

· 研究简报 ·

## Ar<sup>+</sup> 激光辐照对吖啶橙敏化人体宫颈癌细胞的生物学效应\*

马淑懿 谢 勤

(生物学系)

### 摘 要

用不同剂量的氩离子激光照射经吖啶橙敏化的人体宫颈癌细胞后,与对照组细胞比较,观察到其生长曲线下降、死亡率曲线上升、酸性磷酸酶迅速失活以及细胞显微结构与亚显微结构的受损退化等效应,并对上述结果进行了讨论分析。

**关键词** 激光生物学效应, 吖啶橙光敏化剂, HeLa细胞

利用光动力学效应(Photodynamic effect)诊治癌症是一种很有前途的治癌方法。近年来在国内外对此研究均有较大的发展,尤其对以血卟啉衍生物(HPD)为光敏化剂的激光光动力学疗法及其机理的研究较为详尽<sup>[1]</sup>。本文报道以较高功率密度的氩离子(Ar<sup>+</sup>)激光照射经吖啶橙(Acridine Orange,简称Ao)敏化的人体宫颈癌细胞(HeLa cell)的生物学效应,并讨论其作用机理。

### 1 实验材料和方法

1.1 实验材料 ①实验用的光敏化剂为吖啶橙(Ao瑞士Fluka产品),以生理盐水配制成不同浓度的溶液,经过对细胞的毒性试验,最后选择的浓度为0.50μg/ml。②实验用的Ar<sup>+</sup>激光器系由中山大学激光与光谱学研究所制造提供;其主要输出波长为4880、5145Å蓝、绿光,经90°角转向扩束后,照射光斑直径为0.6cm,激光辐照剂量分别为:360.93、806.79和1082.80J/cm<sup>2</sup>。③实验用的癌细胞系由中山医科大学提供的HeLa细胞株,按常规方法用加15%小牛血清的PRMI1640培养获得。

1.2 实验方法 ①Ar<sup>+</sup>激光辐照对敏化HeLa细胞生长繁殖影响测定系以剂量为806.79J/cm<sup>2</sup>的Ar<sup>+</sup>激光照射Ao敏化的HeLa细胞后接种培养(作照射组)与无照射的敏化细胞(即对照组)比较,以常规培养细胞计数方法绘出其生长曲线和死亡率曲线,并用统计学方法检验照射组与对照组细胞的生长繁殖数和死亡数的差异显著性。②Ar<sup>+</sup>激光辐照敏化HeLa细胞的光、电镜标本制备。经Ao敏化10分钟后的HeLa细胞分别用360.93J/cm<sup>2</sup>、806.79J/cm<sup>2</sup>和1082.80J/cm<sup>2</sup>不同激光剂量照射后继续培养,并从0、1、2、12、24小

本文1989年5月23日收到

时分别取样在倒置显微镜下或经10%Giemsa细胞染色后在光镜下观察。电镜标本制备系以常规培养细胞标本制备、Epon812包埋、双色电子染色、超薄切片,在HitachHU-12电镜下观察并摄影记录。③Ar<sup>+</sup>激光辐照对敏化HeLa细胞内酸性磷酸酶(ACPase)与碱性磷酸酶(AKPae)活性影响的组织化学标本制备。将HeLa细胞接种于培养瓶内的盖玻片上,取出含培养细胞的盖玻片,以浓度为0.50μg/ml的Ao敏化和剂量为806.79J/cm<sup>2</sup>的Ar<sup>+</sup>激光照射处理后放回培养瓶内继续培养,分别以不同时间(0,2和6小时)取样为不同照射组;按改良的Gomori钙钴法和硝酸铅法分别检测细胞内ACPase和AKPase的活性,与无辐照的敏化细胞组(即对照组)比较,并摄影记录。

## 2 结果和讨论

2.1 用806.97J/cm<sup>2</sup>的Ar<sup>+</sup>激光剂量照射经Ao敏化的HeLa细胞后继续培养1~7天,与对照组比较,由图1和图2得出其生长繁殖数的 $t = 3.519 > t_{(0.01)} 3.055$ ,和死亡数的 $t = 3.960 > t_{(0.01)} 3.055$ ,即 $P < 0.01$ ,差异显著。同时,照射组的细胞平均世代延长,细胞集落形成率降低和分裂指数下降。

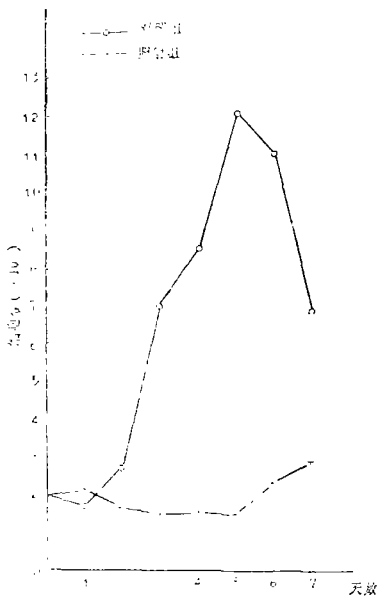


图1 照射组与对照组HeLa细胞的生长曲线  
Fig 1 Growth curves of HeLa cell in irradiation group and control group

