葡萄糖在细胞吸收硼酸及取代硼酸中的作用研究

赵云岑†
(北京师范大学化学学院, 100875, 北京)

摘要 硼中子俘获治疗(boron neutron capture therapy, BNCT)是肿瘤治疗的一种二元体系, 利用含^{10}B 药物对肿瘤细胞的高选择性、在肿瘤细胞中有足够的富集量和滞留时间, 用具有合适能量的超热中子束照射肿瘤部位, 发生中子俘获反应^{10}B(n, α)^{7}Li, 反应释放出的高传能线密度 α 粒子和^{7}Li, 在一个细胞大小范围杀死肿瘤细胞. 因此, 含^{10}B 药物的高效、高选择性对肿瘤细胞的靶向输送是 BNCT 有效性提高的关键. 为了提高肿瘤细胞对含硼化合物的吸收, 本文基于糖类物质与硼酸及其衍生物的相互作用, 以及糖类具有在肿瘤细胞中富集的性质, 研究了葡萄糖对正常细胞和肿瘤细胞吸收硼酸及其衍生物的影响, 探讨了利用糖类物质增加肿瘤细胞中^{10}B 含量的可能性. 研究结果表明, 随着葡萄糖含量的增加, 肿瘤细胞对硼酸及取代硼酸的吸收增加, 而正常细胞的吸收增加不明显. 此外, 葡萄糖对硼化合物在细胞中的滞留无明显的影响.

关键词 硼中子俘获治疗; 葡萄糖; 硼酸; 取代硼酸
中图分类号 O61 **DOI:** 10.12202/j.0476-0301.2021013

硼中子俘获治疗(boron neutron capture therapy, BNCT)是肿瘤治疗的一种先进的二元放疗模式, 其原理是利用含有稳定核素^{10}B 的药物在肿瘤细胞中靶向聚集, 然后用超热中子束照射肿瘤部位, 发生中子俘获反应($^{10}B+n_{th}\rightarrow{}^{4}He+{}^{7}Li+2.31$ MeV), 产生的高传能线密度 α 粒子及反冲核^{7}Li 在一个细胞大小(≈10 μm)范围杀死肿瘤细胞, 从而达到治疗的目的. BNCT 具有高度的肿瘤靶向性、对正常组织损伤小等优点, 临床主要用于脑瘤、头颈部肿瘤和黑色素瘤的治疗. BNCT 使用的中子源过去主要是反应堆, 近年来, 国内外加速器中子源的研发成功, 极大地推动了 BNCT 的临床试验[1−2]. 然而, 尽管化学家和生物学家经过 50 多年的努力, 合成并评价了数百种含^{10}B 的化合物, 但临床使用的药物仍然仅有 2 种(巯基硼烷钠盐, $Na_2B_{12}H_{11}SH$, BSH; 对-二羟基硼酰苯丙氨酸, BPA), 问题的关键在于药物对于肿瘤细胞要有高选择性以及必须输送足够的^{10}B(≈10^9 atoms/cell)到达肿瘤细胞[3]. 因此, 寻找高肿瘤靶向的含硼药物以及提高肿瘤细胞对含硼药物的吸收途径具有重要意义.

肿瘤的物质代谢不同于正常组织. 肿瘤细胞中蛋白质和核酸的合成十分旺盛, 而氨基酸和核苷酸的分解代谢显著降低. 由于合成代谢需提供能量, 所以体内糖类等能源物质的消耗明显加强, 而糖类的合成则减少. 肿瘤细胞的糖代谢有别于正常细胞, 其糖的无氧酵解增强, 生成较多的乳酸, 故肿瘤中能源利用十分浪费, 需消耗更多的糖类能源才能产生和正常组织相等的能量. 由于恶性增殖, 肿瘤组织对能量的需求远高于正常组织, 因此肿瘤细胞对糖的摄取也就显著高于正常细胞[4]. 糖广泛存在于生物体内, 无毒, 生物相容性好, 在水溶液中硼酸与糖类能快速和可逆地形成共价配合物[5−6], 因此, 有可能利用糖作为载体, 提高肿瘤细胞对硼酸类化合物的吸收.

