文章编号:1000-5404(2006)16-1675-04

论著

二氢卟吩e6和5-氨基酮戊酸对恶性黑素瘤裸鼠移植瘤的PDT疗效观察

邓 军,龙朝钦,郝 飞 (第三军医大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 在恶性黑素瘤动物模型上观察二氢卟吩e6(Ce6)和5-氨基酮戊酸(5-ALA)的光动力学治疗(PDT)效应。**方法** 于裸鼠的右后肢腋下注射A-375恶性黑素瘤细胞悬液0.1 ml(约2×10^6个细胞),接种部位出现黄白色结节表明动物模型建立成功。共有27只荷瘤裸鼠接受半导体激光(波长652 nm)照射,每部位光照剂量均为100 J/cm^2。实验裸鼠照射前分别用10% 5-ALA外敷肿瘤部位2 h、Ce6腹腔内给药(7.5 mg/kg)1 h或5-ALA外敷联合Ce6腹腔内注射进行处理。1周后处死裸鼠,观察各组织器官肿瘤转移情况,剥离肿瘤组织并称量,将各裸鼠的瘤体、肝、脾、肺、肾做组织病理学检查。**结果** 各治疗组肿瘤重量与对照组之间均有显著性差异($P<0.01$),而各治疗组之间组间比较无显著性差异($P>0.05$)。组织病理学检查显示PDT后1周肿瘤部位出现干燥、结痂、组织坏死,镜下见细胞坏死、崩解、皮下血栓、细胞轮廓模糊。各治疗组中发现有肿瘤转移情况。**结论** 动物实验表明应用Ce6和5-ALA产生的PDT效应能有效杀伤恶性黑素瘤,但不能抑制恶性黑素瘤的转移。

关键词:二氢卟吩e6;5-氨基酮戊酸;光动力疗法;黑素瘤
中图法分类号: R-332;R454.2;R739.5 **文献标识码:** A

Therapeutic effect of photodynamic therapy with chlorin e6 and 5-aminolevulinic acid on malignant melanoma in mice

DENG Jun, LONG Chao-qin, HAO Fei (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of photodynamic therapy with chlorin e6 (Ce6) and 5-aminolevulinic acid (5-ALA) on mouse model of malignant melanoma. **Methods** The mouse model of malignant melanoma was established by injecting 0.1 ml A-375 cells (about 2×10^6 cells) under the right hind leg of BALB/c-6 mice, and that the yellowish white node appears at injection site proves the successful model. Twenty-four of 27 successful mouse models were irradiated at the tumor site with semiconductor laser (wavelength 652 nm) with a total dose of 100 J/cm^2. Before laser exposure, the mice were treated with 10% 5-ALA by topical compress for 2 h or 7.5 mg/kg Ce6 by intraperitoneal injection for 1 hour or 5-ALA topical application combined with intraperitoneal injection of Ce6 ($n=6$ in each group). Another six mice as control only underwent PDT. One week after PDT, the mice were killed, the tumor mass was peeled off and weighed, whether the metastasis occurred or not was detected, and the tumor, liver, spleen, lung, kidney were sent to histopathological examination. **Results** The tumor weight in 5-ALA group, Ce6 group, and the combined group had significant difference as compared with control group ($P<0.01$), but had no significant difference among the three groups ($P>0.05$). The dehydration and scab formation and necrosis could be seen in tumor sites at 1 week after PDT. The cell collapse and necrosis, subdermal thrombosis and cell outline clouding could be observed by histopathological examination. Metastasis of melanoma were found in 5-ALA group, Ce6 group, and the combined group. **Conclusion** PDT with Ce6 and 5-ALA could kill the malignant melanoma effectively in animal experiment but could not affect the metastasis of melanoma.

Key words: PDT; 5-ALA; Chlorin e6; melanoma

基金项目:第三军医大学校管课题资助项目(2003)
Supported by the Scientific Research Funds of Third Military Medical University (2003)
作者简介:邓 军(1964-),男,重庆合川市人,硕士,副主任医师,副教授,主要从事皮肤性病学临床及激光光动力学的基础方面的研究。电话:(023)68754417
收稿日期:2005-09-16;**修回日期:**2006-03-22

