

文章编号: 1001-3806(2005)04-0395-03

金丝桃素光动力作用诱导人鼻咽癌细胞凋亡

许川山^{1,2}, 梁荣能²

(1. 重庆医科大学 超声影像学研究所, 重庆 400010; 2. 香港浸会大学 中医药学院 教学部, 香港)

摘要: 为了观察中药金丝桃素光动力作用对鼻咽癌细胞凋亡的影响, 应用膜联蛋白 Annexin V-PI 双染结合流式细胞仪, 分析了中药金丝桃素光动力作用后, 人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞发生凋亡和继发性坏死的比率。中药金丝桃素光动力作用实验组人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞发生凋亡和继发性坏死的比率分别增加到 53.08% 和 6.77%, 且均显著高于单纯光照组、单纯金丝桃素光敏剂处理组和假照射组 ($P < 0.01$), 而单纯光照组、单纯金丝桃素光敏剂处理组和假照射组三对照组间无明显差异 ($P > 0.05$)。中药金丝桃素光动力作用能有效诱导人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞凋亡的发生, 这也可能是金丝桃素光动力作用杀伤鼻咽癌的重要机制之一。

关键词: 金丝桃素; 光动力治疗; 鼻咽癌细胞; 凋亡

中图分类号: R730.57 文献标识码: A

Study of hypericin-mediated photodynamic therapy on human nasopharyngeal carcinoma cells

XU Chuan-shan^{1,2}, LEUNG Wing-nang²

(1. Institute of Ultrasound Imaging Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China; 2. Department of Chinese Medicine Education Division, School of Chinese Medicine, HongKong Baptist University, HongKong, China)

Abstract To observe the effect of hypericin-mediated photodynamic therapy on apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells, the apoptotic and secondary necrotic rate of the nasopharyngeal carcinoma (NPC) CNE2 cells induced by hypericin-mediated photodynamic therapy was determined by flow cytometry with Annexin V-PI staining. The apoptotic and secondary necrotic rate of the NPC CNE2 cells after photodynamic therapy significantly increased to 53.08% and 6.77%, and they were higher than those of the controls respectively ($P < 0.01$), but there was no significance of the apoptotic and secondary necrotic rate between the controls ($P > 0.05$). Hypericin-mediated photodynamic therapy might obviously trigger the NPC CNE2 cells into apoptosis, which might be one of the mechanisms of hypericin-mediated photodynamic therapy on nasopharyngeal carcinoma.

Key words hypericin; photodynamic therapy; nasopharyngeal carcinoma cell; apoptosis

引 言

鼻咽癌是东南亚及我国南方各省常见的一种恶性肿瘤, 严重危害东南亚及我国南方人民的身心健康。光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 为人类攻克鼻咽癌提供新的手段。然而, 现常用的光敏剂, 如国外的 Photofrin II 和国产的血卟啉衍生物等均为多种卟啉及其衍生物的混合制品, 成分复杂、化学结构不稳定、易受生物代谢因素的影响, 其光敏损伤作用的程度不易控制, 影响疗效的稳定性, 这严重限制了光动力疗

法的临床应用。目前, 国内外均在致力于成分单一、化学结构明确、性质稳定、在体内吸收代谢快、易于掌握其作用途径和强度的新型光敏剂的研究应用^[1-3]。于是一系列化学合成光敏物质相继问世, 但化学合成药物很难克服其本身的毒副作用。中草药是祖国医学宝藏中的重要组成部分。近年来的研究发现, 某些中草药如姜黄素、补骨脂素等具有一定的光敏活性和凋亡诱导作用。鉴于我国有丰富的中草药资源, 从中草药提取物中研制高效、低毒的新型理想光敏剂正倍受人们的普遍青睐。中药贯叶连翘是藤黄科金丝桃属多年生草本植物, 具有清心明目、调经活血、止血生肌、解毒消炎之功效。金丝桃素是从中药贯叶连翘中提取的主要活性成分。现代药理学研究表明: 金丝桃素这种稠芳环类化合物可抑制蛋白激酶 C、酪氨酸激酶活性, 具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗抑郁和抗肿瘤等作用。且有研究发现, 金丝桃素在光照条件下能产生光化学反应

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300468); 全军医药卫生十五科研资助项目 (01Q102)

作者简介: 许川山 (1972-), 男, 副研究员, 现主要从事光动力基础及应用研究。

Email: xchuan@163.com

收稿日期: 2004-06-10 收到修改稿日期: 2004-11-04

且杀伤病毒和肿瘤细胞的作用较无光照条件下更显著^[4,5]。表明金丝桃素具有光化学反应特性和光动力治疗作用,是一种高效、低毒的新型中药光敏剂,这使其有可能作为一种新的光敏药物应用于病毒感染和恶性肿瘤的光动力治疗。

