

文章编号: 0258-7025(2008)06-0957-04

低强度激光照射对离体人红细胞的影响

许 锋¹ 胡 林^{1*} 王现伟^{2,3} 刘艳辉¹ 曾 柱² 李 明¹

(¹ 贵州大学理学院 光电子技术与应用省级重点实验室, 贵州 贵阳 520025
² 北京大学基础医学院生物物理系, 北京 100083; ³ 河南新乡医学院, 河南 新乡 453000)

摘要 通过对低强度激光照射离体人红细胞后的生物物理学指标分析, 找出影响红细胞(RBC)生物特性的主要因素。以放置在4℃下48 h的变形性下降的正常人血液为样品研究低强度激光对红细胞流变学特性的影响。取2 mL标本分成相等两份, 其中一份在2 mW, 4 mW, 8 mW的功率下照射30 min, 另一份离心后取出红细胞放入等渗的PBS液中用同样的方法进行照射。照射后进行对比发现单照红细胞的样品的变形性、取向、膜流动性、微黏度、各向异性 and 渗透脆性比全血照射下的变化小。表明红细胞膜的生物放大效应对血液的流变学特性的影响是主要的。

关键词 医用光学与生物技术; 低强度激光; 红细胞; 变形性

中图分类号 R 318.51 文献标识码 A

Effects of Low Power Laser Irradiation on Human's Red Blood Cell

Xu Feng¹ Hu Lin¹ Wang Xianwei^{2,3} Liu Yanhui¹ Zeng Zhu² Li Ming¹

¹ Physics Department of Guizhou University, Light Information and Physics Laboratory, Guiyang, Guizhou 520025, China
² Department of Medical Physics, Basic Medical School of Peking University, Beijing 100083, China
³ Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453000, China

Abstract This paper studied the biophysics' index of low power laser irradiation on human's red blood cell (RBC) to find the primary factor that affects biophysics of RBC. The blood cells of the deformability health human deposited in 4℃ for 48 h are used as samples, and the effects of low power laser irradiation on these samples are investigated. These samples are divided into two groups. One group is irradiated for 30 min under the laser with the powers of 2 mW, 4 mW, and 8 mW. The RBCs in the other group are doped with PBS with the same concentration. After centrifugating, they are processed in the same way. The results show that the characteristics of the blood cell irradiated by laser are less than the whole blood. Our study indicates that the magnify effects of the human's red cells' membrane are important to the rheology characteristic of the blood.

Key words medical optics and biotechnology; low power laser; red blood cell; deformability

1 引 言

低强度 He-Ne 激光血液照射治疗, 主要指用低强度激光直接照射循环血液、病变部位以达到治疗疾病的目的^[1]。现已发展有血管外照射、穴位照射、粘膜照射等方法, 已有数万名患者接受过治疗。特别是在高脂血症、脑血管病的治疗中取得了一定的疗效^[2,3]。刘承宜等^[4~8]提出了低强度激光疗法的

生物信息模型(BML)和激光生物效应的转换模型(BIIML)。对于机制的研究分为两种, 一种是强调红细胞(RBC)接受照射后的生物放大效应^[9], 另一种是强调红细胞本身的膜结构改变^[10]而影响血液的流变学特性。为了对比两种作用的强弱, 将血样分成两组, 一组是对全血进行照射, 另一组是对红细胞进行照射。在其他条件相同的情况下将结果进行对照分析。

收稿日期: 2007-07-17; 收到修改稿日期: 2007-12-25

基金项目: 国家自然科学基金(10374021), 贵州省长基金(2006-15), 贵州省组织部高层次人才基金(TZJF-2006008), 贵州省科学技术基金(20080073), 贵州大学科学基金和贵州大学创新性实验计划(200807)资助项目。

