论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201409204

# 5-氨基乙酰丙酸介导光动力治疗甲状旁腺功能亢进的前期研究

廖 勇,王 敏,练 渝,杨 阳,陈 文,赵 婕,陈 兵 (400038 重庆,第三军医大学西南医院内分泌科)

[摘要] **目的** 研究5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid,5-ALA)介导光动力治疗(photodynamic therapy,PDT)对正常大鼠甲状旁腺及其周围组织形态和功能的影响,探索采用该法治疗甲状旁腺功能亢进的可行性。**方法** 64只6~8周龄健康雌性SD大鼠,体质量150~200 g,按光敏剂剂量(0、100、300、500)mg/kg平均分为4个组,每组按光动力照射时间(0、10、15、20)min再分为4个亚组,共16个处理组($n=4$),手术暴露甲状旁腺及其周围组织后行光动力照射,ELISA检测照射前后血清甲状旁腺激素(parathyroid hormone,PTH)、三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine,T3)、甲状腺素(thyroxine,T4)、促甲状腺素(thyroid-stimulating hormone,TSH)浓度,并观察照射前后各组织形态学上的变化。**结果** 单独使用光敏剂或光照对甲状旁腺功能无影响,光动力治疗短时间内即可造成甲状旁腺功能的减低,而对甲状腺功能无显著影响,随着光敏剂浓度和光照时间的增加,其对甲状旁腺功能的破坏作用增强。当光敏剂浓度为500 mg/kg,光照时间为10、15、20 min时,血清PTH值分别为(75.24±6.06)ng/L、(47.23±5.18) ng/L、(39.10±4.03) ng/L,与对照组(0 mg/kg,0 min)(128.19±4.75)ng/L相比,具有显著性差异($P<0.05$)。组织学检查显示,经过光动力照射后的甲状旁腺组织与正常组比较,腺体包膜仍比较完整,其内纤维结缔组织增生明显,主细胞数明显减少,代之以大量空泡状的脂肪细胞,而甲状腺及其周围的肌肉组织在形态学上未见明显改变。**结论** 以5-ALA为光敏剂介导的光动力疗法可对大鼠甲状旁腺组织及其功能产生特异性破坏作用。

[关键词] 光动力治疗;5-ALA;甲状旁腺

[中图法分类号] R454.2; R582.105; R914.4 [文献标志码] A

# Effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy on rat parathyroid gland and surrounding tissues

Liao Yong, Wang Min, Lian Yu, Yang Yang, Chen Wen, Zhao Jie, Chen Bing (Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the impact of 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy (5-ALA PDT) on the morphology and function of rat parathyroid glands and surrounding tissues. **Methods** A total of 64 female SD rats, weighing 150 – 200 g, were randomly divided into 16 groups ($n=4$) according to the dose of photosensitizer (0, 100, 300 and 500 mg/kg) and irradiation time (0, 10, 15 and 20 min). The parathyroid gland and surrounding tissues were surgically exposed, followed by treatment with different doses of photosensitizer for different irradiation times. Before and after PDT, the serum levels of parathyroid hormone (PTH), thyroxine (T4), triiodothyronine (T3) and thyroid-stimulating hormone (TSH) were determined by ELISA. Histological observation was carried out before and after treatment. **Results** 5-ALA PDT or irradiation alone had no significant change in parathyroid function. PDT induced parathyroid

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270870)

[通信作者] 陈 兵,E-mail:chenbing3@medmail.com.cn

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150319.0952.013.html(2015-03-19)

function reduction in a short time, but had no effect on thyroid function. With the increase of photosensitizer dose and irradiation time, the treatment showed significant effect on thyroid function. When the photosensitizer dose was 500 mg/kg and irradiation time was 10, 15 and 20 min, the serum level of PTH was 75.24 ± 6.06, 47.23 ± 5.18, and 39.10 ± 4.03 ng/L, respectively, with significant difference as compared with control group (0 mg/kg and 0 min, 128.19 ± 4.75 ng/L, $P < 0.05$). After PDT, histological examination displayed integrated envelope of parathyroid, normal proliferation of fibrous connective tissue, increased number of vacuolated fat cells, and decreased number of gland cells compared with normal parathyroid, but no significant change was observed in the thyroid and surrounding muscles. **Conclusion** 5-ALA PDT specifically disrupts the morphology and function of parathyroid glands in rats.

