

锌酞菁体外光动力学疗法体外抗肿瘤细胞量效关系

杨曼¹, 邢力允¹, 高卫栋¹, 顾月清²

¹中国药科大学生物医学工程实验室, 江苏南京 210009;

²中国药科大学工学院, 江苏南京 210009

摘要 探讨光敏剂锌酞菁体外光动力学疗法(ZnPc-PDT)抗肿瘤细胞的量效关系,为合理使用 ZnPc 提供参考。采用人脑胶质瘤细胞(U87 MG 细胞)作为研究对象,用噻唑蓝(MTT)实验考察细胞存活率。采用单一变量的研究方法,分别考察了 ZnPc 浓度、激光功率密度、光照时间、体系氧含量和组织厚度等参量与 U87 MG 细胞存活率的关系。利用 1,3-二苯基苯并呋喃(DPBF)和 DCFH-DA 活性氧探针分别检测了 ZnPc-PDT 过程中单线态氧的产量,并通过倒置显微镜观察经 ZnPc-PDT 治疗后的细胞形态和死亡细胞比例。结果表明,随着参量设置的变化,ZnPc-PDT 对 U87 MG 细胞的杀伤力具有差异,通过调节参量,可达到较好的 ZnPc-PDT 治疗效果。

关键词 医用光学; 光动力学疗法; 锌酞菁; 光敏剂; 量效关系; 单线态氧

中图分类号 R730.5

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201744.0307001

Dose-Effect Relationship of ZnPc in Photodynamic Therapy on Tumor Cells *in vitro*

Yang Man¹, Xing Liyun¹, Gao Weidong¹, Gu Yueqing²

¹Laboratory of Biomedical Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 210009, China;

²School of Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 210009, China

Abstract We investigated the dose-effect relationship of photosensitizer ZnPc in photodynamic therapy (ZnPc-PDT) in killing the U87 MG cells and provided reference for rational administration of ZnPc. The proliferation of U87 MG cells was determined by thiazolyl blue (MTT) tests. The effects of ZnPc concentration, laser power density, exposure time, oxygen content and tissue thickness on the proliferation were investigated. Then the production of singlet oxygen during ZnPc-PDT was determined by the DPBF probe and DCFH-DA reactive oxygen species assay kit. The cell morphology and the proportion of cell death were observed by an inverted microscope. The results show that U87 MG cell viability changes different parameters setting after ZnPc-PDT, and we can get a good ZnPc-PDT effect by adjusting the parameters.

Key words medical optics; photodynamic therapy; ZnPc; photosensitizer; dose-effect relationship; singlet oxygen

OCIS codes 170.1420; 170.1530; 170.1790; 170.5180

1 引言

光动力学疗法(PDT)是一种利用特定波长的激光照射光敏药物,使其与周围的氧分子发生光化学反应,产生单线态氧或氧自由基,从而引起靶组织和靶细胞损伤的一种治疗方法^[1]。PDT 的抗肿瘤作用机制主要包括三个方面^[2]:1) 直接细胞杀伤。产生单线态氧或氧自由基,导致细胞膜或蛋白质、核酸和脂类大分子的氧化损伤,直接杀伤肿瘤细胞^[3];2) 脉管损伤。破坏肿瘤的血供导致肿瘤缺血缺氧,延缓肿瘤的生长;3) 免疫应答机制。激活机体的抗肿瘤免疫反应,增加炎症及免疫介质的释放,损伤肿瘤组织^[4]。

PDT 作用效果与所用光敏剂类型、照射条件、组织氧代谢状态和细胞类型有关^[5]。选择人脑胶质瘤细

收稿日期: 2016-11-10; 收到修改稿日期: 2016-12-07

基金项目: 国家自然科学基金(61335007)

作者简介: 杨曼(1992—),女,硕士研究生,主要从事上转换纳米材料和光动力治疗方面的研究。

E-mail: 13236568626@163.com

导师简介: 顾月清(1963—),女,博士,教授,主要从事纳米材料方面的研究。E-mail: cpuyueqing@163.com(通信联系人)

胞株 U87 MG 为研究对象,探讨光敏剂锌酞菁(ZnPc)的抗肿瘤作用。ZnPc 属于第二代光敏剂,拥有稳定的理化性质,在 650~700 nm 波段有较强的吸收峰,体内动力学作用较快,24 h 即可从体内代谢清除^[6]。ZnPc 接受 650~700 nm 波段的光照后,从基态被激发为激发单重态并在很短时间内通过非辐射衰变或发出荧光回到基态,或者通过系间跨越形成存在时间较长的激发三重态并将能量传递给其他分子而产生单线态氧,从而发挥 PDT 作用^[7]。

ZnPc 介导的 PDT(ZnPc-PDT)的治疗效果与 ZnPc 的浓度、光照时间、激光功率和体系内氧含量有关^[8]。由于人体肿瘤部位与外部激光光源之间存在组织间隔,如皮肤、肌肉、脂肪、血管、血液和组织液等,激光经过这些组织屏障后会出现不同程度的削弱^[9]。选择新鲜猪肉(肌肉组织)模拟组织屏障^[10],探讨了不同厚度的猪肌肉组织屏障对 ZnPc-PDT 效果的影响。为解决激光穿透力问题,本课题组构建了多种上载了 ZnPc 的上转换纳米载药系统^[11-12],利用组织穿透力较好的 980 nm 激光激发上转换纳米粒子,上转换纳米粒子受激发后产生 640~680 nm 波段的荧光激发 ZnPc,以此增强 PDT 效果。ZnPc 等光敏剂被大量用于载药系统的构建,它们多用于抗肿瘤研究,然而 ZnPc 自身抗肿瘤效果的量效关系却没有被充分研究。本文探讨了不同氧含量和不同厚度的组织屏障对于体外 ZnPc-PDT 效果的影响,并采用正交实验多参量地研究了 ZnPc-PDT 对 U87 MG 细胞体外抗肿瘤效果的量效关系,为上转换纳米载药系统的应用提供参考。

