

ROS Detection in HL60 Based on ALA-PDT

Lili Li, Zelin Zheng, Kangqiang Huang, Jianwen Xiong*, Jian Wang

Laboratory of Quantum Information Technology, School of Physics and Telecommunication Engineering,

South China Normal University, Guangzhou

Email: lillianlee@126.com; jwxiong@snu.edu.cn

Received: Oct. 5th, 2011; revised: Oct. 28th, 2011; accepted: Nov. 12th, 2011.

Abstract: With the development of the basic research of photodynamic therapy (PDT) and a wide range of potential clinical applications have been carried out. The monitoring of reactive oxygen species (ROS) which produced in PDT has become a hot issue of PDT research in recent years. In the paper, the status of ROS in HL60 cells were investigated by fluorescence spectra acquired during PDT. The results showed that the largest number of ROS in PDT was achieved at the optimized conditions (the cells incubation time is 4 hours, the added concentration of ALA is 10 mM/L), in which up to 93.2% PDT efficiency for the HL60 Cells can be obtained within 60 minutes.

Keywords: Reactive Oxygen Species (ROS); 5-Aminolevulinic Acid (ALA); Photodynamic Therapy (PDT); Fluorescent Probe

基于 ALA-PDT 的 HL60 细胞中活性氧的检测

李莉莉, 郑泽麟, 黄康强, 熊建文*, 王健

广东省高等学校量子信息技术重点实验室, 华南师范大学物理与电信工程学院, 广州

Email: lillianlee@126.com; jwxiong@snu.edu.cn

收稿日期: 2011年10月5日; 修回日期: 2011年10月28日; 录用日期: 2011年11月12日

摘要: 随着光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)基础研究的不断深入和临床应用的广泛开展, 对 PDT 过程中产生的活性氧的实时监测近年来已成为 PDT 研究的热点问题。实验采用荧光探针技术, 通过获得的荧光光谱研究了基于 ALA-PDT 的 HL60 细胞中活性氧产生的情况。实验结果表明在 ALA 浓度为 10 mM/L, 孵育时间为 4 h, 光照剂量为 60 min 的光学参数下, 光动力反应中产生的活性氧是最多, HL60 细胞灭活效果最佳, PDT 效率达 93.2%。

关键词: 活性氧; 氨基乙酰丙酸(ALA); 光动力疗法(PDT); 荧光探针

1. 引言

光动力疗法(Photodynamic Therapy, PDT), 又称光辐照疗法(Photoradiation Therapy, PRT)或光化学疗法(Photochemotherapy)^[1,2], 是利用光敏剂分子接受特定波长的光能后通过光化学反应和能量传递将光能转化为分子内能^[3-5], 在有氧条件下, 产生多种活性氧物质(reactive oxygen species, ROS), 包括单线态氧、氧自

由基、羟自由基、超氧阴离子等, 具有细胞毒作用^[5-7], 它们可进一步与细胞内成分发生光敏化反应, 从而对蛋白质、核酸和脂类等生物大分子产生破坏作用, 使细胞的结构和功能受到严重影响, 导致细胞凋亡或死亡, 起到治疗作用^[8,9], 同时光敏剂自身也会发生光敏化自敏化反应^[10-12]。目前相关研究已证实基于 PDT 过程中的光敏剂光敏反应生成的活性氧是细胞杀伤的主要媒介。光敏剂的光漂白也是由活性氧物质所引起的^[13-15]。因此, 对 PDT 过程中活性氧的检测对于 PDT 原理的研究以及光漂白现象的理解有着重要的意义^[16,17]。

*基金项目: 国家自然科学基金项目(61072029); 广东省自然科学基金项目(10151063101000025); 广州市科技计划项目(2010Y1-C111)。

2. 实验材料与方法

2.1. 主要试剂

ALA(美国 Sigma 公司), 荧光探针 DCFH-DA(碧云天生物科技), CCK-8 试剂(碧云天生物科技)。

2.2. 实验仪器

PDT 反应室(自行设计,以大功率 LED 作为光源), F-4500 荧光分光光度计(日本日立), XDS-1A 倒置显微镜(广州光学仪器), DG5031 型酶联免疫检测仪(南京华东电子), LPE-1A 激光功率能量计(北京物科光电), SW-CJ 型洁净工作台(苏州安泰空气技术), HH.CP-TW 80 升二氧化碳培养箱(上海一恒科技), 24 孔培养板, 细胞计数板及其他常规器皿。

