

倍半氧化羧乙基锗放射增敏作用的研究

孟祥顺 赵芳 高建国 郑秀龙

(第二军医大学, 上海)

李淑安 方家生 施文平

(广州军区后勤部药物研究所, 广州)

黄本才

(同济大学, 上海)

摘要 本文以体外培养的 CHO 细胞微核率的变化及荷 S180 小鼠为动物模型的体内实验, 从不同剂量 γ 线照射、不同有机锗剂量及不同给药途径等方面研究了有机锗的放射增敏作用。结果表明, 体内、体外实验的增敏比(SER 值)分别为 1.22 和 1.18。

关键词 放射增敏剂, 倍半氧化羧乙基锗, 微核率, 再生长延迟, SER 值

倍半氧化羧乙基锗(下简称有机锗)为广州军区药物研究所合成的抗肿瘤药物, 体外细胞活存实验提示其有一定的放射增敏作用。为进一步确定其增敏效价, 同时探讨其开发作为放射增敏药的可能性, 本文用离体培养细胞微核率及整体荷瘤小鼠研究了有机锗的放射增敏作用。

材料与 方法

1. 微核率测定

离体培养的 CHO 细胞微核率测定, 按常规方法进行^[1]。

2. 动物分组

实验动物选用雄性健康昆明种小鼠(体重 20—25 g)。将本实验室妥善保存的 S180 肉瘤肿块切成 1 mm³ 大小后接种于动物左后肢。待肿瘤体积长大至 200 mm³ 大小随机分组。

(1) 观察有机锗对不同剂量 γ 线照射的增敏作用 动物设空白对照组(不照射、不给药)、照射对照组(分别照射 0、8、16、24 和 32 Gy γ 线, 不给药)和实验组(照射相同剂量 γ 线加用 300 mg/kg 的有机锗), 每个剂量点 10—12 只动物。

(2) 观察不同剂量的有机锗对 8 Gy γ 线照射的放射增敏作用 动物设空白对照组, 照射对照组和实验组(药物剂量为 100、300 和 500 mg/kg, 加 8 Gy γ 线照射), 各剂量点 10—15 只动物。

(3) 观察不同给药途径的有机锗对 8 Gy γ 线照射的放射增敏作用 动物设照射对照组和实验组(分别口服和静脉注射 300 mg/kg 的药物, 加 8 Gy γ 线照射), 每观察组 10—15 只动物。

3. 给药方法

药物由广州军区后勤部药物研究所合成并提供, 分子量为 339.3, 用三重蒸馏水加热溶解后以饱和 NaOH 调节 pH 至 6.0。微核试验用药物浓度为 1%, 动物实验因考虑注入药物需等容量, 因此分别配制成 2%、1.2% 和 0.4% 使用。

(1) 微核实验 将指数生长期细胞用胰酶消化, RPMI 1640 培养液悬浮细胞后加入有机锗于

37℃培养1 h。更换新鲜培养液后于室温下进行有氧和乏氧处理。

(2). 动物实验 分别于照前1.5 h经腹腔注射药物, 对照组分别注入等容量的生理盐水。静脉注射和口服给药分别于照射前1.5 h进行。

4. 照射

微核实验时, 细胞于室温下在有氧和无氧条件下分别进行照射。剂量率为1.96 Gy/min, 培养瓶距源1.8 m。动物实验时, 将小鼠固定在特制的木板盒架上, 荷瘤肢暴露于照射野, 身体其余部位用10 cm厚铅砖屏蔽。照前钳夹荷瘤后肢13 min, 造成肿瘤急性乏氧。肿瘤中心距源1.8 m, 剂量率1.96 Gy/min。

5. 观察指标

(1) 微核率观察 细胞经药物处理后更换新鲜培养液, 通 N_2 (或有氧)照射后于37℃继续培养72 h, 常规制片, 计数1000个细胞中形成微核的细胞数, 每瓶计数6000—10000个细胞, 每个剂量点2瓶细胞, 实验重复二次。

(2) 整体动物观察 照后每2 d用毫米游标卡尺逐一测量每只小鼠肿瘤的最大径长和宽, 按Steel经验式($V = \text{长} \times \text{宽}^2 / 2$)计算肿瘤体积。参照汪俊^[2]等工作, 用Fortran语言编制计算机程序, 同时辅以Edusoft公司的Superplot绘图工具程序, 进行全部数据计算、曲线拟合及打印、绘图等工作。分别计算各组的肿瘤体积抑制率、肿瘤重量变化和肿瘤再生长延迟等。以照射剂量对肿瘤再生长延迟的天数绘制剂量效应曲线, 经计算机拟合后求出单独照射组和照射加有机锗组肿瘤再生长延迟为20 d时两组所需的 γ 线剂量, 计算两剂量比值即为增敏比(SER), 以SER值的大小来判断有机锗的放射增敏效应。

