

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.27.005

光敏剂甲苯胺蓝在口腔颊粘膜渗透性的研究*

刘旭 林江 孟培松 齐峰 毕良佳[△]

(哈尔滨医科大学附属第四医院口腔科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:研究不同时间,甲苯胺蓝(Toluidine Blue O, TBO)在大鼠炎症性口腔颊粘膜渗透的浓度变化,及甲苯胺蓝与炎症细胞分布之间的关系。**方法:**实验选取 wistar 大鼠 32 只,炎症组大鼠 20 只,建立以金葡萄菌为优势菌的感染炎症创口模型。将浓度为 1 mg/mL 甲苯胺蓝溶液置于大鼠感染炎症创口组织上 5、10 分钟后处死,正常粘膜组大鼠 8 只,于甲苯胺蓝在正常颊粘膜渗透 5、10、20、40 分钟后处死,避光条件下取组织块进行冰冻切片,即刻荧光显微镜下观察荧光分布;冰冻切片进行 HE 染色,观察炎症细胞分布。采用 Image Pro-plus 6.0 软件检测荧光分布的光密度、分布面积以及炎症分布面积。**结果:**①创口周围正常粘膜及正常完整粘膜组的甲苯胺蓝均停留在角化层,未穿透上皮层,和时间无相关关系;②炎症 5 分钟组平均荧光分布可达到炎症细胞分布面积的 89%,炎症 10 分钟组可达 108%;炎症组在创口表面及深部,荧光光密度均无显著差异。**结论:**①甲苯胺蓝可有效分布于感染的炎症组织,但不能穿透正常组织,完整上皮可保护正常组织免受光动力的杀伤。②浓度为 1 mg/mL 的甲苯胺蓝溶液渗透时间为 10 分钟时,创口中甲苯胺蓝的分布与炎症细胞的分布基本一致,甲苯胺蓝浓度梯度无显著变化。提示甲苯胺蓝作为光敏剂在针对口腔创口感染的抗菌光动力疗法中可有效、安全的发挥作用。

关键词:光动力疗法;甲苯胺蓝;口腔感染

中图分类号:Q95-3;R781 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)27-5213-04

Fluorescence Biodistribution of Toluidine Blue O
on Rat Buccal Mucosa*LIU Xu, LIN Jiang, MENG Pei-song, QI Feng, BI Liang-jia[△]

(Department of stomatology, the Fourth affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: This study focused on the timely change of osmotic concentration of toluidine blue (Toluidine Blue O, TBO) on the rat buccal mucosa, and the corresponding relationship between the distribution of toluidine blue and inflammatory cells. **Methods:** 32 wistar rats, were chosen and divided into three groups, namely inflammation group, control group and blank group. The 20 rats in the inflammatory group were cultured by the type strain of Staphylococcus aureus to established the wound model of inflammation. Primary TBO solution (1mg/mL) was placed on the wound model. Ten rats of the inflammation group were sacrificed after five minutes, the rest rats of the inflammation group were killed 5 minutes later. The specimens were frozen and sliced to observe the fluorescence distribution, and melt were stained with H&E to observe the distribution of inflammation cells. With Image Pro-plus 6.0 software for image processing. After the experiment, parameters, such as the optical density of fluorescence distribution, the area of fluorescence distribution and distribution area of inflammation were measured. **Results:** ① The photosensitizer (PS) was localized in the intact epithelial layers and its distribution was not related to time. ② In 5-minute inflammation group, the average fluorescence distribution of inflammatory cells reached 89%, and 10 minutes group could reach 108%. In the inflammatory group, no significant differences of optical density of fluorescence distribution was noticed though the wound. **Conclusion:** ① Toluidine blue can be effectively distributed in the infected tissue, yet can not penetrate the normal tissues. Inhance intact epithelium may protect normal tissues from Photodynamic killing. ② TBO solution (1mg/mL) was placed on the wound model for 10 minutes, the distribution of toluidine blue consistented with the distribution of inflammatory cells, with on significant change of luidine blue in concentration gradient. These promising results suggested the use of such treatment as a safe and effective alternative to topical anti-microbials in future clinical applications.

