

新型光敏剂叶绿酸 f 对人膀胱癌 T24 细胞的光动力杀伤作用

李 斌¹ 陈 刚¹ 张元芳² 方 杰² 李文智¹ 吴志明¹ 陆建成¹ 陈暨耀³

(¹ 复旦大学附属金山医院泌尿外科, 上海 200540
² 复旦大学附属华山医院泌尿外科, 上海 200040; ³ 复旦大学物理系, 上海 200433)

摘要 将自主研发的新型光敏剂叶绿酸 f 与 T24 细胞共同孵育后, 以 650 nm 激光照射, 通过 MTT 法检测光动力处理后 T24 细胞的生长抑制率, 流式细胞术检测凋亡情况, 同时利用激光共聚焦显微镜 488 nm 和 405 nm 双波长激发, 应用线粒体探针, 进行叶绿酸 f 的亚细胞定位。结果显示叶绿酸 f 为浓度 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对 T24 细胞生长抑制率在光能量密度 4 J/cm^2 下为 17.68%, 49.35% 和 84.42%, 在 1 J/cm^2 时为 4.34%, 37.42% 和 78.38%; 流式细胞术显示 T24 细胞光动力处理后, 凋亡率为 (45.23 \pm 1.2)%, 显著高于对照组; 激光共聚焦显微镜显示 504 nm 激发叶绿酸 f 发出的红光与 488 nm 激发线粒体探针产生的绿光分布基本一致。实验证明叶绿酸 f 对 T24 细胞杀伤效果明显, 主要是通过作用于线粒体, 诱导细胞凋亡来完成的。

关键词 医用光学; 光敏剂; 光动力学疗法; 膀胱癌

中图分类号 R454.2; R737.14 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201232.0117002

Photodynamic Effect of Novel Photosensitizer Chlorophyllin f on Bladder Cancer T24 Cells

Li Bin¹ Chen Gang¹ Zhang Yuanfang² Fang Jie²
Li Wenzhi¹ Wu Zhiming¹ Lu Jiancheng¹ Chen Jiyao³

(¹ Department of Urology, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200540, China
² Department of Urology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China
³ Department of Physics, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract T24 cells are incubated with a novel photosensitizer chlorophyllin f, and then irradiated by 650 nm laser light. MTT assay is used to detect the growth inhibition rate of T24 cells. The apoptosis of T24 cells is observed by flow cytometry. The Mito Tracker Green probe is used to label mitochondrion, and the confocal laser scanning microscopy excited by 488 nm and 405 nm dual channels is applied to reveal intracellular localization. With 4 J/cm^2 of optical energy density, the growth inhibition rates of 2.5, 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chlorophyllin f are 17.68%, 49.35% and 84.42%, while with 1 J/cm^2 optical energy density, the growth inhibition rates are 4.34%, 37.42% and 78.38% respectively. The apoptosis rate of treatment group is (45.23 \pm 1.2)%, significantly higher than control groups. The confocal laser scanning microscopy reveals that, the red fluorescence emitted by chlorophyllin f and green fluorescence emitted by Mito Tracker Green probe distributes almost the same. Therefore, the photodynamic effect of chlorophyllin f on T24 cells is significant. Chlorophyllin f mainly locates and functions at mitochondria, and induces apoptosis, which may be one of the mechanisms against T24 cells.

Key words medical optics; photosensitizer; photodynamic therapy; bladder cancer

OCIS codes 170.1530; 170.1790; 170.3880

收稿日期: 2011-07-14; **收到修改稿日期**: 2011-08-05

作者简介: 李 斌(1984—), 男, 博士研究生, 主要从事光动力学治疗膀胱肿瘤方面的研究。

E-mail: 15216650243@139.com

导师简介: 陈 刚(1964—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事泌尿系肿瘤的诊断和治疗等方面的研究。

E-mail: chgan305@163.com(通信联系人)

1 引言

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,无论是发病率还是死亡率均在我国男性泌尿生殖系统肿瘤中居首位。在美国仅 2008 年膀胱癌新增 68810 例,14100 例死亡^[1]。2009 年膀胱癌在我国最常见恶性肿瘤中排名第 10,约占全年新发恶性肿瘤的 3.0%^[2]。表浅性膀胱肿瘤占初发肿瘤的 70%左右,具有明显的“多中心发生”特点,虽然传统的手术、化疗、放疗乃至生物疗法已有很大的进步,但膀胱癌的预后仍然较差,最终有 10%~15%的表浅性膀胱癌最终发展成肌层浸润性膀胱癌或发生转移^[3~5]。

