

红光结合血卟啉单甲醚光动力疗法治疗微静脉畸形的实验研究

黄雪蕾 林李嵩 杨 栋

【摘要】目的：通过鸡冠动物模型了解红光结合光敏剂血卟啉单甲醚(hematoporphyrin monomethyl ether, HMME)在光动力疗法治疗微静脉畸形中的治疗效果和适宜治疗参数。方法：48 只鸡随机分组，处理组分别注射不同剂量的 HMME 后，半导体激光(红光)或氩离子泵浦染料激光不同能量密度分组照射，照射后肉眼和光镜下观察比较组织损伤程度并测量损伤深度。结果：红光结合 HMME 照射能引起鸡冠颜色变白、血管数量减少等形态学改变。HMME 10mg/kg、15mg/kg 剂量组中，在相同功率密度时，红光高能量密度照射组(240J/cm²)所造成损伤深度(分别为 1.2225±0.8457mm, 2.2800±1.3665mm)均显著大于氩离子泵浦染料激光不同能量密度的各照射组($P < 0.05$)。适宜治疗参数为 HMME 剂量 10mg/kg，红光能量密度 120—240J/cm²。结论：红光结合 HMME 光动力疗法有可能对增厚或结节型微静脉畸形实现更佳的治疗效果。

关键词：光动力疗法；微静脉畸形；激光；光敏剂；鸡冠

[中国图书分类号] R782

[文献标识码] A

[文章编号] 1009-3761(2011)04-00193-04

A experimental study of treatment of venular malformations with photodynamic therapy combined Hematoporphyrin Monomethyl Ether with red laser light

HUANG Xue-lei, LIN Li-song, YANG Dong. (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】Objective: To initially investigate the effects and application parameters of photodynamic therapy combined red light with hematoporphyrin monomethyl ether(HMME)on venular malformations. Methods: 48 adult chickens were randomly divided into 6 control groups and 12 experiment groups. Experiment groups were injected HMME at 5,10 or 15mg/kg dose, then irradiated by argon ion pumped dye laser or semiconductor laser (red light). The energy density of the former was 60J/cm² or 120J/cm². The latter's was 120J/cm² or 240J/cm². All of power density were 200mW/cm². The observation by unaided eyes and light microscopy were conducted after irradiation, including the degree and depth of injury in the combs tissue. Results: The area of irradiated combs in the experiment groups with red light (semiconductor laser of wavelength 630nm) combined with HMME showed blanching and decrease of blood vessel amount. With the same power density and HMME at 10mg/kg or 15mg/kg dose, experiment groups of red light with high energy density (240J/cm²) showed significantly deeper impairment (respectively were 1.2225±0.8457mm, 2.2800±1.3665mm) than those groups of argon ion pumped dye laser with different energy density($P < 0.05$). The optimal treatment parameter should be recommended as HMME dose of 10mg/kg and red light with energy density between 120-240J/cm². Conclusions: Photodynamic therapy combined red light with HMME is likely to realize a preferable therapeutic efficacy for nodular or thicken venular malformations.

Key words: photodynamic therapy; venular malformations; laser; photosensitizer; chicken combs

黄雪蕾 解放军总医院口腔颌面外科 博士生 北京 100853
(现在解放军第一七四医院)

林李嵩 通讯作者 福建医科大学附属第一医院口腔科 主任
主任医师 教授 福建 350005

杨 栋 厦门大学医学院抗癌研究中心 副教授 福建
361005

微静脉畸形(venular malformations)被称为鲜红斑痣、葡萄酒色斑，为一种皮肤常见的先天性毛细血管后微静脉扩张畸形^[1]，面颈部多见，65%的患者在 40 岁前可增厚和出现结节。以往的传统治疗方法如冷冻、放射性核素贴敷、单纯激光照射、硬化剂注射、手术治疗等，疗效均不理想。目前，

