

HMME-PDT 诱导皮肤微血管内皮细胞损伤的作用及机制研究*

杨北辰, 陈涛, 周培媚, 付丽新, 郭在培[△]

610017 成都, 成都市第二人民医院 皮肤科(杨北辰、陈涛、周培媚、付丽新); 610041 成都, 四川大学华西医院 皮肤科(郭在培)

[摘要] 目的: 探讨血卟啉单甲醚光动力治疗(hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic therapy, HMME-PDT)对人真皮微血管内皮细胞氧化应激损伤的具体作用及可能涉及的机制, 为 HMME-PDT 治疗葡萄酒色斑的临床应用提供理论依据。方法: 采用 HDMECs 10~15 代用于本次实验。通过 CCK-8 检测细胞活性变化; 流式细胞术检测各组细胞凋亡比例及细胞内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)水平; 分光光度计法检测各组细胞培养上清液乳酸脱氢酶水平及丙二醛水平; 采用方差分析比较各组差异。Western blot 检测各组 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal Kinase, JNK)、P38、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)总蛋白及磷酸化蛋白表达。结果: HMME-PDT 能明显降低人真皮微血管内皮细胞活性, 诱导细胞凋亡($P < 0.05$)。HMME-PDT 能诱导人真皮微血管内皮细胞产生大量 ROS($P < 0.05$)。HMME-PDT 可以诱导 P38、ERK 磷酸化。结论: HMME-PDT 能诱导人真皮微血管内皮细胞的氧化损伤, 其机制可能与激活 MAPKs 通路有关。

[关键词] 海姆泊芬; 光动力治疗; 人真皮微血管内皮细胞; 氧化应激

[中图分类号] R739.5; R730.231 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2020.12.001

引文格式: Yang BC, Chen T, Zhou PM, et al. Effects and mechanism of HMME-PDT induced damage in HDMECs [J]. J Cancer Control Treat, 2020, 33(12): 907-915. [杨北辰, 陈涛, 周培媚, 等. HMME-PDT 诱导皮肤微血管内皮细胞损伤的作用及机制研究[J]. 肿瘤预防与治疗, 2020, 33(12): 907-915.]

Effects and Mechanism of HMME-PDT Induced Damage in HDMECs

Yang Beichen, Chen Tao, Zhou Peimei, Fu Lixin, Guo Zaipei

Department of Dermatology, Chengdu Second People's Hospital, Chengdu 610017, Sichuan, China (Yang Beichen, Chen Tao, Zhou Peimei, Fu Lixin); Department of Dermatology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China (Guo Zaipei)

Corresponding author: Guo Zaipei, E-mail: guozp930@163.com

This study was supported by grants from Chengdu Bureau of Science and Technology (NO. 2014-HM01-00064-SF).

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and mechanism of hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) photodynamic therapy (PDT) induced oxidative stress in human dermal microvascular endothelial cells (HDMECs) to provide a theoretical basis for the therapeutic opportunities in port-wine stains by HMME-PDT. **Methods:** The 10th-15th generation of HDMECs were used for all experiments. Changes in cell viability were detected by CCK-8; Intracellular and apoptosis reactive oxygen species (ROS) levels were investigated by flow cytometry; lactate dehydrogenase and malonaldehyde contents were evaluated by spectrophotometry; and analysis of variance was used to compare the differences in groups. Total protein

and phosphorylated protein of JNK, P38, ERK were detected by Western blot. **Results:** HMME-PDT significantly reduced the activity of HDMECs ($P < 0.05$), and induced apoptosis ($P < 0.05$), intracellular ROS ($P < 0.05$) and P38, ERK phosphorylation. **Conclusion:** HMME-PDT can significantly

[收稿日期] 2019-11-11 **[修回日期]** 2020-02-28

[基金项目] * 成都市科技局科技惠民工程(编号:2014-HM01-00064-SF)

[通讯作者] [△]郭在培, E-mail: guozp930@163.com

induce oxidative stress in HDMECs, which may be associated with the activation of MAPKs.

[Key words] Hemoporphin; Photodynamic therapy; HDMECs; Oxidative stress

光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 是一种利用光敏剂联合光照后产生靶细胞杀伤力的新型组织消融疗法。它作为一种高选择性、安全性好、副作用小的新治疗技术,已越来越多地应用于多种皮肤疾病的治疗,包括:日光性角化、基底细胞癌、鳞状细胞癌、鲍温病、尖锐湿疣、寻常疣、扁平疣、痤疮等。PDT 的理论基础是光动力反应,广义概念系指有分子氧参与的光敏剂吸收光子引发的一系列光化学反应。在系统或局部应用光敏剂后,病变组织吸收并蓄积外源性或内源性光敏性物质,组织细胞中的光敏性物质受到相应波长(可见光、近红外光或紫外光)的非致热性光线照射时,通过光动力反应产生单线态氧等细胞毒性产物,这些活性物质与相邻的生物大分子及亚细胞器相互作用,损伤和破坏组织及细胞,最终导致肿瘤细胞及增殖旺盛细胞的死亡或凋亡,达到光动力治疗目的^[1-5]。