光动力学疗法(PDT)是继手术、放化疗之后一种特色肿瘤治疗方法,其利用肿瘤细胞对光敏剂的特异性吸收和滞留,结合特定波长的激光照射,达到选择性杀灭肿瘤细胞的目的^[6]。目前 PDT 常用波长为 630~650 nm 的激发光,在某些组织的穿透深度可达 5~10 mm,理论上可以完全消灭膀胱粘膜或粘膜下的表浅性膀胱癌。膀胱自身的解剖特点加上 PDT 良好的肿瘤特异性、较小的副作用而应用于表浅性膀胱癌的治疗。

叶绿酸 f 是从中药蚕砂中提取加工后制得最新合成的光敏剂。本实验以叶绿酸和人膀胱癌 T24 细胞为研究对象,对其光动力学作用体外杀伤膀胱癌 T24 细胞的效应进行初步探讨。

2 材料与方 法

2.1 材 料

膀胱癌 T24 细胞株购自中科院上海生命科学研究院细胞所。RPMI-1640 培养基、二甲基亚砜(DMSO),购自 Thermo 公司,胎牛血清为杭州四季青生物制品研究所产品。细胞培养瓶、24 孔、96 孔细胞培养板为 Corning 公司产品。四唑氮蓝(MTT)试剂盒、Annexin V-FITC 凋亡试剂盒、线粒体荧光探针(MitoTracker Mitochondrion-Selective Green Probe),购自美国 Invitrogen 公司。

2.2 主要仪器

650 nm 半导体激光发生器为美国 Intelite Inc 公司产品。LPE21B 型激光功率计购自上海恒进光电子公司。FACSsort 型流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司。Bio-TekELX800 通用型酶标仪,OLYMPUS FV300 型激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)。

2.3 叶绿酸 f 的制备

根据发明专利说明书(专利号 ZL200510024984.8)制备。取中药蚕砂中提取得到的叶绿素粗品,加入体积分数 80%的丙酮,搅拌均匀后加入体积分数 20%的 NaOH 溶液,水解 60 min,蒸去丙酮,放置分层后取碱性液,用 HCl 调溶液的 pH 值到 10 左右。提取去杂质,再用 HCl 调溶液的 pH 值到 3,有沉淀析出,滤取沉淀,干燥得墨绿色固体。经硅胶柱层析得叶绿酸 e6。将叶绿酸 e6 溶于吡啶中,加体积分数 25% KOH 甲醇溶液,反应 60 min。在通氮气条件下回流 60 min,减压蒸去吡啶,用 HCl 溶液调 pH 值到 3 有沉淀析出。滤取沉淀,用水洗涤,真空干燥得叶绿酸 f。叶绿酸 f 为双亲性光敏剂,采用无菌 RPMI-1640 培养基配制 2.5,5 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 避光保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.4 细胞培养

T24 细胞置于含体积分数 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 庆大霉素的 RPMI-1640 培养液中,37 $^{\circ}\text{C}$,5%的 CO_2 孵箱内培养。培养细胞至对数生长期、生长状态良好、约 80%贴壁融合时进行试验。

2.5 MTT 法测细胞生长抑制率

选择对数生长期细胞,用 0.25%胰酶消化并调整浓度以每孔 $10^4/100\ \mu\text{L}$ 细胞接种于 96 孔板中,每组均设 4 个复孔。设不加药物处理不照射激光的细胞空白对照组,单加药物不照射激光的药物对照组和不加药物仅照射激光的激光对照组。作用组分为 7 组,第 1 组:叶绿酸 f 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +1 J/cm^2 激光;第 2 组:2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +4 J/cm^2 激光;第 3 组:5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +1 J/cm^2 激光;第 4 组:5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +4 J/cm^2 激光;第 5 组:10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +1 J/cm^2 激光;第 6 组:10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +4 J/cm^2 激光;第 7 组:25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +8 J/cm^2 激光。实验组接种细胞后 24 h 弃去旧的培养基,分别加入 2.5,5 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的叶绿酸 f 溶液 100 μL ,继续培养 2 h,换新鲜培养基,以 40 mW/cm^2 的功率密度照射,再培养 12 h,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 50 μL ,细胞培养箱内培养 4 h,弃去培养基,每孔加入 DMSO 150 μL ,振荡器上振荡 10 min,选用波长 490 nm 测吸光密度(OD)值并计算相对抑制率 R_i :

