

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.08.001

• 基础研究 •

光动力疗法对小鼠B细胞淋巴瘤的体外和体内抗肿瘤作用

文兰英

Anti-tumor Effects of Photodynamic Therapy on Mouse B Cell Lymphoma *in vitro* and *in vivo*

WEN Lanying

Department of Obstetrics and Gynaecology, Yanbian University Hospital, Yanji 133000, China

Abstract: Objective To investigate the anti-tumor effects of photodynamic therapy (PDT) using Photodithazine, a chlorin e6 derivatives, as photosensitizer (PS) on mouse B cell lymphoma both *in vitro* and *in vivo*. **Methods** After treated with various concentrations (0.125-1.0 $\mu\text{g/ml}$) of PS, A20 cells were illuminated with 6.25 J/cm^2 of laser [wavelength (662 \pm 3) nm]. WST-1 assay was performed to detect the cell proliferation, electron microscopy was used to observe morphological changes, and flow cytometry (FACS) was applied to detect the apoptosis rate and the expression of B cell specific antigen-CD45R. We established lymphoma animal model by subcutaneously injecting A20 cells into Balb/c mice. Tumor growth was recorded after PDT intervening *in vivo*. The expressions of P53, P21 and Bax in tumor tissue were detected by Western blot. **Results** After PDT for 24 h, the growth of A20 cells was inhibited in the group with > 0.50 $\mu\text{g/ml}$ of PDT ($P < 0.05$), moreover, there was significant inhibition in the group with 0.25 $\mu\text{g/ml}$ of PDT after 48 h ($P < 0.01$). Apoptotic and necrotic cells were detected under the microscope. We successfully established lymphoma animal model and tumor growth was inhibited by PDT *in vivo* ($P < 0.05$). P53, P21 and Bax were highly expressed in tumor tissues which accepted PDT *in vivo*. **Conclusion** Photodithazine/PDT has anti-tumor effects on A20 lymphoma both *in vitro* and *in vivo*.

Key words: Photodynamic therapy (PDT); chlorin e6 derivatives; A20 cells

摘要: 目的 从体外和体内两个方面探讨二氢卟吩e6衍生物-Photodithazine作为光敏剂(PS)的光动力疗法(PDT)对B细胞淋巴瘤的抗肿瘤作用。**方法** 对A20细胞处理不同浓度(0.125~1.0 $\mu\text{g/ml}$)光敏剂后照射激光波长为(662 \pm 3) nm, 照射量为6.25 J/cm^2 。用水溶性四氮唑(WST-1)法测定各组细胞的增殖;用电子显微镜观察细胞形态学变化;流式细胞术(FACS)检测各组细胞的凋亡率及B细胞特异抗原CD45R的表达情况;建立Balb/c小鼠皮下移植瘤模型,对实验动物进行PDT干预后记录各组的肿瘤生长;用Western blot法检测凋亡相关蛋白的表达。**结果** 体外PDT治疗24 h后0.50 $\mu\text{g/ml}$ 浓度以上PDT组的A20细胞生长受到了抑制($P < 0.05$), 48 h后0.25 $\mu\text{g/ml}$ 浓度组细胞生长较对照组也明显抑制($P < 0.01$);实施PDT后A20细胞形态有了明显变化,镜下出现凋亡细胞和死亡细胞;建立了皮下移植瘤模型,观察到体外PDT抑制了淋巴瘤动物模型中肿瘤的生长($P < 0.05$);实施PDT的肿瘤组织中P53、P21及Bax等凋亡相关蛋白表达增加。**结论** Photodithazine为光敏剂的PDT治疗在体内和体外对A20淋巴瘤具有抗肿瘤作用。

关键词: 光动力学治疗;二氢卟吩e6衍生物;A20细胞

中图分类号: R733 **文献标识码:** A

0 引言

利用光来治疗疾病已有上千年的历史,随着光医学的发展,光动力学疗法的理念逐步建立^[1],近40年来,光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)在治疗恶性肿瘤的领域得到认可并成为新的肿瘤治疗方法。PDT是利用光敏剂和

