**分类号：R446.11**  **学校代码： 10392**

**学科专业代码：100208 学** 号: **2010030262**



**硕士学位论文**



**ALA 介导的光动力疗法诱导皮肤癌 A375 细胞与**

**A431 细胞凋亡机制的研究**

**Research on Mechanism of Apoptosis Induced by**

**5-** **Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy on A375 cells and A431 cells**

|  |  |
| --- | --- |
| **学** 位 类 **型：** | **医学硕士** |
| **所** 在 学 **院：** | **协和临床医学院** |
| **申 请 人 姓 名 ：** | **蔡晶晶** |
| **学科 、 专业：** | **临床检验诊断学** |
| **导** 师 **：** | **黄慧芳** **教授** |
| **研究起止日期：** | **2014 年 3 月至 2014 年 12 月** |
| **答辩委员会主席：** | **唐南洪** 教授 |
| **答** 辩 日 **期：** | **2015 年 05 月 30 日** |

**二○一五年五月**



目 录

[英文缩略词](#_Toc686987239) 3

[中文摘要](#_Toc686987240) 5

[英文摘要](#_Toc686987241) 5

**[Abstract](#_Toc686987242)** 5

[前](#_Toc686987243)[言](#_Toc686987243) 5

[材料与方法](#_Toc686987244) 6

**[1](#_Toc686987245)** [实验材料](#_Toc686987245) 6

**[1.1](#_Toc686987246)** [细胞系](#_Toc686987246) 6

**[1.2](#_Toc686987247)** [主要试剂](#_Toc686987247) 6

**[1.3](#_Toc686987248)** [主要仪器](#_Toc686987248) 8

**[1.4](#_Toc686987249)** [主要溶液的配制](#_Toc686987249) 8

[2.5 gSDS加25ml的蒸馏水溶解，4℃保存。](#_Toc686987250) 9

**[2](#_Toc686987251)** [实验方法](#_Toc686987251) 9

**[2.1](#_Toc686987252)** [细胞培养](#_Toc686987252) 9

**[2.2](#_Toc686987253)****[MTT](#_Toc686987253)**[比色法检测](#_Toc686987253)**[ALA-PDT](#_Toc686987253)**[对](#_Toc686987253)**[A375](#_Toc686987253)**[细胞与](#_Toc686987253)**[A431](#_Toc686987253)**[细胞的杀伤作用](#_Toc686987253) 9

**[2.3](#_Toc686987254)****[TUNEL](#_Toc686987254)**[染色法检测细胞凋亡率](#_Toc686987254) 10

**[2.4](#_Toc686987255)****[Western blot](#_Toc686987255)**[方法检测凋亡相关蛋白](#_Toc686987255) 10

**[2.5](#_Toc686987256)** [免疫组化](#_Toc686987256)**[-SABC](#_Toc686987256)**[法检测](#_Toc686987256)**[Cyt-c](#_Toc686987256)**[的细胞定位](#_Toc686987256) 11

[3 次。](#_Toc686987257) 11

[3 统计学分析](#_Toc686987258) 11

**[4](#_Toc686987259)** [免疫组化](#_Toc686987259)**[-SABC](#_Toc686987259)**[法检测](#_Toc686987259)**[Cyt-c](#_Toc686987259)**[蛋白的表达](#_Toc686987259) 15

[讨论](#_Toc686987260) 16

[参考文献](#_Toc686987261) 16

[综述](#_Toc686987262) 18

# 英文缩略词

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文注释** |
| PDT | Photodynamic therapy | 光动力疗法 |
| PS | photosensitizer | 光敏剂 |
| ALA | 5-aminolevulinic acid | 5-α 氨基酮戊酸 |
| A375 | Human melanoma cells | 人黑色素瘤细胞 |
| A431 | Human epidermoid carcinoma cells | 人鳞状细胞癌细胞 |
| ROS | Reactive oxygen species | 活性氧 |
| MTT | Methyl thiazolyl tetrazolium | 噻唑蓝 |
| PBS | Phosphate buffered solution | 磷酸盐缓冲液 |
| FBS | Fetal bovine serum | 胎牛血清 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲基亚砜 |
| s | second | 秒 |
| h | hour | 小时 |
| d | day | 天 |
| rpm | Revolution per minute | 转/分 |
| Tris | Tris(Hydroxymethyl)aminomethane | 三羟甲基氨基甲烷 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基硫酸钠 |
| TEMED | tetramethylethylenediamine | 四甲基乙二胺 |
| TBS | Tris-buffered saline | Tris-Hcl 缓冲盐溶液 |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis | 聚丙基酰胺凝胶电泳 |
| TUNEL | Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling | 脱氧核糖核苷酸末端转移酶  （TdT）介导的缺口末端标记法 |
| SABC | Strept avidin-biotin complex | 链霉亲和素-生物素复合物 |
| BSA | Albumin from bovine serum | 牛血清白蛋白 |

**ALA介导光动力疗法诱导皮肤癌A375细胞与A431**

**细胞凋亡机制的研究**

**硕士研究生蔡晶晶**

**导** 师**黄慧芳教授**

# 中文摘要

**目的：**研究5-α氨基酮戊酸（ALA）介导的光动力疗法（ALA-PDT）对皮肤癌A375细胞与A431细胞的杀伤作用及其诱导其凋亡机制，为ALA-PDT应用于临床提供治疗参数和理论依据。

**方法：**以皮肤黑色素瘤A375细胞与鳞状细胞癌A431细胞为研究对象，1. 研究ALA-PDT对皮肤癌细胞的杀伤作用，A375细胞与A431细胞与不同的

ALA浓度孵育，在PDT作用后不同的时间，用噻唑蓝法（MTT）法检测其增殖抑制率。2.研究ALA-PDT诱导A375细胞与A431细胞发生凋亡机制。首先用TUNEL染色法分析ALA-PDT作用后A375细胞与A431细胞的凋亡率；接着，用Western-blot方法检测ALA-PDT后两株细胞凋亡过程中，外源性凋亡途径相关蛋白Caspase8，线粒体凋亡途径相关蛋白Bcl-2, Bax与Caspase9以及Caspase3与PARP的表达情况；最后，用免疫组化法检测A375细胞与A431细胞在ALA-PDT作用前后细胞色素c（Cyt-c）在细胞内的分布情况，旨在从内源性与外源性途径揭示ALA-PDT诱发皮肤癌细胞凋亡机制。

**结果：**1。MTT比色法结果显示不同浓度的ALA-PDT组对A375细胞与A431细胞均有杀伤作用，并与ALA药物浓度和ALA-PDT作用后的时间密切相关，在0.4mmol/L ALA-PDT作用后4h，对A375细胞的增殖抑制作用达到最大程度；在0.6mmol/L ALA-PDT作用后8h，对A431细胞的增殖抑制作用达到最大程度，趋于平衡。2. TUNEL染色结果显示ALA-PDT作用后阳性反应在细胞核染色质浓缩区出现棕黄色沉淀反应，即细胞发生凋亡，且呈时间依赖性增加。A375细胞在ALA-PDT作用后0.5h，1h，2h，4h与6h的凋亡率分别是11.79%，44.84%，63.75%，75.33%与90%. A431细胞在ALA-PDT作用后1h，

2h，4h，6h与8h的凋亡率分别是10%，25%，55.5%，61.54%与70%.3. Western blot的检测结果显示ALA-PDT作用激活了A375细胞与A431细胞的外源性凋

亡途径和线粒体凋亡途径，启动了Bcl-2家族及Caspase家族参与凋亡过程。随着ALA-PDT作用后孵育时间的延长，抗凋亡蛋白Bcl-2下调，促凋亡蛋白

Bax上调；出现Caspase蛋白的级联反应及剪切。A375细胞在ALA-PDT作用后0.5h, 1h与2h出现Caspase3, 8与9剪切体且上调；但是在ALA-PDT作用后4h与6h上述剪切体下调。A431细胞在ALA-PDT作用后1h，2h与4h出现上述剪切体且上调；但是ALA-PDT作用后6h与8h上述剪切体下调；而且，ALA-PDT作用后，A375细胞与A431细胞出现PARP前体的下调和剪切体的上调，最终导致细胞凋亡。4. Cyt-c免疫组化结果显示ALA-PDT作用前，阳性反应在皮肤癌A375细胞与A431细胞胞质核周出现棕黑色沉淀；ALA-PDT作用后，棕黑色沉淀向远离核周的胞质区均匀铺展，即细胞色素C在ALA-PDT作用后，由富含线粒体的核周区释放至胞质，参与细胞的凋亡过程。

**结论：**ALA-PDT能明显抑制A375细胞与A431细胞的增殖，并诱导其发生凋亡。凋亡的发生与启动细胞外源性凋亡途径和细胞色素C相关的线粒体凋亡途径相关。

**关键词：** **5-α氨基酮戊酸； 光动力疗法； 皮肤癌； 凋亡**

# 英文摘要

**Research on Mechanism of Apoptosis Induced by**

**5-Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy on A375 cells and A431 cells**

**Postgraduate: Cai Jingjing Supervisor**: Prof. Huang **Huifang**

**Abstract**

**Objective:** To investigate the killing effect and mechanism of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on human melanoma A375 cells and human epidermoid carcinoma A431 cells.

**Methods:** Human melanoma A375 cells and human epidermoid carcinoma A431 cells were employed in present study. A375 cells and A431 cells were incubated in different concentration of ALA. The killing effects of ALA-PDT on A375 cells and A431 cells was detected by MTT colorimetric assay. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method was performed to detect the proportion of apoptosis cells. The protein expression level of Bcl-2, Bax, Caspase3, Caspase8 and Caspsase9 were determined by Western blot. Lastly, Cytochrome c (Cyt-c) subcellular localization was compared by immunohistochemistry between pre-ALA-PDT and post- ALA-PDT.

