

两种卟啉类光敏剂对 SMMC - 7721 细胞敏化损伤的拉曼光谱分析

刘婉华¹, 刘 健², 刁振琦¹, 宁 皓¹, 李云涛¹

(1. 郑州大学物理工程学院, 河南 郑州 450001; 2. 郑州大学信息工程学院, 河南 郑州 450001)

摘要:用拉曼光谱技术比较血卟啉单甲醚 HMME 和血卟啉衍生物 HpD 对肝癌细胞 SMMC - 7721 光敏化损伤。实验测定了用两种光敏剂对 SMMC - 7721 细胞光动力作用后的 DNA 和蛋白质的光谱图。结果显示:HMME 和 HpD 对 DNA 和蛋白质构象的光敏损伤特征是相同的,但损伤程度不同。经 HMME 作用的 SMMC - 7721 细胞的谱线, DNA 各峰的位置和强度的变化都比 HpD 大,有的峰消失,蛋白质主链的几条谱线强度与 HpD 谱线相比大幅降低,表示 HMME 对 DNA 和蛋白质主链的损伤较大。结果表明:HMME 对 SMMC - 7721 细胞的光敏损伤效应大于 HpD。

关键词:卟啉类光敏剂;人肝癌细胞(SMMC - 7721);拉曼光谱;光敏损伤

中图分类号:O657.37

文献标识码:A

Raman spectroscopy analysis of sensitized damages by two porphyrin photosensitizers on SMMC - 7721 cells

LIU Wan-hua¹, LIU Jian², DIAO Zhen-qi¹, NING Hao¹, LI Yun-tao¹

(1. College of Physics Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. College of Information Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Raman spectroscopy technology was applied to compare liver cancer cells SMMC - 7721 sensitized damages by Hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) and by Hematoporphyrin derivative (HpD). Measuring the Raman spectroscopy of DNA and protein in SMMC - 7721 cells sensitized by two photosensitizers, we observed that the damage characteristics of DNA and protein damaged by HMME and HpD were same, but the extent was different. For the spectral line of SMMC - 7721 cells by HMME, both the shift of peak position and the change of peak intensity of each peak were larger than those by HpD, and some peaks disappear. Compared to HpD, the intensity of some peaks of main chains in protein decreased dramatically, showing that the damages of DNA and main chains in protein by HMME were larger. It is concluded that the effect of sensitized damages of HMME on SMMC - 7721 cells is higher than that of HpD.

Key words: porphyrin photosensitizer; liver cancer cells(SMMC - 7721); Raman spectroscopy; sensitized damage

1 引言

在光动力疗法(photo dynamic therapy, PDT)中,光敏剂经特定波长的光激发,产生单线态氧(¹O₂)、氧自由基、羟自由基等多种活性氧物质(radical oxygen species, ROS),攻击蛋白质、核酸、脂类等生物大分子,破坏肿瘤细胞,在这个过程中,光敏剂的种类对其杀伤效应有重大影响。

血卟啉单甲醚(HMME)是我国率先研制的一种单体卟啉光敏剂,激发波长为630 nm。HMME具有成分单一、组成稳定、体内代谢清除速度快、避光

基金项目:河南省自然科学基金项目(No. 2010A180022);河南省科技攻关项目(No. 062441052)资助。

作者简介:刘婉华(1963 -),女,副教授,主要从事激光生物医学和光谱分析的研究。E-mail: zdxhwl@yahoo.com.cn

收稿日期:2010-02-02;修订日期:2010-04-08

时间短等优点,属于新一代光敏剂。血卟啉衍生物(HpD)是多种卟啉的混合物,是一种疏水性光敏剂,HMME和HpD均属卟啉类光敏剂,但理化特性和组织吸收特点有所不同。

已有实验证实,卟啉类光敏剂作用的靶分子主要是核酸和蛋白质^[1]。本研究采用激光拉曼光谱技术,观察HMME-PDT和HpD-PDT作用对人肝癌细胞SMMC-7721核酸和蛋白质结构的微观光敏损伤差异,从分子水平了解两种光敏剂对肿瘤细胞敏化损伤的不同特性。

