

两种藻胆蛋白对人肝癌 SMMC-7721 细胞的光动力体外杀伤效应

王源, 蔡春尔, 李柏林, 刘承初, 何培民

上海海洋大学, 上海 201306

摘要: 用 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)法测定提取自条斑紫菜的 R-藻红蛋白(R-PE)和 C-藻蓝蛋白(C-PC)经激光介导对人肝癌 SMMC-7721 细胞的杀伤率, 并检测细胞凋亡率。结果显示在 120 mg/L 浓度下, R-PE 在氩离子激光器 100 J/cm² 辐照下对应的细胞存活率为 27%, C-PC 在 He-Ne 激光器 35 J/cm² 辐照下对应的细胞存活率为 47%; 单用 2 种激光器辐照对应的细胞存活率分别为 65% 和 70%; 单用 2 种蛋白处理细胞在 72 h 后出现对细胞生长的显著抑制, 最大抑制率分别为 31%(R-PE, 120 mg/L)和 27%(C-PC, 250 mg/L)。120 mg/L 的 2 种藻胆蛋白在对应激光辐照下, 于照后 8 h 达到细胞凋亡率最大值, 分别为 31.54%(R-PE)和 32.54%(C-PC)。本实验证明条斑紫菜 R-PE 和 C-PC 具有可开发成为光敏剂的应用前景。

关键词: 条斑紫菜, R-藻红蛋白, C-藻蓝蛋白, 光敏作用, 细胞凋亡, 肝癌细胞

Photodynamic effect of two kinds of phycobiliproteins on human liver cancer cell line SMMC-7721 *in vitro*

Yuan Wang, Chuner Cai, Bailin Li, Chengchu Liu, and Peimin He

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: We studied the effect of photodynamic therapy with phycobiliproteins on human liver cancer cells *in vitro*. With 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT assay), we used two phycobiliproteins, R-phycoerythrin (R-PE) and C-phycoyanin (C-PC) prepared from *Porphyra yezoensis*, to determine the killing rates and apoptosis rates of human liver cancer cells (SMMC-7721) mediated by laser. When the concentration of R-PE was 120 mg/L, the survival rate of human liver cancer cells was 27% after treated by Argon laser with 100 J/cm² doses, while the survival rate in the control group (without adding R-PE) was 65%. When the C-PC concentration was 120 mg/L, the survival cell rate was 47% after treated by He-Ne laser with 35 J/cm² dose, while the survival rate in the control group (without adding C-PC) was 70%. After handled only with these two kinds of phycobiliproteins for 72 h, the growth of cancer cells presented significant inhibition. The maximal inhibition rates reached up to 31% with R-PE (120 mg/L concentration) and 27% with C-PC (250 mg/L concentration) respectively. After irradiated by laser for 8 h, the maximal cell apoptosis rates were 31.54% with R-PE and 32.54% with C-PC, respectively. It indicated that R-PE and C-PC

Received: April 22, 2009; **Accepted:** July 16, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2006AA10Z323, 2007AA09Z406), Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education (No. KFT2008-12), Shanghai Education Committee of China (No. S30701).

Corresponding author: Peimin He. Tel: +86-21-61900423; E-mail: pmhe@shou.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划)(Nos. 2006AA10Z323, 2007AA09Z406), 教育部水产种质资源发掘与利用省部共建重点开放实验室(No. KFT2008-12), 上海市教委优势(重点)学科项目(No. S30701)资助。

extracted from *Porphyra yezoensis* could develop to new photosensitizers for cancer photodynamic therapy.

Keywords: *Porphyra yezoensis*, R-phycoerythrin, C-phycoerythrin, photodynamic therapy, cell apoptosis, liver cancer cell

据世界卫生组织(WHO)统计,全世界每年新发生的癌症病人约650万,死于癌症者约430万,死亡率仅次于心血管疾病而位居第2。在现阶段,几近半数的癌症患者还是单独或结合采用外科手术、放射疗法和化学疗法进行治疗,其复发率以至死亡率很高。此外,传统的细胞毒性抗肿瘤药物毒副作用大,易产生耐药性。因此寻找新的结构类型或新的作用机制的抗肿瘤活性成分成为当前抗肿瘤药物研究的趋势^[1]。

