

文章编号: 1005-5630(2023)01-0045-07

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5630.2023.001.007

用于黑色素瘤治疗的新型光敏剂药物的研究

范 岩, 郑璐璐

(上海理工大学 光电信息与计算机工程学院, 上海 200093)

摘要: 光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 一直是黑色素瘤治疗领域的主要方法, 而研发更为高效的光敏剂是改进治疗的关键所在。为了提高光动力治疗的效果, 设计了一种新型的光敏剂药物, 其以传统的光敏剂原卟啉 IX (Protoporphyrin IX, PpIX) 为基底材料, 通过所合成的 PMHC₁₈-mPEG 将去甲基化药物 SGI-1027 和 PpIX 包裹起来形成 SGI@PpIX-mPEG 复合体系。PpIX 受到光照之后会导致细胞产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 从而使下游的 Caspase-3 蛋白含量增加, 同时去甲基化药物会上调 GSDME 蛋白的含量。研究结果表明, 所合成的新型光敏剂药物不仅能够产生活性氧杀死癌细胞, 而且能够通过 Caspase-3 蛋白和 GSDME 蛋白的相互作用进一步导致细胞焦亡从而提升光动力治疗的效果。

关键词: 光动力治疗; 光敏剂; 活性氧; 去甲基化; 细胞焦亡

中图分类号: TB 34 **文献标志码:** A

Research of the novel photosensitizer for the melanoma therapy

FAN Yan, ZHENG Lulu

(School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: The main method for melanoma is photodynamic therapy (PDT), and the design of more efficient photosensitizers is the key point to melanoma therapy. To promote the therapeutic effect of PDT, a novel photosensitizer was designed. The substrate was the Protoporphyrin IX (PpIX), then the demethylated drug SGI-1027 and PpIX were encapsulated by the synthesized PMHC₁₈-mPEG to form the SGI@PpIX-mPEG complex system. PpIX exposed to illumination causes cells to produce a large amount of reactive oxygen species (ROS), which would increase the content of the downstream protein Caspase-3. The demethylated drug increases the content of GSDME. Research indicates that the synthesized novel photosensitizer drug can not only generate reactive oxygen species to kill cancer cells, but also further lead to pyroptosis and enhance the effect of photodynamic therapy through the interaction between Caspase-3 and GSDME.

Keywords: photodynamic therapy; photosensitizer; reactive oxygen species; demethylation; pyroptosis

收稿日期: 2022-03-14

基金项目: 上海市军民融合发展专项资金科技创新支持项目 (2020-jmrh-kj8)

第一作者: 范 岩 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为光动力治疗。E-mail: fanyan_usst@163.com

通信作者: 郑璐璐 (1982—), 女, 副教授, 研究方向为医用光学与微纳加工。E-mail: llzheng@usst.edu.cn

引 言

恶性黑色素瘤是一种多发于皮肤部位的恶性肿瘤，其发病率在皮肤恶性肿瘤中排第三位。目前黑色素瘤的治疗主要采用光动力疗法^[1]。光动力治疗是将能够响应特殊波段的光敏剂注射到患者的病变部位，采用一定功率的激光照射病变部位从而激活光敏剂的毒性作用杀死癌细胞。传统的光敏剂如原卟啉 IX (Protoporphyrin IX, PpIX) 主要是由 635 nm 波段激光激发，吸收光能之后将能量传递给周围的物质并产生具有一定细胞毒性的活性氧，从而发挥良好的光动力疗效^[2]。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 除了具有细胞毒性，同时还会导致其下游的 Caspase-3 蛋白高表达并活化，起到一定的基因调控作用^[3]。

