文章编号:1000-5404(2006)14-1457-04

论著

MPPa 光动力作用对鼻咽癌细胞生长抑制的初步研究

许川山[1,2,3],Albert Wing Nang Leung[2],杨 青[3] ([1]重庆医科大学超声影像学研究所,重庆 400010;[2]School of Chinese Medicine & Health Care,Chinese University-Tung Wah Community College,Hong Kong;[3]第三军医大学西南医院整形外科,重庆 400038)

提 要:目的 观察 MPPa 光动力作用对人鼻咽癌细胞生长的抑制作用及可能机制。**方法** 采用倒置显微镜观察和 MTT 法检测 MPPa 光动力作用后人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞生长状况;应用膜联蛋白 Annexin V-PI 双染结合流式细胞仪分析和细胞核染色观察 MPPa 光动力作用后人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞凋亡的发生情况;罗丹明 123 结合流式细胞仪分析 MPPa 光动力作用后人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞线粒体膜电位的变化。**结果** MPPa 光动力作用显著抑制人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞的生长,在低浓度 MPPa 和低能量密度光照条件下其抑制作用呈剂量效应关系,倒置显微镜下观察到 MPPa 光动力作用组癌细胞数量显著减少,细胞脱落、固缩;MPPa 光动力作用人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞发生凋亡和继发性坏死的比率均显著高于单纯光照射组、单纯 MPPa 光敏剂处理组和假照射组($P<0.01$),而单纯光照组、单纯 MPPa 光敏剂处理组和假照射组三对照组间无明显差异($P>0.05$),Hoechst33258 细胞核荧光染色荧光显微镜下观察到 MPPa 光动力作用后癌细胞核固缩、碎裂,可见凋亡小体。MPPa 光动力作用人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞线粒体膜电位下降。**结论** MPPa 光动力作用不仅能有效抑制诱导人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞生长,而且可诱导其发生凋亡,且 MPPa 光动力作用可能通过线粒体通路诱导鼻咽癌细胞凋亡。

关键词: 光动力治疗;MPPa;鼻咽癌细胞;细胞凋亡;线粒体膜电位
中图法分类号: R329.24;R454.2;R739.63 **文献标识码:** A

Photodynamic inhibition of pyropheophorbide-a methyl ester in human nasopharyngeal carcinoma cells

XU Chuan-shan[1,2,3], Albert Wing Nang Leung[2], YANG Qing[3] ([1]Institute of Ultrasound, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010; [2]School of Chinese Medicine & Health Care, Chinese University-Tung Wah Community College, Hong Kong; [3]Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore photodynamic inhibition of pyropheophorbide-a methyl ester (MPPa) in nasopharyngeal carcinoma cells and the mechanism. **Methods** The poorly differentiated CNE2 cell line was chosen to investigate the photocytotoxic potency and efficacy of MPPa 24 h after PDT by MTT reduction assay. The apoptosis of CNE2 cells was analyzed 8 h after photosensitization of MPPa (2 μmol/L) under red light irradiation at a light dose of 2 J/cm^2 by flow cytometry with Annexin V-FITC and PI staining and nuclear staining with Hoechst 33258, and the changes in mitochondrial membrane potential ($\triangle\Psi m$) were monitored by flow cytometry with Rhodamine123 staining. **Results** Drug- and light-dose response curves were observed, showing that MPPa mediates a dose- and light-dependent phototoxicity in the NPC/CNE2 cells. MPPa could significantly trigger the NPC/CNE2 cells into apoptosis and the collapse of $\triangle\Psi m$ were observed in the NPC/CNE2 cells treated by PDT with MPPa. **Conclusion** MPPa can effectively photokill the NPC/CNE2 cells and induce apoptosis as a prominent mode of cell death probably through mitochondria-initiated apoptosis pathway.

