

· 综述 ·

细胞光敏损伤位点的研究进展

戴维德 刘凡光 顾瑛

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)是一种在激光器和光敏剂联合应用的基础上将光物理与光化学相结合的治疗方法,通常应用于肿瘤治疗领域,是治疗耐药性肿瘤和抗放疗肿瘤的最佳选择之一。其治疗机理通常认为是由于光敏剂被细胞或组织吸收后,在特定波长激光照射的激发下产生活性氧物质(reactive oxygen species, ROS),包括单线态氧及自由基(如羟基、超氧阴离子等),并进一步与细胞内亚微结构反应引起细胞损伤。研究发现,由于细胞光敏损伤位点不同,其损伤特点及后果也不同^[1]。细胞光敏损伤位点是影响光动力疗法的重要因素之一,现将其近年研究进展综述如下。

一、细胞结构光敏损伤后功能的改变

1. 线粒体:线粒体是由外膜和内膜组成。内膜向内突起形成许多线粒体嵴,内膜与嵴之间的间隙中充满颗粒状的线粒体基质,表面被覆着球型的基本粒子。线粒体在细胞新陈代谢的多个方面,尤其在产生能量和维持 Ca^{2+} 动态平衡中发挥着重要作用。光敏损伤可引起线粒体膜破裂,使多种线粒体酶,如细胞色素氧化酶、琥珀酸脱氢酶、单胺氧化酶、乳酸脱氢酶、NADH 脱氢酶的活性受到抑制,ATP 合成减低 60% 以上。由于在氧化磷酸化中,上述酶和 ATP 酶受到不同程度的抑制,难以维持 Ca^{2+} 通过线粒体内膜所必需的离子梯度,导致线粒体膜钙的转运和释放减少^[2]。光敏剂(如 5-ALA)与线粒体结合可导致凋亡的发生,其作用机理可能是由于线粒体损伤后,线粒体内容物,尤其是细胞色素 C 外泄,后者通过激活细胞凋亡级联中下游的半胱天冬氨酸酶,介导细胞凋亡的发生。Granville 等^[3]采用光敏剂 Verteporfin 与人的主动脉平滑肌细胞共同孵育,以诱导细胞凋亡。光动力治疗后,发现在细胞浆中存在细胞色素 C 及凋亡诱导因子,且持续增高达 2 h。而在细胞色素 C 释放之后,前凋亡 Bcl-2 家族成员 Bax 在胞浆中的水平反而下降。利用激光共聚焦显微镜观察发现,在凋亡细胞中,胞浆中的细胞色素 C 染色呈弥散状态,而正常细胞中的细胞色素 C 染色则明显地局限于线粒体中。有观点认为^[4],由于线粒体膜渗透性转运孔的开放导致线粒体跨膜电位消散,引起细胞色素 C 从线粒体内释放到胞浆中,从而发生细胞凋亡,引起一系列细胞凋亡事件。研究证实:前中幼粒 K560 细胞利用血卟啉类光敏剂进行光动力治疗,使线粒体跨膜电位降低、ATP 水平下降、细胞呼吸作用减弱、细胞膜磷脂酰丝氨酸异位、DNA 断裂及凋亡小体出现,并最终导致细胞膜的完整性丧失。单态氧是血卟啉光照后最可能产生的活性物质,几乎可以与细胞内任何结构发生反应。已证实单态氧及其反应产物可以诱导细胞凋亡的发生^[5]。

2. 细胞膜:细胞膜为脂质双层结构,镶嵌各种蛋白及酶类,在细胞与内环境之间构成一道屏障,膜内含有不同的受体、转运系统及信号转导系统。Fluoresceins、酞菁等光敏剂带阴性电荷,不易进入完整的细胞。这类光敏剂的作用靶点是细胞膜^[6]。

在光动力作用下,细胞膜磷脂、固醇类和氨基酸发生氧化反应,蛋白质分子内部或分子之间产生异常交联,导致膜抗原表达和蛋白合成障碍。光动力学损伤最突出的两个特征为 Na^{+} 和 GDP 从膜内释放,生物大分子构象的改变使 Ca^{2+} 泵功能下降,葡萄糖、氨基酸等转运受限,膜连接酶系失活。