2 材料和方法

2.1 材料与仪器

ZnPc(百灵威科技公司);杜尔伯科改良伊格尔培养基(DMEM)不完全高糖培养液、锥虫蓝染色试剂盒、噻唑蓝(MTT)、即用型 2',7'-二氯二氢荧光素双乙酸酯(Hoechst 33342)染色液(凯基生物公司);2',7'-二氯二氢荧光素双乙酸酯(DCFH-DA)活性氧检测试剂盒(翊圣生物公司);胎牛血清(天杭科技公司);二甲基亚砜(DMSO);1,3-二苯基苯并咪唑(DPBF, AlfaAesar 公司);医用氧气(南京宁卫医用氧气有限公司)。660 nm 光纤耦合激光系统(长春新产业光电技术有限公司);Lambda35 型紫外可见分光光度计(Perkin Elmer 公司);倒置荧光显微镜(Axio Observer A1 公司);酶标仪(Bio-Rad 公司);氧含量传感器(Ocean Optics 公司);循环水式真空泵(予华仪器公司);激光共聚焦荧光显微镜(Olympus 公司)。

2.2 方法

2.2.1 细胞培养

人脑胶质瘤细胞株 U87 MG 用含 10%(质量分数)灭活胎牛血清的 DMEM 不完全高糖培养液在 CO₂ 体积分数为 5%、饱和湿度、37 °C 的培养箱中传代培养。

2.2.2 ZnPc 的细胞定位

在避光条件下,10 μmol/L 的 ZnPc 与 U87 MG 细胞共孵育 4 h,之后与 Hoechst 33342 染色液共孵育 30 min,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗去多余染料,用激光共聚焦荧光显微镜观察两种染料的细胞定位。

2.2.3 不同剂量下 ZnPc 对 U87 MG 细胞的 PDT 杀伤力

1) 660 nm 激光的细胞杀伤力检测

细胞过夜贴壁后,于暗室中用 660 nm 的激光均匀照射细胞 5 min,激光功率密度分别为 0,5,10,15,20,40 mW/cm²。避光培养 24 h,用 MTT 法检测细胞存活率。

2) ZnPc-PDT 量效关系的初步探究

设两组实验,第 1 组的激光功率密度为 10 mW/cm²,第 2 组的激光功率密度为 20 mW/cm²,其他实验参数相同。具体实验设定如下:待细胞过夜贴壁后,分别加入含有 0,5,10,15,20,25 μmol/L ZnPc 的新鲜细胞培养液,每个浓度设 6 组。孵育 4 h 后,加入新鲜细胞培养液,每个浓度小组分别接受 0,1,2,3,4,5 min 的 660 nm 激光照射。避光培养 24 h,用 MTT 法检测细胞存活率。

2.2.4 不同厚度组织屏障下的 ZnPc-PDT 效果

1) 激光功率密度与 PDT 效果关系实验

设 6 组实验,待细胞过夜贴壁后,加入含有 18 μmol/L ZnPc 的细胞培养液,避光孵育 4 h 后更换新鲜培养液,并于暗室中用 660 nm 激光均匀照射 180 s,6 组激光功率密度分别为 0,5,10,15,20,40 mW/cm²,避

光培养 24 h,用 MTT 法检测细胞存活率。设 4 个条件小组:第 1 组直接光照,第 2 组、第 3 组和第 4 组分别在 96 孔板上方放置一块无皮新鲜猪肌肉组织(厚度分别为 0.8,1.5,2 cm)。

2) ZnPc 浓度与 PDT 效果关系实验

设 6 组实验,待细胞过夜贴壁后,加入含有 ZnPc 的细胞培养液,6 组 ZnPc 浓度分别为 0,1.5,4.5,9,13.5,18 $\mu\text{mol/L}$,避光孵育 4 h 后更换新鲜培养液,并于暗室中用 660 nm 激光均匀照射 180 s,激光功率密度为 20 mW/cm^2 ,避光培养 24 h,用 MTT 法检测细胞存活率。设 4 个条件小组:第 1 组直接光照,第 2~4 组分别在 96 孔板上方放置一块无皮新鲜猪肌肉组织(厚度分别为 0.8,1.5,2.0 cm)。

2.2.5 不同溶解氧含量下的 ZnPc-PDT 效果

在 25 $^{\circ}\text{C}$,101.325 kPa 下用氧含量传感器测量溶解氧含量,经仪器测得细胞培养液中溶解氧含量为 8.3 mg/L 。向培养液中通医用氧气(纯氧),使培养液中的溶解氧含量到达饱和状态,经测量得此时的溶解氧含量为 40.5 mg/L 。经计算得,未通氧培养液的溶解氧含量占饱和溶解氧含量的 20%。向细胞培养液中通医用氧气,使培养液溶解氧含量分别维持在 8.3,20.3,32.4,40.5 mg/L ,用溶液中溶解氧含量占饱和溶解氧含量的百分比分别计为 20%,50%,80%,100%,建立不同溶解氧含量体系^[13]。

1) 光照时间与 PDT 效果关系实验

设 7 组实验,待细胞过夜贴壁后,加入含有 18 $\mu\text{mol/L}$ ZnPc 的细胞培养液,避光孵育 4 h 后更换新鲜培养液,并于暗室中用 660 nm 激光均匀照射,激光功率密度为 20 mW/cm^2 ,7 组光照时间分别为 0,18,36,72,108,144,180 s,避光培养 24 h,用 MTT 法检测细胞存活率。设 4 个条件小组:第 1~4 组的体系氧含量分别为 20%,50%,80%,100%。

2) 不同厚度组织屏障下溶解氧含量与 PDT 效果关系实验

设 4 组实验,待细胞过夜贴壁后,加入含有 4.5 $\mu\text{mol/L}$ ZnPc 的细胞培养液,避光孵育 4 h 后分别更换氧含量不同的新鲜培养液,4 组氧含量分别为 20%,50%,80%,100%。于暗室中用 660 nm 激光均匀照射 180 s,激光功率密度为 20 mW/cm^2 ,避光培养 24 h,用 MTT 法检测细胞存活率。设 4 个条件小组:第 1 组直接光照,第 2~4 组分别在 96 孔板上方放置一块无皮新鲜猪肌肉组织(厚度分别为 0.8,1.5,2.0 cm)。

