

激光生物学的若干进展

江腾龙 胡向萍

摘 要 激光生物学是激光学与生物科学交叉学科,本文综述激光微束照射,激光诱导细胞融合,光钳、激光散斑成象,激光显微激发光谱,激光全息,激光育种等激光生物学方面若干近期进展及其应用。

关键词 激光 激光生物学

激光(Laser)是受激辐射光放大器(Light Amplification by the stimulated emission of radiation)的简称,1917年当代科学巨匠爱因斯坦就在理论上证明受激发射是辐射与物质相互作用中的一个必要过程,到一九六〇年美国 T. H. Maiman 制成世界上第一台激光——红宝石激光仪,第二年就用于生物医学上,视网膜激光焊接。随着激光技术在科研、生产、国防建设的广泛应用,在生物学各个领域深入的研究和应用,已形成一门崭新的边缘学科——激光生物学,推动现代生物学蓬勃发展,展示了诱人的前景,兹仅就激光生物学中七个方面的进展综述如下:

一 激光打孔和显微裁剪

激光藉光学显微镜聚焦成微米,亚微米级的微光束对细胞靶体、生物大分子进行显微外科手术,即激光打孔和激光显微裁剪,与化学法、显微注射法相比,激光法定法精确,操作简便,可对细胞靶体,生物大分子作选择性损伤手术,并且无污染,可用玻璃等透明质体与外界隔离。

日本理化研究所 1984 年就用激光微束打孔并导入外源 DNA: 他们用三倍频的 Nd:YAG 激光(355 纳米波长,脉宽 5ns,输出能量约 1mJ)微束给体外培养的大鼠肾细胞(NRK 细胞)打出直径 0.3 μ m 的小孔,该小孔在 1 秒钟内自行愈合,外源 DNA 就通过该小孔流入细胞中,其效率比显微注射法提高 10 倍,成功率高过化学法千倍,1991 年该所用激光微束在大麦细胞的细胞壁、细胞膜、细胞核膜上打孔并导入外源基因,大大推进遗传工程的发展。

美国加州大学欧文分校的贝克曼激光研究所 1989 年应用脉冲紫外激光在人的卵细胞上打孔以使精子进入来提高受精率,以色列的希伯来大学用 0.193 μ m 波长的激光在虎卵上打孔提高受精率。

生物遗传特性取决于生物染色体的数量及染色体上基因排列顺序。日本于 1988 年建成激光切割染色体的微机控制装置,用此对指定染色体位置作自动切断或削去(即激光显微裁

剪),它只用一秒钟时间就可将染色体切为手工操作切割尺寸的十分之一,速度快且精确,因此在基因异常疾病诊断、治疗及判明染色体机能方面有巨大作用,把激光对染色体裁剪术与微克隆,细胞培养等生物技术结合起来,即可为基因定位和分离提供了一个新的高效方法。

二 激光诱导细胞融合

利用细胞融合进行生物细胞染色技术已有 20 多年的发展,物理融合技术继 1978 年 Eimmermann 等创立的破融合方法后,1984 年以来迅速崛起的激光诱导细胞融合术。利用激光微束对相邻细胞接触区的细胞膜进行破坏(或扰动)可将两个不同特性,不同大小的细胞在显微镜下实现融合,1987 年和 1989 年德国海德堡理化研究所用准分子激光器泵浦的染料,激光器使油菜原生质体融合,从开始照射到完成融合仅需几秒钟,对融合产物观测,发现胞质仍在运动,说明融合后的细胞仍存活的。Schierenberg 等用一种线虫(*Coenorhabditis elegans*)作细胞融合,国内山东海洋大学物理系张开迪等以泥鳅受精卵为材料,激光诱导细胞融合率达 40%,融合后泥鳅卵大都能进一步发育,个别甚至能长成幼体。R. Weigand 等将大鼠的 B—淋巴细胞与骨髓瘤细胞对连,形成杂交种,再用激光聚焦定位照射,使分离它们的膜消失并完全融合,形成杂交细胞,若鼠的淋巴细胞预先移入一种抗原作免疫,就可使之产生抵抗这种抗原的抗体,因这种细胞非自然产生的,用它与变质的长寿命癌细胞融合,以生产治癌用的抗体。

此法优点是高度选择性,可在正常培养液中进行,全程监视,无毒性等。

三、“光钳”

1901 年俄国物理学家就提出“光压”概念。由于激光能量高度集中,聚焦后,焦点附近光束的动量亦很大,应用激光动量“转移”产生的辐射压可“抓住”或“操纵”胶体微粒、分子甚至原子,范围遍及数十微米线度到数 $\text{\AA}$ 大小的瑞利粒子美国贝尔电话实验室 A. Ashkin 小组(1970 年)用 150mw 单模 Ar^+ 激光首次实现对 $\text{\AA}20\mu\text{m}$ 微粒的操纵,1987 年又首次因此光钳钳住烟草花叶病毒和细菌,并观察到在激光“陷阱”中可以继续存活。1988 年 A. Ashkin 等发现:生物体对红外辐射是相对透明的,不会受红外激光微束心过热而被烧死,因此他们用 $1.06\mu\text{m}$ 的红外激光解决了问题,在实验中观察到被捕获的大肠杆菌和酵母细胞的繁殖,后来 A. Ashkin 又使用两束激光成功地抓住大肠杆菌的两端,并使它转动。这种利用激光辐射压作用,“抓住”微粒,并拖着微粒随光线运动,激光就犹如“钳子”,故称“光钳”(Optical tweezers)。

1990 年中国科学技术大学物理系李银妹等人在国内用“光钳”首次捕获悬浮于水中的脂肪小球($\text{\AA}3\sim5\mu\text{m}$),红葡萄球菌、鞭毛虫等,不仅“钳”住几十秒钟而未被损伤,还作慢速平移,使细胞与其群体分离,后来“钳”住酵母细胞长达 3 小时之久,宏观观察仍无损伤迹象,Wiegand—steubing 等用光钳使哺乳动物细胞靠接,再激光细胞融合,M. W. Berns 等(1989 年)用光钳将某一染色体捉住,使其生长落后,以观察纺锤丝对染色体的作用,随后 H. Liang 等作了进一步研究,表明只要激光功率适当,捕获和控制的染色体不影响其活性,在光钳作用下,可加速处于细胞分裂中期的染色体的运动速度,平均可达 $9.5\mu\text{m}/\text{min}$,这差不多为正常速度的五倍。

通过“光钳”研究,使之用于俘获、控制细胞及其中的亚结构,可绘制细胞内部结构的细节,并通过对不同分裂代的细胞内部细节和运动性能(如速度、驱动力等)的测定、比较,

来制定细胞的衰老程度,癌变和病理变化等。“光钳”特点是:超精细操作,没有机械接触,亦即无机械损伤,是温和的、无菌的操作方法,唯一危险是辐射损伤,可选择适宜波长而降至最低。

四 激光散斑成象

用可见光波长为尺度观测,生物体表面、生物细胞的表面与一般物体表面一样地很粗糙,可视为一种无规分布的大量面元的集合,从物理光学角度看:每个面元相当于一个衍射单元,而整个生物(或细胞)表面则相当于由无规分布的大量衍射单元构成的光栅,当扩束的激光照射其上时,由不同面元反射的光在空间中因光程差而发生干涉现象,形成具无规分布颗粒结构的衍射图样,亦即激光散斑,它会因物体的位移或变形而变化,通过激光散斑成象可获取生物体(或细胞)与一般物体的位移或形变的规律。这已用于材料无损检测等很多科技领域。

N. Abramson (1975年)用激光照射于苹果表面时,在显微镜下首次观测到它的散斑图是变化的,此后J. Briers, A. Oulamara等用连续输出的非聚焦的He-Ne激光照射柑桔、苹果、西红柿等表面,用二维CCD(电荷耦合元件)检测散斑图,并由计算机系统来分析散斑的瞬间变化,并与同时照射激光的铅板的散斑图作对比分析,建立了细胞散斑分析的理论模型,目前限于图象处理系统速度等,尚未能区分细胞运动的各个部份的细节,但激光散斑成象术为生物表面活性乃至细胞内部运动规律的研究,特别是探索生物膜功能等提供了有力的工具。

五、激光显微激发光谱和全息术

1967年国外有人用红宝石激光照射生物细胞及生物物质,从产生的羽状烟雾利用光谱技术分析其中的元素含量,1975年David. Glick和Kemneth用激光显微激发光谱分析生物组织样品所含的元素。用此已发现人体癌组织中元素含量和正常组织中含量不同,且和癌的类型及所在部位有关。这项技术优点是生物样品无需作特殊处理(或准备)工作,只要将冰冻组织切片(或涂片)置于塑料平片上,再放在载物台,即可快速、简便、精确到 $10^{-14} \sim 10^{-16}$ 克。Fenner和Daly(1968)用之测得人的毛发中碳、氮、氧、钠、硫、钾、铁和铜的含量。Dimitrov等(1971)发现:工业污染区的蝴蝶翅的所有色素中铁、铝、铜最少二倍于非污染区的。这法已应用于法医学和毒理学、病理学等研究中。它对分析单个细胞和小量或痕量元素的微小标本极其适用,标本制备和污染及流损最小。

由于激光的高相干性使早已提出的全息术得以实现,已用于人眼无损活体全息摄影,为临床诊断和研究眼内病变提供有力工具,1973年美国道格拉斯公司制成临床激光还原的声全息设备,结合超声无损伤的激光全息摄影观测人体内脏病变情况和位置,1966年Van-Ligten首次发表眼模型的全息图,Calkins和Bernard研制用二次曝光法测量眼角膜应力的仪器,用此技术极大地改善电子显微镜的分辨本领,对生物样品无需制作薄片样品,甚至可对活标本作显微观测,若用脉冲激光来拍摄标本的全息象,可“冻结”任一动作,保存其原有信息。

激光出现后科学家就提出x射线激光产生机制的探索,经过三十年努力,x射线激光产生的理论日趋完善,实验中亦得到部分成果。由于x射线的高穿透性、激光的高亮度,高相干性等可实现对机体(包括细胞)三维深度的全息摄影,具有高分辨率,摒除传统的光镜、

电镜的制作切片,化学固定等造成的变形,流失、损坏等弊病。将高功率激光会聚于一定的靶材(如铝箔)上形成等离子体,辐射波长易调节到所谓的“水窗”(2.3~4.4nm)区域,对活细胞等发生的生命过程(如病毒,毒物如何破坏细胞等)作三维动态观测。美国劳伦斯.利弗莫尔国家实验室的J. Trebes等已用x射线激光拍摄第一张鼠胰腺细胞的全息图,并用可见光激光再现,虽然分辨率还较低,还未达到实用要求,但x射线激光及其全息术在生物医学应用已跨出有力的一步,有着十分诱人的发展前景。

六、激光诱变育种

激光物性和它对生物体作用机制,决定了它在辐射诱变效应上有鲜明的特点,近些年来大量研究表明:通过不同形式达到定向诱变,定选择,激光诱度的后代有益突变较多,畸形变异很少。作物种子的激光诱变表明:后代突变体大金数集中于早熟,矮秆,千粒重大,籽粒蛋白质含量高几个主要有益性上(Belonozhko 1981;陈芳远(1982),Dudin(1983),彭绍民 1984;严国忠 1984)。通常的电离辐射和化学诱变,主要产生稳性突变,子一代不易被发现,只有在以后各代自交或测交试验中,才能发现,而激光诱变显性突变的几率较大,在子一代就能发现,以后很快就能纯合固定,这就大大加快了选育的进度(Volodin等 1982,彭绍民 1984)。激光辐射安全可靠,无环境污染、残毒等优点。

微生物方面:Mokeyeva等(1981)用红宝石激光对小球藻研究,发现辐射损伤的同时,亦诱发突变。Korn等对大肠杆菌,Johnson-Thompson对SV₄₀病毒研究都表明激光的诱变作用。国内浙江大学用铜蒸气激光辐照棘孢小单孢菌(*Micromonospora echinospora*)选育出Z-36高产庆大霉素的菌株,其发酵单位平均提高10%以上。有人用氩离子激光诱变放线菌海门一号,产量正变率为52.4%。激光诱变纯齿棒杆菌,使产谷氨酸菌株6282的产酸量提高12.9%等等。

植物方面:Belonozhko(1981)研究表明:激光辐射产生的突变型有早熟、高产、粒大、矮秆、抗倒伏、薄壳等有益性状。Dudin(1983)用He-Ne激光照射春大麦,得到早熟、高产、抗倒伏三个突变种,提高了谷粒的蛋白含量,且能遗传给后代的特性。陈芳远用激光照射水稻种子,发现能缩短后代生长期,叶绿素含量比对照组高14.42%,后期叶片数相应多1~2片,并发现遗传性较稳定的性状(如千粒重)要诱变其突变的剂量较大,而遗传力较低的性状所需剂量较小。只用几年时间就选育出水稻新品种——“激青”,已在广西大面积推广。棉花品种“皖棉壹号”(激棉7821)成熟好,纤维整齐,品质优良,尤其是纤维强力高等特点。挑用激光诱变育种得“沙激一号”、“沙激二号”,大豆、小麦等亦都获得优良品种。

动物方面:中国科学院遗传所梁宏等(1980)用脉冲N₂激光照射小鼠睾丸,观察到能引起小鼠初级精母细胞分裂后期和早末期染色体畸变率升高,并随照射剂量加大而增高,首次证明激光能引起哺乳动物生殖细胞遗传变异。安徽农学院用铍玻璃激光(波长1.06μm)诱变家蚕品种“胞激”L₇代细胞学观测:染色体畸变率提高6.9%,上茧均价高5.3%。谭石慈等(1993)用激光诱变锦鲤受精卵,突变体生长速度快,并可遗传后代等特点,诱变出双尾和尾鳍明显增长的新品种:中华彩鲤。

七、激光血卟啉衍生物治癌

H. Auler等(1942)观察到血卟啉(HP)能选择性富集于肿瘤组织和光动力作用的血卟啉醋酸衍生物(HPD),HPD对肿瘤的亲和性比正常组织大2~10倍,从肿瘤组织排出体

外的时间比正常组织晚 72 小时,利用 HPD 可作早期诊断患者的癌组织,静脉注射 2—3 天后,其在肿瘤中浓度达到最高点,用氩离子激光(兰色)照射能发出桔红色荧光,又用 630nm 的氩离子激励的可调谐染料激光进行治疗,通常治疗的光强度选为 $50\sim 100\text{mJ}/\text{cm}^2$,一次照射 10 分钟左右,最大辐照量限制于 $250\text{mJ}/\text{cm}^2$ 之内,以免损伤尚含有 HPD 的正常组织。

国内医科院肿瘤研究所,中科院生物物理研究所等都开展血卟啉治癌工作,用北京制药工业研究所的 HPD 针剂,治疗中用中科院电子研究所研制的连续波染料激光,取得一定的成果。

由于血卟啉衍生物是个混合物,其成分随制备储藏时间而异,至今尚未分离出其有效成分;HPD 在不同环境中形成聚集态,持续 30 天,注射 HPD 患者暴露于直射阳光下,正常皮肤会严重烧伤。故病人要长期避光,影响正常生活,同时对肝、脾等也造成一定损伤;且对深部肿瘤,只能用光导纤维照射,诸多不便,为此 D. Mew 等把血卟啉与单克隆抗体或普通抗血清结合,发现能大幅度提高癌组织对 HP 的吸收能力和滞留时间,而不降低光敏作用。G. Jori 等发现“导弹药物”:血卟啉与脂质体结合,对癌细胞有更强的导向能力。近年来国内外注意酞菁等新的光敏物质研究上。

酞菁较易合成提纯(国内上海交大等单位业已合成),对化学,光化学稳定,无毒,辐照后可产生相当有效的长寿命的三重态,其吸收峰在红区,其荧光发射较长波长,对人体的红外穿透深度大于血卟啉。且还有可能合成更长吸收峰的酞菁,更易穿透人体组织。

新的光敏物质有脱镁叶绿二醇(从菠菜和蕨草提取的);补骨脂衍生物 methoxsalen,类二氢卟吩的 NPe6;值得注意的是我国民间草药——竹红菌素,它是生长于云南高密区野生麦竹的一种寄生真菌,有抑菌和光敏作用,与血卟啉衍生物相比:它的结构确定,易提纯,在人体内富集快,易排除,副作用和毒性小,不仅可注射,还可口服治疗,而 HPD 必需注射,口服无效,但竹红菌素的溶性较差。(这可通过分子上引入活性水溶性基团来解决)。

以上仅列举激光生物学部分进展情况,还有激光生物学机制及应用(如激光治癌等)未予涉及。总之随着激光技术的提高和广泛应用,生命科学发展的需要,激光生物学发展将是更迅速,更深入的。它将为生命科学的发展及整个自然科学的发展,工农业生产,国防建设提供新的方法、新的天地。

参 考 文 献

- [1] Berns M. W., Scientific American, 264, 6 (1991) 58
- [2] Dance B., Laser Focus World, 26, 11 (1990) 25
- [3] Oulamara. A, et. al., J. Mod. Optics, 35 (1988) 1201
- [4] Oulanara. A. et. al., J. Mod. Optics, 36 (1989) 165
- [5] Berns M. W., et. al., International Review of Cytology 129 (1991) 1
- [6] Berns M, W. et. al., Science, 213: 505—513, 1981
- [7] Wiegand. R. et. al., J. Cell Sei., 88: 145—149 1987
- [8] 郑强等:生物工程学 5 (3): 185—190 (1984)
- [9] 张闻迪:中国激光 Vol. 17 NO. 3. (1990) 171—174
- [10] 郭延德:激光生物学 Vol. 1 NO. 1. (1992) 38—40
- [11] 梁宏等:激光生物学 Vol. 1 NO. 3. (1992) 7—12

[12] 田兆斌等: 物理 Vol. 23 NO. 6. 345—349 (1994)

Some Progress in Laser Biology

Jiang Teng-long Hu Xiang-ping

Abstract The laser biology arise frise from the combined consideration of laser science and biology, recent some progresses in laser biology and its applications are reviewed in this paper: The laser microbeam dissection, laser induced cell fusion, laser's tweezer, laser's speckle inaging, laser' microprobe-emission spectroscopy, laser' s holography, laser's breeding, etc.

Key Words laser laser biology

(上接第 71 页) 生活习性、生理功能和进化的地理位置上的比较, 都能收到

七、积极开展课外活动

为了进一步提高生物教学质量, 在完成课堂教学的同时, 积极开展课外活动, 可以培养学生学习生物科学的浓厚兴趣。因为每次活动几乎都包括观察、回忆、思维和想象等心理过程。因此, 开展课外活动, 不仅是课堂教学的必要补充, 而且也是发展学生学习兴趣, 培养他们善于思考, 勤于动手, 学会理论联系实际的主要途径。根据这一道理, 可以结合教学内容, 利用农村这个广阔的天地, 发动学生采集动植物标本, 组织生物课外兴趣小组, 引导他们写生物日记, 记录一些物候现象。此外注意从报刊杂志上摘录并向学生宣讲一些生物科技动态。通过这些活动的开展, 不但开阔了学生的视野, 而且还使学生学习生物的兴趣经久不衰, 同时有利于他们在知识、能力、思想、兴趣爱好等方面得到和谐发展。

总之, 兴趣可以培养, 也可发展。只要能从学生的心理特性的教材内容去启发, 并随时注意学生学习兴趣的发展历程, 积极创造条件, 采取有效措施, 他们的学习兴趣便能向正确而持久的方向发展。

(上接第 11 页)

参 考 文 献

- 1 周相泉, 姜泽恺, 二类特殊多次式的有理根的判定, 聊城师院学报, 1993, (4): 11—13

Methods of Decision on Rational Root of Polynomial.

Mei Hanfei Fan Qiyi

Changde Teachers' College

Abstract In this paper, Two methods of decision on rational root of polynomial is given, and deepen the results in^[1].

Key words Polynomial Coefficient Rotional root.