光动力疗法(Photodynamic therapy, PDT)是近20年来建立和发展起来的一种新型肿瘤疗法^[2]。其原理主要通过光敏剂富集于病灶处,并在光照下产生光敏损伤来实现对肿瘤细胞的杀伤作用^[3]。1993年,加拿大政府首先批准了 Photofrin(商品名 Porfimer sodium, 卟吩姆钠)治疗膀胱癌和晚期食管癌^[4]。目前至少有近20个国家对光动力疗法诊治癌症进行实验和临床研究^[5]。

光动力治疗在很大程度上取决于采用的光敏剂的性质^[6]。第一代光敏剂代表血卟啉(HP)光敏副作用大,成份复杂,原料难以得到。第二代光敏剂代表5-氨基酮戊酸(Delta-aminolevulinic acid, ALA)是一种体内血红素合成的前体物^[7]。目前筛选新型光敏剂的基本要求是癌细胞靶向选择性、系统毒性低、无副作用、无诱变潜力、代谢周期短^[8]。

作为多亚基的蛋白色素复合物,海藻藻胆蛋白作为光敏剂所具有的一些天然的优越性逐渐被人们发现。研究人员经过大量实验证实,藻胆蛋白荧光量子产率高,对游离组织的杀伤力强,是一类理想的光敏剂^[9-10]。自1988年Morcos等^[11]用0.25 g/L的藻蓝蛋白光动力杀伤小鼠骨髓瘤细胞获得成功以来,藻胆蛋白光敏杀伤肿瘤细胞的研究逐渐成为热点。制备藻胆蛋白的传统原料螺旋藻养殖成本高,主要含藻蓝蛋白和变藻蓝蛋白,紫菜作为中国三大经济海藻之一,产量位于世界之首,且藻红蛋白和藻蓝蛋白含量丰富,从紫菜中提取上述蛋白,可以大幅度降低成本,并能促进紫菜的栽培业发展和海

洋生态修复^[12]。笔者前期研究发现提取自条斑紫菜的R-PE和C-PC经碘钨灯辐照可在体外对人咽喉癌细胞株Hep-2产生杀伤作用^[13]。

本实验以He-Ne激光器为光源,以提取自条斑紫菜的高纯度R-PE和C-PC为光敏剂研究其对人肝癌SMMC-7721细胞株的抑制作用,并检测了PDT后细胞凋亡率,进一步研究藻胆蛋白的光敏作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)采自江苏吕泗,海水洗涤阴干后备用。

人肝癌SMMC-7721细胞株购自中科院细胞库; Vivaflow 200超滤膜包购自Vivascience公司; RPMI-1640购自Gibco公司; Napco 6500二氧化碳培养箱购自Thermo公司; A30倒置显微镜购自Motic公司; 630型酶标仪购自Biorad公司; INNOVR 400氩离子激光器购自Coherent公司; He-Ne激光器(QHP型)购自上海玻璃仪器一厂。

1.2 藻胆蛋白提取与光谱分析

条斑紫菜藻胆蛋白提取纯化方法参照文献^[14]。应用“溶胀”和“组织捣碎”组合法制备藻胆蛋白粗提液,经硫酸铵多次盐析后脱盐、离心,所得上清用羟基磷灰石柱层析,梯度洗脱并经超滤膜包浓缩后分别得到R-PE和C-PC。测定紫外可见吸收光谱,鉴定纯度,置于4°C下避光保存备用。

藻胆蛋白纯度按以下公式计算^[15]: R-PE 纯度 = OD_{565}/OD_{280} ; C-PC 纯度 = OD_{615}/OD_{280} 。

1.3 肿瘤细胞培养方法

人肝癌SMMC-7721细胞培养方法参考文献^[12]。当细胞生长旺盛时,用含EDTA的胰酶消化细胞,洗涤吹散细胞稀释至 $10^9/L$,每孔 $1 \times 10^{-4}L$ 接种于96孔板。

1.4 藻胆蛋白经激光激发对SMMC-7721细胞生存率的影响

将含藻胆蛋白不同终浓度(30、60、120、250 mg/L)

