

文章编号: 1001-3806(2006)01-0078-04

## 光敏化 BPD-MA 后膀胱癌细胞凋亡的研究

许川山<sup>1</sup>, 吴士明<sup>2</sup>, 虞乐华<sup>3</sup>, 王志刚<sup>1</sup>, 周媛<sup>3</sup>, 杨青<sup>4</sup>

(1. 重庆医科大学 超声影像学研究所, 重庆 400010; 2. 第三军医大学 新桥医院, 重庆 400037; 3. 重庆医科大学 附属第二医院 康复中心 激光研究室 重庆 400010; 4. 第三军医大学 西南医院 整形外科中心, 重庆 400038)

**摘要:** 为了研究光动力抑癌作用机制, 采用流式细胞仪和 TUNEL 法检测激光光敏化 BPD-MA 后人膀胱癌细胞株 BU-87 细胞凋亡的发生状况。激光光敏化 BPD-MA 后人膀胱癌细胞株 BU-87 组细胞凋亡发生率明显增高, 许多细胞核呈棕黄色, 高倍镜下可见细胞核内有大量棕褐色颗粒, 与阳性对照中凋亡细胞核的特征相符合, 而对照组此种细胞少见。TUNEL 阴性对照中细胞核均呈蓝色。结果表明, 激光激活 BPD-MA 光动力作用明显诱导人膀胱癌细胞株 BU-87 细胞发生凋亡, 这可能是其抑癌作用机制之一。

**关键词:** 医用光学与生物技术; BPD-MA; 光动力作用; 膀胱癌细胞; 细胞凋亡

**中图分类号:** R730.57 **文献标识码:** A

## Apoptosis of human bladder cancer BU-87 cells after photodynamic therapy with laser-activated BPD-MA determined with TUNEL assays

XU Chuan-shan<sup>1</sup>, WU Shi-ming<sup>2</sup>, YU Le-hua<sup>3</sup>, WANG Zhi-gang<sup>1</sup>, ZHOU Yuan<sup>3</sup>, YANG Qing<sup>4</sup>

(1. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China; 2. Xinqiao Hospital Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; 3. Department of Laser Research Rehabilitation Center, Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China; 4. Center of Plastic Surgery, Southwest Hospital Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract** In order to study the mechanism of photodynamic therapy on malignant tumors, photosensitization of BPD-MA is activated by laser with red light (632.8nm) delivered at  $10\text{mW}/\text{cm}^2$  to give a total dose of  $2\text{J}/\text{cm}^2$ . Apoptosis of human bladder cancer BU-87 cells is determined with flow cytometry with PI staining and terminal deoxynucleotidyl transferase (TUNEL) assays. Results show that photodynamic therapy with BPD-MA significantly increases the rate of apoptosis in BU-87 cells. A lot of the positive cells in which their nucleus is brown yellow, fine particle shape or overflowing dispersed are observed after treatment of cells with photodynamic therapy with BPD-MA. However, laser irradiation alone, BPD-MA alone and sham radiation without BPD-MA can not affect apoptosis of human bladder cancer BU-87 cells. A conclusion can be made that treatment of cells with photodynamic therapy obviously induces human bladder cancer BU-87 cells to apoptosis, which may be one of the important mechanisms of photodynamic therapy on malignant tumors.

**Key words** medical optics and biotechnology; BPD-MA; photodynamic therapy; bladder cancer; apoptosis

## 引 言

光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 是随着光纤技术、激光医学和内镜技术发展而兴起的一种治疗恶性肿瘤的新方法, 已在治疗支气管、膀胱和皮肤等部位的肿瘤方面表现出良好的应用前景, 但是光动力抑癌作用机制有待进一步阐明<sup>[1, 2]</sup>。本试验选择人膀胱癌细胞株 BU-87 细胞作为研究对象, 应用流式细胞

仪和脱氧核苷酸转移酶介导 dUTP 切口末端标记技术原位 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 观察了激光激活新型光敏剂苯并卟啉衍生物单酸环 A (benzoporphyrin derivative monoacid ring A, BPD-MA) 光动力作用对人膀胱癌细胞株 BU-87 细胞凋亡的影响, 旨在进一步了解光动力抑癌作用的生物学机制。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 主要试剂及配制

光敏剂 BPD-MA 是加拿大 QLT 公司产品。碘化丙啶 (PI) 是 Sigma 公司产品, 以 PBS 配制成  $50\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PI 染液。小牛血清、胰蛋白酶、RPMI 1640 细胞培养基为美国 Hyclone 公司产品。TUNEL 试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品。DAB 显色剂配制是

