

## 維生素 C 及 Desmethylmisonidazole 對於 CHO 細胞放射線效應之研究

許文林<sup>1</sup> 黃經民<sup>1</sup> 熊佩章<sup>1</sup> 任益民<sup>1</sup> 盧昭元<sup>2</sup> 趙壯飛<sup>2</sup>

- 1.三軍總醫院放射腫瘤部，國防醫學院放射治療學科
- 2.國防醫學院生物及解剖學科

**目的：**探討維生素 C (vitamin C, ascorbic acid, AA) 及 desmethylmisonidazole (DMM) 對於 CHO 細胞之輻射效應，以做為頭頸部腫瘤病人接受放射線治療之臨床參考。

**材料與方法：**本實驗分為三部份，第一部份分別探討 AA 或 DMM 對於 CHO 細胞之輻射效應。第二部份研究在相同濃度 DMM 作用情況下，不同濃度之 AA 對於 CHO 細胞之輻射效應。第三部份探討在相同濃度 AA 作用下，不同濃度之 DMM 對於 CHO 細胞輻射效應之影響。

**結果：**研究顯示，AA 對於 CHO 細胞有輻射保護作用，而 DMM 對 CHO 細胞具有輻射敏感作用，但兩者合併使用時對 CHO 細胞的敏感作用顯著大於保護作用。當 DMM 濃度固定時，愈高濃度之 AA 對細胞之輻射保護作用也愈明顯。反之，當 AA 濃度固定時，DMM 濃度愈高其對細胞之輻射敏感效應也愈顯著。

**結論：**合併 AA (0.025 mg/ml) 及 DMM (0.5-10 mM) 表現出來的是對 CHO 細胞之輻射敏感效應，而 AA 對 CHO 細胞之輻射保護作用只有當 DMM 不存在時才會顯著表現。

[放射治療與腫瘤學 1996; 3: 13-19]

關鍵詞：維生素 C, Desmethylmisonidazole, 中國大頰鼠卵巢細胞, 生存分數

### 前言

目前已有證據顯示放射線照射後腫瘤之局部控制失敗，主要原因是腫瘤內含有對放射線具抵抗性之缺氧癌細胞及照射後細胞發生潛在性致死損傷修復 (potentially lethal damage repair, PLDR) 的現象 [1]。國人常見之口腔癌患者，病人多因認識不清致長成巨大腫瘤或進展到相當晚期時才就醫。這種缺氧組織環境可能造成放射治療後癌細胞進行 PLDR，因而使放射治療對局部廣泛侵犯之癌病患者效果不佳。為解決此一問題，本研究選擇含 2-nitroimidazole 群缺氧細胞放射敏感製劑中之一種藥物 Desmethylmisonidazole (DMM)，利用它們增加缺氧細胞之放射線敏感度及改變照射後 PLDR 能力之特性，使口腔組織在不增加甚至減少放射線劑量的情況下，提升腫瘤之局部控制率。

DMM 是 Misonidazole (MISO) 的代謝產物。此藥物有較低之脂質穿透性與較低之血液半

衰期，因此所產生之神經毒性也較 MISO 等輻射敏感藥物為低。且口服吸收後約一小時可達到相當高之血中濃度，也會迅速經由尿液排出體外 [2, 3]。由於其所產生之副作用較傳統藥物為低，加上以上諸多優點，因此就理論而言，DMM 應是一新而有效之輻射敏感藥物。

另一方面，許多頭頸部腫瘤患者在接受放線治療時，會產生口腔黏膜發炎 (oral mucositis)，甚至潰瘍的現象。這是因為放線使細胞增生減緩 (decreased cell renewal)，唾液腺纖維化，致使黏膜上皮 (mucous epithelium) 產生乾燥、萎縮、次發性感染與潰瘍。在非角化上皮如口腔、唇、軟顎、舌腹面等部位最易發生。放線引起之黏膜炎使治療中的患者極不舒服，進食困難，體重減輕並產生負氮平衡，組織修復所需的養份補充不夠，結果使黏膜炎或潰瘍的癒合更差。許多病人因此必須中斷放線治療約 2-3 週甚至更久以讓受損的黏膜進行修復，但又造成殘餘的腫瘤細胞增生，使治療效果降低 [4, 5]。