2.2.6 细胞存活率检测

采用 MTT 法检测细胞存活率。将 PDT 处理后的细胞避光培养 24 h 后,每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL)溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱避光孵育 4 h 后,吸除培养液,每孔加入 150 μL DMSO,避光摇匀,待蓝紫色结晶充分溶解后,用酶标仪测量 490 nm 处实验组和对照组的光密度值 $D_{\text{experiment}}$ 和 D_{control} 。按公式计算细胞存活率为 $S = D_{\text{experiment}} / D_{\text{control}} \times 100\%$ 。

2.3 溶液中活性氧产率的测定

取 6 孔板,每孔加入 2.8 mL 细胞培养液和 200 μL 2 mmol/L 的 DPBF 乙醇溶液,分别加入 ZnPc,使其终浓度为 0,1.5,4.5,9.0,13.5,18.0 $\mu\text{mol/L}$ 。每个浓度组共设 5 组实验:第 1 组在真空条件下进行光照(水泵抽真空),第 2 组直接光照,第 3~4 组分别在板上方放置一块无皮新鲜猪肌肉组织(厚度分别为 0.8 cm 和 1.5 cm)再进行光照。第 5 组的细胞培养液中通医用氧气使氧含量维持在 80%再进行光照。于暗室中用 20 mW/cm^2 的 660 nm 激光均匀照射 6 孔板 180 s,然后用紫外分光光度计测量溶液在 415 nm 处的光密度值。

2.4 细胞内活性氧产量的检测

将细胞接种到共聚焦皿中,细胞贴壁后加入 ZnPc(0,5,10,20 $\mu\text{mol/L}$),4 h 后吸除培养液加入含 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 的无血清培养液,孵育 30 min,用 PBS 清洗 3 次,并用 20 mW/cm^2 的 660 nm 激光照射 2 min,用激光共聚焦荧光显微镜采集 DCF 和 ZnPc 的荧光信号。

2.5 倒置荧光显微镜观察细胞

将细胞接种到 6 孔板中,细胞贴壁后加入 ZnPc(0,1.5,4.5,9.0,13.5,18.0 $\mu\text{mol/L}$),4 h 后更换新鲜培养液,并于暗室中用 660 nm 激光均匀照射 180 s,激光功率密度为 20 mW/cm^2 ,避光培养 24 h。

倒置显微镜观察细胞形态:用倒置荧光显微镜明场采图,放大倍数为 400 倍,观察不同光敏剂浓度条件下经 PDT 处理后的细胞形态。

锥虫蓝染色法观察死活细胞比例:用胰酶消化细胞,后加入锥虫蓝染色液,用倒置荧光显微镜明场观察死细胞数量与比例,显微镜放大倍数为 400。

2.6 统计学方法

应用 GraphPad Prism 6 统计软件处理分析数据,各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, \bar{x} 表示平均值, s 表示标准差,采用 t 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 ZnPc 的细胞定位

ZnPc 和 Hoechst 33342 的荧光分别为红色和蓝色,图 1(a)和图 1(b)分别为 ZnPc 和 Hoechst 33342 的荧光图,图 1(c)为两图的融合图,其中两种颜色没有重合;图 1(d)为 U87 MG 细胞的 Z 轴扫描图,可观察到不同焦平面的细胞图中两种颜色均无重合现象,图 1(e)为 U87 MG 细胞的三维立体图。以上结果表明光敏剂 ZnPc 主要定位在细胞质中,不进入细胞核。

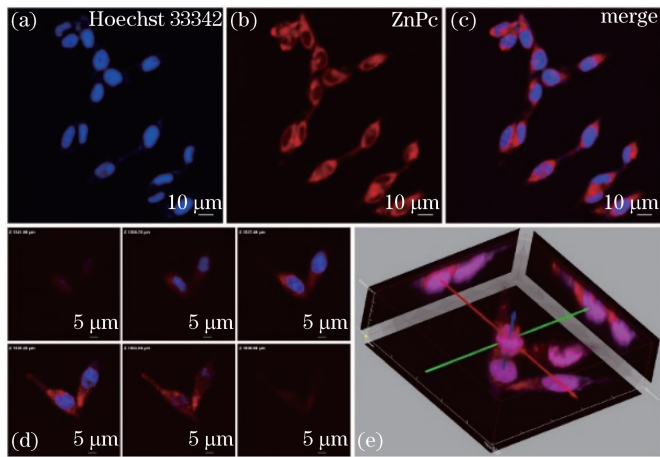


图 1 ZnPc 在 U87 MG 细胞中的定位。(a)核染料 Hoechst 33342 荧光;(b) ZnPc 荧光;
(c) Hoechst 33342 和 ZnPc 荧光融合图;(d)不同焦平面的荧光融合图;(e)三维立体图

Fig. 1 Localization of ZnPc in U87 MG cells. (a) Fluorescence of Hoechst 33342; (b) fluorescence of ZnPc;
(c) fluorescence Hoechst 33342+ZnPc; (d) fluorescence of different focal planes; (e) 3D plot

3.2 660 nm 激光的细胞杀伤力

如图 2 所示,不同光功率密度组与对照组相比,细胞存活率差异均无显著差异($P > 0.05$)。即使光功率密度高达 40 mW/cm^2 ,U87 MG 细胞存活率依然为 92%。结果表明, $0 \sim 40 \text{ mW/cm}^2$ 的 660 nm 激光照射 U87 MG 细胞 5 min,无明显细胞杀伤力,可排除后续实验中 660 nm 激光对细胞存活率的影响。

