

## · 临床研究 ·

## 激光诱导光动力效应对人癌细胞株及脐血单个核细胞体外作用的比较

刁兰萍 徐建民 吴明 吴直江

【摘要】 目的 研究激光诱导的光动力效应对人癌细胞株的体外杀伤作用及对脐血单个核细胞的影响,以探讨自体外周血造血干细胞移植物的体外净化方法。方法 通过 MTT 法测定观察不同剂量光敏剂(血卟啉衍生物,HPD)经激光照射不同时间后,对人白血病细胞株 K562、乳腺癌细胞株 MCF-7 及脐血单个核细胞生长抑制作用的影响。结果 单纯光照对 3 种细胞均无明显作用;单纯加光敏剂对 K562 细胞及 MCF-7 细胞有一定的抑制生长作用;激光照射加光敏剂可显著抑制 K562 细胞及 MCF-7 细胞的生长,且具有时间及浓度依赖性,但对脐血单个核细胞则无明显抑制作用。其细胞抑制率依次为 K562 细胞 > MCF-7 细胞 > 脐血单个核细胞。结论 激光诱导的光动力效应可能为恶性血液病或实体瘤患者的自体外周血造血干细胞移植物体外净化提供简便、有效且经济的方法,值得临床推广、应用。

【关键词】 血卟啉衍生物; 激光; 肿瘤细胞; 光动力效应; MTT 法; 净化

The study of photodynamic effect induced by laser on human tumor cell lines and umbilical cord MNC in vitro DIAO Lan-ping\*, XU Jian-min, WU Ming, WU Zhi-jiang. \* Department of Hematology, The Affiliated Forth Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

【Abstract】 Objective To investigate the photodynamic effect induced by laser and use it as a method for purging of minimal residual tumor cells from autologous peripheral blood stem cell grafts. Methods We studied the effect of various concentrations of hematoporphyrin derivative (HPD) combined with of different time of laser irradiation on human leukemia cell line K562, breast tumor cell line MCF-7 and human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells by using MTT assay to compare the photodynamic effect between cell lines of each group. Results HPD or laser irradiation alone had no apparent cytotoxicity while the application of HPD plus laser exposure caused photosensitization. HPD plus laser irradiation was more efficient for killing K562 cells and MCF-7 cells than doing the normal human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. The photodynamic effect on K562 cells and MCF-7 cells was positively correlated with the increase of treatment duration and HPD concentration. Conclusion These results indicated that the laser photodynamic effect mediated by HPD might be used for purging autologous peripheral blood stem cell grafts in vitro.

【Key words】 Laser; Hematoporphyrin derivative (HPD); Human tumor cell line; MTT assay; Photodynamic effect

目前,利用自体外周血造血干细胞移植治疗恶性血液病及实体瘤的临床应用越来越多,但与异基因造血干细胞移植疗法比较,前者肿瘤复发率较高,其原因之一可能与自体移植中残留或污染的肿瘤细胞有关,如对移植进行体外净化,以减少肿瘤细胞的污染或残存,从而降低移植后肿瘤的复发。应用激光光动力效应加光敏剂去除移植中的肿瘤细胞是一种有效的体外净化方法。脐血中的单个核细胞包含造血干细胞、淋巴细胞及单核细胞等,因此我们用 MTT 法观察血卟啉衍生物(光敏剂)加激光照射对脐血中单个核细胞的影响,并以此了解光动力效应对造血干细胞

的作用,同时观察光动力效应对人白血病细胞株 K562、乳腺癌细胞株 MCF-7 的杀伤作用。

## 材料与方法

## 一、材料与设备

1. 光敏剂(血卟啉衍生物),购自上海第二医科大学附属仁济医院(沪卫药剂 96-301),配制成不同浓度,于 4℃ 环境下避光保存。MTT 购自瑞士 FLUKA 公司,以 5 mg/ml 分装。