细胞焦亡 (pyroptosis) 是细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 方式的一种，通过诱导癌细胞焦亡可以达到杀死肿瘤细胞的目的。细胞焦亡的通路有很多，其中 Caspase-3 蛋白和 GSDME 蛋白的相互作用就能导致细胞焦亡。GSDME 是细胞内的一种抑癌基因，其在大多数癌细胞中被抑制，去甲基化药物可以增加 GSDME 蛋白的表达量^[4-5]。而当机体内的 GSDME 蛋白含量上升时，活化的 Caspase-3 会切割 GSDME 蛋白使其断裂为 GSDME-C 和 GSDME-N 两段，此时 GSDME-N 蛋白会与细胞膜结合导致细胞膜穿孔破裂，造成细胞焦亡的现象^[6-8]，其表现为细胞膜肿胀破裂，细胞内容物流出，可以通过显微镜很直观地区分出焦亡细胞和正常细胞。随着对焦亡的深入研究，诱导细胞焦亡也被当作一种肿瘤治疗的手段。

本文结合光动力治疗与细胞焦亡的原理，通过自组装的方式合成出一种新型的光敏剂药物，以生物学的表征手段在细胞水平验证了其能够有效地杀伤肿瘤细胞，提升了传统光敏剂的治疗效果，也为黑色素瘤的协同治疗提供了一种新的思路。

1 实验方法

1.1 光敏剂药物的制备

首先合成了用于包裹药物的大分子聚合物

PMHC₁₈-mPEG^[9]，然后利用自组装的方法将 PpIX 和去甲基化药物 SGI-1027 包覆起来形成 SGI@PpIX-mPEG 复合体系溶液，具体的实验材料与 方法如下：

(1) 材料与化学试剂

原卟啉 IX (PpIX) (购买于上海阿拉丁生化科技有限公司)，SGI-1027 (购买于 MCE)，马来酸酐/1-十八碳烯交替共聚物 (polymaleic anhydride-alt-1-octadecene) (购买于天津希恩思生化科技有限公司)，聚乙二醇单甲醚 (polyethylene glycol methyl ether) (购买于上海阿拉丁生化科技有限公司)，二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (购买于 Sigma)，吡啶 (C₅H₅N) (购买于国药集团化学试剂有限公司)，1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC.HCL) (购买于国药集团化学试剂有限公司)。

(2) PMHC₁₈-mPEG 的制备

称取马来酸酐/1-十八碳烯交替共聚物 (20 mg, 0.0286 mmol) 与聚乙二醇单甲醚 (228.6 mg, 0.05714 mmol, mPEG-NH₂, 2 KDa)，放入 30 mL 的 DMSO 与吡啶的混合溶液 (两种溶液的体积比 DMSO : 吡啶 = 9 : 1) 中反应 12 h，随后加入 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (43.6 mg, 0.11 mmol)，充分反应 24 h 之后将所得聚合物通过用蒸馏水透析 12000~14000 MWCO 的方式纯化去除副产物。通过冻干法除去溶剂，得到 420 mg 黄色固体，产率约为 71%。

(3) SGI@PpIX-mPEG 的制备

将 4 mg 的 PpIX 和 0.8 mg 的 SGI-1027 溶解在 200 μ L 的 DMSO 中，然后将 10 mg 的 PMHC₁₈-mPEG 溶解在 4 mL 水中。剧烈搅拌 PMHC₁₈-mPEG 水溶液的同时滴加含有 PpIX 和 SGI-1027 的混合溶液，搅拌的过程中注意避光，搅拌约 20 min 后获得 SGI@PpIX-mPEG 溶液。获得的 SGI@PpIX-mPEG 溶液需要避光保存在 4 $^{\circ}$ C 的环境中，避免材料受到光照影响导致失效。

1.2 材料形貌表征

利用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 来观察 SGI@PpIX-mPEG 的

形貌特征。TEM 具有极高的分辨率,能够观察到小于 $0.2\ \mu\text{m}$ 的亚显微结构,其采用电子束作为光源,经过加速的电子束照射到样品表面并与样品原子发生一系列的碰撞从而产生不同的立体角散射,经过成像器件的收集可得到明暗不同的样品影像,所以 TEM 被广泛应用于材料科学领域。样品的厚度对 TEM 的成像质量具有较大的影响。首先将 SGI@ PpIX-mPEG 溶液滴加到带有支持膜的铜网之上,等待样品干燥从而使其均匀分散到支持网之上,随后可以进行透射电镜的拍摄。

