

为 IgG 亢进型。IgG 具有刺激甲状腺机能亢进的作用。其为兴奋因子(细胞刺激型变态反应)即 V 型变态反应。

鉴于激光本身具有抑制兴奋的作用,因而可能对甲状腺特征功能异常的过度分泌具有抑制作用以及能改善和调整免疫功能的作用。一般说来 Graves 病中的甲状腺特征功能异常是不能被外源性激素抑制的过度分泌^[2]。但本文结果表明, 可被激光所抑制, 因而亢进型的 IgG 被纠正, 也有使 LATS、LATS-P 降低的可能, 甲状腺激素水平(T₃、T₄)异常的绝大部分被纠正为正常水平。伴之而来的是甲亢的一系列症状、体征改善或消失。

眼球突出度的改变: 由异常到正常或明显地降低, 这可能主要是由于激光照射睛明穴或耳门穴位作用的结果。从免疫学角度来看眼病变也有其免疫学基础, 眼外肌炎可能由免疫复合物之沉积引起。也有人认为: 球后区脂肪组织增生, 这种组织似乎能对 TSH 刺激起反应, 对刺激甲状腺的抗体可能也起反应, 甚至涉及致突眼抗体^[2], 激光刺激上述二穴位, 不仅有局部抗炎作用, 对眼外肌炎有较好的治疗作用, 更重要的也可能有眼的局部免疫效应及周身免

疫状况的改善有关。即可能是激光的一系列免疫效应, 而引起眼球突出度的改变和改善。

结论: 我们认为激光免疫效应可包括两个方面: 即激光的免疫加强作用和激光的免疫抑制作用。在 I 型变态反应疾病的激光治疗中, 主要表现为免疫加强作用, 使机体的免疫球蛋白水平升高, 主要为 IgG 和 IgM 的含量提高而达到了治疗作用, 尽管对个别病例亦现免疫抑制作用, 但总趋势和主导方面是呈免疫加强作用。而在 V 型变态反应疾病的治疗中, 则主要表现为免疫抑制作用, 主要为亢进型的 IgG 被纠正。这也符合中医针灸学的双向良性调节作用的观点。

参 考 文 献

- 1 上海第一医学院, 实用内科学(人民卫生出版社, 北京, 1976), 618, 619, 622
- 2 M. S. Thaier 等编著, 中国医学科学院肿瘤医院免疫学研究室译, 医学免疫学(人民卫生出版社, 北京, 1980), 639, 391, 393

(收稿日期: 1988年6月6日)

血卟啉衍生物(HPD)-光辐射对 Bcap-37 人乳癌 细胞系杀伤效应的实验研究

秦滨生 张嘉庆 王松霞 王燕玲

(北京医科大学人民医院外科肿瘤研究室)

Experimental study on killing effect of HPD-light irradiation on Bcap-37 human breast cancer cells

Qin Binsheng, Zhang Jiaqing, Wang Songxia, Wang Yanling

(Oncology Research Lab., People's Hospital, Beijing Medical University, Beijing)

提要: HPD-激光对 Bcap-37 人乳癌细胞系有显著的杀伤作用。HPD-激光作用后, 癌细胞最早出现的形态学变化是线粒体的肿胀破坏, 细胞色素氧化酶与琥珀酸脱氢酶活性也不同程度地受到抑制。其损伤依次表现为细胞团缩、胞浆内空泡形成、染色体质凝集、胞体肿胀和核碎裂。

关键词: HPD, 激光, Bcap-37

一、引 言

近几年, 应用激光-血卟啉光动力学效应探索恶

性肿瘤的诊治问题, 引起了国内外学者的广泛兴趣, 在实验研究和临床应用方面已取得了可喜的成效^[1,2]。但目前对其杀伤肿瘤的作用机理尚无一致

认识。本文以我室 1981 年在体外建立的 Bcap-37 人乳癌细胞系,对 HPD 的光动力学效应作体外及裸鼠体内接种肿瘤的联合观察。从肿瘤坏死、超微结构的变化和酶失活等方面,探讨其杀伤机制。

二、材料与方 法

1. 体内观察:HPD-激光对裸鼠移植瘤的杀伤效应研究(形态学与酶活性观察)。

(1) 光敏药物:HPD 由北京制药工业研究所研制,25mg/ml,避光 -20°C 保存。

(2) 癌细胞悬液制备:将本室冻存第 50 代 Bcap-37 乳癌细胞复苏、传代、常规培养后制成细胞悬液。

(3) 动物接种:NIH/nu 裸鼠 35 只,雌雄均有,鼠龄 6~8 周。每只裸鼠背部皮下分 4 点接种 Bcap-37 细胞悬液,每点 $2\sim 3.2\times 10^6/0.1\text{ml}$ 。13~14 天后,接种部位形成直径约 0.8~1.2cm 瘤结。