相应波长的光线来引起靶组织(肿瘤细胞)的细胞凋亡、细胞坏死、血管破坏以及局部免疫作用,从而诱导细胞毒性作用的治疗方法^[2]。可以说光敏剂的开发和发展在PDT的建立和发展中起着关键性作用。第一代光敏剂有血卟啉衍生物(hematoporphyrin derivative, HPD)、二血卟啉酯或Porfimer sodium (Photofrin)等,第二代光敏剂主要有卟啉类的衍生物、外源性卟啉。第二代光敏剂具有组成和结构明确、体内代谢快、作用光波的波长较长、靶组织选择性高等优点,部分克

收稿日期: 2013-07-19; 修回日期: 2013-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260378)

作者单位: 133000 吉林延吉, 延边大学附属医院妇产科

作者简介: 文兰英(1980-), 女, 博士, 主治医师, 主要从事光动力学治疗的基础研究及临床应用

服了第一代光敏剂的缺点。

本研究将水溶性良好的Photodithazine (二氢卟吩e6葡萄糖衍生物) 作为光敏剂^[3-4], 对小鼠B细胞淋巴瘤进行光动力学治疗。通过体内外实验, 观察Photodithazine/PDT对A20细胞的杀伤效应及A20淋巴瘤动物模型的抗肿瘤效果, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

A20细胞株是小鼠B细胞淋巴瘤, 获赠于韩国汉阳大学Joong-Soo Han教授。细胞培养液用添加10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL), 0.37% sodium bicarbonate (Amresco, Solon, Ohio), streptomycin/penicillin (Gibco-BRL) 的RPMI 1640培养液, 并在37℃ CO₂下培养。

1.2 体外光动力学治疗和光学显微镜下观察

光敏剂是水溶性二氢卟吩e6衍生物Photodithazine (ZAO Veta, Moscow, Russia) 获赠于JeongHuan Lee教授 (Diatech Korea)。在96孔细胞培养板中按每孔 6×10^3 个细胞种植, 24 h后将浓度为0.125、0.25、0.5、0.75、1.0 μg/ml光敏剂和培养液的混合液来置换原有培养液。在培养液里避光培养12 h后, 去除含有光敏剂的培养液。再暗室照射6 J/cm²的663 nm激光。体外光动力学治疗24 h后, 在光学显微镜 (Olympus, Japan) 下观察细胞形态的变化。

1.3 水溶性四氮唑 (WST-1) 细胞增殖检测

体外光动力学治疗后, 在96孔细胞培养板的每个孔加入10 μl WST-1溶液 (Beyotime)。37℃培养1 h后将96孔细胞培养板在振动器上轻轻搅匀10 s, 酶标仪在450 nm处测吸光度值, 检测连续进行4日。

1.4 体外光动力学治疗后细胞凋亡的检测

采用Annexin V/PI双染色法和流式细胞仪来检测。体外光动力学治疗48 h后, 离心弃去培养液的方法收集细胞。每样本细胞数为(1~5) × 10⁶/ml, 900 g/min离心5 min。用孵育缓冲液 (10 mmol/L HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂) 洗涤1次, 900 g/min离心5 min。用孵育缓冲液重悬细胞, 添加5 μl Annexin V-FITC solution (BD, Franklin Lakes, NJ) 室温下避光孵育 (10~15) min。900 g/min离心5 min, 沉淀细胞孵育缓冲液洗1次。加入10 μl PI solution (100 μg/ml, BD) 溶液4℃下孵育20 min, 避光并

