

630nm和514.5nm两种波长激光束 对人体胃、肺癌细胞株的 HpD光敏化光剂量的研究

王凯华 杨 栋 陈瑞川 黄明辉

(厦门大学抗癌研究中心)

摘要: 本工作使用630nm和514.5nm两种波长激光束对不同分化程度的人胃、肺癌细胞株进行HpD光敏化光剂量的比较研究。实验数据显示, 514.5nm波长光对体外培养单层癌细胞的光杀伤力是630nm光的2—3倍。分析结果还表明, 分化程度越低的癌细胞受光敏化的效率越高。

为进一步探讨绿光在光动力学疗法(PDT)中的可行性,采用六种不同分化程度的体外培养人胃癌(MG_{C803}、G_{C801}、G_{C7911})和肺癌(PLA₈₀₁、LTEP_{a-1}、LTEP)细胞株为模型,比较了630nm和514.5nm两种波长光所诱发的HpD光敏化效应,现报导如下。

材 料 和 方 法

一、细胞株和培养方法

1. 癌细胞和实验分组

人胃癌细胞:采用王凯华建立的低分化粘液腺癌细胞株MG_{C803},中等分化腺癌细胞株G_{C801}和分化腺癌细胞株G_{C7911};

人肺癌细胞:低分化肺巨细胞癌细胞株PLA₈₀₁、腺癌细胞株LTEP_{a-1}和鳞癌细胞株LTEP₇₈。

各种癌细胞分别接种于96孔培养板中,各设12个对照孔和72个实验孔。对照孔分空白组,用以观察细胞自然死亡率;HpD组(30μg/mlHpD),用以观察HpD的毒性反应;

630nm红光组和514.5nm绿光组,两组功率密度均为200mW/cm²,能量密度前者22J/cm²,后者12J/cm²,用以观察红、绿光对各种癌细胞的杀伤效应。实验孔的细胞分别用红、绿光照射,两种光的功率密度均为200mW/cm²,但能量密度光照剂量不同。红光组分1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22J/cm²12个光剂量组;绿光组分别为0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12J/cm²。每株细胞的各对照孔和实验孔均设三孔,共84孔。

2. 培养方法

用含20%小牛血清的RPMI1640营养液培养癌细胞。将各种细胞分别配制成含30万细胞/毫升的细胞悬液。每孔加入0.1ml细胞悬液,含3万个细胞,然后将培养板放入37℃、5%CO₂培养箱中培养24小时,待细胞铺成单层,弃上清,在各实验孔和HpD对照孔中加入含30μg/mlHpD营养液0.1ml,其他对照孔加入0.1ml营养液。再放入37℃、5%CO₂中温育2小时。温育毕,用Hanks液冲洗各孔三次,然后按设计的光剂量分孔照射。照射后各孔加入营养液0.1ml,置37℃,

1987年10月9日收稿

5%CO₂中4小时。温育后吸出各孔上清于另一空板的相应孔中,在原孔中加入0.1ml 0.02%EDTA消化液10分钟,冲匀各孔细胞悬液并加入吸出的相应孔的上清。每孔加入50μl 1%台盼兰,计算各孔死亡细胞的百分率。

二、血卟啉衍生物(HpD)

用本中心制备的HpD,浓度为5mg/ml,批号为840914,钠盐, pH>7.2,使用前用营养液配制为最终浓度30μg/ml的HpD溶液。

三、光源及照射方法

本工作用Spectra-Physics171-09型氩离子激光器和375B型可调谐染料激光器作为照射光源。当氩激光器以光控制输出方式单线运行时,可输出连续的514.5nm单色光,其功率漂移在数十小时内小于0.5%。氩激光器全线运行泵浦375B染料激光器(以Kiton Red620为工作物质),输出连续630nm光,染料激光器功率漂移在十小时内亦小于0.5%。绿或红光均由耦合器耦合进终端带有特制微透镜的400μ石英光导纤维,通过该镜垂直投射在小孔的平底上。激光照射斑的光强分布很均匀。将带微透镜的光纤末端垂直向下固定,细胞培养板在工作台上作水平移动,使每一照射孔及孔内任一照射区都有相同的光功率密度,从而使光剂量的测定具高的可靠性。

