

He-Ne 激光微辐照对亚甲蓝敏化的 HeLa 癌细胞的光动力学效应*

马淑懿

(中山大学生物系)

黄旭

(中山大学激光与光谱学研究所)

Photodynamic effect of He-Ne laser micro-irradiation on MB-sensitized HeLa cells

Ma Shuyi

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou)

Huang Xu

(Institute of Laser and Spectroscopy, Zhongshan University, Guangzhou)

提要: 本文报道用 He-Ne 激光微束照射单个亚甲蓝敏化的 HeLa 细胞后,在短时间内观察到的光动力学效应。用不同的照射剂量获得“急性损伤”、“慢性损伤”和“弱性损伤”效应三种情况的实验结果,并进行了分析讨论。

关键词: 亚甲蓝, HeLa 癌细胞, 光动力学效应

应用激光光动力学效应诊治癌症的临床和基础研究目前在国内外均已获得较大的发展,尤其是对利用血卟啉衍生物(HPD)为光敏化剂的研究更为详尽^[1,2]。但对利用亚甲蓝(Methylene Blue, 简称 MB)为敏化剂的研究尚少见报道,同时这种基于光敏化作用的光动力学疗法尚存在许多问题有待研究,其中包括对高效光敏化剂的探索及其相应的作用机制研究;而这些问题往往需要深入到细胞和分子水平上进行基础性研究探讨。本文报道用 MB 敏化子宫颈癌培养细胞(HeLa 培养细胞),以 He-Ne 激光微束照射此单个细胞后,在短时间内观察到的光动力学效应。

实验方法和结果

实验用的癌细胞样品系由中山医科大学肿瘤研究所提供的子宫颈癌细胞株,在加 15% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中以每毫升 $4\sim 6 \times 10^5$ 个细胞的浓度,在 37°C 的特制玻璃小室内培养;24 小时后以 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的 MB 生理食盐水溶液敏化 HeLa 细胞 10 分钟后,用不同照射时间 t 对单个细胞进行 He-Ne 激光微束照射。对每一照射剂量均重复三次以上实验,每次实验均作出连续显微摄影记录。

所用的光敏化剂为广州化学试剂厂生产的药用

亚甲蓝(其分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{SCl}$),配制成 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的生理食盐水溶液备用;并用日本岛津 UV-240 自动分光光度计测得其在 400~700 nm 波段的吸收光谱。

所用的 He-Ne 激光器输出波长为 632.8 nm,输出功率为 1.8 mW,经反射引入 Leitz 倒置相衬显微镜后实测落在样品位置上的激光平均功率在 0.5~0.6 mW 范围内改变,用 5 \times 目镜和 20 \times 物镜将激光束微聚焦在单个 HeLa 细胞上的激光光斑大小约为 6 μm ,分别以 1、2、3、3.5、4、5 和 10 分钟的不同时间(t)照射,获得结果如下:

1. 分别以时间 $t=3.5、4、5、10$ 分钟的 He-Ne 激光微束照射经 MB 敏化的单个 HeLa 细胞后,即时发现其细胞变形,并形成几个小圆球体,以后逐渐融合成较大的、其细胞内液均匀一致、无颗粒的圆球体;其后,圆球体液泡化胀大成为一透明大泡,胞核和胞质颗粒被其挤压在一边;随之胞核萎缩,细胞死亡、脱壁。其整个变化过程所经历的时间与激光辐照剂量大小有关,一般经 10~24 小时。我们称之为“急性损伤”的效应(见图 1(a)~(c))。