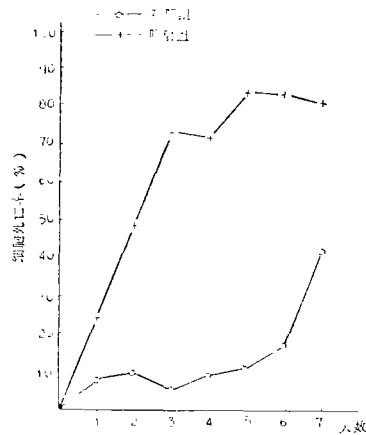


图2 照射组与对照组HeLa细胞的死亡率曲线  
Fig 2 Death rate curves of HeLa cell in irradiation group and control group

但对未敏化HeLa细胞的Ar<sup>+</sup>激光辐照实验中,照射组的上述各项生理指标却无显著变化。这是因为细胞内核酸的强吸收光谱均在260nm附近的紫外区<sup>[2]</sup>,而对可见光(如Ar<sup>+</sup>激光)无明显吸收,故其光辐照效应不显著。但若对细胞添加适当的光敏化剂,则细胞内核酸乃至整个机体、细胞将会受到可见光的光致损伤和破坏<sup>[3]</sup>。经吸收光谱测定表明所用的光敏化剂Ao对Ar<sup>+</sup>激光的主要波长4880Å有较大的吸收。上述实验结

果说明:经Ao浓度为 $0.50\mu\text{g}/\text{ml}$ ,敏化作用时间10分钟, $\text{Ar}^+$ 激光照射剂量为 $806.97\text{J}/\text{cm}^2$ 处理的HeLa细胞,其生长能有效地受到抑制。此外,生长的抑制程度还与敏化剂浓度和激光辐照剂量的大小有关。

2.2  $\text{Ar}^+$ 激光辐照对敏化HeLa细胞形态的影响。在光学显微镜下观察到以 $1082.80\text{J}/\text{cm}^2$ 较高剂量的 $\text{Ar}^+$ 激光照射Ao敏化的HeLa细胞迅速变圆、脱壁并随之死亡;以激光剂为 $806.79\text{J}/\text{cm}^2$ 照射的Ao敏化细胞出现小泡状突起,并变圆、脱壁,2天后大量死亡;以 $360.93\text{J}/\text{cm}^2$ 较低激光剂量照射Ao敏化细胞,未见泡状突起,但其胞核胞质逐渐萎缩,最终退化死亡。

在电子显微镜下的观察结果表明:在激光剂量为 $806.79\text{J}/\text{cm}^2$ 下照射的Ao敏化量HeLa细胞,用扫描电镜观察到其表面微绒毛(Microvilli)减少、变短,细胞变圆;用透射电子显微镜(TEM)观察到细胞内腺粒体肿胀,基质透明,细胞膜形成异常囊状凸起,胞质内空泡增多,细胞内出现不规则片层状膜结构(图版—1,2)。

