

中国人民解放军军医进修学院;中国人民解放军总医院

硕士学位论文

应用荧光探针活性氧检测技术对细胞光生物学效应的初步研究

姓名: 李晓松

申请学位级别: 硕士

专业: 激光医学

指导教师: 刘凡光;顾瑛

20040501

缩略词表

英文缩写	英文全名	中文译名
CCD	Charge-coupled device	电荷耦合器件
DCF	dichlorofluorescein	双氯荧光素
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium	Dulbecco 改良的 Eagle's 培养基
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
ESR	Electron spin resonance	电子自旋共振法
H ₂ DCF	2',7'-dichlorodihydrofluorescein	双氯双氢荧光素
H ₂ DCF-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate	双氯双氢荧光素双乙酸盐
HMME	Hematoporphyrin monomethyl ether	血卟啉单甲醚
HO [·]	hydroxyl radical	羟自由基
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide	过氧化氢
Hp D	Hematoporphyrin derivative	血卟啉衍生物
LSCM	Laser Scanning Confocal Microscope	激光扫描 共聚焦显微镜

英文缩写	英文全名	中文译名
LLLT	Low Level Laser Therapy	弱激光疗法
MMP	mitochondrial membrane permeability	线粒体膜通透性
NADH	Reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide	还原型烟酰胺 腺嘌呤二核苷酸
$O_2^{\cdot-}$	superoxide anion radical	超氧阴离子
1O_2	singlet oxygen	单线态氧
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PMT	Photomultiplier tube	光电倍增管
PDT	Photodynamic Therapy	光动力疗法
ROS	Reactive Oxygen Speices	活性氧

应用荧光探针活性氧检测技术对细胞 光生物学效应的初步研究

摘 要

目的：应用荧光探针活性氧检测技术对单纯光照过程以及血卟啉单甲醚介导的光动力反应（HMME-PDT）过程中人脐静脉血管内皮细胞株 ECV 304 细胞内的活性氧产生情况进行检测。

方法：（1）实验系统的建立：分别利用激光扫描共聚焦显微镜和 CCD 荧光显微镜采集 ECV 304 细胞的 DCF 荧光图像，并比较两者的成像质量，实验可操作性等技术指标；主要测量输出功率、功率稳定性以及光斑直径这三个指标，考察荧光显微镜的高压汞灯作为本研究中照射光源的可行性；比较并选择合适的荧光图像的分析与处理方法。（2）单纯光照时 ECV 304 细胞内活性氧产生位置的确定：将细胞接种于 35 mm 培养皿中，孵育 24h，孵育结束前 30 min 加入 H₂DCF-DA（孵育浓度为 10 μmol/L），同时加入线粒体标记探针 MitoFluor Red 589（孵育浓度 100 nmol/L）。利用荧光显微镜的激发光源作为照射光源，分别采集同一细胞的 DCF 的荧光图和 MitoFluor Red 589 的荧光图，通过比较各细胞分区内 DCF 荧光的平均强度（I₁）与细胞内 DCF 荧光的平均强度（I₂）之比来确定 DCF 分布位置。（3）HMME-PDT 和单纯光照时 ECV 304 细胞内活性氧产量的监测：在孵育结束前 4 h 前加入 HMME（孵育浓度为 10 μg/ml），不加入探针 MitoFluor Red 589，其他实验步骤与上部分研究相同。在光照的同时连续采集两组细胞的 DCF 荧光图，采用图像分析和处理技术，求得两组细胞内不同照射时间点 DCF 平均荧光强度随时间的变化情况，据此绘制荧光强度-时间曲线。

结果：（1）CCD 荧光显微镜采集到的 DCF 荧光图像的质量优于共聚焦显微镜，同时综合考虑包括采图质量、光照射剂量的可控性、实验成本和操作简便性等诸多因素，最终确定了 CCD 荧光显微镜作为实验研究的工具；荧光

显微镜的汞灯输出功率稳定,光斑均匀,经本实验所选取的光路系统后输出波长范围为 460~490 nm,功率密度约为 100 mW/cm^2 ;细胞器-细胞荧光强度比值法对于荧光分布位置的确定优于其他方法。(2)单纯光照时 ECV 304 细胞内 DCF 荧光缓慢增强,经统计分析,参数 m 取不同值时线粒体区内 I_1/I_2 值均明显高于细胞核区和细胞质非线粒体区; $m=20\%$ 时的线粒体区、细胞质非线粒体区内 I_1/I_2 值与细胞核区内 I_1/I_2 值分别为 1.949 ± 0.221 , 0.725 ± 0.083 , 1.113 ± 0.226 ,经方差分析显示三者之间的差异有显著意义。(3)HMME-PDT 组细胞内 DCF 荧光分布区域与单纯光照组类似,尽管单纯光照的因素参与其中,但通过比较两者的变化趋势,发现此区域内 DCF 荧光变化的速度 HMME-PDT 组较单纯光照组快,前者在第 28 s 时即上升至第 2 s 时 5.98 倍,且由于 ROS 的大量产生,荧光淬灭迅速,而后者第 60 s 时上升至第 2 s 时的 4.69 倍。间接证明 HMME-PDT 早期 DCF 荧光的分布的主要位置是线粒体。

结论: 利用荧光探针活性氧检测技术检测细胞内的活性氧,方法简便可靠。单纯光照可致 ECV 304 细胞内活性氧的产生,且主要位于线粒体内,这可能与线粒体内源性光敏物质丰富有关,内源性光敏物质在光照激发时所产生的活性氧可能是引起弱激光生物学效应的重要物质。HMME-PDT 时细胞线粒体内活性氧产量明显高于其他区域,线粒体微环境可能影响了光化学反应的速率,线粒体是 HMME 介导的光动力反应早期损伤的靶位点。

关键词 活性氧; $\text{H}_2\text{DCF-DA}$; 光动力疗法; 弱激光治疗;
线粒体; 荧光显微镜

Preliminary Study on Cellular Photobiological Effect By Reactive Oxygen Species Detection Through Fluorescent Probe Technique

Abstract

Objective To learn the generation of reactive oxygen species(ROS) during light-only irradiation and during photodynamic reaction induced by hematoporphyrin monomethyl ether (HMME-PDT) with fluorescent microscope and H₂DCF-DA.

Methods (1) The device for study was determined by comparing the fluorescent images obtained by laser scanning confocal microscope and CCD fluorescent microscope respectively. The mercury-arc lamp of fluorescent microscope was studied to value its possibility to be used as the irradiation light source. Various image analyzing and processing methods were compared to determine which one was the best to be applied in this study.

(2) ECV 304 cells were subcultured for 24 h. H₂DCF-DA was added into it for 30 min with the final concentration of 10 μ mol/L, and the other probe MitoFluor Red 589, which distributes in mitochondria specifically, was added simultaneously with the final concentration of 100nmol/L. The procedure of light irradiation was carried out during collecting the fluorescent image of DCF. The fluorescent images were collected by CCD fluorescent microscope. The distributed site of DCF was determined by comparing the fluorescence images of MitoFluor Red 589 and DCF of the same cell. The value of I_1/I_2 represented the amount of DCF in different cellular regions.

(3) HMME was added into it for 4 h with the final concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$. MitoFluor Red 589 was unnecessary in this part, and other procedure and operation were similar to the former part. The mean fluorescence intensity of DCF in cells and its variety with time were calculated by image analyzing and processing technique.

Results (1) CCD fluorescent microscope was superior to laser scanning confocal microscope in collecting the fluorescent image of DCF. CCD fluorescent microscope was chosen to be the system applied in this research with the consideration of operation, cost and et al. The mercury-arc lamp of fluorescent microscope was fit for the requirement of our study. The wavelength range of the light output was 460-490 nm and the power density was about 100mW/cm^2 in the condition of our study. Organelle-cell fluorescence intensity ratio analysis was more suitable than other methods.

(2) The fluorescence of DCF in ECV 304 cell increased slowly during the early stage of light-only irradiation and distributed mainly in mitochondria. The value of I_1/I_2 in mitochondria region was much higher than that in nucleus region and non-mitochondria cytosol region, and the value of each were 1.949 ± 0.221 , 1.113 ± 0.226 , 0.725 ± 0.083 respectively, when parameter m was 20%. (3) The site of DCF in ECV 304 cell during the early stage of HMME-PDT seemed to be the same with that of DCF during light-only irradiation, and the fluorescence intensity of the former increased more rapidly than the latter. The fluorescence intensity of the former at 28th second was 5.98 times of that at the 2nd second, but fluorescence intensity of the latter at 60th second was 4.69 times of that at the 2nd second.

Conclusions In this study we set up a series of method to detect the intracellular reactive oxygen species with fluorescent microscope and $\text{H}_2\text{DCF-DA}$, which is simple and reliable. The light irradiation can induce the

generation of ROS, and the generated site was mainly in mitochondria, which may be associated with its abundant endogenous photosensitizer. The ROS generated during the photodynamic reaction induced by endogenous photosensitizer may be the matter that causes the biological effect of low level laser therapy. The generation of ROS in mitochondria during HMME-PDT was much higher than that in other cellular regions. The phenomena indicated the effect of mitochondria inner environment on the velocity of photodynamic reaction. Mitochondria are the main site for the early stage of HMME-PDT.

Key words H₂DCF-DA; reactive oxygen species; photodynamic therapy; low level laser therapy; mitochondria; fluorescent microscope

前 言

1. 活性氧及其在激光医学中的重要意义

活性氧是指氧的某些代谢产物和一些反应的含氧产物, 包括 $^1\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 HO^{\cdot} 、 H_2O_2 等。ROS 对于维持细胞正常的生理功能和代谢具有极其重要的作用。

目前大多数学者认为光动力治疗的机制是由于光敏剂被细胞或组织吸收后在特定波长激光的照射下产生 ROS, 后者具有细胞毒作用, 它们可进一步与细胞内成分反应, 从而引起细胞损伤。ROS 是细胞杀伤的主要介质, 这一点已经十分的明确。了解光动力反应过程中 ROS 的产生情况, 也就了解了光动力损伤的情况。但是由于 ROS 自身性质活跃, 目前对于其产生情况尚缺乏足够的认识。可对光动力反应过程中的 ROS 产生情况进行实时动态的、单细胞水平检测, 有助于深入理解光动力反应的损伤效应。

弱激光治疗的应用和探索一直是激光医学研究的热点之一, 国内外相关的激光医学科研机构投入了大量的人力、物力和财力, 得到了有一定科学价值的实验结果, 但是目前对于其效应机制尚不明确。许多的假说缺乏实验依据。在总结了大量的实验数据的基础上, 国外学者对于光子对细胞非损伤作用的初始过程形成了一定的共识: 细胞有两类光子受体, 一类是细胞色素, 一类是含有生色团的分子, 它们接受光子的能量, 并在弱激光生物学效应方面发挥重要作用。联系到光化学反应的普遍性, 以及光动力治疗与弱激光治疗在细胞生物学效应上的许多相似性, 我们提出 ROS 是否是弱激光生物学效应的主要介质, 发挥重要作用, 这须通过对单纯光照过程中细胞内的 ROS 产生情况进行检测来验证。

深入了解光动力反应以及弱激光照射过程中的 ROS 产生情况, 对 ROS 进行检测, 对于理解光动力治疗和弱激光治疗的效应机制均具有积极的意义。

2. ROS 的常规检测方法

常规检测 ROS 的方法主要包括有：（1）鲁米诺化学发光法；（2）直接发光检测法；（3）电子自旋共振（ESR）法；（4）分光光度仪法；（5）流式细胞仪法；（6）细胞色素 C 还原法。

但是上述方法在研究中的应用存在着种种缺陷和限制。如 ESR 法可直接测得细胞内 ROS 的绝对水平，但对样品制备要求较高，且只能测得样品细胞 ROS 的平均值，仪器昂贵、操作复杂。对于某些活性氧物质的检测并不适宜应用此方法，例如检测 $O_2^{\cdot-}$ 时，必须在低温条件下进行， HO^{\cdot} 在水中的寿命极短，一般不易用 ESR 的方法直接检测。而分光光度仪法和流式细胞仪法只能对群体单位进行检测，无法达到单细胞水平的检测，而且要对细胞进行破碎处理。

3. 荧光探针技术检测 ROS

荧光探针技术在生物医学研究中应用广泛，可测定细胞活性、进行细胞器定位、确定离子浓度、测定电位变化等，技术比较成熟。ROS 检测探针作为新型荧光探针，在自由基研究领域已得到广泛的应用，比较常用的探针是

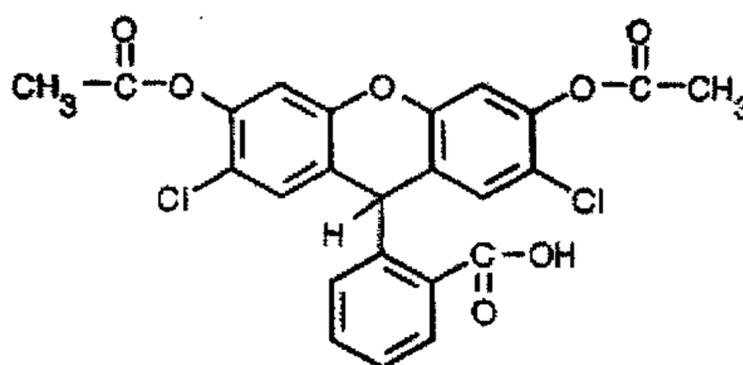


图 1 H₂DCF-DA 的结构

H₂DCF-DA，分子式为 C₂₄H₁₆Cl₂O₇，分子量为 487.29，化学结构式如图 1 所示。

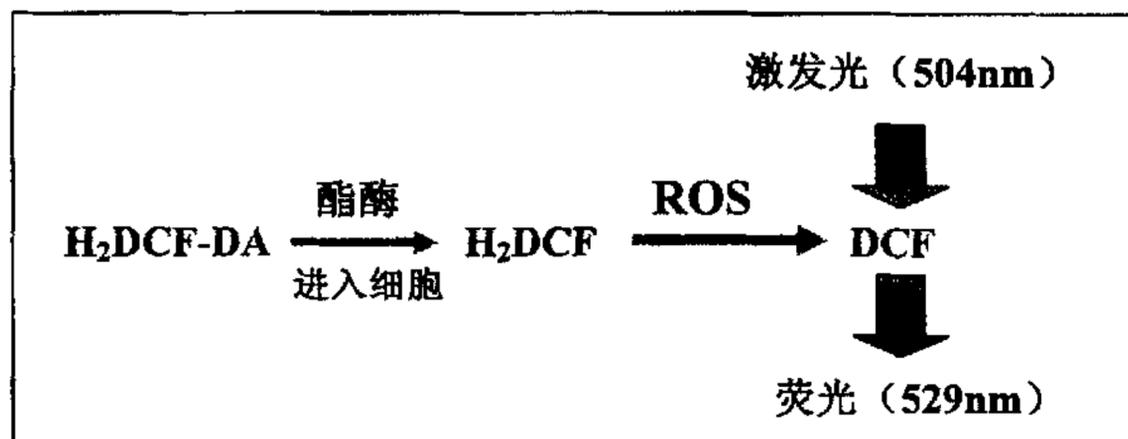


图 2 H₂DCF-DA 的工作原理图

H₂DCF-DA 进入细胞后在细胞内酯酶的作用下脱去乙酸盐基团生成 H₂DCF，原来无荧光的后者可被细胞内的活性氧所氧化而生成 DCF，后者可在适合的激发光激发下发射出绿色的荧光（见图 2）。DCF 荧光的强度与 ROS

的产量成正比，而其位置分布反映了 ROS 的产生位置。

4. 研究背景与意义

国内外研究中对于活性氧的检测大多采用传统的检测方法，因而受到了很大的限制。由于该探针最初应用距今只有短短的十几年，因而在激光医学的研究领域中尚未得到广泛的应用，国外仅在近年来出现了几篇将其应用于光动力学研究的文献报道，应用于激光医学的研究尚有许多问题亟需解决。

通过本系列研究可建立一套完整的、适用于细胞光生物学研究的 ROS 检测系统，此方法操作简便，可在单细胞水平对细胞内 ROS 进行定位定量研究，实时动态的显示 ROS 的产生情况，具有不可比拟的优势；直接对弱激光照射以及光动力反应过程中的 ROS 产生情况进行监测，可对弱激光治疗研究领域中的悬而未决的效应机制问题做出合理的解释，并有助于明确光动力损伤的靶位点，揭示细胞光动力损伤效应的规律。

5. 研究内容

(1) 比较 LSCM 和 CCD 荧光显微镜采集到的细胞 DCF 荧光图像的成像质量，选择最佳的荧光图像采集设备；衡量并评价荧光显微镜的高压汞灯作为细胞光生物学研究的可行性；建立适合本研究的图像处理与分析的方法。

(2) 应用建立的荧光探针 ROS 检测系统，研究单纯照光条件下 ECV 304 细胞内 ROS 的产生情况，并对其在细胞内的产生位置作深入研究。

(3) 应用建立的荧光探针 ROS 检测系统，研究血卟啉单甲醚介导的光动力反应过程中 ECV 304 细胞内 ROS 产生的动态变化，并通过与单纯对照组的比较来反映其 ROS 产生的规律。

第一部分 荧光探针活性氧检测技术应用于 细胞光生物学研究的实验系统的建立

一、荧光图像采集系统 与实验光照系统的建立与评价

引 言

随着自由基研究的迅速发展,活性氧作为十分重要的自由基^[1],在激光医学相关研究中的作用日益凸显出来。然而常规的 ROS 检测方法的缺陷限制了我们对 ROS 进一步的深入研究^[2,3]。荧光探针的使用历史迄今已有一百余年,出现了近千种不同功用的荧光探针^[4]。在荧光图像采集技术上,共聚焦显微成像技术和 CCD 显微图像技术作为目前比较成熟的技术,已得到广泛的应用^[5,6,7]。本部分拟针对激光医学实验研究的特殊性并结合本研究的特点,选择合适的荧光图像采集设备和实验照射光源。

实 验 材 料

1. 细胞株

人脐静脉内皮细胞株 ECV 304: 由本室保存。

2. 实验试剂

二甲基亚砷 (DMSO): 北京石鹰化工厂产品。

DMEM 培养基: 美国 Gibco 公司产品。

胎牛血清: 美国 Gibco 公司产品。

PBS 液: 北京化学试剂公司产品。

胰蛋白酶: 美国 Gibco 公司产品。

0.9%氯化钠注射液：北京双鹤药业股份有限公司产品。

3. 荧光探针

H₂DCF-DA：美国 Fluka 公司产品，用 DMSO 配制成 1 mmol/L 的贮存液，-20℃ 下避光保存备用。

4. 实验仪器

Olympus IX71 型生物荧光显微镜，日本奥林巴斯株式会社产品，其照明光源为 100 W 卤素灯，激发光源为 100 W 超高压汞灯，可加各种中性衰减片调节激发光强度以避免强光对细胞的光损伤。

SPOT RT color 型致冷 CCD，美国 Diagnostic 公司产品，通过标准 C 型接口与荧光显微镜侧面光口连接。面阵像素数为 1600×1200，单位像素面积为 7.4 μm×7.4 μm。CCD 工作时致冷至-12℃。以上仪器由解放军总医院医学实验测试中心提供使用。实验系统照片见图 1-1。

Radiance 2100TM 型激光扫描共聚焦显微镜，美国 Bio-Rad 公司产品，其所用的倒置显微镜为 Nikon TE300 型生物显微镜，由军事医学科学院仪器分析测试中心提供使用。实验系统照片见图 1-2。

LLM-3 型激光功率计：中国计量院产品。由中国人民解放军激光计量测试研究总站标定，532 nm 时的校正系数为 2.03。

35 mm 荧光显微镜专用培养皿：美国 Corning 公司产品。

35 mm LSCM 专用培养皿：由 35 mm 荧光显微镜专用培养皿自行改装。

测量直尺：浙江博大文具厂产品（量制浙字第 24220338 号）。

超净工作台：北京四达净化技术研究所产品。

CO₂ 恒温孵育箱：美国 NAPCO 公司产品。

数字式超级恒温浴槽：成都仪器厂产品。

实验方法

1. 两种荧光图像采集设备的比较

1.1 细胞培养

取生长状态良好的细胞,用 0.3%胰酶消化后,吹打制成单细胞悬液,用含 5%血清的 DMEM 培养液将细胞密度调整为 5.0×10^5 个/ml,并将之接种于 35 mm 培养皿(或 LSCM 专用 35 mm 培养皿)中,每皿加入 2 ml,置于 37°C、含 5%CO₂ 孵箱中孵育 24 h。

1.2 探针孵育

在孵育结束前 30 min 更换 DMEM 培养液,将 H₂DCF-DA 加入 35 mm 培养皿中,使其孵育终浓度为 10 μmol/L。孵育结束后,用 PBS 冲洗三遍,并弃去残液。

1.3 光源照射

荧光激发光源为 100W 超高压汞灯,光照同时完成荧光图像的采集。

1.4 荧光图像的采集

1.4.1 LSCM 系统采集 DCF 的荧光图像

采用物镜为×100 油镜(Nikon Plan Fluor oil immersion lens, NA 1.4)。光电倍增管接收图像并送入计算机供图像处理与分析。输出的图像文件的像素数为 512×512,灰度级为 8 位,灰度范围 0-255。LSCM 的主要工作参数设定如下:λ EX=488 nm, Laser Power: 49.3%, Iris 4.6 mm, Gain: 33.60, Black: 1.50, Emission Filter: HQ 515/30。

1.4.2 CCD 显微系统采集 DCF 的荧光图像

采用×60 (NA 0.7) 荧光物镜,CCD 作为图像采集设备,接于荧光显微镜的侧面光口,并通过控制卡与计算机连接,所采集图像经控制卡进行模数转换后送入计算机供存储和处理。CCD 输出的图像文件为 16 位灰度图像(TIF 格式),灰度范围 0-65535。选择激发滤色镜为 BP460-490,吸收滤色镜为 BA515,分光镜为 DM500,另加一绿通道液晶滤光片,增益 1,曝光时间 5 s。

2. 汞灯作为照射光源的可行性

2.1 汞灯输出功率的测试

以 Olympus IX71 型生物荧光显微镜为研究对象, 使用激光功率计测量汞灯经显微镜光路系统(不同衰减片、不同物镜)并透过 35 mm 培养皿后的最终输出功率。

2.2 汞灯输出功率稳定性与光斑直径的测试

在实验进行过程中不同的时间点: 0 min、10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min, 使用功率计测量的输出功率, 共计测量 3 次, 取平均值, 以考察汞灯输出功率稳定性。并使用直尺测量 35 mm 培养皿内细胞可实际接受照射的光斑直径, 测量 3 次取平均值。

实验结果

1. 两套系统采集荧光图像的比较

利用 LSCM 和 CCD 荧光显微镜两套系统采集得到的荧光图像见图 1-3。

通过对图 1-3 中的 A 与 B 的比较, 显示两者采集的荧光图像强度适中, 均清晰的呈现了 DCF 荧光的分布位置, CCD 荧光显微镜在对于 DCF 荧光的成像质量上优于 LSCM。但是由于 LSCM 采集荧光图像所需的时间较长, 激光照射的强度高, 此时的荧光图像为光照 20 余秒后的情况, 无法抓取早期变化, 在荧光图像上表现为细胞内整体的 DCF 荧光强度增高, 图像对比度稍差; 而 CCD 荧光显微镜采集荧光图像的时间短, 成像质量较高, 在作连续快速的采集时, 仍能清晰的呈现细胞内的细节信息。

2. 汞灯作为照射光源的可行性

2.1 汞灯输出功率的测试

以 Olympus IX71 型生物荧光显微镜为研究对象, 使用激光功率计测量汞灯经显微镜光路系统(不同衰减片、不同物镜)并透过 35 mm 培养皿后的最终输出功率。

2.2 汞灯输出功率稳定性与光斑直径的测试

在实验进行过程中不同的时间点: 0 min、10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min, 使用功率计测量的输出功率, 共计测量 3 次, 取平均值, 以考察汞灯输出功率稳定性。并使用直尺测量 35 mm 培养皿内细胞可实际接受照射的光斑直径, 测量 3 次取平均值。

实验结果

1. 两套系统采集荧光图像的比较

利用 LSCM 和 CCD 荧光显微镜两套系统采集得到的荧光图像见图 1-3。

通过对图 1-3 中的 A 与 B 的比较, 显示两者采集的荧光图像强度适中, 均清晰的呈现了 DCF 荧光的分布位置, CCD 荧光显微镜在对于 DCF 荧光的成像质量上优于 LSCM。但是由于 LSCM 采集荧光图像所需的时间较长, 激光照射的强度高, 此时的荧光图像为光照 20 余秒后的情况, 无法抓取早期变化, 在荧光图像上表现为细胞内整体的 DCF 荧光强度增高, 图像对比度稍差; 而 CCD 荧光显微镜采集荧光图像的时间短, 成像质量较高, 在作连续快速的采集时, 仍能清晰的呈现细胞内的细节信息。

