

BSO 对视网膜母细胞瘤 GSH 含量的影响 及放射增敏作用研究

易先金¹ 丁立² 金一尊² 倪 逵¹ 王文吉¹ 易玉珍³

(¹上海医科大学附属五官科医院, 上海 200031)

(²上海医科大学放射医学研究所, 上海 200032)

(³中山医科大学中山眼科中心, 广州 510060)

摘要 利用体外培养的视网膜母细胞瘤细胞株及裸小鼠移植瘤模型, 研究了巯基修饰剂 BSO (丁胱亚磺酰亚胺) 对其 GSH (谷胱甘肽) 含量的影响以及 BSO 离体放射增敏作用。结果表明, 无论是离体还是整体用药, BSO 均能降低视网膜母细胞瘤的谷胱甘肽含量。离体状态下, BSO 主要表现为乏氧增敏作用。

关键词 BSO(丁胱亚磺酰亚胺), 视网膜母细胞瘤, GSH(谷胱甘肽), 放射增敏作用

实验及临床研究均表明, 不同类型的肿瘤及同种肿瘤不同个体对射线的反应不尽相同。有关研究表明, 肿瘤内乏氧细胞 (Hypoxic cell) 的存在是放疗不能根治或复发的原因之一。而细胞内谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 量的水平, 同细胞尤其是乏氧细胞的放射敏感性及其某些化疗药物的细胞毒作用有较密切的关系。细胞内 GSH 含量高, 对射线的敏感性则相对较差。视网膜母细胞瘤是高度恶性的儿童眼内肿瘤。据文献报道, 临床上虽然多数视网膜母细胞病对射线较敏感, 但存在着复发率高的问题。如予重复照射, 则并发症明显增加。能否应用巯基修饰剂配合放疗, 以求提高其疗效, 降低复发率, 本文作了初步研究。

1 材料和 方法

1.1 细胞

实验所用细胞为视网膜母细胞瘤细胞系 Y-79 及 So-Rb 50, 由美国 Albert 教授及广州中山眼科中心易玉珍提供。实验时取对数生长期细胞。

1.2 动物模型

人视网膜母细胞瘤裸小鼠移植瘤模型由本室建立(待发表资料)。裸小鼠鼠龄为 4—5 周, 体重 20—30 g, 雌雄不限。

1.3 药物及给药方法

BSO 由上海医科大学放射医学研究所金一尊合成。

1.3.1 离体实验 BSO 临用前新鲜配制, 过滤除菌后按所需浓度直接加入培养瓶中, 置 37℃、5%CO₂-95%空气培养箱内培养。分别于加药后 2、6、12 和 24 h 时收集细胞, 测定 GSH 含量。

国家教委资助课题

收稿日期: 初稿1993-11-24, 修改稿 1994-05-09

1.3.2 整体实验 BSO 用灭菌注射用水新鲜配制。分两种给药方式：①一次性腹腔内注射，剂量为 5 mmol/kg；② 每次腹腔注射 5 mmol/kg，重复三次，间隔 1.5 h。均于给药后(后一方案为最后一次给药)6、12、24、36 及 48 h 时处死动物，收集肿瘤、肝、脾、脑及肾等组织测定其 GSH 含量。

1.4 GSH 的测定

本实验采用 Tietze 还原酶法^[1]。

1.5 离体增敏实验

1.5.1 照射条件 ^{60}Co γ 辐射源，剂量率为 1.499 Gy/min，距离 60 cm，面积 18cm×24 cm。

1.5.2 乏氧条件 99.99% 氮气(上海有机所产品)，经 1% 硫酸铜溶液灭菌后，通入培养瓶内。通氮时间为 30 min。

1.5.3 细胞成活率的计算 采用 1.2% 甲基纤维素加 20% 胎牛血清的肿瘤干细胞体外集落培养法。BSO 作用 24 h 后通氮 30 min，室温下照射。照后去除 BSO，细胞接种于塑料平皿后培养三周时间，倒置显微镜下计数集落(>30 个细胞/集落)。