本文选择硼酸、甲基硼酸和 2-甲基-1-丙基硼酸为代表, 研究了在不同浓度的葡萄糖、硼酸及取代硼酸条件下, 肿瘤细胞和正常细胞对硼酸类化合物的吸收和滞留情况.

1 材料与方法

1.1 试剂 葡萄糖(分析纯), 硼酸(优级纯), 甲基硼酸, 2-甲基-1-丙基硼酸(Aldrich 公司), DMEM 培养基(美国 GIBCO 公司), 新生牛血清(北京军区兽医防治研究中心), 胰蛋白酶(华美生物工程公司), 姜黄素(生化试剂, 中国预防医学科学院劳卫所), 冰乙酸、浓硫酸、浓硝酸、甘露醇均为国产优级纯.

1.2 仪器 CO_2 培养箱(美国 Cole-Parmer 仪器公司), 721 分光光度计(上海分析仪器厂), LDZ4-08 自动平衡离心机(北京医用离心机厂), XDS-1 倒置生物显微

† 通信作者: 赵云岑(1963—), 博士, 高级实验师. 研究方向: 核药物化学. E-mail: ylzhao@bnu.edu.cn
收稿日期: 2021-01-24

镜(重庆光学仪器厂).

1.3　细胞株　SP2/0 骨髓瘤细胞株由北京大学生命科学学院单克隆室提供, 2BS 人胚肺细胞由北京大学医学部分子免疫室提供.

1.4　细胞培养　骨髓瘤细胞及人胚肺细胞均培养于含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基, 37 ℃、5% CO_2 条件下, 每 2~3 d 传代一次.

1.5　细胞吸收和滞留分析　取对数生长期细胞(SP2/0 骨髓瘤细胞培养至半满, 2BS 人胚肺细胞培养至近全满), 加入硼化合物和葡萄糖, 继续 37 ℃ 培养一定时间. 然后倒掉培养基, 用 0.01 mol · L^{-1} 的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 遍; 0.25% 胰酶消化细胞, 再用 PBS 洗涤细胞 2 遍, 台盼蓝染色后, 进行细胞计数. 离心收集细胞, 按 1.6 节所述方法进行细胞硼含量分析. 做滞留研究时, 倒掉含硼培养液, 换以无硼培养液继续培养 3、6、12 和 24 h, 然后同上洗涤、收集细胞进行硼含量分析. 所有硼含量值归一化到 10^9 细胞(10^9 细胞≈1 g). 当每克细胞硼含量低于 0.5 μg 时, 则认为是不可检测的[7].

1.6　细胞硼含量的测定　姜黄素比色法: 由于氧化剂干扰比色分析, 因此我们对文献方法[8] 进行了一些改进, 使得该方法适用于本实验体系. 具体操作如下: 将浓硝酸消化后的细胞消化液移至聚四氟乙烯烧杯中, 加入 1 mg · mL^{-1} 甘露醇溶液 0.3 mL, 以防止驱除硝酸过程中引起的硼损失[9]; 在 70 ℃ 蒸发溶液至干, 然后加 3 mol · L^{-1} 盐酸 1 mL 除去硝酸, 重复 4 遍. 最终将溶液蒸干, 加入 0.1% 的姜黄素冰乙酸溶液 1 mL, 再加入浓硫酸-冰乙酸(体积比 1∶1)混合液 0.4 mL, 充分混匀, 此时溶液由黄色变为紫红色; 显色 30 min 后用 70% 乙醇将显色化合物转移至 10 mL 容量瓶中, 稀释至刻度, 混匀; 以试剂为空白, 在 555 nm 处用 5 cm 比色皿测定吸光度.

