

酞菁类光敏剂对肝癌细胞线粒体和微粒体的光辐射效应

傅乃武

黄磊

许慧君

(中国医学科学院肿瘤研究所药理室,北京)

(中国科学院感光化学研究所,北京)

提 要

酞菁 (Phthalocyanin, PC) 化合物结构类似卟啉,是一种新的光敏剂。它的四个苯环上各取代一个磺酸基成为四磺酸酞菁 (phthalocyanine tetrasulfonate, TSPC)。TSPC 30 μ g/ml 合并照光30分钟,肝癌细胞线粒体 ATP 酶和微粒体 G-6-P 酶明显受抑,对线粒体单胺氧化酶 (MAO) 没有明显影响。在上述剂量和照光条件下,线粒体和微粒体膜蛋白巯基含量显著减少,而膜脂质过氧化产物增多,线粒体膜通透性改变,导致线粒体肿胀。

血卟啉衍生物 (HPD) 对某些类型肿瘤的光动力治疗取得明显效果。因它存在一些缺点,各国有关学者正努力开展对新型更为完善光敏剂的研究。酞菁 (PC) 化合物结构上类似卟啉,化学性质稳定,毒性低,易于合成,对红光有强吸收,能选择性地贮留于某些动物肿瘤组织中。基于这些特点,国外一些实验室对 PC 化合物正积极进行研究。本文报道 TSPC 对肝癌细胞线粒体和微粒体的光敏损伤,以探讨其光敏作用机理。

材 料 和 方 法

材料 昆明种小鼠 (医科院实验动物中心供给,合格证号 8707M14), ♀, 体重 20 $\pm$ SD 2.83g。腹水肝癌 (HepA), 每 7 天传代一次,取接种后 7 天腹水,用 PBS 稀释至所需浓度。TSPC 合成按 Weber 等^[1]方法。5'-ATP(Na₂) 为 GMBH 产品, D-glucose-6-phosphate(Na₂) 是 Sigma 产品, 5, 5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 为 Carl Roth 产品。其它试剂是北京化工厂产品,分析纯。

分别进行肝癌细胞线粒体和微粒体提取和分离^[2]; G-6-P 酶和膜脂质过氧化物测定^[2];

ATP 酶测定^[3]; MAO 测定^[4]; 巯基测定^[5]; 蛋白质测定^[6]; 线粒体肿胀试验^[7]。照射光源是碘钨灯, 500 瓦, 发射光谱主峰范围 550—650nm, 光照距离 15.5cm, 光照强度 0.081J/cm²。光源和被照物之间隔一流动水槽以散热。

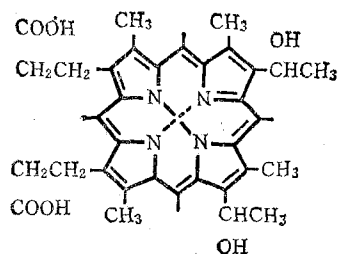
结 果

酞菁化合物的结构 酞菁化合物(图 1)是一多环化合物,含有 4 个苯并异吡啶核,通过 N 桥相连接。此 N 桥可和金属离子生成稳定螯合物,它的 4 个苯环上各取代一个磺酸基成为四磺酸酞菁 (TSPC)。

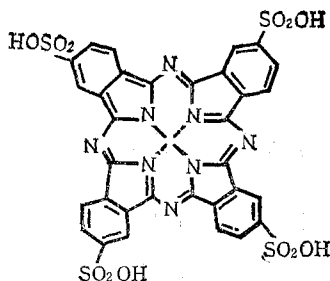
TSPC 对肝癌细胞线粒体 ATP 酶和 MAO 酶的光敏效应 TSPC 30 μ g/ml 合并照光30分钟,线粒体 ATP 酶显著受抑,单独照光或 TSPC 本身对此酶活力无影响。在上述剂量和照光条件下,对线粒体 MAO 酶活力无明显影响(表 1)。

肝癌细胞线粒体和微粒体膜蛋白巯基的变化 TSPC 30 μ g/ml 合并照光 30 分钟,膜蛋白巯基含量明显减少(表 2)。

肝癌细胞线粒体和微粒体膜脂质的过氧化作用 TSPC 30 μ g/ml 合并照光 30 分钟,膜脂



血叶啉(HP)



四磺酸酞菁(TSPC)

