

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201301009

· 论著 ·

# 新型光敏剂 I 对头颈部肿瘤细胞的光动力活性

李东红<sup>1</sup>, 李鹏熙<sup>1</sup>, 蒋宗林<sup>2</sup>, 郭林峰<sup>2</sup>

(1. 创伤、烧伤、复合伤国家重点实验室, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所第二研究室, 重庆 400042; 2. 西华师范大学化学系, 四川南充 637002)

**摘要:** 目的 在光敏剂卟吩分子中通过 PEG 链引入靶向基团-叶酸, 构建了一个新型的光敏剂 I, 并评价光敏剂 I 对喉癌 Hep-2 细胞和鼻咽癌 CNE 细胞的肿瘤靶向性和光动力活性。方法 利用 Western blot 实验检测 Hep-2 细胞和 CNE 细胞的叶酸受体表达; 采用荧光测定法评价两种细胞在有或无过量叶酸存在时对光敏剂 I 的吞噬作用; 采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 试验检测光敏剂 I 在有或无光照条件下对 Hep-2 细胞和 CNE 细胞的细胞毒性, 以及光敏剂浓度和光照剂量对细胞存活率的影响。结果 Western blot 实验结果表明 Hep-2 细胞有较强的叶酸受体表达, 而 CNE 细胞则为叶酸受体低表达。两种细胞对光敏剂 I 的摄取均随光敏剂浓度的增加而增强, 但 Hep-2 细胞的摄取能力明显强于 CNE 细胞 ( $P < 0.01$ ), 且过量自由叶酸的存在可竞争性地抑制 Hep-2 细胞对光敏剂 I 的摄取 ( $P < 0.01$ )。MTT 实验结果显示在光照时, 光敏剂 I 对 Hep-2 细胞和 CNE 细胞均有显著的光毒性, 且其光动力活性与光敏剂浓度和光照剂量呈正相关性。结论 光敏剂 I 对叶酸受体阳性表达的喉癌 Hep-2 细胞有明显的靶向性和光动力活性。

**关键词:** 光敏剂 I; Hep-2 细胞; CNE 细胞; 肿瘤靶向性; 光动力活性

中图分类号: R739.91

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2013)01-0038-06

## Photodynamic activity of novel photosensitizer I for tumor cells of head and neck

LI Dong-hong, LI Peng-xi, JIANG Zong-lin, et al.

(State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, the 2nd Department of Research Institute of Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract:** **Objective** A novel photosensitizer I was synthesized in our laboratory by linking photosensitizer chlorin with folic acid, a targeting group, through PEG linker. The aim of this paper is to evaluate the targeting and photodynamic activities of photosensitizer I for laryngeal carcinoma Hep-2 cells and nasopharyngeal carcinoma CNE cells. **Methods** The expression of folate receptor in Hep-2 cells and CNE cells was detected by Western blot. The cellular phagocytosis of photosensitizer I by Hep-2 cells and CNE cells with or without the presence of excessive folic acid were tested with fluorescence spectroscopy. The cytotoxicity of photosensitizer I against Hep-2 cells and CNE cells with or without irradiation, and the effects of photosensitizer concentration and the irradiation dose on the viability of Hep-2 cells and CNE cells were measured by MTT assays. **Results** Western blot analysis revealed moderate expression of folate receptor in Hep-2 cells, and weak expression in CNE cells. The cellular phagocytosis of photosensitizer I by both Hep-2 cells and CNE cells increased with the concentration of photosensitizer, and the phagocytic activity of Hep-2 cells was stronger than that of CNE cells ( $P < 0.01$ ). The presence of excessive free folic acid could competitively inhibit the phagocytic activity of Hep-2 cells. The results of MTT assays demonstrated that photosensitizer I exhibited significant photocytotoxicity for both Hep-2 cells and CNE cells, and the photodynamic

基金项目: 国家自然科学基金(21072227)。

作者简介: 李东红, 女, 研究员。

通讯作者: 李东红, Email: lqs\_cq@yahoo.com.cn.

activity of photosensitizer I was positively correlated with the concentration of photosensitizer and the irradiation dose.

**Conclusion** Photosensitizer I displays clear targeting and photodynamic activity for laryngeal carcinoma Hep-2 cells with high level expression of folate receptor.

