

血卟啉光敏化作用在细胞生物学中的研究进展

马立伟 郭中和

(解放军总医院激光室,北京)

提 要

本文主要总结了近年来有关血卟啉对细胞的光敏化作用的研究进展。对 HPD 在细胞内的动态分布机理及卟啉-脂蛋白亲和机理进行了讨论;阐述了细胞生物膜的光反应中心学说及 HPD 对各种细胞器的光敏作用;探讨了 HPD 对细胞周期的光动力学作用,认为不同周期时相的细胞其光动力学作用的敏感性是不同的。

在本世纪初首次报道了卟啉具有光敏化作用。1960年 Lipson^[1] 研制成功光敏剂-血卟啉衍生物 (HPD), 其后 Dougherty 等^[2]报道了卟啉光敏化对动物体内肿瘤的根除作用, 1983年 Kennedy 将此作用应用于人, 并取得了一定效果。1980年我国研制成 HPD, 随后此研究工作得到迅速发展, 取得了可喜的成果。但目前在 HPD 的研究领域里仍存在着一些问题, 如: 细胞对 HPD 的摄取方式及其影响因素; HPD 对细胞生物膜的作用机理; 不同周期时相细胞对 HPD 摄取的差异及其光敏性等方面都有待于进一步研究解决。现就上述问题作一综述。

一、HPD 在细胞内的分布与摄取

HPD 在细胞内的分布部位是学术界讨论和研究的对象之一。有人认为 HPD 主要是分布在胞膜上, 也有人认为它主要分布在细胞的内膜系统上。1985年 Dellinger 等^[3]提出 HPD 分布动力学机理, 认为 HPD 在细胞内的分布是一种动态分布, 首先 HPD 掺入胞膜, 当其达到饱和和浓度时, 便在胞膜与胞浆间达成一个适度的分配比, 随后以较慢速度移入内膜系统(线粒体、溶酶体等)。同样, HPD 对细胞的光敏化作用随着细胞与之接触的时间也有所不

同^[4], 短时间内, HPD 分布在胞膜, 其光毒作用在胞膜上, 但此时的 HPD 呈不稳定状态, 较易丢失, 随着时间的延长, HPD 开始紧束在细胞的内膜系统上, 光毒作用发生在各种细胞器上与胞膜作用相比, 其光敏作用维持时间较长。

关于细胞对 HPD 的摄取, Jori 等^[5]提出卟啉-脂蛋白亲和机理。脂蛋白的某些成分与细胞表面的特殊部位有联系, 低密度脂蛋白 (LDL) 在不同组织及不同肿瘤细胞上的各自结合量是相对恒定的。HPD 的有效成分——DHE (双血卟啉醚) 对不同组织的相对亲和量与 LDL 在此组织上的结合量是一致的。1987年 Morliere 等^[6]研究结果显示: 一个 LDL 大约可以结合 60 个 DHE 分子, LDL 运载的卟啉对胞膜及溶酶体有一定的光动力学作用。Jori 曾描述用脂粒包裹的 HP (血卟啉) 可以在鼠体内大量的积聚。目前人们把脂粒作为 HP 的传送系统, 正努力研究并应用于临床。

HPD 的摄取除依赖于不同组织的特性, 还有赖于 HPD 本身的组成成分及其生化性质、溶解度、电荷。主要有下列因素影响 HPD 的摄取: (1) HPD 的组成成分。1987年 Nelson 等^[7]通过高压液相色谱法将 HPD 分离出四种主要成分: 第 1 种成分 (F₁) 主要由 HP 组成, 第 2 种成分 (F₂) 大部分是 HVD (羟乙基乙烯

基次卟啉)的同分异构体,第3种成分(F_3)主要为PP(原卟啉),第4种成分(F_4)是HPD中除去PP后剩下的所有成分。他们分别测定了每种成分的光敏化能力,产生荧光的强度及肿瘤组织的摄取量。结果发现:四种成分各在每克肿瘤组织的含量为 $F_1 = 1.68 \mu\text{g}$, $F_2 = 1.54 \mu\text{g}$, $F_3 = 7.07 \mu\text{g}$, $F_4 = 3.60 \mu\text{g}$,提示肿瘤组织对 F_3 的摄取最多。同时测得 F_3 的荧光强度也最高,其强度是对照组的3.42倍,而 F_1 、 F_2 、 F_4 的荧光强度分别是对照组的2.12、2.26、2.53倍。此结果与Moan等1981年研究所得HP及HVD是肿瘤中最强荧光成分的结论是不一致的,这一差别认为可能是由于在体内、外的实验条件不同所致。(2)HPD的疏水性及带电性。已证实PP具有亲疏水性,主要影响疏水结构,使浆膜、线粒体等生物膜对其摄取较明显。Pasternack^[8]观察到带阳性电的卟啉主要结合在核酸上,带阴性电的卟啉多出现在胞浆内。(3)HPD的酸碱性。肿瘤组织与正常组织在HPD的摄取能力上无明显差别,仅是肿瘤组织对HPD的滞留时间相对较长。而最近Brault等^[9]研究结果证明:肿瘤组织对HPD的摄取较正常组织多。他们发现卟啉对脂质双分子层的亲和力主要依靠pH值和其吡咯环取代基结构的性质。当pH在其生理值范围内出现较小程度的降低,就可导致较明显的卟啉掺合的增加(见图1)。肿瘤组织间液的pH一

