短篇论著

文章编号:1000-5404(2010)05-0494-03

血卟啉衍生物介导的光动力疗法对人肺腺癌细胞杀伤效应的实验研究

杨镇洲[1],张云嵩[2],李梦侠[1],曾林立[1],李增鹏[3],王 东[1],王 阁[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:肿瘤中心[1],胸心外科[2],病理科[3])

[摘要] **目的** 研究血卟啉衍生物(hematoporphyrin derivative, HpD)介导的光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)对在体和离体人肺腺癌细胞A549的杀伤作用。**方法** 以MTT法检测HpD-PDT对A549细胞增殖抑制的量效关系,应用流式细胞术分析其对细胞凋亡的影响。进一步构建A549细胞裸鼠移植瘤动物模型,通过绘制肿瘤生长曲线观察HpD-PDT对肺癌生长的抑制作用,并应用TUNEL法检测肿瘤细胞凋亡。**结果** HpD-PDT作用后,A549细胞增殖受抑,凋亡增加,显著高于对照组($P<0.05$),且其抑制效率依赖于HpD浓度及激光剂量;裸鼠移植瘤动物模型肿瘤生长受抑、凋亡增加,也与对照组存在显著性差异($P<0.01$)。**结论** HpD-PDT可有效杀伤肺腺癌细胞,其作用机制可能与抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡有关。

[关键词] 血卟啉光照疗法;非小细胞肺癌;细胞系,肿瘤;小鼠,裸

[中图法分类号] R73-36;R734.2;R979.1 **[文献标志码]** A

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,尽管手术、放疗、化疗和生物治疗等有了长足进步,但目前肺癌患者的长期生存率仍不理想,亟待探索新的治疗方法[1-4]。光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)是一种在有氧条件下,通过合适波长光激发靶细胞内光敏剂产生活性氧物质直接损伤肿瘤细胞,微血管受损造成癌组织血流灌注减少以及产生肿瘤免疫而致细胞发生凋亡或坏死的微创治疗手段。本研究检测国产血卟啉衍生物(hematoporphyrin derivative, HpD)介导的PDT对离体和在体A549细胞的杀伤情况,旨在确定HpD-PDT的药效学作用和对肿瘤细胞的损伤特点,为临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株与裸鼠 人A549肺腺癌细胞株(ATCC序列号CCL-185),由第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所惠赠,常规传代培养。体质量16~20 g,BALB/c nu/nu无胸腺裸小鼠(4~6周龄16只,雌性)购自中国科学院上海实验动物中心,按SPF级动物饲养于本院所实验动物中心。

1.1.2 实验试剂、仪器 MTT(美国Sigma公司),TUNEL试剂盒(武汉博士德生物试剂公司)。血卟啉衍生物(HpD,重庆华鼎现代生物制药有限公司,规格:100 mg/20 ml和25 mg/5 ml)。倒置荧光显微镜(德国Leica公司),630PDT激光治疗仪(德国DIOMED公司),输出功率0~2 000 mW可调。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT法检测PDT对A549细胞增殖抑制作用 HpD设2.5、5、10、20 μg/ml 4个浓度,激光设0.5、1、2、4、6、8、10 J/cm^2 7种剂量,6复孔/组。A549细胞按2×10^4/孔接种细胞于96孔培养板,常规培养24 h,弃旧培养基加入含不同浓度HpD完全培养基200 μl,再避光培养24 h予不同剂量激光照射后立即换新鲜1640完全培养基继续避光培养24 h。每孔细胞加入MTT(5 g/L)20 μl后避光培养4 h,去除培养基,加DMSO 150 μl/孔,恒温振荡10 min,使紫色结晶完全溶解,用酶标仪检测。在490 nm处以空白对照组调零,测定各组光密度值$D(490)$,重复3次取均值,根据测得的$D(490)$按如下公式计算出细胞相对抑制率[5]:相对抑制率$=[D(490)_{对照组}-D(490)_{实验组}]/D(490)_{对照组}\times100\%$。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡 设空白对照组、HpD组、PDT组和HpD+PDT组,其中HpD组HpD浓度为5 μg/ml,PDT组HpD浓度5 μg/ml,照射剂量4 J/cm^{2}进行PDT治疗。常规处理后调整细胞浓度上流式细胞仪检测。

