

文章编号:1005-6947(2007)07-0684-03

· 文献综述 ·

肿瘤细胞耐受光动力疗法分子机制的研究进展

王嘉倍 综述 刘连新 审校

(哈尔滨医科大学附属第一医院 普外科六病房, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:光动力疗法(PDT)可诱导肿瘤细胞凋亡,治疗消化道肿瘤,或对无法手术的癌症晚期患者进行姑息治疗。因PDT致肿瘤细胞的凋亡率并未达100%,肿瘤细胞耐受PDT的原因目前还不明了,据相关文献报道可能与血红素加氧酶-1、热休克蛋白、锰超氧化物歧化酶、Bcl-2蛋白家族等许多因素相关。现就已知造成肿瘤细胞耐受光动力疗法的各种分子机制作一简要综述。

[中国普通外科杂志,2007,16(7):684-686]

关键词:光动力疗法;光敏剂;活性氧簇;肿瘤细胞

中图分类号:R730.2

文献标识码:A

光动力疗法(potodynamic therapy, PDT),原称光辐射疗法(photoradiation therapy, PRT)、光化学疗法(photochemical therapy, PCT)。该疗法是利用光动力反应进行疾病诊断和治疗的一种新技术。我国光动力治疗事业起步与国外相差不多,20世纪80年代至90年代中期,我国PDT事业蓬勃发展并取得显著成就,但到了20世纪90年代末,由于种种原因而逐渐冷落,几近停顿。进入新世纪以来,我国PDT事业又出现了蓬勃发展的新势头。

细胞在PDT中被光敏化后,表现出一系列应激状态:磷脂酶被激活, N-脂酰鞘氨醇代谢改变,细胞溶质内自由钙离子浓度升高,一氧化氮合酶被激活以及蛋白质磷酸化和基因表达中转录因子修饰的改变等。尽管这些代谢反应大部分促成了细胞的死亡过程,但其中也有对抗细胞死亡的因素。因此,阐明它们的机制有助于设计更有效的肿瘤治疗策略,以期改善PDT的抗肿瘤疗效。

收稿日期:2006-10-17;

修订日期:2007-01-30。

作者简介:王嘉倍,男,河北新镇人,哈尔滨医科大学附属第一医院硕士研究生,主要从事肝胆外科方面的研究。

通讯作者:刘连新 E-mail: liulianxin@medmail.com.cn。

1 有关 PDT

PDT由激光光源、光敏剂和分子氧所组成^[1]。其中任何单独一项对细胞都是无害的,但联合应用几种成分便会产生强烈的细胞毒性。PDT既可对某些晚期肿瘤患者进行姑息治疗,也可根治早期肿瘤和表浅疾病。目前,PDT已在欧美、日本等国家用于临床治疗肺、食管、喉、膀胱和胃的肿瘤。PDT抗肿瘤的活性机制主要是将破坏肿瘤血管、激活炎症反应和免疫应答相结合共同直接作用于肿瘤,其分子机制在于PDT导致氧化应激的产生^[2]。在分子氧存在的前提下,适当波长的激光照射可激活光敏剂从而经历两种类型的反应:1型反应,激活的光敏剂可直接与细胞基质反应产生自由基负离子或自由基正离子,两者进一步与分子氧反应产生活性氧簇(ROS)。2型反应,激活的光敏剂直接将能量转移至分子氧形成高活性短周期的单线态氧^[3]。

由于激光的组织穿透力有限,PDT的抗肿瘤效应通常被限定在数厘米以内。深层肿瘤接受到的光剂量不足以完全激活光敏剂,故导致肿瘤细胞和血管系统的亚致死性损伤能被诱发的保护机制稳定地修复。残留的肿瘤细胞也许是肿瘤复发并导致PDT疗效减弱的主要原因。

2 耐受 PDT 的分子机制

2.1 血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1)

PDT引起的应激状态可导致某些蛋白质的表达升高,这是细胞对应激条件的反应。对中国仓鼠成纤维细胞系(V-79)施行PDT,用光卟啉或四氯四碘荧光素作为光敏剂,可导致血红素加氧酶蛋白水平升高。后者可催化凝血因子X的氧化降解,生成胆绿素;通过胆绿素还原酶的作用将其转化成胆红素^[4]。胆红素和胆绿素是非常有效的抗氧化剂^[5]。血红素加氧酶基因包含一些转录因子的结合位点,包括转录因子激活蛋白-1(AP-1)共有序列,经PDT后它可导致血红素加氧酶基因的表达升高。

