

Effect of Boron [^{10}B] Falen on U87 Cell Toxicity and Retention Time

Shuiying Luo¹ Junqiang Hong^{1*} Xiaoping Sun² Ping Zhou²

1 Xiamen Hongai Hospital, Xiamen, Fujian, 361006, China

2 Zhongbor (Xiamen) Biomedical Co., Ltd., Nanjing, Jiangsu, 211112, China

Abstract

To clarify the cytotoxic effects of HMC3 and U87 cells on L-phenylalanine and boron [^{10}B] falen, as well as the retention time of boron [^{10}B] falen influenced by L-phenylalanine. **Methods:** After cell culture, cytotoxicity tests were conducted using L-phenylalanine and boron [^{10}B] falen. Concentrations were set according to toxicity thresholds for L-phenylalanine stimulation and boron [^{10}B] falen evaluation. **Results:** The cytotoxic thresholds for HMC3 and U87 cells under boron [^{10}B] falen were 3200ppm and 2600 ppm, respectively. Both showed a cytotoxic threshold of 20mM for L-phenylalanine. When cells were first incubated with 2500ppm boron [^{10}B] falen followed by 5 mM L-phenylalanine, no significant changes in boron concentration were observed in HMC3 cells, while U87 cells showed higher boron concentration without statistical significance. Subsequent L-phenylalanine incubation at different concentrations and times revealed significantly increased boron concentration in U87 cells compared to the control group, with no significant difference observed in HMC3 cells. **Conclusion:** After boron [^{10}B] falen incubation and stimulation with certain concentrations of L-phenylalanine, U87 cells exhibited higher boron concentration than HMC3 cells.

Keywords

boron [^{10}B] method; L-phenylalanine; U87; HMC3; cytotoxicity; boron concentration

硼 [^{10}B] 法仑对 U87 细胞毒性及滞留时间的影响

罗水英¹ 洪俊强^{1*} 孙晓萍² 周平²

1. 厦门弘爱医院, 中国·福建 厦门 361006

2. 中硼(厦门)生物医药有限公司, 中国·江苏 南京 211112

摘要

目的:明确HMC3、U87 L-苯丙氨酸与硼[^{10}B]法仑的细胞毒性及L-苯丙氨酸对硼[^{10}B]法仑滞留时间的影响。**方法:**细胞培养后分别进行L-苯丙氨酸与硼[^{10}B]法仑细胞毒性检测。根据毒性阈值, 设置一定的浓度进行L-苯丙氨酸刺激、孵育硼[^{10}B]法仑评估HMC3、U87细胞硼浓度。**结果:**HMC3、U87硼[^{10}B]法仑细胞毒性阈值分别为3200ppm与2600ppm。其L-苯丙氨酸细胞毒性阈值均为20mM。HMC3、U87细胞先孵育2500ppm 硼[^{10}B]法仑, 后分组进行再孵育5mM L-苯丙氨酸, 发现HMC3硼浓度变化不明显, U87硼浓度较高, 但没有统计学差异。后进行不同浓度和时间的L-苯丙氨酸孵育, U87孵育L-苯丙氨酸组较无苯丙氨酸组硼浓度显著增加, HMC3未见显著差异, 且U87硼浓度高于HMC3。**结论:**U87经硼[^{10}B]法仑孵育及一定浓度的L-苯丙氨酸刺激后其硼浓度高于HMC3。

关键词

硼[^{10}B]法仑; L-苯丙氨酸; U87; HMC3; 细胞毒性; 硼浓度

1 引言

硼中子俘获治疗 (BNCT) 是将含有 ^{10}B 的亲肿瘤靶向硼

药注入患者体内, 硼药选择性地聚集于肿瘤细胞内, 再使用热中子或超热中子从患者体外进行照射, 被硼俘获后发生核反应, 从而生成 α 粒子和 ^7Li 粒子, α 粒子能够释放高线性能量转移, 在生物组织中的射程为 5- 9 μm , 与细胞直径类似, 可有效杀死肿瘤细胞, 实现对癌细胞的精准杀伤, 同时最大程度保护周围正常组织^{[1][2]}。其为当前常规肿瘤治疗手段的有效补充, 也是具发展潜力且正新兴快速发展的代表性先进放射治疗技术。