2　结果与讨论

2.1　SP2/0 骨髓瘤细胞吸收硼酸的影响因素

2.1.1　*硼酸和葡萄糖含量的影响*　硼酸和葡萄糖含量对 SP2/0 细胞吸收硼酸的影响见表 1. 硼酸的细胞吸收实验是将 SP2/0 骨髓瘤细胞分别与培养液中不同质量浓度的硼酸或硼酸-葡萄糖(摩尔比 1∶1)在低糖或高糖 DMEM 中于 37 ℃ 培养 24 h.

表 1　硼酸和葡萄糖含量对 SP2/0 细胞吸收硼酸的影响

培养基中硼的质量浓度/(μg · mL^{-1})	细胞中硼的质量分数/(μg · g^{-1})			
	DMEM(低糖)		DMEM(高糖)	
	H_3BO_3	H_3BO_3-Glucose(摩尔比1∶1)	H_3BO_3	H_3BO_3-Glucose(摩尔比1∶1)
25	2.2 ± 0.4	3.7 ± 0.8	4.3 ± 0.8	5.3 ± 1.2
50	5.3 ± 0.5	6.7 ± 0.5	7.2 ± 0.6	8.2 ± 1.3
100	7.2 ± 0.8	8.6 ± 0.3	9.1 ± 0.3	9.9 ± 1.2

从表 1 中可见, 肿瘤细胞对硼酸的吸收与培养液中硼酸及葡萄糖的含量有关. 当葡萄糖含量一定时, 肿瘤细胞对硼的吸收随着培养液中硼质量浓度的增加而增加. 当硼酸质量浓度一定时, 在低糖培养基或者高糖培养基条件下, 细胞对硼酸的吸收在硼酸-葡萄糖(摩尔比 1∶1)中高于在硼酸中; 在硼酸-葡萄糖(摩尔比 1∶1)或者在硼酸中, 细胞对硼酸的吸收在高糖培养基中高于在低糖培养基中. 也就是说, 在硼酸质量浓度一定的条件下, 肿瘤细胞对硼酸的吸收随葡萄糖含量的增加而增加. 由此表明肿瘤细胞的快速生长需要大量的能量, 对于葡萄糖的摄取增加, 导致硼酸的吸收也增加.

2.1.2　*作用时间的影响*　将 SP2/0 骨髓瘤细胞与含硼 50 μg · mL^{-1} 的硼酸-葡萄糖(摩尔比 1∶1)溶液在含 10% 新生牛血清的高糖 DMEM 中, 于 37 ℃ 分别培养 6、12、24 和 36 h, 结果见图 1.

图 1 表示硼酸的细胞吸收随作用时间的变化. 结果表明, 随着时间的增加, 硼酸的细胞吸收增加, 培养 12 h 以后, 吸收就达到了饱和, 基本上不再随时间增加而增加.

2.1.3　*硼酸在 SP2/0 细胞中的滞留*　将 SP2/0 细胞分别与含硼 50 μg · mL^{-1} 的硼酸和硼酸-葡萄糖(摩尔比 1:1)在含 10% 新生牛血清的高糖 DMEM 中于 37 ℃ 孵育 18 h, 然后倒出含硼培养液, 代之以无硼培养液, 继续培养 3、6、12 和 24 h. 硼酸在细胞中的滞留情况见图 2.

结果表明, 随着时间的增加, 硼酸滞留量减少. 前 3 h 硼含量下降迅速, 之后逐步减缓, 24 h 仅有少量硼滞留. 这一滞留时间较文献报道[7] 的要长.

比较硼酸和硼酸-葡萄糖(摩尔比 1∶1)的滞留情况可见, 2 个体系中硼酸的滞留曲线基本上是平行的. 因此, 葡萄糖对硼酸的滞留几乎无影响.

