

新型靶向光敏剂诱导 Hep-2 细胞光氧化行为的研究

李东红¹, 李鹏熙¹, 蒋宗林², 郭林峰²

(1. 创伤、烧伤、复合伤国家重点实验室, 第三军医大学大坪医院, 重庆 400042;

2. 西华师范大学, 四川 南充 637002)

摘要: [目的] 研究新型光敏剂 I 诱导 Hep-2 细胞的光氧化行为。[方法] 利用 MTT 法检测光敏剂 I 对 Hep-2 细胞的细胞毒性; 采用活性氧特异性探针 H₂DCFDA 通过激光共聚焦成像观察 Hep-2 细胞中活性氧的生成; 通过测定超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH) 和丙二醛 (MDA) 水平及乳酸脱氢酶 (LDH) 渗漏检测观察 Hep-2 细胞的氧化应激反应。[结果] 无光照时, 光敏剂 I 对 Hep-2 细胞的毒性为零, 但光照后可明显抑制该细胞的生长, 且其光毒性随光照剂量的增加而加强 ($r=-0.962, P=0.001$)。光动力治疗后, 细胞内 DCFDA 的荧光强度逐渐增强, 在 4h 时达到高峰, 随后又逐渐降低; 细胞内 SOD 和 GSH 水平逐渐降低, 3h 后分别降低 42.5% ($P<0.01$) 和 35.0% ($P<0.01$), 而 MDA 含量却随时间延长逐渐增加, 3h 后增加 54% ($P<0.01$)。LDH 的渗出与光照剂量呈正相关 ($r=0.966, P=0.007$)。[结论] 新型光敏剂 I 可有效光诱导 Hep-2 细胞死亡, 而细胞内氧化应激反应可能是其光诱导 Hep-2 细胞死亡的重要作用机制。

关键词: 靶向性光敏剂 I; Hep-2 细胞; 光动力治疗; 氧化应激反应

中图分类号: R73-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)07-0539-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2013.07.B008

Research on the Photooxidative Action in Hep-2 Cells Induced by A Novel Targeting Photosensitizer

LI Dong-hong¹, LI Peng-xi¹, JIANG Zong-lin², et al.

(1. State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Surgery Institute, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Xihua Normal University, Nanchong 637002, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the photooxidative action of Hep-2 cells induced by a novel photosensitizer I. [Methods] The cytotoxicity of photosensitizer I against Hep-2 cells was measured by MTT assay. The formation of active oxygen in the Hep-2 cells induced by photodynamic therapy (PDT) were observed by using an active oxygen specificity probe H₂DCFDA through confocal laser scanning microscopy. The intracellular oxidative stress was investigated by determination of the levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in Hep-2 cells and the effusion of lactic dehydrogenase (LDH). [Results] No toxicity of photosensitizer I on Hep-2 cells was observed when irradiation was not applied. Hep-2 cells were inhibited after PDT, and the photocytotoxicity of photosensitizer I increased with the augmentation of irradiation ($r=-0.962, P=0.001$). After PDT, the fluorescence intensity of DCFDA in cells increased gradually, and reached the peak at 4h, then decreased gradually; the levels of SOD and GSH decreased gradually, with decreased 42.5% ($P<0.01$) and 35.0% ($P<0.01$) respectively 3h after PDT; but the level of MDA increased with the prolongation of time, and increased 54% 3h after PDT ($P<0.01$). The effusion of LDH was positively correlated with irradiation dose ($r=0.966, P=0.007$). [Conclusion] PDT mediated by photosensitizer I can effectively induce the death of Hep-2 cells, and the oxidative stress in cells maybe the main mechanism.

