

# PsD007 诱导光动力疗法对人喉癌细胞的杀伤作用

陈洪丽<sup>1</sup> 阴慧娟<sup>2</sup> 徐增瑞<sup>3</sup> 王明辉<sup>3</sup> 郑立卿<sup>2</sup> 李迎新<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 天津医科大学生物医学工程学院, 天津 300070  
<sup>2</sup> 中国医学科学院北京协和医学院生物医学工程研究所, 天津 300192  
<sup>3</sup> 天津市第四中心医院耳鼻喉科, 天津 300140

**摘要** 研究癌光啉(PsD007)诱导的光动力疗法(PDT)对人喉癌细胞 Hep-2 的杀伤作用,初步探索其杀伤机制。用噻唑蓝(MTT)法测定在不同光敏剂浓度、光照剂量以及抗氧化剂作用下的 PDT 杀伤效果;用共聚焦显微镜观察光敏剂的亚细胞定位;用 Annexin V/PI 双染法检测凋亡率;用 DCFH-DA 探针检测活性氧(ROS)产量。MTT 结果显示 PDT 对 Hep-2 的杀伤效果可高达 85.4%,光敏剂浓度和能量密度都与细胞死亡率呈正相关;三种抗氧化剂均能不同程度拮抗 PDT 对细胞的杀伤效应,以叠氮钠效果最好;光敏剂主要定位在线粒体;PDT 2 h 后 ROS 产量是对照组的 2.71 倍;PDT 4 h 后凋亡率可达 49.5%(能量密度为 1.2 J/cm<sup>2</sup>)和 70.2%(能量密度为 4.8 J/cm<sup>2</sup>)。PsD007-PDT 对 Hep-2 细胞有明显的杀伤作用,并可诱导细胞凋亡,线粒体可能是其起始靶点。

**关键词** 医用光学;光动力疗法;癌光啉;人喉癌细胞;活性氧

中图分类号 R318.51 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL201340.0504003

## Killing Effect of Photodynamic Therapy Induced by PsD007 on Human Epidermoid Carcinoma *in Vitro*

Chen Hongli<sup>1</sup> Yin Huijuan<sup>2</sup> Xu Zengrui<sup>3</sup> Wang Minghui<sup>3</sup>  
Zheng Liqing<sup>2</sup> Li Yingxin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> College of Biomedical Engineering, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China  
<sup>2</sup> Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China  
<sup>3</sup> ENT Department, Tianjin 4th Centre Hospital, Tianjin 300140, China

**Abstract** We investigate the killing effect of photodynamic therapy (PDT) induced by photocarcinorin (PsD007) on human epidermoid carcinoma Hep-2 *in vitro*, and explore the preliminary killing mechanism. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric assay is applied to measure the relative survival rate of PDT with different photosensitizer concentrations, light doses and antioxidants. Confocal microscope is used to observe the subcellular localization of PsD007. Annexin V/PI double staining is used to detect the apoptosis rate. DCFH-DA probe is used to detect reactive oxygen species (ROS) production. The fatality rate of PDT on Hep-2 can be as high as 85.4%, and is positively correlated with photosensitizer concentration and energy density. Three kinds of antioxidants can all antagonize the damage effect induced by PDT in different degree, while sodium azide has the best effect. The fluorescence images of PsD007 subcellular localization demonstrate that PsD007 diffuses into the mitochondria. Two hours after PDT, the ROS production is as 2.71 times as control group. The apoptosis rate is up to 49.5% (energy density is 1.2 J/cm<sup>2</sup>) and 70.2% (energy density is 4.8 J/cm<sup>2</sup>) four hours after PDT. PsD007-PDT could

收稿日期: 2012-12-28; 收到修改稿日期: 2013-01-23

基金项目: 国家自然科学基金(31271434)资助课题。

作者简介: 陈洪丽(1989—),女,硕士研究生,主要从事激光医学方面的研究。E-mail: chenhl0107@163.com

导师简介: 李迎新(1959—),男,博士,教授,主要从事激光医学方面的研究。

E-mail: yingxinli2005@yahoo.com.cn(通信联系人)

significantly kill Hep-2 cells and induce apoptosis that mitochondria may be the initial target.