**Results:** The results of MTT colorimetric assay showed that ALA-PDT presented significant anti-proliferation effects on both A375 cells and A431 cells in a dose and time dependent manner. When incubated in 0.4mmol/L ALA and at 4h after ALA-PDT, the proliferation inhibition of A375 cells reached greatest degree. Meanwhile, when incubated in 0.6mmol/L ALA and at 8h after ALA-PDT, the proliferation inhibition of A431 cells reached greatest degree. A375 cells were more sensitive to PDT than A431 cells. The phenomena of apoptosis were observed in ALA-PDT-cells by TUNEL assay. The apoptosis rates of A375 cells increased to

11.79%, 44.84%, 63.75%, 75.33% and 90% respectively at 0.5h, 1h, 2h, 4h and 6h after ALA-PDT. The apoptosis rates of A431 cells increased to 10%, 25%, 55.5%, 61.54% and 70% respectively at 1h, 2h, 4h, 6h and 8h after ALA-PDT. Western blot discovered that apoptosis induced by ALA-PDT involved up-regulation of Bcl-2 protein and down-regulation of Bax protein obviously. It was observed that the protein expression of cleaved-Caspase3, 8, and 9 protein and cleaved-PARP increased at 0.5h, 1h and 2h after ALA-PDT in A375cells. It occurred in A431 cells at 1h, 2h and 4h after ALA-PDT. Immunohistochemical localization of Cytochrome c found that Cyt-c was released from mitochondrian into the cytosol in apoptosis cells.

**Conclusion:** ALA-PDT could significantly inhibit proliferation of both A375 cells and A431cells. And PDT could also induce apoptosis in the two cells. The apoptosis induced by ALA-PDT was related to the Caspase-dependent death-receptor pathways and Cytochrome C-dependent mitochondrial pathways.

**Keywords: 5-aminolevulinic acid; Photodynamic therapy; Apoptosis**

**ALA介导光动力疗法诱导皮肤癌A375细胞与A431**

**细胞凋亡机制的研究**

前 **言**

皮肤癌好发于颜面部，其中基底细胞癌和鳞状细胞癌最常见，黑色素瘤较少见，但后者恶性度高，转移侵袭性强，导致高死亡率[1]。临床上以外科手术治疗为主[2]，但手术常引起组织功能损伤，影响美观；同时，老年患者承受不了手术风险以及颜面肿瘤部位的特殊性[3]，使外科手术治疗皮肤癌存在局限性。皮肤癌，特别是黑色素瘤易对化疗药物产生耐药性，导致患者的高复发率和死亡率[4]。因此，基于传统治疗方法存在的缺点，有必要寻找一种高效、针对性强、毒副作用低及耐药性弱的杀伤皮肤癌细胞方案，是近年来国内外众多研究者的目标。5-α氨基酮戊酸介导的光动力疗法(ALA-PDT)是内源性光敏剂原卟啉（PpⅨ）的前体5-α氨基酮戊酸介导的光动力疗法，可选择性杀伤肿瘤细胞，已广泛应用于各种皮肤病及癌前病变中的治疗[5]。此外，对于棘手的存在争议的皮肤癌手术切除，ALA-PDT可作为替代治疗[6-7]；因为浅表皮肤容易暴露光源下，有利光的吸收和光化学作用[8]。

PDT 是在有氧条件下，光敏剂经过一定波长的光源激发产生的活性氧

（ROS）氧化靶细胞的不饱和脂肪，引起生物大分子的破坏和DNA的损伤，从而导致细胞死亡[9]。本课题采用的光敏剂是我国自行研发的5-α氨基酮戊酸

（ALA），ALA在线粒体内生成原卟啉Ⅸ（PpⅨ）。ALA可在人体内生成，经过生物合成人体必须的含铁血红素，PpⅨ是ALA的中间产物。当有外源性

ALA摄入时，由于肿瘤细胞含有较高的胆色素原脱氨酶活性[10]和较低的亚铁螯合酶活性[11-12]，导致产生过多的PpⅨ富集在肿瘤细胞内，在特定波长光照下，可选择性地杀伤肿瘤细胞。

ALA在角质层中的渗透能力、真皮中的扩散、代谢清除力、转化为PpⅨ的量，还有在细胞内的定位，使其在不同的细胞内发挥着不同的作用和机制。本研究以人黑色素瘤A375细胞和人鳞状细胞癌A431细胞为对象，从细胞和分子水平研究ALA-PDT对两种细胞的杀伤能力及其作用机制。PpⅨ作为内源性光敏剂，本身无毒性，只有在特定波长的光源作用下发生光化学反应才能产生具有杀伤作用的ROS. PDT对细胞产生的光毒性与光敏剂与细胞的孵育时

间以及光敏剂在细胞内的含量密切相关[13]。本课题前期已对两个细胞株内的

PpⅨ含量变化进行动态研究，检测到细胞与ALA共孵育4h时，PpⅨ已弥散分布于胞浆和胞膜上，说明ALA已经在皮肤癌细胞代谢合成光敏剂PpⅨ，由线粒体向胞浆内扩散，或者在胞质内其他的细胞器生物合成。因此，在后续的实验中，采取皮肤癌细胞与ALA共孵育4h后进行光照。基于此优化条件，我们将探讨ALA-PDT是否对A375细胞与A431细胞有杀伤效应及揭示其内在机制，为ALA-PDT应用于临床治疗皮肤黑色素瘤和皮肤鳞状细胞癌提供治疗参数和实验依据。

ALA在线粒体中通过亚铁血红素的生物合成途径转化为具有光敏作用的PpⅨ[14]；而且ALA-PDT通过线粒体产生的ROS的生物氧化作用杀伤效应细胞，因此我们推测ALA-PDT对A375细胞与A431细胞的作用与线粒体密切相关，甚至两者的共同作用加速了细胞的死亡。课题前期研究PpⅨ除了分布在富含线粒体的核周，在其他胞浆和胞膜上也检测到它的荧光信号，说明ALA-PDT除了通过线粒体相关途径，还可能涉及到其他信号通路。所以本研究首先检测ALA-PDT对A375细胞与A431细胞的增殖抑制能力；然后，通过TUNEL染色法检测其凋亡率；接着，用Western-blot蛋白免疫印迹法研究Bcl-2，Bax，Caspase3，8，9与PARP的变化；最后，采用免疫组化法观察Cyt-c的胞浆分布情况。

**ALA介导光动力疗法诱导皮肤癌A375细胞与A431**

**细胞凋亡机制的研究**

# 材料与方法

# **1** 实验材料

## **1.1** 细胞系

人黑色素瘤A375细胞株购自南京凯基生物发展有限公司；

人表皮鳞状细胞癌A431细胞株购自广州吉尼欧生物技术有限公司。

## **1.2** 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 光敏剂 5-ALA | 上海复旦张江股份有限公司 |
| 高糖培养基 DMEM | Cyclone 公司 |
| 0.25%胰蛋白酶（不含 EDTA） | Cyclone 公司 |
| FBS | Cyclone 公司 |
| MTT | 美国 Sigma 公司 |
| DMSO | 美国 Sigma 公司 |
| 96 孔板、6 孔板 | 丹麦 Nunc 公司 |
| PBS 粉 | 北京中杉金桥公司 |
| TUNEL 试剂盒 | 美国 Promega 公司 |
| 蛋白提取液 | 美国 PIERCE 公司 |
| 蛋白酶抑制剂 | 上海康城 |
| 蛋白定量试剂盒（BCA） | 北京普利莱公司 |
| 40%的丙烯酰胺 | 上海生物工程有限公司 |
| 脱脂奶粉 | 美国 Sigma 公司 |
| SDS | 美国 Sigma 公司 |
| TEMED | 上海生物化工有限公司 |
| APS | 美国 Amresco 公司 |
| 5×SDS 上样缓冲液 | 中国 Fermentas 公司 |
| 20%Tween | 上海康城有限公司 |
| 甲醇 | 上海振兴化工厂 |

|  |  |
| --- | --- |
| NC 膜 | 厦门鹭隆公司 |
| ECL 发光液 | 上海碧云天生物技术研究所 |
| 辣根过氧化物酶标记的抗鼠二抗 | 厦门鹭隆公司 |
| 辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗 | 厦门鹭隆公司 |
| 小鼠抗人 β-actin 单克隆抗体 | 北京中杉金桥公司 |
| 蛋白 Marker | 中国 Fermentas 公司 |
| Bcl-2 单克隆抗体 | Cell signaling technology 公司 |
| Bax 单克隆抗体 | Cell signaling technology 公司 |
| Caspase3、8、9 单克隆抗体 | Cell signaling technology 公司 |
| PARP 单克隆抗体 | Cell signaling technology 公司 |
| TritonX-100 | 上海康城 |
| Cyt-c 免疫组化试剂盒 | 武汉博士德生物有限公司 |

## **1.3** 主要仪器

|  |  |
| --- | --- |
| LED 光源 | 福建师范大学光子技术重点实验室自行设计 |
| 倒置显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| 超净台 | Airitech 公司 |
| 细胞培养箱 | Heal force 公司 |
| 移液枪一套 | Gilson 公司 |
| 水平式微孔板离心机 | Grant-Bio 公司 |
| 台式高速低温离心机 | Thermo 公司 |
| 电子天平 | Ohaus 公司 |
| 酶标仪 | BioTek 公司 |
| 电泳槽和电泳仪 | 北京六一仪器厂 |
| 转模装置 DYC40C | Bio-Rad 公司 |
| 水平式摇床（THZ-032） | 上海博彩公司 |
| 细胞刮勺 | 美国 BD 公司 |

