

# 血卟啉对癌细胞 DNA 光敏化作用的一种可能机制：促进 DNA 与蛋白质的交联

陈去恶 何建 苏瑞珍 周啟玲 窦娟娟

(中国科学院生物物理研究所)

**摘要** 将人类肝癌细胞, 7703株, 悬于 PBS 中, 与血卟啉一起在 37℃ 保温一小时; 然后用 340—370 nm 的紫外线在 4℃ 照射 32 分钟 ( $\sim 3.94 \times 10^{-2} \text{J/cm}^2 \cdot \text{min}$ ) 用 Fornace 和 Kohn 的与蛋白酶处理相结合的碱液洗脱法测定细胞 DNA 的单链断裂和交联。得到三个结果: (1) 在细胞与血卟啉 (3.1—50.0  $\mu\text{g/ml}$ ) 一起保温的一小时中, 发生 DNA 降解。(2) 血卟啉 (50  $\mu\text{g/ml}$ ) 的光敏化作用会使 DNA 交联作用增多 1 倍 ( $P < 0.01$ )。 (3) 在血卟啉光敏化作用所产生的交联物中的 DNA, 有 87% 是与蛋白质交联的。由于血卟啉促进细胞 DNA 交联作用尚未见于以往文献, 作者认为在考虑用血卟啉作敏化剂的癌的光辐射治疗中细胞杀伤机制时, 不能忽视这种现象。

**关键词** 血卟啉, 光敏化作用, 紫外线照射, 肝癌细胞, DNA 蛋白质交联作用

## 引言

血卟啉(HP)作为一种光敏化剂, 注射入体内后倾向于聚集到肿瘤组织中。在目前的人体肿瘤光辐射治疗中, 它是唯一可实用的光敏化剂。但血卟啉光敏化作用对细胞杀伤的机制至今还不清楚, 虽然已考虑到是由于造成细胞膜和 DNA 的损伤。最近 Moan 等<sup>[1]</sup>的工作表明, 血卟啉光敏化作用引起人类癌细胞 NHIK 3025 的失活, 与胞膜的损伤没有明显的对应关系。现在所知道的细胞 DNA 受损伤的可能机制是: 由于血卟啉光敏化作用所产生的单态氧有选择地破坏了 DNA 中的鸟嘌呤<sup>[2]</sup>, 使受破坏处形成一个对碱敏感的位点<sup>[3]</sup>, 然后在细胞受检测的过程中 DNA 被碱处理而变性, 同时碱敏感位点就变成一个 DNA 的单链断裂<sup>[3,4]</sup>。

可是我们在受血卟啉处理并经紫外线照射的人类肝癌细胞株中没有检出由光敏化作用所造成的 DNA 单链断裂, 却发现血卟啉的光敏化作用会促进 DNA 与蛋白质之间的交联。因此我们认为后者有可能是血卟啉对细胞 DNA 光敏化作用的另一种机制。

## 材料与方 法

培养 7 天的人类肝癌细胞株 7703(中国医科院肿瘤研究所惠给细胞株), 经胰蛋白酶短时处理, 分散在 PBS (pH 6.8) 中。将这种细胞悬液分装于内径 10 mm 的平底玻璃指管中, 然后加入经 PBS 稀释过的血卟啉制剂(北京医药工业研究院生产的注射液)\*, 对照组则加入 PBS。每管最终体积为 0.2 ml, 含细胞  $3.7 \sim 7.6 \times 10^5$  个。全部管都在 37℃ 保温 60 分钟, 让实验细胞摄入血卟啉<sup>[1]</sup>。用上海科仪厂制造的紫外分析仪为照射源, 从样品管下方照射 32 分钟, 照射在 4℃ 冰箱

\* 包装的安瓿上注明为“血卟啉注射液”。

中进行；照射源由电子稳压器供电，以保证剂量率的稳定。经国家计量科学研究所测定，在样品管所在位置 300~400 nm (主要波带为 340~370 nm, 发射峰在 350 nm) 波长范围的剂量率为  $3.94 \times 10^{-2} \text{ J/cm}^2 \cdot \text{min}$ 。以上自细胞与血卟啉接触时起，操作即在暗处进行。

