

• 研究论文 •

新型光敏剂 BF01 光动力治疗人肝癌机制初步研究

谷长维*, 张 玲, 谷 鸣

(上海百菲生物医药科技有限公司, 上海 201203)

摘要: 本文探讨光敏剂二氢卟吩 e6 钛合物 BF01 光动力对人肝癌细胞株 BEL-7402 体外杀伤效应和体内抑瘤效应及其作用机制。实验采用 CCK-8 法检测同一激光强度不同给药浓度 (0、0.8、1.6、3.2、6.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的光敏剂 BF01 光动力对 BEL-7402 细胞的抑制率和半数抑制浓度 (IC_{50}), 通过流式细胞术检测 BEL-7402 细胞死亡方式, DAPI 染色观察细胞凋亡特征, 光动力照射后检测 BEL-7402 活性氧、共聚焦显微镜观察亚细胞定位, 建立裸鼠人肝癌细胞模型, 绘制肿瘤生长曲线, 观察治疗效果, 动物实验经华东理工大学伦理委员会批准。实验结果显示, BF01-PDT 治疗组能明显抑制 BEL-7402 肿瘤细胞增殖, BF01 的浓度为 $6.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其杀伤率达 86%, IC_{50} 是 $2.46 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 检测细胞死亡方式主要是以晚期凋亡为主, DAPI 染色细胞核的形态呈现出凋亡的特征, 活性氧水平随给药浓度增加而增加, 亚细胞定位在线粒体。体内实验表明, 光敏剂 BF01 介导的光动力疗法对人肝癌细胞及小鼠体内肿瘤生长抑制作用明显, 因此新型 BF01 光敏剂具备良好的应用前景。

关键词: 肝癌; 光敏剂; 凋亡; 亚细胞定位; 裸鼠模型

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)12-2251-05

Experimental study of photodynamic therapy using a new photosensitizer BF01 for human liver cancer

GU Chang-wei*, ZHANG Ling, GU Ming

(Shanghai Baifei Biomedical Technology Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract: We study here *in vitro* cytotoxicity, *in vivo* tumor inhibition and the mechanism on photodynamic therapy (PDT) of photosensitizer BF01 using human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402. CCK-8 method was used to detect the inhibition rate and IC_{50} in BEL-7402 cells on the same laser intensity with varying concentrations (0, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of photosensitizer BF01. Cell death mode of BEL-7402 was detected by flow cytometry, with apoptotic characteristics observed by DAPI staining, and the subcellular localization of reactive oxygen was observed using photodynamic detection and confocal microscopy. The cell model of human liver cancer in nude mice was established, tumor growth curve was drawn, and the therapeutic effect of BF01 was determined. The animal experimentation was approved by East China University of Science and Technology Ethics Committee. The results indicated that BF01 PDT treatment can clearly inhibit BEL-7402 tumor cell proliferation, with the killing rate of 86% at the concentration of $6.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of BF01, and half lethal concentration IC_{50} value of $2.46 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. DAPI stained nuclei shows the characteristics of advanced stage apoptosis, whereas reactive oxygen species level in the mitochondria increased with increasing drug concentration. *In vivo* experiments showed that photosensitizer BF01 mediated photodynamic therapy of liver cancer cells and inhibited tumor growth in mice. Therefore, the new BF01 photosensitizer has a potential for development into future clinic application.

Key words: liver cancer; photosensitizer; apoptosis; subcellular localization; nude mouse model

收稿日期: 2019-01-09; 修回日期: 2019-02-11.

基金项目: 上海市科技创新行动计划 (17431904600).

