

竹红菌素光敏杀伤细胞及吸收光谱 和 HPLC 色谱研究

王兰岚 宋桂英 郭延德 徐正平 陆仲康 梁宏

(中国科学院遗传研究所, 北京 100012)

摘要: 本实验对新型光敏剂——竹红菌素加激光辐照对体外培养细胞 PTK₂ 和 HeLa 的杀伤力进行了研究, 同时还对竹红菌素的吸收光谱和高效液相色谱分析(HPLC)层析结果进行了分析。结果表明竹红菌素可能是一种有效的光动力学反应的光敏剂。

关键词: 激光显微照射, 人宫颈癌细胞株(HeLa), 血卟啉衍生物(HPD), 竹红菌素, 长鼻腺肾上皮细胞株

Studies on photodynamic inactivation of hypocrellin on cells in vitro and its absorption spectrum

Wang Lanlan, Song Guiying, Guo Yande, Xu Zhengping, Lu Zhongkang, Liang Hong
(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing)

Abstract: Cytotoxic effect of the new photosensitizer hypocrellin plus light exposure on PTK₂ and heLa cells in vitro was studied by means of He-Ne laser microirradiation. The absorption spectrum and HPLC of hypocrellin were also investigated. It showed that hypocrellin might be an effective photosensitizer in photodynamic reaction.

Key words: laser microirradiation, HeLa, hematoporphyrin derivative (HPD), HPLC hypocrellin A, PTK₂

迄今, 血卟啉衍生物(HPD)是光动力疗法临床上普遍使用的光敏剂。虽然 HPD 能基本满足光动力疗法的临床使用要求, 但 HPD 是一种未经提纯的卟啉类化合物, 临床上病人经 HPD 注射后需采取避光措施以防止皮肤光敏反应副作用, 因而继续寻找低毒、皮肤光敏反应副作用小的新型光敏剂对发展诊治肿瘤的光动力疗法具有重要意义^[1~3]。本研究以体外培养的雄性长鼻腺肾上皮细胞株(PTK₂)和人宫颈癌细胞株(HeLa)为实验材料, 用激光微束照射单细胞的方法对竹红菌素加激光对正常和肿瘤细胞的杀伤效应进行了初步的比较分析。同时, 对竹红菌素进行了吸收光谱分析和 HPLC 层析。

材料和方 法

光敏剂竹红菌素是从竹红菌 [*Hypocrella bambusae* (B. et Br.) Sacc.] 中提取而得到的一

种花甙衍生物。本试验使用了两种竹红菌素样品,即一种为竹红菌素粗制品(以下简称竹红菌素),另一种为提纯的竹红菌甲素。前者由云南微生物研究所提供,后者为中国科学院感光化学研究所提供。HPD 用作对照光敏剂。本实验使用的为扬州生化厂提供的血卟啉。

细胞与细胞培养 本实验使用了两种体外培养的细胞。一种为雄性长鼻鼯肾上皮细胞株(PTK₂),另一种为人宫颈癌细胞株(HeLa)。PTK₂ 和 HeLa 细胞先按常规方法用改良后的 Dulbecco's Eagle 培养基辅加 10% 小牛血清培养在培养瓶中。待细胞铺满单层时用胰酶消化和收集细胞,将细胞接种于 Rose 小室中。细胞在 Rose 小室中贴壁生长 1~2 天后,换入新配制的含竹红菌素或 HPD 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的培养基处理 4~5 小时,然后再换入不含光敏剂的培养基放置于 37°C、5% 的 CO₂ 培养箱中过夜保温培养。次日取出细胞生长健康的 Rose 小室进行激光照射试验。

激光显微照射 其基本原理是把激光引入一台显微镜并通过物镜聚焦成光斑到达细胞样品。本实验使用一台 He-Ne 激光显微仪,波长为 632.8 nm,激光器输出功率 1.4 mW。激光束通过一干涉滤光片反射到显微镜内,再通过 $\times 16$ 相差物镜对放置在显微镜台上的 Rose 小室里定位好的靶体单个细胞聚焦照射。光剂量则通过变换照射时间予以控制。

吸收光谱测量 用 UV-260 型双光束分光光度计(其光谱分辨率为 $\pm 0.1 \text{ nm}$)测量。用二甲基亚砷将竹红菌素溶解成浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液,以二甲基亚砷作对照进行测定。