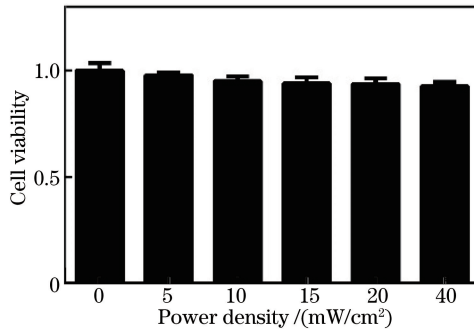


图 2 660 nm 激光对 U87 MG 细胞存活率的影响

Fig. 2 Effects of 660 nm laser on viability of U87 MG cells

3.3 ZnPc-PDT 体外杀伤 U87 MG 细胞的量效关系

图 3 考察了在 10 mW/cm^2 的光功率密度下,ZnPc 浓度和光照时间对于 ZnPc-PDT 杀伤 U87 MG 细胞的影

响。由图可知,当光照时间为 0 min 时,不同 ZnPc 浓度组和对照组相比,细胞存活率均无显著差异($P>0.05$),表明 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度以内的 ZnPc 对 U87 MG 细胞无暗毒性。图 3 结果表明,在相同 ZnPc 浓度下,随着光照时间的增加,细胞存活率逐渐下降;而在相同光照时间下,随着 ZnPc 浓度的增加,细胞存活率也逐渐下降。当 ZnPc 为 25 $\mu\text{mol/L}$,光照时间为 5 min 时,细胞存活率最低,仅为 19%。图 4 的光功率密度为 20 mW/cm^2 ,其他实验设定同图 3。图 4 所呈现的实验结果趋势与图 3 类似,只是在相同光照时间和 ZnPc 浓度下,图 4 的细胞存活率均不同程度地低于图 3,当 ZnPc 为 25 $\mu\text{mol/L}$,光照时间为 3 min 时,图 4 的细胞存活率仅为 15%,而图 3 的高达 56%。

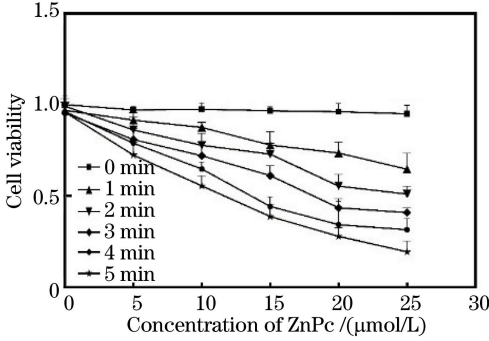


图 3 10 mW/cm^2 下 ZnPc-PDT 对 U87 MG 细胞存活率的影响

Fig. 3 Effect of ZnPc-PDT on viability of U87 MG cells at 10 mW/cm^2

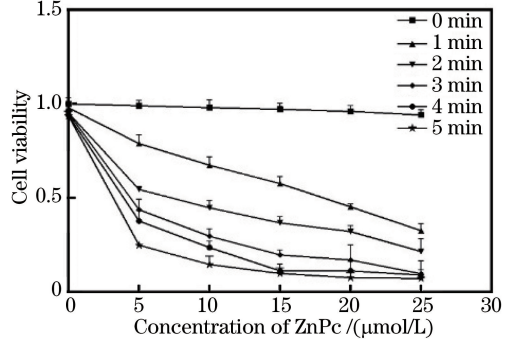


图 4 20 mW/cm^2 下 ZnPc-PDT 对 U87 MG 细胞存活率的影响

Fig. 4 Effect of ZnPc-PDT on viability of U87 MG cells at 20 mW/cm^2

图 5 考察了在不同厚度猪肌肉组织屏障下激光功率密度对 ZnPc-PDT 细胞杀伤作用的影响。由图 5 可得,在无猪肌肉组织遮挡时,随着激光功率密度的增加,细胞存活率逐渐减小,且相邻两组的细胞存活率差异均存在统计学意义($P<0.05$),当激光功率密度为 15 mW/cm^2 时,细胞存活率仅为 17%。但随着猪肌肉组织厚度的增加,同一功率密度下的细胞存活率逐渐上升;在 0.8 cm 的猪肉组织的遮挡下,ZnPc-PDT 依然发挥着一定效果的细胞杀伤力,相邻组间的细胞存活率间差异依然具有统计学意义($P<0.05$);而在 1.5 cm 和 2 cm 的猪肉组织的阻挡下,ZnPc-PDT 细胞杀伤力被进一步削弱,相邻组间的细胞存活率差异均不具有统计学意义($P>0.05$)。其中 10, 15, 20, 40 mW/cm^2 组中不同厚度组织屏障间的细胞存活率差异均具有统计学意义($P<0.05$),表明不同厚度猪肉组织的遮挡对 ZnPc-PDT 的细胞杀伤力有削弱作用。图 6 考察了在不同厚度组织屏障下 ZnPc 浓度对 ZnPc-PDT 细胞杀伤作用的影响,实验结果类似图 5。在无猪肉组织屏障时,ZnPc-PDT 表现出较好的细胞杀伤作用,13.5 $\mu\text{mol/L}$ 以内的相邻浓度组间的细胞存活率差异均具有统计学意义($P<0.05$),而 13.5 $\mu\text{mol/L}$ 组和 18 $\mu\text{mol/L}$ 组间差异不具有统计学意义($P>0.05$);而当存在猪肌肉组织屏障时,ZnPc-PDT 的细胞杀伤力被削弱,猪肉组织越厚,杀伤力越低;0.8 cm 组织屏障组的相邻组间细胞存活率差异均具有统计学意义($P<0.05$),而在 1.5 cm 和 2 cm 的组织屏障下相邻组间的细胞存活率差异均不具有统计学意义($P>0.05$)。

图 7 考察了在不同氧含量下光照时间对 ZnPc-PDT 细胞杀伤作用的影响。在氧含量为 20% 时,随着光照时间的增加,细胞存活率逐渐下降,0, 18, 36, 72, 108 s 组的相邻组间细胞存活率差异均具有统计学意义($P<0.05$),而 108, 144, 180 s 相邻组间的细胞存活率差异不具有统计学意义($P>0.05$)。而当细胞培养液中氧含量增加时,每个时间组的细胞存活率均随之下降。72 s 组随着氧含量的增加可观察到明显的细胞存活率下降趋势,其中 20%, 50% 和 80% 组的相邻组间细胞存活率差异具有统计学意义($P<0.05$),80% 和 100% 组的细胞存活率差异不存在统计学意义($P>0.05$)。图 8 为不同厚度组织屏障下,不同氧含量对细胞存活率的影响。由图可知,在无组织遮挡下,当 20% 组的 ZnPc 浓度为 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,用 20 mW/cm^2 的 660 nm 激光照射细胞 180 s,细胞存活率为 51%;50%、80% 和 100% 组的细胞存活率与 20% 组的细胞存活率差异均有统计学意义($P<0.05$),当体系氧含量达到 100% 时,细胞存活率仅为 16.5%。而当有猪肌肉组织遮挡时,每组的细胞存活率均高于 85%,随着溶解氧含量的增加,细胞存活率并没有表现出明显的下降趋势($P>0.05$)。

