

光动力疗法对血管内皮细胞和视网膜色素上皮细胞的影响

金陈进¹, 周少博¹, 胡卫群², 葛 坚¹, 江儒章¹, 陈凌燕¹

(1. 中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060; 2. 湖北孝感市中心医院眼科, 湖北 孝感 432100)

摘要:【目的】研究光动力疗法(PDT)在体外对视网膜色素上皮细胞和血管内皮细胞的影响。【方法】将体外培养的视网膜色素上皮(RPE)细胞和血管内皮细胞与 PDT 治疗年龄相关性黄斑变性时血药浓度(1.0 μg/mL)相当的光敏剂 verteporfin 共同孵育,根据孵育时间的不同,每种细胞分成 7 组,即 0 min 组、5 min 组、15 min 组、30 min 组、60 min 组、120 min 组和对照组,孵育至上述时间后,分别用光敏剂最大吸收波长的光照(689 nm,功率密度为 600 mW/cm²的二极管激光),能量密度为 2.4 J/cm²,用 MTT 法检测 24 h 后各处理组细胞的存活率。所有实验数据均以均数±标准差的形式表述,数值为 3 次独立重复实验的平均值,资料统计采用方差分析和 *t* 检验。【结果】PDT 后 24 h,RPE 细胞在 0 min 组、5 min 组、15 min 组、30 min 组、60 min 组和 120 min 组的细胞平均存活率分别为:0.94±0.07、0.68±0.13、0.68±0.11、0.65±0.12、0.49±0.11 和 0.21±0.11,细胞的存活率随与光敏剂孵育时间的延长而下降,经单因素方差分析,不同时间组的细胞存活率有显著性差异($P=0.000$),SNK-*q* 检验,5 min 组、15 min 组、30 min 组、60 min 组、120 min 组与 0 min 组比较都有统计学差异;血管内皮细胞在上述各时间组的平均存活率分别为:1.02±0.05、0.78±0.08、0.71±0.11、0.69±0.08、0.62±0.09 和 0.23±0.11,细胞的存活率随孵育时间的延长而下降,经单因素方差分析,不同时间组的细胞存活率有显著性差异($P=0.000$),SNK-*q* 检验,5 min、15 min、30 min、60 min、120 min 组与 0 min 组比较都有统计学差异;PDT 后两种细胞在相同时间组的细胞存活率经 *t* 检验均无统计学差异(所有 $P>0.05$)。【结论】PDT 在体外对 RPE 细胞和血管内皮细胞均有快速地杀伤作用,两种细胞对 PDT 有相似的敏感性。提示临床上与脉络膜新生血管密切相关的 RPE 细胞可能受到 PDT 的损害,提出早期脉络膜新生血管进行 PDT 治疗可能减少对邻近的 RPE 细胞或神经细胞的损害。

关键词:光动力疗法;色素上皮;血管内皮;细胞活力

中图分类号:R774.5

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2005)02-0207-04

Effect of Photodynamic Therapy on Vascular Endothelial Cells and Retinal Pigment Epithelial Cells

JIN Chen-jin¹, ZHOU Shao-bo¹, HU Wei-qun², GE Jian¹, JIANG Ru-zhang¹, CHEN Ling-yan¹

(1. Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. Department of Ophthalmology, Xiaogan Central Hospital of Hubei Province, Xiaogan, 432100, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effect of photodynamic therapy (PDT) on retinal pigment epithelial (RPE) cells and vascular endothelial cells in vitro.【Methods】Cultured retinal pigment epithelial cells and vascular endothelial cells were incubated with verteporfin at the concentration (1.0 μg/ml) that was equivalent to the initial plasma level of verteporfin in clinic therapy. According to the incubated time with verteporfin, each kind of the cells was divided into 7 groups, 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, and control groups. Cells were illuminated with the light of 689nm, the maximum wavelength of absorption of verteporfin. After incubating above time, the cell viability was assessed with 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltertrazoliumbromide (MTT) 24 h after PDT. The values were expressed in the figures as mean±standard deviation of the mean and they were the average of three independent experiments run in triplicate, the data were analyzed with analysis of variance

收稿日期:2004-06-28

基金项目:广东省科技攻关计划项目(99M04702G);卫生部科技专项基金项目(WKZ-2001-1-01)

