文章编号:1000-5404(2010)10-1055-04

论著

注射金丝桃素并525 nm激光照射对鲜红斑痣模型罗曼鸡鸡冠的血管损伤作用

孟德胜[1],鲁元刚[2],傅若秋[1],李卓恒[1],赵艳艳[1],卢来春[1],娄 海[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:药剂科[1];皮肤科[2])

[摘要] **目的** 探讨注射金丝桃素(hypericin,HY)并525 nm激光照射对鲜红斑痣模型罗曼鸡鸡冠的作用。**方法** 取6月龄雄性罗曼鸡36只,按随机数字表法分为6组:正常对照组、激光对照组、血卟啉1 mg/kg阳性对照组、HY 0.3 mg/kg组、HY 1 mg/kg组、HY 3 mg/kg组,每组6只。除正常对照组外,对各组鸡冠单侧进行激光照射,未处理一侧作为自身对照。罗曼鸡静脉注射金丝桃素后,立即用激光照射鸡冠直径2 cm的区域,鸡冠剂量为功率密度100 mW/cm^2。各组(除正常对照组)给药并525 nm激光照射后每天观察照相,处理7、14 d后处死动物,取鸡冠进行病理检查,并对鸡冠毛细血管计数。**结果** HY给药组和血卟啉对照组从外观上可对鸡冠表皮产生不同程度的损伤,造成明显水肿、结痂、坏死。HY 1 mg/kg,HY 3 mg/kg组及血卟啉1 mg/kg阳性对照组对鸡冠的表皮损伤尤其明显,产生明显的坏死、结痂。HE组织学观察显示,HY各给药组及血卟啉对照组能导致鸡冠表皮增生,减少真皮毛细血管数,其毛细血管减少率与正常对照组及激光对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$),激光对照组与正常对照组相比差异不大。**结论** HY静脉注射给药并525 nm激光照射对鸡冠真皮毛细血管有较好的破坏作用,能对鲜红斑痣模型鸡冠起到明显损伤作用。

[关键词] 金丝桃素;光动力学;鲜红斑痣;鸡冠模型
[中图法分类号] R-332; R758.51; R454.2 **[文献标志码]** A

Effect of hypericin injection combined with 525-nm photodynamic therapy on port wine stains

Meng Desheng[1], Lu Yuangang[2], Fu Ruoqiu[1], Li Zhuoheng[1], Zhao Yanyan[1], Lu Laichun[1], Lou Hai[1] ([1]Department of Pharmacy, [2]Department of Dermatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] Objective To explore the effect of hypericin (HY) combined with 525 nm photodynamic therapy (PDT) on vascular lesion of cock comb as the model of port wine stains. Methods Totally 36 Longman cocks at the age of 6 months were divided into 6 groups randomly, including control group, irradiation group, positive control group (hemoporphyrin 1 mg/kg), 0.3 mg/kg HY group, 1 mg/kg HY group, and 3 mg/kg HY group. Aspots of 2.0 cm in diameter on one side of cock comb was irradiated by 525 nm laser at a power density of 100 mW/cm^2 immediately after corresponding photosensitiser intravenous injection. While the other side of cock comb served as control and received no irradiation. Visual observation and photos were recorded every day, pathological changes were observed and the reduction rate of comb's capillary of all groups was counted in 7 and 14 d after photodynamic therapy. Results HY and 1 mg/kg hemoporphyrin damaged the epidermis, such as edema, necrosis and incrustation, and abated the red color of cock bomb obviously, especially in groups of 1 and 3 mg/kg HY combined with 1 mg/kg hemoporphyrin injection. At the same time, epidermis hyperplasia, and the reduction rate of comb's capillary were decreased by HY and hemoporphyrin with 525 nm photodynamic therapy. Control group and irradiation group had no such changes ($P<0.05$). Conclusion Intravenous injection of HY associated with photodynamic irradiation at 525 nm is proved to have effective damage to cutaneous micrangium of cock comb

