

参 考 文 献

- 1 M. W. Berns *et al.*, *Nature*, **221**, 74(1969)
- 2 M. W. Berns *et al.*, *Science*, **186**, 700(1974)
- 3 H. Liang *et al.*, *Exp. Cell Res.*, **144**, 234(1983)
- 4 梁 宏 *et al.*, *中国激光*, **13**, 132(1986)
- 5 S. Monajembashi *et al.*, *Exp. Cell Res.*, **167**, 262(1986)
- 6 F. Scalenghe *et al.*, *Chromosoma*, **82**, 205(1981)
- 7 D. Rohme *et al.*, *Cell*, **36**, 783(1984)
- 8 E. M. G. Fisher *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5846(1985)

(收稿日期: 1989年3月21日)

HPD 加激光对细胞周期中不同时期 Hela 细胞的杀伤作用的比较

蒋如朗 梁 宏

(中国科学院遗传研究所, 100101)

A comparative study of cell killing effect on different stages of cell cycle in Hela by HPD plus laser irradiation

Jiang Rulang, Liang Hong

(Institute of Genetics, Academia, Sinica Beijing)

Abstract: Human cervix Hela cells were synchronized, collected and seeded into Rose chambers for experiment. Cells at G_1 , S and G_2 stages were then treated in the medium with hematoporphyrin (HPD) and irradiated by a laser microbeam at 632.8 nm. It was found that in case of the occurrence of primary and significant visible damage, cells at S stage showed the earliest, G_2 stage the next, and G_1 stage the latest. Variance analysis demonstrated that the variations are statistically significant.

Key words: photodynamic therapy, laser microirradiation, HPD, cell cycle, Hela

血卟啉衍生物(HPD)因其独特的自发荧光和光毒作用以及能选择性地滞留于癌细胞中,而被作为光敏药物应用于癌症的临床诊断和治疗,至今已发展成肿瘤光动力学治疗这一新领域^[1,2]。大量临床治疗的结果表明,HPD-光动力学疗法具有定位准确、对肿瘤杀伤力强、同时对周围组织损伤小的优点^[3]。

人们已知辐射、高热和某些化疗药物等的作用皆受细胞周期的影响。Christensen等^[4]研究了体外培养的NH1K 3025细胞在细胞周期不同时期对血卟啉光敏作用的敏感性差异,发现各时期细胞对光敏作用的敏感性差异很大,王代树等^[5,6]也对MG3-803胃癌细胞进行了类

似的研究。为此,我们在已有的工作基础上^[7]以同步化的 HeLa 细胞为材料,用激光显微照射单细胞的方法进行了本研究,以检验这一现象是否具有普遍性,并进一步探讨光动力学反应对细胞产生影响的有关机制。

材 料 和 方 法

1. 细胞培养和同步化

人宫颈癌 HeLa 细胞在含 15% 小牛血清的 Eagle 培养液中进行培养,一般为每周传代两次。细胞同步化采用下述收集分裂细胞的方法:当细胞在培养瓶中长到适当密度时,放入 4°C 冰箱中一小时,然后置于 37°C 恒温箱中继续培养。20 小时后,在超净工作台上打开培养瓶瓶塞,倒去瓶内培养液以除去悬浮的死细胞,加入适量新鲜培养液,以移液管吸起培养液轻轻冲洗细胞表面数次,使贴壁松弛的分裂细胞脱落。经制片检查发现用该方法收集的细胞分裂相在 90% 以上。

将收集的分裂期细胞以适当的密度接种于 Rose 小室中,置于 37°C 的 5% CO₂ 培养箱中保温培养。不定时地在相差显微镜下追踪小室盖玻片标记圈内细胞的分裂情况,发现培养到 18 小时时几乎没有细胞进入分裂期,而培养到 22 小时时约 70% 细胞已进入分裂期,到 24 小时时 90% 的细胞完成了有丝分裂。因此,本实验所用的 HeLa 细胞的细胞周期总时间为 20~24 小时。参照 Peterson 等^[8]的结果,确定 HeLa 细胞各时期的时间如下: G₁ 期为 8~12 小时; S 期约为 8 小时; G₂ 期为 2~3 小时; M 期为 1 小时。

2. HPD 处理

实验使用的 HPD 为扬州生化制药厂提供的光卟啉固体粉末制剂。实验开始前先将 HPD 粉剂用生理盐水配制成浓度为 250 μg/ml 的溶液避光贮存于 4°C 冰箱中。使用时将此 HPD 原液以培养液稀释成终浓度为 10 μg/ml 的溶液。