**Key words**: Photosensitizer I; Hep-2 cells; CNE cells; Tumor targeting; Photodynamic activity

头颈部肿瘤如鼻咽癌、喉癌等为我国常见的恶性肿瘤之一。由于头颈部区域解剖复杂,在此区域的肿瘤虽可通过手术、放疗等手段控制,但通常导致周围实质器官的功能紊乱和损坏。光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)不仅可取得较好的疗效,并可避免手术治疗引起的毁容或功能丧失,因而近年来倍受关注<sup>[1-2]</sup>。

鉴于叶酸受体在正常组织低表达但在恶性肿瘤组织中高表达的差异性,利用叶酸对叶酸受体的高亲和性而进行的肿瘤特异性治疗引起了人们的兴趣<sup>[3]</sup>。为提高光动力治疗的靶向性,本实验室在光敏剂卟吩分子中通过聚乙二醇(PEG)链引入靶向基团-叶酸,构建了一个新型的光敏剂 I。本研究旨在观察其对喉癌 Hep-2 细胞和鼻咽癌 CNE 细胞的靶向性和光动力活性,以明确叶酸受体的介导作用,为新型靶向性光敏剂的研究提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

人宫颈癌 HeLa 细胞株、人表皮样喉癌 Hep-2 细胞株和人鼻咽癌 CNE 细胞株购于中国科学院上海生命科学研究细胞库,人正常肝 L-02 细胞株由第三军医大学大坪医院肿瘤中心友情赠送;光敏剂 I 由本实验室合成(图 1),用 HPLC 检测光敏剂 I 的纯度达 98% 以上;细胞培养材料购于 Costar (Dutscher, Brumath, France);胎牛血清、青霉素、链霉素和 MEM 培养液购于 Hyclone (Logan, Utah, USA);胰蛋白酶、MTT、DMSO、叶酸购于 Sigma-Aldrich;无叶酸 RPMI 1640 购于 Gibco (USA);TBS 缓冲液、化学发光试剂、预染蛋白 marker、HRP 二抗、GAPDH 内参一抗及单去污剂裂解液 (Western Biotechnology 生物);一抗 aiti-FR (ab3361, abcam);显影液、定影液 (上海冠龙);BCA 试剂盒 (南京建成试剂公司);X-光胶片 (柯达公司);PVDF 膜 (Millipore 公司);其他普通化学试剂为上海化学试剂厂生产的分析级试剂。

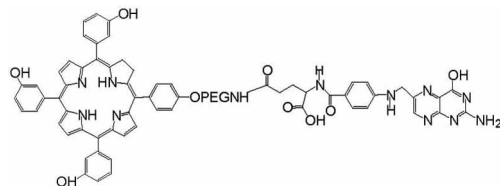


图 1 光敏剂 I

HEPA CLOSS 100 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱和 1500 全波长酶标仪 (美国 Thermo Electron Corporation)。VJ2875 型超净工作台为 (苏净基团安泰公司)。F24500 荧光光谱 (日本 Hitachi)。KDH150B 红光治疗仪 (北京科电微波电子有限公司)。玻璃匀浆器 (宁波新芝 DY89-1)、高速离心机 (湖南湘仪 H1650-W)、分光光度计 (上海欣茂 UV-7504)、-20℃ 低温冰箱、垂直板电泳转移装置 (上海天能生物)、电泳仪 (北京君意 JY300C)、多用脱色摇床 (苏州捷美 SYC-2101)。

### 1.2 细胞培养

CNE、Hep-2 和 L-02 细胞由含 10% 胎牛血清、青霉素 (100 U/ml)、链霉素 (100 U/ml) 的 RPMI 1640 培养液于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养至对数生长期, HeLa 细胞则由含 10% 胎牛血清、青霉素 (100 U/ml)、链霉素 (100 U/ml) 的 MEM 培养液培养至对数生长期, 所有细胞转移到不同的培养板上培养至 80% 细胞融合后改用无叶酸 RPMI 1640 培养液培养 24 h 后再进行相应的实验, 后续试验的培养液均为无叶酸 RPMI 1640。