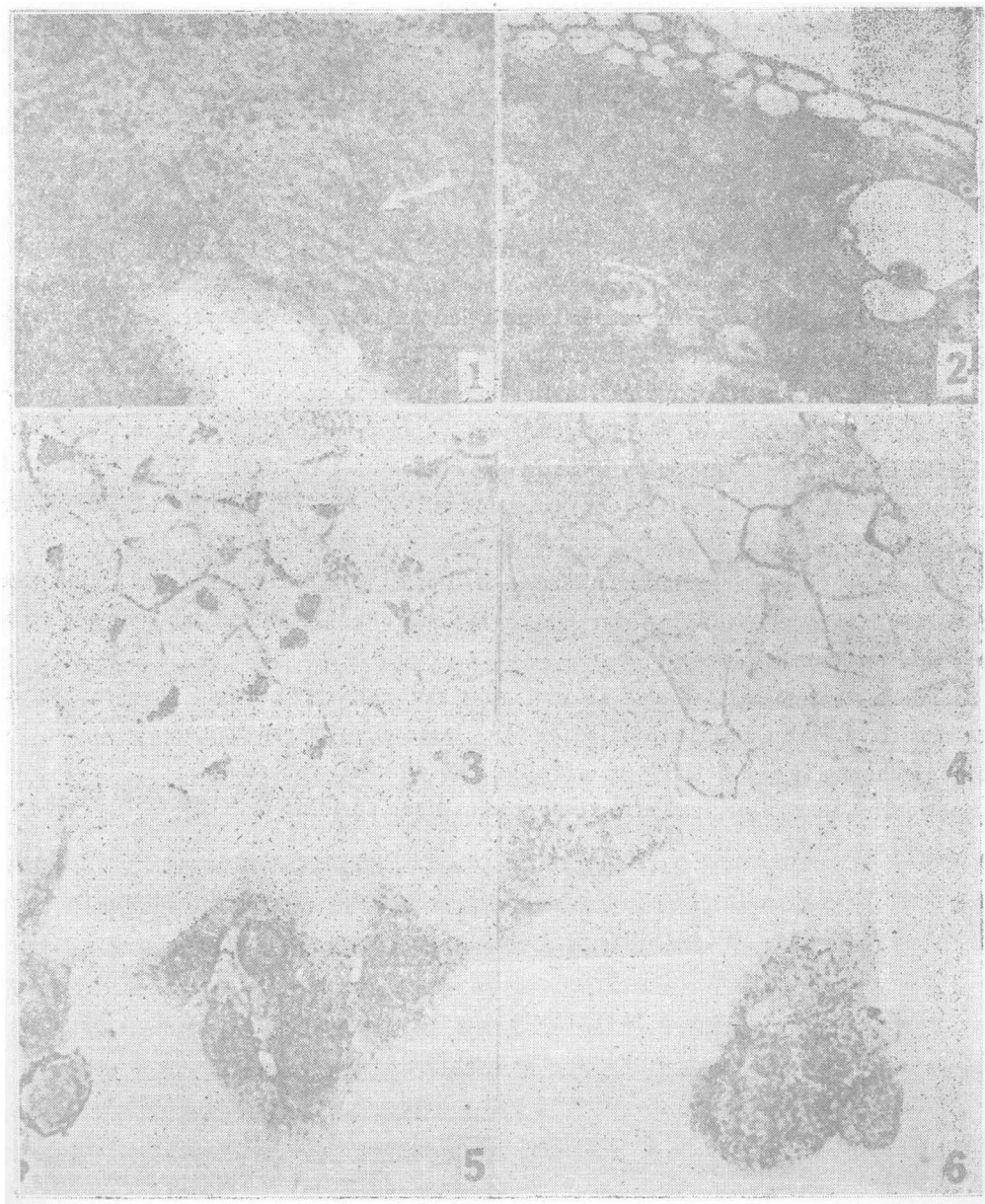
上述结果表明这些形态学上的变异与在维持细胞的正常形态和生理活动中起着重要作用的细胞内膜系统的破坏密切相关。

2.3 从组织化学变化研究结果表明, $\text{Ar}^+$ 激光照射的Ao敏化HeLa细胞内的ACPase活性即时消失,而AKPase活性却未发现明显的变化(图版—3,4,5,6)。因为ACPase主要存在于细胞内担负防御与消化功能的溶酶体中,而光敏化剂Ao亦富集于溶酶体内<sup>[4]</sup>。故溶酶体内ACPase的迅速失活可能是Ao直接与ACPase分子结合,从而在光辐照作用下使ACPase分子结构破坏,酶活性消失。

综上所述, $\text{Ar}^+$ 激光辐照对Ao敏化HeLa细胞的生物学效应是 $\text{Ar}^+$ 激光光动力学作用对敏化HeLa细胞的损伤效应。它主要是由于在细胞中内膜系统包括线粒体、内质网等超微结构成份以及溶酶体酶(主要指酸性磷酸酶)被破坏的结果。

### 参 考 文 献

- [1] V F Kamolov et al., *Sov. J. Quantum Electron.*, 10 (1985), 15, 1319~1335
- [2] R J H Clark et al., *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy*, Heydon & Son Ltd., 5 (1980), 218~219
- [3] Kendrick C Smith, *The Science of Photobiology*, Plenum Press, 1977, Ch.4, 4.1
- [4] A V Zelenin, *Nature*, 212 (1966), 5060, 425~426



图版 Plate

## Biological Effect of Ar<sup>+</sup> Laser Irradiation on HeLa Cell Sensitized by Acridine Orange

Ma Shuyi Xie Qin

### Abstract

The biological effect of Ar<sup>+</sup> laser irradiation on HeLa cells sensitized by acridine orange (AO) is reported. It was shown that:

1. HeLa cells sensitized by AO in the concentration of 0.50 ug/ml and irradiated by Ar<sup>+</sup> laser at doses of 360.93 J/cm<sup>2</sup>, 806.79 J/cm<sup>2</sup> and 1082 J/cm<sup>2</sup> showed an increase in death rate and a decrease in growth rate. The degree of inhibition of the cell growth depends on the concentration of AO and the dosage of Ar<sup>+</sup> laser irradiation.

2. After Ar<sup>+</sup> laser irradiation at doses of 360.93, 806.79 and 1082.80 J/cm<sup>2</sup>, the sensitized HeLa cells appear some morphological changes under the photomicroscope and electron microscope.

3. The histochemical research showed that the activity of acid phosphatase in the sensitized HeLa cells irradiated by Ar<sup>+</sup> laser disappeared immediately, but no obvious change in the activity of alkaline phosphatase was seen.

**Keywords** laser biological effect, photosensitizer acridine orange, HeLa cell