$$R_i = \frac{f_{\text{ODR}} - f_{\text{ODE}}}{f_{\text{ODR}}} \times 100\%, \quad (1)$$

式中 f_{ODR} , f_{ODE} 分别为对照组和实验组 OD 值。

2.6 Annexin-V/PI 流式细胞术检测细胞凋亡

按照试剂盒说明书操作。选择对数生长期 T24

细胞,用 0.25 %胰酶消化并调整浓度以每孔 10^5 个细胞接种于 24 孔板中,每组设置 8 个复孔。设空白对照组、激光对照组、药物对照组和实验组。实验组接种细胞后 24 h 弃去旧的培养基,加入 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的叶绿酸 f,继续培养 2 h 后,换新鲜培养基,照射激光能量密度为 $44 \text{ J}/\text{cm}^2$,照射完后以不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,用 PBS 洗涤细胞二次($2000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 5 min)后和 $500 \mu\text{L}$ Binding Buffer 悬浮细胞,加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 混匀后,再加入 $5 \mu\text{L}$ 碘化丙啶(PI),室温避光反应 15 min,进行流式细胞检测。

2.7 CLSM 观察叶绿酸 f 亚细胞分布

将 T24 细胞转移至放有无菌盖玻片的培养皿内,培养 24 h 使细胞于盖玻片上贴壁生长至对数生长期,除去旧培养液加入 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 叶绿酸 f,5 h 后去除叶绿酸 f 加入线粒体探针 Mito Tracker Green 工作液,再与细胞 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 共孵育 30 min 后,加入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 预温育的新鲜细胞培养液。随后 CLSM 405 nm 和 488 nm 双波长激发进行观察,其中线粒体探针 Mito Tracker Green 的激发波长为 488 nm,叶绿酸 f 的激发波长为 405 nm。

2.8 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS12.0 软件进行单因素方差分析, $p < 0.05$ 为差异有显著意义。

3 实验结果

3.1 MTT 比色法检测

T24 细胞抑制率 MTT 比色法检测各组细胞于波长为 490 nm 的 OD 值(见表 1),计算相对抑制率结果如图 1 所示。在能量密度为 $1 \text{ J}/\text{cm}^2$ 激光照射下时,各浓度 2.5,5 和 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 叶绿酸 f 细胞生长抑制率分别为 4.34%,37.42%和 78.38%;在能量密度为 $4 \text{ J}/\text{cm}^2$ 激光照射下时,各浓度 2.5,5 和 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 叶绿酸 f 细胞生长抑制率分别为 17.68%,

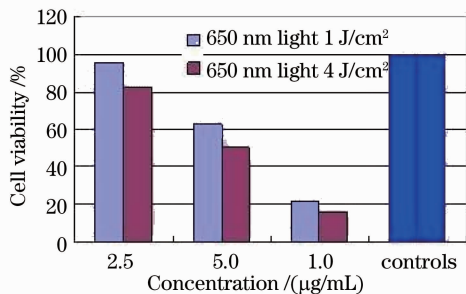


图 1 叶绿酸 f 介导 PDT 作用 T24 细胞的存活率
Fig. 1 Cell viability after PDT with chlorophyllin f in T24 cells

49.35%和 84.42%。实验组随着激光能量和光敏剂浓度的增加,T24 细胞的生长抑制率逐步增加。增加叶绿酸 f 浓度和激光能量至 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $8 \text{ J}/\text{cm}^2$ 后,生长抑制率为 84.56%,与 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $4 \text{ J}/\text{cm}^2$ 时无统计学差异($p > 0.05$)。