[**Key words**] photodynamic therapy; 5-aminolevulinic acid; parathyroid

Supported by the General Program of National Nature Science Foundation of China (81270870). Corresponding author: Chen Bing, Tel: 86-23-68754138, E-mail: chenbing3@medmail.com.cn

光动力治疗(photodynamic therapy,PDT)是始于20世纪70年代末的一项肿瘤治疗的新技术,其主要原理是利用特定组织对光敏物质的差异性蓄积,在氧的存在下,经特定波长(630 nm)光的激发,生成各种氧化物和单线态氧,造成局部组织的缺血和坏死,从而达到治疗肿瘤等病变组织的目的[1-2]。目前已广泛应用于治疗各种肿瘤、癌前病变、皮肤病、甚至炎症性及感染性疾病等[3-6]。已有研究表明[7-8],作为光敏剂之一的5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid,5-ALA),通过注射入大鼠或人体内后,其中间代谢产物原卟啉IX(protoporphyrin IX,PpIX)(一种光敏物质)在相应的甲状旁腺组织中具有差异性高蓄积。依此特性,本研究尝试将5-ALA所介导的光动力疗法(5-ALA PDT)应用于甲状旁腺功能亢进(hyperparathyroidism)的治疗当中,通过观察光动力治疗对正常大鼠甲状旁腺及其周围组织在形态和功能上的影响,明确5-ALA PDT作用于甲状旁腺的特异性、有效性与安全性,为其作为一种治疗甲状旁腺功能亢进的新方法提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选取6~8周龄SD雌性大鼠64只,体质量150~200 g(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);5-ALA(购于上海阿拉丁试剂有限公司);XD-635AB型光动力治疗仪(桂林市兴达光电医疗器械有限公司);大鼠甲状旁腺素激素(PTH)ELISA试剂盒、大鼠三碘甲状腺原氨酸(T3) ELISA试剂盒、大鼠甲状腺素(T4) ELISA试剂盒、大鼠促甲状腺激素(TSH) ELISA试剂盒(均购自上海沪尚生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 实验分组及光动力治疗的实施 采用析因设计,64只大鼠按光敏剂剂量平均分配到0、100、300、500 mg/kg共4个组($n=16$),每个大组内再按光照时间分为0(不照射)、10、15、20 min共4个亚组,共计16个处理组($n=4$)。实验前将避光保存的5-ALA粉末溶于0.9%氯化钠溶液中配制成浓度为3%的5-ALA溶液,再将不同剂量的5-ALA溶液(0 mg/kg组为等体积生理盐水)注射入大鼠腹腔内并开始计时,30 min后采用5%水合氯醛行大鼠腹腔内注射麻醉,颈部备皮,无菌技术下切开皮肤,钝性分离皮下组织、肌肉,充分显露气管、甲状腺及甲状旁腺,将光动力治疗仪光纤探头置于甲状旁腺区域正上方15 cm位置,固定输出功率300 mW,光斑直径2 cm,照射时间按各分组进行设定,待计时1 h后启动激光照射,照射结束后依次缝合各层切口,待麻醉苏醒后放回饲养笼中常规饲养。以上操作尽可能在避光或弱光下进行。

1.2.2 血清标本的收集和指标的检测 自照射完毕后开始计时,6 h后采集各组所有大鼠尾静脉血,其中,中剂量处理组(光敏剂注射剂量300 mg/kg、照射时间15 min)大鼠分别于照射后0.25、0.5、1、7、14、21 d分次采集静脉血,收集所有血清,采用AU5400系列全自动生化分析仪检测血清总钙(Ca),酶联免疫法(ELISA)检测血清甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)、三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T3)、甲状腺素(thyroxine, T4)、促甲状腺素(thyroid-stimulating hormone, TSH)。