作者简介: 许 锋(1978—), 男, 河南人, 讲师, 硕士, 主要从事生物物理方面的研究。E-mail: xufeng6602@sina.com.cn

* 通信联系人。E-mail: hulin53@sina.com

2 材料和方法

主要仪器为 MR450 型低功率 He-Ne 激光器(清华紫光生产), 3F-2 型多功能微量高速离心机(北京市医用离心机厂), 电热恒温水浴箱(北京长安科学仪器厂), 荧光分光光度计(日本 HITACHI 公司), 红细胞电泳仪 LIANG-100(复旦大学医学院生产)。

取正常健康成人血液 8 例, 用肝素抗凝。每例血样为 6 mL, 分为等同的两份。一份直接照射。另一份 1000 r/min 离心 10 min, 弃去血浆和沉于红细胞表面的白细胞, PBS 缓冲液(磷酸二氢钾 0.20 g, 氯化钠 8 g, 氯化钾 0.2 g, 一水磷酸氢二钠 1.56 g, 溶于 1000 mL 蒸馏水中, 用氢氧化钠和盐酸调至 pH = 7.4, 渗透压 300 mOsm/kg)洗涤 3 次(每次都是 1000 r/min 离心 10 min), 最后将离心压实的红细胞用血影制备低渗溶解法^[11]制备成血影细胞, 然后用等渗的 PBS 液悬浮再进行照射。

取照射过的样品 20 μ L 加入到 2.5 mL PVP 液(分子量 30kD, PVP 15 g, 磷酸氢二钠 284 mg, 磷酸二氢钾 68 mg, 氯化钠 0.38 g, 溶于 100 mL 蒸馏水, 用体积分数 10% 氢氧化钠和盐酸调至 pH = 7.4, 黏度 15 mPa·s)中, 用 LBY-BX2 激光衍射仪测得在切变率 50~1000 s⁻¹ 下的红细胞的变形指数(DI)随流场切变率变化的关系曲线, 并将结果与照射前的样品对比。

红细胞膜流动性是反映红细胞状态的重要指标之一。每次取 40 μ L 样品 2500 r/min, 离心 5 min 后除去血浆和灰白色血细胞层, 然后加预冷的等渗液 PBS 将沉淀红细胞悬浮, 继而以 2500 r/min, 离心 5 min, 除去上清液。如此重复洗涤三次后将沉淀的红细胞按 1:40(体积比)加入预冷的低渗液(10 mmol/L THS(C₄H₁₁NO₃)-盐酸溶液缓冲液, THS 1.21 g 以蒸馏水溶解并加至 1 L, 并以盐酸调 pH 值至 7.4)混均放置 4 $^{\circ}$ C 下 1 h, 待完全溶血即制备成血影细胞(血影制备低渗溶解法)后将制备的血影细胞液用 12000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min。弃去上清, 再用 PBS 缓冲液洗涤三次, 即得到白色红细胞膜。然后加等渗 PBS 缓冲液至终体积 2 mL, 再用 0.5 mL 四氢呋喃和浓度为 2×10^{-6} mol/L, 0.5 μ L DPH(-1,6-二苯基-1,3,5-己三烯)荧光标记。放入电热恒温水浴箱中在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min。取出后用荧光分光计测量细胞在不同偏振角度时的荧光强度 I 。激发波长为 360 nm, 发射波长为 430 nm, 标记的细胞在 2 h 内测完, 测量温度 37 $^{\circ}$ C。

根据公式计算荧光偏振度 $P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}}$, 其中 I_{VV} 为起偏器和检偏器光轴均在垂直方向时的荧光强度; I_{VH} 为起偏器光轴在垂直方向上, 检偏器光轴在水平方向上时的荧光强度; G 为校正因子, 校正由于单色器所产生的附加偏振。按 $G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$, 其中 I_{HH} 为起偏器和检偏器均在水平方向时的荧光强度, I_{HV} 为起偏器光轴在水平方向、检偏器光轴在垂直方向时的荧光强度。求得 P 值后, 根据公式 $\eta = \frac{2P}{0.46 - P}$