表 1 MTT 法检测各组 OD 值

Table 1 OD values of each group detected by MTT

Groups	OD value
Cell control	0.6915 ± 0.1106
$2.5 \mu\text{g}/\text{mL} + 1 \text{ J}/\text{cm}^2$	0.6305 ± 0.0766
$2.5 \mu\text{g}/\text{mL} + 4 \text{ J}/\text{cm}^2$	0.5693 ± 0.0410
$5 \mu\text{g}/\text{mL} + 1 \text{ J}/\text{cm}^2$	0.4328 ± 0.0163
$5 \mu\text{g}/\text{mL} + 4 \text{ J}/\text{cm}^2$	0.3503 ± 0.0141
$10 \mu\text{g}/\text{mL} + 1 \text{ J}/\text{cm}^2$	0.1495 ± 0.0058
$10 \mu\text{g}/\text{mL} + 4 \text{ J}/\text{cm}^2$	0.1078 ± 0.0030
$25 \mu\text{g}/\text{mL} + 8 \text{ J}/\text{cm}^2$	0.1068 ± 0.0049
Photosensitizer alone group	0.6915 ± 0.0865
Laser alone group	0.7018 ± 0.0283

统计分析表明,在 $1 \text{ J}/\text{cm}^2$ 激光照射下 5, $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $4 \text{ J}/\text{cm}^2$ 激光照射下 2.5,5 和 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 同细胞对照组、光敏剂对照组和激光对照组相比较,差异有显著意义($p < 0.01$)。而在 $1 \text{ J}/\text{cm}^2$ 激光照射下 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 实验组与细胞对照组、光敏剂对照组和激光对照组之间均没有统计学差异($p > 0.05$)。

3.2 Annexin-V/PI 流式细胞术检测细胞凋亡

浓度 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 叶绿酸 f 在在激光能量 $4 \text{ J}/\text{cm}^2$ 条件下,光动力处理 T24 细胞后,行流式细胞检测结果如图 2 所示。流式细胞术结果显示,细胞死亡以凋亡为主,少量坏死。细胞凋亡率为 $(45.23 \pm 1.2)\%$ 、坏死率为 $(7.12 \pm 0.7)\%$,细胞对照组凋亡率为 $(2.03 \pm 0.2)\%$ 、坏死率为 $(2.45 \pm 0.4)\%$,而单加叶绿酸 f 对照组凋亡率为 $(4.3 \pm 0.3)\%$ 、坏死率为 $(2.59 \pm 0.5)\%$,单照射激光对照组凋亡率为 $(3.77 \pm 0.3)\%$ 、坏死率为 $(2.61 \pm 0.6)\%$ 。实验组与细胞对照组、光敏剂对照组和激光对照组之间差异有显著性意义($p < 0.01$)。

3.3 叶绿酸 f 亚细胞分布

T24 细胞与叶绿酸 f 和特异性线粒体探针共同孵育后行 CLSM 检测,用 405 nm 和 488 nm 激光同时激发,得到结果如图 3 所示。图 3(a)为 T24 细胞底片;图 3(b)为标记线粒体的特异性探针在 488 nm 激光激发下发出的绿色光;图 3(c)为在 405 nm 激光激发下,叶绿酸 f 发出的红色光,可以看出位于细胞浆内,胞核内未见分布;图 3(d)为软件融合图 3(b)和图 3(c)得到的图像,黄色光表示叶绿酸 f 发出的