恶性黑素瘤起源于痣细胞或黑素细胞，好发于皮肤黏膜，恶性程度高，预后差，手术治疗、化疗、生物治疗、基因治疗等疗效多不确切[1]。光动力学治疗(PDT)是近20年来兴起并不断发展的新技术，具有抗瘤谱广、选择性杀伤肿瘤细胞作用强、对正常细胞器官损伤轻微等特点，已在皮肤鳞状细胞癌和基底细胞癌的治疗上取得了可喜的成就[2]。为了研究PDT对恶性黑素瘤的效应，我们应用二氢卟吩e6(Ce6)和5-氨基酮戊酸(5-ALA)二种光敏剂在体外对培养恶性黑素瘤细胞株进行了细胞学试验[3]，证实PDT可以对恶性黑素瘤细胞产生作用。本研究继续用培养恶性黑素瘤细胞在裸鼠上制成恶性黑素瘤动物模型，在体内进行光动力学治疗的实验观察，为恶性黑素瘤的治疗提供新的方法和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人恶性黑素瘤细胞 人恶性黑素瘤细胞株A-375，第三军医大学全军免疫等研究所惠赠。

1.1.2 实验裸鼠 选用4～5周龄BALB/c-6裸小鼠，体质量16～25 g，共30只，雌雄各半，购自中科院上海实验动物中心。

1.1.3 LD650A半导体激光器 波长652 nm，输出功率9 mW(经能量计检测)。西南师范大学物理系研制。

1.1.4 试剂 5-ALA(上海复旦张江公司)、Ce6(美国Logan UT公司)、1640培养基、四甲基偶氮唑盐(Sigma公司)、新生小牛血清、二甲基亚砜、胰蛋白酶(均为Gibco公司)、磷酸盐缓冲液(Hyclon公司)。

1.2 方法

1.2.1 配制恶性黑素瘤细胞培养液及细胞培养 参见文献[3]。

1.2.2 建立恶性黑素瘤动物模型 将培养的恶性黑素瘤细胞悬液接种于裸鼠右后肢腋下，每个接种部位注射0.1 ml，约2×10^6个细胞，3～5 d后局部皮下出现黄白色结节表明模型建立成功。30只裸鼠有27只接种成功，成功率为90 %，接种1周后进行PDT实验。

1.2.3 动物分组及光动力学处理 24只荷瘤裸鼠随机分成4组，每组6只，每只实验裸鼠均在肿瘤局部均给予652 nm的激光照射。照射方法是用输出功率为9 mW(经能量计检测)的LD650A半导体激光器在距离受照面1 cm处照射，游标卡尺测得受照光斑面积为0.108 cm^2，照射时间为20 min使得照射剂量为100 J/cm^2。①对照组：不给于光敏剂处理，只进行激光照射；②Ce6-PDT组：Ce6腹腔内给药(7.5 mg/kg)1 h后进行激光照射；③5-ALA-PDT组：用10% 5-ALA(溶于60%二甲基亚砜)湿润棉球外敷肿瘤局部2 h后，相同条件下激光照射；④联合PDT组：10% 5-ALA湿润棉球外敷肿瘤局部1 h、腹腔内注射Ce6(7.5 mg/kg)1 h后，进行激光照射。

1.2.4 标本采集及常规病理检查 PDT后1周，实验裸鼠脱颈椎处死。检查裸鼠皮下移植瘤及各肺、肝、胃肠、卵巢、肾及肾上腺、腹主动脉旁、淋巴结等器官组织，观察无移植瘤远处转移。沿包膜剥出每个肿块，称重。取下肝、脾、肺、肾及移植瘤组织，经固定、脱水、透明、包埋、连续切片、HE染色后，光镜下观察病理学改变。

1.3 统计学处理

数据采用$\bar{x}\pm s$表示，应用SPSS 10.0统计软件进行F检验，组间比较采用q检验。

2 结果

2.1 人恶性黑素瘤裸鼠移植瘤的生物学特性

人恶性黑素瘤细胞株A-375移植到裸鼠皮下，经3～5 d潜伏期，移植局部表现为皮下黄白色结节，后逐渐增大，边界清，略可活动，质硬。组织病理学检查见大片肿瘤细胞，间质和血管较少，瘤细胞大小不等，形态多样、核大、深染、核异型性明显，病理性核分裂像较多，核质比例明显增大，细胞质较少而淡染(图1)。

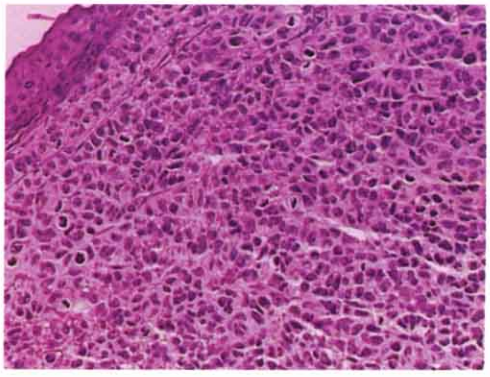


图1 移植部位恶性黑素瘤的病理学改变 (HE×200)

