

甲硝羟乙唑衍生物(CM)对离体乏氧 L₇₇₁₂细胞的辐射增敏作用

杨立锡 郑秀龙

(第二军医大学)

摘要 本文报道了用马血清代替小牛血清改进和建立了能用于检测 L₇₇₁₂ 细胞存活率的 ADC 法。并用此法研究证明了我们合成的甲硝羟乙唑衍生物(CM)对离体乏氧 L₇₇₁₂ 细胞有明显的辐射增敏作用, 其 SER 值为 2 左右, 较原化合物灭滴灵的 SER(1.2)约提高 67%。CM 对缺氧细胞存活率的抑制作用比有氧下强。与前文报道的 CM 对荷瘤小鼠 S₁₈₀ 缺氧下照射有辐射增敏作用及对鼠乏氧 S₁₈₀ 生长有抑制作用的结果一致。作者对台盼蓝染色法和 ADC 法检测细胞存活率作了比较。

关键词 CM; L₇₇₁₂ 细胞; 扩散盒; 存活曲线; SER。

前文报道了我组合成的甲硝羟乙唑衍生物(CM)是一种有效的乏氧细胞辐射增敏剂^[1,2]。本文进一步从细胞水平观察它的辐射增敏作用。

材料与 方法

1. 动物

本校动物所繁殖的昆明种小鼠; 体重 25~32 g, 雄雌皆有。615 小鼠(纯种), 雄性, 体重 18~22 g。

2. 细胞

采用上海医药工业研究院建株的腹水型淋巴性白血病 L₇₇₁₂ 细胞, 由 615 鼠移植传代, 接种后 5 天左右, 在无菌条件下抽取腹水供用。

3. 药物

本组合成的甲硝羟乙唑衍生物(简称 CM)。用酸碱法溶介 CM, 调节 pH 至 7.0 左右, 蒸馏水稀释至所需浓度, 经已消毒过的 4 号砂芯漏斗过滤后使用。

4. 照射条件

本校旋转式 ⁶⁰Co 源, 剂量率为 1.90~1.99 Gy/min, 距离为 80 cm。

5. 缺氧条件

纯度>99.99%的氮气(上海吴松化工厂产品), 经 1%硫酸铜溶液灭菌后, 通入特制的带内插管的试管, 压力 1~1.5 kg/cm², 流量 0.5 l/min, 通氮 30 分钟, 室温下照射。

6. 台盼蓝活染法

取 0.1 ml 细胞悬液, 加 0.1 ml 1% 台盼蓝试液, 在室温下染色 2~3 分钟; 立即涂片, 在光镜下计数 500 个细胞, 算出其中拒染细胞所占百分数, 即台盼蓝拒染率。

7. 体内扩散盒琼脂培养法(ADC)

按林万敏等^[3]所用的 ADC 法略加改进。

(1) 扩散盒 由我校自制的有机玻璃小盘, 内径 11 mm, 高 2 mm, 盘壁开一加液用的小孔。用对细胞无毒的曙光粘合剂将 0.3 μm 微孔薄膜(上海医工院生产)粘在盘的一侧, 经密闭检查合格者, 置 80℃烘箱中干热消毒 24~48 小时后备用。

(2) 含双抗培养液: 将 RPMI-1640 干粉(日本产品)10.4 g, 和 Hepe'S(N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸)缓冲粉 5.95 g (25 m Mol·dm⁻³), 分别用二次重蒸馏水溶解后混合, 加水至 960 ml, pH 为 6.0 左右, 经已消毒过的 EKS₂ 石棉板压滤(压力 1.5~2.0 kg/cm²)除菌, 分装, 置 4℃冰箱保存, 使用时用 5%NaHCO₃ 调节 pH 至 7.0~7.2, 每毫升加青、链霉素各 100 单位, 即成含双抗的培养液(简称 1640 培养液)。

