论著

文章编号:1000-5404(2005)20-2054-03

低浓度的丝裂霉素对结肠癌光动力增效作用研究

廖新华[1],陈祖林[2],葛海燕[2],梁 平[2] (第三军医大学:[1]基础医学部物理学教研室,重庆 400038,[2]新桥医院普通外科,重庆 400037)

提 要:目的 用低浓度的丝裂霉素改变大肠癌细胞周期来达到增强其光动力学疗法,探讨增效作用中对癌细胞杀伤作用规律。**方法** 在结肠癌细胞培养的基础上,加入低浓度的丝裂霉素,光动力学疗法后采用荧光光度法和MTT法对癌细胞内光敏剂含量和细胞存活率进行检测,用SPLM软件统计包进行数据处理。**结果** 低浓度的丝裂霉素可使癌细胞内光敏剂显著增加,随时间延长细胞内光敏含量增加明星;细胞内光敏剂含量与激光照射后细胞存活率呈显著负相关,即细胞内光敏剂含量多,PDT后细胞存活率低;光动力学疗法后癌细胞存活率曲线明显左移,在4、8、16 h细胞存活率显著降低;癌细胞与光敏剂作用8~16 h激光照射可达到最佳的光动力杀伤效果。**结论** 我们设计单独低浓度的丝裂霉素对结肠癌细胞无杀伤作用,但可通过增加癌细胞内光敏剂含量来达到增效作用,8~16 h为最佳给药时间,杀伤作用有明显的规律性。

关键词:光动力学疗法;结肠肿瘤;丝裂霉素C

中图法分类号:R730.5;R735.35;R979.14 **文献标识码**:A

Synergistic effect of low-concentration of Mitomycin C on photodynamic therapy of colon carcinoma cell

LIAO Xin-hua[1], CHEN Zu-lin[2], GE Hai-yan[2], LIANG Ping[2] ([1]Department of Physics, College of Medicine, Chongqing 400038, [2]Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To study the synergistic effects of Mitomycin C in photodynamic therapy for colonic carcinoma. **Methods** The colon carcinoma cell line SW800 was assigned to be treated with 0.02 μg/ml Mitomycin C, or 2 μg/ml PSD-007 (photosensitizer), or Mitomycin C and PSD-007 (PSD + MC group). The cells without any special treatment served as control. Fluorescence spectrophotometer and MTT assay were used to detect the content of intracellular photosensitizer and survival rate of SW700 cells under photodynamic therapy. The obtained data was analyzed with SPLM statistical software. **Results** After PSD was added for 4, 8, 16 and 24 h, intracellular PSD level of PSD + MC group increased significantly as compared with that of PSD group. The intracellular PSD contents of PSD group, PSD + MC group had a strong and negative correlation with cell survival rate respectively after photodynamic therapy, but the cell survival rate curve shifted to the left obviously. The best killing effects on SW700 cells of photodynamic therapy could be obtained when the SW700 cells had been exposed to photosensitizer for 8 – 16 h. **Conclusion** There is insignificant influence of lowconcentration of Mitomycin C alone on cell survival rate. The better synergistic effect of Mitomycin C on killing the colon carcimoma cells can be achieved by enhancing the intracellular content of photosensitizer for 6-8 h before photodynamic therapy.

Key words: photodynamic therapy; colonic neoplasm; Mitomycin C

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)已经成为一种治疗胃肠肿瘤有效的方法之一。但其作用还不够强,为增强其效果,我们用低浓度的丝裂霉素C(Mitomycin C, MC)与光动力疗法结合应用。我们的研究表明,低浓度的丝裂霉素在大肠癌细胞光动力学中增效作用并不是丝裂霉素C的协同杀癌作用,主要是超低浓度的丝裂霉素C改变了癌细胞周期和增加了细

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271481)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30271481)

作者简介:廖新华(1965-),男,四川省安岳县人,讲师,主要从事医学物理学教学和物理因素的生物效应方面的研究。电话:(023)68752213

通讯作者:陈祖林,电话:(023)68774405,E-mail:Chenzulin@163.com

收稿日期:2005-06-21;**修回日期**:2005-09-09

胞内光敏剂含量，但其增效作用机制不清楚，本研究着重探讨丝裂霉素 C 的增效杀伤作用规律，现报告如下。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞株　　人结肠腺癌 SW480 细胞株由第四军医大学实验动物中心细胞库引进。

1.1.2　主要试剂

1.1.2.1　光敏剂　　PSD-007（简称 PSD）购自第二军医大学药物所，避光 -20 ℃保存。

1.1.2.2　细胞培养有关试剂　　RPMI1640（美国 Gibco 公司），Hepes（德国），L-Glutamine（第二军医大学），胰蛋白酶（Sigma）小牛血清（美国 Gibco 公司），MC（日本协和发酵工业株式会社）。