(4) 分组与给药:分 ① 空白对照组,② 单纯 HPD 组,③ 单纯激光照射组,④ HPD 加激光组。②、④ 组小鼠按 10mg/kg 经腹腔给药,给药后避光饲养。

(5) 光照:给药后 48 小时,②、③、④ 组小鼠进行肿瘤局部激光照射,形态学观察组所用的激光器是氩离子激光泵浦若丹染料激光器,发射波长 630nm,功率密度为 $200\text{mW}/\text{cm}^2$ 。各肿瘤点光照 15 分钟,光距 1.5cm,光斑 $\geq 1\text{cm}$,酶活性观察组光源应用氩离子激光泵浦 DCM 染料激光器,发射波长 630nm,输出功率 $300\text{mW}/\text{cm}^2$,光斑 $\geq 1.2\text{cm}$,光距 2cm,照射 15 分钟。

(6) 取材与标本制作:形态学观察组在光照后分别于即刻、20 分钟、1、3、12、24、48、72 小时进行,酶活性观察组于光照后 3、12、24、48、96 小时分批活体取材,每批取 9 个肿瘤点。

(a) 光镜标本:取肿瘤组织约 $0.5\times 0.4\text{cm}$,10% 福尔马林固定 24 小时,常规石蜡切片,HE 染色。

(b) 电镜标本:将肿瘤组织切成约 1mm^3 大小。冷 3% 戊二醛磷酸缓冲液 (pH 7.4) 固定 2 小时,冷 0.2M 蔗糖 0.1M 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 漂洗 1 小时,1% 饿酸溶液 (pH 7.3) 固定 2 小时 (4°C)。梯度丙酮脱水,EPON 812 包埋。超薄切片。醋酸铀、醋酸铅染色。JE MXIII 100 型透射电镜下观察。

(c) 组化标本:取材约 $0.5\times 0.8\text{cm}$,投入液氮骤冷,冰冻切片 $8\mu\text{m}$ 厚。

细胞色素氧化酶采用 Novicoff 氏二乳氨基联苯胺法。各组标本置作用液 37°C 孵育 2 小时,蒸馏水洗,2% 饿酸溶液 5 分钟,蒸馏水洗,甘油-明胶封固,镜检。

琥珀酸脱氢酶采用 Pearson 氏 Nitro-BT 显色法。标本置作用液 37°C 孵育 30 分钟,盐水洗,FCa 溶液 10 分钟,80% 酒精 5 分钟,甘油-明胶封固,镜检。

2. 体外观察:HPD-光辐射对体外培养 Bcap-37 细胞的杀伤效应研究(形态学观察)。

(1) 细胞培养:取培养 Bcap-37 乳癌细胞制成 $1.2\times 10^5\text{ml}$ 细胞悬液,加 1ml 于摄影培养瓶内,含 20% 小牛血清 RPMI 1640 培养液加至 5ml,37°C 培养。

(2) 观察:用附有 Bolex 缩时定格摄影装置及恒温设备的 Nikon 倒置显微镜,相差物镜 20 \times ,目镜 10 \times ,拍摄速度 1 格/30" 或 60",温度控制在 36~37°C。观察过程在尽量避光下进行。

三、结 果

1. 体内观察

(1) 组织形态观察(光镜)

① 空白对照、单纯 HPD 和单纯激光组这三组的组织形态基本相同,无明显差别。接种的瘤组织由圆形或多边形上皮样细胞呈片状或巢状间以少量间质构成。瘤节周围有结缔组织包绕,瘤细胞生长密集,胞浆丰富,核深染,核浆比例大,核内有 1~3 个核仁,核分裂相易见(图 1)。

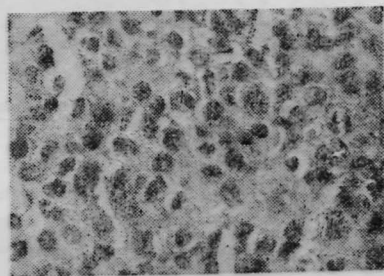


图 1 空白对照组 Bcap-37 乳癌组织 H-E 染色 ($\times 400$)

② HPD 加激光组:即刻取材的肿瘤组织形态学与对照组无明显差别。光照后 20 分钟,瘤节中癌细胞胞浆内出现空泡变性,间质血管扩张充血及红细胞外渗(图 2)。3 小时,空泡变性显著加重,胞浆空化(图 3)。12 小时,肿瘤周边部出现不规则的片状坏死灶,坏死区域有多量红细胞及炎细胞浸润(图 4)。48 小时后,坏死区域逐渐扩大,仍可见炎细胞