结 果

1. CHO细胞照后微核率的剂量效应曲线

在有氧和乏氧条件下, 分别将细胞照射0、0.5、1、2、4和6 Gy, 照射剂量与细胞微核率的关系如图1。结果表明, 在有氧和乏氧条件下随照射剂量增加, 微核率均呈线性增加, 剂量

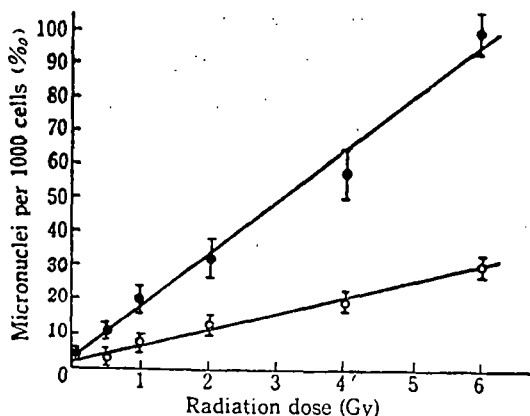


Fig 1. The CHO cells were irradiated under hypoxia (○) and oxygen (●). The doseresponse curve shows the relationship between radiation dose and micronuclei.

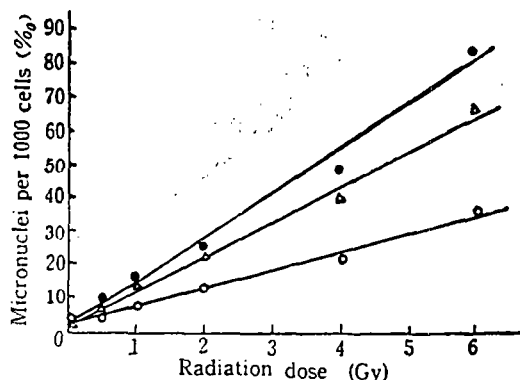


Fig 2. Effect of carboxyethylgermanium sesquioxide on micronuclei: ●) O_2 and 100 µg/ml drug; ○) N_2 and 100 µg/ml drug; △) N_2 and 500 µg/ml drug.

效应曲线的方程分别为: $\hat{Y}_{\text{有氧}} = 2.6425 + 0.1527x$ 和 $\hat{Y}_{\text{乏氧}} = 2.1923 + 0.0454x$ 。两方程的回归系数之比即氧增敏比(OER)为 3.36, 与文献报告相符。

2. 有机锗对微核率的影响

研究有机锗的放射增敏作用, 需确定单独药物作用不影响微核率的浓度。细胞分别用不同浓度(0、50、100、500、1000和2000 $\mu\text{g/ml}$)有机锗处理后观察到, 当药物浓度高于 500 $\mu\text{g/ml}$ 时, 药物本身使微核率显著性增加。

用 100 $\mu\text{g/ml}$ 的有机锗处理细胞后, 分别于有氧和乏氧条件下照射 0—6 Gy γ 线, 本文又观察了 500 $\mu\text{g/ml}$ 的药物处理后于乏氧条件下照射对微核率的影响, 以便比较不同浓度有机锗的作用, 结果如图 2。三条剂量效应曲线的线性方程分别为:

$$\text{有氧}(100 \mu\text{g/ml 有机锗}): \hat{Y} = 2.2072 + 0.1299x$$

$$\text{乏氧}(100 \mu\text{g/ml 有机锗}): \hat{Y} = 1.8747 + 0.0535x$$

$$\text{乏氧}(500 \mu\text{g/ml 有机锗}): \hat{Y} = 2.4724 + 0.1020x$$

乏氧条件下单独照射与照射加有机锗(100 $\mu\text{g/ml}$)线性方程斜率之比即 SER = 1.18, 500 $\mu\text{g/ml}$ 时为 2.25。

Tab 1. The radiosensitizing effect of carboxyethylgermanii sesquioxidum on different doses of γ -ray irradiation