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)已成为微静脉畸形的常用治疗方法并取得较好的疗效^[2],但相对较低的治愈率及治疗所致的并发症需进一步探索以取得较好的疗效,特别是对于增厚和结节型微静脉畸形的治疗。本实验以氩离子泵浦染料激光器为参照,以鸡冠作为动物模型,初步了解利用红光结合光敏剂血卟啉单甲醚(hematoporphyrin monomethyl ether, HMME)光动力疗法治疗微静脉畸形的治疗效果和适宜治疗参数。

1. 材料和方法

1.1 实验动物 雌性海兰鸡 48 只,体重 1.7-2.0kg,平均体重 1.93kg,鸡冠红润、丰满,由厦门大学医学院动物实验室提供,饲养条件相同,均在实验后避光饲养至取材时。

1.2 光敏剂 血卟啉单甲醚,上海红绿光敏剂有限公司,规格 10mg/ml, -20℃低温避光保存。

1.3 主要仪器 氩离子泵浦染料激光器(S-P171-09, Spectra-physics, 美国),采用输出波长 488.0-514.5nm; 半导体激光器(DIOMED630 PDT, DIOMED, 英国),输出波长 630nm; 两者均为连续输出,接配套微透镜光纤。COHERENT 激光功率计(COHERENT, 美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物随机分为以下几组:(1)空白对照组:2 只鸡,不给光敏剂和激光照射处理。(2)控制对照组:①单纯光敏剂组:HMME 剂量分别为 5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg,不照激光,每个处理重复 2 次,共用 6 只鸡。②单纯照光组:不给光敏剂,单纯激光照射,功率密度均为 200mW/cm²,半导体激光器能量密度分别为 120J/cm²、240J/cm²,氩离子泵浦染料激光器能量密度分别为 60J/cm²、120J/cm²,于同一鸡冠上分别取两个照射区,用两种激光分别取能量密度较低或较高的两种光剂量同时照射,每个处理重复 2 次,共用 4 只鸡。(3)处理组:每只鸡分别按单纯光敏剂及照光组中所述的光敏剂及能量密度用两种激光照射,36 只鸡共设 12 个处理组,每 2 个处理组一只鸡,每个处理重复 6 次。

1.4.2 给药及激光照射方法 应用复方氯氨酮(35mg/kg)及咪唑安定(1mg/kg)肌肉注射,麻醉

成功后, HMME 于照光前在避光条件下以原浓度按拟定剂量由鸡翼根静脉注射,在每只鸡冠上取两个相距 10mm 的直径为 10mm 的圆形照射区域,注射 5min 后开始同时激光垂直照射,照光前后监测输出功率,功率波动范围±5%。

1.4.3 观察和取材 处理组分别于处理后即刻及第 1、3、7、14、28 天时先行肉眼观察鸡冠颜色和表面情况,后每组各取一只动物照光区鸡冠组织,常规方法石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观察组织损伤程度并测量损伤深度。控制对照组分别于处理后即刻及一周时同上方法观察、取材。测量损伤深度的方法为:在照射区随机取 5 个点测量从皮肤表层至损伤最深处的垂直距离,取其平均值做为该组的损伤深度值。

1.5 统计学处理 实验所测损伤深度数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 进行统计学处理,多组比较用方差分析,组间比较用 LSD 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。应用 Spearman 秩相关分析对损伤深度的影响因素进行评价。由于在损伤 1 周后,部分处理组损伤区组织开始愈合,因此,本实验仅对损伤后即刻至 1 周时所测量的损伤深度数据做统计分析。

2. 结果

2.1 对照组鸡冠皮肤的形态学观察 空白对照组、单纯光敏剂组、单纯照光组中的半导体激光照射组及氩离子泵浦染料激光 60J/cm² 能量密度照射组肉眼及光镜下鸡冠组织均未见明显改变。氩离子泵浦染料激光 120J/cm² 能量密度照射组照光后即刻肉眼可见照射区有极轻微的发红,2 天后恢复正常颜色,即刻取材标本可见鸡冠皮肤乳头层血管略有扩张,表皮层可见部分棘细胞肿胀,照光后 1 周取材标本光镜下表现基本正常。

