

竹红菌甲素对肝癌细胞线粒体和微粒体的光动力效应

傅乃武、褚衍信 (中国医学科学院肿瘤医院药理室, 北京 100021, 中国)

安静仪 (中国科学院感光化学研究所, 北京 100012, 中国)

Photodynamic action of hypocrellin A on hepatoma cell mitochondria and microsomes

FU Nai-Wu, CHU Yan-Xin (Department of Pharmacology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China) AN Jing-Yi (Institute of Photosensitive Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100012, China)

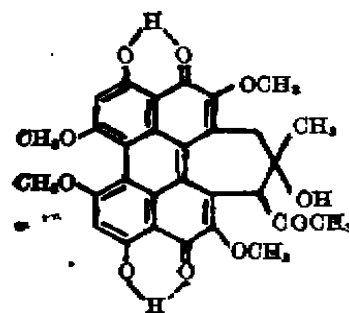
ABSTRACT Hypocrellin A (HA), a perylene quinone derivative, is a new photosensitizer extracted from *Hypocrella bambusae* (B et Br) Sacc. A high voltage sodium lamp was used as the light source; the illumination intensity was 105 mW/cm². After HA 25 µg/ml and illumination for 10 min, mitochondrial ATPase and microsomal G-6-Pase of hepatoma cells were intensively inhibited, but mitochondrial MAO was not affected. Sulfhydryl contents of the mitochondrial and microsomal membrane proteins were significantly reduced. Lipid peroxidation of mitochondrial and microsomal membrane lipids were greatly enhanced. It is concluded that mitochondria and microsomes are the sensitive targets in cells with respect to HA photosensitization.

KEY WORDS hypocrellin A; mitochondria; microsomes; hepatoma cells; lighting

摘要 竹红菌甲素(hypocrellin A, HA)25 µg/ml 合并照光 10 min, 光照强度为 105 mW/cm², 明显抑制肝癌细胞线粒体 ATP 酶和微粒体葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-Pase), 线粒体和微粒体膜蛋白巯基含量显著减少, HA 5 µg/ml 和 6.25 µg/ml 合并上述照光条件, 微粒体和线粒体脂质过氧化产物显著增加, HA 50 µg/ml 同样照光条件下, 线粒体逐渐肿胀, 光吸收减少。

关键词 竹红菌甲素; 线粒体; 微粒体; 肝癌细胞; 采光

血卟啉衍生物对一些类型肿瘤的光动力治疗取得确实效果。由于它存在的一些缺点, 寻找新的更为完善的光敏剂是各国有关学者正在努力的方向。竹红菌甲素(hypocrellin A, HA)是我国学者首先发现的一种新型光敏剂⁽¹⁾。它是从肉座科竹红菌 *Hypocrella bambusae* (B et Br)Sacc 中分离到的一种光敏色素, 是萘醌类衍生物⁽¹⁾。临床应用对消除外阴白色病变和疤痕疙瘩有显著疗效。我们观察到 HA 对人癌细胞和动物肿瘤有明显的光杀伤效力⁽²⁾, 有可能成为一种治疗肿瘤的新型光敏药物。对其作用方式曾有一些报道⁽³⁾。本文应用肝癌细胞线粒体和微粒体以观察 HA 的光敏效应, 为其光动力治疗提供理论依据。



Hypocrellin A

Received 1988 Jun 2 Accepted 1988 Dec 13

MATERIALS AND METHODS

昆明种小鼠(中国医学科学院实验动物中心繁育场供给), ♀, 体重 $20.3 \pm \text{SD } 2.1 \text{ g}$, 腹水肝癌(Hep A)每7 d 传代一次, 本实验所用为接种后 d7 腹水, 用 PBS 稀释至所需浓度。HA 是中国科学院感光化学研究所提纯供给。用无水乙醇溶解, 再加双蒸水配成所需浓度, 乙醇终浓度小于 1%。5'-ATP (Na_2) (含量 98% 以上) 为 GMBH 产品, D-glucose-6-phosphate (Na_2) 为 Sigma 产品, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 为 Carl Roth 产品。其它试剂是北京试剂厂产品, AR。

