

血卟啉对细胞器的光动力效应

杨勇正、傅广礼、滕松山 (中国科学院生物物理研究所, 北京 100080, 中国)

Photodynamic effect of hematoporphyrin on cell organs

YANG Yong-Zheng, FU Guang-Li, TENG Song-Shan

(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

ABSTRACT Seminiferous epithelial cells of mouse testis were treated with hematoporphyrin derivative (HPD)-light *in vitro*. After HPD-light treatment, the changes within cells in early stage of prophase were observed. Examination with EM showed that 30 min after HPD-light treatment, the mitochondria were aggregated and vesiculated, the nucleus showed an irregular outline and a sign of chromatolysis; the other organelles showed no significant changes at this time. The results suggest that both mitochondria and nucleus are susceptible to HPD-light treatment.

Three hours after HPD-light treatment, many of multi-nucleated spermatids appeared and they all contained deformed nuclei. This fact suggests that cytokinesis was inhibited by this treatment, and the chromatin of metaphase were also damage.

KEY WORDS hematoporphyrins; seminiferous epithelium; electron microscopy; photochemotherapy; cytology

摘要 小鼠睾丸生精上皮细胞在体外经血卟啉和光照处理。处理后, 常见早前期细胞受损。处理后早期, 线粒体和胞核损伤较早, 表现在线粒体聚集和空泡化、胞核多形和核质轻度溶解。其他胞器未见明显破坏。

血卟啉加光照后 3 h, 出现许多多核巨细胞, 细胞内含有各种畸形细胞核。提示血卟啉加光照处理后, 细胞质分裂不但受到阻碍, 中期细胞的染色质也受明显破坏。

关键词 血卟啉; 生精上皮; 电子显微镜检查; 光化学疗法; 细胞学

近年来血卟啉衍生物 (hematoporphyrin derivatives, HPD) 对细胞杀伤作用的机理, 已有不少研究⁽¹⁻³⁾。对血卟啉光敏效应作用的胞器部位, 结果不太一致。有的指出, 光敏效应引起 DNA 损伤及其合成作用受阻^(1,2)。也有认为线粒体受损最早^(4,5)。有的报道细胞膜是早期损伤部位^(6,7)。近年报道指出, 光敏效应使多种胞器受破坏⁽⁸⁾。本文对光敏效应作用的胞器部位也作观察, 并利用生精上皮中初级精母细胞的分裂前期持续时间长、形态上易于识别的特点, 探索细胞不同周期时相的敏感性。

MATERIALS AND METHODS

组织细胞制备 用本单位饲养室提供的昆明系♂小鼠 12 只, 体重为 $20.3 \pm SD 0.4$ g, 将小鼠的生精小管迅速离体后放入 Eagle 液中, 切割成 2-4 mm 长度备用。其中 4 鼠的组织离体后立即固定制片, 4 鼠经体外未加药培养后光照。4 鼠为加药培养后光照处理。

加药和光照处理 部分精小管放入含小牛血清 15%、血卟啉 10 μ g/ml (扬州血卟啉注射液) 的 Eagle 培养液内。部分组织放入不含血卟啉的上述培养液中。同时放在 33°C 培养 2 h 后, 用 Hanks 液洗细胞 3 次。更换新培养液后, 在暗室用 100 W 乳白炽灯照光。光照距离为 10 cm, 功率密度为 27 mW/cm²。照光 20 min

Received 1988 Jul 2 Accepted 1989 Apr 19

后 0.5、1 和 3 h, 分别制备样品。按上法重复 4 次制备药物处理组和未加药组样品。另制作组织离体后立即固定的样品。同上述未加药组作比较。

电镜标本制备 组织经 1.5% OsO₄ 溶液固定 1 h 后, 用含 4℃ 饱和三铅溶液和 70% 酒精 1:3 的混合液, 染色约 1 h。经预冷的 70 和 90% 酒精脱水, 在室温中进入无水酒精。Epon 812 包埋。切片时只选择组织两端 1 mm 长度内切片。不经复染即可观察。

RESULTS

体外培养加光照后的细胞超微结构 A 型精原细胞核质颗粒匀细。B 型精原细胞核的异染色质沿核膜周边呈片块状凝集 (Fig 1 A, 见 Plate 2, 以下各图同)。在上述两种细胞质内, 主要含泡形内质网、少量线粒体和一组高尔基复合体; 还含丰富的核糖体颗粒。间期精母细胞核质分布匀细, 第一次成熟分裂前期, 又被细分为细线期、合线期、粗线期、双线期和终变期等 5 个时期。其染色质颗粒分布特征, 由细线期的较匀细至终变期的逐渐变粗。合线期细胞核内, 还含发夹状的联会丝复合物为重要特征。上述各时期的细胞质内, 含一些线粒体、泡形内质网和一组高尔基复合体等。线粒体嵴一般同外膜成近垂直排列 (Fig 1 B)。精细胞染色质分布较匀, 顶体期细胞有一顶体覆盖在胞核一侧; 胞质内含大量小泡和一些线粒体, 嵴紧贴外膜呈波状排列 (Fig 1 C)。支持细胞核形无规则, 核质分布均一, 胞质富含线粒体, 溶酶体和内质网。经电镜观察比较离体后立即固定的上述各种细胞, 在形态上, 同体外短期培养加光照的未加药组 (Fig 1 A, B, C)。无明显差别。

血卟啉加光照处理后的变化 给药和光照后 30 min, 可见一些休止期、细线期和合线期精母细胞, 其线粒体由正常散在分布 (Fig 1 B) 变为异常集中, 有的线粒体膨胀, 或有的空泡化。有的胞核表面比对照不规则, 有的染色质