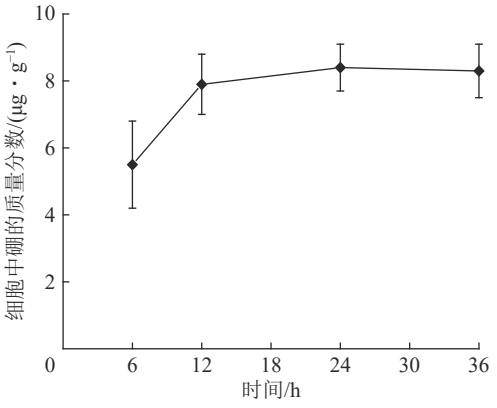

图 1 时间对 SP2/0 细胞吸收硼酸的影响

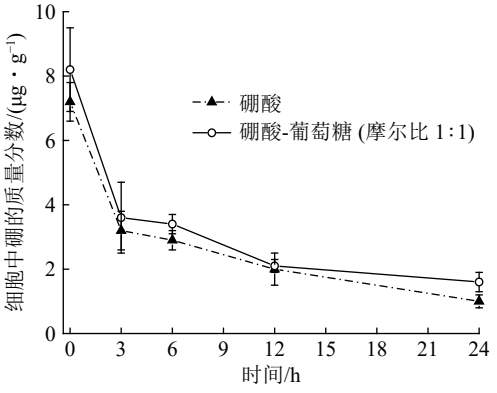

图 2 硼酸、硼酸-葡萄糖(摩尔比 1∶1)在 SP2/0 细胞中的滞留

2.2 骨髓瘤细胞 SP2/0 吸收甲基硼酸的影响因素

2.2.1 甲基硼酸和葡萄糖含量的影响 甲基硼酸和葡萄糖的含量对细胞吸收甲基硼酸的影响,结果列于表 2 和图 3 中. 实验将 SP2/0 细胞分别与不同质量浓度的甲基硼酸,甲基硼酸-葡萄糖(摩尔比 1∶1)以及不同摩尔比的甲基硼酸-葡萄糖(含硼 200 μg · mL^{-1})在含 10% 新生牛血清的高糖 DMEM 中于 37 ℃ 培养 24 h.

表 2 甲基硼酸和葡萄糖含量对 SP2/0 细胞吸收甲基硼酸的影响

培养基中硼的质量浓度/(μg · mL^{-1})	细胞中硼的质量分数/(μg · g^{-1})	
	CH_3BO_2	CH_3BO_2-Glucose (摩尔比1∶1)
25	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.3
50	0.8 ± 0.2	1.2 ± 0.2
100	1.0 ± 0.2	1.4 ± 0.2

结果表明,当葡萄糖含量一定时,细胞对甲基硼酸的吸收随着培养液中甲基硼酸质量浓度的增加而增加;当甲基硼酸质量浓度一定时,细胞对甲基硼酸的吸收随着葡萄糖含量的增加而增加. 这一变化规律与表 1 反映的规律是一致的.

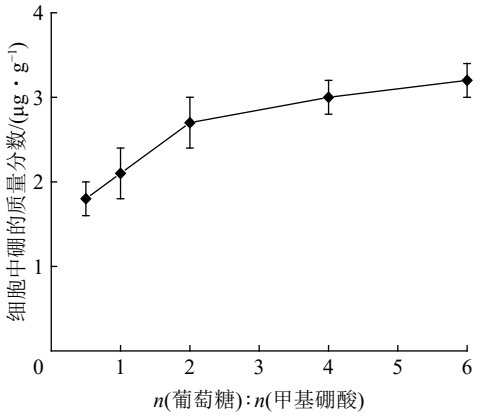

图 3 葡萄糖与甲基硼酸的摩尔比对 SP2/0 细胞吸收甲基硼酸的影响

将表 2 与表 1 比较可以发现,在相同硼质量浓度和葡萄糖含量条件下,SP2/0 细胞对硼酸的吸收高于对甲基硼酸的吸收. 这可能是由于甲基的取代使分子体积增大,导致不易被细胞吸收.

从图 3 可以看出,当硼质量浓度一定时,随着葡萄糖含量的增加,甲基硼酸的细胞吸收增加,当葡萄糖与甲基硼酸的摩尔比达 4∶1 之后,增加的趋势有所减缓.

2.2.2 作用时间的影响 将 SP2/0 骨髓瘤细胞与甲基硼酸-葡萄糖(摩尔比 1∶1)在含 10% 新生牛血清的高糖 DMEM 中于 37 ℃ 分别培养 6、12、24 和 36 h,细胞对甲基硼酸的吸收与作用时间的关系见表 3.

