

裸鼠体内人肝癌细胞受血卟啉光辐射作用后两种酶组织细胞化学研究

彭 迁、何德华、张武扬、董荣春 (第二军医大学病理教研室, 上海 200433)

提要 用光镜观察和显微分光光度仪定量测定 癌光卟啉加红光处理对人体肝癌细胞裸鼠移植瘤细胞线粒体指标酶 SDHase 和细胞质膜指标酶 5'-Nase 活性的影响。结果, SDHase 活性随处理后时间延长而减弱, 5'-Nase 活性在处理早期增强, 以后下降。提示对线粒体膜和细胞质膜上酶类活性的破坏是癌光卟啉光敏效应杀伤活体内人肝癌细胞的主要途径之一。

关键词 培养细胞; 裸鼠; 癌光卟啉; 血卟啉光辐射; 肝肿瘤; 组织细胞化学; 琥珀酸脱氢酶; 5'-核苷酸酶

血卟啉光动力学疗法 (photodynamic therapy, PDT) 杀伤肿瘤细胞的靶部位是线粒体和细胞质膜⁽¹⁾。我校最新研制的癌光卟啉 (carcinophotorin) 是一种新型肿瘤光化学诊断、治疗剂⁽²⁾, 其所含主要成分不同于目前国内外所使用的血卟啉衍生物 (HPD) 和光敏素 II (photofrin II) 等光敏剂^(3,4), 并获得更好的杀伤效应⁽⁵⁾。本文测定癌光卟啉加红光对人肝癌细胞裸鼠移植瘤细胞线粒体指标酶琥珀酸脱氢酶 (SDHase) 和细胞质膜指标酶 5'-核苷酸酶 (5'-Nase) 活性的影响, 以探究 PDT 杀伤人癌细胞的机理。

材 料 和 方 法

癌光卟啉由本校抗疟药研究室合成, 浓度为 10 mg/ml, 批号 840413, 剂量 5 mg/kg。

以 GZA-I 型光敏医疗仪为照射光源, 系中原电子技术研究所和解放军总医院研制。光源为卤钨灯加红色滤片, 24 V, 400 W, 波长 600-640 nm, 功率密度 $75 \pm 5 \text{ mW/cm}^2$, 实验前后均采用对波长无选择的热电偶功率计 (LW-I 型激光功率计, 中国计量院实验工厂生

产) 进行测定。照射 30 min。

裸鼠人肝癌动物模型 用在体外培养已建株的人体肝癌细胞 (SMMC-7721 细胞)⁽⁶⁾ 接种、移植入无胸腺 Balb/c nu/nu 裸鼠皮下, 并连续传代⁽⁷⁾。

光敏实验 将带有人体肝癌组织的裸鼠随机分成对照组和实验组。对照组又分移植瘤组、单纯用药组和单纯照光组。实验组又分用药加照光后即刻组、5、30 min 组、2、8 和 24 h 组。上述每组均为 3 只裸鼠。

癌光卟啉 iv 5 mg/kg, 避光 24 h 后, 用黑纸遮盖裸鼠, 仅暴露出移植瘤部分, 用光敏医疗仪对移植瘤局部进行照射, 然后按规定时间分别取材进行酶组织化学的检测。对照组中用药组仅与实验组等量的癌光卟啉而不照光, 照光组仅在移植瘤局部给予和实验组相同剂量的光辐照而不用药。上述操作过程均在避光环境下进行。

酶组织化学含量测定 移植瘤组织在低温冰冻切片 (AO crystate) 上切成 8 μm 厚的连续切片后, 为保证实验各组在孵育等操作过程中条件的一致和便于比较, 把对照、实验 9 组的实验标本分别切下的 9 张切片, 按顺序分别贴在同一张载玻片上, 冷风吹干后分别进行孵育来显示 SDHase⁽⁸⁾ 和 5'-Nase⁽⁹⁾, 并分别去除各自酶的底物来进行特异性对照。

用 Leitz MPV-II 型显微分光光度仪测定 SDHase 和 5'-Nase 的相对质量。对每张切片均选四角和中央区域进行测定, 并以扫描方法, 每区域随机扫描测定 100 个点吸收率 (A 值), 每组共测得 1500 个 A 值, 并自动输入 HP9815 S 计算机内, 经处理后, 打印出各组 A 值的 \bar{x} 和频数分布。

结 果

光镜观察

1. **SDHase**. 对照组: 酶活性反应物呈蓝色细小颗粒, 颗粒位于瘤细胞胞浆(线粒体)内, 染色普遍较淡(无法照相), 酶反应活性普遍下降, 但均匀分布. 对照组三组间酶反应活性无明显不同. 实验组: 即刻、5 min 组, 酶反应活性无明显变化; 30 min、2 h 组, 活性明显下降; 8 和 24 h 组, 活性几乎消失.

