

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 光動力療法合併高溫腫瘤治療對於大腸癌細胞之影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2213-E-002-118-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學醫學工程學研究所

計畫主持人：王正一

計畫參與人員：賴秉杉、王姿文、彭正良

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 29 日

## 一、中文摘要

惡性腫瘤近幾年來一直是台灣地區十大死因的首位，值得注意的是結腸直腸癌排名第三名且有逐年增加的趨勢。儘管醫學科技日益進步，但目前癌症的主要治療仍脫離不了以手術切除、化學治療以及放射線治療等方式來破壞或抑制癌細胞增生。光動力治療是一種新興的癌症治療方式，主要應用於治療固態癌症，其作用機轉係以雷射光源或是其它非雷射光源激發細胞內的光感藥物，光感藥物受到光子的刺激逐步產生光化學作用，形成單相氧分子或自由基並破壞細胞內微細結構如粒腺體，因而導致細胞死亡。高溫腫瘤治療在臨床上由於會破壞癌細胞的細胞的膜構造而抑制其生長。兩種治療方式造成癌細胞死亡的機制不同，將其合併在治療上有加成的效果。

本計畫探討單獨使用光動力療法及高溫處理對於大腸癌細胞的影響，研究發現光動力療法或是高溫處理後，大腸癌細胞活性隨著時間增長而降低，LDH 隨著時間增加而增高，利用 Annexin V-FITC/PI 螢光染色觀察細胞都呈現凋亡及壞死的現象。光動力療法及高溫腫瘤治療皆會造成細胞死亡，但是機制不盡相同，因此如何合併才能達到最好的治療效果，有其進一步探討的必要。

**關鍵詞：**光動力療法、高溫腫瘤治療、大腸癌細胞

## 二、英文摘要

Recently, malignancy is the leading cause of mortality in Taiwan, and colon cancer accounted approximately 4000 deaths each year. Photodynamic therapy (PDT) is a promising new treatment for cancer that has been recently accepted in the clinic. PDT involves the localization of a light-sensitive drug in the target tissue prior to illumination using an appropriate wavelength. Exposure of tissue containing a sufficient concentration of photosensitizer to irradiation of adequate wavelengths initiates photodynamic activation to generate single oxygen free radicals and other reactive species, causing cellular damage and tissue necrosis. It is a procedure having the potential to selectively destroy malignant tissues without causing serious damage to the adjacent normal structures if light dosimetry can be delivered with care.

This study relates to studies on modes of phototoxicity after incubation of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) on colon cancer cells and compared with hyperthermia treated. The viability results show that the survivals of the colon cancer cells were decreased after PDT or hyperthermia alone as incubation time increased. The Annexin V-FITC/PI assay shows that the cells were apoptosis after PDT or hyperthermia treatment alone. Although PDT and hyperthermia both cause cell apoptosis, the mechanism are different. How to combine these two treatments and the sequence are need to study more.

**Keywords:** photodynamic therapy, hyperthermia, colon cancer cells

## 研究內容：

### 三、前言

根據行政院衛生署於九十二年公布「九十一年台灣地區十大死因」的統計及相關資訊，惡性腫瘤（癌症）已經蟬聯國人死因第一位長達逾二十年，其中大腸癌在男性女性皆為癌症死因第三位，代表大腸癌的好發率並不因性別而有所分別，而且大腸癌有逐年增加的趨勢，因此發展新興治療技術來治療癌症，未來能與台灣產業相結合，帶動台灣生醫產業的發展，具有相當重要的指標意義。

光動力療法（PDT）為一新興的治療技術，其方法是注射光敏感劑，讓藥劑附著在腫瘤細胞累積的血液蛋白，這些蛋白質將光敏感劑送至腫瘤，其作用機轉係以雷射光源或是其它非雷射光源激發細胞內的光感藥物，光感藥物受到光子的刺激逐步產生光化學作用，由激態回復到基態的過程中所釋放能量與細胞內氧分子結合，將血液中氧分子  $^3\text{O}_2$  激發成  $^1\text{O}_2$  狀態或自由基（free radicals）[1-3]，並破壞細胞內微細結構，譬如細胞膜、粒線體或核膜，進而對細胞本體或細胞的重要結構造成傷害使細胞死亡。本計畫採用的光感藥物為 5-aminolevulinic acid (5-ALA)，5-ALA 本身並不是光感物質，而是一個前驅藥物，經由血紅素合成路徑轉變成 PpIX（Protoporphyrin IX），PpIX 才是光感物質，經波長 635nm 的紅光照射之後可殺死細胞，其選擇性及活性皆極高，且副作用較小，是近十年來研究最多的光感劑，目前 FDA 已經核准通過於臨床治療某些癌症使用。