结 果

一、MGc803细胞组

84孔中的每孔计400细胞数。每3孔取其均值,标准差小于1(SD<±1)。死亡细胞被台盼兰染色,按百分数计算死亡率,各种细胞株均按此方法计算死亡细胞的百分数。

1. 对照孔

空白孔死亡率0.5%; HpD孔死亡率

0.42%; 红光孔死亡率0.5%; 绿光孔死亡率0.42%。

2. 实验孔

此细胞对HpD光敏化最敏感。当红光达10J/cm²时,80%以上的细胞死亡;达16J/cm²时,细胞全部死亡。绿光达2J/cm²时,80%以上的细胞死亡;达5J/cm²时,细胞全部死亡。在HpD浓度和光功率密度相同的条件下,绿光导致细胞全部死亡的光剂量低于红光的1/3。见表和图1。

二、Gc₈₀₁细胞组

1. 对照孔

空白孔死亡率0.59%; HpD孔死亡率0.5%; 红光孔死亡率0.59%; 绿光孔死亡率0.67%。

2. 实验孔

此细胞在PDT中的敏感度属中等。当红光剂量达12J/cm²时,50%以上的细胞死亡;22J/cm²时,死亡率达95%。细胞对绿光的反应也较红光敏感,当绿光剂量为10J/cm²时,95%细胞死亡。在相同HpD浓度和光功率密度条件下,绿光使细胞全部死亡的光剂量不到红光的1/2。见表和图1。

三、Gc79a11细胞组

1. 对照孔

空白孔死亡率0.42%; HpD孔死亡率0.5%; 红光孔死亡率0.5%; 绿光孔死亡率0.58%。

2. 实验孔

此细胞受到较低光剂量照射时,产生中毒反应不明显,但当光剂量达到一定强度时,其敏感度比Gc₈₀₁强。红光12J/cm²时,36%细胞死亡,达18J/cm²时,死亡率89%。在相同HpD浓度和光功率密度下,绿光的杀伤力比红光强1倍多。见表和图1。

四、PLA₈₀₁细胞组

1. 对照孔

空白孔死亡率0.63%; HpD孔死亡率0.75%; 红光孔死亡率0.83%; 绿光孔死亡率

0.8%。

2. 实验孔

此细胞对绿光敏感性高。当绿光剂量达 $6\text{J}/\text{cm}^2$ 时, 细胞全部死亡, 其杀伤力比红光强 2 倍多, 见图 2。

五、LTEPa-1 细胞组

1. 对照孔

空白孔死亡率 1%; HpD 孔死亡率 0.83%; 红光组死亡率 1%; 绿光组死亡率 0.83%。

2. 实验孔的结果与 PLA801 相近。见表和图 2。

六、LTEP78 细胞组

1. 对照孔

空白孔死亡率 0.83%; HpD 孔 1%; 红光孔 0.83%; 绿光孔 1.2%。

2. 实验孔的结果与 PLA801 相近。见表和图 2。

讨 论

血卟啉衍生物(HpD)作为一种光敏化药剂在肿瘤诊断和治疗上已有许多学者进行了研究^[1-4]。但尚未见到用不同分化程度的多种癌细胞为材料, 研究绿、红光对细胞

HpD光敏化光剂量。本文目的是探索便于临床应用又能获较好杀伤效果的 PDT 光源, 以及适用于不同癌细胞的辐照剂量。

实验结果表明, 在相同的HpD浓度和光功率密度条件下, 绿光使细胞全部死亡的光剂量为红光的1/3—1/2。这显然与HpD对绿光的吸收强于红光有关。绿光在活体组织中的透过率虽次于红光, 但由于其光敏杀伤力较红光强, 所以在一定深度范围内可望获得比红光明显的PDT疗效。当然, 要想对绿光在PDT治疗中的有效性及适用范围作出比较全面的估价, 还必须在各种不同的活体肿瘤模型上和临床试验上做大量工作。我们观察到不同组织来源的癌细胞对光敏化反应不同。低分化的MGc803细胞对光敏化最敏感。只要 $5\text{J}/\text{cm}^2$ 的绿光剂量或 $16\text{J}/\text{cm}^2$ 的红光剂量就可全部被杀死。肺癌中的PLA801分化亦较低, 对绿光的杀伤亦较敏感, 只要 $6\text{J}/\text{cm}^2$ 就导致全部死亡。而分化较高的 Gc7911 细胞, 即使用到 $12\text{J}/\text{cm}^2$ 的绿光或 $22\text{J}/\text{cm}^2$ 的红光剂量还未全部致死。这提示我们在治疗过程中应根据不同的肿瘤及其分化程度来制定光剂量方案, 以达到既能彻底杀死癌细胞又尽量少损伤正常组织的目的。