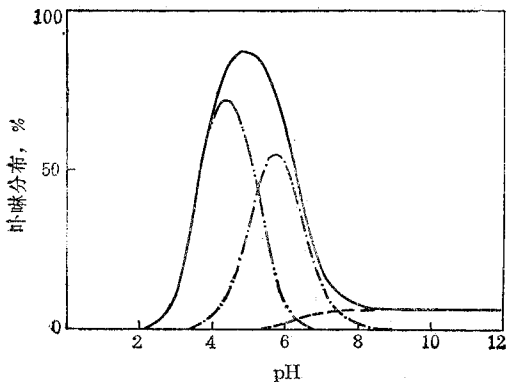


图1 pH值对不同带电形式的卟啉分布的影响^[9]
 ——: P^{2-} (带2个负电荷的卟啉); - - -: PH^{-} (带1个负电荷的卟啉); - · - ·: PH_2 (中性卟啉);
 —: $P^{2-} + PH^{-} + PH_2$

般要比正常组织低0.2—0.4个单位。所以,肿瘤组织局部具有较低的pH值,其对HPD的摄取应较正常组织多。

二、HPD对细胞生物膜的作用

(一)膜的光反应中心

生物膜是光敏剂光敏化作用的重点靶部位。光敏化作用在膜的哪些部位,其中又是哪些成分在导致膜功能紊乱上起着重要作用,一直未能肯定。目前有两个膜成分被视为光反应的中心^[10]。(1)膜蛋白是光反应中心。组成膜蛋白的氨基酸很易发生光氧化,使蛋白变性。Degoeij等^[11]提出:导致膜功能紊乱仅仅是由于光敏剂对膜蛋白作用的结果。中国医科院肿瘤所潘琼婧等在研究HPD照光对细胞摄入 ^3H -酪氨酸影响时,发现 ^3H -酪氨酸的摄入在照光后即刻和六小时后都有减少,从而使膜蛋白的代谢受到抑制。(2)膜上的不饱和脂肪酸(PuFA)和胆固醇是光反应的中心。PuFA和胆固醇也能被氧化,其氧化不仅通过单态氧($^1\text{O}_2$),还可通过在光敏化过程中继发产生的其它活化氧所氧化。Lamola^[12]已证实 $^1\text{O}_2$ 对胆固醇作用的生物学意义,认为胆固醇的光敏过氧化产物可使人红细胞溶血,这种光溶血作用可能是由于产生5- α -水溶性过氧化物所致,此产物还可诱发PuFA链氧化。

1985年中国医科院肿瘤所傅乃武等^[13]将HPD与肝癌细胞结合,加光照射,结果发现肝癌细胞线粒体膜的脂质过氧化作用明显增强,MDA(丙二醛)明显增加,表明HPD对癌细胞膜系统的PuFA有强大的脂质过氧化作用,从而使膜系统的结构和重要功能受到影响。

(二)HPD对细胞器的作用

对线粒体的光敏化作用已广泛研究。不同的卟啉(HP、HPD、PP)在线粒体内都有积聚,卟啉首先可使其皱缩、形成水疱,随之膜对HPD的通透性增加,最终发生肿胀。Hilf等^[14]用 $7 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的HPD和 $0.72 \text{ J}/\text{cm}^2$ 的光作用R₃₂₃₀Ac乳房腺癌,其细胞内线粒体功能受到抑制,ATP生成减少60%。

1985年中国医科院基础所通过电镜观察发现给药 $16 \mu\text{g/ml}$ 光照 2 分钟, 黑色素瘤 B_{16} 细胞内线粒体基质即出现灶性空化, 并且随着作用时间的延长, 损伤越严重。