不时振动。流式细胞仪分析: 流式细胞仪激发光波长用488 nm, 用一波长为515 nm的通带滤器检测FITC荧光, 另一波长大于560 nm的滤器检测PI。

1.5 动物模型的建立和体内PDT

1 × 10⁶的A20细胞种植在雌性Balb/c小鼠皮下。待肿瘤直径平均约8 mm时随机分为4组: 对照组、光敏剂组、照射组及PDT组 (即光敏剂+照射)。PDT实施后每2~3 d用caliper测定肿瘤的长轴 (a), 短轴 (b), 高度 (c), 肿瘤的体积按a × b × c来计算, 肿瘤大小来分析PDT效果。体内PDT实施方法: 静脉内注射每公斤体重10 mg的光敏剂, 3 h后用光纤维导出相应波长的激光, 照射于肿瘤上, 来激活堆积在肿瘤上的光敏剂。所使用的激光总照射量为300 J/cm², 照射直径为1 cm, 照射时间为10 min。一部分实验动物在PDT治疗48 h后死亡, 采集肿瘤组织, 立即放入液氮, 待提取蛋白质。部分动物分别在左右侧各种植细胞, 一侧未进行PDT治疗, 另一侧进行PDT治疗, 以便肉眼直接观察肿瘤大小变化。

1.6 蛋白质提取和Western blot

将肿瘤组织用预冷的PBS冲洗2次, 擦干水分后加入液氮捣碎组织。将组织粉末移入1.5 ml microtube后加入细胞裂解液, 4℃静置30 min。12 000 r/min离心10 min, 取上清液, 用Bradford法进行蛋白定量。总蛋白经SDS-PAGE分离后, 转移至PVDF膜上。用5%脱脂奶粉封闭1 h。随后分别加入P21、P53、PARP及b-actin (santacruz) 等抗体, 室温孵育2 h, 用TBST漂洗3次, 再加入相应的二抗, 孵育1 h, 用TBST漂洗3次。电化学发光 (ECL), 暗室曝光, 洗片显示蛋白条带。

1.7 统计学方法

所有数据采用SPSS 11.0统计软件进行分析。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间均数比较采用t检验, 各组间比较采用析因分析, P < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A20细胞的特性

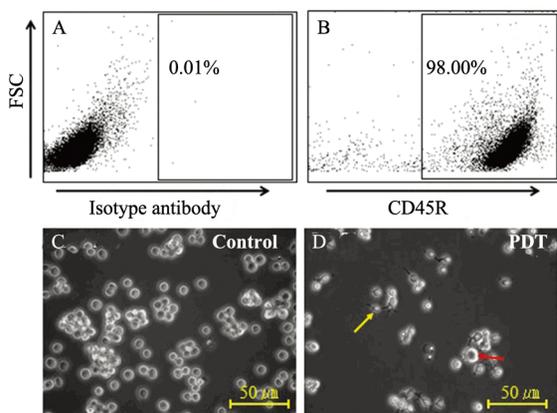
A20细胞起源于一个网状细胞肿瘤, 属Balb/c小鼠的B细胞淋巴细胞系, 以淋巴母细胞的形态生长。B细胞特异性抗体CD45R在A20细胞高表达, 见图1A、1B。A20细胞的形态均匀, 在400倍光学显微镜下显示为表面光滑, 中心部较暗边缘明显的球形细胞, 见图1C。

2.2 体外PDT对淋巴瘤细胞的增殖抑制

体外研究中PDT后A20细胞形态有了明显的变化：细胞表面出现伪足，细胞肿胀或收缩，见图1D。作为对照，设置了三种细胞：分别为对照组（未进行任何处理的细胞），照射组（仅进行激光照射的细胞），光敏剂组（只添加0.5 μg/ml光敏剂而未进行激光照射的细胞）。此三组细胞形态在光学显微镜下均未见明显变化。体外光动力治疗的细胞，即不同浓度光敏剂处理后激光照射的细胞中不同程度出现了细胞数目的减少和形态变化。PDT治疗24 h后，在低浓度0.125 μg/ml PDT组中细胞的形态学变化也不明显，自0.25 μg/ml开始PDT后上述变化比较明显，0.75 μg/ml PDT及以上浓度PDT后几乎全部细胞形态变形。使用不同浓度光敏剂，PDT后A20细胞体外增长均受到抑制，Photodithazine浓度越大，所测定出的OD吸光度越小。24 h后0.50 μg/ml浓度以上PDT组的细胞生长受到了抑制 ($P<0.05$)，48 h后0.25 μg/ml浓度组细胞生长较对照组也明显抑制 ($P<0.01$)。治疗24 h后对照组、照射组及光敏剂组的增殖十分相近，与对照组相比0.125、0.25、0.5、0.75、1.0 μg/ml光敏剂PDT治疗组的细胞生长率分别为 (103.0±3.4) %，(99.7±4.6) %，(77.5±4.2) %，(38.9±8.6) %，(9.9±2.1) %；48 h后分别为 (95.0±3.0) %，(88.8±2.9) %，(58.1±3.1) %，(21.8±0.7) %，(7.0±0.9) %，见图2。