激光拉曼光谱的特征峰位置、强度和线宽可以提供分子振动、转动方面的信息,通过物质的拉曼光谱,可以从分子水平上了解组织、细胞的化学成分和分子结构。拉曼光谱技术在测量生物分子时,具有结构信息量大,操作方便等优点,能提供快速、非侵袭性的检测,给出专一性的光谱信息,使得在线分析和实时检测成为可能。本实验试图利用激光拉曼光谱技术,寻找一种筛选适合肿瘤光动力治疗的优良光敏剂的方法。

2 材料与方法

2.1 实验仪器和材料

仪器:CO₂细胞培养箱;法国Jobin-Yvon T64000型共焦显微拉曼光谱仪;氩离子激光器,激光输出波长为514.5 nm;奥林巴斯倒置显微镜,日本Olympus公司生产;光动力治疗激发光源He-Ne激光器,波长632.8 nm。

材料:光敏剂血卟啉单甲醚(HMME),由上海红绿光敏剂研究所提供;光敏剂血卟啉衍生物(HpD),购自北京制药工业研究所;肝癌细胞SMMC-7721,购于中国医学科学院上海细胞库;含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液购自美国GIBCO公司。

2.2 实验方法

2.2.1 细胞培养

SMMC-7721肝癌细胞培养于含10%胎牛血清(加双抗)的RPMI-1640培养液中,然后放在37℃,5%CO₂的培养箱中培养,每2~3 d传代,取对数生长期细胞进行实验。

2.2.2 实验方法

将细胞常规消化收集,随机分成对照组(不加光敏剂、不照光)和光动力实验组。以细胞浓度为1×10⁵/mL接种到培养板中,在CO₂培养箱中培养24 h后,实验组加入浓度为5 μg/mL的HMME和HpD,每组设3个复孔。在CO₂培养箱中继续培养

4 h,然后用He-Ne激光器垂直照射培养板,能量密度10 J/cm²。光动力作用6 h后收集细胞,进行拉曼光谱采集。

光谱采集用法国Jobin-Yvon公司制造的JY-T64000型共焦显微拉曼光谱仪,用液氮冷却的CCD作为探测器,激发光源为氩离子激光器,功率80 mW,激光输出波长为514.5 nm,测量时间100 s,光谱分辨率4 cm⁻¹,扫描步长1 cm⁻¹,曝光积分时间10 s,扫描范围为600~1800 cm⁻¹。实验重复3次,所得光谱用五次多项式扣除荧光本底后并光滑。

3 结果和讨论

图1~图3是对照组和光动力组肝癌细胞SMMC-7721的拉曼光谱。图1是对照组,图2是HpD光动力组,图3是HMME光动力组。肝癌细胞SMMC-7721拉曼光谱特征峰归属如表1所示^[2-4]。从实验结果可知,与对照组相比,光动力组细胞的谱线有明显的变化,同时也可观察到两个光动力组细胞的谱线也有很大的差异,结果分析如下。