Key words: photodynamic therapy; MPPa; nasopharyngeal carcinoma; apoptosis; mitochondrial membrane potential

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300468),全军医学科研"十五"计划青年基金资助项目(01Q102),香港浸会大学 Faculty Research Grant(FRG)基金资助项目(FRG/03-04/L-17),重庆市中医药管理局科学基金资助项目(渝中医[2004]12 号),重庆市卫生局科学基金资助项目(渝卫科技[2004]53 号)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300468), the Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" for Medical Science Development of PLA (01Q102), Faculty Research Grant of Hong Kong Baptist University (FRG/03-04/L-17), the Scientific Research Fund by Chongqing Administration of Traditional Chinese Medicine ([2004]12) and the Scientific Research Foundation of Bureau of Public Health of Chongqing ([2004]53)

作者简介: 许川山(1972-),男,湖南省洞口县人,博士,副研究员,主要从事光动力治疗基础与应用方面的研究,发表论文 40 余篇,现在重庆医科大学医学超声工程研究所从事博士后研究工作。电话:(023)60606025

收稿日期: 2005-06-06;**修回日期:** 2005-07-28

光动力疗法（photodynamic therapy，PDT）是随着光纤技术和激光医学发展而兴起的一种治疗肿瘤的新方法。鼻咽癌（nasopharyngeal carcinoma，NPC）是东南亚及我国南方各省常见的一种恶性肿瘤，光动力治疗有望为人类攻克鼻咽癌提供新的手段[1,2]。光敏剂的选择是光动力治疗中的关键和核心问题。目前临床应用的光敏剂均为多种卟啉及其衍生物的混合物，给药后需避光1～2个月，限制其在临床上的广泛应用。MPPa（pyropheophorbide-a methyl ester）是近来开发成功的一种新型光敏剂，成份单一，化学结构明确，性质稳定，在体内吸收代谢快，避光时间短，光敏活性强，是一种很有发展前景的新型光敏剂[3]。本研究以人鼻咽癌细胞株CNE2细胞为研究对象探讨MPPa介导的光动力杀伤作用，为更广泛和更好地临床应用MPPa奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及配制

光敏剂MPPa：美国Sigma-Aldrich公司产品，分子量为548.7，以丙酮为溶剂配制成浓度为1 mmol/L贮存液，过滤除菌后避光保存于－20 ℃的冰箱中备用；小牛血清、胰蛋白酶、RPMI1640细胞培养基：美国Hyclone公司产品；亚甲基噻唑蓝（MTT）：美国SUB公司产品，以PBS缓冲液配制成5 mg/ml应用液；Annexin V-PI双染检测试剂盒：Vybrant™ Apoptosis Assay Kit #3（Molecular Probes）。荧光染料Hoechst33258和罗丹明123（Rhodamine123）：美国Sigma公司产品。

1.2 细胞培养

人鼻咽癌细胞株CNE2细胞（香港浸会大学中医药学院保存）在含10%小牛血清的RPMI1640细胞培养液中，37 ℃ 5% CO_2常规细胞培养、传代。

1.3 实验分组及光动力处理

将对数生长期的CNE2细胞随机分成实验组和对照组。实验组为MPPa光动力实验组（即加光敏剂和照光），对照组包括单纯光照对照组（不加光敏剂，只照光）、单纯MPPa对照组（只加光敏剂不照光）和空白对照组（不加光敏剂的假照射组，除不加光敏剂和照光能量密度为0 J/cm^2外其余处理条件与光动力实验组一致）。每组设3复孔，换液后光动力实验组及单纯光敏剂对照组在暗室中加入终浓度为2 μm的MPPa，单纯光照对照组和空白对照组加入等量RPMI1640培养液，37 ℃ 5% CO_2孵育20 h，去掉含MPPa的RPMI1640培养液，用PBS缓冲液冲洗两遍后，再换成新的含10%小牛血清RPMI1640培养液；光动力实验组及单纯光照组使用红光照射，光源为400 W的石英卤素灯，红光经中心波长为610 nm的颜色滤光镜过滤获得，调整光斑面积使各组细胞实际接受到的光能量密度达到2 J/cm^2。