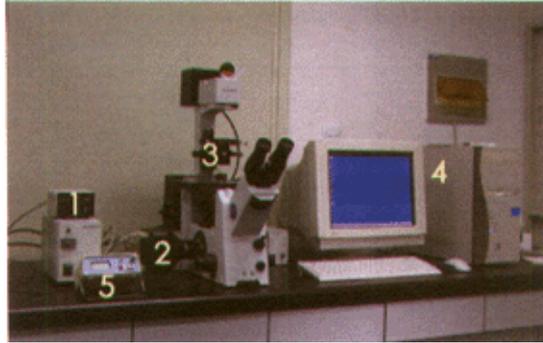


图 1-1 CCD 荧光显微镜实验系统照片

1.电源 2.CCD 3.Olympus IX 71 型荧光显微镜 4.计算机 5.激光功率计

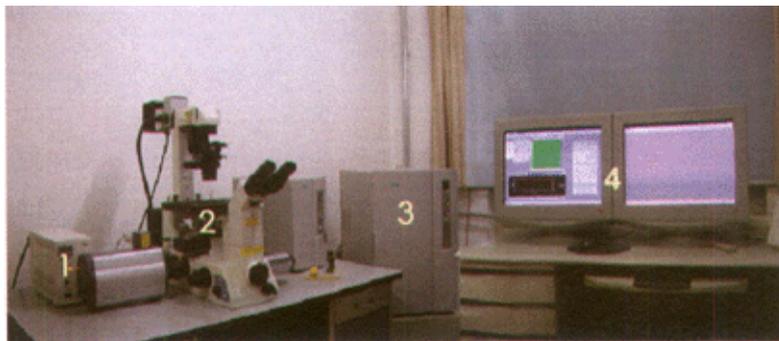


图 1-2 激光扫描共聚焦显微镜实验系统照片

1.电源 2.Nikon TE300 型荧光显微镜 3.激光光源 4.计算机

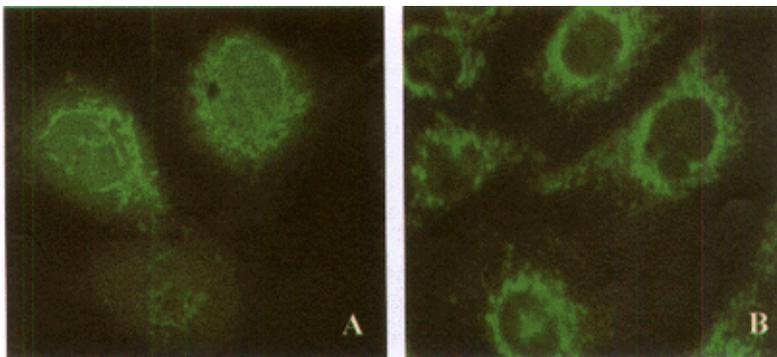


图 1-3 共聚焦显微镜和 CCD 荧光显微镜采集的 DCF 荧光图的比较

A: 共聚焦显微镜成像图 ($\times 100$ 油镜) B: CCD 荧光显微镜成像图 ($\times 60$ 荧光物镜)

2. 汞灯作为照射光源的可行性评估

2.1 汞灯输出功率的测试

汞灯经显微镜光路系统（不同衰减片、不同物镜）并透过 35 mm 培养皿后的最终输出功率列于表 1-1。

表 1-1 不同物镜不同激发模块输出功率 (mW)

		×10	×20	×40	×60
蓝色	强衰减片	6.192	3.654	1.995	0.997
	弱衰减片	25.822	15.184	8.262	4.141
绿色	强衰减片	31.221	19.102	10.373	5.704
	弱衰减片	127.748	78.074	42.407	23.061

2.2 汞灯输出功率稳定性与光斑直径的测试

因为在采集 DCF 荧光中所使用的激发光源为蓝色，观察细胞时采用的是 ×60 荧光物镜，所以此条件下，抽取了 7 个实验时间点测量此时的输出功率，三次的平均值列于表 1-2。

表 1-2 不同时间点汞灯蓝色激发模块输出功率 (mW)
(×60 荧光物镜, 强衰减片)

时间 (min)	0	10	20	30	40	50	60
输出功率	0.981	0.991	0.987	0.991	0.979	0.978	0.991

经测量×60 荧光物镜时，蓝色激发模块输出时，35 mm 细胞培养皿内受到光照的直径约为 1 mm。计算培养皿内细胞所实际接受的光照功率密度约为 100 mW/cm²。经过上述粗略的测量，证明荧光显微镜的汞灯输出功率稳定，光斑均匀，×60 荧光物镜时，蓝色激发模块输出的功率密度完全符合实验中作为照射光源的要求。

讨 论

LSCM 系统与 CCD 荧光显微镜系统相比, 优点在于纵向空间分辨率及对激发波长与荧光探测波长的精确选择上。LSCM 对细胞内单一薄层切面的亚细胞结构聚焦成像, 也即实现单细胞的光学断层成像; 而荧光显微镜则不可避免地存在物镜焦面前后多层切面干扰光的混叠误差。在对多种荧光信号的选择激发、光谱分离与选择探测方面, LSCM 采用单一波长的激光器光源与窄通带的带通型滤光片, 而此系统采用带通型激发滤色镜选择汞灯的激发波长, 荧光信号的选择探测依靠长波通型吸收滤色镜外加 CCD 面阵前的 RGB 三通道选择。相比之下, LSCM 系统既能更好地避免对荧光物质的交叉激发, 又能对激发出的荧光信号在进入探测器前进行更加精细的光谱选择与分离, 更有利于彻底消除多种荧光间的光谱串色干扰。

但 LSCM 的参数较多, 包括 Confocal (共聚焦)、Pinhole (针孔)、Detector (检测器)、PMT (光电倍增管)、Step size (扫描步长) 等十余个, 这些参数的选择或设置, 彼此之间有着非常密切的关系, 因而, 对各个参数的选择应当综合考虑。而且除了要考虑各个参数之间的关系外, 还要考虑所要观察的细胞类型及大小、荧光染料种类及浓度、是做形态学观察还是做细胞的生理、生化指标的动态变化观测等诸多因素^[1]。参数选择的好坏最终决定了采集到的荧光图像的质量。

CCD 荧光显微镜在对于 DCF 荧光的成像质量上优于 LSCM, 究其原因可能是由于本研究中 DCF 荧光强度变化相对较快, LSCM 在成像时, 由于 PMT 点扫描时间较长, 激光照射强度高, 很难抓取 DCF 荧光的早期变化; 在进行连续动态采集时, 使用 LSCM 成像, 由于缩短了扫描时间, 其采集的图像只能用于图像分析时使用, 而无法分辨细胞内的细节。而 CCD 荧光显微镜由于其 CCD 的面阵大, 使其成像视野大, 成像时间大大缩短, 细节呈现效果较好^[2]。另外考虑到设备普及率、操作使用的便捷性、实验费用成本、以及采图时间等方面比较, CCD 荧光显微镜均较 LSCM 具有明显优势。

综合考虑已上种种因素，我们在本实验研究中选择了 CCD 荧光显微镜作为主要的研究工具。

激光作为特殊的光源，具有单色性好、方向性好、相干性好、偏振性好、亮度高等特点^[3]。狭义的激光医学中所应用到的光源指的激光光源。不过这对于实验条件的要求高，一个实验室很难具备所有应用于激光医学研究中所需的不同波长的光源，而且涉及到光源照射系统与显微镜的吻合问题等诸多问题。

实际上，只要光强度足够，包括激光（脉冲或连续）、氙灯、汞灯在内的许多光源均可激发光敏剂而产生活性氧。我们在实验中拟将荧光显微镜的荧光采集激发光作为照射光源，这里即对荧光显微镜的汞灯经其光路和物镜系统后的各项指标进行了检测，以衡量其作为光源照射的可行性。测量激光功率的方法最常用的是光热法和光电法，但是两者所使用的激光功率计都有一定的响应波长范围^[4]，由于受到实验仪器的限制，我们选用了 LLM-3 型激光功率计（532nm 时的校正系数为 2.03），对其进行了粗略的测试。

在激光医学的实验中，光源的照射剂量是十分重要的。可是在应用荧光探针技术时，无论是 CCD 荧光显微镜还是激光扫描共聚焦显微镜，在采集荧光图像的时候都需要激发光的参与，而且为了保证采集到的荧光图像的质量，激发光的强度往往很高，这对于准确计量光照射剂量是不利的。所以在本研究中光源照射的时机最好选在荧光图像采集的同时，两者同步进行。如果将荧光显微镜用于荧光采集时的激发光源作为照射光源，对受试细胞进行照射，同时采集 DCF 的荧光图像。这种方法使得实验过程更为简单，光照射剂量容易准确控制，实验的精确性高，并可对照光过程中的 DCF 荧光产生情况进行实时动态观察。

生物荧光显微镜除了具有一般光学显微镜的机械结构外，它具有激发光源，滤片系统和特殊的光学镜头。荧光显微镜在装置上的重要部件就是要有能提供充分的特定波长的光源装置，使受照射的物体得到理想的激发而发出强的荧光。为达到这一要求，需借助滤光片把激发光的光谱限定在这一特定的波长区域内，而把伴随发出的可见光全部吸收或反射掉。荧光显微镜的激发光源常选用大功率超高压汞灯，它是用石英玻璃制作，中间呈球形，内充一定数量的

汞,工作时由两个电极间放电,引起水银蒸发,球内气压迅速升高,当水银完全蒸发时,可达50~70个标准大气压力,这一过程一般约需5~15 min。超高压汞灯的发光是电极间放电使水银分子不断解离和还原过程中发射光量子的结果。它发射很强的紫外和蓝紫光,足以激发各类荧光物质,因此,为荧光显微镜普遍采用。

大功率超高压汞灯的光源中波长380 nm、449 nm、550 nm、600 nm的谱线为主,还含有少量的红外线(详见图1-4,图1-5)。

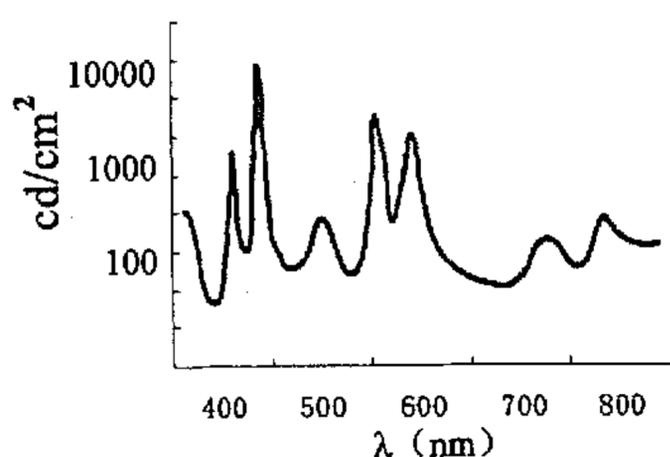


图 1-4 高压汞灯的发光波长曲线

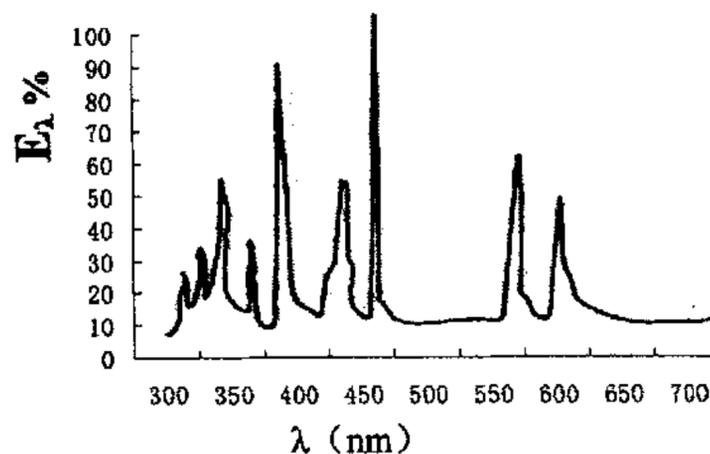


图 1-5 高压汞灯光源的相对能量分布曲线

(引自: 舍英, 伊立齐, 呼和巴特尔主编. 《现代光学显微镜》北京: 科学出版社, 1996)

从某种意义上看,光动力学反应与荧光探针技术有很大的相似性。两者都需要光源辐照来提供能量,吸收一定能量的光敏剂和荧光探针都从基态跃迁到激发态。不同的是最终能量的转化方式,激发态光敏剂可经过氢原子或电子转移,直接同底物或溶剂反应,或者将能量传递给分子氧,分别发生I型、II型光敏反应^[5];而激发态荧光探针发生无辐射跃迁,发射出比激发光波长长的荧光。

实际上发生无辐射跃迁和辐射跃迁是相互竞争,又同时出现的。光敏剂在较高的浓度时可以发射肉眼可见的荧光,而荧光探针在一定的条件下,也可以发生光敏化反应。在光动力学研究中,这种相似性可以使我们更好地理解荧光探针技术。然而,同时也为我们制造了种种麻烦和限制,两者掺杂在一起,有

时是很难区分开的，这就要求我们在实验设计中严谨思维，在实验过程中细心观察，对于我们的实验结果进行合理的分析，不被伪像所迷惑。

新型荧光探针 $H_2DCF-DA$ 目前在 ROS 的研究领域中已得到较广泛的应用^[6,7]，近两年来国外也出现了几篇将其应用于光动力学研究的文献报道^[8,9]。这种利用荧光探针应用于检测活性氧的技术已广泛应用于生物医学研究中，在本研究中我们将其应用与激光医学研究中，主要考虑到此方法的优点在于^[10]：

(1) 实验过程快速：较生化方法和流式细胞仪检测法快速。

(2) 样品处理简单：生化方法和流式细胞仪检测法需要的细胞数多，样品处理过程复杂^[11]。采取本方法仅需在经荧光染料负载的 35 mm 细胞皿上选定一个视野即可检测。

(3) 实验结果准确：检测胞外氧耗或释放到胞外的超氧离子和 H_2O_2 的化学方法无法检测细胞内部分超氧离子和 H_2O_2 。

(4) 得到数据全面：本方法不仅可如生化法和流式细胞仪一样得到样品的总体结果，而且可显示各细胞的荧光强度的动态变化，将检测提高到单细胞水平，和其它细胞器特异探针共同使用，还可得到活性氧在亚细胞结构内的产生位置信息。

因此目前大部分学者认为“光敏剂的细胞定位决定了光敏损伤的亚细胞定位”，其主要依据是因为 ROS 寿命极短（在细胞内通常不超过 $0.6 \mu s$ ）^[12]，作用半径相当小（扩散距离不到 70 nm），所以只能与周围较小半径内的物质发生反应，破坏邻近的细胞结构。然而这些都是间接的推导，目前尚缺乏有力的证据。本研究建立的实验方法，为检测单细胞水平细胞内 ROS 的产生提供了新的行之有效的途径，更为简便、直观、准确。而且国外已有文献报道应用此方法检测活体组织内 ROS^[13]，这些都值得我们进一步的关注。

不过这种方法也有一定的局限性。在激光医学的研究中，光源照射时间往往较长，我们的实验结果显示这种荧光探针的光稳定性稍差，而且当使用较大浓度的光敏剂时，荧光图像无法显示细胞内的细节，这些都影响了其在激光医学实验中的广泛应用。

二、荧光图像分析与处理技术

引 言

对于 DCF 荧光强度的动态监测的研究可通过对原始图像的计算获得各时间点的细胞内 DCF 的平均荧光强度,方法简单准确。但是为确定 DCF 荧光在细胞内的分布位置,须对同一细胞内 DCF 荧光分布图像与细胞器探针荧光分布图像进行分析与处理。目前对于荧光图像的分析与处理方法有多种方法,本部分研究分别对其作一简单介绍,比较各种方法之间的优缺点,并根据本实验采集到的荧光图像的特点,应用 Matlab 6.1 编写程序^[20,21,22],创建了细胞器-细胞荧光强度比值法,实现 DCF 荧光亚细胞定位研究的定量分析处理。

1. 荧光图像的预处理

首先需对采集到的荧光图像进行预处理^[23,24,25],目的是提高图像显示质量,突出有用图像信息。

1.1 荧光图像输出类型与格式

荧光显微成像系统输出的结果图像文件为 TIF 格式。CCD 荧光显微镜系统的输出结果为 16 位灰度图像,灰度范围 0-65535,而 LSCM 系统的输出结果为 8 位灰度图像,灰度范围 0-255。

1.2 荧光图像裁剪

CCD 荧光显微镜系统与 LSCM 系统的视野范围很大,一幅原始结果图像往往包含众多细胞。为方便快捷地显示与处理单细胞图像,以及去除多余背景而节省存储空间,通过图像裁剪分割出各个单细胞图像。

1.3 荧光图像滤波去噪

应用中值滤波等图像滤波方法,可有效去除细胞荧光图像中的噪声。

1.4 荧光图像增强

细胞荧光图像固有的特点为灰度水平较低,对比度较差。应用灰度变换等

图像增强手段,可有效改善图像对比度,突出图像中的有用信息,获得便于人眼观察的视觉效果。

1.5 伪彩色显示

人眼对彩色的分辨能力远远高于对灰度级的分辨能力。选用适合人眼视觉特性的伪彩色调色板,对单细胞荧光图像进行伪彩色显示,可更有效地强化对图像细节部分的表达。

为适应对荧光物质的观察习惯,还采用红、绿两种调色板,对荧光图像进行符合其荧光发射波长的伪彩色显示,以达到与显微镜下直接目视观察相同的视觉效果。在本研究中,绿色调色板用于显示发射绿色荧光的 DCF 的荧光图像,红色调色板用于显示发射红色荧光的线粒体探针的荧光图像。此种伪彩色显示方法是下文所述伪彩色融合定性分析方法的基础。

图 1-6 即是按照上述方法在实验中对采集到的原始图像进行荧光图像预处理的示例。

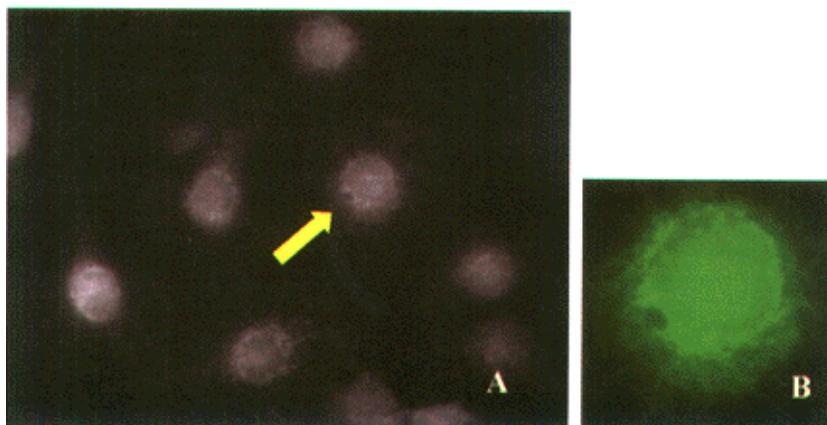


图 1-6 图像预处理的示例

图 A: 原始图像; B: A 中箭头所指细胞经处理后的图像

2. 荧光分布定位技术

对于一种荧光在细胞内分布位置进行定位,需要通过和另一种已知分布位置的探针的荧光进行比较。包括定性方法和定位方法。

2.1 定性方法

截止目前,国外大多数同类研究对荧光图像的分析与处理均采用定性分析方法^[26,27]。主要方法包括有以下三种:

2.1.1 直接观察比较法

即对同一单细胞的两幅荧光图像进行直接目视观察,比较细胞内光敏剂的空间分布与细胞器位点空间分布的相似性。

2.1.2 伪彩色融合法

将同一单细胞的两幅荧光图像融合为一幅 RGB 格式的真彩色图像。一般将其中一幅荧光图像数据送入 RGB 图像的 R 通道,将另一幅荧光图像数据送入 RGB 图像的 G 通道。红色的高灰度区域和绿色的高灰度区域分别表示两种荧光探针的分布区域。融合后的 RGB 图像中,红色亮区域与绿色亮区域重叠的区域经过红绿互相混色而显示为黄色亮区域,即明显标示出两种荧光探针细胞内位置分布的空间重叠区域。

2.1.3 改进型伪彩色融合法

上述伪彩色融合方法中,由于两幅图像的灰度水平、灰度分布直方图存在差异,可能导致以下两种情况:

一方面,某区域在一幅图像中属高灰度区域,而在另一幅图像中属低灰度区域,或在两幅图像中均属低灰度区域,说明此区域本不属于两种荧光物质分布的重叠区域;但两幅图像在此区域的灰度水平却相同或相近,使得融合图像在此区域也显示出表示重叠区域的黄色。

另一方面,某区域在两幅图像中均属高灰度区域,说明此区域本来属于两幅图像荧光分布的重叠区域,融合图像中本应在此区域出现表示重叠区域的正黄色;但两幅图像在此区域的灰度水平却有一定差异甚至相差很大,使得融合图像中此区域无法醒目地显示出正黄色,而是明显地偏红色或偏绿色,与周围其它区域混杂在一切不容易分辨。

以上两种情况均会严重干扰对融合图像中重叠区域的视觉观察与判断,导致错误的分析结果。为此,将此方法做如下改进:

设 A、B 两种探针的荧光图像分别为 A 和 B。某区域在图像 A 中灰度为

I_A ，在图像 B 中灰度为 I_B ，在融合图像中 RGB 三通道的灰度分别为 R、G、B（其中 $B=0$ ）。

设定阈值 m ，划分出两幅图像中的高灰度区域，也即：

- (1) 将图 A 中细胞轮廓内所有像素按灰度高低排序，以灰度最高的前 $m\%$ 像素为高灰度区域 A_1 ，即探针 A 有分布区域；其余像素为低灰度区域 $\sim A_1$ ，即探针 A 无分布区域。
- (2) 将图 B 中细胞轮廓内所有像素按灰度高低排序，以灰度最高的前 $m\%$ 像素为高灰度区域 B_1 ，即探针 B 有分布区域；其余像素为低灰度区域 $\sim B_1$ ，即探针 B 无分布区域。

据此可将细胞区域内部划分为四种子区域，并在融合图像中根据四种子区域的不同意义，分别施以不同的融合方法。即：

- (1) A_1 与 B_1 的交集区域 $A_1 \cap B_1$ ，即为探针 A 与 B 的分布重叠区域。融合图像中此区域灰度值不再简单取做： $R=I_A$ ， $G=I_B$ ，而是改为： $R=G=(I_A+I_B)/2$ 。如此可保证此区域以正黄色显示，而不会偏红色或偏绿色。
- (2) $\sim A_1$ 与 B_1 的交集区域 $\sim A_1 \cap B_1$ ，即为探针 A 无分布而探针 B 有分布区域。融合图像中此区域灰度值取做： $R=0$ ， $G=I_B$ 。
- (3) A_1 与 $\sim B_1$ 的交集区域 $A_1 \cap \sim B_1$ ，即为探针 A 有分布而探针 B 无分布区域。融合图像中此区域灰度值取做： $R=I_A$ ， $G=0$ 。
- (4) $\sim A_1$ 与 $\sim B_1$ 的交集区域 $\sim A_1 \cap \sim B_1$ ，即为探针 A 与 B 均无分布区域。融合图像中此区域灰度值取做： $R=0$ ， $G=0$ 。

上述方法中，通过适当调节阈值 m 的大小，可获得最满意的融合效果，一般 m 取值在 10-20 左右。通过编程对细胞轮廓内图像的灰度分布直方图进行计算，可简便快捷地确定细胞轮廓内荧光灰度最高的 $m\%$ 像素。此前只须用鼠标在细胞荧光图像上勾勒出细胞轮廓即可。

伪彩色融合方法经过以上改进，融合图像中将只显示出探针 A 有分布区域和探针 B 有分布区域，且只有在两区域重叠处才显示黄色，从而有效避免了干扰信息对正确观察判断的影响。

2.1.4 波形比较法

另一种简便易行的定性方法是，在细胞内部感兴趣区域画一条直线路径，画出这条路径上所有像素在两幅图像中的灰度值相对空间坐标的变化起伏曲线，观察比较两条曲线之间的相似程度和相关性。

2.2 定量方法

定性分析方法主观性强，缺少精确量化结果，信息特征不够鲜明，推断结果困难。而定量分析方法可有效弥补定性方法的上述缺陷，深入挖掘图像中蕴含的有用信息特征和动态变化。尤其对于某些具有荧光分布位置弥散的图像，超过人眼分辨力，单纯的定性观察方法往往不易或无法捕捉到具有重要意义的信息，定量方法的优势就更能体现。截止目前，已经报道的此类研究的文献中仅有极少数采用了定量分析的方法^[28]。

2.2.1 相关系数法

采用相关系数法，此方法计算同一单细胞内两幅荧光图像 A 与 B 内各像素的荧光灰度值之间的相关系数。图像 A 与图像 B 的相关系数 r 的计算公式定义如下：

$$r = \frac{\sum_m \sum_n (A_{mn} - \bar{A})(B_{mn} - \bar{B})}{\sqrt{(\sum_m \sum_n (A_{mn} - \bar{A})^2)(\sum_m \sum_n (B_{mn} - \bar{B})^2)}}$$

(其中, $\bar{A} = \frac{1}{mn} \sum_m \sum_n A_{mn}$, $\bar{B} = \frac{1}{mn} \sum_m \sum_n B_{mn}$)