2. 人白血病细胞株 K562、乳腺癌细胞株 MCF-7 购自中科院上海细胞生物研究所;脐带血单个核细胞取自健康产妇正常分娩脐血,用等量培养液稀释,加淋巴细胞分离液离心、分离,提取单个核细胞,制成细胞悬液。

作者单位:050011 石家庄,河北医科大学附属四院血液科(刁兰萍);复旦大学医学院中山医院血液科(徐建民);中科院上海细胞生物研究所(吴明、吴直江)

3. 激光照射采用 Innova 91-5 型氩离子激光器, 购自美国 Becton Dickinson 公司。激光功率调节为 200 mW, 波长为 488 nm。

## 二、实验方法

本研究中, 共分为 4 个组。对照组: 单纯培养 K562 细胞、MCF-7 细胞及脐血单个核细胞; 单纯加药组: 分别在 K562 细胞、MCF-7 细胞及脐血单个核细胞中加入光敏剂 (hematoporphyrin derivative, HPD), 并使每份细胞样品的 HPD 终浓度分别为 5, 10, 20 和 40 mg/L, 均无光照作用; 单纯光照组: 分别对 K562 细胞、MCF-7 细胞及脐血单个核细胞进行持续 10, 20, 40 及 60 min 的激光照射, 各样品均不加入 HPD; 实验组: 分别加入 HPD 到 K562 细胞、MCF-7 细胞及脐血单个核细胞中, 使每份细胞样品的 HPD 终浓度分别为 5、10、20 和 40 mg/L, 同时各细胞样品分别进行持续 10, 20, 40 及 60 min 的激光照射。

开始实验前, 首先将人癌细胞株置于含 10% 小牛血清、100 u/ml 青霉素及 100 μg/ml 链霉素的 RPM-1640 培养液中进行培养, 环境温度为 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 待其生长旺盛。贴壁生长的乳腺癌 MCF-7 细胞株经 0.25% 胰酶消化后, 吹散细胞, 同 K562 细胞及脐血单个核细胞一致, 调整细胞浓度为  $2 \times 10^5$  个/ml, 按上述分组均匀接种于 96 孔培养板中, 各组均设 4 个平行孔。将上述各组样品于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2 h 后, 对单纯光照组及实验组中各种浓度的不同细胞分别进行激光照射, 采取对同一光斑进行均匀照射的方式, 照射时间分别持续 10, 20, 40 及 60 min。照射结束后, 离心去除上清液, 加新鲜培养液, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续孵育 24 h 后, 采用 MTT 法测定各组细胞生存率, 并比较对照组与光照组等的细胞抑制率及细胞生存率间的差别。

## 三、统计学分析

取各平行孔中的细胞抑制率均值进行组间比较, 采用 SNK 方法进行统计学分析,  $P < 0.05$  为差异具有显著性意义。

# 结 果

## 一、单纯光敏剂、单纯光照及光动力效应对细胞生存率影响的比较

实验结果表明, 对照组、单纯加药组及单纯光照组间细胞生存率均数各不相同。对照组 K562 细胞及 MCF-7 细胞的生存率均数与单纯加药组比较, 差异具有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 表明单纯加光敏剂对两种癌细胞的生长均有一定的抑制作用; 对照组与单纯光照组间比较, 两种癌细胞的生存率均数均无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 表明单纯激光照射对癌细胞没有明

显的杀伤作用。对照组与单纯加药组间、对照组与单纯光照组间, 其脐血单个核细胞生存率均数均无显著性差异 ( $P$  均  $> 0.05$ ), 表明单纯加药、单纯光照措施对脐血单个核细胞均无明显的抑制作用。具体数据见表 1。