*通讯作者 Tel: 86-21-58602838, E-mail: gcw106@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0220

肝细胞癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一。在东南亚和非洲,由于乙型肝炎C型病毒感染的增加,预计肝癌的发病率在未来几年将进一步增加^[1,2]。目前,虽然传统的综合治疗方式(手术治疗、介入治疗、分子靶向治疗和放射治疗等)在肝细胞癌的全身治疗中起着重要的作用,然而治疗结果一般比较局限。并且某些方式(如放疗和靶向治疗)在延长肝癌患者的整体生存期的同时,往往也会对机体造成严重毒性和耐药性^[3,4]。因此,寻找一种有效的治疗肝细胞癌的方法是非常重要的。光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)是一种治疗癌症的新方法,它使用光敏剂(photosensitizer, PS)在特定波长激光照射下可引发一系列光化学和光生物学反应,其中最重要的是产生单态氧及释放前列腺素、淋巴因子、血栓素等细胞因子,破坏肿瘤组织的微血管和肿瘤细胞生物膜,从而杀伤肿瘤细胞,动物实验和临床应用均发现有较好的疗效^[5,6]。所以,光敏剂的开发成为PDT治疗中的一个重点和热点^[7]。

BF01(分子结构如图1)是上海百菲生物医药科技有限公司自主研发的一种新型光敏剂,课题组前期已经对光动力学参数进行摸索,确定了最佳光照剂量和给药浓度。本文将继续研究BF01-PDT对人肝癌细胞BEL-7402体外抑制作用功能性评价及初步探讨其作用机制,为其作为抗肿瘤新药提供理论依据。

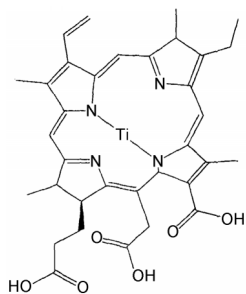


Figure 1 The chemical structure of BF01

材料与方法

材料 BF01为本公司实验室自行合成,纯度大于95%,(高效液相色谱检测),绿色粉末,化学名二氢卟吩e6钛合物,并利用钛离子对其进行改性,从而提高了BF01的各项性能,最大激发波长652 nm,易溶于水。体外实验用PBS配制母液 $4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。BEL-7402细胞、AnnexinV-EGFP细胞凋亡检测试剂盒和活性氧检测试剂盒均购自江苏凯基生物股份有限公司。Rhodamine 123购自上海翊圣生物科技有限公司。激光器购自南京来创激光科技有限公司。DAPI染色试剂盒购自南京碧波生物科技有限公司。NU/NU裸鼠(SPF级)购自北京维通利华实验动物技术有限公司[生产许可

SCXK(沪)2018-0006]。

CCK-8法测定不同光敏剂浓度对BEL-7402抑制率影响 对数生长期细胞培养于96孔培养板内,每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$,含 6×10^3 个肿瘤细胞,置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 温箱中培养。同时设立正常肝脏细胞作为对照,培养条件及细胞数同上。次日给药浓度设置0、0.8、1.6、3.2、6.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,孵育4 h,用PBS洗2遍后,加完全培养基后,利用激光器给予波长为650 nm的激光照射,照射剂量2.4 J,24 h后,每孔加 $10\text{ }\mu\text{L}$ CCK8,2 h后用酶标仪在波长450 nm条件下测OD值。并计算对肿瘤细胞抑制率、半数抑制率(IC_{50})及光敏剂对肝脏细胞有无杀伤效应。

BF01-PDT在BEL-7402中ROS的检测 对数生长期细胞培养于96孔培养板内,每孔 6×10^3 个肿瘤细胞。次日,给药组加入含有不同浓度的BF01。对照组加入含0.1% DMSO的培养液。孵育24 h后,加入DCFH-DA(终浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育30 min后,冷PBS洗2遍。利用激光器给予波长为650 nm的激光照射,功率为 $2.4\text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$,每孔1 min,利用荧光显微镜观察照相,酶标仪在408 nm处检测OD值。

BF01在BEL-7402细胞中的亚细胞定位 将BEL-7402细胞培养于共聚焦培养皿中,每皿1 mL(含 $2\times 10^4\sim 2.5\times 10^4$ 个肿瘤细胞。给药组加入BF01为 $3.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对照组加入含0.1% DMSO的培养液。孵育24 h后,倾去药物溶液,并用不带血清的培养基洗涤2次,按试剂盒操作,加入终浓度为 $500\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 线粒体染料Rhodamine 123,避光孵育30 min。用不带血清的培养基洗涤细胞2次,共聚焦显微镜下观察药物在细胞内的定位情况。

