

几种血卟啉衍生物对肿瘤细胞光动力学灭活作用的比较

徐承熊* 战洪生 林琳 王永泉** 韩锐

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

提要 本文用小鼠 L_{1210} 淋巴白血病细胞和 B_{16} 黑色素瘤细胞研究了几种国内试制的血卟啉衍生物制剂对肿瘤细胞的光动力学灭活作用。与国外新一代血卟啉衍生物 Photofrin II (DHE) 相比, LF-019 和扬州光卟啉 (Y-HPD) 的活性更显著。本文采用了 Trypan blue 排斥试验与注射瘤细胞后观察小鼠存活时间两种评价药物作用的方法, 发现两者的结果是一致的。

关键词 血卟啉衍生物; 光动力学灭活作用; 细胞培养

血卟啉衍生物(HPD)具有为瘤组织选择性吸收和贮存的特性⁽¹⁾。在可见光照射下, HPD 能够发出特征性的荧光及产生细胞毒作用⁽²⁾。这些性质使 HPD 受到国内外研究者的重视, 正在对它应用于肿瘤定位诊断及治疗的可能性进行探讨, 而且已经取得了初步的成效⁽³⁾。光卟啉 II (Photofrin II) 是 Dougherty 等通过生物凝胶过滤法从 HPD 中分离的一个组分, 具有活性强, 用量小, 光敏副作用轻等优点⁽⁴⁾, 是受到各国研究者重视的第二代血卟啉衍生物。本实验以光卟啉 II 作为阳性对照药物, 比较了几种国内试制的血卟啉衍生物对小鼠 L_{1210} 淋巴白血病细胞及 B_{16} 黑色素瘤细胞的光动力学灭活作用, 并对用肿瘤细胞在体外进行血卟啉类制剂抗肿瘤活性的筛选方法进行了初步的探索。

材 料 与 方 法

细胞系 L_{1210} 细胞在 DBA/2 小鼠腹腔生长。接种后 4 天用 Hank's 平衡盐液 (HBS) 洗出腹腔内瘤细胞, 经离心洗涤和低张液去除红细胞后用含 10% 小牛血清的 HBS 配成悬液待用。体外传代的 B_{16} 细胞用含 20% 小牛血清的 α -MEM 培养液培养。在底面积约 12 cm² 的玻璃培养瓶中接种 $1\sim 2 \times 10^5$ 个细胞后置 5% CO₂ 温箱中 37°C 培养 4 天, 使细胞形成贴壁的单层, 在每瓶含 $5\sim 7 \times 10^5$ 个细胞时进行实验。

药物 光卟啉 II 又称 Dihematoporphyrin Ethers (DHE), 系美国 Photofrin Medical Inc. 出品。使用时用 Dulbecco's 磷酸缓冲液 (PBS) 稀释至 1 mg/ml。扬州光卟啉 (Y-HPD) 及 HA-308 由扬州生化制药厂提供。LF-019 由我所合成室制备。均以 PBS 制备成 1 mg/ml 溶液灭菌过滤后 4°C 避光保存。

细胞的药物处理 L_{1210} 细胞配成 $1\sim 2 \times 10^7$ /ml 悬液, 加入 HPD 制剂 2~16 μ g/ml,

本文于 1984 年 5 月 22 日收到

* 中国医学科学院放射医学研究所

** 中国医学科学院肿瘤研究所

37°C保温 1 小时。离心洗去药液后配成 $5 \sim 10 \times 10^6/\text{ml}$ 悬液,分装在培养瓶中每瓶 2 ml 进行光照。 B_{16} 细胞在弃去原培养液后用 HBS 洗一遍,加含 10% 小牛血清的 HBS 2 ml,HPD 制剂 $2 \sim 16 \mu\text{g}/\text{ml}$,37°C保温 1 小时后洗去药液,每瓶加 2 ml 10% 血清 HBS 后进行光照。

光辐照源 由两支 30 W 黑光灯管组成,主波长为 395 nm。在灯管上方约 5 cm 处置置玻璃板,将待照射的培养瓶顺灯管排列,每次照射 30~40 瓶。光照在室温下进行。

细胞杀伤率测定 光照后即刻将培养瓶放置在冰浴中,2 小时后 L_{1210} 细胞用最终浓度为 0.1% 的 Trypan blue 染色; B_{16} 细胞先用滴管将贴壁细胞通过机械吹打作成悬液,再用 Trypan blue 染色。活细胞率以排斥染料的细胞占细胞总数的百分比表示。每一实验点由两个重复样品组成,由两人平行取样用血球计数盘计数,每批试验通常重复 3~5 次,取均数及标准误作图比较。为了检验染料排斥试验测定细胞杀伤率的可靠性,有两批实验把 L_{1210} 细胞同时给 DBA/2 小鼠接种,观察小鼠的活存天数。