Subject words: targeting photosensitizer I; Hep-2 cells; photodynamic therapy; oxidative stress

光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 是针对肿瘤或非肿瘤疾病出现的一种新的治疗方法。它包括光敏剂和适当波长及剂量的光应用, 两者的联合作用导致活性氧物质 (ROS), 如单线态分子氧、氢氧自由基和超氧阴离子等的产生, 从而导致细胞内的

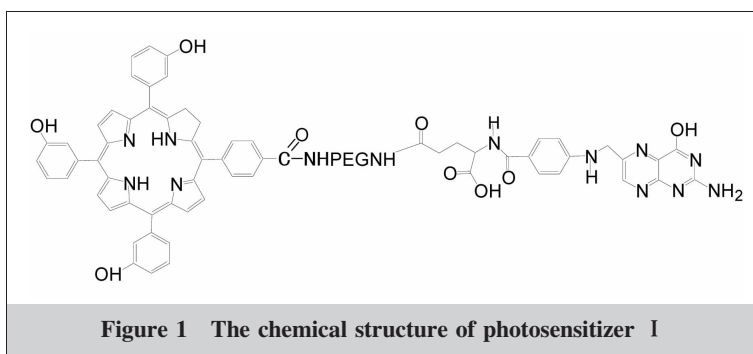
大分子如核酸、蛋白质和脂质体的破坏^[1]。然而组织中光动力反应的机制迄今还不是十分清楚^[2], 一般认为 PDT 的抗肿瘤作用有两种不同的机制^[3]: 一是直接杀死肿瘤细胞、损伤周围血管, 造成肿瘤局部供血不足; 二是破坏血管内皮组织, 引起微血管结构的破坏和微循环功能障碍, 从而导致肿瘤细胞的死亡。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21072227)

收稿日期: 2012-09-17; **修回日期:** 2013-01-16

PDT 抗肿瘤作用的机理主要依赖于光敏剂的种类和浓度、光照剂量、肿瘤细胞的种类及氧的浓度等。

光敏剂 I 是本实验室顺应靶向性光敏剂研发的需求,根据肿瘤细胞叶酸受体阳性表达,正常细胞叶酸受体阴性表达及叶酸与叶酸受体之间高特异性、高选择性结合的特点,通过在光敏剂分子中引入肿瘤靶向分子——叶酸而得到的一种新型的叶酸受体介导的肿瘤靶向性光敏剂 I (Figure 1)。其对叶酸受体阳性细胞的靶向性作用已被证实^[4],本研究进一步考察其对喉癌 Hep-2 细胞的体外光动力活性,并重点研究其介导的 PDT 在喉癌 Hep-2 细胞中引起的氧化应激反应。



1 材料与方法

1.1 材料

人表皮样喉癌 Hep-2 细胞株购于中国科学院上海生命科学研究细胞库,光敏剂 I 由本实验室合成,HPLC 检测纯度达 98%以上。光敏剂溶于无血清培养基 RPMI-1640,配成 0.11mmol/L 的工作液,于 4℃避光保存。细胞培养材料购于 Costar (Dutscher, Brumath, France)。

1.2 试剂

胎牛血清、青—链霉素双抗溶液、0.25%胰蛋白酶 (1X) 溶液及培养基 RPMI-1640 购于 Hyclone (Logan, Utah, USA)。MTT、DMSO 购于 Sigma-Aldrich。总蛋白定量试剂盒 (BCA 法)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒及微量还原型谷胱甘肽 (GSH) 试剂盒购于南京建成生物技术研究所。其他普通化学试剂为上海化学试剂厂生产的分析级试剂。

1.3 仪器

HEPA CLOSS 100 型 CO₂ 恒温培养箱和 1500

全波长酶标仪 (美国 Thermo Electron Corporation); VJ2875 型超净工作台 (苏净集团安泰公司); F4500 荧光光谱仪 (日本 Hitachi); Leica TCS SP2 共聚焦激光扫描显微镜 (德国); KDH150B 红光治疗仪 (输出波长 600~700nm, 北京科电微波电子有限公司); 高速离心机 (湖南湘仪 H1650-W)、分光光度计 (上海欣茂 UV-7504)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养

Hep-2 细胞用含 10%胎牛血清、青霉素(100U/ml)、链霉素(100U/ml)的 RPMI-1640 培养液于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,每 2d 换液。