DAPI染色分析BF01-PDT作用BEL-7402细胞核形态 将BEL-7402细胞接种于24孔板,过夜培养。给药浓度设置:对照组 $0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,实验组 $3.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,作用时间为24 h。用甲醇把DAPI原液稀释10倍,制备成DAPI工作液。从细胞培养箱中取出24孔板,充分除去细胞培养液,每孔加入适量DAPI工作液洗涤细胞1次。充分除去上述工作液,每孔加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ DAPI工作液,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下避光染色15 min。充分除去上述DAPI工作液,用甲醇洗涤细胞1次,充分除去甲醇,加入适量Buffer A,在荧光显微镜下以340/380 nm紫外光为激发光进行观察,拍照记录。

流式细胞仪检测BF01-PDT对BEL-7402细胞凋亡率的影响 待6孔板细胞长满单层后,给药浓度设为0、3.2和 $6.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,经激光照射后,照射剂量为2.4 J,过夜培养,用胰酶消化细胞,PBS分别洗涤对照细胞和凋亡细胞样品, $800\times\text{g}$ 离心力,离心5 min,收集

$1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 细胞, 具体实验操作按 AnnexinV-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行, 样品准备好后进行流式细胞仪检测。

BF01-PDT对NU/NU裸鼠模型的体内抗肿瘤实验 收集 1×10^7 个 BEL-7402 细胞, 注射裸鼠皮下, 建立肿瘤模型。实验分为 4 组, 裸鼠性别为雄性, 每组 6 只, 共 24 只。每组裸鼠尾静脉注射光敏剂剂量分别为 0、2.5、5 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 1 次, 持续 6 次, 注射后 2.5 h, 每只小鼠均照射激光 1 min, 注射后 8.5 h, 每只小鼠均照射 1 min 激光。第 3、7、10、14、21 天测量裸鼠体重及肿瘤体积并计算相对肿瘤体积 (RTV)。动物实验结束后, 对动物实施安乐死, 颈椎脱臼法处死小鼠, 仔细剥离肿瘤组织称重, 实验结束后收集裸鼠主要脏器进行 HE 染色, 观察光敏剂裸鼠体内正常组织是否有损伤。该动物实验经华东理工大学动物实验伦理委员会批准。

统计学分析 采用 GraphPad Prism 5.0 软件对数据进行处理和分析, 所有数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 GraphPad Prism 5.0 软件剂量曲线拟合计算 IC_{50} 。

结果

1 CCK-8 法测定不同光敏剂浓度对 BEL-7402 抑制率影响

化合物 BF01 在药物浓度 $6.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 BEL-7402 抑制率达到 86%, 且暗毒性实验显示, 化合物 BF01 本身对细胞几乎没有暗毒性。实验结果表明, 体外对正常肝脏细胞没有杀伤效应。对光敏剂化合物 BF01 光动力 BEL-7402 细胞杀伤效应的剂量依赖曲线进行拟合, 计算 IC_{50} 为 $2.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 2)。

2 BF01-PDT 在 BEL-7402 中 ROS 的检测

光动力治疗中的一个关键环节就是 ROS 的产生, ROS 产生后可以与细胞和组织中的大分子发生多种反应, 引起了细胞系列的变化, 尤其是破坏了细胞和组织中的关键细胞器, 从而导致靶细胞和组织的死亡。本研究以 BEL-7402 为研究对象, 观察经过不同浓度化合物 BF01 孵育, 然后激光 652 nm (能量密度为 $2.4 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$) 照射, 引起 BEL-7402 细胞中 ROS 的产生。由图 3 可知, 随着 BF01 浓度的增加, 细胞中 ROS 产量也增加, 具有一定的量效关系。这一结果与 CCK8 检测的 BF01 对肿瘤细胞 BEL-7402 PDT 治疗作用的结果一致。

3 化合物 BF01 在 BEL-7402 细胞中的亚细胞定位

化合物 BF01 与 BEL-7402 肝癌细胞共孵育 24 h 后再与线粒体标记物孵育, 因为光敏剂可以激发红色荧光, 而细胞器线粒体的标记物为绿色荧光, 因而细胞中出现黄绿色颗粒说明两种荧光结合, 无黄色荧光说明