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

作者简介: 许川山 (1972-), 男, 副研究员, 博士后, 主要研究方向为光动力研究基础及应用研究。

Email: xcs@163.com

收稿日期: 2004-12-16 收到修改稿日期: 2005-01-25

DAB 5mg 0.01N PBS 10mL (pH 7.4), 用前过滤, 用 30% 的  $H_2O_2$  稀释至 0.02%。HEPES 是德国 Bimol 公司产品。

## 1.2 细胞培养

人膀胱癌细胞株 BU-87(由北京大学泌尿外科研究所分离并建株, 第三军医大学西南医院感染科邓国宏博士惠赠)在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液中, 置于 37°C, 5%  $CO_2$  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 BU-87 细胞随机分成实验前对照组和实验组。实验组包括 BPD-MA 光动力实验组(加光敏剂, 照光)、单纯激光照射对照组(不加光敏剂, 只照光)、单纯 BPD-MA 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  $0J/cm^2$  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 62.5ng/mL 的 BPD-MA, 单纯激光照射对照组和空白对照组加入等量不含小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 置于 37°C, 5%  $CO_2$  孵育箱中孵育 90min, 去掉含 BPD-MA 的 RPMI 1640 培养液, 用 D-Hanks 缓冲液(去酚红)冲洗两遍后, 再换成新的含 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液, 将培养板放置于 37°C 恒温水浴槽, 光动力实验组及单纯激光照射组使用 632.8nm He-Ne 激光照射(HN-3 型, 北京科学仪器厂产品, 输出功率为 0mW ~ 100mW 连续可调, 光导纤维连续输出)。调整激光功率和光斑面积使细胞实际接受到光功率密度为  $10mW/cm^2$ , 使激光通过光导纤维均匀垂直地照射到细胞培养板, 使各组细胞实际接受到的光能量密度达到  $2.4J/cm^2$ 。照射前后监测激光输出功率的变化, 控制其变化幅度小于 5%。照射后置 37°C, 5%  $CO_2$  孵育箱中连续培养 24h 进行以下指标检测。

## 1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率

选取对数生长期的膀胱癌细胞株 BU-87, 制成单细胞悬液, 按  $5 \times 10^4$  /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。各组细胞经实验处理后置于 37°C, 5%  $CO_2$  孵育箱中继续培养 8h 收集细胞, 70% 冷乙醇固定: 置细胞于 0.1mL PBS 缓冲液中, 用注射器迅速注入 4°C 冷乙醇中, 边注射边振荡, 以防细胞成团, 把细胞贮存于 4°C 冰箱中至少 12h 检测时 1500r/min 离心 5min 弃乙醇, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 悬细胞于 0.5mL PBS 缓冲液中, 加入 RNase A (每样品约 3000 活性单位) 37°C 冰浴中孵育 30min 后, 立即放入冰浴中, 终止 RNase A 的作用, 加入 0.5mL

PI 染色 ( $50\mu g/mL$ ) 行 DNA 染色, 样品保存在黑暗处, 至少染色 30min 上机前用大于 100 目的尼网过滤。上机检测, 用 CellQuest 软件进行分析。

## 1.5 TUNEL 法检测细胞凋亡

TUNEL 法按细胞凋亡检测试剂盒使用说明书所示操作方法进行 DNA 末端标记, 具体方法如下: 经 4% 多聚甲醛固定好的样本片, PBS 缓冲液洗 2min  $\times$  2 次, 蒸馏水洗涤 2min  $\times$  2 次  $\rightarrow$  新鲜配制 3%  $H_2O_2$ , 室温处理 10min, 蒸馏水洗涤 2min  $\times$  3 次  $\rightarrow$  标本片加 TBS 1:100 新鲜稀释 Proteinase K, 37°C 消化 3min, 蒸馏水洗涤 2min  $\times$  3 次  $\rightarrow$  加标记缓冲液 (labeling buffer) 20 $\mu$ L / 片, 以保持切片湿润, 按每张切片取 TdT 和 DIG-d-UTP 各 1 $\mu$ L 加入 18mL 标记缓冲液中, 混匀, 甩去玻片上多余液后加标记液 20 $\mu$ L / 片, 置标本片于湿盒中, 37°C 标记 2h  $\rightarrow$  TBS 液洗 2min  $\times$  3 次  $\rightarrow$  加封闭液 50 $\mu$ L / 片, 室温 30min 甩掉封闭液, 不洗  $\rightarrow$  用封闭液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体 50 $\mu$ L / 片加至标本片上, 置于湿盒中, 37°C 反应 30min, TBS 液洗 2min  $\times$  4 次  $\rightarrow$  每张载玻片加入 50 $\mu$ L ~ 100 $\mu$ L DAB 显色液, 室温 15min  $\rightarrow$  苏木素复染 45s, 自来水冲洗, 室温下干燥 24h, 透明, 封片, 光子显微镜下观察细胞核呈棕黄色者为阳性细胞, 细胞核为蓝色者是阴性细胞, 同时设立阳性对照和阴性对照; 阳性对照每张片滴加 100 $\mu$ L DNase I ( $1mg/mL$ ), 室温下放置 10min, 操作同上, 阴性对照用 TUNEL 标记液替代反应混合液, 其余操作同上。

