

脉络膜新生血管光动力治疗药物光敏剂的研究进展

周晓芳, 徐国兴

基金项目: 中国国家自然科学基金资助项目 (No. 81070715); 中国卫生部科研基金资助项目 (No. WKJ2008-2-61); 中国福建省创新平台基金资助项目 (No. 2010Y2003)

作者单位: (350005) 中国福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院眼科 福建省眼科研究所

作者简介: 周晓芳, 在读硕士研究生, 研究方向: 视网膜病。

通讯作者: 徐国兴, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 晶状体与视网膜疾病的基础与临床。zjfmuxg@pub5. fz. fj. com

收稿日期: 2011-12-09 **修回日期:** 2012-01-04

Advanced study on the photosensitizer of photodynamic therapy on choroidal neovascularization

Xiao-Fang Zhou, Guo-Xing Xu

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81070715); Science Research Foundation of Ministry of Health, China (No. WKJ2008-2-61); Innovative Platform Foundation of Fujian Province, China (No. 2010Y2003)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fujian Institute of Ophthalmology, Fuzhou 350005, Fujian Province, China.

Correspondence to: Guo-Xing Xu, Fujian Institute of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. zjfmuxg@pub5. fz. fj. cn

Received: 2011-12-09 Accepted: 2012-01-04

Abstract

• Choroidal neovascularization (CNV) mainly caused by age-related macular degeneration (AMD), can lead to serious central vision effect, even blindness. At present, the photosensitizer Verteporfin mediated photodynamic therapy (PDT) on CNV achieved remarkable results. Because of the price, the clinical treatment is limited. So the scholars of many countries devoted to the research and development of new photosensitizer to obtain replacement for the utility of Verteporfin, this paper applied to the advanced study on the photosensitizer of PDT on CNV.

• **KEYWORDS:** photosensitizer; choroidal neovascularization; photodynamic therapy

Zhou XF, Xu GX. Advanced study on the photosensitizer of photodynamic therapy on choroidal neovascularization. *Guji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(2):249-252

摘要

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 主要继发于年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD), 严重影响中心视力, 甚至致盲。目前, 以光敏剂维替泊芬介导的光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 治疗 CNV 取得了令人瞩目的效果。但由于维替泊芬价格昂贵等问题, 临床应用受到一定限制。因此各国的学者均致力于新型光敏剂的研发, 以期获得替代维替泊芬的效用, 我们就应用于 CNV 治疗的光敏剂的研究进展作一综述。

关键词: 光敏剂; 脉络膜新生血管; 光动力治疗

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2012. 02. 17

周晓芳, 徐国兴. 脉络膜新生血管光动力治疗药物光敏剂的研究进展. *国际眼科杂志* 2012;12(2):249-252

0 引言

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 又称视网膜下新生血管, 主要是因为 Bruch 膜的异常, 来源于脉络膜的新生血管生长进入视网膜色素上皮 (RPE) 或神经视网膜下, 主要继发于年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD)。Zarbin 等^[1]认为这一过程开始于环境和基因因素共同促成的与年龄相关的氧化应激反应。CNV 形成后, 由于管壁的通透性高于正常血管, 易引起出血和渗出, 继而形成瘢痕, 如果累及黄斑, 会严重影响中心视力而致盲。在西方发达国家, AMD 是导致 60 岁以上人群失明的首要原因。随着我国进入老龄化社会, CNV 已成为影响我国老年人生活质量的重要问题。光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 是一种利用光化学反应进行治疗的技术, 是用激光照射被光敏剂积存的靶组织, 产生光化学效应, 损伤靶组织而达到治疗目的。

