

# 磺化竹红菌乙素对小鼠肝癌细胞 光敏作用研究

乐加昌 王天盾 庞素珍

安静仪 蒋丽金

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

(中国科学院感光化学研究所, 北京 100101)

**摘要** 本文首次研究了小鼠腹水肝癌细胞对于磺化竹红菌乙素(简称磺化乙素 S-HB)摄取的过程, 并对细胞的光敏损伤进行了初步研究。结果表明: 磺化乙素在水中有较大溶解度, 细胞摄取与外界溶液浓度呈相关性, 乙素比较对于细胞的杀伤能力相当, 也能导致细胞膜脂过氧化。

**关键词** 磺化竹红菌乙素, 光敏作用, 小鼠肝癌细胞

竹红菌素(Hypocrellin)是一种新型光敏剂。经研究证明它是一种潜在的光动力治疗新药<sup>[1]</sup>, 由于天然竹红菌素主要成分为脂溶性药物, 临床使用很不方便, 因此开展研究水溶性竹红菌乙素(简称磺化乙素)对于小鼠腹水型肝癌细胞(AH)光动力损伤、扩大竹红菌乙素在临床上的应用提供理论依据有一定意义, 磺化乙素的化学结构式如下, 吸收光谱见图1。

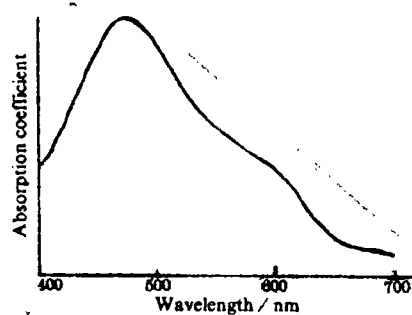
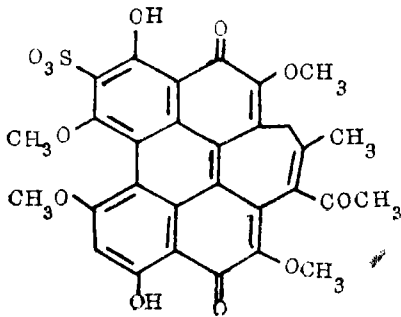


Fig 1. Sulphonated HB absorption spectrum in PBS

## 1 材料与方 法

磺化乙素由中科院感光化学研究所安静仪副教授提供, 直接溶解在磷酸缓冲液(PBS pH 7.4)中。小鼠腹水型肝癌细胞株由中国医学科学院基础研究所吴元德教授提供, 每次取 0.1 ml 细胞接种在昆明小白鼠(体重 25 g)腹腔中, 6—9 d 后, 用注射器将腹水抽出, 用 PBS 洗涤数遍后悬浮于 PBS 中, 调节细胞浓度为  $3 \times 10^6$  个/ml。L-组氨酸, 上海试剂厂产品(分析纯); Vit E、2,6-双特丁基对苯酚(BHT)和 N-对氨基苯甲酰谷氨酸(PABGA)均为 Sigma 公司产品, 其他均为国产分析纯产品。

### 1.1 细胞摄取量测定

国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 初稿 1993-01-11, 修改稿 1993-07-23

磺化乙素进入细胞后, 用 PBS 洗涤 5 遍后再用 0.1 mol/L NaOH 在 70℃ 条件下将细胞消化, 然后在荧光光谱仪上用 470 nm 激发波长、680 nm 发射波长下测定其细胞内的磺化乙素含量。

## 1.2 对细胞的杀伤能力测定

用胎盼蓝排斥法, 以 0.1% 浓度染液按文献[2]方法, 测定细胞存活的百分比。

## 1.3 细胞膜脂的过氧化和内源荧光猝灭的测定

1.3.1 细胞膜脂的过氧化测定 光敏化细胞膜脂质过氧化反应体系中, 产生小分子醛与蛋白质其他氨基酸(主要指赖氨酸), 保温一定时间后产生荧光加合物, 按文献[3]的方法, 将光照的样品在 37℃ 条件下保温 3 h 后, 直接在荧光光谱仪上测定荧光加合物含量(355 nm 激发波长, 430 nm 发射波长)。