**Key words** medical optics; photodynamic therapy; photocarcinorin; human epidermoid carcinoma; reactive oxygen species

**OCIS codes** 170.5180; 170.1530; 180.1790; 180.2520

## 1 引 言

喉癌是来源于喉粘膜上皮组织的恶性肿瘤,其发生率约为 10 万分之 10<sup>[1]</sup>,最常见的喉癌为喉鳞状细胞癌<sup>[2]</sup>,平均发病年龄为 64 岁,且男性多于女性<sup>[1,3]</sup>。近年来喉癌发病率呈明显上升趋势,吸烟饮酒被公认为是喉癌的主要诱导因素<sup>[4~6]</sup>。虽然近几十年来传统的治疗方式如手术、放疗和化疗等有了很大的改进,但手术对喉功能的破坏以及放、化疗的严重副作用仍使以上治疗方式受到极大限制。喉癌特别是晚期鳞状细胞癌对辅助性放、化疗敏感性较差,根治性手术加术后放化疗对晚期喉癌的治疗效果欠佳<sup>[7]</sup>。对于晚期和复发喉癌,国内外都相继开展了多种多样的生物治疗,比如光动力治疗等,能够减轻患者痛苦,取得良好治疗效果<sup>[8]</sup>。

光动力疗法(PDT)主要是利用肿瘤细胞及正常组织细胞对光敏剂有不同的亲和特性,肿瘤组织摄取和存留的光敏剂较多,经特定波长的光照射,在生物组织中氧的参与下发生光化学反应,产生单线态氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)和(或)自由基,破坏组织和细胞中的生物大分子,最终引起肿瘤细胞死亡,从而达到治疗的目的<sup>[9]</sup>。PDT 已被多个国家批准可用于某些肿瘤的治疗,在口腔、皮肤性病和病毒灭活等多个方面都有研究<sup>[10~13]</sup>。影响 PDT 效果的关键因素不仅体现在光敏剂在肿瘤组织或细胞的选择性积聚和特定光照波长及强度的选择上,而且还与光敏剂进入的亚细胞结构和积聚程度有关<sup>[14,15]</sup>。因此探索 PDT 治疗的合适条件,能相对特异性地杀伤肿瘤细胞、减少对健康组织的损害、降低并发症以及毒副作用等,使其成为一项非常有前途的肿瘤治疗方法。本文将通过研究癌光敏剂(PsD007)诱导的 PDT 对人喉癌细胞 Hep-2 的杀伤效应,初步探索其对肿瘤细胞的杀伤机制。

## 2 材料和方法

### 2.1 材 料

光敏剂 PsD007 购于上海张江生物科技有限公司;RPMI-1640 和胎牛血清为 Gibco 公司产品;磷酸盐缓冲液、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)均购自 Sigma 公司;Mito-Tracker Green、Hoechst33342 染色液、细胞膜红色荧光探针(DiI)、

叠氮钠、过氧化氢酶(CAT)和活性氧(ROS)检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。光源为 635 nm 半导体激光器,由中国医学科学院生物医学工程研究所激光医学实验室研制。人喉癌细胞株 Hep-2 购于中国科学院上海细胞库。

### 2.2 方 法

#### 2.2.1 细胞培养

采用含 10% 灭活胎牛血清的 RPMI 1640 培养液(含有双抗:青霉素 100 μg/mL,链霉素 100 μg/mL),在 5% CO<sub>2</sub>、湿度饱和、温度为 37 ℃ 的培养箱中传代培养。含 0.25% 的胰酶和 0.02% 的乙二胺四乙酸的消化液消化。每 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

#### 2.2.2 光敏剂的孵育时间

将处于对数生长期的 Hep-2 细胞接种到 24 孔板中,细胞密度为 2×10<sup>5</sup>/mL。调整光敏剂浓度为 20 μg/mL,分别与 Hep-2 细胞避光孵育 0.25、0.5、1、2、4、8、16、24 h,荧光显微镜紫外光激发并观察记录。

#### 2.2.3 MTT 法检测 PDT 不同剂量下细胞活性的变化

将 Hep-2 细胞接种到 96 孔板中,细胞分子浓度为 2×10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup>,分别加入质量浓度为 3.125、6.25、12.5、25、50、100 μg/mL 的光敏剂,每组 3 个复孔。避光孵育 2 h 后,用 635 nm 激光均匀照射,功率密度为 20 mW/cm<sup>2</sup>,能量密度分别为 1.2、2.4、4.8 J/cm<sup>2</sup>。同时设单纯光敏剂组和单纯光照组。

PDT 处理后,继续培养 24 h,然后每孔加 20 μL MTT(质量浓度为 5 mg/mL),4 h 后弃上清液,每孔加入 100 μL DMSO 溶解 15 min 终止反应。酶标仪 570 nm 处检测吸光度(A)。按公式计算细胞存活率

$$S = \frac{A_{\text{experimental group}}}{A_{\text{control cell group}}} \times 100\% \quad (1)$$

#### 2.2.4 光敏剂的亚细胞定位

与光敏剂 PsD007 共孵育的细胞在完全避光条件下分别与 Mito-Tracker Green 和 Hoechst33342 染色液共孵育。共聚焦显微镜对应波长激光激发并观察记录。