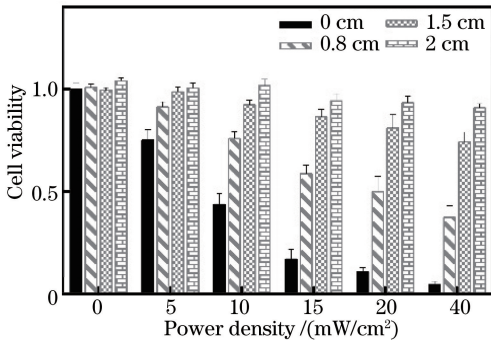


图 5 不同组织厚度屏障和光功率密度下 ZnPc-PDT 对 U87 MG 细胞存活率的影响

Fig. 5 Effect of ZnPc-PDT on viability of U87 MG cells at different power densities and pork tissue thicknesses

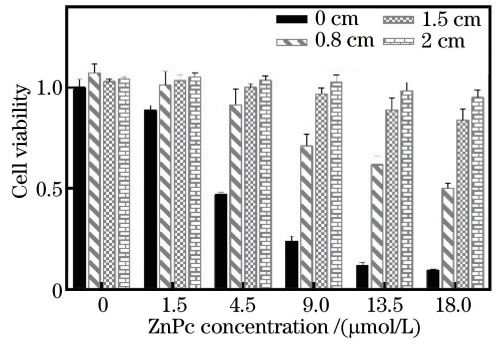


图 6 不同组织厚度屏障和 ZnPc 浓度下 ZnPc-PDT 对 U87 MG 细胞存活率的影响

Fig. 6 Effects of ZnPc-PDT on viability of U87 MG cells at different concentrations and pork tissue thicknesses

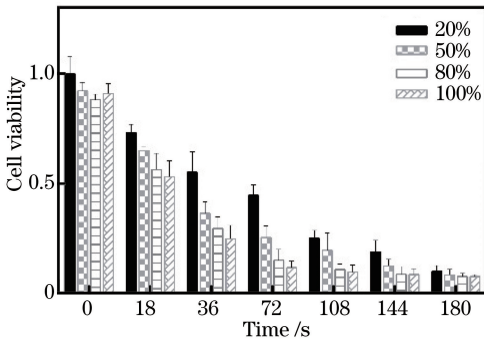


图 7 不同氧含量和光照时间下 ZnPc-PDT 对 U87 MG 细胞存活率的影响

Fig. 7 Effect of ZnPc-PDT on viability of U87 MG cells at different irradiation time and oxygen contents

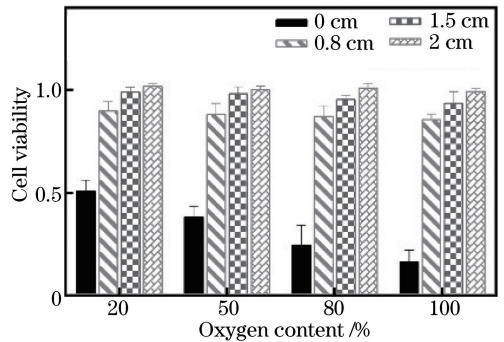


图 8 不同组织厚度屏障和氧含量下 ZnPc-PDT 对 U87 MG 细胞存活率的影响

Fig. 8 Effect of ZnPc-PDT on viability of U87 MG cells at different oxygen contents and pork tissue thicknesses

3.4 活性氧验证

DPBF 是一种常用的检测溶液中单线态氧产率的高效化学探针,能够快速与单线态氧发生反应,破坏原本的共轭结构并生成无色产物,其降解速率与单线态氧的生成速率成正比^[14]。图 9 为 DPBF 于乙醇中的紫外吸收光谱,可看出 400~420 nm 为 DPBF 的最大吸收峰位。DPBF 在 400~420 nm 处的最大光密度与单线态氧产率成反比,可以通过检测 DPBF 光密度的变化来定量分析溶液体系中单线态氧的产率。如图 10 所示,真空组的溶液在 415 nm 处的光密度几乎没有变化,表明没有单线态氧产生;无组织屏障组的溶液 415 nm 处光密度随着 ZnPc 浓度的增加呈现明显的下降趋势;而通氧组随着 ZnPc 浓度的增加,溶液 415 nm 处光密度表现为更加明显的下降趋势,尤其在 ZnPc 浓度为 13.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 18 $\mu\text{mol/L}$ 时与无组织屏障组的差距较大,表明充足的氧气使体系产生了更多的单线态氧;而对于 0.8 cm 组织屏障组,溶液 415 nm 处光密度值只表现出较小的下降趋势,1.5 cm 组织屏障组的 415 nm 处光密度值随着 ZnPc 浓度的增加下降幅度更小,说明相同条件下组织屏障的遮挡严重影响了溶液体系中单线态氧的生成。

DCFH-DA 是一种常用的检测单线态氧的荧光染料,根据其荧光强度的变化,可定量检测细胞内单线态氧水平。DCFH-DA 本身没有荧光,可自由穿过细胞膜。进入细胞后,可以被细胞内的酯酶水解成不能通透细胞膜的 2',7'-二氯二氢荧光素(DCFH)。DCFH 经细胞内的单线态氧的氧化作用会生成有绿色荧光的 2',7'-二氯荧光素(DCF),DCF 荧光强度与细胞内单线态氧的水平成正比^[15]。如图 11 所示,对照组细胞内没有 DCF 的绿色荧光信号和 ZnPc 的红色荧光信号;5 $\mu\text{mol/L}$ ZnPc 组细胞呈现微弱的绿色荧光和红色荧光;10 $\mu\text{mol/L}$ ZnPc 组细胞的绿色荧光和红色荧光较 5 $\mu\text{mol/L}$ ZnPc 组有明显的增强,而 20 $\mu\text{mol/L}$ ZnPc 组细胞的绿色荧光和红色荧光强度最大。表明随着加入 ZnPc 浓度的增加,细胞摄取 ZnPc 的量逐步增多,经照射后产生的单线态氧也逐步增多。