高效液相色谱分析 用 Beckman-344 型高效液相色谱仪。采用 Spherogel PW 500 柱($\phi 7.5 \times 350 \text{ mm}$)。样品一次注入量为 20 μl (浓度 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$),以 5% 的乙腈+水作流动相,流速 1 ml/min,在 280 mm 处检测流出液的吸收峰。

实 验 结 果

根据我们过去对 HPD 的研究^[4],激光辐照可激发细胞内 HPD 发生光动力反应,使细胞出现可见损伤,如核膜和核质变深,细胞核收缩,我们称之为初级可见损伤。经过一段时间,核仁变淡,有时出现一个亮点,我们称之为明显可见损伤。再经过一段时间后,细胞解体,细胞质外溢,我们称之为严重可见损伤。出现上述各阶段时间的早晚因细胞种类不同和使用的的光敏剂种类和光剂量不同而异。因此在相同的实验条件下,根据细胞出现可见损伤的早晚可以判断和比较不同光敏剂的光动力灭活效应。

我们使用了 0.75、2.25、4.50、13.5 和 22.5 $\text{mJ}/\mu\text{m}^2$ 五种光剂量激光显微照射 PTK₂ 和 HeLa 细胞以测试竹红菌素的细胞杀伤效应。同时在相同的实验条件下用 HPD 作为对照光敏剂进行比较。实验结果表明,由竹红菌素加激光辐照处理所诱发的细胞损伤到细胞死亡的过程基本上与 HPD 加激光辐照相似(见图 1 和图 2)。

图 3 和图 4 分别为 PTK₂ 和 HeLa 细胞在使用相同浓度竹红菌素粗制品和 HPD 以及用相同的光剂量激光显微照射细胞杀伤力的比较。横坐标为激光辐照后出现明显可见损伤的时间。由图 3 和图 4 可见,不论是 PTK₂ 或 HeLa 细胞,当激光剂量达到或超过 13.50 $\text{mJ}/\mu\text{m}^2$ 时,竹红菌素粗制品和 HPD 对细胞杀伤力看不出明显的差异。这因为在较大光剂量激光辐照时,细胞都很快出现可见损伤,从而掩盖了不同光敏剂之间的作用差异。然而,随着光敏剂量的减弱,它们对细胞杀伤力的差异就明显地显示出来。这就是说,当使用较弱的激光剂量照射

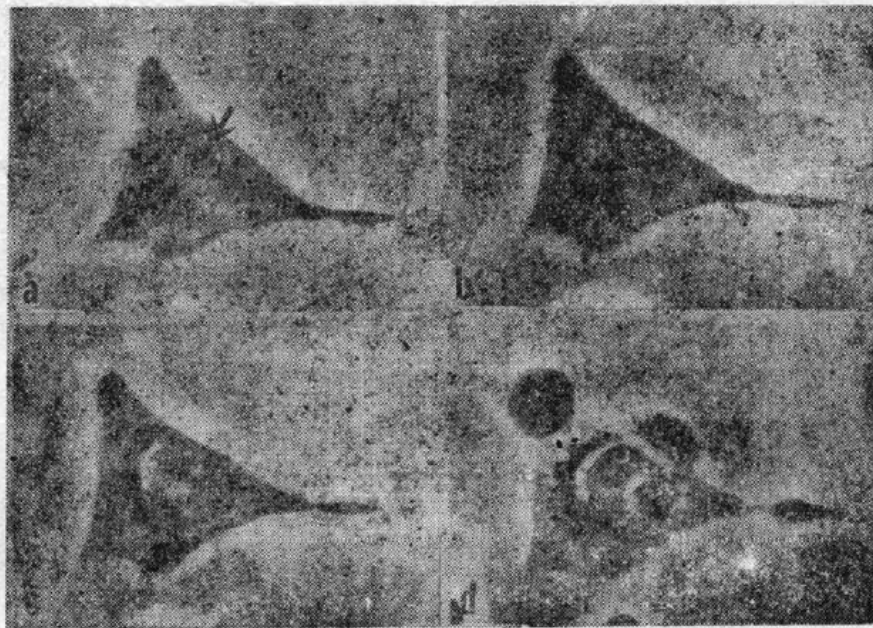


Fig. 1 Cell killing effect by hypocrellin plus laser in HeLa

(a) Before irradiation; (b) primary visible damage; (c) significant visible damage; (d) serious visible damage

