

9401 对 H22 肝癌小鼠放射增敏效应的研究

刘晓秋 王芹 周则卫 韩英 王德芝 沈秀

【摘要】 目的 探讨 9401 对 H22 肝癌小鼠的放射增敏作用。方法 建立 H22 肝癌小鼠模型,按照给药和照射的不同,分为空白对照组、单纯照射组、烟酰胺联合照射组、9401 高剂量联合照射组、9401 中剂量联合照射组和 9401 低剂量联合照射组。照射后观察 H22 肝癌小鼠的肿瘤生长情况、记录肿瘤照射后的生长时间,并计算肿瘤生长的延迟时间和各组的放射增敏系数。照射后 28 d 处死小鼠,剥瘤称重,计算抑瘤率。**结果** 9401 高、中、低各剂量联合照射组均能延缓肿瘤生长,其中 9401 高、中剂量联合照射组与烟酰胺联合照射组相比,差异有统计学意义 ($t=24.7$ 和 7.5 , P 均 <0.01),且 9401 高、中剂量组辐射敏感性均显著增高,增敏系数分别为 2.13、1.73,明显高于烟酰胺联合照射组的增敏系数 1.61,差异有统计学意义 ($t=2.26$ 和 9.04 , P 均 <0.05); 9401 高、中、低各剂量联合照射组的抑瘤率分别为 64.5%、50.9%、42.6%,烟酰胺联合照射组的抑瘤率为 53.2%,9401 高剂量组抑瘤效果显著高于烟酰胺联合照射组,差异有统计学意义 ($t=2.8$, $P < 0.05$)。9401 高、中、低各剂量组与单纯照射组相比,抑瘤率差异有统计学意义 ($t=5.7$, 4.0 和 2.2 , P 均 <0.05)。**结论** 9401 对 H22 肝癌小鼠肿瘤生长有明显的抑制作用,抑制肿瘤作用随给药剂量的增加而逐步增强,放射增敏效果显著,临床应用前景广阔。

【关键词】 肝肿瘤; 辐射增敏剂; 剂量效应关系; 药物; 模型; 动物; 小鼠

Radiosensitizing effects of 9401 on mice bearing H22 hepatoma LIU Xiao-qiu, WANG Qin, ZHOU Ze-wei, HAN Ying, WANG De-zhi, SHEN Xiu. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China
Corresponding author: SHEN Xiu, Email: shenxiu168@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the radiosensitizing effects of 9401 on mice bearing H22 hepatoma. **Methods** Mouse model bearing H22 hepatoma cells were established. Mice were randomly divided into six groups, the control group, the radiation group and four treatment groups including 9401 at high, medium and low dosages and nicotinamide combined with radiation. After irradiated, the growth of tumor was observed, the time of tumor growth was recorded, the delay time of tumor growth and enhancement factor (EF) were calculated. After 28 days, the mice were killed, the tumors were stripped and inhibition rate was calculated. **Results** Groups of 9401 combined with radiation could postpone tumor growth. The difference was statistically significant between 9401 groups at high, medium dosages combined with radiation and nicotinamide combined with radiation group ($t=24.7$ and 7.5 , both $P < 0.01$). Compared with radiation alone group, groups of 9401 combined with radiation had significant radiosensitizing effect. The enhancement factor of 9401 combined with radiation groups at high and medium dosages were 2.13 and 1.73 respectively, they were significant higher than nicotinamide combined with radiation group ($t=2.26$ and 9.04 , both $P < 0.05$). The inhibition rate of 9401 groups at high, medium and low dosages combined with radiation were 64.5%, 50.9% and 42.6% respectively. The inhibition rate of nicotinamide group combined radiation was 53.2%. The inhibition rate of 9401 at high dosage combined with radiation had significant difference with nicotinamide combined radiation ($t=2.8$, $P < 0.05$). Nicotinamide combined with radiation group, 9401 combined with radiation groups could significant inhibit the growth of tumors compared with radiation alone

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.01.004

基金项目: 天津市科技计划项目(09ZCKFSH01500)

作者单位: 300192, 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市
分子核医学重点实验室

通信作者: 沈秀 (Email: shenxiu168@yahoo.com.cn)

group ($t=5.7, 4.0$ and 2.2 , all $P<0.05$). **Conclusion** 9401 can inhibit the tumor growth and the inhibition effect increases gradually with the drug dose increasing. It also has radiosensitizing effects on mice bearing H22 hepatoma and present broadly clinical practice prospect.