将肝癌细胞线粒体和微粒体提取和分离⁽⁴⁾。G-6-Pase 和膜脂质过氧化物测定用比色法⁽⁴⁾。ATP 酶测定⁽⁵⁾, MAO 测定⁽⁶⁾, 巯基测定⁽⁷⁾, 蛋白质测定⁽⁸⁾ 及线粒体肿胀实验⁽⁹⁾ 均用比色法。照射光源用高压钠灯(北京灯泡厂提供), 其功率为 400 W, 发射光谱主峰在 600 nm 左右, 本实验光照强度为 105 mW/cm^2 。样本距光源 10 cm。灯管周围有一密封玻璃套管, 通以流动冷水以散热(套管壁与水层总厚为 5 mm)。

RESULTS

HA 对肝癌细胞线粒体 ATP 酶, MAO 和膜蛋白巯基的光辐射效应 HA $25 \mu\text{g/ml}$ 合并照光 10 min, 明显抑制 ATP 酶活性和膜蛋白巯基(SH)含量, 剂量增至 $50 \mu\text{g/ml}$, 酶活性和巯基含量进一步降低(Tab 1)。MAO 对 HA 光敏效应不敏感, HA $50 \mu\text{g/ml}$, 照光时间延长至 15 min, 酶活力与对照组无明显差别。

HA 对肝癌细胞线粒体和微粒体膜的光氧化作用 HA $6.25 \mu\text{g/ml}$ 合并照光 10 min, 线粒体脂质过氧化产物显著增加, 剂量增至 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 和 $25 \mu\text{g/ml}$, 脂质过氧化产物进一步增加。HA $5 \mu\text{g/ml}$ 和 $16 \mu\text{g/ml}$, 照光 10 min, 微粒体膜脂质过氧化产物亦明显增多(Tab 2)。

Tab 1. Photodynamic action of hypocrellin A (HA, $\mu\text{g/ml}$) on mitochondrial ATPase and SH content of membrane protein of hepatoma cells, illumination intensity 105 mW/cm^2 , $n=3$ expts, 1 mouse/expt, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs control.

HA	Irradiation (min)	ATPase activity ($\mu\text{mol P}_i/\text{mg protein/min}$)	SH content ($\mu\text{mol/mg protein}$)
—	—	0.67 ± 0.39	26.7 ± 0.2
—	10	$0.45 \pm 0.18^*$	$25.8 \pm 0.2^*$
50	—	$0.49 \pm 0.29^*$	$24.7 \pm 0.1^*$
25	10	$0.08 \pm 0.04^{**}$	$20.0 \pm 0.2^{**}$
50	10	$0.03 \pm 0.01^{***}$	$18.2 \pm 0.3^{**}$

Tab 2. Photo-oxidation of mitochondrial and microsomal membrane of hepatoma cells by hypocrellin A (HA, $\mu\text{g/ml}$), illumination intensity 105 mW/cm^2 , $n=3$ expts, 1 mouse/expt, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs control.

HA	Irradiation (min)	TBA-reactive material (nmol/mg protein)	
		Mitochondria	Microsome
—	—	39.6 ± 11.3	89.6 ± 44.0
—	10	$66.7 \pm 18.1^*$	$93.5 \pm 10.7^*$
16	—	—	$107.5 \pm 27.9^*$
5	10	—	$221.5 \pm 43.0^{**}$
16	10	—	$270.9 \pm 15.0^{***}$
25	—	$54.3 \pm 30.5^*$	—
6.25	10	$242.2 \pm 91.6^{**}$	—
12.5	10	$316.9 \pm 50.9^{***}$	—
25	10	$439.6 \pm 119.9^{***}$	—

HA 对肝癌细胞微粒体 G-6-Pase 和膜蛋白巯基含量的光敏效应 HA $12.5 \mu\text{g/ml}$ 照光 10 min, G-6-Pase 活性和 SH 含量比对照组显著减低, 剂量增至 $25 \mu\text{g/ml}$, 且显现出剂量-效应关系(Tab 3)。