将同步收集的分裂期细胞以适当的密度接种于 Rose 小室中,置于 CO₂ 培养箱中保温培养,分别在培养 5 小时、13 小时和 18 小时后换入含 10 μg/ml HPD 的培养液,并继续置于 37°C CO₂ 培养箱中保温培养 1 小时,然后再换入新鲜培养液继续保温培养 1 小时后进行激光显微照射实验。

3. 激光显微照射

所用激光微束照射装置为氦氛激光显微仪。激光器功率 1.5 mW,发射波长 632.8 nm 的连续红光。激光束经匹配引入一台相差光学显微镜,用 16× 物镜聚焦光束于待照射细胞的细胞核部位。光斑直径约为 3~4 个 μm。照射所用的激光剂量通过变换照射时间来控制。

实 验 结 果

多次重复实验的结果表明,由于激光照射激发了细胞内的 HPD,细胞发生了光动力灭活反应。在相差显微镜下,观察到受照射细胞从出现可见损伤到解体死亡的进程,一般分为三个阶段:首先,细胞在受照射后不久,核膜和核质变深,细胞核收缩,并在核膜周围出现数目不等的小空泡,称之为初级可见损伤;经过一段时间后,细胞核质空化,核仁退色变淡,核仁中心出

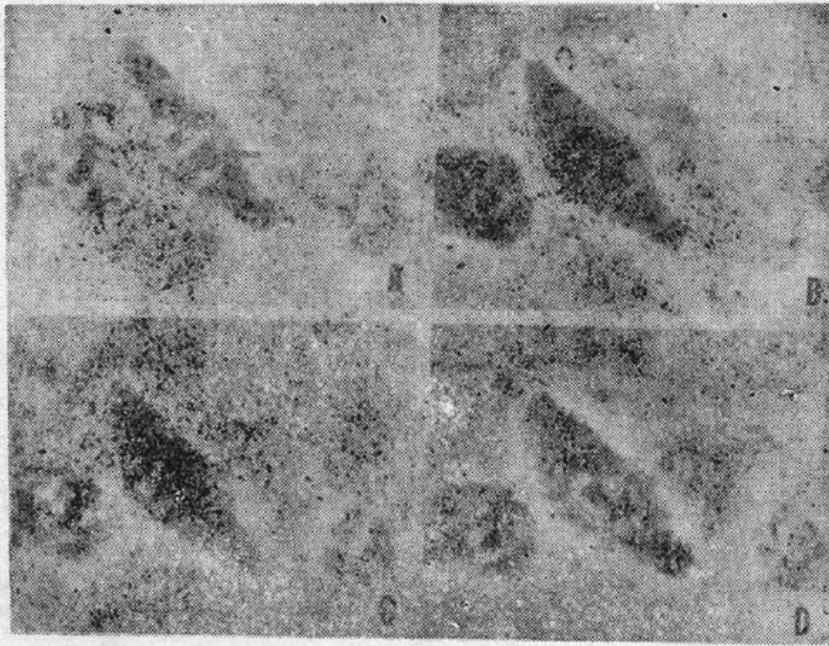


Fig. 1

现亮点,我们称之为明显可见损伤;再经过一段时间后,细胞膜破裂,细胞质外溢,继而细胞解体死亡。细胞损伤的动态过程见图1。对照实验表明,只加HPD处理,不用激光照射以及不加HPD,单用相同光剂量的激光照射对细胞都不产生任何可见损伤,这说明,经HPD处理后细胞受激光照射所出现的损伤死亡确是光动力灭活的结果。

我们分别以上述初级可见损伤和明显可见损伤为指标,研究了HPD加激光照射同步化细胞的杀伤作用。激光照射分别在同步收集的细胞培养7小时、15小时和20小时进行。这样,被照射的细胞分别处于 G_1 、 S 、 G_2 期。照射在样品表面的光剂量为2.34、4.67、9.34、14.01和23.35 $\text{mJ}/\mu\text{m}^2$ 。每个时期的细胞在每种光剂量下重复试验10次,每次照射后分别记录出现初级可见损伤和明显可见损伤的时间,最后求出10次实验的平均值,并用这些数据绘制成曲线。实验结果综合于图2(a)和(b),图中横坐标是激光照射后出现初级可见损伤的时间,由图中可见,不论是初级可见损伤还是明显可见损伤,每个时期细胞出现损伤的时间都随着光剂量的增大而减少,即激光剂量越大,细胞损伤越快。同时,比较 G_1 、 S 、 G_2 期细胞的损伤曲线可以看出,无论是初级可见损伤或是明显可见损伤,都是 S 期细胞出现损伤最快, G_2 期次之, G_1 期则相对较慢。这说明间期细胞中处于 S 期的细胞对HPD和激光处理所诱发的光动力学反应最敏感; G_2 期细胞较敏感; G_1 期细胞敏感性最弱。而且这三个时期细胞对光动力学反应敏感性的差异,随着激光剂量的减小而表现得更加明显。