葡萄酒色斑(port wine stains, PWS), 又称鲜红斑痣,属于毛细血管瘤的一种,是一类常见的先天性血管畸形。该病新生儿发病率约为 0.3% ~ 0.5%, 大部分患儿为先天性局部微静脉异常发育所致。皮损初发可表现为浅红或粉红色斑疹,后颜色渐加深,可呈鲜红或紫红;部分皮损增厚,可出现丘疹、结节,甚至软组织肿大,形成畸形或皮肤出血。此外,由于 70% ~ 80% 的皮损都位于面颈部,严重影响了患者的容貌,给患者及家属带来了巨大的社会心理压力^[6]。目前,脉冲染料激光治疗仍是鲜红斑痣的主要治疗方法。尽管该治疗方法是安全、有效的,但仅有 10% ~ 20% 的患者皮损能够完全清除,而 20% ~ 30% 的患者几乎无效^[7-8]。因此,寻求更多相对安全有效的 PWS 治疗方法成为目前需要解决的问题。

近来,新型光敏剂海姆泊芬(血卟啉单甲醚, hematoporphyrin monomethyl ether, HMME) 的 PDT 治疗开始在 PWS 的治疗领域崭露头角。HMME 是一种单体卟啉类药物,以被动运输的方式通过血管内皮细胞膜,经过一定波长和能量的激光照射激活,产生光动力效应^[9]。与第一代光敏剂(如:光卟啉)相比, HMME 具有组份单一、结构明确、光敏化力强、光动力效应高、代谢迅速、毒副作用更低等优点。I 期临床试验已证实, HMME 单剂量注射(2.5 ~ 10 mg/kg)安全且耐受性良好^[10]。后续的临床试验也充分证实 HMME-PDT 治疗 PWS 的有效性^[11-12]。

本项目拟通过研究 HMME-PDT 对人真皮微血

管内皮细胞(human dermal micro-vascular endothelial cells, HDMECs) 损伤作用及机制,深化对 HMME-PDT 治疗 PWS 的药理作用及分子水平作用机制的认识,为 HMME-PDT 治疗 PWS 提供进一步科学的实验证据及理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

注射用海姆泊芬购自泰州复旦张江药业有限公司; H₂O₂ 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; CCK-8 (AR1160) 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; Annexin V-FITC Kit (FAK015.50) 购自深圳欣博盛生物科技有限公司; 细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal Kinase, JNK)、P38 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。人真皮微血管内皮细胞 HDMECs 来源于美国疾控中心(CDC, Atlanta, GA, USA)。

1.2 方法

1.2.1 HDMECs 培养及传代 使用添加有 10% 热灭活胎牛血清、1% 双抗(100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素)的 DMEM 高糖培养基进行培养与传代。

1.2.2 药物处理 细胞传代培养 48 h 后以不同浓度 HMME 溶液(5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL) 分别处理细胞 30 min、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h 后 PBS 冲洗细胞,通过荧光显微镜观察 HMME 进入细胞后所发荧光,确定最佳光照时间点。本实验根据观察结果选取 3 h 为药物处理时间。

1.2.3 确定光照强度 20 μg/mL HMME 处理细胞 3 h 后予功率密度 25 mw/cm²、50 mw/cm²、75 mw/cm²、100 mw/cm², 波长在 442 ~ 465 nm 波段绿光照射 30 min。分别于处理后即刻、1 h 及 12 h 用普通倒置显微镜观察细胞形态,并结合 CCK-8 结果确定合适光照强度。

1.2.4 细胞处理分组 以浓度为 0.31 μg/mL、0.625 μg/mL、1.25 μg/mL、2.5 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL、80 μg/mL、160 μg/mL HMME 培养基处理细胞 3 h 后予功率密度 75 mw/cm² 波长在 442 ~ 465 nm 波段绿光照射 30 min。恒温孵箱静置培养。

将该组分为低浓度处理组(HMME 浓度为 0.31 μg/mL、0.625 μg/mL、1.25 μg/mL、2.5 μg/mL、5

$\mu\text{g}/\text{mL}$) 及高浓度处理组 (HMME 浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $160 \mu\text{g}/\text{mL}$)。不同浓度单纯 HMME 处理组及单纯光照组 (PDT 组) 为阴性对照, $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 处理细胞 1 h 为阳性对照组, 不予处理细胞为空白对照组。

1.2.5 细胞损伤情况调查

1.2.5.1 CCK-8 检测细胞活力 将传代后的 HDMECs 接种入 96 孔板中, 使每孔细胞数约为 1×10^4 个。分别于处理后 1 h、12 h 及 24 h 吸出原始培养基, PBS 清洗后每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 新鲜培养基及 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液放入细胞培养箱内继续孵育, 1 h 后酶标仪 450 nm 波长检测 OD 值, 从而判定 HMME 对细胞活力的影响。

1.2.5.2 流式细胞术检测细胞凋亡及坏死比率的变化 将传代后的 HDMECs 接种入 6 孔板中, 使每孔细胞数约为 1×10^6 个, 按照上述方法处理细胞 12 h 后, 弃上清液、PBS 冲洗、胰酶消化、离心清洗 3 次后制成 $300 \mu\text{L}$ 细胞悬液。避光双染 Annexin V-FITC 及碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 20 min 后流式细胞术检测荧光强度。Annexin V-FITC 检测早期凋亡, PI 检测中晚期凋亡, 荧光强度与细胞凋亡量呈正比。

1.2.5.3 分光光度计法检测细胞培养上清乳酸脱氢酶水平变化 将传代后的 HDMECs 接种入 6 孔板中, 使每孔细胞数约为 1×10^6 个, 按照上述方法处理细胞 12 h 后收集细胞上清液。按照试剂盒操作步骤处理上清, 使用分光光度计法检测各组细胞培养上清乳酸脱氢酶水平变化。