## **1.4** 主要溶液的配制

**1.4.1无菌PBS缓冲液的配制**

每包加2L双蒸水溶解，高压灭菌备用。

**1.4.2 MTT的配制**

250mgMTT，加入0.01mol/L PH值7.2的PBS50ml，搅拌溶解，0.22µm

滤器过滤除菌，并分装避光保存，置-20℃冰箱备用。

**1.4.3 10%的SDS配制**

## 2.5 gSDS加25ml的蒸馏水溶解，4℃保存。

**1.4.4 10%的APS（过硫酸胺）配制**

0.02g加200µl的蒸馏水溶解，4℃保存。

**1.4.5 0.5M Tris-HCL（PH6.8）和1.5M Tris-HCL（PH8.8）的配制**

分别取Tris15.14g和45.43g，各加200ml双蒸水溶解，调节PH值分别至

6.8和8.8，然后用双蒸水定容至250ml，过滤，4℃保存。

**1.4.6 12%分离胶的配制**

双蒸水1.43ml，40%的丙烯酰胺1.02ml, 1.5M Tris-HCL(PH值8.8) 0.884ml, 10% SDS 34µl,10% APS 34µl, TEMED 1.36µl，加入TEMED后立即

混匀并灌胶。

**1.4.7 4%浓缩胶的配制**

双蒸水0.721ml，40%的丙烯酰胺0.128ml, 0.5M Tris-HCL(PH值6.8) 0.130ml, 10%SDS 10µl，10%APS10µl，TEMED1µl，加入TEMED后立即混匀并灌胶。

1.4.8 **5×电泳缓冲液的配制**（用时用双蒸水稀释1×）

Tris 7.55g，甘氨酸36g, SDS 2.5g，加400ml双蒸水溶解，调PH值至8.6，双蒸水定容至500ml。

**1.4.9即用转膜液的配制**

Tris 3.05g，甘氨酸14.4g，加双蒸水定容至800ml，使用前加甲醇200ml。

**1.4.10 10×TBS的配制**

Tris 24.2g，氯化钠80g，加900ml双蒸水溶解，浓盐酸调节PH值至7.6，用双蒸水定容至1L。

**1.4.11即用TBST的配制**

Tween-20 0.5ml加至500ml的1×TBS 。

**1.4.12封闭液的配制**

0.5g脱脂奶粉+10mlTBST摇匀溶解。

**1.4.13 TritonX-100（曲拉通）的配制**

用0.01mol/L PH值7.2的PBS配成20%的Triton-100，在37℃水浴箱充分溶解后至4℃冰箱保存。用时用0.01mol/L PH值7.2的PBS配成0.2%的Triton-100.

**1.4.14 4%多聚甲醛的配制**

4g多聚甲醛粉加入100mlPBS，37℃水浴箱充分溶解，4℃冰箱避光保存备用。

# **2** 实验方法

## **2.1** 细胞培养

A375细胞与A431细胞的培养条件为：含10%FBS的DMEM培养液，

37℃、5%CO2、饱和湿度的培养箱中培养。A375细胞的接种密度0.5×10 5/ml，

A431细胞的接种密度1×10 5/ml, 2-3d后细胞贴壁生长至融合度达到80%-90%

时，胰酶消化进行传代和实验。

## **2.2** **MTT**比色法检测**ALA-PDT**对**A375**细胞与**A431**细胞的杀伤作用

MTT比色法：其检测原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性

MTT还原为不溶于水的蓝紫色结晶甲瓒并沉积在细胞内，而死细胞无此功能，用二甲基亚砜（DMSO）溶解细胞内的甲瓒，在一定细胞数范围内，MTT结晶形成的量与活细胞数成正比，用酶标仪在490nm和630nm双波长处测定其光吸收值，可间接反映活细胞数量。MTT法是一种检测细胞存活和生长的方法。

**2.2.1种板**

A375细胞以2×10 5/ml, A431细胞以4×10 5/ml细胞密度，每孔100µl接种

96孔板。

**2.2.2药物处理**

分别加入终浓度为0.2, 0.3，0.4, 0.6与0.8mmol/L的ALA孵育4h后光照；同时设立DMEM培养基空白对照组（不加光敏剂，加入相同体积的培养基，孵育4h后不光照），光对照组（不加光敏剂，加入相同体积的培养基，孵育4h后光照）与光敏剂对照组（仅与0.8mmol/L ALA孵育4h，不光照）。每组设3个平行孔。

**2.2.3光照处理**

光照条件：光源波长627nm，光功率密度14.5mW/cm2,光照时间40s，即光剂量为0.580J/cm2. A375细胞各浓度组分别在光照后0.5h，1h，2h，4h 与

6h行MTT检测。A431细胞各浓度组分别在光照后1h，2h，4h，6h与8h 行

MTT检测。

**2.2.4 MTT测定**

避光条件下，每孔加入5mg/ml的MTT 20µl，摇匀，置37℃培养箱中孵育4h；室温2000rpm离心10min,白色背景下肉眼观察可见孔底有紫黑色结晶，用移液枪小心将上清液吸弃；每孔加入150µl的DMSO，酶标仪上震荡10min，使结晶溶解；检测490nm和630nm波长吸光度值（OD值）。计算抑制率：计算不同ALA浓度及ALA-PDT后不同孵育时间细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率%=（1－用药平均OD值/对照组平均OD值）×100%，实验重复3次。

## **2.3** **TUNEL**染色法检测细胞凋亡率

脱氧核糖核苷酸末端转移酶（TdT）介导的缺口末端标记法（TUNEL）是细胞凋亡的重要指标。细胞发生凋亡时，核酸内切酶激活，核小体连接区DNA发生随机性降解，形成180-200bp的寡核小体片段，断裂的DNA片段存在很多3’-OH末端，生物素biotinylate标记的dUTP在脱氧核糖核苷酸末端转移酶的作用下，可以连接到凋亡细胞中断裂DNA的3’-OH末端，并与连接辣根过氧化酶（HRP）的链酶亲和素streptavidin特异性结合，后者又与过氧化物酶

（POD）底物H2O2、二氨基联苯胺（DAB）产生深棕色反应，特异准确地定位在凋亡细胞。能准确反应细胞凋亡最典型的生物化学和形态特征，在细胞凋亡的研究中被广泛应用。TUNEL具体步骤如下：

**2.3.1制作细胞爬片**

A375细胞以2×10 5/L细胞密度接种到置有盖玻片的6孔板，经0.3mmol/L ALA-PDT作用后孵育0.5h，1h，2h，4h与6h，收集对照组和各时相处理组细胞爬片；A431细胞以4×10 5/L细胞密度接种到置有盖玻片的6孔板，经0.5mmol/L ALA-PDT作用后孵育1h，2h，4h，6h与8h收集对照组和各时相处理组细胞爬片。

**2.3.2细胞固定**

将细胞爬片空气干燥，用4%多聚甲醛PBS溶液固定25min。

**2.3.3细胞通透**

0.2%TritonX-100的PBS溶液通透5min。

**2.3.4 TUNEL反应**

平衡缓冲液平衡后，各爬片滴加100µl的TUNEL反应液，37℃保湿反应60min；后用2×SSC终止反应15min；用0.3%H2O2去除内源性过氧化物酶，作用5min；再加入连接有HRP的链酶亲和素，反应30min。

**2.3.5 DAB底物显色**

**2.3.6观察结果**

光镜下观察细胞核呈棕色沉淀为阳性反应，即为阳性细胞，计算凋亡率：阳性细胞/1000个细胞。

## **2.4** **Western blot**方法检测凋亡相关蛋白

**2.4.1蛋白的提取**

A375细胞以2×10 5/L细胞密度接种6孔板，经0.3mmol/L ALA-PDT作用后孵育0.5h，1h，2h，4h与6h；A431细胞以4×10 5/L细胞密度接种到6孔板，经0.5mmol/L ALA-PDT作用后孵育1h，2h，4h，6h与8h；吸弃培养基，用预冷的PBS洗两遍；对照孔和处理孔，每孔加入蛋白提取液RIPA100µl和蛋白酶抑制剂（Phosphatase Inhibitor cocktail, Protease Inhibitor cocktail和PMSF）各1µl，吹打混匀，并用细胞刮勺收集，涡旋振荡；4℃放置30min，4℃离心机，13000rpm离心15min；吸取上清，PCR管分装，-80℃保存备用。

**2.4.2 BCA法测定蛋白浓度**

### 按 A: B=50:1配制BCA工作液，混匀，现配现用；取蛋白标准品（5mg/ml）

10µl，用PBS稀释至100µl（10倍稀释）；标准品孔每孔按20, 19，18，16，

12，8，4与0µl PBS加入96孔板中，然后依次加入稀释后蛋白标准品0, 1，

2，4，8，12，16与20µl；样品孔每孔加入18µl PBS，再加2µl样品（10倍稀释）；标准品孔和样品孔加入200µl/孔BCA工作液，37℃孵育30min；测定波长562nm处OD值；绘制标准曲线，X轴代表BSA标准蛋白浓度（µg/ml），

Y轴代表标准孔的OD值；根据标准曲线求得样品蛋白浓度。

**2.4.3蛋白变性**

根据样品蛋白浓度，计算含40µg蛋白的样品体积即为上样量；各样品按量加至PCR管中，加入5×SDS上样缓冲液2µl，用PCR水补足体系至10µl ；

PCR仪上99℃蛋白变性5min，4℃保存备用。

**2.4.4 SDS-PAGE电泳**

准备清洁、干燥的玻璃板，对齐后垂直卡紧在夹板上，防止漏胶；按上述配方制备的12%分离胶摇匀后立即加入玻璃板之间至夹板的绿带下限，再轻柔缓慢地在上层加水，以挤出气泡和促凝；约15min，可出现胶和水的分界线，说明胶已凝，用滤纸吸弃水；按上述配方制备的4%浓缩胶摇匀后立即加入分离胶的上层，并水平插入小梳子，间隙之间补足浓缩胶，防止气泡形成；约

30min，待浓缩胶凝固，小心拨出梳子，放入电泳装置，注意正负极；样品上样，上样量约9µl，并用蛋白Marker比对；电泳，浓缩胶80V，20min；分离胶120V，60-80min。