2. 当以 $t=2、3$ 分钟的 He-Ne 激光微束照射

* 全国第一届激光医学发展研讨会(武汉)入选论文。

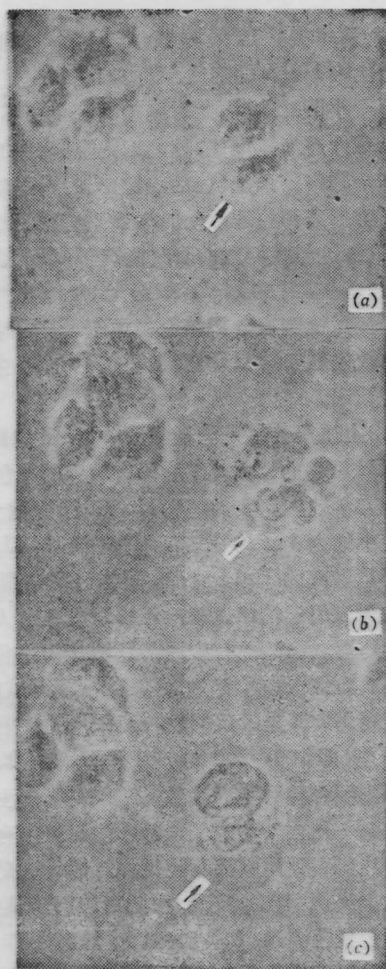


图 1

(a) 激光照射前由 MB 敏化的 HeLa 细胞, 箭头所示为选定的靶细胞(500×); (b) 箭头所示的细胞被激光照射 10 分钟的即时照片, 细胞已变形, 并形成几个小圆球体(500×); (c) 激光辐照后 1 小时的照片, 细胞圆球体液泡化胀大成一透明大泡(500×)

MB 敏化的单个 HeLa 细胞后, 即时观察未发现明显变化, 但约经 1 小时后细胞亦以同上方式发生退行性变化, 而这种变化较慢, 程度较浅。我们称之为“慢性损伤”效应。

3. 当以 $t=1$ 分钟的 He-Ne 激光微束照射 MB 敏化的单个 HeLa 细胞后, 即时观察未见有明显变化, 但经 8~16 小时后在胞核周围的细胞质内出现大量透明小泡, 随之细胞收缩变形, 40~48 小时后细胞呈现萎缩退化。我们称之为“弱性损伤”效应(见图 2(a)~(c))。

上述三种情况, 除被激光微束照射的细胞外, 其周围已敏化但未经激光微束照射的细胞均无明显效

应(参看图 1、2)。

4. 以生理食盐水代替 MB 敏化溶液处理的对照组单个 HeLa 细胞虽用较大剂量(对应 $t=10$ 分钟)的激光微束照射, 但始终未发现明显的效应(见图 3(a)~(c))。

实验结果的分析讨论

1. 利用 MB 为光敏化剂的光动力学效应研究尚未见报道, 同时从测量 MB 的生理食盐水溶液的吸收光谱中可知它具有—吸收峰在~662nm 附近的最强吸收谱带, 而 He-Ne 激光的 632.8nm 波长正好落在此吸收带范围内; 虽然 MB 对此激光波长的吸收还不具最十, 但在实际临床应用此较长波

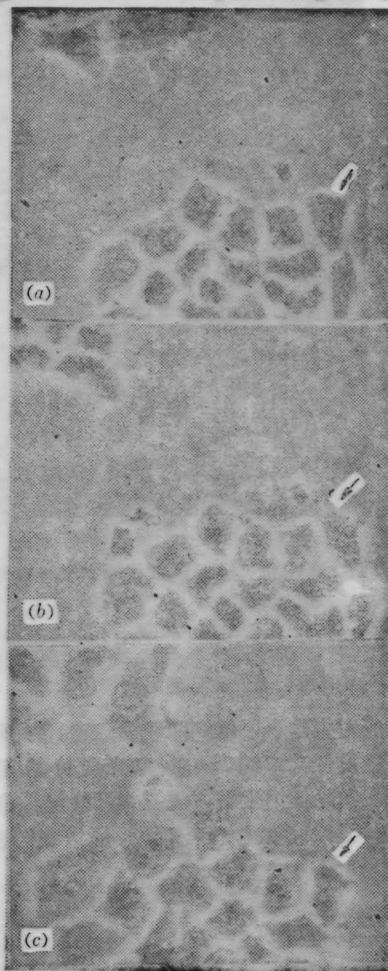
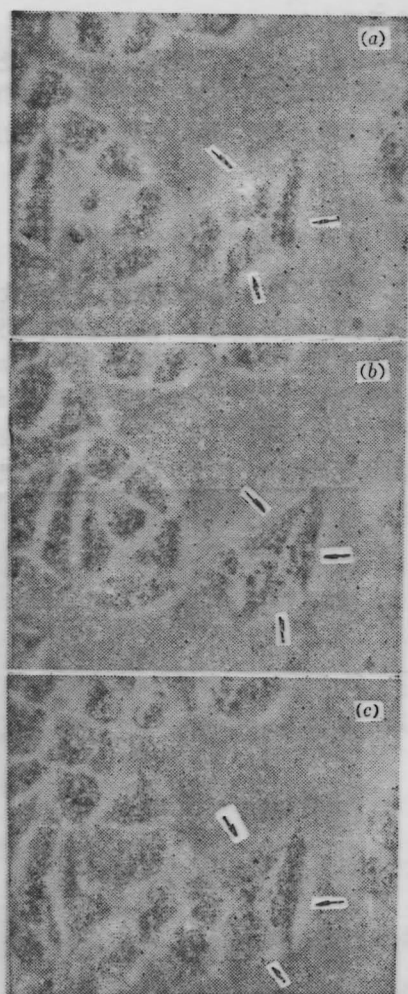