1.2.3 裸鼠移植瘤模型的建立、PDT治疗和移植瘤生长检测 5×10^7/ ml对数生长期A549细胞,以0.2 ml(5×10^6/ml)接种于裸鼠右侧腋窝皮下,6~9 d裸鼠皮下可见明显肿块,第13天当肿瘤体积达到约200 mm^{3}时,将裸鼠分为:空白对照组、HpD组、PDT组和HpD+PDT组,每组4只。HpD以20 mg/kg作瘤体内注射给药,然后行PDT,激光剂量120 J/cm^2,光斑大小3 cm^2。各组在PDT处理前1天及分别在处理后3、7、14、21 d记录肿瘤体积,用游标卡尺测量瘤体最长径(a)与最短径(b),根据公式V(mm^3)$=ab^2/2$计算肿瘤的体积。抑瘤率$=$[(对照组肿瘤体积-治疗组肿瘤体积)/对照组肿瘤体积]$\times$100%。

1.2.4 凋亡细胞的原位检测(TUNEL法) 按说明书常规进行。以细胞核呈棕黄色或褐色为凋亡阳性染色。在400倍

[基金项目] 国家自然科学基金(30571849)

[通信作者] 王 东,电话:(023)68757151,E-mail: dongwang64@hotmail.com

高倍视野下随机选取5个视野,计算凋亡细胞在全部癌细胞中所占的比例和凋亡指数(apoptosis index, AI)。

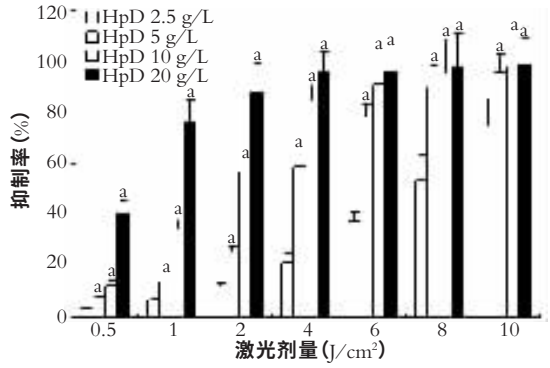
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 10.0统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 MTT检测HpD-PDT对A549细胞增殖抑制作用

MTT结果提示,HpD-PDT对A549细胞增殖有明显抑制作用。在HpD低浓度、激光低剂量条件下,随浓度和剂量升高,抑制率迅速上升,当达到HpD高浓度、激光高剂量条件下,逐渐趋缓达平台期(图1)。



a: $P<0.01$,与HpD 2.5 g/L组比较

图1 MTT法检测不同剂量激光条件下HpD-PDT对A549细胞的增殖抑制作用

2.2 流式细胞术检测A549细胞凋亡

FCM结果显示,空白对照组与HpD组A549细胞无明显凋亡,细胞凋亡率为2.86%和4.52%,而PDT处理后细胞凋亡率显著增加,其中尤以HpD-PDT组最为明显(38.14%),与A549组比较存在显著差异($P<0.01$)。

2.3 PDT对A549细胞移植瘤生长的抑制作用

成功建立A549细胞裸鼠移植瘤模型。结果显示,空白对照组及HpD组肿瘤继续生长,而行PDT的2组在PDT治疗后肿瘤表面可见充血、肿胀及局部坏死,2~3 d后坏死肿瘤组织脱落、结痂,7 d后单独PDT组部分肿瘤复发继续生长,而HpD+PDT组未见明显复发。结果表明:HpD显著增强A549细胞对PDT治疗敏感性,21 d后单独PDT组抑瘤率为52.19%,HpD+PDT组抑瘤率为93.97%($P<0.05$)。