肝癌细胞线粒体肿胀实验 在等渗蔗糖溶液内, 线粒体悬液在 550 nm 的光吸收条件下, 4 min 内维持稳定水平, A 值变化范围为 0.221 至 0.219。HA $50 \mu\text{g/ml}$ 合并照光 10 min, A 值逐渐减少, 4 min 内 A 值为 0.182 至 0.179。

Tab 3. Photodynamic action of hypocrellin A (HA, $\mu\text{g/ml}$) on microsomal glucose-6-phosphatase and sulfhydryl content of membrane protein of hepatoma cells, illumination intensity 105 mW/cm^2 , $n=3$ expts, 1 mouse/expt, $\bar{x}\pm\text{SD}$. * $P>0.05$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$ vs control.

HA	Irradiation (min)	G-6-Pase activity (nmol P_i/mg protein)	SH content ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)
—	—	21.1 ± 7.1	10.4 ± 1.4
—	10	$18.7\pm 9.4^*$	$10.8\pm 1.8^*$
35	—	$17.4\pm 7.9^*$	$10.8\pm 1.6^*$
12.5	10	$10.6\pm 4.3^*$	$8.8\pm 1.4^*$
25	10	$8.0\pm 1.8^{**}$	$6.9\pm 1.6^{**}$

DISCUSSION

本文结果表明, HA 在光激发下使肝癌细胞线粒体和微粒体膜脂质过氧化作用显著增强, 膜蛋白巯基的含量明显减少, 表明膜脂质和膜蛋白的结构遭受破坏。但是, 从有效光敏剂量看, HA $5 \mu\text{g/ml}$ 已能使膜脂质过氧化产物明显增加; 而使膜蛋白巯基减少的有效剂量为 $25 \mu\text{g/ml}$, 表示膜脂质多不饱和脂肪酸对 HA 的光辐射作用比膜蛋白更为敏感。ATP 酶是线粒体内与能量代谢有关的重要酶, 存在于线粒体内膜, 对 HA 光敏效应很敏感。MAO 存在于线粒体外膜, 与单胺代谢有关, 对 HA 光辐射作用不敏感, 说明 HA 对线粒体功能的损伤有一定选择性。G-6-Pase 是微粒体的标志酶, 其活性减低表示微粒体完整性遭受破坏。线粒体肿胀实验反映线粒体对溶质的通透性发生改变, 表示在 HA 光辐射作用下其膜结构的完整性受到破坏。以上结果说明, HA 对线粒体和微粒体产生明显的光动力效应, 破坏其结

构和功能。我们认为, 在 HA 对癌细胞的光杀伤作用中, 线粒体和微粒体是细胞内 HA 光动力学作用的敏感靶部位。

REFERENCES

- 1 Wan XY, Chen YT. Hypocrellin A — a new drug for photochemotherapy. *Kexue Tongbao* 1981; 26 : 1040
- 2 傅乃武、褚衍信、燕利学、安静仪、第五振军。竹红菌甲素对人癌细胞和动物实体肿瘤光动力治疗的研究。中华肿瘤杂志 1988; 10 : 80
- 3 Cheng LS, Wang JZ. Photodamage in human erythrocyte membranes, induced by a new photosensitizer-hypocrellin A. *Acta Biol Exp Sin* 1985; 18 : 89
- 4 Fu NW, Ye SY, Zheng J, Zhao XH, Zhang LS. Photosensitization of mitochondrial and microsomal enzymes by hematoporphyrin derivative *in vitro*. *Acta Acad Med Sin* 1985; 7 : 442
- 5 Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 1979; 100 : 95
- 6 Salach JI Jr. Preparation of monoamine oxidase from beef liver mitochondria. In: Fleischer S, Packer L, eds. *Biomembranes*, 1978 : 495-501. (Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in enzymology*; vol 53)
- 7 Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82 : 70
- 8 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 9 Hunter FE Jr, Scott A, Hoffsten PE, Gebicki JM, Weinstein J, Schneider A. Studies on the mechanism of swelling, lysis and disintegration of isolated liver mitochondria exposed to mixtures of oxidized and reduced glutathione. *Ibid* 1964; 239 : 614