1.3.2 细胞膜内源荧光猝灭 内源荧光猝灭主要反映细胞膜蛋白的色氨酸光敏损伤程度。用 280 nm 波长激发, 340 nm 波长发射, 将光照后细胞直接测定其猝灭程度, Stern-Volmer 方程描述结果。

## 1.4 磺化乙素在细胞内的分布

用 Olympus 荧光显微镜, 在 470 nm 波长激发, 大于 600 nm 发射的条件下照相, 直接观察。

## 1.5 光照条件及仪器

用 500 W 卤素灯光光源, 在装有自来水冷却夹套中进行光照, 除特别条件外一般光照强度在 100 J/M<sup>2</sup>·s, 在室温下进行。测试仪器为日立 850 荧光光谱仪, 所有实验数据重复三遍以上。

# 2 结果与讨论

## 2.1 AH 细胞对于磺化乙素摄取时间进程

图 2 A 表示 AH 细胞对于磺化乙素摄取的时间进程, 大约在 1 h(37℃)后达到平衡, 温度和

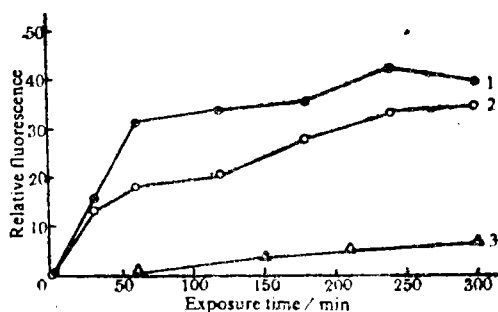


Fig 2 A. The time schedule of S-HB uptake by AH cells  
initial concentration of S-HB 2 μmol/L  
cells concentration 3 × 10<sup>6</sup> cell/ml,  
incubation separately at  
(1) 37℃; (2) 20℃, in PBS;  
(3) 37℃ in DMEM + 10% bovine serum  
fluorescence measured at Ex: 476 nm;  
Em: 680 nm. T = 25℃  
(1) PBS, 37℃ (2) PBS, 20℃  
(3) DMEM + 10% bovine serum, 37℃

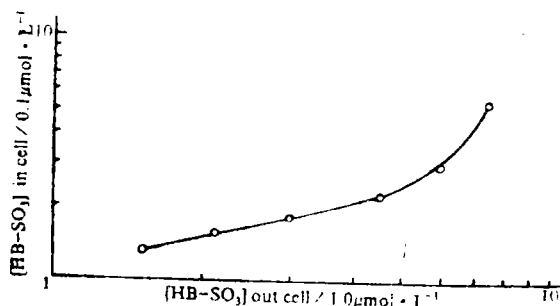
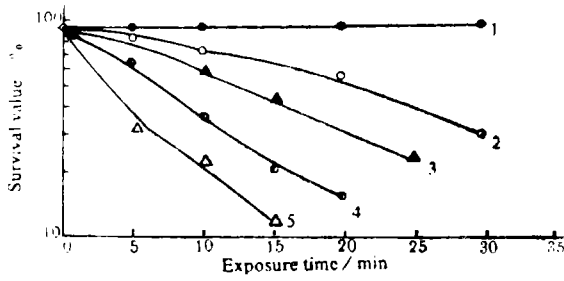
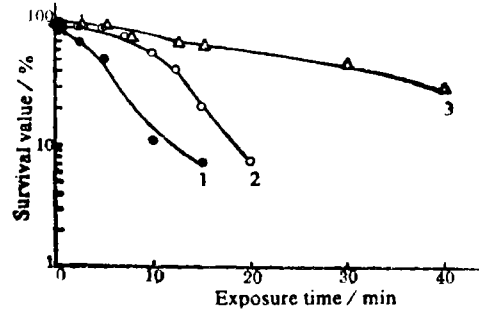


Fig 2 B. The effect of concentrations of S-HB uptake by AH cells  
incubation at 37℃ for 3 h  
fluorescence measured at  
Ex: 476 nm, Em: 680 nm  
T = 25℃