Dose (Gy)	Inhibited rate of tumor volume(%)	Tumor weight (g)	Double time of tumor volume (day)	Regrowth delay (day)
0	—	6.27 $\pm$ 1.80	3.37	
0 + D*	8.09 $\pm$ 14.84	4.82 $\pm$ 1.01	3.52	
8	2.15 $\pm$ 10.48	5.78 $\pm$ 1.37	3.38	0.01
8 + D	16.5 $\pm$ 17.34	3.43 $\pm$ 1.6	3.84	0.32
16	29.61 $\pm$ 28.27	3.61 $\pm$ 1.70	6.85	3.48
16 + D	36.09 $\pm$ 17.91	3.04 $\pm$ 1.53	7.33	3.81
24	42.86 $\pm$ 30.62	3.55 $\pm$ 0.56	8.10	4.73
24 + D	44.74 $\pm$ 21.80	2.60 $\pm$ 0.79	>7.33**	>3.81
32	58.04 $\pm$ 32.23	2.09 $\pm$ 0.89	>8.10	>4.73
32 + D	48.77 $\pm$ 27.61	1.86 $\pm$ 1.12	>7.33	>3.81

注: *加用 300 mg/kg 有机锗(ip)

**大于 24 Gy 照射时, 由于剂量较大, 肿瘤未能长大到原始体积的二倍, 故拟合的肿瘤生长曲线在 $V_t/V_0 = 2$ 时方程无解。肿瘤体积倍增时间及再生长延迟用大于上一剂量点的时间(天)来表示。

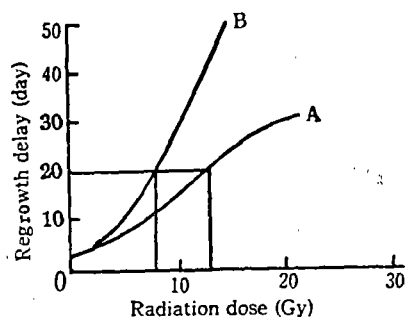


Fig 3. The dose-response curve of radiation dose and regrowth delay A: radiation alone B: radiation and 300 mg/kg carboxyethylgermanii sesquioxidum

3. 有机锗对不同剂量 γ 线照射的放射增敏作用

单独照射 0—32 Gy 及照射加用 300 mg/kg 的有机锗后对小鼠肿瘤体积抑制率、肿瘤重量及再生长延迟的影响结果如表 1。

以照射剂量为横坐标, 肿瘤再生长延迟天数为纵坐标绘制的剂量效应曲线经计算机拟合后如图 3。计算当肿瘤再生长延迟为 20 d 时, 单独照射组与照射加药组所需的 γ 线剂量分别为 12.05 和 9.90 Gy, 两者的比值即 SER 值为 1.22。

4. 不同剂量有机锗对 8 Gy γ 线照射的放射增敏作用

小鼠分别腹腔注射不同剂量的有机锗(100、300 和 500 mg/kg)和 8 Gy γ 线照射, 各组的肿瘤体积抑制率和肿瘤重量见表 2。

Tab 2. The radiosensitizing effect of different doses of carboxyethylgermanii sesquioxidum on 8 Gy γ -ray irradiation

Dose	Inhibited rate of tumor volume(%)	Tumor weight (g)
0	—	5.10±1.2
8 Gy	3.53±13.99	2.97±1.7
8 Gy + 100 mg/kg	14.80±18.94	2.45±1.3
8 Gy + 300 mg/kg	21.50±18.05	2.33±1.8
8 Gy + 500 mg/kg	23.56±14.29	1.53±1.1

5. 不同给药途径的有机锗放射增敏作用

小鼠分别口服和静脉注射 300 mg/kg 的有机锗, 然后照射 8 Gy γ 线, 有机锗对肿瘤体积抑制率等的影响见表 3。

Tab 3. The radiosensitizing effect of carboxyethylgermanii sesquioxidum administered by po. and iv. on 8 Gy γ -ray irradiation

Group	Inhibited rate of tumor volume(%)	Tumor weight (g)	Double time of tumor volume(day)	Regrowth delay (day)
8 Gy	—	5.53±1.60	1.59	—
8 Gy + 300 mg/kg(po.)	26.0± 8.5	4.46±0.91	3.06	1.47
8 Gy + 300 mg/kg(iv.)	49.2±17.3	3.27±0.83	4.83	3.20

