

# 巴氏碳球 C<sub>60</sub> 对体外培养 HeLa 细胞的光敏杀伤效应\*

黄文栋 钱凯先 李文铸\*\*

(浙江大学生物科学与技术系 \*\*物理系 杭州 310027)

巴氏碳球 C<sub>60</sub> (Buckyball) 是新发现的元素碳的第三种形式<sup>[1]</sup> (另两种形式是石墨和金刚石)。C<sub>60</sub> 具有很完美的结构对称性, 它是由 60 个碳原子通过单、双键组成 20 个六边形和 12 个五边形的球状结构, 具有很多奇特的性质, 因而引起了国内外学者的普遍关注和兴趣。Arbogast 等人<sup>[2]</sup> 在测定 C<sub>60</sub> 的光物理性质时意外发现它经光激发后可以产生很高的单线态氧 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 产率。由于 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 是生物系统中常见的一种很活泼的活性氧分子, 因而 C<sub>60</sub> 光激发后可能对生物组织、细胞等产生很强的氧化损伤作用。国外近年来已有文章谈及 C<sub>60</sub> 对生物细胞、DNA 和酶等的光敏效应<sup>[3,4]</sup>, 但尚无有关研究的详细报道。本文采用体外培养 HeLa 细胞作材料, 经 MTT 比色分析, 观察了不同光照强度下不同浓度的 C<sub>60</sub> 的细胞光敏杀伤作用, 从而为进一步认识 C<sub>60</sub> 对生物系统的影响以及如何将 C<sub>60</sub> 的光敏特性应用到生物学有关研究领域打下基础。

## 材料与方 法

### 1、C<sub>60</sub> 的制备和纯化

C<sub>60</sub> 的制备采用电弧法<sup>[5]</sup>, 在真空度 10<sup>-6</sup>Torr, 电压 10—20 V, 电流 100—200 A 的条件下通氮气使石墨电极放电, 可得到 C<sub>60</sub> 以及其他高分子巴氏碳球混合物, 经柱色谱分离, 以活性炭和硅胶混合作固定相, 甲苯为流动相, 收集绛紫色一条色带, 旋转蒸发干后即可获得纯度 >99% 的 C<sub>60</sub> 粉末。

### 2、C<sub>60</sub> 溶液的配制

由于 C<sub>60</sub> 不易溶于水, 故先用少量吡啶溶解 C<sub>60</sub>, 然后加入水配成 90 μg/ml C<sub>60</sub> 浓度的溶液。取少量此溶液测其 UV-VIS 光谱。实际用时采用 RPMI 1640 培养液(无酚红)取代水, 用 φ 0.22 μm 的硝酸纤维素薄膜过滤灭菌。

### 3、HeLa 细胞的培养

用 RPMI 1640 培养液(含 10% 胎牛血清, 100 单位/ml 青霉素-链霉素双抗液, 5 × 10<sup>-6</sup>mol/L 2-巯基乙醇和 2 mmol/L L-谷氨酰胺), 在 5% CO<sub>2</sub>, 37℃, 相对湿度 95% 的条件下培养至贴壁, 然后用 0.25% 胰蛋白酶消化后配成每瓶 5 × 10<sup>6</sup>/ml 细胞浓度。

### 4、C<sub>60</sub> 光激发条件

将灭菌的含不同浓度的 C<sub>60</sub> RPMI 1640 作用液分别加到 50 ml 容量的细胞培养瓶中, 每瓶 2 ml。在培养箱中放置半小时后, 倾去作用液, 换入 2 ml 不含 C<sub>60</sub> 的新鲜培养液, 分别以不同光强度的光照进行处理。光源采用 500 W 卤素灯, 经隔热玻璃距培养瓶 50 cm 高处垂直照射 10 分钟, 保持细胞液温度不超过 37℃。整个实验过程在超净台上操作, 严格控制无菌条件。

### 5、MTT 检测<sup>[6]</sup>

将处理好的 HeLa 细胞转移到 96 孔板上(100 μl/孔), 每个样品作 8 个复份, 同时设置阴性对照(不含 C<sub>60</sub> 的细胞培养液)和空白对照(不含细胞的 C<sub>60</sub>-RPMI 1640 培养基), 经培养箱培养 24 小时使细胞贴壁后, 每孔吸去 20 μl 培养液, 加入 20 μl MTT(5 mg/ml, 用 PBS, pH 7.2 配制)继续培养 4 小时, 倾弃培养液, 加入终止液二甲亚砜(100 μl/孔), 充分振荡 5 分钟, 在倒置显微镜下观察, 待针状紫色结晶溶解后, 用酶联免疫检测仪测定每孔的光密度(O.D.<sub>570nm</sub>)。

