

## 癌光啉加光辐照在活体内杀伤人癌细胞的形态学观察

彭 迁、何德华、张武扬、董荣春 (第二军医大学病理解剖教研室, 上海 200433)

**提要** 本文观察到癌光啉加红光 对人肝癌细胞裸鼠移植瘤有杀伤效应, 随处理后时间的延长, 杀伤效应更趋明显。早期, 癌肿细胞内线粒体、粗面内质网肿胀, 细胞颗粒变性, 间质血管充血; 晚期, 线粒体、粗面内质网空泡化, 异染色质聚集和边集, 细胞核固缩、溶解, 细胞死亡, 间质水肿, 血管广泛性出血。

**关键词** 细胞培养; 裸鼠; 癌光啉; 电子显微镜检查; 实验性肝肿瘤; 光化学疗法

癌光啉(carcinophotorin, PSD-007)是一种新型肿瘤光化学诊治剂<sup>(1)</sup>, 因其含较多疏水性卟啉且含很少血卟啉(4.2%), 以致相应地降低了对正常组织的光毒反应<sup>(2)</sup>和增强对肿瘤的定位能力, 从而得到较好的光化学诊治肿瘤的实验和临床疗效。薄层色谱和高效液相色谱分析结果表明, 癌光啉所含的主要成份不同于目前国内外所使用的血卟啉衍生物(HPD)和光敏素II(photofrin II)<sup>(3)</sup>。其中含有大量色谱行为与血卟啉单乙酯相似的卟啉类物质, 而不含血卟啉二醚。所以在光镜和电镜下观察癌光啉对人癌细胞杀伤作用的过程不仅对弄清癌光啉光动力学效应杀伤肿瘤细胞的过程, 而且对HPD、photofrin II等光动力学效应的机理研究都具有重要意义。

### 材 料 和 方 法

**裸鼠人肝癌动物模型的建立** 将生长旺盛的SMMC-7721细胞<sup>(4)</sup>制成 $1 \times 10^7$ 细胞/0.2 ml悬液, 注入balb/c nu/nu品系的无菌裸小鼠皮下, 待长出实体瘤后, 经摘除并切成 $2 \text{ mm}^3$ 大小的组织块再进行移植、传代(图1)。

**光敏药物** 癌光啉由本校抗癌药研究室研制, 浓度为 $10 \text{ mg/ml}$  [批号 840413], 实验剂量 $5 \text{ mg/kg}$ 。

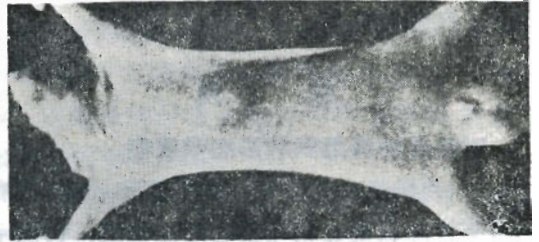


Fig 1. Human hepatocellular carcinoma model in nude mice.

**照射光源** GZA-I型光敏医疗仪(中原电子技术研究所和解放军总医院研制)。光源为卤钨灯加红色滤片,  $24 \text{ V}$ ,  $400 \text{ W}$ , 波长范围为 $600-640 \text{ nm}$ , 功率密度控制在 $75 \pm 5 \text{ mW/cm}^2$ , 实验前后均采用对波长无选择的热电偶功率计(LW-I型激光功率计, 由中国计量院实验工厂生产)进行测定。照射时间 $30 \text{ min}$ 。

**实验分组** 将已长出人体肝癌组织的裸鼠随机分成对照组和实验组。对照组又分移植瘤组、单纯用药组和单纯照光组。实验组又分用药加照光后即刻组、 $5$ 、 $30 \text{ min}$ 组、 $2$ 、 $8$ 和 $24 \text{ h}$ 组。共 $9$ 组, 每组均为 $3$ 只裸鼠。

