

· 论 著 ·

光动力疗法对人肺腺癌细胞系 A549 凋亡的影响

孙燕妮, 李 强*, 刘忠令(第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 探讨光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)对体外培养的人肺腺癌细胞系 A549 凋亡的影响。方法: 以人肺腺癌细胞系 A549 为研究对象, 用 MTT 法筛选最佳 PDT 参数。实验分为对照组(不进行 PDT)和 PDT 组, 在 PDT 24 h 后, 采用 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡的梯形条带, 流式细胞术检测细胞周期及凋亡率, TUNEL 标记法测定细胞凋亡指数(AI)。结果: 血卟啉衍生物(HPD)浓度 10 mg/L、激光剂量 10 J/cm² 是 PDT 对 A549 细胞杀伤作用的最佳条件。当激光剂量均为 10 J/cm² 时, 采取 6 组不同的功率时间组合测得的 D₄₉₂ 值无统计学差异。在最佳 PDT 条件下, 琼脂糖电泳结果可见 PDT 组产生了特征性的 DNA 梯形条带; 流式细胞术检测显示 PDT 组发生了 G₀/G₁ 期生长停顿, 凋亡率为 (18 443 ± 7 122)%, 显著高于对照组的 (0 301 ± 0 361)% ($P < 0.01$); TUNEL 标记法也证实该组可见明显的棕黄色凋亡细胞, AI 为 (18 480 ± 9 555)%, 明显高于对照组的 (0 880 ± 0 944)% ($P < 0.01$)。结论: PDT 通过诱导凋亡对体外培养的 A549 细胞产生杀伤作用。

[关键词] 光动力疗法; 肺肿瘤; 腺癌; 细胞凋亡

[中图分类号] R 734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X (2004) 07-0729-04

Photodynamic therapy inducing apoptosis of human lung adenocarcinoma cell line A549

SUN Yan-Ni, LI Qiang*, LIU Zhong-Ling (Department of Respiratory Diseases, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the effect of photodynamic therapy (PDT) on apoptosis of human lung adenocarcinoma cell line A549. **Methods:** Human lung adenocarcinoma cell line A549 was used and the optimal parameters of PDT were selected by MTT colorimetric assay. The experiment was divided into 2 groups: control group and PDT group. Twenty-four hours after PDT (HPD concentration 10 mg/L, laser dosage 10 J/cm²), cell cycle and apoptosis rate were estimated by flow cytometry; agarose gel electrophoresis and TUNEL were used to observe the DNA fragments and apoptosis index (AI). **Results:** The killing effect was saturated when HPD was 10 mg/L and laser was 10 J/cm². Under the same laser (10 J/cm²), A549 cells were exposed to 6 different duty time fabrications and the outcomes showed that their D₄₉₂ had no statistical difference. Agarose gel electrophoresis of DNA showed DNA ladder, a biochemical hallmark of apoptosis in the PDT group. Flow cytometry showed that PDT group had G₀/G₁ stage arrest. The apoptosis rate was (18 443 ± 7 122)% in PDT group vs (0 301 ± 0 361)% in control group ($P < 0.01$). TUNEL revealed that many cells were dyed brown in PDT group, with AI being (18 480 ± 9 555)% vs (0 880 ± 0 944)% in control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** PDT has a significant killing effect on A549 cells by induction of apoptosis.

[KEY WORDS] photodynamic therapy; lung neoplasms; adenocarcinoma; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(7): 729-732]

〔1〕 原发性支气管肺癌是当今严重威胁人类健康与生命的恶性肿瘤之一, 在我国的许多大城市肺癌已成为排列第 1 位的死亡原因。虽然近年来对肺癌的诊断和治疗有了长足的进步, 但由于多数患者起病隐匿, 待症状明显时多已丧失手术时机, 从而制约其 5 年生存率的提高。除了传统的手术、放化疗外, 光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 以其高度的选择性和组织特异性、较低的不良反应重新受到人们青睐。目前国内外学者对 PDT 的研究多局限于肿瘤临床, 本实验旨在从细胞水平探讨 PDT 对体外培养的人肺腺癌细胞系 A549 凋亡的影响。