高溫腫瘤治療（hyperthermia, HT）是將腫瘤細胞溫度增高並破壞細胞的膜構造而抑制其生長，主持人先前曾與本所林文澧教授合作研究高溫腫瘤治療並已發表[4]。

本計畫發展光動力療法合併高溫腫瘤治療，探討個別治療對於大腸癌細胞的影響。

### 三、研究目的

本計畫目標為發展光動力療法合併高溫腫瘤治療，並探討個別治療及合併治療順序對於細胞死亡影響及細胞週期分析。第一年個別探討光動力療法與高溫腫瘤治療對於大腸癌細胞的影響。第二年合併治療並改變治療順序，探討對於大腸癌細胞死亡及細胞週期分析。

因此本計畫執行第一年研究目標主要是建立光動力療法及高溫腫瘤治療的實驗技術外，並評估單獨光動力療法及高溫腫瘤治療對於細胞毒性、細胞凋亡，並培養光動力治療的研究人才。

### 四、文獻探討

高溫腫瘤治療（hyperthermia, HT）是將腫瘤細胞溫度增高並破壞細胞的膜構造而抑制其生長，HT 可以明顯增加腫瘤的氧化，增進血流[5-6]，也可以增加血紅素和氧的解離[7]，原因是高溫會使得血紅素與氧的結合力下降。在合併治療時，光動力療法會使癌細胞缺氧，降低代謝甚至停止，使細胞內環境變酸[8]，有利於高溫腫瘤治療的效果[9]；高溫腫瘤治療則可以使腫瘤與氧結合，增加光動力治療的效果，由於兩種治療方式有互補的作用，如何結合兩種治療方式得到最佳的治療效果，是當前的重要課題。

目前國外研究光動力療法合併高溫腫瘤治療大多針對光感藥物 hypericin 為主，研究 5-ALA-PDT 合併 HT 的研究資料甚少，且研究主題多為探討熱休克蛋白質（Heat shock protein, HSP）活化的情形，HSP 是人體內一種重要的蛋白質，其功能在於幫助細胞內其他蛋白質的合成，利用與輸送，國外研究指出無論 HT 或是 PDT 皆會活化 HSP。而本研究主要是在探討個別治療與合併治療細胞死亡的情形，以及對於細胞週期的影響，目前尚無

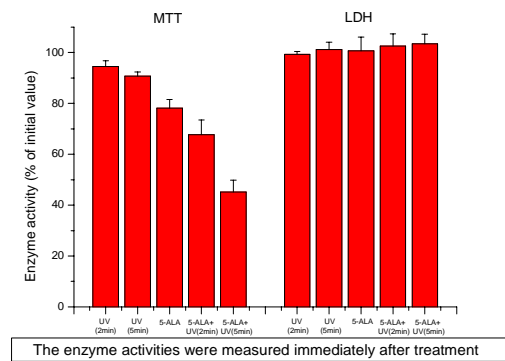
利用 ALA-PDT+HT 探討對於細胞週期的影響，因此本研究結果將具有學術價值。

## 五、實驗方法

1. 實驗設計將利用 MTT、LDH、Annexin V-FITC/PI、細胞週期分析來探討光動力療法與高溫腫瘤治療單獨對於大腸癌細胞 WiDr 的影響。
2. MTT 試驗是利用活細胞中的粒腺體可以將黃色的 MTT 轉換成藍色的 formazan 晶體，可以用來測量細胞中粒腺體的量，進一步評估細胞的存活率。
3. LDH (lactate dehydrogenase, LDH) 為細胞共有的酵素，在細胞死亡後便會因為細胞膜破裂而被釋放，因此和細胞死亡的個數有關。
4. 在細胞進行凋亡早期時，磷脂絲氨酸 (PS) 會外露於細胞膜外，AnnexinV 對於 PS 有親和性，利用 Annexin V-FITC 可以利用螢光顯微鏡偵測細胞凋亡的情形。

## 六、結果與討論

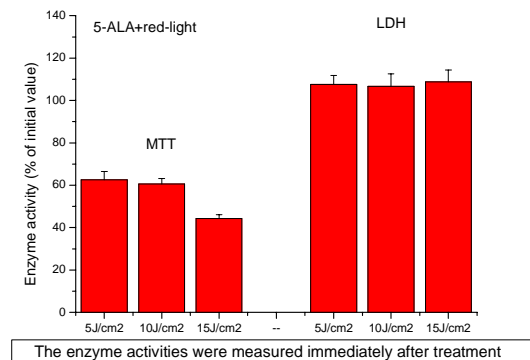
1. 不同 5-ALA-PDT (UV) 照射時間對於大腸癌細胞株 WiDr 的影響 (MTT 及 LDH)