表 3 SP2/0 细胞对甲基硼酸-葡萄糖(摩尔比 1∶1)吸收的时间分布

培养基中硼的质量浓度/(μg · mL^{-1})	细胞中硼的质量分数/(μg · g^{-1})			
	6 h	12 h	24 h	36 h
130	<0.5	0.7	1.2	1.2
200	1.5	1.8	2.1	2.3

表 3 结果表明,随着时间的增加,细胞硼质量分数增加,在 24 h 后,细胞的吸收达到饱和,基本不再随时间而改变.

表 3 与图 1 比较可见,甲基硼酸的细胞吸收达到饱和所需时间较硼酸的要长,这也说明甲基硼酸不容易被细胞吸收.

2.2.3 甲基硼酸在 SP2/0 细胞中的滞留 将 SP2/0 细胞分别与含硼 200 μg · mL^{-1} 的甲基硼酸和甲基硼酸-葡萄糖(摩尔比 1∶1)共同培养 18 h,然后倒出含硼培养液,代之以无硼培养液,继续培养 3、6、12 和 24 h. 甲基硼酸在 SP2/0 细胞中的滞留情况见图 4.

分析图 4 中数据可知:随着时间的增加,甲基硼酸在细胞中的滞留量减少,12 h 就已几乎检测不到硼. 与硼酸的滞留情况相比,甲基硼酸滞留时间缩

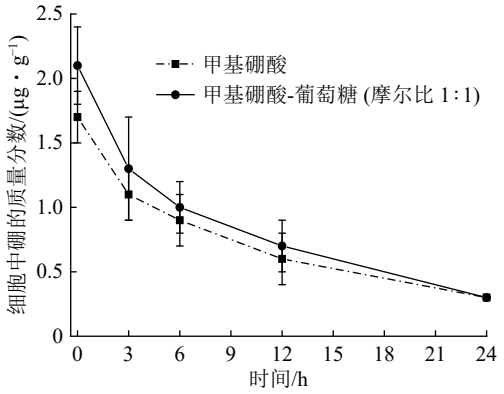

图 4　甲基硼酸、甲基硼酸-葡萄糖(摩尔比 1:1)在 SP2/0 细胞中的滞留

短, 前 3 h 甲基硼酸的滞留下降缓于硼酸.

比较甲基硼酸和甲基硼酸-葡萄糖(摩尔比 1∶1)的滞留情况可见, 2 个体系中硼酸的滞留曲线基本上是平行的. 因此, 葡萄糖对甲基硼酸的滞留也几乎无影响.

2.3　骨髓瘤细胞 SP2/0 吸收 2-甲基-1-丙基硼酸的影响因素

2.3.1　*2-甲基-1-丙基硼酸含量和培养时间的影响*　将不同质量浓度的 2-甲基-1-丙基硼酸-葡萄糖(摩尔比 1∶1)与 SP2/0 细胞分别培养 6、12、24 和 36 h, 2-甲基-1-丙基硼酸的细胞吸收随时间、质量浓度的变化关系列于表 4.

表 4　SP2/0 细胞对 2-甲基-1-丙基硼酸-葡萄糖(摩尔比 1∶1)吸收的时间分布

培养基中硼的质量浓度/(μg · mL⁻¹)	细胞中硼的质量分数/(μg · g⁻¹)			
	6 h	12 h	24 h	36 h
100	<0.5	<0.5	0.6	1.5
150	<0.5	0.7	1.3	1.6
200	0.9	1.1	1.8	1.9

从表 4 可见, 培养时间一定时, 随着培养液中硼质量浓度的增加, 细胞的硼吸收增加; 而当硼质量浓度一定时, 在实验的时间范围内, 随着时间的增加, 细胞硼吸收也增加.

