

氦-氧等离子体针灭活肺癌 A549 细胞*

陈维^{1)†} 黄骏¹⁾ 李辉¹⁾ 吕国华¹⁾ 王兴权¹⁾ 张国平¹⁾ 王鹏业¹⁾ 杨思泽¹⁾²⁾

1) (中国科学院物理研究所软物质物理重点实验室, 北京凝聚态物质物理国家实验室, 北京 100190)

2) (厦门大学物理与机电工程学院, 福建省等离子体与磁共振研究重点实验室, 厦门 361005)

(2012年2月20日收到; 2012年3月7日收到修改稿)

研究了介质阻挡放电等离子体针对肺癌 A549 细胞的灭活机制, 探讨从不锈钢管注入到氦等离子体尾流区域的氧气含量对杀灭肺癌细胞 A549 的影响. 利用中性红吸收测试法定性观察了等离子体处理后死亡的细胞和活着的细胞的形态区别, 并且定量测定了不同条件下的细胞存活率. 在固定功率 24 W 的处理过程中, 氦-氧等离子体的灭活效率主要取决于等离子体曝光时间以及氦气中添加氧气的百分含量. 实验结果显示最好的处理参数为: 处理时间 150 s, 800 mL/min 的氦气添加 3% 氧气, 保持针距样品的距离为 3 mm. 根据氦-氧等离子体发射光谱, 可以推断在细胞灭活过程中, 氦-氧等离子体中的活性粒子 (如羟基和氧自由基) 起主要作用.

关键词: 氦-氧等离子体针, 介质阻挡放电, A549 癌细胞, 发射光谱

PACS: 52.50.Dg, 52.77.-j, 87.80.-y

2 实验

2.1 装置

等离子体针的结构在我们曾经的工作中^[8]阐述过, 如图 1 所示. 主体由石英管、内外电极、橡皮塞、聚四氟乙烯固定器构成. 内径 6 mm, 外径 8 mm 的石英管充当阻挡介质. 内电极为一根内径 0.9 mm, 外径 1.6 mm 的不锈钢管, 被橡皮塞和聚四氟乙烯固定器固定在石英管的中心, 同时能从其上端端口输入氧气. 而外电极则是包裹在石英管下部的铜编织. 氦气由石英管侧壁输入, 内外电极通过石英形成介质阻挡放电便产生氦-氧等离子体, 经由内径从 6 mm 缩到 1 mm 的聚焦装置从喷嘴以针状喷出, 如图 2 所示. 两电极被连接到峰峰值电压为 30 kV, 频率变化范围在 8—40 kHz 的交流电源 (CTP2000) 上.

2.2 样品制备

把培养好的肺癌细胞株 A549 接种于 96 孔板

1 引言

近 20 年来, 低温大气压等离子体由于其巨大的应用前景正成为等离子体物理学界关注的热点, 尤其在生物学上的应用, 如: 细菌灭活^[1-3]、伤口愈合^[4]、牙齿漂白^[5] 以及癌细胞^[6,7] 的处理. 肺癌是世界上导致肿瘤患者死亡最常见的恶性肿瘤, 主要在进展期才能被诊断, 此刻大约 30%—40% 的非小细胞肺癌 A549 已经存在转移性疾病, 治疗措施有限. 治疗已有转移的非小细胞肺癌的传统方法是化疗, 但是副作用大, 作用时间长, 患者的生存率普遍偏低. 然而用低温大气压等离子体消融肺癌细胞是一种较有前途的方法, 相对来说副作用小而且效率高. 本文利用介质阻挡放电装置 (等离子体针) 产生低温大气压等离子体, 研究了其基本特性及对肺癌 A549 细胞的灭活作用. 等离子体处理提供了这种能去除病理细胞又不引发炎症, 且不对身体产生过度伤害的可能性.

* 国家自然科学基金青年科学基金 (批准号: 11005151) 资助的课题.

† E-mail: chwbetter@163.com

的底部,再用含 10%胎牛血清和密理博高糖培养基在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养, 24 h 后用等离子体处理.