圖一：5-ALA、5-ALA+不同 UV 照射時間對於 WiDr 的 MTT 及 LDH 活性的影響

圖一表示單獨 5-ALA、5-ALA+不同 UV 照射時間對於 WiDr 的影響。由 MTT 試驗得知 UV 照射時間 (2 分鐘及 5 分鐘) 使得細胞活性分別下降 5.5% 及 9.3%，影響並不大。單獨使用 5-ALA 會使得細胞活性下降 21.8%，與光動力研究大師 Kristian Berg 等人的發表值相近 (約 23%) [10]。5-ALA+UV (2 分鐘及 5 分鐘) MTT 值則分別下降 32.3% 及 54.9%，K. Berg 發表的值為 43% (UV 照射 2 分鐘)，UV 照射時間越長 5-ALA-PDT 效果越好。LDH 無論單獨照射 UV、單獨使用 5-ALA、以及 5-ALA+UV 與對照組無明顯差異。

2. 不同 5-ALA-PDT (635nm) 照射劑量對於大腸癌細胞株 WiDr 的影響 (MTT 及 LDH)

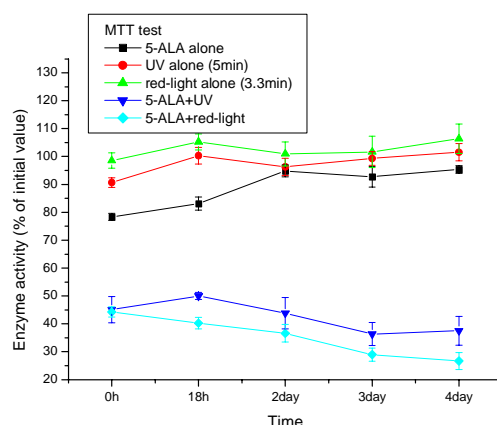


圖二：5-ALA+635nm 紅光照射劑量對於 WiDr 的 MTT 及 LDH 活性的影響

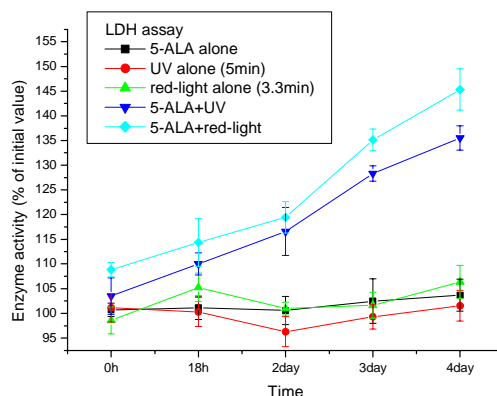
圖二表示單獨 5-ALA、5-ALA+不同紅光照射劑量對於 WiDr 的影響。由 MTT 試驗得知 5-ALA 照射不同劑量紅光 ( 5、10、15J/cm<sup>2</sup> ( 3.3min ) )，會使得細胞活性分別下降 37.4 %，39.5 及 55.8%，照射時間越長，所累積光劑量越多，MTT 值下降越多。LDH 實驗結果則較對照組微高，分別上升 7.6%、6.6%及 8.8%，不同照射劑量對於 LDH 並無明顯差異。

由圖一、圖二實驗得知 5-ALA-PDT 並不會使細胞立即破碎而放出 LDH，而是會先造成細胞的粒線體活性降低 ( 破壞粒線體 )，再進一步使細胞走向死亡途徑

### 3. 5-ALA-PDT 後不同時間 MTT、LDH 變化情形



圖三：5-ALA-PDT 處理後不同時間的 MTT 值變化情形



圖四：5-ALA-PDT 處理後不同時間的 LDH 值變化情形

利用圖一、圖二的實驗結果，選用 UV 照射時間 5 分鐘及紅光照射時間 3.3 分鐘，進一步探討 5-ALA-PDT 處理後 WiDr 大腸癌細胞於不同時間點 MTT 及 LDH 的變化。