近年来,香港浸会大学的梁博士已在新型光敏剂介导的光动力治疗鼻咽癌方面进行了广泛深入的研究,并取得许多有意义的成果^[3,6]。为保持我国在 PDT 基础与应用研究中的领先地位,最近梁博士正致力开拓中草药光敏剂在 PDT 防治鼻咽癌及机制的研究,并以中药金丝桃素作为光敏剂开展了系列研究,初步发现中药金丝桃素光动力疗法具有显著的杀伤鼻咽癌细胞作用,但其作用机制有待明确阐明。研究通过膜联蛋白 Annexin V-PI 双染结合流式细胞仪检测分析金丝桃素光动力作用对低分化人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞凋亡的影响,为深入探讨金丝桃素光动力抗癌作用机制提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及配制

金丝桃素是美国 FDA 产品,分子量为 504.46 其可见光区最大吸收峰值位于 550nm 和 590nm,实验前以二甲亚砜为溶剂配制成浓度为 1mmol/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。Annexin V-PI 双染检测试剂盒:Vybrant™ Apoptosis Assay Kit# 3 (Molecular Probes)。

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)在含质量浓度为 0.1g/mL 的小牛血清的 RPMI1640 细胞培养液中,置于 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 孵育箱中常规细胞培养、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。实验组为金丝桃素光动力实验组(即加光敏剂和光照);对照组包括单纯光照对照组(不加光敏剂,只光照),单纯金丝桃素对照组(只加光敏剂不光照)和空白对照组(不加光敏剂的假照射组,除不加光敏剂和光照能量密度为 0J/cm² 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 0.5μmol/L 的金丝桃素,单纯光照对照组和空白对照组加入等量 RPMI1640 培养液,置于 37℃、体积分数为 5% CO₂ 孵育箱中孵育 4h,去掉含金丝桃素的 RPMI1640 培养液,用 PBS 缓冲液冲洗两遍后,再换成新的含

质量浓度为 0.1g/mL 的小牛血清 RPMI1640 培养液;光动力实验组及单纯光照组使用光源为 400W 的石英卤素灯照射,照射光经中心波长为 590nm 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 2J/cm²。

1.4 检测细胞凋亡

选取对数生长期的人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞,质量浓度为 2.5mg/mL 的胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,按 2 × 10⁴ /mL 接种于 24 孔培养板,继续培养 12h 后进行分组及光动力处理。4 组细胞经实验处理后置于 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 孵育箱中继续培养 8h 质量浓度为 2.5mg/mL 的胰蛋白酶消化,收集细胞,Annexin V-PI 双染严格按 Vybrant™ Apoptosis Assay Kit# 3 (Molecular Probes) 说明书操作,具体如下:吸收细胞培养液至 1.5mL 离心管中 → 加入 PBS 缓冲液 300μL,洗 2 次 → 质量浓度为 2.5mg/mL 的胰蛋白酶消化收集细胞,离心 1500rad/min × 10min,弃上层液 → 加入缓冲液,吹打,将三平行管细胞混和,离心 1500rad/min × 10min,弃上层液 → 加入缓冲液 200μL,吹打混匀,加 5μL Annexin V 和 10μL PI 染液 (1mg/mL),暗处染色 15min → 加入缓冲液 200μL,吹打混匀,上机检测,采用 Elite ESP 流式细胞仪,使用单一氩离子激光器,其激发波长为 488nm,发射波长分别为 530nm (Annexin V-FITC) 和 570nm (DNA-PI),每个标本检测 1 × 10⁵ 个细胞,用 CELLQUEST 软件进行分析。

1.5 统计学分析

资料用率的百分比来表示,采用 SPSS 统计包进行比较,显著性水平 α 一律取 0.05。

2 结果

Annexin V 是一种 Ca²⁺ 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

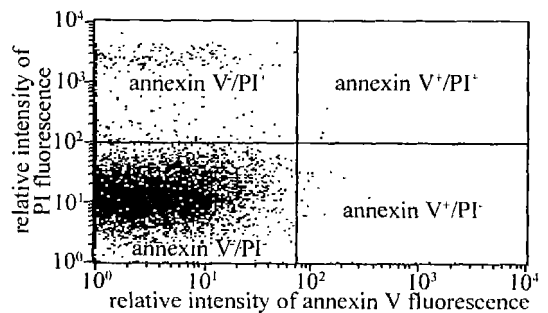


Fig 1 The sketch map of the result analysis of flow cytometry with Annexin V/PI staining