作者简介:金陈进(1962-),男,湖北武汉人,博士,副教授. E-mail:zoclejjin@yahoo.com

(ANOVA) and student's *t* test. 【Results】 The viability of RPE cells in the groups of 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, and 120 min were 0.94 ± 0.07 , 0.68 ± 0.13 , 0.68 ± 0.11 , 0.65 ± 0.12 , 0.49 ± 0.11 , and 0.21 ± 0.11 , respectively. The viability of the vascular endothelial cells in the corresponding groups were 1.02 ± 0.05 , 0.78 ± 0.08 , 0.71 ± 0.11 , 0.69 ± 0.08 , 0.62 ± 0.09 , and 0.23 ± 0.11 , respectively. For both kinds of cell, there were significant differences in the cell viability among the different time groups using one-way-ANOVA, $P = 0.000$; The cell viability was increased with the increase of incubated time with verteporfin in both kinds of cell; Differences in cell viability between 0 min group and the other groups were statistically significant using SNK-*q* test. However, there was no significant difference between the same time groups of the two kinds of cell in the cell viability using *t* test. 【Conclusions】 PDT has a quick killing effect on both vascular endothelial cells and RPE cells; they have equal sensitivity to PDT in vitro. This study indicates that the RPE cells which are adjacent in morphology to choroidal neovascularization (CNV) may be injured by PDT clinically and early treatment for CNV may decrease the damage to adjacent RPE and photoreceptor.

Key words: photodynamic therapy; retinal pigment epithelium; vascular endothelium; cell viability

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(2): 207-210]

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)可以有效降低中心凹下新生血管性年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)中等和严重视力下降的危险^[1],其主要优点在于它选择性地破坏脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)而 Bruch 膜和视网膜神经组织几乎不受伤害^[2]。然而术后 CNV 再通和复发的比率较高,有资料表明,PDT 使脉络膜新生血管关闭的同时有时伴随视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)的损害^[3-5]。AMD 患者术后 CNV 较高的复发率可能与色素上皮的损害有一定关系。在相同的条件下,PDT 对血管内皮细胞和 RPE 细胞的影响如何尚不清楚。本研究通过在体外对色素上皮细胞和血管内皮细胞行 PDT,比较两种细胞对 PDT 的敏感性和反应异同,以揭示 RPE 并发症损害及 CNV 复发的可能原因。

1 材料和方法

1.1 材料

光敏剂:Verteporfin 商品名 Visudyne,由诺华公司生产。激光器:Opal 689 nm 二极管激光器,由美国 lumines 公司生产。细胞:RPE 细胞由美国 Dr Richard C. Hunt (University of South Carolina School of Medicine)友情提供的 D-407 细胞系,人脐静脉内皮细胞由中山大学实验动物中心提供。试剂:DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)、胎牛血清(杭州产)、胰蛋白酶(美国 Sigma 公司)、MTT(美国 Sigma 公司)、二甲基亚砷(广州化学试剂厂)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人视网膜色素上皮细胞系 D-407 和人脐静脉内皮细胞系 ECV304 均为贴壁生长细胞,在 DMEM 培养基中生长,其中含 100 mL/L 的胎牛血清和 100 U/mL 青霉素和链霉素,置入含体积分数 5%二氧化碳和温度为 37 °C 的二氧化碳培养箱中,细胞融合后,用 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化传代。取第 3~5 代细胞以 5×10^4 /mL 的密度均匀接种在 96 孔板中,每孔含培养液 0.2 mL,置入培养箱中继续培养 40 h。

1.2.2 分组与加样 按照加入药物(光敏剂)后孵育时间的不同,分成 7 组,即:0、5、15、30、60、120 min 组以及对照组。每组 4 孔,加入 verteporfin 使其终浓度为 1 μg/mL,相当于临床治疗水平的药效浓度。

1.2.3 光动力治疗 以波长为 689 nm 的记时二极管激光器照射,功率密度为 600 mW/cm²,能量为 2.4 J/cm²。照射完毕后,更换新的培养液,继续培养 24 h。

1.2.4 PDT 后 24 h 细胞活力检测(MTT 法) 按上述方法处理后,每孔加入 MTT(5 mg/mL)液使其终浓度为 0.5 mg/mL,37°C 再孵育 4 h,加入二甲基亚砷(DMSO)150 μL 每孔,置于微量震荡器上震荡 10 min,使结晶物充分溶解,选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值。细胞存活率计算方法:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组吸光度值}}{\text{对照组吸光度值}} \times 100\%$$

1.2.5 重复实验 进行 3 次独立实验。

1.2.6 细胞学检查 按上述方法行 PDT,24 h 后

细胞 HE 染色镜检。

1.3 统计处理

数据统一以均数±标准差表示,为3次独立重复实验的平均值,数据统计采用方差分析和 *t* 检验。统计软件采用 SAS6.12 版软件包。

2 结果

2.1 两种细胞的存活率比较

血管内皮细胞和视网膜色素上皮细胞在 PDT 后 24 h 的存活率如表 1。应用单因素方差分析,不同时间组细胞存活率存在显著差异,随着孵育时间的延长,细胞存活率呈下降的趋势;SNK-*q* 检验,不同时间组别两两比较,5~60 min 组间细胞存活率无统计学差异,0 min 组和 120 min 组均与其余各组间有显著差异。两种细胞在相同时间组细胞存活率经 *t* 检验均无统计学差异,*P* 值均大于 0.05,表明血管内皮细胞和视网膜色素上皮细胞