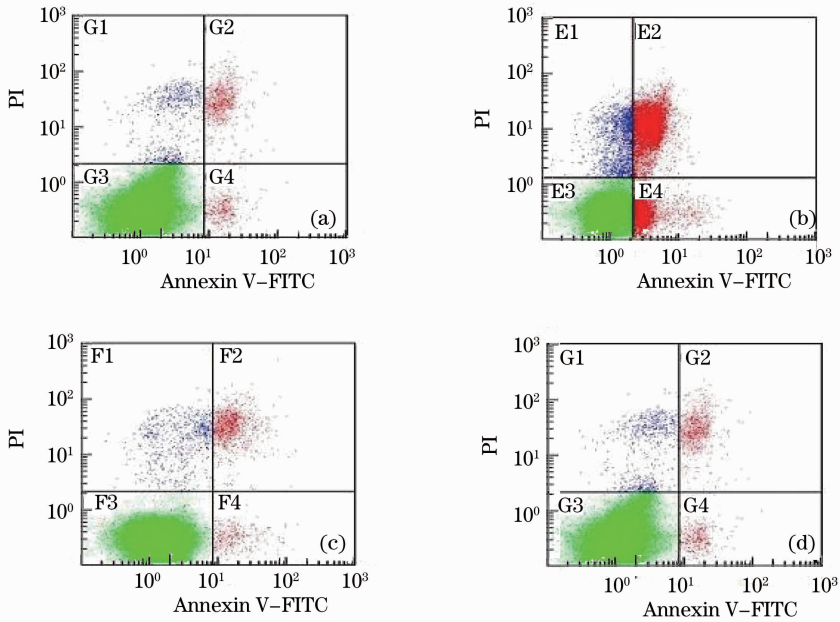


图 2 叶绿酸 f PDT 处理 T24 细胞流式细胞图。(a)细胞对照组;(b)处理组;(c)单加叶绿酸 f 对照组;
(d)单照射激光对照组

Fig. 2 Photodynamic effect of chlorophyllin f on apoptosis in T24 cells. (a) Control group; (b) treatment group;
(c) chlorophyllin f alone; (d) laser alone

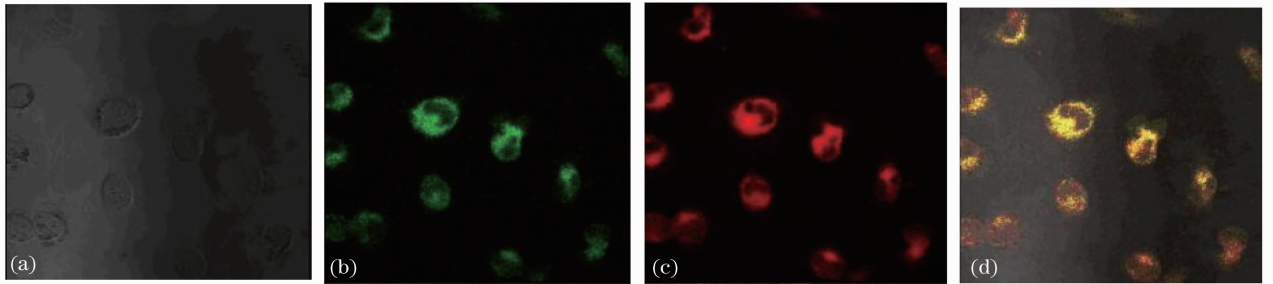


图 3 激光共聚焦显微镜下叶绿酸 f 的细胞内定位。(a) T24 底片;(b)线粒体探针发出的绿光;
(c)叶绿酸 f 发出的红光;(d)融合(b)和(c)的结果

Fig. 3 Intracellular location of chlorophyllin f under CLSM. (a) Photoplate; (b) green light emitted from mito-tracker probe (c) red light emitted from chlorophyllin f; (d) fusion image of (b) and (c)

红色荧光和线粒体探针发出的绿色荧光重叠的结果。

4 讨 论

光动力学疗法是继手术、放化疗之后一种特色的肿瘤治疗方法。它具有特异性杀伤肿瘤细胞的特点,现在已经证明对多种实体肿瘤有效。相对于传统的治疗肿瘤的方法,PDT 的优点包括:对肿瘤细胞选择性杀伤;可以局部应用,全身毒副作用小;可反复应用,不产生耐药性等。在特定波长的激光照射下,光敏剂会产生具有细胞毒作用的活性氧类物质(ROS),从而破坏细胞的结构和功能^[6]。由于膀胱独特的囊状解剖结构且通过尿道与外界连通,以

及膀胱癌表浅性、多发性、易复发并伴发恶性度高的原位癌的特点,使得膀胱癌非常适宜行 PDT 治疗^[7]。目前美国、法国、日本、德国和英国等发达国家均已批准 PDT 临床治疗肿瘤^[8]。

PDT 须具备三个基本要素:光敏剂,激发光和氧气。光敏剂是最基本也是最重要的环节,同时也是制约 PDT 发展的关键^[9]。本实验所用光敏剂叶绿酸 f 属于二氢卟吩类化合物,化学结构式见图 4,具有以下优点:1)叶绿酸 f 是成分单一的化合物,化学、光学性质明确,容易大量合成。而国内自主研发的叶绿素类光敏剂如 CDHS-801^[10]和 CPD4^[11]等也从中药蚕沙中提取后加工制得,但均是含多种光敏活性物质的混合物,成分多样,物理化学特性复杂。

