

# 氩离子激光显微照射对细胞损伤的研究

陆仲康 胡应和 邓燕华 王兰岚 宋桂英 孙宝霞 梁宏

(中国科学院遗传研究所)

**提要:** 利用 YW-1 型氩离子激光显微仪对 PTK<sub>1</sub>、PTK<sub>2</sub> 和人红血球细胞进行显微照射, 最小有效损伤光斑仅 0.5 微米。细胞化学分析表明, 在不用任何活性染料敏化细胞的情况下, 激光照射能够破坏核仁内的 DNA 和 RNA。

## Study of argon laser microbeam irradiation on cell damage

Lu Zhongkang, Hu Yinghe, Deng Yanhua, Wang Lanlan,

Song Guiying, Sun Baoxia, Liang Hong

(Institute of Genetics, Academia Sinica)

**Abstract:** A YW-1 argon laser was used for microirradiation of PTK<sub>1</sub>, PTK<sub>2</sub> cell lines and human red blood cells. The smallest lesion spots were only 0.5  $\mu\text{m}$ . Cytochemistry analysis demonstrated that the laser microbeam irradiation can destruct both nucleolar DNA and RNA without any vital staining.

### 一、引言

激光能够通过显微镜光学系统聚焦到很小的光点, 因而可以对单细胞甚至细胞内某一细胞的特殊位点进行照射, 以研究细胞核、染色体、核仁及其各种细胞器的功能<sup>[1, 2]</sup>。

从 60 年代开始, 就有许多研究者使用激光显微照射研究发育生物学问题。Mckinnell<sup>[3]</sup> 用红宝石激光显微照射研究了两栖类动物卵细胞的发育情况。Mims 等<sup>[4]</sup> 研究了鸡胚早期发育中细胞的分化, 得到了用传统显微操作方法所难以获得的结果。Daniel 和 Takahashi<sup>[5]</sup> 用红宝石激光显微照射 2、4、8 和 16 细胞时期兔胚的卵裂球, 只

留一个不照射, 然后把它进行体外培养, 研究早期卵裂球发育的全能性。

近十年来, 激光显微照射在遗传学中的作用越来越明显。Berns 等<sup>[6]</sup> 用氩离子激光显微照射染色体上的特定基因位点——核仁组织区的 *rDNA* 基因, 使它失去转录活性。细胞有丝分裂后, 子细胞中不再形成核仁, 或者所形成的核仁数目减少。用激光照射染色体的着丝点部位, 则染色体向两极的移动发生异常, 细胞产生缺体或三体<sup>[7]</sup>。另有些研究者用紫外激光显微照射研究染色质的损伤及修复机制<sup>[8, 9]</sup>。这些工作为细胞遗传学及染色体工程的研究提供了新的手段。

收稿日期: 1983 年 4 月 27 日。

## 二、材料和方法

### 1. 激光功率

本工作使用的 YW-1 型氩离子激光显微仪发射的激光主要波长为 5145 埃和 4880 埃,多模输出功率 6 瓦,脉宽范围从 0.001 秒至无穷大。

用东德 AMPLIVAL 相差显微镜 40 倍物镜或 100 倍油镜聚焦激光束,物镜数值孔径分别为 0.65 和 1.25。激光经中性滤色镜向下反射,最后由物镜聚焦到生物样品上。干涉滤色镜对波长小于 5200 埃的光反射率大于 98%,对波长大于 5200 埃的光透过率大于 90%。本实验使用 5145 埃的绿色激光,激光器在这个波长上的最大输出功率为 2.56 瓦。激光经光学显微系统后用 40 倍物镜聚焦时,到达样品表面的光功率为原输出功率的 80%;用 100 倍油镜聚焦的仅占 45%。用十字线瞄准法对激光所要照射的细胞结构进行定位。

### 2. 实验材料

(1) 长鼻鼯 (*Potorous tridactylis*) 肾脏上皮细胞株 (PTK<sub>1</sub> 和 PTK<sub>2</sub>), 经胰酶消化后在无菌条件下注入 Rose 培养小室。培养 30 小时左右,用相差显微镜选择生长良好的细胞,做成特殊小室进行实验。

(2) 中国仓鼠卵巢细胞株 (CHO) 的 Giemsa 制片。

(3) 人红血球细胞制片。

### 3. 激光照射方法

由于本仪器具有较高的激光输出功率,所以激光照射活细胞时,不需用任何活性染料对细胞进行敏化。我们对组织培养的 PTK<sub>1</sub> 和 PTK<sub>2</sub> 细胞的核仁进行了照射。所用激光波长为 5145 埃,脉宽用 0.01 至 0.05 秒,激光输出功率为 0.7 至 2.1 瓦。激光照射后,测定了 PTK<sub>1</sub> 细胞核仁上的光斑直径。PTK<sub>2</sub> 细胞经照射后立即固定染色,用细胞