以此相关系数 r 表征两种荧光探针分布的线性相关性。相关系数越接近 1，表示相关性越强，两种荧光探针分布的重叠程度就越大。

2.2.2 细胞器-细胞荧光强度比值法

本课题组提出的细胞器-细胞荧光强度比值法已成功应用于光敏剂亚细胞内分布定位的研究^[29,30,31]。通过定量计算细胞器探针高荧光区域的 DCF 平均荧光强度和细胞区域内的 DCF 平均荧光强度，以两者之间的比值作为衡量细胞器区域 DCF 产量的指标。

对于同一单细胞，具体算法如下：

- (1) 确定细胞区域，也即整个细胞所占像素范围；
- (2) 计算细胞区域内 DCF 荧光灰度均值 I_2 ；
- (3) 细胞区域内所有像素按探针荧光灰度由高至低排序，依次计算前 $m\%$ ($m=2,4,6,\dots,20$) 像素范围内 DCF 荧光灰度均值 I_1 ；
- (4) 计算 m 取不同值时的 I_1/I_2 。

以上步骤中，第(1)步细胞区域的确定，通过在细胞荧光图像上用鼠标手工勾勒细胞整体轮廓实现，其余各步通过设计 Matlab 程序自动执行。

对于荧光分布位置的确定，国内外大多数文献仅使用图像融合技术，利用肉眼观察重合情况，但是这种方法缺乏客观的评价指标，无法进行统计学的分析和处理。本研究设计并采用了细胞器-细胞荧光强度比值法对 DCF 在细胞内的分布位置进行研究。本方法基于：(1) DCF 荧光图像中各像素灰度反映细胞内各位置的 DCF 的含量；(2) 细胞器探针荧光图像的灰度分布反映探针所标记细胞器的分布，高灰度像素为细胞器聚集区域；(3) 细胞器探针荧光高灰度像素范围内的 DCF 荧光平均灰度，与整个细胞所占像素范围内的 DCF 荧光平均灰度之比，反映细胞器聚集区域与整个细胞内的 DCF 含量之比，因此可用于表征细胞器聚集区域的 DCF 相对含量。

划定细胞器聚集区域，即确定探针荧光高灰度像素范围的分割阈值 m ，细分出不同程度细胞器聚集区域(探针荧光灰度最高的前 m 像素)，聚集程度随 m 增大而降低。 I_1/I_2 值随 m 变化，全面反映细胞器不同程度聚集区域的 DCF 相对含量，因此可作为考察 DCF 在细胞内分布位置的量化指标。在所设的各聚集程度下，利用统计学分析考察取到的像素点位置的平均荧光强度比值与细胞平均荧光强度比值的差异是否显著。

小 结

本部分研究对于活性氧检测探针技术应用于激光医学研究涉及到的荧光图像采集设备、光源照射以及荧光图像的分析与处理等问题，分别进行阐述和研究。

由于 DCF 荧光的变化速度较快，而激光扫描共聚焦显微镜的成像时间较长，激发光功率较高，无法反映 DCF 荧光的早期变化，CCD 荧光显微镜却弥补了上述不足，可以得到较为满意的荧光图像，而且在光照射剂量的可控性、实验成本以及操作的简便性、实验仪器的普及程度等方面，CCD 荧光显微镜似乎均优于激光扫描共聚焦显微镜。综合以上种种，选择 CCD 荧光显微镜作为本研究的荧光图像采集系统。

使用荧光显微镜的高压汞灯作为本研究中的照射光源，功率输出稳定，光斑直径满足实验要求，光照射剂量准确，方法简便可靠。

本研究创建的细胞器-细胞荧光强度比值法，可实现对 DCF 荧光亚细胞定位的研究，定量分析处理的结果可靠，优于国内外文献报道中使用的方法。

第二部分 单纯光源照射致 ECV 304 细胞内 活性氧产生情况的初步研究

引 言

根据国外学者提出的假说以及预实验的结果^[32], 对单纯光照过程中 ECV 304 细胞内活性氧的产生情况进行观察, 并进一步确定其产生位置。选择线粒体特异标记探针——MitoFluor Red 589, 主要通过将其与 H₂DCF-DA 共同孵育 ECV 304 细胞, 利用荧光显微镜的分光滤色系统分别采集细胞 DCF 和 MitoFluor Red 589 的荧光图像, 通过后者确定 3 个细胞区域, 即线粒体区、细胞质非线粒体区、细胞核区, 使用细胞器-细胞荧光强度比值法, 计算 DCF 荧光在以上各区的分布情况, 最终确定 DCF 荧光在细胞内分布的主要区域, 以反映单纯光照时细胞内 ROS 的产生位置。

实 验 材 料

1. 细胞株

人脐静脉内皮细胞株 ECV 304: 由本室保存。

人肺癌细胞株 A549: 由中国科学院生物物理所提供。

2. 实验试剂

二甲基亚砷 (DMSO): 北京石鹰化工厂产品。

DMEM 培养基: 美国 Gibco 公司产品。

胎牛血清: 美国 Gibco 公司产品。

PBS 液: 北京化学试剂公司产品。

胰蛋白酶: 美国 Gibco 公司产品。

0.9%氯化钠注射液: 北京双鹤药业股份有限公司产品。

3. 荧光探针

第二部分 单纯光源照射致 ECV 304 细胞内 活性氧产生情况的初步研究

引 言

根据国外学者提出的假说以及预实验的结果^[32], 对单纯光照过程中 ECV 304 细胞内活性氧的产生情况进行观察, 并进一步确定其产生位置。选择线粒体特异标记探针——MitoFluor Red 589, 主要通过将其与 H₂DCF-DA 共同孵育 ECV 304 细胞, 利用荧光显微镜的分光滤色系统分别采集细胞 DCF 和 MitoFluor Red 589 的荧光图像, 通过后者确定 3 个细胞区域, 即线粒体区、细胞质非线粒体区、细胞核区, 使用细胞器-细胞荧光强度比值法, 计算 DCF 荧光在以上各区的分布情况, 最终确定 DCF 荧光在细胞内分布的主要区域, 以反映单纯光照时细胞内 ROS 的产生位置。

实 验 材 料

1. 细胞株

人脐静脉内皮细胞株 ECV 304: 由本室保存。

人肺癌细胞株 A549: 由中国科学院生物物理所提供。

2. 实验试剂

二甲基亚砷 (DMSO): 北京石鹰化工厂产品。

DMEM 培养基: 美国 Gibco 公司产品。

胎牛血清: 美国 Gibco 公司产品。

PBS 液: 北京化学试剂公司产品。

胰蛋白酶: 美国 Gibco 公司产品。

0.9%氯化钠注射液: 北京双鹤药业股份有限公司产品。

3. 荧光探针

H₂DCF-DA: 美国 Fluka 公司产品, 用 DMSO 配制成 1 mmol/L 的贮存液, -20°C 下避光保存备用。

线粒体定位探针 MitoFluor Red 589: 美国 Molecular Probes 公司产品, 用 DMSO 配制成 0.1 mMol/L 的贮存液, -20°C 下避光保存备用。

4. 实验仪器

Olympus IX 71 型荧光显微镜: 日本奥林巴斯株式会社产品, 由解放军总医院医学实验测试中心提供使用。

SPOT RT Color 型致冷 CCD: 美国 Diagnostic 公司产品, 由解放军总医院医学实验测试中心提供使用。

LLM-3 型激光功率计: 中国计量院产品。由中国人民解放军激光计量测试研究总站标定, 532 nm 时的校正系数为 2.03。

35 mm 荧光显微镜专用培养皿: 美国 Corning 公司产品。

超净工作台: 北京四达净化技术研究所产品。

CO₂ 恒温孵育箱: 美国 NAPCO 公司产品。

数字式超级恒温浴槽: 成都仪器厂产品。

实验方法

1. 细胞培养

取生长状态良好的细胞, 用 0.3% 胰酶消化后, 吹打制成单细胞悬液, 用含 5% 血清的 DMEM 培养液将细胞密度调整为 5.0×10^5 个/ml, 并将之接种于 35 mm 培养皿中, 每皿加入 2 ml, 置于 37°C、含 5% CO₂ 孵箱中孵育 24 h。

2. 探针孵育

在孵育结束前 30 min 更换 DMEM 培养液, 将 H₂DCF-DA 加入 35 mm 培养皿中, 使其孵育终浓度为 10 μmol/L。探针双染实验组, 同时加入 MitoFluor Red 589, 孵育终浓度为 100 nmol/L, 共同孵育 30 min。孵育结束后, 用 PBS 冲洗三遍, 并弃去残液。

H₂DCF-DA: 美国 Fluka 公司产品, 用 DMSO 配制成 1 mmol/L 的贮存液, -20°C 下避光保存备用。

线粒体定位探针 MitoFluor Red 589: 美国 Molecular Probes 公司产品, 用 DMSO 配制成 0.1 mMol/L 的贮存液, -20°C 下避光保存备用。

4. 实验仪器

Olympus IX 71 型荧光显微镜: 日本奥林巴斯株式会社产品, 由解放军总医院医学实验测试中心提供使用。

SPOT RT Color 型致冷 CCD: 美国 Diagnostic 公司产品, 由解放军总医院医学实验测试中心提供使用。

LLM-3 型激光功率计: 中国计量院产品。由中国人民解放军激光计量测试研究总站标定, 532 nm 时的校正系数为 2.03。

35 mm 荧光显微镜专用培养皿: 美国 Corning 公司产品。

超净工作台: 北京四达净化技术研究所产品。

CO₂ 恒温孵育箱: 美国 NAPCO 公司产品。

数字式超级恒温浴槽: 成都仪器厂产品。

实验方法

1. 细胞培养

取生长状态良好的细胞, 用 0.3% 胰酶消化后, 吹打制成单细胞悬液, 用含 5% 血清的 DMEM 培养液将细胞密度调整为 5.0×10^5 个/ml, 并将之接种于 35 mm 培养皿中, 每皿加入 2 ml, 置于 37°C、含 5% CO₂ 孵箱中孵育 24 h。

2. 探针孵育

在孵育结束前 30 min 更换 DMEM 培养液, 将 H₂DCF-DA 加入 35 mm 培养皿中, 使其孵育终浓度为 10 μmol/L。探针双染实验组, 同时加入 MitoFluor Red 589, 孵育终浓度为 100 nmol/L, 共同孵育 30 min。孵育结束后, 用 PBS 冲洗三遍, 并弃去残液。

3. 光源照射以及荧光图像采集

采用 60 倍荧光物镜, 荧光激发光源为 100 W 超高压汞灯, 光照同时完成荧光图像的采集。选择激发滤色镜为 BP460—490, 输出波长范围为 460~490 nm。汞灯输出光经过荧光显微镜的光路系统及培养皿底部后细胞所实际接受的功率密度约为 100 mW/cm^2 。

CCD 作为图像采集设备, 接于荧光显微镜的侧面光口, 并通过控制卡与计算机连接, 所采集图像经控制卡进行模数转换后送入计算机供存储和处理。CCD 输出的图像文件为 16 位灰度图像 (TIF 格式), 灰度范围 0-65535。

3.1 连续采集 DCF 探针的荧光图像

选择激发滤色镜为 BP460—490, 吸收滤色镜为 BA515, 分光镜为 DM500, 另加一绿通道液晶滤光片, 增益 1, 曝光时间 5 s, 间隔时间 0 s。

3.2 分别采集同一细胞两种探针的荧光图像

①采集 DCF 探针的荧光图像: 与 3.1 中条件大抵一致, 曝光时间 5 s;

②采集 MitoFluor Red 589 的荧光图像: 选择激发滤色镜为 BP530—550, 吸收滤色镜为 BA590, 分光镜为 DM570, 另加一红通道液晶滤光片, 增益 2, 曝光时间 5 s。

设立单纯探针对照组, 以考察双探针标记时是否存在 DCF 与 MitoFluor Red 589 之间的相互串色。

4. DCF 荧光分布位置的确定

对采集到的同一细胞的两幅荧光图——MitoFluor Red 589 荧光图 A 和 DCF 荧光图 B——采用定量分析方法, 即第一部分中提到的细胞器-细胞荧光强度比值法, 具体计算步骤应用 Matlab 6.1 编程实现。

(1) 计算细胞内 DCF 荧光的平均灰度: 应用图像处理技术, 从图像背景中分割出细胞的形态轮廓, 计算此范围内像素的灰度均值 I_2 。

(2) 细胞内不同区域位置的确定: 应用图像处理技术, 从图像背景中分割出细胞核的形态轮廓; 在图 A 中根据探针荧光强度确定探针所标记的线粒体位置。具体方法: 设定参数 m (可调: 在确定细胞区域时选择 m 分别为 2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%、20%), 图 A 中细胞内各像素

点按灰度大小由高到低排列，取灰度最高的前 m 像素，作为线粒体位置所在像素；细胞浆非线粒体区为细胞轮廓内除去细胞核以及线粒体的区域。

(3) 计算细胞内不同区域中 DCF 荧光的平均灰度：根据 (2) 分割出的不同细胞区域像素，计算图 B 中相应位置像素的灰度均值 I_1 。

I_1/I_2 为细胞分区内 DCF 荧光的平均强度与细胞内 DCF 荧光的平均强度之比，用于表征 DCF 分布于此细胞器的情况，数值越大表示分布越多。

5. 统计学处理

实验数据用 SPSS 11.0 统计软件处理，各组之间的比较分别采用两因素及单因素方差分析， $P < 0.05$ 表示差异显著，有统计学意义。每组选取的细胞样本数为 14。

实验结果

图 2-1 中由 A 到 H 显示的是同一视野中各时间段 ECV 304 细胞内 DCF 荧光的变化情况，曝光时间 5 s，共计观察时间 40 s。随着照射时间的延长，细胞内 DCF 荧光强度逐渐增加，线性结构的呈现亦逐渐清楚，细胞质核周区域在光源照射后荧光强度明显高于细胞内其它区域。但是随着照射时间进一步延长，其分布失去特异性，逐渐由集中的区域向周围弥散。

线粒体定位探针 MitoFluor Red 589，其在绿光激发下发射红色荧光（激发峰 588 nm，发射峰 622 nm），利用荧光显微镜和 CCD 的分光系统可以很好地将其与 DCF 的绿色荧光区分开，DCF 与 MitoFluor Red 589 之间不存在相互串色。

图 2-2 为使用探针 $H_2DCF-DA$ 与 MitoFluor Red 589 共同孵育 ECV 304 细胞得到的荧光探针双染图。比较其中的图 A 和图 B，可以看到两者的荧光分布位置十分相似。图 C 为使用改进型伪彩色融合法得到的图 A 与 B 的融合图，这幅图中的黄色部分代表了两者重合的区域，清楚的显示两者的大部分区域是重合的。在另一种细胞系——人肺癌细胞株 A549 细胞中，我们也观察到同样的现象（见图 2-3）。

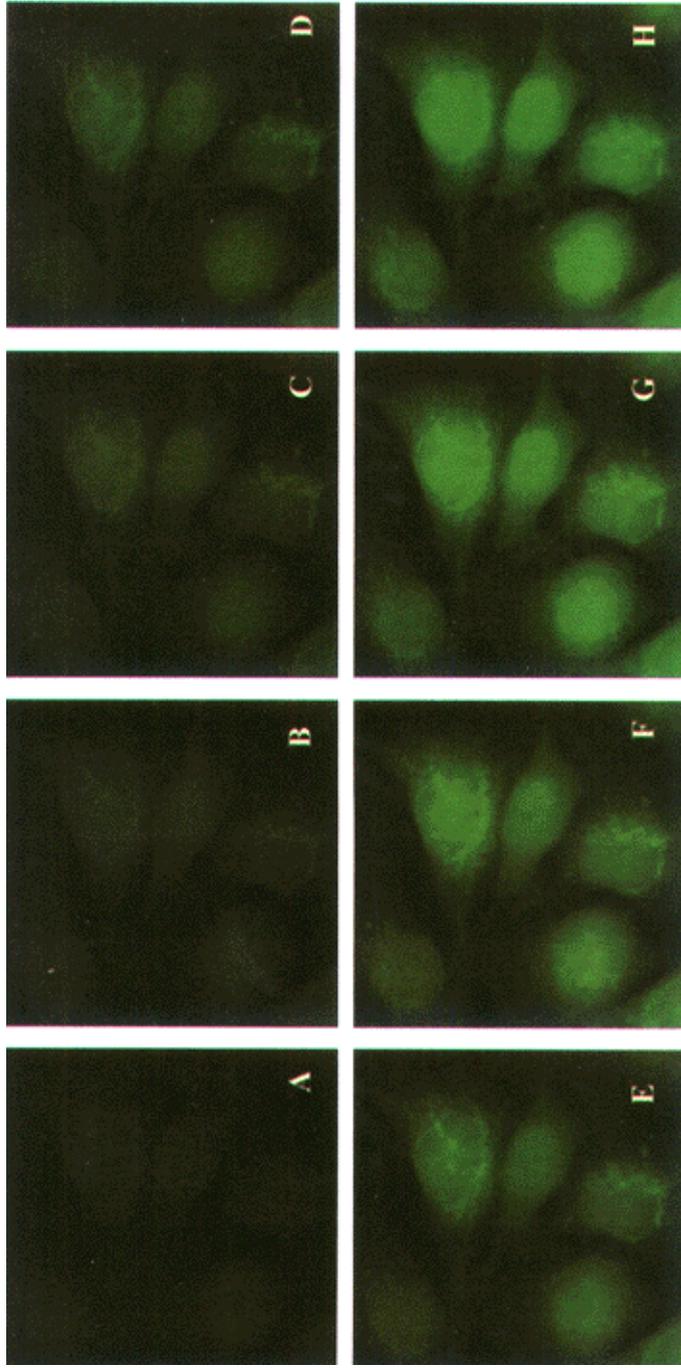


图 2-1 单纯光照时不同时间段同一视野内 ECV 304 细胞内 DCF 荧光图 (曝光时间 5 秒, 间隔时间 0 秒)

Fig. 2-1 The fluorescent images of DCF at different light irradiation time
in the same visual field of ECV 304 cells during light irradiation (exposure time 5 s, time interval 0 s)

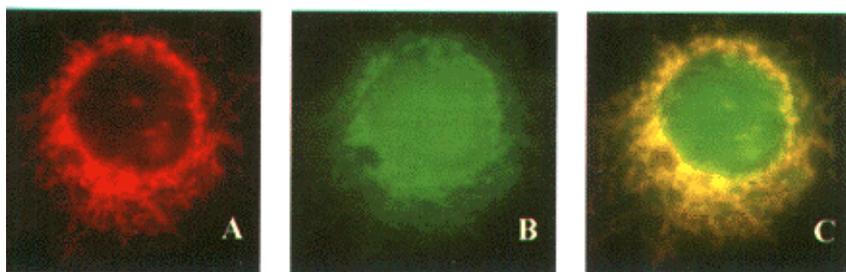


图 2-2 ECV 304 细胞 $H_2DCF\text{-}DA$ 与 MitoFluor Red 589 双染图

A: MitoFluor Red 589 荧光图 the fluorescent image of MitoFluor Red 589

B: DCF 荧光图 the fluorescent image of DCF

C: A 与 B 融和之后的图像 the overlay image of A and B;

Fig. 2-2 The double labeled images of $H_2DCF\text{-}DA$ and MitoFluor Red 589 of ECV 304 cell

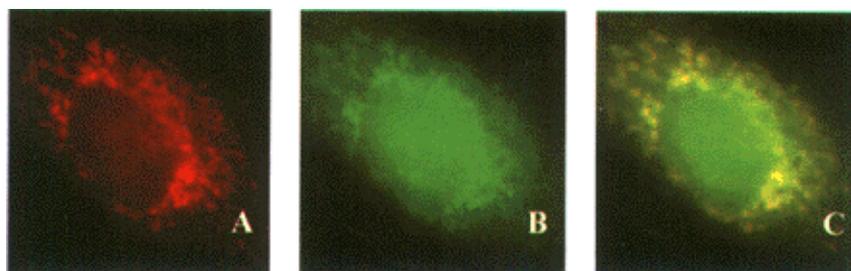


图2-3 A549 细胞 $H_2DCF\text{-}DA$ 与MitoFluor Red 589 双染图

A: MitoFluor Red 589 荧光图 the fluorescent image of MitoFluor Red 589

B: DCF 荧光图 the fluorescent image of DCF

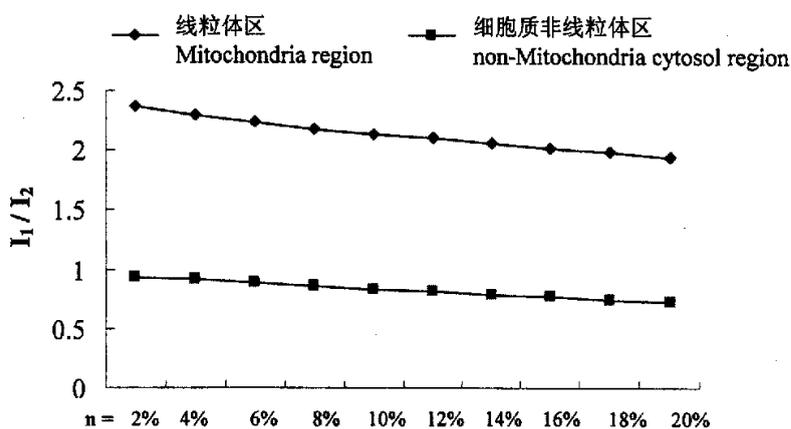
C: A 与 B 融和之后的图像 the overlay image of A and B;

Fig. 2-3 The double labeled images of $H_2DCF\text{-}DA$ and MitoFluor Red 589 of A549 cell

不同参数 m 取值时不同细胞区域的 I_1/I_2 值列于表 2-1, 并根据上述数据绘制图 2-4, 显示: 随 m 增大, 计算区域由探针高荧光区域向低荧光区域扩展, 细胞器聚集程度降低, 两个区域内 I_1/I_2 值亦相应的减小。通过对 m 不同取值时两个区域内 I_1/I_2 值进行两因素方差分析, 两者之间差异有显著意义 ($P=0.0000, <0.05$)。

表 2-1 不同参数 m 取值时不同细胞区域的 I_1/I_2 值

m 值 (%)	线粒体区	细胞质非线粒体区
2	2.369 \pm 0.24	0.941 \pm 0.085
4	2.295 \pm 0.222	0.915 \pm 0.086
6	2.235 \pm 0.205	0.889 \pm 0.086
8	2.184 \pm 0.200	0.864 \pm 0.086
10	2.141 \pm 0.202	0.840 \pm 0.086
12	2.100 \pm 0.207	0.816 \pm 0.086
14	2.061 \pm 0.207	0.792 \pm 0.086
16	2.023 \pm 0.212	0.769 \pm 0.085
18	1.985 \pm 0.216	0.747 \pm 0.084
20	1.949 \pm 0.221	0.725 \pm 0.083

图 2-4 不同 m 取值时 ECV 304 细胞内不同区域 I_1/I_2 值Fig. 2-4 The value of I_1/I_2 in different cellular regions of ECV 304 cell with the variation of m value

将 $m=20\%$ 时的线粒体区、细胞质非线粒体区内 I_1/I_2 值与细胞核区内 I_1/I_2 值进行两两比较，经统计分析，显示三者之间的差异有显著意义 ($P=0.0000, <0.05$)，见图 2-5。据此，推断 DCF 荧光增强的区域明显集中于线粒体。

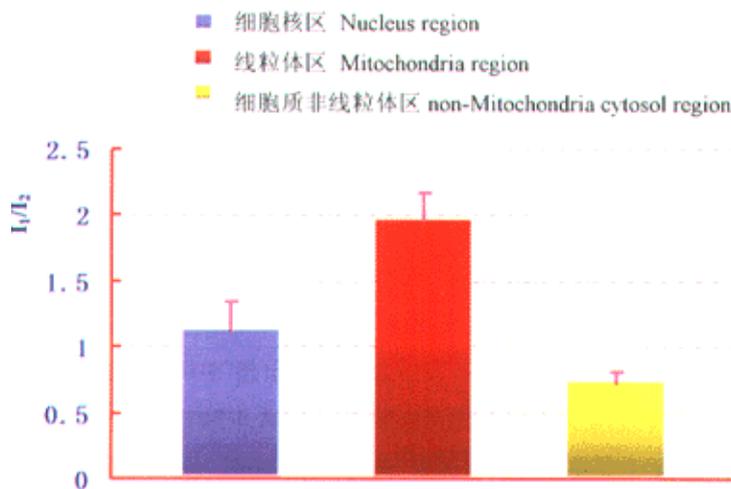


图 2-5 ECV 304 细胞内不同区域 I_1/I_2 的比较 ($m=20\%$)

Fig. 2-5 The comparison of I_1/I_2 value in different cellular regions of ECV 304 cell

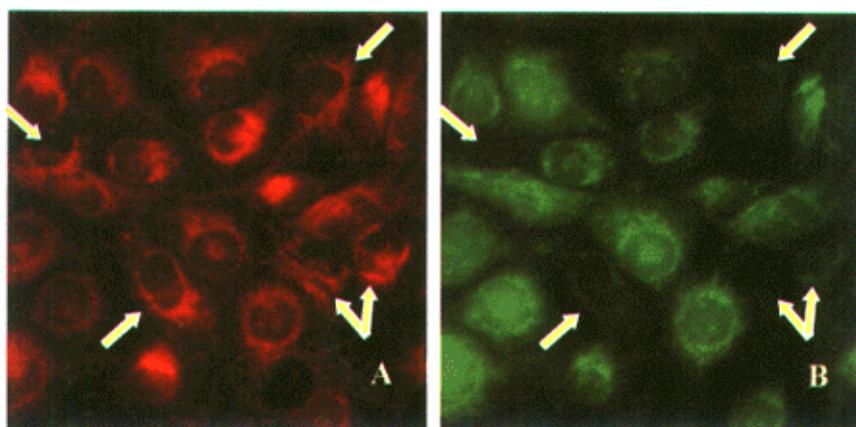


图2-6 ECV 304 细胞 $H_2DCF-DA$ 与 MitoFluor Red 589 双染图

A: MitoFluor Red 589 荧光图 the fluorescent image of MitoFluor Red 589

B: DCF 荧光图 the fluorescent image of DCF

Fig. 2-6 The double labeled images of $H_2DCF-DA$ and MitoFluor Red 589 of ECV 304 cell

需要指出的是上述现象并不是出现于所有被观察的细胞内，部分细胞内并无明显的 DCF 荧光，如图 2-6 中所示，位于同一视野内的 ECV 304 细胞，其中黄色箭头标记的细胞在 MitoFluor Red 589 的荧光图（图 A）中十分清晰的显现出来，而在 DCF 荧光图（图 B）中却仅有微弱的荧光甚至没有荧光。

讨 论

随着照射时间的增加, DCF 荧光强度不断增加, 证明细胞内 ROS 产量增加, 又根据所确定的 DCF 分布位置, 证明了线粒体是细胞内 ROS 产生的主要位置; 但随着照射时间的进一步延长, 荧光强度开始下降, 这可能系由于探针淬灭引起, 而分布逐渐弥散可能是由于某种原因引起的线粒体通透性增加, 导致 DCF 探针从线粒体中扩散出去, 而这很有可能是线粒体内 ROS 产生所引起的变化。DCF 的产生有赖于 ROS, 是什么原因使细胞内 ROS 产生增多? 分析其原因可能是: (1) 探针受到光源照射因素的影响, 自身发生光敏化反应产生 ROS; (2) 细胞自身尤其是线粒体内某种物质在单纯光源照射的情况下产生了 ROS。

首先来讨论第一种原因的可能性。这种 ROS 检测探针已被广泛应用于细胞内 ROS 的检测, 并不只针对于线粒体; 目前尚未见有此探针特异定位于线粒体的文献报道, 理论上讲 H_2DCF 应当均匀地分布于细胞内, 那么在接受光照时就不应该出现 DCF 荧光特异分布的现象, 而这却与我们的实验结果相违背, 借此也可以排除探针原因致 ROS 生成的可能; 由于无辐射跃迁和辐射跃迁是相互竞争的, 荧光探针的性质决定了其在光照激发下以发生无辐射跃迁为主, 发生光敏化反应的能力较弱, 其单线态氧产率较低, 其所产生的 ROS 从数量上可以忽略不计。据此, 我们推测光照可致细胞内 ROS 产生, 且集中于线粒体, 那么, 是什么样的物质基础决定了光照致细胞内 ROS 产生, 且以在线粒体内为主呢?

