

癌光啉加光辐照对体外人肝癌细胞的杀伤作用

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 癌光啉加红光处理人肝癌细胞后, 光镜观察到细胞肿胀, 呈空网状变性。扫描电镜显示细胞微绒毛肿胀呈泡状, 数目减少。透射电镜下除微绒毛肿胀、脱落外, 线粒体、粗面内质网肿胀、空化; 异染色质聚集呈团块和边集。最后细胞膜破裂, 核质、胞质溶解, 细胞死亡解体。

关键词 细胞株(SMMC-7721); 实验性肝癌; 电子显微镜; 扫描电镜; 红光; 光化学疗法

癌光啉(carcinophotorin)⁽¹⁾所含的主要成分⁽²⁾不同于目前国内外临床所使用的血卟啉衍生物(HPD)和光敏素Ⅱ(photofrin Ⅱ), 其主要差别为, 血卟啉(4.2%)和原卟啉(<1%)含量甚少, 而疏水性较强的未知结构卟啉(85%)含量很高, 此外, 癌光啉没有原点附近的组分。为此, 本文在光镜和电镜下观察了癌光啉加红光对人肝癌细胞的杀伤作用。

材 料 和 方 法

细胞为本室 1977 年培养建立的 SMMC-7721 人体肝癌细胞系(简称细胞)^(3,4)。本实验

1986年5月8日收稿 1987年6月2日接受

所用第 135-140 代细胞。

癌光啉由本校抗癌药研究室研制(批号 840413), 10 mg/ml。

照射光源系由复旦大学物理系设计的带冷光膜反光罩的卤钨灯, 功率为 400 W, 照射装置详见图 1, 光源波长范围为 600-640 nm, 功率密度为 25 mW/cm²。

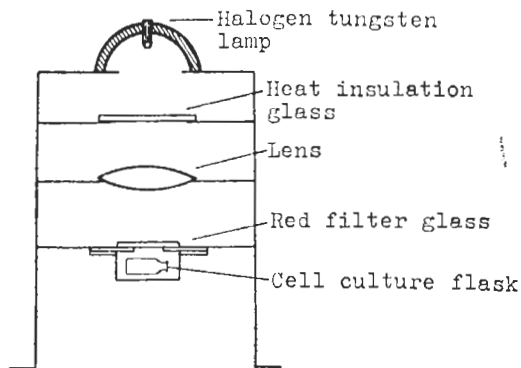


Fig 1. Irradiation device

光敏杀伤效应实验 用癌光啉在 37°C 培养箱中避光处理细胞 1 h, 洗去癌光啉, 经照射后, 用台盼蓝染色, 计数死、活细胞。

形态学观察 取 $3 \text{ ml } 3 \times 10^5$ 细胞/ml 7721 细胞悬液, 接种于底面积为 15 cm^2 的培养瓶内, 取 2 ml 接种于含小盖玻片的培养瓶内。每个实验组接种 3-5 瓶, 用癌光啉 $10 \mu\text{g/ml}$ 同前法处理细胞, 经 3 J 的红光照射后, 避光 37°C 继续培养。按规定时间取出细胞制备光镜、扫描电镜标本, 并用细胞原位包埋方法制备透射电镜标本。

实验分组 3 个对照组即: 未经癌光啉和光照射细胞组; 仅用光照射细胞组; 仅用癌光啉处理细胞组。6 个用药加光照实验组, 按处理后取样时间分为即刻、5 和 30 min、2、8 和 24 h。

上述各组实验都重复 3 次。

扫描电镜标本制备 将培养在小盖玻片上的实验细胞经戊二醛和四氧化锇双重固定后, 丙酮脱水, 醋酸异戊酯取代丙酮, 放入 CO_2 临界点干燥器干燥, HUS-5 GB 型真空喷镀仪碳金旋转喷镀后, 日产 S 450 型扫描电镜观察。

透射电镜标本制备 将生长在涂有鼠尾胶(自制)的小盖玻片上的实验细胞, 经多聚甲醛和四氧化锇双重固定后, 环氧树脂 812 倒扣包埋, 用液氮速冻, 使包埋块和玻片自行分离。包埋的标本经 8800 型 LKB 超薄切片机切片(厚度 $50\text{--}60 \text{ nm}$), 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色后, 日产 H-600 型透射电镜观察。