表 6种人癌细胞株的HpD光敏化光剂量的比较

波 长 细 胞 株	630nm											514.5nm												
	光剂量(J/cm²)											细胞死亡率(%)												
	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
MGc803	3	6.5	22	27	40	81	93	99	100	100	100	100	4	35	83	96	98	100	100	100	100	100	100	100
Gc801	3	6	12	17	28	38	54	57	64	70	85	95	3	18	40	48	64	70	78	87	89	91	95	98
Gc7911	0.2	0.2	4	8	10	26	36	54	62	87	89	92	1	10	38	76	80	85	88	89	90	92	95	98
PLA801	2	4	11	27	33	40	45	50	86	88	93	100	3	21	60	90	94	98	100	100	100	100	100	100
LTEPa-1	2	4	14	32	40	40	50	80	82	84	88	96	4	18	45	85	89	91	95	100	100	100	100	100
LTEP78	2	5	14	30	38	40	51	60	84	88	92	100	3	10	43	66	86	90	95	100	100	100	100	100

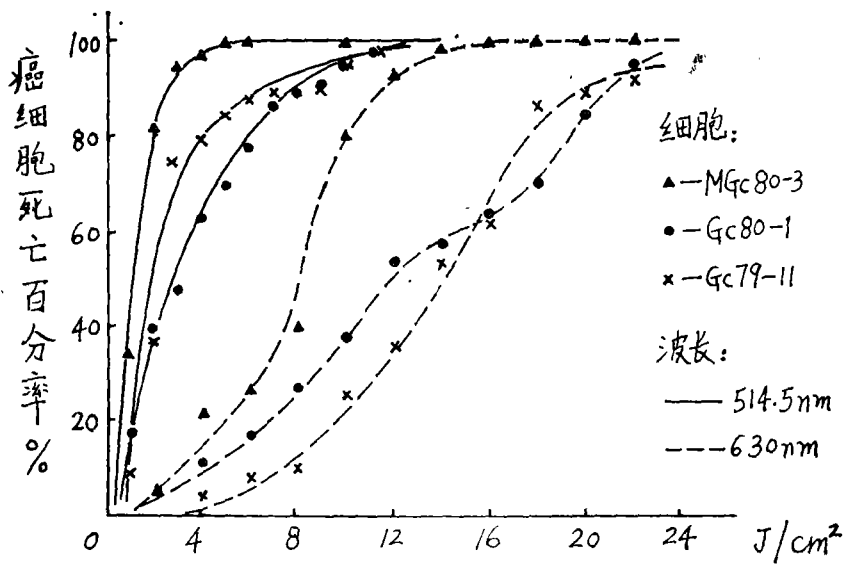


图1 三株不同分化程度的人胃腺癌细胞株对514.5nm和630nm两种不同波长激光束的HPD光敏效应比较

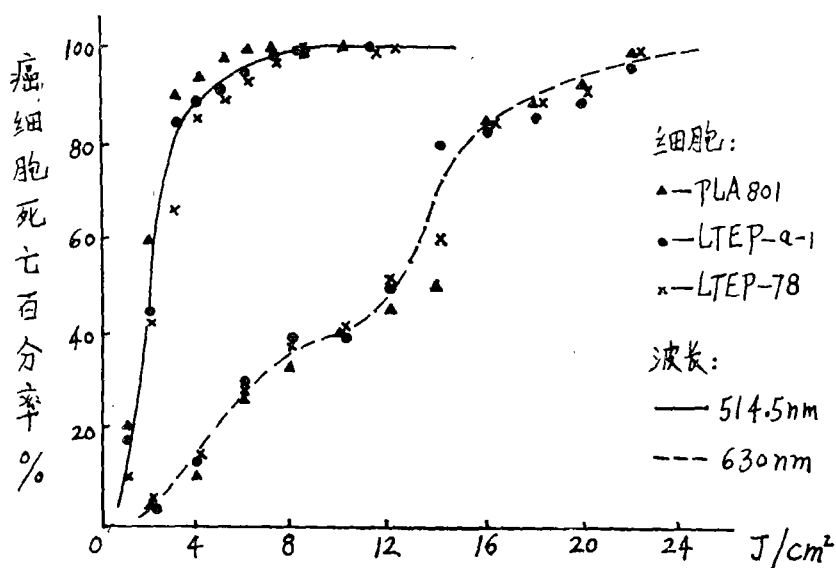


图2 三种人肺癌细胞株对两种不同波长激光束的HPD光敏效应比较