我们提出了“内源性光敏物质致活性氧产生”假说: 细胞内的各种细胞器尤其是线粒体内的某些具有与光敏剂结构类似的物质可被视为“内源性的光敏物质”, 在光照过程中充当了光受体, 发生光敏化反应, 产生活性氧类物质, 并通过后者发挥生物学效应。弱激光的生物学效应主要依赖于细胞内源性光敏物质发生光敏化反应生成的活性氧类物质。

1.线粒体的组成

线粒体一般呈粒状或杆状,但因生物种类和生理状态而异,可呈环形,哑铃形、线状、分枝状或其它形状。主要化学成分是蛋白质和脂类,其中蛋白质占线粒体干重的65-70%,脂类占25-30%。数目一般数百到数千个,植物因有叶绿体的缘故,线粒体数目相对较少;肝细胞约1300个线粒体,占细胞体积的20%;单细胞鞭毛藻仅1个,酵母细胞具有一个大型分支的线粒体,巨大变形中达50万个;许多哺乳动物成熟的红细胞中无线粒体。线粒体作为细胞内代谢活动旺盛的细胞器,在正常生理状况下其内含有一定数量的ROS,并在调节细胞功能状态方面发挥着重要的作用。

在植物细胞的叶绿体内,主要包含有两种色素:叶绿素(主要吸收红光和蓝紫光)和类胡萝卜素(主要吸收蓝紫光),光敏色素在植物的个体发育过程中扮演着重要的作用^[33]。线粒体内含有众多的酶系,目前得到确认的有120余种,是细胞中含酶最多的细胞器^[34]。而某些酶类在结构上与上述光敏色素和临床使用中的光敏剂十分相似,有实验已经证明此类物质可产生活性氧类物质^[35]。从某种意义上看,线粒体内的各种物质尤其是酶类可被视为内源性的光敏物质,尽管它们的单线态氧产率等指标远不如HMME等外源性的光敏剂。

2.活性氧的生物学效应及其信号转导通路

可以说活性氧对于细胞来说是一把“双刃剑”。极低水平活性氧对于维持细胞正常的生理功能和代谢具有极其重要的作用,它可对某些基因进行调制,参与某些酶促反应,参与前列腺素、胶原蛋白等物质的合成,发挥解毒、杀菌作用。在生理情况下,生物体内产生的活性氧在抗氧化酶及外源性和内源性抗氧化剂的协调作用下不断地被清除,活性氧可维持于平衡浓度,此时的活性氧也将会导致细胞损伤,不过损伤的程度较轻,受损伤的分子可以得到修复、置换、降解代谢和重新合成,而不会对机体造成损害。而在衰老、应激、某些病理情况及光敏化反应时,活性氧产生增多或机体的清除能力减弱,活性氧就将对机体造成损伤。

在细胞水平,氧化应激可直接激活多种细胞信号通路,导致细胞的不同反应。已有证据证明,细胞旁分泌或自分泌的ROS在神经、内分泌、循环免疫

等生理活动中作为信号分子发挥着重要作用,在细胞稳态的调节等细胞生命活动中作为第二信使参与多种因子细胞生物学效应的启动^[36]。ROS 在真核生物中的信号传导机制比较复杂,目前尚未搞清。ROS 的信号转导途径具有细胞种类和刺激因子的特异性,通过下列传导途径实现^[1]: 1. 环鸟苷酸相关信号传导途径; 2. 蛋白酪氨酸激酶相关信号传导途径; 3. Ca^{2+} 相关信号传导途径; 4. 蛋白激酶 C 相关信号传导途径; 5. 转录因子 NF- κ B 相关信号传导途径; 6. 转录因子 AP-1 相关信号传导途径。ROS 的信号传导作用与以还原型谷胱甘肽 (GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 比例为标志的细胞氧化还原状态有关^[37]。一方面它们对细胞的氧化还原势能的调节、信号转导和基因表达调控发挥着必不可少的作用; 另一方面,又可造成细胞的氧化应激和氧化损伤,破坏氧化还原平衡,从而引起细胞衰老和死亡,以及在相关的疾病中起加重病势的作用^[38]。

3. 弱激光治疗的简介及其效应规律的特点

所谓弱激光是指用这种激光直接照射时,不会对靶组织造成不可逆性损伤的弱反应水平的激光。弱激光治疗的方法包括激光理疗、激光针灸、弱激光内镜照射和血管内照射等^[10]。LLLT 对于患者一般无痛苦或痛苦较小,无副作用,而且治疗费用较低,易于被患者所接受,其治疗范围广泛,遍及临床各科,治疗各种急性炎症、溃疡、高血压、肌肉及骨组织的损伤、胎位不正、幼儿腹泻、带状疱疹、三叉神经痛、神经衰弱、前列腺肥大以及急性心脑血管疾病、闭塞性动脉内膜炎等疾病。

其生物刺激作用规律的特点如下:

(1) 剂量依赖效应: 激光照射剂量对于决定最终的效应十分重要,小剂量时表现为激励效应,大剂量时表现为抑制效应。

(2) 累积效应: 剂量相等时,一次大剂量照射和多次小剂量照射,两者的生物学效应大致相同。但累积效应与治疗的间隔时间有关,超过一定时间后,即无此种效应。

(3) 抛物线特征: 刺激作用并不是在开始光照即刻即开始出现效应,而是呈抛物线形,通常在开始治疗后 3 天起逐渐增强,至第 10~17 天达最大值,然后刺激作用逐渐减弱,直至某一天变为抑制作用。

(4) 波长效应: 几乎可见光波段的每一种单色光都可以产生细胞效应, 但相同光剂量不同波长的光照所产生的生物学效应的强度不同, 与所使用的照射波长密切相关。

(5) 主要对处于病理状态下的细胞起作用, 对于正常细胞的作用甚微。

(6) 效应的多样性: 已得到专家公认的弱激光的生物效应包括消炎、止痛, 改善血液循环, 促进细胞再生、毛发生长、伤口愈合、组织修复, 调整神经和免疫功能, 提高机体的抗病能力等多种。

4. 关于弱激光治疗机理的各种假说

弱激光生物学效应的作用机理仍不清楚, 尚未得到成熟、公认的科学解答。目前各种关于激光生物刺激作用的假说有: 生物电场假说、色素调节假说、细胞膜受体假说、偏振刺激假说等^[39]。但是上述学说缺乏实验依据, 不能解释临床治疗和实验中的所有现象。

Karu 等提出^[32]: 光受体分子在光照激发下跃迁至激发态氧的过程中, 至少伴随着四种反应, 包括氧化还原状态的改变和电子传递加速、单电子自氧化(生成 $O_2^{\cdot-}$)、光化学反应(生成 1O_2) 以及由于局部热传导引起的光受体分子生化活性的改变, 其中最主要的是光受体分子氧化还原状态的改变。他们还认为在真核细胞内细胞色素 C 氧化酶是红光和近红外光的光受体, 而 NADH 脱氢酶是可见光区紫色至蓝色波段的光受体。但是我们认为这种假说过于狭隘, 细胞内与光敏剂在结构上相似的物质有许多, 并不能只限定于某一种物质, 而且细胞氧化还原状态的改变在产生各种细胞生物学效应方面是否具有重要作用尚有待商榷。

5. “内源性光敏物质致活性氧产生”假说

本研究利用新型荧光探针活性氧检测技术, 直接观察到了单细胞内活性氧的产生, 并通过图像分析的方法确定了线粒体是 ROS 产生的主要部位。实际上本研究中所应用到的光照条件(约 100 mW/cm^2) 相当于弱激光治疗中较高功率密度时的情况。

根据我们提出的“内源性光敏物质致活性氧产生”假说, 包括细胞核、溶酶体、内质网在内各种细胞器内含有的各种结构与外源性光敏剂类似的大分子

物质（如各种酶类）均可被视为内源性光敏物质，发生光敏化反应，每种物质被不同波长的光照激发，产生ROS的效率各不相同。既然属于内源性光敏物质的光敏化反应，就应该遵守光化学反应的规律，反应过程受到光照射剂量、光照波长、光敏物质含量、光敏物质的单线态氧产率的影响。由于此类物质的含量十分微小，产生ROS的数量有限，且ROS扩散距离十分有限^[40]，因而其直接的效应亦很微弱；但是这属于一个级联反应，ROS可以通过上述提及的各种信号转导通路发挥作用，影响其他细胞内的成分，如引起MMP增加、线粒体膜电位增高、pH增高和Ca²⁺浓度的增高等，从而间接发挥生物学效应作用，ROS浓度的轻微变化即可引起较为明显的生物学效应。

内源性的光敏物质遍布于各细胞器内，但由于各细胞器在物质含量上的差异，发生光化学反应生成ROS的数量并不一致，线粒体作为细胞内含酶类最丰富的细胞器，产生的ROS最多，其所引发的生物学效应也最为显著。

第三部分的讨论中提出的——线粒体微环境的特殊性对于光敏化反应速率的影响——亦可能与此实验现象有一定的关联，既然外源性的光敏剂的光敏化反应受其影响，那么其对线粒体内源性光敏物质所发生的光敏化反应同样会具有一定的作用。光照也可能同时引起线粒体呼吸链中某些酶促反应加速，从而导致部分ROS的产生增多。

我们提出的理论可以解释弱激光治疗在临床中的种种现象：

（1）前面提到的剂量依赖效应、累积效应和抛物线特征均与ROS产量有关。ROS产量小时表现为刺激作用，并随着ROS累计量的增加其效应呈非线性的增强，但是超过一定的水平后即表现为抑制效应。

（2）波长效应正是由于各种波长的激光对各种细胞内源性光敏物质的激发效率不同，以往报道的细胞增殖效应—波长曲线可能是不同波长激光对于各种内源性光敏物质激发产生活性氧的综合效应。

（3）在病理状态下，细胞的功能状态异常，对于ROS的清除能力较正常细胞弱；而且，病理状态时细胞内线粒体的数量增加，这种增生实际上是对慢性非特异性细胞损伤的适应性反应或细胞功能升高的表现^[41]，这样造成的结果是细胞内“内源性光敏剂”数量增加，因而光敏化反应产生的ROS数量也较

处于正常状态下的细胞多。上述或许可以解释临床治疗中表现出的对处于病理状态的细胞产生作用，而对于正常细胞作用不明显的现象。

(4) 因为 ROS 作为生物体内重要的自由基物质，参与体内很多的生化反应过程，引起细胞内多种细胞信号物质的含量变化，从而产生多种效应，如调节细胞状态和功能、刺激细胞增殖等。这是弱激光生物刺激效应多样性的原因。

另外，实验结果中图 3-5 中现象的出现可能系由于细胞自身状态的影响，导致进入细胞内的 H₂DCF 数量有限或是光照致细胞内 ROS 产生的数量较少。虽然我们并不清楚探针 H₂DCF-DA 进入细胞的途径，但是，从探针 MitoFluor Red 589 的荧光图像标记良好，如果两种探针进入细胞的途径类似，则 H₂DCF-DA 进入细胞的量似乎应与周围细胞在同一水平，那么最可能的原因就是光照致细胞内 ROS 产生的数量较少，这种情况说明了细胞自身状态在弱激光生物学效应中的重要作用。国内外很多文献报道对于弱激光照射时的生物学效应说法不一，实验结果也大相径庭，分析其原因似乎正是与这种细胞状态的干扰密切相关。

国外已有的文献报道似乎也支持我们的推断。Alexandratou 等利用共聚焦显微镜进行单细胞水平的观测，647 nm 激光照射后的人纤维细胞所出现的改变包括：ROS 产生、pH 增高、线粒体膜电位增高和 Ca²⁺浓度的增高^[42]。Lavi 等观察到当使用普通光源（400~800 nm），以功率密度 40 mW/cm²，照射 1~5 min 时，3.6 J/cm² 的能量密度只导致游离钙浓度缓慢的一过性的增高，而 12J/cm² 则导致游离钙浓度的线性增高，并引起细胞损伤，向未接受照光处理组中加入外源性的 H₂O₂，浓度为 12 μmol/L 时可模拟出类似前者的效应^[43]。Grossman 等发现 780 nm 激光（能量范围 0~3.6 J/cm²）照射刺激角化细胞的增殖，其中 0.45~0.95 J/cm² 对于细胞的增殖效应明显（1.3~1.9 倍），而加入酶的抗氧化剂、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶以及超氧阴离子和过氧化氢的清除剂等都将抑制这种增殖效应^[44]。还有报道近红外飞秒激光、准分子激光照射同样可导致细胞内 ROS 的产生以及细胞的凋亡样坏死或凋亡^[45,46]。

哺乳动物的红细胞内没有线粒体，但有实验证实：淋巴细胞在全血环境中，接受 660 nm 光照（功率密度 40 mW/cm²）处理后，细胞增殖明显较淋巴细胞

分离组（即离开全血环境，接受相同条件的光照）高，红细胞内超氧化物歧化酶的活性亦明显增高，提示了血红蛋白在接受光照的情况下产生 H_2O_2 ，而后者在淋巴细胞增殖中扮演着重要的作用^[47]。

我们根据实验结果提出的解释弱激光生物效应的“细胞内源性光敏物质”假说，这对于理解细胞光生物学效应具有积极的意义。尽管我们提出的理论尚缺乏足够的实验依据，甚至也许若干年之后被证明是错误的，但是我们相信这对于开拓激光医学的研究思路和研究手段，揭示激光医学中本质的规律，解决激光医学临床和科研中的问题不无裨益。

小 结

在荧光图像中往往存在某些具有重要意义的信息特征，由于超过人眼分辨力，单靠定性观察方法是不易或无法获知的。本研究建立的此种计算细胞器-细胞荧光强度比值的定量分析方法，可有效应用于荧光分布的定位研究，弥补定性方法的不足，能够深入有效地挖掘图像中蕴含的有用信息，获得更为精确的量化结果。

本研究对此探针应用于激光医学领域的实验进行了初步的尝试，然而我们对于此探针自身的性质尚不完全了解，我们在讨论中初步排除了其自身性质造成此实验现象的可能。对于此探针知识的积累和再认识将对于我们理解实验结果具有很大的帮助。

经细胞器-细胞荧光强度比值法的计算，并作统计分析，线粒体区内 DCF 荧光强度明显高于细胞核区和细胞质非线粒体区。本研究利用新型荧光探针活性氧检测技术，直接观察到了单细胞内的 ROS 产生，并通过图像分析的方法确定了线粒体是 ROS 产生的主要部位。

针对光照致 ROS 的产生机制，我们提出：细胞内尤其是线粒体内的某些具有与光敏剂结构类似的物质可被视为“内源性光敏物质”，在光照过程中充

分离组（即离开全血环境，接受相同条件的光照）高，红细胞内超氧化物歧化酶的活性亦明显增高，提示了血红蛋白在接受光照的情况下产生 H_2O_2 ，而后者在淋巴细胞增殖中扮演着重要的作用^[47]。

我们根据实验结果提出的解释弱激光生物效应的“细胞内源性光敏物质”假说，这对于理解细胞光生物学效应具有积极的意义。尽管我们提出的理论尚缺乏足够的实验依据，甚至也许若干年之后被证明是错误的，但是我们相信这对于开拓激光医学的研究思路和研究手段，揭示激光医学中本质的规律，解决激光医学临床和科研中的问题不无裨益。

小 结

在荧光图像中往往存在某些具有重要意义的信息特征，由于超过人眼分辨力，单靠定性观察方法是不易或无法获知的。本研究建立的此种计算细胞器-细胞荧光强度比值的定量分析方法，可有效应用于荧光分布的定位研究，弥补定性方法的不足，能够深入有效地挖掘图像中蕴含的有用信息，获得更为精确的量化结果。

本研究对此探针应用于激光医学领域的实验进行了初步的尝试，然而我们对于此探针自身的性质尚不完全了解，我们在讨论中初步排除了其自身性质造成此实验现象的可能。对于此探针知识的积累和再认识将对于我们理解实验结果具有很大的帮助。

经细胞器-细胞荧光强度比值法的计算，并作统计分析，线粒体区内 DCF 荧光强度明显高于细胞核区和细胞质非线粒体区。本研究利用新型荧光探针活性氧检测技术，直接观察到了单细胞内的 ROS 产生，并通过图像分析的方法确定了线粒体是 ROS 产生的主要部位。

针对光照致 ROS 的产生机制，我们提出：细胞内尤其是线粒体内的某些具有与光敏剂结构类似的物质可被视为“内源性光敏物质”，在光照过程中充

当了光受体，发生光敏化反应而产生 ROS。弱激光的生物学效应主要依赖于 ROS 而发挥作用。我们提出的假说将线粒体、活性氧、光化学反应有机的结合在一起，成功的解释了关于弱激光生物学效应的各种现象。当然我们的实验结果尚不足以证明 ROS 在弱激光生物学效应中所具有的重要作用，欲完善此假说，还需大量深入的实验研究工作。

第三部分 HMME-PDT 致 ECV 304 细胞内 活性氧产生情况的动态监测

引 言

活性氧在光动力治疗中的作用已十分明确,在光动力生物学效应中起着举足轻重的作用,研究光敏化过程中活性氧的产生对于理解光动力的生物学效应具有重要意义^[48]。本研究拟应用新型活性氧检测荧光探针和图像分析与处理技术,对由血卟啉单甲醚所介导的光动力反应(HMME-PDT)过程中 ECV 304 细胞内的活性氧产生情况进行研究。

实 验 材 料

1. 细胞株

人脐静脉内皮细胞株 ECV 304: 由本室保存。

2. 实验试剂

二甲基亚砷(DMSO): 北京石鹰化工厂产品。

DMEM 培养基: 美国 Gibco 公司产品。

胎牛血清: 美国 Gibco 公司产品。

PBS 液: 北京化学试剂公司产品。

胰蛋白酶: 美国 Gibco 公司产品。

0.9%氯化钠注射液: 北京双鹤药业股份有限公司产品。

3. 光敏剂

血卟啉单甲醚: 深暗红色溶液,规格: 20 mg/ml,批号: 2001-01-11,上海复旦张江生物医药股份有限公司产品,置于-20℃下避光保存。使用前用生理盐水及不含血清的 DMEM 培养液稀释至所需浓度。

4. 荧光探针

第三部分 HMME-PDT 致 ECV 304 细胞内 活性氧产生情况的动态监测

引 言

活性氧在光动力治疗中的作用已十分明确，在光动力生物学效应中起着举足轻重的作用，研究光敏化过程中活性氧的产生对于理解光动力的生物学效应具有重要意义^[48]。本研究拟应用新型活性氧检测荧光探针和图像分析与处理技术，对由血卟啉单甲醚所介导的光动力反应（HMME-PDT）过程中 ECV 304 细胞内的活性氧产生情况进行研究。

实 验 材 料

1. 细胞株

人脐静脉内皮细胞株 ECV 304：由本室保存。

2. 实验试剂

二甲基亚砜（DMSO）：北京石鹰化工厂产品。

DMEM 培养基：美国 Gibco 公司产品。

胎牛血清：美国 Gibco 公司产品。

PBS 液：北京化学试剂公司产品。

胰蛋白酶：美国 Gibco 公司产品。

0.9%氯化钠注射液：北京双鹤药业股份有限公司产品。

3. 光敏剂

血卟啉单甲醚：深暗红色溶液，规格：20 mg/ml，批号：2001-01-11，上海复旦张江生物医药股份有限公司产品，置于-20℃下避光保存。使用前用生理盐水及不含血清的 DMEM 培养液稀释至所需浓度。

4. 荧光探针

H₂DCF-DA: 美国 Fluka 公司产品, 用 DMSO 配制成 1 mmol/L 的贮存液, -20°C 下避光保存备用。

5. 实验仪器

Olympus IX 71 型荧光显微镜: 日本奥林巴斯株式会社产品, 由解放军总医院医学实验测试中心提供使用。

SPOT RT Color 型致冷 CCD: 美国 Diagnostic 公司产品, 由解放军总医院医学实验测试中心提供使用。

LLM-3 型激光功率计: 中国计量院产品。由中国人民解放军激光计量测试研究总站标定, 532 nm 时的校正系数为 2.03。

35 mm 荧光显微镜专用培养皿: 美国 Corning 公司产品。

超净工作台: 北京四达净化技术研究所产品。

CO₂ 恒温孵育箱: 美国 NAPCO 公司产品。

数字式超级恒温浴槽: 成都仪器厂产品。

实验方法

1. 细胞培养

取生长状态良好的细胞, 用 0.3% 胰酶消化后, 吹打制成单细胞悬液, 用含 5% 血清的 DMEM 培养液将细胞密度调整为 5.0×10^5 个/ml, 并将之接种于 35 mm 培养皿中, 每皿加入 2 ml, 置于 37°C、含 5% CO₂ 孵育箱中孵育 24 h。

2. 光敏剂孵育

在孵育结束前 4 h 更换 DMEM 培养液, 将 HMME 加入 35 mm 培养皿中, 使其孵育终浓度为 10 μg/ml。

3. 探针孵育

在孵育结束前 30 min 将 H₂DCF-DA 加入 35 mm 培养皿中, 使其孵育终浓度为 10 μmol/L。孵育结束后, 用 PBS 冲洗三遍, 并弃去残液。

4. 光源照射

采用 60 倍荧光物镜, 荧光激发光源为 100 W 超高压汞灯, 光照同时完成

H₂DCF-DA: 美国 Fluka 公司产品, 用 DMSO 配制成 1 mmol/L 的贮存液, -20°C 下避光保存备用。

5. 实验仪器

Olympus IX 71 型荧光显微镜: 日本奥林巴斯株式会社产品, 由解放军总医院医学实验测试中心提供使用。

SPOT RT Color 型致冷 CCD: 美国 Diagnostic 公司产品, 由解放军总医院医学实验测试中心提供使用。

LLM-3 型激光功率计: 中国计量院产品。由中国人民解放军激光计量测试研究总站标定, 532 nm 时的校正系数为 2.03。

35 mm 荧光显微镜专用培养皿: 美国 Corning 公司产品。

超净工作台: 北京四达净化技术研究所产品。

CO₂ 恒温孵育箱: 美国 NAPCO 公司产品。

数字式超级恒温浴槽: 成都仪器厂产品。

实验方法

1. 细胞培养

取生长状态良好的细胞, 用 0.3% 胰酶消化后, 吹打制成单细胞悬液, 用含 5% 血清的 DMEM 培养液将细胞密度调整为 5.0×10^5 个/ml, 并将之接种于 35 mm 培养皿中, 每皿加入 2 ml, 置于 37°C、含 5% CO₂ 孵育箱中孵育 24 h。