1.4 MTT比色法检测细胞生长状况

取对数生长期的人鼻咽癌细胞株CNE2细胞，每孔按2×10^4/ml个细胞接种于96孔培养板，24 h后进行分组及光动力处理。各组细胞经实验处理后继续培养18 h，加入MTT溶液（5 mg/ml）20 μl，37 ℃ 5% CO_2孵育6 h，每孔加入150 μl二甲基亚砜（DMSO），振荡使结晶物充分溶解。选择570 nm波长，在酶联免疫检测仪上检测各孔的光密度值（OD）值，取平均值，按公式计算其生长抑制率。在倒置显微镜下观察选择光动力作用后鼻咽癌细胞株CNE2细胞生长状况并拍照。

1.5 膜联蛋白Annexin V-PI双染结合流式细胞仪检测细胞凋亡

选取对数生长期的人鼻咽癌细胞株CNE2细胞，按2×10^4/ml接种于24孔培养板，12 h后进行分组及光动力处理。4组细胞经实验处理后37 ℃ 5% CO_2培养8 h，收集细胞，Annexin V-PI双染严格按Vybrant™ Apoptosis Assay Kit #3（Molecular Probes）说明书操作，采用Elite ESP流式细胞仪上机检测，使用单一氩离子激光器，其激发波长为488 nm，发射波长分别为515～545 nm（Annexin V-FITC）和563～607 nm（DNA-PI），每个标本检测1×10^5个细胞，用Cell Quest软件进行分析。

1.6 Hoechst33258细胞核染色法观察细胞凋亡

选取对数生长期的人鼻咽癌细胞株CNE2细胞，按1×10^5/ml接种于6孔培养板，12 h后进行分组及光动力处理。4组细胞经实验处理后37 ℃ 5% CO_2培养8 h，弃培养液后以冷PBS液洗2次，用加入荧光染料Hoechst33258至5 μg/ml，37 ℃暗处染色5 min，在荧光显微镜下经紫外光激发观察并照相。

1.7 流式细胞仪检测线粒体膜电位

选取对数生长期的人鼻咽癌细胞株CNE2细胞，按1×10^5/ml接种于24孔培养板，12 h后进行分组及光动力处理。各组细胞经实验处理后37 ℃ 5% CO_2培养8 h，制成单细胞悬液，PBS液洗2次，加入Rhodamine123（10 μg/ml）在37 ℃孵育30 min，离心1 000 r/min离心5 min，PBS液洗3次，流式细胞仪测定荧光强度反映线粒体膜电位，测定条件：激发波长488 nm，发射波长525 nm，每份样品随机计数2 000个细胞。同时以C-30软件采集，储存并分析数据。

1.8 统计学分析

资料用$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析和t检验。

2 结果

2.1 MPPa光动力作用对人鼻咽癌细胞株CNE2细胞生长抑制作用

不同浓度MPPa在不同能量密度的红光作用下人鼻咽癌细胞株CNE2细胞生长的改变结果见图1。

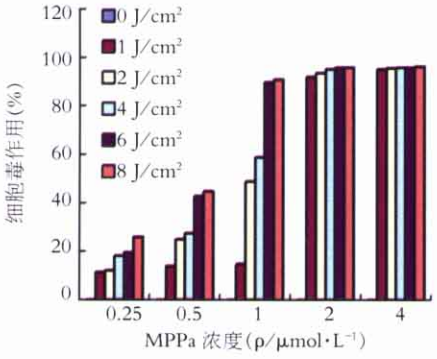
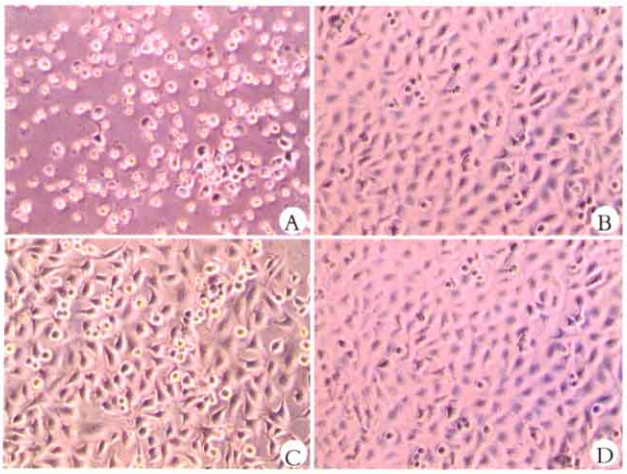