### 1.3 Western blot 试验

在培养瓶中的单层 L-02 细胞、CNE 细胞、Hep-2 细胞和 HeLa 细胞用冰的 PBS 洗涤, 再用含 50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM 乙二胺四乙酸 (EDTA)、0.5% Triton X-100 (pH 7.2) 和 10% 蛋白酶抑制剂在冰上处理 30 min, 4℃ 离心 10 min (7000 g)。总蛋白浓度用 BCA 试剂盒按说明书测定。等量蛋白样品 (30 μg) 用 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶分离胶和 4% 浓缩胶

进行电泳,80 V 跑过浓缩胶后转换电压至 120 V,待溴酚蓝跑到胶版底部即可,采用湿法转移到经甲醇活化的 PVDF 膜上(恒流 200 mA,约 1 h),取膜, TBST 中清洗 1 min 后,封闭液封闭过夜。抗叶酸受体抗体(抗体 1)用封闭液稀释成 1:500 的浓度,内参一抗稀释成 1:3000,然后与膜在室温孵育 1.5 h, TBST 清洗 3 次(每次 5 min)后,与二抗(用稀释液稀释成 1:5000)再孵育 1.5 h, TBST 清洗 4 次(每次 5 min),然后于暗室化学发光、显影及定影。

#### 1.4 光敏剂的吸收

将处于对数生长期浓度为  $5 \times 10^4$ /ml 的 Hep-2 和 CNE 细胞接种到 12 孔板中,用无叶酸 RPMI-1640 培养 24 h 后,于 6 个孔中分别加入不同剂量的光敏剂 I 使其终浓度分别为:79.1、39.6、19.8、9.9、5.0、2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,另外 6 个孔中除分别加以上各浓度的光敏剂 I 外还分别加上叶酸,使其终浓度为各光敏剂 I 浓度的 100 倍,培养 24 h 后,倾去培养液, PBS 洗涤 3 次,每孔新加培养液 500  $\mu\text{l}$  和 4% SDS 500  $\mu\text{l}$ , 10 min 后(显微镜下已观察不到完整的细胞)吸取上清液,于 4 $^{\circ}\text{C}$  离心 20 min (9000 g),荧光光谱仪测定各孔上清液的 OD 值(Ex:498 nm; Em:660 nm),同时,按 BCA 试剂盒中说明分别测定各孔细胞总蛋白量。重复实验 3 次。

#### 1.5 MTT 实验

将  $5 \times 10^4$ /ml 的 Hep-2 细胞和 CNE 细胞分别接种到 96 孔培养板中,培养至对数生长期后各自分为 1 个不加药的正常对照组和 5 个光敏剂 I 浓度组,光敏剂 I 终浓度分别为 79.1、39.6、19.8、9.9、5.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,每组 8 个复孔。培养 24 h 后,移去培养液,冷 PBS 洗涤 3 次,换用新鲜培养液继续培养 24 h,每孔加 MTT 溶液 20  $\mu\text{l}$  (5 mg/ml in PBS),培养 4 h 后弃去上清,加入 150  $\mu\text{l}$  DMSO,振动 10 min,用酶标仪测定 570 nm 波长处吸收值,以 DMSO 空白孔调零,并按下式计算细胞存活率(SR): $\text{SR} = \text{实验组 OD 值} / \text{对照组 OD 值} \times 100\%$ 。

#### 1.6 光敏剂浓度对细胞毒性的影响

将  $5 \times 10^4$ /ml 的 Hep-2 细胞和 CNE 细胞分别接种到可拆卸的 96 孔培养板中,培养至对数生长期后各分为 1 个不加药的正常对照组和 9 个实验组共 10 个组,除正常对照组外其余各组分别加入不同浓度的光敏剂 I,使其终

浓度分别为 79.1、39.6、19.8、9.9、5.0、2.5、1.3、0.6、0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,每组 4 个复孔。培养 24 h 后,移去培养液,冷 PBS 洗 3 次,换用新鲜培养液,除正常对照组外,其余 9 个浓度组用红光治疗仪照射 3 min。照射时,光束均匀垂直地照射到培养板上,光斑直径为 12 cm,检测面的光功能密度为 0.1  $\text{W}/\text{cm}^2$ [4]。为保证光照的均匀性,各组分别从 96 孔板上拆下后单独进行照射,样品置于光斑正中。光照后继续于孵箱中培养 24 h,然后按如上相同的方法测定细胞存活率。