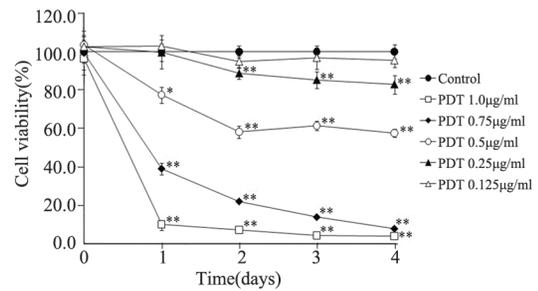
2.3 体外PDT对淋巴瘤细胞诱导细胞凋亡和坏死

PDT后24 h, Annexin V/PI双染色流式细胞分



CD45R was highly expressed on the surface of A20 cells(A:isotype antibody;B:CD45R antibody). Morphology of A20 cells before and after PDT were observed(C:control;D:PDT). Cellular swelling(red arrow) and shrinkage(yellow arrow) were observed simultaneously in the same field, 24h after 0.50 μg/ml Photodithazine/PDT treatment. Bar:50 μm

图1 A20细胞株中CD45R的表达及形态学变化
Figure1 CD45R expression and morphological changes in A20 cell line



A20 cells(1×10^6) were incubated with various doses of Photodithazine(0.125-1.0μg/ml)for 12 h at 37℃ and exposed to 6.25 J/cm² of laser light. The treated cells were further incubated at 37℃ for 4 days for WST-1 assay. (*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ in t-test with the control group)

图2 Photodithazine/PDT 实施后淋巴瘤细胞的生存率
Figure2 The survival rate of lymphoma cells after Photodithazine/PDT

析用于区分凋亡及坏死细胞。流式细胞仪结果，见图3。右下象限代表早期凋亡细胞，右上象限代表晚期凋亡细胞和坏死细胞。在对照组、照射组、光敏剂组、各浓度PDT治疗组中早期细胞凋亡率分别为3.5%、4.9%、3.8%、5.5%、8.5%、8.8%、8.8%、0.4%；除左下象限外三个象限所占细胞比率为13.3%、14.3%、14.2%、16.7%、21.7%、36.1%、60.1%、93.9%。

2.4 动物模型

自种植 1×10^6 的A20细胞4日起可触及皮下结节，约16日时肿瘤长轴可达8 mm，边界清楚，见图4A、4B。形成肿瘤后处死部分实验动物，提取种植物进行了形态学观察。HE染色显示：光学显微镜下瘤细胞大小比较一致，弥漫分布，核大深染，核圆形、卵圆形或不规则形，核染色质不均匀，胞质极少；用CD45R免疫组织化学染色后见：所有肿瘤细胞表面深染为棕色，强表达CD45R，见图4C、4D。

2.5 肿瘤抑制及肿瘤组织中凋亡相关蛋白的变化

光动力治疗后，对照组肿瘤仍继续增大，各径线变长，较对照组PDT组平均肿瘤生长缓慢，自2周始肿瘤体积减小，差异有统计学意义 ($P<0.05$)，见图5。从肿瘤组织中提取的蛋白质表达分析示：P21、P53、Bax 等蛋白的表达比对照组增加。

3 讨论

PDT在肿瘤治疗中，通过利用光敏剂和特定波长光照射后，一系列光动力反应所产生的单线态氧来选择性破坏肿瘤的。PDT以化学、光物理学、生理学为基础，结合其他领域的多学科综合