图 1　不同浓度的 MPPa 在不同光剂量作用下对人鼻咽癌细胞 NPC/CNE2 的光细胞毒作用

从图 1 可以看出：①光敏剂 MPPa 介导的光动力作用对人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞生长具有明显抑制作用，且其抑制作用呈剂量效应关系；光敏剂 MPPa 浓度越高，其杀伤作用越强。统计学分析各浓度组差异显著（$P<0.05$）；浓度在 2 μm 以下、能量密度在 6 J/cm² 以下，相同 MPPa 浓度的各能量密度组间其生长抑制作用相差显著，且随着能量密度的增加，其生长抑制率升高更明显（$P<0.05$），但在 6～8 J/cm² 间，各 MPPa 浓度组间其生长抑制作用差异不明显（$P>0.05$），MPPa 浓度在 2 μm 时各能量密度组间其生长抑制作用差异不显著（$P>0.05$）；②单纯光照和单纯光敏剂 MPPa 处理对人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞均无显著抑制作用（$P>0.05$）。

倒置显微镜下观察到 MPPa 光动力作用组癌细胞表现为数量显著减少，细胞脱落、固缩；单纯光照和单纯光敏剂 MPPa 处理对人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞生长状况无明显影响（图 2）。



A：假照射组；B：单纯光照组；C：单纯 MPPa 处理组；D：MPPa 光动力作用组

图 2　2 μmol/L MPPa 在 2 J/cm² 的光剂量作用下对人鼻咽癌细胞 NPC/CNE2 的光细胞毒作用　（相差显微镜×100）

2.2　MPPa 光动力作用对人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞凋亡的诱导作用

Annexin V-PI 双染结合流式细胞仪定量检测结果显示：MPPa 光动力实验组人鼻咽癌细胞株 CNE2 的早期凋亡发生率、继发性坏死或晚期凋亡发生率明显高于单纯光照对照组、单纯 MPPa 对照组和假照射组（$P<0.01$），而对照组间早期凋亡、继发性坏死或晚期凋亡发生率无明显差异（$P>0.05$）。Hoechst33258 染色观察到 MPPa 光动力作用后的 NPC 细胞核染色质密度增高，呈高亮蓝色，明显固缩、凝聚或碎裂，出现典型的凋亡小体；且这类细胞明显多于单纯光照处理、单纯光敏剂处理和假照射处理组。表明 MPPa 光动力处理能有效诱导人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞凋亡（具体结果将另文发表）。

2.3　MPPa 光动力作用后人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞线粒体膜电位的改变

Rhodamine123 染色－流式细胞仪检测结果显示：反映线粒体膜电位的 Rhodamine123 荧光强度曲线在对照组间无明显变化，而 MPPa 光动力作用后线粒体膜 Rhodamine123 荧光强度曲线明显发生左移，表明其荧光强度下降（图 3）。