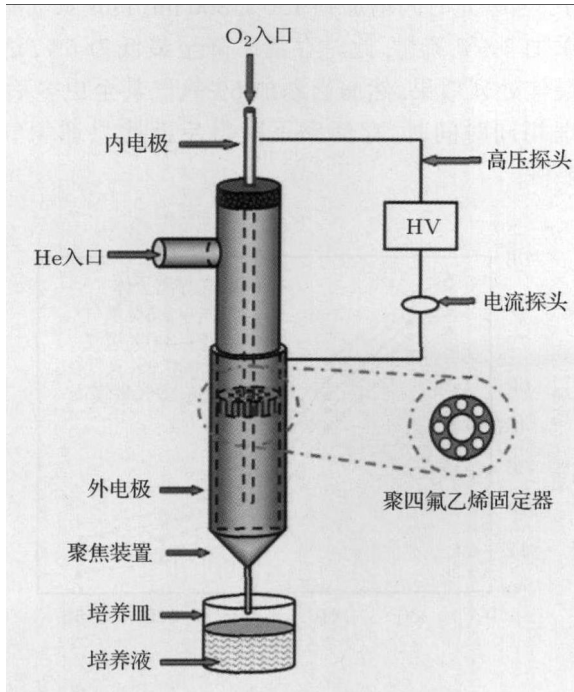


图 1 等离子体针实验装置

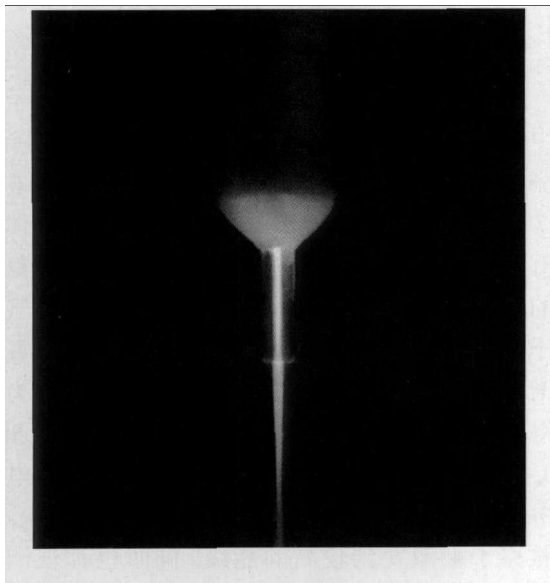


图 2 氦-氧等离子体焰照片

2.3 实验方法

在实验过程中,保持高糖培养液厚度为 2 mm,用等离子体针放入 96 孔板内中心位置,液面以

上 1 mm 处,打开流量计从侧壁输入 800 mL/min 的氦气,保持功率为 24 W,调节不同的曝光时间和不锈钢管内输入氧气的百分含量,进行放电处理.处理时每组参数对应三个样品,然后取平均值.应该注意的是,对照组的处理条件是只用气流并关掉电源.处理后封口,在相同的条件下继续培养 24 h.然后抽出每孔中的培养基,添入磷酸盐缓冲液冲洗细胞,洗毕,移出缓冲液并在每孔中加入中性红染料,将 96 孔板放在培养箱内培养 2 h.接着在倒置显微镜 (Olympus IX70) 观察孔板底部的细胞.移除中性红并反复三次用磷酸盐缓冲液继续冲洗每个孔,加入中性红裂解液,随后将孔板放在微量滴定板的摇床上迅速震动,直到中性红从细胞中溶出并且成为颜色均匀的溶液.在 540 nm 处用分光光度计 (U-3010, Hitachi) 测定溶出的中性红的吸光度值 (optical density, OD).每孔中提取的中性红与活细胞的数量成线性关系^[9],即吸光度值正比于活细胞数目.而实验组与对照组存活细胞比值就是等离子体处理后的细胞存活率.最后利用光纤光谱仪 (Stellarnet, EPP-2000C) 测定等离子体的发射光谱,确定关键的灭活作用粒子.

3 结果和讨论

3.1 I-V 曲线

加在等离子体针反应器上的电压和通过反应器的电流分别用高压探头 (Tektronix P6015 A) 和电流探头 (Tektronix P6021) 实时测量.输出信号由示波器 (Tektronix TDS 210) 收集.等离子体针放电时的电压和电流曲线,如图 3 所示.电压呈正弦曲线,并且随外加交变电压的正弦波变化形成了每半周期一次的快脉冲放电细丝电流.每个电流细丝在放电空间和时间上都是无规则分布的,也称微放电.

3.2 中性红染色

利用中性红吸收测试法定性观察了等离子体处理后死活细胞的形态区别,并且定量测定了不同处理条件下的细胞存活率.中性红是一种水溶性染料,能通过有活性的细胞膜贮存在溶酶体内,染色阳性;当细胞膜和溶酶体膜破坏后,不能摄取染料,因此无活性细胞,染色阴性.根据溶酶体吸收染料的能力,能辨别出活的,毁坏的或死的细胞.如图 4 所示,死细胞呈现皱缩和泡状,最终四分五裂成为

无形态的细胞碎片,不吸收中性红染料,而活细胞呈现正常的生长状态并且能吸收中性红染料.死细胞与活细胞之间有明显的分界线,因为1 mm的口径能保证处理区域的精确性,处理范围内的细胞被杀灭,而临近范围的细胞不受影响.