表 1 同时还显示, 单纯加药组的 K562 细胞及 MCF-7 细胞生存率均数分别为  $0.15 \pm 0.10$  及  $0.30 \pm 0.04$ , 而在同等 HPD (20 mg/L) 浓度下, 实验组该两种细胞的生存率均数分别为  $0.10 \pm 0.02$  及  $0.08 \pm 0.01$ , 与单纯加药组比较, 该两种细胞组间差异均有显著性意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 表明在同等 HPD 浓度下, 光照可对其杀伤效应产生显著影响, 提示血卟啉衍生物经光动力作用后, 对这两种人癌细胞株的杀伤效应明显增高。比较单纯加药组和实验组的脐血单个核细胞, 发现两组间该细胞的生存率均数无显著性差异, 均为  $0.06 \pm 0.01$ , 表明光动力效应对正常造血干细胞的杀伤作用不明显, 符合光动力疗法对癌细胞具有杀灭作用, 而对正常细胞副作用较小的要求。

表 1 光动力效应对细胞生存率影响的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组 别   | K562 细胞         | MCF-7 细胞        | 脐血单个核细胞         |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 对照组   | $0.28 \pm 0.04$ | $0.36 \pm 0.06$ | $0.07 \pm 0.02$ |
| 单纯加药组 | $0.15 \pm 0.10$ | $0.30 \pm 0.04$ | $0.06 \pm 0.01$ |
| 单纯光照组 | $0.21 \pm 0.03$ | $0.34 \pm 0.04$ | $0.08 \pm 0.05$ |
| 实验组   | $0.10 \pm 0.02$ | $0.08 \pm 0.01$ | $0.06 \pm 0.01$ |

注: 此时单纯加药组 HPD 浓度为 20 mg/L, 单纯光照组经激光照射 40 min, 实验组 HPD 浓度为 20 mg/L, 且经激光照射 40 min

## 二、光动力疗法对细胞抑制率的影响

为了了解光动力疗法对细胞抑制率的影响作用, 我们从光敏剂浓度及光照时间两个方面进行了探讨。光动力效应的光敏剂浓度依赖性见图 1 所示, 对经不同浓度 HPD 作用后的 3 种细胞进行同等条件的激光照射持续 40 min 后, K562、MCF-7 细胞均表现出明显的生长抑制作用。其中 K562 细胞在 HPD 各浓度间的抑制率差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。MCF-7 细胞在 HPD 浓度分别为 5 mg/L 与 10 mg/L 时, 其细胞抑制率间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ); 但在相同条件下, 当 HPD 浓度分别为 20 mg/L 和 40 mg/L 时, 其细胞抑制率与 HPD 浓度分别为 5 mg/L 和 10 mg/L 时的抑制率相比, 差异均有显著性意义 ( $P$  均  $< 0.05$ )。提示光动力杀伤效应对这两种细胞具有明显的光敏剂浓度依赖性。脐血单个核细胞经光动力效应作用后, 其生长亦受到一定程度的抑制, 但明显低于 K562 及 MCF-7 细胞 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 并且脐血单个核细胞在 HPD 各浓度下, 其抑制率间差异均无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 表明光动力疗法对正常脐血单个核细胞无明显的光敏剂浓度依赖作用。

光动力效应的作用时间依赖性见图 2 所示。分别将 HPD 加入到 K562 细胞、MCF-7 细胞及脐血单个核细胞中,并都维持各细胞样品 HPD 浓度为 20 mg/L,随着激光照射时间的延长,其光动力效应对细胞的生长抑制作用亦逐渐增强,但各细胞株的敏感性不同。其中 K562 细胞对光动力效应的敏感性高于 MCF-7 细胞及脐血单个核细胞,并且该细胞各时间段间的细胞抑制率均有明显差异( $P < 0.05$ ),表明随着激光照射时间的延长,其光动力效应对 K562 细胞的生长抑制作用亦逐渐增强。脐血单个核细胞及 MCF-7 细胞在各时间段间的细胞抑制率差异均无显著性意义( $P > 0.05$ ),表明光动力效应对这两种细胞的生长抑制作用无明显的时间依赖性。综上所述,本实验表明各细胞对光动力效应的敏感性不同,其敏感性依次为 K562 细胞 > MCF-7 细胞 > 脐血单个核细胞。

