

# 太赫兹波光敏效应的初步探索

阴慧娟<sup>1</sup> 韩家广<sup>2</sup> 牛 卿<sup>1</sup> 王 超<sup>3</sup> 李迎新<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 中国医学科学院生物医学工程研究所激光医学实验室, 天津 300192

<sup>2</sup> 天津大学精密仪器与光电子工程学院太赫兹研究中心, 天津 300192; <sup>3</sup> 天津医科大学生物医学工程学院, 天津 300070

**摘要** 太赫兹波 (THz) 是一种介于微波和红外线波之间的电磁波。由于生物体对 THz 波的独特响应性, 太赫兹波在生物医学领域的应用研究特别是其与生物组织的相互作用成为了研究热点。该研究旨在探索太赫兹波能否激发光敏剂产生光敏效应。采用纳焦级宽谱 (1~3 THz) 的脉冲太赫兹光源对光敏剂 (PS) 血卟啉单甲醚 (HMME) 照射 30 min, 用 DPBF 作为单态氧的捕获剂检测单态氧产率。采用相同的太赫兹光源照射常规培养的 HepG2 细胞, 光学显微镜下观察细胞形态, MTT 法检测细胞活性。PS+THz 组单态氧产率显著高于单纯太赫兹波组 (21.04% vs. 2.39%); PS+THz 组 HepG2 细胞形态较对照组略圆, 细胞有收缩趋势; 细胞活性检测结果显示, 太赫兹波照射后 HMME 孵育的 HepG2 细胞的活性降低至 81.13% (THz 组为 99.21%)。实验结果表明宽谱 1~3 THz 纳焦级太赫兹波可激发光敏剂 HMME, 激发效率约为 20%。

**关键词** 医用光学; 太赫兹波; 光敏效应; 单态氧; 血卟啉单甲醚

中图分类号 Q682 文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201542.s104001

## Preliminary Exploration on the Photodynamic Effect Induced by Terahertz

Yin Huijuan<sup>1</sup> Han Jiaguang<sup>2</sup> Niu Qing<sup>1</sup> Wang Chao<sup>3</sup> Li Yingxin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Laser Medicine, Institute of Medical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China)

<sup>2</sup> Terahertz Wave Center, School of Precision Instrument and Opto-Electronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300192, China)

<sup>3</sup> School of Biomedical Engineering, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

**Abstract** Terahertz (THz) radiation lies between the infrared and microwave regions of the electromagnetic spectrum. Because of organisms' unique response to the THz wave, THz wave applications in biomedical research, especially in its interactions with biological tissues become a hot spot. Whether the THz wave has the photodynamic effect by exciting the photosensitizer is explored in the study. The wide spectrum (1–3 THz) of pulse terahertz is used as a light source to excite the photosensitizer—hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) for 30 min, and then DPBF is used as singlet oxygen scavenger to test the yield of singlet oxygen. HepG2 cells in conventional culture are illuminated with the same dose of terahertz wave, the cell morphology is observed by an optical microscope, the cell activity is determined by MTT method. The singlet oxygen production in PS+THz group is significantly higher than that of pure THz wave irradiation (21.04% vs. 2.39%). Compared to control cells, HepG2 cells in PS+THz group are slightly rounded and have a tendency to shrink. The activity of HepG2 cells incubated in HMME (HMME+THz group) is reduced to 81.13% after irradiation by THz wave (99.21% in THz group). The experimental results show that the THz wave of wide spectrum (1–3 THz) and nanojoule energy can excite the photosensitizer of HMME with excitation efficiency of about 20%.