#### 2.2.5 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡

将分子浓度为 2×10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup>的细胞接种到 6 孔

培养板中,培养 24 h 后,加入  $10 \mu\text{g/mL}$  的 PsD007 孵育 2 h,功率密度为  $20 \text{ mW/cm}^2$ ,光照能量密度为  $1.2 \text{ J/cm}^2$  和  $4.8 \text{ J/cm}^2$ ,同时设空白对照组。照光后避光孵育 4 h,用 Annexin V/PI 双染试剂盒分组染色细胞,流式细胞仪进行凋亡检测。

### 2.2.6 3 种抗氧化剂对 PsD007-PDT 的抑制作用

实验前用无血清培养基配制各种抗氧化剂和 PsD007,其终浓度分别为叠氮钠  $10 \text{ mmol/L}$ , D-mannitol  $40 \text{ mmol/L}$  和 CAT  $100 \mu\text{g/mL}$ , PsD007 为  $10 \mu\text{g/mL}$ 。将细胞接种于 96 孔板,24 h 后加入已配置的光敏剂和抗氧化剂,共同孵育 2 h,功率密度为  $20 \text{ mW/cm}^2$ ,能量密度为  $1.2 \text{ J/cm}^2$  和  $4.8 \text{ J/cm}^2$ 。照光后避光孵育 24 h,MTT 法检测细胞存活情况。

### 2.2.7 流式细胞仪检测细胞内活性氧

将细胞接种到 6 孔板,光敏剂孵育,于照光前

20 min 加入终浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  的  $2',7'$ -二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA),调整功率密度为  $20 \text{ mW/cm}^2$ ,能量密度为  $1.2 \text{ J/cm}^2$  和  $4.8 \text{ J/cm}^2$ 。照光后不同时间收集细胞,随即用流式细胞仪检测二氯荧光素 (DCF) 的荧光。

### 2.2.8 统计

应用 SPSS 16.0 统计软件,各组数据用  $\bar{x} \pm s$  (均值  $\pm$  标准差) 来表示,用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结 果

### 3.1 光敏剂的孵育时间

如图 1 所示,随着光敏剂 PsD007 孵育时间的延长,细胞内光敏剂含量增高,从而荧光强度逐渐增强,本实验选择孵育 2 h 后进行 PDT 处理。

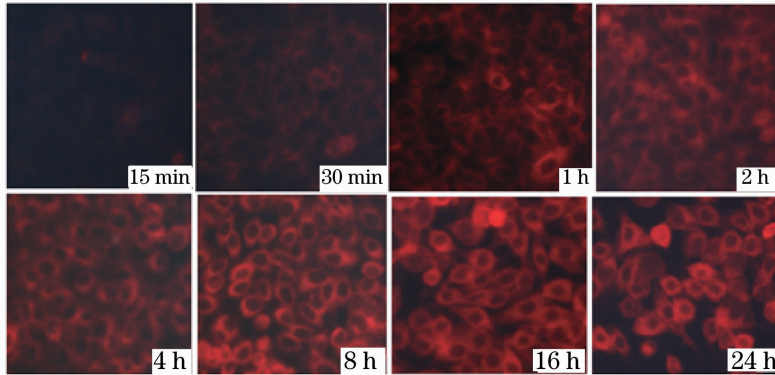


图 1 光敏剂的孵育时间图

Fig. 1 Incubation time of photosensitizer

### 3.2 光敏剂的亚细胞定位

光敏剂、线粒体和细胞核探针的共聚焦显微镜荧光图像分别用红色、绿色和蓝色表示。如图 2 所示,图 2(a)和(b)分别为线粒体探针和 PsD007 的荧光效果图,对两图进行图像融合为图 2(c),色彩重

叠部分设为黄色,表示 PsD007 在线粒体上有分布;图 3(a)和(b)分别为细胞核探针和 PsD007 共孵育的荧光效果图,图 3(c)是图 3(a)和(b)的融合,两个颜色没有重合,表示光敏剂 PsD007 不进入细胞核。

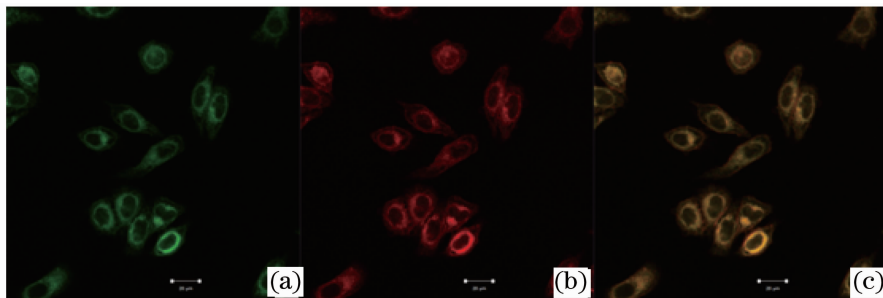


图 2 光敏剂的亚细胞定位图。(a)线粒体探针荧光图;(b)光敏剂荧光图;(c)融合图

Fig. 2 Subcellular localization of PsD007. (a) Mito-Tracker fluorescence image;

