

监测化学发光评估光敏效应对生物分子的氧化伤害

魏言春 邢 达* 杨利勇 陈 群

(华南师范大学生物光子学研究院激光生命科学研究所暨激光生命科学教育部重点实验室, 广东 广州 510631)

摘要 活性氧对生物活性分子如蛋白质、脂类等具有强烈的氧化作用, 从而对生物细胞产生杀伤作用。光敏反应过程会产生大量的活性氧, 利用光子监测判断光敏反应的氧化伤害程度和光敏作用剂量具有重要意义。实验表明, 体外人血清白蛋白在光敏氧化反应后具有长寿命的化学发光过程, 这种氧化损伤的滞后特性可实现暗背景下的低噪声光子监测; 光敏作用后光子检测证明, 不同的光敏剂都存在生物分子的氧化化学发光(CL)。同时, 肿瘤细胞的光敏作用实验中也观测到较强的化学发光信号, 且信号的积累与光敏作用剂量有相关性。因此检测化学发光的实时信号和积累可以评估光敏作用对生物活性分子和细胞造成的损坏程度, 将有望应用到光动力肿瘤治疗等光敏效应的剂量监测上。

关键词 生物光学; 活性氧; 化学发光; 光子检测; 光敏作用

中图分类号 Q503 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS200929s1.0305

Evaluation of Oxidative Damage to Biologic Molecule by Monitoring Chemiluminescence During the Course of Photosensitization

Wei Yanchun Xing Da Yang Liyong Chen Qun

(MOE Key Laboratory of Laser Life Science & Institute of Laser Life Science, College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China)

Abstract Reactive oxygen species (ROS) can damage molecules such as lipids and proteins, thus cause oxidative damages to cells. During photosensitization process such as photodynamic therapy (PDT), a large amount of ROS is produced. By monitoring the ROS production, it is possible to evaluate the oxidation caused by ROS and the subsequent biological outcome by a PDT treatment. Results indicate that, there is a long-life delayed chemiluminescence (CL) after the human serum oxidized with photosensitization. This property may be used to monitor CL after turning off the excitation light source, thus achieve a high signal/noise ratio in detection. With the delayed CL detection method, CL was evaluated with various photosensitizers. The technique was also tested in vitro, it was found that the CL signal was readily detectable and showed a linear relationship with the dose of PDT treatment. In conclusion, the detection of real-time CL is tested both in solutions doped with various photosensitizers and in vitro and the cumulated CL can be used as a marker for evaluating the damage to biologic molecule and cell. This method can be used on photosensitization such as photodynamic therapy to monitor the dose.

Key words biotechnology; reactive oxygen; chemiluminescence; photon detection; photosensitization

1 引 言

活性氧包括单态氧、超氧阴离子、羟自由基等具有强氧化性的高能分子。活性氧可以氧化多种生物分子, 如蛋白质, DNA, 脂类^[1]等, 破坏分子的结构, 使分子失去生物活性, 丧失生物功能。生物细胞在正常生理条件下会有少量的活性氧产生, 由于生物细胞具有抗氧化自我保护机制, 少量的活性氧不会

造成细胞的伤害^[2]。但是当活性氧产生过多超过细胞本身的保护能力时, 则会造成细胞功能的破坏, 甚至细胞的死亡。

生物体存在生物发光、化学发光、超微弱生物光子三种发光^[3]。实验发现, 生物分子氧化反应过程中常常伴随着光子的产生^[4,5]。生物分子被活性氧氧化后, 会形成激发态的产物, 激发态的分子进而退

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30870676, 30870658)和广东省自然科学基金[7117865]资助课题。

作者简介: 魏言春(1973—), 男, 硕士, 主要从事光动力肿瘤治疗方面的研究。E-mail: weiyanchun@sncu.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: xingda@sncu.edu.cn