1.4.2 光动力活性试验

将 5×10⁴/ml 的 Hep-2 细胞接种到可拆卸的 96 孔培养板中,培养至对数生长期后分为 8 个组,除正常对照组外其余各组分别加入光敏剂 I,使其终浓度为 14μmol/L,每组 4 个复孔。培养 24h 后,吸出培养液,冷 DPBS 洗 3 次,换用新鲜培养液,除正常对照组外,其余 7 个组分别用红光治疗仪照射 0、1、2、3、4、5 和 6min,并按公式:光照剂量(J/cm²)=光照密度(W/cm²)×光照时间(s),换算成光照剂量^[5]。照射时,为保证光照的均匀性,各组从 96 孔板上取下,单独进行照射。光束均匀垂直地照射到培养孔上,光斑直径为 10cm,培养孔处于光斑正中。光照后继续于孵箱中培养 24h,然后每孔加 MTT 溶液 20μl (5mg/ml 于 PBS),培养 4h 后弃上清,加入 150μl DMSO,振荡至孔中所有紫色固体溶解均匀,用酶标仪测定 570nm 波长处吸收值,以 DMSO 的空白孔调零,并按下式计算细胞存活率(SR)。SR=实验组 OD 值/对照组 OD 值×100%。实验重复 3 次。

1.4.3 细胞内活性氧(ROS)检测

将细胞接种于 4 块 3.5cm 培养皿中培养过夜。弃培养液,加入新培养基及光敏剂 I,使其终浓度为 14μmol/L,继续培养 24h 后弃上清,DPBS 洗 3 次,加入新培养基,各培养皿分别用红光治疗仪照射 3min,再于不同时相点 (1、2、4、8h) 加入 H₂DCFDA 溶液 (终浓度为 10μmol/L),37℃避光孵育 30min 后弃去培养液,DPBS 洗涤后,用激光扫描共聚焦显微镜观察细胞内活性氧成像,激发波长 488nm,发射波长 520nm,每个时相点选择 4 个视野,每个视野随机

选择数个细胞用软件 Leica TCS SP2, Ver. 1.6.582 分析细胞内平均荧光强度。

1.4.4 细胞内 SOD、GSH 和丙二醛(MDA)的检测

将细胞接种于 5 块 3.5cm 培养皿中培养过夜。弃培养液,加入培养基及光敏剂 I,使其终浓度为 14 μ mol/L,避光继续培养 24h 后弃培养液,DPBS 洗 3 次,加入新培养基,各培养皿分别照射 3min,然后继续培养 0、3、6、12 和 24h。收集细胞,用预冷的 DPBS 洗涤,然后用 0.5ml DPBS 重悬细胞。立即采取冻融法破碎细胞,按试剂盒中说明分别测定细胞破碎液中 SOD、GSH 和 MDA 的含量,同时,按 BCA 试剂盒说明书测定各培养皿中细胞蛋白总量。

1.4.5 LDH 渗漏检测

将细胞接种于 96 孔板中,培育 24h 后弃培养液,加入新培养基及光敏剂 I,使其终浓度为 14 μ mol/L,避光继续培养 24h 后弃上清,DPBS 洗 3 次,加入新培养基,随机分为 5 个组,每组 4 个复孔,各组细胞分别照射 0、1、2、4、6min,按 1.4.2 所示公式计算光照剂量。光照后继续避光培养 24h,按照试剂盒说明书所述步骤检测培养液中 LDH 含量。

1.5 统计学处理

采用 Graph Pad Prism 510 软件(Graph Pad Software Inc., San Diego, CA)进行统计学分析,结果以均值 $\pm$ 标准差表示。组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