呈轻度溶解 (Fig 1 D)。光照后 1 和 3 h, 上述变化更多见。合线期细胞染色质溶解凝集成大小不等的致密团块; 胞质成分减少 (Fig 1 E)。可见一些粗线期细胞也出现类似变化。一些精原细胞的染色质也裂解成致密团块, 核仁消失, 胞质结构减少 (Fig 1 F)。这时, 在上皮基膜附近有时出现退行性变细胞, 未见支持细胞的结构明显破坏 (Fig 1 F)。光照后 3 h, 频繁看到多核巨精细胞, 一个细胞内有 2-8 个不等的胞核。在这些多核细胞内, 均含数量不等的畸形胞核, 表现在由正常的一个胞核覆盖一个顶体, 变为两个胞核共有—个顶体, 或有的子核异常细小或有的分叶为二 (Fig 1 G)。有的巨细胞内, 线粒体聚集在细胞内质部分; 并出现大量致密颗粒。核膜和细胞膜以及其他胞质成分都较完整 (Fig 1 H)。

DISCUSSION

光敏效应引起细胞膜离子通透性和膜粘稠性改变⁽⁷⁾。导致葡萄糖和甘油等物质转运受抑制⁽⁸⁾。在本实验中, 从形态上看, 处理后早期, 线粒体和胞核的结构受损较早, 也较明显。细胞膜无明显受损 (Fig 1 D, E)。有时也见细胞膜破裂现象, 但因其他胞器也明显破坏, 难以确定那些胞器先受其害。从本结果看, 在多核细胞内, 出现的畸形胞核。乃因母核局部染色质受损所致, 导致部分子核畸形或退行性变。正因为细胞膜未受破坏, 细胞才能进行复杂的有丝分裂活动。这间接表明, 胞核受损早于细胞膜。光敏效应后早期出现细胞膜功能等变化, 可能是一种可修复的生理性损伤。假如其他胞器呈现退行性变, 其损伤将不可恢复。

光敏效应对胞核的损伤作用, 随细胞不同周期时相而异。S 期易受影响, 其他时相敏感性较低。或 S 期和 G₁ 期较敏感, M 期不敏感^(2,9)。本实验看到, 部分间期胞核也受损伤, 同食管癌上皮细胞的观察结果⁽¹⁰⁾一致。这可能与不同细胞的敏感性存在差异有关。我们还看到合线期即分裂早前期的受伤细胞频繁出现,

其胞核和线粒体均呈明显损伤(Fig 1 D, E)。本结果提示, 细胞分裂前期阶段, 也是敏感时相之一。

血卟啉光敏效应可抑制细胞质分裂, 但不影响胞核分裂, 导致多核细胞产生⁽¹⁰⁾。本实验看到同样事实, 但还看到在多核细胞内, 都出现畸形细胞核(Fig 1 G, H)。它在正常组织内难以看到。上述畸形胞核大致由第一次成熟分裂或第二次成熟分裂瞬间受伤的染色质分化而来, 导致部分子核畸形失活。这表明, 光敏效应不但能对胞质分裂起阻碍作用, 对染色质也有明显杀伤作用。提示胞核受伤是导致细胞退行性变的重要原因之一。光敏效应引起的DNA分子损伤、染色体畸变和姐妹染色体互换等变化⁽¹⁾。从超微结构模式分析, 不易被觉察, 一旦细胞分裂为子核后, 可能就表现出来。

REFERENCES

- 1 Moan J, Waksvik H, Christensen T. DNA single-strand breaks and sister chromatid exchanges induced by treatment with hematoporphyrin and light or by X-rays in human NHIK₃₀₂₅ cells. *Cancer Res* 1980; 40 : 2915
- 2 Christensen T, Moan J, Wibe E, Oftebro R. Photodynamic effect of hematoporphyrin throughout the cell cycle of the human cell line NHIK₃₀₂₅ cultivated *in vitro*. *Br J Cancer* 1979; 39 : 64
- 3 Dulbbelman TMAR, de Goeij AFPM, van Steveninck J. Protoporphyrin-induced photodynamic effects on transport processes across the membrane of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1980; 595 : 133
- 4 Si CY, Jang TN, Chao WM, et al. Ultrastructural studies on effect of HPD on carcinoma cell line. *Acta Acad Med Sin* 1985; 7 : 244
- 5 Coppola A, Viggini E, Salzarulo L, Rasile G. Ultrastructural changes in lymphoma cells treated with hematoporphyrin and light. *Am J Pathol* 1980; 99 : 175
- 6 Kessel D. Effect of photoactivated porphyrins at the cell surface of leukemia L₁₂₁₀ cells. *Biochemistry* 1977; 16 : 3443
- 7 Moan J, Johannessen J V, Christensen T, Espevik T, Mcghie J B. Porphyrin-sensitized photoinactivation of human cells *in vitro*. *Am J Pathol* 1982; 109 : 184
- 8 An G, Wang DY, Wang KH. Ultrastructural changes of human gastric cancer cell line MG₀ 80-3 caused by HPD-laser *in vitro*. *Acta Biol Exp Sin* 1986; 19 : 173
- 9 Wang DS, Liang YY. The relationship between transport site of HPD and photodamage region of human gastric cancer cells in cell cycle. *Ibid* 1988; 21 : 35
- 10 Ning AL, Pan QG. Studies on HPD photosensitization on human cancer cells *in vitro*. *Acta Acad Med Sin* 1985; 7 : 248

5th World Conference on Clinical Pharmacology & Therapeutics

1992 Jul 26-31

Yokohama

Please contact: Prof Naokata SHIMIZU, President,
Organizing Committee, CPT-92, c/o Simul International Inc,
Kowa Building No 9, 8-10 Akasaka 1-chome, Minato-ku,
Tokyo 107, Japan.