目前已有報告指出：維生素 C(vitamin C, ascorbic acid, AA)對於黏膜潰瘍有預防或加速癒合的效果[6,7]。從我們所完成之動物實驗結果中已得知：AA 對於放射線黏膜炎確實有預防及加速癒合的效果[8]。但在實際臨床治療病人時，AA 對於口腔癌放射治療之效應仍不清楚。如果我們合併使用放射線敏感劑 DMM 與 AA，那麼，對於接受放射治療之口腔癌患者，是否能促進病人治療效果且減少因放射治療所產生之副作用，是本研究的主題。我們計劃將 AA 及 DMM 純予培養中的中國大頰鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cells, CHO 細胞)，觀察它們對於這些照射中的細胞在輻射效應方面的改變。

## 材料與方法

### 一、實驗設計

本實驗分為三部份，第一部份分別探討 AA 或 DMM 對於 CHO 細胞之輻射效應。第二部份研究在相同濃度 DMM 作用情況下，不同濃度之 AA 對於 CHO 細胞之輻射效應。第三部份探討在相同濃度 AA 作用下，不同濃度之 DMM 對於 CHO 細胞輻射效應之影響。

### 二、CHO 細胞之培養

本實驗採用 CHO 細胞為研究對象，細胞培養在 RPMI-1640 培養基，內含 5% fetal bovine serum, 1mM glutamine, 1%之 penicillin 及 streptomycin (10000 units)。將 25T 培養盤置於含 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 之培養箱內，取出時，以 0.005% Trypsin-EDTA in PBS 處理 5 分鐘後取下進行下列實驗或繼續培養。

### 三、AA 及 DMM 濃度之選擇

以不同濃度之 AA 或 DMM 加入 10<sup>5</sup> CHO cells/ml 培養液，包括 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/ml culture medium，研究不同濃度之 AA 或 DMM 對於 CHO 細胞生長之影響。結果顯示濃度愈高對細胞之生長抑制程度也愈大。當 AA 濃度達 0.025 mg/ml, 50% 培養細胞生長受抑制，因此，AA 之 ID<sub>50</sub> 值為 0.025 mg/ml。同理 DMM 之 ID<sub>50</sub> 值為 10 mM。我們以這些濃度做為實驗過程中使用藥物之最高濃度。

### 四、CHO 細胞之放射線照射

將細胞以 10<sup>5</sup> cells/ml 培養液濃度植入培養盤中培養，然後分成七組(含對照組)，在快速生長期(exponential phase)時置於鈷-60 照射。我們使用 CGR-1 鈷-60 遠隔治療機進行照射，劑量率(dose rate) = 143 cGy/min, SSD = 80 公分。培養盤下置 0.5cm 厚之組織等密度物質(bolus)，放射線由培養盤下方照射，放射線以 800 cGy 劑量單次照射，然後觀察 CHO 細胞之生存分數(survival fraction, SF)。