[Key words] hypericin; photodynamic therapy; cock bomb

Corresponding author: Meng Desheng, Tel: 86-23-68757091, E-mail: mengdes@163.com

[通信作者] 孟德胜,电话:(023)68757091,E-mail: mengdes@163.com

鲜红斑痣(port wine stains, PWS)是一种不易自然消退的先天性真皮浅层毛细血管畸形,多发于儿童。光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)是指当光敏剂进入体内后在特定波长激光照射下被激发,产生单态氧或其他自由基,对病变或肿瘤组织起到破坏作用的治疗方法,具有安全、有效、无耐药性等特征,且对患者有良好的依从性,是非常有前景的治疗鲜红斑痣的技术[1,2]。金丝桃素(hypericin, HY)为萘骈二蒽酮类化合物,呈橙红色并带红色荧光,是贯叶连翘中最具生物活性的物质[3]。现代药理学证明,HY是一种非常有效的光敏剂,能通过对线粒体的损伤起到杀灭畸形毛细血管的作用,具有抗抑郁、抗肿瘤、抗病毒等作用[4]。本研究拟通过静脉注射HY并525 nm激光照射下,研究HY对鲜红斑痣鸡冠模型真皮毛细血管的损伤作用,为HY作为一种新型光敏剂治疗鲜红斑痣提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物、试剂和仪器 金丝桃素(hypericin,HY;成都普瑞法科技开发有限公司,批号081204,纯度99.1%),甲醛溶液(重庆博艺化学试剂有限公司,批号080907),无水乙醇(重庆川东化工有限公司。批号20090713),75%乙醇(重庆川东化工有限公司。批号20090206),吐温-80(温州清明化工厂,批号SH28-88),三乙胺(重庆博艺化学试剂有限公司,批号080421),血卟啉(上海红绿光敏剂研究所,批号20090225)。YK-LED-PDT绿光525 nm光动力美容仪(江西新余顺兴科技开发有限公司),BX51双筒光学显微镜(OLYMPUS),BP101万分之一电子分析天平(德国Sartorius)。

1.2.2 实验动物 6月龄雄性罗曼鸡36只,体质量(2±0.2)kg,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2 药品溶液制备

1.2.1 金丝桃素溶液制备 精密称取金丝桃素原料药加入适量乙醇使其完全溶解,加5 ml吐温-80增溶,搅拌溶解后,用三乙胺调pH值至7~8,最后用注射用水定容到100.0 ml,过滤除菌,按照等比稀释分装即得0.3、1、3 mg/ml的金丝桃素棕红色澄清水溶液,冰箱4 ℃保存。

1.2.2 血卟啉溶液制备 将浓度为10 mg/ml的血卟啉注射液用注射用水稀释至浓度为1 mg/ml的血卟啉溶液,冰箱4 ℃保存备用。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 选取健康6月龄雄性罗曼鸡36只,根据随机数字表法将动物分为6组,每组6只。对鸡冠单侧进行激光照射,未处理一侧作为自身对照。正常对照组:动物既不给药也不激光照射;激光对照组:动物只激光照射,不给药;血卟啉1 mg/kg阳性对照组:动物给血卟啉并激光照射;HY 0.3 mg/kg组:动物给HY 0.3 mg/kg后立即激光照射;HY 1 mg/kg组:动物给HY 1 mg/kg后立即激光照射;HY 3 mg/kg组:动物给HY 3 mg/kg后立即激光照射。

1.3.2 525 nm激光照射处理 罗曼鸡翼下静脉注射20 mg/kg戊巴比妥钠麻醉后,在鸡冠上划出直径2 cm的圆形区域,75%乙醇清洁鸡冠表面,黑布遮盖其余部分并固定鸡冠。各实验分组按照等比稀释配置相应浓度的药物,动物按1 ml/kg给药,于翼下静脉注射给药后立即给予525 nm的激光照射,时间20 min,激光剂量为功率密度100 mW/cm^2。照光前后检测输出功率,其波动范围<±5%。

1.3.3 观察和取材 各组(除正常对照组)给药并525 nm激光照射后,每天进行观察并照相记录,观察鸡冠色泽变化,表皮是否有白斑、是否水肿,表面是否组织坏死、是否有结痂,结痂是否脱落、脱落的时间分布等。在给药并525 nm激光照射后处理后7、14 d每组各处死3只动物,切取鸡冠组织块,10%甲醛溶液固定,常规石蜡包埋切片,HE染色,进行组织病理检查及计算各组毛细血管减少率[5]。具体方法为:选取HE染色切片,随机选取5个高倍(×400)镜视野,计算出血管平均数,以未处理侧鸡冠的血管平均数减去处理侧鸡冠的血管平均数,为毛细血管减少数。

