

新型吡啶类生物还原活性物 629 的细胞毒性和辐射增敏作用的研究

张江虹¹ 孔肇路¹ 郝福荣¹ 沈芝芬¹ 季华均¹ 童高顺¹ 胡卓汉² 金一尊¹

¹ (复旦大学放射医学研究所 上海 200032)

² (瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司 上海 201203)

摘要 研究丝裂霉素 C(Mitomycin C, MMC)的衍生物-新型吡啶类生物还原活性物 629 的细胞毒性和辐射增敏作用。采用四氮甲基唑蓝 (Methyl thiazolyl tetrazolium, MMT) 比色法研究 MMC 和 629 对 HepG2 细胞的细胞毒性以及 629 对肝原代细胞的细胞毒性, 结果表明 629 对肝原代细胞无毒性作用, 而其对 HepG2 肝癌细胞的毒性要高于其母体化合物 MMC; 此外, 采用体外细胞克隆培养法观察 MMC 和 629 对 HepG2 细胞的辐射增敏作用, 结果显示 629 的辐射增敏效果强于 MMC。上述研究提示, 629 具有低毒的增敏效果, 在临床上将具有广泛的应用远景。

关键词 生物还原活性物, 细胞毒性, 辐射增敏

中图分类号 Q91, Q291

乏氧细胞普遍存在于各种类型的实体肿瘤中, 其对射线和抗癌药物都有一定的抗性, 也是肿瘤复发的根源。由于乏氧细胞为肿瘤组织所特有, 也可成为抗癌药物研究的靶点。生物还原活性药物正是利用了乏氧细胞的酶系特点, 选择性地作用于乏氧的肿瘤细胞, 成为了兼有细胞毒性的新一代的肿瘤增敏药^[1,2]。

吡啶类生物还原活性药物的先导化合物丝裂霉素 C (Mitomycin C, MMC) 是属于脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid, DNA) 烷化剂的天然产物, 在乏氧条件下优先活化成细胞毒性物, 常与其它抗癌药物合用, 治疗胸与头颈部肿瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌和食管癌等^[3,4]。但其不足之处主要是乏氧选择性不够理想、毒副作用较强, 这限制了其更为广泛的使用。对 MMC 进行结构改造, 可获得新化合物、筛选出低毒高效的乏氧增敏药物, 如 RH1 (人参皂甙), 629 与 629AC 等。其中 629 系 5-(aziridin-1-yl)-3-hydroxymethyl-1-methylindole-4,7-dione 的简称, 是与本实验室合作的英国 Manchester 大学药学院 Stratford 教授近年设计合成的吡啶类化合物, 初步研究发现其乏氧细胞毒性较强。本文以 629 为研究对象, 研究其细胞毒性作用和辐射增敏作用, 旨在为其临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂

629, 暗红色粉末, MW 232, 由英国 Manchester 大学药学院 Stratford 教授友情赠送, 用二甲基亚砜 (Dimethyl sulphoxide, DMSO) 溶解, 再用培养液配成所需的浓度; MMC 购于 KYOWA 公司; 四氮甲基唑蓝 (Methyl thiazolyl tetrazolium, MTT); Sigma 进口分装, 用 pH 7.2 的 PBS 溶液配制成 5mg/mL 母液, 0.22 μ m 过滤器除菌, 4 $^{\circ}$ C 避光保存; 它莫西芬 (Tamoxifen)、二甲基亚砜 (Dimethyl sulphoxide, DMSO)、胰蛋白酶 (Trypsin) 均来自于 Sigma 公司; RPMI Medium 1640 培养液购于 GIBCO 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 细胞系及培养方法

人肝原代细胞, 瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司提供; 肝癌 HepG2 细胞为本所长期培养的成熟细胞系, 生长于含 10% 小牛血清的 1640 培养液中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养, 用 0.125% 胰酶消化传代, 取对数生长期细胞进行实验。

