

HpD 加激光显微照射 HeLa 单细胞的超微结构研究*

邓燕华 欧笑兰 梁宏 陆仲康 徐正平

(中国科学院遗传研究所)

血卟啉衍生物(HpD)结合激光照射处理恶性肿瘤,是近几年发展起来的一种诊治癌症的新疗法即光动力疗法(PDT),从1978年美国Dougherty等人提出用光激活HpD治疗肿瘤后,许多学者对血卟啉光动力学杀伤肿瘤的机制进行了大量深入细致的研究^[1-4]。但是,对于HpD——激光光敏效应的杀伤机理,虽有种种研究,但尚不完全清楚。国内外关于HpD加激光对癌细胞作用的超微结构研究陆续有所报道^[5-8],但是尚未见到有关在单细胞水平上研究HpD与激光照射的超微结构的研究。本实验室曾用激光微束照射体外培养单细胞的方法,在光镜下揭示了经辐照激活细胞内摄入的HpD光敏物质所诱发的细胞损伤的变化及其进程^[9]。并在此基础上用扫描电镜术对单细胞摄入国内外几种HpD光敏剂后的细胞表面结构的变化及受激光微束照射后的损伤进行了观察和研究(待发表)。为更深入地从超微结构方面研究细胞内的早期病变,我们参考苏俐辉等人的单细胞连续切片的电镜技术^[9],结合HpD加激光微束照射单细胞的技术,对体外培养的HeLa单细胞摄入HpD光敏剂后再受激光辐照的损伤进行了透射电镜观察。用单细胞电镜切片术进行了本研究,其目的是用激光微束照射单细胞的方法把在光镜下观察过的特定的单细胞经透射电镜重新找出来进行对比分析。因此,实验必须在单层培养细胞上原位固定、包埋、制作电镜观察的标本,此种方法可以更好地保持细胞原来的生活状态,使被研究的细胞的细微结构精确地保存下来,能在亚细胞水平上揭示摄入HpD光敏剂的单细胞受激光损伤后的形态结构以及细胞器的细微结构的变化。这些基本问题的揭示,对于了解诊治

机理是十分重要的。本文将报道用此技术对HpD加激光显微照射HeLa单细胞的超微结构的观察结果。

材料与 方法

HpD和细胞培养

HpD光敏剂为扬州生化制药厂提供的扬州光卟啉(Y-HpD),批号861112。药物使用浓度为25 μ g/ml培养液,现配现用。细胞选用已建株的人宫颈癌HeLa细胞。细胞生长在含有15%小牛血清的Eagle培养液的培养瓶里,当细胞长满单层时,用0.125%的胰酶消化制成细胞悬浮液注入一批Rose小室。待细胞贴壁生长1—2天后,将Rose小室分成如下三个实验组。1.对照组:未经任何处理的培养细胞;2.给药组:用含Y-HpD药物的培养液处理4—6小时后,再撤除该培养液,换入不含HpD的培养液;3.HpD加激光组:经Y-HpD药物处理4—6小时的培养细胞,次日进行激光微束照射实验。

激光微束照射

激光照射使用氩氛激光显微仪,输出功率1.5 mW,发射波长632.8 nm,激光束通过干涉滤光片直接引入到一台Amplival相差显微镜,经10倍目镜,16倍物镜聚焦成直径约3微米的光斑,靶体细胞的物象通过显微镜观察,采用变换照射时间控制光剂量。将Rose小室置于显微镜载物台上,先用激光微束仪上的照相设备对欲照射的靶细胞进行观察。然后用金刚钻物镜标记器在盖玻片外表面围绕细胞画一小圈(直径约0.5 mm左右)以标记细胞的位置。再用石蜡铅笔在第一个圈外画第二个较大的圈(直径约2—3 mm)。细胞经标记与照相后,瞄准靶体细胞某一部

* 本工作曾得到美国加州大学欧文分校 Beckman Laser Institute and Medical Clinic 苏俐辉研究员的技术指导和 中国医学科学院基础医学研究所李昆、司静懿教授的建议与帮助,以及中国科学院生物物理所电镜室、发育所电镜室及我所电镜室的大力支持,在此一并致谢。