2) 配方简单, 价格低廉, 容易保存。国际常用的光敏剂如 2000 年被美国 FDA 批准用于肿瘤临床治疗的苯并卟啉衍生物单酸环 A (BPD-MA), 是来源于天然产物的半合成产物, 总体产率低, 合成的成本很高, 造成其成品药物维替泊芬 (Verteporfin) 的制剂成本也非常高, 这就极大增加医疗负担, 影响其临床应用。3) 有完全的自主知识产权, 专利号 ZL 200510024984.8。4) 在可见光的红光区均有很强的吸收峰, λ_{\max} (nm): 664.5, 607.5, 506.5, 405, 质谱线 MS m/z : 550 ($M + H + 1$)⁺, 539 ($M + H$)⁺, 538 ($M + H - 1$)⁺。5) 目前实验或临床应用过程中应用光敏剂如苯卟啉衍生物单环酸 A (BPD-MA)、5-氨基酮戊酸 (5-aminolaevulinic acid, ALA) 等, 需要避光一段时间待光敏剂从正常组织中代谢以后才能治疗, 而叶绿酸 f 由于二氢卟吩环结构的相对稳定, 并且此次实验的所有操作都是在可见光条件下进行的, 并且实验结果显示有良好的效果, 为彻底解决实验或光动力学治疗过程中病人需要待在暗室的缺点提供了可能。

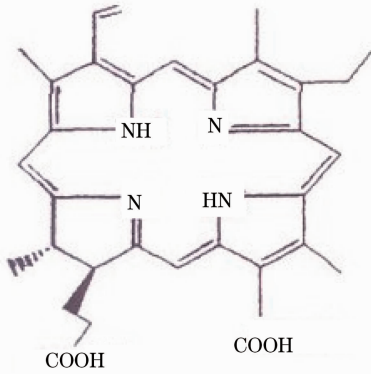


图 4 叶绿酸 f 化学结构式

Fig. 4 Chemical structure of chlorophyllin f

同时对叶绿酸 f 进行光谱分析, 得到其吸收光谱如图 5 所示。可以看出, 叶绿酸 f 在 664.5, 607.5, 506.5 和 405 nm 有较强的吸收峰, 其中 405 nm 的吸收峰是较强的, 因此 CLSM 中选择 405 nm 作为叶绿酸 f 的激发光。另外, 在 PDT 临床治疗中一般采用光敏剂吸收峰附近波长的光源, 使激光波长与所选用的光敏剂吸收峰之间有最大限度的重叠, 同时要考虑所选激光的组织穿透性, 激光的组织穿透深度与其波长成正比, 常用发射红光 (630~650 nm) 的激光, 它的组织穿透深度可达 1 cm, 所以在本实验中检测叶绿酸 f 对 T24 细胞的 PDT 作用时, 使用 650 nm 的激发光。

MTT 在许多肿瘤的化疗中被用作药物敏感性

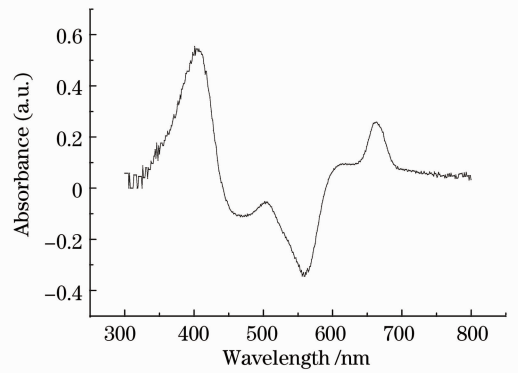


图 5 叶绿酸 f 的吸收光谱

Fig. 5 Absorption spectrum of chlorophyllin f 的检测手段, 是一种简单快速精确的半自动药物筛选方法^[12]。实验发现, 单用药物不照射激光的药物对照组和不加任何处理的细胞对照组比较, 差异无显著意义 ($p > 0.05$)。单独应用光敏剂叶绿酸 f 对细胞无杀伤作用, 提示叶绿酸 f 的暗毒性很小。单独照射能量密度为 4 J/cm^2 、波长为 650 nm 激光的对照组, 细胞生长抑制率同细胞对照组比较, 差异也无显著意义 ($p > 0.05$)。随着激光照射剂量和光敏剂药物浓度的增加, 对 T24 细胞的抑制率也是逐渐增加的。