图1 四磺酸酞菁(TSPC)和血叶啉(HPD)的化学结构

表1 TSPC 对肝癌细胞线粒体 ATP 酶和 MAO 活力的光敏效应

组 别	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	光照时间(分)	ATP 酶活力 ($\text{Pinmol}/(\text{mg}\text{蛋白}\cdot\text{分})$)	MAO 活力 ($\text{苯醛}\mu\text{mol}/(\text{mg}\text{蛋白}\cdot\text{分})$)
对 照	—	—	$151.6\pm 11.0^{(a)}$	$46.4\pm 14.1^{(b)}$
光	—	30	$113.1\pm 9.6^*$	$46.1\pm 12.6^*$
TSPC	30	—	$166.7\pm 6.7^*$	$52.1\pm 12.9^*$
TSPC + 光	30	30	$10.1\pm 6.2^{**}$	$54.2\pm 11.9^*$
TSPC + 光	60	30	$9.1\pm 0.5^{**}$	$55.9\pm 6.6^*$

(a) 3 次实验平均值 $\pm$ S. E.; (b) 2 次实验平均值 $\pm$ S. E.

* $P>0.05$; ** $P<0.001$

表2 TSPC 对肝癌细胞线粒体和微粒体膜蛋白巯基(-SH)的光敏效应

组 别	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	光照时间 (分)	-SH 含量 ($\mu\text{mol}/\text{mg}\text{蛋白}$)	
			线粒体	微粒体
对 照	—	—	$11.6\pm 0.5^{(a)}$	$10.3\pm 1.3^{(a)}$
光	—	30	$10.8\pm 0.4^*$	$9.5\pm 0.7^*$
TSPC	30	—	$10.7\pm 0.7^*$	$10.1\pm 0.3^*$
TSPC + 光	30	30	$7.1\pm 0.9^{**}$	$5.1\pm 0.5^{**}$

(a) 3 次实验平均值 $\pm$ S. E.

* $P>0.05$; ** $P<0.001$

表3 TSPC 合并光照对肝癌细胞线粒体和微粒体膜多聚不饱和脂肪酸的过氧化作用

组 别	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	光照时间 (分)	TBA-反应物含量 ($\text{mmol}/\text{mg}\text{蛋白}$)	
			线粒体	微粒体
对 照	—	—	$0.09\pm 0.01^{(a)}$	$0.09\pm 0.02^{(a)}$
光	—	30	$0.10\pm 0.01^*$	$0.09\pm 0.01^*$
TSPC	30	—	$0.10\pm 0.01^*$	$0.10\pm 0.03^*$
TSPC + 光	30	30	$0.37\pm 0.01^{**}$	$0.31\pm 0.03^{**}$

(a) 3 次实验平均值 $\pm$ S. E.

* $P>0.05$; ** $P<0.001$

质过氧化产物显著增多(表3)。

肝癌细胞微粒体 G-6-P 酶活力的变化
TSPC 30 $\mu\text{g/ml}$ 合并光照 30 分钟, G-6-P 酶活力明显降低, 剂量增至 60 $\mu\text{g/ml}$ 酶活力进一步减低(表4)。

肝癌细胞线粒体肿胀试验 在等渗蔗糖溶液内, 线粒体悬液在波长 550nm 的光吸收 6 分钟内稳定在 0.098 ± 0.0029 , TSPC 30 $\mu\text{g/ml}$ 合并光照 30 分钟, 6 分钟内光密度从 0.098 ± 0.0029 降至 0.087 ± 0.0026 。

表4 TSPC 合并照光对肝癌细胞微粒体
G-6-P 酶的影响

组 别	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	光照时间 (分)	G-6-P 酶活力 (Pinmol/mg 蛋白/分)
对 照	—	—	$21.6 \pm 2.0^{(a)}$
光	—	30	$19.5 \pm 1.2^*$
TSPC	30	—	$19.0 \pm 1.2^*$
TSPC + 光	30	30	$10.1 \pm 1.9^{**}$
TSPC + 光	60	30	$5.4 \pm 0.6^{**}$

(a) 3 次实验平均值 $\pm$ S. E.

