

四溴荧光素对细胞杀伤作用的活性氧机理

周秀芳、王跃华、郝荣梁、王流芳¹ (兰州大学生物物理教研室、¹无机化学教研室, 兰州 730001, 中国)

Mechanism of active oxygen in cytotoxic activity of tetrabromofluorescein

ZHOU Xiu-Fang, WANG Yao-Hua, ZHENG Rong-Liang, WANG Liu-Fang¹(Section of Biophysics and ¹Section of Inorganic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730001, China)

ABSTRACT Photosensitization induced by tetrabromofluorescein (eosin, 3.8 $\mu\text{mol/L}$) in ascites hepatoma cells or in normal kidney cells of mice was found to be significant. The cytotoxic activity increased in proportion to the concentration of fluorescein as well as with irradiation time. ESR signals were not detected using a trapping agent, 2, 2, 6, 6-tetramethyltetrahydroxypiperidine (TMHP) which functions as a singlet oxygen probe. No effect on photosensitization by superoxide dismutase (SOD), NaN_3 , histidine, mannitol or β -carotene were observed. However, catalase did decrease photosensitization. These results indicate that cytotoxic activity is not related to $^1\text{O}_2$, O_2^- or OH^\cdot , but is related to H_2O_2 . The cytotoxic activity of tetrabromofluorescein in ascites hepatoma cells is stronger than that in normal kidney cells.

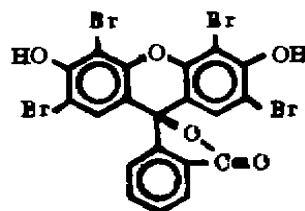
KEY WORDS eosin; phototherapy; free radicals; superoxide dismutase

摘要 四溴荧光素(曙红)无论对腹水型肝癌细胞还是正常肾细胞都有较明显的光敏作用, 对细胞杀伤作用随着浓度的增加及光照时间的延长而加强。作为 $^1\text{O}_2$ 探针的2,2,6,6-四甲基四羟基哌啶(TMHP)未能捕集到ESR信号,SOD, NaN_3 , 组氨酸, 甘露醇和 β -胡萝卜素都对光敏作用无明显影响, 过氧化氢酶能使细胞死亡率明显降低, 说明杀伤作用与 H_2O_2 有关。

Received 1988 Apr 4 Accepted 1988 Dec 6

关键词 曙红; 光疗法; 自由基; 超氧化物歧化酶

利用光敏反应杀死癌瘤的技术是近年来国内外正在研究的新课题, 许多药物包括光敏剂都是通过自由基代谢物产生药效的⁽¹⁾。至于光敏剂对癌细胞的杀伤效应机理尚有不同看法, 有人认为与单线态氧有关, 有人认为与氧自由基有关, 本文观察了四溴荧光素(tetrabromofluorescein, TBF)、曙红对腹水型肝癌细胞和正常肾细胞的光敏反应并验证其自由基机理。



Tetrabromofluorescein (TBF)

MATERIALS AND METHODS

先用丙酮 0.5 ml 将 TBF(上海化学试剂三厂)溶解, 再用灭菌无离子水定容至 5 ml, 配成 10, 1, 0.1, 0.01 mmol/L 备用。

抽取小鼠肝癌腹水, 培养于含 20% 小牛血清的 1640 培养液中, 每瓶 5 ml, 含肝癌细胞 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 加青霉素 100 U/ml 及链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pH 7.2-7.4 置 37 $^\circ\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 15-20 h 加 TBF 后光照, 避光组在细胞

瓶外包一层黑纸。

光源用 1000 W 碘钨灯，光距 37 cm。用水隔热，水层厚 16 cm，玻璃厚 0.5 cm，室温 20℃ 左右。

正常肾细胞的单层培养：取体重 5 ± 1 g 小鼠 3-6 只，断颈杀死，取出肾脏，剪碎，加入 8 ml, pH 7.2-7.4, 0.25% 的胰蛋白酶液于磁力搅拌器上消化 8-10 min，消化 2-3 次，以 $100 \times g$ 离心 10 min 弃上清液，沉淀用 Hanks 液漂洗 2-3 次，将沉淀培养于含 10% 小牛血清及青链霉素的 199 培养液中，pH 7.2-7.4。在青霉素小瓶内放小盖玻片，每瓶 1 ml 培养液，含细胞 $(1-5) \times 10^5$ /ml 于 37℃ CO₂ 培养箱中培养 4-6 d，待细胞铺平展开形成单层后加 TBF 照光。