**2.4.5转膜**

准备6张5cm×8cm的滤纸和1张5.5cm×8.5cm的NC膜，注意膜和滤纸的整洁、无污染；转膜用的夹子、两块海绵垫、滤纸与膜用转膜液浸湿；撬掉玻璃板剥胶，先撬掉薄板，将浓缩胶和多余的分离胶轻轻切去，然后将带有胶的厚板置于转膜液中晃动，使胶脱离厚板并飘起来；打开夹子，黑的一面保持水平，在上面依次垫上海绵垫、三层滤纸、分离胶、NC膜、三层滤纸和海绵垫，随即用转膜液润湿，擀走汽泡，合上夹子；夹子放入转膜槽中，注意夹子的黑面对槽的黑面，白面对槽的红面，槽的边缘放上冰块，防止转膜产热导致温度过高；设置恒流350mA，转膜1h；转完后用丽春红预染，可见泳道和蛋白印迹，根据Marker的位置及目的蛋白的分子量、内参GADPH的分子量，确定目的蛋白和内参的位置，将其剪下，并作标记。

**2.4.6免疫反应**

将蛋白条带用5%的脱脂奶粉的TBST溶液在室温水平摇床上封闭2h；用

TBST按以下比例稀释单克隆一抗：GADPH单克隆抗体1: 1000；Caspase3，8，9，Bcl-2, Bax与PARP单克隆抗体1: 500；一抗反应，蛋白条带和对应的一抗在反应盒内4℃反应过夜。TBST洗条带3次，每次15min；用TBST按以下比例稀释辣根过氧化物酶标记的二抗：抗鼠二抗1: 50000，抗兔二抗1：

5000；二抗反应，蛋白条带和对应的二抗在反应盒内水平摇床上室温反应2h。

**2.4.7化学发光、显影、定影**

TBST洗条带3次，每次15min；将蛋白条带用滤纸吸弃残留液，置于保

鲜膜上，去除气泡和皱褶，放入X光片夹中，注意条带的正反面；于暗室中，将ECL发光液的A与B试剂等体积混匀，滴加至条带上，每条带约100µl；将X光片放在条带上，根据荧光强度，曝光1-30min不等；显影、定影，并晾干胶片。GADPH作为内参调节上样量，以条带的相对灰度表示蛋白的相对表达水平。

## **2.5** 免疫组化**-SABC**法检测**Cyt-c**的细胞定位

检测细胞内或亚细胞水平微量蛋白的定位、定性和定量的方法。根据抗原抗体反应和化学显色原理，细胞中的抗原细胞色素C（Cyt-c）先和一抗结合，再利用一抗与标记生物素的二抗反应，再用标记辣根过氧化物酶（HRP）的链酶亲和素结合，最后通过呈色反应显示细胞中化学成分，在光学显微镜下可清晰看见细胞内发生的抗原抗体反应产物，从而能够在细胞爬片上原位确定某些化学成分的分布和含量。利用SABC（Strept avidin-biotin complex）链霉亲和素-生物素复合物以扩大目标抗原的信号，与染色定位相结合，使免疫细胞化学染色更具有特异性和敏感性。免疫组化-SABC法具体步骤如下：

**2.5.1制作细胞爬片**

盖玻片经防脱片剂左旋多聚赖氨酸（Poly-L-Lysine）处理，A375细胞以2×10 5/L细胞密度接种到置有盖玻片的6孔板，经0.3mmol/L ALA-PDT作用后孵育0.5h，1h，2h，4h与6h，收集对照组和各时相处理组细胞爬片；A431细胞以4×10 5/L细胞密度接种到置有盖玻片的6孔板，经0.5mmol/L ALA-PDT作用后孵育1h，2h，4h，6h与8h收集对照组和各时相处理组细胞爬片。

**2.5.2固定**

4%多聚甲醛固定30min。

**2.5.3灭活H2O2**

3%H2O2室温浸泡30min，以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗1-2次。

**2.5.4封闭**

滴加5%BSA封闭液，室温20min。甩去多余液体，不洗。

**2.5.5一抗反应**

滴加适当的一抗（兔IgG）,4℃过夜（16-24h）。PBS洗3次，每次2min。

**2.5.6二抗反应**

滴加生物素ft羊抗兔IgG，20-37℃20min. PBS（pH7.2-7.6）洗2min，洗

# 3 次。

**3.5.1 SABC反应**

滴加试剂SABC,20-37℃20min. PBS（PH7.2-7.6）洗5min,洗4次。

**3.5.2 DAB显色**

使用DAB显色试剂盒。取1ml蒸馏水，加试剂盒中ABC试剂各一滴，混匀后加至切片。

**3.5.3观察结果**

室温显色，镜下控制反应时间，一般在5-30min之间。蒸馏水洗涤。

# 3 统计学分析

实验数据均用*x**s*表示，采用spss17.0统计软件单因素方差分析和显著性检验。以P<0.05差异有统计学意义。

### 结果

**1** **ALA-PDT可显著杀伤A375细胞与A431细胞**

各种浓度的ALA-PDT组对A375细胞与A431细胞均有杀伤作用，与对照组比较均有显著性差异（p<0.05），并呈ALA剂量相关；ALA-PDT对A375细胞与A431细胞的杀伤作用具有ALA浓度和ALA-PDT作用后孵育时间依赖性，当0.6mmol/L ALA-PDT作用后4h，对A375细胞的抑制作用趋于平衡；当0.6mmol/L ALA-PDT作用后8h，对A431细胞的抑制作用趋于平衡，达到最大程度。光敏剂对照组，光对照组与空白对照组相比均无显著性差别

（p> 0.05）。结果详见表1.1, 1.2和图1.1，1.2.

根据MTT的检测结果，选取增殖抑制率50%-60%的ALA浓度，设定A375细胞的ALA孵育浓度0.3mmol/L, ALA-PDT作用后0.5h，1h，2h，4h与6h各时相；A431细胞的ALA孵育浓度0.5mmol/L, ALA-PDT后1h，2h，4h，

6h与8h各时相作为后续的凋亡机制检测。

**表1.1** **MTT法检测ALA-PDT对A375细胞的杀伤作用（n=3）**

| 组别 |  | 抑制率（%） | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1h | 2h | 4h | 6h |
| 空白对照组 | -- | -- | -- | -- |
| 光对照组 | -- | -- | -- | -- |
| 光敏剂对照组 | -- | -- | -- | -- |
| ALA-PDT 组（mmol/L） | | | | |
| 0.2 | 15.04±1.56 ＊ | 16.89±1.98 ＊ | 26.20±1.46 ＊ | 19.76±1.35 ＊ |
| 0.3 | 22.57±2.70 ＊ | 45.61±1.90 ＊ | 52.40±2.43 ＊ | 57.26±2.51 ＊ |
| 0.4 | 41.37±1.90 ＊ | 78.51±2.67 ＊ | 88.60±3.10 ＊ | 89.31±3.00 ＊ |
| 0.6 | 53.10±2.30 ＊ | 85.53±3.57 ＊ | 95.00±3.91 ＊ | 93.55±2.78 ＊ |
| 0.8 | 54.42±3.56 ＊ | 80.26±3.46 ＊ | 94.60±4.10 ＊ | 91.94±4.09 ＊ |

＊与对照组相比p<0.05



**图1.1** **ALA-PDT对A375细胞的杀伤作用(＊p<0.05)**

**表1.2** **MTT法检测ALA-PDT对A431细胞的杀伤作用（n=3）**

| 组别 |  | 抑制率(%) | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1h | 2h | 4h | 8h |
| 空白对照组 | -- | -- | -- | -- |
| 光对照组 | -- | -- | -- | -- |
| 光敏剂对照组 | -- | -- | -- | -- |
| ALA-PDT 组（mmol/L） | | | | |
| 0.2 | 1.57±1.24 ＊ | 10.5±2.76 ＊ | 11.16±1.98 ＊ | 15.34±2.04 ＊ |
| 0.3 | 14.50±2.43 ＊ | 41.08±3.09 ＊ | 42.92±1.09 ＊ | 55.18±3.89 ＊ |
| 0.4 | 32.55±2.09 ＊ | 55.76±1.99 ＊ | 53.13±2.32 ＊ | 70.52±2.87 ＊ |
| 0.6 | 34.91±2.34 ＊ | 66.59±1.99 ＊ | 63.54±3.01 ＊ | 86.06±2.56 ＊ |
| 0.8 | 40.42±1.87 ＊ | 72.69±2.02 ＊ | 66.46±3.00 ＊ | 85.00±2.75 ＊ |

＊与对照组相比p<0.05



**图1.2** **ALA-PDT对A431细胞的杀伤作用（＊p<0.05）**

**2** **TUNEL染色法的检测结果**

TUNEL染色后，正常细胞呈铺路石样排列，连接性好，细胞核边缘清楚、色泽均一，核仁清晰可见。而ALA-PDT作用后细胞体积变小、全面皱缩，连接中断，细胞核浓缩、边缘化，产生凋亡小体，阳性反应在凋亡细胞细胞核浓缩区有棕黄色沉淀，如图2.1。随着ALA-PDT作用后孵育时间的延长，凋亡率明显增高，A375细胞在ALA-PDT作用后0.5h，1h，2h，4h与6h的凋亡率分别为11.79%，44.84%，63.75%，75.33%与90.00%; A431细胞在ALA-PDT

作用后1h，2h，4h，6h与8h的凋亡率分别为10.00%，25.00%，55.50%，61.54%

与70.00%，如图2.2.