2. 光敏剂孵育

在孵育结束前 4 h 更换 DMEM 培养液, 将 HMME 加入 35 mm 培养皿中, 使其孵育终浓度为 10 μg/ml。

3. 探针孵育

在孵育结束前 30 min 将 H₂DCF-DA 加入 35 mm 培养皿中, 使其孵育终浓度为 10 μmol/L。孵育结束后, 用 PBS 冲洗三遍, 并弃去残液。

4. 光源照射

采用 60 倍荧光物镜, 荧光激发光源为 100 W 超高压汞灯, 光照同时完成

荧光图像的采集。选择激发滤色镜为 BP460-490，输出波长范围为 460~490 nm。汞灯输出光经过荧光显微镜的光路系统及培养皿底部后细胞所实际接受的功率密度约为 100 mW/cm^2 。实际光源照射时间为曝光时间乘以曝光次数。

5. 连续采集 DCF 探针的荧光图像

CCD 作为图像采集设备，接于荧光显微镜的侧面光口，并通过控制卡与计算机连接，所采集图像经控制卡进行模数转换后送入计算机供存储和处理。CCD 输出的图像文件为 16 位灰度图像（TIF 格式），灰度范围 0-65535。

选择激发滤色镜为 BP460-490，吸收滤色镜为 BA515，分光镜为 DM500，另加一绿通道液晶滤光片，增益 1，曝光时间 2 s 或 5 s，间隔时间 0 s。

6. DCF 平均荧光强度动态变化曲线的绘制

应用图像处理技术，从图像背景中分割出细胞的形态轮廓，计算此轮廓范围内像素的灰度总值，进而得到细胞内的平均荧光强度值；分别计算同一细胞的不同时间段细胞内平均荧光强度值，共计选择不同视野中的 14 个细胞，求得同一时间点，14 个细胞的平均荧光强度值。以此平均荧光强度值为 Y 轴，以照射时间点为 X 轴，绘制平均荧光强度-照射时间曲线。

7. 统计学处理

实验数据用 SPSS 11.0 统计软件处理，各组之间的比较分别采用两单因素方差分析， $P < 0.05$ 表示差异显著，有统计学意义。

实验结果

图 3-1、图 3-2 中 1~30 分别显示的是同一 ECV 304 细胞内各时间段 DCF 荧光的变化情况，曝光时间 2 s，间隔时间 0 s，共计观察时间 60 s。其中图 3-1 为单纯照光组，图 3-2 为 HMME-PDT 组。

随着照射时间的延长，单纯光照组的细胞内 DCF 荧光强度随着光照时间的延长而缓慢增加。但是，为了进行图像分析与定量计算，方便与 HMME-PDT 组进行比较，必须保证两组的采图条件完全一致，此时采集到的荧光图像并不

是最佳的, 曝光不够充分(曝光时间 2 s), 导致图像的显现并不如第二部分研究中(曝光时间 5 s) 清楚。

HMME-PDT 组中的细胞内 DCF 荧光强度随照射时间的变化幅度迅速, 线性结构的呈现清楚, 细胞质核周区域在光源照射后荧光强度明显高于细胞内其它区域, DCF 荧光变化的速度明显快于单纯光照组。但是随着照射时间延长, DCF 荧光强度迅速下降, 其荧光分布位置失去特异性, 逐渐弥散。

图 3-3 和图 3-4 中为分别根据不同视野内 14 个细胞内的 DCF 荧光图像计算并绘制的 DCF 强度-时间曲线(两组的采图条件完全一致)。将图 3-3 和图 3-4 的数据汇总, 计算平均值和标准差, 并将两组的平均值相减得到另外一组数据, 见表 3-1, 经两因素方差分析, 单纯光照组与 HMME-PDT 组之间平均 DCF 强度值差异有显著意义($P=0.0000, <0.05$)。

图 3-5 为根据表 3-1 的数据绘制的单纯光照与 HMME-PDT 时不同照射时间点 ECV 304 细胞内 DCF 平均荧光强度随时间变化的曲线。

单纯光照组的曲线在照射的开始阶段, DCF 荧光强度增加较快, 在第 10 s 时便上升至第 2 s 时的 2.17 倍, 但是随着照射时间逐渐延长, 增幅逐渐变小, 到第 60 s 时上升至第 2 s 时的 4.69 倍。HMME-PDT 组的曲线表现为快速的上升, 从照光开始到第 28 s 时即上升至第 2 s 时 5.98 倍, 但随着照光时间的进一步延长迅速下降。HMME-PDT 组数据减去单纯光照组数据得到的曲线, 反映了去除光照影响后外源性光敏剂的光敏化反应致成细胞内 DCF 平均荧光强度的变化情况, 曲线的末端部分同样出现了迅速的下降。

HMME-PDT 组与单纯光照组的 DCF 荧光分布具有相似性, 且前者较后者变化迅速, 实际上细胞内平均 DCF 强度的变化主要反映的是线粒体内 DCF 荧光强度的变化情况, 证明 HMME-PDT 早期 DCF 荧光的分布的主要部位是线粒体。

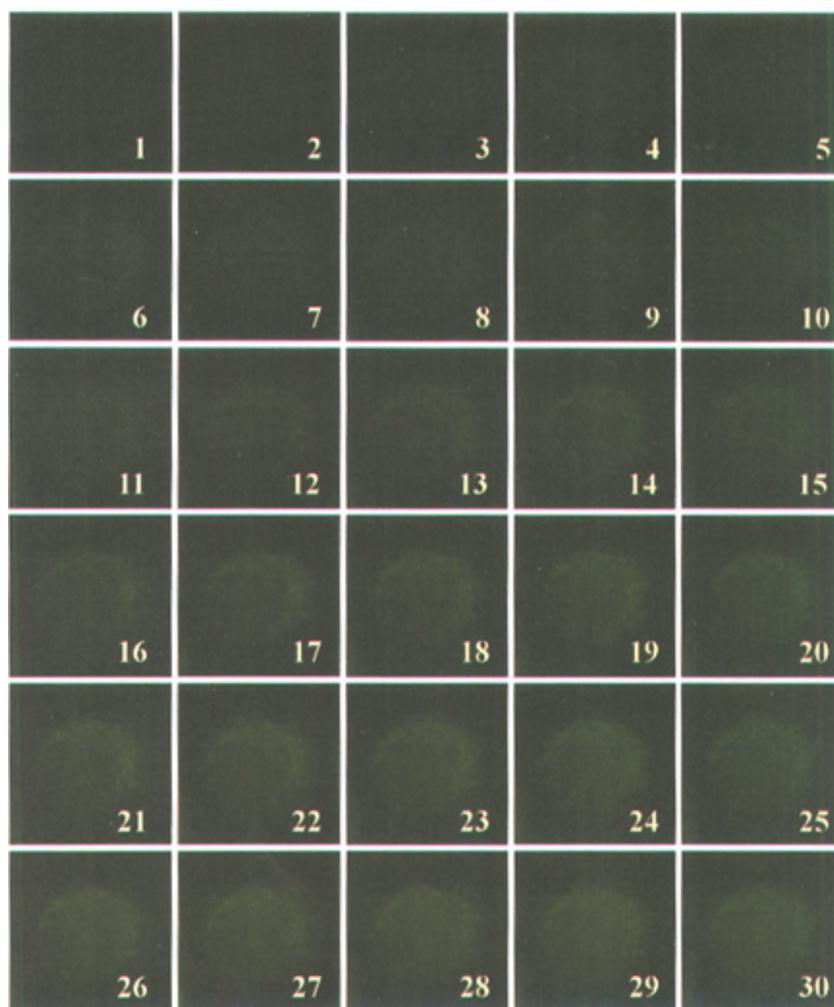


图 3-1 单纯光照时不同时间段同一 ECV 304 细胞内的 DCF 荧光图
(曝光时间 2 s, 间隔时间 0 s) (exposure time 2 s, time interval 0 s)

Fig. 3-1 The fluorescent images of DCF at different light irradiation time
in the same ECV 304 cell during light irradiation

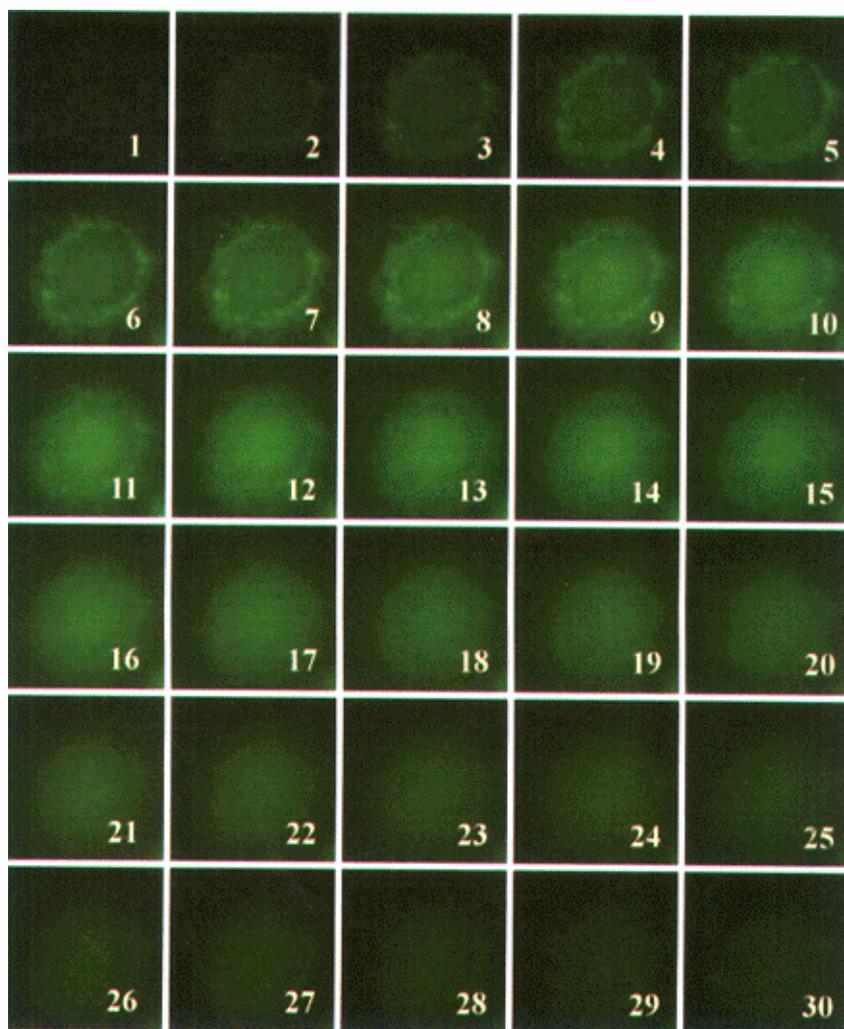


图 3-2 HMME-PDT 时不同时间段同一 ECV 304 细胞内的 DCF 荧光图

(曝光时间 2 s, 间隔时间 0 s) (exposure time 2 s, time interval 0 s)

Fig. 3-2 The fluorescent images of DCF at different light irradiation time
in the same ECV 304 cell during HMME-PDT

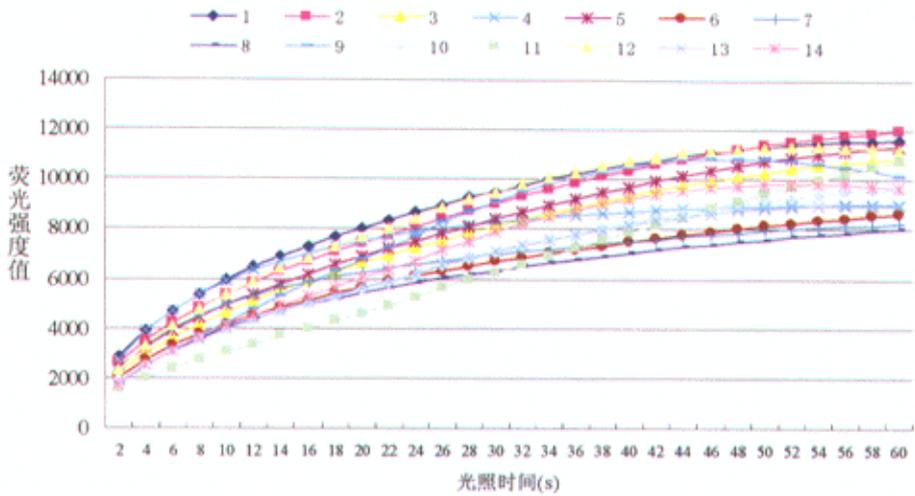


图 3-3 单纯光照时不同照射时间点 ECV 304 细胞内 DCF 平均荧光强度随时间的变化情况
 Fig. 3-3 The variation curve of the mean fluorescence intensity in ECV 304 cells at different light irradiation time

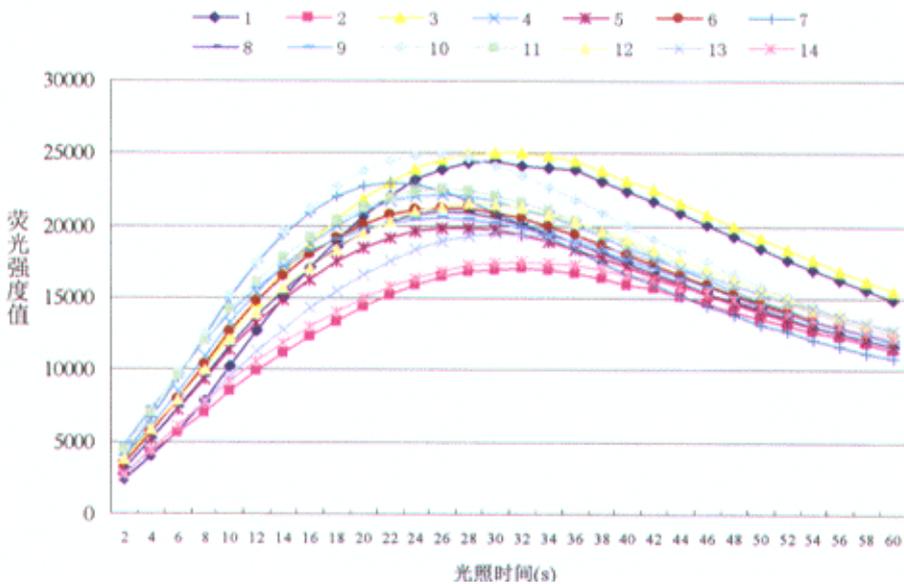


图 3-4 HMME-PDT 时不同照射时间点 ECV 304 细胞内 DCF 平均荧光强度随时间的变化情况
 Fig. 3-4 The variation curve of the mean fluorescence intensity in ECV 304 cells at different light irradiation time during HMME-PDT

表 3-1 各光照时间点 ECV 304 细胞内平均 DCF 荧光强度值

光照 时间(s)	单纯光照	HMME-PDT	(HMME-PDT) - (单纯光照)
2	2132.484 ± 416.153	3549.721 ± 747.564	1417.237
4	2958.534 ± 584.210	5663.739 ± 1118.103	2705.205
6	3599.411 ± 701.373	7810.334 ± 1489.069	4210.923
8	4141.654 ± 786.097	9993.718 ± 1844.119	5852.064
10	4617.767 ± 847.554	12107.374 ± 2136.809	7489.607
12	5047.487 ± 893.718	14065.968 ± 2357.619	9018.481
14	5437.976 ± 925.882	15800.756 ± 2518.725	10362.780
16	5789.779 ± 955.876	17298.455 ± 2631.345	11508.676
18	6121.576 ± 983.857	18566.572 ± 2700.990	12444.996
20	6433.779 ± 1008.121	19608.150 ± 2720.378	13174.371
22	6733.346 ± 1035.176	20391.311 ± 2691.784	13657.965
24	7020.128 ± 1064.581	20912.335 ± 2629.833	13892.207
26	7345.946 ± 1086.979	21187.371 ± 2547.277	13841.425
28	7614.251 ± 1123.446	21244.522 ± 2464.029	13630.271
30	7869.545 ± 1154.992	21091.989 ± 2381.278	13222.444
32	8126.266 ± 1190.732	20749.717 ± 2271.672	12623.451
34	8349.151 ± 1217.222	20326.887 ± 2248.778	11977.736
36	8565.466 ± 1243.440	19808.969 ± 2242.048	11243.503
38	8770.462 ± 1267.192	19173.081 ± 2144.716	10402.619
40	8960.452 ± 1283.911	18527.042 ± 2074.447	9566.590
42	9135.286 ± 1302.428	17894.794 ± 2031.155	8759.508
44	9297.621 ± 1315.785	17198.632 ± 1934.507	7901.011
46	9437.985 ± 1313.783	16519.385 ± 1852.866	7081.400
48	9564.666 ± 1311.677	15858.279 ± 1772.405	6293.613
50	9677.859 ± 1309.973	15222.409 ± 1684.538	5544.550
52	9776.312 ± 1306.923	14615.798 ± 1603.609	4839.486
54	9851.966 ± 1304.033	14038.717 ± 1520.601	4186.751
56	9913.643 ± 1303.291	13493.716 ± 1444.500	3580.073
58	9960.154 ± 1305.249	12971.112 ± 1364.346	3010.958
60	9995.786 ± 1310.077	12483.704 ± 1286.147	2487.918

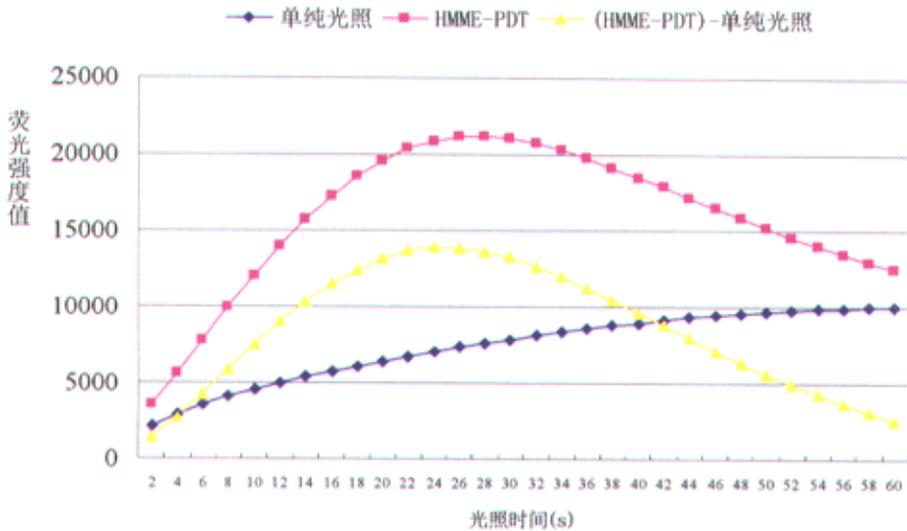


图 3-5 单纯光照与 HMME-PDT 时不同照射时间点 ECV 304 细胞内 DCF 平均荧光强度随时间的变化情况

Fig. 3-5 The variation curve of the mean fluorescence intensity in ECV 304 cells at different light irradiation time during HMME-PDT and light-irradiation-only

讨 论

光敏化反应致 ROS 产生的机理：基态光敏剂吸收光子的能量后，经单重态（寿命 1~1000 ns）系间窜越到三重态（寿命 1~1000 μ s），受光激发的三重态敏化剂可进行以下两种形式的反应^[49, 50]：①经过氢原子或电子转移，直接同底物或溶剂反应，形成自由基或自由基离子，后者可与氧作用产生氧化产物，此型反应叫类型 I（Type I）反应；②将能量转移给分子氧，形成 $^1\text{O}_2$ ， $^1\text{O}_2$ 是高活性的氧化剂，可使底物被氧化，此型反应叫类型 II（Type II）反应。有时也出现从敏化剂到氧的电子转移，给出氧化了的敏化剂和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ，这个过程也属于类型 II 反应，过去常被定义为类型 I 反应。类型 I 和类型 II 反应可同时出现，二者的比例受敏化剂、底物、氧浓度以及敏化剂同底物的结合程度的影

响。

HMME 是一种国产新型第二代卟啉类光敏剂,其化学全名为: [3(或 8)(1-甲氧基乙基)-8(或 3)-(1-羟乙基)]次卟啉IX^[51]。它是用柱层析法分离去除 HpD 中大部分血卟啉所得到的两种互为位置异构体的单体卟啉的异构体混合物,其主要成分为相对疏水性卟啉,光动力效应较强。临床上已应用于鲜红斑痣的治疗,具有避光时间短,光敏化效果好等优点^[52,53]。一般认为其以 II 型反应为主,生成 $^1\text{O}_2$ 。

图 3-5 中 HMME-PDT 组和单纯照光组的曲线显示, HMME-PDT 细胞内 DCF 荧光强度的变化要较单纯照光组快许多,在光照的开始阶段上升幅度较大,DCF 大量生成,说明此时细胞内 HMME 介导的光敏反应产生了大量的活性氧物质;与此同时 H_2DCF 被大量的消耗,而且随着照射时间的进一步延长荧光探针淬灭迅速,因而在光源照射的后期,细胞内 DCF 平均荧光强度曲线开始出现下降,在后期的 DCF 荧光图像上表现为荧光强度的下降以及荧光分布的弥散。

虽然荧光探针在长时间照光后发生淬灭现象,但是比较 HMME-PDT 组与单纯照光组细胞内 DCF 荧光的早期变化,两者在 DCF 荧光分布位置上具有相似性,而且此区域内 HMME-PDT 组 DCF 荧光的强度明显较单纯光照组快。第二部分的研究中已证明此区域为线粒体,说明 HMME 介导的光动力反应早期所产生的活性氧亦主要集中于线粒体内。然而,本课题组已证实 HMME 并不特异的分布于任何一种细胞器内^[30,31],线粒体内 HMME 的含量并不明显高于其他细胞器,那么线粒体与其他细胞器之间的什么差异导致这种现象的出现?

线粒体是对各种损伤最为敏感的细胞器之一^[41]。国内外已有文献报道线粒体在光敏化反应中常常易受到损伤^[54,55]。单纯光源照射致线粒体内活性氧的产生是一部分原因,但不是主要的,所占的比重应该很小。植物细胞的叶绿体是光合作用发生的部位,作为接受光而转移能量的部位,其自身必然具有某种有效促进此种光化学反应进行的特性。动物细胞内没有叶绿体,其线粒体是否会与植物的叶绿体有着某种相似性呢?