(3) 马血清 未灭活的健康马血清(上海生物制品研究所提供), 不加防腐剂, 经无菌压滤, 分装后, 保存在 -20℃冰箱备用。

(4) 3%琼脂 临用前称 0.15 g 琼脂(日本产品), 加二次重蒸馏水 5 ml, 煮沸 10 分钟, 即用。

(5) 集落培养 采用 1640 培养液内含 20% 马血清、0.3% 琼脂和 L₇₇₁₂ 细胞 0.9~6.3 × 10⁴ 个/ml, 混匀后, 于每只扩散盒内注入 0.2 ml, 细胞数为 1.8~12.6 × 10³ 个/盒, 石蜡封口, 植入经乙醚麻醉的小白鼠腹腔内, 5 天后活杀小鼠, 取出扩散盒, 揭开滤膜, 取出琼脂块, 置载玻片上, 用甲醇初步固定并将琼脂块压成薄膜, 经 10% 甲醛溶液固定数小时后, 晾干, 作 HE 染色, 二甲苯透明, 树脂胶封片后, 在低倍镜下计细胞集落数, 按标准被计数集落所含的细胞数应不少于 50 个。细胞集落形成效率等于生成的集落数除以接种的细胞数。细胞存活率等于处理组集落数除以对照组集落数。

结 果

1. L₇₇₁₂ 细胞集落形成效率

已有实验证明 L₇₇₁₂ 细胞能在昆明种小鼠腹腔中生长形成集落^[3]。但由于我们所用的培养液等实验条件不同, 可能会影响集落形成效率。为了在本实验条件下选择合适的细胞接种量和恒定计数集落的标准方法, 我们在扩散盒内植入 0.4~12.6 × 10³ 个细胞/盒, 观察其集落形成率如图 1。结果显示: 随植入细胞数的增加所形成集落数亦增加, 两者呈正相关。回归方程为

$\hat{Y} = 0.3736 + 0.0376 X$, 相关系数 r 为 0.9999 ($p < 0.01$), 细胞集落形成效率为回归系数等于 0.0376; 表明在本实验条件下采用 ADC 法是比较稳定的, 在实验中接种细胞量应在 1.6~12.6 × 10³ 个细胞/盒范围内。

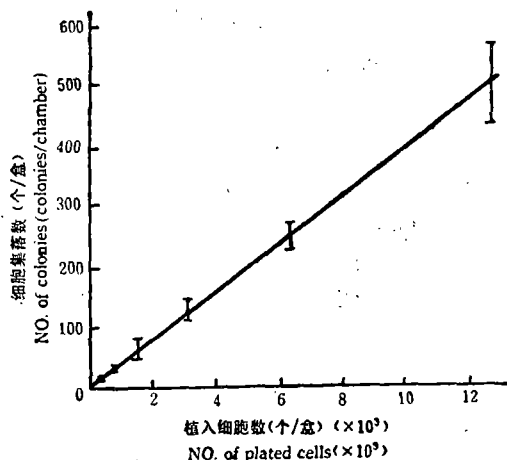


图 1 L₇₇₁₂ 细胞集落形成效率曲线

Fig. 1 Efficiency Curve of L₇₇₁₂ cell Colony-forming

2. CM 与通氮对 L₇₇₁₂ 细胞台盼蓝拒染活性的影响

通常认为台盼蓝拒染细胞属于活细胞。为了查明在本实验条件下 CM 和通氮对细胞拒染活性有否影响, 我们观察了细胞悬液与不同浓度 CM 于 37℃ 共同孵育或单纯通氮不同时间后对细胞拒染活性的影响。由表 1 可见: CM 在 37 m Mol·dm⁻³ 以下及孵育 24 小时以内对细胞拒染活性影响不大; 若延长孵育时间, 则拒染活力略有下降。表 2 表明通氮 50 分钟以内对细胞拒染活性基本没有影响。说明 CM

表 1 不同浓度 CM 与细胞孵育不同时间后对细胞拒染活性的影响($\bar{x} \pm SD\%$)*Table 1 Effect of various concentrations CM on L₇₇₁₂ cell refusing staining activity after the incubation with L₇₇₁₂ cells for various periods($\bar{x} \pm SD\%$).*

CM(mMol·dm ⁻³)	0	10	20	25	32	37
4 小时 hours	97.95±1.00	98.28±0.05	100.00±0.03	88.56±1.28	95.37±0.90	86.77±1.15
17 小时 hours	94.02±0.41	89.94±1.31	90.54±0.16	89.33±0.02	84.84±0.04	82.51±1.10
24 小时 hours	91.23±0.01	96.88±0.24	96.74±0.21	89.83±0.38	84.21±1.01	90.90±0.08

* Each experiment was triplicated.