1.1.2.3　噻唑蓝（MTT，Sigma），MTT 5 mg 溶于 0.01 mol/L PBS 10 ml，配成 0.5 mg/ml 浓度。

1.1.3　主要设备　　RF-540 型荧光分光光度计（Shimadzu），Model2300 型 CO_2 孵箱（Sheldon Manufacturing，Inc），JC-1 型 He-Ne 激光治疗机（国营南京电子管厂，波长 632.8 nm），DG3022 A 型酶联免疫检测仪（国营华东电子管厂），24、48 孔细胞培养板（Corning New York）。

1.2　实验方法

1.2.1　SW480 细胞培养方法　　用含青霉素和链霉素分别 100 U/ml。FCS10% 的 RPMI1640 培养液培养，37 ℃，5% CO_2、饱和湿度，单层贴壁生长。

1.2.2　实验分组　　测试样品分成：①正常培养的细胞空白对照组；② 加低浓度丝裂霉素（浓度为 0.02 μg/ml）的单独 MC 组；③ 加光敏剂 PSD-007（浓度为 2 μg/ml）的单独 PSD 组；④ 同时加低浓度丝裂霉素和光敏剂 PSD-007 的 PSD + MC 组。

1.2.3　激光照射[1]　　各组测试样品均接受 He-Ne 激光束垂直照射，光斑直径 2 cm，癌细胞样品所能接受的激光照射能量为 1 J/cm²。

1.2.4　细胞内 PSD 含量测定[2]　　采用 RF-540 型荧光分光光度计，激发波长 394 nm，发射波长 610 nm，灵敏度 1，狭缝 3.3 μm。

1.2.5　癌细胞存活率检测　　按 MTT 法[2] 采用自动酶联免疫检测仪测定光密度（D 值）按公式计算细胞存活率：

$$细胞存活率(\%)=\frac{实验组\ D\ 值-空白组\ D\ 值}{空白对照组\ D\ 值-空白组\ D\ 值}\times 100\%$$

1.3　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPLM 软件包（第四军医大学研制）进行 t 检验。

2　结果

2.1　给药后不同时间各组癌细胞内光敏剂含量变化

光敏剂浓度为 ng/ml（1 ml 含细胞 2×10^6），$n=8$。低浓度的丝裂霉素可使癌细胞内光敏剂显著增加，随时间延长细胞内光敏含量增加明显；加药后 8、16 h，PSD 组、PSD + MC 组癌细胞内光敏剂可达到较高浓度，见表 1。

表 1　加药后不同时间癌细胞内光敏剂浓度（%，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Intracellular concentration of PSD in colon carcinoma cells after added with Mitomycin C and PSD（%，$\bar{x}\pm s$）

Groups	4 h	8 h	16 h	24 h
Control	14.82 ± 2.02	15.41 ± 1.97	15.20 ± 1.83	14.97 ± 2.13
PSD	43.04 ± 8.75	65.65 ± 8.42 *	77.32 ± 9.48 *	86.25 ± 10.30
PSD + MC	68.12 ± 11.4 +	94.30 ± 9.57 +*	101.36 ± 10.81 +	109.43 ± 14.56 +

+：$P<0.01$，*vs* PSD；*：$P<0.01$，*vs* the adjacent former at the same group

2.2　各组细胞在 PDT 作用后不同时间细胞存活率变化

空白对照和单用 MC 对照，各时相点无明显变化，组间无显著差异，故此处仅选用空白组。PSD + MC 组与 PSD 组相比在激光照射后 4、8、16 h 细胞存活率显著降低（$P<0.01$），32 h 细胞存活率接近，见表 2。我们还观察到各实验组在激光照射后 48 h，癌细胞全部死亡。

表 2　PDT 作用后不同时间癌细胞内细胞存活率变化（%，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　Colon carcinoma cell survival rate on different timepoints after PDT（%，$\bar{x}\pm s$）

Groups	0 h	4 h	8 h	16 h	32 h
Control	95.32 ± 4.67	94.43 ± 3.26	92.59 ± 3.98	90.54 ± 4.64	88.43 ± 5.36
PSD	92.66 ± 5.35	61.92 ± 4.67 *	50.36 ± 3.91 *	30.24 ± 4.73 *	19.55 ± 4.62 *
PSD + MC	93.15 ± 4.91	56.36 ± 3.87 +*	41.28 ± 4.93 +*	21.33 ± 3.57 +*	17.42 ± 5.14

