

## 中药类光敏剂金丝桃素的光谱学特性

王晓芳,张昌莘,林梓毫,方运良,李天乐,朱伟玲  
广东石油化工学院理学院,广东 茂名 525000

**【摘要】**本研究系统地研究了金丝桃素(HY)的紫外-可见吸收光谱、光漂白和荧光光谱特性,为HY的临床应用提供一定的参考。实验测量了不同浓度HY-二甲基亚砷溶液的紫外-可见吸收光谱,结果显示HY在可见光范围内存在多个吸收峰,其中,594 nm处的吸收最强,这表明594 nm为HY光动力治疗的首选光源波长;HY的光漂白特性研究表明,HY的初始浓度越高,光漂白所需的时间越长;HY的荧光光谱研究表明,荧光光谱在可见光范围内也存在多峰结构,其中,643 nm处的荧光峰最强且半峰宽最窄,因此,在光动力诊断中,采用643 nm荧光发射能大大提高检测的灵敏度。

**【关键词】**金丝桃素;光谱特性;吸收光谱;光漂白特性;荧光光谱

**【中图分类号】**R73;O43

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2016)09-0948-04

## Spectral characteristic of traditional Chinese medicine photosensitizer hypericin

WANG Xiao-fang, ZHANG Chang-xin, LIN Zi-hao, FANG Yun-liang, LI Tian-le, ZHU Wei-ling

Department of Physics, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming 525000, China

**Abstract:** The ultraviolet-visible absorption spectrum, photobleaching and fluorescence spectrum characteristics of hypericin (HY) were systematically studied to offer some reference data for the clinical application of HY. The ultraviolet-visible absorption spectrum of varied concentrations of HY in dimethyl sulfoxide (DMSO) solution is investigated. The result indicates that HY has several absorption peaks in the range of visible light, and that the absorption at 594 nm is maximum, which indicates that the 594 nm is the first choice for the HY photodynamic therapy. Photobleaching experiment results show that the higher the initial concentration of HY, the longer the time is required for the photobleaching. The fluorescence spectrum research shows that fluorescence spectrum has several peaks in the range of visible light, in which the fluorescence peak at 643 nm has the largest emission intensity and the lowest half-peak width. The detection sensitivity is greatly improved by using the fluorescence emission at 643 nm.

**Key words:** hypericin; spectral characteristic; absorption spectrum; photobleaching; fluorescence spectrum

### 前言

光动力诊断和治疗是随着光纤技术、激光医学和内镜技术发展而兴起的恶性肿瘤诊断和治疗方法<sup>[1-2]</sup>。光动力诊断是指光敏剂对肿瘤组织具有特异亲和性,在肌体中注射一定浓度的光敏剂后,在特定波长激光的激发下,可检测到肿瘤组织的特征荧光,由于正常组织中的光敏剂浓度低,所以正常组织的发光很弱,最终达到鉴别、诊断早期肿瘤的目的。光动力治疗则是用特定波长的光激活光敏剂,产生具

有细胞毒性的活性氧物质,即单线态氧,从而选择性地杀伤快速增殖的细胞。光动力诊治中,光敏剂起着至关重要的作用。寻找高效、低毒的光敏剂一直是光动力诊治领域中最受各国关注的重大课题。近年来的研究发现,某些中草药如金丝桃素(Hypericin, HY)<sup>[3-6]</sup>、姜黄素<sup>[7-8]</sup>、黄连素<sup>[9-10]</sup>、大黄酸<sup>[11]</sup>、大黄素<sup>[12-13]</sup>等具有一定的光敏活性和细胞凋亡诱导作用。鉴于中国有丰富的中草药资源,有望从中草药提取物中研制出高效、低毒且成本较低的新型光敏剂。

HY是从金丝桃属植物中分离得到的一种天然光敏剂,是贯叶连翘中最具生物活性的物质,具有抗病毒、抗抑郁和光活性等作用,广泛存在于贯叶连翘及其同属植物中。研究表明,光照条件下HY吸收光子,然后激发单线态氧,可以用来治疗如膀胱癌、乳腺癌、前列腺癌、垂体瘤等癌症<sup>[14-17]</sup>。近年来,贯叶