2.2 PDT后各组移植瘤的质量

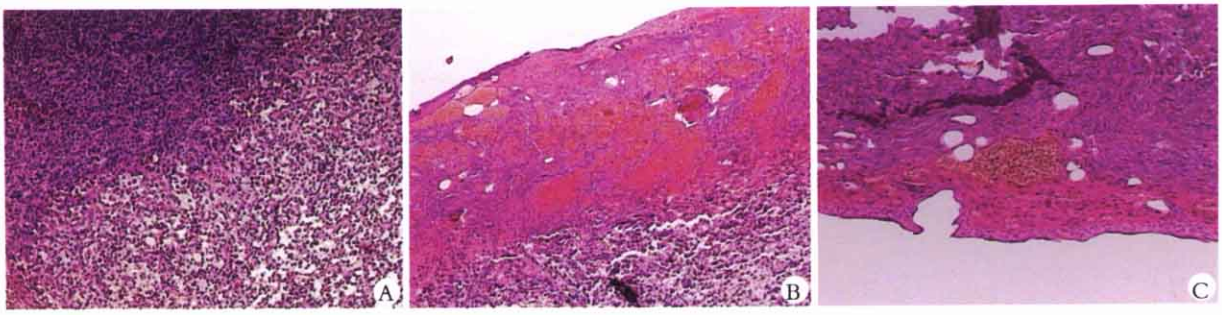
各组分别按前述方法给予光敏剂处理后，于肿瘤局部进行光动力学治疗，1周后处死实验裸鼠，称得各实验荷瘤裸鼠的肿瘤重量统计学显示，Ce6处理组(0.070 5±0.022 5) g、5-ALA处理组(0.179 0±0.059 5) g、联合处理组(0.067 3±0.022 8) g分别与对照组(0.622 8±0.080 3) g比较差异有显著性($P<0.01$)，但各治疗组之间组间比较无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 PDT后恶性黑素细胞移植瘤的病理学改变

Ce6腹腔内给药1 h后进行100 J/cm^2半导体激光照射，不同时段观察受照部位。24 h后局部皮肤出现发红、变白、水肿，48 h后有少量结痂，4 d后见明显的黑色结痂及组织坏死。光镜下观察，24 h后肿瘤组织结构变得疏松，间质水肿，细胞核浓缩，与未照射的肿瘤组织分界清楚(图2A)；48 h后见细胞坏死、崩解、皮下血栓、细胞轮廓模糊(图2B)；4 d后表皮下细胞轮廓不清(图2C)。10% 5-ALA外敷肿瘤局部2 h后进行100 J/cm^2半导体激光照射，不同时段出现的病理学改变与Ce6-PDT结果基本相同。

2.4　裸鼠移植瘤的转移情况

PDT 后 1 周处死实验裸鼠,肉眼检查未发现肺、肝、胃肠、卵巢、肾及肾上腺、腹主动脉旁、淋巴结等有移植瘤转移情况;组织病理学检查,发现各实验组均有 1 例肿瘤转移。Ce6-PDT 组 1 例脾转移、5-ALA-PDT 组 1 例肺转移、联合 PDT 组 1 例肺转移。



A: 24 h(HE, ×100); B: 48 h(HE, ×100); C: 4 d(HE, ×200)

图 2　Ce6-PDT 后不同时段移植瘤的组织病理形态

3　讨论

肿瘤的光动学治疗是利用能聚集于肿瘤部位的光敏剂,经适当波长的光激发后产生一系列的理化作用(主要是产生单线态氧)达到杀伤肿瘤的目的。Ce6 是一种单体的四吡咯化合物,属于叶绿素类光敏剂,可用 450 ~ 700 nm 的光激发,Ce6-PDT 作用的组织穿透深度可达 16.6 mm[4]。Ziolkowski 等[5]用 2.5 ~ 10.0 mg/kg 的 Ce6 给纤维肉瘤裸鼠腹腔注射,24 h 内给予 50 ~ 150 J/cm^2 的光照射,结果表明 Ce6 产生的光动力学效应具有很好的杀伤肿瘤细胞作用。Ce6 是一种强光敏剂,单线态氧产额高,另外 Ce6 在激发后还能诱导肿瘤坏死因子(TNF-α)产生[5]。ALA 为体内血红素合成的前体物,在脱水酶等一系列酶促作用下才生成具有光敏活性的原卟啉 IX(PpIX)[6]。5-ALA 可以外用,将 20% 的 ALA 霜剂局部外用于人基底细胞癌,发现 PpⅨ在肿瘤细胞中的含量是其在周围正常皮肤中含量的 15 倍[7];在局部应用 5-ALA 时,用二甲基亚砜作为溶剂可明显地增加 PpⅨ在局部肿瘤细胞中的聚集,显著提高 PDT 作用,且局部应用 ALA 的副作用轻微[8]。Ce6 和 5-ALA 均为第二代光敏剂,肿瘤选择性强、体内清除速度快、毒副作用小、无须避光。本研究中的实验动物在应用这两种光敏剂后进行 PDT,均未采用特殊的避光措施,动物未发生皮肤光毒性副反应及意外死亡。

