

# 光敏剂 SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub> 介导的 PDT 对人 RPE 的影响

徐国兴<sup>1</sup>, 周晓芳<sup>1</sup>, 陈鲤敏<sup>1</sup>, 彭亦茹<sup>2</sup>

基金项目: 国家自然科学基金课题(No. 81070715); 中国卫生部科研基金课题(No. WKJ2008-2-61); 福建省创新平台基金课题(No. 2010Y2003)

作者单位:<sup>1</sup>(350005) 中国福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院眼科 福建省眼科研究所;<sup>2</sup>(350007) 中国福建省福州市, 福建师范大学

作者简介: 徐国兴, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 晶状体病、视网膜膜病。

通讯作者: 徐国兴. fjmuxuguoxing@hotmail.com

收稿日期: 2012-06-04 修回日期: 2012-09-17

## Influence of photosensitizer SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub> mediated PDT on retinal pigment epithelial cell

Guo-Xing Xu<sup>1</sup>, Xiao-Fang Zhou<sup>1</sup>, Li-Min Chen<sup>1</sup>, Yi-Ru Peng<sup>2</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 81070715); Ministry of Health Research Projects Funded Project, China (No. WKJ2008-2-61); Innovative Platform of Fujian Province, China (No. 2010Y2003)

<sup>1</sup>Fujian Institute of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China; <sup>2</sup>Fujian Normal University, Fuzhou 350007, Fujian Province, China

**Correspondence to:** Guo-Xing Xu, Fujian Institute of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. fjmuxuguoxing@hotmail.com

Received: 2012-06-04 Accepted: 2012-09-17

## Abstract

• **AIM:** To study the mechanism of SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub> mediated PDT on retinal pigment epithelial cell (RPE).

• **METHODS:** hRPE cells were divided into blank control group, laser group, photosensitizer SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub> group, PDT 1J group, PDT 2J group. CCK-8, fluorescent microscopes blue excitation were applied in the experimental groups, and active oxygen level of RPE cell mitochondria and RPE cell apoptosis rate were detected by DCFH-DA.

• **RESULTS:** Different concentration photosensitizer [SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub>] mediated PDT on RPE had different effects, in which 5 μg/L of concentration had the most serious damage.

• **CONCLUSION:** New photosensitizer SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub> mediated PDT on RPE has certain damage effect, its possible mechanism is that the increasing RPE cell

mitochondria reactive oxygen species level caused by photosensitizer [SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub>] mediated PDT results in cell apoptosis.

• **KEYWORDS:** phthalocyanine silicon; fluorescence; light dynamics; apoptosis; flow cytometry

**Citation:** Xu GX, Zhou XF, Chen LM, *et al.* Influence of photosensitizer SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub> mediated PDT on retinal pigment epithelial cell. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012; 12(10): 1841-1843

## 摘要

**目的:** 探讨 SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub> 介导的 PDT 对人 RPE 影响的可能机制。

**方法:** 将 hRPE 细胞分空白对照组、激光组、光敏剂 SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub> 组、PDT 1J 组、PDT 2J 组, 对各实验组应用 CCK-8、荧光显微镜蓝光激发、DCFH-DA 检测 RPE 细胞线粒体活性氧水平与 RPE 细胞凋亡率。

**结果:** 不同浓度光敏剂 [SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub>] 介导的 PDT 对 RPE 产生的作用不一样, 其中以 5 μg/L 的浓度对 RPE 的杀伤作用最大。

**结论:** 新型光敏剂 SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub> 介导的 PDT 对 RPE 具有一定的杀伤作用, 其可能机制为光敏剂 [SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub>] 介导的 PDT 对 RPE 细胞线粒体活性氧水平增加导致细胞凋亡。