化学方法分析激光对核仁内 DNA 及 RNA 的损伤情况。

激光照射 PTK<sub>1</sub>、CHO 及人红血球细胞后,用显微测微尺对损伤光斑进行测量。

### 4. 细胞化学分析方法

激光照射 PTK<sub>2</sub> 细胞核仁后,参照 Haenel<sup>[10]</sup> 的方法用亚甲蓝在一定 pH 条件下对 RNA 进行特异染色。细胞用无水乙醇固定 10 分钟后,用 pH 4.9 的亚甲蓝染色 10 分钟,空气干燥。在显微镜下重新找到激光照射过的细胞进行观察。

采用常规的孚尔根染色法对核仁受过照射的细胞进行染色。然后用西德 MPV-II 型显微分光光度计对孚尔根染色后的样本进行了测定,根据 Lambert-Beer 定律计算实验数据,并对计算结果进行统计分析。

## 三、实验结果

图 1 和图 2 分别是用激光显微照射人红血球细胞及 CHO 细胞核得到的结果。结果

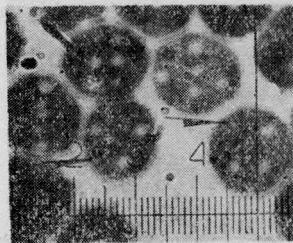


图 1 人红血球细胞经激光照射后的光斑,最小有效损伤光斑仅 0.5 微米。格值为 0.55 微米

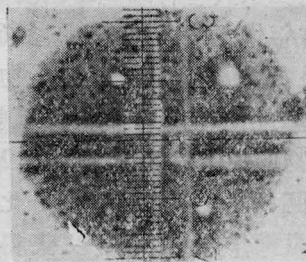


图 2 中国仓鼠卵巢细胞经激光照射后的光斑

表明, 最小有效损伤光斑直径在 0.5 微米左右。图 3、图 4 是激光照射活体 PTK<sub>1</sub> 细胞核仁得到的结果, 激光可在活细胞上形成损伤, 而且损伤光斑直径也在 0.5 微米左右。细胞经激光照射之后并不影响它们的存活, 这与国外文献报导相一致<sup>[11]</sup>。

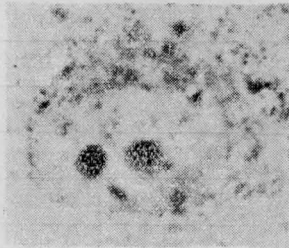


图 3 正常活体 PTK<sub>1</sub> 细胞

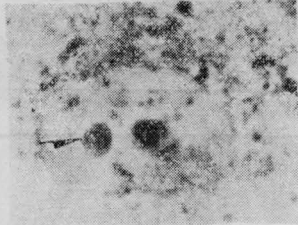


图 4 活体 PTK<sub>1</sub> 细胞核仁经激光照射后的光斑(箭头所示)

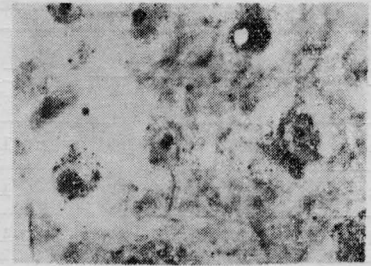


图 5 正常活体 PTK<sub>2</sub> 间期细胞

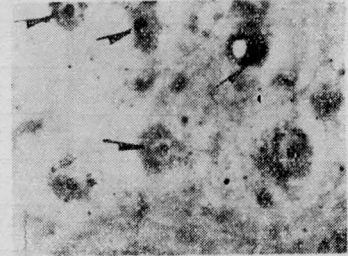


图 6 激光照射核仁后的细胞(箭头所示)

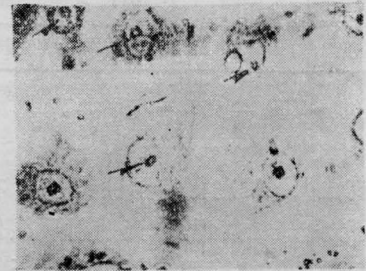


图 7 核仁 RNA 经染色, 箭头所示为激光照射核仁后, RNA 染色呈负反应

为了研究激光显微照射能否损伤核仁内的 RNA, 我们采用亚甲蓝液在 pH 4.9 的条

表 1 显微分光光度计测定的光强度值

核仁序数	光强度			核仁序数	光强度			核仁序数	光强度			核仁序数	光强度		
	$I_s$	$I_c$	$I_0$		$I_s$	$I_c$	$I_0$		$I_s$	$I_c$	$I_0$		$I_s$	$I_c$	$I_0$
1	1.6	0.9	1.7	10	1.5	0.8	1.5	19	1.8	0.6	1.9	28	1.2	0.7	1.9
2	1.5	0.9	1.7	11	1.1	0.9	1.6	20	1.1	0.5	1.4	29	1.1	0.4	1.8
3	1.1	0.7	1.3	12	1.3	1.1	1.4	21	1.4	0.8	1.7	30	1.3	0.3	1.5
4	1.2	0.8	1.5	13	1.3	1.0	1.7	22	1.7	0.7	1.6	31	1.4	0.5	1.8
5	1.7	0.9	1.4	14	1.5	0.8	1.6	23	1.5	0.4	1.9	32	1.7	0.7	1.8
6	1.3	1.0	1.9	15	1.2	0.4	1.9	24	1.2	0.5	1.7	33	1.5	0.5	1.8
7	1.1	0.7	1.1	16	1.1	0.5	1.7	25	1.4	0.7	1.8	34	1.4	0.6	1.7
8	1.0	0.8	1.5	17	1.3	0.7	1.7	26	1.5	0.7	1.8	35	1.3	0.7	1.9
9	1.3	0.7	1.4	18	1.5	0.3	1.4	27	1.8	0.9	1.9	平均数	1.4	0.7	1.7

$I_0$  表示空白对照的光强度;  $I_s$  表示激光照射过的核仁的光强度;  $I_c$  表示正常核仁的光强度。

表 2 显微分光光度计测定的光密度值

核仁序号	光 密 度		核仁序号	光 密 度		核仁序号	光 密 度	
	$E_s$	$E_c$		$E_s$	$E_c$		$E_s$	$E_c$
1	0.0263	0.2762	14	0.0280	0.3010	27	0.0235	0.3245
2	0.0543	0.2762	15	0.1996	0.6767	28	0.1996	0.4337
3	0.0725	0.2688	16	0.1890	0.5315	29	0.2139	0.6532
4	0.0969	0.2733	17	0.1165	0.3854	30	0.0621	0.6990
5	-0.0843	0.1919	18	-0.0300	0.6690	31	0.1091	0.5563
6	0.1648	0.2788	19	0.0235	0.5006	32	0.2009	0.4102
7	0	0.1963	20	0.1047	0.4472	33	0.0792	0.5563
8	0.1761	0.2731	21	0.0843	0.3274	34	0.0843	0.4523
9	0.0322	0.3010	22	-0.0263	0.3590	35	0.1648	0.4337
10	0	0.2730	23	0.1027	0.6767	平均数	0.0891	0.3136
11	0.1627	0.2499	24	0.1516	0.5315	方 差	0.0055	0.0270
12	0.0322	0.1047	25	0.1091	0.4102			
13	0.1165	0.2304	26	0.0792	0.4102			

表中  $E_s = \log_{10} \frac{I_0}{I_s}$ ;  $E_c = \log_{10} \frac{I_0}{I_c}$ 。

件下对核仁 RNA 进行特异性染色。在光学显微镜下,我们观察到,激光照射后核仁的染色明显变浅,但细胞质的颜色则和正常细胞没有区别(见图 5、6、7)。由此可见,激光照射破坏了核仁内的 RNA。

为确定激光显微照射对核仁 DNA 的损伤情况,我们采用了孚尔根染色法。为了能精确测定核仁内 DNA 的相对含量,我们使用显微分光光度计测量法。测出的光强度  $I$  值(表 1)经 Lambert-Beer 定律计算出光密度值  $E$ (表 2)。核仁的染色越深,光密度值就越大。正常核仁的光密度值远比激光照射过的核仁光密度值要大(二者平均值分别为 0.3136 和 0.0891)。统计分析的结果表明,二者的差异极显著( $P < 0.001$ )。这说明,激光照射确实使核仁内的 DNA 受到了损伤,导致孚尔根染色几乎呈负反应。由此证明,激光显微照射间期核仁能破坏核仁组织区基因。

#### 四、讨 论

激光对生物体的作用机制是一个复杂的问题。激光要对所照射的细胞产生生物学效应,首要条件必须是生物体对激光有吸收性<sup>[42]</sup>。生物体内吸收激光的发色团包括有吸收各种波长激光的自然发色团或人工发色团。发色团吸收激光光子之后在细胞内产生热效应或发生一系列光化学反应。其结果是细胞里的各种重要的生物大分子——DNA、RNA 或蛋白质——发生变化。激光对生物体所起的作用还有多光子吸收、压力效应和电磁场效应等。

激光显微照射的生物学效应在很大程度上取决于激光照射到生物样品上的能量。由于激光通过显微镜的光学系统时,有光的反射、散射和镜片对光的吸收,所以只测定激光器的输出总能量还不够,尚应考虑生物样品

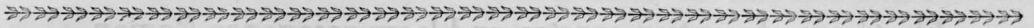
表面的能量。激光的能量在生物样品上呈高斯分布,只有照射到中心部位的能量才会产生引起生物学效应的损伤。所以,激光在生物样品上造成的有效损伤光斑可以很小。Berns 等<sup>[13]</sup>指出,激光聚焦光点的直径是激光波长、聚焦物镜放大倍数以及数值孔径的函数,但由于能量的高斯分布,激光在生物样品上所造成的有效损伤光斑可以比理论上最小值还要小(理论上最小值为激光波长的一半),其直径可以在 0.25 微米以下。

根据我们的实验结果,利用本氩离子激光显微仪进行照射可以在细胞及细胞器上造成 0.5 微米左右的微小损伤光斑,经细胞化学分析,激光照射后能够破坏核仁内的 DNA 和 RNA。因此,利用氩激光显微照射可以在超微米的选择性损伤的条件下研究细胞内某一细胞器,甚至细胞器上某一特殊位点的功能,其优越性超过国内目前使用的红宝石激光显微照射。此外,使用不同的激光能量、波长以及用不同的活性染料处理细胞,还可以

选择性地使细胞内不同的生物大分子受到损伤,进而研究其后代的变异情况。这一特点使激光显微照射成为生物学研究中的一个非常有效的工具。

### 参 考 文 献

- [1] M. W. Berns, A. D. Floyd; *Exp. Cell Res.*, 1971, **67**, 305.
- [2] R. L. Amy *et al.*; *Exp. Cell Res.*, 1967, **45**, 361.
- [3] R. M. Mckinnell *et al.*; *Z. Zell.*, 1969, **93**, 30.
- [4] M. F. Mims; *J. Embryol. Exp. Morph.*, 1971, **26**, 31.
- [5] J. O. Daniel, K. Takahashi; *Exp. Cel Res.*, 1965, **39**, 475.
- [6] M. W. Berns *et al.*; *Exp. Cell Res.*, 1970, **60**, 133.
- [7] M. W. Berns; *Science*, 1974, **186**, 700.
- [8] C. Cremer *et al.*; *Clin. Genet.*, 1978, **14**, 286.
- [9] C. Zorn *et al.*; *Exp. Cell Res.*, 1978, **124**, 111.
- [10] U. Haenel; *Helv. Med. Acta*, 1950, **17**, 627.
- [11] M. W. Berns, *Exp. Cell Res.*, 1971, **65**, 470.
- [12] M. W. Berns, C. Salet; *Int. Rev. Cytol.*, 1972, **33**, 131.
- [13] M. W. Berns *et al.*; *Science*, 1981, **213**, 505.



(上接第 248 页)

在体内外都易产生多肽链变性,影响 Hb-H 中  $Fe^{++} \rightarrow Fe^{+++}$ , 形成低氧亲和力。经实测,样品中的 Met-Hb 竟高达 ~60%。

b.  $\alpha$  型患者的 Hb-A 的激光共振喇曼光谱(图 8)也较复杂,但仍能记录到 1387 厘米<sup>-1</sup> 喇曼谱线,通 O<sub>2</sub> 则向高频移至 1392 厘米<sup>-1</sup>。同时还能记录到 572 厘米<sup>-1</sup> 喇曼谱线。这表明  $\alpha$  型患者的 Hb-A 与正常人的 Hb-A 有相同的分子结构,卟啉环中心铁离子为 Fe<sup>++</sup>, 仍有携 O<sub>2</sub> 功能。本例 Hb-H 占 30%, 所以 Hb-A 约占 70%, 患者可以无明显的缺氧症状。

### 参 考 文 献

- [1] A. E. Sidwell *et al.*; *J. Biol. Chem.*, 1938, **123**, 355.
- [2] T. G. Spiro, T. C. Sterkas; *J. Amer. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 338.
- [3] T. C. Sterkas, T. G. Spiro; *Biochem. Biophys. Acta*, 1972, **263**, 830.
- [4] H. Brunner, H. Sussner; *Biochem. Biophys. Acta*, 1973, **310**, 20.
- [5] H. Brunner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1972, **70**, 153.
- [6] H. Brunner; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, **51**, 883.
- [7] T. M. Loehr, J. S. Loehr; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, **55**, 218.
- [8] L. D. Barron, A. Szabo; *J. Amer. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 660.