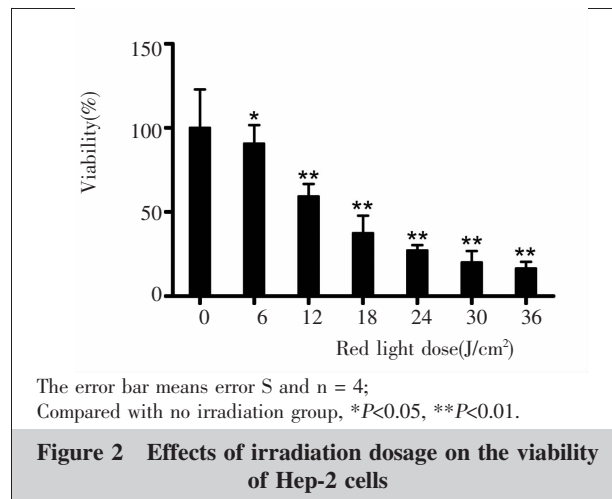
2 结果

2.1 照射剂量对 Hep-2 细胞存活率的影响

光动力治疗过程是光敏剂与光照射协同作用的过程。在培养液中加入光敏剂却不实施光照射时(照射剂量为 0),细胞的存活率仍为 100.0%,即光敏剂自身是没有细胞毒性的(暗毒性为零)。在固定光敏剂浓度(14 μ mol/L)的情况下,Hep-2 细胞的存活率与光照剂量呈负相关,即随光照剂量的增加,细胞的存活率明显下降($r = -0.962, P = 0.001$)。当光照剂量为 6J/cm² 时,Hep-2 细胞的存活率为 90.7%,而当光照剂量增至 36J/cm² 时,Hep-2 细胞的存活率降到 16.4%。其余组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)(Figure 2)。

2.2 Hep-2 细胞内活性氧的测定

非荧光的活性氧自由基特异性探针分子



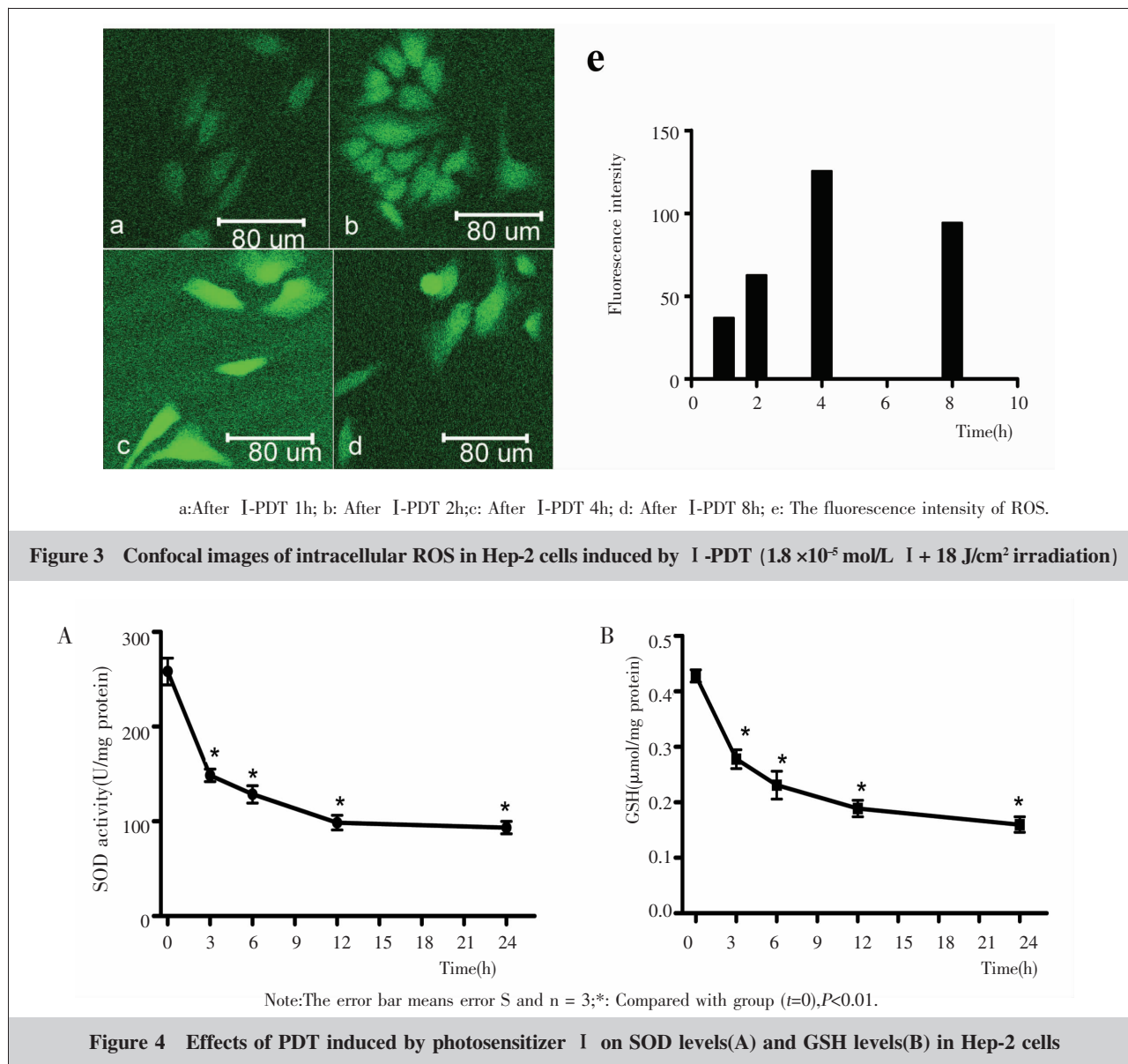
H₂DCFDA 可被活性氧氧化成绿色荧光的 DCFDA 分子,因此通过激光共聚焦监测细胞中 DCFDA 的荧光强度可间接反映细胞内活性氧的生成量。在对 Hep-2 细胞进行光敏剂 I 介导的 PDT 后,细胞内 DCFDA 的荧光强度逐渐增强,在 4h 时达到高峰,随后又逐渐减弱(Figure 3)。