笔者在前期的细胞学试验证实了 Ce6 和 5-ALA 所产生的 PDT 效应对恶性黑素瘤细胞有杀伤作用,当光敏剂的浓度在一定范围内其 PDT 效应大小与激光照射剂量存在明显的剂量-效应关系[3]。Ce6 产生 PDT 作用所需浓度较低,但对细胞毒性方面较 5-ALA 明显。本研究继续在恶性黑素瘤的裸鼠模型上进行了 PDT 试验,并对 Ce6 和 5-ALA 二种敏剂做了对比观察,结果显示两种光敏剂的光动力学效应均能有效抑制并杀伤裸鼠上的恶性黑素瘤细胞。从肿瘤大小的均值来看,Ce6-PDT 对人恶性黑素瘤肿瘤生长抑制程度高于 5-ALA-PDT,但其差异无显著性意义;应用两种光敏剂后再行光照处理(联合治疗组),产生的光动学效应与单独用其中一种光敏剂比较无显著性差异,提示 Ce6-PDT 和 5-ALA-PDT 无叠加作用。说明 PDT 效应不只是与光敏剂有关,理论上还与光照条件、氧浓度及温度等因素有关。

PDT 杀伤肿瘤细胞的生物学机制是以其化学机制为基础:一是通过产生的单线态氧等活性物质对肿瘤细胞的直接杀伤作用;二是通过作用于肿瘤组织的微血管造成血管封闭,使组织缺氧致肿瘤坏死[9]。经 PDT 后肿瘤细胞的死亡模式可以是凋亡[10],也可表现为坏死。在本研究给定的实验条件下,PDT 杀伤恶性黑素瘤细胞的主要方式表现为血管损伤、血栓形成、肿瘤细胞坏死。

在本研究中的各治疗组中均发现了恶性黑素瘤的转移现象,表明 PDT 对肿瘤转移没有产生明显的抑制作用。分析原因可能有:裸鼠免疫力低下,PDT 不能激发机体产生免疫反应;其次可能是激光光波不能到达肿瘤的深部,转移前不能完全杀伤恶性黑素瘤细胞;再者是恶性黑色素瘤细胞转移较早,在进行 PDT 之前可能已经转移。

参考文献:

[1] 郑江红,林子豪. 皮肤恶性黑色素瘤治疗的进展[J]. 中华整形外科

杂志, 2003, 19(1): 62-64.
[2] KALKA, MERK H, MUKHAR H. Photodynamic therapy in dermatology [J]. J Am Acad Dermatol, 2000, 42(3): 389-413.
[3] 龙朝钦, 邓 军, 钟白玉, 等. 5-氨基酮戊酸光动力效应对体外培养人恶性黑素瘤细胞的物理学干预特征[J]. 中国临床康复, 2005, 9(10): 133-135.
[4] KOSTENICH G A, ZHURAVKIN I N, FURMANCHUK A V, *et al*. Photodynamic therapy with chlorin e6. A morphologic study of tumor damage efficiency in experiment[J]. J Photochem Photobiol B, 1991, 11(3-4): 307-318.
[5] ZIOLKOWSKI P, SYMONOWICZ K, MILACH J, *et al*. *In vivo* tumor necrosis factor-alpha induction following chlorin e6-photodynamic therapy in Buffalo rats [J]. Neoplasma, 1997, 44(3): 192-196.
[6] GUPTA A K, RYDER J E. Photodynamic therapy and topical aminolevulinic acid: an overview [J]. Am J Clin Dermatol, 2003, 4(10): 699-708.
[7] DRAGIEVA G, HAFNER J, DUMMER R, *et al*. Topical photodynamic therapy in the treatment of actinic keratoses and Bowen's disease in transplant recipients[J]. Transplantation, 2004, 77(1): 115-121.
[8] DE-ROSA F S, MARCHETTI J M, THOMAZINI J A, *et al*. A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid *in vitro* cutaneous permeation and *in vivo* protoporphyrin Ⅸ accumulation determined by confocal microscopy [J]. J Control Release, 2000, 65(3): 359-366.
[9] HENDERSON R W, DOUGHERTY T J. How does photodynamic therapy work[J]? Photochem Photobiol, 1992, 55(1): 145-157.
[10] Barge J, Decreau R, Julliard M, *et al*. Killing efficacy of a new silicon phthalocyanine in human melanoma cells treated with photodynamic therapy by early activation of mitochondrion-mediated apoptosis [J]. Exp Dermatol, 2004, 13(1): 33-44.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2006)16-1678-01