(b) PsD007 fluorescence image; (c) fused image

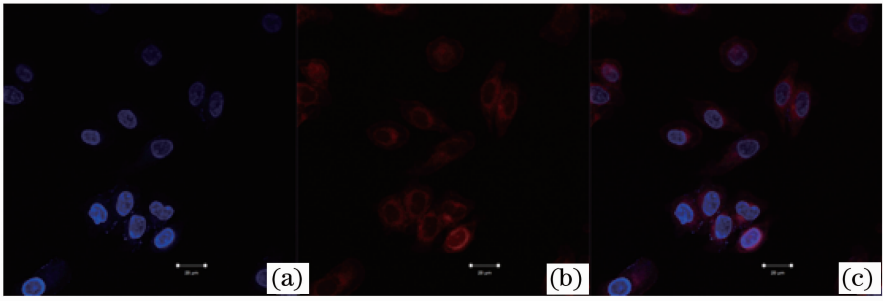


图3 光敏剂的亚细胞定位图。(a)细胞核探针荧光图;(b)光敏剂荧光图;(c)融合图  
Fig.3 Subcellular localization of PsD007. (a) Hoechst33342 fluorescence image;  
(b) PsD007 fluorescence image; (c) fused image

### 3.3 MTT 法检测细胞活性

如图4所示,单纯光敏剂组细胞存活率均在90%及以上,说明光敏剂PsD007无暗毒性;随着光敏剂浓度的增加,细胞的存活率逐渐下降;光敏剂浓度大于 $3\ \mu\text{g/mL}$ 时,PDT组的细胞存活率与对照组相比均有统计学差异( $P < 0.05$ );浓度范围在 $6.25 \sim 50\ \mu\text{g/mL}$ 时,两个高能量密度组优于低能量密度组,但两个高能量密度组之间无显著差异( $P > 0.05$ )。

### 3.4 细胞凋亡的检测

PDT作用4h后,与对照组相比,PDT组细胞出现明显的凋亡和凋亡后死亡,如图5所示象限D1表示机械损伤的细胞,象限D2表示坏死或凋亡后死亡的细胞,象限D3表示存活细胞,象限D4表示

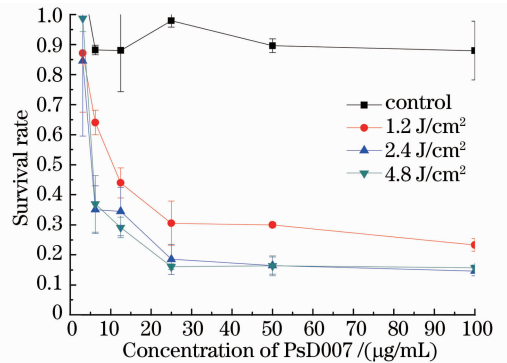


图4 PsD007-PDT处理后 Hep-2 细胞存活率  
Fig.4 Survival rate of Hep-2 after PsD007-PDT  
早期凋亡细胞,PDT  $1.2\ \text{J/cm}^2$  和  $4.8\ \text{J/cm}^2$  组凋亡率分别是 49.5%和 70.2%。

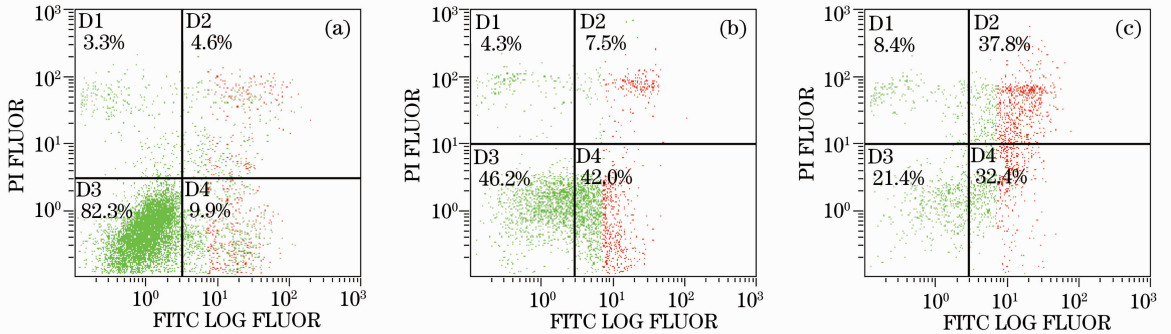


图5 流式细胞仪 Annexin V/PI 双染法检测 PDT 后 4 h Hep-2 细胞的凋亡。(a)对照组;  
(b) PDT 能量密度为  $1.2\ \text{J/cm}^2$  ;(c) PDT 能量密度为  $4.8\ \text{J/cm}^2$

