

盐酸氨基乙酰丙酸介导的 635/670nm 联合波长下光动力学治疗的抗肿瘤效应

Irradiation at 635/670nm in 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy: the anti-tumor effect

吴英鹰, 黄光武*, 张哲

广西医科大学第一附属医院耳鼻喉科, 广西卫生厅重点学科及重点实验室, 南宁 530021

[摘要] **目的** 通过实时测定单态氧(singlet oxygen, 1O_2)评估 635 nm 和(或)670 nm 激光照射下盐酸氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA)介导的光动力学治疗(photodynamic therapy, PDT)抗肿瘤效果。**方法** 以 5-ALA 为光敏剂, 在单波长(635 nm 或 670 nm)及联合波长(635 nm+670 nm)下进行激光照射, 利用新型高灵敏的检测系统测定 PpIX 溶液、肿瘤细胞(9L 神经胶质肉瘤细胞和 HeLa 细胞)及 HeLa 负瘤裸鼠中的 1O_2 强度, H-E 染色法检测肿瘤组织坏死深度。**结果** 接受单一的 635 nm 或 670 nm 波长激光照射时, PpIX 溶液 1O_2 强度在两者中无明显区别。635 nm 与 670 nm 激光联合照射下, 9L 细胞的 1O_2 强度高于 HeLa 细胞; 在两种细胞中 670 nm 激光诱发 1O_2 强度均远远低于 635 nm 激光。在 HeLa 细胞裸鼠皮下移植瘤中, 两种波长激光联合照射产生一定的肿瘤坏死深度, 但低于 635 nm 单波长照射。**结论** 在 5-ALA 介导的 PDT 中, 670 nm 波长激光显示了一定的 PDT 疗效。

[关键词] 光动力学治疗; 单态氧离子; 抗肿瘤效应

[中图分类号] R 730.5 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2011)11-1263-04

近年来, 光动力学治疗(photodynamic therapy, PDT)受到广泛关注和研究。该技术联合利用激发光、光敏剂及氧分子来激发光化学反应, 从而选择性地治疗肿瘤性、血管性及组织增生性疾病。PDT 研究中最具挑战性的难题集中在如何精确及有效地监测治疗过程, 并对其照射条件及剂量进行实时调控。盐酸氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA), 为人体中血红素合成的基本原料, 是高效光敏剂原卟啉(PpIX)的前体, 已广泛应用于多种肿瘤的临床诊断及治疗, 如脑^[1-2]、膀胱^[3]及皮肤肿瘤^[4]。但因其最大吸收波长为 635 nm, 组织穿透性较差, 对深层组织治疗效果欠佳, 故目前临床上主要应用于浅表病变及肿瘤的治疗, 极大地限制了其临床应用及发展。通过研究 PpIX 吸收光谱, 发现除 635 nm 外, 其在较长波长(670 nm)处有一定强度的吸收峰, 且峰值随照射剂量的增加而增强。为了了解 670 nm 波长激光是否能在 5-ALA 介导的 PDT 治疗中发挥抗肿瘤作用, 本研究设计了一系列体外及体内实验, 以 1O_2 作为评估工具, 观察了 670 nm 波长及 635/670nm 联合波长下激光的抗肿瘤效应。

1 材料和方法

1.1 材料 (1)光敏剂: 5-ALA 来自 Cosmo Bio Co, Ltd, Japan; PpIX 来自 Affiniti Research Products, UK。(2)细胞: 9L 神经胶质肉瘤细胞和 HeLa 细胞(Japanese Collection of Research Bioresources cell bank)。(3)动物: BALB/c 裸鼠(雄性, 4 周龄, 18~20 g)购买自 SLC, Inc. Hamamatsu, Ja-

pan。(4)仪器: 近红外多光谱检测系统(near-infrared photo-multiplier tube system, NIR-PMT)由日本国立滨松医科大学光子中心自主研发, 用于 1O_2 的监测。(5)光源: 倍频 YAG 激光(Tempest-30, New Wave Research, Sunnyvale, CA, USA, 脉冲输出), 用于 1O_2 检测及 PDT 试验; 发光二极管系统(TC35-40200-4.5/15; Neo Ark, Tokyo, Japan, 多波长连续输出), 其中 405 nm 用于 PpIX 荧光光谱的检测, 635 nm 用于吸收光谱的检测; 多通道分光光度计(PMA-11; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan), 分光光度计(U-350; Hitachi Ltd, Tokyo, Japan)。