**实验步骤** 癌光啉 $\text{iv } 5 \text{ mg/kg}$ , 避光 $24 \text{ h}$ 后, 用黑纸遮盖裸鼠, 仅暴露出移植瘤部分, 用光敏医疗仪对移植瘤局部进行照射, 然后按规定时间分别取材进行光、电镜观察。对照组中用药组仅 $\text{iv}$ 与实验组等量的癌光啉而不照光, 照光组仅在移植瘤局部给予和实验组相同剂量的光辐照而不用药。上述操作过程均在避光环境下进行。

### 光敏杀伤效应检测

1. 光学显微镜 实验肿瘤标本用 $10\%$ 中性甲醛液固定, 经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、常规切片(厚度为 $4 \mu\text{m}$ )后, 苏木素-伊红染色。

2. 电子显微镜 肿瘤标本取出后迅速切

成  $1\text{ mm}^3$  大小组织块, 4%多聚 甲醛液固定,  $0.1\text{ mol/L}$  磷酸缓冲液冲洗后, 1% 锇酸后固定, 常规乙醇梯度脱水, 丙酮过渡, Epon 812 包埋, 8800 型 LKB 超薄 切片机切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双 重染色, 国产 (DXB-12) 80 万倍电子显微镜观察。

## 结 果

### 对照组肿瘤组织的形态学观察

1. 肉眼及光镜观察 肉眼观察到移植瘤呈结节状, 表面有较完整的纤维包膜; 切面示周围纤维组织向瘤中央生长并分隔瘤组织。光镜下观察瘤组织被纤维分隔成巢状, 部分区域瘤细胞呈小梁状、腺腔状排列。瘤细胞胞浆丰富, 呈多角形; 胞核大小、形态不规则, 可见较多病理性核分裂相。上述变化说明 SMMC-7721 细胞裸鼠移植瘤仍具有原来人体肝细胞癌的组织学形态(图 2-A, 见后图版 4)。

2. 电镜观察 瘤细胞线粒体 较多, 大小不一, 基质内电子致密度较低; 粗面内质网丰富, 高尔基体少见; 胞浆内有丰富的、呈簇状分布的糖原颗粒和游离的核蛋白体。胞核大小不一, 形状不规则, 边缘常见较大而深的凹陷, 核孔易见, 核内较多假包涵体, 染色质丰富, 大多呈均匀分布, 核仁大而清晰(图 3-A, 见后图版 3)。

### 实验组肿瘤细胞的形态学观察

1. 肉眼观察 用药加光照射后即刻组、5 min 组、30 min 组、2 h 组, 皮肤和皮下移植瘤组织均未见异常。8 h 组、24 h 组, 所有实验动物照射局部皮肤组织仍未见明显光敏反应, 而其下肿瘤组织呈暗红色, 质软; 切面瘤细胞中央坏死、液化, 严重出血。

2. 光镜观察 用药加光照射后 即刻组, 移植瘤周围血管轻度扩张, 其内有红细胞、白细胞聚集, 在个别血管中可见中性白细胞附壁、穿入和游出等现象, 周围结缔组织疏松、水肿; 瘤细胞胞浆嗜伊红性, 可见一些小空泡, 较多核分裂相。5 min 组, 上述病变更明

显, 并可见轻度出血现象, 瘤细胞胞浆嗜伊红性, 有较多大小不一的空泡; 瘤细胞核淡染, 仍可见病理性核分裂相。30 min 组, 血管显著扩张, 血管内红细胞高度聚集, 呈严重淤滞现象, 部分血管破裂、出血, 间质高度水肿; 瘤细胞核固缩, 体积变小, 核分裂相少见。2 h 组, 除上述病变外, 部分瘤细胞核碎裂, 细胞死亡解体。8 和 24 h 组, 血管由功能性病变演变为器质性病变, 血管内皮高度增生, 内皮下有匀质的伊红性物质沉积, 管壁增厚, 平滑肌细胞核固缩、深染、碎裂, 瘤组织内及其周围血管弥漫性出血, 瘤组织大片坏死, 但局部皮肤组织未见明显光敏损伤表现(图 2-B、C)。