为了进一步测定不同时期细胞对光动力学反应敏感性差异的可靠性,我们进一步对所得实验数据进行了统计处理。考虑到实验中光剂量到达或超过14.01 $\text{mJ}/\mu\text{m}^2$ 时,激光照射后细胞一般都立即出现可见损伤,从而掩盖了不同时期细胞对光动力学反应的差异而无比较意义,我们对不同时期细胞在9.34、4.67和2.34 $\text{mJ}/\mu\text{m}^2$ 三种光剂量处理下出现初级可见损伤时间和明显可见损伤时间的实验数据分别进行了二因子分组资料的方差分析。

由表1中的 F 值测验结果可见,细胞时期间的差异极显著,光剂量间的差异也是极显著,但细胞时期 \times 光剂量差异不显著。这说明各时期细胞对同一水平的光剂量的反应是一致的。

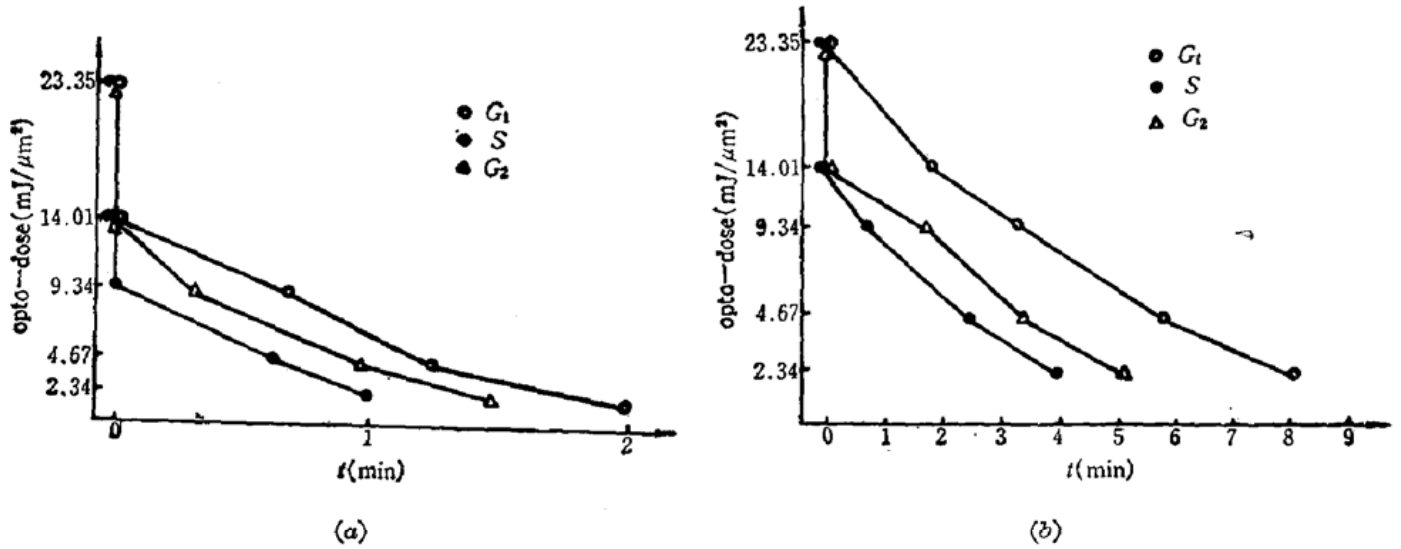


Fig. 2

Tab. 1

source of variation	freedom	sum of square	mean square	F	F _{0.01}	F _{0.05}
stages of cell	2	31146.8	15573.4	100.8**	4.88	3.11
light-dose	2	71371.0	35685.5	230.9**	4.88	3.11
X-ray dose during cell	4	1398.7	349.7	2.2634	3.56	2.48
error	81	12510.9	154.5			
total variation	89	116427.4				

Tab. 2

stages of cell	average(s) (\bar{x}_i)	deviation	
		$\bar{x}_i - 32.5$	$\bar{x}_i - 55.6$
G ₁	78.0	45.5**	22.4***
G ₂	55.6	23.1**	
S	32.5		

* minimum significant deviation LSR 0.01:19.0797 (P=2); 19.9165 (P=3)

Tab. 3

light-dose (mJ/μm²)	average (s) (\bar{x}_i)	deviation	
		$\bar{x}_i - 202.0$	$\bar{x}_i - 568.3$
2.34	891.3	689.3**	323.0**
4.67	568.3	366.3**	
9.34	202.0		