2.2 PDT 作用后鸡冠的形态学改变

2.2.1 肉眼观察鸡冠的形态学改变 轻度反应:PDT 后呈淡红或浅白色,轻度水肿;1-3 天,恢复正常。中度反应:PDT 后呈白色,伴轻度的肿胀;2-4 周,大部分恢复正常颜色,肿胀消退;观察过程中无破溃、结痂、疤痕形成。重度反应:PDT 后呈白色,伴较明显的肿胀;1-2 周出现大面积的破溃、结痂;4 周时部分鸡冠变白范围缩

小, 肿胀消退, 结厚痂处形成疤痕、组织变薄。

2.2.2 光镜下鸡冠的组织形态学改变 轻度反应: PDT 后即刻皮肤乳头层血管轻度扩张, 表皮层及网状层无明显改变, 1 周后恢复正常。其中, 少部分氩离子泵浦染料激光照射组表皮层棘细胞轻度肿胀, 1—2 周后恢复正常。中度反应: PDT 后皮肤乳头层部分血管腔缩小或闭锁, 半导体激光照射组表皮层正常, 网状层全层血管扩张、血栓形成, 而氩离子泵浦染料激光照射组表皮细胞散在的

维持时间约在 1—4 周, 肉眼及光镜下表现为中度反应的表现。剂量 15mg/kg 的处理组鸡冠颜色变白效果能持续 3—4 周以上, 但出现了破溃、疤痕, 多表现为重度反应。半导体激光高能密度照射组 (240J/cm²) 所造成损伤深度均显著大于氩离子泵浦染料激光两种不同能量密度的各个照射组。半导体激光低能量密度照射组 (120J/cm²) 则仅在 HMME 15mg/kg 剂量组中损伤深度显著大于氩离子泵浦染料激光的各照射组。(附表)。

附表 不同药物剂量下不同光照方式对鸡冠损伤深度影响的比较 (mm)

HMME 剂量 (mg/kg)	照射区 (个/组)	损伤深度			
		氩离子激光(60J/cm ²)	氩离子激光(120J/cm ²)	半导体激光(120J/cm ²)	半导体激光(240J/cm ²)
5	4	0.3375±0.2431	0.3575±0.2428	0.5050±0.3781	0.5450±0.3782
10	4	0.3975±0.0995	0.5625±0.1933	0.6650±0.1389	1.2225±0.8457*#
15	4	0.7600±0.2267	0.6725±0.1658	2.0650±1.1553*#	2.2800±1.3665*#

* P<0.05 vs 氩离子激光(60J/cm²); # P<0.05vs 氩离子激光(120J/cm²) HMME: 血卟啉单甲醚

空泡变性, 网状层改变仅在浅层; 1—2 周, 大部分氩离子泵浦染料激光照射组表皮层及网状层恢复正常; 4 周, 乳头层见较多新生毛细血管, 半导体激光照射组网状层见新生毛细血管, 血栓吸收。重度反应: PDT 后皮肤乳头层管腔大部分闭锁、缩小, 血管数量明显减少; 半导体激光照射组表皮层正常, 而较多的氩离子泵浦染料激光照射组表皮细胞出现局灶性空泡变性; 1—2 周, 两种激光照射组表皮层细胞均出现变性、坏死, 溃疡形成; 半导体激光照射组网状层血管明显扩张或破裂, 血栓形成, 而氩离子泵浦染料激光照射组仅网状层浅层至中层出现了以上改变; 4 周, 乳头层大部分区域血管数量仍明显减少, 见新生毛细血管, 表皮细胞增生, 网状层见新生毛细血管。

2.2.3 不同药物剂量下不同光照方式对鸡冠的损伤效果 在 HMME5mg/kg 剂量组, 不同光照方式鸡冠的损伤效果差别不大, 两种波长激光高能密度组均较低能量密度组略重, 但在肉眼及光镜下观察均为轻度反应的表现, 各种光照方式对损伤深度的影响之间无统计学差异。