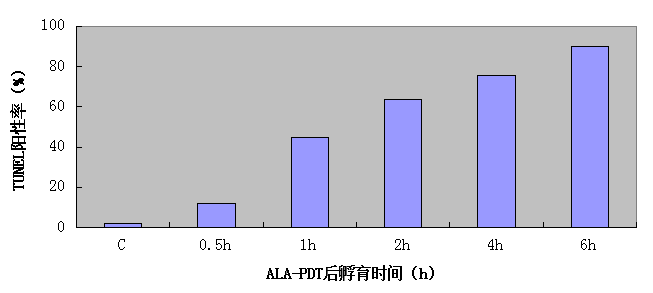


**图2.1** **(a) A375细胞对照组** **图2.1(b) A375细胞ALA-PDT处理后**



### 图 **2.1(c) A431**细胞对照组 图**2.1(d) A431**细胞**ALA-PDT**处理后

**图2.1** **ALA-PDT前后A375细胞与A431细胞的TUNEL染色结果**(×40倍)



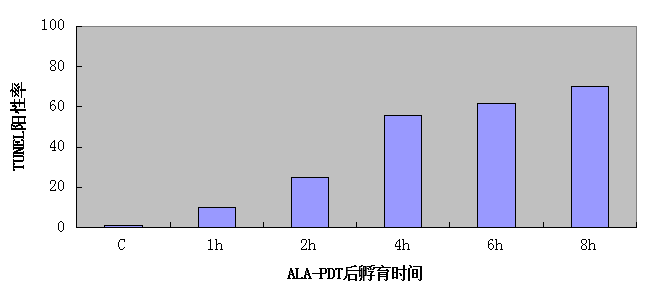
\*

\*

\*

\*

\*



\*

\*

\*

\*

\*

**图 2.2(b)A431 细胞凋亡率**

### **图 2.2(a) A375**细胞凋亡率

**图2.2** **ALA-PDT处理后各时相A375细胞与A431细胞TUNEL结果**

**3** **Western-blot检测结果**

蛋白免疫印迹的结果显示：随着ALA-PDT后孵育时间的延长，A375细胞与A431细胞抗凋亡蛋白Bcl-2下调，促凋亡蛋白Bax上调；出现Caspase蛋白的级联反应及剪切。A375细胞在ALA-PDT作用后0.5h, 1h与2h出现

Caspase3, 8，9剪切体且上调；但是在ALA-PDT作用后4h与6h上述剪切体下调。A431细胞在ALA-PDT作用后1h，2h与4h出现上述剪切体且上调；但是ALA-PDT作用后6h与8h上述剪切体下调；而且，ALA-PDT作用后，

A375细胞与A431细胞出现PARP前体的下调和剪切体的上调，如图3所示。

**Post-PDT**

**C** **0.5** 1 2 4 6

**Post-PDT**

**C** **1** 2 4 6 8

**Bcl-2 Bax**



**cleaved-caspase8**



**pro-caspase8**



**cleaved-caspase9**



**pro-caspase9**



**cleaved-caspase3**



**pro-caspase3**



**cleaved-PARP**



**pro-PARP**



**GADPH**



**图 3.1** **A375细胞凋亡蛋白表达** **图3.2** **A431细胞凋亡蛋白表达**

**图3** ALA-PDT**处理前后A375细胞与A431细胞凋亡蛋白的表达**C代表对照组，0.5,1,2,4与6分别代表A375细胞ALA-PDT作用后孵育时间（h）；

1，2，4，6与8分别代表A431细胞ALA-PDT作用后孵育时间（h）。

# **4** 免疫组化**-SABC**法检测**Cyt-c**蛋白的表达

免疫组化-SABC法染色结果显示A375细胞与A431细胞对照组细胞核周区呈颜色增强的棕褐色团块状沉淀反应，远离核周的胞质区呈均匀淡染的棕黑色细颗粒状沉淀反应；ALA-PDT处理后，棕黑色沉淀阳性反应向远离核周的胞质区铺展开，不仅细胞胞质核周区，远离核周的胞质区均呈颜色增强的棕黑色沉淀反应，有的呈团块状，有的呈粗颗粒状，如图4。



**图 4** **(a) A375细胞对照组图4(b) A375细胞ALA-PDT处理后**



**图4** **(c) A431细胞对照组图4(d) A431细胞ALA-PDT处理**

**图4** **ALA-PDT作用前后A375细胞与A431细胞Cyt-c在胞浆内定位**(×40倍)

# 讨论

MTT结果显示ALA-PDT对皮肤癌A375细胞和A431细胞均有显著的杀伤作用。A375细胞在0.6mmol/L ALA-PDT处理后4h抑制率达到最高值，并趋于饱和；A431细胞在0.6mmol/L ALA-PDT处理后8h抑制率达到最高值，并趋于饱和，可见A375细胞比A431细胞对ALA-PDT敏感。同样，TUNEL实验结果也显示在同样浓度的ALA-PDT处理后的同一时间点，A375细胞的凋亡率明显比A431细胞高；其原因可能是这两种细胞的生理特性及代谢能力存在差异。Tsuimin Tsai等[15]报道，肺腺癌细胞CL1-5对ALA-PDT作用不明显，而另一种肺腺癌细胞H1299则对ALA-PDT表现出明显的光毒性效应。他们认为不同的肿瘤细胞对ALA-PDT表现不同的生物效应，可能是源于相比其它肿瘤细胞，CL1-5含有异常的亚铁螯合酶和胆色素原脱氨酶水平，而这两种酶影响着ALA在细胞内生成光敏剂PpⅨ的含量。所以可以推测A375细胞和

A431细胞可能含有不同水平的亚铁螯合酶和胆色素原脱氨酶。

本研究中设立的ALA-PDT实验组的杀伤作用与光源对照组、光敏剂对照组和空白对照组相比存在显著差异，而对照组间无显著差异，说明ALA产生的光效应需要光敏剂和适当波长的光源共同参与，单纯的光敏剂或单纯的光源照射对细胞无作用，这就是ALA-PDT发挥作用特点。Tomoe Kuhara等[16]用人鳞状细胞癌细胞HSC-5细胞分别暴露于高剂量和低剂量的光源下，但未用

ALA与细胞共同孵育，结果未检测到细胞的生长变化。本实验也验证了由ALA产生的光敏剂PpⅨ和本实验采用的光源无毒副作用，具有安全性，不会干扰我们应用ALA-PDT对皮肤癌A375细胞与A431细胞作用机制的研究。

在ALA-PDT过程中，选择适当的ALA浓度和光剂量可以取得更好的临床效果，并保证最小的副作用[17]。ALA在达到一定浓度后，细胞内产生PpⅨ的酶的合成作用达到饱和不能再提高PpⅨ含量，结合临床，为避免高浓度的光敏剂带来的光毒性及局部残留等副作用，应选用较低浓度光敏剂和较大激光能量为宜[18]。皮肤癌在临床上表现为病灶大小不等、侵润深浅不一，特别是易侵润的黑色素瘤，它们虽然容易暴露在光源下，但PDT作用的深度有限，因此需要选择一种长波长的光源。PpⅨ的最大吸收峰波长是410nm，还有四个吸收峰波长在500-650nm之间[19]。早期研究[20]，PpⅨ的最适合吸收峰波长

是628nm，因为它介导的光毒性作用可达到病灶深度的7-18mm。本实验采用

627nm波长的光源处理细胞，根据MTT结果，A375细胞与0.4mmol/L ALA孵育，A431细胞与0.6mmol/L ALA孵育，ALA-PDT对细胞的杀伤作用达到最大，并趋于饱和。该ALA饱和浓度适用于ALA-PDT对体外单层培养细胞产生最大光效应，是否适用于动物实验和临床治疗还需进一步研究。

ALA-PDT对肿瘤细胞的杀伤作用主要通过诱导细胞凋亡产生的[21-24]. ALA-PDT对皮肤癌A375细胞与A431细胞的杀伤作用是否也是通过凋亡方式诱导的？本课题采用对ALA-PDT对两株细胞杀伤效应为50%-60%的ALA浓度来进一步研究其对皮肤癌细胞死亡方式的诱导作用及其机制，即与A375细胞孵育的ALA浓度为0.3mmol/L，与A431细胞孵育的ALA浓度为0.5mmol/L。为了监测凋亡和相关蛋白的变化，我们设立了几个时间间隔以捕捉峰值和凋亡形态的变化，结果显示ALA-PDT处理后，随着时间的延长，细胞凋亡率呈不同程度的增加，呈现明显的凋亡形态，凋亡相关蛋白存在不同程度的变化。

细胞凋亡的一个显著特征就是细胞染色质的DNA降解，凋亡时DNA的断片大小规律是200bp的整数倍，并且发生不可逆转的细胞死亡。本实验利用

TUNEL染色技术，显示了典型的凋亡形态，即在凋亡细胞的染色质浓缩区呈现棕黄色的阳性反应，其凋亡率随ALA-PDT处理后孵育时间延长而递增。同时，出现PARP剪切体，并有表达上调趋势。PARP是DNA损伤的修复酶，它在

caspase3剪切后形成89kD和24kD的剪切体而失去其酶活性，从而加速细胞的不稳定性。PARP剪切被认为是细胞凋亡的一个重要指标。本实验从TUNEL阳性结果和PARP的剪切表明ALA-PDT诱导皮肤癌A375细胞与A431细胞死亡是通过凋亡方式发生的。A375细胞在ALA-PDT作用后0.5h, A431细胞在ALA-PDT作用后1h就发生细胞的凋亡，与Grebenova等[25]报道ALA-PDT诱导了淋巴瘤细胞HL60通过多信号途径的快速细胞凋亡一致。

ALA-PDT诱导皮肤癌A375细胞与A431细胞凋亡，是细胞内多信号的活化和表达的结果，包括Bcl-2家族、Caspase家族及线粒体释放的蛋白如Cyt-c。

Bcl-2家族在线粒体凋亡途径中发挥重要作用。它包括两种蛋白：抗凋亡蛋白如Bcl-2，促凋亡蛋白如Bax. Bcl-2等抗凋亡蛋白通过跨膜域（TM域）定位在线粒体膜、内置网膜与核膜上[26]，Bax等促凋亡蛋白以未活化的单体形式游离胞质中[27]。Bcl-2蛋白含有4个结构域（BH1, BH2, BH3和BH4）, Bax

蛋白含有3个结构域（BH1, BH2和BH3），Bcl-2蛋白和Bax蛋白具备同源相似的BH1, BH2和BH3结构[28]，可形成异源二聚体。Bcl-2和Bax蛋白相互作用调控着线粒体外膜的通透性。Bax蛋白在凋亡刺激因素的作用下激活，结合到线粒体外膜上，产生线粒体的透化作用（MOMP），使线粒体膜间隙的螯合蛋白如Cyt-c和AKT释放到胞质参与凋亡[29]。Bcl-2蛋白主要通过与