位,主要在核仁或胞质部位,发射激光定位照射。

固定与照相

供试 Rose 小室内的细胞经 HpD 或/和激光微束照射后立即用注射器撤除小室中的培养液,将含有 3%的戊二醛固定液注入小室,经固定后的 Rose 小室放在 OLYMPUS 倒置显微镜下,根据两个同心圆重新找到被照射的靶细胞,较大的蜡笔圈可以迅速定位出总的细胞区域,而较小的金刚钻石标记器画的圈可以更精确定位出靶细胞。然后在低倍镜下对靶细胞进行照相,以便对该细胞和周围邻近细胞有一精确的记录。

包埋与定位

将固定后的 Rose 小室拆开,经 1% 饿酸后固定,醋酸铀染色,梯度乙醇脱水,递增 Epon 812——酒精溶液浸透,最后用纯 Epon 812 混合液覆盖整个盖玻片(厚 2—3 mm),60℃ 聚合 3 天成细胞层聚合块。

将细胞层聚合块放在 16 倍物镜下进行定位。因为蜡笔圈还在盖玻片的背面(非 Epon 面),所以很容易定位出总体细胞区域。根据较小的金刚钻石圈和固定后在低倍镜下所照的照片,就可以定位出预选择的细胞。一旦定位出靶细胞,可用一支锐利的金刚钻石笔直接在 Epon 面上围绕此细胞用手划出第二个圈,这样就可将细胞的位置标记在 Epon 块上。

细胞层聚合块与玻片的分离

刮掉玻片边缘环氧树脂聚合块后浸入液氮数秒,听到破裂声即取出。因为 Epon 和玻璃之间的热膨胀与收缩率的差异能使细胞层聚合块与玻片自然分离。将具有细胞的细胞层聚合块的那一面,在显微镜下再次定位出预选择的靶细胞。

修块与切片

用金刚钻石笔以含有预选择的靶细胞为中心画一个 5 mm 正方形,将它从细胞层聚合块上锯下,把细胞面朝外(与盖玻片直接相接的那个面)直接粘在空白的 Epon 块上,该样品经适当修整后安置在 LKB Nova 型切片机的标本架上,使块的表面与切片刀的边缘完全平行后再进行超薄切片。捞出有切片的铜网经染色后在 JEM-100c x 型电镜下观察。

结 果

对实验中的三个组(对照组、给药组、HpD 加激光组)所进行的透射电镜观察结果报道如下:

对照组 人的子宫颈癌 Hela 细胞外形不规则,细胞核较大,核膜规则,核仁数目不定,大小不等。核质中有大量常染色质,有时可以看到染色质间颗粒,并分布于常染色质之间。线粒体分散在细胞质内,呈圆形或杆状,内膜的不同部位向内折叠,形成嵴,线粒体内充满均一致密的基质,胞质内还可见到一些核糖体、溶酶体(图版 I 图 1)和微丝(图版 I 图 2)等。

给药组 其细胞形态结构特点与上述对照组细胞相似。

HpD 加激光组 我们以前的工作^[3,4,10]已经证明,当用激光微束照射摄入 HpD 的 Hela 单细胞时,能激活细胞内的光敏物质而杀伤细胞。细胞在光镜下出现可见损伤到解体死亡可分为初级可见损伤,明显可见损伤,严重可见损伤三个阶段。当光剂量为 1.88 毫焦/微米²时,Hela 细胞在光镜下见到初级可见损伤的时间为照射后 4—5 分钟,当光剂量加大到 4.50 毫焦/微米²时,则为照射后 2—3 分钟。与此同时,梁宏等^[3]也观察到在相同光剂量条件下,细胞质受照射的细胞出现初级可见损伤的时间似乎比细胞核受照射的细胞要略为提早一些。本研究使用光剂量为 1.88 毫焦/微米²,照射核仁后约 5 秒内立即进行固定。在透射电镜下观察到,核仁的超微结构发生了显著变化,出现了透亮区。接受光激活的靶细胞的核仁在光镜下开始出现透亮区,这些透亮区逐步扩大,以至最后整个核仁出现一个很大的透亮区。在电镜下肯定了上述光镜下的改变。当损伤的初级阶段,核仁的核仁丝(nucleolonema)结构开始不清,界限模糊,核仁的纤维中心(fibrillar center)增大且透明度增加(图版 I,图 3)。随着时间的延长,该透明区逐步扩大,核仁丝结构模糊不清且出现高度致密区域。核的病变不仅限于激光微束直接照射的核仁,核内的染色质也逐渐浓缩,后来形成致密的团块,最后整个核收缩,核膜出现褶皱、呈外形不规则状态。光动力损伤也使胞质成份发生了