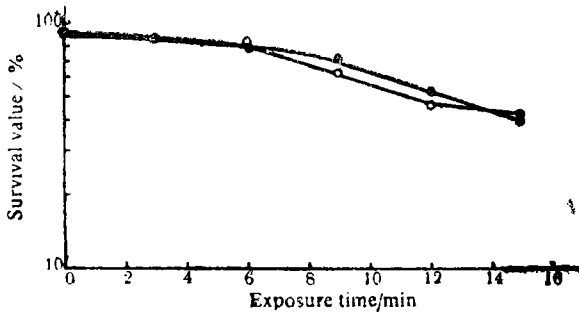
不同外界条件被细胞摄取的速度, 由图可见: 当外界含有牛血清蛋白时磺化乙素被细胞摄取极低。图 2 B 观察了溶液中含有不同浓度磺化乙素时细胞对它摄取的关系, 将细胞内外的磺化乙素浓度取对数作图, 结果说明该化合物被细胞的摄取主要取决于细胞外部的磺化乙素浓度, 并且它的摄取属于扩散型<sup>[4]</sup>。磺化乙素进入细胞后在 10 h 内保持为一常数(数据未列出)。



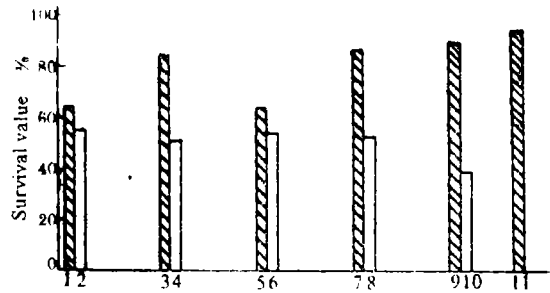
**Fig 3 A.** Survival curves of AH cell for S-HB sensitized photodamage concentrations of S-HB ( $\mu\text{mol/L}$ ), (1) 0, (2) 1.5, (3) 2.5, (4) 4.26; (5) 8.5 cell concentration  $3 \times 10^6$  cells/ml light intensity  $100 \text{ J/M}^2 \cdot \text{s}$  cell counter used trypan blue exclusion,  $T = 25^\circ\text{C}$



**Fig 3 B.** The effect of light intensity for S-HB sensitized photodamage in AH cells light intensity ( $\text{J/m}^2$ ); (1)  $2.78 \times 10^{-2}$ , (2)  $1.12 \times 10^{-1}$ , (3)  $1.67 \times 10^{-1}$  concentration of S-BH  $1 \mu\text{mol/L}$  cell concentration  $3 \times 10^6$  cells/ml



**Fig 3 C.** The comparison of S-HB and HB sensitized photodamage in AH cells the concentration of S-HB or HB  $2.5 \mu\text{mol/L}$  cell concentration  $3 \times 10^6$  cells/ml light intensity  $100 \text{ J/M}^2 \cdot \text{s}$  measurement was the same as Fig 2 A. (●) HB  $2.5 \mu\text{mol/L}$  (○) HB- $\text{SO}_3$   $2.5 \mu\text{mol/L}$



**Fig 4.** The effect of presence radical quenchers and antioxidants for S-HB sensitized photodamage in AH cells  
1. L-His( $10 \mu\text{mol/L}$ )      2. Control  
3. Vit E( $1 \text{ mmol/L}$ )      4. Control  
5. PABGA( $0.1 \text{ mmol/L}$ )    6. Control  
7. BHT( $1 \text{ mmol/L}$ )        8. Control  
9.  $\text{N}_2$                             10. Air  
11. Control(dark)  
S-HB:  $0.2 \mu\text{mol/L}$ , light intensity,  $600 \text{ J/M}^2 \cdot \text{s}$   
Cell counter trypan blue exclusion cell concentration  $3 \times 10^6$  cell/ml  
(▨) add      (□) control

