

· 基础研究 ·

去铁胺促进 δ -氨基酮戊酸诱导皮肤成纤维细胞的光动力学效应

夏育民 刘小明 熊腊元

【摘要】目的 探讨去铁胺对 δ -氨基酮戊酸(ALA)诱导的皮肤成纤维细胞光动力学效应的影响。**方法** 体外培养人皮肤成纤维细胞,分为空白对照组、ALA 组、去铁胺组及 ALA + 去铁胺组。37℃ 下避光孵育 3 h 后,检测细胞内原卟啉 IX (PpIX) 水平、细胞增殖情况(吸光度 A 值)和细胞存活率。对检测出 PpIX 的细胞组予以 632.8 nm 波长 He-Ne 激光照射,流式细胞术测定细胞死亡率与凋亡率。**结果** He-Ne 激光照射前,各组细胞的吸光度 A 值和存活率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);空白对照组与去铁胺组的细胞皆未检测出 PpIX,而 ALA 组与 ALA + 去铁胺组的细胞内 PpIX 水平分别为 $(0.47 \pm 0.04) \mu\text{g/L}$ 和 $(0.85 \pm 0.08) \mu\text{g/L}$,2 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。He-Ne 激光照射后,ALA 组和 ALA + 去铁胺组的细胞凋亡率分别为 14.1% 和 21.5%,2 组差异有统计学意义($P < 0.05$);细胞坏死率分别为 2.7% 和 3.0%,2 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** ALA 和去铁胺都不影响皮肤成纤维细胞的基本生物学特征,去铁胺可促进 ALA 诱导的细胞内 PpIX 生成并增强光动力学效应。

【关键词】 δ -氨基酮戊酸; 去铁胺; 成纤维细胞; 光动力疗法; 原卟啉 IX

The effect of deferoxamine on the photodynamic reaction in human skin fibroblasts induced by δ -aminolevulinic acid XIA Yu-min, LIU Xiao-ming, XIONG La-yuan. Department of Dermatology and Venereology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of deferoxamine (DFO) on the photodynamic reaction in human skin fibroblasts co-cultured with δ -aminolevulinic acid (ALA). **Methods** Human skin fibroblasts were isolated from juvenile foreskin tissue and co-cultured in vitro with nothing (control group), 2 mmol/L ALA, 0.1 mmol/L DFO or ALA + DFO. Three hours later, the protoporphyrin IX (PpIX) levels in the fibroblasts were determined by high performance liquid chromatography with fluorescent detection (HPLC-FLD). Laser scanning confocal microscopy (LSCM) was used to observe the strength of fluorescence in the fibroblasts with the excitation of a 488 nm laser. The proliferation (absorbance ratio) and survival rate of cells were detected by MTT colorimetric methods and trypan blue staining respectively. The cellular PpIX positive groups were irradiated with a 632.8 nm He-Ne laser. Flow cytometry was used to calculate cellular apoptosis and necrosis. **Results** There was no significant difference between the cell absorbance ratio or survival rates of the four groups before He-Ne laser irradiation. No cellular PpIX was found in the control or DFO groups, while the cellular PpIX concentrations in the ALA and ALA + DFO groups were $(0.47 \pm 0.04) \mu\text{g/L}$ and $(0.85 \pm 0.08) \mu\text{g/L}$ respectively. After He-Ne laser irradiation, in the ALA and ALA + DFO groups the cellular apoptosis rates were 14.1% and 21.5% respectively, and the cellular necrosis rates were 2.7% and 3.0% respectively. **Conclusions** Neither ALA nor DFO affected the basic biological features of skin fibroblasts, but DFO could enhance the PpIX production and subsequent photodynamic reactions in human skin fibroblasts co-cultured with ALA.

【Key words】 δ -aminolevulinic acid; Deferoxamine; Fibroblasts; Photodynamic therapy; Protoporphyrin IX

δ -氨基酮戊酸(δ -aminolevulinic acid, ALA)介导的光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)是一种新型组织消融技术,其基本原理是局部外用光敏剂前体 ALA,其被靶细胞选择性摄入后产生原卟啉 IX (protoporphyrin IX, PpIX),经特定波长的光源激发,形成单

态氧($^1\text{O}_2$)等物质,影响靶细胞的生物学功能,从而达到非侵入性治疗的目的。ALA-PDT 最初用于治疗皮肤浅表性肿瘤、病毒疣等疾病;目前,其适应证逐渐扩展至局限性硬皮病等非增生性疾病,并认为其机制与 PpIX 介导的光动力学反应影响皮肤成纤维细胞的胶原代谢有关^[1]。ALA 容易被增殖迅速的细胞摄入,而正常细胞或其他增殖较慢的细胞很少吸收该物质^[2]。所以,相对于肿瘤细胞及病毒感染性细胞而言,增殖速

