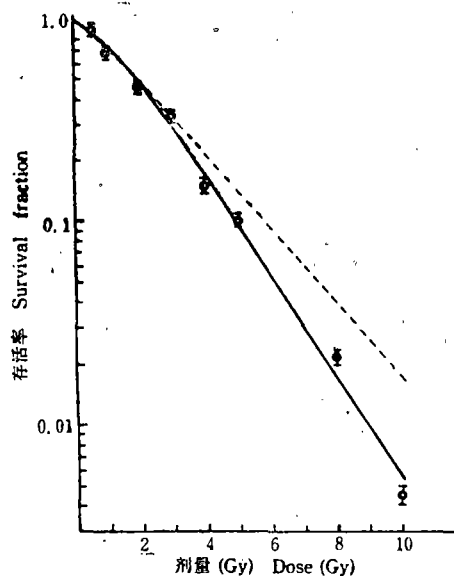


图5 在氮气(……)和氮气加 0.15 mmol/L 乙双吗啉(——)中辐照的 SPC-A-1 细胞的存活率—剂量曲线

Fig. 5 Survival-dose curves of SPC-A-1 cells irradiated in N₂(---) and in N₂+0.15 mmol/L bimolane(——)

由表1得知, 0.05 mmol/L 和 0.15 mmol/L 的乙双吗啉对 SPC-A-1 细胞的增敏比分别为:

$$\text{SER}(0.05\text{mmol/L}) = 2.32/2.21 = 1.05$$

$$\text{SER}(0.15\text{mmol/L}) = 2.32/1.75 = 1.33.$$

讨 论

关于乙双吗啉的辐射增敏性研究近年来陆续有一些报道, 涉及到动物肿瘤、离体细胞和临床观察。这些研究所用的方法不尽相同, 结果也不完全一致, 但均观察到了乙双吗啉在一定条件下的增敏现象。蒋国良^[8]等在临床随机对照试验中, 观察到了乙双吗啉对鼻咽癌病人原发灶完全消退的增敏比为 1.23。张志义^[6]等将乙双吗啉作为原发性肺癌的辐射增敏剂使用, 使肿瘤缩小一半的剂量从 39.5 Gy 下降到 34 Gy。本文中乙双吗啉对乏氧的离体人肺腺癌细胞的增敏比, 当药物浓度为 0.05 mmol/L 时, 其值近似于 1, 但当药物浓度为 0.15 mmol/L 时, 其值为 1.33。虽然临床的指标和体外实验的指标含义不能完全等同, 但这些结果可以相互参照, 在比较接近的水平上反映了乙双吗啉的增敏特性, 从而提供了对它进行深入研究的基础。

蒋国良等(个人通讯)发现, 乙双吗啉对自然状态的小鼠 S 180 肉瘤无辐射增敏作用, 而对缺氧(切断供血)的 S 180 肉瘤有辐射增敏作用。结合本文的研究, 是否可以认为, 乙双吗啉仅是对乏氧细胞, 而不是对有氧细胞发生作用的辐射增敏药物?

在实验中, 注意到由于操作顺序的关系, 各剂量点的细胞与药物接触的时间在实际上是有少许差异的。为了纠正可能存在的偏差, 我们根据图 2 中 1.5 小时急性毒性试验曲线, 和 2 小时的急性毒性曲线, 用线性插入法对原结果进行了校正处理, 结果并没有发现显著的差异。

对乙双吗啉辐射增敏性的研究, 目前还处于初步阶段, 尤其在药物的作用机制、体内和体外试验在毒性和效应方面的相关性及临床试验的标准化诸多方面, 尚有待继续研究。

参 考 文 献

- [1] 任云峰, 科学通报, 25, 189 (1980).
- [2] X. T. Li et al., Europ. J. Cancer Clin. Oncol., 19, 283 (1983).
- [3] T. M. Zhang et al., Acta Pharm. Sinica 15, 576 (1980).
- [4] Zhang Zhi-yi et al., Chinese Medical J., 96, 601 (1983).
- [5] Zhang Zhi-yi et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 10, 2305 (1984).
- [6] Lin Wanmin et al., Radiosensitization Newsletter, 4(3), 7 (1985).
- [7] L. Parker et al., Radiat. Res., 38, 493 (1969).
- [8] 蒋国良等, 肿瘤, 1986年第6卷, 第3期, 第113页。

(收到日期 1986年8月28日)

STUDY ON THE RADIOSENSITIZATION OF AT₁₇₂₇ ON HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA CELL LINE SPC-A-1

Lin Wanmin Ma Chengwu Luo Zuyu Fan Wenlin⁺ Chen Yixin⁺ Liang Jie⁺

(Department of Biology, Fudan University, Shanghai, China)

ABSTRACT Bimolane (AT₁₇₂₇), a new antitumour drug, was synthesized in China. Of late years, attention has been paid to the radiosensitizing activity of AT₁₇₂₇. In present study, this effect has been studied with hypoxic human lung adeno-carcinoma SPC-A-1 using colony formation assay *in vitro*. The result obtained showed that the SER (Sensitivity Enhancement Ratio) was 1.33 when the concentration of AT₁₇₂₇ was 0.15 m mol/L.

Basing on the analysis of some results including those of solid tumour of mice, it is reasonable that AT₁₇₂₇ has radiosensitizing effect on hypoxic tumour cells.

KEY WORDS: Bimolane (AT₁₇₂₇); SPC-A-1 cell line; Cytotoxicity; Hypoxic cell radiosensitizer; SER.

⁺Undergraduated-students of the 5 th grade of biophysics section.