的培养基分别替代 96 孔板内 SMMC-7721 细胞原培养基, 培养 4 h 后, 用波长 514 nm 的氩离子激光器逐孔照射 R-PE 组, 激光器输出功率 100 mW, 每孔 15 min, 累计能量密度 100 J/cm^2 。632.8 nm 的 He-Ne 激光器逐孔照射 C-PC 组, 激光器输出功率 30 mW, 每孔 20 min, 累计能量密度 35 J/cm^2 。辐照结束后继续培养 24 h, 用 MTT 法测定各孔吸光度。以不加任何处理的培养细胞为空白对照, 以单用藻胆蛋白或光源辐照的培养细胞作为阴性对照。每个浓度梯度均设置 12 个平行组, 按照以下公式计算存活率:

$$\text{存活率} = (\text{实验组吸光度平均值} / \text{对照组吸光度平均值}) \times 100\%$$

采用 SPSS12.0 统计软件和 t 检验进行统计分析。

1.5 激光单独辐照对 SMMC-7721 细胞生长的影响

同上方法收集培养细胞, 培养液中不含藻胆蛋白, 直接用激光辐照, 氩离子激光器照射剂量分别达到 50、100、150 J/cm^2 , He-Ne 激光器照射剂量分别达到 20、35、50 J/cm^2 。每个能量梯度均设置 12 个平行组, 分别计算细胞存活率, 并进行统计学处理。

1.6 藻胆蛋白本身对 SMMC-7721 细胞生长的影响

同上方法收集培养细胞, 分别换入含藻胆蛋白终浓度为 30、60、120、250 mg/L 的培养液, 不接受光源辐照, 但保持同样的培养环境和换液条件继续培养 24、48、72 h。每个能量梯度均设置 12 个平行组, 分别计算细胞存活率, 并进行统计学处理。

1.7 藻胆蛋白经激光激发对 SMMC-7721 细胞凋亡率的测定

胰酶消化收集经激光辐照(激光累计能量 100 J/cm^2 (PE)和 35 J/cm^2 (PC), 蛋白浓度 120 mg/L)处理后不同时间点(4、8、12 h)的 SMMC-7721 细胞, 加入预冷的 PBS 缓冲液 2000 r/min, 5 min 离心洗涤 3 次弃上清。每个样品加 $2 \times 10^{-3} \text{ L}$ Carnoy 固定液(甲醇:冰乙酸=3:1), 吹散细胞使每个样品含 1×10^6 个细胞后测定细胞凋亡率。以单用激光辐照和单用蛋白(120 mg/L)不加激光辐照为对照。

2 结果

2.1 藻胆蛋白光谱分析及纯度鉴定

提取纯化的条斑紫菜 R-PE 和 C-PC 经紫外分光光度计测定吸收光谱, 显示 R-PE 在 498 nm 和 565 nm 各有一个吸收峰, 最大吸收峰为 565 nm, 在 540 nm 有 1 个吸收肩, 此即条斑紫菜的“双峰型”R-PE 的特征吸收光谱^[16], 而 C-PC 的吸收峰位于 615 nm, 无吸收肩, 此为 C-PC 的特征吸收光谱^[17](图 1 和图 2)。测定的条斑紫菜 R-PE 和 C-PC 的吸收光谱纯度分别达到 $5.5(OD_{564}/OD_{280})$ 和 $4.0(OD_{615}/OD_{280})$ 。

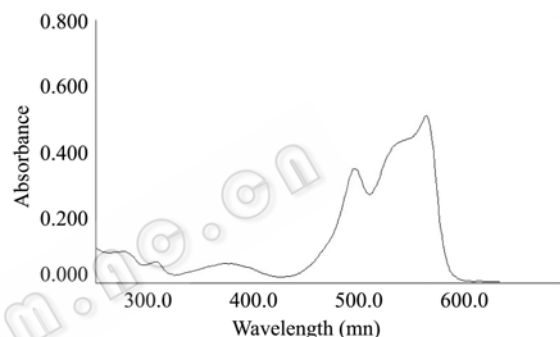


图 1 藻红蛋白吸收光谱
Fig. 1 Absorption of R-Phycoerythrin.

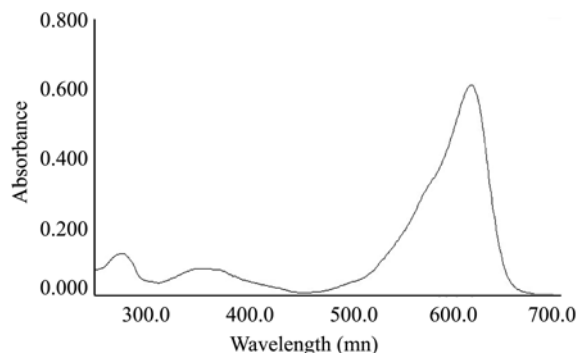


图 2 藻蓝蛋白吸收光谱
Fig. 2 Absorption of C-Phycocyanin.

