

新型辐射增敏药 CM 对受照肝癌 H₂₂ 细胞 DNase 作用的研究

赵 芳 郑秀龙

(第二军医大学, 上海)

摘要 本文报道了新型辐射增敏药甲硝唑氨酸(CM)及其与 Ca²⁺ 结合后对肝癌 H₂₂ 细胞 DNase 作用, 并观察了 CM, CMCa 及 Ca²⁺ 和三者分别对受 30 Gy γ 线照射细胞 DNase 活力的影响。结果表明, CM 浓度在 10 mmol/L 以下对 H₂₂ 细胞 DNase 有激活作用。以 5 mmol/L 时激活作用最强, 在 5 mmol/L 以下随药物浓度的增加, 激活作用随之增加, CM 与 Ca²⁺ 结合成 CMCa 后对细胞 DNase 的激活作用与 CM 相似, 两者无显著差别($p > 0.05$), CM、CMCa 的这种激活作用与 γ 线照射后对 DNase 活力增高有叠加作用, 而 Ca²⁺ 对受照或非受照 H₂₂ 细胞 DNase 活力无明显的影响。上述结果表明, CM 及其与 Ca²⁺ 结合成 CMCa 后无论对受照或非受照 H₂₂ 细胞 DNase 均有激活作用。这种通过激活受照肿瘤细胞 DNase 叠加活力的增加、增强 DNA 破坏而提高肿瘤放疗效果, 可能是其放疗作用的机制之一。

关键词 辐射增敏剂, 甲硝唑氨酸, H₂₂ 细胞, 脱氧核糖核酸酶

甲硝唑氨酸(CM)为甲硝唑乙唑(灭滴灵)衍生物, 是我校合成的一种新型辐射增敏剂^[1,2], 经分子、细胞及整体实验等大量研究, 均证明它有较强的辐射增敏作用, 且与 Ca²⁺ 结合成甲硝唑氨酸钙(CMCa)制剂后增敏效果更强^[3-7]。并已从分子水平阐明了 CM 抑制受照细胞 DNA 慢修复过程是通过抑制 DNA 聚合酶 β 而产生的抑制作用^[4,8], 此外还观察到受照细胞修复不完全 DNA 链的再断裂是与 DNase 活力升高有关^[9]。在使用 CMCa 合并放射治疗肿瘤时, 对 DNase 活力的影响, 以及 Ca²⁺ 在其中的作用, 均是值得探讨的。

材 料 与 方 法

(1) CM、CMCa、Ca²⁺ 由本实验室合成和配制。

(2) 细胞 选用小鼠腹水型肝癌 H₂₂ 细胞。从接种 6—7 d 的昆明种小鼠抽取腹水后, 用日产 RPMI 1640 pH 6.9 培养液洗涤一次, 加 Tris-HCl 缓冲液[由 1.3% Tris 与 0.03% NH₄Cl 溶液, 临用前按 1:9(v/v)混合而成]除去红细胞^[9]。然后用 1640 培养液洗二次, 重新悬浮在 5% 葡萄糖——1640 培养液内(按 9:1 体积混合), 加不同浓度的 CM, 混匀后在 37℃ 水浴内保温 1 h, 使 CM 进入细胞后, 离心去上清, 再用 1640 培养液洗二次除去残留的 CM 后收获细胞。细胞悬浮于 1640 培养液内使成 3×10^7 /ml 细胞。

(3) γ 线照射 细胞悬浮于 10 ml 玻璃试管内, 置冰水浴中, 距 ⁶⁰Co γ 源 100 cm 处, 经 γ 线照射 30 Gy, 剂量率为 6.08 Gy/min。

(4) 细胞匀浆液制备 经照射后的细胞悬液离心去上清。将细胞重新悬浮在 0.9% NaCl—5% 葡萄糖注射液置玻璃匀浆器内, 外用冰水浴冷却, 将细胞破碎制成匀浆液。