计算出表征细胞膜流动性的黏度 η 。

另一份血样经过照射后用相同的方法处理。

离心收集红细胞, 用生理盐水清洗一次(1000 r/min, 5 min), 弃上清。

质量浓度为 9% 的蔗糖溶液将红细胞配成 2×10^6 /mL 悬液。

将注入水的长方形毛细管安放在电泳小室槽, 电泳小室槽安放在载物台上, 借助目镜测微器, 在低倍镜下找到从前壁线到后壁线的 1/10 距离为静止层, 以下的测量均在静止层上进行。

将红细胞悬液通过毛细作用注入电泳小室, 安装在电泳小室槽内, 两端联上琼脂盐桥(用 1.5 g 琼脂粉和 9 g 氯化钠溶于 100 mL 蒸馏水中配制而成)后, 安装在载物台上。

每次测量选定 10 个细胞, 测量其在 30 ± 1 $^{\circ}$ C, 40 V 的电压下, 移过两格(每格 165 μ m)一个来回的时间, 求 10 个细胞的平均时间, 并计算电泳率。每个细胞样品测量 3 次, 将得到的电泳率求平均值和标准差。

用 MR450 型低功率 He-Ne 激光器对样品进行照射, 保证功率在 2 mW, 4 mW, 8 mW(波长为 632.8 nm)光斑(直径 1 cm)的情况下对样品(3 mL 放于试管中)由试管口垂直进行照射 30 min, 照射前充分摇匀。照射中每 10 min 摇动试管一次, 保证红细胞受到照射均匀。将照射的样品取出后离心取红细胞进行电泳率的测量, 与未照射的红细胞的电泳率比较。

将实验结果表达为平均值 \pm 标准误差, 应用 SPSS 软件进行统计学处理, 对照组与实验组的检验采用成对的 t 检验。

3 实验及结果

实验结果表明, 低强度氦氖激光照射能够调整

人红细胞的变形性。但是在全血中照射的红细胞和悬浮液中照射的红细胞相比,全血中的红细胞的变形能力和膜的流动性提高得更明显。由图 1 可以看出 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与正常对照组比较),两种照射条件下红细胞的变形能力、红细胞膜的流动性都比未照射的红细胞有很大改善。但是以在全血中照射的红细胞的改善更为明显。图 2 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与正常对照组比较)中可以看到全血中照射的红细胞电泳率和照射前的相比电泳率得到较大改善,但是在悬浮液中照射的红细胞的电泳率与照射前的统计学上无明显差异。

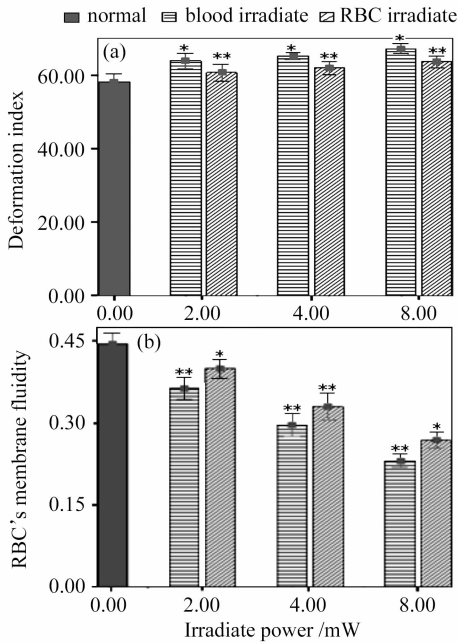


图 1 激光照射后两组红细胞变形性(a)和膜流动性(b)与正常组对比

Fig. 1 Two group RBC deformation (a) and membrane fluidity (b) compared after irradiation

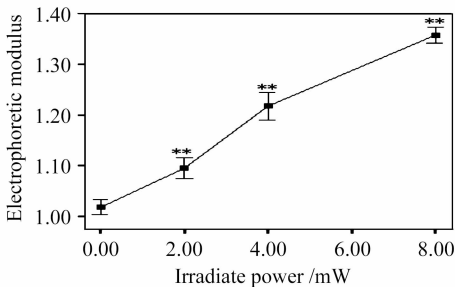


图 2 激光照射后全血组红细胞电泳率与正常组对比

Fig. 2 RBC of blood electrophoretic modulus compared with no irradiation after irradiation