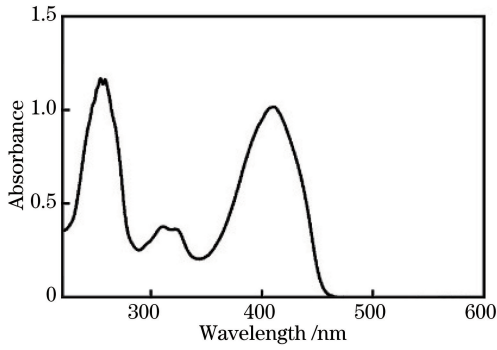


图 9 DPBF 乙醇溶液的紫外吸收光谱
Fig. 9 UV spectrum of DPBF in ethanol

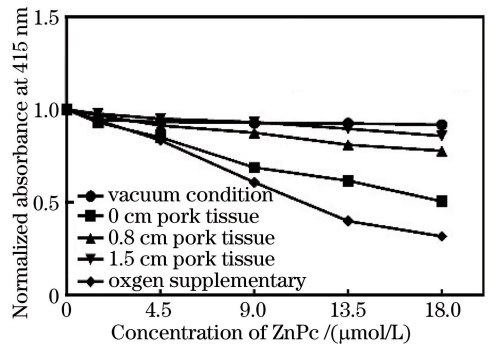


图 10 DPBF 指示的 ZnPc-PDT 水溶液中的单线态氧产生量
Fig. 10 Production of singlet oxygen from ZnPc-PDT in the presence of DPBF

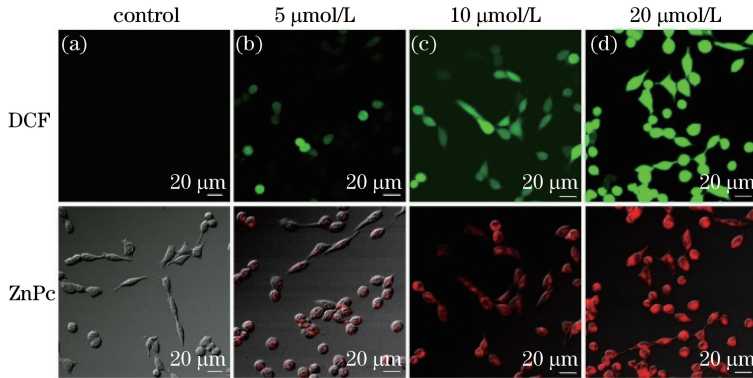


图 11 ZnPc-PDT 治疗后在 U87 MG 细胞中被 DCFH-DA 染色的单线态氧的产生量
Fig. 11 Detection of singlet oxygen by DCFH-DA staining in U87 MG cells after ZnPc-PDT

3.5 ZnPc-PDT 治疗后的细胞形态和死亡细胞比例

图 12 为无组织屏障时,经不同浓度的 ZnPc 所介导的 PDT 治疗后的细胞形态图。由图所示,无 ZnPc 孵育的 U87 MG 细胞密度高达 95%,细胞呈长梭形,细胞膜完整,细胞透亮。而随着 ZnPc 浓度的增加,细胞密度逐渐变小,细胞形态也发生了改变。1.5 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞明显变稀疏,细胞密度约为 60%,部分细胞形态变圆,但并未观察到死亡细胞。4.5 $\mu\text{mol/L}$ 组的 U87 MG 细胞形态几乎全部变圆,细胞密度约为 40%,并可观察到少数细胞膜的破裂以及少量细胞碎片。9 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞密度约为 20%,只有少部分维持圆形,大部分呈细胞膜破碎现象,而 13 $\mu\text{mol/L}$ 和 18 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞密度约为 10%,所有细胞均出现细胞膜破碎现象,细胞皱缩变小,细胞呈现死亡状态。

图 13 为无组织屏障时,经不同浓度 ZnPc 所介导的 PDT 治疗后的死亡细胞比例图。由图可知,

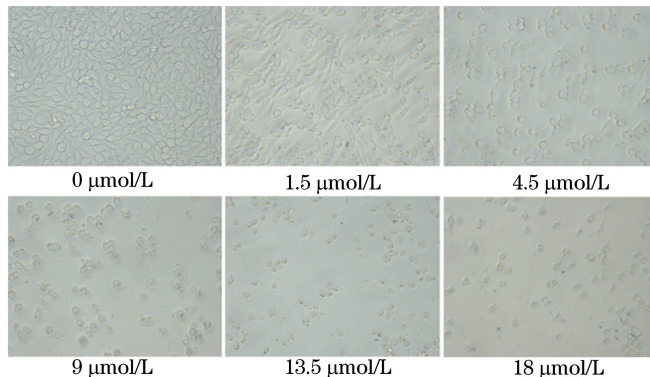


图 12 ZnPc-PDT 治疗后的 U87 MG 细胞形态
Fig. 12 Morphology of U87 MG cells after ZnPc-PDT

0 $\mu\text{mol/L}$ ZnPc 组的 U87 MG 细胞经锥虫蓝染色后,细胞密度较高,细胞呈无色透亮圆形分布,并未出现蓝色细胞,说明并无细胞死亡。而随着 ZnPc 浓度的逐渐增加,细胞逐渐变稀疏,未着色细胞数量渐少,着色细胞渐多;ZnPc 浓度为 9 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞死亡率已高达 80%,而细胞密度仅为 0 $\mu\text{mol/L}$ 组的一半;ZnPc 浓度为 13 $\mu\text{mol/L}$ 和 18 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞基本已全部着色,细胞密度仅为 10%,细胞出现不规则形状,表明此时细胞已全部死亡。