将表 4 结果与表 1~3 的结果作一比较不难发现, 在相同硼质量浓度、相同葡萄糖含量以及相同的培养时间条件下, 2-甲基-1-丙基硼酸的细胞吸收不仅低于相应硼酸的细胞吸收, 而且低于相应甲基硼酸的细胞吸收. 这说明含硼化合物本身的结构和性质影响着细胞的吸收, 取代基越大, 细胞吸收越低.

2.3.2　*葡萄糖含量的影响*　将 SP2/0 细胞与不同摩尔比的葡萄糖和 2-甲基-1-丙基硼酸(含硼 200 μg · mL⁻¹)加到含 10% 新生牛血清的高糖 DMEM 中于 37 ℃ 培养 24 h. 2-甲基-1-丙基硼酸的细胞吸收结果见图 5.

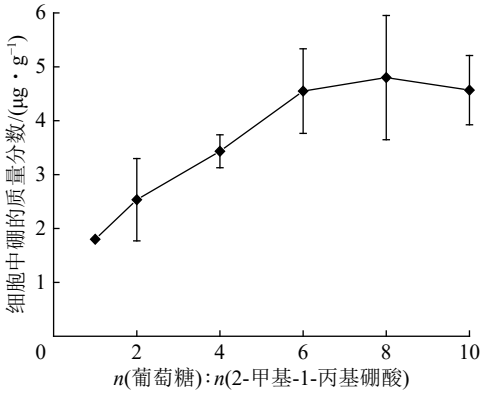

图 5　葡萄糖与 2-甲基-1-丙基硼酸的摩尔比对 SP2/0 细胞吸收 2-甲基-1-丙基硼酸的影响

在硼质量浓度一定的条件下, 随着葡萄糖含量的增加, 细胞内硼质量分数增加. 当葡萄糖与硼酸的摩尔比达到 6∶1 时, 细胞吸收达到饱和, 基本不再随葡萄糖含量的增加而增加. 由此也说明, 葡萄糖对提高含硼化合物的细胞吸收的作用是有限的, 一定程度时趋于饱和.

2.4　2BS 人胚肺细胞吸收硼酸的影响因素

2.4.1　*硼酸和葡萄糖含量的影响*　将不同质量浓度的硼酸、不同摩尔比的硼酸-葡萄糖(含硼 50 μg · mL⁻¹)分别与 2BS 细胞在高糖 DMEM 中于 37 ℃, 5% CO_2 培养 24 h, 结果见表 5 和图 6.

表 5　硼酸和葡萄糖含量对 2BS 人胚肺细胞吸收硼酸的影响

培养基中硼的质量浓度/(μg · mL⁻¹)	细胞中硼的质量分数/(μg · g⁻¹)	
	H_3BO_3	H_3BO_3-Glucose (摩尔比1∶1)
25	5.7 ± 0.9	6.0 ± 1.5
50	7.7 ± 1.3	7.8 ± 1.7
100	9.6 ± 1.2	9.8 ± 1.5

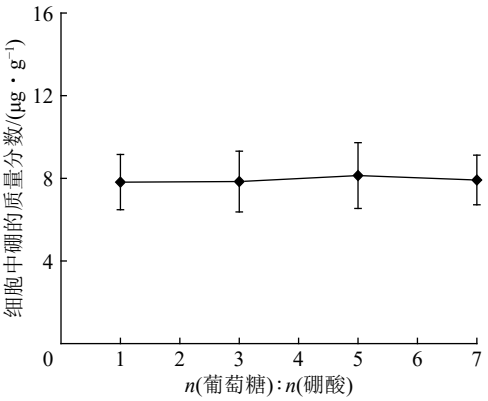

图 6　葡萄糖与硼酸的摩尔比对 2BS 细胞吸收硼酸的影响

分析表 5 结果不难看出, 在葡萄糖含量一定的条件下, 细胞对硼酸的吸收随培养基中硼质量浓度的增

加而增加.