将作为 ¹O₂ 探针⁽²⁾ 的 2,2,6,6-四甲基四羟基哌啶 (2,2,6,6-tetramethyltetrahydroxypiperidine, TMHP) (中国科学院生物物理所合成)，用丙酮：Tris-HCl (50 mmol/L, pH 7.4) (1:4, vol:vol) 配成 0.1, 1 和 10 mmol/L 然后与 0.01, 0.1, 1 mmol/L 的 TBF 按一定比例混匀，装入毛细石英管中，在照光 10 min 与不照光的情况下，用德国 Bruker 200 D-SRC 顺磁共振仪测定其自由基含量。

RESULTS AND DISCUSSION

不同浓度 TBF 的光敏作用 无论对癌细胞或肾细胞 TBF 的浓度在 $0.38 \mu\text{mol/L}$ 时杀伤作用不明显，浓度 $3.8 \mu\text{mol/L}$ 时，照光后 2 h 出现光敏作用，死亡率随着 TBF 浓度的增加而明显增加，但加 TBF 不照光时死亡率与对照组 (不加药不照光) 接近，均约 0.1%，溶剂 (0.5 ml 丙酮加 4.5 ml 无离子水) 对细胞毒害作用甚小，死亡率也约为 0.1%。当浓度相同时，癌细胞对 TBF 的光敏作用比正常肾细胞敏感 (Fig 1)。

不同温育时间的影响 无论癌细胞或正常肾细胞加 TBF 后温育 1 h，TBF 对细胞的光敏杀伤作用已达最高值，随着温育时间的增加，

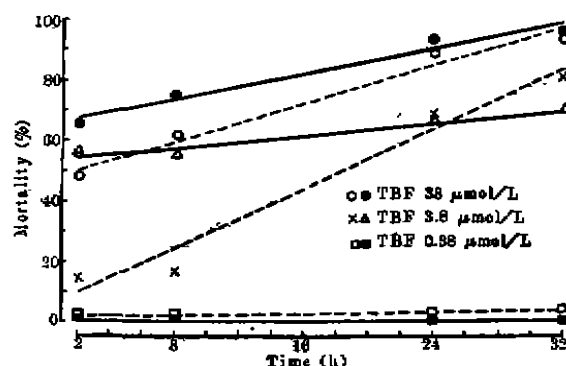


Fig 1. Effects of tetrabromofluorescein (TBF) on cells mortality. (—) ascites hepatoma cells, (---) normal kidney cells of mice.

杀伤作用迅速下降 (Fig 2 A)，这也许是由于随着温育时间的延长，细胞对 TBF 有一定的代谢分解作用所致。

不同照光时间的影响 TBF 与细胞温育 1 h 后照光，随着照光时间的增加，两种细胞死亡率都明显增加 (Fig 2 B)。

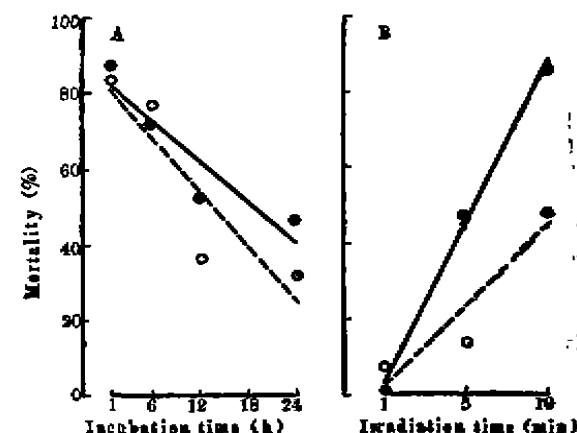


Fig 2. Effects of TBF on cells mortality varied with incubation time (A) and irradiation time (B). (○) TBF $38 \mu\text{mol/L}$ for kidney cells, (●) TBF $20 \mu\text{mol/L}$ for hepatoma cells.