**【收稿日期】**2016-03-27

**【基金项目】**国家自然科学基金(61475195);广东省自然科学基金(2015A030313873);广东省科技计划项目(2010b080701066)

**【作者简介】**王晓芳,女,博士研究生,助理研究员,研究方向:材料的光谱学特性,E-mail: mmwangxf@gdupt.edu.cn

连翘逐渐成为世界最畅销的抗癌草药之一。在中国,贯叶连翘地理分布广、资源丰富、价格低廉,为HY的提取及研究提供了天然的条件。HY抗肿瘤活性的相关文献较多,但从光谱学方面,系统地研究HY的相关报道较少。本论文通过对不同浓度HY的紫外-可见吸收光谱、光漂白特性和荧光光谱等进行实验分析和研究,为HY临床诊断中最佳的激发光源和荧光波长的选择提供一定的参考。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料和方法

光敏剂HY由成都普瑞法科技开发有限公司提供,蓝黑色粉末,纯度大于98%,使用前光敏剂HY避光,保存在4℃的冰箱冷藏室。实验所涉及的二甲基亚砜(DMSO)和无水乙醇均为分析纯试剂。实验前用电子天平称取适量HY粉末,放入适量DMSO或无水乙醇中配制成浓度为456 μmol/L的样品溶液(原液),以此溶液为基础,用不同溶剂进行稀释,采集不同浓度样品溶液的吸收光谱。所有操作过程(配制和采谱)均在暗室中进行。

### 1.2 实验仪器

紫外可见吸收光谱采用岛津公司的UV-2550紫外可见分光光度计测量,采集时用样品溶液对应的溶剂作为参比样品,以扣除溶剂本底的影响。荧光光谱实验采用的是PI公司的SP-2500连续激光器,激发波长405 nm,激光经显微物镜聚焦后激发样品,样品所发荧光采用透镜收集后,进入光谱仪,光谱仪前面需加上短波截止的滤光片滤掉泵浦光,允许大于450 nm波长的光透过。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 不同浓度的HY-DMSO溶液的紫外可见吸收光谱

图1是以DMSO为溶剂时,不同浓度的HY-DMSO溶液的吸收光谱,图中曲线主吸收峰从上到下,浓度分别为300、180、25、20、15、10和5 μmol/L。从图可以看出,HY在可见光范围内存在多个吸收峰,比较明显的4个吸收峰峰值分别位于385、476、550和594 nm处,其中,HY-DMSO溶液在594 nm处的吸收最大,在550 nm处的吸收次之(图1)。HY溶液在可见光范围内的吸收随着溶液浓度的增大而明显增大,此外,不同浓度的HY-DMSO溶液的吸收带形状基本一致,即随着浓度的增加,并没有出现新的吸收带,除了吸收强度大小发生改变外,吸收峰的相对大小和相对位置并没有发生改变,因此,溶液中没有二聚体存在。

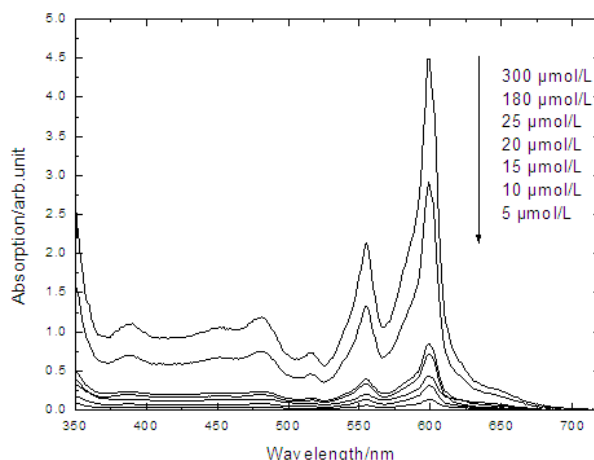


图1 不同浓度HY-DMSO溶液的吸收光谱

Fig.1 Absorption spectra of varied concentrations of hypericin (HY) in dimethyl sulfoxide

光动力疗法治疗恶性肿瘤应选择强吸收相应波长的光源进行照射,这样可以很大程度上提高光敏剂HY对恶性肿瘤的治疗效果<sup>[18]</sup>。由于HY在550~600 nm的吸收很强,其中,594 nm处的吸收最强,因此,橙黄光594 nm是光动力治疗中的首选光源波长,而且该波长的光辐射在组织中的穿透深度大,可以用来治疗深层的恶性肿瘤<sup>[19-20]</sup>。