计算公式:毛细血管减少率=(处理侧毛细血管减少的平均数/对照侧毛细血管的平均数)×100%

1.3.4 给药并激光照射后鸡冠损伤效应分级 给药并照射激光后鸡冠外观大体变化和病理分级见表1。

1.4 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.5统计软件行单因素方差分析。

表1 给药并照射激光后鸡冠损伤效应分级

观察方式	观察时间(d)	轻度	中度	重度	极重度
外观反应	0	呈红白色相间,1 h内变成深红色	略成白色,1 h内变成紫红色	呈苍白色,1 h内变成紫红色	呈紫白色,随即变成黑紫色
	1~3	基本恢复正常鲜红色或略微发白	以白色为主的白紫色或白色	以紫色为主的暗紫或紫中泛白色	黑紫色,肿胀明显,破溃
	7	正常红色	以白色为主的白紫色或白色,无破溃结痂	以紫色为主的紫白色,个别照射区有破溃结痂	黑紫色,多处破溃,结痂
	14	正常鲜红色	白色或浅白色,少量白色结痂,无瘢痕形成	以白色为主的紫白色,瘢痕不明显	结黑色厚痂,瘢痕形成
病理反应	14	正常	表皮基本正常,真皮毛细血管网减少,腔内的红细胞数量减少,有较多的新生毛细血管	有表皮细胞增生,细胞大而浅淡,真皮毛细血管网大量减少,较多的新生毛细血管形成	表皮细胞增生,真皮毛细血管网大量减少,极少有新生毛细血管形成

2 结果

2.1 鸡冠的肉眼观改变

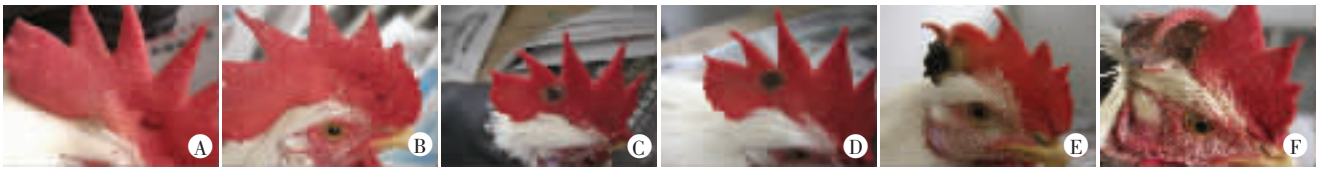
正常对照组和激光对照组鸡冠的外形及色泽均无明显变化;血卟啉组及 HY 给药组在光照后,鸡冠激光照射处均出现明显的红白相间,中间出现水肿。实验后 1 ~ 3 d,HY 0.3 mg/kg 组鸡冠呈以白色为主的白紫色变化,为中度损伤,血卟啉阳性对照组、HY 1 mg/kg 组及 HY 3 mg/kg 组鸡冠呈以紫色为主的紫中泛白色变化,为重度损伤,其中 HY 3 mg/kg 组的颜色加深程度较血卟啉组、HY 1 mg/kg 组严重。实验后 4 ~ 7 d 后,血卟啉阳性对照组及 HY 各给药组鸡冠光照中间结痂,其中 HY 0.3 mg/kg 组结痂颜色较浅,为浅棕色向深棕色转变;血卟啉阳性对照组及 HY 1 mg/kg 结痂颜色由棕色向黑色转变;HY 3 mg/kg 组为黑色结痂。实验 7 ~ 14 d,血卟啉阳性对照组及 HY 各给药组的结痂颜色继续加深,鸡冠无破溃,结痂未脱落,但血卟啉组表皮损伤坏死较 HY 给药组严重。结果见图 1。