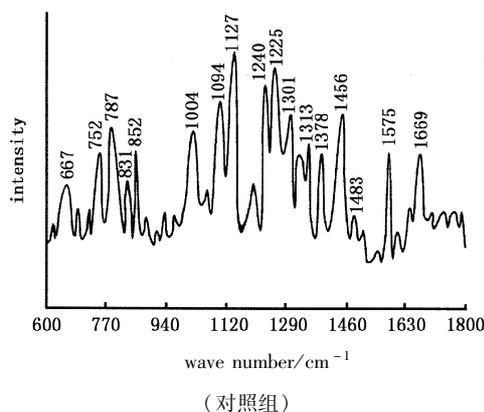


图1 人肝癌细胞SMMC-7721的拉曼光谱

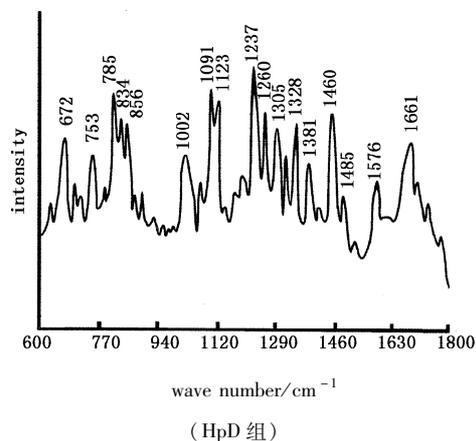


图2 光动力作用后SMMC-7721细胞的拉曼光谱

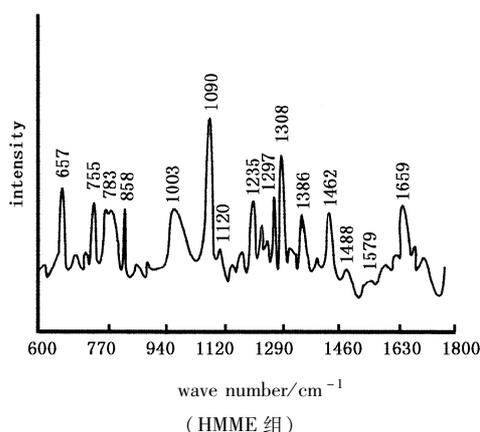


图3 光动力作用后 SMMC-7721 细胞的拉曼光谱

表1 人肝癌细胞 SMMC-7721 特征峰位置和归属

wave number /cm ⁻¹	assignment		wave number /cm ⁻¹	assignment	
	nucleic acid	protein		nucleic acid	protein
667	T, G		1255	C, A	Amide III
752	T	Trp	1301	C, A	Amide III
787	O-P-O str		1313		Amide III
831		Tyr	1337	A	
852		Tyr	1378	T, A, G	
1004		Phe	1456		CH ₂ , CH ₃ def
1094	PO ₂ ⁻ str		1483	G, A	
1127		C-N str	1575	G, A	Trp
1240	T	Amide III	1669		Amide I

注: str 伸缩振动; def 弯曲振动; Phe 苯丙氨酸; Tyr 酪氨酸; Trp 色氨酸; O-P-O 磷酸二酯; PO₂⁻ 磷酸离子; A 腺嘌呤; G 鸟嘌呤; C 胞嘧啶; T 胸腺嘧啶; Amide 酰胺

2.1 DNA 谱线分析比较

2.1.1 DNA 骨架磷酸基团的损伤

代表 DNA 骨架磷酸基团振动的峰有两条: 磷酸二酯(O-P-O) 对称伸缩振动峰 787 cm⁻¹ 和磷酸离子(PO₂⁻) 的对称伸缩振动峰 1092 cm⁻¹。光敏损伤后, 787 cm⁻¹ 峰位移到 785 cm⁻¹ (HpD) 和 783 cm⁻¹ (HMME), 该谱线对 DNA 构象的变化敏感, 谱峰位移表明 DNA 双螺旋结构变为无序^[5], 其峰强度也大幅下降, 分别下降 27% (HpD) 和 42% (HMME), 峰强度代表细胞内磷酸二酯键的含量, 峰强下降表明磷酸二酯受到损伤, 从光谱图也可得知, 787 cm⁻¹ 峰型由尖峰变成一个宽峰, 它可能是 DNA 断裂产生的多个多核苷酸的磷酸二酯(O-P-O) 对称伸缩振动。磷酸离子(PO₂⁻) 的对称伸缩振动峰 1092 cm⁻¹ 谱线是构象不灵敏的^[6], 光敏损伤后, 峰的位移不大, 从 1092 cm⁻¹ 频移到

1091 cm⁻¹ (HpD), 1090 cm⁻¹ (HMME), 但是强度有所下降。这个峰的强度可以作为一种判断 DNA 含量的标准^[7], 峰强度减小, 表明 DNA 双螺旋结构被破坏, DNA 复制被抑制。