激发发出光子,因此此类发光属于化学发光(CL)。研究表明,活性氧和蛋白质,DNA,脂类等反应均会有可见波段的光子产生。这种光子的产生可能是直接的或者是后继的分子自解离形成的激发态产物产生的,波长一般在400~600 nm范围^[6]。一般情况下,由于活性氧的浓度低,氧化反应过程缓慢,因此由此导致的化学发光也很微弱,造成检测的困难。但是对于一些大量产生活性氧的过程,如光动力过程,则会产生高浓度的活性氧,并因此导致一个剧烈的生物分子的氧化过程,形成强烈的化学发光^[7]。光动力肿瘤治疗就是主要利用光敏作用产生大量的活性氧去在位杀伤肿瘤的疗法^[8]。光动力肿瘤治疗过程中首先对患者施用可以特异定位于肿瘤细胞的光敏剂,当肿瘤细胞中的光敏剂达到一定剂量后再施以光照,利用光敏分子将光子的能量直接或间接传递给氧导致活性氧的产生。细胞内产生的大量活性氧可以氧化破坏细胞器、细胞信号传导分子、细胞膜分子等最终使细胞无法自我修复从而启动凋亡或坏死。此时,由于生物分子的氧化反应,大量的氧化产生的光子就会被释放。

相比其他的检测方法,如检测活性氧的产量的方法,由于这种化学发光和生物分子结构的损伤、破坏直接相联系,所以能够更直接地反映生物伤害程度,提高判断剂量的准确性。在光敏反应过程中,通过检测化学发光的产率和产量用于直接判断生物分子的损伤程度和损伤数量,从而判断氧化进程,预测细胞伤害程度,这对于预防氧化伤害和提高活性氧医学的疗效等都具有重要意义。

2 材料与方 法

2.1 试剂和仪器

实验中的光敏剂卟啉 IX (photosensitizer Protoporphyrin IX disodium salt, PPIX)是人工合成物,购自 Aldrich Chem. Co. Milw. W 公司。光敏剂 Npe6 由 C. Julie 博士(Light Science Corporation)赠送。光敏剂 photofrin(Axcan Pharma Ltd, Ireland)是一种被批准用于临床的光敏剂。这三种光敏剂都能被红光激发。

光动力过程光激发由 100 mW,635 nm 半导体激光器及其功率控制器 LDC 2000(ThorLab)和温度控制器 TEC 2000 (Wavelength Electronics)组成。该激光器可以被 TTL 电平调制。光子计数由计数卡 PCL-836 (Advantech Co., Ltd. Taiwan)和数字式光电倍增管 MP952(PerkinElmer, Wiesbaden, Germany)

完成。整个系统用 Labview (LabVIEW version 6.1 National Instruments, USA)编写的程序控制以实现单光子计数测量。

2.2 化学发光延迟测量实验

在 PBS (PH. 7.4) 条件下,配置终浓度为 photofrin 20 $\mu\text{mol/L}$,人血清白蛋白 HSA 5 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液 1 mL,用 60 mW/cm^2 ,635 nm 激光照射 5 min,然后停止激发检测化学发光光子信号。

2.3 不同光敏剂化学发光实验

在 PBS(PH. 7.4)并包含 5 μM 的 HSA 溶液中分别配置光敏剂 Protoporphyrin IX 20 $\mu\text{mol/L}$, Npe 625 $\mu\text{mol/L}$, Photofrin 20 mg/L 的溶液 1 mL,用 0.1 mW/cm^2 ,635 nm 激光照射,并置于单光子计数系统下检测化学发光。光电倍增管采用 gate 技术控制,使光激发时,光电倍增管停止工作,激发光停止时立即开始计数。光照时间为 3 s,光子检测时间为 0.05 s。每种光敏剂用三个样品。

2.4 细胞光敏过程化学发光实验

肺腺癌细胞(ASTCa-1 从暨南大学医学部获取)用 RM1640 培养液,将培养皿中的细胞置于 5% CO_2 , 95% 空气,37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱中孵育。化学发光检测前 16 h 加入光敏剂 Photofrin 以终浓度 20 mg/L 孵育。实验前将细胞用培养液清洗三次,然后置于仪器下进行光照(0.1 mW/cm^2 ,635 nm)并检测光子。

3 结 果

光敏剂被强激光激发后会导致大量的活性氧产生,活性氧和溶液中的血清蛋白发生氧化反应,进而

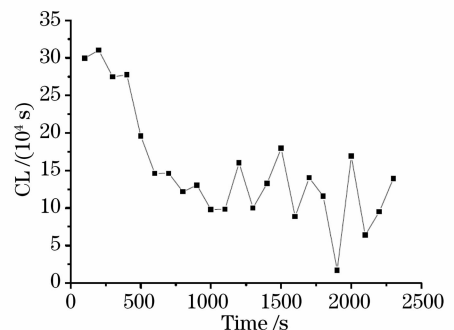


图 1 光动力作用 5 min 后(Photofrin 20 $\mu\text{mol/L}$, HSA 5 $\mu\text{mol/L}$,激光 60 mW/cm^2 ,635 nm),化学发光信号强度的衰减