2.3 Hep-2 细胞中 SOD 和 GSH 水平的变化

SOD 和 GSH 均是调节细胞内活性氧自由基浓度的重要因子,细胞内激烈的氧化应激反应往往会导这两种因子含量减少,从而使过量的活性氧自由基无法被清除,细胞最终受到损伤。在光敏剂 I 介导的 PDT 后即刻($t = 0h$),Hep-2 细胞内的 SOD 活性为 258.3U/mg 蛋白,而 3h 后,SOD 活性降为 148.5U/mg 蛋白($P < 0.01$),同样,GSH 水平也从 0.428 μ mol/mg 蛋白降到 0.278 μ mol/mg 蛋白($P < 0.01$);随着时间的延长,Hep-2 细胞内的 SOD 和 GSH 水平继续逐渐降低,到 24h 时,SOD 和 GSH 的水平已分别降到 93.4U/mg 蛋白和 0.16 μ mol/mg 蛋白(Figure 4)。

2.4 Hep-2 细胞中 MDA 水平及培养液中 LDH 活性的变化

丙二醛(MDA)是膜脂过氧化的终产物之一,其含量高低可以作为考察细胞受到胁迫严重程度的指标之一。而培养液中 LDH 活性的高低反应了细胞释放 LDH 的多少,也象征着细胞质膜受到损伤的程度。PDT 后,Hep-2 细胞内的 MDA 含量随着时间的延长逐渐升高,光照后即刻胞内的 MDA 含量为 35.2nmol/mg 蛋白,而 3h 后,MDA 的含量已上升到 54.2nmol/mg 蛋白($P < 0.05$),24h 后更是达到了 97.1nmol/mg 蛋白($P < 0.01$)。PDT 后,培养液中 LDH 的活性也增