2.1.2 碱基的损伤

从图谱可知, HpD 和 HMME 对不同碱基的损伤程度不同。光动力作用后, 碱基谱线的强度大部分降低, 但也有增加的。因为属于碱基振动的拉曼谱的强度受到碱基堆积的影响, 在螺旋结构形成中碱基的振动谱线强度会明显下降, 产生减色效应^[8]。光动力作用对大部分碱基的影响是先破坏碱基-碱基的堆积相互作用, 然后损伤碱基。光敏损伤后, 代表鸟嘌呤 G、胸腺嘧啶 T 的 667 cm⁻¹ 峰移到 672 cm⁻¹ (HpD) 和 675 cm⁻¹ (HMME), 强度增强 38% (HpD), 49% (HMME), 发生了增色效应。属于腺嘌呤 A、胞嘧啶 C 的 1301 cm⁻¹ 谱线, 强度显著增加, 谱线也产生增色效应, 说明有碱基的解堆积发生。代表腺嘌呤 A、鸟嘌呤 G 振动的 1378 cm⁻¹, 1483 cm⁻¹ 谱线, 强度下降, 分别为 21%, 32% (HpD) 和 30%, 35% (HMME), 峰位移到 1381 cm⁻¹, 1485 cm⁻¹ (HpD) 和 1386 cm⁻¹, 1488 cm⁻¹ (HMME), 拉曼光谱的强度与散射中心的数目成正比, 强度下降说明碱基受到损伤。从图 3 可知属于腺嘌呤 A、鸟嘌呤 G 的 C=N 伸缩振动 1575 cm⁻¹ 的峰几乎消失, 提示 HMME 对腺嘌呤 A、鸟嘌呤 G 损伤严重。1337 cm⁻¹ 是腺嘌呤 A 的振动峰, 在图 2 中移到 1328 cm⁻¹, 在图 3 中该谱线消失。代表胸腺嘧啶 T 的谱线 752 cm⁻¹, 1240 cm⁻¹, 光敏作用后, 752 cm⁻¹ 移到了 753 cm⁻¹ (HpD) 和 755 cm⁻¹ (HMME), 而 1240 cm⁻¹ 的强度急剧下降, 成为宽峰, 谱线半高宽度均减小。1669 cm⁻¹ 峰是包括碱基之间氢键在内的胸腺嘧啶 T 的羰基 C=O 伸缩振动, 峰位向低波数位移到 1661 cm⁻¹ (HpD), 1659 cm⁻¹ (HMME), 峰强降低了 35% 和 57%, 峰强急剧减小, 表明嘧啶碱基强烈地扭曲, 有碱基之间的氢键断裂, 提示已有部分的双螺旋 DNA 变成了无序的单链 DNA^[9]。

通过对 DNA 骨架磷酸基团、碱基的损伤比较可知, HpD 和 HMME 对肝癌细胞 SMMC-7721 中 DNA 骨架磷酸基团和碱基均有损伤。光敏作用后, DNA 的单、双链被切断, 碱基之间氢键断裂, 碱基(A, G, C, T) 的各个基团都有不同程度的损伤。经 HMME 作用的细胞的谱线, 各峰的位置和强度的变化都比 HpD 大, 有的峰消失, 表明 HMME 对 DNA 的光敏损伤要大于 HpD。

2.2 光敏损伤后蛋白质谱线的对比分析

蛋白质的拉曼谱峰可以得到关于其主链构象、二级结构和侧链氨基酸构象变化的信息。

2.2.1 主链构象变化

表征蛋白质主链构象的谱线主要有 5 条:1240, 1255, 1301, 1313, 1456 cm^{-1} 。归属 β 折叠的 1240 cm^{-1} 峰,光敏作用后,峰位移到 1237 cm^{-1} (HpD), 1235 cm^{-1} (HMME), 峰强下降 23% (HpD), 39% (HMME)。1301 cm^{-1} 表征 α 螺旋,其强度也有明显的减弱,峰位分别向低波段频移 3 cm^{-1} (HpD) 和 9 cm^{-1} (HMME)。两谱线的明显变化,可能是活性氧物质破坏了形成 α 螺旋和 β 折叠的链内和链间氢键体系,使 α 螺旋和 β 折叠的有序结构遭到破坏,蛋白的有序构象减少,两者谱线强度也因此降低。从图 2 和图 3 比较可知, HMME 谱线降低得更多,说明蛋白质更加无序, HMME 对蛋白质光敏损伤更大。1255 cm^{-1} 属无规卷曲,峰位变化不大,但峰强度增加,分别增加 46% (HpD), 58% (HMME), 表明蛋白质无序结构增加。表征 β 回折的 1313 cm^{-1} , 谱线大幅下降,原因可能是形成 β 回折结构的 2 个氢键很容易被 $\cdot\text{OH}$ 攻击,使 β 回折遭到破坏。1456 cm^{-1} 谱线表征亚甲基的非对称弯曲振动,光敏损伤后, HpD 组移到 1460 cm^{-1} , HMME 组移到 1462 cm^{-1} , 强度分别减少 23% (HpD), 56% (HMME), 表明蛋白质的 C-H 链和肽链骨架发生断裂^[10]。

