

# HpD 在诊治癌症过程中的光敏机理

惠令凯 张晶如 陈建华 张伟 邓玉妹 徐文洁 刘颂豪

(中国科学院安徽光机所)

沈恒嘉 金熬兴 夏金娣 吴玲娣

(安徽医学院)

江寿平 连少辉

(中国科学院上海生化所)

**提要:** 本文就目前提出的几种 HpD 的光敏机制, 通过离体培养的癌细胞, 在 HpD 的浓度接近诊治癌症的临床条件下进行了比较。初步推断在 HpD-光敏诊治癌症过程中起主导作用的机制仍是单态氧。

## Photosensitiation mechanism of HpD in the cancer treatment process

Hui Lingkai, Zhang Jinru, Chen Jianhua, Zhang Wei, Deng Yumei, Xu Wenjie, Liu Songhao

(Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Academia Sinica)

Shen Henjia, Jin Aoxin, Xia Jindi, Wu Lingdi

(Anhui Medical College)

Jiang Shouping, Lian Shaohui

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

**Abstract:** This paper compares photorensitization mechanisms of HpD suggested at present by means of vitro cancer cellular experiment. The concentrations of HpD are near to the clinical conditions for diagnosis and treatment of cancer. It is derived that the major mechanism in the process of HpD—photosensitized therapy of cancer is still the singlet oxygen.

### 一、引言

对 HpD 光敏机理的研究已有比较多的

报道。当前学者们普遍认为有两种机制: (1) 单态氧( $^1O_2$ ); (2) 自由基。认为 HpD 可通过两种途径产生十分活泼的自由基, 引

收稿日期: 1984年8月6日。

起生物分子一系列链锁反应,以致杀死癌细胞。一种是激发态的 HpD 直接与生物分子作用,产生 HpD 阴离子自由基和生物分子自由基<sup>[2]</sup>。另一种是激发态的 HpD 先把能量转移给氧和水,使它们形成超氧阴离子 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、OH 和水化电子等中介自由基来攻击生物分子<sup>[2,3]</sup>。

在这个基础上,意大利的 A. Andreoni 用 N<sub>2</sub> 脉冲激光器验证了 HpD 的双光子效应。提出了 HpD 两步激光激活作用模型<sup>[4]</sup>,进而认为脉冲光源杀伤癌细胞的效率高于连续光源。

但在 HpD-光敏诊治癌症过程中究竟哪一种机制起主导作用,这对临床诊治和药物的改进都是需要回答的问题。为此,我们设计了本实验,希望能对光源的选择和药物的发展方向提供有益的信息。

## 二、实验材料、装置和步骤

实验所用细胞为人胃癌细胞和宫颈癌 Hela 细胞两种。细胞浓度  $\approx 4 \times 10^5$  个/ml,细胞培养液分别为 Hanks 液和加有小牛血清的 RPMI-1640 两种。细胞样品装在内径为 8mm 的试管中,被辐照的细胞样品体积为 0.6ml。

实验所用的 HpD 为 1984 年 4 月初生产的 SHpD (字头“S”代表某单位生产的 HpD,该药已经临床试用过)。HpD 的浓度为 10  $\mu\text{g/ml}$  和 20  $\mu\text{g/ml}$  两种。所用的激光光源为由调 Q Nd<sup>3+</sup>:YAG 激光器经倍频、调谐产生的 622~630nm 的脉冲激光。脉宽 7ns,平均功率  $\approx 200$  和 400kW。重复频率为 2 次/秒、6 次/秒和 10 次/秒三种。光斑直径 8mm。还用了波长为 647nm 的氦离子激光,功率为 2.7W 和 1.8W 两种,光斑直径分别为 8mm 和 6mm。

细胞在含 HpD 的培养基中(约  $4 \times 10^5$  个细胞/ml)孵育两小时后,即用激光辐照。

辐照时间在使用脉冲激光时为 10 分钟,在使用连续激光时辐照 1 分钟或 1 分半钟。激光辐照后的样品立即经台盼蓝染色,在医用显微镜下计数(每管重复计数 2~4 次,各照射管均有二个复管)求存活率。

## 三、实验结果

HpD 对癌细胞的光敏杀伤效应由图 1 明显可见。

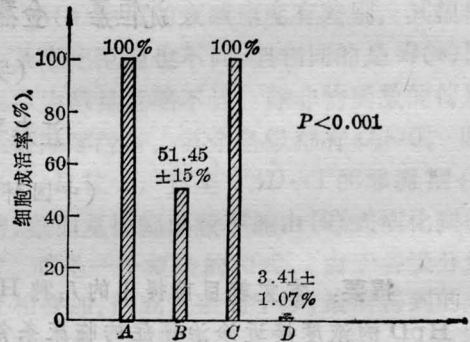


图 1 HpD 对癌细胞的光敏杀伤效应

图中 A 表示细胞样品不加 SHpD,不用激光辐照的存活率; B 表示不加 SHpD,单用激光辐照的存活率; C 为只加 SHpD,不用激光辐照的存活率; D 为加 SHpD,又用激光辐照的存活率。