## 2 结果

应用流式细胞仪定量检测到光敏化 BPD-MA 后人膀胱癌细胞株 BU-87 的凋亡发生率从对照组的 ( $5.28 \pm 1.49$ )% 显著增加到 ( $26.11 \pm 2.59$ )% ( $P < 0.01$ ), 而对照组间比较差异不明显。同时 TUNEL (POD) 法染色, 光学显微镜下观察到光敏 BPD-MA 后人膀胱癌细胞株 BU-87 组许多细胞核呈棕黄色, 高倍镜下可见细胞核内有大量棕褐色颗粒, 与阳性对照中凋亡细胞核的特征相符合, 而对照组此种细胞少见。TUNEL 阴性对照中细胞核均呈蓝色 (见图 1 ~ 图 4)。

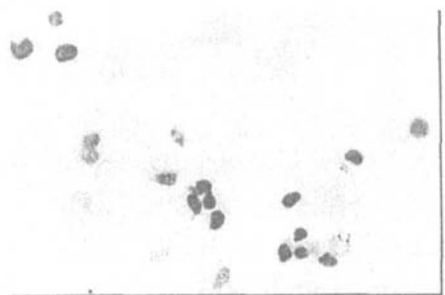


Fig 1 TUNEL-positive control

Fig 2 TUNEL-negative control

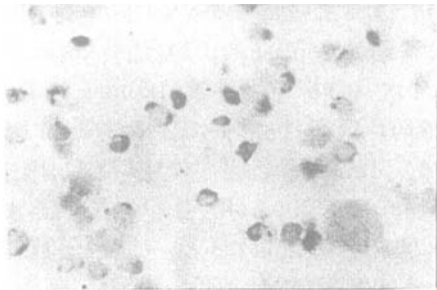


Fig 3 TUNEL staining 8h post photodynamic therapy with BPD-MA

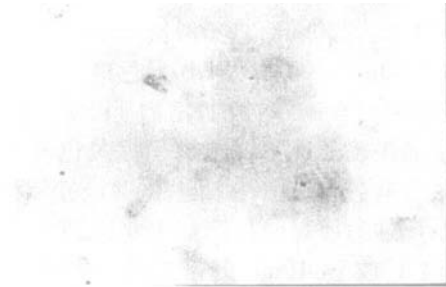


Fig 4 TUNEL staining in experimental control

### 3 讨 论

光动力治疗肿瘤是近 20 年兴起并不断发展起来的治疗恶性肿瘤的一项新技术。其原理利用恶性肿瘤能选择性摄入并滞留光敏剂,在特定波长的光激发下产生一系列光化学反应导致肿瘤细胞的不可逆性损伤达到治癌目的<sup>[3]</sup>。尽管光动力治疗的光化学机制不外乎 I、II 型机制<sup>[4]</sup>,但光动力治疗肿瘤的生物学机制仍需进一步阐明。

真核多细胞生物的细胞数目是通过细胞的增殖和死亡二者的平衡来维持的,而维持这种平衡的因素之一的“死亡”在很大程度上是通过凋亡来实现的。肿瘤实际上也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<sup>[5-7]</sup>。诱导细胞凋亡为人类攻克恶性肿瘤提供了一条新途径<sup>[5]</sup>。目前研究发现许多化学药物和放射治疗方法都是通过诱导细胞凋亡发挥其抗癌作用的<sup>[6,8]</sup>。探讨光动力作用对肿瘤细胞凋亡的影响,有助于全面深入地阐明肿瘤的光动力治疗生物学机制。细胞凋亡又称细胞程序性死亡,是指细胞在一定的生理或病理条件下,遵循自身的程序,自己结束其生命的过程,它是一个主动的、