Bax形成异源二聚体，抑制Bax蛋白的MOMP作用来阻止细胞凋亡[30]。Bcl-2抗凋亡蛋白和Bax促凋亡蛋白作为线粒体凋亡途径的上游蛋白在ALA-PDT诱导的凋亡中发挥重要作用。它们保持着动态平衡，决定ALA-PDT诱导的细胞凋亡。食管鳞状癌细胞Eca-109在ALA-PDT诱导的凋亡过程中表现mRNA水平上bcl-2增强和bax的减弱，说明Eca-109细胞凋亡与线粒体有关[31]。Bax/Bcl-2蛋白表达比例的上升决定着人胶质瘤细胞U87MG发生线粒体途径的凋亡[32]。本实验皮肤癌A375细胞与A431细胞的抗凋亡蛋白Bcl-2表达下调，促凋亡蛋白Bax表达上调，显示ALA-PDT产生的ROS等凋亡刺激因子首先作用于线粒体，引起线粒体形态和功能的变化，进一步激活Caspase家族的级联反应诱导与线粒体相关的凋亡。

线粒体膜蛋白释放至胞质是凋亡的关键环节[33]。细胞色素C是位于线粒体嵴上的电子传递链的媒介，细胞凋亡时线粒体肿胀，嵴连接打开，Cyt-c通过Bax 多聚体形成的孔道，释放到胞质[34]。Cyt-c 激发凋亡小体的形成和

Caspase家族蛋白的活化。Cyt-c通过衔接蛋白Apaf-1上与Caspase9同源的

caspase激活与募集结合域（CRAD），与Caspase9结合，形成由Cyt-c, Apaf-1与Caspase9组成的凋亡小体，引起线粒体途径的凋亡[35]。本实验通过免疫组化-SABC法，利用SABC（Strept avidin-biotin complex）链霉亲和素-生物素复合物以扩大目标抗原Cyt-c的信号，在正常细胞中可检测到远离核周胞质区微弱的Cyt-c信号，可能是它也参与细胞主动的凋亡过程，以维持内环境的稳定，当受到外界刺激则大量释放，加速细胞的凋亡。在ALA-PDT诱导皮肤癌A375细胞与A431细胞凋亡中，位于核周线粒体内的Cyt-c释放至胞质，呈弥散分布，参与Caspase凋亡蛋白的级联反应，启动Cyt-c依赖的线粒体凋亡过程。免疫组化法可以很形象地表达Cyt-c在ALA-PDT处理细胞前后的动态变化。在现代病理学实验室中，免疫组化染色法作为一种对疑难杂症的常规病理诊断方法[36]。因此，我们可以建议使用代表性的标记，如Cyt-c在组织细胞凋亡途

径中的变化，预测ALA-PDT的治疗效果。

Caspase 蛋白参与细胞凋亡是凋亡过程的中心环节。本实验验证了

Caspase3, 8与9参与ALA-PDT诱导的皮肤癌A375细胞与A431细胞的凋亡。

Caspase8是外源性凋亡途径的启动子，Caspase9是内源性也就是线粒体途径的启动子，它们能激活caspase级联反应下游的效应凋亡蛋白Caspase3，使之活化形成具有蛋白水解作用的酶，然后裂解、活化PARP及细胞结构，导致细胞结构破坏，功能丧失，DNA断裂损伤，最终引起细胞死亡[37]。研究认为ALA-PDT 的光敏剂PpⅨ定位在线粒体内，可针对性地引起Cyt-c 释放和

Caspase9 蛋白的活化[38]。但我们的实验结果显示了外源途径的起始凋亡蛋白

Caspase8也参与了细胞的凋亡过程，可能与PpⅨ在线粒体生成后可以转移至胞质内或其它的细胞器有关。与ALA孵育2-4h，PpⅨ主要定位在线粒体内膜上，有少部分分布在内质网膜和胞质膜上[39]。有报道ALA-PDT诱导HL60白血病细胞在内质网上发生的凋亡[40]，以及诱导口腔癌细胞Ca9-22通过外源即死亡受体途径的凋亡[23]。多信号通路的共同作用使ALA-PDT 诱导的皮肤癌

A375细胞与A431细胞发生快速的细胞凋亡。

选择性地诱导肿瘤细胞凋亡是当前一种重要的抗癌手段。本研究ALA-PDT诱导皮肤癌A375细胞与A431细胞凋亡主要通过线粒体凋亡途径伴随着依赖Caspase8的外源性凋亡途径，该信号途径可以成为皮肤黑色素瘤和鳞状细胞癌治疗的一个新的靶点，为ALA-PDT在皮肤黑色素瘤和鳞状细胞癌临床治疗中的应用提供理论依据，并指导ALA-PDT结合化疗药协同作用于皮肤癌，以达到事半功倍的效果。

参考文献

[1] Grossman D, Altieri DC. Drug resistance in melanoma: Mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. Cancer Metastasis Rev, 2001, 20: 3-11.

[2] Chang, J. W. Cutaneous melanoma: Taiwan experience and literature review. Chang Gung Med, 2010, 33(6): 602-612.

[3] Garbe C, Terheyden P, Keillholz U, et al. Treatment of melanoma. Dtsch Artztbl Int, 2008, 105(49): 845-851.

[4] Keuling AM, Felton KE, Parker AA, et al. RNA silencing of Mcl-1 enhances ABT-737-mediated apoptosis in melanoma: role for a caspase-8-dependent pathway. Plos One, 2009, 4(8): e6651.

[5] ] Eugene Jeong, Ji Won Hong, Jung Ah Min. Topical ALA-Photodynamic Therapy for acne can induce apoptosis of sebocytes and down-regulate theirTLR-2 and TLR-4 expression. Ann Dermatol, 2011, 23(1): 23-32.

[6] Erickon, Miller. Treatment options in melanoma in situ: topical and radiation therapy, excision and Mohs surgery. Int. J. Dermatol, 2010, 49(5): 482-491.

[7] Madan, Lear, Szeimies. Non-melanoma skin cancer. Cancer, 2010, 375(9715): 673-685.

[8] Yuan-Gang Lu, Yuan-yuan Wang, et al. Efficacy of topical ALA-PDT combined with excision in the treatment of skin malignant tumor. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2014, 11(2): 122-126.

[9] Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. J Clin Laser Med Surg, 2002, 20(1): 3-7.

[1010] Leibovici, Schoenfeld, Yehosshua, et al. Activity of porphobilinogen deaminase in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic cancer. Cancer, 1988, 62(11): 2297-2230.

[11] Ohgari Y, Nakayasu Y, Kitajima S, et al. Mechanisms involved in tumorcells: Relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin. Biochem Pharmacol, 2005, 71(1-2): 42-49.

[12] L Teng, M Nakada, S-G Zhao, et al. Silencing of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy. British Journal of Cancer, 2011, 104(5): 798-807.

[13] Svaasand LO, Wyss P, Wyss MT, et al. Dosimetry model for photodynamic

Therapy with topically administered photosensitizers. Laser Surg Med, 1996, 18(2): 139-149.

[14] Kemmner W, Wan K, Ruttinger S, et al. Silencing of human ferrochelatase causes abundant protoporphyrin-Ⅸaccumulation in colon cancer. FASEB J, 2008, 22(2): 500-509.

[15] Tsuimin Tsai, Hong Tai Ji, Pei-Chi Chiang, et al. ALA-PDT result in phenotypic changes and decreased cellular invasion in surviving cancer cells. Lasers in Surgery and Medicine, 2009, 41(4): 305-315.

[1616] Tomoe Kuhara, Daisuke Watanabe, Yoichi Aktita, et al. Thioredoxin upregulation by 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy in human skin squmous cell carcinoma cell line. Photodermatolagy, Photoimmunolagy& Photomedicine, 2008, 24(3): 142-146.

[17] Soad Zakaria, Amira M, Gamal-Eldeen PhD, et al. Synergistic apoptotic effect of Doxil and aminolevulinic acid-based photodynamic therapy on human breast adenocarcinoma cells. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2014, 11(2): 227-238.

[18] 钟俊波, 岑瑛, 刘全. ALA-PDT对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖作用的研究. 四川大学学报, 2010, 41(2): 222-225.

[19] Peng Q, Warloe T, Berg K, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: clinical research and future challenges. Cancer, 79: 2282-2308.

[20] Kaye AH, Hill JS. Photodynamic therapy of cerebral tumors. Neurosurg Q, 1992, 1: 233-258.

[21] Bednarz N, Zawacka-Pankau J, Kowalska A. Protoporphyrin Ⅸinducedapoptosis in Hela cells prior to photodynamic treatment. Pharmacol Rep, 2007, 59(4): 474-479.

[22] Masanao Yamamoto, Hirofumi Fujita, Naoki Katase, et al. Improvement of the efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment in human oral squamous cell carcinoma HSC-4. Acta Medica Okayama, 2013, 67(3): 153-164.

[23] Chen HM, Liu CM, Yang H, et al. 5-Aminolevulinic acid induce apoptosis via NF-κB/JNK pathway in human oral cancer Ca9-22cells. J Oral Pathol Med, 2011, 40(6): 483-489.

[24] 曹良启, 薛平, 陈育宾, 等. 光动力抑制胆管癌QBC939细胞生长的实验

研究. 中华普通外科学文献(电子版), 2011, 2(5):21-24.

[25] Grebenova D, Kuzelova K, Smetana K, et al. Mitochondrial and endopasmic reticulum stress induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. J Photochem Photobiol B, 2003, 69(2): 71-85.

[26] Ospina A, Lagunas-Martinez A, Pardo J, et al. Protein oligomerization mediated by the transmenbrane carboxyl terminal domain of Bcl-xl. Febs Lett, 2011, 585(19): 2935-2942.

[27] Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, et al. Bcl-xl retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. Cell, 2011, 145(1): 104-116.