率低的皮肤成纤维细胞对 ALA 的吸收率也较低。如何促进皮肤成纤维细胞生成 PpIX, 是提高 ALA 介导的 PDT 对局限性硬皮病等疾病疗效的关键因素之一。本研究旨在探索铁离子螯合剂——去铁胺对 ALA 诱导的皮肤成纤维细胞光动力学反应的影响。

材料与方法

一、实验材料

1. 主要试剂: Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、台盼蓝、青霉素、链霉素及胰酶购自武汉市亦新生物技术公司, II 型胶原酶、透明质酸酶、PpIX 二钠盐 (分析纯) 为美国 Sigma 公司产品, 兔抗人 I 型胶原抗体、生物素标记羊抗兔 IgG 及 DAB 购自武汉博士德公司, Annexin V/PI 凋亡试剂盒购自杭州联科生物技术公司, ALA 由上海复旦张江生物医药公司生产, 甲磺酸去铁胺注射剂由 Novartis Pharma Schweiz AG 公司生产 (进口注册证 H20020043)。

2. 实验仪器: P680A 型高效液相色谱仪、DIONEX DE 50 型荧光检测器为美国 Dionex 公司产品, TCS SPII 型激光共聚焦显微镜为德国 Leica 公司产品, MK3 型全自动酶标仪由芬兰 Labsystem 公司生产, 桂林产 XD-635AB 型光动力激光治疗仪, Epics Altra II 型流式细胞仪为美国 Beckman 公司产品。

二、皮肤成纤维细胞的培养^[3]

手术获取儿童包皮, 置于含有 100 U/ml 氨苄青霉素和 100 mg/ml 硫酸链霉素的磷酸盐缓冲液中漂洗, 剪弃脂肪和结缔组织; 将皮肤剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小块, 加入含有 200 U/ml II 型胶原酶、300 U/ml 透明质酸酶、5% 胎牛血清的 DMEM 培养基中于 4℃ 下过夜; 加入含有 0.25% 胰酶和 0.02% 乙二胺四乙酸 (1:1) 的磷酸盐缓冲液, 滴加血清终止消化, 离心后收集细胞; 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调定细胞密度为 4×10^5 /ml 后进行细胞接种, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养并传代。细胞鉴定: 制备细胞爬片, 用冰冻丙酮和甲醇 (按 1:1 比例配制) 固定, 经苏木素-伊红 (HE) 染色后在光镜下观察并行细胞化学染色鉴定, 具体参照兔抗人 I 型胶原抗体 (一抗)、生物素标记羊抗兔 IgG (二抗) 试剂说明书。

三、细胞分组

皮肤成纤维细胞传代后在 6 孔板中培养, 暂停用胎牛血清而继续培养, 使细胞同步化。将细胞分为空白对照组、ALA 组 (加入终浓度为 2 mmol/L 的 ALA)、去铁胺组 (加入终浓度为 0.1 mmol/L 的去铁胺) 及

ALA + 去铁胺组 (加入 ALA 和去铁胺, 浓度同前), 控制每孔内细胞密度皆为 10^6 /L, 于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 3 h。每组细胞培养 5 孔 (其中 1 孔制备细胞爬片), 分别用于检测胞内 PpIX 水平、吸光度 A 值 (MTT 法)、细胞存活率 (台盼蓝染色法) 以及在激光共聚焦显微镜下观察荧光强度 (细胞爬片) 和用流式细胞仪检测细胞凋亡率与死亡率 (He-Ne 激光照射后)。

四、检测胞内 PpIX 水平

弃去培养孔内培养液, 以 D-Hanks 液漂洗后用 0.25% 胰酶常规消化, 加适量 D-Hanks 液配置成密度为 1×10^6 /ml 的细胞悬液; 离心并弃去 D-Hanks 液后加入等量去离子水, -20℃ 冻融 3 次; 涂片镜下观察, 此时无完整细胞, 4 500 转/min 离心 5 min 后取上清液 0.3 ml, 置于 1.5 ml 离心管中。色谱条件: BDS C18 色谱柱温度 25 ~ 30℃, 配制流动相, 甲醇: 乙腈: 乙醇为 50:40:10, pH 值 7.0, 流速 1 ml/min, PpIX 保留时间 2 ~ 5 min。在上述离心管内加流动相 0.7 ml, 混合后再次离心并取上清液 20 μl 进样检测。设定高效液相色谱检测仪相关系数: 激发波长 488 nm, 发射波长 630 nm。依据 PpIX 标准品曲线, 每孔样本检测 5 次, 记录平均值, 作为胞内 PpIX 水平。

