

# 激光照射癌细胞 RNA 对移植肿瘤影响的初步实验报告

刘德民 杨绪霞 张翠珍 梁梅英 曹鹏飞 陈兆平 周忆萍

(上海第一医学院眼耳鼻喉科医院)

杨福寿

(上海海员医院)

**提要:** 从癌细胞提取的 RNA, 经 3250 Å、4416 Å 各 8 J, 3371 Å 6 J 及 4880~5145 Å 9 J 分别照射, 然后与定量癌细胞预温 18 小时, 移植入 C<sub>57</sub>DL 小鼠腹腔内, 观察腹水癌形成与否的过程。

实验结果: 3250 Å 及 4416 Å 组饲养 6 个月未发生腹水癌。3371 Å 组从 21 天起部分形成腹水癌。4880~5145 Å 组在 50 天内全部发生腹水癌, 部分动物发生腹腔内实体癌。

## Preliminary experimental report: the influence of laser irradiated cancer cell RNA on animal transplanted tumors

*Liu Demin, Yang Xuxia, Zhang Cuizhen, Liang Meiyang, Cao Penfei  
Chen Zhaoping, Zhou Yiping*

(Dept. of Laser Medical Research, EENT Hospital, Shanghai First Medical College)

*Yang Fushou*

(Shanghai Seamen Hospital)

**Abstract:** First we irradiated respectively RNA extracted from cancer cells with laser light at different wavelengths and energy then preheated the cancer cells RNA for 18 hrs and transplanted them into the absominal cavity of C<sub>57</sub> DL mice, and observed the influence of carcinoma growth.

Result: I. 3250 Å and 4416 Å group: no ascitic cancer for six months. II. 3371 Å group: ascitic cancer at some parts from the 21th day. III. 4880 Å~5145 Å—group: ascitic cancer caused in all mice from 50 th day, and a part engendered with abdominal cavity consolidatic cancer.

## 前言

在20世纪60年代,Beukers和Berends<sup>[1]</sup>首先开拓了核酸光生物学研究的新领域,随着短波长激光的发展,于70年代后期,许多学者都开展了激光对核酸及其衍生物作用的研究。研究证明,短波长激光对组成核酸的碱基是很敏感的,即激光可使碱基的排列顺序产生质与量的变化,而导致核酸的遗传信息发生偏差。我们的实验研究目的是企图用几种不同波长的激光,使癌细胞的基因达到所希望的偏差,改变癌细胞的分裂顺序,最后希望能得到控制癌细胞生长的手段。

## 材料与方 法

### 1. RNA 提取

根据 Kay E.R.M.<sup>[2]</sup>方法将中国科学院药物研究所提供的 C<sub>57</sub>DL 纯种小黑鼠,体重 18~20 克,腹腔移植的肝癌腹水型癌细胞(Mouse-Hepatoma),提取 RNA。

RNA 纯度测量:经用紫外分光光度计测定,在 2600 Å 和 2800 Å 处测得 OD 值之比

$$\frac{2600 \text{ \AA}}{2800 \text{ \AA}} = \frac{0.61}{0.305} = 2$$

符合核酸纯度提取标准,标本纯度在 95% 以上。

提取的 RNA 白色粉末,可溶于蒸馏水。

### 2. 激光器及照射能量(见表 1)

表 1

激光器种类	波长(Å)	照射能量(J)
He-Cd	4416	8
He-Cd(倍频)	3250	8
N <sub>2</sub>	3371	6
Ar	4880~5145	9

### 3. RNA 的配制与激光照射

将提取的肝癌腹水型 RNA 白色粉末,

溶于双蒸水,剂量为 5 μg/ml,根据预定的激光波长和能量进行照射。照射时 RNA 液体置于石英瓶内,将瓶置于特定的高频振荡器所安装的每 30 秒/周定时旋转器上。