【基金项目】2021 年厦门市医疗卫生指导性项目“AB-BNCT 治疗脑高级别胶质瘤的临床前研究”(项目编号: 3502Z20214ZD1091)。

【作者简介】罗水英(1990-), 女, 中国福建龙岩人, 硕士, 主治医师, 从事肿瘤放射治疗学研究。

【通讯作者】洪俊强(1981-), 男, 中国福建南安人, 本科, 副主任医师, 从事肿瘤放射治疗研究。

1951 年, Sweet 等首次提出 BNCT 概念, 并尝试使用硼硫氢化物 (BSH) 作为硼携带剂^[3]。这是第一代硼携带剂, BSH 因含硫基团易于穿透血脑屏障, 被用于脑肿瘤治疗。然而, 其肿瘤选择性低且代谢不稳定, 导致临床效果有限。

1967年, Soloway 团队开发了对硼苯丙氨酸(BPA), 利用肿瘤细胞对氨基酸的高摄取特性提高靶向性^[4]。

BPA 的肿瘤/正常组织硼浓度比显著优于 BSH, 成为第二代硼携带剂的代表^[5]。1990年代, 通过 BPA 改良优化形式提高水溶性, 并采用静脉输注替代口服, 增强了药物稳定性。同时还有许多新型硼携带剂的探索, 如含硼卟啉、纳米载体系统。硼^{[10]B}法仑为苯丙氨酸的衍生物, 与日本已上市同类产品化学式相同, 但处方工艺和辅料配方已行改良。为进一步了解肿瘤与正常细胞的差别, 本实验拟行胶质母细胞瘤细胞、正常细胞的硼^{[10]B}法仑细胞实验, 为临床试验提供参考依据。

材料与方

细胞系: 人源小胶质细胞系 HMC3、人源胶质母细胞瘤细胞系 U87

试剂及仪器: 注射用硼^{[10]B}法仑注射液(批号 155191202)、100ug/mL 硼(B)标准溶液(批号 77591-6)、Adamas 69% 硝酸(批号 P2202604)、Agilent ICP-MS 7900、果糖溶液、L-苯丙氨酸、10% cck-8 试剂、二氧化碳碳培养基、Simplicity UV 水纯化系统, 细胞培养箱、酶标仪、96 孔板、6 孔板、移液器、细胞计数仪、硼浓度测定仪器等。

实验步骤:

2 L-苯丙氨酸细胞毒性检测

1) HMC3、U87 细胞培养;

2) 按照 1×10^4 cells/孔接种于 96 孔板, 每孔 200ul 完全培养基培养至汇合度 70%;

3) 加入 100ul 不同浓度 L-苯丙氨酸(0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 mM), 每个浓度 6 个复孔;

4) 加药 24h 后, 100ul/孔含 10% cck-8 试剂的完全培养基, 置于细胞培养箱避光孵育 1h, 酶标仪检测波长 450nm 的 OD 值。

3 硼^{[10]B}法仑细胞毒性检测

1) HMC3、U87 细胞培养;

2) 按照 1×10^4 cells/孔接种于 96 孔板, 每孔 200ul 完全培养基培养至汇合度 70%;

3) 加入 100ul 不同浓度硼^{[10]B}法仑和相应同浓度果糖溶液做对照(0, 600, 1000, 1600, 2000, 2600, 3200ppm), 每个浓度 6 个复孔;

4) 加药 24h 后, 100ul/孔含 10% cck-8 试剂的完全培养基, 置于细胞培养箱避光孵育 1h, 酶标仪检测波长 450nm 的 OD 值。

4 L-苯丙氨酸刺激后肿瘤细胞对硼^{[10]B}法仑在细胞中滞留时间的影响

1) U87、HMC3 细胞培养;

2) 按照 1×10^5 cells/孔接种于 6 孔板, 每孔 2ml 完全

培养基培养至汇合度 70%;