### 五、DMM 及 AA 對於 CHO 細胞放射線敏感度之影響

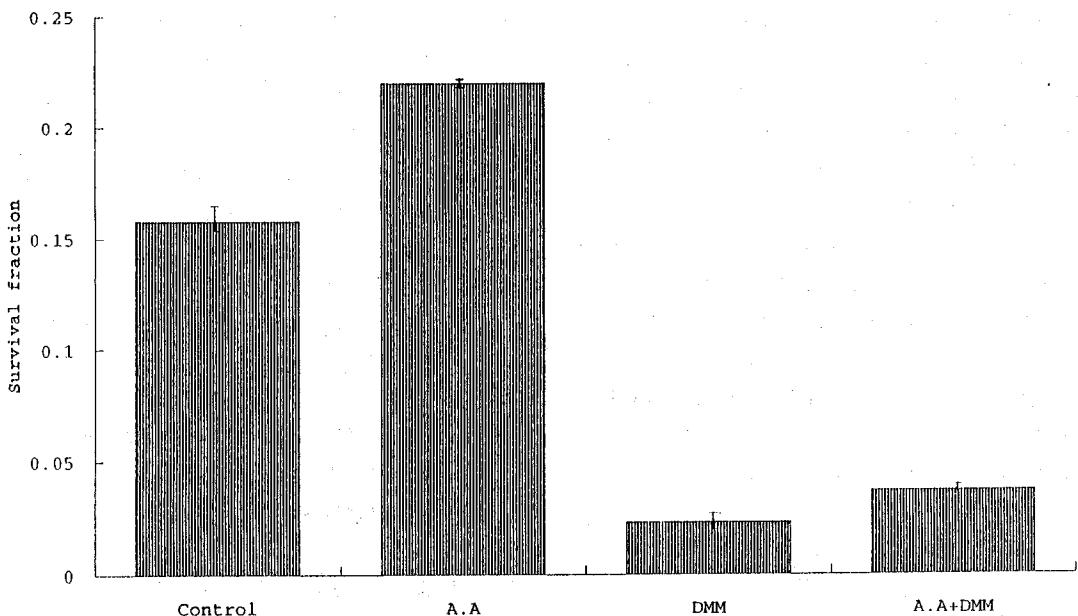
將 CHO 細胞置於培養盒內，以 N<sub>2</sub>氣灌注入培養盒內(wash out)約 30 分鐘造成缺氧環境，再以 800 cGy 之放射線劑量單次照射分別已添加 DMM, AA, 及 DMM+AA 之 CHO 細胞，研究這些藥物改變 CHO 細胞放射線敏感性之效應。N<sub>2</sub>造成缺氧培養環境有許多方法，我們採用的方法是改良其它作者的方式。N<sub>2</sub>之流速約是 3L/min，置矽膠瓶塞封於 25T 培養盒口上，維持流入與流出管道。N<sub>2</sub>灌注入培養盒內約 30 分鐘後，以血液氣體分析儀確認培養盒內缺氧程度[9, 10, 11]。

## 結 果

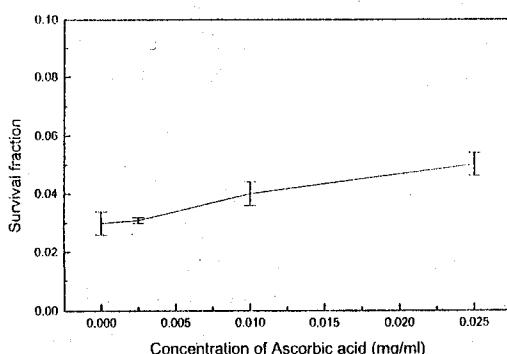
四組缺氧 CHO 細胞，一組作為對照組，另外兩組以 10mM 之 DMM 單獨或分併 AA 純予培養中之 CHO 細胞，最後一組細胞單獨給予 AA，各組都給予 800 cGy 劑量以鈷六十進行放射線照射。結果顯示與對照組相比 AA 組對 CHO 細胞有明顯保護作用，而 DMM 對細胞有顯著輻射敏感效應，合併 DMM 及 AA 對細胞之效應介於 AA 組及 DMM 組之間，但細胞之生存分數仍較對照組為低(圖一)。

四組缺氧之 CHO 細胞液內每組先給予 10 mM 之 DMM，再加上不同濃度之 AA(濃度由 0 → 0.025 mg/ml)，然後各組都給予 800 cGy 單一劑量放射線照射，結果顯示所加入之 AA 濃度愈高則對細胞之輻射保護效果也愈明顯，當 AA 濃度達到 0.025 mg/ml 時，細胞之 SF 值較對照組高約 67%(圖二)。

在 DMM 實驗中，四組缺氧 CHO 細胞培養



圖一 AA及DMM對於缺氧環境狀態下培養之CHO細胞放射線(800cGy)生存分數(survival fraction, SF)之比較圖。

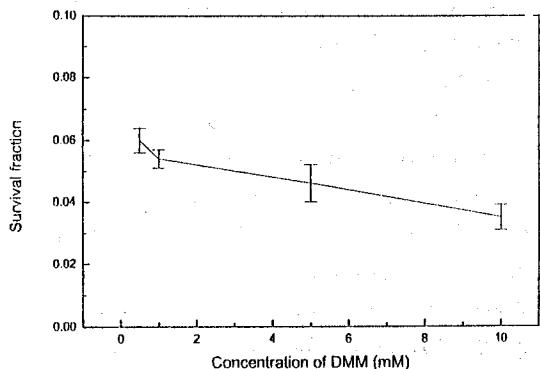


圖二 DMM濃度(10 mM)固定狀態下，AA對於缺氧環境狀態下培養之CHO細胞放射線(800 cGy)生存分數(SF)之效應圖。

液內各先加入 0.025 mg/ml 之 AA，再加入不同濃度之 DMM (由 0.5-10 mM)，然後每組都接受 800 cGy 單一劑量放射線照射，結果顯示 DMM 對細胞之致敏效果隨藥物劑量增加而增加(圖三)。