1.2 细胞培养 9L 和 HeLa 细胞培养于 EMEM 培养液中(10% FBS, 50 IU/ml 青霉素及 50 μ g/ml 链霉素), 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 潮湿环境中。

1.3 PpIX 溶液荧光及吸收光谱测定 PpIX 溶液(溶于丙酮, 10 μ mol/ml)置于石英杯中, 以 405 nm 及 635 nm 波长光照射(100 mW/cm²), PMA-11 及 U-350 分光光度计测定其荧光及吸收光谱。

1.4 PpIX 溶液 1O_2 测定 YAG 激光(630 nm 或 660 nm, 30 Hz, 20 mW/cm²)照射 PpIX 溶液(10 μ mol/ml), NIR-PMT 系统实时测定 1O_2 发射光强度。

1.5 肿瘤细胞 1O_2 测定 肿瘤细胞经 5-ALA(10 mmol/L)处理 4 h 后, 收集单细胞悬液(1×10^7 /ml)于石英杯中进行 PDT 照射, NIR-PMT 系统实时测定 1O_2 , 每 10 s 读取一次数据, 以 PBS 溶液为阴性对照。功率为 240 mW/cm² 不变, 9L 细

[收稿日期] 2011-05-09 **[接受日期]** 2011-09-05

[作者简介] 吴英鹰, 博士. E-mail: rainnielong@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0771-5358221, E-mail: drjinhua@163.com

胞的照射条件为:635 nm(180 s, 43.2 J/cm²)+ 635 nm 或 670 nm(60 s,14.4 J/cm²);HeLa 细胞的照射条件为:635 nm(405 s, 97.2 J/cm²)+ 635 nm 或 670 nm (135 s,32.4 J/cm²)。

1.6 裸鼠皮下移植瘤模型的建立 9L 和 HeLa 细胞生长于 EMEM 培养液中(10% FBS, 50 IU/ml 青霉素及 50 μg/ml 链霉素),置于 37℃、5% CO₂ 潮湿环境中。行细胞移植当天,细胞经 PBS 清洗,收集单细胞悬液于 50 ml 离心管,1 000×g 离心 5 min,弃去上清液,加入 PBS 重悬细胞,以相同转速再次离心 5 min。弃上清,加入新鲜 PBS,重悬细胞成单细胞悬液,计数,调整细胞悬液密度为 5×10⁷/ml。每 0.1 ml 细胞悬液分装于 1 ml 细胞冻存管中,10 min 内使用。经过约 1 周适应性喂养的裸鼠(5 周龄,18~22 g)接种前 48 h 以 10% 碘仿液(povidone-iodine, Johnson-Johnson Co., USA)擦拭全身,指数生长期的 HeLa 细胞悬液(5×10⁶)行裸鼠背部皮下注射,肿瘤细胞在皮下形成局限性隆起团块,观察裸鼠无不良反应后放回鼠笼,继续喂养;每天观察肿瘤生长情况及动物反应。细胞移植后 72 h 内,移植部位形成隆起团块,2 周后固体肿瘤包块形成,注射后 4 周,肿瘤生长迅速;肿瘤移植后 5~8 周即可用于实验。在此过程中,实验

动物无不良反应。

1.7 肿瘤组织坏死深度测定 新鲜配制的 5-ALA 溶液(PBS 溶解,pH 值 5.0~6.5,一次性过滤器过滤)由裸鼠尾静脉注入,给药浓度 300 mg/kg,避光饲养 3 h 后进行照射。照射结束后动物继续饲养 24 h,经过量麻醉处死,完整分离肿瘤组织,常规切片进行 H-E 染色,利用图像处理软件计算肿瘤坏死深度(mm)。