【Key words】 Hepatoma; Radiation-sensitizing agents; Dose-response relationship, drug; Model, animal; Mice

新药 9401 是以烟酰胺为母体化合物合成的烟酰胺氨基酸类化合物, 是中国医学科学院放射医学研究所自行设计、合成、研制的国家一类创新药物。该药物具有毒性低, 辐射增敏效果明显等特点。体外实验结果表明, 9401 辐射增敏效果比目前临床试用的母体化合物烟酰胺好, 且毒性低^[1], 是目前很有希望成为肿瘤放疗高效、低毒而有实用前景的放射增敏剂。本研究以荷 H22 肝癌小鼠为实验对象, 探讨 9401 对延缓肿瘤生长时间和抑制肿瘤生长的作用及在体内的放射增敏作用。

1 材料与方法

1.1 动物和瘤株

健康昆明种小鼠 60 只, 雌雄各半, 体质量 18~22 g, 6~8 周龄, 由天津实验动物中心提供。小鼠 H22 肝癌瘤株由天津医药研究所提供。

1.2 药物

9401 由我所药物室合成, 白色粉状晶体, 纯度大于 99%, 熔点 182~191 °C, 分子质量为 133.11^[2]。烟酰胺由我所药物室提供。

1.3 动物模型的建立

无菌条件下, 抽取接种 7 d 的传代 H22 肝癌小鼠腹水, 用生理盐水稀释细胞悬液。用血细胞计数板计数肿瘤细胞, 浓度为 1.6×10^7 个/ml, 接种于小鼠右后脚皮下, 每只接种 0.05 ml。

1.4 分组与处理

小鼠接种 8 d 后, 将小鼠按照肿瘤大小随机分为 6 组: 空白对照组、单纯照射组、烟酰胺联合照射组 (1000 mg/kg)、9401 高剂量 (1000 mg/kg) 联合照射组、9401 中剂量 (500 mg/kg) 联合照射组、9401 低剂量 (250 mg/kg) 联合照射组, 每组 8 只, 雌雄各半, 在无特定病原体级动物实验室饲养。给药方法: 空白对照组: 腹腔注射生理盐水, 0.25 ml/只, 不照射; 单纯照射组: 腹腔注射生理盐水, 0.25 ml/只, 进行照射; 烟酰胺 (1000 mg/kg) 联合照射组: 腹腔注射烟酰胺生理盐水溶液, 0.25 ml/

只, 进行照射; 9401 高、中、低剂量联合照射组腹腔分别注射 9401 生理盐水溶液, 0.25 ml/只, 进行照射。

1.5 照射条件和照射方法

¹³⁷Cs γ 射线照射源由加拿大原子能有限公司提供, 照射剂量率为 0.78 Gy/min。

给药后 30 min 于清醒状态下进行照射, 照射剂量为 5 Gy^[3]。每次照射 4 只小鼠。照射时将小鼠固定, 将接种肿瘤的小鼠后脚掌暴露于照射野中, 非照射部位用铅砖屏蔽。

1.6 观察指标

照射后观察实验小鼠的进食、活动、体质量增长情况; 每隔 1 d 测量肿瘤的长、宽、高; 照射 28 d 后处死小鼠, 剥取肿瘤称重。计算抑瘤率、肿瘤生长的延缓时间 (tumor grow delay time, TGD)、辐射增敏系数。其中, 抑瘤率 = $(1 - \text{给药组平均瘤重} / \text{空白组平均瘤重}) \times 100\%$; TGD: 肿瘤体积生长至照射前 3 倍所需时间为 3 倍倍增时间, 不同实验组与空白对照组的 3 倍倍增时间之差为 TGD; 辐射增敏系数 = $\text{给药照射组 TGD} / \text{单纯照射组 TGD}$, 辐射增敏系数 > 1 表示有辐射增敏效应^[4]。

