

文章编号: 0258-7025(2004)07-0888-05

低强度激光照射对离体动物 红细胞流变学性质的影响

宓现强^{1,2}, 岑 剡^{1,2}, 周正谊³, 周鲁卫¹, 陈暨耀^{1*}

(复旦大学¹ 物理系,² 应用表面物理国家重点实验室, 上海 200433;³ 上海市激光技术研究所, 上海 200040)

摘要 以动物血液为样品研究低强度激光对红细胞流变学特性的影响。将放置后的猪血血液(红细胞变形能力已变差)施以激光照射,测量红细胞变形能力的变化。用 650 nm 激光照射 20 min 后,红细胞变形能力有明显改善,此变形能力的改善随照射功率的增大而增强,至 4~5 mW 后趋于饱和。在相同的照射功率下(10 mW)650 nm 与 632.8 nm 对红细胞变形能力的改善有相近的效应,这可由红细胞中血红蛋白对两波长的激光有相近的吸收得到解释。以小鼠血液为样品,研究激光照射对红细胞电泳率的影响。经 632.8 nm 激光照射后,红细胞的电泳率明显增加,此红细胞带电量的增加将有助于改善红细胞的聚集性。在所使用的激光功率下(小于 20 mW),经形态学显微测量表明,红细胞并未造成可观察到的伤害,也未有溶血现象发生。

关键词 激光技术;红细胞;变形能力;电泳率

中图分类号 TN 249;R 318.51 **文献标识码** A

The in Vitro Effects of Low Power Laser Irradiation on Animal Erythrocyte Rheology

MI Xian-qiang^{1,2}, CEN Yan^{1,2}, ZHOU Zheng-yi³, ZHOU Lu-wei¹, CHEN Ji-yao¹

(¹Physics Department, ²State Key Laboratory of Applied Surface Physics, Fudan University, Shanghai 200433, China)
³Shanghai Research Institute of Laser Technology, Shanghai 200040, China)

Abstract Using the blood samples of animal, the in vitro effects of low power laser irradiation on erythrocyte rheology were investigated. After the deposited pig's erythrocytes (the deformation of erythrocytes have already turned to worse) were irradiated with laser, the effects of laser irradiation on erythrocyte's deformation were measured. When 650 nm laser was used for irradiation, the deformability of erythrocytes was improved obviously. The changing tendency is that, the erythrocyte's deformation was enhanced with the increasing of irradiation power and then saturated around 4~5 mW. When the blood samples were irradiated by 650 nm and 632.8 nm lasers respectively with the same power (10 mW), the erythrocyte deformability in two cases were all obviously increased to the similar level. These phenomena can be explained by that, the hemoglobin in erythrocytes has the similar absorption to both lasers. Taking the mouse blood as the samples, the effects of laser irradiation on erythrocyte's electrophoretic mobility was studied further. When irradiated by 632.8 nm laser, the electrophoretic mobility of erythrocytes was speeded also, reflecting the electric charges on the surface of erythrocytes were increased which will help to decrease the aggregation of erythrocytes. Under such low power irradiation (less than 20 mW), no morphological change was detected by the microscopy and no hemolysis was found also.

Key words laser technique; erythrocyte; deformability; electrophoretic mobility

收稿日期:2003-03-31;收到修改稿日期:2003-09-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:10174017)资助项目。

作者简介:宓现强(1972—),男,医学硕士,现为复旦大学在读博士研究生,研究方向为生物医学物理。

* 通信联系人。E-mail:jychen@fudan.edu.cn

1 引言

大量生物试验和临床治疗发现低强度激光照射可刺激细胞生长,促进病灶组织恢复正常状态,这被称为低强度激光的生物刺激效应^[1]。低强度激光疗法的应用之一是血管内照射。该疗法自 20 世纪 90 年代引入我国后,已有数万名患者接受过治疗^[2],对治疗脑梗塞、高血压等很多心脑血管疾病取得了一定的效果^[3~6]。但此类研究大多以疗效观察和临床现象总结为主,虽已开展了不少基础研究^[7],但由于其复杂性,在作用机制上至今尚无定论。原因之一是由于血液的实验样品大多取自患者,病人的病因各异使样品本身存在很大差异,给统计比较带来很大困难,导致许多不同的结论。为了探讨低强度激光对血液的作用,我们采用取自同一动物身上的血液为实验样品进行体外实验研究,增加了可比性,探索低强度激光照射对血液流变学带来的影响,并比较不同激光强度及不同波长的效应,研究激光血管内照射的机理。