2.2.2 蛋白质侧链构象变化

表征侧链构象的谱线有 6 条:1004, 852, 831, 752, 1378, 1575 cm^{-1} 。图 2 和图 3 光谱结果显示,蛋白质侧链的变化也相当明显。1004 cm^{-1} 代表苯丙氨酸的单基取代苯基环的伸缩振动,是构象不灵敏的,在本实验中作为内标,峰位移到 1002 cm^{-1} (HpD) 和 1003 cm^{-1} (HMME), 峰强有所下降。其强度减弱可能是在 $\cdot\text{OH}$ 羟基自由基的作用下生成邻位、间位和对位酪氨酸,从而自身的量减少^[11]。

831 cm^{-1} 和 852 cm^{-1} 的两个峰是酪氨酸残基的振动谱带,与环呼吸振动和面外弯曲振动倍频之间的费米共振有关,随侧链微环境而变。两个拉曼峰的比值可以反映酪氨酸的外环境,当酪氨酸处于掩埋状态时,两峰强比值小于 1,当酪氨酸完全处于暴露状态时两峰强比值大于 1,该强度比对于氢键结合的性质和酚羟基基团离子化的状态是敏感的。从图 2 和图 3 可知,它们从 831 cm^{-1} 和 852 cm^{-1} , 频移到 834 cm^{-1} 和 856 cm^{-1} (HpD), 833 cm^{-1} 和

858 cm^{-1} (HMME), 该双峰的比值为 1.25 (HpD), 1.31 (HMME), 说明酪氨酸外环境发生变化,变为完全暴露的状态。752, 1378, 1575 cm^{-1} 属于色氨酸的吡啉环的特征峰,谱线明显减弱,这可能是单线态氧 ($^1\text{O}_2$) 同色氨酸的吡啉环 2, 3 位双键产生加成反应,使吡啉环开环^[12]。

从实验结果表明,光敏作用造成蛋白质主链结构的 α 螺旋、 β 折叠减少,无规卷曲增加,蛋白质侧链结构的吡啉环、单基取代苯基环等明显减少,表明蛋白质分子的主链和侧链基团受到损伤。造成蛋白质主链和侧链基团损伤的原因较多,其中之一可能是单线态氧 ($^1\text{O}_2$)、超氧阴离子自由基 (O_2^-)、羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 等氧化蛋白质分子,使蛋白质分子空间结构的氢键受到了损伤,氢键体系有所变化。氢键是稳定蛋白质二级结构的主要作用力,蛋白质分子空间结构的氢键受到了损伤,会导致蛋白质空间结构较明显的变化,蛋白质主链的氢键体系的损伤也会改变酪氨酸、色氨酸的环境,影响侧链构象,造成蛋白质侧链损伤。

实验结果表明 HMME 和 HpD 对蛋白质的光敏损伤特征是相同的,但两种光敏剂对蛋白质主链和侧链的损伤层度不同,经 HMME 作用后蛋白质主链的几条谱线强度与 HpD 谱线相比大幅降低,表示 HMME 对主链的损伤要大于 HpD。

卟啉类光敏剂是由四个吡咯环和四个次甲基桥联结起来的大共轭体系分子,对癌细胞有特殊的亲和力和,其光动力作用原理是光敏剂在光激发后,产生的活性氧物质 (ROS) 同底物发生电子转移或抽氢作用,产生底物或光敏剂的自由基或自由基离子,与周围的氧反应生成氧化物,称为 I 型反应 (氧化还原反应)。另一种是光敏剂的三重态氧与基态分子氧发生能量传递产生单重态氧,它具有亲电性,能高效的氧化生物分子,称为 II 型反应 (能量传递反应)。已有证据表明,卟啉类光敏剂的光动力疗效取决于单重态氧,大多数情况下 II 型反应起主导作用,但超氧阴离子自由基、羟基自由基等也参与了光动力损伤的某些过程。

