

光动力过程中线粒体膜表面电位和细胞存活关系

魏荣慧, 黄燕萍, 李琳, 祁春媛

(华东师范大学光谱学与波谱学教育部重点实验室,
华东师范大学物理系, 上海 200062)

摘要: 以 1-anilionaphthalene-8-sulfonate (ANS) 作荧光探针, 通过其荧光光谱研究了苯硫基酞菁锌 (ZnPcS)、苯硫基铝酞菁 (AlPcS) 和烷氧基铝酞菁 (AlPc) 这三种金属酞菁配合物作为光敏剂的光动力作用对癌细胞线粒体膜表面电位的影响。研究表明, 光动力作用后线粒体膜表面电位降低, 表面电荷数面密度增加。ZnPcS 的影响最大, 这与酶联免疫检测光动力作用后对癌细胞的杀伤效果相一致, 提示细胞线粒体膜可能是金属酞菁配合物在光动力过程中的作用位点。通过比较细胞线粒体膜表面电位以及表面电荷数面密度与细胞存活之间的关系, 阐述了光动力作用的物理学机制。同时, 由于线粒体膜电位与细胞凋亡的密切关系, 金属酞菁配合物对线粒体膜表面电位的影响提供了一个衡量药物疗效的判据。

关键词: 金属酞菁; 光动力治疗; 线粒体膜表面电位; 细胞存活率; 物理机制

中图分类号: Q632

1 引言

生物膜因磷脂、蛋白质和糖类的离子化而具有表面电荷和表面电位, 构成了膜的相应的生物学功能。Ren 等^[1]认为光敏剂最早是在细胞的线粒体中聚积, 之后扩散到细胞质中, 并由实验数据得到证实。Roberson 等^[2]研究了线粒体膜表面电位对 ANS (1-anilionaphthalene-8-sulfonate) 结合以及荧光的影响; 生文君等^[3]通过 ANS 荧光研究了 pH 对紫膜表面电位的影响。黄燕萍等^[4]通过 ANS 荧光研究了细菌视紫红质能化态时表面电位的非线性光学机制。本文以 ANS 作荧光探针, 研究了光动力过程中苯硫基钛菁锌 (ZnPcS, 简称 Pc1)、苯硫基铝酞菁 (AlPcS, 简称 Pc2) 和烷氧基铝酞菁 (AlPc, 简称 Pc3) 这三种金属酞菁对癌细胞线粒体膜表面电位的影响, 又用酶联免疫检测了三种金属酞菁光敏剂对细胞存活的作用, 并对灭癌效果最好的 Pc1 作了时间效应曲线。通过比较不同条件下癌细胞线粒体膜表面电位跟细胞存活之间的关系, 探讨光动力作用的物理机制。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

BCat-37 乳腺癌细胞购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所; Pc1、Pc2、Pc3 和 ANS 购

自 Sigma 公司。胰蛋白酶为 Difco 进口分装; 二甲亚砜、乙酸乙酯购自上海东懿化学试剂公司; 小牛血清、RPMI1640 培养基购自上海实生生物技术有限公司; 金属酞菁配合物溶液浓度为 20 mg/L, 溶剂为乙酸乙酯与二甲亚砜的混合溶液 (体积比为 9:1)。荧光分光光度计为日立 MC-970 型。

2.2 方 法

2.2.1 细胞培养

BCat-37 乳腺癌细胞常规培养在 37°C 含 10% 小牛血清、1 单位/mL 青霉素和 24 mg/L 链霉素的 1640 培养基中, 培养到 5~6 代。

2.2.2 样品的制备

BCat-37 乳腺癌细胞经 0.2% 胰蛋白酶消化, 制成细胞密度为 2×10^5 个/mL 的细胞悬液, 接种到 5 ml 细胞培养瓶中, 待细胞在瓶中长至 80% 面积时分别加入 0.5 ml 配制好的 Pc1、Pc2 和 Pc3, 在培养箱中培养 3.5 h 后, 换新鲜培养基。置于 200 W 卤钨灯下加隔热玻璃和红色滤光片 (光波波长为 600~750 nm) 照射 30 min, 之后离心收集; 设不加金属酞菁不光照的平行对照组。