### 6、扫描电镜观察

将 C<sub>60</sub> 浓度为 30 μg/ml, 经不同光强处理后的 HeLa 细胞用胰酶消化, 离心(800 转/分)弃上清液, 然后经固定, 脱水后用 Hitachi HCP-2 临界点干燥仪干燥, EiKo IB-5 离子溅射仪镀膜, 在 Hitachi S-570 扫描电镜下观察。

## 结 果

### 1、C<sub>60</sub> 溶液的 UV-VIS 光谱

\* 浙江省自然科学基金资助项目。

$C_{60}$  的吡啶溶液呈浅紫色,加水后颜色变为黄棕色。测其 UV-VIS 光谱发现在 271 nm, 339 nm 有两个强吸收峰,在 450 nm 有一较弱的吸收峰,并且一直拖延到 600 nm 开外(图 1)。与  $C_{60}$  的吡啶溶液相比,水的加入改变了  $C_{60}$  的溶解格式,使  $C_{60}$  光吸收产生溶剂效应,向长波长方向偏移,这一结果说明  $C_{60}$  溶液有一较宽波长范围的光吸收。

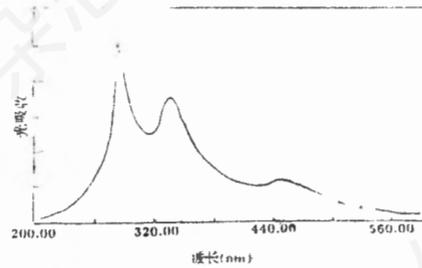


图 1  $C_{60}$  溶液的 UV-VIS 光谱

## 2、不同 $C_{60}$ 浓度对 HeLa 细胞的光敏杀伤效应

由表 1 可以很清楚地看到,当  $C_{60}$  浓度为 20  $\mu\text{g/ml}$  时即产生明显的光敏杀伤作用,HeLa 细胞杀伤率接近 100%,与阴性对照有显著差

异。另外我们做了  $C_{60}$  浓度分别为 20  $\mu\text{g/ml}$ , 40  $\mu\text{g/ml}$ , 60  $\mu\text{g/ml}$  时不光照的对照实验,它们最后的  $O.D._{570\text{nm}}$  值分别为  $1.10 \pm 0.04$ ,  $1.06 \pm 0.05$ ,  $1.05 \pm 0.04$ ,与阴性对照没有显著差异,说明 HeLa 细胞的死亡是  $C_{60}$  光激发

表 1 不同  $C_{60}$  浓度光激发对 HeLa 细胞的光敏杀伤效应 ( $O.D._{570\text{nm}}$ )

孔号	$C_{60}$ 浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	0	10	20	30	40	50
1.2	1.08	0.89	0.17	0.20	0.18	0.16
3.4	1.11	0.92	0.17	0.22	0.18	0.16
3.5	1.12	0.84	0.20	0.25	0.24	0.14
7.8	1.02	0.99	0.24	0.22	0.16	0.11
平均值±标准差	$1.08 \pm 0.05$	$0.91 \pm 0.06$	$0.20 \pm 0.03^*$	$0.22 \pm 0.02^*$	$0.19 \pm 0.03^*$	$0.14 \pm 0.02^*$

注: 每种  $C_{60}$  浓度 8 个孔作随机选择,表内数据为同一  $C_{60}$  浓度的两个孔的平均值

阴性对照孔的平均  $O.D._{570\text{nm}}$  为  $1.24 \pm 0.04$

空白对照孔的平均  $O.D._{570\text{nm}}$  为  $0.19 \pm 0.03$

\*与阴性对照组比较,  $P < 0.01$

表 2  $C_{60}$  不同光照强度对 HeLa 细胞的光敏杀伤效应

光照强度 ( $\times 100$ Lux)	$O.D._{570\text{nm}}^*$	细胞浓度 ( $\times 10^4$ 细胞/ml)	细胞存活率 (%)
0	$1.16 \pm 0.05$	$44.1 \pm 0.8$	94.2
10	$0.93 \pm 0.03$	$38.9 \pm 1.3$	83.1
20	$0.20 \pm 0.03^{**}$	$2.0 \pm 1.0^{**}$	$4.3^{**}$
40	$0.19 \pm 0.04^{**}$	$0^{**}$	$0^{**}$
70	$0.18 \pm 0.06^{**}$	$0^{**}$	$0^{**}$