应用与应激反应相关的基因芯片研究发现^[6],结肠腺癌细胞系C-26在PDT 2h后,血红素加氧酶-1基因表达至少上调2倍。X因子是血红素加氧酶-1的内源性诱导剂,其非毒性浓度范围在5~10 $\mu\text{mol/L}$ 。在此浓度范围内,用X因子预孵育C-26细胞24h可显著提高其对PDT的耐受性。用4.5kJ/m²的PDT处理正常C-26细胞,可以杀死50%细胞;而对于经过10 $\mu\text{mol/L}$ X因子预处理的C-26细胞,PDT只能杀死26%的细胞。应用血红素加氧酶-1的抑制剂锌(II)-原卟啉IX重复上述试验,可获得相同结论。

2.2 热休克蛋白(heat-shock proteins, HSP)

应用二氢卟吩作为光敏剂在活体内外进行 PDT 研究发现,在鼠类辐射诱发的纤维肉瘤(RIF-1)细胞系中,HSP-70 mRNA 和蛋白质的水平都有升高^[7]。以苯卟啉衍生物作为光敏剂进行 PDT 发现,在活体内外 HSP-70 蛋白质的表达形式是相同的^[7]。应用双向凝胶电泳并与公布的凝胶模型比较发现,PDT 后表达有改变的热休克蛋白包括 HSP-110, HSP-90, HSP-73, HSP-72 和 HSP-47。调节 HSP 家族基因转录的机制包括热激因子(HSF)结合到特异的热激元件上(HSE)。在非应激状态下,转录因子 HSF 存在于细胞浆中,以单体的形式与 HSP-70 结合。一旦细胞受到刺激处于应激状态,HSP-70 结合变性蛋白并释放 HSF,后者随即移行到细胞核并结合 HSE。相应地,在体外用二氢卟吩光敏化 RIF-1 细胞系可诱导 HSF-1 结合到 HSE 上,并短暂诱导包含 HSP-70 启动子的基因的表达^[8]。然而,用光卟啉作为光敏剂却观察不到这种结果,可能与不同光敏剂作用的亚细胞分子靶点不同有关。

HSP-27 在保护细胞免受光氧化损伤方面起到一定作用。HSP-27 属于小热休克蛋白家族的一员,它在正常细胞和组织内表达很低,但各种刺激都可导致其表达升高。高表达的 HSP-27 可以保护细胞免遭高温、炎症和氧化应激所造成的损伤,其保护机制可能与磷酸化活性、分子伴侣功能或谷胱甘肽调节有关^[9-10]。HSP-27 是对应激和生长刺激反应的早期磷酸化靶点。HSP-27 磷酸化可使氧化应激状态下的肌动蛋白免于断裂,故可提高细胞存活率。基因芯片分析显示,在耐受 PDT 的结肠癌 HT29-P14 细胞系中,HSP-27 基因比正常结肠癌细胞系上调 20 倍,因而可使 HT29-P14 细胞耐受 PDT。

2.3 抗氧化酶-锰超氧化物歧化酶(MnSOD)

应用鼠类低分化结肠腺癌细胞系 C26 研究发现,光卟啉诱导的 PDT 可导致 MnSOD 蛋白水平显著升高,但 Cu/Zn SOD 水平并不升高。将 T24 膀

胱癌细胞系转染 MnSOD 基因,可显著降低 PDT 诱导细胞凋亡的功效^[11]。

PDT 时,光敏剂被激活后生成 ROS,包括单线态氧和超氧化物,从而诱导细胞凋亡,线粒体是光动力治疗的主要靶点。SOD 可以部分防止 PDT 所造成的光损害。细胞过表达 MnSOD 可防止光毒性^[12]。PDT 诱导细胞凋亡的初期会有神经鞘脂类(如神经酰胺)的蓄积,这种蓄积与线粒体的去极化有关^[13-14]。神经酰胺的蓄积主要是由于 PDT 使鞘磷脂合酶、葡萄糖基神经酰胺合酶和丝氨酸软脂酰转移酶的活性降低,从而使神经酰胺不能进一步转化成神经鞘脂类,导致神经酰胺的蓄积。神经酰胺可以诱导多种生物学反应,包括细胞凋亡、细胞周期停滞、细胞分化和增殖。应用敲除了 MnSOD 基因的鼠类成纤维母细胞的研究发现,MnSOD 可显著降低 PDT 所诱发的凋亡率。以上的结果说明,抑制 MnSOD 的活性可显著提高 PDT 的抗肿瘤功效。