**关键词:** 酞菁硅; 荧光; 光动力学; 凋亡; 流式细胞术

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.10.06

**引用:** 徐国兴, 周晓芳, 陈鲤敏, 等. 光敏剂 SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub> 介导的 PDT 对人 RPE 的影响. 国际眼科杂志 2012; 12(10): 1841-1843

## 0 引言

金属钛配合物作为一种新型的光敏剂, 具有以下特点: 成分明确; 最佳吸收峰在近红外; 单线态氧产率高; 在运用于光动力治疗中具有一定的优点<sup>[1]</sup>。然而, 由于靶向性和特异性的不专一, 周围组织必然会受到或多或少的损害。视网膜色素上皮(RPE)具有复杂而重要的生理功能, 包括维生素 A 的储存、转运和代谢, 药物解毒, 合成色素和细胞外基质, 在视网膜外层和脉络膜之间选择性转运代谢物质, 吞噬和消化光感受器外界脱落的膜盘, 起到光感受器活动的色素屏障及环境维持等作用, 鉴于其吞噬作用, 对光敏剂具有一定的摄取, 继而导致 RPE 层的损伤。本文重点研究新型光敏剂对 hRPE 的损伤及机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本实验用第二代 hRPE 细胞株, 购自上海锐聪

表1 光敏剂[SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub>]浓度与 PDT 激光能量对 hRPE 细胞凋亡率的影响

SiPc(C <sub>35</sub> H <sub>27</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>8</sub> 浓度(μmol/L)	OD 值( $\bar{x} \pm s$ )				抑制率(%)			
	光敏剂组	激光组	PDT(1J)	PDT(2J)	光敏剂组	激光组	PDT(1J)	PDT(2J)
2.5	0.936±0.009	0.874±0.013	0.819±0.016	0.802±0.018	1.37	7.90	13.70	15.49
5	0.917±0.010	0.856±0.006	0.704±0.042	0.622±0.005	3.37	9.80	25.81	34.46
10	0.934±0.012	0.866±0.006	0.804±0.032	0.714±0.006	1.58	8.75	15.28	24.76

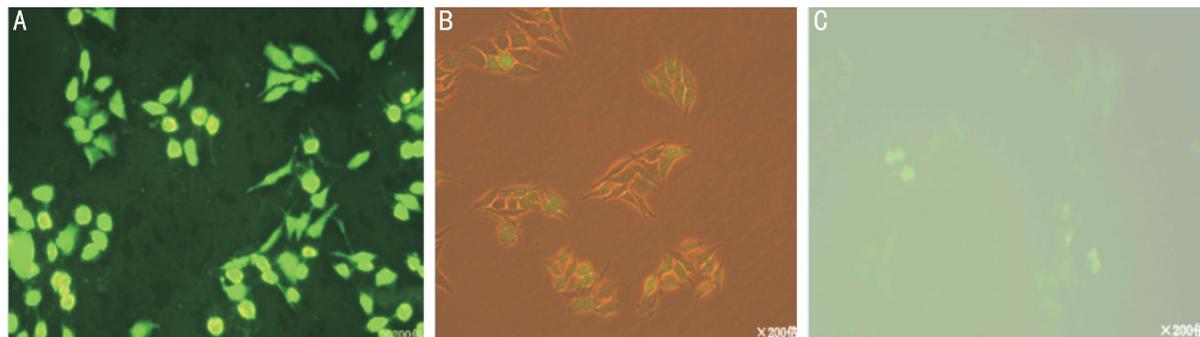


图1 蓝光激发 hRPE 荧光强度 A: PDT 组; B: 激光组; C: 光敏剂组。

科技发展有限公司(编号407);DMEM/F<sub>12</sub>培养基,胎牛血清,胰酶,青链双抗,CCK-8 试剂盒,活性氧检测试剂盒,逆转录试剂盒,Real-time 试剂盒。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养与实验分组