1 光敏剂治疗 CNV 的作用机制

光敏剂是 PDT 治疗的核心物质, 光敏剂的不断发展提升了 PDT 的价值。光敏剂的光动力活性、光吸收特性和靶向特性决定了其临床应用价值。光敏剂在相应波长光的激发下, 吸收光子的能量由基态升迁至极不稳定的激发态, 激发态的光敏剂可形成三重态, 并与周围的化学物质产生反应, 形成 I 型与 II 型光动力反应。I 型反应主要是指激发态的光敏剂与相邻物质发生电子或氢原子转移形成的氧化还原反应, 导致自由基或自由基离子的产生, 在此过程中也有氧的参与, 产生过氧化物、超氧离子和羟自由基等。II 型光动力反应主要是三重态光敏剂把能量传递给基态分子氧, 产生单态氧 ($I O^2$)。单态氧是一种高反应活性的物质, 它具有亲电性, 能高效氧化细胞中的生物分子, 如核酸、不饱和脂肪酸及蛋白间的桥连结构, 改变生物膜渗透性和流动性, 激活或抑制了膜上的酶蛋白和

受体,最终引起细胞的凋亡与坏死^[2,3]。线粒体被认为是光损伤最有效的靶器官^[4]。研究发现,结合到线粒体上的光敏剂主要诱导凋亡,而结合到溶酶体上的光敏剂则主要引起细胞死亡^[5]。1995年 Miller等^[6]首次将 PDT 引入眼科治疗,CNV 管径细且迂曲,较易储存光敏剂等分子物质,且 CNV 内皮细胞增殖旺盛、高表达低密度脂蛋白(LDL)受体,所以易于和 LDL-光敏剂复合物结合。采用光敏剂最大吸收峰相应的光照射产生的自由基和单态氧,可以直接破坏毛细血管内皮细胞,氧化毛细血管的有关蛋白和脂质,破坏血管内皮细胞、线粒体、溶酶体等细胞器,破坏的血管内皮细胞失去正常连接,引起血小板聚集、纤维蛋白凝块形成、血栓形成,从而达到封闭新生血管的作用。

2 光敏剂维替泊芬介导的光动力疗法

维替泊芬是第一个通过随机临床试验证实 CNV 患者可减少视力丧失的光动力药物^[7,8],也是目前唯一被批准用于治疗典型性湿性 AMD 的药物。CNV 血管壁的组成包括血管内皮细胞、内皮细胞前体、周皮细胞,这些细胞都是维替泊芬的靶组织。维替泊芬在注射后积存于其中产生活性氧,引起局部细胞的改变,导致血栓的形成。研究发现,维替泊芬的作用不止封闭新生血管,还会引起 VEGF, VEGFR3 和 PEDF 的表达^[9],新生血管的封闭有可能会改变因子的释放或调整信号通路,这方面还有待于进一步的研究。PDT 治疗除了考虑 CNV 的病因、病变大小、定位、程度、年龄和其他全身性疾病外,激光能量的选择对经维替泊芬治疗的 PDT 也很重要。有研究表明,25J/cm² 的激光能量可以减少脉络膜的低灌注,与 50J/cm² 的激光能量产生的效果基本相似^[10],而脉络膜的低灌注和缺氧会造成 VEGF 的上调,因此减少激光能量对 PDT 的治疗可能利大于弊。对于 PDT 治疗后会导致 VEGF 的上调,不少学者提出 PDT 联合抗 VEGF 以治疗 CNV^[11]。此外,还有一些其他的联合治疗方式,相信对 PDT 治疗能起到更好的疗效。但是,维替泊芬是天然产物的半合成产物,合成过程较复杂,总体产率低、售价较贵,限制了部分患者的临床应用,眼科领域都期盼能有更多安全、有效、价廉的光敏剂应用到临床。

3 光敏剂的分类

3.1 第一代光敏剂 一般认为,1970 和 1980 年代早期研发的卟啉等光敏剂称为第一代光敏剂。第一代光敏剂有:血卟啉衍生物(hematoporphyrin derivative, HpD)、二血卟啉醚(dihematoporphyrin ether, DHE)和光敏素II(Photofrin II),现主要用于肿瘤的治疗。