对 PDT 的敏感性无显著差异。

表 1 各时间两种细胞存活率

PDT groups	VE cells	RPE cells	<i>P</i> values
0 min	1.02±0.05	0.94±0.07	0.14
5 min	0.78±0.08	0.68±0.13	0.29
15 min	0.71±0.11	0.68±0.11	0.77
30 min	0.69±0.08	0.65±0.12	0.67
60 min	0.62±0.09	0.49±0.11	0.20
120 min	0.23±0.11	0.21±0.11	0.85

PDT: photodynamic therapy; VE: Vascular endothelial; RPE: retinal pigment epithelial

2.2 细胞的形态学改变

RPE 细胞和血管内皮细胞 PDT 后 24 h 都随时间组的不同分别出现凋亡样和坏死状的形态改变,5 min 至 30 min 组细胞呈凋亡样改变,60 min 至 120 min 出现坏死状改变,与光敏剂作用时间的增加,细胞损害逐渐加重(图 1)。

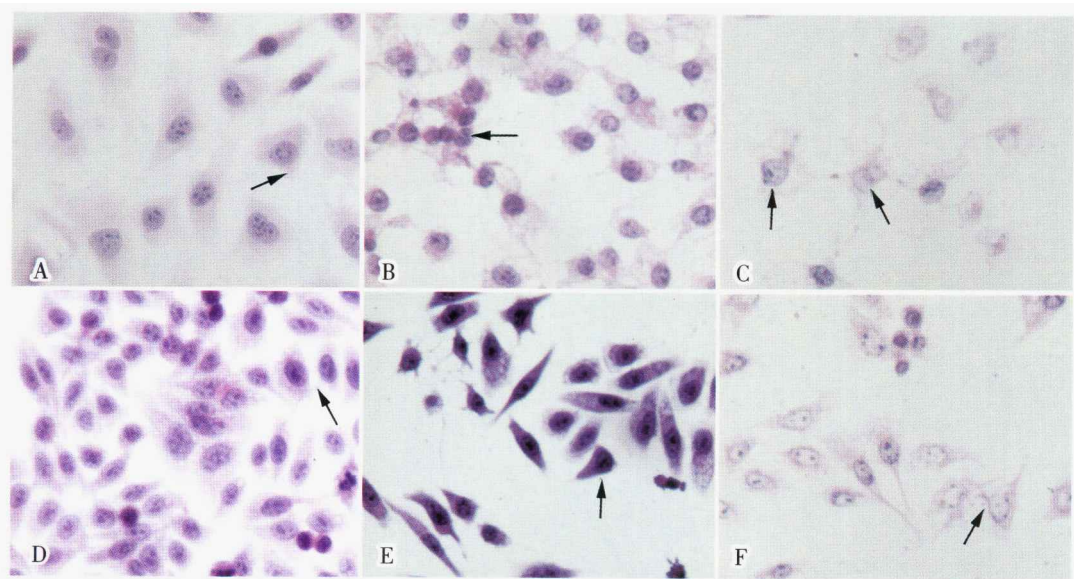


图 1 PDT 后血管内皮细胞和 RPE 细胞形态改变

Fig.1 The morphological change of vascular endothelial cells and RPE cells after PDT

A, B, C: represent vascular endothelial cells, HE, ×400; D, E, F: represent RPE cells, HE, × 400

The cells in 0 min group (A, D) display a normal polygonal or short spindle-shaped profile, and the nucleus is even (arrows); A great deal of condense cells with the deep dyed nucleus (arrows) were observed in 5 min group (B, E), and in the 120 min group(C, F), the cells and the nucleus became swollen and even dissolved (arrows).

RPE: retinal pigment epithelial; PDT: photodynamic therapy

3 讨论

PDT 的主要机理是光化学反应中产生的活性氧和自由基破坏血管内皮以及继发的血流淤滞和

血管阻塞。活性氧的形成,特别是单态氧对细胞的毒性作用,被认为是其主要作用机制;光动力疗法的选择性是通过光敏剂选择性地聚集于靶组织和将光照限制在靶区域这种双重选择来实现的^[6,7]。对继发于 AMD 的 CNV 来说,光照区域的选择容

易实现,光敏剂的选择性聚集则取决于靶组织细胞的优先摄取。有研究表明^[9],Verteporfin 进入细胞的途径主要是通过细胞膜表面的低密度脂蛋白(low density lipoprotein,LDL)受体,而血管内皮细胞和 RPE 细胞都含有丰富的 LDL 受体^[9],因此可以迅速地摄入光敏剂。本实验中,RPE 细胞和血管内皮细胞与光敏剂作用 5 min 即产生较强的反应,说明相同条件下 PDT 对两种细胞均有作用。