采用培养瓶培养 hRPE 细胞,用 10% DMEM-F12 培养基加入 10% 胎牛血清培养 hRPE 细胞,细胞一般 4~6h 可贴壁,呈长梭形,2~3d 可贴满瓶底,取指数生长期的细胞进行实验。培养瓶中细胞消化后种于 96 孔板,每孔约 5000 个细胞,分空白对照组、激光组、光敏剂组、PDT 1J 组、PDT 2J 组,过夜培养贴壁后,加入三种浓度光敏剂[SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub>]共培养,分别是 10,5,2.5 μmol/L。在确定细胞摄取高峰时间点进行激光照射,激光能量分别为 1,2J/cm<sup>2</sup>。激光照射完成后,细胞培养 1h,然后吸出光敏剂和培养液,加入 100 μL 新鲜培养液和 10 μL CCK-8,于 2h 后进行酶标检测细胞凋亡率。

### 1.2.2 光敏剂 SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub> 介导的 PDT 作用后 hRPE 细胞线粒体活性氧水平检测

培养瓶中细胞消化后种于 6 孔板,密度为每孔 1×10<sup>6</sup> 个细胞,设 PDT 组、空白对照组。过夜培养贴壁后,加入最佳摄取量光敏剂[SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub>]共培养。在确定细胞摄取高峰时间点进行激光照射后培养 1h。按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10 μmol/L。在激光照射后立即、20min,40min 装载探针,去除细胞培养液,加入适当体积稀释好的 DCFH-DA。加入的体积以能充分盖住细胞为宜,通常对 6 孔板的一个孔加入稀释好的 DCFH-DA 不少于 1mL。37℃ 细胞培养箱内孵育 20min。用 PBS 洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。荧光显微镜蓝光激发,观察荧光,检测 hRPE 细胞线粒体活性氧水平。

### 1.2.3 光敏剂 SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub> 介导的 PDT 作用后流式细胞仪检测 hRPE 细胞凋亡率

培养瓶中细胞消化后种于 6 孔板,密度为每孔 1×10<sup>6</sup> 个细胞,设 PDT 组、激光组、光敏剂组、空白对照组。过夜培养贴壁后,加入 5 μmol/L 光敏剂共培养。在确定细胞摄取高峰时间点进行 2J/cm<sup>2</sup> 能量激光照射后培养 1h。按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10 μmol/L。在激光照射后 30min,去除细胞培养液,加入适当体积稀释好的 DCFH-DA。

加入的体积以能充分盖住细胞为宜,通常对 6 孔板的一个孔加入稀释好的 DCFH-DA 不少于 1mL。37℃ 细胞培养箱内孵育 20min。用 PBS 洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA,加入胰酶消化细胞,细胞变圆后加入培养液终止反应,离心 1000r/min,5min,离心完后去培养液,0.5mL PBS 悬浮细胞后流式细胞仪检测 hRPE 细胞凋亡率。

统计学分析:运用 SAS 6.12 统计学软件,采用 Student-t 检验进行数据分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CCK-8 检测 hRPE 细胞凋亡率

结果显示,空白对照组 OD 值为 0.949±0.15,不同浓度光敏剂[SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub>]对 RPE 产生的杀伤作用不一样,其中以 5 μmol/L 浓度对 RPE 的杀伤作用最大,1J 的能量照射 RPE 凋亡率达到 25.81%,10 μmol/L 和 2.5 μmol/L 的凋亡率分别是 15.28% 和 13.70%;而 2J 的能量照射细胞凋亡率达到 34.46%,10 μmol/L 和 2.5 μmol/L 的凋亡率分别是 24.76% 和 15.49%,光敏剂组 10,5,2.5 μmol/L 的凋亡率分别是 1.58%,3.37%,1.37%;激光组 10,5,2.5 μmol/L 的凋亡率是 8.75%,7.90% 和 9.80%。经统计学分析,空白对照组与光敏剂组、激光组无统计学差异(P>0.05),与 PDT(1J) 和 PDT(2J) 均有统计学差异(P<0.05,表 1)。