Fig.5 Flow cytometry analysis of Hep-2 cell with Annexin V/PI double staining 4 h after PDT. (a) Control group;  
(b) PDT with energy density of  $1.2\ \text{J/cm}^2$  ; (c) PDT with energy density of  $4.8\ \text{J/cm}^2$

### 3.5 抗氧化剂对 PsD007-PDT 的抑制作用

从图6中得知,加入叠氮钠未照光的 PDT 对照组显示叠氮钠对细胞有一定的损伤;在 PDT 剂量为  $\text{IC}_{55}$  条件下,叠氮钠能完全拮抗 PDT 对 Hep-2 细胞产生的杀伤效应( $P < 0.05$ ),其他两种抗氧化剂使细胞存活率提高  $10\% \sim 15\%$ ;增强激光的能量密度到  $3.0\ \text{J/cm}^2$ ,与 PDT 组相比,叠氮钠能使细胞存活率提高  $20\%$ 左右( $P < 0.05$ ),其他两组则未能拮

抗 PDT 效应;当能量密度达到  $4.8\ \text{J/cm}^2$ ,即 PDT 对细胞杀伤率超过  $60\%$ 时,三组抗氧化剂均未能拮抗 PDT 的杀伤效应。

### 3.6 细胞活性氧的检测

DCFH-DA 可相对特异性地检测胞质内活性氧活性氧的变化。如图7所示,用流式细胞仪检测在 PDT 后不同时间点的 DCF 荧光强度来检测细胞内活性氧含量。从图可知,PDT 组细胞内活性氧含量

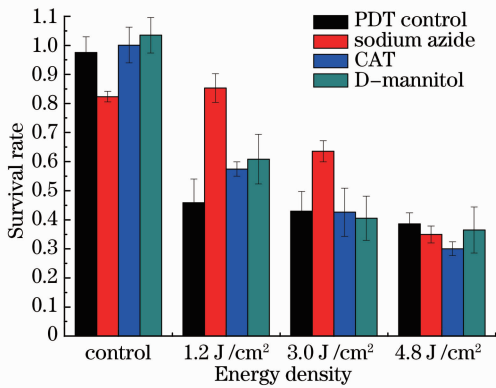


图6 抗氧化剂对 PDT 效应的影响

Fig. 6 Effect of antioxidant on PDT

显著提高,是单纯对照组的 2.08 倍,PDT 后 2 h 更是升至对照组的 2.71 倍。

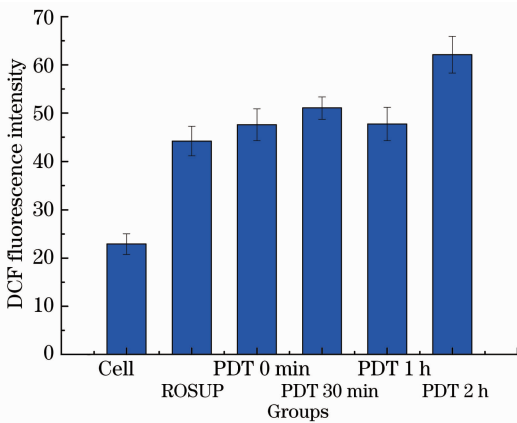


图7 流式细胞仪 DCFH-DA 探针法

检测 PDT 后 2 h 内活性氧产量

Fig. 7 Flow cytometry analysis of ROS production with DCFH-DA in 2 h after PDT

## 4 讨论

PDT 过程中产生活性氧物质,破坏组织和细胞中的生物大分子,最终引起肿瘤细胞死亡。实验用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测。DCFH-DA 本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜,进入细胞内后,可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH,而 DCFH 不能通过细胞膜,从而使探针很容易被装载到细胞内,细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。通过检测 DCF 的荧光来确定细胞内活性氧的水平<sup>[16]</sup>。流式细胞仪的检测结果显示 PDT 组细胞内活性氧含量显著提高,是单纯对照组的 2.08 倍,PDT 后 2 h 更是升至对照组的 2.71 倍。