Fig.1 After photosensitization for five minutes (photofrin 20 $\mu\text{mol/L}$, HSA 5 $\mu\text{mol/L}$, laser: 60 mW/cm^2 , 635 nm) the decay of chemiluminescence

产生化学发光。实验表明(图 1),在光照结束后的 10 min内,都能观测到较强的化学发光信号。且光子信号强度呈指数下降。

不同光敏剂的光动力实验结果表明(图 2),当光敏作用导致活性氧产生后,加入 HSA 的溶液检测到的光子比未加的有了明显的提高,说明血清蛋白的氧化产生了化学发光。图 2 中各参数: HSA: 5 μM ; Protoporphyrin IX: 20 $\mu\text{mol/L}$; Npe6: 25 $\mu\text{mol/L}$; Photofrin: 20 mg/L 。用 0.1 mW/cm^2 , 635 nm 激光照射。光子信号取自光敏过程中前 20 次检测数据的平均,每类实验样品量 $n=3$ 。

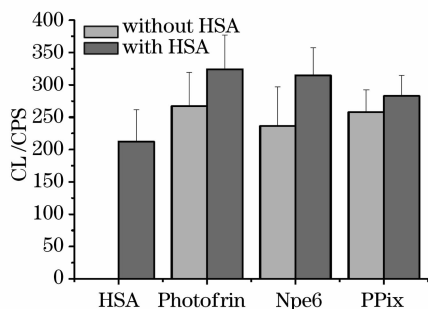


图 2 不同光敏剂参与的光敏作用下氧化人血清白蛋白产生的化学发光信号

Fig. 2 Chemiluminescence of oxidizing HSA with different photosensitizer

细胞实验结果如图 3。在没有光敏剂和光敏剂情况下,光激发后检测的光子强度有显著性的差异[图 3(a)]。吸收了光敏剂的细胞的光子强度明

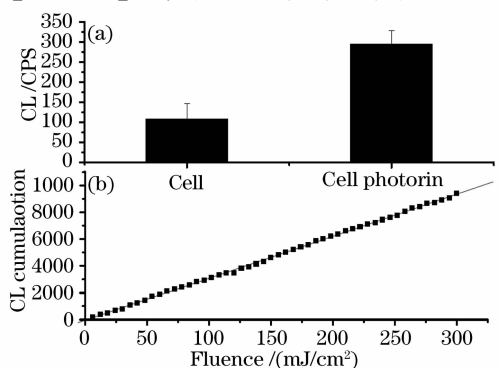


图 3 光敏作用下细胞氧化产生的化学发光。(a)化学发光光子强度;(b)化学发光光子积累和光敏作用光剂量的关系。Photofrin 以终浓度 20 mg/L 孵育 16 h。0.1 mW/cm^2 , 635 nm 激光激发

Fig. 3 Chemiluminescence of cell with photosensitization. (a)Intensity of chemiluminescence;(b) the relationship between chemiluminescence and photodynamic dose. Photofrin 20 mg/L for 16 h incubation; laser 0.1 mW/cm^2 , 635 nm

显上升,表明光子的产生来自于光敏作用下的生物分子氧化的化学发光。图 3(b)则说明检测的光子累积值(减去本底)和光敏作用的剂量(光剂量)存在线性关系,相关系数 $R=0.99$ 。

4 讨 论

生物分子的化学发光是由于氧化反应导致的。氧化过程本身会生成激发态的产物,但是氧化产物后继的自分解过程也会产生激发态^[9]。这些激发态退激发会相继发射出光子。另外有许多活性氧,如超氧阴离子、羟自由基具有较长的寿命,从而导致较长的延迟化学发光产生,延迟时间甚至可以长达几分钟(图 1)。激发时直接监测化学发光往往由于激发光的干扰,造成本底很高,降低了监测的灵敏度。这种延迟特性使在激发光的间隙进行光子的检测成为可能,可以大大提高检测的灵敏度。

实验 2 采用了延迟测量化学发光的方法,在光照停止的间隙进行光子检测有效地提高了信噪比。结果表明不同的光敏剂参与下都有化学发光光子的产生(图 2)。而且结果同时显示光子强度存在差异,导致此现象的原因有多种,除了直接与使用的浓度有关外,还与光敏剂量子效率的不同,产生的活性氧种类及比例也不相同等原因有关,但这不会影响检测的目的,因为化学发光的光子是和生物分子损伤直接关联的。图 3 则在肿瘤细胞水平确认了光子检测和光敏剂量的关系。结果表明,化学发光光子累积和光敏作用的光剂量可以很好地相关,用光子累积可以监测光敏的剂量,而且比单纯监测激发光剂量更加直接。