本课题为国家自然科学基金与上海市青年科学基金资助课题。

(5) 细胞 DNase 活力测定 取 0.2 ml 匀浆液, 加入含有底物的试管内, 使反应液总体积为 3.2 ml, 内含 1 ml 0.05% 小牛胸腺 DNA (上海生物化学研究所东风试剂厂生产), 1 ml 40 mmol/L MgCl₂, 1 ml 4 mmol/L CaCl₂ (均溶解在 pH 6.0 Tris-HCl 缓冲液内)。摇匀后于 37℃ 水浴内保温 2 h。加入 0.15 ml 冷 70% HClO₄ 终止反应。样品在冰箱内放置 6—12 h, 沉淀过剩的 DNA。然后于 4℃ 以 14000 rpm/min 离心 40 min, 取上清, 用 M 750 UVIS-A 型微量紫外可见分光光度计于 260 nm 处测光吸收, 按前法计算酶活力单位^[9]。实验时各组均设有 3 个平行管及空白自溶对照管。后者系将细胞匀浆与反应底物分别于 37℃ 保温 2 h 后混合在一起, 以除去细胞匀浆中核苷酸及核酸酶水解核苷酸产物所引起的紫外吸收对测定细胞 DNase 活力的影响。

(6) 细胞匀浆 DNA 含量的测定 按郑秀龙改进的 Burton 法^[10]。

结 果

1. 不同浓度的 CM 对 H₂₂ 细胞 DNase 活力的影响

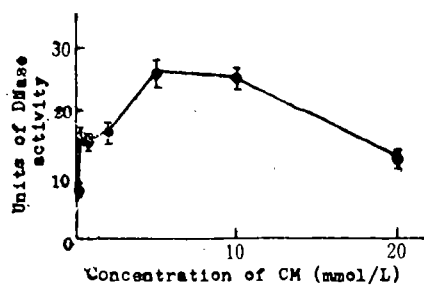


Fig 1. The effect of different concentrations of CM on DNase activity of H₂₂ cell ($\bar{x} \pm SD$, n=9)

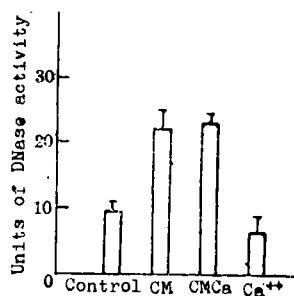


Fig 2. The effect of CM and its Ca²⁺ chelation composed On DNase activity of H₂₂ cell ($\bar{x} \pm SD$, n=9)

将不同浓度的 CM 分别与细胞在 37℃ 水浴内保温 1 h 后, 按上述方法测定细胞 DNase 活力。图 1 显示细胞经不同浓度 CM 作用后, 在 5 mmol/L 时酶活力增至最高, CM 浓度增加至 10 mmol/L 时, 酶活力不再增高, 两者与对照组相比均有非常显著差别 ($p < 0.01$)。将浓度再增加至 20 mmol/L 时, 对酶活力反而无影响, 与对照无明显差别 ($p > 0.05$)。上述结果表明, 在一定的浓度范围内, CM 对 H₂₂ 细胞 DNase 有激活作用, 且在 5 mmol/L 时对酶的激活作用最强。故以下实验均采用此浓度。

2. CM 与 Ca²⁺ 结合成 CMCa 后对 H₂₂ 细胞 DNase 的影响

将细胞分别与 5 mmol/L CM、CMCa 及 2.5 mmol/L Ca²⁺ (相当于 CMCa 中含 Ca²⁺ 量) 一起于 37℃ 水浴内保温 1 h, 测 DNase 活力。从图 2 可见, CM 与 Ca²⁺ 结合成 CMCa 后对 DNase 激活作用与 CM 无明显差别 ($p > 0.05$), 但与对照组相比差别非常显著 ($p < 0.01$), 而 Ca²⁺ 组与对照组相比无显著差别 ($p > 0.05$)。提示 CM 与 Ca²⁺ 结合后对 DNase 仍有激活作用。而 Ca²⁺ 对 H₂₂ 细胞 DNase 活力无明显影响。