1.2.6 细胞氧化应激状态调查

1.2.6.1 细胞内活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 产生 将传代后的 HDMECs 接种入 6 孔板中, 使每孔细胞数约为 1×10^6 个, 按照上述方法处

理细胞 12 h 后弃上清, 收集细胞洗涤后制成 $300 \mu\text{L}$ 细胞悬液, 避光单染二氯荧光素二乙酸酯 20 min, 流式细胞术检测荧光强度。荧光强度与细胞内 ROS 量成正比。

1.2.6.2 细胞脂质过氧化产物的变化 按照检测细胞上清液乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 水平步骤培养处理细胞并收集培养上清液。按丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 检测试剂盒说明书操作, 分光光度计法检测各组脂质过氧化产物 MDA 水平。

1.2.7 细胞 MAPKs 家族蛋白活化 将传代后的 HDMECs 接种入直径 10 cm 平皿, 各组细胞按上述方法处理 15 min 后去除培养基, 用冷 PBS 洗 3 次, 加 $300 \mu\text{L}$ 裂解液, 裂解完成后提取总蛋白。在 12% 的 SDS-PAGE 胶上进行分离, 并转到聚偏氟乙烯中空纤维膜上。用含 5% BSA 的 TBS-T 液封闭 1 h 后, 膜上加入一抗 (t-ERK、p-ERK、t-JNK、p-JNK、t-P38、p-P38) 孵育过夜, 再与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h。其后, 用增强化学发光法显色, 并在胶片上进行曝光。以 β -actin 表达作为内参对照。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析, 全部数据均以均数 \pm 标准差表示, 组间比较使用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HMME-PDT 对 HDMECs 损伤的影响

2.1.1 HMME-PDT 改变细胞形态 将细胞置于普通光学显微镜下观察细胞形态。正常生长 HDMECs 为梭形, 细胞间排列紧密, 予 HMME-PDT 处理后细胞皱缩、变形, 排列松散, 单纯给药组及单纯光照组细胞形态正常 (图 1)。

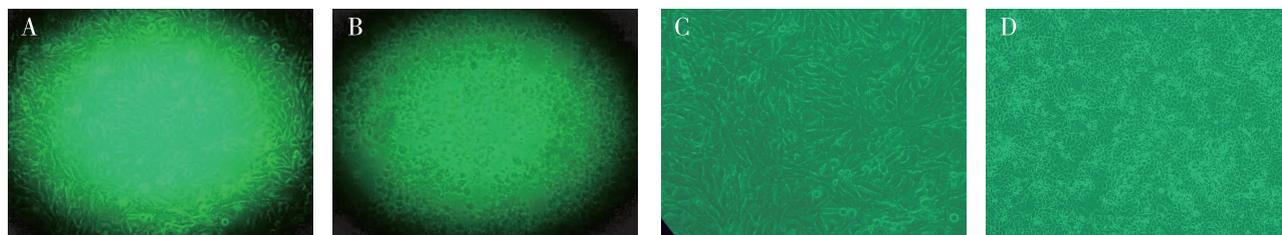


图 1 HMME-PDT 处理细胞后细胞形态改变

Figure 1. Morphological Changes of Cells after Treated by HMME-PDT

A: The control group; B: The HMME-PDT group; C: The HMME group; D: The PDT group.

HMME: Hematoporphyrin monomethyl ether; PDT: Photodynamic therapy.

2.1.2 HMME-PDT 降低细胞活力 以不同浓度 HMME 预处理细胞 3 h 后光照 30 min。与空白对照组相比,低浓度 HMME-PDT 组(0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理细胞后 1 h、12 h 及 24 h 细胞存活率均明显降低(图 2A ~ C)。低浓度 HMME 组(0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理细胞后细胞存活率差异均无统计学意义(图 2D)。高

浓度 HMME-PDT 组(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理细胞后细胞存活率均明显降低(图 2E)。高浓度 HMME 组(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理细胞后细胞存活率差异均无统计学意义(图 2F)。PDT 单独处理对细胞存活率无明显影响,200 μM H_2O_2 可致细胞存活率明显降低。