3. 光敏杀伤效应对瘤细胞生长抑制的观察 每张切片在高倍( $10\times 40$ )光镜下随意选择 10 个视野观察, 计数核分裂相数。结果见表 1。说明光敏杀伤效应的抑制作用虽然在照光后即刻组就表现出来, 但照光后 30 min 乃至 24 h, 抑制作用才表现得最为显著。

4. 电镜观察 用药加光照射后即刻组, 线粒体轻度肿胀, 其内基质电子致密度增高, 并可见较多灶性空化现象, 粗面内质网亦明显扩张、脱颗粒, 其它细胞器和胞核未见明显改变(图 3-B)。5 min 和 30 min 组, 线粒体明显肿大, 基质电子致密度显著减低, 线粒体嵴断裂、紊乱、减少、甚至消失; 粗面内质网明显肿胀, 核周间隙扩张成宽狭不等的腔隙, 糖原、核蛋白体颗粒无明显减少; 胞核变化不明显(图 3-C)。2 h 组, 线粒体高度肿胀, 嵴断裂、消失, 基质电子致密度极低, 呈空泡化; 粗面内质网扩张更明显, 溶酶体数目增多, 糖原、核蛋白体颗粒减少, 核周间隙严重扩张, 甚至个别呈半圆形。8 h 组, 几乎所有线粒体和粗面内质网都扩张成泡状结构; 溶酶体数目明显增多, 大小不一, 类圆形, 边缘毛刺状, 其内电子致密度不均匀, 似含较多脂质成份; 糖原颗粒明显减少(图 3-D)。24 h 组, 扩张、空泡化的线粒体开始破裂, 粗面内质网除扩张外, 也有破裂现象, 胞浆内有较多形状不规则

Tab 1. Photodynamic effect of carcinophotorin on the growth of the implants. \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$  vs first group.

| Groups                            | Number of cell mitoses on the implants |       |                     |
|-----------------------------------|--|-------|---------------------|
|                                   | Total                                  | Range | $\bar{x} \pm SD$    |
| Neither carcinophotorin nor light | 78                                     | 6-10  | $7.8 \pm 1.5$       |
| Carcinophotorin only              | 76                                     | 5-10  | $7.6 \pm 1.6^*$     |
| Light only                        | 72                                     | 5-10  | $7.2 \pm 1.7^*$     |
| at once after treatment           | 52                                     | 3-7   | $5.2 \pm 1.7^{***}$ |
| 5 min after treatment             | 36                                     | 2-7   | $3.6 \pm 1.6^{***}$ |
| 30 min after treatment            | 14                                     | 1-2   | $1.4 \pm 0.5^{***}$ |
| 2 h after treatment               | 10                                     | 0-2   | $1.0 \pm 0.8^{***}$ |
| 8 h after treatment               | 4                                      | 0-1   | $0.4 \pm 0.5^{***}$ |
| 24 h after treatment              | 2                                      | 0-1   | $0.2 \pm 0.4^{***}$ |

的空泡破裂残体, 细胞膜亦破裂, 糖原颗粒所存无几, 胞浆基质水肿、透亮; 胞核染色质高度聚集成团块状, 并沿核膜周边凝集, 核基质透亮, 部分核膜破裂, 细胞死亡解体(图 3-E)。间质毛细血管内红细胞聚集, 血管壁内皮细胞受损, 血管壁断裂、缺损(图 3-F)。