注: \* 表内为 8 个孔数据的平均  $O.D.$  值±标准差

阴性对照组的  $O.D._{570\text{nm}}$  为  $1.19 \pm 0.06$ , 细胞浓度为  $46.8 \pm 1.5 \times 10^4$  cells/ml

细胞浓度采用 0.05% 的台盼蓝染色,用血球计数板计数,每种样品 6 个复份

细胞存活率计算公式:  $\frac{\text{样品细胞平均浓度}}{\text{阴性对照细胞平均浓度}} \times 100\%$

\*\* 与阴性对照组比较,  $P < 0.01$

后所产生的效果,  $C_{60}$  溶液本身对 HeLa 细胞并不构成威胁。

### 3、不同光照强度的 $C_{60}$ 光敏杀伤效应

选用  $C_{60}$  浓度为 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 用调压器作不同光强的选择, SZ-301 照度计测量光强, 光照时间均为 10 分钟。由表 2 可以看到, 当光强达到 4000 Lux 时, HeLa 细胞已接近 100% 死亡。显微观察发现, 1000 Lux 光强处理后的细胞开始圆缩, 脱壁(图版图 2), 4000 Lux 光强处理后的细胞内出现大量颗粒, 大部分细胞死亡(图版图 3)。扫描电镜观察表明, 经  $C_{60}$  光激发处理过的细胞, 失去膜表面微绒毛状和小泡状结构, 变得光滑不规则, 甚至破损(图版图 5, 6)。

## 讨 论

$C_{60}$  经光激发后从基态跃迁到活泼的三重态, 但很快被周围的氧分子猝灭, 从而产生具有很强生物损伤作用的单线态氧  $^1O_2$ 。  $^1O_2$  是生物系统中常见的一种破坏力很强的活性氧分子。它一方面可以起保护作用, 杀伤细菌, 病毒等; 另一方面又能引起生物体健康组织的损害<sup>[7]</sup>。由于  $C_{60}$  正被逐步地应用到人们正常生活中来, 所以研究  $C_{60}$  光激发后对生物细胞等的影响就显得很有必要。另外,  $C_{60}$  作为一种新型光敏分子, 对许多有关的生物学研究如光生物学和癌的光敏治疗等也有很大的研究价值。

由于  $C_{60}$  不易溶于水, 所以实验中我们使用了既对  $C_{60}$  有较高溶解度又能与水任意混溶的吡啶以帮助  $C_{60}$  溶于水中。光谱分析表明,  $C_{60}$  在吡啶-水体系中光吸收往长波长方向偏移, 有一较宽波长范围的光吸收, 这样有利于  $C_{60}$  在可见光谱长范围的光源激发下产生  $^1O_2$ 。为了排除吡啶对细胞生长的影响, 我们分别做了  $C_{60}$ -吡啶-RPMI 溶液不光照以及吡啶-RPMI 溶液光照处理对 HeLa 细胞生长影响的实验。结果表明在实验所用吡啶浓度为 6% (体积比) 的条件下, HeLa 细胞的生长没有受

到明显影响。因此, HeLa 细胞的光敏杀伤效应是由于  $C_{60}$  受光激发产生  $^1O_2$ , 进而氧化破坏细胞质膜甚至细胞内的各种生物膜结构如线粒体、内质网等, 从而使细胞产生不可逆的死亡。当  $C_{60}$  浓度为 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 光强 4000 Lux 时, 可以基本上把 HeLa 细胞全部杀伤。