实 验 结 果

(一) 血清、光照时间及光照后放置时间对活细胞率的影响

L_{1210} 细胞用不含血清的 HBS 配成 $3 \times 10^7/\text{ml}$ 的悬液,加入 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DHE 或 Y-HPD,经 37°C 1 小时后活细胞率由 94% 下降为 75.9% 及 52.0%,说明虽未经光照,细胞经药物处理后也有部分死亡。进一步实验发现,即使不用药物,悬浮于 HBS 中的细胞在 37°C 下也逐渐死亡。在 HBS 中加入 10% 小牛血清对细胞有一定的保护作用(表 1)。

用含 10% 血清 HBS 配制的细胞悬液加 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DHE 或 Y-HPD 37°C 处理 1 小时后,活细胞率无明显变化(表 2)。因此在以后的实验中当细胞用药物处理或光照时,都在 HBS 中加入 10% 小牛血清。

L_{1210} 细胞用 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ DHE 或 Y-HPD 在 37°C 温育 1 小时后,洗去药液光照 5~30 分

Tab 1. The effect of calf serum (CS) on the viability of L_{1210} cells suspended in Hank's balanced saline (HBS)

	HBS without CS			HBS with 10% CS		
	No of living cells $10^6/\text{ml}$	No of dead cells $10^6/\text{ml}$	Viability %	No of living cells $10^6/\text{ml}$	No of dead cells $10^6/\text{ml}$	Viability %
Before incubation	11.5	2.25	83.6	11.4	1.90	85.7
37°C 1 h	12.9	3.50	78.7	12.6	2.45	83.7
37°C 2 h	8.90	4.10	68.5	11.9	2.95	80.1

Tab 2. The viability of L_{1210} cells suspended in HBS with 10% calf serum and treated with HPDs in 37°C for 1 h

Concentrations of HPDs $\mu\text{g}/\text{ml}$	Cellular viability	
	DHE	Y-HPD
2	92.9	87.2
4	91.9	87.1
8	89.8	90.4
16	92.9	91.3
Control	86.6	92.6

钟。照射 5 分钟时，用 Y-HPD 和 DHE 处理的细胞的存活率分别下降为 50.8% 和 52.5%，10 分钟时进一步下降为 8.47% 和 20.0%。但是，当照射时间延长至 20 和 30 分钟时，活细胞率不再进一步下降，保持在 10~20% 的水平。说明照射 10 分钟已足以使药物处理细胞产生杀伤效应。

在实验初期，细胞在照射后立即就用 Trypan blue 染色计数。后发现在计数过程中继续有一些细胞被着色，因此观察了照射后放置不同时间计数对结果的影响。L₁₂₁₀ 细胞用 2~16 μg/ml 的 DHE 或 Y-HPD 处理后光照 10 分钟，照后将细胞置冰浴中经 30 分，2 小时和 4 小时进行计数，结果见图 1。用 Y-HPD 处理的细胞在照后 30 分钟计数时，细胞的杀伤已接近完全，与 4 小时的死亡率曲线相差无几。但是，用 DHE 处理的细胞 30 分钟后损伤尚未充分显现，2 小时与 4 小时的杀伤率明显提高。由于 2 小时与 4 小时结果基本相同，可以认为照后放置 2 小时已使细胞损伤充分显现。

(二) DHE, HA-308, Y-HPD 和 LF-019 活性的比较

用 10 μg/ml HPD 制剂处理的 L₁₂₁₀ 细胞用黑光灯照射不同时间，光照时间与细胞活力的关系见图 2。单用药物和单用光照处理的细胞的存活率与正常对照相似。给药组经光照后活细胞率指数下降，在存活曲线的起始部位有一个斜率较小的肩部。在进行比较的 3 个制剂中，LF-019 效果最好，Y-HPD 次之，DHE 较弱。