2.3. 细胞株

人前髓细胞(早幼细胞)株 HL60(凯基生物)。

2.4. 细胞培养

HL60 细胞加 RPMI-1640 培养基(胎牛血清 FCS 含量 12%), 置于环境温度为 37℃, 空气湿度为 95%, CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱中培养, 取对数生长期(即生命力最旺盛时期)的细胞进行实验。

2.5. 光谱分析

在基于 ALA 介导的 PDT 中, 被光诱导激发的“光敏剂”是 PpIX (protoporphyrin IX), PpIX 由 ALA 内源生长合成, ALA 是其合成前体物。PpIX 的吸收光谱如图 1 所示, 由图可见, PpIX 在 410 nm 附近有个强吸收峰。为了使 PDT 获得较好的光动力效应, 光源波长应选择在 410 nm 附近。实验采用单色性好、光斑面积大、光功率均匀稳定、热效应变化不显著、中心波长在 410 nm 附近的大功率 LED 作为 PDT 光源。从图 2 可以看到, 蓝光 LED 的最大发射峰是 410 nm, 半带宽为 45 nm, 能很好地满足实验中 PDT 光源的需要。

3. 实验结果和讨论

3.1. 单态氧检测实验方法与数据分析

3.1.1. 不同 ALA 浓度下活性氧的检测实验

采用 24 孔培养板, 用其中的 18 个孔作试验孔,

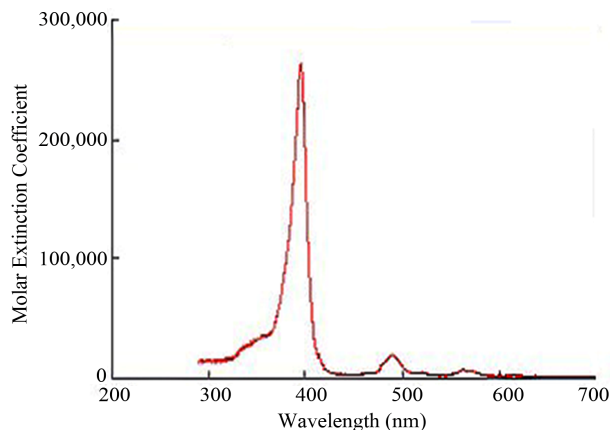


Figure 1. The absorption spectrum of PpIX
图 1. PpIX 的吸收光谱图

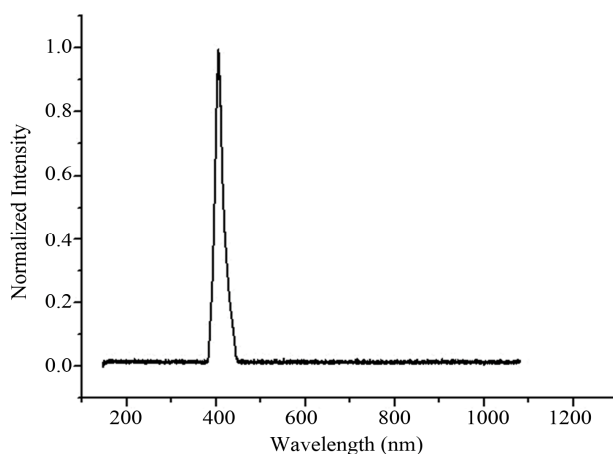


Figure 2. The emission spectra of the blue LEDs
图 2. 蓝光 LED 的发射光谱

分成六组, 每孔注入 500 μ l HL60(接种浓度为 1×10^6 /ml)细胞, 然后按照 1:1 的比例各组分别放入浓度为 0 mM/L、5 mM/L、8 mM/L、10 mM/L、12 mM/L、15 mM/L 的 ALA, 孵育 4 小时, 光照 1 小时。按照荧光探针的使用方法装载活性氧检测探针 DCFH-DA, 用荧光分光光度计测量 DCFH-DA 的荧光强度。不同 ALA 浓度下, HL60 细胞的存活率如表 1 所示, DCFH-DA 荧光强度的变化如图 3 所示。