+：$P<0.01$，*vs* PSD；*：$P<0.01$，*vs* the adjacent former at the same group

2.3　癌细胞与光敏剂作用不同时间经 PDT 作用后癌细胞存活率变化

各组与含 PSD 的 RPMI1640 作用不同时间后，激光照射，8 h 后，细胞存活率变化。结果表明：癌细胞与光敏剂作用 8 h 或 16 h 可达到最佳 PDT 杀伤效果，与作用 24 h 比无显著差异，与作用 4 h 比细胞存活率显著降低，见表 3。

表 3　癌细胞与光敏剂作用不同时间，PDT 作用后癌细胞存活率变化（%，$\bar{x}\pm s$）

Tab 3　The survival rate of colon carcinoma cells treated with PSD for different time after PDT（%，$\bar{x}\pm s$）

Groups	0 h	4 h	8 h	16 h	24 h
MC	93.42 ± 4.10	90.67 ± 3.55	87.64 ± 5.32	91.51 ± 4.93	90.27 ± 3.89
PSD	95.76 ± 5.03	70.53 ± 4.67 *	46.33 ± 5.27 *	34.17 ± 4.06 *	35.16 ± 4.21
PSD + MC	94.17 ± 4.45	58.24 ± 5.31 +*	34.25 ± 3.61 +*	25.33 ± 4.34 +*	24.75 ± 4.63 +

+：$P<0.01$，*vs* PSD；*：$P<0.01$，*vs* the adjacent former at the same group

3　讨论

PDT 杀伤作用与光敏剂聚集到癌细胞内的含量密切相关，因此直接检测癌细胞内光敏剂含量，可反映该光动力学杀伤作用。实验结果表明，对培养的单层贴壁细胞，含光敏剂的培养液与细胞作用 4、8、16 h，细胞内光敏与相邻前一时相比增加最明显，24 h 与 16 h 比则增加不显著；提示在常规 PDT 研究中，加光敏剂后 8 ~ 16 h，即可达到较满意的癌细胞内光敏剂浓度，此段时间激光照射，可获得满意 PDT 杀伤效果。PSD + MC 组 16、24 h 分别与相邻前一时相比无明显增加，说明 MC 可使光敏剂进入癌细胞内作用提前，可能在于 MC 可致癌细胞膜有轻的变异，而随时间延长，癌细胞

膜功能逐渐恢复，恢复过程中膜的结构不稳定对光敏剂的渗透减少[3]。但 PSD + MC 组各时相细胞光敏剂含量均比 PSD 组显著增加，除超低浓度的 MC 对细胞膜结构的影响外，还可使细胞周期改变，增加静止期细胞数量[4]，使静止期细胞与光敏剂作用时间延长，从而使光敏剂进入到癌细胞内含量相对增多。

丝裂霉素是一种肿瘤抑制药，与 DNA 结合，经双重链 DNA 架桥，阻碍增殖期细胞 DNA 复制而发挥效果，对 G、S 期细胞敏感。我们所用浓度比正常浓度低 100 倍，属超低浓度。有研究表明[5]该浓度的 MC 本身不会对癌细胞有杀伤作用，仅能改变癌细胞周期，去掉该药后，癌细胞又可恢复其本来周期繁殖特点。我们的研究表明，单独该浓度的 MC 对细胞存活率在激光照射后，各时相点与空白组比无显著变化；组内各时相点间亦无显著差异，较好地说明了这一点。PSD + MC 组在激光照后 4、8、16 h 与 PSD 组有显著差别，存活细胞显著减少，这与两组细胞内含光敏剂量的多少呈高度负相关，相关系数 PSD 组：$r = -0.963$，PSD + MC 组 $r = -0.989$。32 h 时两组无明显差别。说明：①MC 增效作用主要在激光照射后 8、16 h 发生；②细胞内 PSD 含量越多，PDT 后细胞存活率越低，也就是说 PDT 杀伤作用越强，因此增加细胞内或肿瘤组织内光敏剂含量，是 PDT 增效重要的途径之一，而超低浓度的 MC 增效作用可能在于其增加 G_1 期癌细胞和改变膜渗透性结果，其详细机制有待进一步研究；③ PSD + MC 组细胞存活率曲线左移，32 h 组与 PSD 组接近，可能是因为光动力学杀伤细胞一般发生在光照后 32 ~ 40 h。也有报道，最大细胞杀伤率在光照后 48 h[6]，这可能与用光敏剂剂量大小和种类不同有关。

参考文献：

[1] 陈祖林，唐建民，单治堂，等. 细胞培养用品对光透射率的影响[J]. 中国激光医学杂志，1998，7(3)：166 - 169.