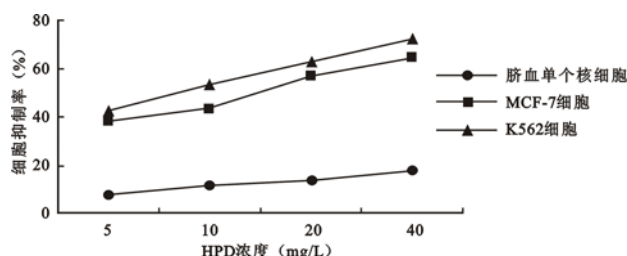


图 1 光动力效应的光敏剂浓度依赖性(激光照射持续 40 min)

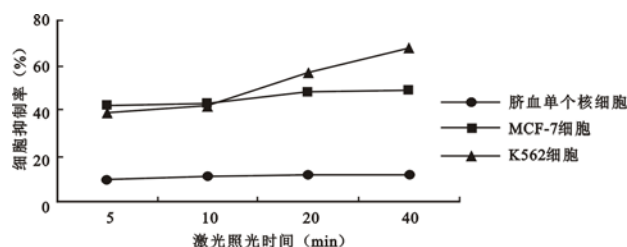


图 2 光动力效应的时间依赖性(HPD20 mg/L)

## 讨 论

光动力效应目前已被用来治疗肿瘤等疾病<sup>[1]</sup>,其疗效已被许多实验研究及临床治疗所证实。光动力治疗的功效除与光敏剂种类、剂量及组织细胞类型等因素有关外,还与所用的光源有关<sup>[2]</sup>。例如,普通灯光需加滤光片以便选择特定波长的光线加以照射,且在剂量精确性和强度控制等方面均不理想,而激光的出现则大大扩展了光动力治疗的临床应用范围。我们曾在以前的实验中比较了激光照射与日光灯照射的效果,结果表明激光照射对肿瘤细胞的杀伤作用要明显优于日光灯,两组间差异有显著性意义<sup>[3]</sup>。

光敏剂(HPD)是从卟啉中分离出的一种化合物。相关研究表明,HPD 经特定波长的激光照射后,会产

生一系列光动力效应及光生物学反应<sup>[1]</sup>,可使机体组织在能量转换过程中产生单态氧,也可直接与生物分子作用或将能量转移给氧和水,使之形成超氧阴离子自由基、羟自由基或过氧化氢等,这些氧化性极强的细胞毒性物质可使生物分子氧化,对线粒体及细胞膜造成损伤,导致细胞灭活。由于肿瘤细胞内清除活性氧的相关酶系异常,如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化氢酶等浓度较正常细胞低,所以容易受到活性氧的损害<sup>[4]</sup>。由于 HPD 对肿瘤细胞具有优势定位的特点,故我们选择其杀灭肿瘤细胞,以达到治疗目的。邹善华等<sup>[5]</sup>研究发现血卟啉衍生物加光照对 K562 细胞株具有选择性杀伤作用,进一步研究发现,肿瘤细胞存活率的对数与血卟啉剂量、光照时间呈线性关系,但对正常造血祖细胞影响较小;还有学者发现当 HPD 浓度  $\geq 15$  mg/L,且经激光照射 10 min 后,HPD 对 K562 细胞的杀伤作用增加了 5 个对数级;同时对正常造血祖细胞也有一定的损伤作用,粒细胞-单核细胞集落生成单位(CFU-GM)可存活 16%,但由于造血干细胞有强大的增殖、分化能力,即使存活 0.1%,也能使机体造血系统重建<sup>[6]</sup>。