2 材料和方法

2.1 照射装置

采用 YNH05-A 型 650 nm 波长半导体激光血管内治疗仪和 LJL 40-HA 型氦氛激光血管内治疗仪,输出功率可用衰减片调节。

2.2 样品制备

新鲜猪血用肝素抗凝。1000 g/min 离心 10 min,弃去血浆和沉于红细胞表层的白细胞,PBS 缓冲液洗涤 2 次(最后一次为 2000 g/min),离心 10 min,然后吸取压实的红细胞(约 0.5 mL),配成 5% 压积红细胞悬浮液,用于变形能力测定。

小白鼠尾部取血,置于含 PBS 缓冲液的试管中,至溶液呈淡红色。此时红细胞浓度约为 $(1 \sim 1.5) \times 10^4 / \text{mm}^3$,将样品置于 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温。用于红细胞电泳测定。

2.3 红细胞变形能力测定

采用 DXC-400 型核孔滤膜红细胞变形能力测定仪^[8]测定红细胞率过指数(IF)来反映红细胞变形能力大小, $IF = [(t_b - t_s) / t_s] \times (1/H)$, t_b 和 t_s 分别代表样品和生理盐水通过滤膜的时间, H 代表压积。IF 值反映红细胞通过核孔滤筛所受相对阻力的大小。IF 愈大,变形能力愈差;反之,IF 愈小,变形能力愈强。

2.4 红细胞电泳测定

采用 Liang-200 型红细胞电泳仪^[9]测试。取长 5 cm,截面积(宽×厚)为 $1 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$ 的长方形毛细管,将其一端浸入细胞悬液中,由于毛细作用,细胞悬液将自动充满整个毛细管。用显微镜测量方形毛细管中离管壁十分之一深度层(静止层)上细胞的平均迁移时间(s)。测量时选择相同清晰的细胞,温度保持在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 。两极间电压为 40 V。琼脂盐桥通过 1.5 g 琼脂粉与 9 g 氯化钠溶于 100 mL 蒸馏水配制而成。每次测量 10 个细胞来回往返目镜测微尺的两小格($34 \mu\text{m}$)距离所需时间 T 。按下列公式计算细胞电泳率(EPM): $EPM = \text{电泳速度} / \text{电压梯度}$ 。

2.5 照射方法

2.5.1 变形性测定

1) 将放置的猪血液样品,均分为对照组和照射组进行激光照射。激光波长为 650 nm,输出功率分别为 2.4, 5.7, 10, 20 mW,光斑直径 4 mm,样品置于 20 mL 锥形瓶。锥形瓶通过震荡仪均匀晃动,保证血液标本均能被均匀照到。光束从侧面入射,照射时间为 20 min。

2) 650 nm 激光输出功率分别改为 3.0, 3.4, 4.1 mW,对室温放置 48 h 的猪血液样品进行激光照射(20 min)。

3) 采用功率 10 mW 的 632.8 nm 波长激光对样品进行同样照射(20 min)。

2.5.2 电泳测定

将放置 24 h 后的 5 只小白鼠血液样品均匀分为两份,采用 632.8 nm 波长激光自试管顶部照射,输出功率为 20 mW,光斑直径 4 mm(照射时间为 20 min)。

2.6 统计学处理

将实验结果表达为平均值±标准误差,应用 Origin 6.0 进行统计学处理,对照组及实验组间的比较采用成对的 t 检验。

2.7 光谱测量

猪血吸收光谱由 UV500-Visible Spectrometer 测得。

3 结果

1) 由于血液离体后随着放置时间的延长而老化,红血球的变形能力也随之变差^[10]。实验采用放置 24 h 后的猪血液样品用不同功率 650 nm 波长激光照射后进行变形性测定,结果如表 1 所示。

表 1 放置 24 h 后不同功率激光照射前后猪红细胞变形性的改变 (650 nm)

Table 1 After deposite for 24 h, changes of pig's erythrocyte deformability after laser irradiation with different intensity (650 nm)