Torinuki 提出, HP 加光照射肝脏细胞内的溶酶体, 可使其释放出各种溶解酶。Santus^[45] 把 β -半乳糖苷酶作为光敏化作用后溶酶体释放其含酶的一种标记, 发现 HPD 与溶酶体的膜发生作用, 在光密度为 $40-150 \text{J/m}^2$ 条件下, 可使溶酶体通透性增强, 形态发生改变, 最终导致各种酶的释放, 以致细胞死亡, Mulkul Das^[46] 报道: HPD 加长波紫外可使肝细胞微粒体内的 P-450 迅速破坏, 同时伴有 P-420 结构的生成及微粒体内血红素的丢失。他们认为此作用主要是光动力学过程产生单态氧的结果。HPD 对微粒体内血红素蛋白 P-450 的破坏作用是一种特异性作用, 因为它对同样含血红素的肌球蛋白, 细胞色素 c 的结构均未发现有光催化的破坏作用。这就提示: 在微粒体膜上含有一种对 HPD 光敏化作用唯一敏感的物质。

三、HPD 对细胞周期的光动力学作用

不同的化疗药物、辐射、过热对细胞周期都有一定的效应。Christensen^[47] 将细胞株 NHIK 3025 细胞进行同步化后观察所得: 早 G_1 期、晚 S 期和 G_2 期的细胞对 HPD 光灭活作用的敏感性较小, 其敏感性从晚 G_1 到早 S 期逐渐增高, 到中 S 期达到最高。 G_1 期和中 S 期细胞在同样条件下 ($4 \times 10^{-4} \text{m}$ 的 HP、20 分钟的照射) 比较他们各自的细胞生存率 (SF), 结果 S 期比 G 期的 SF 小 100 倍之多。Christensen 认为不同周期时相的细胞光动力学作用的敏感性不同, 其原因一方面可能是细胞膜流动性结构变化所致。De Leat 等曾发现神经纤维母细胞膜的流动性在 G_1 期最小, 在 S 期最大。这与上述的细胞光敏感周期时相顺序是一致的。另一方面可能是由于细胞对膜损伤修复能力的变化所致。1981 年 Christensen 对 NHIK 3205 细胞进行了进一步的研究, 结果发现光动力学作用后的存活细胞首先出现的是间

期 (G_1-S-G_2) 延长现象, 进而产生对 M 期细胞的明显效应, 主要是 M 期时限增加, 同时部分细胞可逆性地阻抑在 M 期。另外, 在光照后仍能完成有丝分裂的那些细胞, 随后还能以与对照组相同的速率进行繁殖传代。在晚 M 期受到光照的细胞, 仍可正常繁殖。这就提示: HPD 加光照后, 可使处于 M 期的某个特殊阶段的细胞发生阻抑作用, 引起这种阻抑作用的原因之一, 很可能是 HPD 抑制了有丝分裂纺锤体蛋白的合成。

1984 年北京肿瘤防治所研究了 HPD 光敏效应对 MGC-803 胃癌细胞 M 期与间期时相的杀伤作用, 结论是 M 期细胞经 HPD 加红光处理后的耐受力比间期细胞强, 且能阻抑 M 期细胞有丝分裂的胞质分裂, 但不影响其细胞核的分裂。1985 年北京师范大学生物系对 HPD 在静止期 (G_0) 和增殖态 (周期细胞) 小儿包皮原代培养细胞中的摄取和滞留进行了研究。结果 G_0 期和周期细胞对 HPD 的摄取相差不大, 周期细胞比 G_0 期细胞对 HPD 有较强的滞留能力, 在洗去 HPD 48 小时后, 两者持有 HPD 荧光能力相差 3 倍以上。

对 HPD 细胞周期的光动力学作用的研究, 为人们探讨 HPD 与其它抗肿瘤细胞周期药物间的协同作用提供了前提。Stephen^[48] 观察了 HPD 加光对化疗药物苯丙氨酸芥 (LPAM) 和放线菌素 D 作用后的白血病 L_{12} 细胞反应曲线的影响。结果表明: 当 LPAM ($1-30 \mu\text{m}$) 孵育细胞 1 小时, 紧跟加入 HP ($0-50 \mu\text{m}$), 如无光照, 则 LPAM 保持其原有的细胞效应, 当细胞经光照后, LPAM 的细胞反应曲线出现变化, 呈现出光动力和化疗对细胞毒性的综合作用。HP 加光再注入放线菌素 D 也可使反应曲线变化。产生上述效应的机理, 目前尚未得到清楚的解释。最近 Prudence^[49] 报道了在鼠体内服用阿霉素 ($0.5-4.0 \text{mg/kg}$) 后, 加入 HP 和光, 可增加 PDT (光动力学疗法) 对 Lewis 肺癌的效应, 其原因很可能是阿霉素提高了 Lewis 肺癌组织对 HPD 的摄取。氨甲喋呤 (0.2mg/kg) 也有提高 PDT 效应

