

血卟啉单甲醚介导的光动力治疗对巨噬细胞的作用

程佳丽¹, 李青松¹, 梁慧娟², 彭程海¹, 石 颀³, 张治国², 田 野^{1,3}

(1. 哈尔滨医科大学附属第一医院心内科, 黑龙江省哈尔滨市 150001; 2. 哈尔滨工业大学物理系, 黑龙江省哈尔滨市 150001; 3. 哈尔滨医科大学病理生理学教研室, 黑龙江省哈尔滨市 150081)

[关键词] 巨噬细胞; 血卟啉单甲醚; 动脉粥样硬化; 光动力治疗

[摘要] **目的** 研究血卟啉单甲醚介导的光动力治疗对巨噬细胞的作用。**方法** 检测血卟啉单甲醚随时间增加在巨噬细胞内的聚集量,共聚焦显微镜观察血卟啉单甲醚在细胞的聚集情况;用不同能量对巨噬细胞进行光动力作用,MTT 法观察巨噬细胞的存活率,流式细胞仪检测细胞凋亡率。**结果** 血卟啉单甲醚随着孵育时间的增加,细胞内荧光强度增加;随着光动力作用时间的增加细胞活性降低,光动力作用后 12 h 巨噬细胞的凋亡数量增加,光动力治疗 1.5 min 组晚期凋亡率(5.82% ± 3.27%)较对照组(1.20% ± 3.54%)稍有增加($P < 0.05$);光动力治疗 3 min 组晚期凋亡率(65.45% ± 5.17%)较对照组显著增加($P < 0.001$)。**结论** 血卟啉单甲醚可以在巨噬细胞内聚集,其介导的光动力治疗可以诱导巨噬细胞凋亡。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Hematoporphyrin Monomethyl Ether-Mediated Photodynamic Effects on THP-1 Cell-Derived Macrophages

CHENG Jia-Li¹, LI Qing-Song¹, LIANG Hui-Juan², PENG Cheng-Hai¹, SHI Sa³, ZHANG Zhi-Guo², and TIAN Ye^{1,3}

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001; 2. Department of Pathophysiology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150081; 3. Department of Physics, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

[KEY WORDS] Macrophage; Hematoporphyrin Monomethyl Ether; Atherosclerosis; Photodynamic Therapy

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) mediated photodynamic therapy (PDT) on macrophage. **Methods** Fluorescence of HMME with different incubated time was tested. Confocal scanning laser microscope was used to investigate HMME subcellular distribution. The survival and apoptosis rate of macrophages were determined by MTT assay and flow cytometer. **Results** HMME was identified to accumulate in the cytoplasm of macrophages by confocal scanning laser microscope. The number of apoptotic macrophages increased slightly in the photodynamic therapy for 1.5 min group(5.82% ± 3.27%) at 12 h post irradiation ($P < 0.05$), whereas increased significantly in the photodynamic therapy for 3 min group (65.45% ± 5.17%, $P < 0.001$). **Conclusions** HMME could accumulate in macrophages and HMME-mediated PDT induced macrophage apoptosis.

近年来,光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)作为一种新型治疗方法引入了心血管病的治疗领域^[1]。在兔动脉粥样硬化模型中,光动力治疗可以减缓斑块的进展,促进血管内皮愈合修复,减少斑块内巨噬细胞的数量^[2-4]。血卟啉单甲醚(hematoporphyrin monomethyl ether, HMME)是二代血

卟啉衍生物类光敏剂^[5],基础研究和临床实验表明 HMME 光敏效应强、毒性低、皮肤光敏性时间短,并且价格相对低廉^[6-10]。本实验将探讨 HMME 在细胞内的聚集情况,并研究 HMME 介导的光动力治疗对巨噬细胞的作用。

[收稿日期] 2011-09-30

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30970786 和 81171483)

[作者简介] 程佳丽,博士研究生,主要从事冠心病方面的研究,E-mail 为 chengjiali@hotmail.com。通讯作者田野,博士研究生导师,教授,主要从事动脉粥样硬化、心律失常方面的研究,E-mail 为 tianye@ems.hrbmu.edu.cn。张治国,教授,博士研究生导师,主要从事光学和光学医学结合研究,E-mail 为 zhangzhiguo@hit.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 主要材料