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,借助流式细

胞仪可以将细胞分为 4 个亚群,如图 1 所示:第 1 象限表示机械性损伤细胞 ($Annexin V^- / PI^+$),第 2 象限表示继发性坏死细胞或晚期凋亡细胞 ($Annexin V^+ / PI^+$),第 3 象限表示正常活细胞 ($Annexin V^- / PI^-$),第 4 象限表示早期凋亡细胞 ($Annexin V^+ / PI^-$)。结果直接用每个象限中细胞数占细胞总数的百分比(率)分析比较,简单方便且灵敏特异,被认为是目前检测细胞凋亡的首选方法^[7,8]。实验应用 $Annexin V$ -PI 双染结合流式细胞仪定量检测金丝桃素光动力作用后 8h 人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞的凋亡发生率的结果显示:金丝桃素光动力实验组人鼻咽癌细胞株 CNE2 的凋亡发生率达 53.08%,单纯光照对照组、单纯金丝桃素对照组和空白对照组的凋亡发生率分别为 0.23%, 0.71%, 0.21%。金丝桃素光动力实验组人鼻咽癌细胞株 CNE2 的继发性坏死发生率为 6.77%,单纯光照对照组、单纯金丝桃素对照组和空白对照组的继发性坏死发生率分别为 0.11%, 0.08%, 0.07%。统计学分析结果表明,对照组间凋亡和继发性坏死发生率无明显差异 ($P > 0.05$),而金丝桃素光动力实验组凋亡率以及继发性坏死发生率与对照组相比,差异非常显著性 ($P < 0.01$)。

3 讨论

随着分子生物学的迅猛发展,人们发现肿瘤实际上是一种凋亡异常的疾病,本该发生凋亡的细胞未发生凋亡是肿瘤发生的机制之一^[9]。目前研究表明,诱导细胞凋亡是许多化疗药物和放射治疗方法杀伤恶性肿瘤的重要机制^[9]。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 (reactive oxygen species, 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^[10]。因此,研究光动力治疗诱导鼻咽癌细胞凋亡的生物学作用为深入探讨中药金丝桃素光动力作用防治鼻咽癌的生物学效应和明确阐明金丝桃素光动力作用抗癌效应的生物学机制开创了新的领域。

目前检测细胞凋亡的方法很多,但现已有的研究表明, $Annexin V$ -PI 双染法既可检测早期凋亡细胞,又可区分早期凋亡与继发性坏死或晚期凋亡细胞,较现有的其它凋亡检测方法具有更高的灵敏性和特异性,且不需要固定,省时省力,是目前流式细胞仪定量检测细胞凋亡的首选方法^[7,8]。实验就是在梁博士的指导下,利用 $Annexin V$ -PI 双染结合流式细胞仪检测了金

丝桃素光动力作用后人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞凋亡的发生情况。结果表明,金丝桃素光动力作用具有早期诱导人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞发生凋亡的生物学效应。这为深入探讨金丝桃素光动力作用杀伤鼻咽癌细胞的生物学机制提供了理论依据。

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^[11,12]:即细胞凋亡的线粒体依赖性途径和死亡受体途径。尽管有研究表明线粒体不仅是新型光敏剂金丝桃素优先定位的靶标也是光动力损伤的最先打击的靶点^[6],但金丝桃素光动力作用究竟是通过上述哪条途径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。

实验得到香港浸会大学 FRG 课题的资助,并得到了该校中医药学院张若韶女士和生物系梁碧蓬小姐的无私帮助,在此一并表示衷心感谢!

参 考 文 献

- [1] 陈志龙,张黎明,孙 结 *et al* 卟啉氮芥对人肝癌细胞 SMMC7721 的光动力杀伤作用 [J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(3): 271~273
- [2] 梁治平,刘长征,程竟仪 *et al* PVM-BAC5 和 I31FBAC5 联合导向治疗鼻咽癌的实验研究 [J]. 癌症, 2003, 22(8): 831~835
- [3] 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]. Toxicology Letter, 2000, 115(1): 53~61
- [4] KAMUHABWA A A, HUYGENS A, de WITTE P A. Photodynamic therapy of transitional cell carcinoma multicellular tumor spheroids with hypericin [J]. International Journal Oncology, 2003, 23(5): 1445~1450.
- [5] DU H Y, OLIVO M, TAN B K *et al* Hypericin mediated photodynamic therapy induces lipid peroxidation and necrosis in nasopharyngeal cancer [J]. International Journal Oncology, 2003, 23(5): 1401~1405
- [6] SUN X, LEUNG W N. Photodynamic therapy with pyropheophorbide a methyl ester in human lung carcinoma cancer cell efficacy, localization and apoptosis [J]. Photochemistry and Photobiology, 2002, 75(6): 644~651.
- [7] 傅文字,李敏伟,陈加平 *et al* 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, 2004, 28(1): 101~102
- [8] 彭黎明,江虹, BRADLEY C 细胞凋亡和继发性坏死的 $Annexin V$ 法定量检测 [J]. 华西医科大学学报, 2001, 32(4): 602~604
- [9] 郭德玉,陈意生,卞修武 *et al* 去甲二氢愈创木酸诱导体外恶性胶质瘤细胞凋亡的研究 [J]. 癌症, 2001, 20(11): 1246~1250.
- [10] 高 飞,易 静,史桂英 *et al* 活性氧水平决定白血病细胞对三氧化二砷诱导细胞凋亡的敏感性 [J]. 生物物理学报, 2001, 33(5): 585~589
- [11] GREEN D R. Apoptotic pathways paper wraps stone blunts scissors [J]. Cell, 2000, 102(1): 1~4
- [12] GREEN D R, REED J C. Mitochondria and apoptosis [J]. Science, 1998, 281(8): 13909~13921.