2.2 鸡冠的组织病理变化

正常对照组和激光对照组,病理检查可见表皮正常,真皮浅层血管清晰,有扩张的毛细血管,内皮细胞完整,内皮下有不连续的平滑肌层,管腔较大,内有红细胞;HY 1 mg/kg 组,在光照 7 d 后处死动物检查,表皮正常,鸡冠真皮浅层细胞增生,浅溃疡、水肿,轻微凝固性坏死(缺血性坏死);血卟啉阳性对照组及 HY 3 mg/kg 组,表皮细胞增生,真皮浅层毛细血管减少,血管中红细胞减少,溃疡、水肿,严重凝固性坏死(缺血性坏死)。光照 14 d 后,HY 1 mg/kg 组表皮细胞不完整,真皮浅层毛细血管数目减少;血卟啉阳性对照组及 HY 3 mg/kg 组鳞状上皮细胞明显增生,伴角化不全,真皮浅层毛细血管管壁水肿,伴血管内皮灶性缺失,偶见红细胞,大面积严重凝固性坏死(缺血性坏死)。结果见图 2。

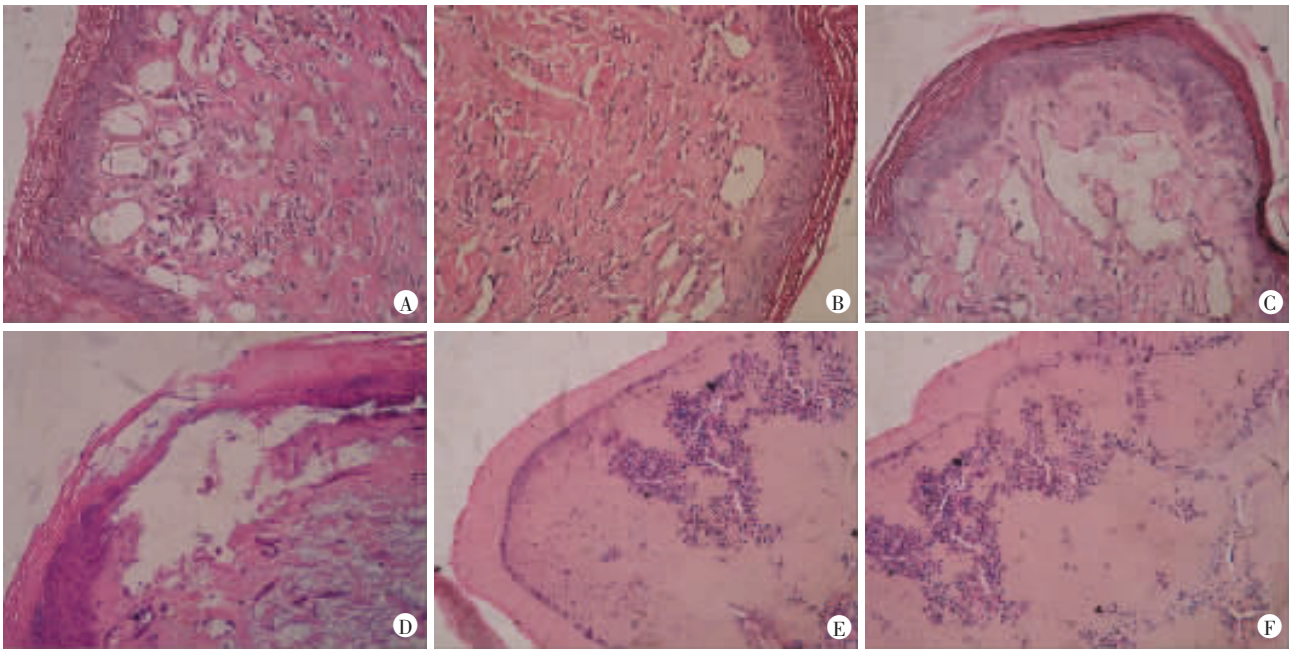
2.3 毛细血管减少率

从鸡冠的毛细血管减少率可以看出,正常对照组 7 d 与 14 d 有一定差异,系因每次处死不同动物,鸡冠部位有个体差别造成的;激光对照组 7 d 与 14 d 有明显差别,可能是由于单纯激光对鸡冠的损伤较小,鸡冠自身对轻微的损伤有修复作用;与正常对照组相比,单纯激光组在 7 d 时毛细血管减少率有显著性差异,14 d 无显著性差异($P > 0.05$),这说明不给药单纯激光照射对鸡冠皮肤影响不大。HY 各给药组及血卟啉组在 7、14 d 时与正常对照组及激光对照组相比,毛细血管减少率均有极显著差异($P < 0.01$),表明 HY 在 525 nm 激光照射下能明显破坏鸡冠毛细血管网。结果见表 2。