严重改变,其中线粒体最早出现损伤,线粒体出现肿胀,脊减少,基质密度降低,并呈现不均一的灶性空化,但内质网变化不大(图版I图4)。

另一实验组用光剂量4.50毫焦/微米²对Hela细胞进行胞质照射,同样,在照射后约5秒钟内立即固定,受照射的部位出现明显的裂解,照射区域外的其他细胞器均遭到破坏。值得注意的是,我们发现非照射的一端也出现明显的裂解。在整个胞质中,只发现还残留着少数几个线粒体,这些线粒体除基质的灶性空化和嵴残缺不全外,看上去体积也略有肿胀。胞质内的其他成份也发生了很大变化,如内质网明显扩张,微丝消失,初级溶酶体增多,出现许多体积较大的次级溶酶体,内含不均一的密度较大的颗粒成份(图版II图5—6)。整个胞质的结构受到严重破坏,但核的结构变化较小。

讨 论

前人对HpD加光照射肿瘤细胞的研究表明,单纯HpD处理或单纯光照射无直接杀伤作用,用HpD处理的细胞,在氧存在的情况下经一定波长的光,照射后才产生破坏作用,即单态氧在光敏反应中起了决定性作用。有的学者认为生物膜是HpD光敏反应的主要靶体,生物膜是由脂质、蛋白质和少量多糖组成的具有多种功能的动态结构,它结合HpD后破坏了膜的正常结构与功能。另一些研究者从分子水平的研究结果表明主要的影响是核内DNA或线粒体。有的则认为HpD——激光光敏作用对癌细胞的杀伤效应是多方面的^[9]。我们的观察结果和司静懿^[7]与安钢^[8]等人全细胞照射结果相近,同样证实了只有把HpD和激光照射结合起来处理肿瘤细胞,才能起到杀伤作用。实验中单纯给药组,即以HpD处理细胞,未进行激光照射,结果没有引起细胞超微结构的变化,基本与对照细胞相似。只有经过Y-HpD加激光的实验组,受照射的细胞才

发生一系列的超微结构的破坏性变化。并且,我们采用的是单细胞定位照射的电镜技术,激光所照射的靶区是细胞的某一特定部位即细胞核仁或细胞质,不仅可直接在光镜下观察、选择、照相,而且还可密切配合光镜与电镜的观察。这进一步揭示了HpD光动力对细胞核和细胞质影响的差异。从我们的实验结果来看,直接照射核仁,造成核仁丝结构模糊,核仁纤维中心扩大,这说明核仁部位吸收一定量的HpD分子,在光敏反应中该区域的RNA和DNA等生物分子受到了破坏。同时,未照射的胞质内的线粒体也有很大的变化,这可能是在激光照射核仁时,散射到胞质中的少量激光使线粒体发生光敏化反应,说明线粒体是细胞中聚集较多HpD的部位。在直接照射胞质的实验中,我们发现经激光照射后,胞质发生了裂解及微丝消失等现象,而核的结构变化较小。我们照射的样品是体外培养的活细胞,胞质内的细胞器的流动性变化很大,所以,当激光微束照射后,线粒体在光敏反应中解体,内质网扩张以及由微丝等组成的网络结构的破坏,使得胞质内出现裂解,这说明细胞的光动力损伤的部位主要是胞质,尤其是胞质中的线粒体。梁宏等在光镜下的研究发现^[9],在相同光剂量照射下,经HpD处理的PTK₂和Hela细胞的细胞质出现损伤的时间比细胞核略早,这可提供生物膜的破坏,而线粒体最为敏感的启示,并与本文超微结构的观察是吻合的。