2.4 TUNEL染色检测PDT对肺癌A549细胞移植瘤凋亡的影响

肺癌A549细胞移植瘤TUNEL法检测结果显示:空白对照组和HpD组偶见凋亡细胞,PDT组凋亡细胞增加,而HpD+PDT组凋亡细胞增加更为显著。

3 讨论

光动力疗法(PDT)是激光、光导、光信息处理、生物光化学技术和现代医学有机结合的产物,是肿瘤治疗的新手段,近年来欧美日等发达国家越来越多的医院开始把PDT作为肿瘤的常规治疗方法之一,应用日益广泛[6-9]。

PDT生物效应和最终临床疗效由受照靶细胞或靶组织中的光敏剂浓度、照射光量以及分子氧含量和靶细胞对PDT敏感性等多种因素决定,其常用计量参数主要是:光敏剂浓度、光照强度、给药和光照的间隔时间等,如何选择最佳光动力作用参数在提高疗效的同时有效减轻副反应是PDT研究的首要问题。由于所选细胞类型、光敏剂种类、激发光波长等因素不同,国内对PDT最佳作用参数报道不一[5,10]。通过改构光敏剂增强PDT疗效也是目前光动力治疗肿瘤领域的研究热点[11],HpD是目前应用最广泛且疗效肯定的光敏剂,本研究选用的光敏剂血卟啉衍生物(HpD),其组成稳定、在波长630 nm处有1个吸收峰。DIOMED 630PDT仪属半导体激光器,可采用连续照射方式避免脉冲照射的不良反应。因而确定应用HpD配合DIOMED 630PDT仪治疗肺腺癌时适宜的PDT作用参数,这是本研究目的所在。

本实验结果显示PDT对A549细胞杀伤具有显著的剂量依赖性,其增殖抑制随光敏剂浓度增加和光照强度增强而升高,与既往的研究表明PDT作用总效应是组织内给定空间点上光敏剂浓度和光照剂量的函数,即PDT效应∝光敏剂浓度×光照剂量相一致[10]。在低光动力剂量下,抑制作用迅速上升,后逐渐达平台期。此外还观察到光敏剂浓度和光照强度存在交互关系,在一定范围内,为达到相同的抑制率,可选择提高光敏剂浓度经较小的光照强度组合或选择降低光敏剂浓度经较大的光照强度。同时我们关于光动力治疗人A549细胞荷瘤裸鼠的实验研究中发现高光敏剂浓度会引起严重的皮肤光敏毒性反应,并且在尚未发表的资料中还表明,在选择最佳能量密度的基础上,大功率短时间照射与小功率长时间照射的PDT效应无明显差别。所以从临床角度出发,建议在光纤允许的最大功率范围内,大功率短时间的照射方式可达到安全快捷的目的。进一步通过构建A549细胞裸鼠移植瘤动物模型,观察发现与空白对照组及HpD组比较,PDT可有效抑制肿瘤细胞生长,其中21 d后HpD+PDT组抑瘤率达到93.97%,与PDT组有显著性差异($P<0.05$),证实HpD是PDT疗效的决定性因素之一。通过对体外培养细胞的FCM实验和裸鼠移植瘤动物模型TUNEL法检测发现PDT杀伤肿瘤细胞作用机制可

能与诱导肿瘤细胞凋亡相关。

参考文献：

[1] 杨玲，李连弟，陈育德，等. 中国肺癌死亡趋势分析及发病、死亡的估计与预测[J]. 中国肺癌杂志，2005，8(4)：274－278.

[2] Moghissi K, Dixon K. Update on the current indications, practice and results of photodynamic therapy (PDT) in early central lung cancer (ECLC) [J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2008, 5(1): 10－18.

[3] Lee J E, Park H S, Jung S S, *et al*. A case of small cell lung cancer treated with chemoradiotherapy followed by photodynamic therapy [J]. Thorax, 2009, 64(7): 637－639.

[4] Friedberg J S. Photodynamic therapy as an innovative treatment for malignant pleural mesothelioma [J]. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2009, 21(2): 177－187.

[5] 赵玉沛，杨波，张太平，等. 血卟啉衍生物光动力作用杀伤人胰腺癌细胞的实验研究[J]. 中华外科杂志，2000，38(3)：204－207.