#### 1.7 光照剂量对光动力活性的影响

将  $5 \times 10^4$ /ml 的 Hep-2 细胞和 CNE 细胞分别接种到可拆卸的 96 孔培养板中,培养至对数生长期后各分为 1 个不加药的正常对照组和 7 个实验组,除正常对照组外其余各组分别加入光敏剂 I,使其终浓度均为 9.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,培养 24 h 后,移去培养液,冷 PBS 洗 3 次,换用新鲜培养液,除正常对照组外,其余 7 个组分别用红光治疗仪按上述方法照射 0、1、2、3、4、5、6 min,然后继续于孵箱中培养 24 h,再按与上述 MTT 实验相似的方法测定细胞的存活率。光照剂量按如下公式计算:光照剂量( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) = 功能密度( $\text{W}/\text{cm}^2$ )  $\times$  光照时间(s)。

#### 1.8 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 510 软件(Graph Pad Software Inc. San Diego, CA)进行统计学分析,结果以均数  $\pm$  标准差表示,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 叶酸受体的表达

为了比较 CNE 细胞和 Hep-2 细胞上叶酸受体的表达,笔者以人宫颈癌 HeLa 细胞作为阳性对照,人正常肝 L-02 细胞作为阴性对照,采用 Western Blot 实验考察了 4 种细胞的叶酸受体表达,结果如图 1 所示。在 4 种细胞中,HeLa 细胞为叶酸受体高表达,与文献报道一致[5],Hep-2 细胞为叶酸受体中等表达,而 CNE 细胞的叶酸受体表达接近于人正常肝细胞 L-02,为叶酸受体低表达。

### 2.2 细胞对光敏剂的摄取

采用荧光测定法笔者考察了 Hep-2 细胞和

CNE 细胞对不同浓度光敏剂 I 的摄取作用及过量自由叶酸的存在对这种摄取作用的影响。为排除细胞数不同带来的误差,笔者同时采用 BCA 法测定了细胞中的蛋白总量,并以单位蛋白含光敏剂的量来表示两种细胞对光敏剂的摄取能力。如图 2 所示,两种细胞对光敏剂 I 的摄取强度与光敏剂 I 的浓度呈正相关性,且在相同浓度时,Hep-2 细胞对光敏剂 I 的吸收明显强于 CNE 细胞。如当光敏剂 I 浓度为  $2.5 \mu\text{g}/\text{L}$  时,Hep-2 细胞对光敏剂 I 的摄取量为  $1.7 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{g}$  蛋白,而 CNE 细胞对光敏剂 I 的吸收强度仅为  $0.7 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{g}$  蛋白,两者相比差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ );当光敏剂 I 浓度为  $79.1 \mu\text{g}/\text{L}$  时,Hep-2 细胞的吸收强度增加到  $9.5 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{g}$  蛋白,但 CNE 细胞的吸收强度仅增加到  $4.3 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{g}$  蛋白,两者相比差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。另外,过量自由叶酸的存在,明显抑制了细胞对光敏剂 I 的摄取,尤其是 Hep-2 细胞。当光敏剂 I 浓度小于  $19.8 \mu\text{g}/\text{L}$  时,由于叶酸与叶酸受体的竞争结合,使 Hep-2 细胞对光敏剂 I 的吸收几乎为零,即使在本实验的最高浓度 ( $79.1 \mu\text{g}/\text{L}$ ),Hep-2 细胞对光敏剂 I 的吸收也仅为  $4.1 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{g}$  蛋白,与相同浓度条件下而无叶酸存在时的结

果相比,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

### 2.3 光敏剂浓度的影响

采用 MTT 法笔者考察了在有、无光照的条件下光敏剂 I 浓度对 Hep-2 细胞和 CNE 细胞存活率的影响。如图 3 所示,在所试验的浓度范围内,在无光照的条件下 Hep-2 细胞的存活率和不加光敏剂的对照组一样,且不受光敏剂浓度变化的影响,即使当光敏剂的浓度高达  $79.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  时,Hep-2 细胞的存活率仍为 100%。但光敏剂 I 对 CNE 细胞的增殖却有一定的影响,当光敏剂浓度从  $9.9 \mu\text{g}/\text{ml}$  增至  $79.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  时,CNE 细胞的存活率从 98.6% 降到了 89.6%。然而在光照的影响下,光敏剂 I 对两种细胞却表现出明显的光毒性,且光毒性随其浓度的增加而增加,见图 4。