1.3 细胞培养

本文采用人类恶性黑色素瘤 A375 细胞作为实验对象。采用 DMEM 高糖培养基培养 A375 细胞,培养基中含有 10% 的胎牛血清以及 1% 的双抗。细胞放置在 $37\ ^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中,培养箱含有体积分数为 5% 的二氧化碳。

1.4 细胞吞噬实验

将 A375 细胞提前铺在底部直径为 14 mm 的共聚焦小皿之中,在 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中放置 24 h 后,加入培养基稀释后的质量浓度为 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SGI@ PpIX-mPEG,分别在 2 h, 4 h, 12 h, 24 h 4 个时间段用共聚焦显微镜捕获细胞的吞噬情况。为了确定新型光敏剂药物 SGI@ PpIX-mPEG 在细胞内的相对位置,需要对细胞核进行定位。本实验采用 Hoechst 33258 染色液对细胞核进行定位,它是一种能够同时作用于活细胞与死细胞的细胞核的荧光染料,结合之后能够被激发出蓝色荧光,最大发射波长为 460 nm。在进行拍摄之前,轻轻用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 冲洗每组共聚焦小皿,然后将 Hoechst 33258 染色液用 PBS 稀释 100 倍并加入每个实验组之中。染色 10 min 后,洗去染色液,用共聚焦显微镜获取细胞吞噬图像。

1.5 DCFH-DA 染色实验

DCFH-DA 染色实验步骤如下:将细胞铺入共聚焦小皿之中,待细胞贴壁之后,在不同的小皿中分别加入 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SGI-1027、 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ PpIX 以及 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SGI@ PpIX-mPEG 与细

胞共同孵育 2 h,其中 Control 组中只含有 A375 细胞,不加入任何材料。用功率密度为 $50\ \text{mW}/\text{cm}^2$ 的 635 nm 激光对每个小皿进行光照处理 5 min。之后去除细胞培养液上清,用 PBS 轻轻冲洗每孔,然后加入浓度为 $10\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 的 DCFH-DA 染色探针。染色 10 min 后,再次用 PBS 轻轻冲洗,置于共聚焦显微镜下拍摄图像。

1.6 细胞形态表征

细胞形态的表征实验处理方法同前,同样是分为 Control、SGI-1027、PpIX 和 SGI@ PpIX-mPEG 4 组。在进行共聚焦显微镜拍摄之前,将小皿中的细胞培养上清液从边缘缓慢用移液枪吸出,避免死亡的细胞由于与小皿脱离而被过大的吸力吸出,导致小皿中细胞数量减少。之后利用 PBS 轻轻冲洗一遍,然后加入用 PSB 稀释后的浓度为 $10\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 的 SYTOX GREEN 荧光染料,避光孵育 7~8 min,孵育时间不宜过长。最后吸出染色液,用 PBS 轻轻把未结合的 SYTOX GREEN 荧光染料冲洗干净之后就能进行共聚焦显微镜表征实验。

1.7 CCK-8 实验

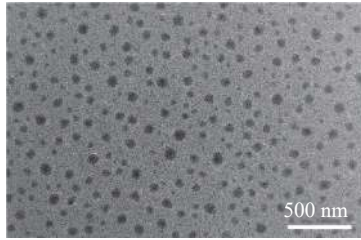
首先将 A375 细胞接种在 96 孔培养板之中预培养一段时间,实验组别处理方式同上。测量时每孔加入 $10\ \mu\text{L}$ 的 CCK-8 溶液,在 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中反应 30 min 左右,采用酶标仪测量每孔在 450 nm 处的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 SGI@ PpIX-mPEG 的形态表征

得到合成的样品之后,首先需要对样品的形态进行表征。图 1(a)是 SGI@ PpIX-mPEG 的 TEM 图像,可以看出 SGI@ PpIX-mPEG 呈现出圆形颗粒状,形貌均一,具有良好的 consistency,其平均粒径约在 100 nm。图 1(b)是 SGI@ PpIX-mPEG 溶液在比色皿中的图像,溶液整体呈褐色,无明显沉淀物,说明所合成的 SGI@ PpIX-mPEG 具有良好的水溶性。由此可见,PMHC₁₈-mPEG 成功地将 PpIX 和 SGI-1027 包裹起来形成 SGI@ PpIX-mPEG 复合体系,符合实验的预