### 討 論

許多文獻報告已指出 AA 對於黏膜潰瘍有預防或加速其癒合的效果，這在某些黏膜潰瘍或



圖三 AA濃度(0.025 mg/ml)固定狀態下，DMM對於缺氧環境狀態下培養之CHO細胞放射線(800 cGy)生存分數(SF)之效應圖。

燒傷的患者身上已得到證實[12-14]。有些學者也已指出 AA 能促進膠原纖維的合成[6]。此外，已有學者以體外實驗證實 AA 能使培養中的人類皮膚結締組織的細胞合成膠原纖維[7]。如果 AA 對於放射線黏膜炎(radiation mucositis)有預防及加速癒合的效果，那麼，它的使用在口腔癌之放射治療上會不會有影響？反之，加入放射線敏感劑可能促進癌病之控制，但它的存在是否又會加重放射線黏膜炎之程度，使治療中斷？如果兩者合用，是否會減少放射線黏膜炎並提高口腔癌

控制率？目前為止，腫瘤之局部控制(local control)以及放射線黏膜炎和 AA & DMM 之間的關係，不論國內或國外的報告都很少，然而這在目前卻是十分重要的問題。我們相信放射線、AA 與口腔黏膜發炎三者間可能存在某種關係，而此三者之關係很有可能因加入放射線敏感劑而改變。同時，其間之關係是彼此相連且相互影響的。

DMM 是 MISO 之代謝物，與傳統使用之 MISO 比較，脂溶性較低。DMM 之脂水質分配比例(lipid: water partition coefficient) = 0.1，而 MISO = 0.4，故理論上較不易穿透神經組織因而所造成之神經性副作用較低且排出體外速度較快。其口服吸收後約一小時可達到相當高之血中濃度[2,3]。由於其所產生之副作用較傳統藥物為低，加上以上諸多優點，因此就理論而言，DMM 應是一新而有效之輻射敏感藥物。目前有類似藥理作用之類 MISO (MISO analogs) 藥物有三種：DMM, SR-2508, SR-2555。與 MISO 比較，這三種藥物具較低之腦血漿比(brain:plasma ratio)，血液濃度較高，自尿液排出速度較快且比例亦較高。但是脂溶性降低亦會減低其口服吸收之程度與速度，此現象在 SR-2508 及 SR-2555 明顯，在 DMM 較不明顯[15]。Stratford 亦指出 DMM 之半衰期(half life)長短和藥物給與之劑量無關，但血液最高濃度則與藥物給與之劑量有關[16]。由於 DMM 在增進輻射敏感度方面有上述等諸多優點，因此臨床上用於提升缺氧腫瘤放射治療效果之研究一直在進行著。Kapp 以高分次放射劑量合併 DMM 治療多形性神經膠質母細胞瘤(glioblastoma multiforme)，結果發現正中存活期較傳統放射治療或非傳統放射治療合併

放射敏感劑更長[17]。因此 DMM 在增進缺氧腫瘤放射敏感度方面必有其正面的效果。

由本實驗可知，AA(特別是濃度達 0.025 mg/ml)對於細胞雖有明顯輻射保護作用，但此保護作用在 DMM (10 mM) 納予之後就變得極不明顯(表一)。因此，對於正常細胞而言，若同時給予 AA 及 DMM，則放射線照射時所呈現的結果是極明顯的細胞致敏效應，AA 所提供之保護作用微不足道。至於腫瘤細胞，由於其血流分佈與正常組織不同，由此所導致之藥物濃度分佈差異可能會有不同之結果，由於此問題涉及藥物動力學之關係，仍需實驗進一步證實。