[28] Garcia-Saez AJ. The secrets of the Bcl-2 family. Cell Death Differ, 2012, 19(11): 1733-1740.

[2929] Thomas Landes, Jean-Claude Martinou. Mitochondrial outer menbrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial admission. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(4) S1: 540-545.

[30] Llambi F, Green DR. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the Bcl-2 family. Curr Opin Genet Dev, 2011, 21(1): 12-20.

[31] Xiaohua Chen, Peng Zhao, Fengsheng Chen, et al. Effect and mechanism of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in esophageal cancer. Lasers in Medical Science. 2011, 26(1): 69-78.

[3232] Surajit Karmaker, Naren L, Banik, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma U87MG cells. Neuroscience Letters, 2007, 415: 242-247.

[33] Fulda S, Debatin KM. Apoptosis signaling in tumor therapy. Ann NY Acad Sci, 2004, 1028: 150-156.

[34] Walensky LD, Gavathiotis E. Bax unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore. Trends Biochem Sci, 2011, 36(12): 642-652.

[3535] Martinou JC, Desagher S, Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. Nat Cell Biol, 2000, 2(3): E41-E43.

[36] Chuan-Hang Yu, Hsin-Ming Chen, Hung-Pin Lin, et al. Expression of Bax and Bax/Mcl-1 ratio can predict photodynamic therepy outcome for oral verrucous hyperplasia and leukoplakia. J Oral Pathel Med. 2013, 42(3): 257-262..

[37] Park HH. Structural features of caspase-activating complexes. Int J Mol Sci, 2012, 13(4): 4807-4818.

[38] Kessel D, Luo Y. Photodynamic therepy: a mitochondrial inducer of apoptosis. Cell Death Differ, 1999, 6(1): 28-35.

[3939] B. J. Wilson, M. Olivo, G. Singh. Subcellular localization of photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to photofrin mediated photodynamic therapy. Photochem Photobiol, 1997, 65(1): 166-176.

[40] Dana Grebenova, Katerina Kuzelova, Karel Smetana, et al. Mitochondeial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are actived by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therepy in HL60 leukemia cells. Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2003, 69(2): 71-85.

# 综述

**ALA-PDT抗肿瘤机制研究**

蔡晶晶综述黄慧芳审校

**【摘要】**ALA-PDT利用ALA的代谢中间产物原卟啉Ⅸ（PpⅨ）在肿瘤细胞内富集，作为光敏剂，在光源和氧的参与下，对肿瘤细胞产生光动力杀伤作用。细胞凋亡是ALA-PDT发挥光动力效应的主要形式。外源性凋亡途径和线粒体凋亡途径是细胞凋亡的重要通路。本文就ALA-PDT的抗肿瘤效应及其诱导细胞凋亡通路的关系作一综述。

【**关键词**】**ALA-PDT； 原卟啉Ⅸ； 光动力效应； 凋亡**

**Research on Mechanism of Anti-Tumor Induced by**

**ALA-PDT**

**Abstract:** ProtoporphyrinⅨ(PpⅨ), as a photosensitizer, is intermediate metabolites of 5-Aminolevulinic acid(ALA). 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy(ALA-PDT) using the accumulation of PpⅨin cancer cells induces photo-damage in the participation of appropriate light and oxygen. Cells

Apoptosis is the main photodynamic effect. Exogenous apoptosis pathway and mitochondrial-related apoptosis pathway is important to cell apoptosis. Here we would make a review about the relationship of the anti-tumor effect induced by ALA-PDT and the cell apoptosis pathway.

**Key words:** 5-Aminolevulinic acid; Photodynamic therapy; Protoporphyrin

Ⅸ; apoptosis

**1 ALA-PDT概述**

5-α氨基酮戊酸（5-ALA）可在人体内由甘氨酸和琥珀酰辅酶A合成，并在线粒体内生成原卟啉Ⅸ(PpⅨ)，后者在胆色原脱氨酶作用下生成含铁血红素，经过亚铁螯合酶的催化生成含铁蛋白[1]。ALA的合成受含铁血红素的负调控作用，当含铁血红素高时，可抑制ALA的合成。因此，在正常人体内，

ALA的含量保持着动态平衡。当有外源ALA摄入，产生的PpⅨ易聚集在生长旺盛的细胞或肿瘤组织内，由于这些细胞缺乏亚铁螯合酶[2]，导致PpⅨ过

多的聚集。它作为一种内源性强光敏剂，经在一定波长光的照射下，并在组织氧的参与下，产生的活性氧（ROS），ROS能选择性损伤增殖旺盛的细胞或肿瘤细胞，而对周围的正常细胞无明显影响[3]；ROS可氧化生物大分子，破坏细胞器，至细胞的损伤，从而导致肿瘤细胞的死亡[4]，此方法称为ALA介导的光动力疗法（ALA-PDT）。

**2 ALA-PDT抗肿瘤效应**

ALA-PDT已被广泛应用在光动力治疗疾病和光动力诊断疾病中。Eugene

Jeong[5]将12个痤疮病人用ALA-PDT治疗，发现他们的皮脂腺细胞发生凋亡，症状改善，细胞表达Toll样受体：TLR-2和TLR-4,比治疗前表达增强，推断通过Fas/FasL途径发生凋亡。许多临床工作者将ALA-PDT与化疗药物联合使用，取得良好的效果。ALA-PDT与顺铂联合使用，可改善肿瘤干细胞来源的头颈部肿瘤细胞对顺铂的耐药[6]，因此，它可作为化疗药物的佐剂减弱肿瘤细胞的侵袭性。Yuan-gang Lu MD等[7]，将ALA-PDT用于皮肤恶性肿瘤切除术后的联合治疗，减少肿瘤的切除面积，而且复发率明显降低。他认为ALA-PDT尤其适用于皮肤表面的恶性肿瘤，因为皮肤容易暴露于光源下。此外，ALA-PDT联合化疗药已应用在临床其他领域研究，如膀胱癌[8]、胆管癌[9]、乳腺癌[10]和前列腺癌[11]等，提示ALA-PDT能增强化疗药物的细胞毒性，导致细胞凋亡。

**3 ALA-PDT与细胞凋亡**

ALA-PDT对细胞的毒性作用与它诱发的细胞凋亡有关。细胞凋亡或程序性细胞死亡是机体在生长、发育、分化和病理过程中，为了维持自身的稳定，在基因精细调控下所采取的一种主动的、积极的死亡方式。表现为细胞体积变小，密度增加，线粒体膜电位消失，细胞色素C释放到细胞质, DNA降解为180bp-200bp的小片段，膜内侧磷脂酰丝氨酸外翻到膜表面，出现凋亡小体，但不引起周围组织的炎症，最终被巨噬细胞吞噬。

**3.1线粒体凋亡途径**

细胞凋亡时，线粒体膜电位消失，膜通透性增加，线粒体内容物释放到胞质，此过程是引起细胞凋亡的关键环节。这一环节主要受Bcl-2家族蛋白调控。Bcl-2家族在线粒体凋亡途径中发挥重要作用。根据其结构和功能可分成三组：

第一组，抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-xl与Mcl-1；第二组，促凋亡蛋白如Bax 与

Bak。第一组抗凋亡蛋白通过跨膜域（TM域）定位在线粒体膜、内置网膜与核膜上[12]，第二组促凋亡蛋白以未活化的单体形式游离胞质中[13]。第一组蛋白含有4个结构域（BH1, BH2, BH3和BH4）,第二组蛋白含有3个结构域（BH1，

BH2和BH3），它们在凋亡刺激因素的作用下激活，结合到线粒体外膜上，产生线粒体的透化作用（MOMP），使线粒体膜间隙的螯合蛋白如Cyt-c、AKT释放到胞质参与凋亡[14]。第一组和第二组蛋白具备同源相似的BH1、BH2 和

BH3结构[15]，可形成异源二聚体，抗凋亡蛋白通过抑制促凋亡蛋白Bax、Bak对线粒体膜的透化作用来阻止细胞凋亡[16]。Bax和Bcl-2两者的比值决定细胞的凋亡与否，比值上调促进凋亡，比值下调抑制凋亡[17]。第三组Bcl-2家族蛋白包括Bid和Bad，只含有BH3结构域，通过直接作用于Bax和Bak，促进后者对线粒体的作用，导致细胞凋亡[18]。Bid可被Caspase8裂解形成有活性的

tBid而执行其促凋亡功能[19]。细胞凋亡过程中，Bcl-2家族蛋白相互作用，线粒体膜通透性增加，线粒体膜间隙蛋白Cyt-c释放到胞质[20]。Cyt-c含有衔接蛋白Apaf-1的结合位点，Apaf-1具有与Caspase9同源的激活和募集结合域，因此三者在ATP作用下形成凋亡小体，启动以Caspase9为起始凋亡蛋白酶的线粒体凋亡途径[21]。

**3.2死亡受体凋亡途径**

死亡受体Fas在外界凋亡刺激因子作用下，与配体FasL结合，并聚集衔接蛋白FADD, FADD 上含有起始凋亡蛋白酶Caspase8 的同源位点，形成

Fas/FasL、FADD和Caspase8的死亡受体信号复合物（DISC）。

以Caspase9组成的凋亡小体和Caspase8组成的DISC具备裂解激活效应蛋白酶Caspase3的能力，从而引发Caspase家族蛋白酶的级联反应[22]。多聚

ADP核糖聚合酶（PARP）是Caspase3的作用底物。PARP具有保持DNA稳定，修复DNA损伤的功能。当细胞启动凋亡程序时，活化的Caspase3可将

PARP剪切成85kD和24kD的小片段，前者与DNA结合不牢固，无催化能力，后者通过两个锌指结构不可逆结合到DNA断端，从而抑制DNA修复。PARP的剪切活化标示着细胞发生凋亡[23]。