### 2.2 HY的光漂白特性

光敏剂的光漂白是指在光的照射下,光敏剂所激发出来的荧光强度随着时间推移逐步减弱乃至消失的现象。光敏剂的光漂白是光动力诊断临床应用中考虑光剂量和检测许用时间的一个重要因素<sup>[21]</sup>。本研究主要从吸收光谱随时间的变化来分析光漂白特性。

实验用DMSO将HY原液稀释制成3种浓度的样品,浓度分别为5、99和180 μmol/L。将这3种浓度的HY-DMSO溶液倒入透明的玻璃瓶,放置于无遮挡的窗口,放置一定的时间,即产生一定程度的光漂白后,取出约4 mL的溶液,采集相应的吸收光谱。每组数据重复测量2次。图2为检测吸收最强处的599 nm吸收峰的峰值强度随漂白时间的变化情况。实验结果表明,HY-DMSO溶液随着光照时间的延长,其吸收光谱的吸收峰位置基本不变,但其强度会不断减小,而且初始浓度越高,其光漂白所需的时间越长。图2a为5 μmol/L的样品在599 nm处吸收峰的峰值强度随漂白时间的变化,光漂白200 h后的样品吸收基本为零。图2b分别为99 μmol/L和180 μmol/L的样品,光漂白10 d后吸收还比较强,但只要有足够的长的光照时间,不同浓度的样品的峰值强度最终会趋近于零。

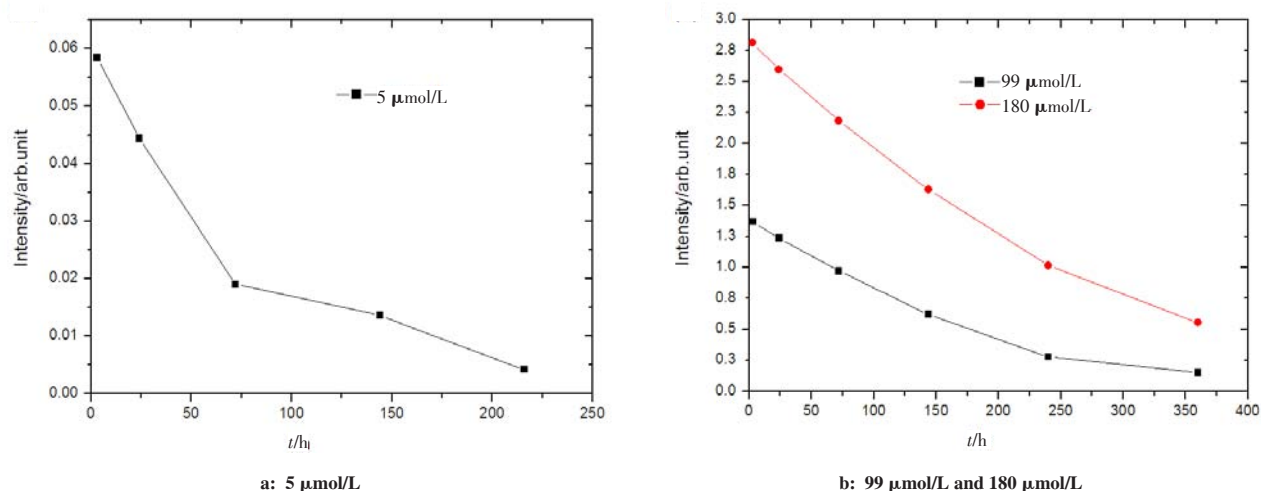


图2 不同浓度的HY599 nm处的峰值强度随漂白时间的变化情况

Fig.2 Peak intensity of HY of different concentrations at 599 nm changed with photobleaching time

### 2.3 荧光发射光谱

图3为HY-无水乙醇溶液浓度为10  $\mu\text{mol/L}$ 所发射的荧光光谱。HY溶液的荧光发射谱也存在多峰结构,其中峰值波长位于643 nm的发射峰最强,谱带的半峰宽(FWHM)最窄,位于610 nm处的发射带强度次之,这个发光带是由两个靠得很近的发光峰组成,还有一个FWHM很宽、峰值波长位于700 nm的弱发射带,改变样品浓度,样品的荧光光谱谱带强度出现变化,但峰值位置不变(图3)。

