

血卟啉 Y-Hpd 和 Photofrin-II 对肿瘤 细胞光敏损伤的比较:细胞摄 取与光敏化作用

曹恩华 范贤俊*

(中国科学院生物物理研究所)

摘要 本文比较了血卟啉、Y-Hpd 及 Photofrin-II 对 S 180 瘤细胞和 HeLa 细胞光动力学杀伤作用,并定量测定了细胞及脂质体内卟啉化合物的浓度。结果表明:在体外 Y-Hpd 对肿瘤细胞的杀伤作用显著高于 Photofrin-II 和 Hp, 其生物活性顺序是 Y-Hpd、photofrin-II、Hp。与 Hp 和 Photofrin-II 相比, Y-Hpd 所含组分在细胞及脂质体内的浓度最高。由此可见细胞内卟啉化合物的水平是评价不同的血卟啉衍生物制剂生物活性的重要参数之一。

关键词 血卟啉衍生物;光敏剂;光动力学作用;光敏化;脂质体。

前 言

自从 1978 年 Dougherty 等人^[1]首次提出血卟啉衍生物(Hpd)加激光照射治疗恶性肿瘤后,近几年来已发展成为一种新的诊治癌症方法。光敏剂的选择一直是光敏治疗的一个重要环节,目前临床上使用的血卟啉衍生物是一种卟啉的混合物。Dougherty 等人认为以双卟啉醚(DHE)为主要成分的 Photofrin-II (P-II) 具有疗效高、光敏付作用低的优点^[2]。最近几年我国扬州生产的血卟啉衍生物(Y-Hpd)已获得满意的疗效。一些研究者指出它比 P-II 有更强的杀伤癌细胞的作用^[3-4]。而血卟啉衍生物在光物理和光化学性质上差别不大,那末杀伤能力的大小与什么有关呢?本文利用可见光源,选择国产 Y-Hpd, P-II 和血卟啉(Hp)三种光敏剂,以体外培养的肿瘤细胞为材料,在光敏剂加光辐照对细胞杀伤能力进行比较的基础上,研究了细胞摄取与光敏损伤之间的关系。证明了对双分子脂膜有较高渗透能力的 Y-Hpd 能较多地浓集于细胞中,可能是它有较强杀伤肿瘤细胞能力的主要因素。目的在于为临床前评价光敏剂的效力从生物物理学的角度提供理论依据,有助于提高光敏治疗效果。

材 料 和 方 法

1. 光敏剂

扬州光卟啉二钠盐(Y-Hpd)、扬州生物化学制药厂赠送。血卟啉二盐酸盐(Hp),美国 Sigma 公司产品。Photofrin-II (P-II), 美国临床所应用的一种血卟啉衍生物针剂(2.5 mg/ml, 美国 Photofrin Medical Inc. 出产。

* 中国医学科学院肿瘤研究所

2. 细胞培养

S180 瘤细胞(腹水型)、接种于小鼠腹腔中生长 6-7 天后取其腹水、离心收集,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次、制成细胞悬液备用。人子宫颈癌 HeLa 细胞株,培养在含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基的培养皿中,含 3 mmol/L 谷氨酰胺、青霉素 100 单位/ml,链霉素 0.1 mg/ml,在 37℃, CO₂ 含量 7% 温箱中培养。

3. 脂质体

含 150 mg 提纯的大豆磷脂的氯仿-甲醇溶液真空抽干后,加 2.0 ml 的 PBS 缓冲液密封后使其膨胀,然后用 MSE 超声波发生器针形探头进行超声处理,功率 500 W。一般处理 1.5 分钟。

上述制备的脂质体或细胞悬液加入光敏剂(最终浓度 40 μg/ml), 37℃, 保温 1 小时。离心收集细胞、用 PBS 洗去没有结合的光敏剂。脂质体经 Sephadex G 25 分子筛的柱(60 mm × 25 mm)分离得到已结合光敏剂的脂质体。然后进行荧光或吸收光谱测定。

4. 细胞杀伤力的测定

按 Phillips 的 Trypan blue 染料排除法测定细胞活力^[6], 活细胞以排斥染料的细胞占细胞总数的百分比表示。HeLa 细胞的存活曲线测定: 每个皿中(60 mm)含 2×10^2 — 10^4 细胞、加含光敏剂(25 μg/ml)、1% 小牛血清的 DMEM 培养基、保温 2 小时后、在 PBS 缓冲液中照光、照后立即换上新鲜的培养基,培养 10 天,计数活存的细胞数。

5. 辐照光源

灯源为 500 w 的氙灯,用水冷滤光装置滤掉紫外线和红外线,再经透镜聚焦照射到含 S180 瘤细胞的样品上、样品池内温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 光强度为 2.5 kw/M^2 。或者以溴钨灯(1000 w)为灯源照射 HeLa 细胞、含细胞的平皿置于冰浴上,光强度为 1.3 kw/M^2 , 光强度的测定用 BTY-8204 型光辐射仪进行。