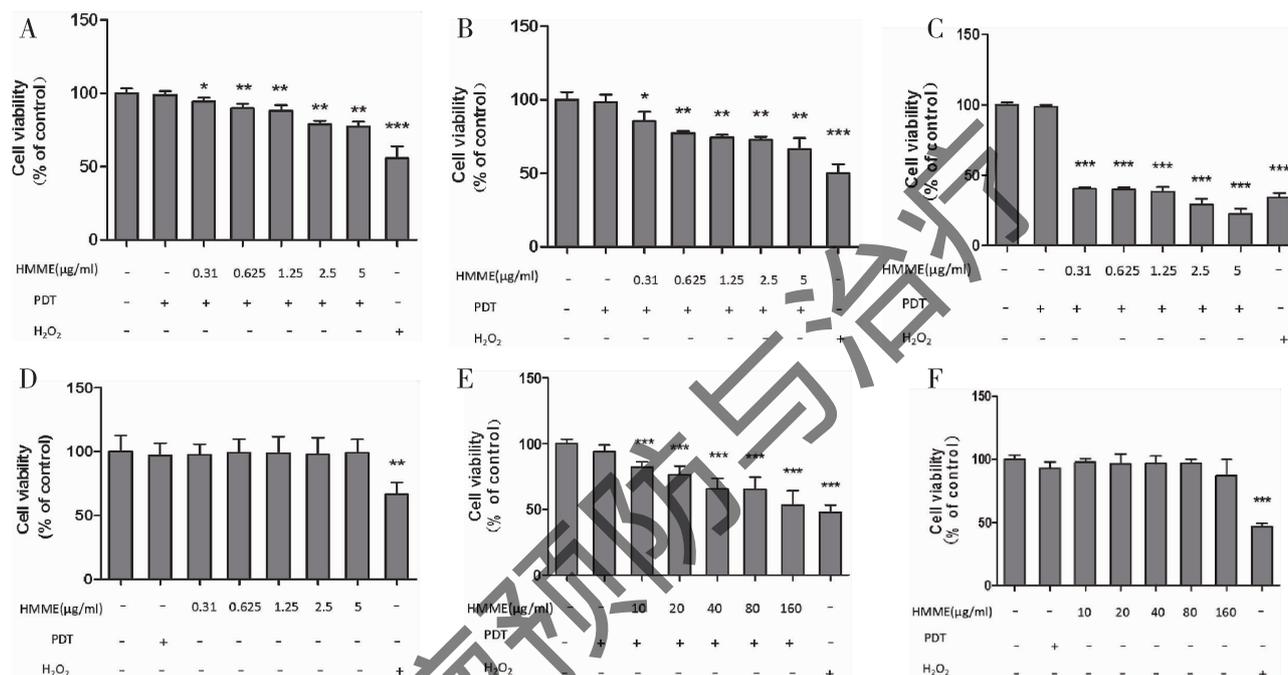


图2 不同浓度的 HMME-PDT 均可致细胞活力明显降低

Figure 2. HMME-PDT Leads to Decreased Cell Viability

A. The survival of cells significantly decreased 1 h after being treated by HMME-PDT (0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$); B. The survival of cells significantly decreased 12 h after being treated by HMME-PDT (0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$); C. The survival of cells significantly decreased 24 h after being treated by HMME-PDT (0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$); D. The survival of cells did not vary after being treated with HMME (0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or treated by PDT compared to the control group ($P > 0.05$), and it significantly decreased after being treated with H_2O_2 (200 μM) (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$); E. The survival of cells significantly decreased after being treated by HMME-PDT (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) compared to the control group and the PDT group (*** $P < 0.001$); F. The survival of cells did not vary after being treated with HMME (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) compared to the control group and the PDT group ($P > 0.05$).

Abbreviations as indicated in Figure 1.

2.1.3 HMME-PDT 诱导细胞凋亡 通过流式细胞术发现,与空白对照组相比, HMME-PDT 组(0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理细胞后 12 h 细胞凋亡率均明显增高;PDT 单独处理组及 HMME 单独处理组细胞凋亡率差异均无统计学意义;200 μM H_2O_2 阳性对照组细胞凋亡率

明显增加(图 3)。

2.1.4 HMME-PDT 致细胞 LDH 释放 检测细胞上清液发现,与空白对照组相比, HMME-PDT 组(0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理细胞后 12 h 细胞 LDH 释放量明显增多(图 4A)。PDT 及 HMME 单独处理细胞后细

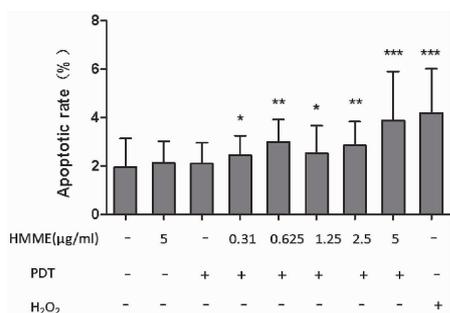


图3 不同浓度 HMME-PDT 均可诱导细胞凋亡 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Figure 3. HMME-PDT Significantly Induces Apoptosis Rate (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Abbreviations as indicated in Figure 1.

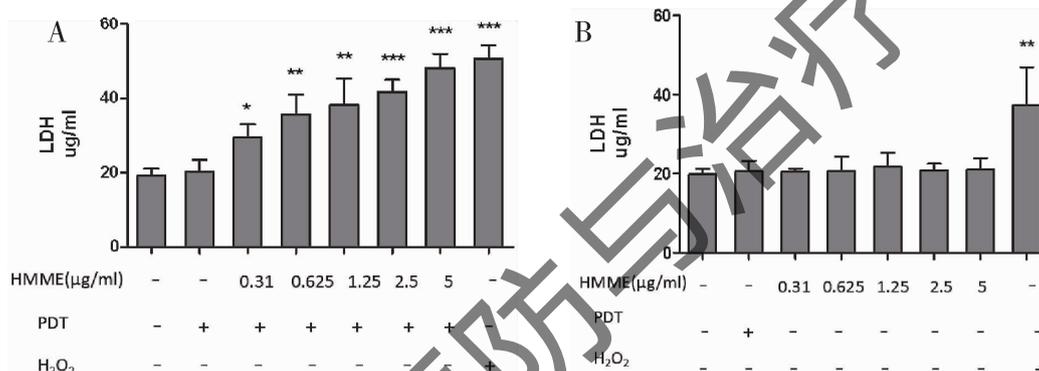


图4 HMME-PDT 组细胞上清 LDH 含量明显增多

Figure 4. HMME-PDT Significantly Induces Intracellular LDH

A. The LDH release in HDMECs markedly increased after being treated by HMME-PDT (0.31 μg/mL, 0.625 μg/mL, 1.25 μg/mL, 2.5 μg/mL and 5 μg/mL) compared to the control groups (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$); B. The LDH release in HDMECs did not vary after being treated with HMME (0.31 μg/mL, 0.625 μg/mL, 1.25 μg/mL, 2.5 μg/mL and 5 μg/mL) or treated by PDT compared with control group ($P > 0.05$), and it markedly increased after being treated with H₂O₂ (200 μM) compared to other groups (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

LDH: Lactate dehydrogenase; other abbreviations as indicated in Figure 1.