3.2 第二代光敏剂 1980 年代后期制成的卟啉衍生物或合成物称为第二代光敏剂,临床正在使用的以第二代光敏剂居多。第二代光敏剂部分克服了第一代光敏剂的组分复杂、对组织选择性和光动力损伤强度的稳定性都很差的缺点。第二代光敏剂的主要优点为光敏期短、作用的光波波长较长,可增加作用的深度,产生的单态氧也较多,对肿瘤更具选择性。大多为卟啉类化合物的衍生物,包括卟啉、卟吩、红紫素、内源性卟啉等,其它还有金属酞菁、稠环醌类化合物等。

3.3 第三代光敏剂 第三代光敏剂通常指一些修饰产物,

包括各种物质交联的 Npe6 和酞菁类,尚处在动物研究阶段,是在第二代光敏剂的基础上交联上某些特殊的化学物质,进一步提高了肿瘤组织的选择性。这些物质简单的如多聚体和脂质体,复杂的如肿瘤组织表达的抗原或受体的相应抗体和配体等,PDT 治疗更具特异性,而且结构稳定,高效低毒。目前第三代光敏剂的研究已获得很大的进展,且有的已进入临床研究阶段。

4 各种处于试验阶段的治疗 CNV 的光敏剂

4.1 锡乙基初红紫素 红紫素(purpurins)类光敏剂是一个家族,较有代表性的有初红紫素(ET2)、八乙基红紫素(NT2)等。在有些红紫素大环中加一个金属原子形成金属红紫素如含锡,形成锡乙基初红紫素(SnET2)和锡八乙基红紫素(SnNT2)等,它们多在 664nm 处有较强吸收峰。SnET2 是一种疏水性的光敏剂,主要通过血浆中脂蛋白运输定位于血管内皮细胞中的线粒体,导致血管内皮细胞凋亡,阻止新生血管的形成,而且不会导致血管破裂和炎症等较剧烈反应。Peyman 等^[12]对有色兔进行经 SnET2 介导的 PDT,发现脉络膜内皮细胞、RPE 细胞、视网膜外层有损伤,提示 SnET2 介导的 PDT 治疗 CNV 的可行性。

4.2 N-天门冬酰基二氢卟吩 二氢卟吩 e6 (chlorin e6)属叶绿素类光敏剂,经化学处理后可得到 N-天门冬酰基二氢卟吩(N-aspartyl chlorin e6, Npe6),Npe6 也是在波长 664nm 处有一强吸收峰,在体内存留时间短、清除快,现已进入临床试用。Mori 等^[13]采用 25mg/kg Npe6 和 15mg/kg 吲哚青绿注射激光造模形成的 CNV 猴模型,证实 Npe6 选择性积聚于 RPE 和脉络膜组织,并能较快从视网膜脉络膜组织中清除。

4.3 得克萨菲啉 得克萨菲啉(lutetium texaphyrin, Lu-Tex)即 PCI-0123,波长为 732nm,是一种纯品的亲水性光敏剂,对新生组织新生血管选择性强,不需运输载体包裹。研究表明 Lu-Tex 能较快从血浆中清除,其中 15.8% 与 LDL 结合,39.7% 与高密度脂蛋白(HDL)结合,而且对视网膜没有毒性,其特点是既可用于荧光血管造影显影视网膜和脉络膜,又可作为光敏剂进行治疗,具有很好的应用前景^[14]。Reem 等发现 Lu-Tex 介导的 PDT 和血管他汀联合作用可以加强对牛视网膜毛细血管内皮细胞(bovine retinal capillary endothelial cells, BRCEs)的细胞毒作用,而对 RPE 细胞无影响,此方法可以用于提高经 Lu-Tex 介导的 PDT 的选择性^[15]。Lu-Tex 作用 BRCEs 和 RPE 后通过 Bcl-2 家族的选择性调节来诱导凋亡,而且 BRCEs 和 RPE 的凋亡机制不同。