收稿日期: 2004-07-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (10405010)

通讯作者: 黄燕萍, 电话: (021)62232713,

E-mail: yphuang@Phy.ecnu.edu.cn

滴定 ANS 与膜结合后的饱和曲线, 结果如图 1 所示。ANS 的正比区域为 1~50 $\mu\text{mol/L}$, 取 ANS 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 进行下面的实验。

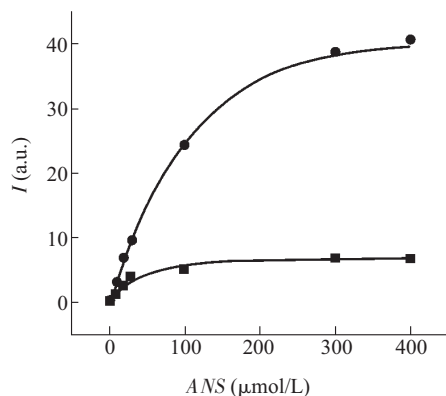


Fig.1 The relationship between fluorescence of mitochondrial-ANS solution and ANS concentration. ■: Control; ●: Pc1+light

在 Pc1、Pc2、Pc3 和对照组中加入相同浓度 ANS, 以后分别称为样品 1、样品 2、样品 3 和样品 4。

2.2.3 荧光检测

用波长 370 nm 的光激发 ANS 水溶液, 得到荧光峰值在 516 nm 的荧光光谱。用同样波长的光激发不加光敏剂的癌细胞对照组样品 4, 荧光光谱显示其峰值位于 470 nm。

用波长 370 nm 的光激发 Pc1 溶液, 荧光峰值在 410 nm 处, 且峰值极低。用同样波长的光激发样品 1, 在 470 和 516 nm 处有峰值。

用波长 370 nm 的光分别激发样品 1、样品 2、样品 3 和样品 4。在相同荧光峰位置 470 nm 处得到不同的峰值强度, 记录在案。

按文献[2]方法测得线粒体表面电位在相对零电位时的荧光强度为 $I_0=6.1$ 。

2.2.4 结果测试

对 Pc1、Pc2 和 Pc3 作灭杀癌细胞的疗效测试。对 Pc1 作光照时间对线粒体膜表面电位影响的测试。

3 结果

3.1 ANS 荧光谱峰值位置及其蓝移

结合脱辅基血红蛋白的 ANS 的荧光激发谱峰值在 370 nm 左右, 我们用 370 nm 光激发水中的 ANS, 得到的荧光发射谱如图 2 中曲线 2 所示。其

中有 516 和 420 nm 二个强度显著不同的峰值位置。可认为前者是 ANS 的荧光发射谱峰值位置, 后者表明 ANS 中含有杂质。水中 ANS 的荧光量子产率极低, 荧光很弱, 该项杂质的显示也极为有限, 在 ANS 与不同样品结合的荧光光谱中将被淹没, 故不会影响对问题的讨论。图 2 中曲线 1 表明 ANS 与癌细胞结合后的荧光峰值位置 (470 nm) 比水中 ANS 的峰值位置 (516 nm) 有近 50 nm 的蓝移。ANS 的荧光峰值位置因溶液极性降低而向短波长位移, 表明 ANS 与癌细胞结合后微环境发生了变化。

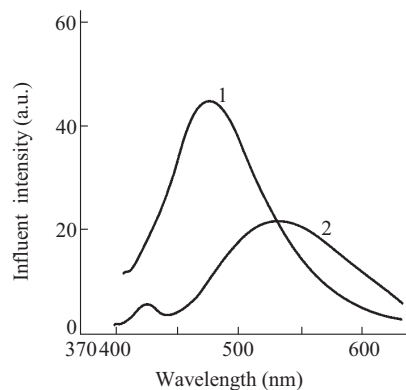


Fig.2 Fluorescence spectra of ANS in H_2O and combined with cancer cells. 1: ANS-cancer cell; 2: ANS- H_2O