### 4. RNA 配制液的连续光谱分析

应用配制的 RNA 溶液,取浓度为 0.07 μg/ml 作光谱分析,在 2120 Å 及 2600 Å 有明显的吸收峰,如图 1 所示。

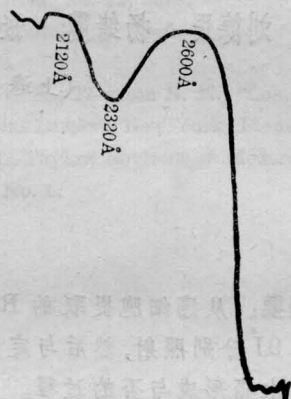


图 1 RNA 配制液连续光谱显示的吸收峰  
肝癌腹水型提取 RNA 稀释 1/64 浓度=0.07 mg/ml

### 5. 实验动物与分组

动物是中国科学院药物研究所提供的 C<sub>57</sub>DL 纯种小黑鼠,体重 18~20 克。采用该所提供的肝癌腹水型癌株。通常将该癌株 600 万癌细胞注入动物腹腔内,饲养 5~7 天,几乎 100% 形成腹水癌。

#### (1) 对照组

A 腹水癌对照组:动物 20 只,单纯将肝癌腹水型癌细胞注入腹腔内,不作任何处理,观察自然腹水癌的形成。

B 癌细胞预温对照组:动物 10 只,肝癌细胞 600 万,先在温箱内预温 18 小时后再注入动物腹腔内,观察预温后对腹水癌形成的影响。

C RNA 对照组:动物 10 只,单独腹腔内注入未经激光照射的 RNA 配液 1 μg/ml,观察动物的反应是否亦可形成腹水癌。

D RNA 预温对照组:动物 10 只,经

激光照射后的 RNA 配制液, 预温 18 小时后, 观察腹腔注射后的反应。

## (2) 实验组

实验组根据四种不同的激光波长, 照射不同的能量, 分别照射 RNA  $1\mu\text{g}$  配液后, 与  $6\times 10^6$  癌细胞混合。经预温 18 小时, 再注入动物腹腔。故动物也分为四个实验组, 如表 2。

表 2 实验动物分组

组 别	动 物 数	激光照射能量(J)
3250 Å 组	9	8
3371 Å	9	6
4416 Å	9	8
4880~5145 Å	9	9

## 6. RNA 配制液污染鉴定

细菌培养, 5 天无细菌生长。霉菌培养, 5 天无生长。

## 实验结果

### 1. 对照组

(1) 腹水癌对照组: 动物给腹腔内注射癌腹水型癌细胞  $6\times 10^6$ , 20 只 C<sub>57</sub>DL 小鼠, 经饲养 5~7 天全部分别发生腹水癌。抽腹水作癌细胞计数, 6000~80000 万/ml。

该组小鼠剖杀, 病理组织学所见, 部分动物肝脏癌变。余无特殊发现。

(2) 癌细胞预温对照组: 将肝癌腹水型癌细胞  $6\times 10^6$  预温 18 小时移植入动物腹腔。10 只小鼠, 于 5~7 天亦全部分别形成腹水癌。

将动物剖杀, 发现部分肝脏和脾脏癌变, 组织亦有改变。

上述二组的结果基本相同 (癌细胞预温后接种仍能形成腹水癌)。

(3) RNA 对照组: 单纯用  $1\mu\text{g}$  RNA 未经激光照射的配制液, 注入动物腹腔。10 只动物, 正常饲养, 7 天无腹水形成, 剖杀病

理组织所见, 颈淋巴肿大, 胸腺增大。21 天, 无腹水形成, 剖杀见肝脏略大, 颈淋巴大, 肝细胞组织学改变。继续饲养到 6 个月均无腹水, 动物以正常状态生存。

### (4) RNA 预温组对照组

经激光照射后的 RNA  $1\mu\text{g}$  配液, 预温 18 小时, 注入动物腹腔内, 10 只小鼠, 7 天无腹水出现。剖杀见胸腺较小, 颈淋巴肿大, 伴有部分坏死。21 天亦无腹水形成, 剖杀见肝脏略大, 颈淋巴肿大, 部分肝组织病变。继续观察 6 个月仍无腹水, 亦无特殊发现, 动物正常生存。

## 2. 实验组

### (1) 3250 Å 激光照射 RNA 组

RNA  $1\mu\text{g}$  经 3250 Å 激光照射 8J, 与癌细胞  $6\times 10^6$  混合预温 18 小时, 注入 9 只小鼠腹腔内。7 天无腹水形成, 剖杀亦无特殊发现。21 天亦无腹水, 剖杀见胸腺及颈淋巴肿大, 组织学呈反应性变化。继续观察 6 个月仍无腹水癌形成, 动物正常生存。图 2 为动物存活照片。