前面已提到 AA 對於細胞之保護作用在 DMM 影響下並不明顯，在 DMM 不出現的情況下則很明顯(圖一、表一)。但是對於都有 DMM 作用的情況下，加入愈高濃度之 AA，對細胞之保護作用也愈明顯。當 AA = 0.025 mg/ml 時，其 SF 是不加 AA 之 1.67 倍(表二)。同樣的，當 AA 濃度相同時，DMM 之濃度愈高則其對細胞之輻射敏感效應也愈顯著。當 DMM 濃度是 10 mM 時其 SF 是 0.5 mM 之 58%(表三)。

Rose 在 1990 年指出 AA 能保護組織免於受到放射線所產生之氫氧自由根離子(hydroxyl free radical)之傷害[18]，這些是否意味著接受頭頸部放射線治療的患者除了放射線對口腔黏膜的直接傷害外，AA 的缺乏也是造成放射線黏膜炎的主要原因之一。此外，許多文獻也已報告 AA 對於黏膜潰瘍有預防及加速癒合的效果。這些論點在一部份胃潰瘍與燒傷患者身上已得到證實[12, 13]。除此，目前在動物體內能程度不等的鑑別促進腫瘤與正常組織之放射線敏感劑，乃是

表一 AA 及 DMM 對於缺氧環境狀態下培養之 CHO 細胞放射線(800 cGy) 生存分數(SF) 之效應

	對照組	A.A. [0.025mg/ml]	DMM [10mM]	A.A.+DMM
生存分數 (SF)	0.158 ± 0.01	0.22 ± 0.003	0.023 ± 0.006	0.037 ± 0.003

表二 DMM 濃度(10 mM) 固定狀態下，AA 對於缺氧環境狀態下培養之 CHO 細胞放射線(800 cGy) 生存分數(SF) 之效應

DMM 濃度 [mM]	AA 濃度 [mg/ml]	生存分數
10	0	0.030 ± 0.004
10	0.0025	0.031 ± 0.001
10	0.01	0.040 ± 0.004
10	0.025	0.050 ± 0.004

表三 AA濃度(0.025 mg/ml)固定狀態下，DMM對於缺氧環境狀態下培養之 CHO 細胞放射線(800 cGy)生存分數(SF)之效應

Conc. of A.A. [mg/ml]	Conc. of DMM [mM]	Survival fraction
0.025	0.5	0.060±0.004
0.025	1	0.054±0.003
0.025	5	0.046±0.006
0.025	10	0.035±0.004

利用氧或類氧效應藥物(oxygen mimetic drugs)，如本實驗所用之DMM。DMM能促進腫瘤細胞對於放射線之敏感度，特別是當腫瘤內含有對放射線不敏感之缺氧細胞時[19, 20]。

綜合實驗資料可得知一個結論，合併使用AA (0.025 mg/ml)及DMM (0.5- 10mM)，輻射敏感效應遠大於保護作用，此外AA之輻射保護作用只有當DMM不存在時才會顯著表現。

### 參考文獻

- Hall EJ, Phil D: Repair of radiation damage and the dose-rate effect In: Radiobiology for the radiologist. 4th Ed. Philadelphia, J.B. Lippincott Company 1994;108-115.
- Dische S, Saunders MI, Riley PJ, Hauck J, Bennett MH, Stratford MRL, Minchington AI: The concentration of desmethylmisonidazole in human tumors and cerebral spinal fluid. Br J Cancer 1981;43: 344-349.
- Dische S, Saunders MI, Stratford MRL: Neurotoxicity with desmethylmisonidazole. Br J Radiol 1981;54:156-157.
- Checharick D, Mossman KL: Nutritional consequences of radiotherapy of head and neck cancer. Cancer 1983;51:811-815.
- Hooley R, Levine H, Flores TC: Predicting postoperative head and neck complications using nutritional assessment: The prognostic nutritional index. Arch Otolaryngol 1983;109:83.
- Murad S, Grove D, Lindberg KA, Reynolds G, Sivarajah A, Pinnell SR: Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. Proc Natl Acad Sci USA 1981;78:2879-2882.
- Murad S, Sivarajah A, Pinnell SE: Regulation of prolyl and lysyl hydroxylase activities in cultured human skin fibroblasts by ascorbic acid. Biochem Biophys Res Commun 1981;101:868-875.
- Hsu WL, Hwang JM, Jen YM, Shih RP, Lee HS, Lee WH: Study on effects of vitamin C on repair and prevention of radiation oral mucositis of mice. Therapeutic Radiol Oncol 1995; 2: 181-186.
- Korbelik M, Palcic B, Skov K, Skarsgard L: Misonidazole and potentially lethal damage. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1982;8: 461-464.
- Hall EJ, Astor M, Biaglow J, Parham JC: The enhanced sensitivity of mammalian cells to killing by X rays after prolonged exposure to several nitroimidazoles. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1982;8: 447-451.
- Bump EA, Yu NY, Martin Brown J: The use of drugs which deplete intracellular glutathione in hypoxic cell radiosensitization. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1982;8:439-442.
- Ingalls TH, Warren HA: Asymptomatic scurvy. Its relation to wound healing and its incidence in patients with peptic ulcer. N Engl J Med 1937;217:443-446.
- Klasson DH: Ascorbic acid in the treatment of burns. New York State J of Medicine 1951;51:2388-2392.
- Cameron E: Biological function of ascorbic acid and the pathogenesis of scurvy. Medical Hypotheses 1976;2:154-163.