结 果

光敏杀伤效应 结果见(图 2、3)癌光啉 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 加红光照射对细胞有杀伤效应。 $5 \mu\text{g/ml}$ 的杀伤效应更明显($P < 0.01$)。在相同癌光啉浓度条件下(除 $2.5 \mu\text{g/ml}$), 随红光照射强度的增加, 杀伤效应更加明显($P < 0.01$)。与此同时, 对照组中单用癌光啉或单用红光照射, 对细胞均无杀伤效应($P > 0.05$)。甚至单用癌光啉, 即使浓度加至 $50 \mu\text{g/ml}$, 或单用红光照射, 强度高达 100 J/cm^2 , 继续培养 24 h 后, 对细胞的生长和形态均无影响。因此, 可以认为决定癌光啉加光照射杀伤细胞光敏效应

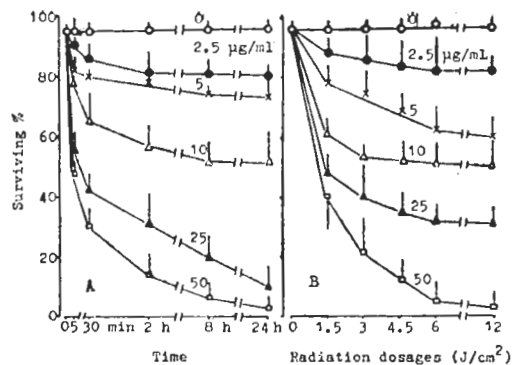


Fig 2. Photodynamic effect of carcinophotorin on the activity of human hepatocarcinoma cells cultivated *in vitro* (A) at various times after carcinophotorin ($2.5\text{--}50 \mu\text{g/ml}$) plus red light radiation 3 J/cm^2 , (B) at 24 h after carcinophotorin ($2.5\text{--}50 \mu\text{g/ml}$) plus red light radiation ($1.5\text{--}12 \text{ J/cm}^2$).

的因素包括癌光啉浓度、光照射量和光照后时间。为了进一步观察细胞损伤的早期形态学变化, 本文采用癌光啉 $10 \mu\text{g/ml}$ 、照光强度 3 J/cm^2 以及照光后不同时间分别取材来进行形态学变化的动态观察研究。

倒置相差显微镜观察 用癌光啉 $10 \mu\text{g/ml}$ 加红光 3 J/cm^2 照射细胞, 其形态学变化开始见于 5 min 后。原来贴壁生长的部分扁平状细胞变圆, 边缘部分可见放射状的刺状突起, 但胞浆无变化; 30 min 后, 大多数细胞圆缩, 刺状突起也逐渐增多、增大, 胞浆内变化仍不明显; 2 h 后, 刺状突起变成大小不一的泡状结构, 部分泡状结构体积可占细胞体积的 $1/2$, 胞浆内可见大小不一的空泡状结构; 8 和 24 h 后, 几乎所有细胞都见损伤, 表现为细胞明显肿胀, 除胞膜上泡状结构数目增多、体积增大外, 胞浆内呈空网架样变化, 部分细胞质膜开始破裂, 可见胞浆外溢现象; 核膜明显增厚, 折光性强, 核基质稀少、透亮、水肿变, 核仁明显, 最后, 细胞呈空网架样变性, 大多数细胞膜破裂, 细胞死亡解体(图 3-A, 见铜版图 2, 下同)。

扫描电镜观察 细胞经癌光啉加红光处理后立即观察, 部分细胞表面微绒毛末端开始轻

度肿胀,呈杆状;5 min后,肿胀更为明显,呈鼓槌状和小泡状;30 min后,肿胀的微绒毛变成大小不等的泡状结构,同时,原来表面丰富的微绒毛数目明显减少,细胞表面变光滑;2 h后,泡状结构逐渐增多并明显增大,部分泡状结构的基部呈一柄样结构与细胞相连;8和24 h后,泡状结构和肿胀的微绒毛开始断裂、脱落,细胞也开始碎裂成不规则残体碎片(见图3-C)。