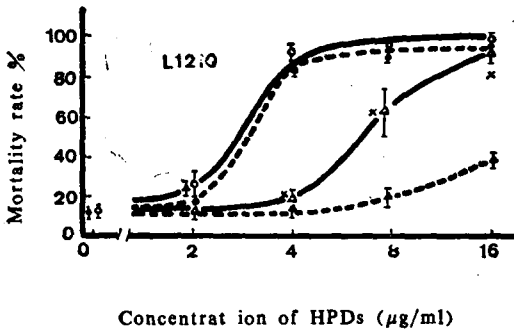


Fig 1. Changes of the mortality rate of L₁₂₁₀ cells at different times after exposure to HPDs and light
Y-HPD:○ 30 min, ●——○ 4 h after exposure
DHE:△ 30 min, ×——△ 4 h after exposure

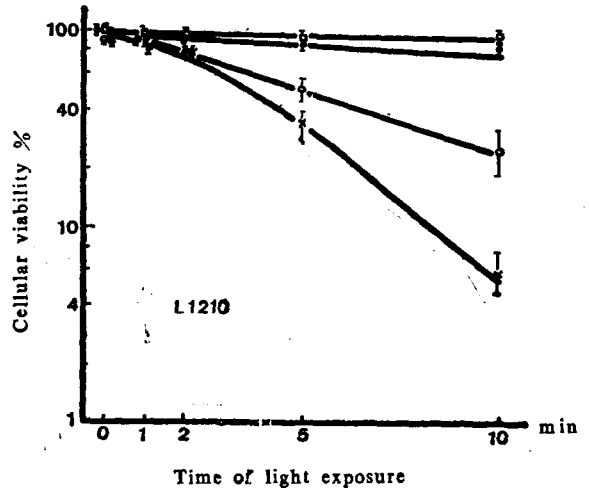


Fig 2. L₁₂₁₀ cells exposed to 10 μg/ml DHE (●), Y-HPD (◻) and LF-019 (×), and light, the relationship between irradiation time and cellular viability is shown. The viability of cells treated with light (◻) or HPDs alone is higher than 90%

L₁₂₁₀ 细胞在用不同浓度的 HPD 制剂处理后光照 10 分钟，冰浴中放置 2 小时后经 Trypan blue 染色测定活细胞率，结果见图 3。Y-HPD 在药物浓度较低时即表现出明显的光动力学作用。当药物浓度为 8 μg/ml 时，Y-HPD 活性最高，HA-308 次之，DHE 较差。但当药物浓度为 16 μg/ml 时，HA-308 的作用与 Y-HPD 接近，DHE 仍较差。

用 B₁₆ 细胞作类似试验时，细胞的存活曲线见图 4。在作比较的 4 种药物中，仍以 LF-019 的作用最强，用 16 μg/ml 处理及光照 10 分钟后活细胞率小于 3%。DHE, HA-308 和 Y-

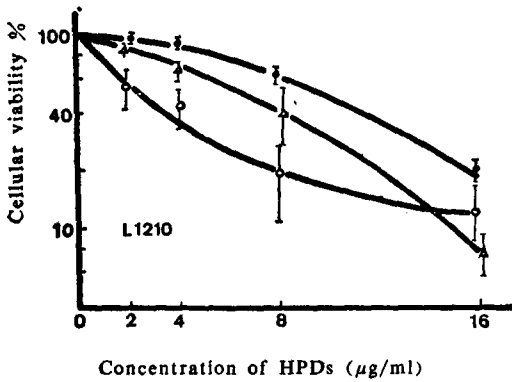


Fig 3. The photodynamic inactivation of L₁₂₁₀ cells treated with DHE (◦), HA-308 (△) and Y-HPD (◐) and exposed to light for 10 min

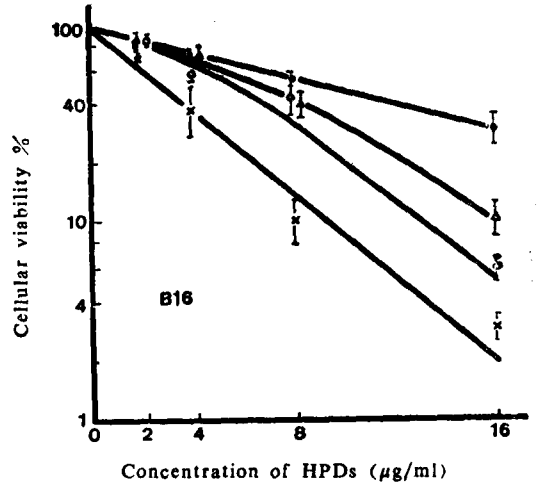


Fig 4. The photodynamic inactivation of B16 cells treated with DHE (•), HA-308 (△), Y-HPD (◐) and LF-019 (×), and exposed to light for 10 min