用一种简化的，不需蠕动泵的 Kohn 碱液洗脱法<sup>[5]</sup>测定细胞 DNA 的降解和交联。检查 DNA 交联物的成份时，用 0.1% 胰蛋白酶 (Difco 牌) 代替 Fornace 和 Kohn 等<sup>[6-9]</sup>所用的蛋白酶 K。在进行碱洗脱之前，让微孔滤膜上的交联物受 3 ml 胰蛋白酶溶液在 33°C 处理不同时间。

血卟啉注射剂经稀释 1000 倍后，用 Beckman 3600 型分光光度计扫描出吸收光谱曲线。

## 结 果

我们测得血卟啉的主要光吸收带在 350~400 nm 之间，吸收峰在 372 nm。我们所用的 340~370 nm 主要照射波带的大部份都落在血卟啉的主要吸收带之内，所以可以相信，这种实验条件是足以引起光敏化作用的。实验的主要结果如下：

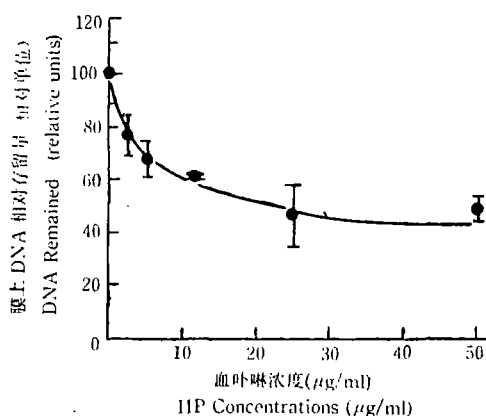


图 1 人类肝癌细胞 7703 与不同浓度血卟啉一起在 37°C 保温 60 分钟中的 DNA 分子降解

Fig 1 DNA degradation of human hepatocarcinoma cells, line 7703, incubated with HP at various concentrations for 60 min at 37°C

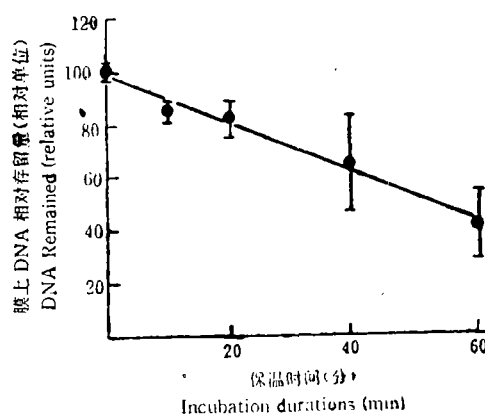


图 2 人类肝癌细胞 7703 与 50 μg/ml 的血卟啉一起在 37°C 保温不同时间的 DNA 分子降解。

Fig. 2 DNA degradation of human hepatocarcinoma cells, line 7703, incubated with 50 μg/ml HP at 37°C for various duration

(1) 人类肝癌细胞与血卟啉一起在 37°C 保温时的 DNA 降解：图 1 表示细胞与不同浓度血卟啉一起在 37°C 保温 60 分钟中的 DNA 降解情况；表现为存留在滤膜上的 DNA 量下降 ( $P < 0.02$ ) 图 2 表示细胞与 50 μg/ml 血卟啉一起在 37°C 保温不同时间中的 DNA 降解，可以见到，保温时间越长，膜上 DNA 存留量越少 ( $P < 0.01$ )

(2) 血卟啉的光敏化作用促进人类肝癌细胞的 DNA 交联：图 3 表示：① 在没有血卟啉存在下，细胞受紫外线照射 32 分钟，发生 DNA 交联；表现为滤膜上 DNA 存留量增高了 30 相对单位，(B-A) ( $P < 0.02$ )。② 当细胞 (其 DNA 已在与血卟啉一起保温时部份地降解) 与 50 μg/ml 血卟啉一起受同样剂量紫外线照射，则膜上 DNA 存留量增高了 63 相对单位 (D-C) ( $P < 0.01$ )。③ 受血卟啉敏化细胞的 DNA 增高量比不受敏化而受同样剂量照射细胞的增高量大一倍 (63:30;  $P < 0.02$ )。这清楚表明，血卟啉的光敏化作用会促进细胞 DNA 交联。