6. 含量测定及数据分析

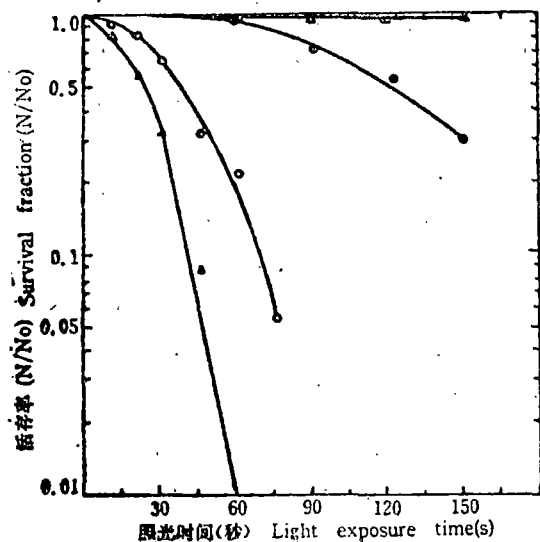
目前各国所使用的血卟啉衍生物制剂并非单一的化合物。其有效成分是具有卟啉基本骨架的混合物。Y-Hpd、P-II 及 Hp 在缓冲液中其最大吸收峰分别为 372 nm、365 nm 及 394 nm, 荧光发射最大峰均为 615 nm。结合于细胞或脂质体后、最大吸收峰分别为 394 nm、390 nm 及 405

图 1 卟啉化合物加光照对 HeLa 细胞活存率的影响。每点代表 3 批实验的平均数。

- △— Control, 对照组, 未经光敏剂处理。
- HP, 照光前用血卟啉, 25 μg/ml, 37℃处理 1 小时。
- P-II, 照光前用 Photofrin-II, 25 μg/ml, 37℃处理 1 小时。
- ▲— Y-Hpd, 照光前用扬州光卟啉, 25 μg/ml, 37℃处理 1 小时。

Fig. 1 The effect of porphyrins plus light exposure on the survival fraction of Hela cells. Each point represents the mean of 3 experiments.

- △— Control, not treated by photosensitizer.
- Hp, treated by hematoporphyrin, 25 μg/ml, 37℃, 1 hr before light exposure.
- P-II, treated by photofrin-II, 25 μg/ml, 37℃, 1 hr before light exposure.
- ▲— Y-Hpd, treated by hematoporphyrin derivative, 25 μg/ml, 37℃, 1 hr before light exposure.



nm, 荧光发射最高峰在 630 nm。考虑到卟啉化合物有自身聚合倾向, 使其荧光量子产率下降。另一方面细胞摄取的有效成分的结构也有差异。因此本文采用它们在较稀的溶液中、并含有待测样品的同一介质分别制定标准曲线。荧光测定用 WFD-9 型或 Hitachi 850 型荧光分光光度计, 在 25℃ 进行测定。用 Unicam SP 1700 型紫外分光光度计测定吸收光谱。

结 果

1. 对 HeLa 细胞活存的影响

HeLa 细胞经光敏剂合并光照后的活存曲线(见图 1), 由图可见细胞存活率随光照时间的增加而下降、单纯的 Hpd 或照光处理对细胞活存无显著影响、Y-Hpd 合并照光后 HeLa 细胞存活率明显下降, P-Ⅱ 作用较弱。

2. 对 S 180 瘤细胞台盼兰(Trypan blue)排斥率的影响

S 180 瘤细胞用光敏剂(40 μg/ml), 37℃ 处理 1 小时后, 除去没有结合的光敏剂后照光 20 分钟, 在冰水中放置 1 小时。用 0.4% 台盼兰染色计数排斥染料的活细胞。由表 1 可见单纯 Hpd 或照光处理对活细胞率无显著影响。与图 1 相比, 两种方法所得结果基本一致。

表 1 用 Trypan blue 排斥试验测定
S 180 瘤细胞的活存率

Table 1 Survival fraction of S 180 tumour cells
determined by trypan blue exclusion test

卟啉化合物 Porphyrins	N	活细胞率 Cell Viability		
		Mean	S. D.	P value
—	5	94.50	1.03	
Hp	5	88.30	1.40	0.01 ¹
P-Ⅱ	5	77.80	4.95	0.02 ²
Y-Hpd	5	54.60	4.90	0.01 ³