### 2.4 光照剂量的影响

同样,采用 MTT 法笔者评价了光照剂量对 Hep-2 细胞和 CNE 细胞存活率的影响。如图 5 所示,两种细胞的存活率与光照剂量均呈负相关。在无光照时,Hep-2 细胞和 CNE 细胞的存活率分别为 100% 和 98.6%,给予  $6 \text{ J}/\text{cm}^2$  的光照(光照 1 min)后,两细胞的存活率分别降至 85.7% 和 75.4%,当光照剂量升至  $36 \text{ J}/\text{cm}^2$  后,两细胞的存活率均分别急降至 16% 和 5.6%。

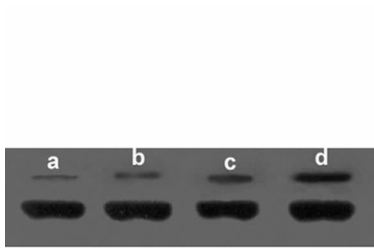


图 1

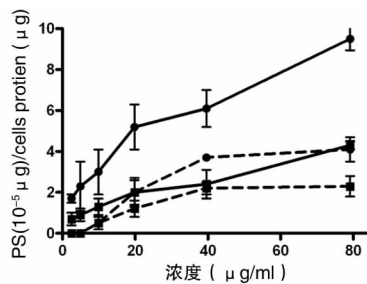


图 2

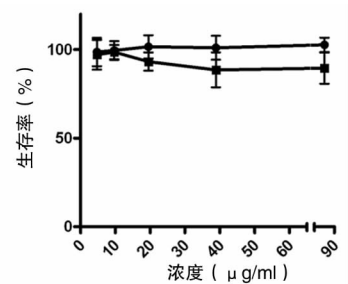


图 3

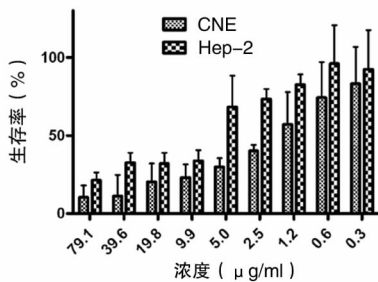


图 4

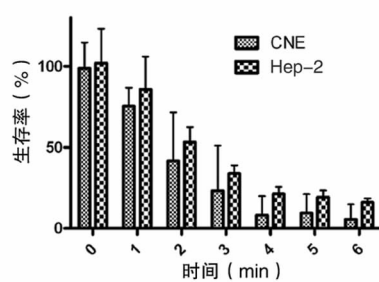


图 5

图 1 细胞叶酸受体表达的 Western blot 实验结果 a: L-02 细胞; b: CNE 细胞; c: Hep-2 细胞; d: HeLa 细胞 图 2 细胞对光敏剂 I 的摄取强度与其浓度的关系 (●) Hep-2 细胞; (■) CNE 细胞; 实线为光敏剂; 虚线为光敏剂加过量叶酸 图 3 无光照时光敏剂 I 对细胞存活率的影响 (●) Hep-2 细胞; (■) CNE 细胞 图 4 光照条件下,光敏剂浓度对细胞存活率的影响 图 5 光照时间对细胞存活率的影响

### 3 讨论

目前,头颈部肿瘤的治疗手段仍以手术切除、放疗和化疗为主,而手术切除易引起毁容或功能丧失,放疗则易发生不可逆转的、难以治疗且预后较差的放射性脑病<sup>[6]</sup>,特别是对于首次治疗失败、局部复发及远处转移的晚期患者这些传统的治疗手段效果均不够理想<sup>[7]</sup>。因此,新的毒副作用小且能提高患者的生存率、改善生存质量的治疗方法倍受期待。