1.7 统计学处理

采用 SPSS15.0 软件进行统计学分析。肿瘤生长天数、肿瘤瘤重等计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 9401 对 H22 肝癌小鼠肿瘤的辐射增敏作用

各组肿瘤生长的延缓时间和辐射增敏系数见表 1。结果表明, 9401 高、中、低各剂量联合照射组均能延缓肿瘤生长, 与单纯照射组相比, 差异有统计学意义 ($t=40.1, 26.0$ 和 $9.7, P$ 均 < 0.01); 9401 高、中剂量联合照射组与烟酰胺联合照射组相比, 肿瘤生长延缓时间差异有统计学意义 ($t=24.7$ 和 $7.5, P$ 均 < 0.01); 且 9401 高、中剂量组辐射敏感性均显著增高, 增敏系数分别为 2.13、1.73, 明显

高于烟酰胺联合照射组的增敏系数 1.61, 差异有统计学意义($t=2.26$ 和 9.04 , P 均 <0.05); 9401 低剂量联合照射组的增敏效果低于烟酰胺联合照射组, 差异有统计学意义($t=18.6$, $P<0.01$)。

表 1 各组 H22 肝癌小鼠肿瘤生长的延缓时间和辐射增敏系数

组别	只数	肿瘤生长天数($\bar{x}\pm s$, d)	肿瘤生长的延缓天数(d)	辐射增敏系数
空白对照组	8	7.5±0.75	-	-
单纯照射组	8	15.4±0.73	8.9	-
烟酰胺联合照射组	8	21.8±0.19	14.3	1.61
9401 低剂量联合照射组	8	18.4±0.48	10.9	1.22
9401 中剂量联合照射组	8	22.9±0.36	15.4	1.73
9401 高剂量联合照射组	8	26.5±0.25	19.0	2.13

注: 表中, “-”表示无数据。

2.2 9401 对 H22 肝癌小鼠肿瘤生长的抑制作用

9401 高、中、低各剂量联合照射组均能抑制肿瘤生长, 抑制肿瘤作用随给药剂量的增加而逐渐增强。9401 高、中、低各剂量联合照射组的抑瘤率分别为 64.5%、50.9%、42.6%, 烟酰胺联合照射组的抑瘤率为 53.2%, 9401 高剂量联合照射组抑瘤效果显著高于烟酰胺联合照射组, 差异有统计学意义 ($t=2.8$, $P<0.05$)。9401 高、中、低各剂量联合照射组与单纯照射组比较, 差异有统计学意义 ($t=5.7$, 4.0 和 2.2 , P 均 <0.05)(表 2)。

表 2 各组 H22 肝癌小鼠肿瘤重及抑瘤率

组别	只数	瘤重($\bar{x}\pm s$, g)	抑瘤质量($\bar{x}\pm s$, g)	抑瘤率(%)
空白对照组	8	1.044±0.209	-	-
单纯照射组	8	0.740±0.108	0.304±0.101	29.1
烟酰胺联合照射组	8	0.489±0.136	0.555±0.073	53.2
9401 低剂量联合照射组	8	0.599±0.141	0.445±0.068	42.6
9401 中剂量联合照射组	8	0.513±0.117	0.531±0.092	50.9
9401 高剂量联合照射组	8	0.371±0.149	0.673±0.060	64.5