国家自然科学基金(30400089)资助

第一作者: 张江虹, 女, 1973 年 4 月出生, 1998 年毕业于山西医学院, 目前为复旦大学放射医学研究所在读博士, 讲师
通讯联系人: 金一尊

收稿日期: 初稿 2006-06-02, 修回 2006-08-07

1.3 照射

Gammacell-40 型 ¹³⁷Cs γ 射线照射装置，照射容积 7.5L，剂量率 0.8Gy/min。

1.4 629 对肝原代细胞的细胞毒性实验

将对数生长期后细胞用 EDTA 和胰蛋白酶消化，调节浓度至 1×10^4 细胞/mL，200 μ L/孔接种 96 孔板。24h 后换含不同浓度的 629 和 Tamoxifen，37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 2h，加入 MTT (5mg/mL) 20 μ L，37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 4h，然后吸弃培养液，加入 200 μ L DMSO，570nm 测吸光度值(OD 值)。629 设 0、0.1、1、10、100、1000 与 10000ng/mL 剂量组（该剂量组选择由预实验确定，预实验在 HepG2 细胞的剂量选择基础之上进行）。以 Tamoxifen 为阳性对照，设 0、6.25、12.5、25、50、100 与 200ng/mL 剂量组。

1.5 629 和 MMC 对肝癌 HepG2 细胞的细胞毒性实验

将对数生长期 HepG2 细胞用 EDTA 和胰蛋白酶消化，调节浓度至 1×10^4 细胞/mL，200 μ L/孔接种 96 孔板。24h 后换含不同浓度的 629 和 MMC，乏氧组通 99.99%氮气 30min，置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 4h，换不含药物的完全培养基培养 3d，隔天换液。实验结束前 4h 加入 MTT (5mg/mL) 20 μ L，37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 4h，然后吸弃培养液，加入 200 μ L DMSO，570nm 测吸光度值 (OD 值)。629 设 0、0.2、1.0、2.0、10、20、100 与 200ng/mL 剂量组。MMC 设 0、50、100、200、500、1000 与 5000ng/mL 剂量组。

1.6 629 和 MMC 的辐射增敏作用的离体实验

取对数生长期的 HepG2 细胞，胰酶消化，计数细胞数，逐级稀释后将一定量的细胞接种在培养瓶中，待细胞贴壁后，分别给予不同剂量的 629 和 MMC 处理，并分为有氧组和乏氧组，乏氧组通 99.99% 氮气 30min，然后给予不同剂量的照射，4h 后用 1640 完全培养液小心清洗 3 次，继续培养 2—3 周后收

获，用姬母萨染色，并进行克隆计数（计数>50 个细胞的集落）。629 和 MMC 的剂量选择依赖于其各自毒性试验所得的 IC₅₀，在各自 20% IC₅₀ 以下选用 3 个剂量组，629 为 0.02ng/mL、0.2ng/mL 与 2ng/mL，MMC 为 20ng/mL、2ng/mL 与 0.2ng/mL。照射剂量分别为 0、2、4、6、8 与 10Gy。全部实验点均同时设置 3 个平行样本并重复 3 次。

1.7 数据处理

1.7.1 细胞毒性数据处理 使用 GraphPad Prism 4.0 软件处理各组的 OD 值，获得各种情况下 629、MMC 和 Tamoxifen 的 IC₅₀，两组间差异采用 *t* 检验。

1.7.2 细胞存活曲线及各参数 将各组的克隆数输入 Radiomed 软件包计算细胞存活率，数据拟合模型为 $S=1-[1-\exp(-D_q/D_0)]^N$ ，作图求得 D_0 、 D_q 、 N 值，其中 D_0 为细胞存活曲线斜率的倒数， D_q 为剂量存活曲线的肩区， N 为外推值。再以下式计算氧增比 (OER) 和放射增敏比 (SER)。

OER = 乏氧状态下照射所得存活曲线的 D_0 / 有氧状态下照射所得存活曲线的 D_0 。

SER = 单纯乏氧状态下照射的对照组 D_0 / (增敏剂 + 乏氧状态下照射的实验组 D_0)。

2 结果

2.1 629 对肝原代细胞的细胞毒性

已知 Tamoxifen 具有原代细胞毒性，实验结果表明 Tamoxifen 对人原代肝细胞的细胞毒性 (IC₅₀) 为 58.44ng/mL，提示细胞毒性的测试方法可靠（见图 1 和表 1）。