3. 溶酶体:溶酶体内含有 β -半乳糖苷酶、酸性磷酸酶、 β -葡萄糖苷酸酶等多种酶,当光动力损伤溶酶体膜后,这些溶酶体酶释放到细胞浆,可能引起受累细胞自身溶解^[7]。但也有一些研究发现:Phthalocyanine 和 Nile blue 衍生物可损伤溶酶体膜但并没有杀伤细胞。这是由于在光照条件下,溶酶体损伤,光敏剂外泄,而胞浆中存在的 pH 值和蛋白水解抑制剂使水解酶失去活性,或溶酶体的损伤并不足以引起水解酶和蛋白酶释放,仅使光敏剂通过溶酶体进入胞浆^[8]。

4. 细胞核及 DNA:细胞核是一个对活性氧物质极其敏感的靶点^[9]。Ben-Hur 等^[10]报道,光敏剂 PcS 介导的光敏反应可引起 V79 细胞 DNA 单链断裂和 DNA 蛋白交联。在同等毒性剂量下,由光敏反应产生的 DNA 单链断裂数量大约仅为由放射线引起的 DNA 单链断裂数量的 1/3。Peng 等^[11]发现,由 Photofrin 参与的光敏反应导致的 DNA 单链断裂仅发生在 DNA 与核膜的接触点。这一点与观察 Photofrin 亚细胞定位时发现其位于核膜而不是核内是一致的。这些片断的平均长度为 155 KD。光敏剂 Pc4 介导的光动力效应使鼠淋巴瘤细胞核的 DNA 降解为 180 ~ 190 个碱基对片段,后者被认为是 PDT 导致细胞凋亡的一个生化征象,和染色体边集等特征性形态学改变一致^[12]。也有观点认为,由于细胞核修复能力强,可能其并不是 PDT 的主要靶点。

5. 细胞骨架:真核细胞内存在 3 种类型的蛋白细丝,即微管、微丝和中间丝,它们组成细胞的支架,又叫细胞骨架。细胞骨架的功能与保持细胞形态、内部各成分的相互位置关系及其运动有关。有研究显示^[13],通过 β -微管蛋白间接荧光染色法观察发现,光敏剂 AlPcS₄ 引起的光敏反应抑制了细胞微管的功能,干扰了 NHIK 细胞在有丝分裂期纺锤体的形成,使其停留在有丝分裂中期。5 mM 光敏剂 TPPo 和 HeLa 细胞共同孵育 30 min 后采用光照,HeLa 细胞中期和分裂期的微管发生改变,其损伤程度与光照时间长短有关。光照 3 或 15 min 后,其存活率分别约为 50% 和 15%。亚致死性治疗引起中期细胞逐渐聚集,有丝分裂指数升高,并于 6 h 后达最大值;致死性治疗引起间期和中期微管不可逆性损伤。研究认为,微管是光敏剂 TPPo 介导的光动力损伤的重要位点。

6. 内质网:PDT 对内质网的作用长期以来很少受到重视。事实上,内质网也是 PDT 的一个非常重要的损伤位点^[14]。内质网损伤后,以不同的方式启动凋亡的发生,或者开启内质网上 Ca^{2+} 通道,使胞浆中 Ca^{2+} 浓度升高,激活相关的酶;或进入线粒体、细胞核内,直接通过它们启动凋亡。研究发现,PDT 激活的 caspase-8 可以进一步激活内质网蛋白 Bap31,后者也能诱导细

胞凋亡的发生^[15]。

二、影响光敏剂在细胞内分布的重要因素

光敏化反应产生的活性氧物质寿命较短,在细胞内通常不超过 0.6 μs ,扩散距离不到 70 nm,光敏剂在细胞内作用半径不超过 40 nm,只能破坏临近的细胞结构。因此,光敏剂在细胞内的分布,即亚细胞定位决定了细胞光敏损伤位点^[16]。影响其在细胞内分布的重要因素归纳如下:

(一) 光敏剂的理化特性

1. 光敏剂的溶解性:当前,应用较广泛的卟啉类及酞菁类光敏剂包括亲脂性和亲水性两类,其中亲脂性较强的为 Photofrin II、3TPP 和 Hematoporphyrin 等,亲水性较强的有 TPPS₂₀、Al-PcS₂₄ 和 AlPcS₄ 等。亲脂性较强的光敏剂主要定位于细胞的各种膜结构,而亲水性较强的光敏剂分布于溶酶体。Moan 等^[17]研究了 HpD 和 Photofrin 两种脂溶性光敏剂,发现其在体外培养细胞内聚集于线粒体、内质网、细胞浆及核膜与细胞质的核周区域。作者认为,由于其包含了多种具有不同疏水性的血卟啉成分,因此聚集于细胞内不同的结构中。

2. 光敏剂的离子性:光敏剂按其所带电荷的正、负可分成两大类,一类是阴离子类光敏剂,如 Photofrin II、二氢卟吩和红紫素等,其分子携带 1 个负电荷;一类是阳离子类光敏剂,如 Kryptocyanine N、Oxazine Nile blue A 及其衍生物等,其分子携带 1 个正电荷。Oseroff 等^[18]发现,4 种定位于线粒体的血卟啉类衍生物都具有阳离子侧链,由此推断侧链带正电荷的血卟啉衍生物容易被线粒体选择性吸收,其原因在于线粒体的跨膜电位。已证实线粒体中阳离子染料浓度较培养基高 10 000 倍,这可以用来解释 Nernst 反应。血卟啉选择性地通过位于线粒体外膜的外周苯二氮卓受体或同心肌磷脂相互作用进入线粒体。而侧链较小、疏水性弱及带阳离子电荷的血卟啉复合物则趋向分布于溶酶体。

3. 光敏剂的剂量及孵育时间:光敏剂浓度及细胞的孵育时间也影响光敏剂在细胞内的分布。Kessel 等^[19]研究发现,疏水性光敏剂 CAME 10 mM 与鼠白血病 L1210 细胞共同孵育 30 min 后光照,导致线粒体光敏损伤和细胞凋亡。而在光敏剂较高浓度水平及较长时间孵育后,可观察到质膜和溶酶体的光敏损伤。高浓度光敏剂使细胞凋亡受到抑制,转而引起细胞坏死。Soukos 等^[20]在研究中也发现,某些血卟啉类光敏剂孵育早期位于线粒体,而随着时间的推移逐渐被溶酶体摄取。推测这与溶酶体具有吞噬线粒体等细胞器的功能有关。但是,并不是所有滞留光敏剂的线粒体都会被吞噬,只有那些形态异常的线粒体有可自食的可能。

(二) 照射功率及能量

Luo 等^[4]采用光敏化作用很强的光敏剂绿铝酞菁杀伤鼠白血病 P388 细胞。当靶细胞与 0.3 mM 光敏剂共同孵育后,用能量密度为 45 mJ/cm² 的光照 60 min,90% 的靶细胞发生凋亡。光敏剂弥散分布于细胞质中可引起溶酶体和线粒体的光敏损伤,当光照的能量密度增加,在加重膜损伤的同时也对细胞核产生损伤作用,凝胶电泳显示细胞核 DNA 断裂。

(三) 细胞的种类

同一种光敏剂,光动力作用的靶细胞不同,损伤的亚细胞位点也可能不同。Chen 等^[21]使用激光扫描共聚焦显微镜和细胞器荧光探针检测光敏剂 MC540 在鼠髓样白血病 M1 细胞和 JCS

细胞中的亚细胞定位,光敏剂 MC540 在 JCS 细胞中定位于浆膜和线粒体,而在白血病 M1 细胞中则定位于溶酶体。在研究 MC540 亚细胞定位与光动力作用引起的凋亡之间的关系后发现,两类细胞在光照后 4 h DNA 凝胶电泳都可检测到凋亡细胞核的典型阶梯状特征。凋亡率分别为 78% 和 38%。