1.2.3 形态学观察 手术切除正常对照组及中剂

量处理组21 d后甲状旁腺、甲状腺及周围肌肉组织，4%甲醛固定，常规脱水、透明、包埋、切片及HE染色，光学显微镜下观察各组织形态学特征。

### 1.3 统计学分析

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件，等方差正态分布资料多组间比较采用方差分析，两两比较采用LSD $t$检验；方差不齐时采用Kruskal-Wallis H检验。

## 2 结果

### 2.1 光动力治疗对甲状腺及甲状旁腺功能的影响

中剂量组（5-ALA注射剂量300 mg/kg、照射时间15 min）PDT照射后各时间点血清PTH水平均显著低于照射前（$P<0.05$），血清总Ca水平亦低于照射前（$P<0.05$），各时间点血清T3、T4、TSH水平分别与照射前比较均无显著差异（$P>0.05$）。见表1。

### 2.2 光敏剂剂量、光照时间对光动力效果的影响

单独使用光照或单独注射光敏剂对甲状旁腺功能无影响，与正常对照组比较（$P>0.05$）；二者协同作用所产生的光动力效应可对甲状旁腺功能产生破坏作用，各实验组与正常对照组比较（$P<0.05$）；通过改变光动力条件后，随着照射时间的延长、5-ALA的注射剂量的增加，照射后血清PTH值越低，当光敏剂500 mg/kg、照射时间20 min时，对应的血清PTH值最低。见表2。

**表2 不同光敏剂剂量和照射时间PDT后大鼠血清PTH值变化**（ng/L，$n=4$，$\bar{x} \pm s$）

| 光照时间(min) | 0 mg/kg | 100 mg/kg | 300 mg/kg | 500 mg/kg |
|---|---|---|---|---|
| 0(不照射) | 128.19±4.75 | 112.56±13.12 | 127.64±6.48 | 122.80±9.26 |
| 10 | 132.82±6.96 | 103.5±8.40[a] | 93.33±5.42[a] | 75.24±6.06[a] |
| 15 | 126.41±8.93 | 91.71±5.96[a] | 83.34±4.21[a] | 47.23±5.18[a] |
| 20 | 130.75±10.38 | 81.44±7.72[a] | 51.54±5.78[a] | 39.10±4.03[a] |

a：$P<0.05$，与0 mg/kg组比较；采血时间为照射后6 h

### 2.3 光动力治疗后甲状旁腺及其周围组织形态学上的变化

分别取正常对照组及PDT（5-ALA剂量300 mg/kg、照射时间15 min）照射后第21天的甲状腺、甲状旁腺及其周围肌肉组织进行切片，HE染色。正常对照组甲状旁腺：在低倍光学显微镜下，由完整的结缔组织所包被，其内充满腺体细胞，在高倍镜下，腺体内排列着致密的主细胞，其间分布有毛细血管、少量结缔组织及散在的脂肪细胞；PDT照射后的甲状旁腺：低倍镜下可见腺体包膜仍完整，腺体中穿行大量结缔组织，将腺体分隔成若干假小叶，而在高倍镜下显示，腺体内染色较深的主细胞较正常腺体明显减少，代之以大量空泡状的脂肪细胞。而经PDT照射后的甲状腺、周围肌肉组织与正常对照组对比，未看到明显变化（图1）。