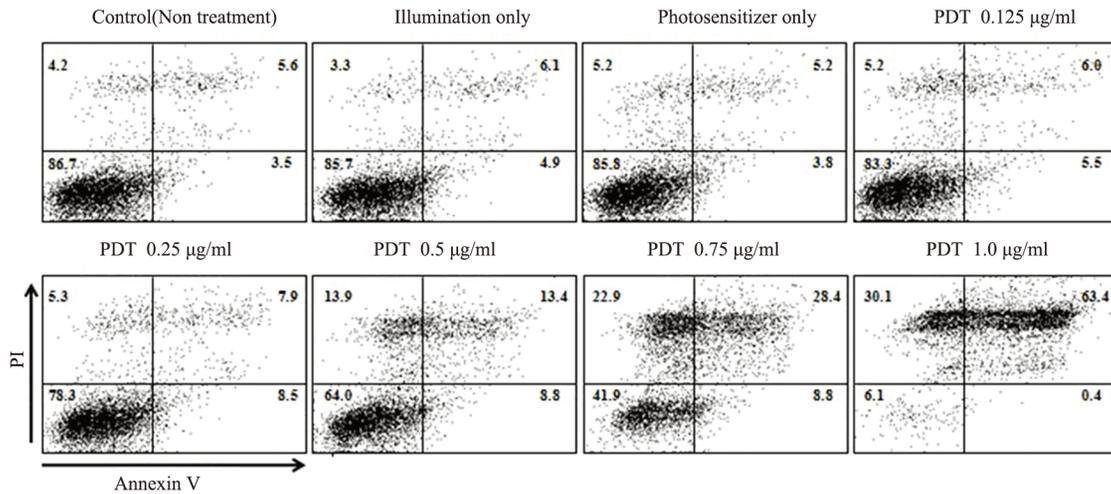
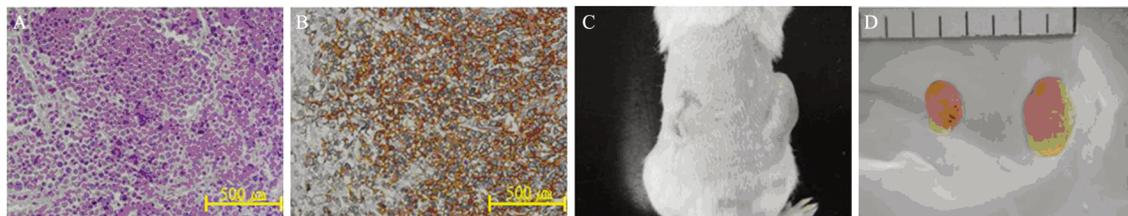


图3 Annexin V/PI染色后各组A20细胞的细胞凋亡及坏死

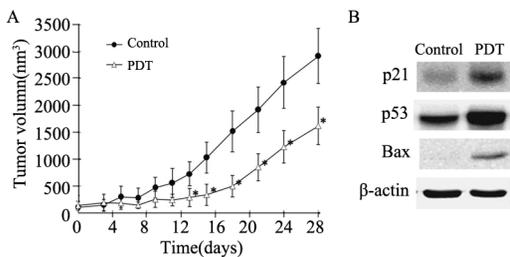
Figure3 Apoptosis and necrosis of A20 cells in each group after Annexin V/PI staining



A: typical large B-cell lymphoma(HE staining); B: atypical lymphoid cells in all regions were clearly stained by CD45R(Immunohistochemistry staining of CD45R). Scale bar: 500µm. The tumor volume was reduced with PDT(C,D left side) compared with that without PDT(C,D right side)

图4 肿瘤组织的镜下形态及PDT治疗后肿瘤的生长变化

Figure4 Microscopic findings of tumor tissues and growth changes after PDT



A: Tumor volume was measured and calculated every 2-3 days. Tumor growth was inhibited in PDT group versus that in control group (*:P<0.05);B:Western blot analysis was performed to detect the expression of apoptosis-associated protein in tumor tissues, after Photodithazine/PDT treatment for 48h