高度有序的、基因调控的过程。细胞凋亡发生时,核 DNA 在内源性核酸水解酶的作用下降解成  $(50 \sim 300) \times 10^3$  bp (base pair 碱基对)的大片段,然后其中约 30% 的在  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  依赖的核酸内切酶的作用下在核小体之间被随机切断,形成  $(180 \sim 200)$  bp 及整数倍碱基对的寡核苷酸片段,在琼脂糖凝胶电泳上呈典型的“梯形带”。在脱氧核糖核酸末端转移酶的作用下,可将荧光标记的 dUTP 标记到寡核苷酸的 3'-羟基末端,该荧光素与马辣根过氧化物酶标记的抗荧光素抗体结合后,再加入显色底物反应,即可形成有色沉淀,使凋亡的细胞核原位染色,在光镜下可以看到着色的细胞核。且凋亡细胞表现为细胞体积变小、染色质浓缩、边集,胞质、胞核固缩以及凋亡小体的形成,凋亡细胞内 DNA 含量减少,加之由于 DNA 降解,与荧光染料结合减少,细胞 DNA 荧光强度降低, DNA 直方图上显示在  $G_0/G_1$  峰前出现一个 DNA 含量减少的亚二倍体峰,或称亚  $G_0/G_1$  峰,即凋亡峰。基于上述原理,目前检测细胞凋亡的方法主要有超微结构的观察、DNA 电泳分析、流式细胞仪检测和 TUNEL 法检测<sup>[9-12]</sup>。流式细胞仪结合 PI 染色可通过检测在  $G_0/G_1$  峰前出现的亚二倍体峰定量分析细胞凋亡的发生率,目前较广泛地应用于细胞凋亡的检测。实验中 PI 结合流式细胞仪检测到光敏化 BPD-MA 后人膀胱癌细胞株 BU-87 细胞凋亡发生率较对照组明显增高,提示 BPD-MA 光动力处理能显著诱导人膀胱癌细胞株 BU-87 细胞凋亡的发生(具体资料另文发表)。TUNEL 法是现代分子生物学与形态学相结合检测细胞凋亡的新方法,能准确反映细胞凋亡的形态学和生物化学特征。自 1992 年 GAVRIELI 首次将 TUNEL 法应用于细胞凋亡的检测以来, TUNEL 检测法以其简便、灵敏的特性赢得了广大研究者的普遍青睐<sup>[13]</sup>。因此,本研究采用 TUNEL 法检测 BPD-MA 光动力作用对人膀胱癌细胞株 BU-87 凋亡发生状况,为进一步证实光敏化 BPD-MA 促膀胱癌细胞凋亡的作用。结果显示,光学显微镜下观察到 TUNEL 阳性对照中细胞核均呈棕黄色, TUNEL 阴性对照中细胞核均呈蓝色。BPD-MA 光动力作用后人膀胱癌细胞株 BU-87 组有较多细胞的核呈棕黄色,高倍镜下可见细胞核内有大量棕褐色颗粒,与阳性对照中凋亡细胞核的特征相符合,而对照组此种细胞少见。这不仅表明 TUNEL 法是一种重要的细胞凋亡检测手段,而且进一步表明激光活化 BPD-MA 光动力作用能有效诱导人膀胱癌细胞株 BU-87 细胞凋亡。可见,有效诱导人膀胱癌细胞株 BU-87 细胞发生凋亡可能是激光活化 BPD-MA 光动力作用抑制膀胱癌细胞的重要生物学机制。不过,激光活化 BPD-MA 光动力作用能有效诱导人膀胱癌细

胞株 BU-87 细胞凋亡的分子机制还有待今后探讨。

该研究得到了中国人民解放军北京军区总医院肿瘤科刘爱琴博士、四川省泸州医学院康复科余茜博士、第三军医大学新桥医院唐建民教授、第三军医大学基础部物理教研室的邓玲副教授、陈仕国讲师以及第三军医大学西南医院感染科邓国宏博士的大力帮助,在此深表感谢!

### 参 考 文 献

- [ 1 ] CHEN Zh L, ZHANG LM, SUN J *et al*. The photodynamic and chemotherapeutic effect of porphyrin nitrogen mustard on liver cancer cell SMMC7721 [ J ]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2001, 22( 3 ): 271 ~ 273( in Chinese).
- [ 2 ] XU Ch S, YU Q, WU Sh M *et al*. Leukemia cell purging through photodynamic therapy with oligonucleotide modified by photosensitizer [ J ]. Laser Technology, 2002, 26( 2 ): 159 ~ 160( in Chinese).
- [ 3 ] WANG R P, LIY X. Application of photodynamic therapy in management of tumors [ J ]. Biomedicine and Engineering of Foreign Medical Sciences, 1999, 22( 6 ): 355 ~ 358( in Chinese).
- [ 4 ] WANG T Y, MA J Sh. As the light took effect the symptoms vanished——introduction of photodynamic therapy [ J ]. Nature Journal, 2001, 22( 5 ): 276 ~ 281( in Chinese).
- [ 5 ] THOMPSON H J, STRANGE R, SCHEDN P J *et al*. Apoptosis in the