浸润(图5)。

(2) 电镜观察

① 空白对照、单纯 HPD 和单纯激光组三组超微结构基本一致。

② HPD 加激光组: 即刻取材的肿瘤组织形态学所见与对照组一致, 无明显改变。光照后 20 分钟, 突出改变的是部分线粒体开始出现不同程度的肿胀, 嵴断裂或减少, 1 小时, 线粒体膨胀加剧呈圆球状, 出现膜断裂, 嵴残缺不全, 很难找到正常线粒

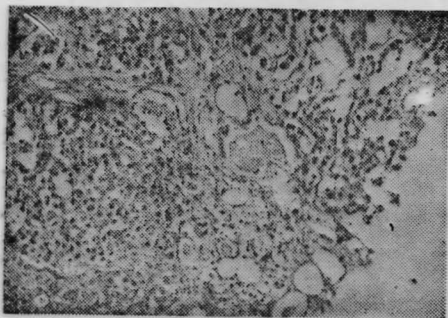


图2 HPD 合并激光照射后 20 分钟, 癌细胞胞浆空泡变性, 间质血管扩张、充血及红细胞外渗, H-E 染色($\times 100$)

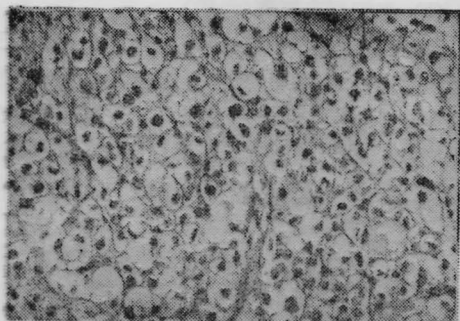


图3 HPD 合并激光照射后 3 小时, 空泡变性加剧, H-E 染色($\times 200$)

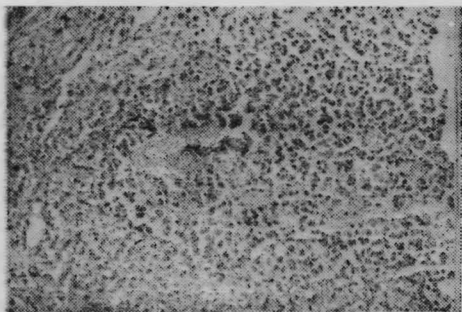


图4 HPD 合并激光照射后 12 小时, 瘤结周边部出现不规则片状坏死, 其内有炎细胞浸润, H-E 染色($\times 100$)

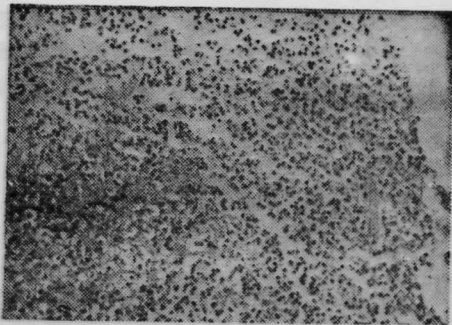


图5 HPD 合并激光照射后 72 小时, 坏死灶扩大, H-E 染色($\times 100$)

体存在。间质血管内细胞浆结构破坏, 管腔内充满红细胞, 血管闭塞。3 小时, 细胞损害更为明显, 内质网扩张呈大小不等的囊泡状, 核糖体及细胞表面微绒毛减少。12 小时, 线粒体和内质网膜破裂, 相互融合形成多个巨大空泡。核糖体明显减少。膜表面微绒毛消失, 胞膜出现损伤破裂, 胞质外渗。24 小时, 核膜出现断裂, 核质外渗, 染色质凝集。48 小时, 细胞膜破坏愈加严重, 细胞轮廓模糊不清, 染色质凝集呈团块状或密度减低形成散在的颗粒, 核仁模糊不清或消失。72 小时, 随损害加重, 胞核崩解消失, 细胞内结构几乎完全破坏。

(3) 酶活性观察

① 细胞色素氧化酶: 空白对照可见细胞内棕色颗粒沉淀, 颗粒较粗大, 呈团块状。HPD 加光照组于光照后 3 小时, 颗粒密度降低示酶活性减弱。12 小时, 沉淀颗粒明显减少。24 小时后, 见不到沉淀颗粒。而其它对照组均未见改变。

② 琥珀酸脱氢酶: 空白对照组可见细胞内蓝紫色细小颗粒沉淀。HPD 加光照组与对照组比较, 光照后 12 小时, 沉淀颗粒密度减低, 24~48 小时, 逐渐消失。其它对照组无变化