讨 论

(1) 近几年已应用细胞微核率的变化评价放射增敏剂效价^[3,4], 这方法具有简便、快速的优点。照射剂量与微核率间有良好的线性关系, OER 值一般为 3 左右。本实验结果显示在有氧条件下照射、单独照射与照射加药组(100 μ g/ml)的线性方程, 经显著性检验, $P>0.05$ 。提示有氧条件下药物未能增加 CHO 细胞微核率的形成, 即无放射增敏作用, 与一般放射增敏剂的特点相同。而乏氧条件下照射两方程显著性检验, $P<0.01$, 表现出放射增敏作用, SER 值为 1.18 (100 μ g/ml), 随药物浓度增加(500 μ g/ml)而 SER 增加(2.25), 提示其增敏作用大小与药物浓度有一定的依赖关系。

(2) 对荷瘤整体动物的放射增敏作用观察结果表明, 300 mg/kg 的有机锗对 0—32 Gy 各剂量均表现出放射增敏作用。与空白对照组相比, 单独使用有机锗(0 Gy + 300 mg/kg 药物)对肿瘤生长有一定的抑制作用, 与其它实验证明此药为抗癌药的结果相一致, 随照射剂量增加, 对肿瘤生长抑制率、肿瘤重量和肿瘤再生长延迟的影响均增加。照射同时加用有机锗后各项观察指标均继续增加, 表现了有机锗的放射增敏作用(见表 1)。本实验条件下 SER 值为 1.22, 基本与微核实验的结果(SER = 1.18)相近。

不同剂量有机锗对 8 Gy γ 线增敏效果的比较可看出, 放射增敏效价与药物剂量有一定的依赖关系。照射同时加用有机锗后与空白对照组及照射对照相比, 均表现出一定的放射增敏作用。

口服和静脉注射两种给药途径均有效, 静脉给药方式效果更好一些。如对肿瘤体积抑制率口服给药后平均增加 26.6%, 而静脉给药后平均增加 49.2%。其它实验采用腹腔注药, 也证实有一定作用。

(3) 有机锗放射增敏作用的评价。经大量实验证实, 有机锗结构明确, 毒副作用小, 有肯定的抗肿瘤作用。如能确定该药有放射增敏作用, 则对开发该类药物的新治疗作用有重要意义。

在乏氧情况下, 有机锗对照后微核的形成有一定放射增敏作用, 但当药物浓度为 $100 \mu\text{g/ml}$ (相当于 249.7 mmol/L) 时 SER 值仅为 1.18, 整体动物实验的 SER 值为 1.22。与其它药物如 RSU-1069、SR-2508 等相比, 仍不太理想, 显得偏低。作为增敏剂其临床效果尚待进一步证实。但有机锗类药物有一定的放射增敏作用, 在此结构基础上进行改造, 仍不失为一条新的途径, 如能进行一定的临床试验, 进一步确定其临床使用价值, 并在可能的情况下进一步探讨此类药物的放射增敏作用机理, 将有一定的研究意义。

本文承同济大学工程力学系研究生匡志平、袁国清参加计算机程序设计, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] P. I. Countrymen, *Mutat. Res.*, 41, 321(1976).
- [2] 汪俊, 糜福顺, 沈瑜, 中国医学科学院院报, 8(3), 174 (1989).
- [3] 糜福顺, 芝本雄太, 第三届全国辐射研究学术讨论会论文摘要汇编, 1986, 北京。
- [4] Jin Yizun (金一尊), in *Proceedings of International Conference on Biological Effects of Large Doses Ionizing and Non-Ionizing Radiation*, 1988, Hangzhou, p 91.

(稿件收到日期: 1990 年 5 月 11 日)

STUDY ON THE RADIOSENSITIZING EFFECT OF CARBOXYETHYLGERMANII SESQUIOXIDUM

Meng Xiangshun, Zhao Fang, Gao Jianguo, Zheng Xiulong

(*Sesond Military Medical University, Shanghai*)

Li Shuan, Fang Jiasheng, Shi Wenping

(*Institute of materia medica, Logistics department, Guangzhou military region, Guangzhou*)

Huang Bencai

(*Tongji University, Shanghai*)

ABSTRACT The radiosensitizing effect of carboxyethylgermanii sesquioxidum was determined by the frequency of micronuclei and regrowth delay. The results showed that the radiosensitization effect was observed under hypoxia condition and the value of sensitizing effect ratio (SER) were 1.23 and 1.18 respectively in vivo and in vitro.

KEYWORDS Radiosensitizer, Carboxyethylgermanii sesquioxidum, Micronuclei, Regrowth delay, SER value