从表 5 和图 6 可见,当硼质量浓度一定时,即使葡萄糖与硼酸的摩尔比高达 7∶1,硼酸的细胞吸收也无明显增加.说明葡萄糖含量对正常细胞的吸收基本无影响.这也从一个侧面证明了正常细胞的糖代谢不同于肿瘤细胞.通过这种差别,利用葡萄糖来提高肿瘤细胞对硼化合物的吸收是可行的.

3 结论

本文研究了葡萄糖对肿瘤细胞和正常细胞吸收硼酸及取代硼酸的影响,结果表明:随着葡萄糖含量的增加,肿瘤细胞对硼酸及取代硼酸的吸收增加,而正常细胞对硼酸的吸收增加不明显;葡萄糖对硼酸类化合物在肿瘤细胞中的滞留无明显的影响.由此从一个侧面说明正常细胞的代谢不同于肿瘤细胞,通过这种差别,利用葡萄糖作为载体来提高肿瘤细胞对硼酸类化合物的吸收是可行的,为硼酸类化合物靶向肿瘤富集提供了一种可能的途径,对于 BNCT 提高含 ^{10}B 药物的肿瘤吸收具有积极的意义.

致谢

北京大学王祥云教授和郭振泉教授给予的指导和帮助,谨致谢忱.

4 参考文献

[1] 何静,汤晓斌,刘渊豪,等.硼中子俘获治疗头颈部肿瘤临床试验进展[J].中华放射医学与防护杂志,2020,40(8):642

[2] SUZUKI M. Boron neutron capture therapy (BNCT): a unique role in radiotherapy with a view to entering the accelerator-based BNCT era[J]. International Journal of Clinical Oncology, 2020, 25(1): 43

[3] BARTH R F, GRECULA J C. Boron neutron capture therapy at the crossroads-where do we go from here?[J]. Applied Radiation and Isotopes, 2020, 160: 109029

[4] 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 47

[5] WESTMARK P R, GARDINER S J, SMITH B D. Selective monosaccharide transport through lipid bilayers using boronic acid carriers[J]. Journal of the American Chemical Society, 1996, 118(45): 11093

[6] SUENAGA H, ARIMORI S, SHINKAI S. Sugar-controlled association–dissociation equilibria between DNA and boronic acid-appended porphyrin[J]. Jounal of the Chemical Society Perkin Transactions 2, 1996(4): 607

[7] LIU L, BARTH R F, TJARKS W, et al. In vitro and in vivo evaluation of carbonyl aridness as boron delivery agents for neutron capture therapy[J]. Anticancer Research, 1996(16): 113

[8] HAYES M R, METCALFE J. The boron-curcumin complex in the determination of trace amounts of boron[J]. Analyst, 1962, 87(1041): 956

[9] FELDMAN C. Evaporation of boron from acid solutions and residue[J]. Analytical Chemistry, 1961, 33(13): 1916

Glucose regulates cellular uptake of boric acid and substituted boric acid

ZHAO Yunling†

(College of Chemistry, Beijing Normal University, 100875, Beijing, China)

Abstract Boron neutron capture therapy (BNCT) is a binary radiotherapeutic modality based on nuclear capture and fission reactions that occur when the stable isotope boron-10 is irradiated with neutrons to produce high energy α particles. For this to be successful, about 20 μg · g^{-1} of ^{10}B (per weight of tumor) must be selectively delivered to tumor cells (≈ 10^9 atoms · $cell^{-1}$), and enough neutrons must be absorbed to sustain a lethal $^{10}B(n, \alpha)^7Li$ capture reaction. Therefore the key to enhance effectiveness of BNCT is for ^{10}B to be targeted to tumor cells efficiently and selectively. Carbohydrates are known to accumulate in tumor cells. Increased boron uptake in tumor cells is expected after introducing carbohydrates in the form of covalently-bonded complexes of boric acid or derivatives. It was found that the uptake of boric acid and derivatives by tumor cells increased with increasing concentrations of glucose, but glucose uptake by normal cells did not increase markedly. Glucose had no effect on cellular persistence of boron compounds.

Keywords boron neutron capture therapy (BNCT); glucose; boric acid; substituted boric acid

【责任编辑:武 佳】