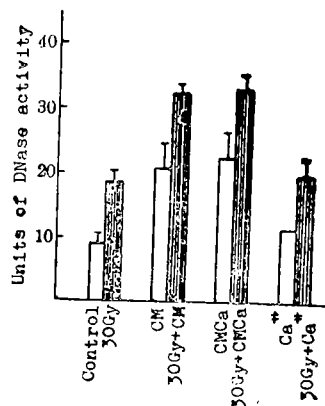


Fig 3. The effect of CM, CMCa and Ca²⁺ on DNase activity of irradiated H₂₂ cells ($\bar{x} \pm SD$, n=9)

3. CM, CMCa、Ca²⁺ 对受照 H₂₂ 细胞 DNase 的作用

为了进一步探讨 CM 及其与 Ca²⁺ 结合后对受照 H₂₂ 细胞 DNase 的作用, 将细胞分别与 5 mmol/L CM、CMCa、及 2.5 mmol/L Ca²⁺ 混匀, 于 37℃ 保温 1 h 后于 0℃ 水浴内照射 30 Gy, 立刻匀浆检测 DNase 活力。图 3 可见, 细胞受 30 Gy γ 线照射后 DNase 活力明显增高。与对照组相比, 有非常显著差异 ($p < 0.01$)。细胞经 CM、CMCa、及 Ca²⁺ 处理后再照射 30 Gy 后, DNase 活力均比相应对照 (即只经 CM、CMCa、Ca²⁺ 处理但不照射) 组高, 各组两者相差均非常显著 ($p < 0.01$)。

讨 论

在研究药物对 DNase 活力作用时, 由于药物中的钙离子易与 1640 培养液内某些成份结合发生沉淀而阻滞 CMCa 和 Ca²⁺ 进入细胞内, 影响对 DNase 活力作用的观察。若只用 5% 葡萄糖溶液, 则细胞活力受影响。经多次摸索, 选用将 5% 葡萄糖溶液与 1640 培养液按 9:1 (v/v) 配制的上述混合液培养细胞 1 h 效果较好, 台盼兰拒染活性变化不大, 不影响细胞活力。

图 1 结果表明, 在一定浓度范围内, CM 对 H₂₂ 细胞 DNase 有激活作用, 以 5 mmol/L 时激活作用最强, 5 mmol/L 以下随药物浓度的增加, 激活作用随之增加, 若再增加 CM 浓度至 10 mmol/L 时, 酶的激活作用则不再增加。若超过此浓度继续增至 20 mmol/L 时, 酶活力反而下降至空白对照水平。这种现象的出现, 是否由于 CM 浓度过高对细胞产生毒性作用, 为此, 用台盼兰拒染法观察了细胞拒染活性, 结果活细胞率均达 90% 以上。证明不是因为细胞毒所致, 推测, CM 对 H₂₂ 细胞 DNase 的激活作用也与一般酶的激活剂相似, 存在着浓度的依赖性。

为了便于比较 CM 及其与 Ca²⁺ 结合后以及对受照细胞 DNase 活力的影响, 本文又进一步将上述研究结果归纳列表如下:

Tab 1. Comparison of the influences of equal concentration of CM, CMCa, Ca²⁺ and γ -ray irradiated H₂₂ cells on the DNase activity. ($\bar{x} \pm SD, n=9$)

Treatment	Contrast	CM	CMCa	Ca ²⁺
Contrast (DNase Units)	8.85 $\pm$ 2.4	21.26 $\pm$ 3.6	21.97 $\pm$ 3.5	11.77 $\pm$ 2.7
P		<0.01	<0.01	>0.05
Radiation 30 Gy (DNase Units)	18.92 $\pm$ 3.0	32.27 $\pm$ 1.4	33.20 $\pm$ 2.8	21.21 $\pm$ 3.6
P		<0.01	<0.01	>0.05
Radiation/contrast (%)	113.8	262.00	275.0	139.0
P		>0.05*	<0.01**	

* CM 与 CMCa 比较, **CM 或 CMCa 与 Ca²⁺ 比较。

CM 及其与 Ca²⁺ 结合后, 均对 H₂₂ 细胞 DNase 有激活作用 (见图 2 和表 1), 而单纯钙离子对酶的活性影响不大, 与对照组相比无统计学差别。细胞经 30 Gy γ 线照射后即刻 DNase 活性增高, 与我们先前的研究结果一致^[9]。