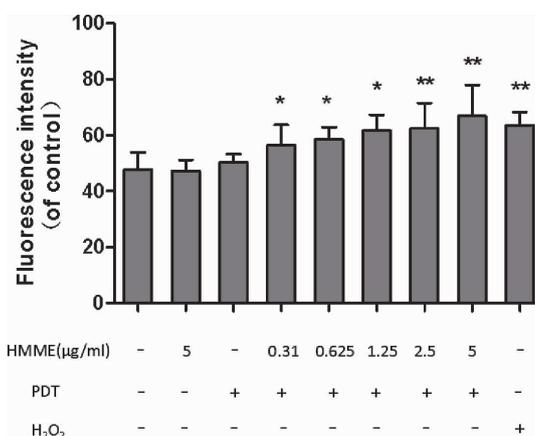


图5 HMME-PDT 可致细胞产生 ROS (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Figure 5. HMME-PDT Significantly Induces Intracellular ROS (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

ROS: Reactive oxygen species; other abbreviations as indicated in Figure 1.

胞上清 LDH 含量无明显变化(图 4B)。200 μM H₂O₂ 可致细胞释放大量 LDH。

2.2 HMME-PDT 对 HDMECs 氧化应激状态的影响

2.2.1 HMME-PDT 诱导细胞内产生 ROS

通过流式细胞术发现,与空白对照组相比,不同浓度 HMME-PDT 组(0.31 μg/mL、0.625 μg/mL、1.25 μg/mL、2.5 μg/mL、5 μg/mL)处理细胞后 12 h 细胞内 ROS 产量明显增多;PDT 单独处理组及 HMME 单独处理组未见细胞内 ROS 产生量发生明显变化,200 μM H₂O₂ 阳性对照组细胞 ROS 产生量明显增加(图 5)。

2.2.2 HMME-PDT 致细胞内产生 MDA 检测细胞上清液发现,与空白对照组相比,不同浓度 HMME-PDT 组处理细胞后 12 h 细胞产生 MDA 量明

显增多(图 6A)。PDT 单独处理组及 HMME 单独处理组细胞内 MDA 产量无明显变化(图 6B)。200 μM H_2O_2 可致细胞产生大量 MDA。

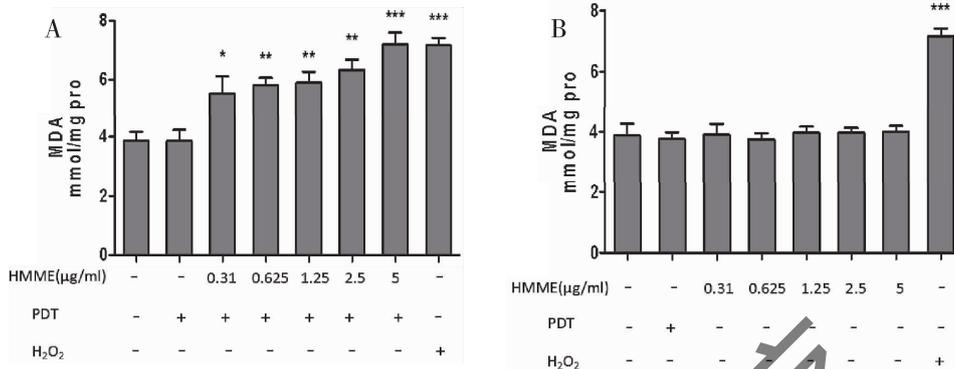


图 6 HMME-PDT 组 MDA 含量明显增加

Figure 6. HMME-PDT Significantly Induces Intracellular MDA

A. The expression of MDA in HDMECs markedly increased after being treated by HMME-PDT (0.31 $\mu\text{g/ml}$, 0.625 $\mu\text{g/ml}$, 1.25 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ and 5 $\mu\text{g/ml}$) compared to the control groups (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$); B. The MDA release in HDMECs did not vary after being treated with HMME (0.31 $\mu\text{g/ml}$, 0.625 $\mu\text{g/ml}$, 1.25 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ and 5 $\mu\text{g/ml}$) or treated by PDT compared to the control group, and it markedly increased after being treated with H_2O_2 (200 μM) compared to other groups (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

MDA: Malonaldehyde; other abbreviations as indicated in Figure 1.