**3.3 ALA-PDT诱导细胞凋亡途径**

肿瘤种类，光照剂量，光敏剂含量和在细胞器上的定位决定了ALA-PDT

引起细胞凋亡的途径。

ALA-PDT能抑制食管癌Eca-109细胞的增殖，ALA与细胞孵育4小时，可检测出在线粒体和细胞质上的定位，并引起Bax上调，Bcl-2下调[24]。人口腔癌Ca9-22细胞可检测出NF-κB-JNK途径引起下游Caspase8和9活化[25]。而Hideo Fukuhara[11]等利用亚铁螯合酶抑制剂增强5-ALA-PDT作用，发现前列腺癌PC-3细胞，与ALA孵育1小时，PpⅨ主要分布在线粒体；孵育3小时，细胞质内都检测有PpⅨ，提示PpⅨ可以从线粒体转移至细胞质；且未检测出

Caspase3活性，Caspase抑制剂也未能减轻细胞的死亡和挽救线粒体膜电压，从而推测细胞凋亡是通过依赖AIF的线粒体途径，与caspase途径无关。Dana

Grebenova[26]等在研究淋巴瘤白血病HL60细胞的ALA-PDT作用，得出结果：细胞的凋亡除了线粒体途径外，还通过由于钙失衡引起内质网应激有关的凋亡途径。Surajit Karmakar[27]等支持了上述的说法，人胶质瘤U87MG细胞在ALA-PDT后，线粒体可释放AIF和Cyt-c，提示存在不依赖Caspase的凋亡通路。内质网应激压力变化可使抗凋亡蛋白Bcl-2和Bcl-xl下调，Caspase3和9上调。Tomoe Kuhara[28]等比较了低剂量和高剂量光能源作用下的人皮肤鳞状细胞癌HSC-5细胞凋亡情况。低剂量照光ALA-PDT后，HSC-5细胞产生硫氧还原酶，有利于细胞的生长；而高剂量照光ALA-PDT后，细胞反而发生凋亡，硫氧还原酶低表达，Caspase3和PARP上调。而Sanjay Anand[29]等比较人皮肤癌细胞SCC13、HEK1细胞与正常角质细胞中PpⅨ的分布，发现对于正常细胞，PpⅨ只出现在胞膜上，而癌细胞出现在胞质和富含线粒体的核周，由此推断ALA-PDT对肿瘤细胞的杀伤更可能通过线粒体途径。

**4结论**

5-ALA作为安全、无毒副作用的光敏剂前体，已应用于临床各领域。ALA-PDT后产生过多的ROS，使细胞处于氧化应激状态，导致细胞线粒体电位下降，Cyt-c和AIF释放，TNF、Bcl-2和caspase家族蛋白酶的活化，以及NF-κB途径的参与，调控着细胞的死亡方式-凋亡。这些指标将用于指导ALA-PDT的抗癌效应，并提供实验依据。

**5参考文献**

[1] Peng Q, Berg K, Moan J, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: Principles and experimental research. Photochem Photobil. 1997, 65(2): 235-251.

[2] Ohgari Y, Nakayasu Y, Kitajima S, et al. Mechanisms involved in tumor cells: Relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin. Biochem Pharmacol, 2005, 71(1-2): 42-49.

[3] Milla Sanabria L, Rodriguez ME, Cogno IS, et al. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular Components of the tumor microenviroment. Biochim Biophys Acta, 2013, 1835(1): 36-45.

[4] Matsumoto Y, Muro Y, Banno S, Ohashi M, Tamada Y. Differential apoptotic pattern induced by photodynamic therapy and cisplatin in human squamous cell carcinoma cell line. Arch Dematol Res, 1996, 289(1): 52-54.

[5] Eugene Jeong, M. D., Ji Won Hong, B. S., Jung Ah Min, M. D. Topical ALA-Photodynamic Therapy for acne can induce apoptosis of sebocytes and down-regulate their TLR-2 and TLR-4 expression. Ann Dermatol, 2011, 23(1): 23-32.

[6] Chuan-Hang Yu, Cheng-Chia YU. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid(ALA) impairs tumor initiating and chemo-resistance property in head and neck canner-derived cancer stem cells. Plos One, 2014, 9(1): e87129.

[7] Yuan-gang Lu MD, Ph. D., Yuan-yuan Wang, et al. Efficacy of topical ALA-PDT combined with excision in the treatment of skin malignant tumor. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2014,11(2): 122-126.

[8] Ewelina Szliszka, Aleksandra Kawczyk-Krupka, Zenon P. Czuba, et al. Effect of ALA-mediated photodynamic therapy in combination with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL) on bladder cancer cells. Central european journal of urology, 2011, 64(3): 175-179.

[9] Cy Hyun Kim, Chung-Wook Chung, Hye Myeong Lee, et al. Synergistic effects of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy and celecoxib via oxidative stress in human cholangiocarcinama cells. International Journal of Nanomedicine, 2013, 8: 2173-2186.

[10] Soad Zakaria, Amira M, Gamal-Eldeen Phd, et al. Synergistic apoptotic effect of Doxil and aminolevulinic acid-based photodynamic therapy on human breast adenocarcinoma cells. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2014, 11(2): 227-238.

[11] Hideo Fukuhara MD, Keiji Inoue, Atsushi Kurabayashi, et al. The inhibition of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action for prostate cancer. Photodianosis and Photodynamic Therapy, 2013, 10(4): 399-409.

[12] Ospina A, Lagunas-Martinez A, Pardo J, et al. Protein oligomerization

Mediated by the transmenbrane carboxyl terminal domain of Bcl-xl. Febs Lett, 2011, 585(19): 2935-2942.

[13] Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, et al. Bcl-xl retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. Cell, 2011,145(1): 104-116.

[14] Thomas Landes, Jean-Claude Martinou. Mitochondrial outer menbrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial admission. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(4) S1: 540-545.

[15] Garcia-Saez AJ. The secrets of the Bcl-2 family. Cell Death Differ, 2012,

19(11): 1733-1740.

[16] Llambi F, Green DR. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the Bcl-2 family. Curr Opin Genet Dev, 2011, 21(1): 12-20.

[17] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ, et al. Bcl-2 heterodemerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell,1993, 74(4): 609-619.

[18] Garcia-Saez AJ. The secrets of the Bcl-2 family. Cell Death Differ. 2012, 19(11): 1733-1740.

[19] Kantari C, Walczak H. Caspase8 and Bid: caught in the act between death

Receptors and mitochondria. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(4) S1: 558-563 [20] Walensky LD, Gavathiotis E. Bax unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosilic monomer into a toxic mitochondrial pore. Trends

Biochem Sci, 2011, 36(12): 642-652.

[21] Reubold TF, Eschenburg S. A molecular view on signal transduction by the

Apoptosome. Cell Signal, 2012, 24(7): 1420-1424.

[22] Jia LT, Chen SY, Yang AG.. Cancer gene therepy targeting celluar apoptosis machinery. Cancer Treat Rev, 2012, 38(7): 868-876.

[23] Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP. PARP-1 cleavaage fragments: signatures of cell death proteases in neurodegeneration. Cell Commun Signal, 2010, 8: 31.

[24] Chen X, Zhao P, Chen F, et al. Effect and mechanism of 5-aminolevulinic acid

-mediated photodynamic therapy in esophageal cancer. Lasers Med Sci, 2011, 26(1): 69-78.

[25] Hsin-Ming Chen, Cheing-Meei Liu, Hsiang Yang. 5-Aminolevulinic acid induce apoptosis via NF-κB/JNK pathway in human oral cancer Ca9-22 cells. Oral Pathology Medicine, 2011, 40(6): 483-489.

[26] Dana Grebenova, Keterina Kuzelova, Karel Smetana, et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. Photochemistry and photobiology B: Biology, 2003, 69(2): 71-85.

[27] Surajit Karmakar, Naren L. Banik, Sunil J. Patel, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human gliblastoma U87MG cells. Neuroscience Letters, 2007, 415(3): 242-247.

[28] Tomoe Kuhara, Daisuke Watanabe, Yoichi Akita, et al. Thiredoxin upregula- tion by 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy in human skin squamous cell carcinoma cell line. Photodermatology, Photoimmunology& Photomedicine, 2008, 24(3): 142-146.

[29] Sanjay Anand, Golara Honari, Tayyaba Hasan, et al. Low-dose methtexate enhances aminolevulinate-based photodynamic therapy in skin carcinoma cells in vitro and in vivo. Clin Cancer Res, 2009, 15(10): 3333-3343.

致 谢

本课题是在导师黄慧芳教授悉心指导和关怀下完成的。在学习和科研实验中，我的知识结构和科研能力上了一个新台阶，这些都离不开慧芳老师的深切教诲与热情鼓励。她帮助我开拓研究思路，精心点拨，她一丝不苟的作风，严谨求实的态度，踏踏实实的精神，不仅授我以文，而且教我做人，给我终生受益之道。从课题设计到论文顺利通过盲审，倾注了她大量的心血，真心感谢她的教育和培养。同时也感谢我的同学陈万紫硕士给予的鼎力相助和引荐，默默支持，给我精神上的动力，使我的学业顺利完成。感谢协和医院基因工程实验室提供的实验平台以及原琴硕士、姜熙硕士、陈美环硕士、庾冬兰硕士、金晴硕士、杨辉硕士等在实验技术和操作上的指导。

感谢福建师范大学李步洪教授提供的课题和实验器材，和实验过程的指导和建议。感谢福建师大郑秋萍硕士提供的实验参考数据。借此机会，我特别感谢家人的宽容、无私的关爱和无限的支持。老师、亲人、同学的理解和帮助是我前进的动力和成功的基石。

**课题经费来源**

1.国家卫生和计划生育委员会科研基金（WKJ-FJ-30）

2.福建省杰出青年科学基金项目（2011J06022）**在学期间发表论文**

1.**蔡晶晶**，黄东红，谢若腾。鲍曼不动杆菌385株医院感染分布及耐药性分析。福建医药杂志，2011，33（5）：93-94.

2.**蔡晶晶**，林萍，谢若腾。探讨血浆D2聚体的临床应用价值。海峡药学，2015，

27(4)：181-182.