单核细胞 THP-1 细胞系购自上海中科院细胞库, HMME 由上海第二军医大学药理学教研室提供。主要试剂有胎牛血清(FBS)、RPMI1640 培养基(HyClone 公司), 佛波酯(PMA)(EMD Biosciences 公司), Annexin V-FITC 凋亡试剂盒(BD Bioscience), 其他药品和化学试剂购自于 Sigma 公司。

1.2 细胞培养

将 THP-1 细胞以含 10% 胎牛血清、100 mg/L 链霉素、 1×10^5 U/L 青霉素的 RPMI1640 细胞培养液, 于 37°C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中传代培养。细胞计数并调整密度约 5×10^8 /L, PMA 终浓度 100 μg/L 的 RPMI1640 完全培养液加入离心管重悬细胞, 并吹打混匀, 6 孔板每孔加 2 mL, 24 孔板每孔加 1 mL, 96 孔板加入 200 μL, 置恒温培养箱中静置培养, 72 h 后诱导成巨噬细胞。

1.3 巨噬细胞吸收血卟啉单甲醚光谱探测和共聚焦成像

培养在 96 孔板的巨噬细胞用 30 mg/L HMME 孵育 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 和 6 h 后, 弃去孔内培养液, 用 PBS 冲洗 2 遍, 每孔加入 200 μL RPMI1640 培养液。用 $\lambda = 405$ nm 激光器分别照射每孔, 用光纤接受发出的荧光, 并用 Origin 软件进行荧光光谱分析。培养在 24 孔板的巨噬细胞用 30 mg/L HMME 孵育 3 h 后, DAPI 染色, 在共聚焦显微镜下观察、拍照。

1.4 MTT 比色法检测巨噬细胞活性

培养在 96 孔板内的巨噬细胞与 HMME(10、20、30 和 40 mg/L) 共同孵育 3 h, 弃去孔内培养液, 用 PBS 冲洗 2 遍, 进行 MTT 检测。培养在 96 孔板内的巨噬细胞与 HMME(10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L) 用 $\lambda = 635$ nm 激光器分别照射每孔, 时间分别为 1.5 min 和 3 min。另设空白对照组、只加药组(只加不同浓度的 HMME, 不光照)、只光照组(不加药, 只进行光照)。光动力作

用后, 更换培养液, CO₂ 孵箱避光孵育 12 h, 弃去孔内培养液, 每孔加入 MTT 溶液(5 g/L) 20 μL, RPMI1640 培养液 80 μL, 37°C 继续避光孵育 4 h, 终止培养, 弃去孔内上清液。每孔加入 150 μL DMSO, 摇床低速振荡 10 min, 使其充分溶解。选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度, 记录结果。存活率 = (实验组 A 值 - 空白对照组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白对照组 A 值) × 100%。

1.5 巨噬细胞凋亡率检测

因为使用 >30 mg/L 的 HMME 孵育巨噬细胞, 其在细胞内聚集的幅度增加减小, 因此选择 30 mg/L 进行后续研究。30 mg/L HMME 避光孵育巨噬细胞 3 h。3 h 后对光动力治疗组开始进行光动力作用, 作用时间分别为 1.5 min 和 3 min。另设空白对照组、只加药组(只加不同浓度的 HMME, 不光照)、只光照组(不加药, 只进行光照)。治疗后弃去培养液, 用 PBS 冲洗 2 遍, 加入 1 mL 无血清 RPMI1640 培养液 37°C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下避光孵育 6 h。弃去孔内培养液, 用 PBS 冲洗 2 遍, 0.25% 胰蛋白酶消化, 用含血清的 RPMI1640 培养液终止消化, 吹打悬浮细胞, 收集细胞, PBS 液冲洗 2 遍, 收集细胞 500 μL 缓冲液重悬, 检测细胞密度约为 5×10^8 /L, 5 μL 的钙磷脂结合蛋白 V (Annexin V) 和 5 μL 碘化丙啶 (PI) 常温下避光共孵育 20 min, 20 min 后用流式细胞仪分析测试细胞凋亡率。

1.6 统计学分析

所有数据应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Dunnett-T 和 LSD 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血卟啉单甲醚在细胞的聚集情况