无结合。本研究结果发现化合物 BF01 分布在 BEL-7402 细胞线粒体内产生黄绿色荧光, 说明 EF01 分布在 BEL-7402 细胞中线粒体发挥 PDT 效应 (图 4A~C)。

4 BF01-PDT 作用 BEL-7402 细胞后细胞核的形态呈现出凋亡的特征

DAPI 染色结果 (图 5A、B) 显示, 对照组的细胞核较完整, 边缘清晰, 染色均匀, 产生较弱的蓝色荧光; 给药组 $3.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 部分细胞出现核边缘不规则, 细胞核

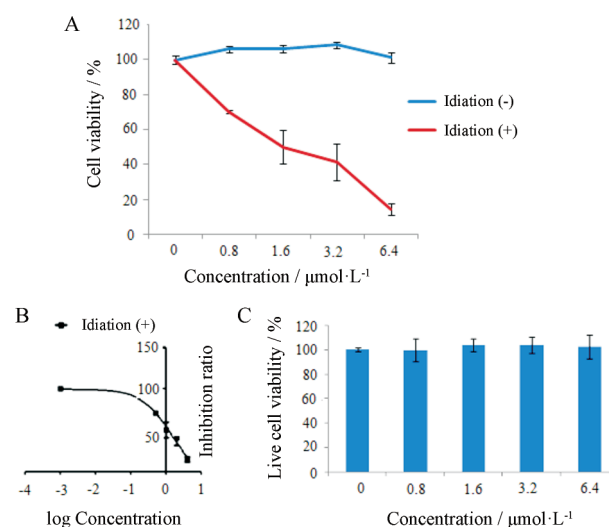


Figure 2 Cell viability after BF01-PDT was assessed. A: After irradiation or not, BEL-7402 cells viability was measured by CCK-8 assay; B: Cytotoxic activity of BF01-PDT on BEL-7402 cells; C: Without irradiation, normal liver cells viability was measured by CCK-8 assay. PDT: Photodynamic therapy. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

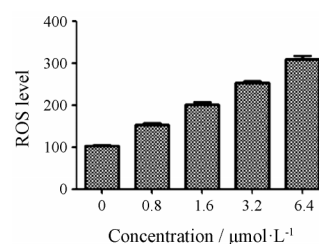


Figure 3 Generation of reactive oxygen species (ROS) in BF01 cells treated with BF01-PDT. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

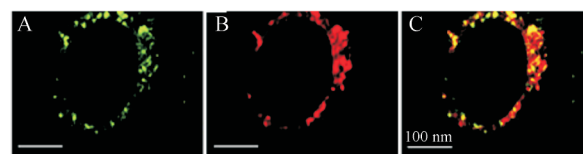


Figure 4 Fluorescence microscopy analysis of the subcellular localization of BF01 in BEL-7402 cells. A: Fluorescence arising from R123 alone (green); B: Fluorescence arising from BF01 alone (red); C: In the merge, yellow represents the subcellular regions in which the fluorescence of R123 and BF01 overlaps

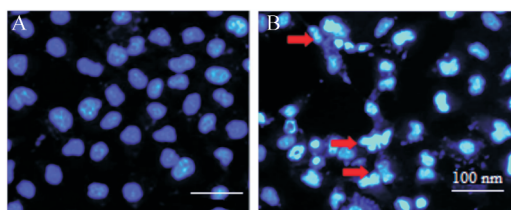


Figure 5 Nuclear morphology in BEL-7402 treated with BF01-PDT by DAPI staining analysis. A: Control group showing complete nucleus; B: Medication group showing typical apoptosis characteristics

固缩, 细胞核碎片增加, 产生较强的蓝色荧光, 呈现出典型的凋亡特征 (如图4B中的红色箭头所示)。

5 流式细胞仪检测 BF01-PDT 对 BEL-7402 细胞凋亡率的影响

用 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒检测了 BF01-PDT 作用人肝癌细胞 BEL-7402 细胞的凋亡的情况。从图6可以看出, 给药组 (3.2 和 $6.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) PDT 可以诱导 BEL-7402 明显产生凋亡, 并且凋亡主要以晚期凋亡为主。