不同粘固剂粘固的金属烤瓷冠边缘微渗漏的比较研究

张志红[1], 彭 伟[2] ([1]北京大学口腔医院第三门诊部, 北京 100083; [2]华北煤炭医学院口腔系, 唐山 063000)

金属烤瓷冠是目前临床常用的一种修复体,而粘固剂的选择不仅影响烤冠的抗折强度,还与烤瓷冠粘固后边缘微渗漏密切相关[1],边缘微渗漏可继发龋、牙髓坏死及颈缘色素沉着,是影响冠修复体远期疗效及临床使用寿命的主要因素[2-4]。为此,本试验采用2种不同粘固剂粘固烤瓷冠,观察其边缘微渗漏状况,为临床选择粘固剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 冠修复体制作

选择16颗近期拔除的前磨牙,并保存于生理盐水溶液内,要求牙完整且牙冠大小相近。进行标准烤瓷冠牙体预备,冠边缘完成线位于釉-牙骨质界根方0.5 mm处。最终形成龄面磨除2 mm,轴壁聚合度4°,1.0 mm宽,带圆钝内线角90°肩台的牙预备体。采用个别托盘,硅橡胶(德国)取印模,超硬人造石(日本)灌注工作代型。16个代型按金属烤瓷全冠修复技术要求完成蜡型、包埋、焙烧、铸造、喷砂、超声清洗、烤瓷、上釉等工序。所有烤瓷冠制作过程中,均在6倍放大的专用显微镜下进行蜡型的颈缘检查修整,冠的试戴和就位调适,以减小制作过程对冠修复体边缘质量的影响。

1.2 冠修复体粘固

所有冠修复体粘固前均进行喷砂,热蒸汽喷洗清洁,相应的牙预备体从生理盐水溶液取出后清洗吹干。16个烤瓷冠随机分成2组,每组8个,分别用日本松风无酸水门汀、瑞士康特公司双重固化树脂水门汀粘固,粘固操作步骤均严格按材料说明进行,仔细清除多余粘固剂。所有冠指压就位后均在专用固定器上以40牛顿力固定7 min。所有粘固后样本置于生理盐水溶液3 d,然后保存于37 ℃去离子水中20 d。

1.3 温度循环试验

将16个标本放入温度循环试验机(德国),进行3 500次温度循环试验。试验参数如下:冷水浴(5 ℃)60 s,室温15 s,温水浴(55 ℃)60 s。

1.4 边缘微渗漏测量

用橡皮杯蘸浮石粉轻轻抛光样本颈缘区,喷金处理后,用扫描电镜观察和摄影,先用10 kV,20倍观察全貌,再在1 000倍放大的条件下利用测量软件直接在显示屏上进行测量烤瓷冠与粘结剂界面,粘结剂与牙体界面的间隙。转动标本台,顺着冠颈缘周长每200 μm测量1次,若遇冠颈缘或牙预备体完成线不清晰区则不作测量,每个标本获取80~120个测量值。

1.5 统计学处理

从扫描电镜测量的原始数据计算出每个样本烤瓷冠与粘结剂界面、粘结剂与牙体界面的间隙平均值每组8个样本均值代表该组数据。统计分析由SPSS统计软件行方差分析。

2 结果

20倍放大见烤瓷冠与粘结剂界面、粘结剂与牙体界面均无明显缝隙,1 000倍放大见有不均匀间隙,并测量结果如表1

(下转1681页)

作者简介:张志红(1971-),女,河北省唐山市人,主治医师,主要从事临床口腔综合方面的研究。电话:(010)82037076

收稿日期:2005-10-20;修回日期:2006-03-21