Key words: Photodynamic therapy; Toluidine blue O; Oral infection

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R781 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)27-5213-04

前言

口腔感染是临床常见的疾病,其治疗多为抗生素治疗,但随着临床的广泛应用,细菌常会出现耐药性,又给临床治疗工

作带来了新的困难^[1-2]。因此寻找新的有效治疗方法,已成为人们的关注热点。光动力抗微生物化学疗法(PACT)能杀伤细菌等微生物,且不伤害正常组织,已尝试应用于抗细菌微生物治疗^[3-5],但由于目前光敏剂价格较贵,极大的限制了光动力在国

* 基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金联合资助课题(20132307110018)

作者简介:刘旭(1983-),男,医学硕士,医师,主要从事光动力治疗牙周病的研究,

E-mail:liuxu326@163.com,电话:0451-82576565

△通讯作者:毕良佳,博士生导师,主任医师,E-mail:biliangjia66@163.com

(收稿日期:2014-03-11 接受日期:2014-04-12)

内的应用。所以开发研究价格低廉、性质稳定的新型光敏剂,对于光动力疗法的发展和普及有着至关重要的促进作用。甲苯胺蓝已被证明是对抗许多微生物及其毒性产物有效的光敏剂,其介导的光动力可能成为治疗局部感染抗菌药物的有价值替代方法^[6]。

本研究利用甲苯胺蓝介导的光动力对大鼠口腔感染创口进行处理,观察其在组织的渗透性分布,旨在为甲苯胺蓝作为光敏剂进行光动力治疗依据。为口腔感染的临床治疗树立新的理念。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 Wistar 大鼠 32 只, 体重 170 ± 10 g 克, 雄性, 由哈尔滨医科大学附属第一医院动物实验中心提供, 普通饲料常规饲养。随机分为二组, 对照组 4 只, 实验组 28 只。

1.1.2 光敏剂 甲苯胺蓝(TBO), 中国上海国药化学试剂有限公司生产。将甲苯胺蓝粉末溶于无菌蒸馏水中, 制成浓度为 1 mg/ml 的甲苯胺蓝溶液, 之后用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤过膜滤菌, 避光保存。

1.1.3 细菌样本 临床标准金黄色葡萄球菌标准株, 哈尔滨医科大学微生物实验室提供, 在灭菌磷酸盐缓冲液中稀释到 10^{10} 个/毫升浓度。

1.2 研究方法

1.2.1 造模 大鼠 10%水合氯醛, $3 \text{ ml}/1000\text{g}$ 腹腔注射麻醉。在大鼠左右两侧颊侧粘膜建立大小 $2 \times 2 \text{ mm}^2$ 大小切口, 将表皮及其皮下结缔组织去除, 止血后, $20 \mu\text{L}$ 金黄色葡萄球菌菌液注入创口保持 5 分钟, 普通饲料和水饲养 24 小时建立以金黄色葡萄球菌为优势菌的感染炎症动物模型。

1.2.2 实验分组 (1)空白对照组:4 只, 创口未施加光敏剂。(2)光敏剂组:28 只, A 组 10 只(创口)施加光敏剂 5 分钟, B 组 10 只(创口)施加光敏剂 10 分钟, C 组 2 只(正常完整粘膜)施加光敏剂 5 分钟, D 组 2 只(正常完整粘膜)施加光敏剂 10 分钟, E 组 2 只(正常完整粘膜)施加光敏剂 20 分钟, F 组 2 只(正常完整粘膜)施加光敏剂 40 分钟。

1.2.3 实验方法 将鼠麻醉后, 开口器打开口腔, 暴露术区。移液器取 $10 \mu\text{L}$ TBO 液表面放置于术区, 鼠头偏向患侧分别停

留时间如实验分组所示。空白对照组施加生理盐水 $20 \mu\text{L}$ 。颈椎离断法处死。小心取材不要破坏组织, 标本异戊烷浴, 放置于液氮中冷冻, $10 \mu\text{m}$ 切片, -70°C 保存, 荧光显示前解冻。切片和荧光观察时, 注意避光。荧光显微镜手机荧光信号, CCD 照相机记录, 计算机处理计算。对照空白组组织的自体荧光也进行测量。所有照片必须在完全同样的显微镜条件下拍摄, 所有的样品必须一次拍摄完全保持各张切片的拍摄条件一致。冰冻切片标本随后进行 HE 染色。将切片固定 30 秒至 1 分钟, 水洗, 染苏木素 3 至 5 分钟, 分化, 于碱水中返蓝 20 秒, 伊红染色 10 至 20 秒, 脱水, 透明, 中性树胶封固。所有标本通过倒置显微镜观察定位, 拍照。