**2.2 对小鼠肝癌细胞的杀伤作用**

图 3 A 是碘化乙素对于 AH 细胞的光敏损伤存活曲线。从图见到随碘化乙素含量的增加，在同等的光照条件下，随着浓度的增加，细胞的损伤加强；当浓度为  $1.5 \mu\text{mol/L}$  时， $\text{ID}_{50}$  的光照剂量为  $1.2 \times 10^5 \text{ J/M}^2 \cdot \text{s}$ ；而当它浓度为  $8.5 \mu\text{mol/L}$  时， $\text{ID}_{50}$  光照剂量为  $400 \text{ J/M}^2 \cdot \text{s}$ 。可见对细胞

的杀伤能力和浓度成正比关系。图 3 B 为碘化乙素与不同光照强度时对细胞的杀伤能力变化情况,随着光照强度的增加,对细胞的杀伤能力增强。图 3 C 为相同条件下乙素和碘化乙素对于 AH 细胞的光敏损伤存活曲线的对照,说明碘化乙素与乙素一样具有很强的光动力杀伤能力。

### 2.3 光敏损伤机理

用单线态氧猝灭剂和抗氧化剂,研究细胞的杀伤机理,从图 4 可见,当样品中分别存在有 L-组氨酸(10  $\mu\text{mol/L}$ )、 $\text{N}_2$ 、以及 PABGA(0.1 mmol/L),并分别与各自对照组一起光照,在上述过程中它们都有明显的保护作用。当存在 Vit E(1 mmol/L)或 BHT (1 mmol/L),并与对照组比较时,能明显保护由脂过氧化引起的细胞损伤。

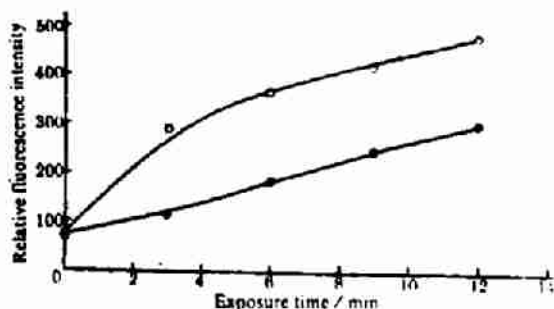


Fig 5 A. The comparison between HB and S-HB sensitized photodamage on lipid peroxidation in AH cells concentration of S-HB or HB 2.5  $\mu\text{mol/L}$  the cell concentration  $3 \times 10^6$  cells/ml, the measurement of sample incubated at 37°C after exposure for 3 h (light intensity, 100  $\text{J/M}^2\cdot\text{s}$ ), fluorescence measured Ex, 355 nm, Em, 430 nm  $T = 25^\circ\text{C}$   
(●) HB-SO<sub>2</sub> 2.5  $\mu\text{mol/L}$ ,  
(○) HB 2.5  $\mu\text{mol/L}$

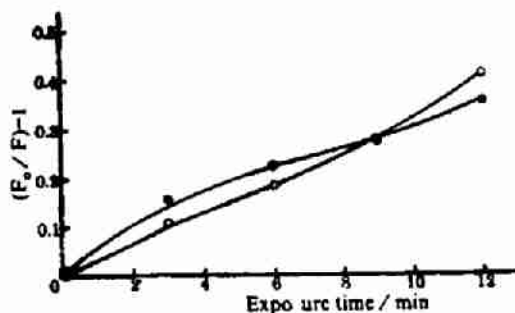


Fig 5 B. The comparison between S-HB and HB sensitized photodamage on the quenching of intrinsic protein fluorescence in AH cells, concentration of S-HB or HB 2.5  $\mu\text{mol/L}$  cell concentration  $3 \times 10^6$  cells/ml light intensity 100  $\text{J/M}^2\cdot\text{s}$  fluorescence measurement Ex, 280 nm, Em, 340 nm,  $T = 25^\circ\text{C}$   
(●) HB-SO<sub>2</sub> 2.5  $\mu\text{mol/L}$ ,  
(○) HB 2.5  $\mu\text{mol/L}$