本实验研究同时表明,光动力效应对 K562 细胞的生长抑制作用非常显著,且具有明显的光敏剂浓度依赖性及照射时间依赖性;对 MCF-7 细胞也有明显的光敏剂浓度依赖性;对正常脐血单个核细胞则无明显作用。血卟啉衍生物的活性成分是卟费默钠(porphimer sodium, PS)<sup>[2]</sup>,当不照光时,PS 对小鼠的 24 h 半数致死量(LD50)为 140 mg/kg,小鼠死于肝、肾坏死;经激光照射后,LD50 为 4 mg/kg,动物死于休克样综合征。一般 PS 的临床剂量上限为(2~5) mg/kg,本着最大限度杀伤肿瘤细胞,同时对正常细胞损伤较轻的原则,结合相关文献及实验,我们得出采用 20 mg/L HPD 加激光照射 40 min 为自体干细胞移植体外净化的最佳实验参数。由于自体外周血干细胞采集物的容量约为 100 ml(含保养液),遵循该参数对其进行体外净化,回输到人体干细胞移植中的 HPD 剂量一般不会引起严重副作用,临床证实是安全、有效的,值得推广、应用。

## 参 考 文 献

- 1 黄卓正,李峻亨,主编. 现代激光医学. 南宁:广西科学技术出版社,1996. 105-115.
- 2 van Hillegerberg R, Kort WJ, Wilson JH. Current status of photodynamic therapy in oncology. Drugs, 1994, 48: 510-527.
- 3 刁兰萍,徐建民,吴明. 血卟啉衍生物对人乳腺癌细胞系及脐血造血细胞的光化学作用. 中国实验血液学杂志, 2001, 9: 383-384.
- 4 Kessel D, Erickson C. Porphyrin photosensitization of multi-drug resistant cell types. Photochem Photobiol, 1992, 55: 397-399.

- 5 邹善华, 王宝珍, 袁弥满. 光卟啉-光照选择性杀灭白血病细胞株 K562 的研究. 白血病, 1998, 7: 204-207.
- 6 Gulliya KS, Matthews JL, Fay JW, et al. Increased survival of normal cells during laser photodynamic therapy: implications for ex vivo autolo-

gous bone marrow purging. Life Sci, 1988, 42: 2651-2656.

(收稿日期: 2002-10-29)

(本文编辑: 易 浩)

## 脑卒中偏瘫患者自我强化 PT 训练对下肢运动功能的影响

王俊华

近年来,越来越多的康复专业人士认识到患者自我强化康复训练及康复环境建设对其康复效果的重要性<sup>[1]</sup>,即为了提高患者的康复效果,他们强调患者参与康复训练的积极性及同时创造一个良好的康复环境,但是目前国内关于康复环境建设、强化康复训练等对偏瘫患者肢体功能影响的报道较少。本文试就探讨自我强化 PT 训练(即在病区空闲时间内利用开放式 PT 室的设备训练)对脑卒中偏瘫患者下肢功能康复的影响。

### 资料与方法

#### 一、病例选择

选取 1998 年 10 月~2000 年 10 月我院脑卒中偏瘫患者 64 例,均符合全国第四届脑血管病学术会议修订的脑血管病诊断标准<sup>[2]</sup>。将患者随机分成对照组及强化康复组,每组各 32 例。其中对照组男 20 例,女 12 例,平均年龄 60.48 岁,脑出血 8 例,脑梗死 24 例,发病后开始康复治疗时间为 $(8.4 \pm 2.3)$  d;强化康复组男 18 例,女 14 例,平均年龄 58.64 岁,脑出血 7 例,脑梗死 25 例,发病后开始康复治疗时间为 $(10.2 \pm 2.6)$  d。