## 3 讨论

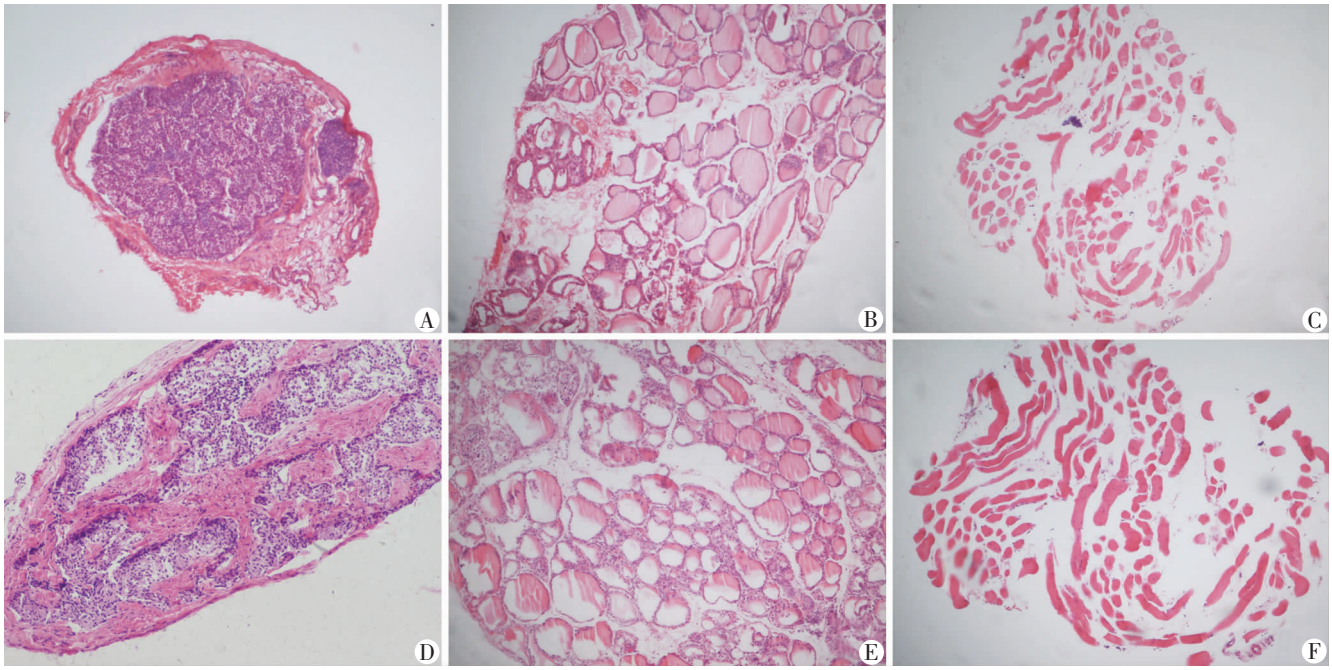
甲状旁腺功能亢进症是一组以甲状旁腺素分泌过多为主要临床特征的内分泌疾病，主要分为原发性、继发性、三发性和假性4类，以原发性最常见，年自然发病率2.7/10万～3.0/10万，其治疗手段以外科手术切除最为有效。手术治疗除有其严格的适应证外，对于多发或非典型腺瘤患者，术中被遗漏或切除相对不足等事件时有发生，而切除过多常导致术后深远而持久的低钙血症，甚至发生永久性甲状旁腺功能减低的可能，而使其应用受到一定限制[9-12]。

光动力治疗是近年来兴起的一种新的治疗方法，相比于传统的手术、放疗或化疗，具有适应证广、特异性高、副作用小、操作简便、微创或无创等优点，目前已广泛应用于各种皮肤病及肿瘤等疾病当中[3-6]。本课题组前期的研究发现作为常用光敏剂之一的5-ALA，在注射入大鼠腹腔内一定时间后，其中间代谢产物原卟啉IX（PpIX，光敏物质），在正常或增生的甲状旁腺组织中均具有差异性的高蓄积，在特定波长（375～400 nm）