五、观察荧光强度

取前述培养板孔内的细胞爬片 (单层细胞), 甩除表面液体后直接用激光共聚焦显微镜观察 (激发波长 488 nm, 发射波长 630 nm)。

六、检测细胞增殖

采用 MTT 比色法: 每组细胞培养板取 1 孔, 消化并常规换液后转移至 96 孔培养板内 (细胞密度 10^6 /L), 每孔加入 20 μl MTT (即 5 g/L), 37℃ 下培养 3 h; 吸弃孔内上清液并加入二甲基亚砜, 每孔 150 μl, 充分溶解结晶物; 在酶联免疫检测仪上选择波长 570 nm, 测定各孔吸光度 A 值, 每个标本检测 5 次, 记录均数。

七、计算细胞存活率

收集培养末期细胞进行台盼蓝染色: 用无血清培养基把细胞悬液稀释至约 1 000 个/ml, 在 0.1 ml 的细胞中加入 0.1 ml 的 0.4% 台盼蓝溶液, 轻轻混匀, 3 min 后在相差显微镜下用血球计数板计数细胞。活细胞排斥台盼蓝, 因而染成蓝色的细胞是死细胞。细胞存活率 (%) = $(1 - \text{蓝染细胞数}/100) \times 100\%$ 。每孔计数 5 次, 取均数。

八、ALA-PDT 与流式细胞术检测

取经高效液相色谱、激光共聚焦显微镜证实胞内出现 PpIX 的细胞, 每组 1 孔, 采用波长 632.8 nm 的 He-Ne 激光, 距光源 5 cm 处垂直照射, 光斑直径 4 cm, 输出功率 300 mW/cm², 照射剂量 36 J, 能量密度

2.9 J/cm²。照射完毕后立即更换新鲜培养液,继续培养 12 h, Annexin V/PI 双染,应用流式细胞仪检测细胞凋亡率与死亡率。

九、统计学分析

采用 SPSS 13.0 版统计软件分析,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示并采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

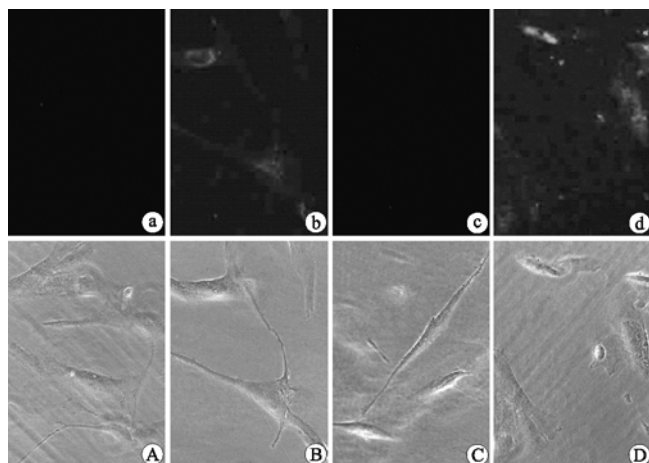
结 果

一、皮肤成纤维细胞鉴定

倒置显微镜下观察到,培养细胞贴壁生长,细胞伸展呈长梭形或多角形,体积较大。HE 染色后,普通显微镜下显示胞核为淡蓝色,胞浆为粉红色。用兔抗人 I 型胶原抗体进行免疫细胞化学染色,显示细胞胞浆呈深棕色。证实上述细胞为皮肤成纤维细胞。

二、胞内 PpIX 水平及荧光

经高效液相色谱荧光法检测发现,空白对照组与去铁胺组细胞内无 PpIX,而 ALA 组与 ALA + 去铁胺组的胞内 PpIX 水平分别为 $(0.47 \pm 0.04) \mu\text{g/L}$ 和 $(0.85 \pm 0.08) \mu\text{g/L}$, 2 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。激光共聚焦显微镜观察发现,空白对照组与去铁胺组未见胞内荧光,而 ALA 组和 ALA + 去铁胺组都可见明显红色荧光,且后者的荧光强度高于前者 (图 1)。