## 讨 论

利用人体癌肿作为实验对象, 在动物活体内进行光动力学疗法 (photodynamic therapy) 的杀伤机理研究尚未见报道。本文观察到线粒体、粗面内质网受损较早且严重以及直接损伤生物膜的单线态氧 ( $^1O_2$ ) 在它淬灭前仅能弥散  $0.1 \mu m$  距离的事实<sup>(5)</sup>, 可以推测, 接受光能后的癌光敏, 由于能量转移所产生的单线态氧很接近于本实验所观察到的受损部位, 从而提示线粒体膜、粗面内质网膜中癌光敏含量是较多的。

经癌光敏加光处理后晚期, 受损癌细胞内出现较多含脂丰富的次级溶酶体, 可能是细胞内被破坏的生物膜结构, 包括其中的脂质成份和初级溶酶体融合的结果, 从而推测, 在严重受损的细胞内, 由于生物膜的损伤而释放出大量脂质成份, 促使细胞内产生大量初级溶酶体以分解和消化受损的膜结构,

血卟啉在癌肿组织中滞留, 以癌组织间质成分居多, 尤其是血管和坏死组织。其原因为癌组织中血管排列紊乱, 没有有效的侧支循环, 缺乏淋巴回流系统, 从而造成由血带来的血卟啉滞留在血管间质内<sup>(6)</sup>。本实验所观察到的毛细血管高度扩张、充血和弥漫性出血, 小血管壁嗜伊红性物质沉积等病变符合上述现象。这些血管病变可能对 PDT 杀伤癌肿起了很重要的协同作用。

对癌细胞内线粒体、粗面内质网等生物膜结构和血管壁内皮细胞、平滑肌细胞等成分的直接损伤, 是癌光敏加光在活体内杀伤人体癌肿细胞的主要靶部位, 从而导致人癌细胞的需氧代谢、能量产生和蛋白质合成等生命活动均遭破坏, 直至癌细胞死亡<sup>(7-9)</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 许德余、殷祥生、陈雄、刘军。新光敏剂 PSD-007 的研究。第二军医大学学报 1984; 5: 31
- 2 陈雄、殷祥生、周真如。光敏剂 PSD-001 及癌光敏的薄层色谱分析研究。同上 1986; 7: 86
- 3 许德余、殷祥生、陈雄、陈文晖、刘军。癌光敏的化学研究。同上 1986; 7: 247
- 4 董荣春、周荣华、吕发度、陶文照。SMMC-7721 人体肝癌细胞株的建立及其生物学特性的初步观察。同上 1980; 1: 5
- 5 Moan J, Pettersen EO, Christensen T. The mechanism of photodynamic inactivation of human cells *in vitro* in the presence of haematoporphyrin. *Br J Cancer* 1979; 39: 398
- 6 Bugelski PJ, Porter CW, Dougherty TJ. Autoradiographic distribution of haematoporphyrin derivative in normal and tumor tissue of the mouse. *Cancer Res* 1981; 41: 4606
- 7 Bellnier DA. Membrane lysis in chinese hamster ovary cells treated with hematoporphyrin derivative plus light. *Photochem Photobiol* 1982; 36: 43
- 8 Coppola A, Viggiani E, Salzarulo L, Rasile G. Ultrastructural changes in lymphoma cells treated with hematoporphyrin and light. *Am J Pathol* 1980; 99: 175
- 9 Moan J, Johannessen JV, Christensen T, Espevik T, Mcghe JB. Porphyrin-sensitized photoinactivation of human cell *in vitro*. *Ibid* 1982; 109: 184

## Morphological observation on the photodynamic effect of carcinophotorin plus light radiation killing human liver cancer cells *in vivo*

PENG Qian, HE De-Hua, ZHANG Wu-Yang, DONG Rong-Chun

(Department of Pathology, Second Military Medical College, Shanghai 200433)

**ABSTRACT** The morphological changes on the implants of a human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 in the Balb/c nude mice were observed under the optic microscope and transmission electron microscope at various times after treatment with carcinophotorin plus red light. Under the optic microscope the cell structure showed that the cytoplasm transformed into acidophilic, with granular degeneration, karyopyknosis and karyolysis. Meanwhile, there were significant vasodilatation, vascular obstruction and haemorrhage in and round the tissue of the implants. Under

the electron microscope the structure showed that the mitochondria and rough endoplasmic reticulum dilated and had vacuoles. The number of lysosome increased greatly. Condensed heterchromatin clumped against the nuclear membrane. The above pathological changes were getting obvious with the lapse of time after treatment.