2. **5'-Nase**. 对照组: 酶活性反应物呈棕色颗粒, 颗粒大小不一, 类圆, 分布于瘤细胞胞浆膜表面(图 1 A, 见铜版图 3). 对照组三组间酶反应活性无明显差异. 实验组: 即刻、5 min 组, 酶反应活性增强; 30 min 组, 酶反应活性开始下降; 2 h 组及其后各组, 酶反应活性几乎消失(见图 1 B).

上述二种酶中对照组和实验组去底物后均未见酶活性反应物(见表 1)

Tab 1. Histochemistry under optic microscope.

Carcinophotorin	Light	Time	SDHase*	5'-Nase*
-	-		++	++
+	-		++	++
-	+		++	++
+	+	30 s	++	++
+	+	5 min	+~++	+++
+	+	30 min	+	+
+	+	2 h	+	+
+	+	8 h	-	+
+	+	24 h	-	-

* - = absent(no reactant on the implanted tumor cells membrane); + = scarce(little reactant on the implanted tumor cells membrane); ++ = moderate (reactant intensity between +++ and +); +++ = intense (much diffuse reactant on the implanted tumor cells membrane).

酶组织化学含量测定 因在 9 组实验中的组织切片厚度、载玻片厚度、显微镜各项参数等条件都一样, 所以本文用 MPV-II 型显微分光光度仪测定这二种酶活性反应物的 A 值.

1. **SDHase**. 对照组 3 组间酶活性反应物相差不显著. 用药加照光后即刻组, 酶活性开始下降, 随照光后时间的延长, 活性下降更趋明显. 实验组 6 组间除 6、7 组间相差不显著外均相差非常显著, 并和对照组 3 组之间相差亦非常显著, 从而说明癌光敏光敏效应对该酶活性的损伤在早期就存在, 并随照光后时间的延长, 损伤更为严重(见图 2).

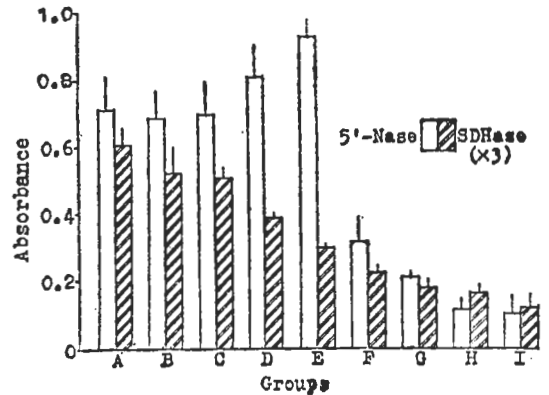


Fig 2. A-value of the 2 enzymes in 9 experimental groups. Group A): Neither carcinophotorin nor red light. B): Carcinophotorin 5 mg/kg iv. C): Red light. D): Immediate after treatment with iv carcinophotorin plus red light. E): After 5 min. F): After 30 min. G): After 2 h. H): After 8 h. I): After 24 h. $\bar{x} \pm SD$.

2. **5'-Nase**. 对照组 3 组间无显著差异. 用药加照光后即刻、5 min 组, 酶活性明显增强, 和对照三组之间差异非常显著, 但这二组之间无差异. 30 min、2、8 和 24 h 各组酶活性逐渐下降, 它们间差异非常显著, 并和对照 3 组、即刻组、5 min 组亦存在非常显著差异. 上述结果表明, 用药加照光后早期, 该酶活性增强, 以后随时间延长, 活性逐渐下降(见图 2).

上述测定结果和光镜观察结果基本相符.

讨 论

本文观察和线粒体内膜相结合的 SDHase 以及和细胞质膜相关的 5'-Nase 活性变化, 是

弄清 PDT 杀伤人癌细胞靶部位的有效佐证。

PDT 影响人癌细胞质膜中的脂质流动性, 进而使和脂质体结合的酶分子构型发生变化, 更易暴露结合或催化基团来发挥酶的功能是对本文中处理早期 5'-Nase 活性增强这一现象的推测。

和细胞内生物膜结合的 SDHase 和 5'-Nase 在 PDT 的直接效应下, 或/和在以类脂双层分子为骨架的生物膜受到 PDT 效应中产生的单线态氧(1O_2)的攻击下所造成的脂质过氧化后, 膜的脂质流动性发生变化, 极性基团松弛, 并通过静电作用和疏水键作用, 使结合在膜上的蛋白质(包括酶蛋白)发生移位和脱落, 改变酶的结构和功能, 从而不仅引起膜结构(包括酶蛋白)的破坏, 而且必能影响细胞的生长、分裂及代谢等生命活动过程。癌光淋光动力学效应对 SDHase 和 5'-Nase 活性的损伤不仅表明能破坏 SMMC-7721 人肝癌细胞线粒体膜和细胞质膜的生物膜结构, 而且必然影响该细胞一系列的生命活动功能。