2 结果

2.1 PpIX 溶液荧光及吸收光谱 总照射剂量为 700 J/cm²(7 000 s),PMA-11 系统检测 100、200、300、400、500、600 及 700 J 时 PpIX 发射荧光,其强度随照射剂量增加而衰减,700 J 时荧光强度几乎为 0,如图 1A 所示。随后,本研究检测了 PpIX 吸收光谱。总照射剂量为 400 J/cm²,U-350 分光光度计在 50、100、200 及 400 J 时进行测定,结果提示 300~900 nm 范围内,PpIX 吸光度随照射剂量增加而迅速升高,最大峰值位于 400 nm(图 1B),其第二峰值出现在 670 nm 附近(图 1C)。

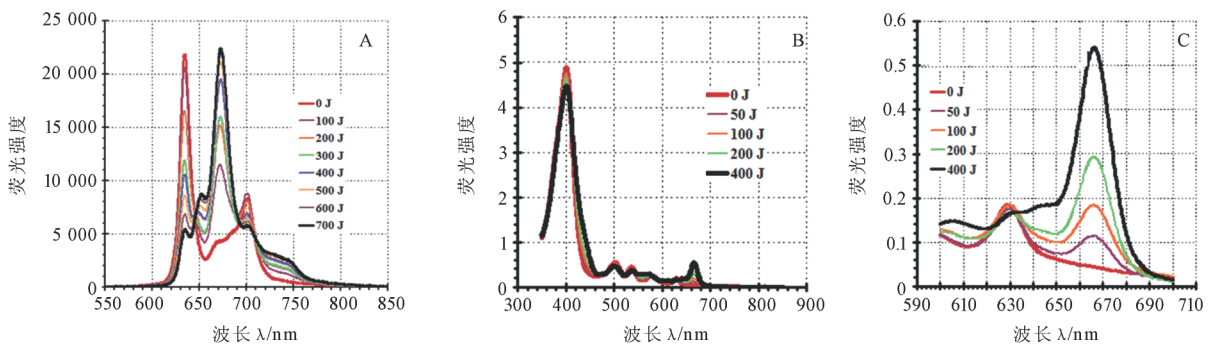


图 1 PpIX 溶液荧光光谱和吸收光谱测定

A: PpIX 荧光光谱测定[连续激光(405 nm, 100 mW/cm²)] ;B: PpIX 在 300~900 nm 范围内吸收光谱[连续激光(635 nm, 150 mW/cm²)] ;C: PpIX 溶液在 600~700 nm 范围内吸收光谱[连续激光(635 nm, 150 mW/cm²)]

2.2 PpIX 溶液¹O₂ 测定 630 nm 激光照射下,¹O₂ 强度在照射开始即达到峰值,维持较高水平直到照射结束(图 2A); 666 nm 激光照射时,¹O₂ 强度随照射时间而逐渐上升(图 2B)。将不同浓度(0、2 和 4 mmol/L)的¹O₂ 猝灭剂叠氮化钠

(NaN₃)加入 PpIX 溶液中,随后进行¹O₂ 检测,NIR-PMT 系统在 NaN₃-PpIX 混合溶液中无法检测到波长为 1 260 nm 荧光,提示该系统所检测到的荧光确实来自¹O₂(图 2C)。

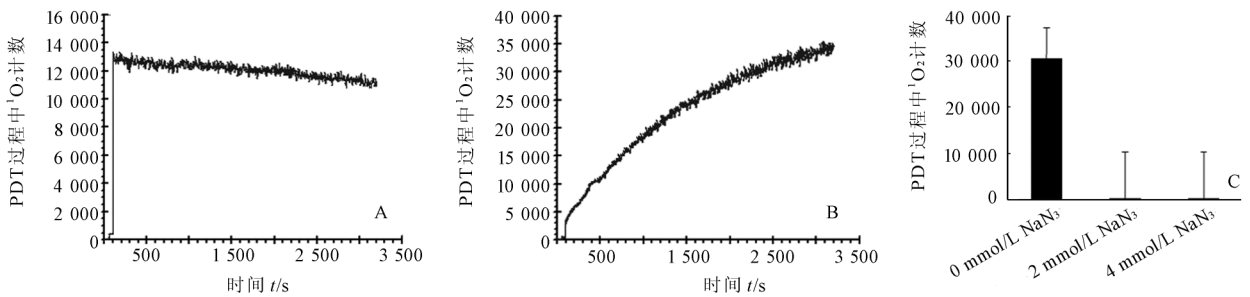


图 2 PpIX 溶液(10 μmol/ml)¹O₂ 测定

A: 脉冲激光 630 nm,20 mW; B: 脉冲激光 666 nm,20 mW;C: NaN₃(2 或 4 mmol/L)加入 PpIX 溶液(10 μmol/L)中,激发光为 635 nm,30 Hz,40 mW. n=3, x̄±s