* $P > 0.05$; ** $P < 0.001$

讨 论

酞菁化合物在体外和体内对瘤细胞都有较明显光动力作用。Chan 等^[8]观察到 PC 和 Al 螯合后,在红光作用下对 UV-2237 纤维肉瘤细胞株有很强的光杀伤作用。Brasseur 等^[9]用磺酸化的 PC 与 Al 螯合,观察对小鼠 EMT-6 乳腺癌有明显的光动力治疗作用。PC 化合物对癌细胞光杀伤的作用机理尚不清楚。细胞膜和膜系统是光敏剂光杀伤的重要靶部位^[2,10,11],本文结果表明,在光激发下 TSPC 对肝癌细胞线粒体和微粒体膜脂质的过氧化作用显著增强,膜蛋白巯基含量明显减少,表明膜脂质和膜蛋白的结构受到破坏。ATP 酶存在于线粒体内膜,和能量代谢有关,对 TSPC 光敏效应很敏感,MAO 在线粒体外膜,和单胺类代谢有关,对 TSPC 光敏不敏感,说明 TSPC 对线粒

体功能的损伤有一定选择性。G-6-P 酶是微粒体的标志酶,分布于微粒体膜上,其活性的减低表示微粒体膜脂质组分的完整性遭受损害。线粒体肿胀试验反映线粒体膜对溶质的通透性发生改变,提示在 TSPC 光辐射作用下膜结构的完整性受到破坏。以上结果表明,TSPC 对线粒体和微粒体产生明显的光敏效应,破坏其结构和功能。这表明线粒体和微粒体是细胞内 PC 化合物光动力作用的敏感部位。关于 PC 化合物对细胞质膜和其他亚细胞器的光敏效应有待进一步实验研究。

参 考 文 献

- [1] Weber, JH & Bush, DH: *Inorganic Chemistry*, 1965, 4, 469.
- [2] 傅乃武、叶树勇、张谨等,《中国医学科学院学报》,1985, 7, 442.
- [3] Lanzetta, PA et al.: *Anal. Biochem.*, 1979, 100: 95.
- [4] Salach, JI.: *Methods in enzymol.*, 1978, LIII, 495.
- [5] Ellman, GL: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 82, 70.
- [6] Lowry, OH et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- [7] Edmud, F et al.: *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 614.
- [8] Chan WS et al.: *Photochem and Photobiol.*, 1987, 45, 757.
- [9] Brasseur, N et al.: *Photochem and Photobiol.*, 1987, 45, 581.
- [10] Kessel, D: *Biochemistry*, 1977, 16, 3443.
- [11] 傅乃武、全兰萍、张立生:《中国药理学报》1987, 8, 551.

[本文于 1988 年 6 月 6 日收到]

(上接第 292 页)

参 考 文 献

- [1] Rotruck, J. T. et al.: *Science*, 1973, 179, 588.
- [2] Lawrence, R. A. and Burk, R. F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, 71, 952.
- [3] Prohaska, J. R.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1980, 611, 87.
- [4] Miwa, T. et al.: *J. Pharm. Dyn.*, 1983, 6, 459.
- [5] 朱世英等:《陕西医药资料》,1982, 4, 28.
- [6] 杨建国等:《陕西医药资料》,1982, 4, 59.
- [7] Schneider, C. W.: *J. Biol. Chem.*, 1948, 176, 259.
- [8] Wendel, A.: *Method in Enzymology*, Acad. Press, New York, 1981, Vol. 77, 325—332.
- [9] Habig, W. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 7130.
- [10] Ohkawa, H. et al.: *Anal. Biochem.*, 1979, 95, 351.

- [11] Wilkie, J. B. et al.: *Agric. Food Chem.*, 1970, 18, 944.
- [12] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- [13] 朱蓬珍等:《营养学报》,1982, 4, 229.
- [14] Mills, G. C.: *J. Biol. Chem.*, 1957, 229, 189.
- [15] Prohaska, J. R. and Ganther, H. E.: *J. Neurochem.*, 1976, 27, 1379.
- [16] Masukawa, T. et al.: *Biochem. Pharmac.*, 1984, 33, 2635.
- [17] Tappel, W. A.: *Free Radicals in Biology*, Acad. Press, New York, 1980, Vol. 4, 1—47.
- [18] Booth, J. et al.: *Biochem. J.*, 1961, 79, 516.
- [19] Wahllander, A. et al.: *FEBS Lett.*, 1979, 97, 138.
- [20] Prohaska, J. R. and Ganther, H. F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 76, 437.

[本文于 1988 年 7 月 20 日收到]