**KEY WORDS** cultured cells; nude mice, carcinophotorin, electron microscopy, experimental liver neoplasms, photochemotherapy

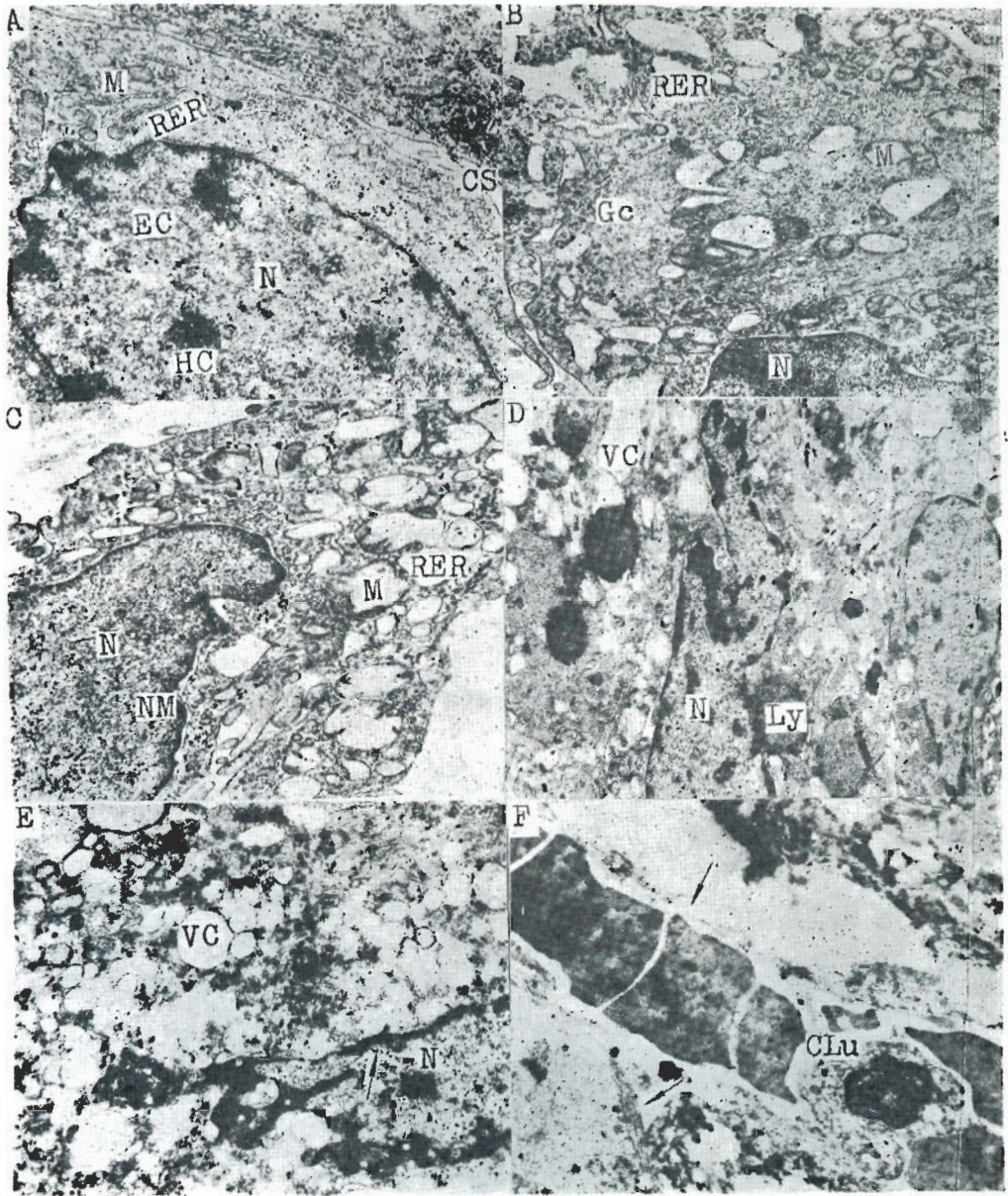
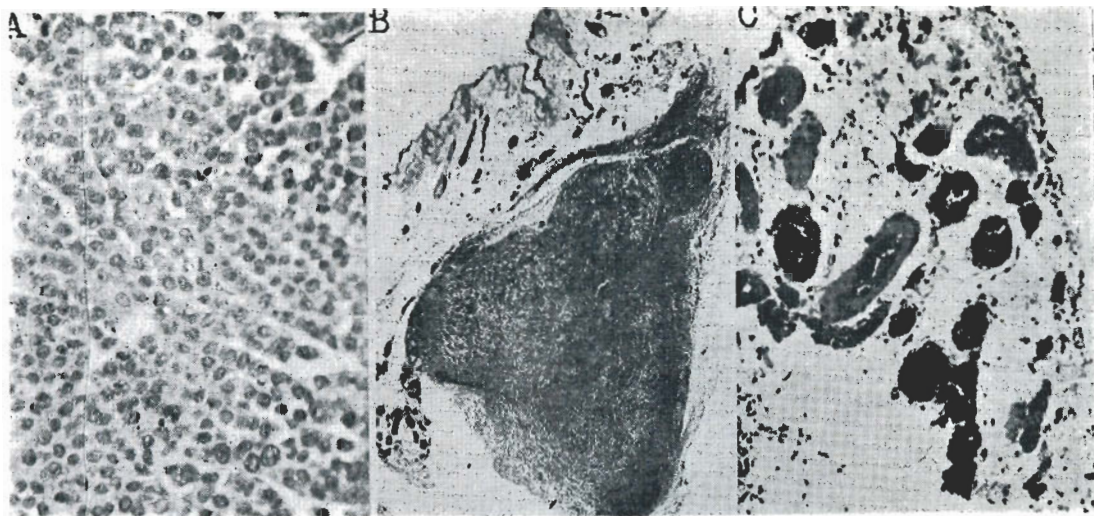