对于叶绿酸 f, 在浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$, 激光能量密度为 4 J/cm^2 条件下, 对 T24 细胞生长抑制率最高达到 84% 以上。与目前国际上常用的光敏剂如间-四羟基二氢卟吩 (m-THPC)、贯叶连翘提取物 (*Hypericum perforatum* L) 等体外杀伤效果相比 (分别为 86% 和 80%)^[13,14], 达到同等或相似的杀伤效果, 显示出良好的研究和应用前景。当加大浓度和激光能量至 $25 \mu\text{g/mL}$ 和 8 J/cm^2 后, 细胞抑制率与在 $10 \mu\text{g/mL}$ 和 4 J/cm^2 条件下没有统计学差异, 认为在 $10 \mu\text{g/mL}$ 和 4 J/cm^2 时是有效作用条件。

通过对叶绿酸 f PDT 处理 T24 细胞后行流式细胞术检测, 发现 PDT 处理后 T24 细胞凋亡率为 $(45.23 \pm 1.2)\%$, 坏死率为 $(7.12 \pm 0.7)\%$, 而单加叶绿酸 e4 对照组凋亡率为 $(4.3 \pm 0.3)\%$, 坏死率为 $(2.59 \pm 0.5)\%$, 单照射激光对照组凋亡率为 $(3.77 \pm 0.3)\%$, 坏死率为 $(2.61 \pm 0.6)\%$ 。实验组与细胞对照组、光敏剂对照组和激光对照组之间差异有显著性意义 ($p < 0.01$), 显示叶绿酸 f 介导的 PDT 杀伤 T24 细胞是以诱导凋亡为主要途径。

PDT 过程中起细胞毒作用杀死细胞的主要为 ROS。ROS 半衰期极短, 小于 $0.04 \mu\text{s}$, 在细胞内的

播散距离大约 200 nm 左右^[15], 仅能破坏其附近的组织结构, 因此叶绿酸 f 进入细胞后定位的细胞器就是其作用靶点。不同的荧光物质具有不同的激发光谱和发射光谱, 发出不同颜色的荧光, 因而把荧光与生物分子联系在一起可以研究许多生物医学问题^[16,17]。随着荧光标记探针的发展和探测技术的进步, CLSM 已经在生物医学以及临床病理检测研究领域得到广泛的应用^[18,19]。通过 CLSM 对叶绿酸 f 的亚细胞定位进行进一步的分析, 结果表明: 405nm 激光激发叶绿酸 f 发出的红色荧光和 488 nm 激光激发线粒体特异性探针发出的绿色荧光, 均位于细胞浆内, 细胞核内未见分布, 显示红光和绿光位置基本一致, 而且重合良好形成黄光, 表明叶绿酸 f 是定位在线粒体上发挥杀伤作用的。

5 结 论

综上所述, 可以认为新型光敏剂叶绿酸 f 结合 650 nm 激光 PDT 处理膀胱癌 T24 细胞, 可有效地抑制肿瘤细胞的生长, 其机制推测是叶绿酸 f 定位并作用于线粒体, 引起肿瘤细胞的凋亡, 显示出叶绿酸 f 光动力学治疗膀胱癌较好的应用前景, 但其作用和效果需进一步的动物实验和临床试验。