6 BF01-PDT 对 NU/NU 裸鼠模型的体内抗肿瘤研究

从图7可以看出, $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ BF01 在第14天的时候肿瘤抑制率达到最大。裸鼠实验模型证明 BF01-PDT 可以抑制小鼠肝癌 BEL-7402 的生长, 且裸鼠尾静脉给药模式抑制作用较强, 说明 BF01-PDT 在体内有较好的抗肿瘤活性。表1结果显示, 3个剂量治疗组的肿瘤重量与对照组相比明显减小, 有显著性差异; 在本

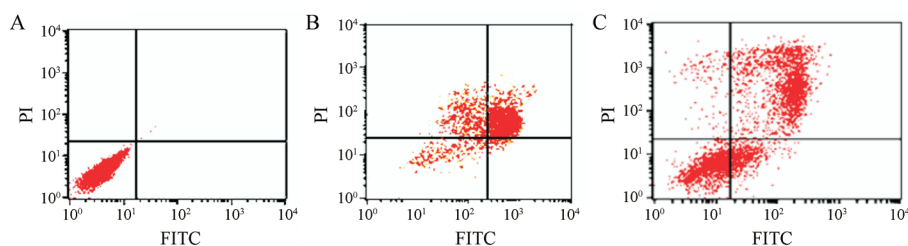


Figure 6 Flow cytometric analysis of apoptosis in BEL-7402 cells treated with or without BF01. A: Control group; B: Medication group ($3.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); C: Medication group ($6.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

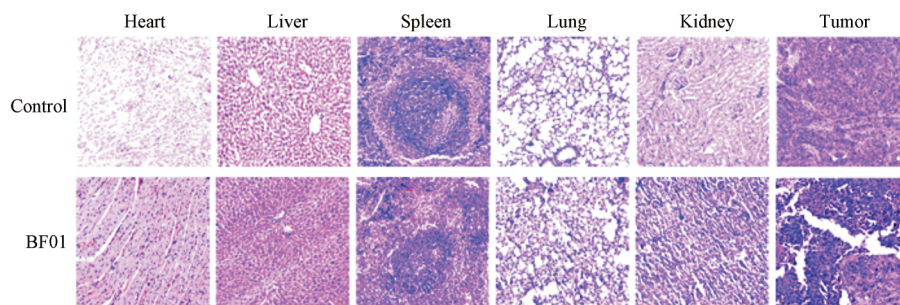


Figure 8 The micrographs of HE-stained sections of main organs and tumors after treatment. Almost no pathological changes and injuries were detectable in the main organs in mice after treatments of BF01 laser irradiation

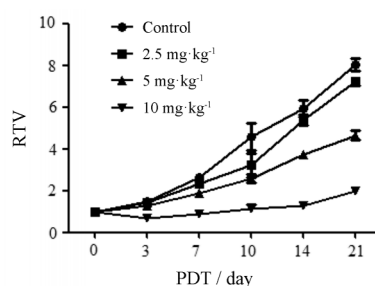


Figure 7 Anti-tumor effect of BF01-PDT on NU/NU nude mouse model. Tumor response in mice treated with BF01-PDT at the indicated doses of BF01. BF01-PDT was performed when tumor volume reached about $50\text{--}150 \text{ mm}^3$. Each time point represents the average response rate [relative tumor volume (RTV) of six mice]. BF01 dose-dependent tumor reduction was shown in BEL-7402 tumors treated with BF01-PDT. $n = 6, \bar{x} \pm s$

Table 1 Inhibition of BF01-PDT on liver cancer NU/NU nude mice. $n = 6, \bar{x} \pm s. ^*P < 0.05$ vs control group

BF01 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Tumor weight /mg	Weight /g	Inhibition rate/%
0	1485.3 ± 658.1	34.2 ± 2.5	
2.5	635 ± 463.5	32.7 ± 2.9	57.2*
5	454 ± 256.7	31.5 ± 1.8	69.4*
10	348 ± 105.3	30.4 ± 1.5	76.6*

次实验中给药组小鼠与对照相比较, 体重有少许减轻, 但与对照组相比无显著性差异, 说明有效剂量的 BF01 无明显的系统毒性。另外, 收集主要脏器及肿瘤, 对其进行 HE 染色 (图8), 结果表明其主要分布在肿瘤和肝脏中, 说明 BF01 具有良好的靶向性和蓄积能力, 光敏