1.2.4 图像软件处理分析 使用 Image Pro-plus 6.0 软件及 Photoshop 进行图片处理。首先使用 Photoshop 调整每组对应的荧光分布照片与 HE 染色照片, 使其重合, 裁掉多余部分, 然后使用 Image Pro-plus 6.0 软件根据光强度的不同, 确定荧光分布和炎症细胞分布的边界, 根据边界测量选中部分的面积, 即为荧光分布及炎症细胞分布的面积, 编制宏, 计算每张荧光片中的荧光分布面积及 H&E 照片中炎症细胞分布的面积。使用 Image Pro-plus 6.0 软件载入处理后的荧光图片, 首先进行强度校准, 调整强度曲线, 再进行光密度校准, 重新设定亮水平及暗水平。将荧光分布面积按照由表面到深部的顺序平均分为 3 部分, 分别为表层、中间 1 层、中间 2 层, 并将荧光深部边界外设为底层, 测量每层的荧光光密度, 单位为图片的像素单位。制作宏, 计算每张荧光图片的光密度数值。

1.3 统计分析

采用 SPSS13.0 软件统计分析处理。实验数据荧光分布面积与炎症细胞分布面积两两比较用 t 检验, 检验标准 $\alpha=0.05$ 。荧光光密度分析使用单因素方差分析。

2 结果

2.1 实验结果

空白对照组未见荧光, 组织的自体荧光不明显。

C、D、E、F 组中正常粘膜组无论 5、10 分钟组还是 20、40 分钟组, 甲苯胺蓝荧光均停留在角化层, 未穿透上皮层。四组比较没有明显差别, 见图 1。

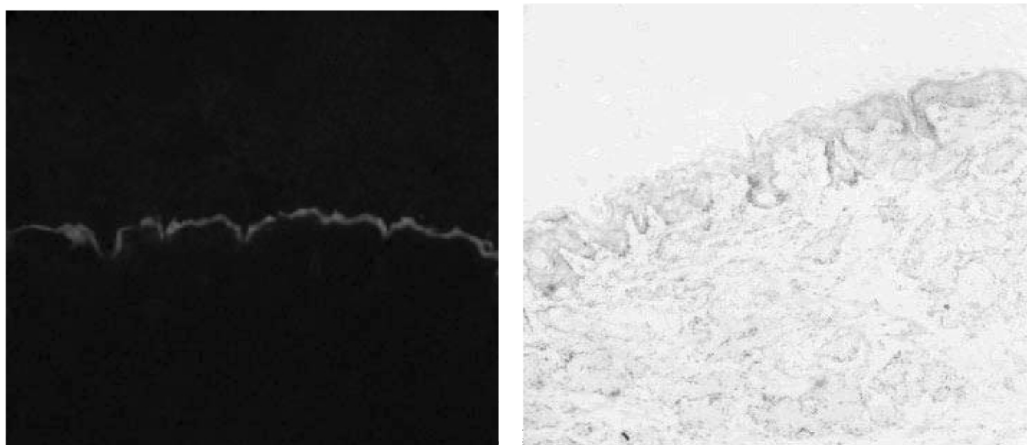


图 1 甲苯胺蓝在完整上皮的的荧光分布及相应的 HE 切片(40 倍)

Fig.1 TBO fluorescence distribution in normal tissue with intact epithelium and HE image ($\times 40$)