2.4 Bcl-2 蛋白家族

研究发现,Bcl-2 的过表达防止了半胱天冬酶 3 和 6 前体的分裂、多聚腺苷二磷酸聚合酶的蛋白水解作用和 DNA 亚二倍体的生成,这是由于 Bcl-2 磷酸化所致,通过细胞周期调节蛋白依赖性蛋白激酶-1(CDK-1),导致细胞在 G2/M 期停滞。在 PDT 中,Bcl-2 还可以延迟细胞的形态学变化,抑制半胱天冬酶活性。但在光敏化的条件下,过表达的 Bcl-2 不能抑制细胞色素 C 从线粒体释放。说明 Bcl-2 耐受 PDT 主要系通过抑制半胱天冬酶的活性而实现,甚至在细胞质中出现细胞色素 C 后仍可以抑制半胱天冬酶的活性^[15]。

为了观察 Bcl-2 在 PDT 中所起的调节作用,有学者用含有反义 Bcl-2 序列的反转录病毒载体转染人胃腺癌 MGC803 细胞系,随后对其进行 PDT。噻唑蓝(MTT)分析显示,降低的 Bcl-2 蛋白水平可提高光毒性。同样,用 Bcl-2 反义寡核苷酸孵育耐受 PDT 的 RIF-1 细胞系经 PDT 后,PDT 诱导的凋亡率也有所升高^[16]。

2.5 环氧化酶-2(Cox-2)

Cox-2 在调节肿瘤的血管发生和

凋亡方面起重要作用。联合 Cox-2 和化学疗法或放射疗法进行治疗,可进一步提高抗肿瘤功效^[17],而且并未观察到 Cox-2 对正常组织有不利影响。

有研究显示,肿瘤细胞在经历 PDT 后,花生四烯酸的代谢会发生改变,胰腺腺泡也会短暂地释放 PGE2。RIF 细胞经光敏剂卟菲尔钠诱导的 PDT 后,Cox-2 的转录增强,Cox-2 蛋白水平长期上调,而 Cox-1 并未被诱导生成。应用小鼠乳腺癌细胞系 BA 和 Lew's 肺癌细胞系 LLC 体外研究发现,卟菲尔钠作为光敏剂,同样可使光敏化的细胞中的 Cox-2 蛋白水平上调;用 PDT 治疗种植 RIF 肿瘤的 C3H 小鼠也可以观察到相同的结果^[18]。活体内外研究发现,Cox-2 蛋白水平的上调伴随着 PGE2 生成增加;抑制 Cox-2 的活性可以提高 PDT 治疗 RIF 肿瘤的效果。

有学者^[19]用选择性 Cox-2 抑制剂 NS-398 联合 PDT 观察其破坏肿瘤细胞的功效,发现应用 NS-398 孵育的细胞其 PGE2 表达水平很低,经 PDT 处理后细胞凋亡率有显著升高。在 PDT 治疗 RIF 肿瘤时,全身给予 NS-398 不但显著降低 PGE2 水平,而且还降低血管内皮生长因子的生成。故认为,应用选择性 Cox-2 抑制剂可以显著提高 PDT 的治疗效果。

2.6 低氧诱导因子(HIF)

肿瘤缺氧是被公认的导致放射疗法疗效降低的原因之一,而且也可导致化学疗法的疗效降低^[20-21]。细胞缺氧可导致 PDT 的疗效降低。用新近研制的 HIF1a 和 HIF2a 的单克隆抗体作用于食管癌肿瘤组织,可以明显地观察到 HIF 在肿瘤组织内的作用。

最近的研究^[22]发现,HIF 的表达与食管癌细胞耐受 PDT 有关。HIF 的表达是食管癌通常发生的现象,并且与 PDT 根除病灶的损伤功效有关。HIFs 是低氧诱导的关键蛋白质,表达 HIF 的肿瘤一般都强烈缺氧,这可以解释肿瘤细胞对 PDT 的不完全反应率,因为实验发现 PDT 诱发的损伤与氧化作用的关系极为密切。