由表 1 和图 3 得到: ALA 浓度小于 10 mM/L, 细胞存活率随 ALA 的浓度增加而降低; ALA 浓度大于 10 mM/L, 细胞存活率随 ALA 浓度的增加没有显著变化, 说明再增大 ALA 浓度对细胞灭活意义不大。综上所述, 当 ALA 浓度为 10 mM/L 时, 细胞存活率最低, 根据 PDT 效率 = $(1 - \text{Livability}) \times 100\%$, PDT 效率为 93.2%, 灭活效果最佳。

Table 1. Survivability of HL60 cells in the different ALA density
表 1. 不同 ALA 浓度下 HL60 细胞存活率

| ALA density | OD Value | | Mean Value | | Mean Livability |
|------------------------------|----------|-------|------------|---------------|-----------------|
| A (Cells + culture solution) | 0.787 | 0.797 | 0.800 | 0.795 ± 0.007 | 1.000 |
| B (Cells + 5 mM ALA) | 0.463 | 0.502 | 0.421 | 0.462 ± 0.041 | 0.581 |
| C (Cells + 8 mM ALA) | 0.194 | 0.195 | 0.188 | 0.192 ± 0.004 | 0.116 |
| D (Cells + 10 mM ALA) | 0.052 | 0.054 | 0.055 | 0.054 ± 0.002 | 0.068 |
| E (Cells + 12 mM ALA) | 0.055 | 0.057 | 0.060 | 0.057 ± 0.003 | 0.072 |
| F (Cells + 15 mM ALA) | 0.056 | 0.053 | 0.058 | 0.056 ± 0.003 | 0.070 |

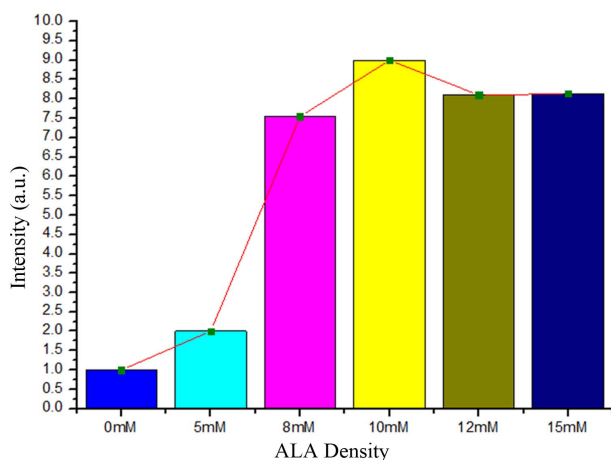


Figure 3. Changes in fluorescence intensity variation of DCFH-DA in the different ALA density
图 3. 不同 ALA 浓度下 DCFH-DA 荧光强度

3.1.2. 不同 ALA 孵育时间下活性氧的检测

采用 24 孔培养板, 用其中的 24 个孔作试验孔, 分成八组, 每孔注入 500 μ l HL60(接种浓度为 1×10^6 /ml) 细胞, 然后按照 1:1 的比例各孔放入 10 mM/L 的 ALA, 分别孵育 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、4.5 h、5 h、7 h, 光照 1 小时。装载探针, 测量 DCFH-DA 荧光强度, 细胞存活率数据如表 2, 得到的数据如图 4。

由表 2 和图 4 可得, 当孵育时间小于 4h, 细胞存活率随孵育时间的增加而降低, 也就是说 PDT 效率随着时间的增加而增大; DCFH-DA 的荧光强度也随着孵育时间的增加而增强, 并在 4 h 达到最大值。当孵育时间大于 4 h, 细胞 PDT 效率和荧光强度随孵育时间的增加反而不断降低。这说明孵育 4 h 时细胞对 ALA 的