[2] Chen Zulin, Ge Haiyan, Lai Yan, *et al*. Experimental study on synergistic mechanism of verapamil for photodynamic therapy on colonic adenocarcinoma cells[J]. Proc of SPIE, 2003, 5254: 476 - 483.

[3] French A J, Datta S N, Allman R, *et al*. Investigation of sequential mitomycin C and photodynamic therapy in a mitomycin-resistant bladder cancer cell-line model[J]. BJU Int, 2004, 93(1): 156 - 161.

[4] Sano M, Furuta T, Takahira K, *et al*. Cell-cycle-dependent efficacy of photodynamic therapy with ATX-S10 (Na) [J]. Lasers Med Sci, 2005, 20(1): 1 - 5.

[5] Baas P, van Geel I P, Oppelaar H, *et al*. Enhancement of photodynamic therapy by mitomycin C: a preclinical and clinical study[J]. Br J Cancer, 1996, 73(8): 945 - 951.

[6] Banfi S, Caruso E, Caprioli S, *et al*. Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells [J]. Bioorg Med Chem, 2004, 12(18): 4853 - 4860.

（编辑 汪勤俭）

（上接 2053 页）

线照射或太阳曝晒。监护仪探头用 3% 双氧水纱布擦拭消毒，呼吸机管道用含氯液浸泡后，再用戊二醛熏蒸消毒待用。

1.2 皮肤护理

先天性梅毒患儿一般都有不同程度的皮肤损害：红斑、脱屑，特别是有梅毒性大疱疮时，大疱内渗出液具有很强的传染性，破皮后又容易感染，故而做好皮理至关重要[1]。对于有红斑、脱屑者，可用 1∶5 000的高锰酸钾溶液冲洗。有斑丘疹及大疱疮者，冲洗后涂以百多邦软膏防止感染，并用单层无菌纱布覆盖患处。较烦躁的患儿，足底、踝部包裹纱布，以防擦破皮肤。同时加强臀部护理，并保持全身皮肤清洁干燥。3 例患儿经以上处理后，无 1 例感染，3 ~ 5 d 皮损痊愈，红斑消失、大疱吸收脱皮后光滑无痕迹。输液完毕拔针时应先用生理盐水松解胶布，以防不慎撕破皮肤。

1.3 维护血管功能

先天性梅毒患儿血管弹性差，容易穿破，在行头皮或四肢静脉穿刺时，动作轻柔，避开皮肤斑丘疹、大疱的部位。尽可能的使用静脉留置针，减少血管破坏及反复穿刺带给患儿的痛苦。

1.4 饮食护理

母乳是婴儿的最好食品，但因患儿母亲 RPR、TPHA 均为阳性，不宜母乳喂养。我科以婴儿配方奶粉喂养。对于胎龄小、体质量低的早产儿，予以适应其消化功能的早产儿奶粉喂养。因其吸吮功能差，喂养时应仔细，防呛咳窒息，吃后头偏向一侧。吸吮能力差，吞咽功能好的患儿，可用滴管喂养。吸吮、吞咽反射均差的患儿，可留置胃管鼻饲喂养。不论何种喂养，都应做好口腔护理，特别是鼻饲喂养者，每日应用 2% 碳酸氢钠溶液做口腔护理早晚各 1 次，以预防细菌、霉菌感染。如需使用胃肠道外静脉营养时，则用微量注射泵 24 h 均匀输入。每日准确记录出入量，以便准确计算供给患儿所需热量。

2 出院指导

出院后的喂养指导，如母亲经过正规足量的驱梅疗法，梅毒血清血检查 RPR 滴度下降 4 倍以上的，可予母乳喂养，如未正规治疗或治疗后滴度仍高者，应暂缓母乳喂养，予配方婴儿奶粉喂养较好。

医护人员要向家长宣教梅毒的传播途径，提高家长对此病危害性的认识，拒绝不洁性生活，彻底治疗成人梅毒。告诉家长，患儿出院应继续治疗和病情观察，在 2、4、6、9、12 个月回医院复查血清反应，并了解患儿生长发育及智力的发育情况。

关键词：新生儿先天性梅素；临床护理

中图法分类号：R473.72　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 金汉珍，黄德明，官希吉 主编. 实用新生儿学[M]. 第 3 版. 北京：人民卫生出版社，2001. 359 - 362.

[2] 李书云，孙琦巍. 先天性梅毒患儿 38 例临床分析[J]. 郑州大学学报(医学版)，2003，38(4)：642 - 643.

（编辑 薛国文）