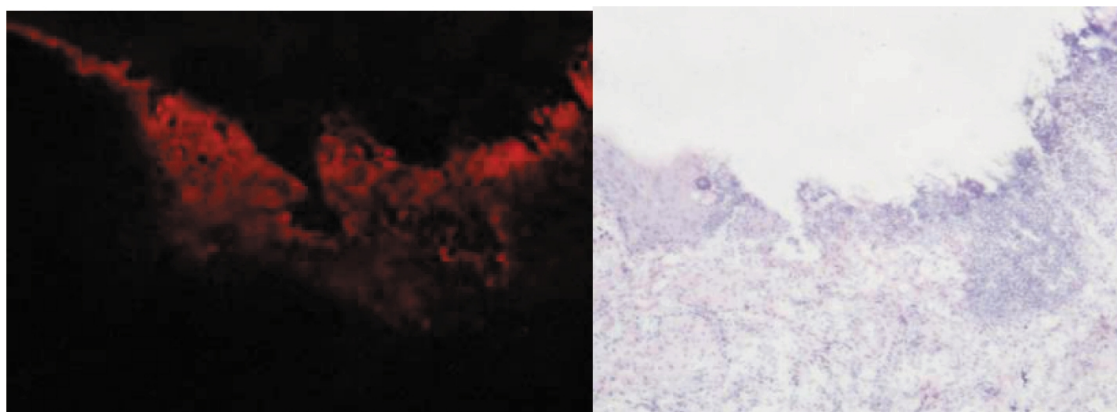


图2 甲苯胺蓝在创口组织中的荧光分布及相应的 HE 切片(40 倍)

Fig.2 TBO fluorescence distribution in normal tissue with intact epithelium and HE image($\times 40$)

无上皮覆盖创口组织时,荧光分布明显增加,如图2所示。

2.2 统计结果

如表1所示,和相应的HE病理片相比对,5分钟组平均

荧光分布面积可达到炎症细胞分布面积89%;10分钟组平均荧光分布面积可达到炎症细胞分布面积108%。统计学分析,有显著差别见表1($P < 0.05$)。

表1 荧光面积与炎症细胞面积的比较

Table.1 The comparison of fluorescence area and the area of inflammatory cells

	N	Group A	Group B	Ratio
Distribution area of fluorescence	20	35439.60 $\pm$ 9595.433	34966.25 $\pm$ 8241.597	0.8900 $\pm$ 0.15785*
Distribution area of inflammation	20	39970.40 $\pm$ 8781.835	33439.00 $\pm$ 9282.745	1.0835 $\pm$.21596*

Note: $t = -3.325$, $P = 0.003$, $P < 0.05$.

如图3所示,为荧光分布的光密度,分别计算每层的荧光光密度,发现表层、中间1层、中间2层的光密度无显著差异,而底层介于荧光分布的边缘,底层组与其他各组之间差异有显著性,但底层组数据标准差过大,数据不稳定。

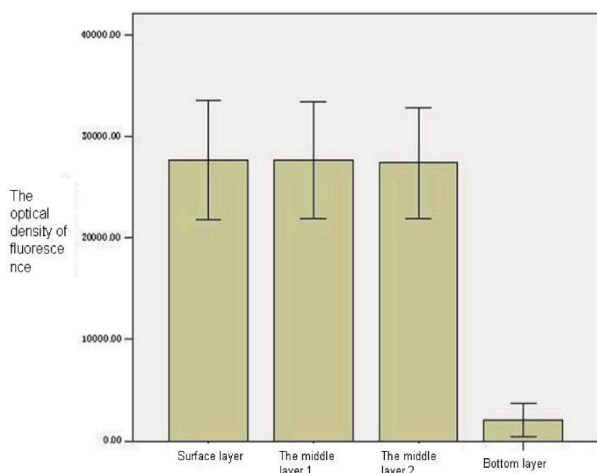


图3 甲苯胺蓝荧光的光密度

Fig.3 The optical density of fluorescence

3 讨论

已有研究表明甲苯胺蓝具有光动力活性。Wong^[8]等人发现甲苯胺蓝诱发的光动力反应能有效地抑制细菌的活力和毒性。还有文献指出^[9,10],甲苯胺蓝介导的光动力疗法能有效杀灭链球菌等多种细菌。实验中采用甲苯胺蓝浓度为1 mg/ml,因为前期的体外实验中证明了此浓度可提供最好的杀菌效果^[11]。在我们课题组的前期研究中发现,即使当我们用远高于正常治疗的