在 HMME10mg/kg、15mg/kg 剂量组中, 同一鸡冠上, 半导体激光照射组较氩离子泵浦染料激光照射组鸡冠变白时间维持更久; 同一 HMME 剂量组中低能量密度较高能量密度照射所造成的损伤程度轻。剂量 10mg/kg 的处理组鸡冠变白效果好,

用 Spearman 秩相关分析评价影响损伤深度的因素, 结果表明损伤深度与 HMME 剂量呈中强度正相关 (r= 0.535, P< 0.001), 与光照方式呈中强度正相关 (r= 0.422, P= 0.001), 后者 r 值略小, 提示 HMME 剂量与损伤深度相关性更强。

3. 讨论

3.1 HMME 对损伤效果的影响 本研究结果提示, 光敏剂剂量是影响光敏损伤程度的主要因素, 增加 HMME 的给药剂量可以提高 PDT 造成的鸡冠组织的损伤效果, 实验发现, 10mg/kg 给药剂量可以产生足够的变白效果, 且无过度损伤的表现出现, 而 15mg/kg 给药剂量则出现了皮肤破溃、结痂、疤痕等过度损伤的表现。与既往的鸡冠模型实验结果一致, 因此, 预计在临床上采用波长 630nm 的半导体激光 PDT 治疗微静脉畸形时, 采用既往的 HMME 临床给药剂量 3.0- 7.0mg/kg 即可达到预期的效果^[2]。

HMME 是一种国产光敏剂, 其吸收峰(nm): 397(soret)、498、531、620^[3], 其中 620nm 的吸收峰与 630nm 接近, 虽然波长 630nm 的光源并不是其最佳匹配光源, 但在本实验中仍可见 PDT 治疗产生了较强的光动力效应。由于 HMME 已在临床应用多年, 实验结论可直接用于临床治疗的指导和提示, 而且该药具有反应轻、愈合快、不良反应

少、安全度大、避光期短、色素沉着轻、护理容易、重复治疗间隔期短的优点^[4]。

3.2 激光对损伤效果的影响 研究结果显示激光波长影响组织光敏损伤的深度, 氩离子泵浦染料激光波长较短, 即使在高剂量组, 损伤深度也局限于网状层的浅层或中层以上, 而半导体激光波长较长, 造成的损伤深度明显大于氩离子泵浦染料激光, 提示在临床采用红光治疗较深或较厚的微静脉畸形时, 可使病变消除更为彻底。

另外, 能量密度与光敏损伤程度也密切相关, 实验结果显示, 加大能量密度可提高光敏损伤效果, 但当 HMME 剂量较大时, 如一味提高能量密度, 将造成表皮破溃、结痂等过度损伤, 实验结果提示, 在 HMME 15mg/kg 剂量组, 如果以低于 120J/cm² 的能量密度照射后很有可能在达到较深的治疗深度时不出现过度的损伤。

同为卟啉类光敏剂的 HpD 光敏化剂量的研究中显示, 514.5nm 波长的光其光敏效能是 630nm 的 2-3 倍^[5], 因此本实验将半导体激光的能量密度选择为氩离子泵浦染料激光的 2 倍, 旨在使两者在功率密度相同、HMME 剂量相同的条件下取得相似的损伤效果, 以比较两者引起的损伤深度的差别。

实验中发现, 氩离子泵浦染料激光在中等剂量组中即有部分出现了表皮细胞的损伤, 而半导体激光则仅在 HMME 高剂量处理组中 1-3 天后才部分出现表皮层的损害, 分析是由于半导体激光波长长、光子能量较低, 更不易对表皮细胞造成热损伤, 仅在高剂量组中由于损伤深度较深, 才造成了鸡冠血管的广泛破坏引起的表皮缺血性坏死。