中国科学院上海细胞生物化学研究所。血卟啉衍生物 (hematoporphyrin derivative, HPD) 针剂 5 g/L 为天津医科大学激光所馈赠。碘化丙啶 (PI)、RNase A 购自上海华舜生物公司, 基因组 DNA 抽提试剂盒由 Gentra 公司出品, TUNEL 试剂盒由 RD System 公司出品, DDM ED 630 PDT 治疗仪由重庆华鼎公司出品, Multiskan Ascent 自动酶联免疫检测仪由 Labsystems 公司出品, 流式细胞仪由 Becton-Dickinson 公司出品, Fluor-S MultiImager 多功能图像分析仪由 Bio Rad 公司出品。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 人肺腺癌细胞系 A549 购自中

[基金项目] 上海市科委重点科研基金 (034119828)。

[作者简介] 孙燕妮 (1974-), 女 (汉族), 博士生, 住院医师

*Corresponding author. E-mail: Liqies@sh163.net

1.2 MTT 法筛选最佳 PDT 作用参数 将 HPD 用无血清 DM EM 培养液稀释至 5、10、20 mg/L 质量浓度, 设 10、20、30 J/cm² 3 个照射剂量, 每个培养板均设有单独培养液的空白对照组、A549 细胞对照组(不照射)和实验组, 每组均 3 复孔。每板只接受 1 种激光剂量, 光斑直径 3 cm。调节 A549 细胞密度至 2×10^5 /ml, 取 100 μ l 接种于 96 孔培养板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后弃去原培养液, 加入不同浓度 HPD 溶液 200 μ l, 避光培养 24 h 以使细胞对 HPD 的吸收达到饱和。予不同剂量激光照射后立即换新鲜的 DM EM 培养液, 继续避光培养 24 h。每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 避光培养 4 h 后去除孔内培养液, 每孔加入 150 μ l DM SO, 恒温振荡 10 min 后进行酶标仪检测。在 492 nm 处以空白对照组调零, 测定各组 D_{492} 值, 重复 2 次取均值, 每孔 D_{492} 值为实测值减去空白对照孔值。

根据上述筛选结果得知 HPD 浓度 10 mg/L、激光剂量 10 J/cm² 是本实验最佳 PDT 作用参数。由于受所用光纤最大承受功率为 800 mW 的限制, 在能量密度均为 10 J/cm² 条件下, 设计了 6 组不同功率-时间组合 (mW $\times$ min): 214 $\times$ 10、268 $\times$ 8、357 $\times$ 6、428 $\times$ 5、535 $\times$ 4、714 $\times$ 3。MTT 法测定 D_{492} 值。

1.3 实验分组及处理 实验分为对照组和 PDT 治疗组。将 10^5 个 A549 细胞分别接种于直径 3.5 cm 培养皿中, 常规培养 24 h。PDT 治疗组根据 MTT 法筛选的结果加入 10 mg/L 的 HPD 溶液 1 ml, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 24 h 后进行激光照射, 激光波长 630 nm, 所用能量密度 10 J/cm² (729 mW $\times$ 4 min), 光斑直径 3.5 cm。对照组不进行 PDT。PDT 后 24 h 检测细胞的凋亡情况。

1.4 DNA 琼脂糖电泳检测细胞凋亡 按基因组 DNA 抽提试剂盒说明书操作, 取 20 μ l 所得 DNA 溶液上样电泳, Fluor-S 成像仪成像。

1.5 流式细胞术检测细胞周期及凋亡率 胰酶消化后收集 10^6 个细胞, 离心后悬浮于 PBS 中制成单

细胞悬液; 用预冷至 -20 $^{\circ}$ C 的 70% 乙醇固定, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 2 000 r/min 离心洗涤; 将细胞沉淀悬浮于 300 μ l PI 染液 (含 PI RNA ase A 各 50 mg/L) 中, 37 $^{\circ}$ C 避光温育 1 h 后上 FACSscan 流式细胞仪检测细胞核 DNA 含量, 激发光波长 488 nm, CELL QUEST 软件分析细胞周期及凋亡率。

1.6 TUNEL 标记法检测细胞凋亡指数 按 TUNEL 试剂盒说明书操作: 细胞消化后种入含消毒盖玻片的 3.5 cm 培养皿中, PDT 后 24 h, 取出盖玻片, 用 PBS 洗涤 5 min; 4% 多聚甲醛固定 20 min; 0.1% Triton X-100 PBS 洗 10 min; 20 mg/L 蛋白酶 K 37 $^{\circ}$ C 消化 20 min; TUNEL 混合液 37 $^{\circ}$ C, 反应 1 h; Streptavidin-HRP 37 $^{\circ}$ C, 反应 1 h; TBS 洗涤后 DAB 显色 30 min, 水洗; 苏木精衬染, 常规树脂封片。阳性结果细胞核呈棕黄色。200 倍高倍显微镜下, 随机观察 5 个视野, 每个视野计数 500 个细胞, 计数细胞核染色呈棕黄色的阳性细胞所占的百分数, 计算其平均值即为凋亡指数 (A I)。