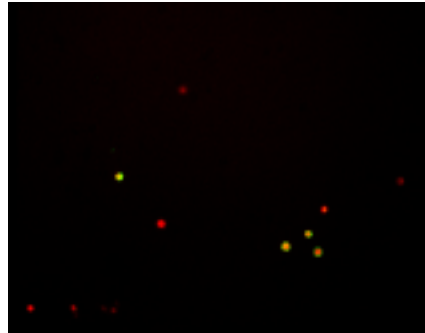
圖三表示單獨照光、單獨 5-ALA 以及 5-ALA-PDT 處理後不同時間的 MTT 變化情形。實驗結果得知，單獨加入 5-ALA 雖然會對細胞造成影響 ( 下降 21.8% )，但是隨著時間的增加細胞活性也會增加，因此加入 5-ALA 雖有些許立即的傷害，但經過一段時間細胞即可回復，因此 5-ALA 對於細胞的傷害是可回復的。5 分鐘的 UV 照射並不會造成細胞活性明顯下降，且處理後不同時間的細胞活性與對照組無明顯差異。3.3 分鐘的紅光照射處理後的不同時間的細胞活性也顯示其不受照光的影響，由此結果可知照射適當時間的 UV 以及

635nm 紅光不會造成細胞的破壞,因此在探討 5-ALA-PDT 的效果時可以排除光照射對於細胞的影響。5-ALA+UV 處理後細胞活性會隨著時間而降低至對照組的 37.5% (4 天後), 5-ALA+紅光處理後細胞活性也會降低至對照組的 26.7%(4 天後),且不論照射 UV 或紅光, 5-ALA-PDT 後細胞活性立即會下降,且隨著時間增加細胞活性下降越多,因此 5-ALA-PDT 會造成細胞不可逆的傷害。

圖四表示單獨照光、單獨 5-ALA 以及 5-ALA-PDT 處理後不同時間的 LDH 變化情形。由實驗結果得知單獨照 UV 或紅光、單獨 5-ALA 處理後, LDH 並不會隨著時間的變化而增加。但是 5-ALA-PDT, 不論是照射 UV 或是紅光, 一開始並不會明顯造成 LDH 的增加, 但隨著時間增長, LDH 值會越來越高, 4 天後 5-ALA-UV 會上升 35.5%, 而 5-ALA-紅光會上升 45.3%, 因為 LDH 需要在細胞死亡後細胞膜破裂而被釋放, 因此可以得知經過 PDT 處理後, 細胞膜並不會立即破裂, 但隨著時間的增加, 細胞死亡數目也跟著增加。

綜合圖三與圖四的實驗結果可以得知, 5-ALA-PDT 會立即造成細胞粒線體活性降低, 但不會造成細胞立即死亡破裂, 隨著時間增加, 粒線體活性降至更低, 細胞會逐漸死亡破裂而釋放出 LDH。

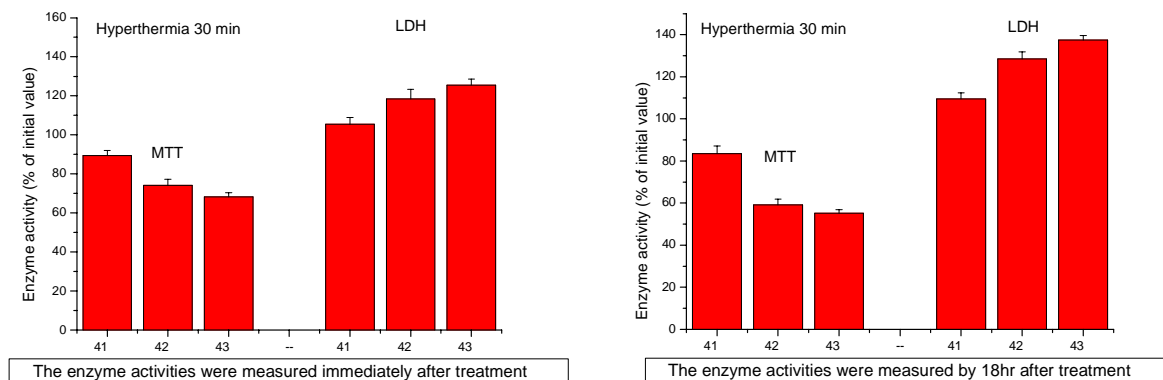
#### 4. 5-ALA-PDT 造成細胞走向凋亡途徑



圖五：WiDr 經 5-ALA-PDT 處理後, Annexin V-FITC+PI 染色後螢光顯微鏡觀察結果。

圖五顯示經由 5-ALA-PDT 處理後 18 小時, Annexin V-FITC+PI 染色後螢光顯微鏡觀察圖, 結果顯示細胞被 Annexin V-FITC (綠色螢光) 染到細胞膜, 表示細胞呈現細胞凋亡 (apoptosis) 的早期特性, 同時細胞也呈現紅色螢光 (PI), 代表有細胞壞死 (necrosis) 的情形, 進一步證實經過 5-ALA-PDT 處理後細胞會走向死亡。