30 mg/L HMME 孵育巨噬细胞 3 h 后进行荧光成像, 共聚焦显微镜下发现 HMME 在细胞浆内成斑点样聚集(图 1)。

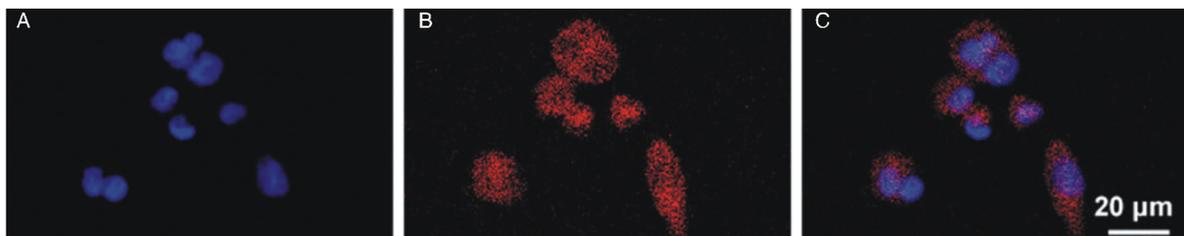


图 1. 血卟啉单甲醚在巨噬细胞内分布的共聚焦照片(×400)

A 为 DAPI 染细胞核为蓝色荧光, B 为 HMME 聚集在细胞内呈红色斑点状, C 为复合图像。

Figure 1. Fluorescence microscope photograph of HMME intracellular localization

2.2 血卟啉单甲醚孵育巨噬细胞不同时间光谱探测

巨噬细胞与 30 mg/L HMME 共培养 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 和 6 h 后进行荧光探测,用 $\lambda = 405$ nm 的激光器激发,可以接收到 HMME 激发出的荧光,荧光在 $\lambda = 635$ nm 和 $\lambda = 701$ nm 处有两个波峰。随着孵育时间的增加荧光强度增加(曲线下面积可代表细胞内摄取光敏剂的量),说明细胞内 HMME 的量增加,而孵育时间超过 3 h 后荧光强度增加幅度减低,因此下一步实验选择孵育时间为 3 h(图 2)。

2.3 光动力治疗对巨噬细胞活力的影响

巨噬细胞与不同浓度 HMME (10、20、30 和 40 mg/L) 共孵育,发现 HMME ≤ 30 mg/L 对细胞活性没有影响,当 HMME 为 40 mg/L 时细胞活性降低($P < 0.05$,图 3A);巨噬细胞与不同浓度 HMME (10、20、和 30 mg/L) 共孵育,经行光动力治疗(光照时间分别为 1.5 min 和 3 min),结果发现只加

药组和只光照组细胞活性没有变化,光动力治疗组随着光敏剂 HMME 浓度的增加及光照时间的增加,细胞活力下降($P < 0.05$;图 3B)。

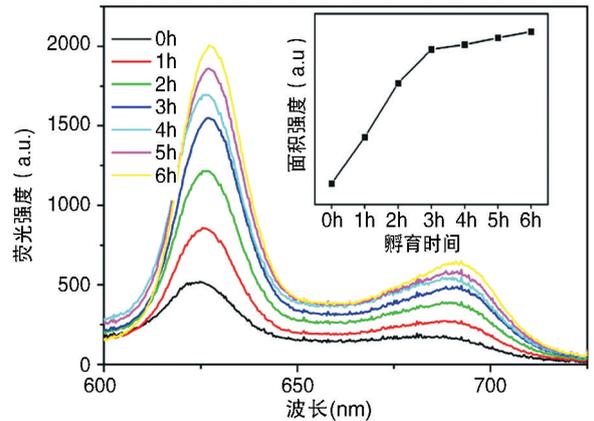


图 2. 巨噬细胞摄取血卟啉单甲醚的荧光光谱探测

Figure 2. Fluorescence emission profiles of cells incubated with different concentrations