参 考 文 献

1 Moan J, Johannessen JV, Christensen T,

Espevik T, McGhie JB. Porphyrin-sensitized photoinactivation of human cells *in vitro*. *Am J Pathol* 1982; 109 : 184

2 许德余、殷祥生、陈雄、刘军. 新光敏剂 PSD-007 的研究. 第二军医大学学报 1984; 5 : 31

3 陈雄、殷祥生、周真如. 光敏剂 PSD-001 及癌光淋的薄层色谱分析研究. 同上 1986; 7 : 86

4 许德余、殷祥生、陈雄、陈文晖、刘军. 癌光淋的化学研究. 同上 1986; 7 : 247

5 彭迁、董荣春. 癌光淋和 Photofrin 对人体肿瘤细胞系光敏杀伤作用的比较. 同上 1986; 7 : 280

6 董荣春、周荣华、吕发度、陶文照. SMMC-7721 人体肝癌细胞株的建立及其生物学特性的初步观察. 同上 1980; 1 : 5

7 彭迁、范维杰. 简易裸鼠饲养方法及裸鼠人肝癌动物模型建立的初步研究. 同上 1987; 8 : 279

8 Nachlas MM, Tsou KC, de Souza E, Cheng CS, Seligman AM. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J Histochem Cytochem* 1957; 5 : 420

9 Newman W, Feigin I, Wolf A, Kabat EA. Histochemical studies on tissue enzymes IV. Distribution of some enzyme system which liberate phosphate at pH 9.2 as determined with various substrates and inhibitors; demonstration of three groups of enzymes. *Am J Pathol* 1950; 26 : 257

Acta Pharmacologica Sinica 1988 May; 9 (3) : 272-275

Histocytochemical studies on hematoporphyrin photoradiation effect on two enzymes of human liver cancer cells in nude mice

PENG Qian, HE De-Hua, ZHANG Wu-Yang, DONG Rong-Chun

(Department of Pathology, Second Military Medical College, Shanghai 200433)

ABSTRACT After inoculating a human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 into the Balb/c nude mice, enzymatic histochemical studies of the succinic dehydrogenase (the marker enzyme of mitochondrial endomembrane) and 5'-nucleotidase (the marker enzyme of cytoplasmic membrane) were immediately performed at 5, 30 min, 2, 8, 24 h after treatment with iv

carcinophotorin 5 mg/kg plus general red light. The activities of the two enzymes were estimated semiquantitatively under the optic microscope as well as quantitatively by means of Leitz MPV-II type of microspectrophotometer. The results showed that the activities of the succinic dehydrogenase gradually decreased with the lapse of time from 5 min after treatment. The activities

of the 5'-nucleotidase increased at 5 min after treatment, decreased with the lapse of time from 5 min after treatment. The above results suggest that the damage to enzymatic protein in cell biomembrane is one of the main photodynamic effects on

killing human liver cancer cells *in vivo*.

KEY WORDS cultured cells; nude mice; carcinophotorin; hematoporphyrin photoradiation; liver neoplasmas; histochemistry; succinate dehydrogenase; 5'-nucleotidase



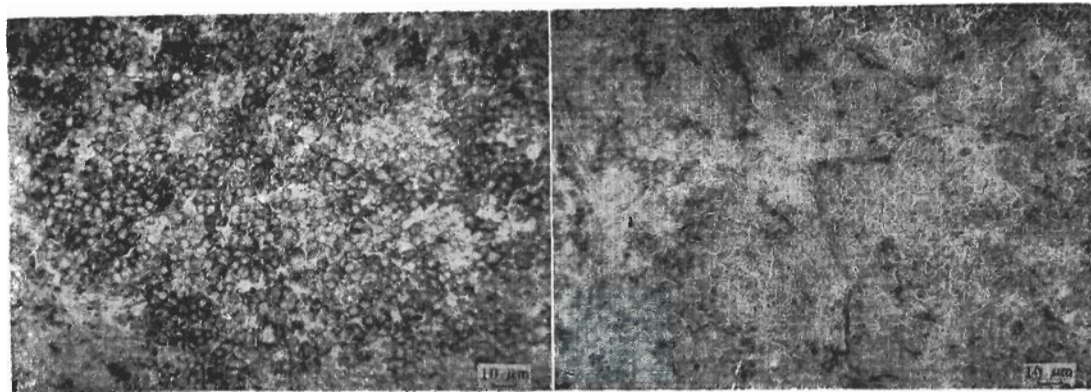


Fig 1. Cytoplasmic membrane of implanted tumor cells, $\times 250$. A) Only iv carcinophotorin 5 mg/kg, much active reactant of 5'-Nase. B) 2 h after treatment with iv carcinophotorin 5 mg/kg plus general red light, little active reactant of 5'-Nase. (See p 273)