

## 几种国产光敏剂的光动力学效应、 皮肤光敏副反应及毒性的比较研究

王耐勤 于 刚 梁亚云 \*叶爱莲 \*张 燕 \*袁启忠

(北京市肿瘤防治研究所; \*北京市制药工业研究所)

**提要** 本文选用六项指标对国产3种光敏剂HPS、LF-019和Y-HPD与美国产的Photofrin II进行了光动力学效应、皮肤光敏副反应及毒性的比较研究。结果表明国产三种光敏剂光敏效应的主要指标均比Photofrin II强。在三种光敏剂中,以Y-HPD的作用最好,除光敏副反应比HPS和LF-019明显外,从其它五项指标观察,如Y-HPD加照光对MGC-803细胞的杀伤作用;对 $L_{615}$ 小鼠存活时间的影响;对 $L_{1210}$ 细胞核酸生物合成的影响;Y-HPD在 $L_{1210}$ 细胞内的含量,以及小鼠的 $LD_{50}$ , Y-HPD均比HPS和LF-019强。

**关键词** 光敏剂; 光动力学效应; 耳或皮指数; 血卟啉; 光卟啉 II

光敏剂是光辐射疗法的必要条件。迄今为止,国内外临床在光辐射疗法中仍沿用血卟啉衍生物(HPD)作为光敏剂。与此同时,许多学者也企图从卟啉类物质中寻找光动力学效应更强,毒副反应更小的光敏剂。国内自开展激光-血卟啉治疗恶性肿瘤的研究以来,已有几种新血卟啉衍生物提供试用。如北京市制药工业研究所研制的新血卟啉分离物(HPS)<sup>(1)</sup>;中国医科院药物研究所的LF-019和扬州生化制药厂的扬州光卟啉(Y-HPD)等。本实验的目的系选用能较客观地反映光敏剂的疗效、光敏副反应和毒性的六项指标,对上述3个国产血卟啉衍生物进行比较试验,并与美国产的第二代血卟啉衍生物光卟啉 II (photofrin II) 进行比较。

### 材料、方法和结果

HPS、LF-019和Y-HPD分别由前述的研制单位提供原料药,均为黑褐色结晶,冰箱中避光保存,实验前用生理盐水配制成所需浓度。photofrin II由美国ORD公司进口。

$^3\text{H-TdR}$ 比活性为41.5 Ci/mM;  $^3\text{H-UR}$ 比活性为30 Ci/mM,购自中国科学院原子能研究所。

本实验所用的光源均为北京灯泡厂生产的黑光灯,功率30 W,波长主峰395 nm。癌细胞悬液的照光时间均为6 min,光源与细胞培养瓶距离5 cm。

#### 1. 对体外培养的人胃癌细胞株的杀伤效应

取培养于含20%小牛血清的Eagle's培养液中传代的MGC-803人胃低分化粘液腺癌细胞株<sup>(3)</sup>,稀释成 $3 \times 10^4$ 细胞/ml,分装于培养瓶中,每瓶3 ml。待细胞贴壁后,分别加入5或10  $\mu\text{g/ml}$ 的所试光敏剂,对照组细胞不加药,每组5瓶细胞。在37°C避光下孵育1 h,更换新营养液后进行照光,照光后再孵育4或16 h,用台盼兰排斥法计活细胞数。本实验重复一次。

结果见图1。5  $\mu\text{g}$ 或10  $\mu\text{g/ml}$ 浓度的4种光敏剂+照光,无论4 h或16 h组,对MGC

-803 细胞均有明显的杀伤效应。其中以 Y-HPD 和 LF-019 最强; photofrin II 次之; HPS 最弱。

## 2. 对 $L_{615}$ 小鼠存活时间的影响

按常规用 Eagle's 液将接种  $L_{615}$  白血病细胞后 6 h 小鼠脾制成悬液, 分为 5 瓶。其中 4 瓶分别加入 4 种光敏剂  $5 \mu\text{g/ml}$ , 一瓶不加药供对照。避光孵育 1 h 后照光。照光后立即给  $L_{615}$  小鼠皮下注射脾细胞悬液, 每只 0.2 ml, 每组 10 只动物。观察各组动物的存活时间。

结果可见, 对照组小鼠平均于第 10 天死亡; photofrin II 组生存期延长 54%; LF-019, HPS 和 Y-HPD 组的生存期分别延长 284, 333 和 368%, 并且与 photofrin II 组间有显著差异 ( $P < 0.01$ ), 其中以 Y-HPD 组的效果最好 (见表 1)。