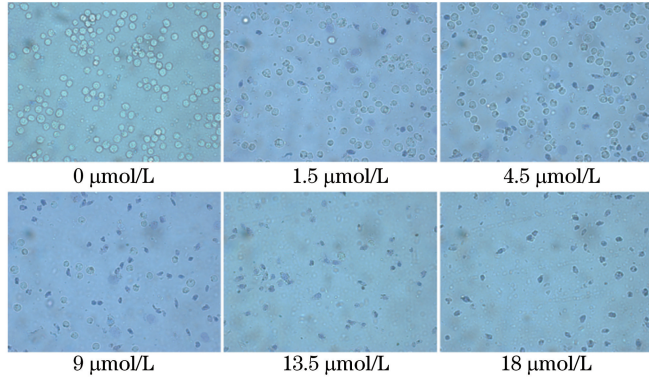


图 13 ZnPc-PDT 治疗后的 U87 MG 细胞死亡细胞比例图

Fig. 13 Proportion of dead U87 MG cells after ZnPc-PDT

4 分析与讨论

单线态氧在水溶液中的存在时间不超过 4 μs ,扩散范围约为 125 nm,是第二代光敏剂 ZnPc 在 PDT 过程中产生的主要细胞毒性物质。在生理环境下,单线态氧可能与其扩散范围内的任何生物分子发生反应,导致其存在时间的缩减和扩散距离的减小。因此,单线态氧在细胞中的存在时间一般仅为 10~40 ns,作用半径也小于 20 nm^[16]。这意味着 ZnPc-PDT 造成的损伤范围极小,一般仅发生在光敏剂分子聚集的亚细胞结构中。亲脂性光敏剂易结合于细胞的内质网、高尔基体、溶酶体和线粒体等多种膜性结构中,此类光敏剂的荧光一般均匀地分布在核外胞质中。ZnPc 属于亲脂性光敏剂,图 1 结果显示 ZnPc 均匀地分布在细胞质中,并不进入细胞核,可推断出其主要定位在线粒体和内质网等膜结构中,经 PDT 作用后,可能引起线粒体和内质网以及一些大分子物质的损伤,从而导致细胞的凋亡或坏死^[17]。

过大的激光功率、光照时间和 ZnPc 浓度都会对细胞产生伤害,首先研究了对细胞不产生伤害作用的光剂量和 ZnPc 剂量。图 2 结果表明本次研究中所使用的激光能量对 U87 MG 细胞均不产生伤害作用,图 3 中 0 min 组的实验结果表明,本次研究中所使用的 ZnPc 浓度对 U87 MG 细胞无暗毒性。图 3 和图 4 的实验结果是对于 ZnPc-PDT 对 U87 MG 细胞的体外杀伤效果的初步探索,图中结果表明,在光照时间、激光功率密度和 ZnPc 浓度这三个参量中控制任何两个参量值,增加第三个参量值都可以达到较好的细胞杀伤效果。在 ZnPc 介导的 PDT 中,可根据具体情况设置参数,如果细胞或组织对于激光强度较敏感,则可通过降低激光功率、增加光照时间的方法以达到较好的杀伤效果;如果治疗部位 ZnPc 积聚较少则可通过调节激光功率、增加光照时间的方法以达到较好的杀伤效果。

PDT 治疗深层肿瘤组织的主要障碍是光敏剂的激发光无法有效穿透组织屏障到达治疗部位,因此激发光的组织穿透力是影响 PDT 效果的一大重要因素。波长范围 600~1200 nm 通常被称为人体组织光学窗口,这一波段的光线拥有较强的组织穿透力,而且随着波长的增加,光线的组织穿透力也逐渐增加^[18]。ZnPc 的激发波长 660 nm 位于人体组织光学窗口内,拥有较强的组织穿透力,实验采用厚度分别为 0, 0.8, 1.5, 2 cm 的猪肌肉组织研究组织屏障对 ZnPc-PDT 效果的影响。图 5 和图 6 的结果显示,在没有组织屏障时,ZnPc-PDT 发挥着有效的细胞杀伤效果,但随着组织厚度的增加,细胞存活率也逐渐增加,导致 PDT 作用不能有效发挥。虽然 660 nm 激光的组织穿透力有限,但适当增加激光功率,依然可以达到较好的细胞杀伤效果。图 5 中 40 mW/cm² 组相较于其他功率组拥有更低的细胞存活率,另外在此条件下适当增加光照时间也可以达到较好的治疗效果。因此,在治疗深层肿瘤时,可通过适当提高激光功率和光照时间的方法增加

PDT 作用,以此破坏肿瘤组织达到治疗效果。

图 7 是在控制 ZnPc 浓度和激光功率密度的条件下光照时间和体系氧含量对细胞存活率影响的正交实验结果。在体系氧含量为 20% 时,36 s 组的细胞存活率已低至 55%,说明在 ZnPc 浓度较高、激光功率密度较高的条件下,短时间光照可使 ZnPc 迅速产生大量的单线态氧发挥细胞杀伤作用。但在光敏剂浓度和光功率密度均较高的情况下,体系氧含量将被 PDT 作用快速消耗,导致氧含量不足引起的 PDT 效果的削弱。在此情况下,如果及时向体系中补充氧气可增强 PDT 的作用效果。如图 7 的 72 s 组,可观察到在补充氧气后,细胞存活率出现明显的趋势下降,当体系氧含量维持 80% 时,细胞存活率低至 15%。针对 PDT 治疗中的氧耗竭问题,间断性 PDT、节律性 PDT、高压氧呼吸、常压氧呼吸等 PDT 治疗模式被相继提出,但是,这些 PDT 治疗模式对于不同类型光敏剂和病灶组织的有效性及其临床效果都有待于进一步研究^[19]。

图 8 的结果显示,虽然增加体系氧含量可提高 ZnPc-PDT 的细胞杀伤力,但当存在组织屏障时,增加体系氧含量对 ZnPc-PDT 的细胞杀伤力已经没有明显贡献。虽然无组织屏障、100% 氧含量组的细胞存活率低达 16%,但有组织屏障的 100% 氧含量组的细胞存活率均高于 85%。原因在于较低的 ZnPc 浓度和较低的光功率密度下,体系溶解氧消耗量小,多余的氧气并不被消耗,外加的氧气没有明显的 PDT 增强效果。