* minimum significant deviation LSR 0.01:19.0797 (P=2); 19.9165 (P=3)

表 2 说明 G₁ 期细胞出现初级可见损伤的时间与 G₂、S 期细胞的差异也是极显著的。

表 3 说明当使用 2.34mJ/μm² 光剂量照射时细胞出现初级可见损伤的时间与 4.67、9.34 mJ/μm² 光剂量的差异极显著，而 4.67 mJ/μm² 与 9.34 mJ/μm² 光剂量间的差异也是极显著的。

对细胞因光动力学反应出现明显可见损伤时间的二因子分组资料的方差分析列于表 4。

表 4 F 值测验表明，与上述细胞出现初级可见损伤一样，细胞时期间的差异极显著，光剂

Tab. 4

source of variation	freedom	sum of square	mean square	F	F _{0.01}
stages of cell	2	647176.9	323588.5	488.583**	4.88
light-dose	2	776867.3	388433.7	624.190**	4.88
X-ray dose during cell	4	26422.0	6605.5	9.974**	3.56
error	81	54973.2	662.3		
total variation	89	1505436.4			

量间的差异极显著,但细胞时期 X 光剂量差异也是极显著。这说明各时期的细胞对同一水平的光剂量的反应是不一致的。

总之,统计学分析证明不论是细胞出现初级可见损伤还是明显可见损伤,细胞周期不同时期 G_1 、 G_2 和 S 期之间在光动力反应方面的差异以及不同光剂量之间的差异在统计学上都具有显著意义。

我们的实验结果表明细胞周期中不同时期 HeLa 细胞对 HPD 加激光处理的光动力学反应存在着差异,其中以 S 期细胞最敏感, G_2 期细胞次之, G_1 期细胞敏感性最小。而这种差异具有统计学上的显著意义。这与 Christensen 等人^[9]所得到的实验结果相吻合。王代树等^[5]通过 HPD 加光照对 MG3-803 胃癌细胞株的研究表明,间期细胞和 M 期细胞的光敏杀伤率具有明显的差异, M 期细胞对 HPD 光敏耐受性远大于间期细胞。以后他们又观察到^[6],间期细胞中的光敏杀伤率 $S > G_1 > G_2 > M$, 与 Christensen 的实验结果趋势是近似的,但他们的实验结果缺乏统计学意义,因此,他们认为各期细胞之间的光动力学反应虽有差异,但没有本质上的不同。需要指出的是我们的实验结果是以细胞出现损伤早晚来分析比较各时期细胞对 HPD 加激光照射的光动力学反应,但我们过去的研究业已证明,用这种激光显微照射单细胞的技术研究光动力学效应具有结果重复性好、用药量小和实验过程中条件控制比较一致等优点^[10,11]。当然,归根到底光动力效应对细胞的杀伤作用最关键的是决定于细胞内 HPD 的浓度和光吸收量的关系。例如,在我们的实验中观察到当激光照射的光剂量达到或超过 $14.01 \text{ mJ}/\mu\text{m}^2$ 时,受照射细胞一般都立即出现损伤,从而看不出各时期细胞对光动力反应的差别。

目前,尚不能就此肯定这种 $S > G_2 > G_1$ 的光动力学反应敏感性的差异是否细胞周期中的一种普遍现象。这需要用更多种类的细胞和更广泛和更深入的实验予以验证。

参 考 文 献

- 1 Dougherty T. J. *et al.*, *Cancer Res.*, **38**, 2628(1978)
- 2 Dougherty T. J. *et al.*, In: Kessel D., Dougherty T. J. eds. Porphyrin Photosensitization. New York: Plenum Press, 1983, 3
- 3 Dougherty T. J., In: Daniel R. D., Gomer C. J. eds. Porphyrin Localization and Treatment of Tumors. New York, Alan R. Liss Inc., 1984, 75
- 4 Christensen T. *et al.*, *Br. J. Cancer*, **39**, 64(1979)
- 5 王代树 *et al.*, 中华肿瘤杂志, **9**, 265(1987)
- 6 王代树 *et al.*, 实验生物学报, **21**, 35(1988)
- 7 梁 宏 *et al.*, 科学通报, **31**, 1019(1986)
- 8 Petterson E. O. *et al.*, *Cell Tissue Kinet.*, **10**, 511(1977)
- 9 Christensen T. *et al.*, *Br. J. Cancer*, **44**, 717(1981)
- 10 梁 宏 *et al.*, 中华肿瘤杂志, **8**, 19(1986)
- 11 梁 宏 *et al.*, 应用激光, **4**, 231(1984)

(收稿日期: 1989年3月21日)