表 2 通氮对 L₇₇₁₂ 细胞拒染活性的影响($\bar{x} \pm SD\%$)*Table 2 Effect of exposure to nitrogen for different time on L₇₇₁₂ cell refusing staining activity ($\bar{x} \pm SD\%$).*

通氮时间(分)	0	10	20	30	40	50
台盼蓝拒染率(%)	98.25±1.55	97.61±0.67	98.14±0.04	100.00±1.00	96.08±0.62	96.08±1.32

*Each experiment was triplicated.

和通氮不会引起细胞立即死亡(代谢死亡)。已有实验证明通氮 10 分钟后培养液内含氧量低于 100 ppm^[4], 因此, 在观察 CM 对细胞辐射增敏作用时, 将细胞悬液通氮 30 分钟可获得所需的缺氧条件。

3. 有氧(空气)与缺氧(N₂)下 CM 对 L₇₇₁₂ 细胞存活率的影响

实验中发现用台盼兰染色法与 ADC 法所测的细胞活力不一致。为了避免 CM 在本实验条件下对细胞的存活率可能产生的影响, 我们又观察了 CM 在有氧与缺氧下对细胞存活率的影响, 以便找到合适的 CM 浓度进行 L₇₇₁₂ 细胞辐射增敏的观察。实验是在 L₇₇₁₂ 细胞悬液中加入不同浓度的 CM 后, 分别在有氧(空气)或缺氧(通 N₂ 30 分钟)条件下观察了 CM 对细胞存活率的影响。图 2 表明: 在二种条件下 CM 均对细胞存活率有抑制作用; 都随 CM 浓度的增加而迅速下降, 且在缺氧下的抑制作用比有氧下强, 为能观察到 CM 的辐射增敏效应而又对细胞毒性不大, 故在以后的实验中使用 CM 的浓度均在 0.5 mMol·dm⁻³ 以下。

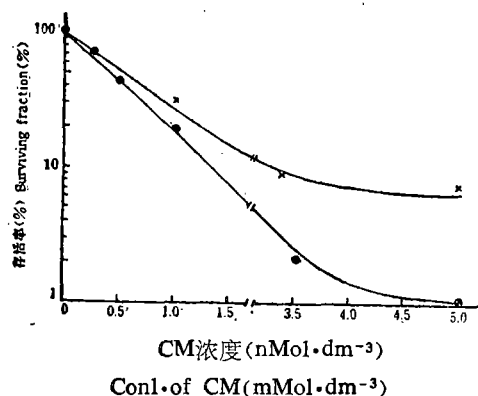
图 2 CM 对有氧(空气)或缺氧(N₂) L₇₇₁₂ 细胞存活率的影响 (×) 空气; (●) N₂

Fig. 2 Effects of CM on surviving fraction of L₇₇₁₂ cells under anoxic(N₂) or aerobic(air) conditions. (×) air; (●) N₂. Each point represents 9~13 mice.

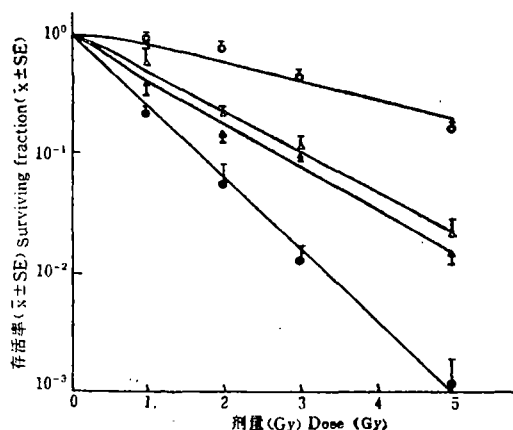
图 3 CM 对有氧(空气)或缺氧(N₂)照射后 L₇₇₁₂ 细胞存活率的影响; (○) N₂; (△) N₂ + 0.25 mMol·dm⁻³ CM; (▲) N₂ + 0.5 mMol·dm⁻³ CM; (●) 空气

Fig. 3 Effects of CM on surviving fraction of L₇₇₁₂ cells after radiation under aerobic(air) or anoxic(nitrogen) Conditions (○) N₂; (△) N₂ + 0.25 mMol·dm⁻³ CM; (▲) N₂ + 0.5 mMol·dm⁻³ CM; (●) air. Each point represents 9~13 mice.