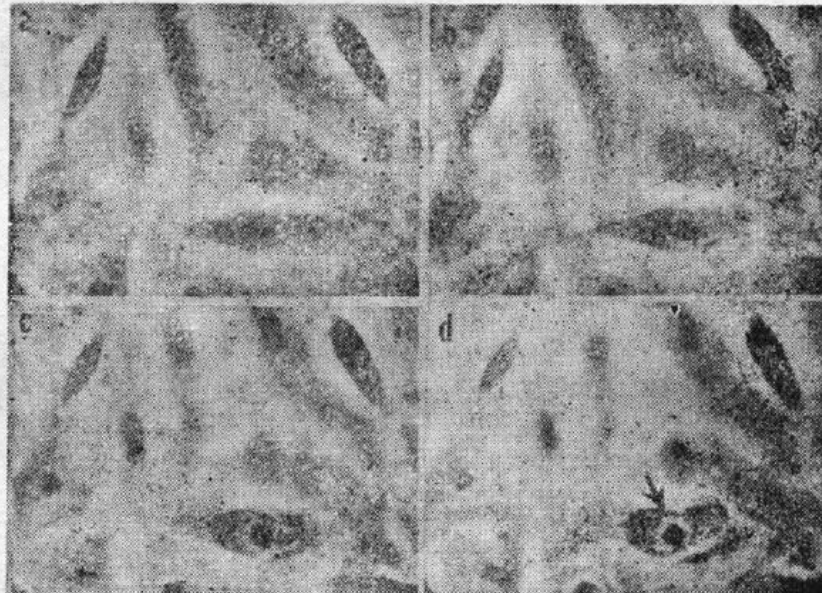


Fig. 2 Cell killing effect by hypocrellin plus laser in PTK₂

(a) Before irradiation; (b) primary visible damage; (c) significant visible damage; (d) serious visible damage

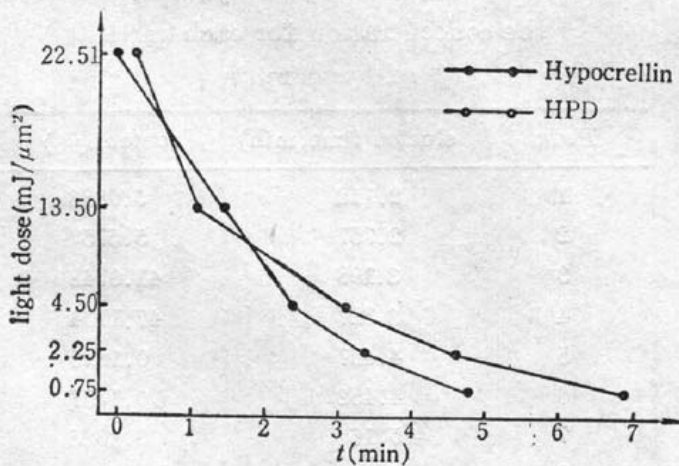


Fig. 3 Cytotoxic effect induced by hypocrellin and HPD plus laser exposure in PTK₂

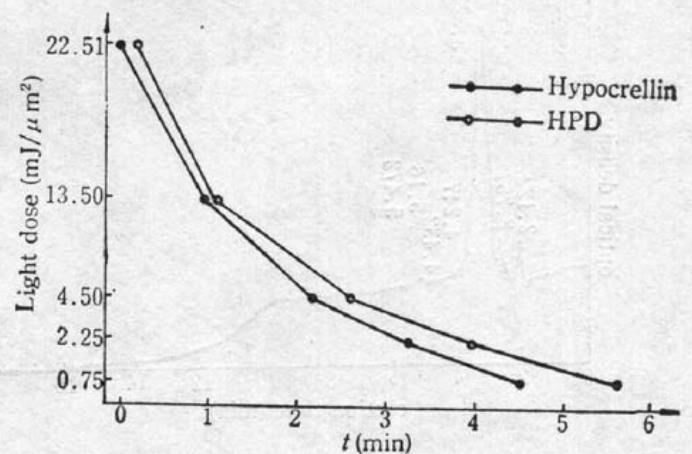


Fig. 4 Cytotoxic effect induced by hypocrellin and HPD plus laser exposure in HeLa

时,竹红菌素粗制品处理的细胞要比 HPD 处理的细胞更早地出现细胞损伤,即摄入竹红菌素的 PTK₂ 正常细胞和 HeLa 肿瘤细胞较摄入 HPD 的 PTK₂ 和 HeLa 细胞具有更强的光动力灭活作用。