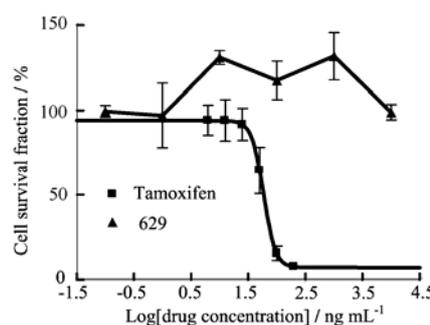


Fig.1 Cytotoxicity of 629 to hepatocyte

Table 1 IC₅₀ and HCR of 629, MMC and Tamoxifen in different condition (ng/mL)

Drug	Cell line	IC ₅₀ in air	IC ₅₀ in N ₂	HCR(air/N ₂)
629	HepG2	59.90 (44.23—81.12)	14.94 (12.77—17.47)	4.00
MMC	HepG2	394.9 (291.8—534.5)	161.9 (137.4—188.8)	2.44
629	Hepatocyte	—	—	—
Tamoxifen	Hepatocyte	58.44 (50.15—68.09)	—	—

图1和表1表明629在所有测试浓度对人原代肝细胞均无毒性作用,而对肝癌HepG2细胞却具有较强的细胞毒性,在有氧和乏氧条件下的 IC_{50} 分别达59.90ng/mL和14.94ng/mL。以上结果说明629对正常的肝脏细胞无不利影响,但对肝癌细胞的选择性较强,可有效杀伤肝癌细胞,且对肝癌细胞中的乏氧细胞的选择性更强,具有较好的应用前景。

2.2 629和MMC对肝癌HepG2细胞的细胞毒性

图2为不同浓度的629和MMC作用下的肝癌HepG2细胞的存活曲线,由图2和表1可以看出:在乏氧条件下,629和MMC对HepG2细胞的 IC_{50} 分别是14.94ng/mL和161.9ng/mL,比有氧条件下分别降低75% ($p<0.05$)和59% ($p<0.05$),乏氧毒性比(Hypoxic cytotoxicity ratio, HCR)分别为4.00和2.44,说明629和MMC均具有较强的乏氧选择性,在乏氧条件下对细胞的杀伤作用更强;比较629和MMC的细胞毒性,在有氧和乏氧条件下的629的 IC_{50} 分别比MMC降低85% ($p<0.05$)和91% ($p<0.05$),提示不论是在有氧情况下还是在乏氧情况下,629的细胞毒性均高于其母体化合物MMC,尤其是乏氧毒性。

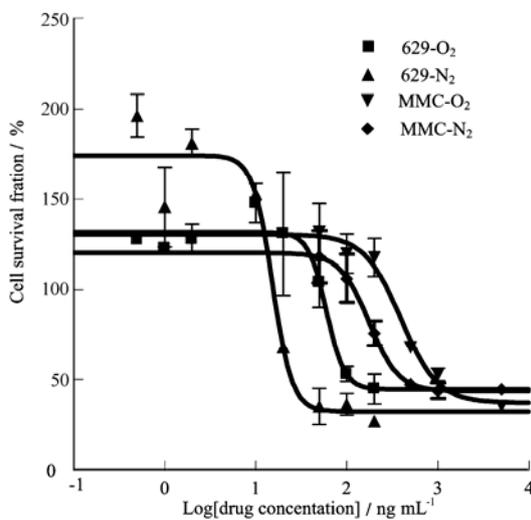


Fig.2 Survival curves of HepG2 cells with 629 and MMC under different conditions

Table 2 The parameters of cell survival curve of different groups of 629

Groups	D_0	D_q	N	SER/OER
In N_2	3.6809	3.8648	2.8575	
0.02ng / mL in N_2	3.1397	2.9972	2.5976	1.17
0.2ng / mL in N_2	2.3096	1.5888	1.9895	1.59
2ng / mL in N_2	1.9142	1.7946	2.5536	1.92
In air	1.4331	0.9723	1.9708	2.57