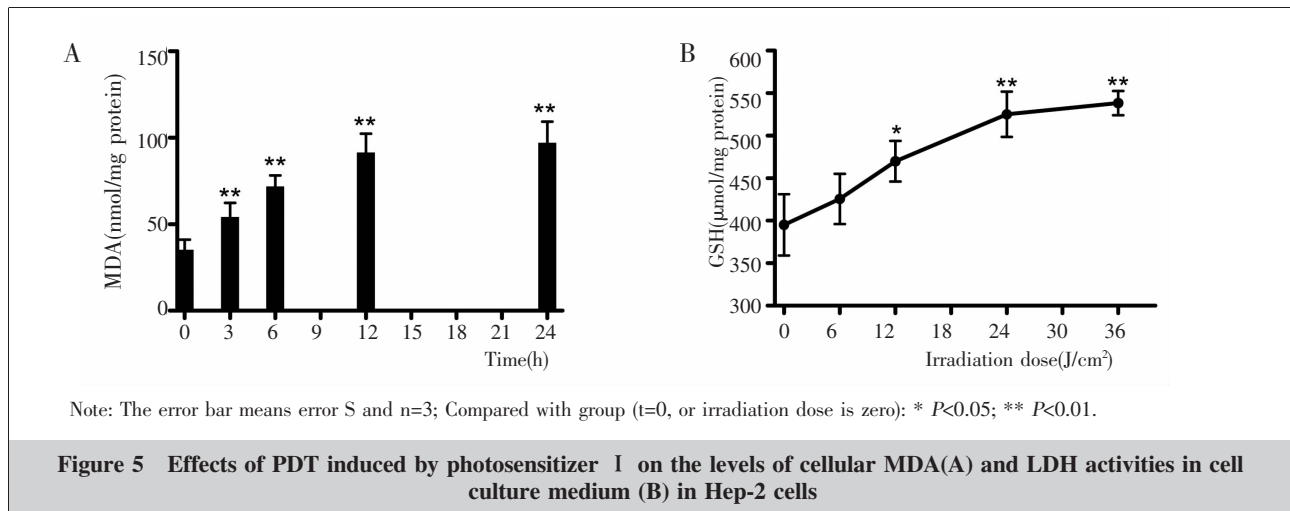


强, 且随光照剂量的增加而升高, 呈正相关性 ($r=0.966$, $P=0.007$)。与未光照时(光照剂量为零)相比, 差异有统计学意义 ($P<0.01$) (Figure 5)。

3 讨论

头颈部肿瘤如鼻咽癌、喉癌等为我国常见的恶性肿瘤之一。由于头颈部区域解剖复杂, 对此区域的肿瘤虽可通过手术、放疗等手段控制, 但通常引起实质性功能紊乱和损坏。PDT 不仅可取得较好的疗效, 并可避免手术治疗引起的毁容或功能丧失, 因而近年来倍受关注^[6,7]。

PDT 是光敏剂分子在受到一定波长的光照射后发生光化学反应从其基态跃迁到激发态, 然后再与周围的氧分子发生反应。反应方式包括两种: ①直接与底物反应, 发生氢或电子的转移生成自由基, 这些自由基再与氧反应生成氧自由基, 并启动生物分子的一系列反应。②直接与分子氧发生能量传递形成单线态氧 1O_2 。通常两种方式是同时存在并相互竞争的, 何种方式占优势取决于光敏剂、底物及氧浓度。然而由于单线态氧 1O_2 与生物分子反应的高效性, 方式 2 在细胞毒性方面起了十分重要的作用^[8]。Milanesio 等^[9]用 5,10,15,20-四-对甲氧基苯基卟啉对 Hep-2 细胞的光动力实验证实了 1O_2 的生成, 且



证明该光敏剂介导的 PDT 主要是通过方式 2 对 Hep-2 细胞产生作用的。

活性氧自由基可引起脂质过氧化反应损伤细胞膜,主要是细胞质膜,使得细胞膜结构和功能上受到损伤,改变膜的通透性,从而影响一系列生理生化反应的正常进行,进而导致细胞死亡,MDA 则是膜脂过氧化的终产物之一,其含量高低可以作为考察细胞受到胁迫严重程度的指标之一。在生理情况下,机体内自由基的产生和分解清除处于一种平衡状态,使自由基维持在一个正常的生理水平上。而生物体内,清除自由基的首要物质是 SOD,它可对抗与阻断因氧自由基对细胞造成的损害,并及时修复受损细胞,复原因自由基造成的对细胞的伤害。其次, GSH 作为体内一种重要的抗氧化剂,也可清除掉人体内的自由基,保护许多蛋白质和酶等分子中的巯基。两者活性的变化可能在 PDT 过程中调节细胞的存活率扮演着重要的作用。