2.2 R-PE 和 C-PC 经激光激发对 SMMC-7721 细胞的杀伤效果

R-PE 在 60 mg/L 时的对应细胞存活率为 40%, 到 250 mg/L 时仅为 20%。C-PC 组在 35 J/cm^2 辐照下对癌细胞的杀伤率为 59%(250 mg/L)(表 1)。

表 1 藻胆蛋白光动力杀伤对 SMMC-7721 细胞存活率的影响

Table 1 Survival rates of SMMC-7721 under phycobiliproteins PDT

Concentration of PB (mg/L)	0 (Control)	Laser only	30	60	120	250
Survival rates of R-PE group (%) ($\bar{X} \pm S$)	100%	65±6.8*	59±5.0*	40±6.1**	27±6.4**	20±5.6**
Survival rates of C-PC group (%) ($\bar{X} \pm S$)	100%	70±4.5*	73±6.1*	65±4.8*	47±6.7**	41±7.1**

t-test, *P<0.05, **P<0.01.

2.3 激光辐照能量对 SMMC-7721 细胞生长的影响

氩离子激光器 514 nm 波长单独对 SMMC-7721 细胞辐照, 累计能量分别达到 50、100、150 J/cm² 时对应的细胞存活率均在 65% 上下浮动, He-Ne 激光器 632.8 nm 波长单独辐照, 累计能量达 20、35、50 J/cm² 时对应的细胞存活率均在 70% 上下(表 2、3)。

2.4 R-PE 和 C-PC 对 SMMC-7721 细胞生长的影响

单用藻胆蛋白培养 24 h 后, 实验组细胞存活率与对照组相比未出现显著性差异; 48 h 后, 仅 C-PC250 mg/L 组出现显著性差异; 72 h 后, 蛋白高浓度梯度组(60、120、250 mg/L)出现对细胞生长的显著抑制, 最大抑制率分别为 31% (PE, 120 mg/L)和 27% (250 mg/L)(表 4)。

2.5 R-PE 和 C-PC 经激光激发对 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响

单用 120 mg/L 蛋白培养, R-PE、 C-PC 孵育细

胞 8 h 后凋亡率分别为 9.55% 和 9.91%(图 3)。单用对应激光器辐照, 细胞凋亡率分别为 8.0%(R-PE)和 10.9%(C-PC) (图 4)。而 120 mg/L R-PE、 C-PC 经各自对应激光器累计辐照能 100 J/cm², 于辐照后 4、8、

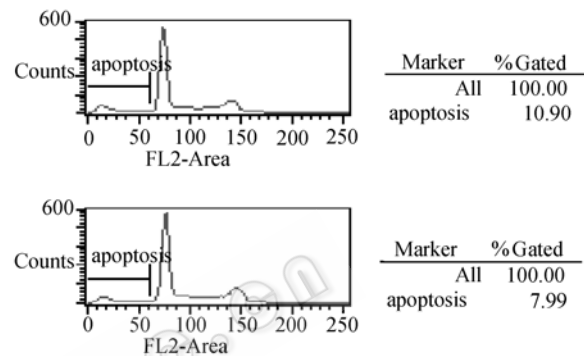


图 3 单用 120 mg/L 藻胆蛋白处理细胞凋亡率

Fig. 3 Apoptosis ratio of cells 8 h later treated only by 120 mg/L phycobiliproteins. C-PC is above, R-PE is below, same below.

表 2 514 nm 氩离子激光器单独辐照对 SMMC-7721 细胞生存率的影响

Table 2 Survival rates of SMMC-7721 under different irradiation of 514 nm Argon laser alone

Accumulated radiation dose (J/cm ²)	0 (Control)	50	100	150
Survival rates(%) ($\bar{X} \pm S$)	100%	66±3.8*	65±6.8*	66±3.5*

t-test, *P<0.05.

表 3 632.8 nm He-Ne 激光单独辐照对 SMMC-7721 细胞生存率的影响

Table 3 Survival rates of SMMC-7721 under different irradiation of 632.8 nm He-Ne laser alone

Accumulated radiation dose (J/cm ²)	0 (Control)	20	35	50
Survival rates (%) ($\bar{X} \pm S$)	100%	73±5.2*	70±4.5*	68±3.8*

t-test, * P<0.05.

