

细胞谷胱甘肽含量与放射增敏研究

金一尊 丁立 严敏芬

(上海医科大学放射医学研究所 上海 200032)

摘要 谷胱甘肽(GSH)是一种内源性放射防护物质,在正常状况下大部分以还原型存在于细胞和组织中。本研究结果表明,通过外源性化学修饰剂丁胱亚磺酰亚胺(BSO),可有效地抑制细胞内GSH的生物合成,从而使内源性GSH含量下降,在1 mmol/L BSO作用后24 h,可使原有的GSH含量从 4.67684×10^{-12} mmol/cell下降至 0.05092×10^{-12} mmol/cell,为对照组的1.09%。BSO的抑制作用与其浓度和作用时间长短有关:0.1 mmol/L BSO作用2 h后,GSH含量为 2.63448×10^{-12} mmol/cell,而在作用48 h后,GSH含量为 0.09277×10^{-12} mmol/cell。即BSO在0.1 mmol/L浓度时,作用48 h后细胞内GSH下降为对照组的1.98%。细胞在GSH含量降低的情况下,进行电离辐射,通过对细胞放射增敏比(SER)的观察表明,GSH下降时SER值增大,说明减少GSH的含量,可增加细胞对射线的敏感性。这对放射生物学和临床放射肿瘤学的理论与实践均有一定意义。

关键词 谷胱甘肽, 丁胱亚磺酰亚胺, 放射敏感性

谷胱甘肽(Glutathione, GSH)是一种内源性的巯基化合物,存在于红细胞和其它组织内,在正常状况下大部分以还原型存在于机体内。它在细胞的生长、增殖和分化等方面都起着重要的作用^[1]。放射生物学的研究表明,GSH与细胞的放射敏感性有关。临床上发现脑胶质细胞瘤的放射治疗疗效较差,其原因之一是由于细胞内的GSH含量较高^[2]。为此本文对谷胱甘肽与细胞的放射敏感性关系进行报道,以期阐明两者之相关性,为肿瘤放射增敏治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞系

中国仓鼠V79-379 A细胞(英国MRC Radiobiology Unit提供),人视网膜母细胞瘤Y79细胞(美国哈佛大学医学院眼科室提供),SPC-A-1肝癌细胞,SGC-7901胃癌细胞,So-Rb 50人视网膜母细胞瘤(中山医科大学眼科中心)。

1.2 药品与试剂

丁胱亚磺酰亚胺(BSO)由本室合成,硫代水杨酸、三乙醇胺, β -NADPH、DTNB、谷胱甘肽还原酶、标准谷胱甘肽均由Sigma公司生产。

1.3 测定方法

采用改良的Tietze还原酶法^[3]和Griffith法^[4]进行GSH含量测定,所有样品均用三蒸水溶解,光密度(OD)测定用全扫描紫外UV-260分光光度计(日本岛津公司)。

BSO按实验所需的各种浓度,在实验前用新鲜培养液配制并过滤灭菌,加入含一定细胞数的

培养瓶内, 置 37℃ 的二氧化碳恒温培养箱内, 按实验设计的不同作用时间培养后取出, 胰酶消化后备用。

1.3.1 标准曲线的建立 用标准的谷胱甘肽制成 6 种不同浓度的测定液, 于 412 nm 波长进行 OD 值测定, 并作出 OD 值 ~ GSH 浓度标准曲线。

1.3.2 离体细胞内 GSH 含量测定 取传代后第 2 ~ 3 d 细胞, 消化后制成单细胞悬液, 并进行计数, 加 PBS 洗后, 离心, 弃上清液, 加蒸馏水及 12% 硫代水杨酸溶液, 高速离心。取上清液, 并加入测定体系液, 于 412 nm 波长处测定 OD 值, 求出各实验点的斜率, 并在标准曲线上找出相应的 GSH 浓度, 再用下列公式计算细胞内 GSH 量值。

$$[\text{GSH}](\text{mmol}/\text{cell}) = \frac{S \times 10^{-3}}{\text{细胞数}}$$

S 为标准曲线上查得的 GSH 值 (mmol/L)。放射增敏比 (SER) 测定方法见文献 [5]。

2 结 果

2.1 不同细胞系内 GSH 含量

实验结果表明, 不同的离体培养细胞系, 其内源性 GSH 含量不同, 如表 1 所列。

Tab 1. Intracellular GSH levels in different cell lines

Cell line	GSH/ 10^{-12} mmol cell $^{-1}$
V 79-379 A	4.67840 ± 1.12141
SPC-A-1	5.29209 ± 3.31538
SGC-7901	2.17677 ± 1.44193
Y-79	2.71260 ± 1.32720
So-Rb 50	1.39900 ± 0.15700

Tab 2. The levels of GSH in V 79-379 A cells exposed to different concentration of BSO for 24 h