一些研究表明 PDT 可诱导脂质过氧化水平的提高^[10],本研究结果也表明光敏剂 I 介导的 PDT 可诱导 Hep-2 细胞中活性氧的生成,细胞中 SOD 和 GSH 水平逐渐下降,MDA 含量逐渐增高,细胞释放的 LDH 增加,说明生物分子的氧化反应和抗氧化平衡失调,脂质过氧化作用增强,而 Hep-2 细胞的死亡可能就是这些变化的结果。

参考文献:

[1] Saczko J, Chwilkowska A, Kulbacka J, et al. Photooxidative action in cancer and normal cells induced by the use of photofrin in photodynamic therapy[J]. Folia Biol (Praha),

2008, 54 (1): 24-29.

- [2] Kim SY, Kwon OJ, Park JW. Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye [J]. Biochimie, 2001, 83 (5): 437-444.
- [3] Wang ZH, Wang XF, Jiang H, et al. Domestic clinical research progress of photosensitive anticancer drugs[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2012, 17 (1): 107-111. [王子豪, 王雪峰, 江翰, 等. 光敏药物抗肿瘤的临床研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17 (1): 107-111.]
- [4] Li DH, Li PX, Jiang ZL, et al. Photodynamic activity of novel targeting photosensitizer for Hep-2 cells [J]. Cancer Research and Clinic, 2013, 25(1): 1-4. [李东红, 李鹏熙, 蒋宗林, 等. 新型靶向光敏剂 I 对 Hep-2 细胞的光动力抑瘤活性[J]. 肿瘤研究与临床, 2013, 25(1): 1-4.]
- [5] Zhang LN, Li QQ, Zhou ZX. Oxidative stress contributes to the photocytotoxicity of EAHB as a novel photosensitizer to HeLa cells[J]. Acta Biophysica Sinica, 2010, 26 (11): 1064-1071. [张立娜, 李千千, 周志祥. 新型光敏剂分子二乙醇胺基竹红菌乙素光诱导 HeLa 细胞死亡中的氧化应激研究[J]. 生物物理学报, 2010, 26(11): 1064-1071.]
- [6] Gu LL, Zhang J, Qiu RX. Mechanism and research of photodynamic therapy for otorhinolaryngologic tumors [J]. Applied Laser, 2007, 27(5): 435-438. [顾凌澜, 张菁, 仇荣星. 光动力疗法治疗耳鼻咽喉肿瘤的作用机制及研究[J]. 应用激光, 2007, 27(5): 435-438.]
- [7] Fayter D, Corbett M, Heirs M, et al. A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of precancerous skin conditions, Barrett's oesophagus and cancers of the biliary tract, brain, head and neck, lung, oesophagus and skin [J]. Health Technol Assess, 2010, 14(37): 1-288.
- [8] Daicovicu D, Filip A, Ion RM, et al. Oxidative photodamage induced by photodynamic therapy with methoxyphenyl porphyrin derivatives in tumor bearing rats[J]. Folia Biologica (Praha), 2011, 57(1): 12-19.
- [9] Milanesio ME, Alvarez MG, Yslas EI, et al. Photodynamic studies of metallo-5, 10, 15, 20-tetrakis (4-methoxyphenyl) porphyrin: photochemical characterization and biological consequences in a human carcinoma cell line[J]. Photochem Photobiol, 2001, 74 (1): 14-21.
- [10] Saczko J, Skrzypek W, Chwilkowska A, et al. Photo-oxidative action in cervix carcinoma cells induced by HPD-mediated photodynamic therapy [J]. Exp Oncol, 2009, 31 (4): 195-199.