表 4 藻胆蛋白本身对 SMMC-7721 细胞存活率的影响

Table 4 Survival rates of SMMC-7721 under different concentration of phycobiliproteins alone

Concentration of PB (mg/L)	0 (Control)	30	60	120	250
Survival rates of R-PE group after 24 h (%)	100%	99±1.2	96±2.1	92±0.9	89±1.9
Survival rates of R-PE group after 48 h (%)	100%	90±2.7	91±2.1	85±1.4	85±3.5
Survival rates of R-PE group after 72 h (%)	100%	84±4.1	80±4.2*	69±2.7**	75±6.7**
Survival rates of C-PC group after 24 h (%)	100%	98±1.3	98±1.8	95±2.1	86±2.4
Survival rates of C-PC group after 48 h (%)	100%	97±3.1	91±2.6	88±2.6	82±3.7*
Survival rates of C-PC group after 72 h (%)	100%	87±5.3	75±3.6*	78±7.0*	73±6.3**

t-test, *P<0.05, **P<0.01.

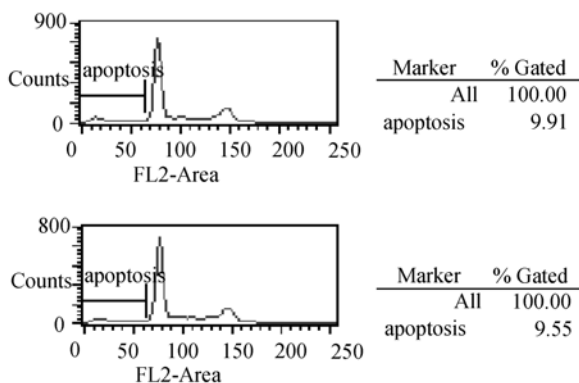


图 4 单用 100 J/cm² 激光处理的细胞凋亡率
Fig. 4 Apoptosis ratio of cells 8 h later after 100 J/cm² illumination of laser.

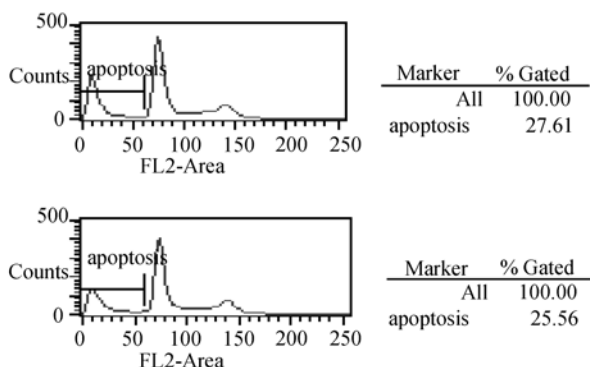


图 5 PDT 处理 4 h 后的细胞凋亡率
Fig. 5 Apoptosis ratio of cells 4 h later after PDT treatment.

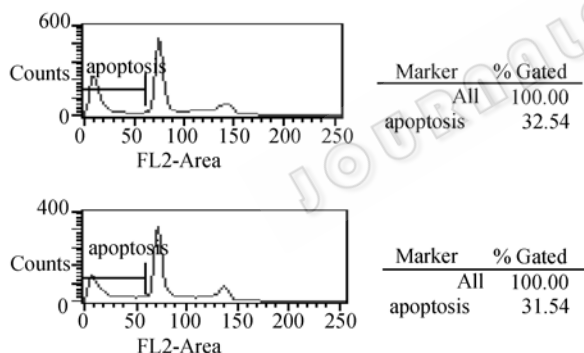


图 6 PDT 处理 8 h 后的细胞凋亡率
Fig. 6 Apoptosis ratio of cells 8 h later after PDT treatment.

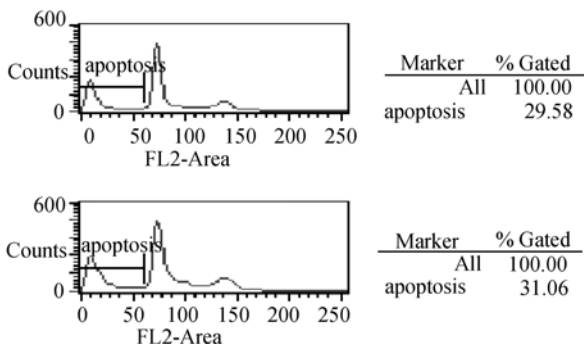


图 7 PDT 处理 12 h 后的细胞凋亡率
Fig. 7 Apoptosis ratio of cells 12 h later after PDT treatment.