15. Coleman CN, Wasserman TH, Phillips TL, et al: Initial pharmacology and toxicology of intravenous desmethylmisonidazole. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982; 8:371-375.
16. Stratford MR, Minchinton AI, et al: Desmethylmisonidazole (Ro-05-9963): clinical pharmacokinetics after multiple oral administration. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982;8:377-379.
17. Kapp DS, Wagner FC, Lawrence R: Glioblastoma multiforme: treatment by large dose fraction irradiation and metronidazole. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982;8:351-355.
18. Rose RC: Ascorbic acid metabolism in protection against free radical: a radiation model. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;169:430-436.
19. Wasserman TH, Coleman CN, Urtasun R, et al: Final report: Phase I trial of desmethylmisonidazole(DMM)-an hypoxic cell sensitizer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982;8:76.
20. Sheldon PW, Hill SA: Hypoxia cell radiosensitizers and tumor control by x-ray of a transplanted tumor in mice. *Br J Cancer* 1977;35:795- 808.



## STUDY OF VITAMIN C AND DESMETHYLMISONIDAZOLE ON THE RADIATION EFFECTS OF CHO CELLS

Wen-Lin Hsu<sup>1</sup>, Jing-Min Hwang<sup>1</sup>, Pei-Wei Shueng<sup>1</sup>, Yee-Min Jen<sup>1</sup>, Jao-Juan Lu<sup>2</sup>, Chun-Faye Chao<sup>2</sup>

1. Department of Radiation Oncology, Tri-Service General Hospital

Division of Radiotherapy, National Defense Medical Center &

2. Division of Biology and Anatomy, National Defense Medical Center

**Purpose:** The goal of this research is to study the influence of vitamin C (ascorbic acid, AA) and desmethylmisonidazole (DMM) on the radiobiological effects of CHO cells and then as a basis of radiotherapy for head and neck cancer patients.

**Materials and Methods:** This study was designed to investigate the influence of AA and DMM on radiobiological effects of CHO cells. Combination of AA (with different concentration) and DMM (with constant concentration) was also used to evaluate their radiobiological effects. In the same way, the radiobiological effects of combined DMM (with different concentration) and AA (with constant concentration) was also evaluated.

**Results:** The results showed that there are radioprotective effects of AA and radiosensitizing effects of DMM on CHO cells. However, the radiosensitizing effect is significantly greater than radioprotective effect when both drugs were combined used. In addition, the higher concentrations of AA were, the greater it protected CHO cells from radiation under constant concentrations of DMM. On the contrary, the higher concentration of DMM was, the greater it sensitized CHO cells to radiation under constant concentrations of AA.

**Conclusion:** The effect of combined AA (0.025 mg/ml) and DMM (0.5-10 mM) on CHO cells is radiosensitization. When DMM is absent, the radioprotective effect of AA is expressed.

[Therapeutic Radiol Oncol 1996; 3: 13-19]

Key words: Vitamin C, Desmethylmisonidazole, CHO cells, Survival fraction