2.3 HMME-PDT 诱导细胞 MAPKs 家族蛋白的活化

Western blot 实验检测结果显示:与空白对照组比较, HMME-PDT 处理组磷酸化的 P38 及 ERK 表达增高。PDT 单独处理组及 HMME 单独处理组

未见明显促磷酸化作用(图 7A)。半定量统计分析灰度值结果显示 HMME-PDT 处理组磷酸化的 ERK、P38 表达增高,磷酸化 JNK 表达未见明显变化(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)(图 7B)。

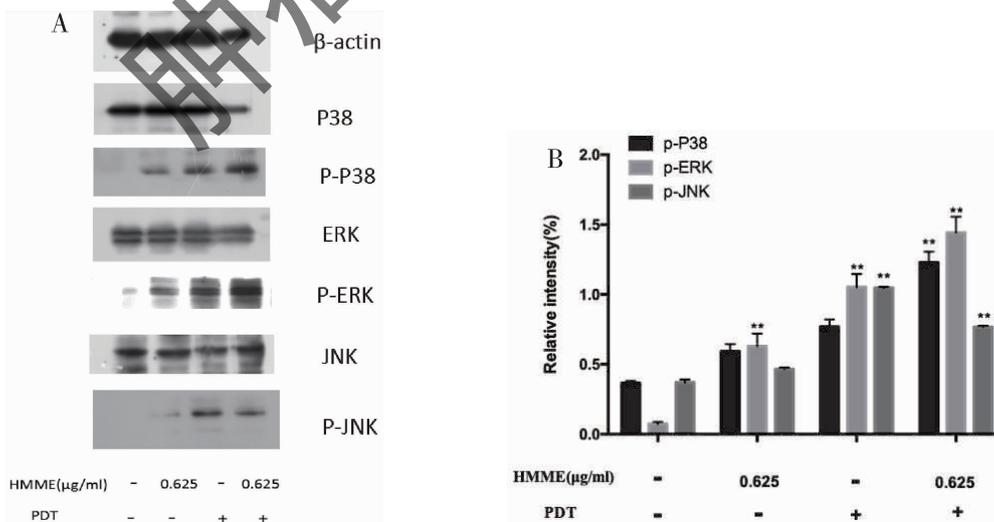


图 7 HMME-PDT 可以诱导 P38、ERK 磷酸化

Figure 7. HMME-PDT Induces P38 or ERK Phosphorylation

A. HDMECs cells treated with HMME-PDT resulted in an increased phosphorylation of ERK and P38, but no difference in JNK phosphorylation; B. The intensity was measured by densitometry(** $P < 0.01$).

Abbreviations as indicated in Figure 1.

3 讨论

HMME 是一种单体卟啉类光动力药物。与第一代光敏剂相比,海姆泊芬具有光动力效能更强、代谢迅速、毒副作用更低等优点,已开始临床应用中崭露头角。现有资料显示 HMME-PDT 治疗 PWS 安全、有效^[10-12]。本研究发现, HMME-PDT 可致 HDMECs 产生大量 ROS, 诱导细胞凋亡。这一作用可能与其细胞 MAPKs 蛋白家族的磷酸化, 进而激活炎症信号通路有关。

ROS 是细胞在有氧代谢过程中产生的具有高生物活性含氧化合物的总称, 包括超氧阴离子 ($\cdot O_2^-$)、羟自由基 ($\cdot OH$)、过氧化氢 (H_2O_2)、氢过氧自由基 ($HO_2\cdot$)、一氧化氮 (NO) 等。目前普遍认为 ROS 是一种具有生物学活性的毒性分子, 参与调控了多种因子的细胞生物学效应^[13]。ROS 可以通过脂质过氧化反应、蛋白质变性、DNA 损伤、线粒体膜电位改变以及调控细胞信号转导等途径引起细胞损伤^[14-18]。相关研究表明 HMME-PDT 作用机制可能是药物进入循环, 并在高浓度时, 由于光化学反应诱导血管内皮细胞活性氧产生, 选择性地损伤血管内皮细胞所致^[10, 19-23]。

本次研究通过对细胞损伤情况的调查发现, 低浓度 HMME-PDT 就能使细胞活力显著下降, 凋亡细胞明显增多。并且药物浓度越大, 细胞凋亡率越高。这说明在光照强度一定的情况下, HMME 对 HDMECs 的损伤作用呈浓度依赖。同时我们发现, 完成处理后继续培养细胞, 随着培养时间的延长, 细胞的凋亡现象更加明显, 且早凋亡及中晚凋亡细胞比例均明显增加。由此我们可以推测, HMME-PDT 对细胞的损伤作用存在时间依赖性。即在光照处理后的一段时间内 HMME 对目的细胞的损伤作用能持续进行。以上结果说明 HMME 具有较高的光反应性及较强的光动力效能, 接受相应波长的可见光照射后能有效地杀伤目的细胞。随后我们发现, 阴性对照组细胞在接受高浓度 HMME 单独处理后与空白对照相比并未出现明显凋亡现象, 这说明 HMME 本身并不使细胞发生损伤, 进一步证实了 HMME 的安全性。LDH 存在于细胞质中, 当细胞受到损伤时会通过受损的细胞膜释放到胞外。由于释放出的 LDH 性质较稳定, 所以培养基中 LDH 的含量可以作为判定细胞死亡和受损程度的相对指标。本次研究通过检测处理组与对照组细胞上清 LDH 含量也再次证实 HMME-PDT 能导致 HDMECs 损伤。

之后的研究结果表明 HMME-PDT 能导致细胞产生大量 ROS 并引起脂质过氧化反应。且随着药物浓度的增加及处理后培养时间的延长氧化应激损害越明显, 与其致细胞损伤结果一致。这也证明 HMME-PDT 是通过氧化应激途径杀伤目的细胞。

MAPKs 途径是主要的细胞内信号转导途径之一, 在细胞增殖及凋亡方面具有重要作用^[24], 包括 ERK、JNK 和 P38^[25-26]。大量研究表明, ROS 能活化血管内皮细胞, 使得 ERK、P38、JNK 等蛋白磷酸化^[27-30]; 而这些 MAPKs 家族蛋白的活化, 可诱导下游凋亡相关转录, 促进细胞死亡。