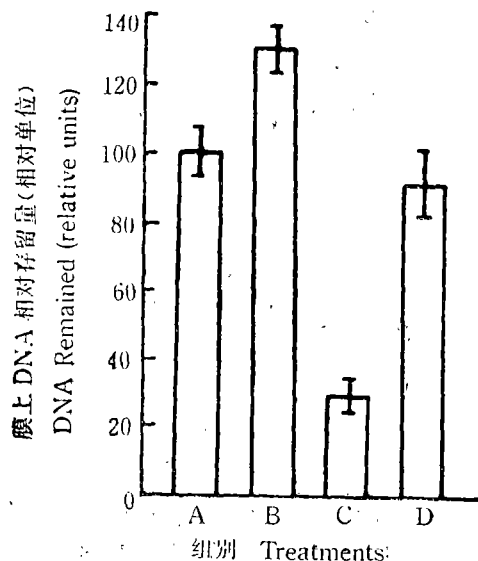


图3 血卟啉光敏化作用促进人类肝癌细胞7703的DNA交联

A = 未经血卟啉处理, 不受紫外线照射;  
 B = 未经血卟啉处理, 受紫外线照射 32 分钟;  
 C = 经 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  血卟啉处理, 不受紫外线照射;  
 D = 经 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  血卟啉处理, 受紫外线照射 32 分钟

Fig. 3 Enhancement of DNA crosslinking in human hepatocarcinoma cells, line 7703, by HP photosensitization;

A) Incubated without HP, un-irradiated.  
 B) Incubated without HP, irradiated for 32 min.  
 C) Incubated with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  HP, un-irradiated.  
 D) Incubated with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  HP, irradiated for 32 min.

射和血卟啉光敏化作用所引起的交联物中的DNA, 约87%是与蛋白质交联的。

## 讨 论

人类肝癌细胞系7703与血卟啉一起在37 $^{\circ}\text{C}$ 保温会引起DNA降解(图1和2),这种意外的结果我们未见于以往文献。无法对其作出解释,也不知道它在肿瘤光辐射治疗中能否有所贡献。Moan等<sup>[4]</sup>曾提出,较低的细胞悬液pH值有利于血卟啉光敏化作用中产生DNA断链,所以我们将PBS调到pH 6.8,但仍未检出DNA单链断裂。

用碱洗脱法结合蛋白酶处理,来检出辐射及化学因素引起的细胞DNA交联,并检验交联物的性质(是DNA-DNA或DNA与蛋白质的复合物),这在文献中已屡有应用<sup>[6-9]</sup>,而且Fornace等<sup>[7]</sup>还指出,此法比以往的其它方法都更灵敏。

就我们所知,目前唯一已证实的血卟啉光敏化作用引起的细胞DNA损伤,是引言中叙述过的单链断裂<sup>[3,4]</sup>。Gutter等<sup>[2]</sup>曾在受300~700 nm白光照射的小牛胸腺DNA与血卟啉的混合溶液中见到DNA发生“集结”(aggregation),但这种结果不是得自细胞材料,他们也没有去检验这种集结物的成份。本研究中见到血卟啉能促进细胞DNA的交联(图3),并证明这种交联物主要是

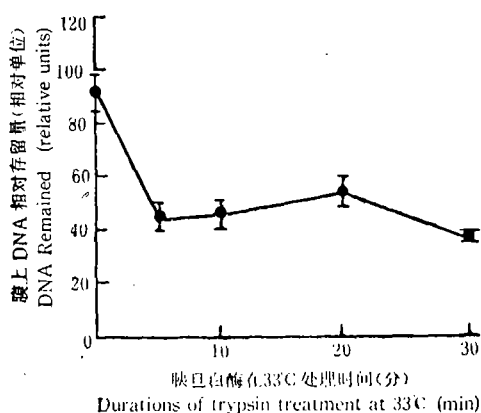


图4 受50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  血卟啉光敏化作用的人类肝癌细胞7703的DNA交联物在滤膜上受胰蛋白酶处理后,膜上DNA相对存留量下降( $P < 0.01$ )。

Fig. 4 Decrement of relative amount of DNA remained on filter of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  HP photosensitized human hepatocarcinoma cells, line 7703, by treating the cross-linked substance on filter with 0.1% trypsin ( $P < 0.01$ ).