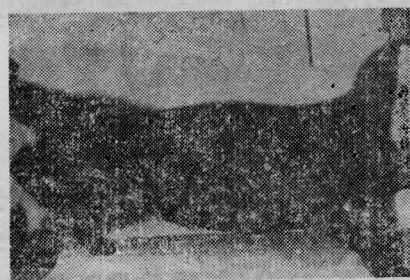


图 2 3250 Å 实验组动物存活六个月外观

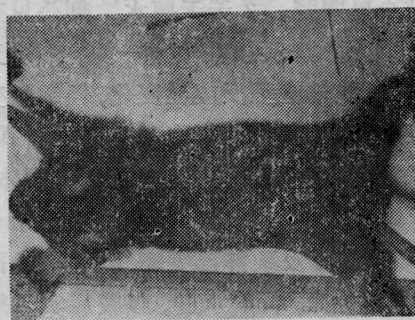


图 3 4416 Å 实验组动物存活六个月外观

## (2) 4416 Å 激光照射 RNA 预温组

RNA 1 μg 经 4416 Å 激光照射 8J, 与癌细胞  $6 \times 10^6$  混合预温 18 小时, 注入 9 只小鼠腹腔内。7 天无腹水形成, 剖杀见颈淋巴结肿大。21 天亦无腹水形成, 剖杀无特殊发现, 仅组织学呈反应性变化。此后到 6 个月, 均无腹水形成, 动物正常生存。图 3 为动物存活照片。

## (3) 3371 Å 激光照射 RNA 预温组

RNA 经 3371 Å 激光照射 6J, 与癌细胞  $6 \times 10^6$  混合预温 18 小时, 注入 9 只小鼠腹腔内。7 天无腹水, 剖杀见胸腺坏死变性, 颈淋巴结肿大。21 天三只发生腹水, 剖杀见肝色泽变淡, 脾萎缩, 颈淋巴结肿大, 组织学检颈淋巴结呈反应性增生。40 天又发生 2 只腹水死亡, 仅 2 只存活到 6 个月。图 4 为存活动物照片。

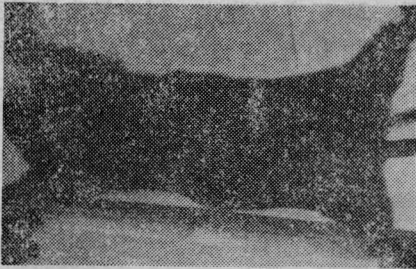
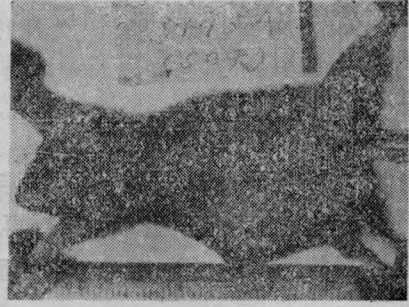


图 4 3371 Å 实验组动物未发生  
癌肿存活六个月外观

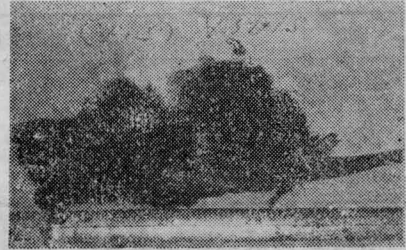
## (4) 4880~5145 Å 激光照射 RNA 预温组

RNA 经 4880~5145 Å 激光照射 9J, 与癌细胞  $6 \times 10^6$  混合预温 18 小时后, 注入 9 只小鼠腹腔。7 天无腹水, 剖杀见颈淋巴结肿大坏死。21 天发生腹水一只, 剖杀无特殊发现, 组织学检呈反应性变化, 但细胞变性范围较广。40 天出现腹水 3 只死亡。51 天发生 3 只腹水, 剖杀后见腹腔内生长实体瘤。此 3 只腹水腹腔内实体瘤剖检如下:

其一, 胸腺及颈淋巴萎缩, 肝肿大表面成结节状, 脾肿大, 肾脏水肿, 腹膜后实体瘤重 13 克。



(a) 动物 50 天腹腔发生实体瘤外观

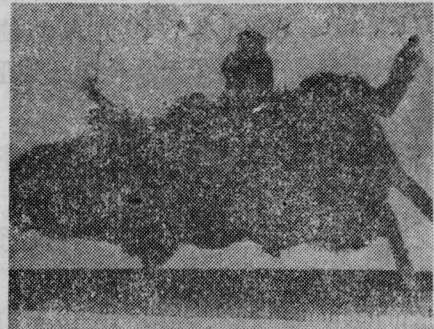


(b) 剖杀后腹腔实体瘤重 13 克

图 5 4880~5145 Å 实验组

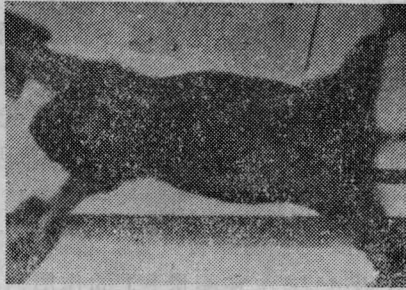


(a) 50 天发生腹腔实体瘤外观

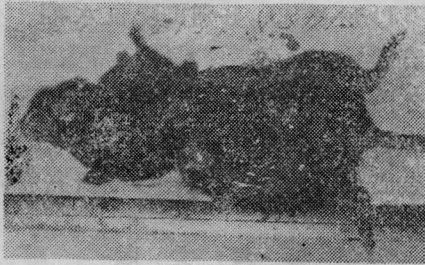


(b) 剖杀后腹腔实体瘤重 6 克

图 6 4880~5145 Å 实验组



(a) 50 天发生腹腔实体瘤外观



(b) 剖杀后四处不同大小的腹腔实体瘤  
图 7 4880~5145 Å 实验组

其二，胸腺及颈淋巴结肿大，肝肿大色苍白，脾脏肿大，肾水肿，实体瘤来自腹膜，重 6 克。

其三，胸腺及颈淋巴结不肿大，但肝脏发生结节状肿瘤，腹腔发生四颗肿瘤，2 处约  $1 \times 1.5 \text{ cm}$ ，2 处约  $0.5 \times 0.3 \text{ cm}$ 。见图 5~7 所示。

### 3. 动物剖杀后组织学变化

各组动物在 21 天随机抽样剖杀，对肝脏、脾脏、颈淋巴结和胸腺作组织学检查，就其有组织改变者如表 3。

## 讨 论

1. 实验结果表明  $3250 \text{ \AA}$  和  $4416 \text{ \AA}$  激光组能量 8J 对肝癌腹水型癌细胞 RNA 作用后，经 6 个月的观察均未发生腹水癌及其它类型癌，说明该二种波长对癌细胞 RNA 是有作用的。但波长  $3371 \text{ \AA}$  组的动物，在腹腔注射后 21 天出现三只腹水癌比对照组延迟二倍时间，可是最后有三只未发生癌肿，已存活 6 个月。其原因可能因所给能量仅 6J，比前二组低 2J 之故。而  $4880 \sim 5145 \text{ \AA}$  组亦于 21 天开始陆续发生腹水癌及 51 天出现腹腔临近器官及组织的实体瘤，从时间上都比对照组延长，可以认为该波长的能量虽增大到 9J，仍不及前三种波长的作用。根据实验结果其作用机理有待进一步探讨。

2. 据文献报道国内外学者曾应用哺乳动物的正常肝 RNA 与肝癌细胞预温实验，

表 3 实验动物 21 天的组织学变化

组 别	肝 的 病 理 变 化	转 移 情 况	其 它
癌细胞预温对照组	肝细胞浊肿，变性，窦隙及中央静脉高度扩张，并见肝癌细胞团的侵袭。	肝脾有转移	脾高度充血，有的区域变性
RNA 组	肝细胞之间出现多的间变细胞及少数癌变细胞，分裂相多见。	无	
$3250 \text{ \AA}$ 组	肝窦中央静脉高度扩张充血，汇管区有柯氏细胞增生，部分区域肝细胞浊肿变性。	无	脾滤泡增生，间质多核巨细胞 1~4/H-P
$3371 \text{ \AA}$ 组	基本同上	无	淋巴结呈反应性增生
$4416 \text{ \AA}$ 组	肝局部区域有炎症反应，其它基本同上。	无	
$4880 \sim 5145 \text{ \AA}$ 组	形态变化基本同 $3250 \text{ \AA}$ 组，细胞变性范围较大。	无	