**Key words** medical optics; terahertz wave; photosensitive effect; singlet oxygen; hematoporphyrin monomethyl ether

**OCIS codes** 170.5180; 170.6795; 350.5130

收稿日期: 2015-01-24; 收到修改稿日期: 2015-04-05

作者简介: 阴慧娟 (1981—), 女, 博士, 副研究员, 主要从事激光医学方面的研究。E-mail: yinzi490@163.com

\* 通信联系人。E-mail: yingxinli2005@126.com

# 1 引言

近年来太赫兹波在生物医学中的应用研究受到越来越多的关注,并在疾病诊断、蛋白状态识别、检测受体绑定、无标记 DNA 测序等方面表现出强大的潜力<sup>[1-2]</sup>,近期还有部分研究报道了太赫兹波对细胞基因的调节作用,提示了太赫兹波在疾病治疗上的可能性<sup>[3-4]</sup>。这些研究的本质在于探索太赫兹波与生物组织的相互作用。在光子医学领域,光与生物组织的相互作用除直接作用外,还包括光敏效应介导的间接效应,也可达到疾病诊断和治疗的目的,比如光动力疗法治疗肿瘤已被美国、日本、欧洲多国批准用于临床<sup>[5-6]</sup>。光敏效应以光敏剂为媒介,将光子的能量传递给生物组织中的反应底物而发挥作用。目前应用最多的光敏剂是卟啉类光敏剂<sup>[7]</sup>,这些光敏剂根据结构的不同,可被特殊波长的可见光和红外光激发。是一种介于红外和微波之间的电磁波,是否能够激发光敏剂目前在国内外尚未见到任何报道。本文将将以 HepG2 细胞为研究对象进行太赫兹波激发光敏剂产生光敏效应的首次探索。

## 2 材料和方法

### 2.1 细胞培养

将 HepG2 细胞(人肝癌细胞,购自中国医学科学院基础所细胞库)培养于含 10% 胎牛血清(Gibco)的 RPMI 1640 培养基(Gibco)中,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每 2~3 d 传代一次,实验时取对数生长期细胞,用含 0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)的 0.25% 胰酶进行消化,重悬,接种于 35 mm 共聚焦专用小皿中,培养箱中过夜培养。

### 2.2 太赫兹波光源和照射

太赫兹波光源由天津大学精密仪器学院太赫兹研究中心提供,是由超短脉冲激光作为激励源产生的纳焦级宽带亚皮秒太赫兹波,中心频率为 1~3 THz。采用组合透镜聚焦,如图 1 所示,使到达载物台的光斑直径约为 1 cm,太赫兹波从下向上照射置于载物台上的细胞培养皿,太赫兹时域光谱仪监测透过细胞培养皿的光谱信号。



图 1 太赫兹波照射平台

Fig. 1 Terahertz wave irradiation system

将细胞样品分为 4 组,分别为对照组(control),单纯光敏剂组(PS),单纯太赫兹照射组(THz),光敏剂加太赫兹组(PS+THz)。PS 组和 PS+THz 组在照射前 2 h 在细胞培养液中加入血卟啉单甲醚(HMME)(上海复旦张江生物医药股份有限公司),终浓度为 20 μg/ml,control 组和 THz 组加入相应体积的培养基,避光条件下培养箱中孵育 2 h,进行太赫兹波照射,照射时间为 30 min。control 组和 PS 组细胞在除太赫兹波照射外相同的条件下放置 30 min,整个过程避光进行,实验重复 3 次。

### 2.3 细胞形态和活性检测

太赫兹波照射后 2 h 将各组细胞用新鲜培养基轻轻洗涤两次,除去多余的光敏剂,置于倒置光学显微镜下观察拍照。同组其他细胞样品用噻唑兰(MTT)(Sigma)法检测细胞活性。即在培养皿中加入 1/10 体积的 MTT,继续孵育 4 h,弃去培养液,加入同体积的 DMSO 进行溶解,用酶标仪在 490 nm 处检测吸光度值。细胞活性  $C_{SR} = A_{test}/A_{control} \times 100\%$ ,其中为  $C_{SR}$  存活率,  $A$  为光密度值。

### 2.4 单态氧的检测

用二甲基亚砜(DMSO)分别溶解 1,3-二苯基苯并呋喃(DPBF)(Sigma)和光敏剂 HMME,两者或单独使用,或以 1:1 混合,使终浓度分别为  $2 \times 10^{-4}$  mol/L 和 20 μg/mL。实验分为 4 组:DPBF、DPBF+THz、

DPBF+PS、DPBF+PS+THz。太赫兹波照射时间为 30 min,非太赫兹波照射组除太赫兹波照射外其他条件相同。处理后的样品在酶标仪 410 nm 处检测吸光度。相对单态氧产率  $R_{RSOP} = (A_{THz-} - A_{THz+}) / A_{THz-} \times 100\%$ 。

### 2.5 统计学方法

数据采用 SPSS 统计分析软件处理,以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用 *t* 检验,以  $p < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结 果