1. Comparing with Control 2. Comparing with control and Hp 3. Comparing with control, Hp and P-Ⅱ.

1. 与对照组比较, 2. 与对照组、Hp 组比较, 3. 与对照组、Hp 组、P-Ⅱ 组比较。

3. 细胞摄取量的测定

将新鲜制备的活细胞或经冰冻破裂的 S180 瘤细胞、经光敏剂(40 μg/ml), 37℃ 保温 1 小时后, 前者低速离心去除没有结合的光敏剂, 后者用三倍体积的 95% 乙醇沉淀。所得到的细胞或细胞沉淀物分别进行荧光定量分析, 计算细胞内光敏剂的含量、结果见表 2。所试的三种卟啉化合物均能被细胞摄取, 但摄取量以 Y-Hpd 最高、P-Ⅱ 次之、Hp 进入细胞量最少。各组之间统计学上均有显著和非常显著差异。当膜受损、光敏剂直接与细胞内蛋白质相互作用、Y-Hpp 及 P-Ⅱ 结合量增加, 两组之间无显著差异, Hp 的结合量变化不大。

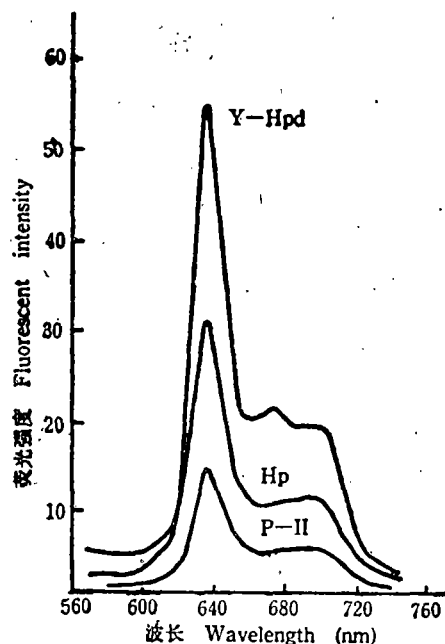


图 2 脂质体—卟啉化合物的
荧光光谱(λ_{ex} 400 nm)

Fig 2. Fluorescent spectra of porphyrin-phospholipid. (λ_{ex} 400 nm)

表2 细胞及脂质体内卟啉化合物的含量

Table 2. uptake Quantity of Hp, Y-Hpd and P-II in cell and liposome

卟啉化合物 Porphyrins	细 胞 Cells (fg/cell)		脂质体 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) liposome ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
	完整的 Intact	破裂的 Ruptured	
Hp	148 ± 9.8	131 ± 17.3	0.34 ± 0.06
P-II	$228 \pm 9.8^*$	$435 \pm 47.3^{**}$	$4.03 \pm 0.09^{**}$
Y-Hpd	$322 \pm 24.0^{**}\Delta$	$425 \pm 46.0^{**}$	$5.87 \pm 0.41^{**}\Delta\Delta$

与 Hp 组比较
Comparing with Hp

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

与 P-II 组比较
Comparing with P-II

$\Delta P < 0.05$

$\Delta\Delta P < 0.01$

4. 通过双分子脂膜的能力

脂质体仅含双分子脂膜与细胞膜有相似的特性。脂质体加光敏剂($40 \mu\text{g}/\text{ml}$), 在 37°C 保温 1 小时后, 用 Sephadex G-25 柱分离得到结合光敏剂的脂质体, 再分别进行荧光扫描和吸收光谱测定。当用 400 nm 波长激发, 其荧光发射峰在 630 nm (见图 2)。测定 390 nm 的光吸收值, 对照相应的标准曲线计算每毫克脂质体所结合的光敏剂的重量(见表 2)。经方差分析, 各组间均有非常显著差异($P < 0.01$)。比较表 2 内细胞吸收与脂质体结合的光敏剂量有类似的规律。

如将结合光敏剂的脂质体用 2 mol/L HCl 处理半小时、处理组与对照组再经 Sephadex G-25 柱分离, 两组样品所得结果无明显差别。表明光敏剂已进入脂质体内。

倘若在相同的条件下, 用相同量($5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)的光敏剂猝灭细胞蛋白质内源性荧光(335 nm), 对应于 Hp、Y-Hpd 和 P-II, 其细胞蛋白质荧光强度分别是原来的 83%、72% 和 63%。猝灭荧光的能力是 P-II 最强, 表明 Y-Hpd 和 P-II 结合于蛋白质的部位及其结合量可能有差别。

讨 论

在以前的工作中, 我们曾观察到 P-II 与组蛋白的结合常数大于 Y-Hpd、照光后与蛋白质反应生成的新的荧光衍生物的荧光强度也较高^[6]。由于该试验是在纯蛋白质的系统中进行的。因此并不能反映细胞体系与血卟啉衍生物的相互作用。在研究光敏剂对细胞的光敏损伤时, 细胞内的剂量是不可忽视的一个重要因素。