发现有抑制癌细胞生长的作用, 并且证明该类正常 RNA 可以被癌细胞摄取, 而引起酶活力改变, 使癌细胞向正常细胞逆转的变化。而我们的实验与众不同的则使用肝癌腹水型癌细胞, 经额定的激光能量作用后, 同样也应该认为可被肝癌细胞所摄取。

对于正常细胞向癌的转化<sup>[9]</sup>, 在部分生物化学反应中, 使一个磷酸基转为带离子的蛋白质复合物, 穿透细胞膜进入正常细胞, 然后产生一系列反应。E. Racker 等在小鼠的肿瘤中观察到某些肿瘤细胞有所谓钠离子-钾离子三磷酸腺苷酶, 它连接着一个磷酸基的亚单位, 但在正常小鼠中则没有。他又发现这种添加的磷酸基是经过一系列反应的最后产物, 即蛋白激酶  $F \rightarrow$  蛋白激酶  $L \rightarrow$  蛋白激酶  $S \rightarrow$  蛋白激酶  $m \rightarrow Na^+ - K^+$  三磷酸腺苷酶, 这过程是通过磷酸化作用, 而此过程起催化激活作用的是一种酶。

这种催化激活过程, 不同于正常细胞的磷酸化作用, 因在正常作用中, 磷酸基是连接

在蛋白分子的丝氨酸上, 但上述反应, 是所有四种蛋白激酶的活性形式。都有一个磷酸基连接在酪氨酸上。

3. 由此可以设想特定参量的激光作用于癌细胞的 RNA 后, 使癌的遗传基因受到干扰或者破坏, 阻止癌细胞的分裂繁殖, 而发生逆转或改变它的原有特征。在我们实验中 3250 Å 及 4416 Å 在能量 8 J 的作用后, 使腹水癌不发生。而 3371 及 4880~5145 Å, 前者能量 6 J, 后者 9 J, 分别出现腹水癌。但两者确有差异。后者最终结果全部变为腹腔内的实体瘤, 这样的结果很有趣, 进一步探讨它的发生机理是非常有意义的工作, 当然也是很复杂而艰巨的, 有待进一步的研究和探讨。

### 参 考 文 献

- [1] R. Beukers, W. Berends; *Biochem. Biophys. Acta*, 1960, **41**, 550.
- [2] Kay E. R. M. *et al.*; *Amer. Chem. Soc.*, 1953, No. 75, 4041.
- [3] Spector M.; *Amer. Sciences News*, 1981, No. 27, 1.

(上接第 98 页)

量。此时 (55°C), 可计算得铷的原子浓度低于  $2.5 \times 10^{11}/\text{cm}^3$ 。

对于杂质铯来说, 当温度为 190°C 时, 其受激辐射能量已达本实验装置的能量最小检测量。考虑到铯仅仅是纯度为 99.9% 的铷金属样品中的杂质成分之一, 因而可估算得 190°C 时的杂质铯的原子浓度为  $10^{11}/\text{cm}^3$ 。

我们曾在低原子浓度下测量了所检测定向辐射的发散角, 其数值约为 11 mrad, 比同一装置所测得的泵浦光的发散角略大。

值得提出的是, 由于实验条件限制, 以上所有测量均是在泵浦光能量为数十微焦耳的情况下进行的。实验表明, 这一泵浦能量还远未达到饱和能量。另外安放样品的热管仅由

机械泵抽空到  $10^{-2}$  Torr, 光束变换系统也非最佳状态。所以, 我们认为如以更高能量去泵浦样品, 且改进其它有关实验条件, 那么必将在更低的温度和原子浓度下测量到受激辐射以及通过受激辐射的探测来检测高纯度样品中的杂质。

### 参 考 文 献

- [1] P. Niay *et al.*; *Opt. Commun.*, 1979, **29**, 369.
- [2] D. Cottor, D. C. Hanna; *Opt. and Quant. Electr.*, 1977, **9**, 509.
- [3] J. Piter, L. Kranse; *Canadian Journal of Physics*, 1968, **46**, 125.
- [4] 张道中等; 《物理》, 1979, **8**, No. 5, 394.
- [5] A. N. Nesmeyanov; *Vapor Pressures of Chemical Elements*, (Moscow, 1961).