3 展望

致使肿瘤细胞耐受 PDT 的因素很

多,本文所介绍的是极小部分。要使其在临床上发挥有效的减轻或解除患者病痛的功效,必须更深入地研究其分子机制,特别是耐受 PDT 的分子机制。在实际研究中,可以通过各种基因芯片技术找出致使肿瘤细胞耐受 PDT 的相关基因,再利用 RNA 干扰技术鉴定出关键基因。从分子水平上发挥 PDT 抗肿瘤的最大功效,造福患者。

参考文献:

- [1] McBride G. Studies expand potential uses of photodynamic therapy [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(23): 1740 - 1742.
- [2] Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, *et al.* Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy [J]. *Acta Biochim Pol*, 2005, 52(2): 339 - 352.
- [3] Dysart JS, Patterson MS. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro [J]. *Phys Med Biol*, 2005, 50(11): 2597 - 2616.
- [4] Angermayr B, Mejias M, Gracia-Sancho J, *et al.* Heme oxygenase attenuates oxidative stress and inflammation, and increases VEGF expression in portal hypertensive rats [J]. *J Hepatol*, 2006, 44(6): 1033 - 1039.
- [5] Baranano DE, Rao M, Ferris CD, *et al.* Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(25): 16093 - 16098.
- [6] Nowis D, Legat M, Grzela T, *et al.* Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity [J]. *Oncogene*, 2006, 25(24): 3365 - 3374.
- [7] Mitra S, Goren EM, Frelinger JG, *et al.* Activation of heat shock protein 70 promoter with meso-tetrahydroxyphenyl chlorin photodynamic therapy reported by green fluorescent protein in vitro and in vivo [J]. *Photochem Photobiol*, 2003, 78(6): 615 - 622.
- [8] Luna MC, Ferrario A, Wong S, *et al.* Photodynamic therapy-mediated oxidative stress as a molecular switch for the temporal expression of genes ligated to the human heat shock promoter [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(6): 1637 - 1644.
- [9] Wang HP, Hanlon JG, Rainbow AJ, *et al.* Up-regulation of Hsp27 plays a role in the resistance of human colon carcinoma HT29 cells to photooxidative stress [J]. *Photochem Photobiol*, 2002, 76(1): 98 - 104.
- [10] McCollum AK, Teneyck CJ, Sauer BM, *et al.* Up-regulation of heat shock protein 27 induces resistance to 17-allylamino-demethoxygeldanamycin through a glutathione-mediated mechanism [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(22): 10967 - 10975.
- [11] Golab J, Nowis D, Skrzycki M, *et al.* Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. A superoxide dismutase inhibitor [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(1): 407 - 414.
- [12] Dolgachev V, Oberley LW, Huang TT, *et al.* A role for manganese superoxide dismutase in apoptosis after photosensitization [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332(2): 411 - 417.
- [13] Dolgachev V, Nagy B, Taffe B, *et al.* Reactive oxygen species generation is independent of de novo sphingolipids in apoptotic photosensitized cells [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 288(2): 425 - 436.
- [14] Liu GY, Hung YC, Hsu PC, *et al.* Ornithine decarboxylase prevents tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by decreasing intracellular reactive oxygen species [J]. *Apoptosis*, 2005, 10(3): 569 - 581.
- [15] Vantieghem A, Xu Y, Declercq W, *et al.* Different pathways mediate cytochrome c release after photodynamic therapy with hypericin [J]. *Photochem Photobiol*, 2001, 74(2): 133 - 142.
- [16] Zhang WG, Ma LP, Wang SW, *et al.* Antisense bcl-2 retrovirus vector increases the sensitivity of a human gastric adenocarcinoma cell line to photodynamic therapy [J]. *Photochem Photobiol*, 1999, 69(5): 582 - 586.
- [17] Kishi K, Petersen S, Petersen C, *et al.* Preferential enhancement of tumor radioresponse by a cyclooxygenase-2 inhibitor [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(5): 1326 - 1331.
- [18] Hendrickx N, Volanti C, Moens U, *et al.* Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(52): 52231 - 52239.
- [19] Ferrario A, Von Tiehl K, Wong S, *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment enhances photodynamic therapy-mediated tumor response [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(14): 3956 - 3961.
- [20] Brown JM. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy——eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(23): 5863 - 5870.
- [21] Matsuyama T, Nakanishi K, Hayashi T, *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2005, 96(3): 176 - 182.
- [22] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, *et al.* Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 1830 - 1832.