肿瘤光动力治疗(PDT)是现代肿瘤微创或无创治疗领域的发展方向。与手术和放、化疗等传统手段相比,其具有特异性高、创伤小、毒副作用小、适用性好、可重复治疗和可协同治疗等优点。尤其是对皮肤癌、口腔癌、阴茎癌、喉癌、宫颈癌等既可有效杀伤癌组织,又可使创面愈合后保持器官外形和功能的完整。迄今为止 PDT 已成功用于治疗头颈部各种体表、口腔颌面部肿瘤。它既可单独使用,使早期癌症得到根治,也可以配合手术、放疗、化疗及生物治疗等其他综合治疗手段,对晚期肿瘤患者进行姑息治疗,延长患者生存期和提高生存质量<sup>[8]</sup>。

而光动力治疗中决定其疗效的重要因素之一是光敏剂的靶向性和光动力活性。如今进入临床试验阶段的 m-四间羟基苯基卟吩(Temoporfin)、苯并卟啉衍生物单酸(BPD-MA)等第二代光敏剂与第一代光敏剂相比,在 600~800 nm“治疗窗”内的吸收系数及单线态氧产率等方面都有了极大的提高,光动力活性明显加强<sup>[9]</sup>,但光动力治疗中的主要副作用-皮肤光毒性反应至今仍没有得到满意的解决。因而如何进一步提高此类光敏剂的肿瘤靶向性,减少正常组织尤其是皮肤的光毒性反应,以实现肿瘤的靶向性光动力治疗已成为该领域的研究焦点<sup>[10-11]</sup>。

叶酸受体(folate receptor, FR)是一种糖基化磷脂酰肌醇连接的膜糖蛋白,研究发现,FR 在正常组织中为低表达,而在大部分恶性肿瘤特别是卵巢、子宫、脑、肾、头颈及

间皮肿瘤中为高表达,甚至有些还高出正常组织 100~300 倍。FR 对叶酸及叶酸类似物具有很高的亲和力,可介导这些物质内吞进入细胞,是生物细胞最具特点的转运过程之一<sup>[12]</sup>。本实验室在前期研究中,利用这一原理,将叶酸分子引入卟啉光敏剂结构中,有效地改善了卟啉光敏剂的肿瘤靶向性。但由于卟啉和叶酸两者在生理条件下的溶解性都极为有限,使其终产物的溶解性极不理想。为此,我们选择光动力活性已得到认可的卟吩类光敏剂作为母体,利用 PEG 二胺作为桥连剂,通过酰胺化反应实现了 5,10,15-三间羟基苯基-20-对羧基苯基卟吩与叶酸的键连,得到了一个水溶性的新型靶向性光敏剂 I。

在本研究中,Western blot 实验结果表明,Hep-2 细胞叶酸受体高表达,CNE 细胞叶酸受体低表达。而荧光强度测定结果显示,Hep-2 细胞对光敏剂 I 的吸收明显强于 CNE 细胞,且这种吸收可被过量叶酸的加入所抑制。两个实验的结果相互佐证了光敏剂 I 对叶酸受体阳性细胞的靶向性,即 Hep-2 细胞对光敏剂 I 的摄取是通过叶酸受体介导的胞吞作用实现的,所以叶酸分子的存在可以竞争性地抑制叶酸受体对光敏剂 I 的介导作用。MTT 实验结果表明,在无光照条件下光敏剂 I 对 Hep-2 细胞和 CNE 细胞的生长无明显的抑制作用,尤其是对 Hep-2 细胞,说明光敏剂 I 无光照细胞毒性极低。但光敏剂 I 却对两种细胞均表现出满意的光动力活性,且这种光动力活性是与光敏剂的浓度和光照剂量呈正相关。光敏剂 I 对 Hep-2 细胞表现出的良好光动力活性可能源于 Hep-2 细胞表面叶酸受体的介导作用使大量光敏剂 I 内吞进入细胞,胞内光敏剂 I 浓度大,从而光动力活性强。但为何光敏剂 I 对 CNE 细胞表现出良好的光动力活性还需进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 顾凌澜,张菁,仇荣星. 光动力疗法治疗耳鼻咽喉肿瘤的作用机制及研究[J]. 应用激光,2007, 27(5): 435-438.

(下转第 47 页)