三、细胞损伤位点的调控

光敏剂亚细胞损伤位点的不同,导致细胞光动力损伤的结局不同。一般认为,以线粒体损伤为主可引起靶细胞凋亡的迅速启动,而溶酶体破裂所包含的各种水解酶释放会导致细胞坏死。细胞核损伤根据其损伤程度不同,结局也不同,轻微损伤可能引起细胞凋亡,而严重损伤则能导致细胞迅速坏死。近年来,随着较高灵敏度的荧光显微镜及激光共聚焦显微镜在本领域内的应用,对上述研究更加深入,完全有可能找到 PDT 与靶细胞之间相互作用的规律,在光动力学治疗过程中,应根据我们的治疗目的选择适当的光敏剂种类、剂量和激光照射参数,通过控制 PDT 细胞损伤的位点及损伤程度对 PDT 致细胞凋亡、细胞增殖抑制、细胞蛋白合成抑制及细胞能量代谢抑制等不同光敏损伤作用进行调控。

参 考 文 献

- Lan J, Janet M, David A, et al. Subcellular localization patterns and their relationship to photodynamic activity of pyropheophorbide-a derivatives. *Photochem Photobiol*, 1999, 70:789-797.
- Klein SD, Walt H, Richter C, et al. Photosensitization of isolated rat liver mitochondria by tetra (m-hydroxyphenyl) chlorin. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 348:313-319.
- Granville DJ, Cassidy BA, Ruehlmann DO, et al. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and cytochrome C during smooth muscle cell apoptosis. *AM J Pathol*, 2001, 159:305-311.
- Luo Y, Kessel D. Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine. *Photochem Photobiol*, 1997, 66:479-483.
- Kochevar IE, Lynch MC, Zhuang S, et al. Singlet oxygen, but not oxidizing radicals, induces apoptosis in HL-60 cells. *Photochem Photobiol*, 2000, 72:548-553.
- Lagerberg JW, Ueberriegler KP, Krammer B, et al. Plasma membrane properties involved in the photodynamic efficacy of merocyanine 540 and tetrasulfonated aluminum phthalocyanine. *Photochem Photobiol*, 2000, 71:341-346.
- Christensen T, Volden G, Moan J, et al. Release of lysosomal enzymes and lactate dehydrogenase due to hematoporphyrin derivative and light irradiation of NHIK 3025 cells in vitro. *Ann Clin Res*, 1982, 14:46-52.
- Lin CW, Shulok JR, Kirley SD, et al. Photodynamic destruction of lysosomes mediated by Nile blue photosensitizers. *Photochem and Photobiol*, 1993, 58:81-91.
- Akhlynina TV, Jans DA, Rosenkranz AA, et al. Nuclear targeting of chlorin e6 enhance its photosensitizing activity. *J Biol Chem*, 1997, 272:328-331.
- Ben-Hur E, Fujihara T, Suzuki F, et al. Genetic toxicology of the photosensitization of Chinese hamster cells by phthalocyanines. *Photochem Photobiol*, 1987, 45:227-230.
- Peng Q, Moan J, Nesland JM, et al. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. *Ultrastruct Pathol*, 1996, 20:109-129.
- Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, et al. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer*

- Res, 1991, 51: 5993-5996.
- 13 Villanueva A, Canete M, Nonell S, et al. Photodamaging effects of tetraphenylporphycene in a human carcinoma cell line. *Anticancer Drug Des*, 1996, 11: 89-99.
 - 14 Granville D, Ruehlmann J, Choy B, et al. Bcl-2 increases emptying of endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores during photodynamic therapy-induced apoptosis. *Cell Calcium*, 2001, 30: 343-350.
 - 15 Dana G, Katerina K, Karel S, et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. *J Photochem Photobiol B*, 2003, 69: 71-85.
 - 16 Andrey A, David A, Alexander S, et al. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunol Cell Biol*, 2000, 78: 452-464.
 - 17 Moan J, Berg K. photochemotherapy of cancer: experimental research. *Photochem Photobiol*, 1992, 55: 931-948.
 - 18 Oseroff AR, Ohuoha D, Arb G, et al. Intramitochondrial dyes allow selective in vitro photolysis of carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1986, 83: 9729-9733.
 - 19 Kessel D, Poretz RD. Sites of photodamage induced by photodynamic therapy with a chlorin e6 triacetoxymethyl ester (CAME). *Photochem Photobiol*, 2000, 71: 94-96.
 - 20 Soukos NS, Hamblin MR, Hasan T, et al. The effect of charge on cellular uptake and phototoxicity of polylysine chlorin (e6) conjugates. *Photochem Photobiol*, 1997, 65: 723-729.
 - 21 Chen JY, Cheung NH, Fung MC, et al. Subcellular localization of merocyanine 540 (MC540) and induction of apoptosis in murine myeloid leukemia cells. *Photochem Photobiol*, 2000, 72: 114-112.