Fig 3. Transmission electron microscopic structure of the implants of SMMC-7721 cells in nude mice. A) Treated with carcinophorin only ( $\times 17\,500$ ). B) At once after treatment, showing that the mitochondria had a more electron-dense matrix and rough endoplasmic reticulum (RER) were degranulated and dilated ( $\times 25\,000$ ). C) 5 min after treatment, showing that the mitochondria and RER were more dilated ( $\times 18\,000$ ). D) 8 h after treatment, showing that the number of lysosomes increased ( $\times 8400$ ). E) 24 h after treatment, showing that the cytoplasm, mitochondria and RER became transformed into vacuoles and heterochromatin clumped against the nuclear membrane (arrow) ( $\times 17\,000$ ). F) 24 h after treatment, showing the rupture (arrow) of the wall of the capillary ( $\times 9\,600$ ).

(See p 472)



**Fig 2.** Optic microscopic structure of the implants of SMMC-7721 cells in nude mice. **A)** The untreated implants, showing the morphological changes similar to that of human primary hepatocellular carcinoma ( $\times 125$ ). **B)** 24 h after photosensitization with carcinophotorin plus red light, showing that there were significantly extensive vasodilatation and hemorrhage in and around the tissue of the implants and a great deal of the death tumor cells ( $\times 80$ ). **C)** 24 h after treatment, showing that the vessel walls appear to take on a homogenous eosinophilic appearance and markedly thickened ( $\times 500$ ).