光敏剂吸光以后,从基态经寿命极短的单重态,

系间窜越到三重态(寿命  $10^{-3} \sim 10$  s)。受光激发的三重态敏化剂可进行两种形式的反应<sup>[9,17]</sup>:1) 经过氢原子或电子转移,直接与底物或溶剂反应,形成自由基或自由基离子,并进一步与周围的氧反应生成氧化产物,叫 I 型反应。2) 转移能量到分子氧,形成单线态氧 $^1O_2$ , $^1O_2$  是高活性的氧化剂,并进一步与周围的底物发生反应生成氧化产物,叫 II 型反应。在 PDT 过程中由于组织中含氧量的不同,其反应机制可表现为 I 型和 II 型两种完全不同的路径。在含氧量充足的体系中,II 型反应占主导地位;而当组织中的含氧量降低到一定水平时,尤其是当  $pO_2 < 2$  mmHg (1 mmHg=0.133 kPa) 时,将抑制 $^1O_2$  的生成<sup>[18]</sup>,此时 I 型反应则占主导作用<sup>[19]</sup>。

为进一步探讨是哪一种类型的 ROS 引起了细胞的死亡,本实验用三种抗氧化剂来分别淬灭不同成分的活性氧,当 PDT 杀伤率达到 55% 时,以单线态氧的淬灭剂叠氮钠效果最明显,能完全拮抗 PDT 对 Hep-2 细胞产生的杀伤效应 ( $P < 0.05$ ),其他两种抗氧化剂与 PDT 组相比使细胞存活率提高 10%~15%;说明在这个 PDT 剂量时,确实产生 ROS,主要是通过 II 型反应产生单线态氧以杀伤肿瘤细胞。增强光照能量,提高 PDT 杀伤效应,抗氧化剂拮抗效应下降,以叠氮钠组的拮抗效果最好。当能量密度达到  $4.8$  J/cm<sup>2</sup>,即 PDT 对细胞杀伤率超过 60% 时,三组抗氧化剂均未能拮抗 PDT 的杀伤效应。可能是因为 I 型反应和 II 型反应交互影响,当我们抑制其中某一种 ROS 时,并未能抑制产生其他的物质。PDT 效应 II 型反应产生的单线态氧是瞬间大量产生的,此时抗氧化剂的含量并不能完全消耗 PDT 产生的活性氧,或者是淬灭单线态氧后,氧的大量消耗使细胞处于乏氧状态,从而又以 PDT 的 I 型反应为主将肿瘤细胞杀死。这也说明 PsD007-PDT 对 Hep-2 细胞的作用是迅速而剧烈的。

Moan 等<sup>[20]</sup> 研究显示光动力效应产生的单线态氧的寿命很短,使其在生物系统中作用范围受到限制(半衰期小于  $0.04 \mu s$ ,作用半径小于  $0.02 \mu m$ ),表明光动力过程主要的分子靶向是在染料周围几纳米范围内。光敏剂的亚细胞定位主要取决于光敏剂的亲疏水性,也与其带电性、苯环数、四吡咯结构中心原子的存在和聚集状态等有关。亲脂性较强的光敏剂主要定位在各种膜结构(细胞膜、线粒体膜、核膜和内质网膜),此类光敏剂的荧光一般是均匀地分布在核外胞浆中,偶尔在核膜和线粒体可见荧光,在极少数细胞中可见到荧光呈颗粒状分布于胞浆,它



们一般不引起 DNA 损伤。亲水性较强的光敏剂主要定位于溶酶体。也有文献报道<sup>[21]</sup>,长链和高浓度的光敏剂更易于定位于溶酶体,而短链的光敏剂则主要积聚在线粒体。戴维德等<sup>[22]</sup>的研究表明,PDT 可导致亚细胞结构产生不同数量的单线态氧,其中线粒体区域内产生的单线态氧数量较多,可能是 PDT 的主要作用靶点之一。本实验使用的光敏剂 PsD007 是由我国第二军医大学研制的第二代新型卟啉类光敏剂,几乎囊括了血卟啉衍生物<sup>[23]</sup>(HpD)所有的活性物质。细胞器探针结果显示该光敏剂并不能进入细胞核,线粒体是其主要靶向定位的细胞器。

细胞的死亡方式主要包括坏死和凋亡,细胞在 PDT 作用后究竟是发生哪种死亡方式,受多种因素影响,如细胞种类、状态以及光敏剂在细胞内的定位<sup>[24]</sup>。细胞凋亡有多种诱导途径<sup>[25]</sup>。一是细胞表面受体介导途径,某些生物因子通过细胞膜表面的凋亡相关受体诱导细胞凋亡。这些受体主要是肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族,比如 TNFR、Fas 和肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体-受体(TRAIL-R)。二是线粒体介导途径,这是一条快速凋亡途径,凋亡所需要的各种因子都已存在,只需被激活。PDT 产生的活性氧物质可以激活线粒体多种通道,使其释放凋亡蛋白或刺激钙依赖酶的活性等。还有可能是 PDT 处理后引起凋亡细胞的溶酶体应激反应,或者是凋亡蛋白酶介导的凋亡途径。因此,确定光敏剂在亚细胞中的定位对于研究 PDT 对细胞作用后发生的凋亡和坏死很有意义。