2.3 肿瘤细胞 $^1\text{O}_2$ 测定 如图 3 所示, 635 nm 及 670 nm 激光均在 9L 细胞中诱导产生一定强度的 $^1\text{O}_2$ 。扣除背景噪声后, 670 nm 激光产生的 $^1\text{O}_2$ 低于 635 nm, 比值为 $309/771 = 0.40$ 。此外, NIR-PMT 系统在阴性对照组中也检测到了 $^1\text{O}_2$ 信号, 但强度远低于实验组, 且没有上升或衰退趋势, 该信号

来自内源性 PpIX 发出的自体荧光以及背景噪声。因此, 实验组 $^1\text{O}_2$ 计数减去对照组计数(表示为累积氧离子计数), 即为肿瘤细胞真实 $^1\text{O}_2$ 水平。与此相似, 在 HeLa 细胞中 670 nm 激光诱发 $^1\text{O}_2$ 强度要远远低于 635 nm 激光, 其比值仅为 $0.14(212/1538)$, 该比值也明显低于 9L 细胞(0.40)。

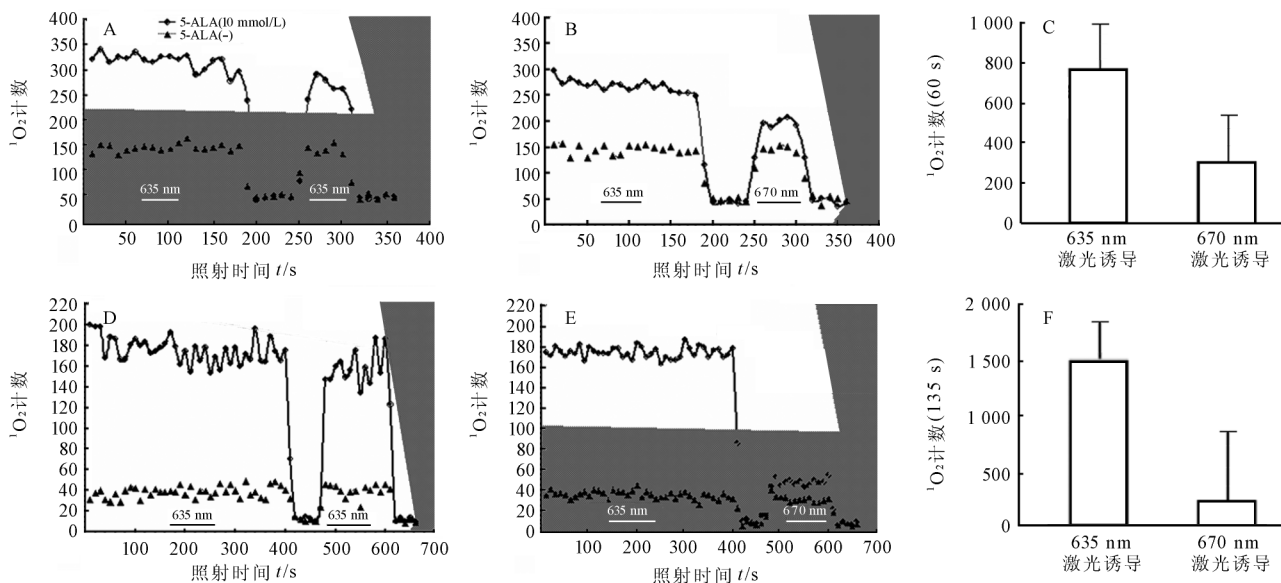


图 3 9L 细胞和 HeLa 细胞 $^1\text{O}_2$ 测定

A~C: 9L 细胞; D~F: HeLa 细胞; A, D: 635 nm 激光诱导 $^1\text{O}_2$ 发生; B, E: 670 nm 激光诱导 $^1\text{O}_2$ 发生; C, F: 635 nm 及 670 nm 波长下累积氧离子计数(实验组 $^1\text{O}_2$ 计数—对照组 $^1\text{O}_2$ 计数), 以未经 5-ALA 处理的细胞悬液为阴性对照组。 $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.4 肿瘤组织坏死深度 照射剂量 100 J/cm^2 , 负瘤裸鼠(HeLa 细胞)按照照射光源的不同分为 5 组: 635 nm; 635 nm (75 J/cm^2) + 670 nm (25 J/cm^2); 635 nm (50 J/cm^2) + 670 nm (50 J/cm^2); 635 nm (25 J/cm^2) + 670 nm (75 J/cm^2); 670 nm。每组各 5 只裸鼠进行实验, 以肿瘤坏死深度来表示 PDT 的抗肿瘤效应(图 4)。结果显示在照射剂量相同情况下, 各组诱导的 PDT 疗效完全不同, 其中 635 nm 激光的抗肿瘤效果最强, 该组肿瘤坏死深度明显高于其他组; 而加入 670 nm 激光照射后, PDT 的抗肿瘤效应开始减弱, 并随着 670 nm 激光照射剂量的增加而减少。