Table 2. Survivability of HL60 cells in the different ALA incubation time
表 2. 不同 ALA 孵育时间下 HL60 细胞存活率

| ALA incubation time(h) | OD Value | | Mean Value | | Mean Livability |
|------------------------|----------|-------|------------|---------------|-----------------|
| A (Cells + 0 h) | 0.787 | 0.797 | 0.800 | 0.795 ± 0.007 | 1.000 |
| B (Cells + 1 h) | 0.554 | 0.565 | 0.602 | 0.574 ± 0.025 | 0.722 |
| C (Cells + 2 h) | 0.452 | 0.422 | 0.441 | 0.438 ± 0.015 | 0.551 |
| D (Cells + 3 h) | 0.271 | 0.265 | 0.243 | 0.260 ± 0.015 | 0.327 |
| E (Cells + 4 h) | 0.052 | 0.054 | 0.055 | 0.054 ± 0.002 | 0.068 |
| F (Cells + 4.5 h) | 0.053 | 0.057 | 0.059 | 0.056 ± 0.003 | 0.070 |
| G (Cells + 5 h) | 0.077 | 0.085 | 0.079 | 0.080 ± 0.004 | 0.101 |
| H (Cells + 7 h) | 0.533 | 0.541 | 0.572 | 0.549 ± 0.021 | 0.690 |

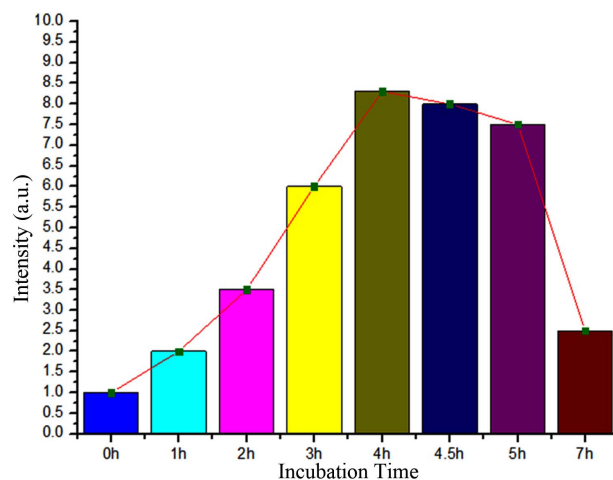


Figure 4. Changes in fluorescence intensity variation of DCFH-DA in the different ALA incubation time
图 4. 不同 ALA 孵育时间下 DCFH-DA 荧光强度

吸收最大, 之后细胞自身的代谢作用会不断耗掉一部分 ALA。综上可得, 当孵育时间为 4 h 时, 细胞存活率最低, DCFH-DA 的荧光强度最强(产生活性氧数量最多), 此时的 PDT 效率为 93.2%, 灭活效果最佳。

3.1.3. 不同光剂量下细胞活性氧的检测试验

采用 24 孔培养板, 用其中的 21 个孔作试验孔, 分成七组, 每孔注入 500 μ l HL60(接种浓度为 1×10^6 /L) 细胞, 然后按照 1:1 的比例各孔放入 10 mM/L 的 ALA, 孵育 4 小时, 分别光照 0 min、10 min、20 min、30 min、

40 min、50 min、60 min、70 min。装载探针，测量 DCFH-DA 荧光强度，得到的数据如下图所示。

由图 5 和图 6 可得：辐照时间低于 60 min，DCFH-DA 荧光强度随辐照时间的增加而增强，即细胞 PDT 效率随辐照时间的增加而增大；辐照时间高于 60 min 荧光强度随辐照时间的增加反而降低。综上可得，辐照时间 60 min 时，细胞存活率最低(PDT 效率最高)，灭活效果最佳。

3.2. 单态氧检测分析

从图 7 看出 DCFH-DA 的荧光强度跟光照时间是线性关系。在 ALA 浓度为 10 mM/ml，孵育时间为 4 h 时，细胞中生成的光敏剂 PPIX 的量最高，可认为此时细胞中的光敏剂是充足的，此时随着光照时间的增多，产生的活性氧物质逐渐增多，活性氧物质氧化 DCFH-DA 使之产生具有荧光的 DCF 也逐渐增多，而 DCF 的荧光强度反映的是活性氧物质的量，因此荧光强度跟活性氧物质成正相关关系。同时，结合以上试验可知，活性氧的荧光强度的变化基本表征了细胞 PDT 效率的变化。