A:正常对照组;B:激光对照组;C:HY 1 mg/kg 组光照 7 d;D:HY 1 mg/kg 组光照 14 d;E:HY 3 mg/kg 组光照后 14 d;F:血卟啉 1 mg/kg 组光照后 14 d

图 1　各组处理后鸡冠的外观变化



A:正常对照组;B:激光对照组;C:HY 1 mg/kg 组 7 d;D:HY 1 mg/kg 组 14 d;E:HY 3 mg/kg 14 d;F:血卟啉1 mg/kg 组 7 d

图 2　各组处理后鸡冠组织病理变化　(HE ×400)

表2 各组鸡冠处理7、14 d后毛细血管减少率（%，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	7 d	14 d
正常对照组	3.77±0.25	2.87±0.32
激光对照组	8.98±1.13[a]	3.50±4.60
血卟啉1 mg/kg组	89.61±3.28[bc]	92.75±9.68[bc]
HY 0.3 mg/kg组	58.52±6.60[bc]	70.46±12.20[bc]
HY 1 mg/kg组	81.15±16.40[bc]	77.80±11.14[bc]
HY 3 mg/kg组	93.63±11.66[bc]	93.54±7.05[bc]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较，c：$P<0.01$，与激光对照组比较

3 讨论

鲜红斑痣是一种先天浅层的毛细血管异常的增生和畸形，造成了表皮的异常红润[6]。因其不易自然消退，且随着年龄增长，颜色加深变红、变紫，65%的患者病灶将逐渐扩张，创伤后易出血，对患者身心健康产生严重影响。而鸡冠大量丰富的毛细血管网与人类异常增生的血管疾病具有相似性，早在1966年Ritter就用莱亨鸡的鸡冠和肉垂作为皮肤毛细血管瘤（鲜红斑痣）动物模型。顾瑛等[7,8]研究显示鸡冠作为皮肤毛血管瘤的动物模型除了组织学上相似外，血液的光吸收特性也基本相同。本实验采用的鸡冠模型为罗曼鸡的雄性种鸡，因其品种纯正，鸡冠较大，真皮层毛细血管丰富，鸡冠颜色鲜艳，与人类鲜红斑痣皮下异常增生的大量毛细血管相似，符合模拟鲜红斑痣模型的要求。

鲜红斑痣的治疗手段主要有手术治疗、脉冲激光和光动力学疗法。手术治疗因其术后容易产生感染、瘢痕、损毁性皮肤改变及疱疹[9]，逐渐被对皮肤组织损害轻微、安全、有效的光动力治疗所取代。光动力学治疗鲜红斑痣的主要原理是光敏剂在靶组织中遇光被激发，产生有强细胞毒性的单线氧，起到杀死细胞的作用[10]。HY为一种良好的光敏剂，在光激发下对肿瘤细胞模型的研究中，能产生血管损伤，其机制可能与抑制线粒体的呼吸比率和使内膜电势下降进而导致细胞皱缩、细胞核裂解有关[11]；HY还能通过促凋亡caspase介导的信号通路诱导细胞凋亡和抗凋亡信号转导通路[12]。HY静脉注射进入罗曼鸡体内后，迅速被血管内皮细胞选择性集中吸收，可在鸡冠毛细血管中形成短暂的药物高浓度，其光敏剂浓度远远高于真皮血管外间质和表皮细胞，此时立即光照，病变血管内皮细胞因吸收较多光敏剂可产生强烈光敏反应，起到细胞毒性作用，而真皮血管外间质与表皮细胞因不含或少含光敏剂，故不产生或仅产生较轻微的可恢复的光敏反应，在有效破坏畸形毛细血管网的同时，又能保存其他表皮组织不受损伤[13]。