1.7 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 MTT 法筛选 A549 细胞最佳 PDT 作用参数 在相同的 HPD 浓度下, 10、20、30 J/cm² 3 组之间 PDT 效应的增加不明显; 在相同的激光照射剂量下, HPD 为 5 mg/L 时基本无治疗作用, 但是超过 10 mg/L PDT 效应增加有限。因此, HPD 10 mg/L、激光剂量 10 J/cm² 是本实验的最佳作用参数, 见表 1。在能量密度均为 10 J/cm² 条件下, 功率-时间组合 (mW $\times$ min) 为 214 $\times$ 10、268 $\times$ 8、357 $\times$ 6、428 $\times$ 5、535 $\times$ 4、714 $\times$ 3 的 6 组 D_{492} 值分别为 (0.304 $\pm$ 0.034)、(0.278 $\pm$ 0.021)、(0.254 $\pm$ 0.019)、(0.260 $\pm$ 0.014)、(0.253 $\pm$ 0.040) 和 (0.252 $\pm$ 0.021), 组间无明显差异。说明在最佳能量密度基础上, 不管采用何种功率-时间组合对治疗效果都无明显影响。

表 1 MTT 法测定不同 HPD 浓度和激光剂量对 A549 细胞 D_{492} 值的影响

Tab 1 Effects of different HPD concentrations and laser dosages on D_{492} of A549 cells by MTT

($n=3, \bar{x} \pm s$)

HPD (μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	Laser dose (J $\cdot$ cm ⁻²)			
	0 (Control)	10	20	30
0 (Control)	0.721 $\pm$ 0.086	0.799 $\pm$ 0.215	0.776 $\pm$ 0.082	0.661 $\pm$ 0.066
5	0.630 $\pm$ 0.195	0.537 $\pm$ 0.110	0.494 $\pm$ 0.140*	0.510 $\pm$ 0.083
10	0.603 $\pm$ 0.051	0.364 $\pm$ 0.109*	0.322 $\pm$ 0.103**	0.301 $\pm$ 0.057**
20	0.650 $\pm$ 0.053	0.309 $\pm$ 0.081*	0.261 $\pm$ 0.024**	0.308 $\pm$ 0.048**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $P < 0.05$, $P < 0.01$ vs 0 mg/L HPD

2.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡 对照组未见小片段 DNA 梯形条带, 仅见距点样孔不远的 1 条大分子基因组 DNA 条带; 而 PDT 治疗组可见特征性的 200 bp 不同倍数的 DNA 梯形条带(图 1)。

2.3 流式细胞术检测细胞周期及凋亡率 流式细胞术对细胞周期及凋亡率的分析结果表明: PDT 组 G_0/G_1 期细胞所占比例增加, S 期细胞减少, 发生了 G_0/G_1 期生长停顿, G_2/M 期细胞比例两组无明显差异; PDT 组凋亡率明显高于对照组 ($P < 0.01$, 表 2)。

2.4 TUNEL 检测细胞凋亡 TUNEL 法检测发现, 对照组细胞核呈紫蓝色, 基本未见细胞核染成棕黄色的凋亡细胞(图 2A); PDT 治疗组可见明显的

棕黄色凋亡细胞(图 2B), AI 为 $(18.480 \pm 9.555)\%$, 显著高于对照组的 $(0.880 \pm 0.944)\%$ ($P < 0.01$)。

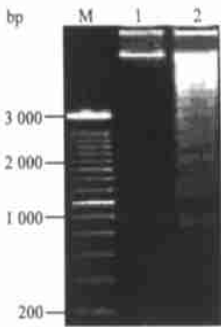


图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳
Fig 1 Genomic DNA electrophoresis
M: DNA marker(200 bp); 1: Control group; 2: PDT group

表 2 两组细胞周期及凋亡率
Tab 2 Cell cycle and apoptosis rate of 2 groups

Group	Cell cycle			Apoptosis rate
	G_0/G_1	S	G_2/M	
PDT	$72.493 \pm 4.020^*$	20.570 ± 3.162	6.940 ± 1.951	$18.443 \pm 7.122^{**}$
Control	60.487 ± 4.742	24.087 ± 3.410	15.430 ± 8.154	0.310 ± 0.361