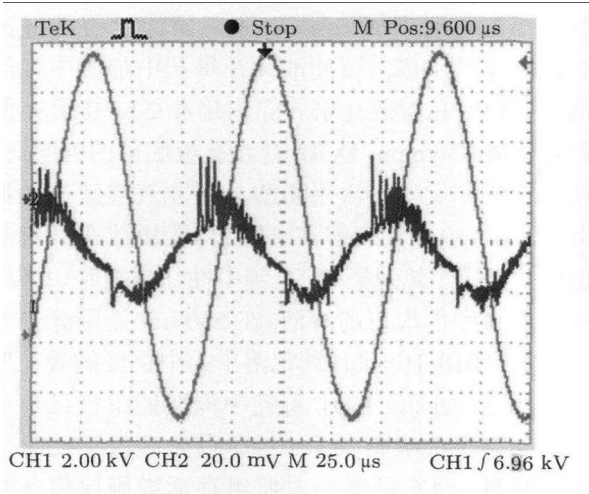


图3 等离子体针放电电压电流曲线图(氦气流量为800 ml/min; 1为电压曲线, 2为电流曲线)

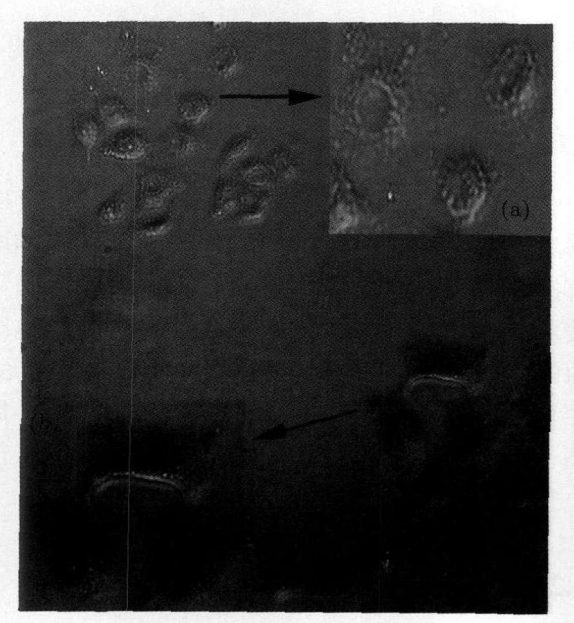


图4 等离子体处理后死亡的和存活的 A549 细胞的典型照片 (a) 死细胞; (b) 活细胞

3.3 存活率测定

固定功率24 W条件下,改变等离子体的曝光时间和从内电极输入的氧气百分含量对细胞存活率有着显著的影响,如图5所示.图中纵坐标为处

理后24 h测得的细胞存活率.横坐标为曝光时间分别从15 s升至150 s的过程.随着曝光时间的延长和添加氧气百分含量的增加,细胞的存活率不断减小.当曝光时间增加到150 s,800 mL/min氦气流量添加3%氧流量,此时存活率降至最低为6%,达到最佳处理效果.然而当添加6%氧气甚至更多后,处理相同时间时,存活率下降得反而比只通氦气时要慢.