进而我们研究了从竹红菌素粗制品中分离提纯的竹红菌甲素对细胞的光动力灭活效应,以 HeLa 细胞为材料,同时与竹红菌素粗制品和 HPD 进行了比较。与上述实验一样,也采用了 He-Ne 激光显微照射,使用了 0.75、2.25、4.50、13.5 和 22.51 mJ/μm² 五种光剂量。所得实验结果综合于图 5。由图 5 可见,除 22.51 mJ/μm² 光剂量时,竹红菌素粗制品和竹红菌甲素两者无差别,即在激光辐照后这两个处理的细胞都立即出现明显可见损伤,而 HPD 约在激光辐照后半分钟出现明显可见损伤外,在 22.51 mJ/μm² 以下的光剂量,都是有规律地显示出竹红菌甲素具有最强的细胞杀伤力,即最早出现可见损伤;其次为竹红菌素粗制品;第三位为 HPD。

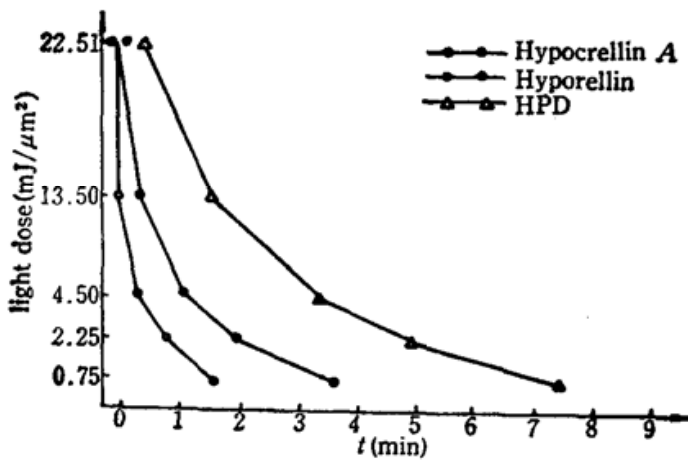


Fig. 5 Cytotoxic effect induced by hypocrellin A, hypocrellin and HPD plus laser exposure in HeLa

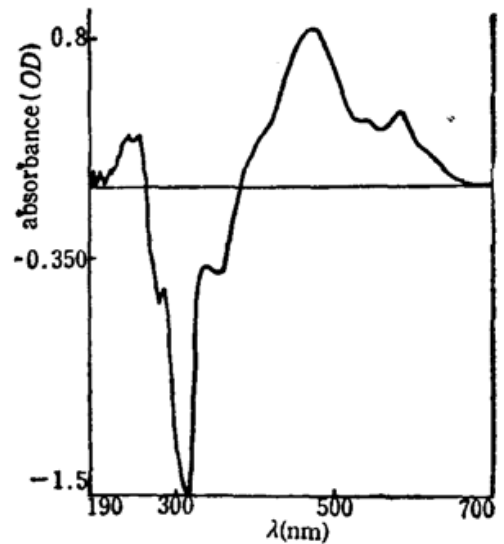


Fig. 6 Absorption spectrum of hypocrellin (20 μg/ml)

实验进一步对竹红菌素进行了从紫外光区到可见光区范围的全波长光谱扫描,结果见图 6。有趣的是竹红菌素在 240~381 nm 处为负吸收,也就是说在这一波长范围内溶解在二甲基亚砷中的竹红菌素增加了二甲基亚砷的透光度,其机理还不清楚。但是,竹红菌素在可见光区的

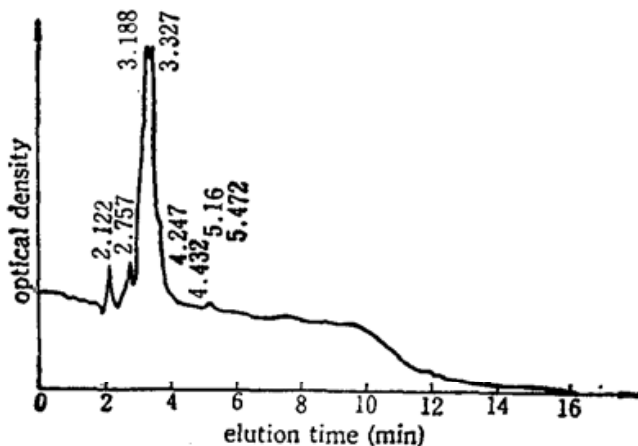


Fig. 7 HPLC analysis of hypocrellin

Table 1 HPLC analysis of the concentration for each peak of hypocrellin

Peak	elution time(min)	content(%)
1	2.112	5.0883
2	2.757	5.575
3	3.198	41.0748
4	3.327	47.1104
5	4.427	0.1219
6	4.432	0.1757
7	5.16	0.8025
8	5.472	0.0514