2.3 629和MMC的乏氧增敏作用

图3和图4是不同浓度629或MMC作用下且受不同剂量 γ 射线照射的HepG2细胞的存活曲线。629和MMC乏氧加药组的细胞存活率均低于单纯乏氧照射组,说明MMC及其衍生物629均能有效的提高射线对乏氧细胞的杀伤作用,且其杀伤作用明显随着药物浓度增加。表2和表3是由Radiomed拟合曲线得到的各参数值。对于加MMC组,乏氧加药组的 D_0 值明显低于乏氧照射组,给药组的SER值在1.14—1.72之间,可以看出MMC对HepG2细胞具有明显的放射增敏作用,且随着浓度的增加放射增敏作用增强,其 $C_{1.6}$ 为1.9254ng/mL;对于加629组,乏氧加药组的 D_0 值也明显低于乏氧照射组,给药组的SER值在1.17—1.92之间。可以看出629对HepG2细胞具有明显的放射增敏作用,且随着浓度的增加放射增敏作用增强,其 $C_{1.6}$ 为0.2047ng/mL。由上述可见629的乏氧辐射增敏毒性也强于其母体化合物MMC。

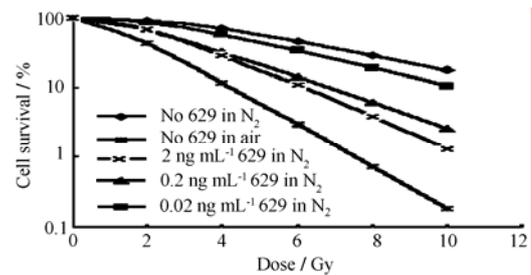


Fig.3 Survival curves of HepG2 cells with different amount of 629 after irradiation of different doses

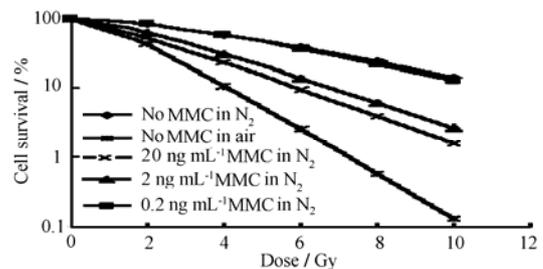


Fig.4 Survival curves of HepG2 cells with different amount of MMC after irradiation of different doses

Table 3 The parameters of cell survival curve of different groups of MMC

Groups	D_0	D_q	N	SER/OER
In N_2	3.8270	2.7707	2.0626	
0.2ng/mL in N_2	3.4940	2.8962	2.2908	1.10
2ng/mL in N_2	2.3593	1.3991	1.8094	1.62
20ng/mL in N_2	2.1955	0.8687	1.4854	1.74
In air	1.3592	1.0018	2.0898	2.82

3 讨论

乏氧是实体肿瘤的一个主要特征, 而氧对于固定射线对细胞的损伤至关重要。在低氧状态下受照射时, 细胞 DNA 中产生的自由基会从还原剂或防护剂中得到氢原子而被修复。因此, 处于这一区域的细胞对于射线的敏感性差^[1]。而生物还原活性物可在肿瘤乏氧细胞区还原转变成具有细胞毒性作用的代谢产物, 该代谢产物在乏氧和还原酶作用下经单电子还原成具有细胞毒的活性产物, 进一步与 DNA 等大分子反应, 通过抽氢氧化导致 DNA 链断裂以及交联损伤产生细胞毒作用, 另外该活性产物对氧敏感, 易被氧化逆变成原型药物, 因而对正常有氧细胞无毒性^[1]。MMC 已常用于治疗局限性膀胱癌、乳腺癌、头颈部癌、非小细胞肺癌、子宫癌、胃癌、胰腺癌等多种肿瘤^[5]。近年来, 对 MMC 体内代谢机制进行了深入的研究, 一般认为 MMC 作为乏氧增敏剂具有主要的两大不足: (1) 乏氧选择性不强。这主要与其抗肿瘤的作用机制有关, MMC 结构中的醌在还原酶的作用下形成氢醌化合物, 可与 DNA 发生交联, 造成细胞损伤; 此外其分子结构中有一个氮丙啶, 作为烷化剂在有氧的条件下能引起细胞损伤; 同时参与 MMC 代谢的主要还原酶-NAD(P)H 在有氧和乏氧条件下都发挥作用^[6], 这是 MMC 乏氧选择性弱的主要原因。(2) 毒副作用较强, 并可引起泌尿系统的损伤。以上因素限制了 MMC 的使用^[7]。629 为 MMC 结构改造而得的化合物, 本工作表明, 其对正常的肝脏细胞无细胞毒作用, 而对肝肿瘤细胞的毒性作用较大。其对 HepG2 细胞的毒性要远大于 MMC ($p < 0.05$), 尤其对乏氧的肿瘤细胞。