实验结果显示, 红光结合 HMME 光动力治疗在鸡冠动物模型实验中能达到良好的变白效果, 且较氩离子泵浦染料激光达到更持久的变白效果和更大的治疗深度, 有可能对增厚或结节型的微静脉畸形实现更佳的治疗效果。适宜治疗参数为 HMME 剂量 10mg/kg, 红光(波长 630nm) 能量密度 120J/cm²-240J/cm², 在 HMME 15mg/kg 剂量时, 以低于 120J/cm² 的能量密度照射后很有可能在达到较深的治疗深度同时不造成非靶组织的损伤。

至今, 临床在微静脉畸形的 PDT 治疗中, 对于光剂量和光敏剂剂量的掌握还主要是依靠治疗医师的临床经验来确定, 疗效差别较大, 由于红光穿

透的深度较深, 容易造成过度损伤, 限制了红光的临床应用。在临床治疗中, 由于中国人的皮肤属于 Fitzpatrick III、IV 型者较多, 为光敏感类型, 与白种人的肤色相比对光的吸收较强, 易产生血管周围皮肤结构的损伤^[6]。而使用短波长的激光光子能量较高, 易对表皮细胞造成热损伤, 且由于穿透能力有限, 难以治疗深部的病变血管, 因此对于增厚型和结节型微静脉畸形的患者, 常在多次的光动力治疗后仍不能达到理想的治疗效果。

研究结果提示, 对于增厚型和结节型微静脉畸形的治疗, 采用适宜治疗剂量的红光结合匹配的光敏剂, 可将 PDT 控制在理想的程度和深度, 随各种在活体测定微静脉畸形病变深度、实时监测有效光剂量及光敏剂浓度的研究及辅助设备的开发^[7-10], 彻底、有效、安全、无需重复多次的治疗结果将有可能实现。

参 考 文 献

- [1] Waner M. Classification of port-wine stains [J]. *Fac Plast surg*, 1989, 6(3): 162-166
 - [2] 顾 瑛, 刘凡光, 王 开, 等. 光动力疗法治疗鲜红斑痣 1216 例临床分析[J]. *中国激光医学杂志*, 2001, 10(2): 86-89
 - [3] 许德余, 张 浩, 陈文晖, 等. 光动力治癌新药血卟啉单甲醚(HMME)的研究[J]. *中国激光医学杂志*, 1993, 2(1): 3-7
 - [4] 刘凡光, 顾 瑛, 富秋涛, 等. 光动力疗法治疗鲜红斑痣的基础研究 - 血卟啉单甲醚与血卟啉衍生物吸收特性的比较[J]. *中国激光医学杂志*, 2001, 10(1): 9-12
 - [5] 王凯华, 杨 栋, 陈瑜川. 630nm 和 514.5nm 两种波长激光束对人胃、肺癌细胞株的 HpD 光敏化剂量的研究[J]. *激光杂志*, 1988, 9(5): 303-306
 - [6] 周国瑜, 沈玲悦, 赵婷婷, 等. 微静脉畸形激光治疗研究现状与进展[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2009, 2(5): 268-271
 - [7] Vivek Sivarajan, Graeme Smith, Iain R. Mackay. The validation of the Depth Measurement Videomicroscope (DMV) as a noninvasive tool for the assessment of capillary vascular malformations[J]. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2007, 60(1): 79-86
 - [8] F Bazant- Hegemarkab, I Meglinskia c, N Kandamany, et al. Optical coherence tomography: A potential tool for unsupervised prediction of treatment response for Port-Wine Stains[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2008, 5(3): 191-197
 - [9] NY Huang, G Cheng, XS Li, et al. Influence of drug-light-interval on photodynamic therapy of port wine stains—Simulation and validation of mathematic models[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2008, 5(2): 120-126
 - [10] 赵士勇, 俞 信, 邱海霞, 等. 光学相干层析术用于鲜红斑痣诊断[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(12): 3347-3350
- (收稿日期: 2011-05-04)