[6] Eljamel M S. Brain photodiagnosis (PD), fluorescence guided resection (FGR) and photodynamic therapy (PDT): past, present and future[J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2008, 5(1): 29－35.

[7] Xia Y, Huang Y, Lin L, *et al*. A comparative study on the enhancement efficacy of specific and non- specific iron chelators for protoporphyrin IX production and photosensitization in HaCat cells [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009, 29(6): 765－770.

[8] Kiyotoki S, Nishikawa J, Tanimoto H, *et al*. A case of effective photodynamic therapy for local recurrence after definitive chemoradiotherapy for esophageal cancer [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2009, 36(12): 2055－2057.

[9] Nikitina R G, Mardynskaja V P, Morozova T G, *et al*. A method for improving the efficiency of therapy for melanoma [J]. Bull Exp Biol Med, 2009, 148(2): 238－240.

[10] 温子龙，薛平，卢海武，等. 血卟啉光动力作用杀伤人胆管癌细胞的实验研究[J]. 中华普通外科文献，2008，2(1)：17－20.

[11] Nishiyama N, Morimoto Y, Jang W D, *et al*. Design and development of dendrimer photosensitizer- incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(4): 327－338.

（**收稿**：2009-07-20；**修回**：2009-09-15）

（编辑　王小寒）

短篇论著

文章编号：1000-5404(2010)05-496-03

转化生长因子-β和结缔组织生长因子在翼状胬肉中的表达

刘　鹢[1]，董利群[1]，陈　菲[1]，邵志华[2]　（201800 上海，嘉定区中心医院眼科[1]；200092 上海，同济大学医学院生物学教研室[2]）

[摘要]　目的　研究正常结膜组织、原发性和复发性翼状胬肉组织中转化生长因子-β(transforming growth factor-β，TGF-β)和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor，CTGF)的表达，探讨翼状胬肉的发病机制。**方法**　采用免疫组化法检测10例正常结膜组织、30例原发性和20例复发性翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF表达情况，Spearman等级相关分析翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF阳性表达间关系。**结果**　正常结膜组织中TGF-β和CTGF没有或轻度表达。翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF的表达均明显高于正常对照组，差异有显著性意义($\chi^2=7.593$，$\chi^2=13.187$，$P<0.01$)。原发性翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF阳性表达分别为66.7%和70.0%，复发性翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF阳性表达分别为80%和85%。翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF阳性表达间存在显著正相关($r=0.4$，$P<0.01$)。**结论**　TGF-β和CTGF在翼状胬肉中高表达，提示这两种细胞因子可能参与了翼状胬肉的发生、发展过程。

[关键词]　翼状胬肉；转化生长因子β；结缔组织因子；免疫组织化学

[中图法分类号]　R777.33；R341；R446.8　　**[文献标志码]**　A

翼状胬肉(pterygium)是眼科的常见病和多发病。表现为睑裂区局部球结膜纤维血管组织呈三角形膜样增生及变性侵犯角膜，多见于鼻侧睑裂区，常双眼发病，术后易复发。发展到一定程度时可引起散光、视力下降、眼部不适感及美容问题，严重影响患者的身心健康。但翼状胬肉的确切发病机制至今不清楚。近年研究表明，翼状胬肉组织中有多种细胞因子(cytokines，CKs)异常表达，并且对翼状胬肉的发生、发展有重要调控作用[1-3]。转化生长因子-β(transforming growth factor-β，TGF-β)和组结缔组织生长因子(connective tissue growth factor，CTGF)在多种眼科疾病发生、发展的病理过程中起关键作用[4-6]。本研究采用免疫组化法比较正常结膜组织与翼状胬肉CTGF、TGF-β的表达差异，以探讨翼状胬肉的发病机制，为其进一步预防及治疗提供依据。

[基金项目]　上海市嘉定区科学技术委员会基金(2006JKK022)

[通信作者]　董利群，电话：(021)69987008-3259，E-mail：lulu_z@live.cn