4.4 甲基氯化铷鲍光敏素(MV6401) Photopoint MV6401 是加拿大圣巴巴拉 Miravant 制药公司的产品,是鲍光敏素类的新型光敏剂,在鲍光敏素的大环中心螯合氯化铷,分子量为 696.9,以磷酸卵磷脂乳剂全身静脉给药,经 MV6401 的 PDT 在急性期会引起血管收缩,远期会导致血栓形成,而对周围的正常血管影响较小,血管通透性增加可能在血管关闭中发挥作用,血管性水肿是白细胞血小板聚集并与内皮细胞相互作用,引起机械性阻塞所致^[16]。另外, MV6401 有两个吸收峰,分别是 423nm 和 659nm, MV6401 在 0.15mmol/kg 的剂量,激光能量在 3.3~20J/cm² 之间时能高选择性关闭正常兔脉络膜毛细血管^[17],而在

灵长类动物, 0.15mol/kg 的剂量, 增加注射后激活时间 (60~90min) 和低能量激光照射 (10~20J/cm²) 能高选择性关闭正常脉络膜毛细血管和中型脉络膜血管, 对视网膜影响极小^[18]。

4.5 金属酞菁 酞菁是卟啉类配合物, 它是由 4 个吡咯单元通过 4 个 N 原子连接起来, 形成一个大的共轭体系。酞菁的吸收波长在 600~800nm 之间。酞菁作为 PDT 的光敏剂具有以下优点: 有较高的纯度; 有良好的光热稳定性和生理活性; 红光区吸收较强; 有良好的两亲性 (疏水性和亲水性); 对肿瘤的选择性好; 有较适宜的吸收波长和较高的摩尔消光系数。酞菁大环可以络合金属元素称为金属酞菁, 主要的金属酞菁光敏剂有: 氯代碘化铝酞菁 (AlClPcS)、邻苯二甲酰亚氨基酞菁锌 (ZnPcS2P2)、四磺酸酞菁锌 (ZnPcS4) 和四磺酸酞菁铝 (AlPcS4) 等。酞菁类光敏剂存在着 3 个可变的结构因素: 中心离子、环取代基、轴向配体。有研究显示金属酞菁的光敏作用同样可以氧化损伤心磷脂, 当心磷脂被氧化, 细胞色素 C 释放到膜间隙, 推测经酞菁硅 (Pc4) 的 PDT 治疗导致细胞死亡是因为氧化导致发生在线粒体内膜的细胞色素 C 和心磷脂的损伤^[19]。Huang 等^[20]对新型光敏剂 ZnPcS4 作用于 CNV 的 PDT 治疗进行研究, 发现积存于 CNV、脉络膜毛细血管、RPE 的 ZnPcS4 在荧光显微镜下能够很好的显影, 静脉注射 10~20min 后 ZnPcS4 吸收达到高峰, 而静脉注射 20min 后进行 670nm 激光照射可使 CNV 完全封闭, 对周围组织及视网膜的影响极小。白蛋白是血清中一种重要的蛋白, 它对负电荷分子有较大的亲和力, 能与许多内源及外源性化合物结合, 起到存储与转运作用, 对于以 BSA 作为载体的 PDT 治疗有多方面的报道。Huang 等^[21]用 ZnPcS4 和 ZnPcS4-BSA 作用于 RPE 的效果进行对比研究, 发现 ZnPcS4 和 ZnPcS4-BSA 加入 RPE 后 4h 的 PDT 分别引起 60.71% 和 90.48% 的细胞死亡率, 通过活性氧及线粒体膜电位的测定均提示有明显致细胞凋亡的作用。负载芳醚树枝状酞菁锌聚合物纳米粒子是一种新型的第三代光敏剂, 由酞菁锌的周边引入芳醚树枝状大分子取代基, 以及树枝状酞菁锌与两亲嵌段共聚物自组装形成, 具有理想光敏剂的各种特征。聚合物胶束以亲水性聚乙二醇与疏水性聚合物如聚氨基酸、聚乳酸或聚氧化丙烯构建的嵌段共聚物, 其在水中溶解后自发形成高分子胶束, 完成对药物的增溶和包裹。通过控制合成可将聚合物胶束的尺寸降至 100nm 以下, 由于胶束独特小尺寸的性质, 通透性高, 可以进入许多大粒子难以进入的组织器官或者难以越过的生物屏障, 在新生组织内部特异性富集。亲水聚合物链段可以促进聚合物载体在血液中的循环和输送到新生组织附近, 疏水链段使聚合物载体易被新生组织吸收。因此聚合物纳米离子在靶向新生组织药物输送方面已成为最有发展前途的方法之一^[22]。