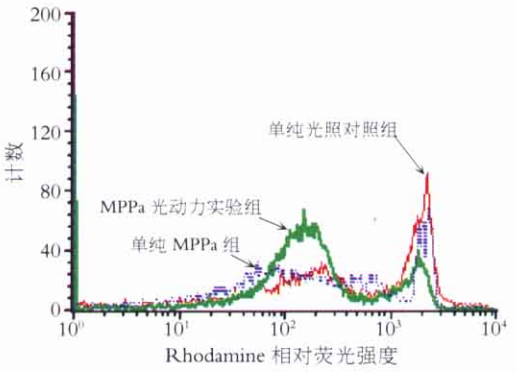


图 3　MPPa 光动力作用后人鼻咽癌细胞 NPC/CNE2 线粒体膜电位的崩解

3　讨论

叶绿素降解产物衍生物是近年来国内外发展第 2 代光动力治疗新药的重点研究对象之一。MPPa（pyropheophorbide-a methyl ester）是新近开发成功的一种叶绿素降解产物衍生物，成份单一，化学结构明确，性质稳定，在体内吸收代谢快，避光时间短，光敏活性强，是一种很有发展前景的新型光敏剂。多年来香港中文大学的 Leung 博士对 MPPa 介导的光动力治疗进行了广泛深入的研究并取得许多有意义的成果。系列研究表明 MPPa 光动力作用对小细胞肺癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤细胞具有显著的杀伤作用[2,3]，本课题在上述研究的基础上，探讨了 MPPa 光动力治疗鼻咽癌的可能性。结果显示，MPPa 光动力作用致使鼻咽癌细胞数量显著减少，细胞脱落、固缩，显著降低人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞的生长率，在低浓度 MPPa 和低能量密度光照条件下（0.25～2 μmol/L，1～6 J/cm²）其生长抑制作用呈剂量效应关系。表明，MPPa 光动力作用在临床防治鼻咽癌领域具有良好的研究开发前

景。为更好地应用于临床,其抑制作用机制有待深入探讨。

在肿瘤光动力治疗过程中,光敏剂经光照后产生的活性氧物质(ROS)是诱导肿瘤细胞死亡的主要原因。众多研究表明细胞内活性氧的氧化应激可以诱导细胞凋亡,提高细胞内活性氧的水平,细胞凋亡的发生率明显增加,认为细胞内的 ROS 作为一种信使分子在调控细胞生存及凋亡过程中起关键作用[4]。因此,探讨光动力作用的凋亡诱导作用对明确阐明光动力作用抗癌效应的生物学机制开创了新的领域。Annexin V 是一种 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白,对磷脂酰丝氨酸有特殊的亲和力。在正常的活细胞中,磷脂酰丝氨酸位于细胞膜内侧,在凋亡早期,磷脂酰丝氨酸从膜内侧转到膜外侧,可以与荧光素标记的 Annexin V 结合,但此时细胞膜仍具有完整性,使变性染色质着色的荧光染料 PI 不能进入细胞,应用 Annexin V-PI 双染结合流式细胞仪可以简单方便且灵敏特异将凋亡和继发性坏死细胞区分开来,被认为是目前检测细胞凋亡的首选方法[5,6]。本实验利用 Annexin V-PI 双染结合流式细胞仪检测了 MPPa 光动力作用后人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞凋亡的发生情况。结果显示:MPPa 光动力实验组人鼻咽癌细胞株 CNE2 的早期凋亡发生率、继发性坏死或晚期凋亡发生率明显高于单纯光照对照组、单纯 MPPa 对照组和假照射组($P<0.01$),而对照组间早期凋亡、继发性坏死或晚期凋亡发生率无明显差异($P>0.05$)。Hoechst33258 细胞核染色法进一步观察到 MPPa 光动力作用实验组出现核凝聚、凋亡小体的人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞明显多于单纯光照射组、单纯 MPPa 光敏剂处理组和假照射组,而单纯光照组、单纯 MPPa 光敏剂处理组和假照射组三对照组中出现核凝聚、凋亡小体的细胞非常少见。提示早期诱导鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞发生凋亡可能是 MPPa 光动力抑制作用的重要机制之一。这为深入探讨 MPPa 光动力作用杀伤鼻咽癌细胞的生物学机制提供理论依据。