HPD 对 B16 细胞的作用与对 L₁₂₁₀ 细胞的作用相似, DHE 的作用仍然最弱。根据图 4 推算, DHE 对 B₁₆ 细胞杀伤作用的 IC₅₀ 约为 8.2 μg/ml, HA-308、Y-HPD 和 LF-019 依次约 6.2, 5.3 和 2.5 μg/ml。

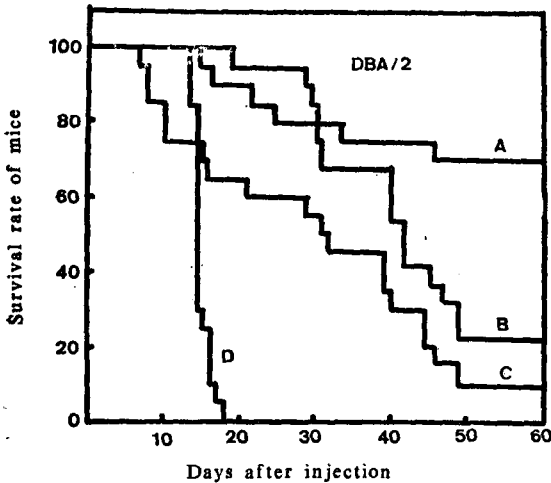


Fig 5. The survival time of mice received 1×10^6 L₁₂₁₀ cells pretreated with 10 μg/ml HPDs and exposed to light for 10 min. A: LF-019, B:Y-HPD, C: DHE, and D: Control(light alone)

(三) 用 DHE, Y-HPD, LF-019 处理并光照的 L₁₂₁₀ 细胞给小鼠注射后对小鼠存活时间的影响

L₁₂₁₀ 细胞在体外用 10 μg/ml 的 HPD 制剂 37°C 作用 1 小时, 洗去药液后光照 10 分钟, 然后给每组 10 只 DBA/2 小鼠腹腔注射, 每只小鼠 1×10^6 个细胞。每天记录小鼠的存活率。图 5 为两批实验结果的综合。LF-019 组小鼠在 60 天尚有 14 只存活, 活检腹腔中无瘤细胞。Y-HPD 和 DHE 组分别有 4 只和 2 只小鼠存活; 对照组在 18 天内全都死亡。如活存小鼠的存活天数以 60 天计, 则对照组, DHE 组, Y-HPD 组和 LF-019 组的平均存活天数依次为 14.6 ± 0.3 天, 30.4 ± 4.0 天, 42.2 ± 2.8 天和 49.9 ± 3.8 天。

讨 论

在研究血卟啉衍生物和光辐射对体外瘤细胞的杀伤作用时通常采用三种方法, 即集落形成法⁽⁶⁾, 细胞增殖法⁽⁶⁾及 Trypan blue 排斥试验法⁽⁷⁾。由于排斥试验具有简便, 快速等优点, 为不少研究者所采用⁽⁷⁻¹⁰⁾。一般认为含卟啉的细胞在可见光作用下产生单态氧。它是

一种强烈的氧化剂,可以与氨基酸,不饱和脂肪酸等相互作用,引起细胞膜蛋白质交联,抑制电子传递系统,改变膜的通透性而导致细胞死亡⁽¹¹⁾。由于光灭活作用的这种特点,使用 Trypan blue 排斥试验能比较可靠地反映细胞的杀伤率。本实验把经 HPD 制剂与光照处理的 L₁₂₁₀ 细胞给小鼠注射,小鼠存活时间以 LF-019 组最长, Y-HPD 组次之, DHE 组较差,与 Trypan blue 排斥试验结果吻合,说明用排斥法作此类药物的初筛是可行的。Kinsey 等⁽¹⁰⁾曾比较了用排斥法与集落形成法测定 AKR-MCA 细胞经 HPD 和光照处理后的存活率,也发现两法的结果基本一致,但集落形成法更敏感些。本研究表明,经 HPD 和光照处理的细胞,其损伤的显现需要一定的时间。由于各种药物所需的时间不完全一致(见图 1),在光照后即刻作检查不能正确反映药物的活性。照后在冰浴中放置 2 小时可使作用较慢的 DHE 的活性充分显现,又不致使 Trypan blue 着色细胞崩解,因此结果较为稳定,可以作为比较药物活性的一个指标。

在培养液中加入适量小牛血清对体外的细胞有一定的保护作用,但血清中含有一种 β -糖蛋白(Hemopexin),它与卟啉有很强的结合力,使与细胞结合的卟啉量下降⁽¹²⁾。由于 Hemopexin 在血清中含量不一致⁽⁹⁾,因此最好各批实验采用同一批号的血清以减少结果的波动。