12 h 分别固定后, 凋亡率为 25.6%、31.5%、31.1% 和 27.6%、32.5%、29.6(图 5~7)。可知条斑紫菜 R-PE、C-PC 经激光激发后均能引起肿瘤细胞的凋亡。

3 讨论

前人用提取自螺旋藻的 100 mg/L 藻蓝蛋白经 12 J/cm² 铜泵激光器辐照对人大肠癌细胞 HR8348 杀伤率达到 78%^[18], 经 28.8 J/cm² He-Ne 激光器辐照对人乳腺癌 Bcap-3 的杀伤率达到 72%^[19]。提取自多管藻的 100 mg/L 藻红蛋白在 25.6 J/cm² 氩离子激光辐照下对 S180 肿瘤细胞的杀伤率达到 76%^[10], 对 8113 人口腔上皮癌细胞的杀伤率达到 75%^[9]。提取自坛紫菜的 100 mg/L 藻红蛋白和藻蓝蛋白分别经多波长风冷氩离子激光器和 He-Ne 激光器辐照对人乳腺癌 Bcap-3 的杀伤率达到 85% 和 79%^[19]。本实验所用藻红蛋白和藻蓝蛋白分别经氩离子激光器和 He-Ne 激光器辐照在 120 mg/L 时对人肝癌 SMMC-7721 细胞的杀伤率达到 73% 和 53%, 在 250 mg/L 时分别达到 80% 和 59%, 表明条斑紫菜藻胆蛋白具有较强的光敏杀伤性, 为藻胆蛋白光敏剂制备原料提供了新的方向。

也有人以藻胆蛋白酶解产物为对象并找到了杀伤效率甚至更高的小分子物质。如从多管藻藻红蛋白分离出的色基多肽经 28.8 J/cm² 氩离子激光辐照对小鼠肉瘤 S180 细胞的杀伤率达到 79%~88%^[20], 从螺旋藻藻蓝蛋白分离出的色素肽对体外培养的 S180 细胞的光敏杀伤率达 69%~80%, 对荷瘤小鼠的抑瘤率达到 46%~81%^[21]。但藻红蛋白色基肽本身在相同浓度下 4 h 后对 S180 细胞抑制率在 31%~65%^[20], 藻蓝蛋白色基肽本身在 4 h 后的细胞抑制率为 28%~68%^[21]。表明这类小分子的肿瘤杀伤机制可能主要不在于光敏作用。相比之下, 藻胆蛋白大分子本身对肿瘤细胞的影响不显著。本实验中, 在大于 30 mg/L 时, 条斑紫菜藻红、藻蓝蛋白对 SMMC-7721 细胞存在抑制作用, 且随蛋白浓度增加和作用时间延长呈增强趋势, 但在 120 mg/L 下作用 24 h 后的抑制率分别仅为 8% 和 5%, 而细胞加藻胆蛋白后至光照前的时间间隔为 4 h, 尚不足以受到显著抑制, 因此促使癌细胞大量死亡的根源应为藻胆蛋白光动力作用。其他研究也表明, 在添加坛紫菜

和钝顶螺旋藻藻胆蛋白培养基 24 h 后, 当 R-PE < 25 mg/L, R-PC、C-PC < 50 mg/L 时, 对 Bcap-37 细胞具有一定的促进生长作用, R-PE 25 mg/L, R-PC、C-PC 50 mg/L 时, 抑制细胞生长^[19]。而多管藻藻红蛋白对 S180 细胞始终存在抑制作用^[10]。

本实验中 2 种蛋白经激光器辐照可使 SMMC-7721 细胞凋亡率达到 31.54% 和 32.54%, 表明藻胆蛋白杀伤肿瘤细胞机制之一为诱导细胞凋亡。凋亡(Apoptosis)是组织器官发育和细胞死亡的一种积极的可调节的死亡方式^[22]。各种外来刺激, 包括: 辐射、热和一些药物均能在一定条件和一些基因的调控下诱导细胞凋亡^[23]。李冠武等^[24]曾报道 100 mg/L R-PE 经 PDT 处理后 4、8、12 h 对应的细胞凋亡率分别达到 56.2%、82.2% 和 98.1%。鉴于凋亡的过程一般分为启动、效应和降解 3 个阶段, 是一个动态发展的阶段, 故考虑在后续实验中增设更多时间点并配合形态观察以期更确切地阐明藻胆蛋白的光动力学杀伤机制。