Laser intensity /mW	2.4	5.7	10	20
Control group ($n = 4$)	7.88 ± 0.48	8.6 ± 1.1	8.73 ± 0.38	8.73 ± 0.95
Irradiation group ($n = 4$)	$7.2 \pm 0.42^{**}$	$5.63 \pm 0.48^{**}$	$5.77 \pm 0.21^{**}$	$5.38 \pm 0.48^{**}$
Mean RV /%	8.54 ± 2.41	34.29 ± 3.9	33.94 ± 1.79	38.3 ± 1.18

RV: relative variance; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

表 2 放置 48 h 后不同功率激光照射前后猪红细胞变形性的改变 (650 nm)

Table 2 After deposite for 48 h, changes of pig's erythrocyte deformability after laser irradiation with different intensity (650 nm)

Laser intensity /mW	3.0	3.4	4.1
Control group ($n = 4$)	21.83 ± 0.15	22.1 ± 0.36	21.27 ± 1.1
Irradiation group ($n = 4$)	$20 \pm 0.04^{**}$	$18.33 \pm 0.29^{**}$	$12.33 \pm 0.85^{**}$
Mean RV /%	8.39 ± 0.64	17.02 ± 2.6	41.98 ± 3.26

RV: relative variance; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

由表 1 可见,不同功率组经激光照射后,变形能力均有改善, P 值均小于 0.01,与对照组有显著差异,但从 2.4 mW 到 5.7 mW 百分比相对变化幅度最大(从 8.5%到 34%),再加大功率此变化已没有增加。为了验证变形能力随照射功率增大(2.4 mW 到 5.7 mW)的变化关系,选用 3 mW,3.4 mW 和 4.1 mW 三组功率对同一批猪血进行跟踪照射(此批猪血放置 48 h 后),然后测定红细胞的变形性(表 2)。比较表 1 与表 2 中对照组的数据可明显发现,放置 48 h 后的猪血变形能力远差于放置 24 h 后的猪血,但表 2 中变形能力的改善百分比与表 1 的数据吻合,且可连接表 1 中(2.4 mW,5.7 mW)的变化。表 2 证实在 3~4 mW 间为一对红血球变性能力有极大影响的变化区域。经激光照射后红细胞变形能力改善百分比与激光照射功率间的关系见

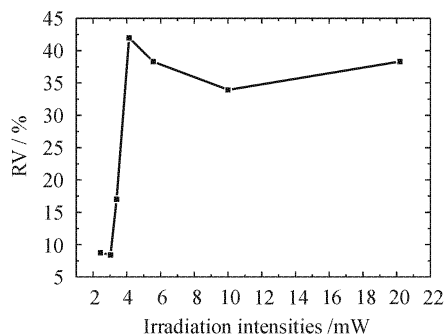


图 1 不同激光功率与红细胞变形性改善百分率的关系

Fig. 1 Relationship between RV of erythrocyte's deformability and laser intensity

图 1。此结果显示,只有达到一定的激光照射功率才能获得较好的红细胞变形能力改善效果。

2) 临床发现 632.8 nm 与 650 nm 激光在血管内照射中均有效。表 3 是以猪血(放置 24 h 后)为样品,比较不同波长激光对红细胞变形能力改善的差异。为避免功率过小的影响,两激光的照射功率均选为 10 mW。表 3 显示经同样功率同等时间照射后,两激光的效应相同,均能对红细胞的变形能力有明显的改善。图 2 为红细胞的吸收光谱,由图可见,猪血红细胞在 633 nm 与 650 nm 处有相近的吸收,可对表 3 的结果作出解释。

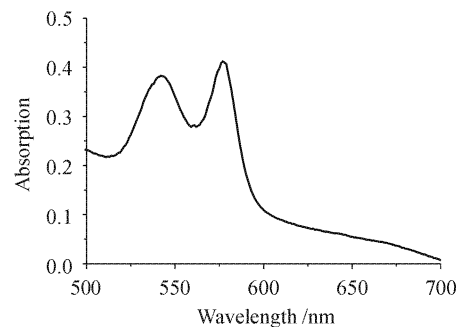


图 2 猪血红细胞的吸收光谱(红细胞浓度 0.13%)
Fig. 2 Absorption spectra of pig erythrocytes
(concentration of erythrocytes was 0.13%)