注: 表中, “-”表示无数据。

3 讨论

9401 是以烟酰胺为母体化合物合成的烟酰氨基

酸类化合物, 烟酰胺是一种低毒的放射增敏剂^[5-6], 其增敏机制是通过增加血流灌注, 增加乏氧肿瘤细胞的氧合作用和乏氧肿瘤组织氧分压而起作用的^[7-8]。将其与卡波金(Carbogen, 即 95%O₂+5%CO₂ 的混合气体)合并用于荷瘤小鼠分剂量照射下肿瘤放疗研究, 结果证明, 二者合并应用是有效的低毒或无毒的放射增敏剂, 目前已进行了烟酰胺放射增敏条件下的药代动力学研究, 证明健康人试服 6 g 情况下不影响血压、脉搏和呼吸; 国外将其作为头、颈部癌和膀胱癌的放疗增敏剂进行了 III 期临床试验, 结果表明, 其有很高的肿瘤局部控制率^[9-10]。

9401 是以烟酰胺为母体化合物合成的烟酰氨基类化合物, 在体外肿瘤细胞放射增敏作用的研究中发现, 9401 的放射增敏效果比母体化合物烟酰胺好, 而且氨基酸的引入毒性也大大低于母体化合物烟酰胺。本研究以 H22 肝癌小鼠为实验对象, 研究 9401 在小鼠体内的放射增敏作用, 结果表明, 9401 有较强的放射增敏作用, 9401 中剂量联合照射组和高剂量联合照射组的放射增敏系数分别为 1.73 和 2.13, 均高于其母体化合物烟酰胺的放射增敏系数 1.61, 差异有统计学意义($t=2.26$ 和 9.04 , P 均 <0.05)。9401 高剂量联合照射组、中剂量联合照射组和低剂量联合照射组的抑瘤率分别为 64.5%、50.9%和 42.6%, 表明 9401 不同剂量给药照射后, 对肿瘤的生长有一定的抑制作用, 小鼠肿瘤重量明显低于空白对照组, 9401 高剂量联合照射组对 H22 肝癌小鼠的抑制作用较强。9401 高剂量联合照射组的抑瘤率显著高于烟酰胺联合照射组。9401 作为一种新型肿瘤放射增敏剂, 高效低毒, 具有广阔临床应用前景。

参 考 文 献

- [1] 顾菲, 刘晓秋, 韩英, 等. 肿瘤放疗增敏药 9401 号的细胞毒性和体外放射增敏作用. 中国辐射卫生, 2006, 15(4): 392-393.
- [2] 赵阿津, 刘晓秋, 韩英. 9401 号药对小鼠皮肤放射反应试验. 中国药理通讯, 2009, 26(2): 79.
- [3] 叶因涛, 徐文清, 沈秀, 等. 二氢丹参酮 I 对 H22 肝癌荷瘤小鼠的放射增敏作用. 中国辐射卫生, 2009, 18(3): 284-285.
- [4] Milas L, Fujii T, Hunter N, et al. Enhancement of tumor radioreponse in vivo by gemcitabine. Cancer Res, 1999, 59(1): 107-114.
- [5] Fenton BM, Lord EM, Paoni SF, et al. Enhancement of tumor perfusion and oxygenation by carbogen and nicotinamide during single- and multifraction irradiation. Radiat Res, 2000, 153(1): 75-83.

(下转第 37 页)

DNA 损伤后, BRCA1、BRCA2 和 Rad51 同时聚集到 DNA 损伤部位进行修复。如果缺少 BRCA1, 则 BRCA2 和 Rad51 就不能形成聚集进行 DNA 损伤修复。在 BRCA1 基因表达缺失的细胞中, 射线诱导 DNA 损伤后, BRCA1-Rad50-Mre11-NSB1 也同样不能发生聚集。

4 展望

生物体 DSBs 修复是当前生命科学研究领域的热点。通过对 DSBs 修复通路机制的阐明, 新的 DNA 损伤修复蛋白不断被发现, 丰富了人们对于 DNA 修复机制及功能的认识。深入研究 DNA 修复蛋白如何在人类最常见的肿瘤疾病中发挥作用, 有助于进一步了解基因突变导致肿瘤发生发展的过程, 给肿瘤的治疗提供更多新靶点和新方法。