BSO/mmol	GSH/ 10^{-12} mmol cell
1	0.05092 ± 0.23153
0.5	0.06453 ± 0.14419
0.1	0.09950 ± 0.12141
0.01	0.15838 ± 0.38141

从上述测定的五种哺乳动物和人的细胞内源性 GSH 含量中可以看到, 人视网膜母细胞瘤内 GSH 较低 (So-Rb 50 为中山医科大学眼科中心建立的人视网膜母细胞瘤的细胞株), 而人肝癌细胞 SPC-A-1 中含量较高, 两者相差 3.78 倍。此外, 同一类细胞 (人视网膜母细胞瘤细胞) 的不同

Tab 3. The GSH levels in V 79-379 A cells under the influence of BSO in different time

BSO/mmol/L	Time/h	GSH/ 10^{-12} mmol cell $^{-1}$
0.1	2	2.63448 ± 0.23950
0.1	4	1.36326 ± 0.23950
0.1	6	0.61806 ± 0.49671
0.1	10	0.28221 ± 0.41599
0.1	18	0.10880 ± 0.39517
0.1	24	0.10836 ± 0.30296
0.1	36	0.10007 ± 0.06576
0.1	48	0.09277 ± 0.23393
0.01	2	2.05639 ± 0.08381
0.01	4	1.71158 ± 0.38141
0.01	6	1.24449 ± 0.65359
0.01	10	0.55312 ± 0.80625
0.01	18	0.29030 ± 0.19482
0.01	24	0.14246 ± 0.50800

系(Y 79 和 So-Rb 50)它们之间的 GSH 亦有差别,前者比后者稍高(1.94 倍)。上述结果表明了各种细胞系之间 GSH 的含量有差异。

2.2 BSO 对细胞内 GSH 含量的影响

BSO 是一种 GSH 生物合成抑制剂,用不同浓度的 BSO、在不同的作用时间下,观察细胞内的 GSH 合成,以达到降低其内源性 GSH 的水平,表 2、3 和图 1 分别表明上述实验结果。

表 2 为 BSO 作用 24 h 时对细胞内源性 GSH 的影响,结果表明 GSH 的含量随着 BSO 作用浓度增加而下降,其中以 1 mmol/L BSO 引起细胞内 GSH 下降最多,为对照组 4.67840×10^{-12} mmol/cell 的 1.09%,说明细胞内源性 GSH 含量可用外源性药物进行有效的抑制。

表 3 的结果表明,引起内源性 GSH 合成抑制,不仅与药物剂量有关,而且与药物作用时间也有很大关系,0.1 mmol/L BSO 作用 2 h 后, GSH 为 2.63448×10^{-12} mmol/cell,在 48 h 作用后, GSH 为 0.09277×10^{-12} mmol/cell,即在 BSO 作用 48 h 后细胞内 GSH 下降为作用 2h 的 28.4 倍,相当于对照的 1.98%,因此认为 BSO 作用时间长,引起 GSH 下降程度也大。但是一般在作用 24 h 后,其下降量基本上趋向恒定。

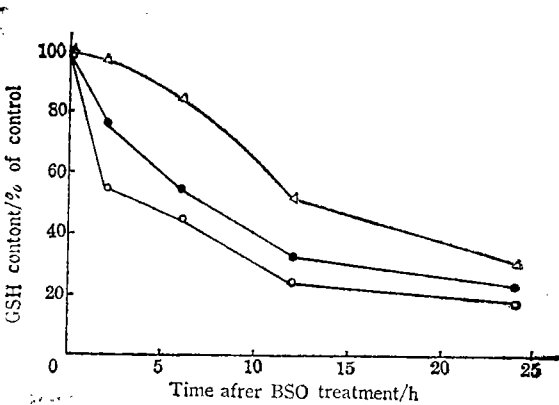


Fig 1. The effects of BSO on GSH levels in Y 79 cells
BSO (mmol/L): (Δ)0.01 (●)0.05 (○)0.1

图 1 为 BSO 在不同浓度(0.1、0.05 和 0.01 mmol/L)和不同作用时间(2、6、12 和 24 h)下,对人视网膜母细胞 Y 79 中 GSH 含量影响,这一结果进一步表明外源性 BSO 对 GSH 合成的抑制作用。

2.3 GSH 与放射敏感性

BSO 能有效地抑制细胞内 GSH 的合成,从而引起内源性 GSH 下降,用 BSO 进行细胞的放射增敏作用研究表明,其放射增敏效应与药物浓度有关(表 4、5),而药物浓度与 GSH 下降之间

Tab 4. The radiosensitization on V 79-379 A cells by BSO

BSO/mmol L ⁻¹	D ₀ /Gy		SER	
	Air	Hypoxic	Air	Hypoxic
0	1.60	3.90		
0.1		3.35		1.16
0.5	1.50	2.90	1.07	1.34
1.0	1.40	2.60	1.14	1.50