Tab 1. The effect of four photosensitizers plus exposure to light on the survival time of  $L_{615}$  mice

Group	Average survival time (day)	Prolongation of life %
	( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )	
Control	$10.0 \pm 0.63$	
Photofrin II	$15.4 \pm 3.5^{***}$	54
LF-019	$38.4 \pm 11.1^{**}$	284*
HPS	$43.3 \pm 11.1^{**}$	333*
Y-HPD	$46.8 \pm 4.4^{**}$	368*

10 mice in each group;

\*\*\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \* Compared with photofrin II group ( $P < 0.01$ )

## 3. 对 $L_{1210}$ 细胞核酸生物合成的影响

取接种在 DBA 小鼠腹腔内的  $L_{1210}$  细胞, 用含 20% 小牛血清的 Eagle's 液制成  $1 \times 10^6/\text{ml}$  的细胞悬液, 分为 5 组。其中 4 组分别加入  $5 \mu\text{g/ml}$  的四种光敏剂, 对照组不加药。避光孵育 30 min 后照光。将每组细胞悬液均分为 10 瓶, 加入  $^3\text{H-TdR}$  或  $^3\text{H-UR}$  0.5

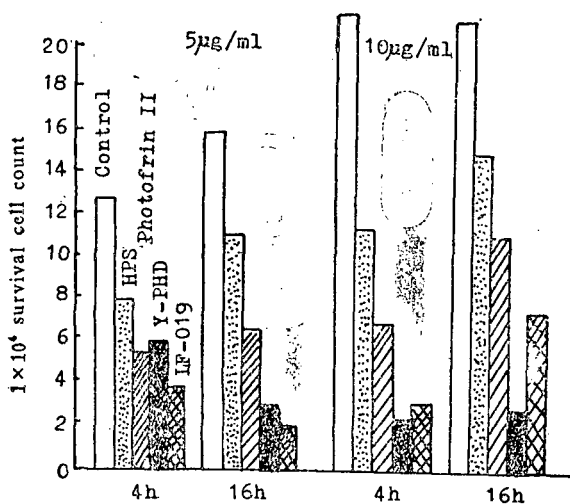


Fig 1. The killing action of photosensitizers plus exposure to light on MGC-803 cells

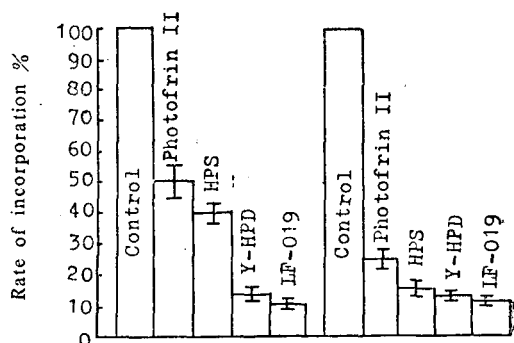


Fig 2. The effect of four photosensitizers plus exposure to light on  $^3\text{H-TdR}$  or  $^3\text{H-UR}$  incorporated into DNA or RNA

$\mu\text{Ci/ml}$ , 继续孵育 1 h。然后, 立即吸取每瓶细胞悬液经  $0.45 \mu\text{m}$  的纤维微孔滤膜抽滤, 收集细胞, 5 ml 生理盐水冲洗, 5% TAC 破坏细胞, 无水乙醇固定。用 FJ-2100 液闪仪记录 CPM 值。以对照组的 CPM 值为 100%, 求出各实验组的掺入率。

结果几种光敏剂 + 照光对  $^3\text{H-TdR}$  或  $^3\text{H-UR}$  掺入  $L_{1210}$  细胞的 DNA 或 RNA 都有明显的抑制效应。三种国产光敏剂均比 photofrin II 强, 且 LF-019 和 Y-HPD 对  $^3\text{H-TdR}$  掺入的抑制效应强于 HPS。但对  $^3\text{H-UR}$  掺入的影响三者无差别(图 2)。

#### 4. 光敏剂在 $L_{1210}$ 细胞中荧光强度的比较

用 Hank's 液将  $L_{1210}$  细胞稀释成  $1 \times 10^5/\text{ml}$  悬液, 分为 5 管, 分别加入  $5 \mu\text{g/ml}$  的四种光敏剂, 一管供对照。孵育 30 min 后, 生理盐水洗两次。细胞悬液中加入 0.1N 盐酸酸化, 在岛津 RF-502 型荧光分光光度计上测各管的相对荧光强度。测定参数: 发射波长 630 nm, 激发波长 405 nm。比较细胞对 4 种光敏剂的摄取情况。