2 结 果

2.1 BSO 对离体 Y-79 及 So-Rb 50 细胞 GSH 含量的影响

视网膜母细胞瘤细胞系 Y-79 及 So-Rb 50 细胞的 GSH 含量各不相同，前者为 2.7 ± 1.3 fmol/细胞，后者为 1.4 ± 0.2 pmol/细胞。实验前测得 BSO 对 Y-79 及 So-Rb 50 细胞的 LD_{50} 值分别为 3 mmol/L 及 0.19 mmol/L。BSO 作用后，两个细胞株内 GSH 变化的程度不一致(见表 1)。

Tab 1. GSH depletion by BSO on retinoblastoma cell lines (% of control)

Cell lines and drug concentration /mmol·L ⁻¹		Time after BSO treatment/h			
		2	6	12	24
Y-79	0.01	98.05	84.29	51.34	28.9
	0.05	75.41	54.19	32.31	21.34
	0.1	55.04	44.98	23.61	16.35
So-Rb50	0.01	—	56.55	44.52	4.7

Tab 2. GSH depletion by BSO on retinoblastoma-bearing nude mouse ($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{mol/g}$

Tissue		Time after BSO administration/h				
		6	12	24	36	48
Tumor	(1)	1.40 ± 0.07	0.98 ± 0.02	0.61 ± 0.04	—	—
	(2)	0.52 ± 0.06	—	0.39 ± 0.04	0.27 ± 0.09	0.47 ± 0.11
Liver	(1)	0.26 ± 0.08	1.53 ± 0.54	2.59 ± 0.5	—	—
	(2)	1.10 ± 0.16	—	1.88 ± 0.29	1.84 ± 0.25	2.52 ± 0.22
Spleen	(1)	0.63 ± 0.09	0.65 ± 0.05	0.53 ± 0.08	—	—
	(2)	0.18 ± 0.07	—	0.13 ± 0.13	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.06
Brian	(1)	0.70 ± 0.14	0.59 ± 0.16	0.37 ± 0.05	—	—
	(2)	0.24 ± 0.06	—	0.20 ± 0.09	0.06 ± 0.02	0.14 ± 0.06
Kidney	(1)	0.024 ± 0.007	0.02 ± 0.008	0.02 ± 0.003	—	—
	(2)	0.013 ± 0.001	—	0.015 ± 0.003	0.02 ± 0.003	0.05 ± 0.07

(1) GSH depletion after 5 mmol/kg per time BSO for one time,

(2) GSH depletion after 5 mmol/kg per time BSO for three times, Each time seperated by 1.5 hours

2.2 BSO 整体给药后，对肿瘤及主要脏器 GSH 含量的影响

荷瘤裸小鼠的肿瘤和肝、脾、脑及肾等主要脏器的 GSH 含量分别为 1.299 ± 0.33 、 2.83 ± 1.19 、 1.14 ± 0.17 、 0.59 ± 0.13 及 $0.05 \pm 0.05 \mu\text{mol/g}$ 。一次及三次腹腔注射后 GSH 的变化见表 2。

2.3 BSO 对离体 Y-79 细胞的放射增敏作用

表 3 所示为 Y-79 细胞在有氧及乏氧状态下，BSO 对其放射敏感性的影响。从中看到氧增比约为 3，说明本实验条件是合适的。 D_0 值为使细胞群体存活率下降至 37% 时所需的照射剂量。

Tab 3. Effect of BSO treatment on radiosensitivity of Y-79 cells in vitro

	D ₀ value		SER	
	Air	N ₂	Air	N ₂
Control	0.83	2.51		
0.01 mmol/L × 24 h	0.76	2.07	1.09	1.21
0.05 mmol/L × 24 h	0.77	1.84	1.08	1.36

SER, sensitization enhancement ratio

3 讨 论

GSH 是细胞内主要非蛋白巯基，具有多种重要生理功能。有关研究表明^[2-8]，利用巯基修饰剂降低细胞内 GSH 水平后，可明显提高细胞在乏氧状况下的放射敏感性。