3) 硼^{[10]B}法仑(2500ppm)孵育 4h 后, 再按照下面实验分组(3 孔/组)处理后, 收集细胞计数测硼浓度。

a. 对照组: 无药空白对照;

b. 实验组 1: 硼^{[10]B}法仑孵育 4h (4h+0+0);

c. 实验组 2: 硼^{[10]B}法仑孵育 4h 后换完全培养基 2h (4h+0+2h);

d. 实验组 3: 硼^{[10]B}法仑孵育 4h 后换 L-苯丙氨酸 5mM 孵育 1h 后再换完全培养基 1h (4h+1h+1h);

e. 实验组 4: 硼^{[10]B}法仑孵育 4h 后换 L-苯丙氨酸 5mM 孵育 2h (4h+2h+0h)。

5 先孵育硼^{[10]B}法仑

1) U87、HMC3 细胞培养;

2) 按照 3×10^5 cells/孔接种于 6 孔板, 完全培养基培养至汇合度 70%;

3) 先分别加 2ml 含硼^{[10]B}法仑(2500ppm)的完全培养基孵育 4h 后, 再按照下面实验分组(3 孔/组)处理后, 收集细胞计数测硼浓度。

a. 4h-0-0: 孵育 4h 硼^{[10]B}法仑;

b. 4h-0-2h: 孵育 4h 硼^{[10]B}法仑后完全培养基培养 2h;

c. 4h-10mM 1h-1h: 孵育 4h 硼^{[10]B}法仑, 再孵育 1h 10mM L-苯丙氨酸, 后完全培养基培养 1h;

d. 4h-10mM 2h-0: 孵育 4h 硼^{[10]B}法仑, 再孵育 2h 10mM L-苯丙氨酸;

e. 4h-20 mM 1h-1h: 孵育 4h 硼^{[10]B}法仑, 再孵育 1h 20mM L-苯丙氨酸, 后完全培养基培养 1h;

f. 4h-20mM 2h-0: 孵育 4h 硼^{[10]B}法仑, 再孵育 2h 20 mM L-苯丙氨酸。

6 结果

6.1 L-苯丙氨酸与硼^{[10]B}法仑的细胞毒性

细胞存活率低于 70% 即该药物浓度对细胞具有潜在毒性。HMC3、U87 试验所用 5mM 浓度 L-苯丙氨酸均对细胞没有毒性, 其 L-苯丙氨酸最高无毒浓度可达 20mM。在硼^{[10]B}法仑浓度达到 3200ppm 时对 HMC3 细胞无毒性, 浓度达到 2600ppm 时对 U87 细胞无毒性, 如图 1。

6.2 L-苯丙氨酸对硼^{[10]B}法仑滞留时间的影响

HMC3、U87 先孵育 2500ppm 硼^{[10]B}法仑 4h, 后各分组孵育 5mM L-苯丙氨酸, 并设置不同的孵育时间, 再检测硼浓度。实验发现 HMC3 孵育硼^{[10]B}法仑后直接测硼浓度者其硼浓度最高。HMC3 孵育硼^{[10]B}法仑后再行细胞培养 2h 组、孵育硼^{[10]B}法仑后再换 1h 5mM L-苯丙氨酸及细胞培养 1h 组、孵育硼^{[10]B}法仑后再换 2h 5mM L-苯丙氨酸组硼浓度均较低, 部分数值低于对照组, 其数值相差不明显。U87 孵育硼^{[10]B}法仑后直接测硼浓度其硼浓度也处于最高

值。U87 孵育硼^{[10]B}法仑后再行细胞培养 2h 组、孵育硼^{[10]B}法仑后再换 1h 5mM L- 苯丙氨酸及细胞培养 1h 组、孵育硼^{[10]B}法仑后再换 2h 5mM L- 苯丙氨酸组硼浓度均较低，但