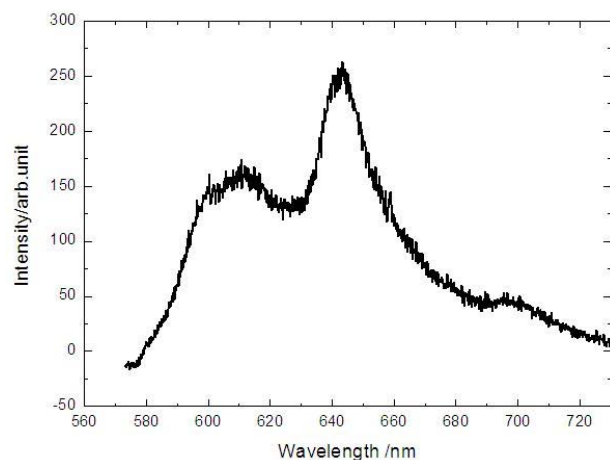


图3 HY-无水乙醇的荧光光谱

Fig.3 Fluorescence spectrum of HY in ethyl alcohol

对比HY-无水乙醇溶液的荧光光谱(图3)和吸收光谱(图1),可以推断出其荧光发射过程:HY分子吸收光子跃迁到高能级,受激发的分子不稳定,与周围分子不断碰撞,通过内转换以热能的形式消耗一部分能量,从激发态下降到第一电子激发态的最低振动能级,而后将多余的能量以光子形式辐射出去,发出的光就是

图3中的荧光发射带,由于荧光光量子的能量小于所吸收的入射光子能量,所以荧光的波长大于入射激发光的波长。此外,图3中位于643 nm处的荧光发射带最强且FWHM最窄,能极大地提高检测的灵敏度。

在临床上,静脉注射一定剂量的光敏剂HY后,根据吸收光谱,用波长为390、480、555或600 nm的光激发,恶性肿瘤部位由于聚集的HY浓度较高,将发出红色荧光(600~660 nm),而正常组织部位由于HY含量低而观察不到红色荧光,通过观察荧光所成的像或定量检测的荧光强度就可以诊断和定位恶性肿瘤。

### 3 结论

HY是从金丝桃属植物中分离得到的一种天然光敏剂,在中国,HY的资源丰富,具有成本优势。实验测量了不同浓度的HY-DMSO溶液的紫外-可见吸收光谱,结果表明HY-DMSO在可见光范围内存在多个吸收峰,比较明显的4个吸收峰分别位于385 nm、476、550和594 nm,其中594 nm处的吸收最强。因此,橙黄光594 nm是光动力治疗中的首选光源波长。而且该波长的光辐射在组织中的穿透深度大,可以用来治疗深层的恶性肿瘤。HY光漂白特性的研究表明,HY的初始浓度越高,其光漂白所需的时间越长。HY荧光光谱的研究表明,谱带也存在多峰结构,峰值波长分别位于610、643和700 nm,其中位于643 nm处的荧光发射峰最强且FWHM最窄,能极大地提高检测的灵敏度。研究光敏剂的光谱特性是光动力学诊断和癌症治疗中非常重要的问题,光敏剂的光谱特性为最佳诊断和治疗光源波长的确定提供了直接的依据,在光动力诊断和治疗恶性肿瘤中的临床应用具有一定的指导意义。