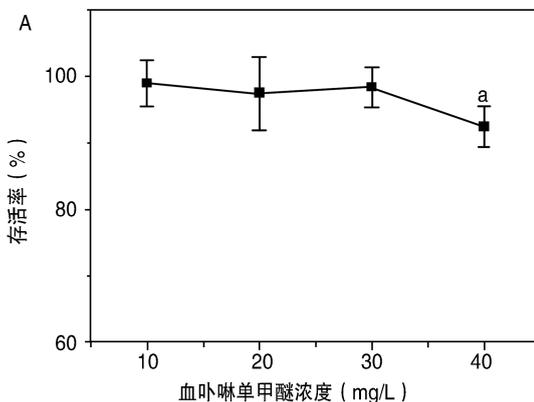
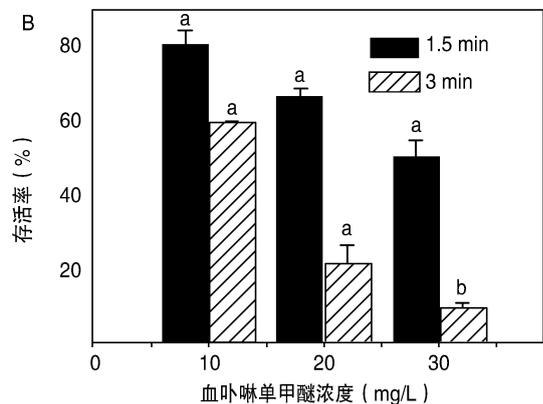


图 3. 光动力治疗对巨噬细胞活力的影响 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.001$, 与对照组(100%)相比。

Figure 3. The photocytotoxicity of HMME towards macrophages



2.4 光动力治疗诱导的巨噬细胞凋亡

30 mg/L HMME 孵育细胞 3 h 后进行光动力治疗,12 h 后巨噬细胞的凋亡数量增加,光动力治疗 1.5 min 组晚期凋亡率($5.82\% \pm 3.27\%$)较对照组($1.20\% \pm 3.54\%$)稍有增加($P < 0.05$);光动力治疗 3 min 组晚期凋亡率($65.45\% \pm 5.17\%$)较对照组显著增加($P < 0.001$)。只加药组和只光照组与对照组比差异无显著性(图 4)。

3 讨论

本实验证实 HMME 可以在 THP-1 源性巨噬细胞内积累,以斑点形式聚集于细胞浆内。光敏剂选

择性聚集于巨噬细胞内,是由于巨噬细胞的 I 型清道夫受体能识别血清白蛋白,而 HMME 在血清中是与血清蛋白相结合的,因此清道夫的定向作用使动脉粥样硬化的光动力治疗具有特异性^[11]。

在动脉粥样硬化形成过程中巨噬细胞起着重要的作用。巨噬细胞释放炎症因子促进动脉粥样硬化进展,诱导单核细胞不断浸润。巨噬细胞释放基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)和其他蛋白水解酶能使纤维帽变薄导致斑块破裂^[12]。研究表明,在动脉粥样硬化病变早期,巨噬细胞凋亡可以减轻斑块炎症反应,减缓斑块进展,缩小斑块^[13]。而在动脉粥样硬化晚期,巨噬细胞主要发生凋亡后坏死,这使巨噬细胞本应释放的 find-me 信号

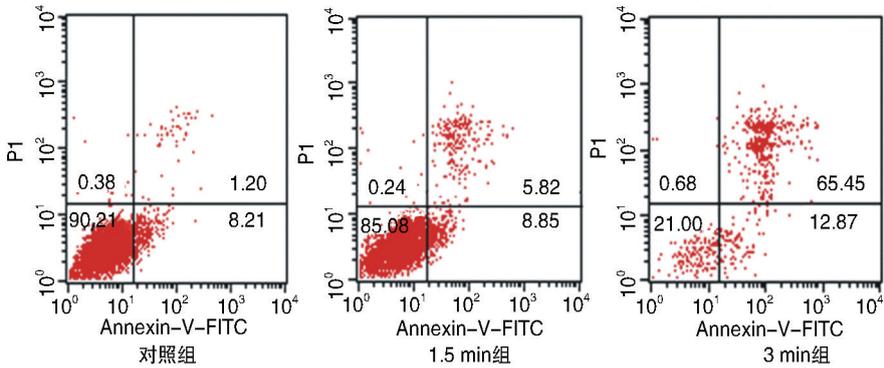


图 4. 流式细胞仪检测光动力治疗诱导的巨噬细胞凋亡 左下象限为正常细胞,右下象限为早期凋亡细胞,右上象限为晚期凋亡细胞,左上象限为坏死细胞。

Figure 4. PDT-induced apoptosis in the macrophages, as assayed using flow cytometry