随着细胞凋亡分子机制的研究不断深入,人们发现细胞凋亡信号通路主要有两条:即细胞凋亡的线粒体依赖性途径和死亡受体途径。Leung 博士等的前期研究发现线粒体不仅是新型光敏剂 MPPa 优先定位的靶标也是光动力损伤的最先打击的靶点,提示线粒体依赖性途径可能在诱导鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞发生凋亡机制中起重要作用。目前已有的研究认为线粒体调节细胞凋亡有 3 种机制[7,8]:①线粒体电子传递与能量代谢的破坏;②细胞氧化还原状态的改变;③线粒体膜通透性改变后促凋亡分子的释放。线粒体膜 PTP 开放,膜电位降低,可导致线粒体内膜通透性增加,阻抑线粒体呼吸电子链,造成氧化及磷酸化作用脱偶联,细胞能量代谢紊乱,导致细胞损伤甚至死亡。此外,线粒体膜 PTP 开放,使膜电位降低,由于孔道小于 1.5×10^3 的大分子均可通过,H_2O_2 和小分子到达基质,导致基质膨胀而使线粒体内膜嵴被拉直,外膜破裂,膜间隙中的凋亡诱导因子(AIF)及细胞色素 C 被释放至胞质中,激活 caspase 级联反应,启动核凋亡的产生[7-10]。本研究中我们初步观察到 MPPa 光动力作用后鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞线粒体膜电位显著下降,提示线粒体在 MPPa 光动力诱导鼻咽癌细胞凋亡的生物学机制中扮演重要角色,但 MPPa 光动力作用究竟是如何通过调控线粒体诱导人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞发生凋亡等一系列问题还有待于分子生物学和光动力学领域学者们的深入探讨。

(致谢:本实验得到了香港浸会大学中医药学院张若韶女士和香港浸会大学生物系梁碧蓬女士的无私帮助,在此一并表示衷心感谢!)

参考文献:

[1] 梁治平, 刘长征, 程竟仪, 等. PYM-BAC_5和^{131}I-BAC_5联合导向治疗鼻咽癌的实验研究[J]. 癌症, 2003, 22(8): 831-835.

[2] YOW C M, MAK N K, SZETO S, *et al*. Photocytotoxic and DNA damaging effect of temoporfin (mTHPC) and merocyanine 540 (MC540) on nasopharyngeal carcinoma cell[J]. Toxicol Lett, 2000, 115(1): 53-61.

[3] SUN X, LEUNG W N. Photodynamic therapy with pyropheophorbide-a methyl ester in human lung carcinoma cancer cell: efficacy, localization and apoptosis[J]. Photochem Photobiol, 2002, 75(6): 644-651.

[4] 高 飞, 易 静, 史桂英, 等. 活性氧水平决定白血病细胞对三氧化二砷诱导凋亡的敏感性[J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(5): 585-589.

[5] 傅文宇, 李敏伟, 陈加平, 等. 一种检测微囊藻毒素 LR 诱导大鼠肾细胞凋亡的方法[J]. 水生生物学报, 2004, 28(1): 101-102.

[6] 彭黎明, 江 虹, Chris Bradley. 细胞凋亡和继发性坏死的 Annexin 法定量检测[J]. 华西医大学报, 2001, 32(4): 602-604.

[7] ZORATTI M, SZABO I. The mitochondrial permeability transition[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1241(2): 139-176.

[8] 黄 伟, 张瑶珍. 线粒体膜与肿瘤进展[J]. 国外医学:生理、病理科学与临床分册, 2002, 22(1):9-11.

[9] XUE L Y, CHIU S M, OLEINICK N L. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4[J]. Oncogene, 2001, 20(26): 3420-3427.

[10] GRUZ P, PISARI F M, SHIMIZU M, *et al*. Synthetic activity of Sso DNA polymerase Y1, an archaeal DinB-like DNA polymerase, is stimulated by processivity factors proliferating cell nuclear antigen and replication factor C[J]. J Biol Chem, 2001, 276(50): 47394-47401.

[11] 陈东风, 房殿春. 线粒体膜通透性转换孔与细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(17): 1598-1600.

(编辑 汪勤俭)