图 2

(a) 激光辐照前 MB 敏化的 HeLa 细胞, 箭头所示为选定的靶细胞(500×); (b) 激光辐照 1 分钟, 16 小时后的照片, 在胞核周围细胞质内有大量透明小泡(500×); (c) 辐照 42 小时后的照片, 细胞已呈萎缩退化情况(500×)



(a) 激光辐照前未经 MB 敏化的 HeLa 细胞, 箭头所示为选定的靶细胞(500×); (b) 激光照射 10 分钟 4.5 小时后的照片, 此时各靶细胞均未发现明显改变(500×); (c) 辐照后 17 小时照片, 各靶细胞仍未发现有明显改变(500×)

长的激光对人体表层组织却较易穿透。此外, 还考虑到连续波低功率的 He-Ne 激光器价格低廉、易得, 且在实际使用上既方便操作又能较易将激光束引入相衬显微镜实施微束辐照, 所以我们选择 MB 为此试验的光敏化剂。

2. 从本实验结果分析, 经 He-Ne 激光照射 MB 敏化的 HeLa 细胞后, 首先出现细胞变形, 并形成若干个小圆球体, 而此时胞核的变化却不大, 其后细胞圆球体逐渐液泡化, 随之细胞脱壁、死亡。这是典型的细胞内膜系统(包括线粒体、内质网以及维持细胞正常形态和生理活动的微梁系统)受破坏而退变的过程, 这与我们以前研究氩离子(Ar⁺)激光照射吡啶橙(Δo)敏化的 HeLa 细胞光动力学效应所获得的电子显微镜观察分析结论相类似^[3]; 同时也表明 MB 光敏化剂如同 HPD 光敏化剂^[2]一样, 主要定域于细胞质内。

3. 上述实验结果已表明, He-Ne 激光微束照射对用 MB 敏化的 HeLa 细胞确有较强的损伤癌细胞的光动力学效应。我们还用 He-Ne 激光宽光束(其光斑大小约为 4 mm)在较低剂量(即 13.3 J/cm²)下照射 MB 敏化的 HeLa 细胞, 同样可观察到此效应。但是能否应用于临床试验, 还需考虑它对人体是否有毒性作用。虽然已有应用 MB 治疗由化学药物引起的高铁血红蛋白和氰化物中毒^[4], 但我们仍参考临床应用 HPD 光敏化剂时一般采用的注射剂量的 20~40 倍(即 100~200 mg/kg)的 MB, 对 22 只小白鼠进行腹腔和静脉注射试验, 结果发现在注射后 10 天内均无一死亡, 其中仅在静脉注射组中有 2 只小白鼠在注射后其尾基部发生炎症, 估计这是由于注射技术上失误引起的皮炎。由此可以初步认为: 在一定注射剂量范围内, MB 对生物体的毒性作用是不大的。但是若应用于临床试验尚需审慎作进一步试验。至于 MB 光敏化剂是否适用于子宫颈癌或其他种类恶性肿瘤的临床治疗, 以及其实际效率等则更须作进一步实验。

参 考 文 献

- 1 江寿平, 激光科学与技术, 7 (2), 1 (1984)
- 2 V. F. Kamalov et al., *Sov. J. Quant. Electr.*, 15 (10), 1319 (1985)
- 3 马淑懿, 谢勤, 国际大剂量电离与非电离辐射生物效应会议论文摘要集, 1988, D-34, 160
- 4 杨藻宸主编, 医用药理学(人民卫生出版社, 1982), p. 1000