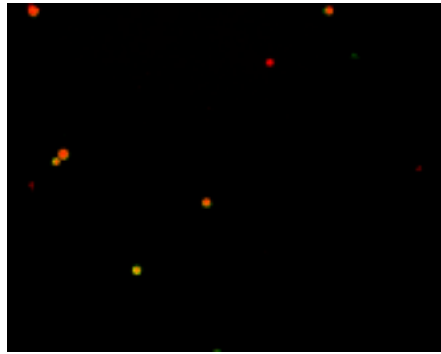
#### 5. 不同溫度的熱處理對於大腸癌細胞株 WiDr 的影響 (MTT 及 LDH)



圖六：不同溫度的熱處理後 0 小時及 18 小時對於 WiDr 的 MTT 及 LDH 活性的影響

圖六顯示不同溫度的熱處理 30 分鐘後 0 小時及 18 小時對於 WiDr 的 MTT 及 LDH 活性的影響，MTT 結果指出熱處理溫度越高，造成粒線體活性下降越多，下降幅度會隨著處理後時間增加而變大，41 的熱處理無法造成大量的細胞死亡，42 及 43 的熱處理結果較相近會造成較多的細胞死亡，0 小時後 MTT 值分別下降 40.9% 及 44.9%。LDH 結果顯示 41 的處理並不會立即造成大量的細胞死亡，43 的熱處理會使得 LDH 立即上升 25.5%，18 小時後更造成 37.5% 的上升。

#### 6. HT 造成細胞死亡的觀察



圖七：WiDr 經 HT 處理後 Annexin V-FITC+PI 染色後螢光顯微鏡觀察結果  
圖七顯示經由 43 HT 處理 30 分鐘後，Annexin V-FITC+PI 染色螢光顯微鏡觀察圖，結果呈現類似 PDT 的結果，細胞具有細胞凋亡及細胞壞死的情形。

### 七、結論

1. PDT 處理後細胞死亡隨著時間而增加，且造成之細胞死亡為不可回復。
2. HT 處理後細胞死亡同樣隨著時間而增加，18 小時後細胞死亡情況更為明顯。
3. PDT 與 HT 造成細胞死亡的機制不盡相同，如何合併治療以獲得最大的效果，將需要進一步探討並有其重要意義。

### 八、計畫成果自評

1. 研究成果目前已在結果整理及論文英文撰寫階段，預期將發表在具水準的期刊。
2. PDT 與 HT 機制不同，且如何合併效果最大，具有相當研究意義，因此第二年計畫的執行有其必要性。

### 九、參考文獻

1. Spikes D. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 244(1975), 496-508.
2. Ochsner M., *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 39(1997), 1-18.
3. Philips D., *Prog. Reaction Kinetics*, 22(1997), 175-300.
4. Lu BY, Yang RS, Lin WL, Cheng KS, Wang CY, Kuo TS, Theoretical study of convergent ultrasound hyperthermia for treating bone tumors, *Medical Engineering and Physics*, 2000, 22, 253-263.
5. Horsman, M. R. and J. Overgaard, "Can mild hyperthermia improve tumour oxygenation?", *Int. J. Hyperthermia*, 13(1997), 141-147.

6. Okajima, K., R. J. Griffin, K. Iwata, A. Shakil and C. W. Song, "Tumour oxygenation after mild-temperature hyperthermia in combination with carbogen breathing: dependence on heat dose and tumor type", *Radiation Res.*, 149(1998), 294-299.
7. Slonim, N. B. and L. A. Hamilton, *Respiratory Physiology*, 4<sup>th</sup> ed., pp. 128-130.
8. M. Chopp, F. W. Hetzel and Q. Jiang, "Dose-dependent metabolic response of mammary carcinoma to photodynamic therapy", *Radiation Res.*, 121(1990), 288-294.
9. C. W. Song, "Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment", *Cancer Res.*, 44(1984), 4721-4730.
10. O. A. Gederaas, M. H. Rasch, K. Berg, et. Al: Photodynamically induced effects in colon carcinoma cells (WiDr) by endogenous photosensitizers generated by incubation with 5-aminolevulinic acid, *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, 49(1999), 162-170.