(修回日期: 2003-08-18)
(本文编辑: 吴倩)

· 临床研究 ·

急性重度脑外伤患者心率变异性的临床分析

孙金龙 孙强三 孙晓莉 马卫红

心率变异性(heart rate variability, HRV)分析是反映交感-副交感神经张力及其平衡的重要指标,用于测定脑外伤患者自主神经系统(autonomic nervous system, ANS)功能改变,被认为是一种研究脑损伤患者 ANS 功能活性的定量指标^[1]。本研究旨在通过 HRV 分析急性重度脑外伤患者 ANS 功能改变特点及其临床意义。

对象与方法

一、病例选择及分组

急性重度脑外伤组:患者 35 例(均为重度脑挫裂伤和/或脑干损伤患者),其中男 26 例,女 9 例;平均年龄(38.0 ± 12.1)岁;Glasgow 昏迷量表(Glasgow coma scale, GCS)评分均 ≤ 8 分。住院期间死亡 7 例(男 5 例,女 2 例),均死于呼吸循环衰竭。所有患者均无心脏病、糖尿病、高血压、脑血管疾病等病史,入院时心电图检查正常。对照组:31 例健康人,其中男 19 例,女 12 例;平均年龄(38.0 ± 10.8)岁;既往无心脏病、糖尿病、甲亢、脑血管疾病等影响自主神经活性的疾病。

二、研究方法

采用由欧洲心血管学会和北美起搏和心电生理学会 HRV 专题委员会推荐的方法及指标,参照中华心血管病 HRV 对策组规定的统一方法,使用 Holter-Star 三导联全信息 24 h 连续动态心电图记录器及 3.0 版心率变异性分析系统。于患者入院 1 周内进行 24 h HRV 检测,将记录的 24 h 连续心电信号经 A/D 转换成数字信号后输入计算机,动态心电图分析系统自动识别窦性心搏,剔除早搏前、后的正常窦性心搏(NN)间期,自动计算 HRV 各项指标。

时域分析指标:①全部 NN 间期的标准差(SDNN);②全程按 5 min 分成连续的时间段,先计算每 5 min 的 NN 间期平均值,再计算所有平均值的标准差(SDANN),单位 ms;③全程相邻 NN 间期之差的均方根值(RMSSD),单位 ms;④三角指数(HRV triangular index);NN 间期的总个数除以 NN 间期直方图的高度。

频域分析指标:①总功率谱(TP)频段 0.04 ~ 0.40 Hz,反映植物神经总活性;②低频功率(LF)0.04 ~ 0.15 Hz,反映交感和副交感神经的双重活性;③高频功率(HF)0.15 ~ 0.40 Hz,反映迷走神经活性,是心脏副交感神经支配的定量指标。

非线性分析指标:①矢量角指数(VAI);②矢量长度指数(VLI);③NN 间期散点图(即 Poincare 散点图)。

三、统计学分析

全部结果数据以($\bar{x} \pm s$)表示,用 SAS 软件包进行统计学分析,检测资料采用 *t* 检验、单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

结 果

一、急性重度脑外伤患者的 HRV 特点

时域分析结果(表 1):与对照组比较,急性重度脑外伤组所有时域指标均降低, $P < 0.01$ 。

24 h 频域分析结果(表 1):与对照组比较,急性重度脑外伤组频域分析总功率谱面积均减少, $P < 0.01$,反映交感和副交感神经双重活性的 LF 较反映迷走神经活性的 HF 减少更明显, $P < 0.01$ 。

非线性分析结果:急性重度脑外伤患者散点图定量分析(表 1)与对照组相比,无论是反映散点图长度的指标,还是反映散点图散开程度的指标,急性重度脑外伤组均明显减少, $P < 0.01$ 。对照组 Poincare 散点图的特征为彗星状;急性重度

作者单位:250033 济南,山东大学第二医院神经外科(孙金龙),康复科(孙强三),心内科(马卫红);山东大学齐鲁医院保健科(孙晓莉)