另取腹腔内接种  $L_{1210}$  的 DBA 小鼠 5 只, 接种后第 5 日分别 iv 10 mg/kg 的 4 种光敏剂或生理盐水。30 h 后处死动物, 吸取腹水稀释成  $1 \times 10^5/\text{ml}$  的细胞悬液。用盐水洗两次后, 测定细胞内的相对荧光强度。比较癌细胞对四种光敏剂的摄取和储留情况。

从  $L_{1210}$  细胞在体外摄取几种光敏剂后所显示的荧光强度观察, 以 Y-HPD 和 HPS 被细胞摄取最多, photofrin II 最低。从  $L_{1210}$  小鼠 iv 几种光敏剂 30 h 后的细胞内荧光强度比较, 则以 Y-HPD 含量最高。表明  $L_{1210}$  细胞对 Y-HPD 不仅摄取多, 而且储留时间长(表 2)。

Tab 2. Comparison of fluorescence of the four photosensitizers in  $L_{1210}$  cells

Drug	Time (h)	Relative intensity of fluorescence
Photofrin II	0.5 ( <i>in vitro</i> )	$0.47 \pm 0.03$
LF-019		$0.77 \pm 0.03$
HPS		$1.22 \pm 0.04$
Y-HPD		$1.18 \pm 0.03$
Photofrin II	30 ( <i>in vivo</i> )	$0.26 \pm 0.03$
LF-019		$0.27 \pm 0.05$
HPS		$0.30 \pm 0.04$
Y-HPD		$0.49 \pm 0.02$

#### 5. 几种光敏剂的急性毒性( $\text{LD}_{50}$ )比较

取 18~22 g 昆明种小鼠, 雌雄各半。光敏剂经 iv 给药。观察 2 周内各不同剂量组动物的死亡率。按改良寇氏法求  $\text{LD}_{50}$  及 95% 平均可信限。

据 Dougherty 报告<sup>(4)</sup> photofrin II 的  $\text{LD}_{50}$  为 130 mg/kg。本实验所测得的 LF-019、HPS 和 Y-HPD 的  $\text{LD}_{50} \pm 95\%$  平均可信限分别为  $116.9 \pm 11.1 \text{ mg/kg}$ ;  $154.7 \pm 20.6 \text{ mg/kg}$ ; 和  $204.7 \pm 15.7 \text{ mg/kg}$ 。以 Y-HPD 的毒性最低。

#### 6. 光敏剂对皮肤光敏副反应的比较

18~22 g 昆明种小鼠剪除背毛, 均分为 10 组, 每组 10 只。实验时分别 iv 10 mg/kg 的四种光敏剂, 对照组给盐水。其中 5 组给药后立即将动物俯位固定于特制的本板上, 在 60 W 日光灯下照光 4 h。另 5 组给药 48 h 后给予照光。照光后立即处死动物, 分别精确剪取两耳(直径 0.4 cm)及背部皮肤(直径 1.2 cm)的圆形皮片, 称重。分别求出各组的耳指数和皮指数<sup>(1,2)</sup>。

从表 3 的结果可见, 给小鼠 iv 四种光敏剂后立即照光, 均可看到小鼠耳及皮肤肿胀, 耳指数及皮指数明显高于对照组。以 photofrin II 和 Y-HPD 的光敏副反应最强; LF-019 和 HPS 的反应最弱。在给予光敏剂 48 h 后照光组, 仍以 Y-HPD 的光敏副反应最强(皮指数), 但经统计学处理, 各给药组与对照组间无显著差异。表明光敏剂对小鼠的致光敏副反应持续时间较短。

Tab 3. Comparison of four photosensitizers with respect to the side action of skin photosensitivity (10 mice in each group)

Group	Time (h)	The ear index ( $\bar{X} \pm SD$ )	The skin index ( $\bar{X} \pm SD$ )
Control	0	94.1 ± 17.4	393.9 ± 108.5
Photofrin II	0	142.3 ± 31.3*	781.5 ± 193.2**
HPS	0	146.1 ± 30.3**	624.7 ± 204.3*
LF-019	0	169.3 ± 37.9**	658.8 ± 241.0*
Y-HPD	0	181.4 ± 49.6**	874.7 ± 204.3**
Control	48	101.9 ± 17.4	374.0 ± 104.7
Photofrin II	48	114.0 ± 9.8	420.9 ± 84.4
HPS	48	106.2 ± 9.8	346.4 ± 90.1
LF-019	48	110.4 ± 12.6	406.0 ± 99.6
Y-HPD	48	100.0 ± 9.8	443.5 ± 123.0