离体及整体实验均表明，BSO 有明显放射增敏作用^[7,8]。文献[9]报道，BSO 降低细胞内 GSH 含量后，对小剂量照射(0—4 Gy)有增敏作用，这一结果对临床放射增敏治疗可能有重要意义。本文观察了不同浓度的 BSO 作用于离体培养的视网膜母细胞瘤细胞株 Y-79 及 So-Rb 50 细胞以及荷瘤裸小鼠的情况。结果表明，不仅细胞株之间的 GSH 含量差异较大，而且对 BSO 的反应也不一样。如 Y-79 细胞经 0.01 mmol/L BSO 作用 24 h 后，其 GSH 含量降为对照组的 28.9%，而 So-Rb 50 细胞在上述同等条件下，其 GSH 的含量降为对照组的 4.7%，这种差异可能同细胞的本身特性有关。

关于 BSO 的乏氧增敏作用，文献有比较一致的报道。但对其有氧增敏作用则看法不一。本文的实验结果表明，BSO 对视网膜母细胞瘤细胞株 Y-79 细胞主要表现出乏氧增敏作用。0.01 mmol/L 及 0.05 mmol/L 的 BSO 作用 24 h 后，其乏氧状态下 SER 值分别为 1.21 及 1.36，而有氧状态下 SER 值仅为 1.09 及 1.08。

因 BSO 抑制 GSH 合成的作用无选择性，故整体给药后肿瘤及脏器的 GSH 含量都会下降。尽管实验研究表明，BSO 的放射增敏作用主要表现在乏氧细胞。但 GSH 降低后，有氧细胞对射线或对某些化疗药物的反应增高也不能完全除外。故观察全身用药后，肿瘤及各主要脏器 GSH 变化的规律，有助于决定合理给药方案。实验结果表明，荷瘤裸小鼠给药后，虽然肿瘤和各主要脏器的 GSH 都降低，但在降低程度和恢复时相上存在差异。如给药后 24—36 h，肿瘤内 GSH 降至最低水平，约为对照组的 21%—29.7%，而此时肝脏的 GSH 已明显回升。约为对照组的 65%—66%。总的趋势是，用药剂量越大，肿瘤及各器官的 GSH 降低越明显，且恢复也越缓慢。各主要脏器中以肝脏 GSH 恢复最快，如单次给药后 24 h 即恢复到正常的 91%，三次用药后 48 h 达

正常的89%。脑组织中GSH下降出现稍晚但持续时间长,说明BSO可透过血脑屏障且在脑组织中停留较长时间而持续发挥作用。结果提示,在使用BSO配合放射或化疗时,二者之间的使用间隔时间可能相当重要。如时机选择合适,则有可能提高射线或药物对肿瘤细胞的杀灭作用,而尽量避免或减少GSH降低后可能增加的放疗或化疗的毒副作用。

参 考 文 献

- 1 Tietze F. Anal. Biochem., 1969, 27: 502
- 2 Mitchell J B et al. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1989, 16: 1289
- 3 Mitchell J B et al. Radiat. Res., 1983, 96: 422
- 4 Biaglow J E et al. Int. J. Radiat. Biol., 1983, 44: 486
- 5 Barranoo S C et al. Investigational New Drugs, 1991, 9: 29
- 6 Adams C E. Brit. J. Cancer, 1984, 50: 285
- 7 Astor M B et al. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1984, 10: 1239
- 8 Shrieve L et al. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1986, 12: 1171
- 9 Skov K A et al. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1992, 22(3): 533

THE EFFECTS OF BSO ON GSH CONTENTS AND RADIOSENSITIVITY OF RETINOBLASTOMA CELLS

Yi Xanjin¹ Ding Li² Jin Yizun² Ni Chuo¹ Wang Wenji¹
Yi Yuzhen³

(¹Department of Ophthalmology, Eye and E. N. T Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai 200031)

(²Radiation Medicine Institute, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

(³Zhongshan Ophthalmic center, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060)

ABSTRACT The radiobiological effects of thiol modifier BSO on retinoblastoma were studied using cultured retinoblastoma cell lines Y-79 and So-Rb 50 and retinoblastoma bearing nude mouse. The preliminary results shown that BSO can deplete intracellular GSH contents of retinoblastoma cells in vitro and vivo. In vitro data demonstrated that low and nontoxic concentration BSO increased the retinoblastoma cells radiosensitivity especially under the hypoxic condition.

KEYWORDS BSO, Retinoblastoma, GSH (glutathione), Radiosensitization