在实验中, 我们发现  $C_{60}$  的浓度和光照强度是  $C_{60}$  光敏杀伤细胞的两个主要限制因素。Wenzhu, L.<sup>[8]</sup> 以及 Tsuchiya, T.<sup>[9]</sup> 等人发现  $C_{60}$  在一定条件下有刺激细胞分裂或分化的作用, 这主要可能是  $C_{60}$  浓度或光照强度尚未达到激活  $C_{60}$  分子产生大量  $^1O_2$  的程度。Kuochu, H.<sup>[10]</sup> 等人发现  $C_{60}$  在人工双层脂膜中有很强的促电子传递的作用, 这也许是  $C_{60}$  在一定条件下反而起到促进细胞生长作用的一个原因。另外, 我们发现  $C_{60}$  的光敏损伤作用与细胞的状态和时相也有一定的关系, 正在分裂的细胞受伤较明显。由于处于正在分裂的细胞内部代谢旺盛, 细胞表面活动也非常活跃, 对  $C_{60}$  分子的吸收以及对  $^1O_2$  的敏感性都较高, 从而给  $C_{60}$  的光敏作用提供了更大的机会。同时, 从图版中还可以看出, 处于相同时期的细胞受伤程度相当一致。

总之, 实验结果表明  $C_{60}$  在一定浓度和适当光照强度下对体外培养的 HeLa 细胞有很强光敏杀伤作用。如何避开  $C_{60}$  有害的一面, 进一步修饰、改造  $C_{60}$  分子, 使其发展为一种有益的生物光敏分子, 是值得进一步深入研究的。

## 摘 要

采用 MTT 比色分析法, 观察了不同  $C_{60}$  浓度和不同光照强度下  $C_{60}$  对体外培养的 HeLa 细胞的光敏杀伤效应。结果表明,  $C_{60}$  在 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 光强 4000 Lux 的条件下即可杀伤大部分细胞。受伤细胞圆缩、脱壁, 里面颗粒增多, 失去表面微绒毛状结构。当光强增大时, 细胞表面甚至出现破损。

关键词:  $C_{60}$  光激发 HeLa 细胞  
光敏杀伤效应

## 参 考 文 献

- [1] Kroto, W. et al., 1985, *Nature*, 318: 162—163.
- [2] Arbogast, J. W. et al., 1991, *J. Phys. Chem.*, 95: 11—12.
- [3] Tokuyama, H. et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 7918—1919.
- [4] Sijbesma, R. et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 6510—6512.
- [5] Kratschmer, K. et al., 1990, *Nature*, 347: 354—358.
- [6] Mosmann, T., 1983, *J. Immuno. Methods*, 65: 55—63.
- [7] Harman, D. et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7124—7130.
- [8] Wenzhu, L. et al., 1994, *Chin. Phys. Lett.*, 11: 207—210.
- [9] Tsuchiya, T. et al., 1995, *Biochem. Biophys. Research Communications*, 206: 885—894.
- [10] Kuochu, H. & David, M., 1993, *Nature*, 361: 138—140.

## THE PHOTODAMAGE EFFECT OF BUCKYBALL C<sub>60</sub> ON THE HELA CELLS CULTURED IN VITRO

Huang Wendong Qian Kaixian Li Wenzhu\*

(Department of Biological science & Technology, \*Department of Physics, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

### ABSTRACT

The method of MTT colorimetric assay was used to detect the photodamage effect of C<sub>60</sub> on the HeLa cells cultured in vitro under different concentrations and photo-intensity. The result showed that when the concentration of C<sub>60</sub> was 30 μg/ml and the photo-intensity reached 4000 Lux, C<sub>60</sub> could damage most of the cells. The damaged cells detached from the wall of bottles and their shape became round and contractive. The dark particles were increased in the cells and the microvilli were decreased. The surface of the cells was even damaged when the photo-intensity was increased.

Key words: C<sub>60</sub> Rrradiation HeLa cells Photodamage effect

## 骨髓高增殖潜能集落形成细胞(HPP-CFC) 分化产生巨核细胞的研究

张学军 蒋丽珍 王新明 韩忠朝

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

巨核细胞形成是一个分多阶段的细胞分化成熟过程。通过这些过程,原始干细胞分化并产生巨核细胞祖细胞,继而形成巨核细胞和血小板。近年来对于已定向的巨核细胞祖细胞的增殖和成熟有广泛的研究。许多检测祖细胞的新

方法的应用和多种基因重组造血生长因子的使用,刺激和推动了该研究的进展<sup>[1-3,18]</sup>。但是,对于原始干细胞如何分化成巨核细胞祖细胞的过程仍不很清楚。小鼠造血干细胞的分化阶段是不同的,各个阶段的亚群可根据 5-FU 处理