单线态氧、羟自由基与超氧阴离子的作用 无论何种浓度 (0.1, 1, 10 mmol/L) 的 TMHP 与何种浓度 (0.01, 0.1, 1 mmol/L) 的 TBF 相结合，照光或不照光均无 ESR 信号产生，单独的 TBF 或单独的 TMHP 照光或不照光也都测不到 ESR 信号，可见 TBF 的光敏反应中无

$^1\text{O}_2$ 产生。

迭氮化钠 NaN_3 ⁽³⁾、组氨酸及 β -胡萝卜素是 $^1\text{O}_2$ 的清除剂，将它们分别与已加入 TBF 的腹水癌细胞温育 1 h 后照光 10 min，它们对光敏作用的影响都不明显 (Tab 1)，进一步说明光敏反应与 $^1\text{O}_2$ 无关。

甘露醇是 OH^\cdot 的清除剂⁽⁵⁾，它对细胞也无明显的保护作用。

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 是 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的有效清除剂⁽⁶⁾，它对 TBF 的光敏反应也无明显影响 (Tab 1)。看来 $^1\text{O}_2$ 、 OH^\cdot 及 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 在 TBF 的光敏作用中都不起作用。

过氧化氢的作用 在加入 TBF 的同时，加入过氧化氢酶 (catalase) 对细胞有明显的保护作用，加入灭活后的过氧化氢酶细胞死亡率与

不加过氧化氢酶时的死亡率几乎相等 (Tab 1)。可见 TBF 光敏作用与 H_2O_2 有着密切关系。

本结果与巨噬细胞杀伤癌细胞的机理⁽⁷⁾ 相同，他们发现光敏反应中与 $^1\text{O}_2$ 、 OH^\cdot 及 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 无关，仅与 H_2O_2 有关。

TBF 对癌细胞的杀伤作用大于对正常肾细胞的杀伤作用。

致谢 中国科学院生物物理研究所张清刚同志提供 2,2,6,6-四甲基四羟基吡啶。

Tab 1. Cytocidal activity of tetrabromofluorescein (TBF) (20 $\mu\text{mol/L}$) combined with scavengers of oxygen radicals on ascites hepatoma cells of mice.

TBF 20 $\mu\text{mol/L}$ + Scavengers ($\mu\text{g/ml}$)	Mortality of cells (%) after irradiation			
	2 h		24 h	
	Dark	Light	Dark	Light
Control	0.1	89.2	0.1	93.1
NaN_3 (25)	0.1	73.6	0.1	94.8
Histidine (600)	0.1	81.5	0.4	99.8
Histidine (60)	0.1	91.8	0.8	99.7
Solvent of β -carotene*	0.4	0.8	1	1.2
β -Carotene (20.6)	0.3	77.1	0.3	89.8
β -Carotene (2.06)	0.1	53.6	0.1	99.5
Mannitol (20)	0.7	79.5	0.9	88.6
SOD (76.5)	1.2	65.4	1.5	97.8
Inactive SOD (76.5)	0.1	83.5	0.3	98.3
Catalase (38.4)	0	8.9	1.2	4.2
Inactive catalase (38.4)	0.1	82.9	0.1	99.8

* Propanediol 0.5 ml + deionized water 4.5 ml

REFERENCES

- 1 Li ASW, Chignell CF. Spectroscopic studies of cutaneous photosensitizing agents. IX. A spin trapping study of the photolysis of amiodarone and desethylamiodarone. *Photochem Photobiol* 1987; 2 : 191
- 2 Liu F, Huang NN, Zhang QG. ESR studies of the channel of photooxidation-photoreduction by hematoporphyrin derivatives. *Acta Biochim Biophys Sin* 1987; 19 : 8
- 3 Hasty N, Merkel PB, Radlick P, Kearns DR. Role of azide in singlet oxygen reactions: reaction of azide with singlet oxygen. *Tetrahedron Lett* 1972; 13 : 49
- 4 Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford : Clarendon Press, 1985 : 52-55
- 5 Weitzman SA, Stossel TP. Effect of oxygen radical scavengers and antioxidants on phagocyte-induced mutagenesis. *J Immunol* 1982; 128 : 2770
- 6 McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte cuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244 : 6049
- 7 Nathan CF, Cohn ZA. Antitumor effects of hydrogen peroxide *in vivo*. *J Exp Med* 1981; 154 : 1539