3) 表 4 为 5 只小鼠血液样品经 632.8 nm 激光照射后,红细胞电泳率的改变。结果显示,红细胞经照射后电泳率有明显增加,表明红细胞的带电量增加,这将有效地改善红细胞的聚集。

表 3 两种波长 10 mW 激光照射对猪红细胞变形性改善的比较

Table 3 Comparison of erythrocyte deformability between two wavelengths laser irradiation

Laser wavelenth /nm	650	632.8
Control group ($n = 4$)	8.73±0.38	8.73±0.25
Irradiation group ($n = 4$)	5.77±0.21**	6±0.3**
Mean RV /%	33.94±1.79	31.29±3.21

RV: relative variance; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

表 4 激光照射前后小鼠红细胞电泳率的改变

Table 4 Changes of mouse erythrocyte's electrophoresis mobility

No.	1	2	3	4	5	Mean RV /%
Control group	1.172	1.261	1.236	1.190	1.077	
Irradiation group	1.428	1.449	1.468	1.343	1.335	
RV /%	21.84	14.91	18.77	12.86	23.96	18.47±4.63

t test for control group and irradiation group, $P = 4.43 \times 10^{-4}$, indicating evident difference.

4) 对经 20 mW 激光照射后的红细胞进行显微镜观察,未发现红细胞有任何形态学变化。将照射后的样品离心,弃除红细胞,对除细胞后的溶液进行吸收光谱测定,未发现任何血红蛋白的吸收峰,此结果表明,红细胞经 20 mW 的激光照射未造成溶血现象。

4 讨 论

低强度激光对血管内皮细胞的生物刺激作用国外已经有较为肯定的报道,但仍不能完全解释其全身效应^[11~14]。红细胞占血液中有形元素总体积的 99% 以上,血液体积的 40%~45%。红细胞变形性是指其能溃由通过比其自身直径小的微血管的能力。红细胞变形性降低会导致全血粘度增高,加大血流阻力,因此红细胞的变形性在某些缺血性心脑血管疾病(如心肌梗塞、中风等)的发生发展中有着重要作用。激光照射明显地改善了红细胞的变形能力,这可能是血管内照射疗效的机理之一。

国内在激光血管内照射的临床应用中,激光功率大多较低,在 1~5 mW 的范围。我们在实验中发现即使使用 20 mW 的强度来照射,并未使红细胞有任何损伤(溶血或形态变化),因此提示在临床应用中,是否可以使用稍大的强度(5~10 mW)。

国外的研究已发现,红细胞的变形能力与粘在红细胞膜上的血红蛋白(Hb)数量有关^[15],粘在膜上的血红蛋白越多,变形性越差。由于血红蛋白与膜的连接是一种弱耦合相互作用^[16],血红蛋白在吸收激光能量后振动能增加将可能脱离与膜的连接成为细胞中的自由血红蛋白,从而改善红细胞的变形能力;当激光功率增大,光强度增加后,有更多血红

蛋白受激发脱离膜束缚,使红细胞膜变形能力有更大的改善,直至血红蛋白基本脱落,此时呈现变形能力对激光功率的饱和。这可能是激光与红细胞的作用机制之一。

红细胞对激光的吸收主要是由于细胞中血红蛋白对激光的吸收。图 2 实际上为典型的血红蛋白吸收光谱。由于血红蛋白对 650 nm 及 632.8 nm 有相近的吸收率,因此红细胞的变形能力在两种波长作用下有相近的改善程度,此结果反过来进一步说明血红蛋白是激光照射的原初靶位之一。

细胞表面细胞膜上有许多带电基团,如羧基、氨基、羟基、磷酸基等。由于细胞表面带负电的集团(如 COO⁻)占多数,因而在一定电压下红细胞向正极移动。若血液中的某些蛋白(如胶原蛋白等)吸附在红细胞外表面将造成红细胞的电负性减少,这样将造成红细胞的聚集,使血液粘度升高。红细胞在受到激光照射后,膜振动加剧,摆脱蛋白的吸附,恢复其电负性,从而电泳率增加,改善聚集性。表 4 的结果显示激光照射对红细胞流变性特性的改善有多重作用,这可为临床多种疾病在激光照射的辅助治疗后获得的好效果提供解释。