4. CM 对缺氧照射后 L_{7712} 细胞存活率的影响

细胞悬液或含 0.25 或 $0.5 \text{ m Mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CM 的细胞悬液于室温下通 N_2 30 分钟,或在空气下的细胞悬液,分别于室温下照射 $0 \sim 5 \text{ Gy}$,用 ADC 法观察生成集落数的变化。每个实验点重复 3 次,每次 6 只小鼠。从图 3 辐射敏化效应曲线斜率的陡峭部份可见细胞在有氧或缺氧下照射后,细胞存活率均随照射剂量($0 \sim 5 \text{ Gy}$)的增加而呈线性下降;且在同一剂量下,有氧照射对细胞存活率的抑制作用较相应缺氧下强。前者直线方程为: $\ln \hat{Y} = -0.1904 - 1.3405 D$; $D_0 = -0.1421 \text{ Gy}$; $r = -0.9977$; 后者为: $\ln \hat{Y} = 0.2088 - 0.3914 D$; $D_0 = 0.5351 \text{ Gy}$; $r = -0.9736$; 两条直线斜率之比即氧增强比(OER)为 3.4, 结果与文献报道的 OER(3.0)^[5] 左右相近。表明本实验中所用的缺氧条件是适宜的。

但 CM 可使缺氧下照射后细胞存活率明显下降(图 3),其剂量效应曲线较为陡峭。 $0.25 \text{ mMol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CM 时的线性方程为: $\ln \hat{Y} = 0.0796 - 0.7975 D$, $r = -0.9979$; $0.5 \text{ mMol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CM 时的线性方程为: $\ln \hat{Y} = -0.1096 - 0.8383 D$, $r = -0.9947$; 在 CM 的作用下其 D_0 值由单纯缺氧照射后的 2.55 Gy 下降至 $1.25 \sim 1.19 \text{ Gy}$ (表 3),说明 CM 对缺氧照射后细胞存活率有明显的抑制作用。其增敏比(SER) = $\frac{D_0(N_2)}{D_0(N_2 + \text{CM})} = 2.04 \sim 2.14$, 即同在缺氧条件下 CM 处理后细胞存活率下降量是处理前的 $2.04 \sim 2.14$ 倍。结果表明: CM 对缺氧 L_{7712} 细胞有明显的辐射增敏作用,其增敏强度随药物浓度的增加而增加,但仍低于氧的辐射增敏效应。只有氧效应的 $43 \sim 47\%$ (表 3),从表 3 还可见, CM 能使缺氧照射后的 D_0 值从 0.54 Gy 降至 -0.13 Gy , 说明 CM 有抑制细胞的修复功能。

表 3 CM 对缺氧 L_{7712} 细胞辐射敏化的效应
Table 3 Efficiency of the radiosensitization of CM on anoxic L_{7712} cells

条 件 condition	CM ($\text{m Mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)	$D_0(\text{Gy})$	$D_q(\text{Gy})$	SER	P 值	RSE(%) [*]
空气 air	无	0.75	-0.14	3.52	<0.01	100
氮气 nitrogen	无	2.55	0.54	—	—	—
氮气 nitrogen	0.25	1.25	0.09	2.04	<0.01	42.79
氮气 nitrogen	0.50	1.19	-0.13	2.14	<0.01	47.09

* Relative Sensitizing Efficiency (RSE) = $[(\text{ER} - 1)/(\text{OER} - 1)] \times 100\%$ ^[6]