5 结 论

研究了光敏剂 ZnPc 的体外抗肿瘤量效关系,为其他光敏剂的体外抗肿瘤量效关系研究提供了参考。考察了 ZnPc 光动力治疗的体外抗肿瘤量效关系,发现通过增加光敏剂浓度、光照时间、光功率密度、体系氧含量可以增加 PDT 的治疗效果,而组织屏障厚度的增加可削弱 ZnPc-PDT 的细胞杀伤效果。利用 ZnPc 构建了多种载药系统,ZnPc 体外抗肿瘤量效关系的测量为这些载药系统的参数设置和治疗效果提供了参考。目前由 808 nm 激光激发的上转换纳米载药系统和包含 ZnPc 在内的双光敏剂上转换纳米载药系统正在研究中^[20],更多结果将在以后报道。

参 考 文 献

- [1] Zhen Jie, Wang Ying, Wang Chengming, *et al.* Research on the structure and optical parameter changes of port wine stain after photodynamic therapy based on optical coherence tomography[J]. Chinese J Lasers, 2015, 42(6): 0604001. 甄洁, 王颖, 王成铭, 等. 应用光学相干层析术研究光动力治疗鲜红斑痣前后皮肤结构和光学参数的变化[J]. 中国激光, 2015, 42(6): 0604001.
- [2] Chen Yong, Li Wanwan, Zhou Jiangjiao, *et al.* Molecular mechanism of photodynamic therapy[J]. Journal of Central South University (Medical Science), 2014, 39(1): 102-108. 陈勇, 李婉婉, 周江蛟, 等. 光动力疗法分子机制研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2014, 39(1): 102-108.
- [3] Moor A C E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy[J]. Journal of Photochemistry & Photobiology B, 2000, 57(1): 1-13.
- [4] Wachowska M, Muchowicz A, Demkow U. Immunological aspects of antitumor photodynamic therapy outcome[J]. Central-European Journal of Immunology, 2016, 40(4): 481-485.
- [5] Taub A F, Schieber A C. New methods for the clinical enhancement of photodynamic therapy[J]. Journal of Drugs Dermatology, 2015, 14(11): 1329-1334.
- [6] Ding L L, Luan L Q, Shi J W, *et al.* Phthalocyanine based photosensitizers for photodynamic therapy[J]. Chinese Journal of Inorganic Chemistry, 2013, 29(8): 1591-1598.
- [7] Conte C, Ungaro F, Mazzaglia A, *et al.* Photodynamic therapy for cancer: principles, clinical applications, and nanotechnological approaches[M]// Alonso M J, Garcia-Fuentes M. Nano-Oncologicals. Cham: Springer International Publishing, 2014: 123-160.
- [8] Li Weina, Yang Jiqing, Liu Yuansheng, *et al.* The study of comparing the efficiency of ZnPC-PDT and HPD-PDT in killing LLC lung cancer[J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2012, 29(2): 3289-3292. 李维娜, 杨继庆, 刘渊声, 等. ZnPc 和 HPD 介导的 PDT 对肺癌细胞杀伤效果的对比研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2012, 29(2): 3289-3292.
- [9] Hudson D E, Hudson D O, Wininger J M, *et al.* Penetration of laser light at 808 and 980 nm in bovine tissue samples[J]. Photomedicine & Laser Surgery, 2013, 31(4): 163-168.

- [10] Punjabi A, Wu X, Tokatli-Apollon A, *et al.* Amplifying the red-emission of upconverting nanoparticles for biocompatible clinically used prodrug-induced photodynamic therapy[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(10): 10621-10630.
- [11] Cui S S, Chen H Y, Zhu H Y, *et al.* Amphiphilic chitosan modified upconversion nanoparticles for *in vivo* photodynamic therapy induced by near-infrared light[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2012, 22(11): 4861-4873.
- [12] Cui S S, Yin D Y, Chen Y Q, *et al.* *In vivo* targeted deep-tissue photodynamic therapy based on near-infrared light triggered upconversion nanoconstruct[J]. *ACS Nano*, 2012, 7(1): 676-688.
- [13] György P, Williams R J. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(17): 7223-7228.
- [14] Huang Xianwen, Lü Wangyang, Yao Yuyuan, *et al.* Preparation and optical activity of pH-sensitive zinc phthalocyanine polymer[J]. *Journal of Zhejiang Sci-Tech University*, 2010, 27(1): 1-5.
黄显雯, 吕汪洋, 姚玉元, 等. pH 敏感锌酞菁聚合物的制备及光活性[J]. *浙江理工大学学报*, 2010, 27(1): 1-5.
- [15] Wang H J, Liu Z Y, Wang S, *et al.* MC540 and upconverting nanocrystal coloaded polymeric liposome for near-infrared light-triggered photodynamic therapy and cell fluorescent imaging[J]. *ACS Applied Material & Interfaces*, 2014, 6(5): 3219-3225.
- [16] Emens L A. Chemotherapy and tumor immunity: an unexpected collaboration[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2008, 13(1): 249-257.
- [17] Chen Hongli, Yin Huijuan, Xu Zengrui, *et al.* Killing effect of photodynamic therapy induced by PSD 007 on human epidermoid carcinoma *in vitro* [J]. *Chinese J Lasers*, 2013, 40(5): 0504003.
陈洪丽, 阴慧娟, 徐增瑞, 等. PsD007 诱导光动力疗法对人喉癌细胞的杀伤作用[J]. *中国激光*, 2013, 40(5): 0504003.
- [18] Juzeniene A, Nielsen K P, Moan J. Biophysical aspects of photodynamic therapy [J]. *Biophysical Aspects of Photodynamic Therapy*, 2006, 25(1-2): 7-28.
- [19] Framme C, Flucke B, Birngruber R. Comparison of reduced and standard light application in photodynamic therapy of the eye in two rabbit models[J]. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2006, 244(7): 773-781.
- [20] Ye Shuai, Song Jun, Chen Linchun, *et al.* Research on photoluminescence of Nd³⁺ doped NaYF₄: Yb, Er/Tm upconversion nanoparticles[J]. *Acta Optica Sinica*, 2015, 35(8): 0816005.
叶 帅, 宋 军, 陈林春, 等. Nd³⁺ 掺杂的 NaYF₄: Yb, Er/Tm 上转换纳米颗粒的光谱分析[J]. *光学学报*, 2015, 35(8): 0816005.