光化学反应是地球上最普遍、最重要的过程之一，绿色植物的光合作用，动物的视觉，涂料与高分子材料的光致变性等，无不与光化学过程有关，有很多因素影响了光化学反应的速率^[56]。

我们推测：细胞线粒体内微环境与其他细胞器之间的差异——包括氧浓度、pH 值和电位梯度等——使得其内的光化学反应中激发态分子的生命延长，光化学反应速率的加快，从而导致了线粒体内 ROS 产生的显著性，ROS 产量的明显增加最终使线粒体成为光动力早期损伤的靶位点。

线粒体的主要功能是对糖、脂肪、氨基酸等能源物质的氧化，线粒体是细胞内物质被彻底氧化的最终部位。在生物体内，90%以上的氧分子在线粒体中被消耗^[57]。

线粒体外膜（outer membrane）含40%的脂类和60%的蛋白质，具有孔蛋白构成的亲水通道，允许分子量为5KD以下的分子通过，1KD以下的分子可自由通过。线粒体内膜（inner membrane）含100种以上的多肽，蛋白质和脂类的比例高于3:1。心磷脂含量高（达20%）、缺乏胆固醇，类似于细菌。通透性很低，仅允许不带电荷的小分子物质通过，大分子和离子通过内膜时需要特殊的转运系统。如：丙酮酸和焦磷酸是利用H⁺梯度协同运输。线粒体氧化磷酸化的电子传递链位于内膜，因此从能量转换角度来说，内膜起主要的作用。线粒体结构模型见图3-6。

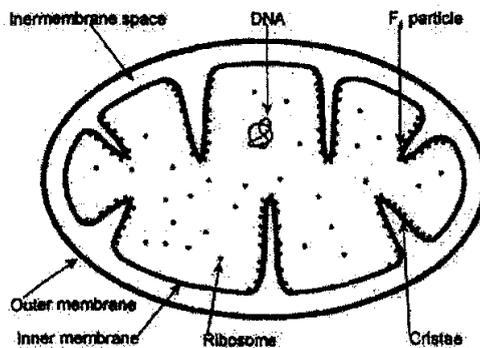


图 3-6 线粒体结构模型简图

Fig. 3-6 Diagram of mitochondria structure

根据英国生物学家Mitchell P提出的化学渗透假说（chemiosmotic coupling

hypothesis): 当高能电子沿呼吸链传递时, 释放出的能量使质子 (H^+) 从线粒体内膜的基质侧泵至膜间隙, 由于线粒体内膜对离子是高度不通透的, 从而使膜间隙的质子浓度高于基质, 在内膜的两侧形成pH梯度 (ΔpH) 及电位梯度 (Ψ), 两者共同构成电化学梯度 (electrochemical proton gradient), 即质子动力势 (ΔP)^[58]。上述种种都是线粒体的特殊之处, 可能也是此处光化学反应速率较高的原因。

HMME-PDT 组 (孵育浓度 10 $\mu g/ml$, 孵育时间 4 h) 时荧光变化的过程可以较为清晰的展现。在实验中尝试着增加 HMME 的孵育浓度至 160 $\mu g/ml$, 孵育时间仍为 4 h, 此种情况下, 光照一开始, 细胞内 DCF 极其迅速的增加, 却缺少了上述逐渐变化的过程, 整个细胞内遍布均匀强度的 DCF 荧光。当 HMME 的孵育浓度为 160 $\mu g/ml$, 而孵育时间为 30 min 时, DCF 荧光的变化情况介于前两者之间。在激光照射条件不变的情况下, 观察到了孵育浓度和孵育时间对于光敏反应致活性氧产生的影响, 当然这部分实验结果尚不够精细, 有待进一步的深入研究。应用本方法还可以比较不同光敏剂介导的光化学反应过程中 ROS 产生情况, 揭示各种光敏剂在光动力损伤效应上的差异性。

众所周知, 光敏剂的亚细胞定位不同导致亚微结构之间光敏剂含量的差别, 但是我们认为光敏剂含量在各细胞器之间的差别并不是决定其生物学效应的唯一因素, 因为还有以下几个方面决定其最终效应:

① 光敏剂含量相同并不代表产生的活性氧的量相同, 因为不同细胞器内的亚微环境不同, 其活性氧产生情况也不可能相同, 即使在同一细胞器内, 位于膜上的光敏剂与基质中的光敏剂产生 ROS 的情况也存在差异;

② 由于组成成分含量上的差异造成了不同细胞器结构对于 ROS 敏感性的千差万别, 如核膜与线粒体膜在组成成分上基本相同, 但是在各组分的含量上却存在种种差别;

③ 不同细胞器结构对于光敏反应生成的活性氧的清除能力迥异, 那些定位接近 ROS 清除剂产生位置的光敏剂, 其产生的 ROS 可很快地被清除掉, 而很难发挥杀伤作用^[59];

④ 对于已经造成的损伤, 不同细胞器的修复能力亦不尽相同, 例如在相

同的活性氧损伤条件下,线粒体 DNA 的损伤常重于核 DNA,主要因为前者的修复能力较后者低^[60]。

小 结

通过 CCD 荧光显微镜连续采集 ECV 304 细胞的 DCF 荧光图像,比较 HMME-PDT 组与单纯光照组之间的相似性与差异性,并计算细胞内平均荧光强度值,绘制 DCF 强度-时间曲线,反映 HMME 介导的光动力反应时细胞内的活性氧产生情况。

HMME-PDT 时 ECV 304 细胞内的 DCF 平均荧光强度表现为快速的上升,从照光开始到第 28 s 时即上升至第 2 s 时 5.98 倍,但随着照光时间的进一步延长迅速下降。单纯光照组的曲线在照射的开始阶段,强度增加较快,在第 10 s 时便上升至第 2 s 时的 2.17 倍,但是随着照射时间逐渐延长,增幅逐渐变小,到第 60 s 时上升至第 2 s 时的 4.69 倍,两组之间的差异有显著意义。两实验组细胞内 DCF 荧光均主要集中于细胞质内核周区域内,但 HMME-PDT 组出现此现象的速度较单纯光照组快。单纯光照时荧光主要集中于线粒体区域,则 HMME-PDT 组的 DCF 荧光同样主要存在于线粒体区域。

通过实验间接证明了线粒体是 HMME 介导的光动力反应早期损伤的靶位点。上述现象的出现,单纯光照因素的影响是一部分原因,我们猜测主要的原因是细胞线粒体内包括氧浓度、pH 值和电位梯度等微环境与其他细胞器之间的差异,使得光化学反应中激发态分子的生命延长,光化学反应速率的加快。

参 考 文 献

- [1] 方允中, 郑荣梁主编. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [2] 史桂英, 高飞, 石学耕, 等. 流式细胞术检测细胞内活性氧的方法[J]. 上海第二医科大学学报, 2001, 21(2): 122~124.
- [3] 庞战军, 周玫, 陈瑗主编. 自由基医学研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [4] 李楠, 王凤翔, 周春喜主编. 荧光探针应用技术[M]. 北京: 军事医学科学院出版社, 1998.
- [5] 李楠, 尹岭, 苏振伦主编. 激光扫描共聚焦显微术[M]. 北京: 人民军医出版社, 1997.
- [6] 李炳兴, 李文冲, 顾唤国, 等. 面阵 CCD 与计算机显微图像处理技术[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1996, 35(增刊 2): 157~161.
- [7] Webb RH. Theoretical basis of confocal microscopy[J]. Methods in Enzymology, 1999, 307: 3~20.
- [8] 雷国华, 鲍永耀, 朴英杰, 等. 共聚焦显微镜及其参数选择[J]. 中国医学物理学杂志, 1997, 14(1): 46~48.
- [9] 张展霞, 刘洪涛, 何家耀. 电荷耦合器件及其应用进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(2): 160~166.
- [10] 徐国祥主编. 激光医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.
- [11] Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation[J]. Photochem Photobiol, 1991, 54(5): 659.
- [12] Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, et al. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with

- 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123[J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27(1-2): 146~159.
- [13] 霍霞, 徐锡金, 陈耀文. 激光扫描共聚焦显微镜荧光探针的选择和应用[J]. *激光生物学报*, 1999, 8(2): 152~156.
- [14] Akhlynina TV, Jans DA, Statsyuk NV, et al. Adenoviruses synergize with nuclear localization signals to enhance nuclear delivery and photodynamic action of internalizable conjugate containing chlorin e6[J]. *Int J Cancer*, 1999, 81: 734~740.
- [15] Kunz L, MacRobert AJ. Intracellular photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) chlorin (Foscan) exhibits a complex dependence on oxygen level and fluence rate[J]. *Photochem-Photobiol*, 2002, 75(1): 28~35.
- [16] 黄行许, 鲍永耀, 黄辉, 等. 一种检测巨噬细胞呼吸爆发的新方法[J]. *第一军医大学学报*, 1998, 18(3): 218~210.
- [17] Gilaberte Y, Pereboom D, Carapeto FJ, et al. Flow cytometry study of the role of superoxide anion and hydrogen peroxide in cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX[J]. *Photodermatol-Photoimmunol-Photomed*, 1997, 13(1-2): 43~49.
- [18] 顾瑛, 刘凡光主编. 光动力疗法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2004.
- [19] Bourre L, Thibaut S, Briffaud A, et al. Indirect detection of photosensitizer ex vivo[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2002, 67(1): 23~31.
- [20] Hanselman D 主编. 精通 MATLAB 6[M]. 北京: 清华大学出版社, 2002.
- [21] 王晓丹, 吴崇明主编. 基于 MATLAB 的系统分析与设计——图像处理[M]. 西安: 西安电子科技大学出版社, 2000.
- [22] 徐飞, 施晓红主编. MATLAB 应用图像处理[M]. 西安: 西安电子科技

- 大学出版社, 2002.
- [23] Kenneth R 主编. 数字图像处理[M]. 北京: 电子工业出版社, 2002.
- [24] 章毓晋主编. 图像处理与分析[M]. 北京: 清华大学出版社, 1999.
- [25] 阮秋琦主编. 数字图像处理学[M]. 北京: 电子工业出版社, 2001.
- [26] Hsieh YJ, Wu CC, Chang CJ, et al. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets[J]. *J Cellular physiology*, 2003, 194(3): 363~375.
- [27] Leung WN, Sun X, Mak NK, et al. Photodynamic effects of mTHPC on human colon adenocarcinoma cells: photocytotoxicity, subcellular localization and apoptosis[J]. *Photochem Photobiol*, 2002, 75(4): 406~411.
- [28] Trivedi NS, Wang HW, Nieminen AL, et al. Quantitative analysis of Pc 4 localization in mouse lymphoma (LY-R) cells via double-label confocal fluorescence microscopy[J]. *Photochem Photobiol*, 2000, 71(5): 634~639.
- [29] 戴维德, 王雷, 刘凡光, 等. 超高灵敏度荧光显微成像技术对光敏剂细胞内分布的初步研究[J]. *激光生物学报*, 2003, 12(6): 435~439.
- [30] 王雷, 戴维德, 李家泽, 等. 血卟啉单甲醚在鼠肺毛细血管内皮细胞内的亚细胞定位[J]. *应用激光*, 2003, 23(6): 366~369.
- [31] 戴维德, 王雷, 刘凡光, 等. 应用激光共聚焦显微成像术研究光敏剂亚细胞定位[J]. *中国激光医学杂志*, 2004, 13(1): 12~17.
- [32] Karu Tiina. *The science of Low-power Laser Therapy*[M]. The Netherlands: Gordon and breach science publishers, 1998.
- [33] 余叔文主编. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [34] 凌詒平主编. 细胞生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.

- [35] Redmond RW, Gamlin JN. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules[J]. *Photochem Photobiol*, 1999, 70(4): 391~475.
- [36] Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation[J]. *Free Radical Bio Med*, 1995, 18(4): 775~794.
- [37] Yabuki M, Kariya S, Ishisaka R, et al. Resistance to nitric oxide-mediated apoptosis in HL-60 variant cells is associated with increased activities of Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase[J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(3-4): 325~332.
- [38] Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling[J]. *Biochimie*, 2002, 84(2-3): 131~141.
- [39] 王惠文主编. 激光与生命科学[M]. 北京: 北京理工大学出版社, 1995.
- [40] Baker A, Kanofsky JR. Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells[J]. *Photochem Photobiol*, 1992, 55(4): 523~528.
- [41] 武忠弼主编. 病理学(第四版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [42] Alexandratou E, Yova D, Handris P, et al. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy[J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2002, 1(8): 547~552.
- [43] Lavi R, Shainberg A, Friedmann H, et al. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(42): 40917~40922.
- [44] Grossman N, Schneid N, Reuveni H, et al. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species[J]. *Lasers Surg Med*, 1998, 22(4): 212~218.
- [45] Tirlapur UK, Konig K, Peuckert C, et al. Femtosecond near-infrared laser pulses elicit generation of reactive oxygen species in mammalian cells

- leading to apoptosis-like death[J]. *Exp Cell Res*, 2001, 263(1): 88~97.
- [46] Shimmura S, Masumizu T, Nakai Y, et al. Excimer laser-induced hydroxyl radical formation and keratocyte death in vitro[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(6): 1245~1249.
- [47] Stadler I, Evans R, Kolb B, et al. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes[J]. *Lasers Surg Med*, 2000, 27(3): 255~261.
- [48] Sharman WM, Allen CM, van-Lier JE. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy[J]. *Methods in Enzymology*, 2000, 319: 376~400.
- [49] Moan J, Peng Q, Sorensen R, et al. The biophysical foundations of photodynamic therapy[J]. *Endoscopy*, 1998, 30(4): 387~391.
- [50] Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation[J]. *Photochem Photobiol*, 1991, 54(5): 659.
- [51] 许德余, 陈文辉, 张浩, 等. 光动力治癌新药血卟啉单甲醚 (HMME) 的研究[J]. *中国激光医学杂志*, 1993, 2(1): 3~7.
- [52] 顾瑛, 李峻亨, 王开, 等. 血卟啉甲醚用于光动力学疗法治疗鲜红斑痣的初步临床研究[J]. *中国激光医学杂志*, 1996, 5(4): 201~204.
- [53] 刘凡光, 顾瑛, 富秋涛, 等. 光动力学疗法治疗鲜红斑痣的基础研究——血卟啉单甲醚与血卟啉衍生物吸收特性的比较[J]. *中国激光医学杂志*, 2001, 10(1): 9~12.
- [54] Morgan J, Oseroff AR. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 49: 71~76.
- [55] Peng Q, Morn J, Nesland JM. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy[J]. *Ultrastructural Pathology*, 1996, 20(2): 109~129.
- [56] Cowan DO, Drisko RL 主编. 有机光化学原理[M]. 北京: 科学出版社,

1989.

- [57] 赵云罡, 徐建兴. 线粒体, 活性氧和细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(2): 168~171.
- [58] 王庸晋, 张联珠, 车德才主编. 医学细胞生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [59] Haylett AK, McNair FI, McGarvey D, et al. Singlet oxygen and superoxide characteristics of a series of novel asymmetric photosensitizers[J]. Cancer-Lett, 1997, 112(2): 233~238.
- [60] Sawyer DE, Van Houten B. Repair of DNA damage in mitochondria[J]. Mutat Res, 1999, 434(3): 161~176.

综 述 1

荧光图像采集技术

普通光是由发光质点的热运动所引起的辐射；而荧光是非温度辐射，是一种冷光。在自然界中荧光现象极为普遍。荧光有多种，包括有光致荧光（由光源激发而产生的荧光）、放射荧光（由放射性物质激发而产生的荧光）、生物荧光（生物体发出的荧光）、化学荧光（如磷的氧化时发出的荧光）等等。

荧光的图像采集主要依赖于荧光显微镜，用短波长的光线照射用荧光素染色过的被检物体，使之受激发后而产生长波长的荧光，然后在荧光显微镜下观察。在生物医学领域的研究，特别是在激光医学光动力治疗领域的研究中得到了广泛的应用^[1,2]。

1. 荧光显微镜^[3]

荧光显微镜是一种对能发荧光的物质或经荧光色素染色后能发荧光的物质进行观察的显微镜。

1.1 荧光显微镜的分类：

根据其光路的不同可分为透射式和落射式两种类型：

(1) 透射式：激发光来自被检物体的下方，聚光镜为暗视野聚光镜，使激发光不进入物镜，而使荧光进入物镜。它在低倍情况下明亮，而高倍则暗，在油浸和调中时，较难操作，尤以低倍的照明范围难于确定，但能得到很暗的视野背景。透射式不适用于非透明的被检物体。

(2) 落射式：透射式目前几乎被淘汰，新型的荧光显微镜多为落射式，光源来自被检物体的上方，在光路中具有分光镜，所以对透明和不透明的被检物体都适用。由于物镜起了聚光镜的作用，不仅便于操作，而且从低倍到高倍，可以实现整个视场的均匀照明。

1.2 荧光显微镜的组成与使用：

生物荧光显微镜除了具有一般光学显微镜的机械结构外，它具有激发光

综 述 1

荧光图像采集技术

普通光是由发光质点的热运动所引起的辐射；而荧光是非温度辐射，是一种冷光。在自然界中荧光现象极为普遍。荧光有多种，包括有光致荧光（由光源激发而产生的荧光）、放射荧光（由放射性物质激发而产生的荧光）、生物荧光（生物体发出的荧光）、化学荧光（如磷的氧化时发出的荧光）等等。

荧光的图像采集主要依赖于荧光显微镜，用短波长的光线照射用荧光素染色过的被检物体，使之受激发后而产生长波长的荧光，然后在荧光显微镜下观察。在生物医学领域的研究，特别是在激光医学光动力治疗领域的研究中得到了广泛的应用^[1,2]。

1. 荧光显微镜^[3]

荧光显微镜是一种对能发荧光的物质或经荧光色素染色后能发荧光的物质进行观察的显微镜。

1.1 荧光显微镜的分类：

根据其光路的不同可分为透射式和落射式两种类型：

(1) 透射式：激发光来自被检物体的下方，聚光镜为暗视野聚光镜，使激发光不进入物镜，而使荧光进入物镜。它在低倍情况下明亮，而高倍则暗，在油浸和调中时，较难操作，尤以低倍的照明范围难于确定，但能得到很暗的视野背景。透射式不适用于非透明的被检物体。

(2) 落射式：透射式目前几乎被淘汰，新型的荧光显微镜多为落射式，光源来自被检物体的上方，在光路中具有分光镜，所以对透明和不透明的被检物体都适用。由于物镜起了聚光镜的作用，不仅便于操作，而且从低倍到高倍，可以实现整个视场的均匀照明。

1.2 荧光显微镜的组成与使用：

生物荧光显微镜除了具有一般光学显微镜的机械结构外，它具有激发光

源, 滤片系统和特殊的光学镜头。

荧光显微镜在装置上的重要部件就是要有能提供充分的特定波长的光源装置, 使受照射的物体得到理想的激发而发出强的荧光。为达到这一要求, 需借助滤光片把激发光的光谱限定在这一特定的波长区域内, 而把伴随发出的可见光全部吸收或反射掉。荧光显微镜的激发光源常选用大功率超高压汞灯, 它是用石英玻璃制作, 中间呈球形, 内充一定数量的汞, 工作时由两个电极间放电, 引起水银蒸发, 球内气压迅速升高, 当水银完全蒸发时, 可达 50~70 个标准大气压力, 这一过程一般约需 5~15 min。超高压汞灯的发光是电极间放电使水银分子不断解离和还原过程中发射光量子的结果。它发射很强的紫外和蓝紫光, 足以激发各类荧光物质。因此, 为荧光显微镜普遍采用。

滤片系统是荧光显微镜的重要组成部分, 是获得特定波长激发光, 清晰的荧光影像和发挥显微镜最佳性能的关键, 包括激发滤片、阻断滤片、隔热滤片、分光镜和其他一些中性滤片。

荧光显微镜必须有效地激发样品中的荧光物质和尽可能地收集荧光, 显微荧光图像的质量主要决定于像的亮度和反差。像的亮度受激发光光源和样品中荧光物质等决定, 为此常选用宽波段滤光片激发, 后者不仅增强特异荧光也会导致非特异荧光的升高; 像的反差则由特异结构荧光与本底光之比来决定。本底光包括透过阻断滤光片的杂散激发光, 组织细胞的自发荧光和其他杂光。而增加反差的措施往往会导致荧光图像变暗。因此在实际操作中必须兼顾特异荧光和非特异荧光的相对允许限度。

在使用荧光显微镜时需根据所用的光源、染料的激发波长和发射波长综合分析, 加以选择搭配, 选取不同的分色镜和滤光片。如果分色镜和滤光片的选取合适, 可提高特异信号的强度, 降低非特异信号的强度, 最大限度地提高检测灵敏度和分辨率。此外, 为了提高荧光镜检的效果, 对聚光镜(透射式用)、载玻片、盖玻片和物镜等均有一定的要求。在采集荧光图像时, 还需要选择合适的激发滤色镜、吸收滤色镜以及分光镜, 调整好增益值和曝光时间。

1.3 荧光显微镜具有以下特点^[4]:

(1) 由于标本发出的荧光与背景反差很大, 荧光显微镜在暗背景下观察图

像，比普通明视场显微镜有更好的对比度，更强的反差，可以观察到普通显微镜观察不到的结构、细节。

(2) 在荧光显微镜下观察时标本会发出荧光色素特有的荧光，呈现标本的真彩色图像，易于鉴别，减轻疲劳。

(3) 用于染色的荧光色素只需很低的浓度(1~100 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)就能发出明亮的荧光，一般对机体无毒，有利于活体观察。正因为实现了活体观察，所以使研究组织细胞内变化成为可能，某些荧光物质具有特异性染色作用，即荧光强弱、分布的变化代替了细胞内物质、离子的分布与变化。

(4) 荧光还有助于分析物质的化学成分，荧光色素的特殊基团能特异地与某些化学物质官能团发生结合，可间接分析物质官能团的结构。

几乎所有的有机分子都能直接或经过适当的化学处理后发出荧光而被观察分析，荧光色素染色法不仅可用于精细观察一般的细胞组织，也可用于微生物诊断。

2. CCD 荧光显微镜

CCD 荧光显微镜是在生物荧光显微镜的基础上加装 CCD 构成的。CCD (Charge-coupled device) 称为电荷耦合器件，是一种用于探测光强分布的新型半导体器件，可分为一维(线阵)或二维(面阵)光电列阵。它以电荷量表示光量大小，用耦合方式传输电荷量。具有自动扫描、灵敏度高、动态范围大、光谱响应范围宽、体积小、功耗低、寿命长和可靠性高等一系列优点^[5]。其结构简图见图 1^[6]。

1969 年，美国贝尔实验室 Boyle 和 Smith 利用当时已发展得很好的硅技术研制成第一个 CCD，至今 CCD 技术已发展了三十多年。利用面阵 CCD 作像传感器的 CCD 摄像是现代测试技术中具有广泛应用前景的新技术，由它建立的 CCD 显微图像处理系统，能将计算机的数字图像处理技术应用于显微图像

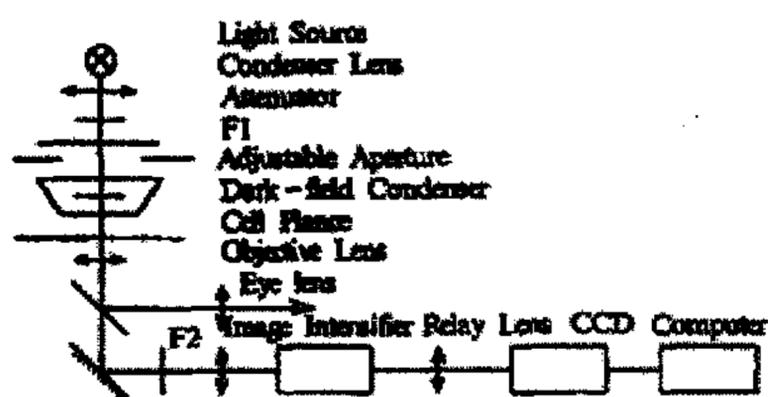


图 1 CCD 荧光显微镜的结构简图

像，比普通明视场显微镜有更好的对比度，更强的反差，可以观察到普通显微镜观察不到的结构、细节。

(2) 在荧光显微镜下观察时标本会发出荧光色素特有的荧光，呈现标本的真彩色图像，易于鉴别，减轻疲劳。

(3) 用于染色的荧光色素只需很低的浓度(1~100 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)就能发出明亮的荧光，一般对机体无毒，有利于活体观察。正因为实现了活体观察，所以使研究组织细胞内变化成为可能，某些荧光物质具有特异性染色作用，即荧光强弱、分布的变化代替了细胞内物质、离子的分布与变化。

(4) 荧光还有助于分析物质的化学成分，荧光色素的特殊基团能特异地与某些化学物质官能团发生结合，可间接分析物质官能团的结构。

几乎所有的有机分子都能直接或经过适当的化学处理后发出荧光而被观察分析，荧光色素染色法不仅可用于精细观察一般的细胞组织，也可用于微生物诊断。

2. CCD 荧光显微镜

CCD 荧光显微镜是在生物荧光显微镜的基础上加装 CCD 构成的。CCD (Charge-coupled device) 称为电荷耦合器件，是一种用于探测光强分布的新型半导体器件，可分为一维(线阵)或二维(面阵)光电列阵。它以电荷量表示光量大小，用耦合方式传输电荷量。具有自动扫描、灵敏度高、动态范围大、光谱响应范围宽、体积小、功耗低、寿命长和可靠性高等一系列优点^[5]。其结构简图见图 1^[6]。

1969 年，美国贝尔实验室 Boyle 和 Smith 利用当时已发展得很好的硅技术研制成第一个 CCD，至今 CCD 技术已发展了三十多年。利用面阵 CCD 作像传感器的 CCD 摄像是现代测试技术中具有广泛应用前景的新技术，由它建立的 CCD 显微图像处理系统，能将计算机的数字图像处理技术应用于显微图像

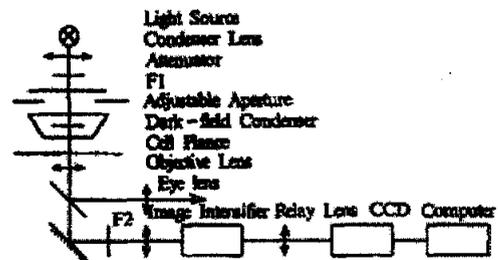


图 1 CCD 荧光显微镜的结构简图

处理中去,大大提高了对显微镜图像观察的直观性和图像分析的灵活性。整个系统具有 CCD 管理、图像测量、图像编辑、图像增强、图像分割、真彩色图、伪彩色图、图像连续采样等多种图像处理功能。本系统经实际应用,在光谱分析、医疗诊断和微循环参数测量方面,取得极好的应用效果^[7,8]。

3. 激光扫描共聚焦显微镜^[9,10]

激光共聚焦扫描显微镜 (laser scanning confocal microscope, LSCM) 是 20 世纪 80 年代发展起来的一种新型的显微镜。它是在荧光显微镜成像的基础上装有激光扫描装置,以单色激光作为光源,使样品被激发出荧光,利用计算机进行图像处理,从而得到细胞或组织内部微细结构的荧光图像。近年来起来的双光子成像技术,以其独具的优势迅速得到了应用^[11]

3.1 LSCM 的原理

传统的光学显微镜使用的是场光源,标本上的每一点的图像都会受到临近点的衍射光或散射光的干扰,而降低图像的清晰度,尤其是观察较厚的样品时。激光扫描共聚焦显微镜利用激光扫描束经照明针孔形成点光源对标本内焦平面上的每一点扫描,标本上的被照射点在检测器的检测针孔处成像,由检测器逐点收集,并在计算机显示器上形成荧光图像。

由于照明针孔和探测针孔相对于物镜焦平面是共轭的,焦平面上的点同时聚集于照明针孔和检测针孔,焦平面以外的点不会在检测针孔处成像,这样得到的共聚焦图像是标本清晰的光学切面图,克服了普通光镜图像模糊的缺点。另外,在显微镜的载物台上加一个微量步进马达,使载物台上下移动,改变焦平面,其最小移动距离为 0.1 微米。不同