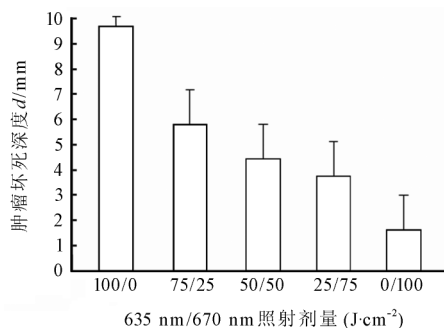


图 4 PDT 诱导的肿瘤组织坏死深度

$n=5$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

一般而言, 波长越长的激光组织穿透性越高, 但光敏剂对其吸收度越小, 激发效果差; 而波长较短的激光其吸收度

较高, 但组织穿透性差。本研究所选用的光敏剂 5-ALA 为第二代光敏剂, 与一代光敏剂相比, 其安全性更高、组织选择性更强、光敏化能力强、给药后避光时间短。但因其最大吸收波长为 635 nm, 组织穿透性较差, 对深层组织治疗效果欠佳, 故目前临床上主要应用于浅表病变及肿瘤的治疗。

$^1\text{O}_2$ 是 PDT 的主要细胞毒物质, 检测 $^1\text{O}_2$ 发生以评估 PDT 疗效已成为 PDT 研究的前沿热点。 $^1\text{O}_2$ 的检测方法有间接法和直接法, 间接法主要有荧光探针、磁共振成像等, 其特异性仍有待实验证实。PDT 过程中 $^1\text{O}_2$ 由活性单态转变为失活性三态时, 发出波长为 1270 nm 强烈的激发光, 这是检测 $^1\text{O}_2$ 的金标准, 本研究利用新型的、高灵敏的 NIR-PMT 直接地、非侵入性地、实时地对 PDT 过程中 1270 nm 激发光进行测量, 并以此为工具, 研究新的激光光源的抗肿瘤效应。

$^1\text{O}_2$ 是 PDT 抗肿瘤的主要作用因子, 其机制如下: (1) 对肿瘤细胞及组织的直接杀伤作用; (2) 对光敏剂(即 PpIX)的猝灭作用^[5-6]。PDT 过程中, 随照射剂量的累积, PpIX 结构改变而失去原有的光化学特性——即发生了光敏剂猝灭, 其转变为一种氯化物型的光化学产物, 该产物在荧光光谱、吸光度以及 $^1\text{O}_2$ 发生等方面与 PpIX 完全不同, 并在某个特定波长下有吸收峰。本研究中, 当照射剂量小于 700 J 时, PpIX 荧光峰值出现在 635 nm 及 700 nm , 且随照射时间而衰减; 当照射剂量达到 700 J 时, 其峰值出现在 670 nm, 并随时间而逐渐增强。此外, 对 PpIX 吸收光谱的研究显示, 400 nm 、 500 nm 、 540 nm 、 580 nm 及 635 nm 处光密度差别不大; 在 666 nm 附近其光密度在照射开始时几乎为 0, 但随照