我们对HY给药剂量及激光照射时间进行了筛选，调整给药剂量，根据光照后鸡冠表皮的肿胀情况决定给药剂量及激光照射时间，最终确定本实验条件。本实验观察HY静脉给药在525 nm激光照射下对鸡冠的作用，HY 0.3 mg/kg对血管的损伤不够，HY 3 mg/kg在对真皮层毛细血管损伤的同时也严重损伤了表皮，均不是理想的给药剂量，HY 1 mg/kg在对鸡冠真皮层毛细血管损伤的同时对表皮的损伤较轻，为理想的鲜红斑痣鸡冠模型治疗剂量；与血卟啉相比，HY对鸡冠表皮的损伤较血卟啉轻，且同样能起到损伤真皮毛细血管的目的，这说明HY在给药的副作用及减轻后期的光毒性等方面可能较传统光敏剂血卟啉更有优势，这将是我们下一步需要探讨的问题。

综上所述，我们认为，HY在激光激发下通过导致细胞的凋亡，起到破坏血管的作用，可将其开发成一种治疗血管性疾病的良好光敏剂。但HY对正常表皮和真皮可能也有损伤，且全身给药后产生的全身光敏作用，可能对人体产生不同程度的光毒性，需要进一步研究避免或控制副反应。

参考文献：

[1] Machado A H, Soares C P, Beltrame-Junior M, *et al*. Cytotoxicity of octal-bromide zinc phthalocyanine after photodynamic therapy with different light sources[J]. Photomed Laser Surg, 2008, 26(5): 455-459.

[2] 鲁元刚，伍津津，杨宏珍，等. 两种光敏剂对鲜红斑痣光动力学疗法的疗效影响[J]. 中国激光医学杂志，2008，17(1)：28-31.

[3] Huygens A, Kamuhabwa A R, Van-Laethem A, *et al*. Enhancing the photodynamic effect of hypericin in tumour spheroids by fractionated light delivery in combination with hyperoxygenation[J]. Int J Oncol, 2005, 26(6): 1691-1697.

[4] Olivo M, Du H Y, Bay B H. Hypericin lights up the way for the potential treatment of nasopharyngeal cancer by photodynamic therapy[J]. Curr Clin Pharmacol, 2006, 1(3): 217-222.

[5] 廖明德，陈石海，韦强，等. 单纯激光和光动力学疗法对鸡冠血管的作用[J]. 中国激光医学杂志，2006，15(3)：156-159.

[6] 段炜，陈康宁，黄圆媛. 鲜红斑痣并颅内血管畸形致癫痫发作1例[J]. 第三军医大学学报，2006，28(4)：297.

[7] 顾瑛，李峻亨，陈华，等. 光动力学疗法选择性治疗鲜红斑痣的基础研究[J]. 中国激光医学杂志，1992，1(2)：81-84，122.

[8] 黄乃艳，刘凡光，顾瑛，等. 竹红菌素B的两种剂型用于鲜红斑痣光动力治疗的动物实验研究[J]. 激光生物学报，2007，16(3)：359-363.

[9] 李光，周展超. 鲜红斑痣的治疗进展[J]. 国际皮肤性病学杂志，2008，34(3)：149-151.

[10] Dewi N A, Yuzawa M, Tochigi K, *et al*. Effects of photodynamic therapy on the choriocapillaris and retinal pigment epithelium in the irradiated area[J]. Jpn J Ophthalmol, 2008, 52(4): 277-281.

[11] Quiney C, Billard C, Mirshahi P, *et al*. Hyperforin inhibits MMP-9 secretion by B-CLL cells and microtubule formation by endothelial cells[J]. Leukemia, 2006, 20(4): 583-589.

[12] Chen B, Xu Y, Roskams T, *et al*. Efficacy of antitumoral photodynamic therapy with hypericin: relationship between biodistribution and photodynamic effects in the RIF-1 mouse tumor model[J]. Int J Cancer, 2001, 93(2): 275-282.

[13] Gold M H. Introduction to photodynamic therapy: early experience[J]. Dermatol Clin, 2007, 25(1): 1-4.

（**收稿**：2009-12-22；**修回**：2010-01-15）

（编辑 汪勤俭）