3.2 用以判断膜表面电位的荧光峰值位置的确定

酞菁类配合物在可见光区域 (600~800 nm) 有强电子 $\pi-\pi^*$ 类跃迁, 称为宽带, 它的吸收系数大于 10^4 cm^{-1} 。图 3 中有三条曲线, 曲线 3 是用 370 nm 光激发的 Pc1 的荧光谱, 表明光敏剂金属酞菁本身的荧光, 对 ANS 与癌细胞结合后的荧光

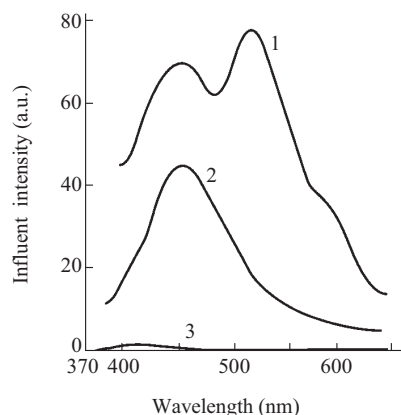


Fig.3 Fluorescence spectra of ANS and Pc1. 1: ANS-Pc1-cancer cell; 2: ANS-cancer cell; 3: Pc1

谱的测量没有实质性的影响。曲线 1 是在样品 1 中加入 ANS 后的荧光发射光谱。它在 470 和 516 nm 处都有峰值,前者与曲线 2 (ANS 与癌细胞结合后的荧光光谱)的峰值位置一致,说明 ANS 除了与癌细胞有结合,还存在游离的 ANS 成分。因此,用 470 而不是 516 nm 处的荧光峰值来判断癌细胞线粒体膜表面电位是正确的选择。

3.3 相同浓度光敏剂对膜表面电位的影响

ANS 对膜的结合力 b 取决于配体对结合位点的亲和力和,也与配体浓度 $[c]$ 和解离常数 K_d 有关。当 $K_d \gg [c]$ 时, b 与 $[c]/K_d$ 成正比。ANS 的荧光强度 I 与结合力成正比,因而与解离常数 K_d 成反比。由离子解离反应的吉布斯自由能可以求出线粒体表面电位与荧光强度的关系式^[3]:

$$\begin{aligned} \psi - \psi_0 &= RT/zF \ln(K_d/K_d^0) \\ &= (2.3RT/F) \ln(I_0/I) \end{aligned}$$

式中 R 为气体常数, T 为绝对温度; z 为离子电荷数, F 为法拉第常数。 ψ 、 K_d 和 I 为膜表面电位 (mV)、解离常数和对应的荧光峰值强度, ψ_0 、 K_d^0 和 I_0 为其零点值。当取 $T=298$ K, 代入得膜表面电位增加值为:

$$\Delta\psi = -59 \ln(I/I_0)$$

由上式可见,与线粒体结合的 ANS 的荧光强度越大,相应的线粒体膜表面电位越低。由实验中测得的四种样品的荧光光谱峰值,计算出三种金属酞菁配合物对线粒体膜表面电位的影响,在图 4 中示出。可见在相同的条件下, Pc1 对线粒体膜表面电位的影响最大,而 Pc2 的影响大于 Pc3。从对 Pc1、Pc2 和 Pc3 所做的癌细胞存活率的测试结果

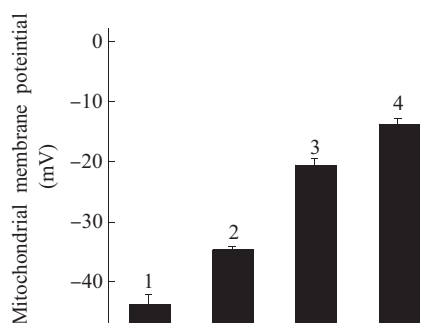


Fig.4 Effect of different metal phthalocyanine on surface membrane potential of mitochondria at irradiation time of 30 min. The differences between all the results are significant statistically ($P < 0.01$). 1: Pc1+light; 2: Pc2+light; 3: Pc3+light; 4: Control