注:a~d 分别表示空白对照组、ALA 组、去铁胺组及 ALA + 去铁胺组的胞内荧光,A~D 依次为上述 4 组的细胞原形

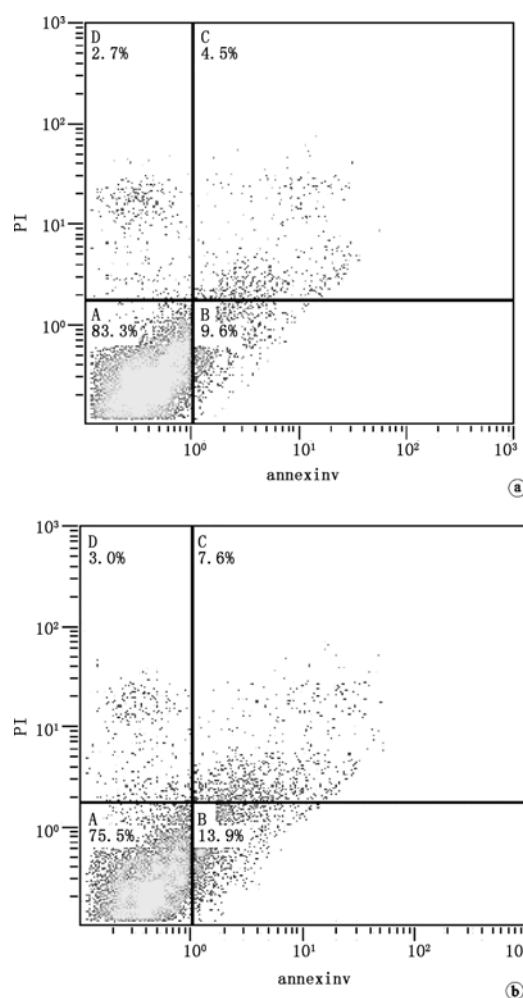
图 1 激光共聚焦显微镜观察各组细胞 PpIX 荧光 ($\times 400$)

三、细胞增殖与存活率

空白对照组、ALA 组、去铁胺组及 ALA + 去铁胺组细胞的吸光度 A 值分别为 (0.44 ± 0.06) 、 (0.42 ± 0.05) 、 (0.41 ± 0.06) 和 (0.42 ± 0.07) , 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 其细胞存活率分别为 $(95.83 \pm 3.04)\%$ 、 $(93.97 \pm 2.63)\%$ 、 $(96.58 \pm 4.34)\%$ 及 $(92.60 \pm 3.45)\%$, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

四、ALA-PDT 后细胞凋亡率与坏死率

由于前述结果仅发现 ALA 组和 ALA + 去铁胺组细胞内有 PpIX,故对这 2 组细胞进行 ALA-PDT 处理,随后采用流式细胞术检测其凋亡率与坏死率。结果显示,ALA 组和 ALA + 去铁胺组的细胞凋亡率分别为 14.1% 和 21.5% ($P < 0.05$),细胞坏死率分别为 2.7% 和 3.0% ($P < 0.05$),见图 2。这些结果提示经 ALA-PDT 处理后,ALA + 去铁胺组细胞的光动力学效应较 ALA 组强。



注:a. ALA 组;b. ALA + 去铁胺组;A. 正常细胞;B. 早期凋亡细胞;C. 晚期凋亡细胞;D. 坏死细胞

图 2 流式细胞术检测结果

讨 论

ALA-PDT 治疗局限性硬皮病等以皮肤成纤维细胞为主要靶细胞的疾病时,作用机制与金属蛋白酶等影响成纤维细胞胶原代谢有关^[4]。所以,提高 ALA-PDT 疗效的重要途径是增强皮肤成纤维细胞对 ALA 的摄入。金属离子螯合剂可以直接作用于 ALA 的胞内代谢途径,改变 PpIX 等物质的合成与聚集程度,从

而影响 ALA-PDT 的效果^[5]。卟啉合成的第一步是 5-ALA 合成酶促成琥珀酰 CoA 和氨基乙酸形成 PpIX, 最终导致亚铁血红素的形成; 而形成亚铁血红素的最后一步是铁螯合进 PpIX, 该过程取决于线粒体内亚铁螯合酶的作用。去铁胺作为铁离子螯合剂, 主要用于治疗体内铁负荷过载造成的疾病^[6]。通过铁螯合剂抑制亚铁螯合酶的活性, 可进一步促进 PpIX 积聚, 从而有望增强 ALA-PDT 的疗效。既往研究已证实, 依地酸二钠钙 (CaNa₂-EDTA) 和去铁胺等铁离子螯合剂, 可以促进体外培养的 Hep-2 系鳞癌细胞产生更高浓度的 PpIX, 继而增强该细胞的光敏感性^[7-8]。那么, 对于正常组织来源的皮肤成纤维细胞, 是否也存在类似的效应呢?