### 3.1 细胞形态

单纯太赫兹波照射后,细胞形态无明显改变,细胞间的连接也无镜下可见的变化。与之相比,PS+THz 组细胞较正常细胞略圆,细胞间隙略宽,如图 2 所示。

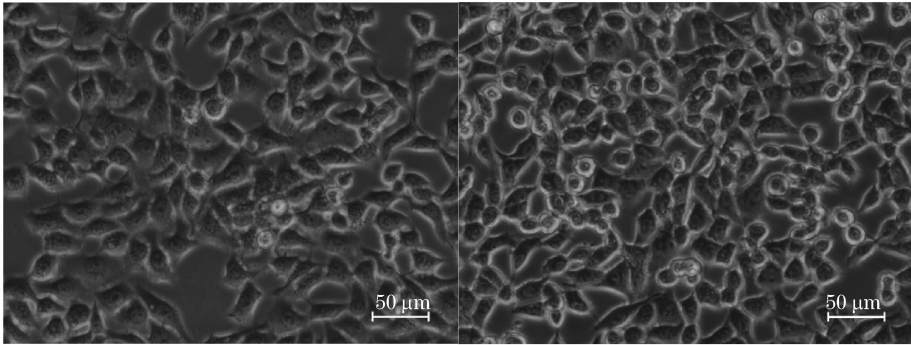


图 2 HepG2 细胞在实验后的形态学变化。(a)THz 组;(b)PS+THz 组

Fig. 2 Morphological change of HepG2 cells after treatment. (a) THz group; (b) PS+THz group

### 3.2 细胞活性

与对照组相比,单纯太赫兹波照射对 HepG2 细胞无明显损害,细胞活性为 99.21%;单纯光敏剂组由于暗毒性的影响,细胞活性下降到 89.84%;而 PS+THz 组细胞活性则下降到 81.13%,这 3 组两两间比较有统计学差异( $p < 0.05$ )。

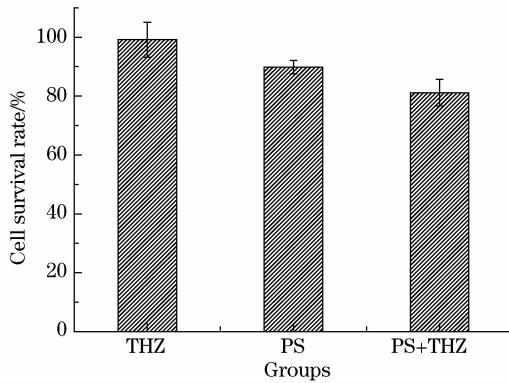


图 3 HepG2 细胞经实验处理后的细胞活性

Fig. 3 HepG2 cell activity after treatment

### 3.3 单态氧产率

DPBF 作为一种单态氧的捕获剂,在 410 nm 处有特殊吸收峰,可以 DPBF 的消耗作为单态氧产生能力的衡量指标。如图 4 所示,DPBF+PS+THz 组的相对单态氧产率远高于 DPBF+THz 组(21.04% vs. 2.39%),差异有统计学意义。

## 4 讨 论

单态氧是可见光或近红外光激发光敏剂产生的主要效应物质,可与生物大分子发生反应,导致细胞或组

织的病理性变化<sup>[8]</sup>。它的产生机制是光敏剂分子吸收光子能量后将能量传递给周围的氧分子,从而生成单态氧。氧分子到单态氧的能级差大约为 1 eV,这就要求光敏剂分子传递给它的能量要大于或等于 1 eV,根据公式  $E=h\nu$ ,其中  $E$  为能量, $h$  为普朗克常数, $\nu$  为频率,能够激发光敏剂分子的光源波长应小于 1000 nm。但是,并不是所有小于 1000 nm 的光源都能激发光敏剂,还与光敏剂的结构有关,一般情况下,只有光敏剂的吸收光谱上峰值位置的光源才能获得较高的激发效率。太赫兹波的波长范围为 0.03~3 mm,它的光子能量非常小,大约为可见光的千分之一。按照上述理论,太赫兹波应该不能激发光敏剂。但是实验结果显示,太赫兹波照射孵育 HMME 的 HepG2 细胞 30 min 后不但能产生约 20% 的杀伤率,同样条件下其相对单态氧产率也约为 20%。对可见光来说,如 635 nm 波长的激光,只需要大约 30 s 就能产生相似的效果<sup>[9]</sup>。虽然与可见光相比,太赫兹波激发光敏剂的效率较低,但其确实能够产生光敏剂效应。分析其产生机制,可能是一种目前尚未认识到的新理论。DNA、RNA、蛋白等重要生物大分子的旋转及振动能级多处于 THz 波段,正是利用这种特性,太赫兹波才能对生物大分子的结构、性质进行分析鉴定乃至精确操控和调节<sup>[10]</sup>。卟啉是生物体固有的一种大分子,太赫兹波可能通过某种未知的机制影响了卟啉的能级状态,从而产生单态氧。