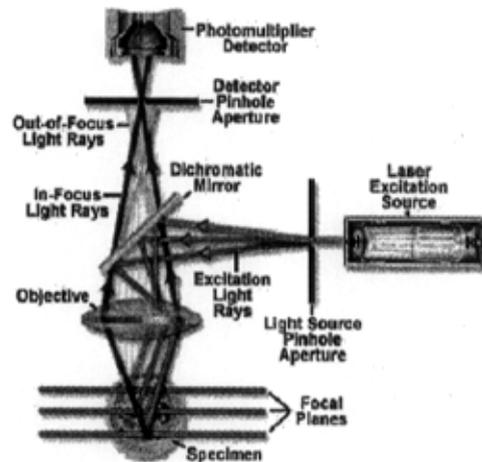


图 2 共聚焦显微镜的工作原理图

层次的光学切面图像经计算机图像三维重建,就能得到一定厚度样品的全层立

体结构图像。其工作原理图见图 2。

3.2 LSCM 的构成

LSCM 是在显微镜基础上配置激光光源、扫描装置、共轭聚焦装置和检测系统而形成的新型显微镜。

LSCM 使用的激光光源有单激光和多激光系统。氩氦离子激光器是可见光范围内使用的多光谱激光器,发射波长为 488 nm、568 nm 和 647 nm,分别为蓝光、绿光和红光;大功率氩离子激光器是紫外和可见光混合激光器,发射波长为 351-364 nm、488 nm 和 514 nm,分别为紫外光、蓝光和绿光。单个激光优点是安装方便、光路简单,但价格较贵并存在不同激光之间的光谱竞争和色差校正问题。多激光器系统在可见光范围使用氩离子激光器,发射波长为 488 nm 和 514 nm 的蓝绿光,氦氖激光器发射波长为 633 nm 的红光,紫外光选用氩离子激光器,波长为 351-364 nm。其优点是各谱线激光单独发射,不存在谱线竞争的干扰,调节方便,但光路复杂,光学系统共轴准直调试要求高。

LSCM 为多通道荧光采集系统,光路上要求至少有三个荧光通道和一个透射光通道,如有第四荧光通道更好,可对物体进行多谱线激光激发,样品发射荧光的探测器为感光灵敏度高的光电倍增管 PMT,配有高速 12 位 A/D 转换器,可以做光子计数。每个 PMT 前设置单独的针孔,由计算机软件调节针孔大小,光路中设有能自动切换的滤色片组,满足不同测量的需要。通过在线视频打印机或数字照相机可以实时拷贝图像和制作幻灯。

3.3 LSCM 的特点

- (1) 可对样品进行非侵入性无损断层扫描,即“光切片”(optical sectioning),最薄可达 0.1 微米;
- (2) 可三维重建,重现立体图像,还可在不同的观察方向对不同深度层次的样品成像;
- (3) 排除焦点外模糊,成像更加清晰;
- (4) 改善水平分辨率,比常规光镜高 1.4 倍,达 130 μm 。

3.4 LSCM 的参数选择^[12]

使用时可根据实验的要求,调整 LSCM 的参数,以便使图像质量的效果最

佳, 实验结果更为准确可靠。这些参数包括 Confocal (共聚焦)、Pinhole (针孔)、Detector (检测器)、PMT (光电倍增管)、Step size (扫描步长)、X points、Y points (X 轴、Y 轴方向扫描点数)、Laser Pwr (激光功率)、Scan Str (激光扫描强度)、Speed (扫描速度)、Samples / pt (点重复扫描次数)、Bk Sub Val (背景消除), 以及 Auto Zoom 和 Display。

由于共聚焦激光显微镜涉及激光、光学、精密仪器、计算机、荧光光谱和生物学、细胞化学、形态学等许多学科的知识, 因而, 要设计一个好的实验方案, 必须对该仪器有一定的了解。这些参数的选择或设置, 彼此之间有着非常密切的关系, 因而, 对各个参数的选择应当综合考虑。而且除了要考虑各个参数之间的关系外, 还要考虑所要观察的细胞类型及大小、荧光染料种类及浓度、是做形态学观察还是做细胞的生理、生化指标的动态变化观测等诸多因素。

3.3.5 LSCM 的用途^[13,14,15,16]

1、图像处理功能: (1) 组织光学切片; (2) 三维图像重建; (3) 细胞物理和生物化学测定; (4) 荧光的定量、定位分析; (5) 及其它细胞内离子的实时定量测定。

2、细胞生物学功能: (1) 粘附细胞的分选: 它有两种方式: Ablation 方式和 Cookie Cutting 方式; (2) 激光细胞显微外科及光陷阱技术; (3) 荧光漂白恢复 (FRAP) 技术; (4) 胞间通讯的研究; (5) 细胞膜流动性; (6) 光活化技术。

4. 荧光图像采集的注意事项^[17]

(1) 激发光长时间的照射, 会发生荧光的衰减和淬灭现象, 因此尽可能缩短观察时间, 暂时不观察时, 应用挡板遮盖激发光。

(2) 作油镜观察时, 应用“无荧光油”, 尤其是在 U、V 激发时因香柏油带有青色荧光。

(3) 荧光几乎都较微弱, 应在较暗的室内进行。

(4) 因照明光源含有紫外线, 应避免直视照明光源, 常在载物台前上方有黄色遮光板予以保护, 以防止紫外线对视网膜的损伤。

(5) 电源应装置稳压器, 否则电压不稳不仅会降低汞灯的寿命, 也会影

佳, 实验结果更为准确可靠。这些参数包括 Confocal (共聚焦)、Pinhole (针孔)、Detector (检测器)、PMT (光电倍增管)、Step size (扫描步长)、X points、Y points (X 轴、Y 轴方向扫描点数)、Laser Pwr (激光功率)、Scan Str (激光扫描强度)、Speed (扫描速度)、Samples / pt (点重复扫描次数)、Bk Sub Val (背景消除), 以及 Auto Zoom 和 Display。

由于共聚焦激光显微镜涉及激光、光学、精密仪器、计算机、荧光光谱和生物学、细胞化学、形态学等许多学科的知识, 因而, 要设计一个好的实验方案, 必须对该仪器有一定的了解。这些参数的选择或设置, 彼此之间有着非常密切的关系, 因而, 对各个参数的选择应当综合考虑。而且除了要考虑各个参数之间的关系外, 还要考虑所要观察的细胞类型及大小、荧光染料种类及浓度、是做形态学观察还是做细胞的生理、生化指标的动态变化观测等诸多因素。

3.3.5 LSCM 的用途^[13,14,15,16]

1、图像处理功能: (1) 组织光学切片; (2) 三维图像重建; (3) 细胞物理和生物化学测定; (4) 荧光的定量、定位分析; (5) 及其它细胞内离子的实时定量测定。

2、细胞生物学功能: (1) 粘附细胞的分选: 它有两种方式: Ablation 方式和 Cookie Cutting 方式; (2) 激光细胞显微外科及光陷阱技术; (3) 荧光漂白恢复 (FRAP) 技术; (4) 胞间通讯的研究; (5) 细胞膜流动性; (6) 光活化技术。

4. 荧光图像采集的注意事项^[17]

(1) 激发光长时间的照射, 会发生荧光的衰减和淬灭现象, 因此尽可能缩短观察时间, 暂时不观察时, 应用挡板遮盖激发光。

(2) 作油镜观察时, 应用“无荧光油”, 尤其是在 U、V 激发时因香柏油带有青色荧光。

(3) 荧光几乎都较微弱, 应在较暗的室内进行。

(4) 因照明光源含有紫外线, 应避免直视照明光源, 常在载物台前上方有黄色遮光板予以保护, 以防止紫外线对视网膜的损伤。

(5) 电源应装置稳压器, 否则电压不稳不仅会降低汞灯的使用寿命, 也会影

响镜检的效果。

参 考 文 献

- [1] Kessel D, Poretz RD. Sites of photodamage induced by photodynamic therapy with a chlorin e6 triacetoxymethyl ester (CAME)[J]. *Photochem Photobiol*, 2000, 71: 94~96.
- [2] Trivedi NS, Wang HW, Nieminen AL, et al. Quantitative analysis of Pc 4 localization in mouse lymphoma (LY-R) cells via double-label confocal fluorescence microscopy[J]. *Photochem Photobiol*, 2000, 71: 634~639.
- [3] 舍英, 伊立齐, 呼和巴特尔主编. 现代光学显微镜[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [4] 李楠, 王凤翔, 周春喜主编. 荧光探针应用技术[M]. 北京: 军事医学科学院出版社, 1998.
- [5] 张展霞, 刘洪涛, 何家耀. 电荷耦合器件及其应用进展[J]. *光谱学与光谱分析*, 2000, 20(2): 160~166.
- [6] 陈天明, 王苏生, 俞信等. 高灵敏度荧光显微镜量化技术及其在光生物学研究中的应用[J]. *生物物理学报*, 1995, 11(3): 446~450.
- [7] 李炳兴, 李文冲, 顾唤国, 等. 面阵 CCD 与计算机显微图像处理技术[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 1996, 35(增刊 2): 157~161.
- [8] Adams MC, Salmon WC, Gupton SL, et al. A high-speed multispectral spinning-disk confocal microscope system for fluorescent speckle microscopy of living cells[J]. *Methods*, 2003, 29(1): 29~41.
- [9] 李楠, 尹岭, 苏振伦主编. 激光扫描共聚焦显微术[M]. 北京: 人民军医出版社, 1997.
- [10] Webb RH. Theoretical basis of confocal microscopy[J]. *Methods in Enzymology*, 1999, 307: 3~20.

响镜检的效果。

参 考 文 献

- [1] Kessel D, Poretz RD. Sites of photodamage induced by photodynamic therapy with a chlorin e6 triacetoxymethyl ester (CAME)[J]. *Photochem Photobiol*, 2000, 71: 94~96.
- [2] Trivedi NS, Wang HW, Nieminen AL, et al. Quantitative analysis of Pc 4 localization in mouse lymphoma (LY-R) cells via double-label confocal fluorescence microscopy[J]. *Photochem Photobiol*, 2000, 71: 634~639.
- [3] 舍英, 伊立齐, 呼和巴特尔主编. 现代光学显微镜[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [4] 李楠, 王凤翔, 周春喜主编. 荧光探针应用技术[M]. 北京: 军事医学科学院出版社, 1998.
- [5] 张展霞, 刘洪涛, 何家耀. 电荷耦合器件及其应用进展[J]. *光谱学与光谱分析*, 2000, 20(2): 160~166.
- [6] 陈天明, 王苏生, 俞信等. 高灵敏度荧光显微镜量化技术及其在光生物学研究中的应用[J]. *生物物理学报*, 1995, 11(3): 446~450.
- [7] 李炳兴, 李文冲, 顾唤国, 等. 面阵 CCD 与计算机显微图像处理技术[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 1996, 35(增刊 2): 157~161.
- [8] Adams MC, Salmon WC, Gupton SL, et al. A high-speed multispectral spinning-disk confocal microscope system for fluorescent speckle microscopy of living cells[J]. *Methods*, 2003, 29(1): 29~41.
- [9] 李楠, 尹岭, 苏振伦主编. 激光扫描共聚焦显微术[M]. 北京: 人民军医出版社, 1997.
- [10] Webb RH. Theoretical basis of confocal microscopy[J]. *Methods in Enzymology*, 1999, 307: 3~20.

- [11] K.Konig. Multiphoton microscopy in life sciences[J]. *J Microscopy*, 2000, 200: 83~104.
- [12] 雷国华, 鲍永耀, 朴英杰, 等. 共聚焦显微镜及其参数选择[J]. *中国医学物理学杂志*, 1997, 14(1): 46~48.
- [13] Hollingworth S, Soeller C, Baylor SM, et al. Sarcomeric Ca²⁺ gradients during activation of frog skeletal muscle fibres imaged with confocal and two-photon microscopy[J]. *J Physiol*, 2000, 526 Pt 3: 551~560.
- [14] Wu SM, Ren QG, Zhou MO, et al. Photodynamic effects of 5-aminolevulinic acid and its hexylester on several cell lines[J]. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, 2003, 35(7): 655~660.
- [15] Shen ZY, Shen WY, Chen MH, et al. Mitochondria, calcium and nitric oxide in the apoptotic pathway of esophageal carcinoma cells induced by As₂O₃[J]. *Int J Mol Med*, 2002, 9(4): 385~390.
- [16] Buttino I, Ianora A, Carotenuto Y, et al. Use of the confocal laser scanning microscope in studies on the developmental biology of marine crustaceans[J]. *Microsc Res Tech*, 2003, 60(4): 458~464.
- [17] 余炳生, 张仪编著. 研究用生物显微镜[M]. 日本欧林巴斯光学工业株式会社赞助, 1989.

综 述 2

活性氧与光动力疗法

自 1900 年医学生 Oscar Raab 偶然发现丫啉橙(Acridine orange)染色使草履虫发生光敏致死现象, 揭开了人们对于光敏化反应研究的序幕。此后的一个多世纪, 对于光动力过程的研究逐步深入, 特别是近二十余年, 随着激光技术的发展和新型光敏剂的出现, 光动力治疗作为一项新型诊疗技术, 逐渐被各国学者接受。PDT 的临床适应证也在不断的扩大, 在某些疾病的治疗上, 光动力治疗已经成为首选的方案^[1]。

目前大多数学者认为 PDT 的治疗机制是由于光敏剂被细胞或组织吸收后在特定波长激光的照射下产生活性氧, 后者具有细胞毒作用, 它们可进一步与细胞内成分反应, 从而引起细胞损伤。因此, 目前认为光敏反应生成的活性氧是细胞杀伤的主要介质。研究光敏过程中活性氧的产生对于理解光动力的生物学效应具有重要意义。

1. 活性氧的种类及其检测方法^[1,2,3]

所谓活性氧(Reactive oxygen species, ROS)是指氧的某些代谢产物和一些反应的含氧产物。除了单线态氧(singlet oxygen, $^1\text{O}_2$)、超氧阴离子(superoxide anion radical, $\text{O}_2^{\cdot-}$)、羟自由基(hydroxyl radical, HO^{\cdot})、过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)外, 还包括脂质过氧化的中间产物 LO^{\cdot} 、 LOO^{\cdot} 和 LOOH^{\cdot} 。也有人还把臭氧 O_3 和几种氮的氧化物包括在内。

正常生理状态下人体细胞内会通过某些反应产生一定数量的活性氧。如体内的 $^1\text{O}_2$ 主要产生于嗜中性粒细胞与巨噬细胞在吞噬细菌时随过氧化物酶的催化反应中, 以及脂质(LH)过氧化过程中 LO_2^{\cdot} 与 LO_2^{\cdot} 的相互作用, 而眼角膜中柱细胞含有的视黄醛亦可通过光敏化反应产生 $^1\text{O}_2$ 。

ROS 对于细胞来说是一把“双刃剑”。极低水平 ROS 对于维持细胞正常的生理功能和代谢具有极其重要的作用, 它可对某些基因进行调制, 参与某些酶

促反应,参与前列腺素、胶原蛋白等物质的合成,发挥解毒、杀菌作用。在生理情况下,生物体内产生的 ROS 在抗氧化酶及外源性和内源性抗氧化剂的协调作用下不断地被清除,ROS 可维持于平衡浓度,此时的 ROS 也将会导致细胞损伤,不过损伤的程度较轻,受损伤的分子可以得到修复、置换、降解代谢和重新合成,而不会对机体造成损害。而在衰老、应激、某些病理情况及光敏化反应时,ROS 产生增多或机体的清除能力减弱,就将对机体造成损伤。

1.1 单线态氧及其检测方法

1976 年 Weishaupt 等^[4]首先提出 $^1\text{O}_2$ 在 PDT 过程中的细胞毒性物质。组成生物物质的成分中,除了水以外,各种氨基酸、嘌呤、嘧啶以及磷脂等均可与 $^1\text{O}_2$ 反应,从而引起细胞损伤甚至死亡。 $^1\text{O}_2$ 可与膜脂质反应导致细胞膜的破裂,可使蛋白活性丧失以及 DNA 的不可逆性损伤^[2]。可以说 II 型反应在光动力治疗中占主导地位,而 $^1\text{O}_2$ 作为重要的细胞毒性物质而起的相当主要的细胞杀伤作用。

$^1\text{O}_2$ 不是自由基,其分子中没有不成对电子,故具有顺磁性,不是自由基^[1]。 $^1\text{O}_2$ 有两种形式: $^1\Delta_g\text{O}_2$ 和 $^1\Sigma_g^+\text{O}_2$, 其中前者比基态氧的能量高 94 kJ/mol, 而后者比基态氧的能量高 156.7 kJ/mol, $^1\Sigma_g^+\text{O}_2$ 极不稳定,在甲醇中的寿命只有 20 ps^[5],一生成就衰减成 $^1\Delta_g\text{O}_2$ 或基态氧,所以没有多大的生物学意义。

$^1\text{O}_2$ 在水中的寿命为 4.4 μs ,在类脂中为 50-100 μs ,在细胞内由于其高反应性寿命往往较短,在细胞膜的脂质区域中约为 100 ns,在细胞质中约为 250 ns^[6]。 $^1\text{O}_2$ 的寿命短也就决定了它的扩散半径相当短,大约只有 45 nm。Morn 等在实验也证明由血卟啉在大肠杆菌细胞壁外所产生的 $^1\text{O}_2$ 不会引起细菌 DNA 链的断裂^[7]。而人的细胞直径范围在 10 μm 到 100 μm 范围内,相比细胞的体积而言, $^1\text{O}_2$ 的作用半径相当小,只能与周围较小半径内的物质发生反应,破坏邻近的细胞结构。 $^1\text{O}_2$ 的产生位置决定了其损伤的靶位点,因此目前大多数学者认为光敏剂的细胞定位决定了光敏损伤的亚细胞定位^[11]。

在这种光敏化反应中, $^1\text{O}_2$ 的生成速度和生成量主要取决于光照时间、光照强度和该反应中的光子使用效率,即量子产率 (quantum yield, Q)。量子产率由光敏剂的理化特性决定。Photofrin 的 $^1\text{O}_2$ 产率为 0.87。

单线态氧产率公式如下^[8]：

$$\phi_{\Delta} = \phi_T \phi_{en} = \phi_T \left(\frac{k_{en} [O_2]}{k_r + k_{nr} + k_q [O_2]} \right)$$

其中 ϕ_T 是光敏剂的三线态产率； ϕ_{en} 是能量转移的效率； k_{en} 是能量转移的速率常数， k_q 是被氧淬灭的三线态光敏剂的总速率常数。

1O_2 淬灭剂对于 PDT 生物效应的抑制作用也证实 1O_2 在 PDT 光损伤中的重要作用。经证实许多化合物均可以与 1O_2 竞争性反应，从而起到保护细胞免受 1O_2 损伤的作用。它们包括叠氮化钠 (sodium azide)，组氨酸 (histidine)，二甲基呋喃 (2,5-dimethylfuran)， β -胡萝卜素 (β -carotene) 及 DABCO (1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane) 等，但这些淬灭剂的专一性不强，也可清除 HO \cdot 。重水可延长 1O_2 的半衰期， 1O_2 在重水中的寿命可达 65 μ s^[16]。

由于 1O_2 的反应活性强，寿命短，检测生物体系内 1O_2 水平较为困难。探测 1O_2 的最直接的方法是利用当其从单线态回到基态时，可辐射能量而发射波长为 1270 nm 红外光的原理，利用瞬态光谱技术观察^[2]。

电子自旋共振 (Electron spin resonance, ESR) 又称电子顺磁共振 (Electron paramagnetic resonance, EPR) 可以直接检测含有不配对电子的物质 (自由基)。不过由于有些自由基性质非常活泼，寿命极短，浓度又低，使用顺磁共振法难以查到，可采用在标本中加入自旋捕捉剂 (自旋捕捉剂是一些氮酮或亚硝酸类有机化合物，如 ABN、PBV、DMPO 等)，它们可与标本中活泼自由基反应生成稳定的氮氧化物自由基。后者寿命较长，可以用顺磁共振法检测出。利用 ESR 间接检测生物体内 1O_2 时，利用 TMPD (2,2,6,6-tetramethylpiperidone) 在 1O_2 的氧化下生成 TAN (2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone-N-oxyl)，后者是一种相对稳定的氮氧化物，可由 ESR 检测其电子自旋共振光谱，从而对单线态氧进行定量^[2]。此法已用于检测溶酶体、红细胞、支气管上皮细胞内 1O_2 水平，目前技术已较为成熟。还有报道利用此方法检测活体皮肤内 1O_2 ，为 1O_2 活体研究提供了可行的技术。但本方法对样品制备要求较高，同时仪器昂贵、操作复杂^[16]。

1.2 其它活性氧物质及其检测方法

正如前面介绍的 $^1\text{O}_2$ 是 PDT 过程中较为重要的 ROS, 但是起作用的还有 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 HO^{\cdot} 等活性氧成分。 HO^{\cdot} 是化学性质最活泼的活性氧, 它几乎与细胞内每一类的有机物反应, 并且有非常高的速率常数, 因此其破坏性极强^[2]。

同时, 值得注意的是活性氧之间可以相互转变、相互反应, 对于光动力过程中所产生的任何一种活性氧对生物体的危害都不能孤立的看待^[1]。

许多生物物质如 NADH、维生素 C、半胱氨酸、酪氨酸和尿嘧啶等可提供电子而与光敏剂反应^[9]。光敏剂的阴离子自由基与分子氧发生电子交换, 而生成超氧阴离子。理论上讲 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 也可通过分子氧与三线态的光敏剂发生反应来生成, 但是实验证明在热动力反应中能量更易被用于生成 $^1\text{O}_2$ ^[16]。

HO^{\cdot} 在水中的寿命极短, 一般不易用 ESR 的方法直接检测。而利用 ESR 直接检测 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 时, 必须在低温条件下进行。但是可以通过使用 DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrrolidine-1-oxide) 等自旋捕捉剂所显示的自旋共振波谱间接检测 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 HO^{\cdot} , 虽然两者均可与之生成稳定的加合物, 加入乙醇可以区分 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 HO^{\cdot} 。

细胞色素 C 还原法是通过计算高铁细胞色素 C (ferricytochrome c) 转变为亚铁细胞色素 C (ferrocycytochrome c) 的量可以得到 PDT 过程中产生的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。

化学发光法检测 H_2O_2 是利用其与化学发光剂如鲁米诺 (Luminol) 反应, 在碱性条件下, H_2O_2 氧化鲁米诺产生内过氧化物, 后者分解时部分能量以光子的形式释放, 利用化学发光仪即可检测。比色法利用过氧化氢酶 (catalase) 也可检测 H_2O_2 。

Gilaberte 等报道使用流式细胞仪检测 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 , 以 hydroethidine 和 dihydrorhadamine 123 作为标记探针, 其中 hydroethidine 与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 反应生成发射红色荧光的 ethidium bromide, 而 dihydrorhadamine 123 可与 H_2O_2 反应生成发射绿色荧光的 rhadamine 123^[10]。

2. 光动力疗法中 ROS 的产生

光动力疗法 (Photodynamic therapy, PDT) 是由可见光、近红外光或紫外光所驱动的, 通过生物组织中激发态光敏物质的退激而引发的一系列物理、化

学和生物学过程^[11]。

光动力疗法作为近二十年来发展起来的新型治疗手段,得到了很快的发展,出现了很多新的临床适应症。目前由美国的 FDA 通过批准的 PDT 治疗方案包括老年眼底黄斑变性、Barrett 食管伴高度不典型增生和腺癌、梗阻性非小细胞性肺癌的辅助治疗等。

光动力疗法组织选择性好、对微血管组织的损伤作用强、是一种局部治疗方法、全身副反应少^[11]。而且光动力疗法还可以杀伤放疗和化疗耐受的肿瘤细胞,这就提示光动力治疗肿瘤具有其它临床常规方法所不可比拟的优势^[12]。

2.1 光敏化反应致 ROS 产生的机理

基态光敏剂吸收光子的能量后,经单重态(寿命 1~1000 ns)系间窜越到三重态(寿命 1~1000 μ s),常见光敏剂的三重态产率(triplet state quantum yields, ϕ_T)通常在 0.2~0.7 的范围内^[13];一般认为光敏剂的三重态寿命(triplet state lifetimes, τ_T)至少要长于 500 ns 才有可能作为有效的光敏剂而供临床使用^[14]。受光激发的三重态敏化剂可进行以下两种形式的反应^[1, 15];

①经过氢原子或电子转移,直接同底物或溶剂反应,形成自由基或自由基离子,后者可与氧作用产生氧化产物,此型反应叫类型 I (Type I) 反应;

②将能量转移给分子氧,形成 1O_2 , 1O_2 是高活性的氧化剂,可使底物被氧化,此型反应叫类型 II (Type II) 反应。有时也出现从敏化剂到氧的电子转移,给出氧化了的敏化剂和 $O_2^{\cdot-}$, 这个过程也属于类型 II 反应,过去常被定义为类型 I 反应。

类型 I 和类型 II 反应可同时出现,二者的比例受敏化剂、底物、氧浓度以及敏化剂同底物的结合程度的影响。光敏化反应的示意图见图 1。

尽管我们知道 PDT 在特定条件下具有很强的细胞毒性作用,然而对于其具体的反应尚缺乏足够的了解。对于总体的光损伤结果而言,反应类型似乎并不太重要,因为在氧存在的情况下, I 型反应与 II 型反应均引起类似的氧化损伤和自由基链式反应,并最终引起细胞死亡。而当我们为获得最佳的生物学效应时,两型反应路径之间的差别就变得极为重要了,所以说了解光动力反应的具体反应机制与反应路径,对于理解 PDT、指导临床治疗至关重要^[16]。