上述实验是用输出波长为 647nm,激光功率为 1.8W 的连续激光辐照宫颈癌 Hela 细胞 1 分半钟后,过半小时(此时细胞温度约为 35°C)的检测结果。用人胃癌细胞分别在连续或脉冲器件上得到类似的结果。由此不难看出,在用 HpD 光敏诊治癌症过程中,只有在“光”和 HpD 共同作用于癌细胞时,才会取得最佳疗效。

实验中发现,杀伤癌细胞的效率与受激光辐照时细胞悬液的基质有关。该实验结果示于图 2 和图 3。实验中各组辐照前的细胞培养条件完全相同。

图 2 中 SHpD 的浓度均为 10  $\mu\text{g/ml}$ ,A 组样品为 SHpD+15% 小牛血清+RPMI-

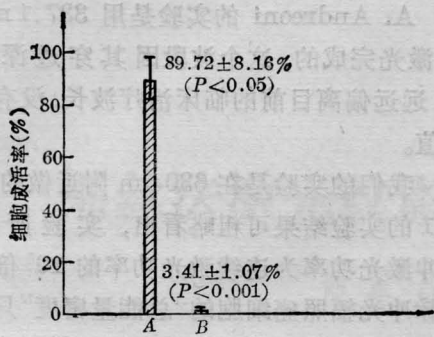


图2 不同细胞基质对杀伤癌细胞效率的影响(一)

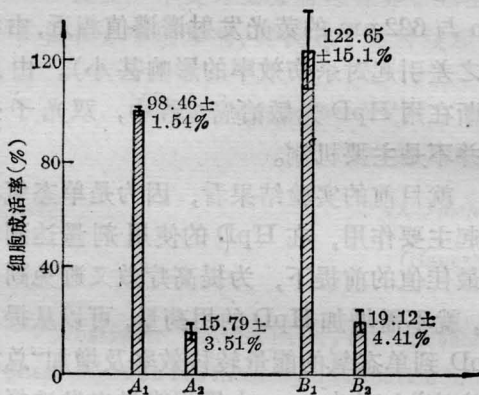


图3 不同细胞基质对杀伤癌细胞效率的影响(二)

1640+Hela 细胞; B 组样品为 SHpD+Hanks 液+Hela 细胞。辐照光源为功率 1.8 W、波长 647 nm 的连续氦离子激光。辐照时间为 1 分半钟。

图 3 中 A<sub>1</sub> 样品为 20 μg/ml SHpD+含 20% 小牛血清的 1640 液+人胃癌细胞; A<sub>2</sub> 样品是 20 μg/ml SHpD+Hanks 液+人胃癌细胞; B<sub>1</sub> 样品是 10 μg/ml SHpD+含 20% 小牛血清的 1640 培养液+人胃癌细胞; B<sub>2</sub> 样品是 10 μg/ml SHpD+Hanks 液+人

胃癌细胞。

实验中所用的 HpD 剂量为 10 μg/ml, 和临床上用的 5~10 mg/kg HpD 的剂量相当。据动物实验报道<sup>[6]</sup>, 超过这个药物剂量时, 就会出现对生物体有害的“SCE”(即诱发细胞姐妹染色单体交换)。而 HpD 在生物体中以什么状态存在, 与在诊治癌症过程中, HpD 的光敏渠道直接相关<sup>[6]</sup>。在日本岛津“UV-360 分光光度计”(该仪器的测量波段为 185~2500 nm)上测了含 SHpD 10 μg/ml 浓度的 PBS 溶液(即磷酸盐缓冲液)的紫外-可见吸收谱, 结果见图 4。发现 SHpD 在这个浓度下的 Soret 峰在 390 nm 至 400 nm 间。这表明 SHpD 这时是以单体或二聚体的形式存在于溶剂中的<sup>[7]</sup>。

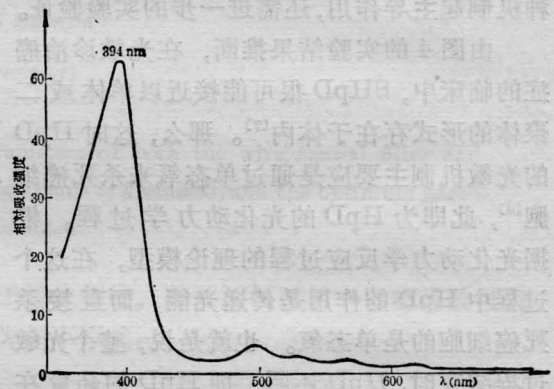


图4 SHpD在PBS液内的紫外-可见吸收谱

浓度: 10 μg/ml SHpD; pH: 7.4; 样品池长: 10 mm

在同样的癌细胞孵育条件下, 当用不同能量密度的激光辐照时, 杀伤癌细胞的效率截然不同。结果见表 1。

表1 不同能量密度的激光对癌细胞杀伤效率的影响

光源	λ	(平均)功率	(平均)功率密度	重复率	辐照时间	总能量密度(J/cm <sup>2</sup> )	细胞成活率
氦离子激光	647 nm	2.7 W	5.4 W/cm <sup>2</sup>	/	1 分	324	15.71%
脉冲调谐光	622 nm	400 kW	800 kW/cm <sup>2</sup>	10 次/秒	30 分	100	55.79%