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

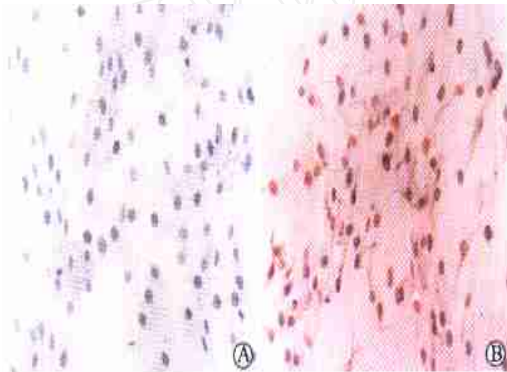


图 2 对照组(A)和 PDT 组(B)的 TUNEL 染色结果
Fig 2 TUNEL staining of control group (A) and PDT group (B) ($\times 200$)

3 讨论

PDT 是随着激光医学、光纤和内镜技术发展而兴起的一种治疗恶性肿瘤的新方法。与传统放、化疗相比, 它最大的优点在于可选择性杀伤肿瘤细胞, 对正常细胞损害小, 并可与其他疗法联合使用。目前, 这一疗法已在支气管、膀胱和皮肤等部位肿瘤的治疗中显示出良好的应用前景^[1]。光敏剂与激光是 PDT 的核心问题。HPD 是目前应用最广泛且疗效肯定的光敏剂。

本实验观察到 HPD 为 5 mg/L 时不管激光剂量如何, PDT 对 A 549 的杀伤效应不明显。当 HPD

浓度增加为 10 mg/L、激光剂量为 10 J/cm² 时, PDT 效应达平台期, 此时再增加光敏剂浓度和激光剂量也无益于疗效的显著提高, 反而有可能因组织内光敏剂浓度过高而带来光毒性等不良反应。国内对 PDT 最佳作用参数报道不一^[2,3], 考虑与选择的细胞类型、光敏剂种类、激发光波长不同等因素有关。为保证疗效, 避免不必要的不良反应, 在选择足够 PDT 剂量的基础上宜采用较小光敏剂浓度和较大激光剂量的组合^[4]。此外, 本研究还表明, 在选择最佳能量密度时, 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, 本实验在光纤允许的功率范围(0~ 800 mW)内采用大功率短时间的照射方式(729 mW $\times$ 4 min)。

肿瘤细胞选择性摄取 HPD 后经适当波长的激光激发, 从基态转变为激活的单线态, 再与周围的氧起反应, 产生激发态活性单态氧, 作用于细胞膜系统, 导致肿瘤细胞的崩解破坏^[5]。近年来研究发现, PDT 作用的靶位除了细胞膜系统外, 还包括蛋白质、酶、核酸等生物大分子及其组成氨基酸、碱基等。作用机制除了单线态氧的细胞毒作用外, 还可诱导细胞凋亡^[6]。PDT 后凋亡发生的早晚随细胞种类而异, 大多数细胞 PDT 后需经过长短不同的潜伏期, 在 1~ 3 d 内发生凋亡。有些细胞凋亡发生得较早,

在 PDT 后 3 h 就可发生^[7], 但也有些细胞则表现出对 PDT 凋亡的抵抗^[8]。本实验联合使用 DNA 琼脂糖凝胶电泳、流式细胞术、TUNEL 标记法 3 种方法证实 PDT 后 24 h A 549 细胞发生了显著的凋亡。

[参考文献]