期设计。



(a) SGI@PpIX-mPEG 的 TEM 图像



(b) SGI@PpIX-mPEG 溶液

图 1 SGI@ PpIX-mPEG 形态表征图像

Fig. 1 Morphological characterization of SGI@ PpIX-mPEG

2.2 SGI@ PpIX-mPEG 的细胞吞噬情况研究

为了确保光敏剂药物能够进入细胞内发挥作用,首先对细胞吞噬 SGI@ PpIX-mPEG 的情况利用共聚焦显微镜进行表征。如图 2 所示,图中红色荧光代表 SGI@ PpIX-mPEG,蓝色荧光为 Hoechst 33258 染色之后的细胞核。可以看出,在细胞核的周围环绕着一圈红色荧光,证明 SGI@ PpIX-mPEG 已经进入细胞质之中,并且 A375 细

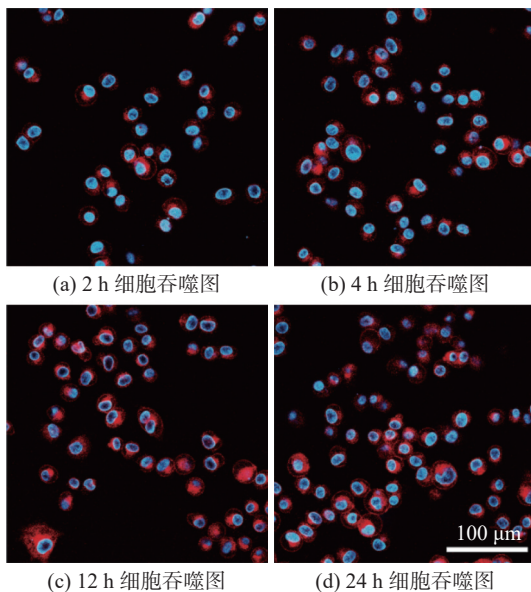


图 2 SGI@ PpIX-mPEG 在细胞内的吞噬图像

Fig. 2 Phagocytosis images of SGI@ PpIX-mPEG in cells

胞在与 SGI@ PpIX-mPEG 孵育 2 h 之后就已经展现出良好的吞噬能力,在 24 h 之后红色荧光依然存在,证明所合成的新型光敏剂药物不仅具有良好的生物相容性,并且能够在体内保持稳定结构从而避免药物失效的情况。

2.3 SGI@ PpIX-mPEG 产生 ROS 能力的研究

为了验证 SGI@ PpIX-mPEG 是否和 PpIX 一样具有产生 ROS 的能力,采用 DCFH-DA 荧光染色的方法来探究细胞内 ROS 的产生水平。DCFH-DA 是一种本身不具有荧光的化学探针,其进入细胞后会被酯酶水解为能够与 ROS 发生氧化反应的 DCFH,其氧化产物为带有绿色荧光的 DCF,能够被 488 nm 波段的激光激发产生强烈的绿光,其最大发射波长为 525 nm,可以通过荧光显微镜捕获并进行 ROS 定量分析^[10]。

图 3(a)~(d)所示分别为共聚焦显微镜下 Control、SGI-1027、PpIX 以及 SGI@ PpIX-mPEG 4 组实验组中 ROS 产生情况的图片,图中的绿色荧光代表活性氧的产生。Control 组和 SGI-1027 组由于不能产生活性氧,所以视野中几乎看不到绿色荧光。而在 PpIX 以及 SGI@ PpIX-mPEG 两组之中出现大量的荧光,并且从两组中的对比可以看出,合成的新型光敏剂药物 SGI@ PpIX-mPEG 并不会影响 PpIX 本身产生活性氧的能力,甚至在一定程度上加强了活性氧的生成。利用 Origin 软件对每张图片的平均荧光强度进行分析,如图 3(e)所示,SGI@ PpIX-mPEG 组的平均荧光强度达到了 87.20,比 PpIX 组高了 7 左右,而 Control 组和 SGI-1027 却只有 22.86 和 27.93,进一步证明所合成的 SGI@ PpIX-mPEG 是性能优异的光敏材料。