我们用离体的集落形成实验检测了 629 和 MMC 在乏氧条件下的辐射增敏作用, 进一步肯定上述特性。629 组和 MMC 组的 OER 值表明它们已

达乏氧条件; 由它们的 SER 值, 629 具有明显的乏氧照射增敏作用。629 的 $C_{1.6}$ 值为相同条件下 MMC 的 $C_{1.6}$ 值的 10.63%。 $C_{1.6}$ 是指增敏比达 1.6 时化合物的浓度。 $C_{1.6}$ 值是评价化合物增敏作用强度的指标, 可用于不同化合物辐射增敏作用或同一化合物对不同肿瘤组织、肿瘤细胞辐射作用的比较, $C_{1.6}$ 值越小增敏效应越大^[1]。总体而言, 新型吡啶类生物还原活性物 629 的细胞毒性和乏氧辐射增敏作用都强其母体化合物 MMC。

从不同类型的化合物中寻找新的高效低毒并具有多功能的增敏剂, 受到越来越多的重视。迄今为止, 对 MMC 的作用机制研究较多, 而 629 的作用机制及其代谢产物的研究尚未见报道。本实验结果表明, 吡啶类生物还原活性物 MMC 的衍生物 629 显示了其高效低毒的特性, 也为其在临床上应用提供了理论的依据。

参考文献

- 1 郑秀龙, 金一尊, 沈瑜. 肿瘤治疗增敏药(修订版). 上海: 上海科学技术文献出版社. 2000. 134-135
ZHENG Xiulong, JIN Yizun, SHEN Yu. Sensitizer for cancer therapy (Revision). Shanghai: Shanghai Reference Publisher of Science and Technology, 2000. 134-135
- 2 Sun Z S, Zhu Z. Drug Untoward Reaction Journal, 2000, (1): 6-14
- 3 Koya M P, Simon M A, Soloway M S, *et al.* J Urology, 2006, **179**(6): 2004-2010
- 4 Trumper M, Ross P J, Cunningham D, *et al.* European J Cancer, 2006, **42**(7): 827-834
- 5 Bradner W T. Cancer Treat Rev, 2001, **27**(1): 35-50
- 6 Jaffar M, Phillips R M, Williams K J, *et al.* Biochemical Pharm, 2003, **66**(7): 1199-1206
- 7 Ekelund S, Persson I, Larsson R, *et al.* Chemotherapy, 2002, **48**(4): 196-204

5-(aziridin-1-yl)-3-hydroxymethyl-1-methylindole-4,7-dione: Its cytotoxicity to HepG2 cells and the radiation sensitizing effect

ZHANG Jianghong¹ KONG Zhaolu¹ HAO Furong¹ SHEN Zhifen¹ JI Huajun¹
TONG Gaosun¹ HU Zhouhan² JIN Yizun¹

¹(Shanghai Institute of Radiation Medicine, Fudan university, Shanghai 200032)

²(Research institute for Liver Diseases (Shanghai) Co, Ltd, Shanghai 201203)

ABSTRACT The object of this work is to study the radiation sensitizing effect and cytotoxicity to HepG2 cells of a new tapy bioreduction activity-5-(aziridin-1-yl)-3-hydroxymethyl-1-methylindole-4,7-dione(629) in vitro. Cytotoxicity of 629 or MMC in vitro were evaluated in HepG2 cells or hepatocyte by MMT method under anaerobic and aerobic, in vitro radiosensitizing ability was estimated using Cells Cloning Technology. The results suggested that the cytotoxicity of 629 to HepG2 cells has significant enhanced ($p<0.05$) than MMC, and no significant cytotoxicity to hepatocyte; in addition, 629 has radiosensitizing effect in vitro on HepG2 cells and the SER value ranged from 1.17 to 1.92, it is showed that 629 have powerful radiosensitizing effect than MMC. The results indicated that 629 has radiosensitizing characteristic with high efficiency and low toxicity, and it is promising for clinic applications.

KEYWORDS Bioreduction activity, Cytotoxicity, Radiosensitizing

CLC Q691, Q291