参 考 文 献

- 1 J. R. Basford. Low intensity Laser therapy; still not an established clinical tool [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 1995, **16**(4):331~342
- 2 Dong Weiren, Xiao Yingqing, Cheng Jieluan. Combined treatment of cerebrovascular diseases by endovascular laser irradiation of blood [J]. *Laser Journal*, 1997, **18**(1):56~58
董为人,肖应庆,程洁鑫. 血管内激光照射血液综合治疗脑血管病[J]. 激光杂志, 1997, **18**(1):56~58
- 3 Li Xiangzhong, Li Minxia, Wang Yufang *et al.*. He-Ne laser intravascular irradiation therapy in the treatment of 55 cases with acute cerebral infarction [J]. *Chinese J. Phys. Ther.*

- 1998, **21**(1):17~19
李相中,李敏霞,王玉芳等. 氦氛激光血管内照射治疗急性脑梗塞 55 例观察[J]. 中华理疗杂志, 1998, **21**(1):17~19
- 4 Bai Jie, Liang Xiaoguang, Song Lixin *et al.*. The influence of semi-conductor laser irradiation for hyper-viscosity and hyperlipidemia of hypertension patients [J]. *Chinese J. Phys. Ther.* 2000, **23**(2):79~82
白 洁,梁晓光,宋丽新等. 半导体激光治疗高血压病高粘高脂血症观察[J]. 中华理疗杂志, 2000, **23**(2):79~82
- 5 Lan Xiufeng, Liu Xiaoran, Wang Yawei *et al.*. Physical analysis of intravascular low-reaction-level laser irradiation therapy decreasing the aggregate degree of erythrocyte [J]. *Chinese J. Lasers*, 2000, **A27**(5):477~480
兰秀凤,刘晓然,王亚伟等. 弱激光血管内照射改善红细胞聚集能力的物理机理研究[J]. 中国激光, 2000, **A27**(5):477~480
- 6 Liu Xiaoran, Lu Jian, Wang Yawei *et al.*. Fractal analysis on the physical mechanism of intravascular low-reaction-level laser irradiation therapy improving the deformity of erythrocyte [J]. *Chinese J. Lasers*, 2002, **A29**(2):189~191
刘晓然,陆 建,王亚伟等. 弱激光照射改善红细胞变形性的物理机理的分析研究[J]. 中国激光, 2002, **A29**(2):189~191
- 7 D. G. Siposan, A. Lukacs. Effect of low-level laser radiation on some rheological factors in human blood; an in vitro study [J]. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, 2000, **18**(4):185~195
- 8 Li Xinbo, Guo Xueqin, Liang Zijun. Effects of acute hypoxia on blood viscosity, red blood cell deformability and the left ventricular function in rats [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 1995, **47**(2):165~172
李新波,郭学勤,梁子钧. 急性低氧对大鼠血粘度红细胞变形能力和左心室功能的影响[J]. 生理学报, 1995, **47**(2):165~172
- 9 Ruan Xuzhi, Cai Fuchou. Effects of different dosage He-Ne laser irradiated on Raji cell membrane lipid fluidity [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 1997, **6**(1):975~977
阮绪芝,蔡福筹. 不同剂量的 He-Ne 激光对 Raji 细胞膜脂流动性的影响[J]. 激光生物学报, 1997, **6**(1):975~977
- 10 P. L. La Celle. Alteration of deformability of the erythrocyte membrane in stored blood [J]. *Transfusion*, 1969, **9**(5):238~242
- 11 M. Schaffer, H. Bonel, R. Sroka *et al.*. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation; preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI) [J]. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2000, **54**:55~60
- 12 N. Kipshidze, H. Sahota, R. Komorowski *et al.*. Photoremodeling of arterial wall reduces restenosis after balloon angioplasty in an atherosclerotic rabbit model [J]. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1998, **31**(5):1152~1157
- 13 K. Spodaryk. The influence of low-power laser energy on red blood cell metabolism and deformability [J]. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2001, **25**(3-4):145~151
- 14 N. Kipshidze, V. Nikolaychik, M. H. Keelan *et al.*. Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro [J]. *Laser in Surgery and Medicine*, 2001, **28**:355~364
- 15 E. Friederichs, R. A. Farley, H. J. Meiselman. Influence of calcium permeabilization and membrane-attached hemoglobin on erythrocyte deformability [J]. *American Journal of Hematology*, 1992, **41**:170~177
- 16 C. W. M. Haest. Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, **694**:331~352