#### 二、治疗方法

一般脑卒中患者在结束当天的康复训练回到病房之后,因没有合适的康复环境,患者将会躺在病床上或坐在轮椅上消磨掉大量的空闲时间。考虑到以上情况,我们在病区内建立了一个约 50 m<sup>2</sup> 开放式的 PT 训练室,主要的训练设备包括训练床、肋木架、平行杠、姿势镜、小型台阶等。另外,我们还以“观察与分析”、“练习”、“一般计划”及“康复目标”4 个方面配套设计了“康复计划表”(详见附表,并以 1 位 62 岁男性脑梗死患者为例加以说明)。强化康复组患者每天接受常规神经内科药物治疗,床边良肢位指导及每天 1 次的 PT、OT 训练,还通过“康复计划表”熟知自己运动功能中存在的障碍,在接受每天常规的 PT、OT 训练外,主动在病区空闲时间内利用开放式 PT 室设备进行康复训练。康复作业内容包括:①患者在治疗床上进行关节活动度维持训练及髋、膝、踝关节的控制训练;②利用平行杠、姿势镜、肋木架及台阶等进行站立负重训练、平衡训练及步行训练等。治疗床上训练半小时,中间休息半小时,站立或步行训练半小时。训练强度以患者次日不出现肢体酸痛及疲劳症状为标准。对照组患者的“康复计划表”除没有填写“病房内的练习(空闲)”一栏外,其它内容与强化康复组一致;即对照组患者除没有在病区空闲时间内利用 PT 室进行康复训练外,其它治疗措施均与强化康复组一致。

### 三、评定方法及统计学分析

2 组患者分别于治疗前及治疗 2 个月后,均由同一位康复医师运用简化 Fugl-Meyer 运动功能评分法(FMA)对患者下肢功能进行评定,并对评定结果数据进行 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异具有显著性意义。

### 结 果

2 组患者经过 2 个月的治疗后,FMA 评定结果如下(表 1):2 组患者治疗前,其 FMA 评分 2 组间差异无显著性意义( $P > 0.05$ ),治疗后 2 组患者的 FMA 评分均较治疗前有显著提高( $P$  均  $< 0.01$ ),且强化康复组下肢运动功能的恢复显著优于对照组( $P < 0.05$ )。

表 1 强化康复组与对照组治疗前、后 FMA 评分比较(分,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组 别   | <i>n</i> | FMA 评分          |                               |
|-------|----------|-----------------|-------------------------------|
|       |          | 治疗前             | 治疗后                           |
| 强化康复组 | 32       | 8.78 $\pm$ 3.04 | 25.66 $\pm$ 4.64 * * $\Delta$ |
| 对照组   | 32       | 9.45 $\pm$ 2.89 | 18.78 $\pm$ 4.25 *            |

注:与治疗前比较,\*  $P < 0.01$ ,\*\*  $P < 0.001$ ;与对照组比较, $\Delta P < 0.05$

### 讨 论

近年来,全国各地相继建立了康复中心,综合性医院也建立了康复科,但由于我国的具体国情,我们不但在康复治疗技术上与国外具有较大差距,而且在康复管理体制上也存在一些弊端。具体表现如下:康复环境不够丰富多彩,患者有效康复时间较少,康复医师与患者的沟通少,患者参与康复训练的积极性不高。

针对上述情况,我们根据运动再学习方案,设计“康复计划表”,统一康复小组成员间的认识,针对 2 组偏瘫患者的康复治疗及生活,建立一个统一、协调及有效的康复软环境。在此基础上,我们有目的地加快强化康复组在病区空闲时间内的康复硬环境(病区开放式 PT 室)的建设,进而探讨脑卒中偏瘫患者自我强化 PT 训练对下肢运动功能的影响。这种针对强化康复组的开放式 PT 室与普通康复训练 PT 室的最大区别是:前者是免费开放式的,强调自我康复训练为主,后者则不是。当然,这种自我康复训练应严格按照康复医师在“康复计划表”上要求的训练内容、时间及强度进行。

从临床结果可以看出,强化康复组疗效明显优于对照组,可能是通过以下几方面实现的:①延长了患者的有效康复时间。偏瘫患者每天接受 PT、OT 训练各 1 次,其有效康复时间显然过