2. 体外观察

(1) 单纯光照及单纯 HPD 作用的细胞观察: 细胞形态和运动与常规培养细胞比较无明显变化。

(2) HPD 加光照后细胞观察: 光照后即刻观察, 细胞形态和运动与各对照组比较均无明显改变。至 30 分钟左右, 细胞开始缓慢团缩, 体积变小呈圆球状, 胞膜伸展运动消失(图6)。1 小时左右, 胞浆内出现大小不等空泡。随时间推移, 空泡不断扩大并相互融合以至胞浆渐呈网状。4 小时左右, 细胞继续膨胀, 并出现“扭动”(细胞死亡前的一种运动表现), 随“扭动”逐渐停止, 细胞呈静止状态, 其形态与结构不再发生变化, 表明细胞已死亡(图7)。

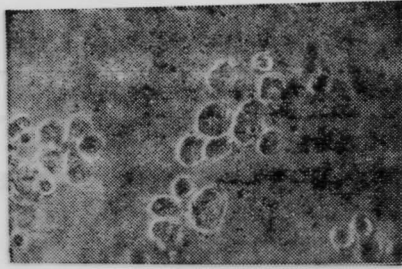


图6 HPD 合并光照后 45 分钟, 细胞圆缩($\times 200$)

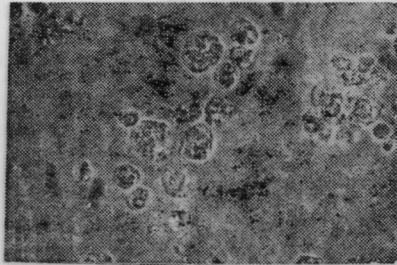


图7 HPD 合并光照后 4 小时, 胞体膨胀, 边缘出现大泡状突起, 染色质凝集, 核仁消失, 可见核崩解($\times 200$)

四、讨论

无论从体内或体外光动力学效应观察, HPD 加光辐射对 Beap-37 乳癌细胞有显著的杀伤效应。

综合实验结果, 无论从超微结构变化或是细胞氧化酶系的观察, 都证实了线粒体对 HPD 有较强的亲和力, 是光敏作用的药敏靶点, 是首先受损的部位。

Kessel 等提出光敏作用破坏细胞膜中氨基酸残基, 引起广泛的膜蛋白交联和非特异性损伤, 使膜的

主动转运功能障碍, 非特异性通透性增加^[3,4]。本实验也观察到, 光照后 3~12 小时, 细胞表面微绒毛减少, 胞膜断裂, 胞质外渗。体外显微定格摄影观察到光照后 2 小时, 细胞表面形成泡状突起, 膜通透性增加, 胞体肿胀增大。分析病变发展顺序, 胞膜的损伤晚于线粒体的破坏, 因而膜损伤究竟是原发于光敏效应还是继发于线粒体的损害, 当有待于进一步探讨。

光动力学效应损伤 DNA 已见报道^[5,6]。本实验中观察到染色质的凝集, 核膜破坏与胞核崩解等现象, 但上述变化发生于细胞损害的后期, 因此推测细胞核 DNA 的损伤属继发性破坏。

Bugelski 等认为肿瘤血管系统的破坏和光敏杀伤肿瘤有密切关联^[7]。从本实验中见到, 光照后 20 分钟~1 小时, 肿瘤间质血管扩张充血, 血管内血流淤滞, 血管闭塞, 内皮细胞变性坏死及管壁破裂红细胞外渗, 提示光敏效应间接地破坏肿瘤的微循环系统, 影响了肿瘤的血供, 是肿瘤坏死的重要因素之一。

本实验过程得到解放军总医院呼吸科李峻亨教授的热心指导与协助, 在此致衷心感谢。

参 考 文 献

- 1 Hahlman A. *et al.*, *Cancer Res.*, **43**, 430(1983)
- 2 哈献文 *et al.*, *中华医学杂志*, **63**, 322(1983)
- 3 Kessel D. S., *Biochemistry*, **16**, 3443 (1976)
- 4 Veweij H. *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, **87**, 647 (1981)
- 5 Morn J. *et al.*, *Cancer Res.*, **40**, 2919(1980)
- 6 Evenson J. F. *et al.*, *Br. J. Cancer*, **45**, 456(1981)
- 7 Bugelski P. J. *et al.*, *Cancer Res.*, **41**, 4606(1982)

(收稿日期: 1987 年 10 月 20 日)

(上接第 640 页)

Contents of *Applied Physics A*
Volume 49, Number 2, August 1989 **A5**
Contents of *Chinese Journal of Lasers*
Volume 16, Number 6, June 1989 **A6**
Indexed in *Current Contents*
Evaluate and abstracted

for *PHYS on STN*

Rapid Communications

W. Holzapfel, W. Settgast

Precise Force Measurement over 6 Decades

Applying the Resonator-Internal Photoelastic

Effect **169**