实验中 MTT 结果显示在一定范围内,随着 PsD007 质量浓度(0~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的增加或光照能量(0~4.8  $\text{J}/\text{cm}^2$ )的增强,其诱导的 PDT 效应增强,对喉癌细胞的杀伤率可达 85.4%。凋亡检测实验显示,在光照能量密度为 1.2  $\text{J}/\text{cm}^2$  和 4.8  $\text{J}/\text{cm}^2$  的 PDT 参数下,诱导的细胞凋亡率分别是 49.5% 和 70.2%。高浓度的活性氧能够触发细胞内的氧化应激,引起氧化损伤,致使线粒体丧失功能,并最终引发细胞凋亡<sup>[25~27]</sup>。Nie 等<sup>[28,29]</sup>研究表明,超氧阴离子和过氧化氢等形式的活性氧可以直接氧化修饰 Bax 蛋白上 62 位和 126 位的半胱氨酸残基,激活 Bax 并使其向线粒体转移,引发后续的凋亡。国内外大量文献表明<sup>[25,26]</sup>,PDT 引起的细胞死亡包括凋亡、坏死和自体吞噬的细胞死亡,因此在一些体系中,抑制某种特殊的死亡信息并不足以阻止 PDT 引起的细胞死亡。凋亡只是细胞死亡的首选途径,但

并不是唯一途径,如果凋亡路线被挽救,那么光动力损伤的细胞将通过自体吞噬或者坏死方式死亡。这也解释了本实验中为什么提高 PDT 效应,抗氧化剂并不能完全挽救损伤的细胞。

## 5 结 论

综上所述,本实验中 PsD007-PDT 对 Hep-2 细胞杀伤效应的主要机制是细胞凋亡,凋亡发生可能是通过产生活性氧诱发线粒体凋亡途径引起的,同时也伴随着其他死亡方式。照光瞬间产生的单线态氧对生物体内的组织和细胞产生杀伤作用,这早已成为人们的共识,但由于其寿命之短、作用范围之小,因此最初的单线态氧在整个治疗过程中的贡献可能只是一小部分,而其后续继发生的活性氧光化学产物,继续发挥杀伤破坏作用,在整个治疗过程中具有重要意义,而这一点往往是人们不甚关注和容易忽视的。本实验检测到的照光后 2 h 的活性氧数据,为这种后续的治疗效应提供了有力的佐证。研究 PDT 诱导细胞凋亡的机制和规律,在临床治疗或基础研究中,增加组织或细胞中氧含量,提高 PDT 作用时活性氧的产率,将有助于拓展 PDT 在临床治疗领域中的应用。

## 参 考 文 献

- 1 A. Jemal, F. Bray, M. M. Center *et al.*. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J. Clin.*, 2011, **61**(2): 69~90
- 2 G. Almadori, F. Bussu, G. Cadoni *et al.*. Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: towards an integrated clinicobiological approach[J]. *European J. Cancer*, 2005, **41**(5): 683~693
- 3 L. Ellis, B. Rachet, B. Birchall *et al.*. Trends and inequalities in laryngeal cancer survival in men and women; England and Wales 1991~2006[J]. *Oral Oncology*, 2012, **48**(3): 284~289
- 4 F. Islami, I. Tramacere, M. Rota *et al.*. Alcohol drinking and laryngeal cancer: overall and dose-risk relation—a systematic review and meta-analysis [J]. *Oral Oncology*, 2010, **46**(11): 802~810
- 5 M. S. Cattanarza, P. Maisonneuve, P. Boyle. Epidemiology of laryngeal cancer [J]. *European J. Cancer Part B: Oral Oncology*, 1996, **32**(5): 293~305
- 6 R. Khelifi, A. H. Chaffai. Head and neck cancer due to heavy metal exposure via tobacco smoking and professional exposure: a review [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010, **248**(2): 71~88
- 7 K. W. Mouwa, A. A. Solanki, K. M. Stenson *et al.*. Performance and quality of life outcomes for T4 laryngeal cancer patients treated with induction chemotherapy followed by chemoradiotherapy [J]. *Oral Oncology*, 2012, **48**(10): 1025~1030
- 8 R. R. Allison, R. E. Cuenca, G. H. Downie *et al.*. Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers: a review of applications and outcomes[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2005, **2**(3): 205~222
- 9 T. J. Dougherty, C. J. Gome, B. W. Henderson *et al.*. Photodynamic therapy [J]. *J. National Cancer Institute*, 1998,