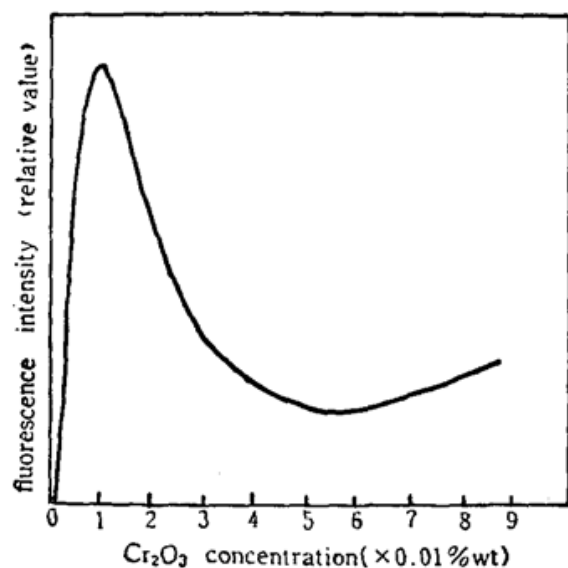


Fig. 5 Effect of Cr³⁺ ion concentration on emission intensity

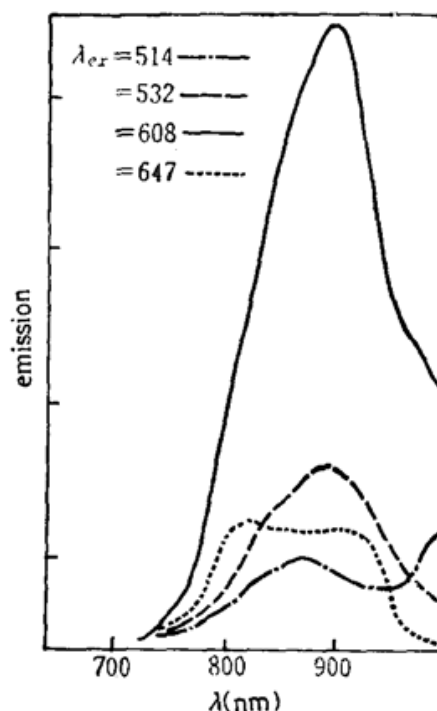


Fig. 6 Emission spectra excited by various wavelengths

汪良苗参加了晶体生长工作，中国科学院物理所许祖彦同志在激光激发实验中给予了很大帮助，在此表示感谢。作者还十分感激张克从教授对本工作的关心和指导。

参 考 文 献

- 1 G. Huber *et al.*, *J. Luminescence*, **39**, 259~268 (1988)
- 2 D. Vivien *et al.*, *J. Luminescence*, **39**, 29~33 (1987)
- 3 K. Petermann *et al.*, *J. Luminescence*, **31** & **32**, 71~77 (1984)
- 4 W. Kolbe *et al.*, *IEEE J. Quant. Electr.*, **QE-21** (10), 1596 (1985)
- 5 A. S. Marfunin, 矿物物理学导论, 地质出版社, 1984, 67

(上接第 474 页)

消光系数高，约从 420~600 nm 这样宽的吸收谱带上的消光值对数几乎均在 4 以上，其中三个吸收峰的消光系数分别为 $\lambda_{\max}(\lg \epsilon_{\max})$ 474(4.45)、539(4.07)、581(4.13) nm。这是其他光敏剂少见的，也是竹红菌素对细胞杀伤力强的主要原因。

实验还对竹红菌素粗制品进行了 HPLC 层析。从图 7 和表 1 可见，其成分比较简单，主要有 3、4 两个洗脱峰，它们的含量分别为 41% 和 47%；其次是 1、2 两个洗脱峰，它们的含量分别为 5% 和 5.5%；其余各峰总合占 1%。

参 考 文 献

- 1 J. D. Spikes, *Photochem. Photobiol.*, **43**, 691(1986)
- 2 A. M. Richer *et al.*, *JNCI*, **79**, 1327(1987)
- 4 A. R. Morgan *et al.*, *Cancer Res.*, **48**, 194(1988)
- 梁宏 *et al.*, 科学通报, **31**, 1019(1986)