Tab 5. The radiosensitization on Y 79 cells by BSO

BSO/mmol L ⁻¹	D ₀		SER	
	Air	Hypoxic	Air	Hypoxic
0	0.83	2.51		
0.01	0.78	2.07	1.09	1.21
0.05	0.77	1.84	1.08	1.36

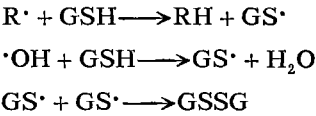
的关系，已在前面实验证实。故 GSH 含量下降可使细胞的放射敏感性增加，表现在放射增敏比 (Sensitization Enhancement Ratio, SER) 增加。表 4、5 分别表示 BSO 对中国仓鼠 V 79—379A 和人视网膜细胞瘤 Y 79 细胞的放射增敏作用。

上述两表表明，不论 V 79—379 A 细胞或 Y 79 细胞，它们的 SER 均随着 BSO 的浓度增加而增大，特别是在乏氧情况下的 SER 值的增加更加明显，说明由于 BSO 浓度增加而 GSH 下降更为显著。

3 讨 论

由于放射敏感性与细胞内物质代谢的变化、细胞分裂周期的改变、细胞外界环境的影响以及血液和神经体液调节等方面有着直接与间接关系^[6,7]，因此通过多种途径以提高原有细胞的放射敏感性，对于临床肿瘤放射治疗是十分有价值的措施。

本研究表明，GSH 与细胞放射敏感性密切相关，对 V 79—379 A 细胞而言，通过 0.5 mmol/L BSO 作用 24 h 后，其内源性 GSH 含量由原来的 4.67684 mmol/cell 下降至 0.06455 mmol/cell (为对照的 1.38%)，其 SER 为 1.34，说明它的放射敏感性增加；在 1 mmol/L BSO 作用 24 h 后，GSH 下降更甚，为 0.05092 mmol/cell，其 SER 也随之增加为 1.50。Y-79 细胞的研究也表示了相似的效果^[8]。这表明 GSH 与放射敏感性之间的关系是：GSH 含量高，其放射敏感性差；GSH 含量低，其放射敏感性强。原因是由于 GSH 本身是一种射线保防剂，它可使射线通过直接作用和间接作用在生物体内产生高活性的各种自由基，通过 GSH 作用后而淬灭。



其淬灭能力与 GSH 的量有一定的关系，因此在 GSH 含量下降的情况下，这种自由基的清除作用亦就减弱，促使损伤增加。通过外源性药物对内源性的 GSH 含量进行修饰，使肿瘤细胞在 GSH 降低的情况下进行照射，可使其放射敏感性增加，有希望在治疗中提高疗效。

参 考 文 献

1 Dorr R T, Liddil J D, Soble M J. Inverstigational New Drugs, 1986, 4: 305
2 Taghian A, Suit H, Phil D et al. Int. J. Radiat, Oncol. Biol, Phys., 1992, 23(1): 55
3 Tietze F. Anal, Biochem., 1969, 27: 502
4 Griffith O W. Enzymol., 1981, 77: 59
5 Stratford I J. In: Breccia A, et al cds. Radiosensitizers of Hypoxic cells. Amsterdam; Elsevier, 1979, 109
6 Mitchell J B and Russo A. Br. J. Cancer, 1987, Suppl VII, 55
7 Okada S. Radiosensitization Newsletter, 1986, 5(1): 5
8 X Yi, L Ding, Y Z Jin et al. Int. J. Radiat, Oncol, Biol, Phys., 1994, 29(2): 393

THE STUDY ON CELL GLUTATHIONE LEVELS AND RADIOSENSITIZATION

Jin Yizun Ding Li Yan Minfen

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

ABSTRACT The role of intracellular glutathione (GSH) in radiation protection has been noticed in recent years. In this study, we found that the level of intracellular glutathione and radiosensitization had a certain relationship. It was recognized that the higher GSH level, the lower radiosensitization. The GSH level in V 79-379 A, Y 79, SPC-A-1, SGC-7901 and So-Rb 50 cells were showed in this experiments by Tietze method. The GSH level which was depleted by BSO was assessed. The radiosensitization was determined by the standard colony formation assay *IN VITRO*. The results showed that SER (Sensitization Enhancement Ratio) for V 79-379 A cell was increased with GSH depletion. The SER for BSO 0.1, 0.5 and 1.0 mmol/L were 1.16, 1.34 and 1.50, respectively. Same results for Y 79 cells were also observed that the SER for BSO 0.01 and 0.05 mmol/L were 1.21 and 1.36 respectively. On the other hand, the exposure time of BSO also influenced GSH level and SER. These results suggested that the level of glutathione in cell and radiosensitization has a close relationship.

KEYWORDS Glutathione (GSH), Buthione sulfoximine (BSO), Radiosensitization