高于对照组。且孵育 L- 苯丙氨酸 2h 组较 1h 组的硼浓度高，L- 苯丙氨酸孵育 1h 组较无苯丙氨酸孵育组硼浓度高，但没有统计学差异，如图 2。

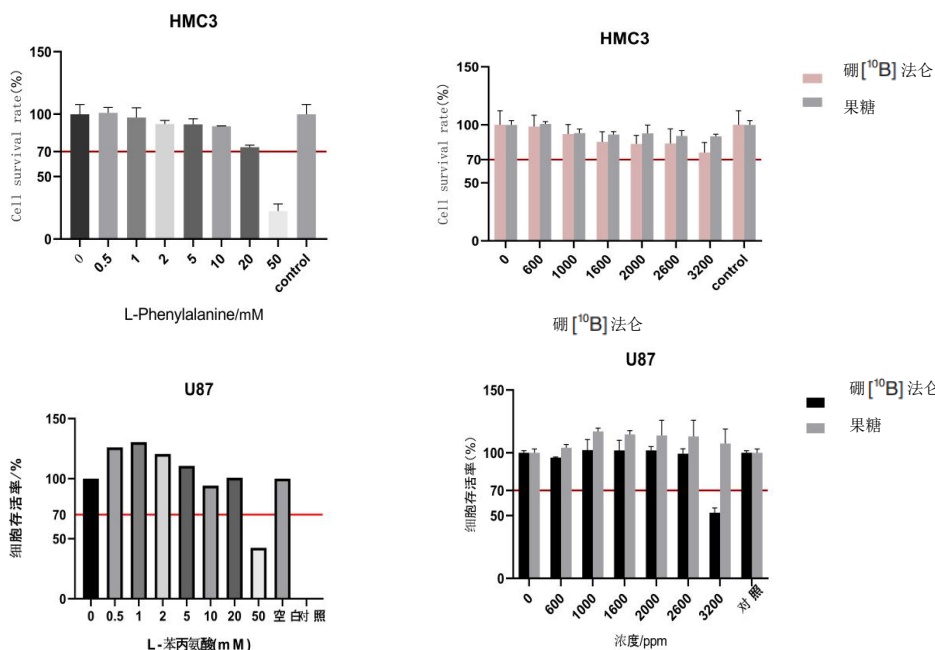


图 1.HMC3、U87 细胞 L- 苯丙氨酸与硼^{[10]B}法仑的毒性检测

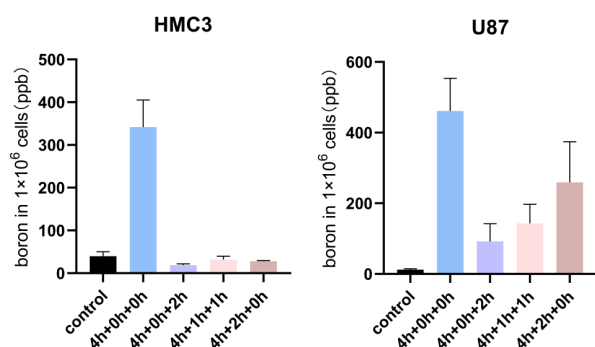


图 2 HMC3、U87 细胞 L- 苯丙氨酸对硼^{[10]B}法仑滞留时间的影响

各细胞孵育硼^{[10]B}法仑后，在安全范围内提高 L- 苯丙氨酸浓度，设置不同的孵育时间，后进行硼浓度测定。结果显示，U87 细胞先孵育 4h 硼^{[10]B}法仑后孵育 1h 10mM L- 苯丙氨酸再细胞培养 1h 组、先孵育 4h 硼^{[10]B}法仑后孵育 2h 10mM L- 苯丙氨酸组、先孵育 4h 硼^{[10]B}法仑后孵育 1h 20mM L- 苯丙氨酸再细胞培养组、先孵育 4h 硼^{[10]B}法仑后孵育 2h 20mM L- 苯丙氨酸组硼浓度数值均较孵育 4h 硼^{[10]B}法仑后细胞培养 2h 组高，P<0.05，有统计学差异。而 HMC3 细胞先孵育 4h 硼^{[10]B}法仑后孵育 1h 10mM L- 苯丙氨酸再细胞培养 1h 组、先孵育 4h 硼^{[10]B}法仑后孵育 2h 10mM L- 苯丙氨酸组、先孵育 4h 硼^{[10]B}法仑后孵育 1h 20mM L- 苯丙氨酸再细胞培养组硼浓度数值与孵育 4h