本文采用了细胞的存活曲线、台盼兰排斥试验、观察光敏剂的生物学作用, 同时利用活细胞和人工双分子脂膜与光敏剂的相互作用, 分析光敏剂进入细胞内的剂量。两者之间有很好的相关性。证明国产扬州光卟啉在体外对肿瘤细胞杀伤作用较 P-II 强, 与 Y-Hpd 能较多地通过细胞双分子脂膜、细胞内含量高相关。各种血卟啉衍生物在光物理和光化学性质上差别不大, 在体内肿瘤组织的光敏损伤的重要因素之一是它们在细胞内的浓集能力。因此, 通过细胞双分子脂膜的能力是细胞摄取的基础, 而光敏剂与蛋白质的结合能力与光敏剂在细胞内的滞留有关。Y-Hpd 与 P-II 与蛋白质的结合能力相差不大, 而通过双分子脂膜的能力 Y-Hpd 却明显优于 P-II。Hp 上述两方面的性质均差, 故杀伤肿瘤细胞能力最差。

本文所用的 Y-Hpd 含 40% 左右的 DHE, 而 P-II 含有近 78% 的 DHE, Dougherty 认为 DHE 是血卟啉衍生物的有效成分^[2]。从本文的结果来看, 生物活性的排列顺序与 DHE 的含量似无明显

显联系。最近沈恂等人用高压液相色谱法将 Y-Hpd 分成不同组分, 发现细胞对组分 d 的摄取量最多, 其结构可能与 DHE 不同^[7]。

当然体外实验的结果不一定完全表示在整体情况下各 Hpd 制剂的活性顺序。细胞体外培养由于能控制在比较严格的相同条件下进行试验等优点、已发展成为一种与体内研究相结合的重要实验技术方法。小牛血清的含量以及 Hpd 与细胞温育的时间对细胞摄取有影响。小牛血清对细胞有一定的保护作用, 血清中的一种糖蛋白与卟啉有很强的结合力, 使与细胞结合的卟啉量下降。为减少这一影响, 本实验使用含 1% 小牛血清培养基、采用保温 1 小时, 延长保温时间未观察到结果有明显的变化。本工作对我国已经或正在研究试制的各种光敏剂从另一角度提出科学依据, 并为提高临床光敏治疗效果提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] T. J. Dougherty, J. E. Kanfman, A. Goldfar, K. R. Weishaupt, D. Boylo and A. Mittleman Cancer Res. 38 2628~2635, (1978)
- [2] T. J. Dougherty, D. G. Boyle, K. R. Weishaupt, B. A. Henderson, W. R. Porter D. A. Beilnier and K. E. Wityk, Porphyrin Photosensitization ed by D. Kessel and T. J. Dougherty, P 3-13, New York Plenum Press (1983)
- [3] 王耐勤、于刚、梁亚云、叶爱莲、张燕、袁启忠, 药学学报, 21, 7(1986)
- [4] 傅乃武、叶树勇、张谨、赵秀花、张立生, 中国医学科学院学报 7, 422, (1985).
- [5] H. J. Phillips, Tissue culture, Methods and Applications eds by P. F. Krus and M. K. Pattersons P 406, New York and London, Academic Press (1973)
- [6] 曹恩华, 生物物理学报, 1, 247, (1985)
- [7] 沈恂、马海官、张茵、庞素珍、傅迎宪、李新愿、蒋中华、陈秀苇、周晓岗、崔明启、章乃森, 生物物理学报 1, 199(1985)

(收到日期 1986 年 7 月 12 日)

COMPARISON OF THE PHOTSENSITIZING EFFECT OF HEMATOPORPHYRIN, Y-HPD AND PHOTOFRIN-II ON TUMOUR CELLS: CELLULAR UPTAKE AND PHOTSENSITIZATION

Cao Enhua

Fan Xianjun*

(Institute of Biophysics, Academia Sinica,* Institute of Cancer, Chinese Academy of Medical Sciences)

ABSTRACT In this paper, the photodynamic effects of hematoporphyrin, Y-Hpd (which is prepared by Yangzhou Biochemical Pharmaceutical Co.) and photofrin-II on S180 tumour cells and HeLa cells were compared, with each other the concentration of three porphyrins in S180 tumour cells or liposome were assayed after cellular uptake. In vitro the photodynamic cell killing activity of Y-Hpd was significantly higher than that of hematoporphyrin and photo-frin-II, their biological activity order is as follows: Y-Hpd, photofrin-II, hematoporphyrin. Comparing with hematoporphyrin, photofrin-II, the concentration of Y-Hpd was the highest in S180 tumour cells or liposome. It is indicated the level of porphyrins in cells is one of the important factors for evaluating their biological activity.

KEY WORDS Hematoporphyrin derivative, Photosensitizer, Photodynamic effect, Photosensitization, Liposome