### 2.2 荧光显微镜蓝光激发 检测 hRPE 细胞线粒体活性氧水平

荧光显微镜蓝光激发检测 hRPE 细胞线粒体活性氧水平,分别观察三种装载方式(激光照射后即刻、20min,40min)装载探针后荧光强度,三种装载方式均可产生绿色荧光(图 1A),但是即刻装载探针荧光强度稍弱,而 20min 和 40min 装载探针组荧光强度稍强且两组的强度相当。激光组及光敏剂组均可见荧光(图 1B,C),但强度明显低于 PDT 组,空白对照组无荧光显影。

### 2.3 PDT 后 DCFH-DA 定量检测 hRPE 细胞凋亡率

流式细胞仪检测 DCFH-DA 荧光强度,正常对照组为 1.59±0.16,光敏剂组为 2.69±0.27,激光组为 5.32±3.29,PDT 组为 30.9±10.15,而空白对照组与光敏剂组、激光组均无统计学差异(P>0.05),与 PDT 组具有统计学差异(t=5.775,P<0.01,图 2)。

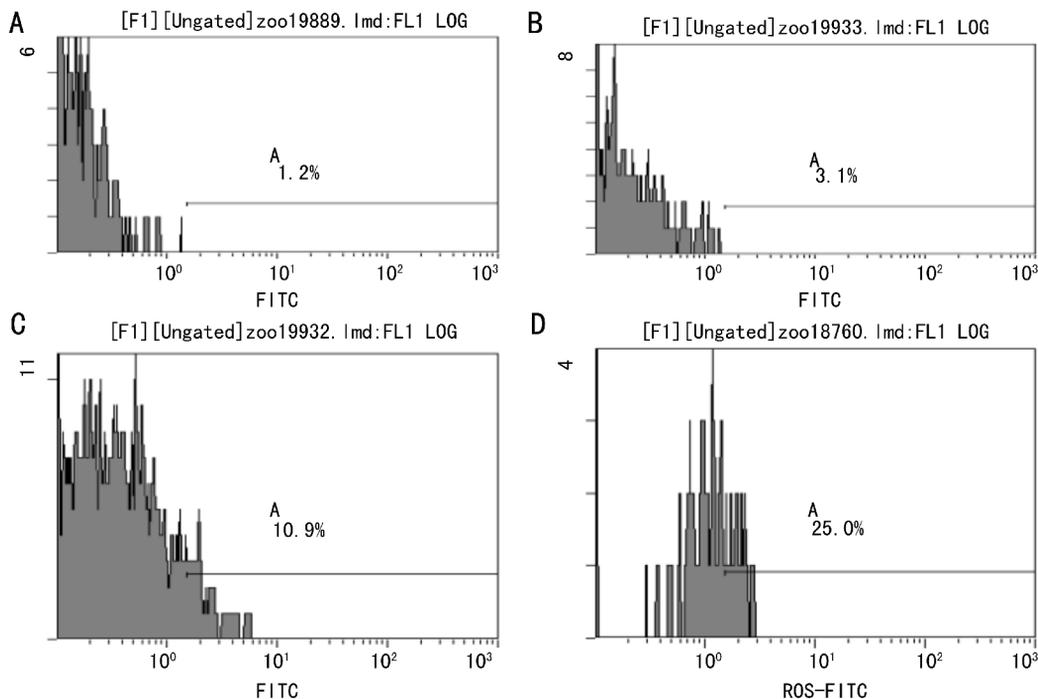


图2 流式细胞仪检测 DCFH-DA 荧光强度 A:空白对照组;B:光敏剂组;C:激光组;D:PDT 组。

### 3 讨论

PDT 是一种利用光化学反应进行治疗的技术,它是用激光照射被光敏剂积存的靶组织,产生光化学效应、损伤靶组织而达到治疗目的,其优点在于对正常组织损伤小<sup>[2]</sup>。然而光敏剂从其发展至今,对正常组织尤其是 RPE 层的损伤是 PDT 治疗中的一大软肋。因而光敏剂的靶向性一直是研究的热点,靶向性强的光敏剂自然对正常组织产生的副作用要小,光敏剂的靶向性与光敏剂在靶组织中的积存和激光对靶组织的照射有关,光动力治疗的机制主要是凋亡,而促使细胞凋亡的介质是活性氧,且活性氧存在的时间极短,所以只有光敏剂进入到靶细胞中才能更好地发挥光动力作用<sup>[3]</sup>,而进入到靶细胞中的光敏剂越多,光动力效力自然更强。

对靶向性的研究主要是指载体,包括牛血清白蛋白、纳米载体等<sup>[4-6]</sup>。Wachtlin 等<sup>[6]</sup>报道 PDT 对 RPE 损伤的病例,观察 PDT 后患者视敏度有所提高,但是治疗后 6wk,荧光造影显示出明显的同轴性 RPE 萎缩。现今维替泊芬作为唯一可用于 CNV 治疗的光敏剂,其治疗作用已经得到大众的认可,然而,研究显示 RPE 和血管内皮细胞对维替泊芬有相似的吸收功能,从而对 RPE 也会造成一定损伤<sup>[7]</sup>。因而,学者都致力于研究新型光敏剂或是减少光敏剂对 RPE 损伤的方法<sup>[8,9]</sup>。作为新型光敏剂的 SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub> 具有其自身优点,本研究旨在探讨其在治疗过程中对 RPE 所造成的损伤。当然,此结果需要与 SiPc(C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>)<sub>8</sub> 的治疗结果,也就是对于血管内皮细胞的作用进行比较,从而才能更好地诠释新型光敏剂所具备的治疗意义,所以仍需要进一步的研究为新型光敏剂的研发提供理论依据。

### 参考文献

- 1 Keizer SP, Han W, Stillman MJ. Photochemically - induced radical reactions of zinc phthalocyanine. *Inorg Chem* 2002;41(2):353-358