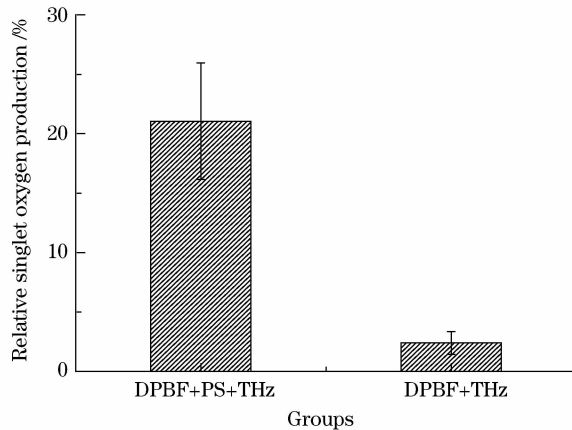


图 4 各实验组的相对单态氧产率

Fig. 4 Relative singlet oxygen production of various groups

但该实验是一项探索性的研究,可能会存在一些影响因素导致结果出现假象。譬如光敏剂的暗毒性,尽管在实验过程中设置了单纯光敏剂组作为对照并全程避光,但不可能完全消除可见光的影响;另外,为了避免细胞样品之间的差异,虽然采用了均一化处理,但也不能完全消除误差。

总之,太赫兹波有可能激发光敏剂产生光敏效应是一项新的科研发现,需要更多的实验进行验证。

### 参 考 文 献

- 1 Sirtori C. Applied physics; Bridge for the terahertz gap [J]. Nature, 2002, 417(6885): 132-133.
- 2 Kimmitt M F. Restrahlen to T-rays-100 years of terahertz radiation [J]. J Biol Phys, 2003, 29(2-3): 77-85.
- 3 Alexandrov B S, Phipps M L, Alexandrov L B, et al.. Specificity and heterogeneity of terahertz radiation effect on gene expression in mouse mesenchymal stem cells [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1184.
- 4 Alexandrov B S, Rasmussen K Φ, Bishop A R, et al.. Non-thermal effects of terahertz radiation on gene expression in mouse stem cells [J]. Biomed Opt Express, 2011, 2(9): 2679-2689.
- 5 Rkein A M, Ozog D M. Photodynamic therapy [J]. Dermatol Clin, 2014, 32(3): 415-425.
- 6 Allison R R, Moghissi K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action [J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2013, 10(4): 331-341.
- 7 Senge M O, Radomski M W. Platelets, photosensitizers, and PDT [J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2013, 10(1): 1-16.
- 8 Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, et al.. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects [J]. Lasers Med Sci, 2009, 24(2): 259-268.
- 9 Chen Hongli, Li Yingxin, Yin Huijuan, et al.. Investigating the killing effect of photodynamic therapy induced by different photosensitizers on human leukemia cell *in vitro* [J]. International Journal of Biomedical Engineering, 2012, 35(4): 197-200.
- 10 陈洪丽, 李迎新, 阴慧娟, 等. 研究不同光敏剂诱导的光动力疗法对人白血病细胞的杀伤作用[J]. 国际生物医学工程杂志, 2012, 35(4): 197-200.
- 10 Feng Hua, Li Fei, Chen Tunan, et al.. Current situation and future trends for THz-biomedicine [J]. Journal of Terahertz Science and Electronic Information Technology, 2013, 11(6): 827-835.
- 冯 华, 李 飞, 陈图南, 等. 太赫兹波生物医学研究的现状与未来[J]. 太赫兹科学与电子信息学报, 2013, 11(6): 827-835.