2.4 细胞焦亡形态的表征

随后对 SGI@ PpIX-mPEG 诱导 A375 细胞焦亡的能力进行评估,仍然是用细胞染色的方法并用共聚焦显微镜进行结果表征,形态表征的实验处理方式同上。在拍摄之前,为了直观地看出细胞是否死亡,利用 SYTOX GREEN 对每组细胞进行染色处理。SYTOX GREEN 是一种针对死细胞的染料,能够穿过死亡细胞的细胞膜并与细胞内的核酸结合,在 488 nm 激光光源的激发下产生绿色荧光^[11]。

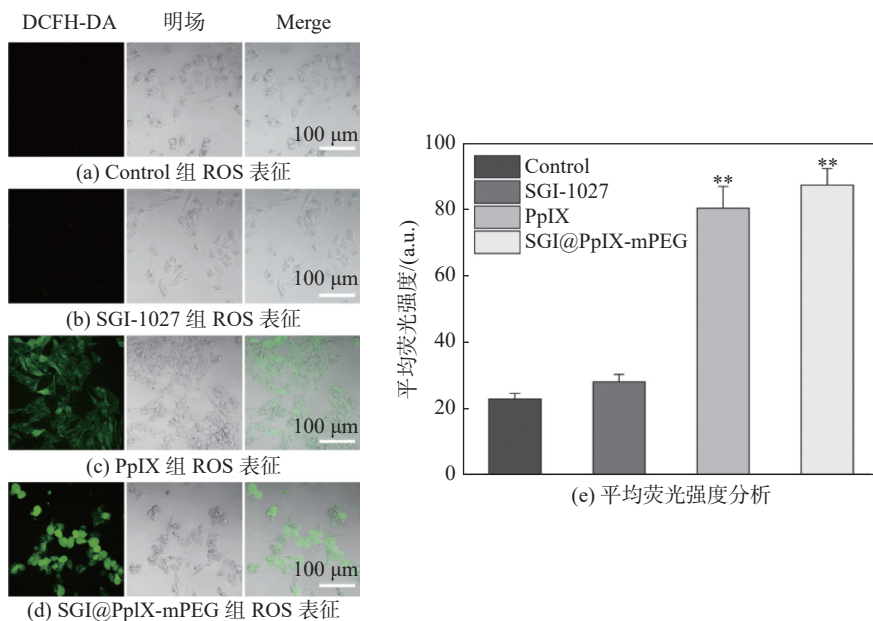


图 3 ROS 的表征

Fig. 3 The characterization of ROS

图 4 是共聚焦显微镜下拍摄的所有组别中细胞的形态表征。在绿色通道之中, Control 组和 SGI-1027 组中没有出现绿色荧光, 而 PpIX 和 SGI@ PpIX-mPEG 组中则出现了大量荧光, 说

明经过 635 nm 激光光照之后, PpIX 和 SGI@ PpIX-mPEG 都表现出了其细胞杀伤性导致 A375 细胞死亡, 而 SGI-1027 并不能导致癌细胞死亡。在共聚焦显微镜明场的视野下, Control 组