4.6 竹红菌素 竹红菌素 (HA) 是我国特产的天然光敏物质。HA 具有亲脂性, 易于聚集在细胞膜上, HA 在二甲亚砜溶液中, 其在可见光区均呈现三个吸收峰, 波长为 475, 545 和 585nm, 它的吸收峰位不随浓度改变而位移, 谱形亦无变化, 只是吸收值随浓度的增加而增高, 说明 HA 在高浓度下并不形成聚集态。HA 具有许多优势, 如原料易

得、易纯化、不易聚集 (聚集降低了 HpD 的光疗效果)、三重态氧量子产率高、体内代谢快等^[23]。HA 的光敏靶组织是细胞膜, 产生膜自由基诱导 DNA 损伤, 并且在线粒体膜促进凋亡诱导因子 Bax 表达, 降低凋亡抑制因子 Bcl-2 表达, 显示 HA 诱导细胞凋亡与 Bax 和 Bcl-2 基因的平衡有关^[24]。

4.7 其他类型光敏剂 Stakel 是钡取代的叶绿素衍生物, 带负电荷, 具有亲水性, 最大吸收波长在 753nm 左右。Berdugo 等^[25]对经 Stakel 和维替泊芬的 PDT 对脉络膜毛细血管的影响进行比较, 经 Stakel 的治疗参数是能量 50J/cm², 剂量 5mg/kg, 照射时间 1min, 经维替泊芬的治疗参数是 100J/cm², 剂量 12mg/m², 照射时间 5min, 前者能封闭 100% 的血管, 未发现对 RPE 损伤; 后者封闭 89% 的血管, 但会造成 RPE 的损伤, 提示 Stakel 用于治疗 CNV 选择性封闭血管的巨大潜力。

5 展望

随着药物研究的深入开展, 越来越多针对于 CNV 治疗的光敏剂不断被研发并进入实验和临床研究。相信随着各种第三代酞菁光敏剂研究的不断深入, 第三代酞菁光敏剂将为 CNV 患者带来复明的曙光。

参考文献

- 1 Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2004;22:598-614
- 2 Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3: 380-387
- 3 Takahashi H, Itoh Y, Miyauchi Y, et al. Activation of two caspase cascades, caspase 8/3/6 and caspase 9/3/6, during photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-S10 (Na), in normal human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 2003;295:242-248
- 4 Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, et al. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 2004;1704(2): 59-86
- 5 Kessel D, Luguya R, Vicente MG. Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distributions. *Photochem Photobiol* 2003;78:431-435
- 6 Miller JW, Walsh AW, Krltiller M, et al. Photodynamic therapy of experimental choroidal neovascularization using lipoprotein-derived benzoporphyrin. *Arch Ophthalmol* 1995;113:810-818
- 7 Blinder KJ, Blumenkranz MS, Bressler NM, et al. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization pathologic myopia; 2-year results of randomized clinical trial-VIP no. 3. *Ophthalmology* 2003; 110: 667-673
- 8 Blumenkranz MS, Bressler NM, Bressler SB, et al. Verteporfin therapy for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration; three-year results of an open-label extension of 2 randomized clinical trials-TAP Report 5. *Arch Ophthalmol* 2002;120: 1307-1314
- 9 Schmidt-Erfurth U, Schlotzer-Schrehard U, Cursiefen C, et al. Influence of photodynamic therapy on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor 3, and pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(10):4473-4480
- 10 Michels S, Hansmann F, Geitzenauer W, et al. Influence of treatment parameters on selectivity of verteporfin therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:371-376
- 11 Dhalla MS, Shan GK, Blinder KJ. Combined photodynamic therapy with verteporfin and intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularization

- in age-related macular degeneration. *Retinal* 2006;26:988-993
- 12 Peyman GA, Moshfeghi DM, Moshfeghi A, *et al.* Photodynamic therapy for choriocapillaris using tin ethyl etiopurpurin(SnET2). *Ophthalmic Surg Lasers* 1997;28(5):409-417
- 13 Mori K, Kanai K, Peyman GA, *et al.* Intraocular biodistribution of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a primate choroidal neovascularization model. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2007;38(2):142-147
- 14 Blumenkranz MS, Woodburn KW, Qing F, *et al.* Lutetium Texaphyrin (Lu-Tex): A Potential New Agent for Ocular Fundus Angiography and Photodynamic Therapy. *Am J Ophthalmol* 2000;129(3):353-362
- 15 Renno RZ, Delori FC, Holzer RA, *et al.* Photodynamic Therapy Using Lu-Tex Induces Apoptosis In Vitro, and Its Effect Is Potentiated by Angiostatin in Retinal Capillary Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(12):3963-3971
- 16 Dolmans DE, Kadambi A, Hill JS, *et al.* Vascular Accumulation of a Novel Photosensitizer, MV6401, Causes Selective Thrombosis in Tumor Vessels after Photodynamic Therapy. *Cancer Res* 2002;62:2151-2156
- 17 Ciulla TA, Criswell MH, Snyder WJ, *et al.* Photodynamic therapy with PhotoPoint photosensitizer MV6401, indium chloride methyl pyropheophorbide, achieves selective closure of rat corneal neovascularisation and rabbit choriocapillaris. *Br J Ophthalmol* 2005;89:113-119
- 18 Ciulla TA, Criswell MH, Danis RP, *et al.* Evaluation of photopoint photosensitizer mv6401, indium chloride methyl pyropheophorbide, as a photodynamic therapy agent in primate choriocapillaris and laser-induced choroidal neovascularization. *Retina* 2004;24(4):521-529
- 19 Miller JD, Baron ED, Scull H, *et al.* Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc4: The case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;224(3):290-299
- 20 Huang Y, Xu G, Peng Y, *et al.* Zinc phthalocyanine tetrasulfonate (ZnPcS4): a new photosensitizer for photodynamic therapy in choroidal neovascularization. *J Ocul Pharmacol Ther* 2007;23(4):377-386
- 21 Huang Y, Xu GX, Peng YR, *et al.* Photodynamic effects of ZnPcS4-BSA in human retinal pigment epithelium cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009;25(3):231-238
- 22 Nishiyama N, Morimoto Y, Jang WD, *et al.* Design and development of dendrimer photosensitizer-incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(4):327-338
- 23 魏玉德. 竹红菌素研究的进展. *中国实用医药* 2008;3(11):147-149
- 24 Fei XF, Chen J, Zheng KY, *et al.* Apoptotic effects of hypocrellin A on HeLa cells. *Chem Res Chinese U* 2006;22(6):772-775
- 25 Berdugo M, Bejjani RA, Valamanesh F, *et al.* Evaluation of the new photosensitizer Stakel (WST-11) for photodynamic choroidal vessel occlusion in rabbit and rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(4):1633-1644