(图 5), 可看出 Pc1 对癌细胞的杀伤率最大, 细胞存活率最小。其次是 Pc2, Pc3 对癌细胞的杀伤率最小。

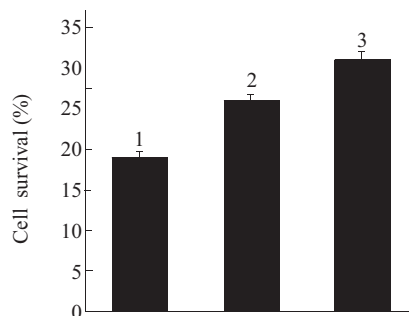


Fig.5 Effect of different metal phthalocyanine on cell survival at irradiation time of 30 min. The differences between all the results are significant statistically ($P < 0.01$). 1: Pc1+light; 2: Pc2+light; 3: Pc3+light

3.4 光照时间对膜表面电位的影响

在光动力过程中,除了注入光敏剂外,还要给予适当波长的光照剂量。从图 6 可见,癌细胞样品不加光敏剂金属酞菁而光照,与加光敏剂但不光照,膜表面电位几乎没有变化。只有加光敏剂又光照组,在光照 30 min 后,膜表面电位发生了极大变化。

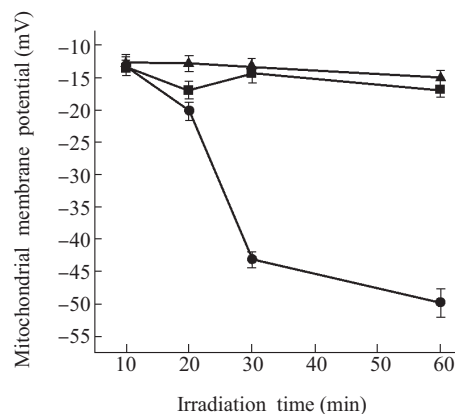


Fig.6 Effect of irradiation time on surface membrane potential of mitochondria with Pc1 as the photosensitizer.

▲: Pc1; ■: +light; ●: Pc1+light

3.5 癌细胞线粒体的表面电荷面密度

有人从非线性光学角度研究金属酞菁,认为它们都是具有显著非线性光学性能的有机聚合物,在恰当的光场激发下,通过共振非线性效应,产生以

电子-空穴对形式出现的激子,致使生物线粒体膜表面电荷密度发生变化^[5]。阐明表面电荷面密度对表面电位的依赖关系的 Guoy-Chapman 理论可表述为^[6]:

$$4A^2\sigma^2/C=\exp(-z\psi_e/kT)$$

式中 C (mol/L) 为介质中盐浓度, z 为离子电荷数, e 为电子电量, k 为玻耳兹曼常数, A 为与温度有关的常数, 在文献[5]中已列出不同温度下的 A 值。在本文中 $A=135.8$, $T=298$ K, $kT/e=25.70$ mV, $C_{\text{KCl}}=0.04$ mol/L。表面电位取单位 mV 时, σ 取 10^{-16} 电荷数/cm², 从上式可求出对照组和光敏剂作用(以 Pc1 为例)后线粒体膜表面电荷数面密度分别为 $(9.61\pm 0.01)\times 10^{12}$ 和 $(17.58\pm 0.03)\times 10^{12}$ /cm², 即光动力作用能显著提高线粒体的表面电荷数面密度。

4 讨 论

细胞凋亡作为细胞固有的、受机体严密调控的细胞死亡形式,在多细胞生物体消除衰老细胞及无能细胞等方面发挥重要的作用。近年来细胞凋亡的研究重点已从细胞核转向线粒体。凋亡机制的深入研究表明,在几乎所有诱导剂引起的各种类型的细胞凋亡中,如剔除神经生长因子的交感神经元细胞凋亡、糖皮质激素诱导淋巴细胞凋亡、肿瘤坏死因子诱导的单核细胞凋亡,均出现线粒体膜电位下降。各种死亡信号诱导线粒体膜通透性改变孔(permeability transition pore, PT pore)开放,引起线粒体膜电位下降,导致凋亡物质释放,继而激活 Caspase,最终使细胞凋亡^[7]。实验结果表明:与对照组相比,金属酞菁作用后癌细胞线粒体膜表面电位明显降低,线粒体膜表面电荷密度增加。在相同条件下, Pc1 对线粒体膜表面电位的影响最大,而 Pc2 影响大于 Pc3,这同 MTT 结果细胞存活率 $\text{Pc1}<\text{Pc2}<\text{Pc3}$ 相一致。同时,光动力作用效果最好的 Pc1 对时间依赖的效应研究表明,光照时