**表1 300 mg/kg 5-ALA PDT 15 min前后大鼠甲状腺及甲状旁腺功能的变化**（$n=4$，$\bar{x} \pm s$）

| 时相点 | PTH(ng/L) | T3(ng/mL) | T4(ng/mL) | TSH(mU/L) | Ca(mmol/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| 照射前 | 128.15±4.37 | 0.68±0.08 | 28.15±1.84 | 0.77±0.11 | 2.73±0.17 |
| 照射后0.25 d | 83.34±4.21[a] | 0.62±0.14 | 27.82±2.54 | 0.74±0.23 | 2.14±0.04[a] |
| 照射后0.5 d | 75.58±5.60[a] | 0.75±0.09 | 31.01±2.97 | 0.73±0.18 | 2.08±0.18[a] |
| 照射后1 d | 71.74±8.09[a] | 0.65±0.09 | 32.01±2.97 | 0.89±0.18 | 2.19±0.13[a] |
| 照射后7 d | 63.10±7.52[a] | 0.61±0.05 | 26.69±1.75 | 0.73±0.09 | 2.15±0.16[a] |
| 照射后14 d | 69.37±8.21[a] | 0.72±0.07 | 29.42±3.84 | 0.85±0.12 | 2.21±0.21[a] |
| 照射后21 d | 81.59±6.37[a] | 0.65±0.12 | 27.27±3.49 | 0.80±0.12 | 2.33±0.19[a] |

a：$P<0.05$，与照射前比较




A:正常甲状旁腺; B:正常甲状腺;C:正常肌肉组织;D:PDT 后甲状旁腺;E:PDT 后甲状腺;F:PDT 后肌肉组织

**图 1　正常对照组与 PDT 照射 21 d 后大鼠甲状旁腺、甲状腺、周围肌肉组织学病理学变化**　(HE ×100)

光的激发下,可产生肉眼可见的荧光,依次特性可将其作为甲状旁腺相关手术的术中定位剂[12]。

光动力治疗的三要素是光敏剂、光源和氧,其中光敏剂的特性是决定光动力疗效的关键。ALA 属于第二代光敏剂,与其他光敏剂相比具有光毒性副作用小、用药后避光时间短、渗透性好、组织选择性佳等优点[13-15]。Prosst 等[16]通过大鼠动物实验证实:将 3% ALA(100 mg/kg 体质量)注射入大鼠腹腔后,在甲状旁腺及其周围组织内的荧光动力学特点表现为注射 3% ALA 后,甲状旁腺内的荧光值在 1 ~ 2 h 逐渐达到峰值,之后强度开始逐步下降,在 2 h 时检测到的甲状旁腺内荧光强度是甲状腺内的 3.2 倍以及周围肌肉组织内的 2.6 倍。因此,在本研究中我们将 5-ALA 注射入大鼠体内后,选取的激光照射延迟时间为 1 h,并检测照射前后各血清指标的变化情况。通过对比我们发现,经过光动力照射后的大鼠血清 PTH 在 6 h 内即出现了明显的下降,之后一直维持在一个较低的水平,到第 21 天时略有回升,且这一变化趋势与血清总钙相平行,而血清 T3、T4、TSH 始终未出现明显的动态改变。说明 5-ALA PDT 可以破坏甲状旁腺的功能,造成继发性的甲旁减,且同时对甲状腺功能无明显影响,具有良好的器官特异性。血清 PTH 在 PDT 照射后短时间内即出现明显的下降的原因可能与 PTH 在血清中半衰期极短有关。通过改变 5-ALA 的注射剂量和激光照射时间,我们发现,只有在 5-ALA 和光照同时存在条件下,血清 PTH 才会出现下降,且 PTH 下降的程度随光敏剂剂量与光照强度的增加而加强,具有双重依赖性,这进一步证实了光动力治疗的三要素缺一不可,并在一定程度上说明 5-ALA PDT 作用于甲状旁腺具有强度可控性这一特点。

由于 PDT 的生物学效应完全不同于手术、放疗或化疗,在光动力治疗过程中,它不伴随温度的改变,且胶原等结缔组织较少受影响,这在很大程度上维持了被治疗器官组织结构的完整性[17]。在本研究中,我们发现经过光动力照射后的甲状旁腺包膜仍比较完整,但是腺体内结缔组织增生,主细胞明显减少,空泡状脂肪细胞增多。而甲状腺及其周围肌肉组织在形态学上未观察到明显的变化,进一步表明 5-ALA PDT 作用于甲状旁腺的有效性与安全性。