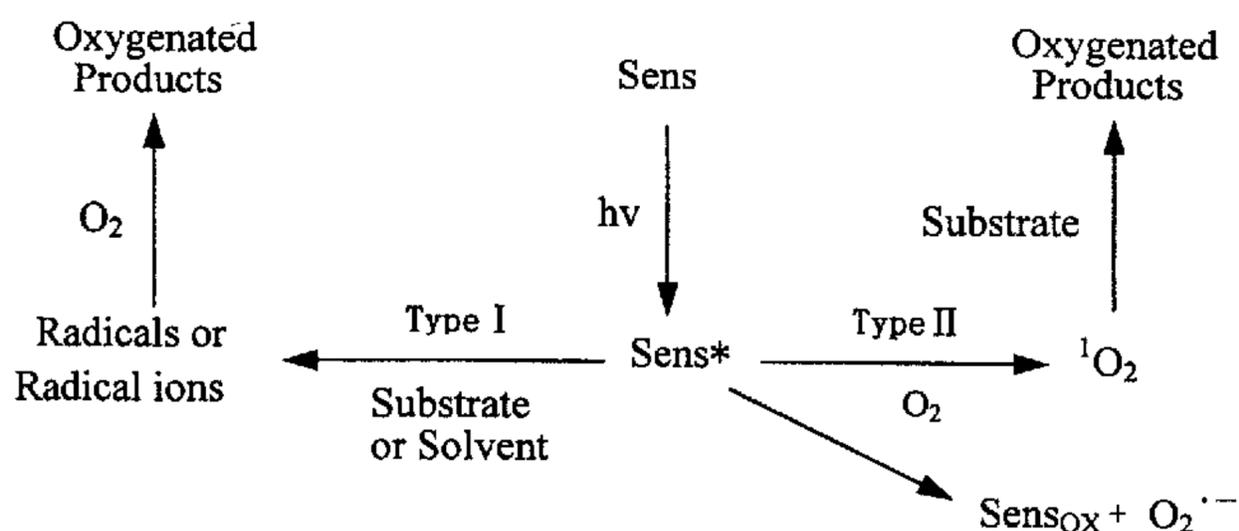


图 1 光敏化 I 型与 II 型反应的示意图

Fig. 1 Diagrammatic presentation of type I and type II photosensitized oxidation reactions. From C.S. Foote, Photochem. Photobiol, 1991, 54(5): 659

2.2 两型反应之间的竞争

尽管我们对于 I 型、II 型反应之间相互竞争的影响因素已了解的比较清楚，然而由于生物体系环境的复杂性，光敏剂的定位及其与组织和细胞成分的结合位点的不确定性，以及组织甚至细胞亚微结构内氧浓度的波动，使我们很难预计某一给定体系的光动力反应类型。

反应体系的环境因素在决定光动力反应的类型方面十分重要。理论上讲，氧浓度高时以 II 型反应为主，反之则以 I 型反应为主。PDT 时的组织氧摄量的变化可改变光动力反应的类型，当肿瘤血管受到破坏、组织氧浓度下降到一定水平时，光动力反应应该可以从 II 型变为 I 型。I 型反应易于在极性环境中发生，而 II 型反应易于在脂质环境中发生，此时 $^1\text{O}_2$ 的寿命也相对变长，然而实验结果显示即使是在相对极性的环境中 II 型反应仍然占主要地位^[14]。

前面提到的各种活性氧的淬灭剂可用于鉴别特定系统的反应机制。然而淬灭剂并不十分特异，它不只可与 $^1\text{O}_2$ 反应，也可与光敏化反应时产生的其他活性氧分子相互作用。例如 $^1\text{O}_2$ 的有效淬灭剂——叠氮化钠，也可与羟基自由基反应（虽然其效率不高）。Korytowski 等在实验中发现叠氮化钠对脂质过氧化的抑制作用仅为预期值的 1/50，究其原因可能是叠氮化钠未能有效的清除胞膜内产生的 $^1\text{O}_2$ ，而羟基自由基也与叠氮化钠反应而使其消耗^[17]。因而只有仔细

分析反应的产物才能合理的鉴别出光敏反应的具体类型。

Ferraudi 等使用 tetrasulfonated chlorgallium(III) phthalocyanine 类光敏剂观察到在低氧浓度时, 主要是 I 型反应引起膜成分和氨基酸的光氧化^[18]。由于 anthracyclines 低的三重态量子产率和 $^1\text{O}_2$ 产率, 推测其光动力作用的以 I 型反应为主^[11]。竹红菌素 B (Hypocrellin B) 的光敏化反应同时通过 I 型、II 型反应起作用, 但似乎 I 型反应占主导地位^[19]。Viola 等在实验中发现 phthalocyanine 在 DMF 的均一溶液中同时发生 I 型、II 型反应, 但以 I 型反应为主。在同样的人工膜反应体系中, 轴配合基的存在与否决定着反应的类型, 无轴配合基的以 I 型反应为主、而有轴配合基的以 II 型反应为主^[20]。上述试验结果都证明环境因素在决定 PDT 反应机制上的重要作用。

光敏剂 copper(II)- α -meso-N,N-dimethyloctaethylbenzochlorin iminium chloride 已证明在鼠膀胱上皮癌动物模型上光动力效应十分有效, 这种光敏剂的三线态寿命小于 20 ns, 如此短的时间不足以将其能量传递给氧而生成 $^1\text{O}_2$ 。使用 SOD 和过氧化氢酶也证明此种光敏剂的细胞损伤作用主要由除 $^1\text{O}_2$ 以外的其它活性氧成分所介导。推测可能是由于光敏剂接近亦或是连接某一重要的生物分子, 而且很短的电子传递的时间比例 (time scale) 促进了 I 型反应, 才使得此种光敏剂具有如此高效的光动力治疗作用^[21]。Hadjur 等认为 BPD-MA (Benzoporphyrin derivative monoacid A ring) 的光动力作用是类型 I 和类型 II 的共同结果^[22]。

2.3 活性氧的产生位置

我们知道光动力治疗的选择性主要依赖的是光敏剂在不同组织之间的浓度差; 而在亚细胞水平, 同样存在着选择性分布。光敏剂在不同组织的分布、光敏剂对细胞的亲和性以及光敏剂进入亚细胞结构并聚集的情况都将影响 PDT 的效应强度。现在已知的具有高度选择性定位的光敏剂有定位于细胞膜的 monocationic porphyrin^[23]、定位于线粒体的 porphycene monomer^[24]以及定位于溶酶体的 lysyl chlorin p6^[25]。有学者认为: 光敏剂的亚细胞结构定位决定了细胞死亡的类型。定位于线粒体的光敏剂一般引起细胞的凋亡, 如 Photofrin 和原卟啉 IX (protoporphyrin IX, PpIX), 后者由 5-氨基酮戊酸 (5-aminolaevulinic

acid, 5-ALA) 在线粒体内合成转变而来; 而定位于膜和溶酶体的光敏剂则导致细胞的坏死^[26]。

由于光敏剂具有荧光特性, 可以使用荧光显微镜或共聚焦显微镜来研究光敏剂在细胞内的分布情况, 从而间接的反映活性氧的产生位置。因为通常光敏剂的荧光性均较弱, 因而要求探测的灵敏度高, 同时还需要考虑光漂白现象、光损伤以及光敏剂的再分布等问题, 而且光敏剂的荧光量子产率亦会随着周围环境的不同而发生变化^[26]。需要引起注意的是光敏剂分布的选择性只是一个相对的概念, 其实细胞内的任何结构内均会存在一定量的光敏剂, 只是含量上存在差别。

光敏剂的亚细胞定位不同导致亚微结构之间光敏剂含量的差别, 但是我们认为光敏剂含量的差别并不是决定其生物学效应的唯一因素, 因为还有以下几个方面决定其最终效应:

①光敏剂含量相同并不代表产生的活性氧的量相同, 因为不同细胞器内的亚微环境不同, 其活性氧产生情况也不可能相同, 即使在同一细胞器内, 位于膜上的光敏剂与基质中的光敏剂产生 ROS 的情况也存在差异;

②由于组成成分含量上的差异造成了不同细胞器结构对于 ROS 敏感性的千差万别, 如核膜与线粒体膜在组成成分上基本相同, 但是在各组分的含量上却存在种种差别;

③不同细胞器结构对于光敏反应生成的活性氧的清除能力迥异, 那些定位接近 ROS 清除剂产生位置的光敏剂, 其产生的 ROS 可很快地被清除掉, 而很难发挥杀伤作用^[27];

④对于已经造成的损伤, 不同细胞器的修复能力亦不相同, 例如在相同的活性氧损伤条件下, 线粒体 DNA 的损伤常重于核 DNA, 主要因为前者的修复能力较后者低^[28]。

3. PDT 过程中 ROS 产生的影响因素

参与光动力反应的多种因素均影响活性氧的产生, 在前面我们已经提到了一些, 概括起来有以下几个方面:

3.1 光敏剂

光敏剂不同就决定了其单线态氧产率不同,而且产生的活性氧种类也不同。光敏剂的化学、光化学特性、光物理特性(包括脂溶性和离子性)以及其孵育时间和孵育浓度等均影响 ROS 产率。光敏剂在细胞内分布的位置不同,ROS 的产生就不可能相同,最终所导致的结果亦不同。所以专家们考虑可否促使光敏剂在敏感的亚细胞结构内含量增加,以降低患者在光动力治疗时光敏剂的摄入量,避免毒副作用。目前光动力治疗的发展在很大的程度上依赖于新型光敏剂的研发,杀伤效应强、毒副作用轻微、剂型方便使用和价格合理的光敏剂对于光动力治疗未来的发展至关重要。

3.2 光源

只要光强度足够,包括激光(脉冲或连续)、氙灯、汞灯在内的许多光源均可激发光敏剂产生活性氧。活性氧的产生与光源的波长,工作方式,照射方式,照射光剂量(功率密度、能量密度)等密切相关,从而影响到光动力治疗的效果。目前在临床治疗中激发波长的选取往往是一对矛盾,因为波长与穿透深度成正比,为了有效地治疗肿瘤,选取长波长的光源可以治疗深部的肿瘤,而此时往往远离光敏剂的最佳激发波长,ROS 的产率降低,而影响光动力的杀伤作用。

双光子激发技术的出现有望解决上述问题^[29]。在研究竹红菌素 A 和竹红菌素 B 的实验中发现双光子激发光谱分别与单光子激发光谱相近,提示双光子与单光子激发光敏剂的反应过程类似^[30]。

3.3 细胞内外环境

前面已经提到了环境因素在决定光动力反应类型方面的重要作用,这里仅列举几个常见的因素,包括组织氧浓度、内环境 pH 值、温度等。

氧分子在光敏反应中均扮演着重要的作用,组织氧浓度的重要性越来越引起学者的关注。无论是 I 型还是 II 型反应,均需氧的参与,缺氧条件下,PDT 介导的生物学效应完全被抑制。对于 Photofrin®,当以 50 mW/cm^2 的功率密度照射时,摄氧率约为 $6-9 \mu\text{M/s}$ ^[31]。利用 Photofrin II 进行的体外细胞实验发现 8 torr 氧分压时的光动力效应仅有 40 torr 氧分压时效应的一半^[32]。大量的实验证明氧的存在是光动力反应的必要条件。距离血管近的组织内的氧在消耗后能够

得到迅速的补充, 活性氧产量大, 杀伤效应强, 而那些远离血管的组织则不能取得良好的治疗效果。而在光动力治疗时, PDT 致血管损伤将使氧含量下降, 同时光敏化反应生成活性氧物质亦消耗作为原料的氧, 这些都必将影响到光动力治疗的效果^[33]。

有些因素是通过影响其它因素而起作用的。良恶性组织细胞外 pH 值的差异被认为有可能是引起光敏剂在肿瘤组织中富集的原因之一。在实验中已经证实酸性环境的确有利于细胞摄取光敏剂, 不过并不是所有光敏剂的摄取都受 pH 值的影响^[34,35]。这种内环境 pH 值对光敏剂的摄取所造成的影响最终关系到活性氧的生成情况。Moan 等发现可以通过提高温度来提高治疗靶组织内 PpIX 的水平, 而加强光动力的选择性治疗作用^[36,37]。

3.4 细胞种类与细胞状态

细胞的种类也对发生的光动力反应的类型起着至关重要的影响。实验证明革兰氏阴性细菌与革兰氏阳性细菌对于光动力反应所产生的 ROS 敏感性不同。Rywkin 等使用各种淬灭剂, 在实验中证明红细胞的杀伤效应通过 I 型、II 型反应共同实现, 而与红细胞处于同一反应体系中的病毒的杀伤效应则通过 II 型反应进行^[38]。

细胞自身的状态也影响光动力反应中 ROS 对细胞的杀伤作用。Wyld 等发现膀胱癌细胞 HT1197 在 ALA 孵育 1 小时后, 细胞内 PpIX 的荧光在 G1 期、S 期、G2 期存在明显的差异, 相应各期的细胞存活率亦存在差异, 这或许可以解释在 PDT 的临床治疗肿瘤时出现的治疗不敏感或治疗无效等现象^[39]。

3.5 各因素之间的相互影响

上述提到的各种因素彼此之间彼此影响, 互为作用, 构成了影响细胞内光敏反应的网状系统。如: 细胞种类不同, 对于光敏剂的吸收就存在差别; 细胞状态和内环境 pH 等都将直接影响到进入细胞内的光敏剂的数量。光照强度与光敏剂的浓度是两个最重要的影响因素, 降低前者而增加后者可以取得合适的杀伤效应, 而提高前者而降低后者仍可取得相似的效应。所以说光动力反应杀伤效应的调节机制十分复杂, 仍有大量的规律性的知识亟待探索。

结 语

总而言之,光动力反应是一个比较复杂的过程,涉及许多方面。尽管 PDT 已应用于临床多年,并取得了良好的疗效,然而在 PDT 的作用机制和临床应用等方面尚存在许多问题,这对于其发展是十分不利的。只有将其完善成一个作用机理清楚、应用指征明确的成熟的治疗方法,才能够使临床医生逐步接受这种新型治疗方式,在临床治疗中更好地把握应用指征,综合考虑参与光动力作用的各种因素,完善治疗方案,从而取得医患双方满意的治疗效果。相信随着光动力研究的深入,新的临床适应证的不断拓展,以及激光医学相关领域包括新型激光医疗器械和光敏剂的研发,光动力疗法必将成为人类战胜疾病的又一利器。

参 考 文 献

- [1] 方允中, 郑荣梁主编. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [2] Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305: 761~770.
- [3] 庞战军, 周玫, 陈瑗主编. 自由基医学研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [4] Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor[J]. *Cancer Res*, 1976, 36(7 PT 1): 2326~2329.
- [5] Schmidt R, Bodesheim M. Time-resolved measurement of $O_2(^1\Sigma_g^+)$ in solution. Phosphorescence from upper an excited state[J]. *J Phys Chem*, 1994, 98: 2874~2876.
- [6] Baker A, Kanofsky JR. Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells[J]. *Photochem Photobiol*, 1992, 55(4): 523~528.

结 语

总而言之,光动力反应是一个比较复杂的过程,涉及许多方面。尽管 PDT 已应用于临床多年,并取得了良好的疗效,然而在 PDT 的作用机制和临床应用等方面尚存在许多问题,这对于其发展是十分不利的。只有将其完善成一个作用机理清楚、应用指征明确的成熟的治疗方法,才能够使临床医生逐步接受这种新型治疗方式,在临床治疗中更好地把握应用指征,综合考虑参与光动力作用的各种因素,完善治疗方案,从而取得医患双方满意的治疗效果。相信随着光动力研究的深入,新的临床适应证的不断拓展,以及激光医学相关领域包括新型激光医疗器械和光敏剂的研发,光动力疗法必将成为人类战胜疾病的又一利器。

参 考 文 献

- [1] 方允中, 郑荣梁主编. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [2] Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305: 761~770.
- [3] 庞战军, 周玫, 陈瑗主编. 自由基医学研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [4] Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor[J]. *Cancer Res*, 1976, 36(7 PT 1): 2326~2329.
- [5] Schmidt R, Bodesheim M. Time-resolved measurement of $O_2(^1\Sigma_g^+)$ in solution. Phosphorescence from upper an excited state[J]. *J Phys Chem*, 1994, 98: 2874~2876.
- [6] Baker A, Kanofsky JR. Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells[J]. *Photochem Photobiol*, 1992, 55(4): 523~528.

- [7] Moan J, On the diffusion of singlet oxygen in cells and tissues[J]. *J Photochem Photobiol B*, 1990, 6: 343~344.
- [8] DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002, 233—234: 351~371.
- [9] Davila J, Harriman A. Photosensitized oxidation of biomaterials and related model compounds[J]. *Photochem Photobiol*, 1989, 50(1): 29~35.
- [10] Gilaberte Y, Pereboom D, Carapeto FJ, et al. Flow cytometry study of the role of superoxide anion and hydrogen peroxide in cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX[J]. *Photodermatol-Photoimmunol-Photomed*, 1997, 13(1-2): 43~49.
- [11] 顾瑛, 刘凡光主编. 光动力疗法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2004.
- [12] Capella MA, Capella LS. A light in multidrug resistance: photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors[J]. *J Biomed Sci*, 2003, 10(4): 361~366.
- [13] Moan J, Peng Q, Sorensen R, et al. The biophysical foundations of photodynamic therapy[J]. *Endoscopy*, 1998, 30(4): 387~391.
- [14] Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors[J]. *J Photochem Photobiol B*, 1997, 39(1): 1~18.
- [15] Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation[J]. *Photochem Photobiol*, 1991, 54(5): 659.
- [16] Sharman WM, Allen CM, van-Lier JE. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy[J]. *Methods-Enzymol*, 2000, 319: 376~400.
- [17] Korytowski W, Bachowski GJ, Girotti AW. Photoperoxidation of cholesterol in homogeneous solution, isolated membranes, and cells: comparison of the

- 5 alpha- and 6 beta-hydroperoxides as indicators of singlet oxygen intermediacy[J]. *Photochem Photobiol*, 1992, 56(1): 1~8.
- [18] Ferraudi G, Arguello GA, Ali H, et al. Types I and II sensitized photooxidation of aminoacid by phthalocyanines: a flash photochemical study[J]. *Photochem Photobiol*, 1988, 47(5): 657~660.
- [19] Yu C, Chen S, Zhang M, et al. Spectroscopic studies and photodynamic actions of hypocrellin B in liposomes[J]. *Photochem Photobiol*, 2001, 73(5): 482~488.
- [20] Viola A, Jeunet A, Decreau R, et al. ESR studies of a series of phthalocyanines. Mechanism of phototoxicity. Comparative quantitation of $O_2^{\cdot-}$ using ESR spin-trapping and cytochrome c reduction techniques[J]. *Free Radic Res*, 1998, 28(5): 517~532.
- [21] Skalkos D, Hampton JA, Keck RW, et al. Iminium salt benzochlorins: structure-activity relationship studies[J]. *Photochem Photobiol*, 1994, 59(2): 175~181.
- [22] Hadjur C, Wagnieres G, Monnier P. EPR and spectrophotometric studies of free radicals ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, BPD-MA \cdot^-) and siglet oxygen (1O_2) genernted by irradiation of benzoporphyrin derivative monoacid ring A[J]. *Photochem Photobiol*, 1997, 65: 818~827.
- [23] Kessel D, Woodburn K, Gomer CJ, et al. Photosensitization with derivatives of chlorin p6[J]. *J Photochem Photobiol B*, 1995, 28(1): 13~18.
- [24] Kessel D, Woodburn K, Henderson BW, et al. Sites of photodamage in vivo and in vitro by a cationic porphyrin[J]. *Photochem Photobiol*, 1995, 62(5): 875~881.
- [25] Kessel D, Luo Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis[J]. *J Photochem Photobiol B*, 1998, 42(2): 89~95.

- [26] Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, et al. Photodynamic therapy[J].
J Nat Can, 1998, 90(12): 889~905.
- [27] Haylett AK, McNair FI, McGarvey D, et al. Singlet oxygen and superoxide characteristics of a series of novel asymmetric photosensitizers[J].
Cancer-Lett, 1997, 112(2): 233~238.
- [28] Sawyer DE, Van Houten B. Repair of DNA damage in mitochondria[J].
Mutat Res, 1999, 434(3): 161~176.
- [29] Bhawalkar JD, Kumar ND, Zhao CF, et al. Two-photon photodynamic therapy[J]. J Clin Laser Med Surg, 1997, 15(5): 201~204.
- [30] Liu J, Zhao YW, Zhao JQ, et al. Two-photon excitation studies of hypocrellins for photodynamic therapy[J]. J Photochem Photobiol B, 2002, 68(2-3): 156~164.
- [31] Foster TH, Murant RS, Bryant RG, et al. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy[J]. Radiat Res, 1991, 126(3): 296~303.
- [32] Chapman JD, Stobbe CC, Arnfield MR, et al. Oxygen dependency of tumor cell killing in vitro by light-activated Photofrin II[J]. Radiat Res, 1991, 126(1): 73~79.
- [33] Schouwink H, Oppelaar H, Ruevekamp M, et al. Oxygen depletion during and after mTHPC-mediated photodynamic therapy in RIF1 and H-MESO1 tumors[J]. Radiat Res, 2003, 159(2): 190~198.
- [34] Friberg EG, Cunderlikova B, Pettersen EO, et al. pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer[J]. Cancer Lett, 2003, 195(1): 73~80.
- [35] Cunderlikova B, Kongshaug M, Gangeskar L, et al. Increased binding of chlorin e(6) to lipoproteins at low pH values[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2000, 32(7): 759~768.
- [36] Moan J, Berg K, Gadmar OB, et al. The temperature dependence of

- protoporphyrin IX production in cells and tissues[J]. *Photochem Photobiol*, 1999, 70(4): 669~673.
- [37] Juzeniene A, Juzenas P, Kaalhus O, Iani V, et al. Temperature effect on accumulation of protoporphyrin IX after topical application of 5-aminolevulinic acid and its methylester and hexylester derivatives in normal mouse skin[J]. *Photochem Photobiol*, 2002, 76(4): 452~456.
- [38] Rywkin S, Lenny L, Goldstein J, et al. Importance of type I and type II mechanisms in the photodynamic inactivation of viruses in blood with aluminum phthalocyanine derivatives[J]. *Photochem Photobiol*, 1992, 56(4): 463~469.
- [39] Wyld L, Smith O, Lawry J, et al. Cell cycle phase influences tumor cell sensitivity to aminolaevulinic acidinduced photodynamic therapy in vitro[J]. *Br J Cancer*, 1998, 78(1): 50~55.

在学期间发表文章情况

1. 李晓松, 刘凡光, 顾瑛, 等. 应用荧光探针 $H_2DCF-DA$ 检测光照致细胞内活性氧产生的研究[J]. 中国激光医学杂志, 2004, 13 (2) :69~74.
2. 顾瑛, 李晓松, 刘凡光. PAOD 的激光治疗. 李晓鹰, 叶平主编. 老年周围动脉硬化闭塞性疾病[M]. 济南: 山东科技出版社, 2004.
3. 李晓松. 5-氨基酮戊酸与卟啉类光敏剂 Photosan 在癌性支气管狭窄光动力治疗的临床比较研究 (摘译). 中国激光医学杂志, 2003 (3): 202.
4. 李晓松. 脉冲染料激光治疗红斑狼疮 (摘译). 中国激光医学杂志, 2004 (1): 66.

致 谢

三年硕士研究生的生活转瞬从指尖划过，几许欢畅，几许惆怅，追忆似水流年，我感到深深地庆幸，庆幸我的身边总有那么多期待的眼神、感动的话语、温暖的双手，这些都是我能够不断向前迈进的动力源泉。

首先，衷心地感谢我的导师刘凡光教授、顾琪教授，是他们将我这个刚刚跨出大学校门的懵懵懂懂的医学生带入了激光医学的神圣殿堂。在我人生的重要学习阶段，两位导师无私的将他们的所学传授给我，使我的科研水平和临床能力得到很大的提高。他们对工作对生活的态度对我产生巨大的影响，必将使我终生受益。任何言语都不足以表达我对导师的感激之情。

感谢我的两位合作伙伴，戴维德博士和王雷博士在课题进行的整个过程中给予了很大帮助。

感谢激光医学科实验室的曹晶、丁新民、张丽、韩丽娜、黄乃艳、陈虹霞、王颖、焦泽龙同学对于本实验的关心和帮助。

感谢解放军总医院医学实验测试中心的于力方副主任技师，军事医学科学院仪器分析测试中心的周涛副研究员和满江红同学，他们高超的技术水平使得我能够高质量的完成实验研究。

感谢激光医学科梁洁、潘玉明、王开老师在临床实践中给予的指导和帮助，使得我在门诊工作的临床工作中积累了很多技能和经验。

感谢我的室友贾鑫、林季多年来的关心和帮助，难忘一起走过的青春岁月。

由衷地感谢我的父母和亲人们对我学业的全力支持和理解，我取得的任何成绩都属于他们，希望我能够成为他们的骄傲。