间效应对线粒体膜表面电位有一定影响。Leonid Brown^[8]曾报导,生物体内静电场变化是大规模蛋白质构象发生变化的主要原因。从光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)的物理学过程来分析, PDT 光敏剂都是具有显著的非线性光学效应的有机聚合物。这可能是由于在恰当的光场激发下,金属酞菁通过共振非线性效应,产生以电子-空穴对形式出现的激子,致使癌细胞线粒体膜表面电荷密度发生变化。线粒体膜表面电荷密度的变化势必引起膜表面电位的改变,从而引起跨膜电位的变化,当膜电位低于阈值时,就会诱导细胞凋亡。同时,由于线粒体膜电位的重要生理意义,不同金属酞菁用于光动力治疗对线粒体膜表面电位的影响,提供了衡量其光动力疗效的依据。实验结果表明 Pc1 的光动力效率优于 Pc2,而 Pc2 优于 Pc3。

参考文献:

- [1] Ren QG, Wu SM, Peng Q, Chen JY. Comparison of 5-Aminolevulinic acid and its hexylester medicated photodynamic action on human hepatoma cells. *Acta Biochemistry et Biophysics Sinica*, 2002,34:650-654
- [2] Roberson DE, Rottenberg H. Membrane potential and surface potential in mitochondria. *The Journal of Biological and Chemistry*, 1983,258(18):11039-11048
- [3] 生文君,谈曼琪,张衡涛,张克,石志远. pH 对紫膜表面电位的影响. *生物物理学报*, 1991,7(1):14-17
- [4] 黄燕萍,沈珊雄,李琳,黄立,李庆国. 细菌视紫红质能化态时表面电位的非线性光学机制. *光学学报*, 2003,23(8):902-905
- [5] 李琳,黄燕萍,李珊珊,戴允文. 三种金属酞菁配合物的非线性光学性质研究, *光谱学与光谱分析*, 2004,24(2):149-151
- [6] Aveyrad R, Haydon DA. An introduction to the principle of surface chemistry. London: Cambridge University Press, 1973. 70-74
- [7] 蔡循,陈国强,陈竺. 线粒体跨膜电位与细胞凋亡. *生物化学与生物物理学进展*, 2001,28(1):3-6
- [8] Brown LS, Kamikubo H, Zimanyi L. A local electrostatic change is the cause of the large-scale protein conformation shift in bacteriorhodopsin, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:5040-5044

RELATIONSHIP BETWEEN MITOCHONDRIAL MEMBRANE SURFACE POTENTIAL AND CELL LIVABILITY IN PHOTODYNAMIC THERAPY

WEI Rong-hui, HUANG Yan-ping, LI Lin, QI Chun-yuan

(Key Laboratory for Optical and Magnetic Resonance Spectroscopy, Department of Physics, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: With ANS as fluorescence probe, effect of three metal phthalocyanines on mitochondrial membrane surface potential and charge density in photodynamic therapy were investigated; meanwhile, cell survival was studied by MTT. Results showed that effect of ZnPcS was most prominent and its effect on mitochondrial membrane surface potential was coincident with the result of MTT. The mitochondrial membrane may be the binding site of photosensitizers in PDT. Because of the close relationship between mitochondrial membrane potential and cell apoptosis, the effect of photosensitizers on mitochondrial membrane surface potential proves an evidence for its curative effect, and the physical mechanism in PDT was discussed.

Key Words: Metal phthalocyanines; Photodynamic therapy; Cell survival; Physical mechanism