硼^{[10]B}法仑后细胞培养 2h 组比较，P > 0.05，无统计学差异。但先孵育 4h 硼^{[10]B}法仑后孵育 2h 20mM L- 苯丙氨酸组硼浓度数值较孵育 4h 硼^{[10]B}法仑后细胞培养 2h 组高，P < 0.05，有统计学差异，如图 3。

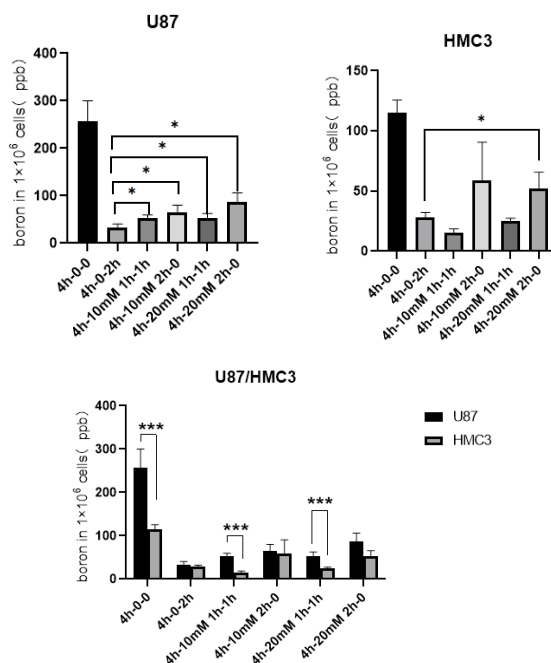


图 3 HMC3、U87 细胞不同浓度的 L- 苯丙氨酸对硼^{[10]B}法仑滞留时间的影响

进行 HMC3 与 U87 细胞对比，关于孵育 4h 硼^{[10]B}

法仑后细胞培养 2h 组、先孵育 4h 硼 [^{10}B] 法仑后孵育 2h 10mM L-苯丙氨酸组、先孵育 4h 硼 [^{10}B] 法仑后孵育 2h 20mM L-苯丙氨酸组 U87 与 HMC3 硼浓度对比, U87 数值高于 HMC3, 但 $P > 0.05$, 无统计学差异。只孵育 4h 硼 [^{10}B] 法仑组、先孵育 4h 硼 [^{10}B] 法仑后孵育 1h 10mM L-苯丙氨酸再细胞培养 1h 组、先孵育 4h 硼 [^{10}B] 法仑后孵育 1h 20mM L-苯丙氨酸再细胞培养组 U87 均较 HMC3 硼浓度高, $P < 0.001$, 有统计学差异。

7 结语

本研究首先研究 L-苯丙氨酸与硼 [^{10}B] 法仑的细胞毒性, 设定不同浓度, 初步试验获得 HMC3、U87 细胞 L-苯丙氨酸毒性阈值为 20mM, HMC3 细胞硼 [^{10}B] 法仑毒性阈值为 3200ppm, U87 细胞硼 [^{10}B] 法仑毒性阈值为 2600ppm。这与先前的一些研究成果相呼应, 在 Yin J 等^[6]的研究表明, 特定的氨基酸在一定浓度范围内对细胞的生长和代谢无明显负面影响, 本研究进一步验证了这一观点。但对于含硼制剂, 不同细胞系对其耐受浓度的差异也在研究中有所体现, 这可能与细胞的代谢能力、膜通透性等因素有关^[7]。

关于 L-苯丙氨酸对硼 [^{10}B] 法仑滞留时间的影响, 该试验主要采用安全剂量范围内的固定小剂量 5mM L-苯丙氨酸和大剂量 2500ppm 硼 [^{10}B] 法仑孵育进行实验的探索孵育的时间、细胞培养的价值。结果发现 HMC3 细胞硼浓度变化不明显, U87 细胞硼 [^{10}B] 法仑含量较高, 且 L-苯丙氨酸孵育时间长其硼浓度有获益趋势, 但没有统计学差异。这可能暗示着不同细胞系对 L-苯丙氨酸和硼 [^{10}B] 法仑的相互作用机制存在差异。有研究指出, 细胞内的转运蛋白和代谢酶的表达水平在不同细胞系中有所不同, 这可能导致对硼 [^{10}B] 法仑的摄取和滞留情况不同^[8]。