理想的光敏剂应符合以下特性:①化学组分单一、结构明确且性质稳定;②暗毒性低;③能被靶器官优先摄取;④副作用小;⑤单线态氧及其他活性氧物质产量高。

光敏剂 HpD 是第一代光敏剂,是含多种卟啉成分的混合制剂,对恶性肿瘤的亲性和性较强,缺点是光敏剂的单态氧量子产率偏低,在体内滞留时间长,避

光需较长时间。HMME 是第二代国产光敏剂,是单体内卟啉制剂,具有性质稳定、单态氧量子产率高、体内排泄快、皮肤的光敏反应持续时间短、安全性较大、避光时间短等优点。

本实验证明 HMME 对 DNA 和蛋白质的光敏损伤要大于 HpD,可能的原因是 HMME 产生单态氧 1O_2 和超氧阴离子自由基、羟基自由基的能力强于 HpD^[13]。已有实验证明,单态氧 1O_2 可以氧化碱基,使碱基脱落、碱基破坏、单链双链断裂、DNA 链内交联和链间交联等,DNA 受到严重损伤,所以血卟啉单甲醚 HMME 对肿瘤细胞的体外光敏杀伤效应高于光敏剂 HpD。

参考文献:

- [1] 曹恩华,范贤俊. 血卟啉 HpD 和 Photofrin II 对肿瘤光敏损伤的比较:细胞摄取与光敏化作用[J]. 辐射研究与辐射工艺学报,1997,5(4):19-23.
- [2] Lord R C, Yu N. Laser-Raman spectroscopy of biomolecules I. Native lysozyme and its constituent amino acids [J]. Mol Biol,1990,50(6):509-524.
- [3] Carey P R. Biochemical applications of Raman and resonance Raman spectroscopy[J]. New York:Harcourt Brace Jovanovich,1992,12(3):71-98.
- [4] 张志义,许以明. 光卟啉(YHpD)光敏作用的分子机制 - YHpD 对蛋白质微观光敏损伤的激光拉曼光谱研究. 中国科学:B 辑,1991,6(2):595-601.
- [5] Xu Y M, Zhao H X, Zhang Z Y. Raman spectroscopic study of microcosmic and photosensitive damage on the liposomes of the mixed phospholipids sensitized by hypocrelin and its derivatives [J]. Photochem & Photobiol B:Boil,1998,43(5):41-46.
- [6] 陈雯,张桥,魏青,等. 端粒酶抑制剂对肿瘤细胞及端粒酶活性的影响[J]. 肿瘤,2000,20(6):415-418.
- [7] Hudson J B, Lmperial Haugl, Diwu Z. Antiviral activities of photoactive perylenequinones [J]. Photochemistry and Photobiology,1997,65(2):352-354.
- [8] Small E W, Peticolas W L. Conformational dependence of the Raman scattering intensities from polynucleotides Order-disorder changes in structure [J]. Biopolymers, 1998,10(5):1377-1416.
- [9] Buschman H P, Marple E T, Wach M L, et al. In vivo determination of the molecular composition of artery wall by Intravascular Raman spectroscopy [J]. Analytical Chemistry,2000,72(5):3771-3775.
- [10] 王斌,王靖,余江,等. 蛋白质的傅立叶拉曼谱研究 [J]. 光谱学与光谱分析,1999,19(5):674-676.
- [11] 邹祖全,刘燕楠,吴瑛,等. 臭氧对胎牛血清氧化损伤的表面增强拉曼光谱[J]. 光谱学与光谱分析,2007,27(6):1140-1142.
- [12] 郭建宇,孙真荣,吴良平,等. 人血清白蛋白与 3-氨基吡啶相互作用的拉曼光谱研究 [J]. 光谱学与光谱分析,2006,26(3):460-462.
- [13] 富秋涛,顾瑛,刘凡光,等. 血卟啉甲醚体外光敏效应观察[J]. 激光生物学报,2000,9(2):137-141.