本研究结果证实了 HMME-PDT 可以明显促进 ERK、P38 磷酸化, 但并未见促进 JNK 磷酸化。这提示 HMME-PDT 可能是通过调控 MAPKs 通路中的 ERK、P38 两种激酶从而诱导 HDMECs 凋亡的发生。有研究表明 ROS 能活化 MAPKs 途径, 并诱导凋亡蛋白酶 caspase3 产生, 促进细胞凋亡^[31]。Caspase 家族被认为与细胞凋亡密切相关, 通过基因敲除技术发现 Caspase 还参与了细胞的成熟、生长和分化及免疫的调节^[32-34]。之前, Wei 等^[35]的研究显示, HMME 可进入细胞线粒体, 在光照后通过线粒体膜电位改变及 caspase 家族蛋白活化, 介导卵巢癌细胞株 3AO 细胞死亡。细胞凋亡还可通过细胞色素 C 途径。细胞色素 C 从线粒体内释放是关键的一步^[36]。在细胞凋亡信号的刺激下, 细胞色素 C 从线粒体内释放到胞浆内, 在 dATP 存在下与凋亡分子 Apaf-1 形成复合体, 并招募细胞内 caspase 9 的前体 pro-caspase 9 到复合体上并发生自身切割活化; 从而促进 pro-caspase 3 切割活化, caspase 3 产生并诱导细胞凋亡^[36-37]。HMME-PDT 促进血管内皮细胞凋亡作用是否与活化 caspase 家族相关, 值得后期的进一步研究与验证。

综上所述, 本项研究显示: HMME-PDT 可诱导 HDMECs 产生 ROS, 致其发生氧化应激损害和细胞凋亡。其机制可能是通过调控 MAPKs 通路中的 ERK 和 P38 磷酸化从而诱导凋亡相关转录来实现的。总之, 海姆泊芬因其较强的光敏性及光动力效能、较高的安全性、药物处理时间相对较短等特点对于治疗因血管畸形造成的葡萄酒色斑等相关皮肤疾病具有独特的优势。

本课题以体外细胞模型为研究对象, 从分子水平部分阐明了海姆泊芬治疗葡萄酒色斑的作用机制, 其结果为 HMME-PDT 治疗葡萄酒色斑的可靠性及安全性提供了科学的实验证据, 并为 HMME-PDT

临床应用提供了理论依据和线索。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Gan LQ, Wang H, Ni SL, *et al.* A clinical study of HMME-PDT therapy in Chinese pediatric patients with port-wine stain [J]. *Photodiagn Photodyn Ther*, 2018, 23(11):102-105.
- [2] Li DC, Nong X, Hu zy, *et al.* Efficacy and related factors analysis in HMME-PDT in the treatment of port wine stains [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2020, 29 : 101649.
- [3] Katelyn MU, Amor K. Port-wine stains: A focused review on their management [J]. *J Drugs Dermatol*, 2017, 16(11):1145-1151.
- [4] Kathleen MN, Eva AH. A port-wine stain treated with pulsed dye laser: A complication from contaminated makeup [J]. *Dermatol Surg*, 2018, 44(10):1359-1362.
- [5] 姚文秀,李鑫,魏于全. 肿瘤内科治疗的现状与未来 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2019, 32(9):743-748.
- [6] Vi N, Marcelo H, Martin CM, *et al.* The pathogenesis of port wine stain and Sturge Weber syndrome: Complex interactions between genetic alterations and aberrant MAPK and PI3K activation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9):2243.
- [7] Chen JK, Ghasri P, Aguilar G, *et al.* An overview of clinical and experimental treatment modalities for port wine stains [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2012, 67(2):289-304.
- [8] Xing QL, Fen N, Xiu WX, *et al.* HMME combined with green light-emitting diode irradiation results in efficient apoptosis on human tongue squamous cell carcinoma [J]. *Lasers Med Sci*, 2015, 30(7):1941-1948.
- [9] 王美玲,刘华绪. 鲜红斑痣发病及治疗相关机制研究进展 [J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2019, 35(9):564-567.
- [10] Sun PH, Zhao X, Zhou Y, *et al.* Tolerance and pharmacokinetics of single-dose intravenous hemoporphin in healthy volunteers [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(12):1549-1554.
- [11] 吴秋菊,周展超,林彤,等. 光动力疗法与脉冲染料激光治疗鲜红斑痣的临床比较 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2016, (8):587-590.
- [12] Gao K, Huang Z, Yuan KH, *et al.* Side-by-side comparison of photodynamic therapy and pulsed-dye laser treatment of port-wine stain birthmarks [J]. *Br J Dermatol*, 2013, 168(5):1040-1046.
- [13] 盛珉旻,王芳,张汝芝,等. 海姆泊芬光动力治疗鲜红斑痣的临床疗效及声像学变化研究 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2019, 52(12):923-927.
- [14] Robert L, Zhen QJ, Michel AT. Defining ROS in biology and medicine [J]. *React Oxyg Species (Apex)*, 2016, 1(1):9-21.
- [15] Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 80,50-64.
- [16] Forrester SJ, Kikuchi DS, Hemandes MS, *et al.* Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling [J]. *Circ Res*, 2018, 122(6):877-902.
- [17] Sahdeo P, Subash CG, Amit KT. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals [J]. *Cancer Lett*, 2017, 387:95-107.
- [18] Mailloux RJ, Harper ME. Mitochondrial proteotoxicity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins [J]. *Trends Endo Metab*, 2012, 23(9):451-458.
- [19] Chen T, Guo ZP, Wang L, *et al.* Paeoniflorin suppresses vascular damage and the expression of E-selectin and ICAM-1 in a mouse model of cutaneous Arthus reaction [J]. *Exp Dermatol*, 2013, 22(7):453-457.
- [20] Chen T, Guo ZP, Jiao XY, *et al.* Peoniflorin suppresses tumor necrosis factor- α induced chemokine production in human dermal microvascular endothelial cells by blocking nuclear factor- κ B and ERK pathway [J]. *Arch Dermatol Res*, 2011, 303(5):351-360.
- [21] 刘恺,刘进,席超等. 基于光敏剂的光动力疗法 [J]. *化学教育*, 2017, 38(6):1-4.
- [22] Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, *et al.* Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(5):721-733.
- [23] Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, *et al.* The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(9):1619-1633.
- [24] Son Y, Kim S, Chung HT, *et al.* Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases [J]. *Methods Enzymol*, 2013, 528:27-48.
- [25] Ong JYH, Yong PVC, Lim YM, *et al.* 2-Methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ) induces apoptosis of A549 lung adenocarcinoma cells via oxidation-triggered JNK and p38 MAPK signaling pathways [J]. *Life Sci*, 2015, 135:158-164.
- [26] Liu Z, Huang Y, Jiao Y, *et al.* Polystyrene nanoplastic induces ROS production and affects the MAPK-HIF-1/NF κ B-mediated antioxidant system in *Daphnia pulex* [J]. *Aquat Toxicol*, 2020, 220:105420.
- [27] Zhu J, Yu W, Liu B, *et al.* Escin induces caspase-dependent apoptosis and autophagy through the ROS/p38 MAPK signalling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10):e3113.
- [28] Yuan H, Zhang X, Huang X, *et al.* NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species mediate FFAs-induced dysfunction and apoptosis of β -cells via JNK, p38 MAPK and p53 pathways [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12):e15726.
- [29] Xu DG, Lv W, Dai CY, *et al.* 2-(Pro-1-nyl)-5-(5,6-dihydropenta-1,3-dienyl) thiophene induces apoptosis through reactive oxygen species-mediated JNK activation in human colon cancer SW620 cells [J]. *Anatomical Record*, 2015, 2989(2):376-385.