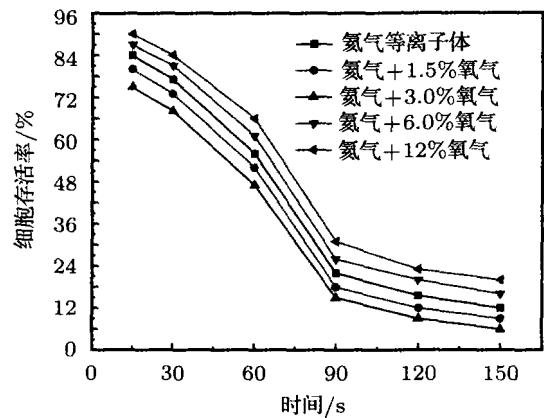


图5 800 mL/min氦等离子体中不同曝光时间和添加氧含量下测得的A549细胞存活率曲线

3.4 光谱测定

通过测量等离子体发射光谱来判定等离子体羽中存在的各种活性粒子.在等离子体下方3 mm处测量纯氦气和添加氧气时的发射光谱,图6和图7所示为200—850 nm波长范围内等离子体的发射光谱,能清晰观察到谱线中均出现了氦、氮、氧的各种激发态物种.图6为800 mL/min氦气等离子体光谱,图7为800 mL/min氦气和3%氧气光谱.比较不同条件下的发射光谱,其共同点为均测得了7个波长下的激发态氦原子谱线(501, 587, 640, 656, 669, 707, 729 nm),这是因为氦气放电过程中电子直接碰撞氦气($e^- + He \rightarrow He^* + e^-$),从而氦原子被激发到较高的能级.同时也都观测到氦气在316, 337, 357和380 nm发射的电子-振动谱线($C^3\Pi_u - B^3\Pi_g$),这是因为整个实验过程是在大气压条件下进行,所以在等离子体针内尤其在针管口处会混入一定量的空气.391 nm处的 N_2^+ 离子是典型的第一负带系,可能通过彭宁电离($He^* + N_2 \rightarrow He + N_2^+ + e^-$),这是因为He的亚稳态能量较高,因此容易发生彭宁电离.而氧自由

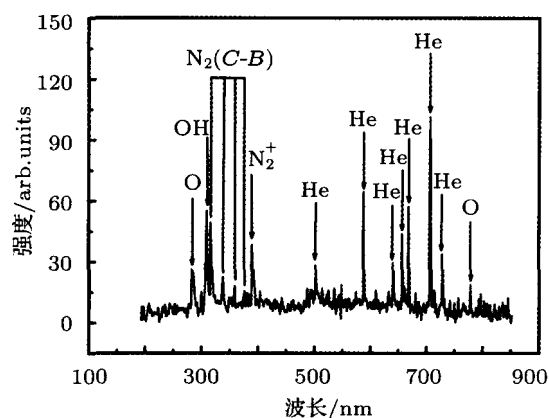


图6 功率 24 W, 氦气为 800 mL/min 等离子体下方 3 mm 处的发射光谱图

基 (285 nm, 777 nm) 主要可能由两种方式产生: 一种是氧分子被电子碰撞 ($e^- + O_2 \rightarrow O + O + e^-$)^[10,11], 另一种则也是彭宁电离 ($N_2^+ + O_2 \rightarrow N_2 + O + O$)^[12,13]. 309 nm 处的 OH 通过两种途径产生: 一种是激发态的氧与混入针管内空气里水分子反应 ($H_2O + O^* \rightarrow 2OH$)^[14], 另一种是电子碰撞水分子 ($H_2O + e^- \rightarrow H + OH + e^-$)^[14]. 与氦气等离子体相比, 氦添氧等离子体中发现 O_2^+ , 也是彭宁电离产生 ($He^* + O_2 \rightarrow He + O_2^+ + e^-$)^[15,16]. 同时也能发现图 7 中氮和羟基的谱线相对强度比图 6 只通入氦气时要高. 由于活性粒子氧和羟基的强氧化机制能够穿透 A549 的细胞膜从而导致细胞死亡^[17,18], 而这恰恰上我们的实验结果很好地符合, 添入 3% 含量的氧气处理效果比不添氧时要好. 但是过量氧气可能会吸收大量电子从而导致等离子体内活性粒子及各种自由基减少, 反而影响处理效果, 因此当添加氧达到 6% 时, 效果并没有不添

氧时好.

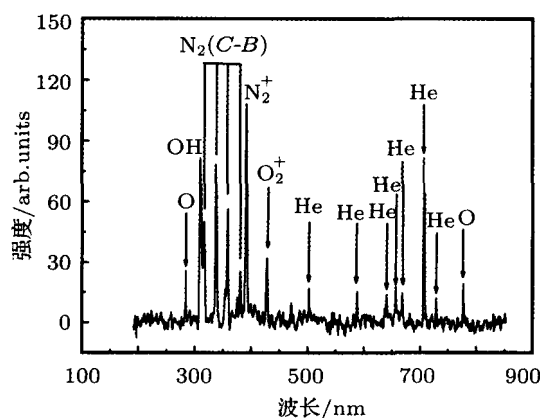


图7 功率 24 W, 氦气为 800 mL/min, 添加氧气为 3% 的等离子体下方 3 mm 处的发射光谱

4 结论

本文利用介质阻挡放电装置产生的低温大气压等离子体对非小细胞肺癌 A549 进行灭活. 并且比较了氦等离子体中添加不同含氧量时对处理效果的影响. 实验表明随着曝光时间延长, 处理效果越好. 功率在 24 W, 800 mL/min 流量的氦气, 添加 3% 的含氧量, 处理时间 150 s 时效果最佳, 此时 O 和 OH 自由基浓度最高, 相对强度最大, 癌细胞存活率最低降至 6%. 这说明适当增加氧自由基含量能提高等离子体灭活效率. 而当继续增加含氧量, 处理效果下降. 这说明过量氧气反而影响灭活效率. 通过等离子体的发射光谱, 发现氧自由基 (O, OH) 在对 A549 癌细胞灭活的过程中起着主导作用.