本实验结果显示, 上述 4 组培养细胞的吸光度 A 值和细胞存活率比较, 差异无统计学意义, 表明无论是 ALA 还是去铁胺, 本身不改变皮肤成纤维细胞的基本生物学活性。同时, 空白对照组与去铁胺组的细胞中皆未检测出 PpIX, 而仅在 ALA 组与 ALA + 去铁胺组的细胞内发现 PpIX, 且后者的 PpIX 浓度较前者高。这说明只有 ALA 才能诱导细胞内生成 PpIX, 而去铁胺无此效应, 但去铁胺可促进 ALA 诱导的皮肤成纤维细胞生成 PpIX。这 2 组细胞经 632.8 nm 波长的 He-Ne 激光照射后, 采用流式细胞术测定细胞死亡率与凋亡率, 发现 ALA + 去铁胺组的细胞死亡率和细胞坏死率均明显高于 ALA 组。这进一步证实, 去铁胺能够促进 ALA 诱导的皮肤成纤维细胞的光动力学效应。

由于体外培养环境与体内环境存在诸多差别, 如体内循环系统等因素对细胞的局部环境有明显调节作用, 所以本实验的结论是否适用于在体尚需进一步研究。另外, 由于 ALA-PDT 治疗局限性硬皮病等疾病的原理是改变皮肤成纤维细胞的胶原代谢, 而非完全杀

死该类细胞, 故需审慎评估去铁胺促进皮肤成纤维细胞生成 PpIX 的意义。

参 考 文 献

- [1] Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, et al. Influence of 5-aminolevulinic acid and red light on collagen metabolism of human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 2003, 120:325-331.
- [2] Lee JB, Choi JY, Chun JS, et al. Relationship of protoporphyrin IX synthesis to photodynamic effects by 5-aminolaevulinic acid and its esters on various cell lines derived from the skin. *Br J Dermatol*, 2008, 159:61-67.
- [3] 陈勇, 戴和平, 龙志高, 等. 人皮肤成纤维细胞的分离和体外培养. *湖南医科大学学报*, 2002, 27:477-478.
- [4] Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, et al. Keratinocyte-derived cytokines after photodynamic therapy and their paracrine induction of matrix metalloproteinases in fibroblasts. *Br J Dermatol*, 2004, 151:776-783.
- [5] Choudry K, Brooke RC, Farrar W, et al. The effect of an iron chelating agent on protoporphyrin IX levels and phototoxicity in topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Dermatol*, 2003, 149:124-130.
- [6] Bring P, Partovi N, Ford JA, et al. Iron overload disorders: treatment options for patients refractory to or intolerant of phlebotomy. *Pharmacotherapy*, 2008, 28:331-342.
- [7] Liu HF, Xu SZ, Zhang CR. Influence of CaNa₂-EDTA on topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Chin Med J*, 2004, 117:922-926.
- [8] Uehlinger P, Ballini JP, van den Bergh H, et al. On the role of iron and one of its chelating agents in the production of protoporphyrin IX generated by 5-aminolevulinic acid and its hexyl ester derivative tested on an epidermal equivalent of human skin. *Photochem Photobiol*, 2006, 82:1069-1076.

(修回日期: 2009-09-12)

(本文编辑: 吴 倩)

· 消息 ·

中国康复医学会第 6 届老年康复学术年会将于 2010 年 6 月在北京召开

中国康复医学会第 6 届老年康复学术大会将于 2010 年 6 月 11 日至 13 日在北京召开。本次论坛主题为: 提高老年康复水平、关注老年生活质量, 欢迎国内外康复医学科、老年医学科及临床相关学科同仁参加会议并踊跃投稿。

征稿范围: 国内外老年病、老年康复发展趋势; 老年康复综合评估; 老年病康复经验; 老年人营养; 老年神经系统、骨关节病和内科疾病的康复治疗现状和进展; 物理治疗、作业治疗、言语治疗的现状和进展; 传统医学与老年康复; 社区康复; 老年康复经验技术交流; 康复工程等。

来稿要求: 未在国内外杂志上公开发表的康复医学领域最新研究成果等, 具有较强的科学性、先进性和实用性。征文格式请按科技期刊要求 (包括目的、方法、结果、结论、参考文献), 文责自负。请一律采用电子版投稿, 论文投稿截止日期: 2010 年 5 月 20 日。

会议专用 E-mail: lnkf2010@163.com。