- 2 Chen B, Pogue BW, Hoopes PJ, et al. Vascular and Cellular Targeting for Photodynamic Therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2006;16(4):279-305
- 3 Tsung Peng, Cheng-Jen Chang, Shuo-Bin Jou, et al. Photosensitizer Targeting: Mitochondrion - Targeted Photosensitizer Enhances Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Calcium - Mediated Apoptosis. *Optical and Quantum Electronics* 2005;37(13-15):1377-1384
- 4 Huang Y, Xu GX, Peng YR, et al. Photodynamic Effects of ZnPcS4-BSA in Human Retinal Pigment Epithelium Cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009;25(3):231-238
- 5 Huang Y, Xu G, Peng Y, et al. Zinc Phthalocyanine Tetrasulfonate (ZnPcS4): A New Photosensitizer for Photodynamic Therapy in Choroidal Neovascularization. *J Ocul Pharmacol Ther* 2007;23(4):377-386
- 6 Wachtlin J, Behme T, Heimann H, et al. Concentric retinal pigment epithelium atrophy after a single photodynamic therapy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241(6):518-521
- 7 周少博, 金陈进, 葛坚. 血管内皮细胞和 RPE 细胞对光敏剂 Verteporfin 的吸收比较. *眼科研究* 2007;25(2):121-123
- 8 Berdugo M, Bejjani RA, Valamanesh F, et al. Evaluation of the New Photosensitizer Stakel (WST-11) for Photodynamic Choroidal Vessel Occlusion in Rabbit and Rat Eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(4):1633-1644
- 9 Lavie G, Barliya T, Mandel M, et al. "Competitive Quenching": A Mechanism by Which Perhydroxylated Perylenequinone Photosensitizers Can Prevent Adverse Phototoxic Damage Caused by Verteporfin During Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol* 2007;83(5):1270-1277