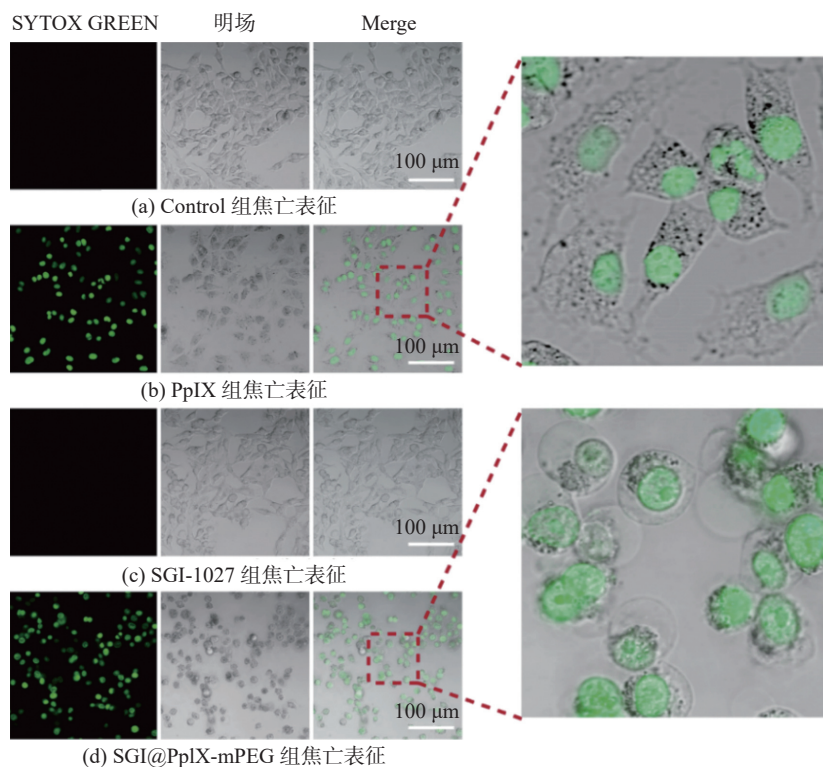


图 4 焦亡形态表征

Fig. 4 The characterization of pyroptosis

和 SGI-1027 组中的细胞形态都没有发生明显变化,而在 SGI@ PpIX-mPEG 组中很明显地观察到细胞呈现出肿胀状态,细胞膜与细胞内容物出现分离的趋势,表现出焦亡的细胞形态。PpIX 组中的细胞虽然已经死亡,但是却没有呈现出细胞焦亡的形态,而是表现出皱缩破碎形态,这是细胞凋亡的典型特征。其产生的原因是由于细胞内的活性氧水平的上升,而活性氧是调控凋亡通路关键蛋白 Caspase-3 的重要物质^[12-13]。图 4(b)和图 5(d)中红色虚线框表示的是对 PpIX 组和 SGI@ PpIX-mPEG 组中图像局部区域的放大,可以更为显著地观察到经过两种不同处理方式之后 A375 细胞形态之间的差异。由此可见,所合成的 SGI@ PpIX-mPEG 能够诱导 A375 细胞走向焦亡,并且有显著的杀伤作用。

2.5 SGI@ PpIX-mPEG 光动力疗效的研究

为了对比传统的光敏剂 PpIX 与合成的新型光敏剂药物 SGI@ PpIX-mPEG 光动力治疗效果方面的差异,采用常用的细胞毒性实验 CCK-8 来评估不同实验组之间细胞存活率的差异。CCK-8 试剂中含有水溶性四唑盐-WST-8,在细胞微环境下会被还原成黄色甲瓞产物,其含量越多证明体系中存在的活细胞数量越多,因此被广泛应用于细胞毒性或药物筛选等实验^[14-15]。

如图 5 所示是各组别细胞存活率的柱状图,图中 SGI-1027 组的细胞存活率为 87.66%,较 Control 组没有显著差别,证明该组别的细胞毒性较小。SGI@ PpIX-mPEG 组的细胞存活率仅有 28.34%,比 PpIX 组的 39.12% 降低了 10.78%,说明 SGI@ PpIX-mPEG 通过细胞焦亡的方式杀