图5 Photodithazine/PDT实施后肿瘤的生长曲线及肿瘤组织的蛋白表达

Figure5 Tumor growth curves and protein expression of tumor tissues after Photodithazine/PDT

性很强的自然学科。为了提高光敏剂的吸收、增强选择性及快速代谢，各国研究者致力于新的光敏剂的开发和研究。Photofrin是第一个被批准应用的光敏剂，目前已在十多个国家获得政府药监部门批准，用于食管癌、肺癌、膀胱癌、宫颈癌与皮肤癌的治疗。第二代光敏剂中对5-氨基酮戊酸

(5-ALA)的研究较多，它是血红素的前体，在体内经一系列酶促作用，转化为光敏性强的原卟啉IX衍生物(PPIX)，聚集在肿瘤细胞内的PPIX，经激光照射后发生光动力反应，杀伤肿瘤细胞。

本研究选用俄罗斯开发研制的Photodithazine(化学名: N-dimethyl glucamine chlorin)，属于第二代光敏剂，在较长的红色区域有密集的吸收带(663 nm)^[3-4]。Photodithazine在TC-1小鼠肺癌细胞中主要被溶酶体吸收，小部分被线粒体吸收^[5]。在此项研究中经6.25 J/cm²的激光照射24 h后，对照组细胞存活率在0.25、0.5、0.75 µg/ml浓度时分别约为84.1%、69.2%、28.0%，这与本次结果较相近，但在各个浓度中对TC-1治疗效果更好，第一，这可能与细胞形态有关：较A20细胞TC-1的细胞体积大，附着于培养皿底部生长的有突起的细胞，A20是球形表面光滑的浮游生长的细胞，故在细胞表面积上有差异，接收照射面积有差异；第二，由于A20细胞的形态和生长方式，在同样的细胞存活研究中增加了起初种植细胞数目为每孔6×10³细胞，最后是照射装备的不同可能小部分影响到结果。但整体来说，Photodithazine/PDT抑

制了肿瘤细胞的生长, 且与光敏剂浓度增加而增强。同样, 对照组、照射组和光敏剂组三组的体外各项实验效果十分相近, 对A20细胞均无明显影响^[5]。PDT治疗后电子显微镜下可观察到凋亡细胞及坏死细胞; Annexin V/PI双染色流式细胞分析中也观察到右下象限代表早期凋亡细胞, 在各浓度 Photodithazine-PDT 后凋亡细胞和坏死细胞数目明显增加。

A20细胞是B淋巴细胞系, 通过尾静脉注射或皮下注射细胞的方法, 用作白血病或淋巴瘤的动物模型来使用^[6-8]。在本研究中皮下注射 1×10^6 的A20细胞, 成瘤率为100%, 肿瘤组织形态学检查发现呈典型的淋巴瘤, 且高表达CD45R。因该模型造模简单、肿瘤边界清楚、易测得肿瘤体积, 是理想的淋巴瘤动物模型。实际PDT应用中光的照射方法对疗效起着很重要的作用。体内的照射方法可分为: 表面照射 (Superficial illumination)、间质内照射 (Interstitial illumination)、管腔内照射 (Intraluminal illumination)、空洞内照射 (Intracavitary illumination)。根据肿瘤生长的方式, 选择合适的照射方法, 大多数实验动物模型采用的是皮下造模方式, 故一直以来研究者多采用间质内照射或表面照射方法^[9-11]。本研究中进行体内照射方法是投药3 h后一次性表面照射, 照射范围为直径10 mm的圆形区域 (肿瘤长径<8 mm)。实施体内PDT48 h后, 见大多数肿瘤表面中央部塌陷, 肿瘤生长较对照组缓慢, 但基底部分及边缘肿瘤组织仍有生长活性继续生长。若此现象在临床中出现, 第二期治疗中应该更改照射方向或照射方法, 治疗效果会更加明显。事实上在PDT领先国家PDT光传导物质的研究和针对不同部位肿瘤治疗的照射头研究也是非常积极和细分化的。结果显示, 不仅在体内实验中PDT后肿瘤体积受到控制, 肿瘤组织中提取的蛋白质经蛋白印记法分析高表达抑癌因子及凋亡因子, 分别为P21、P53、Bax, 这与其他光敏剂诱导的PDT在各种肿瘤的治疗中通过调整P21、P53等蛋白的结果是相近的^[12-13], 也是一个预测中的结果。