透射电镜观察 细胞经癌光啉加红光处理后立即观察,细胞变化不明显。5 min后,细胞边缘可见肿胀的微绒毛切面,其内可见一些边缘模糊的细颗粒状结构;部分线粒体基质电子致密度增加,灶性空化现象增多;粗面内质网表面核糖体颗粒开始脱落;糖原颗粒减少。30 min后,可见明显肿胀脱落的泡状结构断面,呈圆形和椭圆形,其内除可见一些模糊的细颗粒状结构外,未见细胞器;一部分线粒体固缩,基质电子密度明显增高,嵴间间隙大小不一,另一部分线粒体嵴结构模糊不清,电子密度降低,其内可见数目不等的多个灶性空化区,个别还互相融合成大空化区;粗面内质网扩张,高尔基氏器少见;糖原明显减少;染色质凝集成小团块状并边集于核膜上。2 h后,细胞边缘可见向外突出的大泡状结构,部分细胞的泡状膜结构和细胞质膜相连续,提示扫描电镜所见的大泡状结构至少一部分可能来源于细胞质膜的直接外突;线粒体明显肿胀,嵴变短、断裂、消失,其内空化区增多、增大,使线粒体变囊泡状;粗面内质网扩张更明显;部分细胞内次级溶酶体数目明显增多,其内电子密度不均匀,似含较多脂质成分;胞质基质内亦出现一些大小不一的空化区;胞核内染色质凝集成大小不等的团块,边集于核膜上。8和24 h后,大多数线粒体内基质稀疏、透亮,嵴断裂、消失,体积增大,甚至压迫胞核,粗面内质网高度扩张,糖原消失,胞浆、核基质透亮、水肿变。最后,细胞器肿胀、破裂、溶解、消失,细胞核膜、质膜破裂乃至整个细胞崩解死

亡(见图3-E, F)。

对照组细胞的形态学变化 三组细胞无论在细胞和超微结构水平均未受影响(见图3-B, D)。

讨 论

癌光啉加红光照射7721细胞有明显杀伤效应,并首先损伤线粒体、细胞膜⁽⁵⁻⁷⁾。随红光照射后时间的延长,除线粒体、细胞膜损伤更趋明显外,粗面内质网、胞核内染色质亦有明显损伤⁽⁸⁾,说明癌光啉是一种较为满意的新型肿瘤光化学治疗剂。

本实验结果表明,由于线粒体、细胞膜的损伤,导致细胞的需氧代谢、能量产生等生命活动均受损伤,以及由其引起的继发反应或光动力学效应的直接损伤粗面内质网、细胞核等作用,使细胞的整个生物膜系统均遭破坏,膜的离子主动、被动运输系统受损,膜通透性发生改变,从而表现出细胞的微绒毛、线粒体、粗面内质网、胞核乃至整个细胞的肿胀、增大,基质透亮、水肿样变,直至胞质、核质、细胞器完全溶解,细胞死亡解体。

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 及癌光啉的薄层色谱分析研究. 同上 1986, 7: 86
- 3 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特性的初步观察. 同上 1980, 1: 5
- 4 张武扬、陶文照、董荣春、吕发度、何德华. SMMC-7721 人体肝癌细胞株的电镜和光镜观察. 同上 1980, 1: 10
- 5 Coppola A, Viggiani E, Salzarulo L, Rasile G. Ultrastructural changes in lymphoma cells treated with hematoporphyrin and light. *Am J Pathol* 1980, 99: 175
- 6 Moan J, Johannessen JV, Christensen T, Espevik T, McGhie JB. Porphyrin-sensitized photoinactivation of human cells *in vitro*. *Ibid* 1982, 109: 184
- 7 Bellnier DA, Dougherty TJ. Membrane lysis in Chinese hamster ovary cells treated with

hematoporphyrin derivative plus light. *Photochem Photobiol* 1982, 36 : 43

8 Franco P. Inhibition of cellular DNA

synthesis and lack of antileukemic activity by non-photoactivated hematoporphyrin derivative. *Tumori* 1980, 67 : 183

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Jan, 9 (1) : 93-96

Cytotoxic effect of carcinophotorin plus red light on human liver cancer cells *in vitro*

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

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

ABSTRACT The morphological changes of human hepatocarcinoma cells cultivated *in vitro* after treatment with carcinophotorin (10 µg/ml) plus red light (3 J/cm²) were observed under the optic microscope to identify the vitality of the treated cells. The cells were swollen, with cytoplasmic blebs. There were large and small vacuoles in the mitochondria. The rough endoplasmic reticulum were degranulated and dilatated. Vesicles of cytoplasmic membrane were

formed as the sizes and numbers of normal microvilli were reduced. The condensed heterochromatin seemed to aggregate at the nuclear membrane. Finally, the injured cells were disintegrated.