射时间而逐渐增强, $^1\text{O}_2$ 强度也随时间显著增强。尽管以上结果分别来自完全不同的检测方法,但均提示 PpIX 的光敏剂猝灭与光化学产物的产生存在十分密切的关系。

在 635 nm 及 670 nm 波长激光照射下,NIR-PMT 系统在经 5-ALA 处理的 9L 及 HeLa 细胞中均检测到了 $^1\text{O}_2$ 信号,该信号来自 PpIX 本身及猝灭时所产生的光化学产物(最大吸收波长为 670 nm)。对肿瘤细胞 $^1\text{O}_2$ 测定结果提示,固定光敏剂浓度、作用时间及细胞数不变时,较长波长激光(670 nm)在 9L 细胞要比 HeLa 细胞激发出更高水平的 $^1\text{O}_2$,提示神经胶质瘤细胞要比宫颈癌上皮细胞对 670 nm 波长激光吸收度高;无论在较长或是较短波长激光(635 nm)照射下,9L 细胞 $^1\text{O}_2$ 数量在各个时间段均高于 HeLa 细胞,即使增加对 HeLa 细胞的照射剂量,其结果仍然相同;提示经外源性输入光敏剂后,9L 细胞能产生更多的 PpIX。其原因可能由于不同肿瘤类型对 PpIX 的敏感性不同所致。Moan 等^[7]曾报道 5-ALA 介导的体外 PDT 实验中,体积较大的肿瘤能产生更多的 PpIX。9L 细胞和 HeLa 细胞的体积分别为 80 μm 和 30 μm ,体积较大的 9L 细胞能诱导出更多的 $^1\text{O}_2$,这与 Moan 等^[7]的结果相一致。此外在 9L 细胞中, $^1\text{O}_2$ 随照射时间的推移出现轻微下降的趋势,提示发生了光敏剂猝灭,而 HeLa 细胞没有出现类似现象。

HeLa 细胞是由人类乳突状瘤病毒第 18 型转化的宫颈癌细胞(又称实验用增殖表皮癌细胞),其特点是增殖迅速,且可以无限分裂,现已广泛应用于癌症模型研究,是用于 PDT 研究较好的细胞模型,故本研究选用其作为体内试验的细胞模型。前期研究发现体内实验中 5-ALA 给药剂量越低($<200\text{ mg/kg}$),PDT 重现性越差,因此本研究设计 300 mg/kg 为 5-ALA 的实验剂量。经 5-ALA 处理 3 h 的负瘤裸鼠(HeLa 细胞)分组在不同激光下进行照射,照射剂量为 100 J/cm^2 ,结果提示 635 nm 激光的抗肿瘤作用最强,其诱导的肿瘤坏死深度最大;670 nm 的抗肿瘤作用最弱,且 PDT 的抗肿瘤作用随 670 nm 激光剂量的增加而减弱。关于 670 nm 波长激光的抗肿瘤效应仍然说法不一,目前尚无明确定论。König 等^[8]将负瘤裸鼠经 5-ALA 处理后,分别在 633 nm (150 J/cm^2),633 nm (75 J/cm^2) + 655~670 nm (75 J/cm^2) 下进行 PDT 实验,结果显示在加入 670 nm 激光后,PDT 抗肿瘤效应较单纯 633 nm 激光明显减低。在本实验中,在不同照射剂量及照射时间下,670 nm 波长激光诱导的 $^1\text{O}_2$ 低于 635 nm 激光,且两者联合进行照射没有出现协同的抗肿瘤效果,这与 König 等^[8]的结果一致。然而在最近的日本 PDT 学会年会上,Miyoshi 等^[9]报道了联合运用 635 nm 及 670 nm 激光进行裸鼠皮下移植瘤的 PDT 治疗,结果认为联合激光照射能增强 PDT 的抗肿瘤效果。导致结论不一致的原因可能是 PpIX 发生光敏剂猝灭后新生成的光化学产物在结构上不够稳定,在照射过程中会很快转化为其他中间产物而失去光化学特性。