的作用。但 Prudence 认为其他细胞毒剂：环磷酰胺、5-Fu、噻替派、长春新碱均与 PDT 无综合作用。与上不同，Cowled 等同样对 Lewis 肺癌进行了研究，他们给已接收了 HPD 的小鼠注入长春新碱 (0.025 mg/kg) 或环磷酰胺 (10 mg/kg)，结果可使小鼠的 Tc50 (50% 的接种小鼠其体内肺癌组织增长致可用手触到为止所需的的天数) 比单用 HPD 加光组延长 2 天左右。

北京肿瘤防治所曾进行光敏疗法与化疗药物(平阳霉素和长春新碱)对人胃癌细胞协同杀伤作用的研究。他们发现先给 HPD 加光，后给平阳霉素，有 80% 以上的细胞被杀伤，而两者处理顺序颠倒时，则出现拮抗作用。服用长春新碱 3 小时后再给 HPD 加光，结果约有 93% 的细胞杀伤，但处理顺序相反时，细胞杀伤率并不比单用一种处理方法明显升高，此机理目前尚未见到明确的阐述。

四、展 望

PDT 在肿瘤诊治中起着重要作用，目前对其基础方面特别是作用机理的研究仍在进行。今后的 PDT 工作目标是寻找一种能选择性作用于不同靶组织的光敏物质，现有两种方法：1. 光免疫疗法，即使 HPD 与单克隆结合，特异性的作用于不同肿瘤组织。2. 脂质包容法，即将 HPD 用脂质包裹，使其增加在靶组织中的积聚，产生长时间的光敏效应。然而单靠光敏治疗往往很难根治肿瘤，合并应用一些抗癌

药物是提高光敏治疗疗效的一个重要途径。但目前对两者协同作用研究结果的报道尚缺乏一致性，两者间既有协同作用，也可有拮抗作用，此影响可能与许多因素有关，如 HPD 对细胞的光动力作用机制，对不同细胞时相的影响等方面都有待于进一步研究探讨。

参 考 文 献

- [1] Lipson, R. L. et al.: *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1961, 42, 623.
- [2] Dougherty, T. J. et al.: *J. Natl. Cancer. Inst.*, 1975, 55, 115.
- [3] Dellinger, M. et al.: *Proceeding of the meeting on porphyrins as phototherapeutic agents for tumors and other diseases*, Alghero, Italy, 1985, 25—127.
- [4] Moan, J.: *Porphyrins in Tumor Phototherapy*, Plenum Press, New York, 1984, 109—124.
- [5] Jori, G. et al.: *Cancer. Lett.*, 1984, 24, 291.
- [6] Morliere, P.: *Photochem. Photobiol.*, 1987, 46(2), 183.
- [7] Nelson, S. J.: *Cancer. Res.*, 1987, 47(4), 1027.
- [8] Pasternack, R. F. et al.: *Biochemistry*, 1983, 22, 2406.
- [9] Brault, D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 857, 238.
- [10] Kessel, D.: *Biochemistry*, 1976, 16, 3443.
- [11] Degoeij, A. F. P. M. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 1975, 62, 293.
- [12] Lamola, A. A. et al.: *Science*, 1973, 179, 1131.
- [13] 傅乃武等:《中国医学科学院学报》,1985,7(6),442.
- [14] Hilf, R. et al.: *Cancer. Res.*, 1986, 46(1), 211.
- [15] Santus, R.: *Photochem. Photobiol.*, 1983, 38, 71.
- [16] Mulkul, Das. et al.: *Cancer. Res.*, 1985, 45, 608.
- [17] Christensen, T. et al.: *Br. J. Cancer.*, 1979, 39, 64.
- [18] Stephen, P. et al.: *Cancer. Res.*, 1983, 43, 5252.
- [19] Prudence, A. et al.: *Cancer. Res.*, 1987, 47, 971.

[本文于1988年5月27日收到]

农业部有关单位与北京市星火技术研究所联合

举办特种养殖培训班

包盈利、包销路、包种源、包技术

一、**血红素提取技术**：是从各种动物血液中提出十分贵重的生化药品，市场售价每公斤 1.5 万元以上。且供不应求。投资 100 元即可生产，工艺简单，300 公斤血可提取一公斤血红素，三人每天可加工一公斤血红素。函授 35 元。

二、**牛蛙养殖技术**：牛蛙为大型肉用蛙，因其肉

味鲜美，营养丰富而成为许多国家餐桌上的美味佳肴，国际市场每公斤十美元；牛蛙皮是市场抢手货。全国各地均可养殖，回收产品每公斤 8 元。函授 18 元。

汇款及通讯处：北京 867 信箱。20816 组李群邮政编码：100024。

地址：北京市朝阳区平房东口发明城内。