本研究对Y-HpD处理后受照射的单细胞的透射电镜观察结果表明:应用光敏剂加光杀伤体外培养肿瘤细胞,单态氧在光敏反应中起一定的作用。它不但可以破坏细胞核,而且还可以使细胞内多种细胞器结构遭到破坏,HpD加激光光敏作用对癌细胞的杀伤效应,是多种损伤的结果。同时也揭示了能在电镜下观察到在光镜下看不到的明显的超微结构的损伤。

摘 要

本文叙述了一种能用于HpD加激光微束

照射单细胞的电子显微镜技术。在光学显微镜下,预选择的单细胞受激光照射后,单层细胞经过固定、包埋、切片等一系列过程,仍然能在电镜下重新找到所选择的单细胞。Y-HpD加激光照射后的Hela单细胞电镜研究表明:光剂量为1.88毫焦/微米²照射核仁时,不仅受照射部位出现透亮区,而且未受照射的胞质内的线粒体等也发生异常病变。当光剂量增加到4.5毫焦/微米²照射胞质时,其损伤不仅在受照射部位明显可见,并且,另一部分未受照射的胞质也发生裂解,而细胞核无显著变化。研究结果表明,胞质与核相比,胞质更易受到损伤,而胞质内的线粒体对HpD加激光有较大的敏感性。

图版说明

图版 I

1. 正常培养的人宫颈癌Hela细胞。细胞的核(N)较大,核仁(Nu)数目不定,大小不等。核膜清晰,核质中常染色质多,异染色质少。胞质内有丝粒体(M)、溶酶体、核糖体等。×4600
2. 示Hela细胞的胞质内有丰富的微丝(MF)。×43000
3. 经Y-HpD加激光照射的Hela细胞的超显微变化。核仁的纤维中心增大,核仁丝结构模糊不清。胞质内的线粒体等其他细胞器也发生异常。左上图为细胞的光学照片,箭头所示位于被照射的核仁部位。×6000

4. 示细胞胞质内线粒体(M)的嵴遭致破坏,出现不均一的灶性空化等。×55000

图版 II

5. 经Y-HpD加激光照射细胞中的胞质,受照射部位(箭头所示)与未照射部位均发裂解,而核(N)没有显著变化。左上图为细胞的光学照片,箭头所示位于被照射的胞质部位。×3300
6. 显示出胞质内线粒体(M)的灶性空化与嵴残缺不全。SLY为次级溶酶体。PLY为初级溶酶体。×37000

参 考 文 献

- [1] Dougherty, T. J., 1978, *Cancer Res.*, 38, 2628-2636.
- [2] 哈献文等, 1983, 中华医学杂志, 63(6): 322-325.
- [3] 梁宏等, 1986, 中华肿瘤杂志, 8(1): 29-31.
- [4] 梁宏等, 1986, 科学通报, 13: 1019-1021.
- [5] A. Coppola, MD, E. Viggiani, MD, L. Salzarulo, PhD, and G. Rasiie, MD. 1980, *Am. J. Pathol.*, 99: 175-192.
- [6] 户志达等, 1983, 中华医学杂志, 63(6): 336-338.
- [7] 司静懿等, 1985, 中国医学科学院学报, 7(4): 244-246.
- [8] 安钢等, 1986, 实验生物学报, 19(2): 173-181.
- [9] Lih-Huei L. Liaw and Michael W. Berns., 1981, *Journal of Ultrastructure Research*, 75, 187-194.
- [10] 梁宏等, 1984, 应用激光, 4(5): 231-234.

小鼠乳腺癌细胞淘式离心后 G₁ 相部分的生物学特征及放射敏感性

程文英 周锦锋 徐 萍 罗伟华 丁志圣

(上海医科大学放射医学研究所)

从肿瘤生长动力学观点,实体肿瘤不是均一的群体,而是由以下三部分所组成,即快速增长进入细胞周期的部分、处细胞周期之外相对静止的部分和无增殖能力及濒临死亡的部分⁽¹⁾。在离体培养条件下,接种2—3天呈指

数型生长的细胞群P中有相当比例的增殖期细胞,以后5—10天进入坪区的细胞群Q中大部分为相对静止期细胞。P细胞和Q细胞的生

本工作在美国Utah大学医学中心L. A. Dethlefsen教授协助下进行,特此致谢。