本研究还显示,两种细胞在 0 min 组,细胞存活率接近 1,表明单纯的低能量光照射对细胞的活力几乎没有影响,而其余各组细胞的存活率与 0 min 组相比均有显著差异,表明光敏剂被光激活后产生了强大的光动力效应。两种细胞的存活率均与光敏剂共同孵育的时间有关,时间越长,存活率越低,表明光动力效应有一定的时间依赖性,这种变化的根本原因在于细胞对光敏剂的吸收的变化,因此,我们可以通过选择光照时机,来达到治疗的目的。

本实验中,PDT 后 24 h,两种细胞均发生了明显的形态学改变,在 5-30 min 组,细胞呈典型的凋亡样改变,而 60-120 min 组,则成坏死样改变为主,表明损害的程度是随光敏剂作用的时间延长而加重的,不难想象,随着时间的延长,进入细胞内光敏剂含量增加,PDT 后,产生更多的活性氧自由基,细胞的损害必然加重。PDT 诱导眼组织细胞损伤的报道较多,2001 年,金陈进等^[10]报道 PDT 可致视网膜母细胞移植瘤显著地坏死,最近,陈慧怡等发现 PDT 可诱导结膜成纤维细胞的凋亡^[11]。由于组织坏死后往往伴随炎症反应,在治疗 CNV 时,严重的炎症反应对视力恢复不利,因此本研究亦提示,临床上应注意药物的剂量和光照时机,避免严重的坏死发生。

本研究按目前临床治疗协议所测得的血药浓度水平给药^[12],在不同的时间行 PDT,以模拟体内治疗 CNV 的 PDT 方法,选择指数生长期细胞,与体内快速增殖的新生血管内皮细胞有相似的特性,使实验更接近体内情况。本研究结果表明,PDT 在体外对血管内皮细胞和视网膜色素上皮细胞都有较强的杀伤作用,两种细胞的敏感性相似,提示临床上与 CNV 密切相关联的 RPE 细胞可能受到 PDT 的损害,因为这些 RPE 细胞与 CNV 内皮细胞处于相近的微环境,摄取光敏剂的条件也相似。基于上述结果,我们提出 PDT 应强调早期治疗对那些处于初期尚未长入 RPE 的 CNV 应该

是最佳适应症,这样可以避免对邻近 RPE 细胞或神经细胞的损伤。

参考文献:

- [1] Treatment of Age-related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy (TAP) Study Group. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin. Two-year results of 2 randomized clinical trials TAP report 2 [J]. Arch Ophthalmol, 2001, 119(2): 198-207.
- [2] Schmidt-Erfurth U, Hasan T, Gragoudas E, et al. Vascular targeting in photodynamic occlusion of subretinal vessels [J]. Ophthalmology, 1994, 101(12): 1953-61.
- [3] Yao XY, Marmor MF. Induction of serous retinal detachment in rabbit eyes by pigment epithelial and choriocapillary injury [J]. Arch Ophthalmol, 1992, 110(4): 541-6.
- [4] Reinke MH, Canakis C, Husain D, et al. Verteporfin photodynamic therapy retreatment of normal retina and choroids in the cynomolgus monkey [J]. Ophthalmology, 1999, 106(10): 1915-23.
- [5] Schnurrbusch UE, Welt K, Horn L, et al. Histological findings of surgically excised choroidal neovascular membranes after photodynamic therapy [J]. Br J Ophthalmol, 2001, 85(9): 1086-91.
- [6] Schmidt-Erfurth U, Hasan T. Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration [J]. Surv Ophthalmol, 2000, 45(3): 195-214.
- [7] 张恩黑,夏云飞,孙振权,等.血卟啉衍生物对鼻咽癌放射治疗效应观察[J].中山医科大学学报,1996,17(1):32-6.
- [8] Jori G, Reddi E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers [J]. Int J Biochem, 1993, 25(10): 1369-75.
- [9] Hayes KC, Lindsey S, Stephan ZF, et al. Lipoprotein receptors and endothelial cells [J]. Semin Thromb Hemost, 1988, 14(2): 206-9.
- [10] 金陈进,吴中耀,李永平,等.光动力疗法对实验性视网膜母细胞瘤移植瘤超微结构的影响[J].眼视光学杂志,2001,3(2):95-8.
- [11] 陈慧怡,葛坚,郭彦,等.光动力疗法抑制体外培养的人球筋膜囊成纤维细胞增殖的研究[J].中华眼科杂志,2003,39(3):160-2.
- [12] Houle JM, Strong A. Clinical pharmacokinetics of Verteporfin[J]. J Clin Pharmacol, 2002, 42(5): 547-57.

(编辑 刘清海)