- [1] Laroussi M 2005 *Plasma Process. Polym.* **2** 391
 [2] Fridman G, Brooks A, Galasubramanian M 2007 *Plasma Process. Polym.* **4** 370
 [3] Deng X T, Shi J J, Kong M G 2006 *IEEE Trans. Plasma Sci.* **34** 1310
 [4] Fridman G, Friedman G, Gutsol A 2008 *Plasma Process. Polym.* **5** 503
 [5] Lee H W, Kim G J, Kim J M 2009 *Endod J.* **35** 587
 [6] Fridman G, Shereshevsky A, Jost M M 2007 *Plasma Chem. Plasma Process.* **27** 163
 [7] Zhang X H, Li M J, Zhou R L 2008 *Appl. Phys. Lett.* **93** 021502
 [8] Zhang X H, Huang J, Liu X D 2009 *Acta Phys. Sin.* **58** 1595 (in Chinese) [张先徽, 黄骏, 刘筱娣 2009 物理学报 **58** 1595]
 [9] Guillermo R, Ana D P, Jorge L Z 2008 *Nature Protocols* **3** 1125
 [10] Jacob A E, Hobbs S J 1974 *J. Bacteriol.* **117** 360
 [11] Andrade F J, Wetzel W C, Chan G C 2006 *J. Anal. At. Spectrom.* **21** 1175
 [12] Alvarez R, Quintero M C, Rodero A 2005 *J. Phys. D* **38** 3768
 [13] Naidis G V 1997 *J. Phys. D* **30** 1214
 [14] Leveille V, Coulombe S 2005 *Plasma Sources Sci. Technol.* **14** 467
 [15] Lee Y H, Yi C H, Chung M J 2001 *Surf. Coat. Technol.* **146-147** 474
 [16] Seo D C, Chung T H 2001 *J. Phys. D* **34** 2854
 [17] Dreher D, Junod A F 1996 *Eur. J. Cancer* **32A** 30
 [18] Halliwell B, Aruoma O I 1991 *FEBS Lett.* **281** 9

Inactivation of A549 cancer cells by a helium-oxygen plasma needle*

Chen Wei^{1)†} Huang Jun¹⁾ Li Hui¹⁾ Lv Guo-Hua¹⁾ Wang Xing-Quan¹⁾
Zhang Guo-Ping¹⁾ Wang Peng-Ye¹⁾ Yang Si-Ze¹⁾²⁾

1) (Key Laboratory of Soft Matter Physics, Beijing National Laboratory for Condensed Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Science, Beijing 100190, China)

2) (Fujian Provincial Key Laboratory for Plasma and Magnetic Resonance, School of Physics and Mechanical and Electrical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

(Received 20 February 2012; revised manuscript received 7 March 2012)

Abstract

An inactivation mechanism of A549 cancer cells is studied by using a dielectric barrier discharge (DBD) plasma needle. The influence of oxygen concentration, which is injected into helium plasma afterglow region through a stainless steel tube, is investigated. The neutral red uptake assay provides a qualitative observation of morphological differences between the dead cells and the viable cells after plasma treatment and a quantitative estimation of cell viability under different conditions. In the treatment process at a fixed power of 24 W, the inactivation efficiency of helium-oxygen plasma depends mainly on the exposure time and percentage of added oxygen in helium plasma. Experimental results show that the best parameters of the process are 150 s treatment time, 800 mL/min He with 3% O₂ addition and separation of needle-to-sample 3 mm. According to the helium-oxygen emission spectra of the plasma jet, it is concluded that the reactive species (for example, OH and O) in the helium-oxygen plasma play a major role in the cell deactivation.

Keywords: helium-oxygen plasma needle, DBD, A549 cancer cells, optical emission spectra

PACS: 52.50.Dg, 52.77.-j, 87.80.-y

* Project supported by the Young Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 11005151).

† E-mail: chwbetter@163.com