剂BF01对小鼠主要脏器几乎没有病理变化和损伤。

讨论

本研究开发的化合物具有光响应范围宽且灵敏、光毒性小特点,靶向性强,不易发生光降解且容易保存,在使用相同剂量条件下能更为有效地杀伤肿瘤细胞,抑制细胞增殖。光动力学治疗的一个重要优势就是光敏剂本身是无细胞毒性的,只有在光、氧气的存在下才能发挥作用,从而光动力学治疗有很强的靶向性。光敏剂如何作用于靶组织或肿瘤组织的关键是由它的亚细胞定位决定的^[8]。PDT诱导细胞产生凋亡的机制与光敏剂的定位,细胞类型密切相关。线粒体在细胞死亡机制中发挥关键作用并且与抑制凋亡通路相关^[9]。

但是其通过何种途径还有待进一步研究验证。在PDT的治疗中,产生的ROS可以破坏细胞内的大分子如脂质、核酸和蛋白质等,当这些损坏积累到一定程度时ROS不但诱导自噬而且会激活自噬性的细胞死亡,所以ROS的类型、氧化损伤的程度和涉及的分子靶标影响了PDT诱导自噬性死亡的结果^[10]。体外细胞实验使课题组掌握了BF01-PDT对人肝癌细胞BEL-7402细胞的作用规律及相关治疗参数,体内实验显示,BF01-PDT可以明显抑制小鼠肝癌生长,抑制效果十分明显,这一结果与肿瘤内光敏剂蓄积多少有一定关系,局部肿瘤给药光敏剂可以不经过代谢,最大量地进入肿瘤细胞内,因而会产生较好的治疗效果,而决定PDT结果最重要因素是光敏剂如何作用于靶组织或肿瘤组织。而本研究所涉及的新型光敏剂亚细胞定位主要是定位在细胞的线粒体中。研究发现BF01定位于肿瘤细胞的线粒体,在激光照射的情况下产生具有细胞毒性的活性氧,从而杀死病变细胞^[11],二者之间存在的必然联系。而这些研究结果,为接下来的研究奠定了一定的基础。但是关于BF01光敏药物杀伤肝癌的

进一步机制还需进行更深入的研究,这必将极大推进该光敏药在肝癌治疗领域中的应用。

References

- [1] Chan HL, Hui AY, Wong ML, et al. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma [J]. *Gut*, 2004, 53: 1494-1498.
- [2] Harnois DM. Hepatitis C virus infection and the rising incidence of hepatocellular carcinoma [J]. *Mayo Clin Proc*, 2012, 87: 7-8.
- [3] Guha C, Kavanagh BD. Hepatic radiation toxicity: avoidance and amelioration [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2011, 21: 256-263.
- [4] Yan J, Zhou Y, Chen D, et al. Effects of mitochondrial translocation of telomerase on drug resistance in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer*, 2015, 6: 151-159.
- [5] Pervaiz S, Olivo M. Art and science of photodynamic therapy [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, 33: 551-556.
- [6] Chiaviello A, Paciello I, Postiglione I, et al. Combination of photodynamic therapy with aspirin in human-derived lung adenocarcinoma cells affects proteasome activity and induces apoptosis [J]. *Cell Prolif*, 2010, 43: 480-493.
- [7] Li B, Chu XM, Gao MH, et al. Research on the mechanism of phycocyanin mediated photodynamic therapy in the treatment of breast cancer [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2011, 27: 383-389.
- [8] Szliszka E, Czuba ZP, Mazur B, et al. Chalcones and dihydrochalcones augment TRAIL-mediated apoptosis in prostate cancer cells [J]. *Molecules*, 2010, 15: 5336-5353.
- [9] Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 501-507.
- [10] Scherz-Shouval R, Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy [J]. *Trends Cell Biol*, 2007, 17: 422-427.
- [11] Deng CY, Long YY, Liu X, et al. Construction of biotin-modified polymeric micelles for pancreatic cancer targeted photodynamic therapy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 1038-1044.