参 考 文 献

- 1 A. Jemal, R. Siegel, E. Ward *et al.*. Cancer statistics, 2008[J]. *CA-Cancer J. Clin.*, 2008, **58**(6): 71~96
- 2 Yu Lei, Sun Yan, Lei Mingde *et al.*. Prognostic significance of aurora-a expression in human bladder cancer [J]. *Acta Histochemica*, 2011, **113**(5): 514~518
- 3 R. J. Sylvester, A. P. M. Van der Meijden, W. Oosterlinck *et al.*. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients and seven EORTC trials [J]. *Eur. Urol.*, 2006, **49**(9): 466~477
- 4 A. Jemal, R. Siegel, E. Ward *et al.*. Cancer statistics, 2009 [J]. *CA-Cancer J. Clin.*, 2009, **59**(8): 225~249
- 5 J. A. Garcia, R. Dreicer. Systemic chemotherapy for advanced bladder cancer: update and controversies [J]. *J. Clin. Oncol.*, 2006, **24**(35): 5545~5551
- 6 Ángeles Juarranz, Pedro Jaén, Francisco Sanz-Rodríguez *et al.*. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications [J]. *Clin. Transl. Oncol.*, 2008, **10**(3): 148~154
- 7 G. R. Prout, Jr. Bladder carcinoma and a TNM system of classification. [J]. *J. Urology*, 1987, **117**(12): 583~590
- 8 Ron R. Allison MDa, Claudio H. Sibata PhD. Oncologic

- photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review [J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2010, **7**(10): 61~75
- 9 A. Juzeniene, Q. Peng, J. Moan. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis [J]. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, **6**(21): 1234~1245
- 10 Zheng Jingcun, Wang Guozeng, Jiang Ning *et al.*. Mechanism of bladder cancer T24 cell apoptosis induced by CDHS801 photodynamic therapy [J]. *Shandong Medical Journal*, 2010, **50**(22): 1~3
- 郑景存, 王国增, 姜 宁等. CDHS801 光动力诱导膀胱癌细胞凋亡的机制探讨 [J]. *山东医药*, 2010, **50**(22): 1~3
- 11 Qiao Zhu, Chen Ping, Tong Zhongsheng *et al.*. Photodynamic effects of new photosensitizer CPD4 for human breast cancer cells in vitro [J]. *Chinese J. Clinical Oncology*, 2009, **36**(8): 230~233
- 乔 柱, 陈 平, 佟仲生等. 新型光敏剂 CPD4 对人乳腺癌细胞体外光动力杀伤效应 [J]. *中国肿瘤临床*, 2009, **36**(8): 230~233
- 12 S. Suzuki, S. Nakamura, S. Sakaguchi *et al.*. Experimental study of intraabdominal photodynamic therapy [J]. *Laser. Med. Sci.*, 1987, **2**(5): 195~203
- 13 N. E. Stavropoulos, A. Kimb, U. U. Nseyo *et al.*. Hypericum perforatum L. extract-movel photosensitizer against human bladder cancer cells [J]. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2006, **84**(6): 64~69
- 14 Kinga Nawalany, Aleksandra Rusin, Mariusz Kepczyn'ski *et al.*. Comparison of photodynamic efficacy of tetraarylporphyrin pegylated or encapsulated in liposomes; in vitro studies [J]. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2009, **97**(5): 8~17
- 15 A. P. Castanoa, T. N. Demidova, M. R. Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization [J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004, (1): 279~293
- 16 Li Zuanfang, Huang Zufang, Chen Rong *et al.*. Two-photon fluorescence imaging of thyroid tissue [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(3): 765~768
- 李钻芳, 黄祖芳, 陈 荣等. 甲状腺组织的双光子荧光成像 [J]. *中国激光*, 2009, **36**(3): 765~768
- 17 Chen Guannan, Huang Zufang, Chen Rong *et al.*. Cellular localization analysis of 5-ALA induced Pp IX in DHL cells [J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(6): 1605~1608
- 陈冠楠, 黄祖芳, 陈 荣等. DHL 细胞中 5-ALA 代谢 PpIX 的定位分析 [J]. *光学学报*, 2009, **29**(6): 1605~1608
- 18 Ma Jun, Zhang Xining, Xu Ming *et al.*. Detection of gastric cancer peritoneal dissemination in nude mouse model by laser-induced fluorescence spectroscopy in vivo [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2566~2570
- 马 君, 张奚宁, 徐 明等. 激光诱导荧光技术在体探测裸鼠腹膜胃癌播散 [J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2566~2570
- 19 Zhou Chenjuan, Pan Wenliang, Chen Tongsheng. Artesunate induces reactive oxygen species-mediated apoptosis [J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(2): 132~136
- 周陈娟, 潘文良, 陈同生. 青蒿琥酯诱导活性氧依赖性的细胞凋亡 [J]. *中国激光*, 2011, **38**(2): 132~136