讨 论

体内扩散盒琼脂培养法最早用于造血干细胞的培养检测。1981 年林万敏等^[3]将此法应用于白血病 L_{7712} 细胞的培养,其所采用的培养条件为 199 培养液和小牛血清,本文则采用含 Hepe's 的 1640 培养液和马血清。图 1 表明:在我们改进后的实验条件下在一定范围内植入细胞数与生成集落数间有很好的线性关系($p < 0.01$)。并提示如果能严格控制植入细胞量($1.6 \sim 12.6 \times 10^3$ 个细胞/盒)和细胞集落计数标准,则采用本实验方法研究药物的辐射增敏效应是可靠的,且用马血清具有价廉易得的优点。

关于细胞活力的检测,有用台盼蓝拒染活性,也有用细胞存活率来表示,我们应用这二种方法比较了 CM 对细胞活力的影响,发现 CM 用量达 $37 \text{ mMol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 对细胞拒染活性影响不大(表 1),而用 ADC 法,则只用 $5 \text{ mMol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 即对细胞存活率明显抑制(图 2),两者结果不一致。我们认为用 ADC 法所检出的细胞与台盼蓝活染法检出的细胞不同,前者代表分裂死亡细胞,而后者代

表立即(或代谢)死亡的细胞,故在测定分裂细胞的存活率时应选用细胞集落培养法较好。

CM 对缺氧细胞照射有明显的辐射增敏作用;其增敏比为 2 左右(表 3),说明我们改造合成的 CM 能把肿瘤中对射线有抗性的乏氧细胞杀伤率提高 2 倍,且比原化合物灭滴灵(SER = 1.2)^[7]增加约 67%,与前文报道的 CM 对 S₁₈₀ 有辐射增敏和抑制肿瘤生长作用的结果相符。另外,CM 无论在空气或氮气下都能抑制 L₇₇₁₂ 细胞的存活率(图 2),这可能与 CM 本身有抑制 DNA 合成作用有关(结果将另文发表)。

在工作中得到张明华付教授、陈顶市讲师、倪亦俊、薛峰等同志的大力帮助和热情指导,谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] 郑秀龙,杨立锡,朱宇翱,高建国,赵芳,刘楠,第二军医大学学报,7(2),91 (1986),
- [2] 杨立锡,郑秀龙,高建国,朱宇翱,刘楠,第二军医大学学报,7(1),17 (1986),
- [3] 林万敏,马承武,罗祖玉,辐射研究与辐射工艺学报,1(1),74 (1981),
- [4] 刘楠,郑秀龙,中国药理学报,6(3),209 (1985),
- [5] G. E. Adams, (A. Breccia, C. Rimondi, and G. E. Adams eds) "Radiosensitizers of Hypoxic cells", pp. 16, Elsevier/North-Holland biomedical press, Amsterdam. New York. Oxford (1979),
- [6] J. Denekamp, B. D. Michael and S. R. Harris, Radiat. Res. 60, 119, (1974),
- [7] J. C. Asquith, J. L. Foster, R. L. Willson, Brit. J. Radiol. 47, 474, (1974).

(收到日期 1986 年 1 月 6 日)

RADIOSENSITIZATION OF HYPOXIC L₇₇₁₂ CELLS BY METRONIDAZOLE DERIVATIVE (CM)

Yang Lixi Zheng Xiulong (S. L. Cheng)

Second Military Medical College (Shanghai)

ABSTRACT The modified ADC method which can be used in measuring the survival fraction of L₇₇₁₂ cells was established using horse serum instead of calf serum. It demonstrated the obvious radiosensitizing effect of metronidazole derivative (CM) on in vitro hypoxic L₇₇₁₂ cells. Its SER was about 2, and was about 67 percent higher than SER (1.2) of the original compound, metronidazole. CM was found to be stronger under hypoxic condition than under aerated condition in the inhibition of cell survival fraction. It was consistent with the results of the preceding paper that CM showed a strong ability to sensitize sarcoma 180 to radiation and to inhibit the growth of sarcoma 180 under hypoxic condition. Using trypan blue staining method and the ADC method to observe cell survival were compared.

KEY WORDS CM; L₇₇₁₂ cells; diffusion chamber; survival curve; SER.