## 【参考文献】

- [1] ALLISON R R, SIBATA C H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review[J]. Photodiagn Photodyn, 2010, 7(10): 61-75.
- [2] 李步洪, 谢树森, 陆祖康. 光动力学疗法新型光敏剂的光谱特性研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2002, 22(6): 902-904.  
LI B H, XIE S S, LU Z K. Spectral properties of new photosensitizers for photodynamic diagnosis and therapy [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2002, 22(6): 902-904.
- [3] GARG A D, KRYSKO D V, VANDENABEELE P, et al. Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin[J]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61(2): 215-221.
- [4] 张传力, 范健. 金丝桃素在肿瘤治疗和诊断中的应用[J]. 国际药学研究杂志, 2012, 39(5): 402-404.  
ZHANG C L, FAN J. Application of hypericin in cancer therapy and diagnosis[J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2012, 39(5): 402-404.
- [5] KRAMMER B, VERWANGER T. Molecular response to hypericin-induced photodamage [J]. Curr Med Chem, 2012, 19(6): 793-798.
- [6] LEE A N, PERUSSI J R, HAMBLIN M R. Electroporation enhances antimicrobial photodynamic therapy mediated by the hydrophobic photosensitizer, hypericin[J]. Photodiagn Photodyn, 2013, 10(4): 647-650.
- [7] 陈建平, 李琳, 苏健裕. 姜黄素的抗氧化及抗肿瘤活性研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(12): 11-15.  
CHEN J P, LI L, SU J Y. Antioxidant and antitumor activities of curcumin[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(12): 11-15.
- [8] GU Q, GUAN H, SHI Q, et al. Curcumin attenuated acute propionibacterium acnes-induced liver injury through inhibition of HMGB1 expression in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 24(2): 159-165..
- [9] 刘佳鑫, 张月婷, 旦菊花, 等. 黄连素对恶性胶质瘤C6细胞增殖抑制和诱导凋亡作用[J]. 昆明理工大学学报(自然科学版), 2016, 41(1): 93-96.  
LIU J X, ZHANG Y T, DAN J H, et al. Effect of berberine on cell proliferation and apoptosis in rat malignant glioma cell C6[J]. Journal of Kunming University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2016, 41(1): 93-96.
- [10] MANTENA S K, SHARMA S D, KATIYAR S K. Berberine inhibits growth, induces G1 arrest and apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells by regulating Cdk1-Cdk-cyclin cascade, disruption of mitochondrial membrane potential and cleavage of caspase 3 and PARP [J]. Carcinogenesis, 2006, 27(10): 2018-2027.
- [11] 武超, 曹红燕, 孙明瑜. 大黄酸在肝病中的应用研究[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(12): 2382-2387.  
WU C, CAO H Y, SUN M Y. Research progress of rhein in liver diseases[J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 42(12): 2382-2387.
- [12] ZHONG X, HUANG G, LUO T, et al. Protective effect of rhein against oxidative stress-related endothelial cell injury[J]. Mol Med Report, 2012, 5(5): 1261-1266.
- [13] LEE H Z, YANG W H, HOUR M J, et al. Photodynamic activity of aloemodin induces resensitization of lung cancer cells to anoikis[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 648(1): 50-58.
- [14] HUNTOSOVA V, NADOVA Z, DZUROVA L, et al. Cell death response of U87 glioma cells on hypericin photoactivation is mediated by dynamics of hypericin subcellular distribution and its aggregation in cellular organelles[J]. Photochem Photobiol Sci, 2012, 11(9): 1428-1436.
- [15] RITZ R, DANIELS R, NOELL S, et al. Hypericin for visualization of high grade gliomas: first clinical experience[J]. Eur J Surg Oncol, 2012, 38(4): 352-360.
- [16] YOW C M, TANG H M, CHU E S, et al. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens[J]. Photochem Photobiol, 2012, 88(3): 626-632.
- [17] OLIVO M, FU C Y, RAGHAVAN V, et al. New frontier in hypericin-mediated diagnosis of cancer with current optical technologies[J]. Ann Biomed Eng, 2012, 40(2): 460-473.
- [18] LI J, CONA M M, CHEN F, et al. Sequential systemic administrations of combretastatin A4 phosphate and radioiodinated hypericin exert synergistic targeted theranostic effects with prolonged survival on SCID mice carrying bifocal tumor xenografts[J]. Theranostics, 2013, 3(2): 127-137.
- [19] AGOSTINIS P, VANTIEGHEM A, MERLEVEDE W, et al. Hypericin in cancer treatment: more light on the way[J]. Int J Biochem Cell B, 2002, 34(3): 221-241.
- [20] 陈祖林. 光动力学治疗肿瘤增效作用研究进展[J]. 激光杂志, 2015, 36(5): 8-10.  
CHEN Z L. Progress in the study of synergistic effect of photodynamic therapy on tumor[J]. Laser Journal, 2015, 36(5): 8-10.
- [21] LI X, GAO L, ZHENG L, et al. The efficacy and mechanism of apoptosis induction by hypericin-mediated sonodynamic therapy in THP-1 macrophages[J]. Int J Nanomed, 2015, 10(1): 821-838.

(编辑:谭斯允)