KEY WORDS cell line (SMMC-7721); experimental liver neoplasms; electron microscopy; scanning electron microscopy; carcinophotorin; red light; photochemotherapy

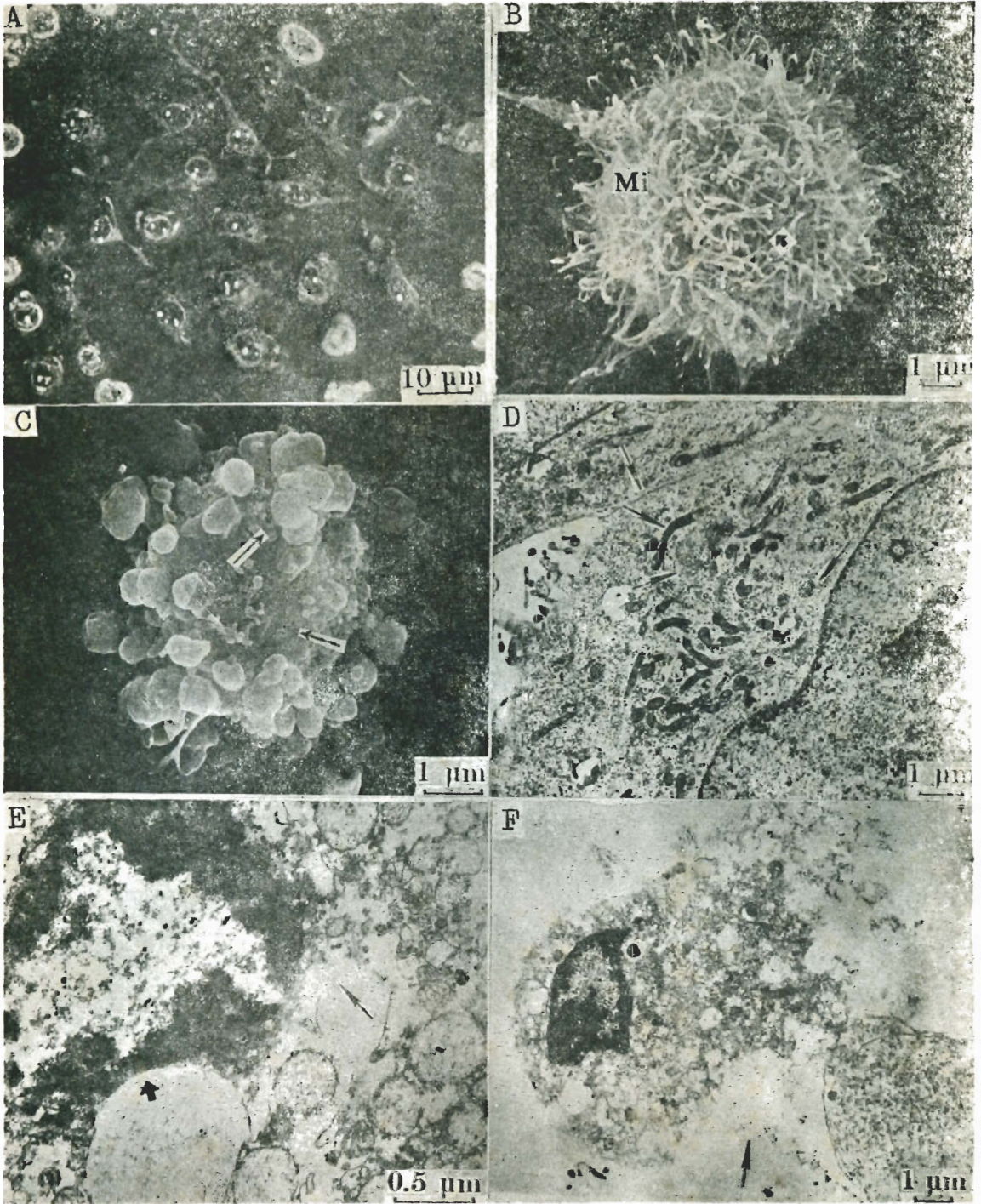


Fig 3. (A) Phase-contrast microscopy; 24 h after treatment with carcinophotorin plus red light. The cells were swollen and rounded, with cytoplasmic blebs, $\times 400$. (B, C) Scanning electron microscopy. (B) untreated, $\times 6500$. (C) 30 min after photochemotherapy. The vesicles of cytoplasmic membrane were formed as the sizes and numbers of normal microvilli were reduced, $\times 10\ 000$. (D-F) Transmission electron microscopy. (D) Untreated, $\times 8000$. (E) 24 h after treatment, showing the greatly swollen mitochondria and compressed nuclear membrane, $\times 30\ 000$. (F) 24 h after treatment, showing the final rupture of cytoplasmic membrane, $\times 7000$. (See p 94-95)