对肿瘤细胞的选择性杀伤是光敏剂筛选的基本要求, 但目前即使是临床所用的光敏药物对癌细胞的选择性仍不够强, 即使是新型的酞菁类等, 经脂质体包裹, 也只是相对更多地被癌细胞摄取, 而第一代光敏剂 HpD 主要依靠在正常组织中代谢快, 肿瘤组织因其 pH 较低、血管通透性增高, 较有利于光敏剂的积累, 而淋巴引流很差, 又使其清除缓慢, 从而在静脉注射后 1~2 d 时, 肿瘤组织与正常组织中所含 HpD 形成显著的浓度差^[25]。同样有报道证明藻红蛋白在 pH 5(大多数肿瘤组织所处 pH 环境)时比在 pH 7(正常组织所处 pH 环境)时更易进入细胞^[26], 至于其是否在正常组织中代谢更快则有待进一步研究。当然最直接的方法是给藻胆蛋白安上一个癌细胞特异性抗体以提高其选择性, 这是目前新一代光敏剂的修饰方法, 也是后续实验的方向之一。

REFERENCES

- [1] Chakraborty M, Gelbard A, Carrasquillo JA, *et al.* Use of radiolabeled monoclonal antibody to enhance vaccine-mediated antitumor effects. *Cancer Immunol Immunol*, 2008, **57**: 1173–1183.
- [2] Zhang JP, Xie J, Zhang SP. Photosensitive properties of

two kinds of phycobiliprotein on photodynamic reaction. *Chin Sci Bull*, 1999, **4**(5): 495–498.

张建平, 谢洁, 张素萍, 等. 两种藻胆蛋白光动力光敏性质研究. *科学通报*, 1999, **4**(5): 495–498.

- [3] Dougherty T. Photodynamic therapy-new approaches. *Semin Surg Oncol*, 1989, **5**: 6–16.
- [4] Cai CE, Wu QL, Xu CH, *et al.* Advance of phycoerythrin as a photosensitizer. *Lett Biotechnol*, 2004, **15**(6): 629–632.
蔡春尔, 吴庆磊, 徐春和, 等. 藻红蛋白光敏剂研究进展. *生物技术通讯*, 2004, **15**(6): 629–632.
- [5] Dickson EFG, Goyan RL, Pottier RH. New directions in photodynamic therapy. *Cell Mol Biol*, 2002, **48**(8): 939–954.
- [6] Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical application. *Drug Discov Today*, 1994, **4**(11): 507–517.
- [7] Bunke A, Zerbe O, Schmid H, *et al.* Degradation mechanism and stability of 5-aminolevulinic acid. *J Pharm Sci*, 2000, **89**(10): 1335–1341.
- [8] Thomas JV, Katrin Eichler, Martin GM, *et al.* Interstitial photodynamic laser therapy in interventional oncology. *Eur Radiol*, 2004, **14**(12): 1063–1073.
- [9] Li GW, Wang GC, Lu L, *et al.* Effect of the photosensitivity of phycoerythrin on survival rate of human tumor cell line. *Acta Laser Biol Sin*, 1997, **6**(3): 1119–1121.
李冠武, 王广策, 陆雷, 等. 多管藻 R-藻红蛋白的激光光敏作用对体外培养的肿瘤细胞生存率的影响. *激光生物学报*, 1997, **6**(3): 1119–1121.
- [10] Li GW, Wang GC, Wen BG, *et al.* Phycoerythrin as a novel photosensitizer applied in the photodynamic therapy of cancer. *Chin J Can Prev Treat*, 2001, **8**(4): 353–356.
李冠武, 王广策, 温博贵, 等. 藻红蛋白应用于肿瘤光动力治疗的研究. *肿瘤防治杂志*, 2001, **8**(4): 353–356.
- [11] Morcos NC, Berns M, Henry WL. Phycocyanin: laser activation, cytotoxic effect, and uptake in human atherosclerotic plaque. *Laser Surg Med*, 1988, **8**(1): 7–10.
- [12] He PM, Xu SN, Zhang HY, *et al.* Bioremediation efficiency in the removal of dissolved inorganic nutrients by the red seaweed *Porphyra yezoensis*, cultivated in the open sea. *Water Res*, 2008, **42**(4): 1281–1289.
- [13] Wang Y, Zhang LX, Cai CE, *et al.* Photodynamic effect of two kinds of phycobiliproteins on human laryngeal cancer cell line Hep-2. *Biotechnol Bull*, 2008, **195**(4): 145–148.
王源, 张陆曦, 蔡春尔, 等. 两种藻胆蛋白对人喉癌 Hep-2 细胞的光动力杀伤效果. *生物技术通报*, 2008, **195**(4): 145–148.