综上所述,5-ALA PDT 可对正常大鼠甲状旁腺的组织形态和功能产生破坏作用,具有组织特异性好、安全性高、可控性良好等优点,可进一步将其应用于甲状旁腺功能亢进的实验研究,具有潜在的临床应用价值。本研究中所采用的照射方法是在手术暴露甲状旁腺的前提下进行的,因此,其仍属于有创治疗。由于目前光动力治疗所采用的激发光波长均为 630 nm,接近近红

外光(650～1 000 nm),基于近红外光具有较大生物穿透深度这一特点[18],当采用无创方式直接行体表光动力照射时,其是否仍然有效有待进一步研究。

**参考文献:**


[1] Juzeniene A, Peng Q, Moan J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis[J]. Photochem Photobiol Sci, 2007, 6(12): 1234－1245.

[2] Juzeniene A, Nielsen K P, Moan J. Biophysical aspects of photodynamic therapy[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2006, 25(1/2): 7－28.

[3] Nelke K H, Pawlak W, Leszczyszyn J, *et al*. Photodynamic therapy in head and neck cancer[J] Postepy Hig Med Dosw (Online), 2014, 68: 119－128.

[4] Wan M T, Lin J Y. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology[J] Clin Cosmet Investig Dermatol, 2014, 7: 145－163.

[5] Calabro G, Patalano A, Lo-Conte V, *et al*. Photodynamic chemotherapy in the treatment of superficial mycoses: an evidence-based evaluation[J]. G Ital Dermatol Venereol, 2013, 148(6): 639－648.

[6] 王元元, 杨亚东, 高杨, 等. 手术切除联合局部光动力疗法治疗皮肤恶性肿瘤的临床效果[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(7): 682－684.

[7] Liu W W, Li C Q, Guo Z M, *et al*. Fluorescence identification of parathyroid glands by aminolevulinic acid hydrochloride in rats[J]. Photomed Laser Surg, 2011, 29(9): 635－638.

[8] Takeuchi S, Shimizu K, Shimizu K Jr, *et al*. Identification of pathological and normal parathyroid tissue by fluorescent labeling with 5-aminolevulinic acid during endocrine neck surgery [J]. J Nippon Med Sch, 2014, 81(2): 84－93.

[9] Fraser W D. Hyperparathyroidism[J]. Lancet, 2009, 374 (9684): 145－158.

[10] Clarke B L. Epidemiology of primary hyperparathyroidism [J]. J Clin Densitom, 2013, 16(1): 8－13.

[11] Gasser R W. Clinical aspects of primary hyperparathyroidism: clinical manifestations, diagnosis, and therapy[J]. Wien Med Wochenschr, 2013, 163(17/18): 397－402.

[12] Dowthwaite S A, Young J E, Pasternak J D, *et al*. Surgical management of primary hyperparathyroidism[J]. J Clin Densitom, 2013, 16(1): 48 53.

[13] 杨阳, 练渝, 姜友昭, 等. 5-氨基乙酰丙酸介导继发性甲状旁腺功能亢进症大鼠甲状旁腺荧光特性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(10): 969－972.

[14] Silva J N, Filipe P, Morliere P, *et al*. Photodynamic therapies: principles and present medical applications[J]. Biomed Mater Eng, 2006, 16(4 Suppl): S147－S154.

[15] Lee P K, Kloser A. Current methods for photodynamic therapy in the US: comparison of MAL/PDT and ALA/PDT [J]. J Drugs Dermatol, 2013, 12(8): 925－930.

[16] Prosst R L, Schroeter L, Gahlen J. Kinetics of intraoperative fluorescence diagnosis of parathyroid glands[J]. Eur J Endocrinol, 2004, 150(5): 743－747.

[17] Bown S G. Photodynamic therapy for photochemists[J]. Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2013, 371(1995): 20120371.

[18] 陈志钢, 匡兴羽, 宋琳琳, 等. 近红外光驱动的纳米材料和器件的研究进展[J]. 无机化学学报, 2013, 29(8): 1574－1590.


(**收稿**:2014-11-15;**修回**:2014-12-29)

(编辑　栾　嘉)