当然,对于生物细胞,考虑到不同的光敏剂定位的细胞器不同^[10,11],因此导致细胞伤害的氧化剂量也会有所差异。但是光敏作用依赖光氧化作用本质是相同的,当把光子信号作为细胞伤害的判断依据时,同种光敏剂完全可以建立一个剂量的标准。所以,用检测化学发光光子的方法检测判定氧化程度,作为杀伤剂量监测是可行的。同一般的采用监测光敏剂浓度和激发光剂量的方法,或者采用监测活性氧产量的方法^[12]监测光敏氧化对生物细胞或生物体的伤害方法相比,监测生物分子的化学发光,因为反映的是生物分子的氧化伤害,所以更加直接、有效。

另外,化学发光强度与活性氧浓度有直接关系,通过检测化学发光也可以推知活性氧的产率,也可以了解损伤的快慢等信息。

5 结 论

本方法可以用于监测包括光动力肿瘤治疗在内的光敏过程对生物分子的氧化伤害和氧化进程。利用延迟化学发光信号作为活性氧产率及氧化作用的监测标准,既可以避开激发光的干扰又可以检测到较强的发光信号,可以大大提高检测的信噪比,使检测具有相当的灵敏度。治疗肿瘤时,在整个光动力治疗过程中用灵敏的光电检测装置同步检测延迟产生的化学发光光子产率和产量作为判断氧化进程,预测疗效的依据,用来判断生物分子的损伤数量、细胞的损伤程度,进而得知治疗的剂量,具有直接、灵敏、关联性高等优点。

参 考 文 献

- Victor J. Thannickal, Barry L. Fanburg. Reactive oxygen species in cell signaling[J]. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.*, 2000, **279**: L1005~L1028
- Behrend L., Henderson G., Zwacka R. M.. Reactive oxygen species in oncogenic transformation[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2003, **31**: part6
- Gu Qiao. Biophotonics[M]. Beijing: Science Press, 2007. 5~25
顾 樵. 生物光子学[M]. 北京: 科学出版社, 2007. 5~25
- Turrens J. F., Giulivi C., Boveris A.. Increased spontaneous chemiluminescence from liver homogenates and isolated hepatocytes upon inhibition of O_2^- and H_2O_2 utilization[J]. *J. Free Rad. Biol. Med.*, 1986, **2**: 135~140
- Cadenas E., Varsavsky A. I., Boveris A. *et al.*. Oxygen or organic hydroperoxide-induced chemiluminescence of brain and liver homogenates[J]. *Biochem. J.*, 1981, **198**: 645~654
- Yu W. L., Zhao Y. P.. Chemiluminescence evaluation of oxidative damage to biomolecules induced by singlet oxygen and the protective effects of antioxidants [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, **1725**: 30~34
- Tekmura T., Ohta N., Nakajim S. *et al.*. The mechanism of photosensitization in photodynamic therapy: chemiluminescence caused by photosensitization of porphyrins in saline containing human serum albumin[J]. *Photochem. Photobiol.*, 1992, **55**(1): 137~140
- Wang J., Xing D., He Y. H. *et al.*. Experimental study on photodynamic diagnosis of cancer mediated by chemiluminescence probe[J]. *FEBS Lett.*, 2002, **523**(1~3): 128~132
- Alarcon E., Henriquez C., Aspee A. *et al.*. Chemiluminescence associated with singlet oxygen reactions with amino acids peptide and proteins[J]. *Photochem. Photobiol.*, 2007, **83**: 475~480
- Nowis D., Makowski M., Stokłosa T. *et al.*. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy[J]. *Acta Bichimica Polonica*, 2005, **52**(2): 339~352
- Wan Q. l., Liu L., Xing D. *et al.*. Bid is required in NPe6-PDT-induced apoptosis [J]. *Photochem. Photobiol.*, 2008, **84**(1): 250~257
- Yamamoto J., Yamamoto S., Hirano T. *et al.*. Monitoring of singlet oxygen is useful for predicting the photodynamic effects in the treatment for experimental glioma[J]. *Clin. Cancer Res.*, 2006, **12**(23): 7132~7139