PDT作为治疗肿瘤领域中兴起的治疗方法, 因其具有创伤小、毒性低、选择性和适用性好、可重复治疗等多个优点, 而受到越来越多的重视。光敏剂、光源等核心要素的发展是PDT领域的关键。世界各国的研究者正积极研发水溶性更好、选择性更强、代谢更快、稳定性更好的第三代光敏剂^[11, 14-15], 而第三代光敏剂大多数是第二代光敏剂的衍生物。只有掌握更多关于第一代、第二代

光敏剂对不同肿瘤的特性、效能和机制, 才能将其有效地应用最大化。

参考文献:

- [1] Moan J, Peng Q. An outline of the hundred-year history of PDT[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(5A): 3591-600.
- [2] Allison R, Moghissi K, Downie G, *et al*. Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2011, 8(3):231-9.
- [3] Tran Thi Hai Yen, Ignat'eva EV, Polozkova AP, *et al*. Qualitative and quantitative analysis of a new lyophilized liposomal formulation of photodithazine[J]. *Pharma Chem J*, 2010, 44(6):337-40.
- [4] Romanko YS, Tsyb AF, Kaplan MA, *et al*. Relationship between antitumor efficiency of photodynamic therapy with photodithazine and photoenergy density[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2005, 139(4): 460-4.
- [5] Wen LY, Bae SM, Do JH, *et al*. The effects of photodynamic therapy with Photodithazine on HPV 16 E6/E7 associated cervical cancer model[J]. *J Porphyrins Phthalocyanines*, 2011, 15(3):174-80.
- [6] Wen LY, Bae SM, Ahn WS. Establishment of leukemia mouse model using mouse-derived A20 leukemic cells, and detection of tumor cells in bone marrow[J]. *Lab Anim Res*, 2010, 26(4):415-23.
- [7] Wen LY, Bae SM, Chun HJ, *et al*. Therapeutic effects of systemic photodynamic therapy in a leukemia animal model using A20 cells[J]. *Lasers Med Sci*, 2012, 27(2):445-52.
- [8] Heier I, Hofgaard PO, Brandtzaeg P, *et al*. Depletion of CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibits local tumour growth in a mouse model of B cell lymphoma[J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 152(2):381-7.
- [9] Ferrario A, von Tiehl KF, Rucker N, *et al*. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(15):4066-9.
- [10] Bae BC, Na K. Self-quenching polysaccharide-based nanogels of pullulan/folate-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(24):6325-35.
- [11] Lim DS, Bae SM, Kwak SY, *et al*. Adenovirus-mediated p53 treatment enhances photodynamic antitumor response[J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(3):347-52.
- [12] Chan WH. Photodynamic treatment induces an apoptotic pathway involving calcium, nitric oxide, p53, p21-activated Kinase 2, and c-Jun N-terminal Kinase and inactivates survival signal in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(2):1041-59.
- [13] Wei XQ, Ma HQ, Liu AH, *et al*. Synergistic anticancer activity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in combination with low-dose cisplatin on Hela cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(5):3023-8.
- [14] Ling D, Bae BC, Park W, *et al*. Photodynamic efficacy of photosensitizers under an attenuated light dose via lipid nano-carrier-mediated nuclear targeting[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(21):5478-86.
- [15] Tran TH, Bae BC, Lee YK, *et al*. Heparin-folate-retinoic acid bioconjugates for targeted delivery of hydrophobic photosensitizers[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(2):1615-24.

[编辑: 刘红武; 校对: 邱颖慧]