(3) 受血卟啉敏化细胞的DNA交联物中绝大部分DNA是与蛋白质交联的。图4表示,受(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )血卟啉光敏化细胞的DNA交联物,在滤膜上受0.1%胰蛋白酶处理5—30分钟,使原来新增高DNA存留部份由63相对单位,下降到平均8相对单位。表明由紫外线照

DNA 与蛋白质的交联复合物(图 4), 血卟啉的这种作用机制, 则可能是将它自己所吸收到的紫外线能量转移给了 DNA 或蛋白质分子, 而使两者发生交联。

我们认为以上结果, 在考虑用血卟啉作敏化剂的肿瘤光辐射治疗中的细胞杀伤机制时, 是不应忽视的。

### 参 考 文 献

- [1] J. Moan, J. B. McGhie and T. Christensen, *Photobiochem. Photobiophys.*, 4, 337—345 (1982).
- [2] B. Gutter, W. T. Speck and H. S. Rosenkranz, *Biochim. Biophys. Acta*, 475, 307—314 (1977).
- [3] E. Boye, and J. Moan, *Photochem. Photobiol.*, 31, 223~228 (1980).
- [4] J. Moan, H. Waksvik and T. Christensen, *Cancer Res.*, 40, 2915~2918 (1980)
- [5] 陈去恶, 周启玲, *生物化学与生物物理进展*, № 1, 37~40(1982).
- [6] A. J. Fornace, and K. W. Kohn, *Biochim. Biophys. Acta*, 435, 95~103 (1976).
- [7] A. J. Fornace, and J. B. Little, *Biochim. Biophys. Acta*, 477, 343~355 (1977).
- [8] K. W. Kohn, and A. G. Ewig, *Biochim. Biophys. Acta*, 562, 32~40 (1979).
- [9] K. W. Kohn, E. A. G. Ewig, L. C. Erickson and L. A. Zwelling, in "DNA REPAIR, A Laboratory Manual of Research Procedures" (ed. by E. C. Friedberg and P. C. Hanawalt), Vol. 1, Part B, pp. 379~401 (1981).

(收到日期 1985 年 5 月 6 日)

## A POSSIBLE MECHANISM FOR HEMATOPORPHYRIN PHOTOSENSITIZATION ON CANCER CELL DNA: ENHANCEMENT OF DNA-PROTEIN CROSSLINKING

Chen Qu-e, He Jian, Su Ruizhen, Zhou Qiling and Dou Juanjuan

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

**ABSTRACT** Human hepatocarcinoma cells, line 7703, suspended in PBS were incubated with hematoporphyrin (HP) at 37°C for an hour and then irradiated by 340—370 nm UV for 32 minutes ( $\sim 3.9 \times 10^{-2}$  J/cm<sup>2</sup>·min) at 4°C. The Fornace and Kohn's method of alkaline elution combined with protease treatment was used for measuring the SSB and crosslink of cell DNA. Three results were obtained: (1) Cell DNA degradation occurred in incubating the cells with HP (3.1—50.0 µg/ml) for an hour. (2) The HP (50 µg/ml) photosensitization enhanced the cell DNA crosslinking by a factor of 2. (3) About 87% of the DNA in crosslinked substance induced by UV in the presence of HP is linked with protein. The enhancement of DNA crosslinking by HP photosensitization reported here has not been found in previous papers so the authors suggest that this phenomenon should not be overlooked in considering the mechanisms of cell killing in photoradiation therapy of cancer using HP as the photosensitizer.

**KEY WORDS** Hematoporphyrin; Photosensitization; UV-irradiation; Hepatocarcinoma cell; DNA-protein crosslinking.