本研究利用新型、高灵敏度、高特异性的 NIR-PMT 系统在 $^1\text{O}_2$ 发生水平对 670 nm 波长激光及其与 635 nm 激光的协同作用进行了研究,670 nm 波长激光在神经胶质瘤细胞(9L

细胞)中能产生较多的 $^1\text{O}_2$,而宫颈癌上皮细胞 $^1\text{O}_2$ 水平较低,提示不同肿瘤类型对 670 nm 激光的敏感性不同;此外 670 nm 激光诱导的 $^1\text{O}_2$ 及肿瘤组织坏死深度均无法与 635 nm 激光相比,但仍显示了一定的 PDT 疗效,通过进一步优化其照射条件,如照射时间、剂量、对现有光纤设备的改造(配备特制透射滤光片^[10-11]用于 PDT 照射)等,其未来应用于某些特定类型肿瘤的 PDT 治疗仍有可能。本研究通过实时检测 PDT 过程中 $^1\text{O}_2$ 发生特性,为不同波长激光下 5-ALA 介导 PDT 抗肿瘤效应的研究提供了客观基础实验数据。

[参考文献]

- [1] Díez Valle R, Tejada Solís S, Idoate Gastearena M A, García de Eulate R, Domínguez Echávarri P, Aristu Mendiroz J. Surgery guided by 5-aminolevulinic fluorescence in glioblastoma: volumetric analysis of extent of resection in single-center experience [J]. *J Neurooncol*, 2011, 102: 105-113.
- [2] Kaneko S, Miyoshi M. Abstract of the 17th meeting on the Japanese Photodynamic Association (JPA), SS3[C]. Kinugawa, Japan, 2007.
- [3] Zaak D, Hungerhuber E, Schneede P, Stepp H, Frimberger D, Corvin S, et al. Role of 5-aminolevulinic acid in the detection of urothelial premalignant lesions[J]. *Cancer*, 2002, 95: 1234-1238.
- [4] Hirata Y, Koga S, Fukui N, Yu A, Koshida S, Kosaka Y, et al. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy to superficial malignant skin tumors using Super Lizer[J]. *J Dermatol*, 2011, 38: 748-754.
- [5] Chekulayeva L V, Chekulayev V A, Shevchuk I N. Active oxygen intermediates in the degradation of hematoporphyrin derivative in tumor cells subjected to photodynamic therapy [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2008, 93: 94-107.
- [6] Hu X H, Feng Y, Lu J Q, Allison R R, Cuenca R E, Downie G H, et al. Modeling of a type II photofrin-mediated photodynamic therapy process in a heterogeneous tissue phantom [J]. *Photochem Photobiol*, 2005, 81: 1460-1468.
- [7] Moan J, Bech O, Gaullier J M, Stokke T, Steen H B, Ma L W, et al. Protoporphyrin IX accumulation in cells treated with 5-aminolevulinic acid; Dependence on cell density, cell size and cell cycle [J]. *Int J Cancer*, 1998, 75: 134-139.
- [8] König K. Photoproduct formation during porphyrin photodynamic therapy [M] // Wyss P, Tadir Y, Tromberg B J, Haller U. *Photomedicine in gynecology and reproduction*. Basel: Karger, 2000: 86-95.
- [9] Miyoshi N, Sugimoto K, Hukunaga Y. Abstract of the 17th meeting on the Japanese Photodynamic Association (JPA), SS1 [C]. Kinugawa, Japan, 2007.
- [10] Jedrych E, Pawlicka Z, Chudy M, Dybko A, Brzozka Z. Evaluation of photodynamic therapy (PDT) procedures using microfluidic system [J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 683: 149-155.
- [11] Becker T L, Paquette A D, Keymel K R, Henderson B W, Sunar U. Monitoring blood flow responses during topical ALA-PDT [J]. *Biomed Opt Express*, 2010, 2: 123-130.