4. 结论

本文通过荧光探针技术，通过获得的荧光光谱研究了基于 ALA-PDT 的 HL60 细胞中活性氧产生的情况，PDT 实验中活性氧产生的数量跟 ALA 浓度、孵育时间以及光照时间有关，它们是影响产生活性氧物的

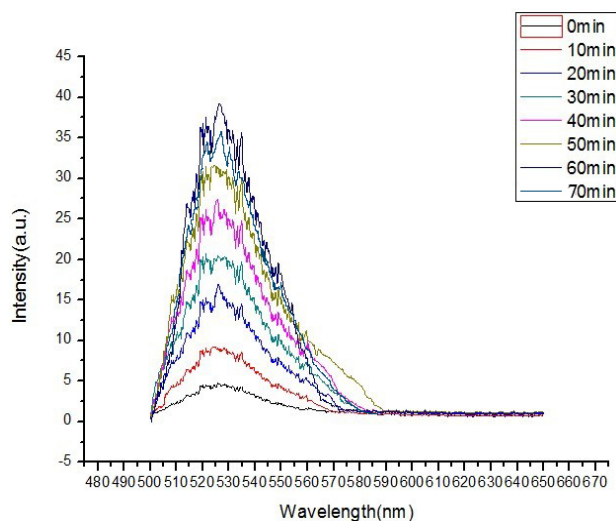


Figure 5. Fluorescence intensity variation of DCFH-DA in the different radiation time
图 5. 不同辐照时间下 DCFH-DA 荧光强度的变化

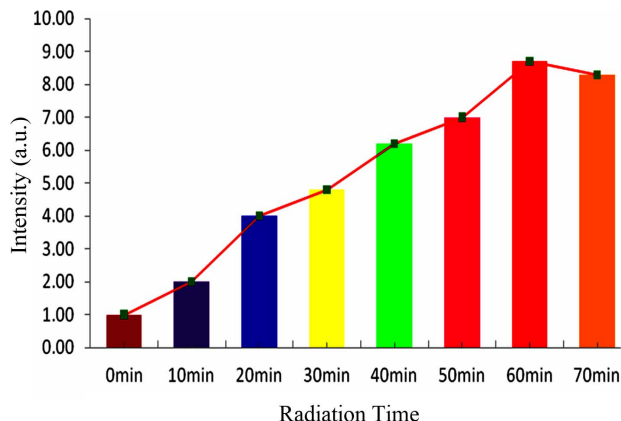


Figure 6. Changes in fluorescence intensity variation of DCFH-DA in the different radiation time
图 6. 不同辐照时间下 DCFH-DA 荧光强度

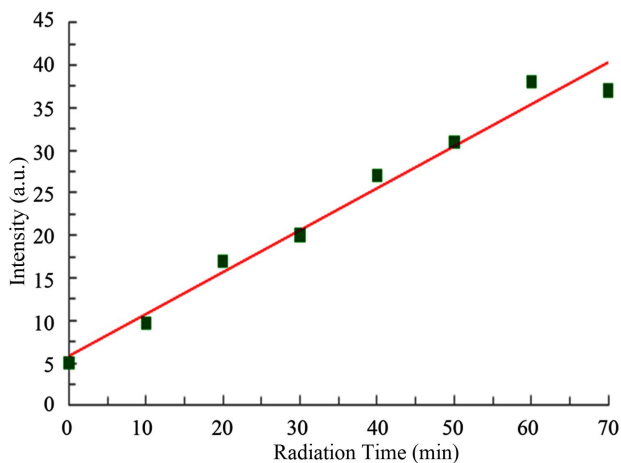


Figure 7. Fluorescence intensity fitting curve of DCFH-DA in the different radiation time
图 7. 不同辐照时间下 DCFH-DA 荧光强度的曲线拟合