- [14] Cai CE, Wu QL, He PM. Extraction and purification of R-phycoerythrin in *Porphyra yezoensis*. *Lett Biotechnol*, 2005, **16**(5): 518–521.
蔡春尔, 吴庆磊, 何培民. 条斑紫菜 R-藻红蛋白提纯工艺研究. *生物技术通讯*, 2005, **16**(5): 518–521.
- [15] Galland-Irmouli AV, Pons L, Lucon M, *et al.* One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 2000, **739**(1): 117–123.
- [16] Sui ZH, Zhang XC. Review on phycoerythrin research. *Marine Sci*, 1998, **22**(4): 24–27.
隋正红, 张学成. 藻红蛋白研究进展. *海洋科学*, 1998, **22**(4): 24–27.
- [17] O'hEocha C. Phycobilin In Physiology and biochemistry of algae/Lewin RA, ed. New York and London: Acad Press, 1962: 421–435.
- [18] Cai XH, He LM, Jiang JL, *et al.* Study on promotion of laser therapy for carcinoma using phycocyanin from *Spirulina*. *Chin J Mar Drugs*, 1995, **14**(1): 15–18.
蔡心涵, 何立明, 蒋家伦, 等. 螺旋藻藻蓝蛋白对癌激光疗法增敏作用的实验研究. *中国海洋药物杂志*, 1995, **14**(1): 15–18.
- [19] Chen XQ, Gong XG, Liang Q, *et al.* Photodynamic effect of three kinds of phycobiliproteins on human mammary cancer line Bcap-37. *J Zhejiang Univ (Science Edition)*, 2005, **32**(4): 438–441.
陈小强, 龚兴国, 梁倩, 等. 三种藻胆蛋白对人乳腺癌 Bcap-37 细胞的光动力杀伤效果. *浙江大学学报(理学版)*, 2005, **32**(4): 438–441.
- [20] Huang B, Li ZG, Wang GC, *et al.* The experimental research of R-phycoerythrin and its chromophore polypeptides in the photodynamic therapy of cancer. *J Univ Sci Technol Chin*, 2001, **31**(2): 241–246.
黄蓓, 李振刚, 王广策, 等. R-藻红蛋白白色基多肽对肿瘤细胞光动力杀伤作用的实验研究. *中国科学技术大学学报*, 2001, **31**(2): 241–246.
- [21] Huang B, Wang GC, Li ZG. Antitumor studies of C-phycocyanin chromophore peptides mediated photodynamic therapy. *Acta Laser Biol Sin*, 2002, **11**(3): 194–198.
黄蓓, 王广策, 李振刚. 藻蓝蛋白色素肽光动力学抗肿瘤作用的实验研究. *激光生物学报*, 2002, **11**(3): 194–198.
- [22] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Cancer*, 1972, **26** (4): 239–257.
- [23] Vaux DL, Stresser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(6): 2239–2244.
- [24] Li GW. Application of phycobiliproteins in the photodynamic therapy of cancer. Hefei: University of Science and Technology of China, 1997: 84–86.
李冠武. 藻胆蛋白作为光敏剂应用于肿瘤光动力治疗的研究. 合肥: 中国科学技术大学, 1997: 84–86.
- [25] Liao WJ. Clinical Photodynamic Therapy on Oncology. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 11–19.
廖旺军. 临床肿瘤光动力治疗学. 北京: 人民军医出版社, 2006: 11–19.
- [26] Li GW, Wang GC, Qi Y, *et al.* Study of morphological mechanism on photodynamic killing mediated by R-phycoerythrin. *J China Univ Sci Technol*, 1999, **29**(15): 560–564.
李冠武, 王广策, 齐媛, 等. R-藻红蛋白光动力杀伤的形态学机制研究. *中国科学技术大学学报*, 1999, **29**(15): 560–564.