考虑到实验中 L-苯丙氨酸孵育时间长其硼浓度有获益表现, 我们在允许范围内提高 L-苯丙氨酸浓度及孵育时间。发现 U87、HMC3 孵育硼 [^{10}B] 法仑后直接测硼浓度者其硼浓度最高。但人体体内含有复杂的内环境, 有丰富的糖类、氨基酸、电解质。故采用模拟体内状态, 进行孵育硼 [^{10}B] 法仑后, 设置不同浓度和孵育时间的 L-苯丙氨酸, 测定硼浓度数值结果显示, 相较于无苯丙氨酸孵育组, U87 L-苯丙氨酸孵育组的硼浓度显著增加 ($P < 0.05$), 而 HMC3 细胞无显著差异。这一结果表明, U87 细胞可能对 L-苯丙氨酸的刺激更为敏感, 其内部的代谢途径可能更容易受到 L-苯丙氨酸的调节, 从而影响硼 [^{10}B] 法仑的滞留时间。相关文献^[9]也提到, 癌细胞在代谢上具有一定的特殊性, 可能更容易受到外界因素的影响, 本研究中 U87 细胞的这一表现与此观点相符。

后将 HMC3 与 U87 细胞对比, 细胞培养无苯丙氨酸孵育组 U87 与 HMC3 的硼浓度无显著差异, 但经 L-苯丙氨酸孵育后, U87 硼浓度显著高于 HMC3, 部分有统计学差异。

这一结果为癌症的诊断和治疗提供了潜在的思路。有研究表明, 利用癌细胞与正常细胞在代谢和物质摄取上的差异, 可以开发出更具针对性的诊断和治疗方法^[10]。本研究中 L-苯丙氨酸孵育后癌细胞硼浓度的显著增加, 可能为基于硼中子俘获疗法等癌症治疗手段提供了新的靶点和策略。

8 讨论

本研究探讨了 L-苯丙氨酸与硼 [^{10}B] 法仑的细胞毒性以及 L-苯丙氨酸对硼 [^{10}B] 法仑滞留时间的影响, 揭示了肿瘤细胞与正常细胞的差异。未来的研究可以进一步深入探究细胞对药物响应差异的分子机制, 以及如何更好地利用这些特性来开发更有效的癌症治疗方法。

参考文献

- [1] Nedunchezian K. Boron neutron capture therapy - A literature review[J]. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 2016: ZE01-ZE04.
- [2] Barth R F, Coderre J A, Vicente M G H, et al. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects[J]. Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2005, 11(11): 3987-4002.
- [3] Sweet W.H., The possible use of neutron-capturing isotopes such as boron 10 in the treatment of neoplasms. I. Intracranial tumors. J Neurosurg., 1952, 9(2): 200-209.
- [4] Soloway A H, Hatanaka H, Davis M A. Penetration of brain and brain tumor VII: tumor-binding sulfhydryl boron compounds[J]. J Med Chem, 1967, 10(4): 714-717.
- [5] Mishima Y. et al., New thermal neutron capture therapy for malignant melanoma: melanogenesis-seeking ^{10}B molecule-melanoma cell interaction from in vitro to first clinical trial. Pigment Cell Res., 1989, 2(4): 226-234.
- [6] Yin J, Li Y, Han H, et al. Effects of Lysine deficiency and Lys-Lys dipeptide on cellular apoptosis and amino acids Metabolism [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(9): 1600754.
- [7] Audebert M, Dolo L, Perdu E, et al. Use of the γH2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell Lines [J]. Archives of Toxicology, 2011, 85(11): 1463-1473.
- [8] Romers R F, Nicklisch S C T. Interactions of Environmental Chemicals and Natural Products With ABC and SLC Transporters in the Digestive System of Aquatic Organisms [J]. Frontiers in Physiology, 2022, 12.
- [9] Yang J, Shay C, Saba N F, et al. Cancer metabolism and Carcinogenesis [J]. Experimental Hematology and Oncology, 2024, 13(1).
- [10] Tang Q, Wu S, Zhao B, et al. Reprogramming of glucose metabolism: The hallmark of malignant transformation and target for advanced diagnostics and Treatments [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2024, 178: 117257.