- genesis and prevention of cancer [ J ]. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 1992, 1( 1 ): 597 ~ 603.
- [ 6 ] GUO D Y, CHEN Y, SHI BIAN X W *et al*. Study of nordihydroguaiaretic acid induced apoptosis in human malignant glioma cell line [ J ]. Cancer, 2001, 20( 11 ): 1246( in Chinese).
- [ 7 ] HETTS SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease [ J ]. Journal of the American Medical Association, 1998, 279( 4 ): 300 ~ 307.
- [ 8 ] FEUS L, SZONDY Z, URA Y I. Probing the molecular program of apoptosis by cancer chemotherapeutic agents [ J ]. Journal of Cell Biochemistry, 1995, 22( suppl 1 ): 151 ~ 161.
- [ 9 ] ORMEROD M G. The study of apoptotic cells by flow cytometry [ J ]. Leukemia, 1998, 12( 7 ): 1013 ~ 1025.
- [ 10 ] PENG L M. Contrastive study of six assays for apoptosis [ J ]. Chinese Journal of Pathology, 1999, 28( 1 ): 55 ~ 57( in Chinese).
- [ 11 ] LU A Q, LIU D Q, GU Y *et al*. Effects of copper vapor laser irradiation on apoptosis and proliferation inhibiting of vascular smooth muscle cells [ J ]. Laser Journal, 2002, 23( 6 ): 71 ~ 72( in Chinese).
- [ 12 ] GUPTA S, HUSSIAN T, MUKHTAR H. Molecular pathway for cepigallocatein-3-gallate induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells [ J ]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003, 4( 1 ): 177 ~ 185.
- [ 13 ] GAVRIELIY, SHERMAN Y, BEN-SASSON S A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragment [ J ]. Journal of Cell Biology, 1992, 119( 3 ): 493 ~ 501.

(上接第 77 页)

增加了薄膜对入射激光能量的热吸收,使产生的温度场分布不均匀,有利于激光对薄膜元件的损伤或破坏。

激光辐照  $\text{TD}_2/\text{SiO}_2$  薄膜元件出现薄膜起泡、膜层脱落现象可能与元件镀膜的制备工艺有关。薄膜起泡、膜层脱落可能意味着在薄膜制备工艺中形成膜层与基体材料之间的附着力较差。此外,激光辐照  $\text{TD}_2/\text{SiO}_2$  薄膜元件形成薄膜与基体材料的热变形差别也是薄膜起泡、脱落的主要原因之一。

通过实验,得到  $1.06\mu\text{m}$  连续激光在不同激光强度下辐照  $\text{TD}_2/\text{SiO}_2$  薄膜元件产生反射光信号随时间的变化过程,为确定  $\text{TD}_2/\text{SiO}_2$  薄膜元件激光损伤阈值和破坏时间提供了依据。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] GAO Zh Y, GAO Y, ZHANG K H. Military photoelectricity system

- [ M ]. Beijing: Beijing Institute of Science and Technology Press, 1996, 7( in Chinese).
- [ 2 ] LI Zh Y, LI F Ch, GUO J P *et al*. Wavelength effects on laser induced optical thin film damage [ J ]. Chinese Journal of Lasers, 1991, 18( 1 ): 31 ~ 33( in Chinese).
- [ 3 ] HU J P, CHEN M, FU X Y *et al*. Relation between and defects of  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{SiO}_2$  HR coating [ J ]. High Power Laser and Particle Beams, 2001, 13( 5 ): 529 ~ 532( in Chinese).
- [ 4 ] LI Zh Y, DENG H, FANG Zh X.  $1.06\mu\text{m}$  laser induced damage of  $\text{T}_i\text{Zr}$  thin-film optical coating [ J ]. Chinese Journal of Lasers, 1988, 16( 7 ): 413 ~ 416( in Chinese).
- [ 5 ] PAN Y J, FENG J. Damage mechanism of optical films by high-power laser [ J ]. Semiconductor Optoelectronics, 1997, 18( 1 ): 62 ~ 65( in Chinese).
- [ 6 ] XIA J J, LI Zh Y, CHENG L.  $532\text{nm}$  laser induced damage to optical film [ J ]. Laser Technology, 1996, 20( 3 ): 378 ~ 379( in Chinese).
- [ 7 ] SUN Ch W. Laser irradiation effect [ M ]. Beijing: National Defense Industry Press, 2002, 310 ~ 312( in Chinese).