- [1] 黄金陵, 黄剑东, 刘尔生, 等. 酞菁配合物的结构与其光动力抗癌活性[J]. 物理化学学报, 2001, 17(7): 662-671.
Huang JL, Huang JD, Liu ES, et al. Some relationships between structures and photodynamic anticancer activities of phthalocyanines[J]. Wuli Huaxue Xuebao (Acta Phys Chim Sin), 2001, 17(7): 662-671.
- [2] 刘树硕, 杨永华, 邱灵华. 体外膀胱癌细胞光动力学杀伤效应的研究[J]. 中华理疗杂志, 1998, 21(5): 275-277.
Liu SS, Yang YH, Qiu LH. In vitro photodynamic therapy of the human bladder cancer cells[J]. Zhonghua L iliao Zazhi (Chin J Phys Ther), 1998, 21(5): 275-277.
- [3] 韩 勇, 郑志红, 葛平江, 等. 血卟啉衍生物光动力学疗法体外杀伤人喉癌细胞株 Hep-2 的实验研究[J]. 农垦医学, 2002, 24(1): 1-3.
Han Y, Zheng ZH, Ge PJ, et al. Haematoporphyrin derivative destruct laryngeal carcinoma cell line Hep-2 in vitro by photodynamic therapy[J]. Nongken Yixue, 2002, 24(1): 1-3.
- [4] 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.
Zhao YP, Yang B, Zhang TP, et al. Photodynamic therapy of hematomorphyrin derivative on human pancreatic carcinoma cell lines[J]. Zhonghua W aike Zazhi (Chin J Surg), 2000, 38(3): 204-207.
- [5] Sakharov DV, Bunschoten A, van Weelden H, et al. Photodynamic treatment and H₂O₂-induced oxidative stress result in different patterns of cellular protein oxidation [J]. Eur J Biochem, 2003, 270(24): 4859-4865.
- [6] Date M, Fukuchi K, Namiki Y, et al. Therapeutic effect of photodynamic therapy using PAD-S31 and diode laser on human liver cancer cells[J]. Liver Int, 2004, 24(2): 142-148.
- [7] Nhamad N, Feyes DK, Agarwal R, et al. Photodynamic therapy results in induction of WAF1/CIP1/p21 leading to cell cycle arrest and apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(12): 6977-6982.
- [8] Separovic D, He J, Oleinick NL. Ceramide generation in response to photodynamic treatment of L5178Y mouse lymphoma cells[J]. Cancer Res, 1997, 57(9): 1717-1721.

[收稿日期] 2004-05-08

[修回日期] 2004-06-21

[本文编辑] 曹 静

· 个案报告 ·

先天性冠状动脉瘘一例报告

Congenital coronary artery fistula: a case report

韩庆奇, 徐志云 (第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433)

[关键词] 冠状动脉; 血管瘘; 畸形

[中图分类号] R 541.1

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X (2004) 07-0732-01

1 临床资料 患者, 男, 40 岁。活动后胸闷、心悸 2 个月入院。幼时体检发现心脏杂音。体检: 一般情况可, 心界向左右扩大, 胸骨右缘第 2 肋间连续性杂音。心电图示窦律, 右心室肥厚劳损。X 线胸片示肺野清晰, 心影向两侧扩大, 以右侧为著。超声心动图示右冠起始部增宽(内径约 2.1 cm), 中部在右房室沟内形成巨大瘤样扩张(内径约 6.2 cm), 经二尖瓣后叶瓣根穿入左室(内径约 1.3 cm)。升主动脉及选择性冠脉造影示右冠起始部增宽, 中部形成巨大动脉瘤, 成管状进入左室。全麻体外循环下手术, 术中探查见: 右冠主干在右房室沟处呈瘤样扩张, 直径约 7 cm。建立体外循环后, 经主动脉根部逆行灌注停跳后改经冠状静脉窦逆灌, 切开瘤壁, 内无血栓, 瘤体内径约 6.5 cm, 右冠开口直径约 3 cm, 远端出口直径约 2 cm, 切除瘤体, Teflon 补片封闭右冠开口, 缝闭出口, 经房间隔探查左室, 在后瓣下近前后交界处见冠状动脉瘘口, 直径 2 cm, 切开后瓣根部, Teflon 补片修补瘘口。然后行升主动脉-大隐静脉-右冠状动脉远端旁路移植术。术后心电图无心肌缺血表现, 心脏杂音消失。患者恢复良好, 术后 10 d 痊愈出院。

院。

2 讨论 先天性冠状动脉瘘(CAF)是一种罕见的先天性心血管畸形, 其发病率极低, 约占先天性心脏病的 0.3% 以下。目前认为 CAF 是由于心脏胚胎发育过程中心肌窦状间隙未能退化而持续存在所形成的冠状动脉主干或其分支与心脏或血管间的异常通道。瘘管来自右冠状动脉多于左冠状动脉, 少数可来自双侧冠状动脉。90% 的瘘管开口于右心系统, 以右心室最多, 右心房和肺动脉次之, 其血液动力学改变类似于左向右分流。而开口于左心室者最少, 其血液动力学改变类似于主动脉关闭不全。本例 CAF 开口于左心室并形成巨大动脉瘤实属罕见。

本病大多临床症状不典型。多数病例可闻及心前区连续性杂音, 其最响部位根据瘘道及其交通的心腔不同而异, 大

(下转第 745 页)

[作者简介] 韩庆奇(1976-), 男(汉族), 硕士

Email: hanqingqi@hotmail.com