[30] Chen T, Guo ZP, Jiao XY, *et al.* Protective effects of peoniflorin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2011, 89(6) : 445-453.

[31] Choi JB, Kim JH, Lee H, *et al.* Reactive oxygen species and p53 mediated activation of p38 and caspases is critically involved in kaempferol induced apoptosis in colorectal cancer cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(38) : 9960-9967.

[32] Qian H, Fang L, Xin JL, *et al.* Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy [J]. *Nature Medicine*, 2011, 17(7) : 860-866.

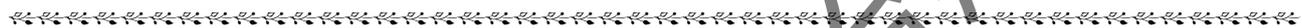
[33] Li M, Song M, Ren LM, *et al.* AlCl₃ induces lymphocyte apoptosis in rats through the mitochondria-caspase dependent pathway [J]. *Environ Toxic*, 2016, 31(4) : 385-394.

[34] 李静, 吴东明, 喻叶, 等. Caspase-1 信号通路介导的细胞焦亡在放射性肠炎中的作用[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2019, 32(9) : 756-763.

[35] Wei Y, Kong B, Song K, *et al.* Involvement of mitochondria-caspase pathway in Hemoporphin-mediated cell death [J]. *Photochem Photobiol*, 2007, 83(6) : 1319-1324.

[36] Gaurav SC, Sayer AH, Alexandra A, *et al.* Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1219 : 1-9.

[37] Yi NL, Meng YZ, Qi H, *et al.* Mechanistic insights into caspase-9 activation by the structure of the apoptosome holoenzyme [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(7) : 1542-1547.



· 读者 · 作者 · 编者 ·

《肿瘤预防与治疗》文章荐读: 具有乳头样核特征的非浸润性甲状腺滤泡性肿瘤诊治进展

近年来,具有乳头状核特征的非浸润性甲状腺滤泡性肿瘤逐渐被临床及病理学者加以重视。由于此种类型的甲状腺肿瘤具有甲状腺乳头状癌的细胞核特征,之前归属为甲状腺乳头状癌的一个特殊病理亚型,临床处理依据分化性甲状腺癌诊疗规范进行,但由于该类型肿瘤预后好,很少出现复发和转移,因此有学者建议此种肿瘤应从“癌”重新界定为极低度恶性潜能癌从而避免过度诊断及过度治疗。但如何正确诊断该类型肿瘤并规范处理国内外仍存在认识不足而出现不平衡现象。《具有乳头样核特征的非浸润性甲状腺滤泡性肿瘤诊治进展》一文对这类肿瘤的临床特征、诊断及鉴别诊断、治疗及预后的最新研究进展进行综述性报道,旨在为提高甲状腺肿瘤相关临床医生对该病的重视程度及诊疗水平提供参考。

阅读该文请登陆本刊网站 www.zlyfyzl.cn, 或点击推荐文章链接 http://125.71.214.100:801/Jwk_zlyf/CN/abstract/abstract343.shtml 查看。

本刊编辑部