由图 3 和表 1 可见, 单纯照射组及单纯加 CM、CMCa 组 DNase 活力均比加 Ca²⁺ 及未经任何处理的空白对照组高, 差异非常显著 ($p < 0.01$)。分别合并 30 Gy γ 线照射后, 除 Ca²⁺ 组 DNase 活性只达到照射组水平外, CM、CMCa 组均比相应对照组 (只经 CM、CMCa 处理不照射) 高, 两者差异非常显著。这表明细胞经 CM、CMCa 处理后合并 γ 线照射对增高 H₂₂ 细胞 DNase 活性有

协同作用。

已有实验证明, CMCa有浓集于肿瘤的作用^[2], 提高肿瘤细胞 DNA 辐射敏感性^[4,7], 以及抑制受辐射损伤 DNA 的慢修复和 DNA 聚合酶 β ^[4,8]。本研究结果又证明了 CM 与 CMCa 均能激活受照细胞 DNase 活性, 提高 DNA 断链重接后再断裂损伤的作用。这可能是辐射增敏药提高了肿瘤放射治疗效果的一个重要原因。

参 考 文 献

- [1] 郑秀龙, 杨立锡, 高建国, 朱宇翔, 赵 芳, 刘 楠, 辐射研究与辐射工艺学报, 4, 58 (1986)。
- [2] Yang Lixi and Zheng Xiulong, Journal of Medical Colleges of PLA, 2(3), 265 (1987)。
- [3] 杨立锡, 郑秀龙, 辐射研究与辐射工艺学报, 5, 33 (1987)。
- [4] 杨立锡, 郑秀龙, 生物化学与生物物理学报, 20, 202 (1988)。
- [5] 郑秀龙, 杨立锡, 朱宇翔, 高建国, 赵 芳, 刘 楠, 陈顶市, 第二军医大学学报, 7, 91 (1986)。
- [6] 孟祥顺, 郑秀龙, 朱宇翔, 赵 芳, 高建国, 辐射研究与辐射工艺学报, 5, 8 (1987)。
- [7] Zheng Xiulong, Yang Lixi and Meng Xiangshun, Radiat. Res., 1, 298 (1987)。
- [8] 蒋逸凤, 郑秀龙, 辐射研究与辐射工艺学报 8(3), 150 (1990)。
- [9] 赵 芳, 郑秀龙, 孟祥顺, 生物化学与生物物理学报, 22, 2 (1990)。
- [10] 郑秀龙, 吴德林, 刘巧年, 赵 芳, 第二军医大学学报, 2, 137 (1981)。

(稿件收到日期: 1989年10月4日)

STUDIES ON THE EFFECT OF A NEW RADIOSENSITIZER CM ON THE DNase ACTIVITY OF IRRADIATED HEPATIC TUMOR CELLS

Zhao Fang and Zheng Xiulong

(Second Military Medical University, Shanghai)

ABSTRACT The effects of a new radiosensitizing compound—metronidazolamic acid (CM) and its Ca^{+2} chelation compound (CMCa) on the DNase activity of mouse hepatic tumor (H_{22}) cells were observed. The effects of CM, CMCa or Ca^{+2} at same molarity and their combination with γ -rays irradiation on DNase activity of H_{22} cells were also observed respectively. The results showed that CM could activate the DNase activity to be increased as CM concentration increased below 5 mmol/L. The highest DNase activity was activated by CM at 5 mmol/L. The degree of activation between CM and CMCa had no significant difference ($p > 0.05$), whereas free Ca^{+2} alone had no effect. The activation of combined CM or CMCa and radiation groups were greater than that of each given independently (Fig. 3), they possessed a coordinate activation. However free Ca^{+2} still could not activate the DNase activity after γ -irradiation. From all the above results, it is suggested that CM or CMCa improved the tumor radiotherapeutic efficiency probable due to its activation the DNase activity of cancer cells which enhanced the DNA damage. It might be one of the radiosensitizing mechanism in tumor radiotherapy.

KEYWORDS Radiosensitizer, Metronidazolamic acid, H_{22} cells, DNase