### 2.4 细胞膜脂过氧化和膜蛋白的光敏损伤

加入乙素和碘化乙素样品,除了对细胞存活比较之外,还对细胞的膜脂过氧化和膜蛋白的损伤进行了对比(见图4)。实验证明碘化乙素和乙素一样能使细胞的膜脂过氧化(见图 5 A),同时也使膜蛋白损伤(用膜蛋白荧光猝灭方法测定)(见图 5 B)。从图 5 可知:碘化乙素和乙素对细胞的损伤效应均随光照时间延长而增加,但乙素在细胞膜脂过氧化能力方面明显大于碘化乙素,而对于膜蛋白的损伤从内源荧光猝灭能力来看两者相差不多。

### 2.5 碘化乙素在细胞内的分布

用荧光显微镜照相,结果见图 6。从图可见碘化乙素主要分布在细胞膜上,也有一部分进入了细胞浆,而乙素在细胞内的分布,根据以前的观察,主要聚集在细胞膜的位置<sup>[5,6]</sup>。



Fig 6. Fluorescence photomicrograph S-HB 2  $\mu\text{mol/L}$ , 37°C, for 1h, Ex, 470 nm, Em, incubation at 600 nm

### 3 小 结

上述研究表明,磺化乙素和乙素一样,具有很强的光动力作用。由于磺化乙素能直接溶解在水溶液中,给临床应用带来方便,磺化乙素由于改变了乙素的物理化学特性,细胞光敏损伤的靶部位与细胞摄取的动力学过程均有明显的差别。(1)从图3C细胞存活能力的比较,看到两者对于整体细胞的存活能力影响基本一致。但从图4A上观察两者对于细胞膜的脂过氧化能力比较,乙素明显大于磺化乙素;从图6荧光显微照片上看到磺化乙素不仅能进入细胞膜,而且还有相当一部分进入了细胞更深入的部位,说明磺化乙素除了一部分进入细胞膜起光敏作用之外,还有相当部分进入细胞内其他细胞器中起光敏作用。(2)一般脂溶性药物容易进入细胞膜内且速度快,如乙素进入细胞的速度约几分钟就达到平衡;而磺化乙素进入细胞的速度慢,约60 min才达到平衡。细胞的摄取能力仅是溶液中的十分之一左右,进入细胞主要依靠扩散作用;溶液中存在血清蛋白时,对细胞的摄取有阻碍作用。(3)上述磺化乙素是在第五位置上的磺化产物,另外也较第13位置上磺化乙素生物特征,发现13位置的磺化乙素不如5位置的磺化乙素(数据未列出),说明磺化乙素的位置对于细胞光生物活性有重要意义,有关磺化乙素其他的光生物特征正在研究中。

### 参 考 文 献

- 1 蒋丽金.科学通报,1990,21:1608
- 2 张鸿卿,连幕兰 主编.细胞生物学实验方法与技术,北京:北京师范大学出版社,1992:28
- 3 Tadao Ohyashihi, et al.,Archives of Biochemistry and Biophysics,1992, Vol.284, 2
- 4 孙继山,张 莉,乐加昌等.生物物理学报,1992,8(2):269
- 5 王家珍,程龙生.生物物理学报,1987,1:33
- 6 郭绳武,唐德将,叶忠全.生物物理学报,1987,1:69

## SULPHONATED HYPOCRELLIN B SENSITIZED PHOTODAMAGE TO ASCITIC HEPATOMA CELLS

Yue Jiachang    Wang Tidun    Pang Suzhen

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101)

An Jingyi    Jiang Lijing

(Institute of Photographic Chemistry, Academia Sinica, Beijing 100101)

**ABSTRACT** In this paper the cellular uptake of sulphonated hypocrellin (S-HB), as well as photodamage on cellular viability, lipid peroxidation and intrinsic fluorescence quenching of membrane protein was studied.

It was found that S-HB suitable dissolved in aqueous solution, its cellular uptake is slower than HB. The photodamage on cellular viability both photosensitizers was close to each other, however the photosensitizers were different in physical and chemical properties. The HB photodamage target of cells was membrane, but the sulphonated HB photodamage target of cells may be part of organelles, besides the membrane. The experiments showed the sulphonated HB would be suggested as a potential advantage for photodynamic therapy of tumor in clinical application.

**KEYWORDS** Sulphonated hypocrellin B, Photosensitization, Ascitic hepatoma cell