- 90(12): 889~905
- 10 Zou Zhaohui, Gao Ping, Yin Huijuan *et al.*. Influence of photodynamic therapy on dental plaque of oral biofilm of artificial dental caries[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2700~2704  
邹朝晖, 高平, 阴慧娟等. 光动力疗法对人工龋口腔生物膜菌斑的影响[J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2700~2704
  - 11 Zhang Hongyu, Ma Wenjiang, Zou Zhaohui *et al.*. Generation of antitumor vaccines for H22 tumor on mouse using photodynamic therapy[J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(4): 631~634  
张红雨, 马文江, 邹朝晖等. 光动力法制备抗小鼠 H22 肝癌的肿瘤疫苗[J]. *中国激光*, 2008, **35**(4): 631~634
  - 12 Cheng Gang, Zhong Qihai, Huang Naiyan *et al.*. Mathematics modeling and clinic experiment of photodynamic therapy for port wine stain[J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(6): 857~862  
程刚, 钟秋海, 黄乃艳等. 鲜红斑痣光动力治疗数学模型及临床验证[J]. *中国激光*, 2006, **33**(6): 857~862
  - 13 Yin Huijuan, Zheng Yongtang, Li Yingxin *et al.*. Photochemical inactivation of cell-associated and cell-free human immunodeficiency virus *in vitro* [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2705~2711  
阴慧娟, 郑永唐, 李迎新等. 光动力疗法抑制人免疫缺陷病毒复制的实验研究[J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2705~2711
  - 14 A. A. Rosenkranz, D. A. Jans, A. S. Sobolev. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency[J]. *Immunology and Cell Biology*, 2000, **78**(4): 452~464
  - 15 Shi Lei, Wang Xiuli, Wang Hongwei. Application of nanoparticle vectors in photodynamic therapy of tumors[J]. *J. International Oncology*, 2012, **39**(3): 193~196  
石磊, 王秀丽, 王宏伟. 纳米粒载体在光动力治疗肿瘤中的应用[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2012, **39**(3): 193~196
  - 16 M. Afri, A. A. Frimer, Y. Cohen. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer. Part IV: locating 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF), 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer[J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2004, **131**(1): 123~133
  - 17 A. P. Castano, T. N. Demidova, M. R. Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy. Part one: photosensitizers, photochemistry and cellular localization[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004, **1**(4): 279~293
  - 18 T. H. Foster, R. S. Murant, R. G. Bryant *et al.*. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy[J]. *Radiation Research*, 1991, **126**(3): 296~303
  - 19 J. Fuchs, J. Thiele. The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy [J]. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998, **24**(5): 835~847
  - 20 J. Moan, K. Berg. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1991, **53**(4): 549~553
  - 21 I. J. MacDonald, J. Morgan, D. A. Bellnier *et al.*. Subcellular localization patterns and their relationship to photodynamic activity of pyropheophorbide: a derivatives [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1999, **70**(5): 789~797
  - 22 Dai Weide, Li Xiaosong, Zeng Jing *et al.*. Photobleaching of subcellular distributed sites of photosensitizers: an experimental study [J]. *Chinese J. Laser Medicine & Surgery*, 2007, **16**(3): 137~141  
戴维德, 李晓松, 曾晶等. 光敏剂亚细胞分布位点光漂白作用的实验研究[J]. *中国激光医学杂志*, 2007, **16**(3): 137~141
  - 23 K. Berg, J. C. Bommer, J. W. Winkelman *et al.*. Cellular uptake and relative efficiency in cell inactivation by photoactivated sulfonated meso-tetraphenylporphines [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1990, **52**(4): 775~781
  - 24 M. Dellinger. Apoptosis or necrosis following photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1996, **64**(1): 182~187
  - 25 E. Buytaert, M. Dewaele, P. Agostinis. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2007, **1776**(1): 86~107
  - 26 L. Duprez, E. Wirawan, T. V. Berghe *et al.*. Major cell death pathways at a glance [J]. *Microbes and Infection*, 2009, **11**(13): 1050~1062
  - 27 M. T. Lin, M. F. Beal. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. *Nature*, 2006, **443**(7113): 787~795
  - 28 C. Nie, C. Tian, L. Zhao *et al.*. Cysteine 62 of Bax is critical for its conformational activation and its proapoptotic activity in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis [J]. *The J. Biological Chemistry*, 2008, **283**(22): 15359~15369
  - 29 F. Huang, C. Nie, Y. Yang *et al.*. Selenite induces redox-dependent Bax activation and apoptosis in colorectal cancer cells [J]. *Free Radic. Biol. Med.*, 2009, **46**(8): 1186~1196

栏目编辑: 韩峰