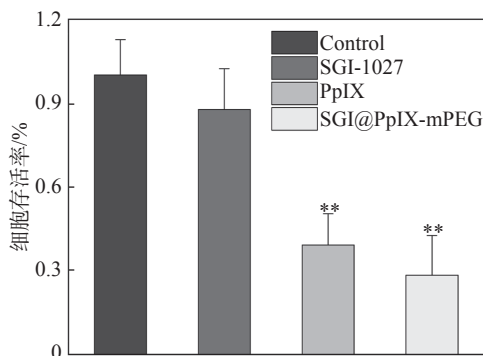


图 5 细胞存活率检测

Fig. 5 Cell viability assay

伤肿瘤细胞的效果要优于传统光敏剂 PpIX 的光动力治疗效果,与预期的实验结果基本保持一致。

3 结 论

本文在传统光敏剂 PpIX 的基础上,利用聚合物 PMHC₁₈-mPEG 的自组装特性,将去甲基化药物 SGI-1027 与传统光敏剂构建成黑色素瘤的协同治疗体系,在光动力治疗的基础上引入了细胞焦亡的治疗手段,通过共聚焦显微镜的表征验证所合成的 SGI@ PpIX-mPEG 不仅能够产生活性氧杀死癌细胞并且能够导致癌细胞焦亡。且通过细胞毒性实验发现当 SGI@ PpIX-mPEG 作用于 A375 恶性黑色素瘤细胞时治疗效果相对于传统的光动力治疗提升了 10.78%,在一定程度上改良了传统的光敏剂,并且通过细胞吞噬实验证明此新型光敏剂药物具有良好的生物相容性,可以在短时间内进入细胞并发挥作用,有望在黑色素瘤治疗的领域得到进一步应用。

参考文献:

- [1] 小普布卓玛. 光动力学疗法辅助治疗黑色素瘤的研究进展 [J]. *重庆医学*, 2015, 44(21): 2994 – 2996.
- [2] FISHER C, OBAID G, NIU C, et al. Liposomal lapatinib in combination with low-dose photodynamic therapy for the treatment of glioma[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2019, 8(12): 2214.
- [3] SHIN D Y, KIM G Y, LI W, et al. Implication of intracellular ROS formation, caspase-3 activation and Egr-1 induction in platycodon D-induced apoptosis of U937 human leukemia cells[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2009, 63(2): 86 – 94.
- [4] KIM M S, CHANG X, YAMASHITA K, et al. Aberrant promoter methylation and tumor suppressive activity of the *DFNA5* gene in colorectal carcinoma[J]. *Oncogene*, 2008, 27(25): 3624 – 3634.
- [5] RILOVA E, ERDMANN A, GROS C, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 4-amino-N-(4-aminophenyl) benzamide analogues of quinoline-based SGI-1027 as inhibitors of DNA methylation[J]. *ChemMedChem*, 2014, 9(3): 590 – 601.
- [6] HU L, CHEN M, CHEN X R, et al. Chemotherapy-induced pyroptosis is mediated by BAK/BAX-caspase-

- 3-GSDME pathway and inhibited by 2-bromopalmitate[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11(4): 281.
- [7] ZHANG Z W, ZHANG H, LI D B, et al. Caspase-3-mediated GSDME induced Pyroptosis in breast cancer cells through the ROS/JNK signalling pathway[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, 25(17): 8159 – 8168.
- [8] LI Y S, YUAN Y, HUANG Z X, et al. GSDME-mediated pyroptosis promotes inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2021, 28(8): 2333 – 2350.
- [9] PRENCIPE G, TABAKMAN S M, WELSHER K, et al. PEG branched polymer for functionalization of nanomaterials with ultralong blood circulation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(13): 4783 – 4787.
- [10] WANG C G, GUAN Y K, LV M Z, et al. Manganese increases the sensitivity of the cGAS-STING pathway for double-stranded DNA and is required for the host defense against DNA viruses[J]. *Immunity*, 2018, 48(4): 675 – 687.E7.
- [11] ROTH B L, POOT M, YUE S T, et al. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(6): 2421 – 2431.
- [12] SU X M, CHEN Y, WANG X B, et al. PpIX induces mitochondria-related apoptosis in murine leukemia L1210 cells[J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2014, 37(3): 348 – 356.
- [13] JIANG L R, MALIK N, ACEDO P, et al. Protoporphyrin IX is a dual inhibitor of p53/MDM2 and p53/MDM4 interactions and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells[J]. *Cell Death Discovery*, 2019, 5: 77.
- [14] BRITTON D R, YAHIRO L, CULLEN M J, et al. Centrally administered CCK-8 suppresses activity in mice by a "peripheral-type" CCK receptor[J]. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1989, 34(4): 779 – 783.
- [15] BLACKSHAW L A, GRUNDY D. Effects of cholecystokinin (CCK-8) on two classes of gastroduodenal vagal afferent fibre[J]. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 1990, 31(3): 191 – 201.

(编辑: 张 磊)