注: 实验所用样品为 20 μg/ml SHpD 孵育的人胃癌细胞。



## 四、分析和讨论

由图 1 见, 只有吸收了光能后处于激发态的 HpD 才对癌细胞具有杀伤作用。这个结果与文献报道的<sup>[9,3]</sup>完全相符。

图 2、图 3 的实验结果表明, 小牛血清+1640 等水解乳蛋白的存在, 会堵塞激发态的 HpD 杀伤癌细胞的两个渠道(即通过单态氧杀伤癌细胞的渠道和通过自由基杀伤癌细胞的渠道)。究竟堵塞的是哪一种渠道, 1979 年 J. Moan 等人认为小牛血清等猝灭的就是单态氧<sup>[8]</sup>; 而在 1980 年以后, Moan 和 John 等人认为它和癌细胞一样, 两种机制都存在<sup>[4,9]</sup>。看来在诊治癌症过程中, 究竟是哪一种机制起主导作用, 还需进一步的实验验证。

由图 4 的实验结果推断, 在光敏诊治癌症的临床中, SHpD 很可能接近以单体或二聚体的形式存在于体内<sup>[7]</sup>。那么, 这时 HpD 的光敏机制主要应是通过单态氧来杀死癌细胞<sup>[6]</sup>, 此即为 HpD 的光化动力学过程。根据光化动力学反应过程的理论模型, 在这个过程中 HpD 的作用是传递光能, 而直接杀死癌细胞的是单态氧。也就是说, 整个光敏过程结束时, HpD 还原, 即 HpD 的药量在反应前后应接近不变(这是指离体癌细胞情况。实际临床时, 还应考虑药物的代谢作用损失药量, 应采取必要的追加措施)。

对于激发态的 HpD 直接与生物分子作用的自由基机制(通过 HpD 的自由基杀死癌细胞)在光敏过程中是要消耗 HpD 的。如果是这种自由基的机制起主导作用, 则药量增加一倍时, 其杀伤效率起码应有明显的增加。而由图 3 中的 A<sub>2</sub>、B<sub>2</sub> 组数据对照所得的结论是相反的。这就从反面证明了单态氧机制起主导作用的推断。

那么, A. Andreoni 的双光子效应产生自由基的机制能否与单态氧的机制抗衡? 这就要证明杀伤效率与激光功率有关。

A. Andreoni 的实验是用 337.1 nm 的 N<sub>2</sub> 激光完成的, 这个波段因其穿透深度太浅, 远远偏离目前的临床治疗波长, 没有实用价值。

我们的实验是在 630 nm 附近做的。由表 1 的实验结果可粗略看出, 实验所用的脉冲激光功率为连续激光功率的 10<sup>5</sup> 倍; 而该脉冲光辐照癌细胞的“总能量密度”只低于连续光约 3 倍, 但杀伤效率反而低于连续光的。这说明影响杀伤效率主要的是“总能量密度”, 而功率指标并不重要(HpD 在 647 nm 与 622 nm 的荧光发射谱谱值相近, 由波长之差引起对杀伤效率的影响甚小)。由此推断在用 HpD 光敏治癌过程中, 双光子效应并不是主要机制。

就目前的实验结果看, 因为是单态氧机制起主要作用, 在 HpD 的使用剂量达到临床最佳值的前提下, 为提高疗效又避免副作用, 就不需增加 HpD 的用量, 可以从提高 HpD 到单态氧的能量转移效率及增加“总能量密度”上下功夫。由累积能量出发选择光源, 自然是连续光源优于脉冲光源。

氦离子激光实验是在汪晨熙、周杰同志的帮助下取得的。

## 参 考 文 献

- [1] C. C. Felix *et al.*; *Photochem. Photobiol.*, 1983, **37**, 141.
- [2] P. V. Hariharen *et al.*; *Int. J. Radiat. Biol.*, 1980, **37**, 691.
- [3] E. Rossi *et al.*; *Photochem. Photobiol.*, 1981, **34**, 447.
- [4] J. Moan *et al.*; *Tumor. Res.*, 1980, **15**, 1~10.
- [5] 鄂征等; “HpD 对动物三致效应的实验研究”, 《全国光敏会议文集》, 1984.
- [6] L. I. Grossmeiner *et al.*; *Photochem. Photobiol.*, 1982, **36**, 159.
- [7] A. Andreoni *et al.*; *Chemic. Physics Lett.*, 1982, **88**, 33~36.
- [8] J. Moan *et al.*; *Br. J. Cancer*, 1979, **39**, 398.
- [9] John D. Spikes; The Clayton Foundation Symposium on Porphyrin Localization and Treatment of Tumors, April 25, 1983, in California.