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

## 讨 论

实验结果表明, 国产光敏剂 + 照光对癌细胞的光敏效应(HPS 除外); 对癌细胞核酸生物合成的抑制作用, 均优于 photofrin II, 且后者在  $L_{1210}$  细胞中的含量较低, 光敏副反应也较明显。

在国产的 3 种光敏剂中, 以 Y-HPD 的优点较多, 如对癌细胞的杀伤效应和对核酸生物合成的抑制作用强, Y-HPD 在  $L_{1210}$  细胞中的含量高; 贮留时间长; 急性毒性也较其他光敏剂低。Y-HPD 唯一不足之处是光敏副反应较明显, 与 photofrin II 近似。HPS 除光敏副反应低于其他各光敏剂外, 其他指标均不及 LF-019 和 Y-HPD。

随着国内有关光敏疗法治疗恶性肿瘤工作的开展, 今后定会有更多的新光敏剂问世。实验室选用哪几项指标对新光敏剂进行筛选, 临床前的药理评价与临床的相关性如何, 都是值得探索的问题。我们初步认为, 选用本文所使用的六项指标, 或再加上带瘤动物的光敏疗法体内实验<sup>(5~8)</sup>, 当会较客观地评价新光敏剂的光动力学效应及毒副反应。

## 参 考 文 献

1. 王耐勤等. 血卟啉新分离物-HPS 光敏效应的实验研究. 肿瘤 1985; 5:49.
2. 程雨时等. 一种简便的比较光敏副作用的方法及其在寻找光敏副作用防治药的作用. 药学报 1985; 20:395.
3. 王凯华. 人体胃低分化粘液腺癌系 MGC-803 的建立及其生物学特性初步观察. 实验生物学报 1983; 16:257.
4. Dougherty TJ et al. Photoradiation therapy 2. Cure of animal with hematoporphyrin and light. *J Nat Cancer Instit* 1975; 55:115.
5. Dougherty TJ, et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumor. *Cancer Res* 1978; 38:2628.
6. Nicoline AC, et al. Inhibition of DNA synthesis and lateral mobility in hematoporphyrin treated cells. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1981; 22:1114.

7. 李占荣等. 血卟啉衍生物-光辐射对 L<sub>1210</sub> 白血病细胞核酸生物合成的影响. 药学报 1985; 20:17.  
8. 卢志达等. 血卟啉衍生物 (HPD)-激光对动物移植性瘤杀伤作用的实验研究. 中华医学杂志 1983; 63:326.

## A COMPARATIVE STUDY ON THE PHOTODYNAMIC EFFECT, PHOTOSENSITIVE SIDE ACTION AND TOXICITY OF SEVERAL CHINA-MADE PHOTOSENSITIZERS

WANG Nai-Qin, YU Gang and LIANG Ya-Yun \*YE Ai-Lian, \*ZHANG Yan and \*YUAN Qi-Zhong

(Beijing Institute for Cancer Research, Beijing; \*Beijing Pharmaceutical Industrial Institute, Beijing)

**ABSTRACT** In this paper, the photodynamic effect, photosensitive side action and acute toxicity of three China-made new hematoporphyrin derivatives, HPS, LF-019 and Y-HPD were compared with those of America-made photofrin II. The experimental method included: (1) the killing effect of photosensitizer plus exposure to light on MGC-803 cells, (2) the survival time of mice that received L<sub>615</sub> cells pretreated with photosensitizer and light, (3) the inhibitory effect on <sup>3</sup>H-TdR or <sup>3</sup>H-UR incorporated into DNA or RNA, (4) the uptake and storage of photosensitizers in L<sub>1210</sub> cells, (5) the ear index and skin index that showed skin photosensitive side action and (6) the LD<sub>50</sub> in mice.

The results showed that the photodynamic effect of the three China-made photosensitizers was more potent than that of photofrin II. In the three China-made photosensitizers, except for the skin photosensitive side action, Y-HPD was more potent than HPS or LF-019 on the killing effect of MGC-803 cells, the survival time of L<sub>615</sub> mice, the inhibitory effect of nucleic acid biosynthesis and the content of photosensitizers in L<sub>1210</sub> cells. The acute toxicity of Y-HPD was lower than that of other photosensitizers.

**Key words** Photosensitizers; Photodynamic effect; Ear and skin index; Hematoporphyrins; Photofrin II