减少或不能被有效传递,这造成斑块的炎症不能被有效清除^[14]。而光动力治疗可以使巨噬细胞进行有效凋亡,避免发生凋亡后坏死,从而促进有效吞噬的发生,减轻斑块炎症反应。本实验表明 HMME 介导的光动力治疗降低巨噬细胞存活率,诱导巨噬细胞凋亡。

药物和经皮冠状动脉介入治疗动脉粥样硬化的缺陷,使人们对于应用光动力治疗这种疾病产生极大的兴趣。Tawakol 等^[15]人研究证实光动力治疗可以减轻斑块炎症反应,延缓疾病的进展。光动力治疗结合了靶组织中蓄积的光敏剂和血管内光照射两个因素,产生具有细胞毒性的单线态氧,治疗原位动脉粥样硬化,预防和治疗再狭窄^[5]。目前临床研究发现 HMME 光敏性强、毒性小及皮肤光敏性时间短等优点,这些都提示患者对 HMME 介导的光动力治疗耐受性好,容易产生收益^[16, 17]。本实验所使用的二极管激光器,与脉冲激光器和染料激光器相比,具有操作简单、便携、价格低廉的优点。635 nm 激光光可直接传导或通过导管、纤维传导,有足够的穿透性,可以不阻断血流进行光动力治疗。

光动力疗法已被成功地应用于恶性肿瘤和某些非肿瘤性疾病的治疗,其特点是选择性作用于病变部位,并且治疗剂量可控制。目前国际上已应用酞菁类光敏剂、5-氨基酮戊酸、血卟啉衍生物等作为光敏剂的光动力疗法,开展治疗原发动脉粥样硬化斑块及支架后再狭窄的研究,发现光动力治疗可以稳定斑块、减轻斑块的炎症反应及预防和治疗再狭窄^[16, 17]。研究表明光敏剂可以能够选择性地作用于动脉粥样硬化斑块,被巨噬细胞大量吞噬,光动力治疗后造成巨噬细胞凋亡;降低斑块的炎症程度,从而稳定斑块并抑制其进一步发展,防治动脉粥样硬化。

总之,我们的实验表明 HMME 介导光动力治疗可以诱导巨噬细胞凋亡,在治疗动脉粥样硬化方面 HMME 是有前景的光敏剂,光动力治疗是有效的治疗手段,它的具体作用机制和效果会在实验室以及临床实践中进一步评估。

[参考文献]

- [1] Gordon T, Shigeyo H, John S, et al. Application of photodynamic therapy to the treatment of atherosclerotic plaques[J]. *Neurosurgery*, 1993, 32(3): 438-443.
- [2] Jenkins M, Buonaccorsi G, Mansfield R, et al. Reduction in the response to coronary and iliac artery injury with photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 45(2): 478-485.
- [3] Hayase M, Woodburn KW, Perlroth J, et al. Photoangioplasty with local motexafin lutetium delivery reduces macrophages in a rabbit post-balloon injury model[J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 49(2): 449-455.
- [4] Chen ZP, Woodburn KW, Shi C, et al. Photodynamic therapy with motexafin lutetium induces redox-sensitive apoptosis of vascular cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(5): 759-764.
- [5] Kossodo S, LaMuraglia GM. Clinical potential of photodynamic therapy in cardiovascular disorders[J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2001, 1(1): 15-21.
- [6] Song K, Kong B, Qu X, et al. Phototoxicity of hemoporphin to ovarian cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(1): 127-132.
- [7] Ding X, Xu Q, Liu F, et al. Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation [J]. *Cancer Letters*, 2004, 216(1): 43-54.
- [8] Gu Y, Huang NY, Liang J, et al. Clinical study of 1949 cases of port wine stains treated with vascular photodynamic therapy (Gu's PDT) [J]. *Ann Dermatol Venereol*, 2007, 134(3 Pt 1): 241-244.

(下转第 401 页)