量的主要因素。ALA 浓度为 10 mM/L、孵育时间为 4 h、光照 60 min 时，光动力反应中产生的活性氧最多，HL60 细胞的灭活效果最佳，此时的 PDT 效率达 93.2%。证实了光动力反应中的活性氧跟 HL60 细胞的灭活率有必然的关系，活性氧的荧光强度的变化基本表征了细胞 PDT 效率的变化，因此，能够使用检测光动力反应中活性氧的量来判断 HL60 细胞的灭活率，为 HL60 细胞的 PDT 的灭活效率的间接检测提供了一种简便易行的“隐形”方法。

5. 致谢

感谢国家自然科学基金项目(61072029)；广东省自然科学基金项目(10151063101000025)；广州市科技计划项目(2010Y1-C111)对本论文研究工作的支持，感

谢熊建文教授对本论文研究工作的悉心指导, 感谢郑泽麟、黄康强两位师兄对本论文成文后的修改提供的帮助。

参考文献 (References)

- [1] 吴继明, 熊建文, 肖化. 用于肿瘤治疗的光动力学疗法[J]. 激光杂志, 2003, 24(1): 70-74.
- [2] B. Z. Zhao, Y. Y. He. Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2010, 10(11): 1797-1809.
- [3] 熊建文, 肖化, 陈丽等. 基于 ALA-PDT 体外灭活 HL60 细胞的实验研究[J]. 光电子激光, 2004, 15(9): 1180-1183.
- [4] 吴继明, 熊建文, 肖化等. 普通白光光源应用于 ALA-PDT 的实验研究[J]. 激光杂志, 2004, 5(5): 231-234.
- [5] J. H. Park, Y. H. Moon, D. J. Kim, et al. Photodynamic therapy with hexenyl ester of 5-aminolevulinic acid induces necrotic cell death in salivary gland adenocarcinoma cells. *Oncology Reports*, 2010, 24(1): 177-181.
- [6] C. Kim, C. W. Chung, K. H. Choi, et al. Effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy via reactive oxygen species in human cholangiocarcinoma cells. *International Journal of Nanomedicine*, 2011, 6: 1357-1363.
<http://www.dovepress.com/effect-of-5-aminolevulinic-acid-base-d-photodynamic-therapy-via-reactiv-a7775>
- [7] V. Nadeau, M. O. Dwyer, K. Hamdan, et al. *In vivo* measurement of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX photobleaching: A comparison of red and blue light of various intensities. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2004, 20: 170-174.
- [8] 熊建文, 肖化, 张镇西. MTT 法和 CCK-8 法检测细胞活性之测试条件比较[J]. 激光生物学报, 2007, 16(5): 559-562.
- [9] R. Traystmn, J. Kirsch, R. Koehler. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *Applied Physiology*, 1991, 71(4): 1185-1195.
- [10] 邢达, 谭石慈等. 植物体应激反应中生物光子发射的实验观测[J]. 科学通报, 1999, 44 (21): 2299-2302.
- [11] V. Verma, Z. Ning, A. K. Cho, et al. Redox activity of urban quasi-ultrafine particles from primary and secondary sources. *Atmospheric Environment*, 2009, 43(40): 6360-6368.
- [12] D. Sutoa, Y. Ikeda, K. Stato, et al. Nactivation of cysteine and serine proteases by singlet oxygen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 461(2): 151-158.
- [13] R. Bonnett, G. Martinez. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 2001, 57(47): 9513-9547.
- [14] C. L. Yu, S. Chen and M. Zhang. Spectroscopic studies and photodynamic actions of hypocrellin B in liposomes. *Photochemistry and Photobiology*, 2001, 73(4): 482-488.
- [15] W. Zhong, J. P. Celli, I. Rizvi, et al. *In vivo* high-resolution fluorescence microendoscopy for ovarian cancer detection and treatment monitoring. *British Journal of Cancer*, 2009, 101(12): 2015-2022.
- [16] M. Price, J. J. Reiners, A. M. Santiago, et al. Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 2009, 85(5): 1177-1181.
- [17] B. Diez, R. C. Russo, M. J. Teijo, et al. ROS production by endogenously generated protoporphyrin IX in murine leukemia cells. *Cellular and Molecular Biology*, 2009, 55(2): 15-19.