参 考 文 献

- [1] Demuth I, Digweed M. T The clinical manifestation of a defective response to DNA double-strand breaks as exemplified by Nijmegen breakage syndrome. *Oncogene*, 2007, 26(56): 7792-7798.
- [2] Yano K, Morotomi-Yano K, Adachi N, et al. Molecular mechanism of protein assembly on DNA double-strand breaks in the non-homologous end-joining pathway. *J Radiat Res*, 2009, 50(2): 97-108.
- [3] Liu Y, Tarsounas M, O'regan P, et al. Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *J Biol Chem*, 2007, 282(3): 1973-1979.
- [4] 杨青山, 樊飞跃. Ku 蛋白与 DNA 修复. *国际放射医学核医学杂志*, 2008, 32(1): 40-43.
- [5] 程晋. DNA 损伤修复及细胞周期检控点激活的研究进展. *国际放射医学核医学杂志*, 2009, 33(6): 360-364.
- [6] Roberts SA, Ramsden DA. Loading of the nonhomologous end joining factor, Ku, on protein-occluded DNA ends. *J Biol Chem*, 2007, 282(14): 10605-10613.
- [7] Mari PO, Florea BI, Persengiev SP, et al. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(49): 18597-18602.
- [8] Evans JW, Liu XF, Kirchgessner CU, et al. Induction and repair of chromosome aberrations in scid cells measured by premature chromosome condensation. *Radiat Res*, 1996, 145(1): 39-46.
- [9] Simsek D, Jasin M. Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(4): 410-416.
- [10] Nasiri M, Saadat I, Omidvari S, et al. Genetic variation in DNA repair gene XRCC7 (G6721T) and susceptibility to breast cancer. *Gene*, 2012, 505(1): 195-197.
- [11] Shammam MA, Shmookler Reis RJ, Koley H, et al. Dysfunctional homologous recombination mediates genomic instability and progression in myeloma. *Blood*, 2009, 113(10): 2290-2297.
- [12] Kuznetsov SG, Haines DC, Martin BK, et al. Loss of Rad51c leads to embryonic lethality and modulation of Trp53-dependent tumorigenesis in mice. *Cancer Res*, 2009, 69(3): 863-872.
- [13] 王芹. X 射线修复交叉互补基因功能的研究进展. *国外医学放射医学核医学分册*, 2005, 29(3): 132-136.
- [14] Tambini CE, Spink KG, Ross CJ, et al. The importance of XRCC2 in RAD51-related DNA damage repair. *DNA Repair (Amst)*, 2010, 9(5): 517-525.
- [15] Johnson RD, Liu N, Jasin M. Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature*, 1999, 401(6751): 397-399.
- [16] 张占春. 电离辐射损伤与 DNA 修复基因. *国外医学放射医学核医学分册*, 2004, 28(1): 26-29.
- [17] Fan S, Meng Q, Auburn K, et al. BRCA1 and BRCA2 as molecular targets for phytochemicals indole-3-carbinol and genistein in breast and prostate cancer cells. *Br J Cancer*, 2006, 94(3): 407-426.

(收稿日期: 2012-06-03)

(上接第 15 页)

- [6] Bussink J, Kaanders JH, Rijken PF, et al. Vascular architecture and microenvironmental parameters in human squamous cell carcinoma xenografts: effects of carbogen and nicotinamide. *Radiother Oncol*, 1999, 50(2): 173-184.
- [7] Bussink J, Kaanders JH, Van der Kogel AJ, et al. Clinical outcome and tumour microenvironmental effects of accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide. *Acta Oncol*, 1999, 38(7): 875-882.
- [8] Nishioka A, Ohizumi Y, Lam GK. The effects of nicotinamide plus carbogen or pions for microscopic SCCVII tumors. *Oncol Rep*, 1999, 6(3): 583-586.
- [9] Kaanders JH, Bussink J, Van der Kogel AT, et al. ARCON: a novel biology-based approach in radiotherapy. *Lancet Oncol*, 2002, 3(12): 728-737.
- [10] Kaanders JH, Pop LA. Accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide (ARCON) for laryngeal cancer. *Radiother Oncol*, 1998, 48(2): 115-122.

(收稿日期: 2012-09-11)