目前各实验室采用的 HPD 与细胞共同温育的时间相差很大,从半小时⁽¹³⁾至 18 小时⁽⁸⁾均有。Sery⁽⁹⁾认为大约 3.5 小时可使致敏作用基本完成。我们采用温育 1 小时,按 Sery 的标准似不足够,因此对一些重点药物应进行不同保温时间对光动力学作用的影响。在本研究条件下,4 种 HPD 制剂中以 LF-019 的作用最强, Y-HPD 其次, HA-308 又次之,但 3 者的活性都比 DHE 强。DHE 是新一代血卟啉衍生物,其活性约为原 HPD(Photofrin I)的两倍。LF-019 和 Y-HPD 在体外的作用比 DHE 更强,因此值得对它们的药理作用作进一步研究,以便向临床试用过渡,这方面的工作正在进行。

参 考 文 献

1. Bugelski PL, et al. Autoradiographic distribution of HPD in normal and tumor tissue of the mouse. *Cancer Res.* 1981; 41:4606.
2. Lipson RL, et al. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Cancer* 1967; 20:2255.
3. 北京地区激光血卟啉治癌协作组, 激光-血卟啉诊断治疗恶性肿瘤. *激光医学* 1983, (1,2):1.
4. 徐石麟: 激光-血卟啉治癌症赴美考察(药物部分). 同上, 1983, (1,2):37.
5. Moan J, et al. The mechanism of photodynamic inactivation of human cells *in vitro* in the presence of haematoporphyrin. *Br J Cancer* 1979; 39:398.
6. Christensen T. Multiplication of human NHIK 3025 cells exposed to porphyrins in combination with light. *Ibid* 1981; 44:433.
7. Granelli SG, et al. Photochemotherapy of glioma cells by visible light and hematoporphyrin. *Cancer Res.* 1975; 35:2567.
8. Wakulchik S D, et al. Photolysis of protoporphyrin-treated human fibroblasts *in vitro*: Studies on the mechanism. *J Lab Clin Med* 1980; 96:158.
9. Sery TW. Photodynamic killing of retinoblastoma cells with hematoporphyrin and light. *Cancer Res* 1979; 39:96.
10. Kinsey JH, et al. Photodynamic effect of hematoporphyrin derivative as a function of optical spectrum and incident energy density. *Ibid* 1981; 41:5020.
11. Kessel D. Transport and binding of hematoporphyrin derivative and related porphyrin by murine leukemia L₁₂₁₀ cells. *Ibid* 1981; 41:1318.
12. Christensen T, et al. Photodynamic inactivation of synchronized human cells *in vitro* in the presence of hematoporphyrin. *Ibid* 1979; 39:3735.
13. Evensen J F, et al. Photodynamic action and chromosomal damage: A comparison of HPD and light with X-irradiation. *Br J Cancer* 1982; 45:456.

A COMPARATIVE STUDY ON THE PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF TUMOR CELLS IN THE PRESENCE OF SEVERAL HEMATOPORPHYRIN DERIVATIVES

XU Cheng-Xiong*, ZHAN Hong-Sheng, LIN Lin, WANG Yong-Quan** and HAN Rui

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

ABSTRACT The photodynamic effect of several newly prepared hematoporphyrin derivatives (HPDs) on L₁₂₁₀ and B₁₆ cells *in vitro* was compared. The cells pretreated with HPDs were exposed to black light and cellular viability was determined by trypan blue exclusion assay. Photofrin II (DHE), a new kind of commercial HPD, was used as a positive control. The results showed that the photodynamic effect of tested HPDs, LF-019, Y-HPD and HA-308 were more potent than that of DHE. The 50% inhibiting concentration (IC₅₀) for DHE was 8.2 μg/ml when the treated B₁₆ cells were exposed to the light for 10 min. However, the IC₅₀ for LF-019, Y-HPD and HA-308 were 2.5, 5.3 and 6.2 μg/ml respectively. The effect of LF-019 was 3 times that of DHE. In order to test the reliability of the trypan blue exclusion assay for evaluating the cell killing, the survival times of DBA/2 mice received 1×10^6 L₁₂₁₀ cells treated with HPDs plus light were measured. The results from these two assays were found to be in good agreement.

Key words Hematoporphyrin derivatives; Photodynamic inactivation; Cell culture

* Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin

** Institute of Cancer, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing