

# 激光技术在细胞融合中的应用研究

张 闻 迪

(青岛海洋大学物理系)

**提要:** 本文提出了一种新的细胞融合方法——激光诱导细胞融合, 给出用于细胞融合的激光参数和条件。并以受精泥鳅卵为材料进行了可行性实验, 获得了成功。激光融合无毒、无损伤, 融合后成活率高, 可发展为动物育种的新技术。

**关键词:** 微束激光, 细胞融合, 卵

## A new application of laser in cell engineering ——laser induced cell fusion

Zhang Wendi

(Department of Physics, Qingdao University of Oceanology, Qingdao)

**Abstract:** A new method——laser induced cell fusion is put forward. The parameters of micro-beam laser and the conditions of cell fusion have been analysed and presented. It has been tested on the fertilized loach eggs detached from the body successfully. The outstanding advantages over existing methods are non-lethal, non-damage and high viability rate.

**Key words:** microbeam laser light, cell fusion, egg

### 一、引 言

随着细胞生物学与发育生物学的发展, 细胞融合已成为一项重要的细胞工程技术。利用它能够进行种间和种内不同细胞的融合, 使一种生物具有另一种生物的遗传性状, 产生出新的性质。这一技术已在医药、育种和生物学研究中取得了不少成果<sup>[1, 2]</sup>。

通常采用的细胞融合方法有使用融合剂<sup>[3, 4]</sup>与电融合<sup>[5]</sup>两种。但前者具有“毒性”, 严重影响融合细胞的成活。而后者由于采用高压电脉冲, 使细胞内部某些低电离电位分子可能发生离解造成“电损伤”, 影响融合细胞的成活。它们的本质性缺点在于导致质膜融合的作用并不是仅仅作用在细胞接触处的质膜微区, 而是作用于整个细胞表面或整个细胞。

本文试图探索一种无毒的融合方法。在激光生物效应研究中我们发现激光能使细胞质膜形成可逆性微孔, 有可能发展成一种新的对细胞损伤极小的细胞融合方法——激光诱导细胞融合, 并进行了可行性验证, 取得了与理论预期相符的结果。

### 二、激光诱导细胞融合的原理与方法

细胞融合实际上是以某种手段改变两个细胞接触处质膜的通透性, 使两个细胞的内含物

相互混合而成为一个细胞的过程。实验表明,若两个细胞紧贴在一起,用高峰值功率密度激光对细胞接触处的质膜进行照射,质膜发生光击穿,可产生微米量级的微孔。由于质膜上的微孔是可逆的,质膜分子在重组过程中借助细胞连接处小孔的表面曲率很高,处于高张力状态,细胞就逐渐由哑铃状变为圆球状,细胞就融合了起来。

脂质分子是细胞质膜的主要成份,在膜内呈双分子层排列,起着支架的作用。我们测量了作为研究质膜的典型材料——人的红血细胞膜及其脂质的吸收光谱曲线,如图 1 所示,无明显吸收峰。考虑到远紫外光对细胞有较强的致死作用,以不用为好。

光击穿质膜产生的可逆性微孔与电击穿类似。电击穿的实验表明,质膜在  $10\sim 100\text{ ns}$  高压电脉冲作用下击穿还是可逆的。电脉冲过长,质膜在被击穿后仍有电场通过细胞内部引起高密度电流<sup>[7]</sup>,这对细胞器是极为有害的。由平面脂膜的测量估计,可逆电击穿的孔洞密度为  $10^7/\text{cm}^2$ <sup>[8]</sup>,平均每个孔洞的线度约为  $3\ \mu\text{m}$ ,过强的电脉冲形成过大的孔洞。击穿将是不可逆的。由电击穿这些数据可以看出,若以激光诱导细胞融合以选用通常的调 Q 激光为宜,其脉宽为  $10\text{ ns}$  量级,与电击穿时间相近。实验中观察到激光形成的微孔,约在一秒钟时间内愈合,孔洞大小与电融合相似。孔洞过大,击穿将为不可逆的。用脉宽为  $10\text{ ns}$  的调 Q 激光激发,以水分子计,  $0.01\sim 0.1\text{ mJ}$  的可见光可在  $1\sim 10\ \mu\text{m}$  孔洞范围内引起 100% 的光击穿。激光在质膜上形成的微孔大小和形状密切地依赖聚焦系统和激光功率,需细心地调整。

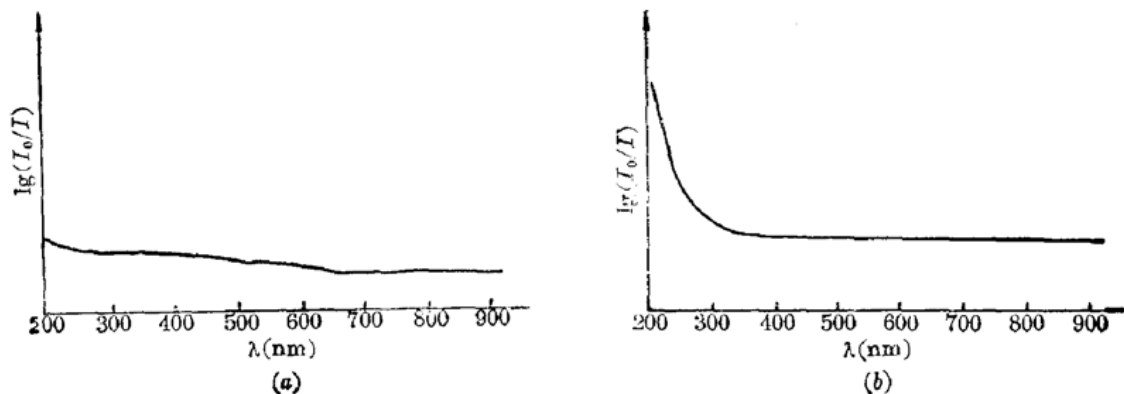


图 1 吸收光谱

(a) 红血细胞膜的吸收光谱

(b) 红血细胞膜脂的吸收光谱

### 三、泥鳅受精卵的激光融合

为检验激光诱导细胞融合方法的可行性及探讨其对动物卵细胞融合的应用情况,我们选用了泥鳅受精卵进行实验。

融合的激光微束系统是一套 YAG 倍频  $0.53\ \mu\text{m}$  及由其泵浦的染料激光器  $0.59\ \mu\text{m}$  和一台荧光显微镜。激光脉宽为  $10\text{ ns}$ 。用 He-Ne 激光为指示光。激光经显微镜聚焦后对样品进行照射。实验样品的瞄准及观察皆通过显微镜及电视监视器进行。并同时用录像机和照相机进行记录。

人工受精泥鳅卵经胰蛋白酶去膜后,放入特制的融合槽中使其紧密接触,然后在显微镜下使微束激光沿与卵排列的垂直方向瞄准质膜接触处进行照射。为融合,微束激光的能量密度的控制是十分重要的。应使其稍低于在质膜上产生明显的微孔的能量密度。过大的能量密度

将产生过大的孔洞而影响细胞的成活。微束激光的能量密度可由调整显微镜物镜和激光单脉冲能量来选择。对泥鳅受精卵以  $10 \mu\text{J}/\mu\text{m}^2$  为宜。照射后的细胞在 1/10 Holtfreter 液中培养,并观察记录。

激光照射后两个紧贴着的卵呈哑铃状(图 2(a))。随着两个卵细胞胚盘的出现,卵裂的进行,哑铃状逐渐发生变化,环境温度为  $24^\circ\text{C}$ , 约经 5 小时即变为椭球形或球形(图 2(b))。卵间的质膜明显消失,其体积约为对照卵的两倍,此时两个卵已明显地融为—体。共做了三次实验,照射 120 对卵,明显融为一体的为 37 对。考虑到对照组的卵裂率为 90%,故融合率约为 30%。

融合的卵全部都能继续卵裂发育。早期发育的时序与对照组基本一致,个别的较慢。融合卵进一步发育的形态是各式各样的,与融合时两个卵的胚盘的相对位置有关。但基本上可分为两大类:一类为胚盘相距较远,它们的发育表观上保持分别各自卵裂,这一类共 28 例,其中发育到囊胚的有 13 例,原肠的 9 例,肌节期的 4 例,最后有 2 例发育为幼体。另一类为胚盘相距较近,开始发育时虽然也是各自进行卵裂,但随着分裂球逐渐增多,分裂球连成一片,而发育为一个单一的囊胚(图 2(c))。这类卵共 8 例,发育至囊胚期的 5 例,原肠的 3 例,肌节期的 3 例,形成幼体的 2 例。在幼体期可见肌节的收缩运动、心脏跳动、色素细胞并出现胸鳍。幼鱼卵黄耗尽后可自由游动和摄食。图 2 为这类卵由哑铃状经卵裂、囊胚、原肠、肌节发育为幼体全过程的一组照片。

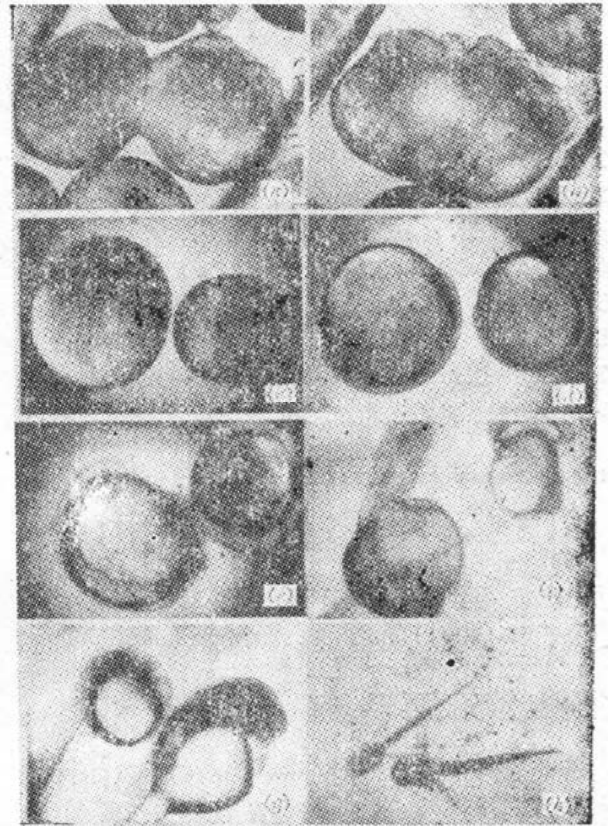


图 2 融合并形成一个胚胎的发育过程  
融合过程: (a)→(b) 激光照射 4 小时由哑铃状变为椭球状; (c) 囊胚期,右端为对照; (d) 原肠期,右端为对照; (e) 肌节期,右端为对照; (f) 初孵仔鱼,右端为对照; (g) 血液循环前期,上为对照; (h) 稚鱼期,上为对照

#### 四、总 结

本文实验表明,激光可以使细胞融为—体,并且动物卵细胞融合可发育至幼体。这是至今尚未见到的用融合方法所获得的动物个体。激光诱导细胞融合方法与过去的方法相比有如下特点:

1. 毒性小,损伤小。用于融合的微束激光仅作用于细胞接触处的质膜微区内,并且是沿着与细胞排列相垂直方向进行照射,因此处于激光光斑以外的细胞的其它部份(包括质膜内侧)处的光能量很低,在可见红外波段上不会产生明显损伤。

2. 定位、定时性强。微束激光可被严格地控制在细胞的某一特定部位和在某一特定时刻进行照射,因此可按细胞的结构和形态的不同选择细胞的不同部位进行融合,或在细胞周期的不同时刻进行融合,还可在细胞融合前或融合后有选择地用激光对细胞的某个细胞器施加作用。融合方式的这种多样性是用病毒等其它方法难以做到的。这将为细胞融合的研究提供更

多的可能性。

综上所述可以看出, 激光细胞融合方法是一种切实可行而又有效的方法, 它为生物新品种, 尤其是动物新品种的培育提供一种新的强有力的手段。

### 参 考 文 献

- 1 Kohler G. and Milstein L., *Nature*, **256**, 495(1975)
- 2 Schierenberg E. et al., *Develop. Bio.*, **107**, 337(1985)
- 3 Okada Y. et al., *Exp. Cell Res.*, **40**, 154(1965)
- 4 Kao K. N. et al., *Planta*, **115**, 355(1974)
- 5 Zimmermann U. and Vienken J., *J. Membrane Bio.*, **67**, 165(1982)
- 6 Zimmermann U., *Biochim., Biophys. Acta*, **597**, 637(1980)
- 7 Zimmermann U., *J. Membrane Biol.*, **53**, 33(1980)
- 8 汪和睦 et al., 生物化学与生物物理进展, (3), 52(1985)

(上接第 170 页)

$M$  离物体和干板远了, 镜面反射的物光的视场就要减小。为了避免视场的减小, 我们可以用大口径的球面反射镜来代替平面反射镜  $M$ 。由于在本方法的第二步记录过程中, 只要 FMH 复位良好及再现光  $O$  与  $R_1$  完全共轭, 共轭物光就将沿原光路返回, 因此该共轭物光经过球面反射镜的补偿, 最后会聚成与原物面  $B$  全同的实像。调节光路可使光程  $OGB$  和  $OA$  之差恰为所用激光器腔长的偶数倍, 同样能获得较好的全息图。

本工作得到林典要教授和于洛平老师的支持, 何源老师在实验方面给予了帮助, 在此深表谢意。

### 参 考 文 献

- 1 T. H. Jeong et al., *J. Opt. Soc. Am.* **58** (9), 1263 (1966)
- 2 R. J. Collier et al., *Optical Holography* (Academic Press, New York, 1971), p.533
- 3 N. George, *Opt. Commun.*, **1** (6), 457 (1970)
- 4 P. Hariharan, *Opt. Eng.*, **16** (5), 520 (1977)
- 5 A. K. Aggarwal, S. K. Kaura, *Opt. and Laser Tech.*, **19** (4), 209 (1987)
- 6 S. A. Benton, *J. Opt. Soc. Am.*, **59** (10), 1545 (1969)
- 7 R. J. Collier et al., *Optical Holography* (Academic Press, New York, 1971), p.514
- 8 葛万福, 熊秉衡, 光学学报, **5**(7), 600 (1985)