光敏剂量和光剂量(2.5 mg/ml 和 140 J/cm²)进行治疗时,牙龈、牙骨质和牙槽骨都没发生损伤和坏死^[12],这表明甲苯胺蓝诱发的光动力反应具有较好的安全性。而Komerik^[13]的研究也表明甲苯胺蓝具有较高的安全性。同时,本实验发现由于完整的上皮粘膜尤其是有角化的上皮粘膜可阻止甲苯胺蓝的渗透,甲苯胺蓝介导的光动力对上皮下正常的组织就不会产生效应,这也从另一方面证实了甲苯胺蓝的选择性和安全性。

目前口腔中光动力疗法的灭菌应用只是局限于种植体表面和上皮,但是光动力对口腔创口感染的治疗尚未见文献报道,而口腔的理化环境和身体其他部位有很大区别。前期实验证明,在激光能量为48 J/cm²和TBO浓度为1 mg/ml的组合下,大鼠口腔创口表面约93%的细菌被杀灭,取得了理想的杀菌效果^[14]。

国外一些学者已有对光敏剂在组织中的渗透性进行了研究。如Takehiro Oura等^[15,16]对PDT充分反应所需的光敏剂ALA的局部施加时间进行了研究,发现无论光敏剂施加的时间长短,PDT的反应均被限制在粘膜的上皮层。N. Komerik等^[17]对甲苯胺蓝在组织的渗透性研究发现随施加时间和光敏剂浓度的增加,其在上皮层的穿透效果越好。但TBO的荧光只限于上皮层,其中角化层荧光水平达到最高,结缔组织层很低和对照组类似^[18-20]。

4 结论

甲苯胺蓝可有效分布于感染的靶组织,但不能穿透正常组织。完整上皮对甲苯胺蓝渗透的抵抗,可保护正常组织免受光动力对其可能的杀伤。在感染创口中浓度为1 mg/ml的甲苯胺蓝溶液渗透时间为10分钟时,甲苯胺蓝光敏剂就可到达有效部位,且浓度梯度无改变,可保证光动力在炎症组织中的光敏

化效应的产生。

参考文献(References)

- [1] Schuster GS. Oral flora and pathogenic organisms [J]. Infect Dis Clin North Am, 1999, 13(4): 757-774
- [2] Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(9):629-641
- [3] Malik Z, Hanania J, Nitzan Y. Bactericidal Effects of Photoactivate Porphyrins -an Alternative Approach to Antimicrobial Drugs[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology, 1990, 5(3-4):281-293
- [4] Wilson M. Photolysis of Oral Bacteria and Its Potential Use in the Treatment of Caries and Periodontal Disease: A Review [J]. The Journal of Applied Bacteriology, 1993, 75(4):299-306
- [5] Kömerik N, Wilson M, Poole S. The Effect of Photodynamic Action on Two Virulence Factors of Gram-negative Bacteria[J]. Photochemistry and Photobiology, 2000, 72(5):676-680
- [6] Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy [PACT] [J]. J. Antimicrob. Chemother, 1998, 42(1):13-28
- [7] Iwersen-Bergmann S, Schmoldt A. Acute intoxication with aniline: detection of acetaminophen as aniline metabolite [J]. Int J Legal Med, 2000, 113(3):171-174
- [8] Wong TW, Wang YY, Sheu HM, Chuang YC. Bactericidal Effects of Toluidine Blue-mediated Photodynamic Action on Vibrio Vulnificus [J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2005, 49(3):895-902
- [9] Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, et al. Lethal Photosensitization of Periodontal Pathogens by a Red-filtered Xenon Lamp in Vitro [J]. Journal of Periodontal Research, 2003, 38(4):428-435
- [10] Romanova NA, Brovko LY, Moore L, et al. Assessment of Photodynamic Destruction of Escherichia Coli O157:h7 and Listeria Monocytogenes by Using Atp Bioluminescence[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(11):6393-6398
- [11] Qin Y, Luan X, Bi L, et al. Toluidine blue mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques [J]. Lasers Med Sci, 2008, 23(1):49-54
- [12] Luan XL, Qin YL, Bi LJ, Hu CY, Zhang ZG, Lin J, Zhou CN. Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice [J]. Lasers Med Sci, 2009, 24(2):162-166
- [13] Kömerik N, Curnow A, MacRobert AJ, et al. Fluorescence Biodistribution and Photosensitising Activity of Toluidine Blue On Rat Buccal Mucosa[J]. Lasers Med Sci, 2002, 17(2):86-92
- [14] 林江, 毕良佳, 董占海. 甲苯胺蓝介导的光动力对大鼠口腔创口金黄色葡萄球菌感染治疗的研究 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2009, 19(8): 462
- Lin Jiang, Bi Liang-jia, Dong Zhan-hai. Toluidine blue-mediated photodynamic therapy of oral wound infected with Staphylococcus aureus in rats[J]. Chinese Journal of Conservative Dentistry, 2009, 19(8):462
- [15] Oura T, Tanaka H, Morimoto Y, et al. Sufficient PpIX production for PDT even with short contact time of topically applied 5-ALA in rabbit tongues[J]. Lasers Med Sci., 2008, 23(4):355-360
- [16] Dögnitz N, Salomon D, Zellweger M, et al. Comparison of ALA- and ALA hexyl-ester-induced PpIX depth distribution in human skin carcinoma [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2008, 93(3):140-148
- [17] Kömerik N, Curnow A, MacRobert AJ, et al. Fluorescence Biodistribution and Photosensitising Activity of Toluidine Blue On Rat Buccal Mucosa[J]. Lasers Med Sci, 2002, 17(2):86-92
- [18] Cross S E, Magnusson B M, Winckle G, et al. Determination of the effect of lipophilicity on the in vitro permeability and tissue reservoir characteristics of topically applied solutes in human skin layers [J]. J Invest Dermatol, 2003, 120(5):759-764
- [19] Kanikkannan N, Kandimalla K, Lamba S S, et al. Structure-activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery[J]. Curr Med Chem, 2000, 7(6):593-608
- [20] Schaefer H, Stüttgen G, Zesch A, et al. Quantitative determination of percutaneous absorption of radiolabeled drugs in vitro and in vivo by human skin[J]. Curr Probl Dermatol, 1978; 7: 80-94
- [8] Onitsuka T, Uramoto H, Nose N, et al. Acquired resistance to gefitinib: the contribution of mechanisms other than the T790M, MET, and HGF status[J]. Lung Cancer, 2010, 68(2): 198-203
- [9] Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: A history of macroautophagy[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9): 814-822
- [10] Apel A, Hanswalter Z, Büchler MW, et al. Autophagy-A double-edged sword in oncology[J]. Int J Cancer, 2009, 125(5): 991-995
- [11] 潘耀柱. 抑制自噬增加阿霉素对骨髓瘤细胞的促凋亡活性[D]. 西安, 第四军医大学, 2009: 1-104
- Pan Yao-zhu. Autophagy inhibition enhances doxorubicin-induced apoptosis in myeloma cells [D]. Xi'an, Fourth Military Medical University, 2009: 1-104
- [12] Takeuchi H, Kondo Y, Fujiwara K, et al. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors [J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3336-3346
- [13] Yamamoto C, Basaki Y, Kawahara A, et al. Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of EGR1 in gefitinib-resistant lung cancer cells harboring epidermal growth factor receptor-activating mutations[J]. Cancer Res, 2010, 70(21): 8715-8725
- [14] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting [J]. Autophagy, 2007, 3(6): 542-545
- [15] Ito H, Daido S, Kanzawa T, et al. Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells[J]. Int J Oncol, 2005, 26(5): 1401-1410
- [16] Scott RC, Juhsz G, Neufeld TP. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death [J]. Curr Biol, 2007, 17(1): 1-11
- [17] 王树彦, 周易明, 陈宗祐. 自噬与肿瘤的发生和治疗研究进展[J]. 复旦学报(医学版), 2008, 35(6): 928-934
- Wang Shu-yan, Zhou Yi-ming, Chen Zong-you. Advancement in the study of relations of autophagy, carcinogenesis and cancer therapy[J]. Fudan Univ J Med Sci, 2008, 35(6): 928-934
- [18] Eimer S, Belaud-Rotureau MA, Airiau K, et al. Autophagy inhibition cooperates with erlotinib to induce glioblastoma cell death[J]. Cancer biology & therapy, 2011, 11(12): 1017-1027
- [19] Moreira-Leite FF, Harrison LR, Mironov A, et al. Inducible EGFR T790M-mediated gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cells does not modulate sensitivity to PI103 provoked autophagy[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(6): 765-777

(上接第 5206 页)