4 分析与讨论

两组标本中的红细胞数量是相等的,在等量的

悬浮液中所接收到的激光照射剂量的机会从统计学上来讲也是相等的,因此实验的初始条件是相等的。根据实验结果可以看出,在全血中照射的红细胞和悬浮液中照射的红细胞的变形能力和膜的流动性都有提高,而照射后全血中的红细胞比 PBS 缓冲液中的红细胞的变形能力和膜的流动性提高得更明显。全血中红细胞的电泳率在照射后有明显提高,但在悬浮液中的红细胞的电泳率在照射前后没有明显变化。造成这种结果的原因可以从以下几个方面分析。

以往研究发现,细胞内的钙含量对红细胞变形性有显著影响。当胞外钙浓度大于 $200 \mu\text{mol/L}$ 并用 A23187(一种钙离子载体,能将胞外钙离子带入胞内)处理红细胞时,增加了胞内钙浓度,使红细胞从双凹圆盘形向棘形改变^[11],同时细胞的表面积也减小^[12]。红细胞在剪切力下变形部分的恢复时间有所减慢^[13],认为胞内钙含量的增加导致红细胞变形性的下降。Tadahiro Oenishi 等^[14]使用一种镍网过滤法研究了红细胞在含有钙的介质中受机械剪切力后变形能力(滤过能力)的变化,验证了红细胞变形能力受两个主要的胞内信号转导系统的调节。他们发现在形态和体积不发生变化的情况下,红细胞变形能力的降低表现出一种依赖细胞外钙浓度的 V 状曲线,并且在 $50 \mu\text{mol/L}$ 处变形能力减少得最多。这与本实验结果相对应。在全血中红细胞的外环境内有钙、钠、钾等离子满足了照射后钙离子向细胞内外的转运条件,但悬浮液中的红细胞不具备此条件。根据本次实验结果的对照可以看出,全血中的红细胞变形能力、膜流动性的改善好于悬浮液中的红细胞可能就是因为激光照射后的红细胞内外钙离子的转运有关。

根据 Karu 对其他细胞的研究^[15],低强度激光可与细胞线粒体的细胞色素作用,促进 ATP 的合成。然而,成熟的红细胞没有线粒体。根据刘承宜等^[4]的研究,认为细胞膜上化学配体的受体可以介导低强度 He-Ne 激光的作用。红细胞的激光受体在受到激光作用后,将启动红细胞内部的信号转导系统,引起细胞内部第二信使如钙离子和 cAMP 浓度的改变,从而调整红细胞的变形性。根据本次实验结果可以看到,在悬浮液中红细胞因为去除了血浆因素的影响,在激光照射后红细胞变形能力、膜流动性仍有很大的改善。这种改善只可能是红细胞本身的物理化学变化。结合刘承宜等在总结低强度激光生物效应的基础上提出的低强度激光的生物信息

假说(BIMI)和激光生物信息转换假说(BITMI),可以对实验结果作出合理的解释同时对以上两种假说提供一定的依据。

细胞表面细胞膜上有许多带电基团,如梭基、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。若血液中的一些蛋白(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,红细胞的聚集,使血液黏度升高。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。图2的结果显示激光照射对全血红细胞电泳率有提高,但在悬浮液中的红细胞的电泳率未发生明显改变,这可能是红细胞在离心分离、清洗中已去除了大量的黏附在红细胞上的蛋白,照射后红细胞的电泳率变化不明显。

5 结 论

研究表明,低强度 He-Ne 激光血液照射改善血液流变性特性是通过改善红细胞膜的结构、对细胞膜的光生物调节、对细胞带电的基团等多方面的影响,是多重共同作用的结果,主要是通过血浆和红细胞本身的综合作用。在这些作用中,低强度激光对红细胞膜的生物调节是占主要作用的。

参 考 文 献

- Han Shuzhen, Fu Jianjun. Clinical observation of low-intensity-laser radiating in nasal cavity in reducing TG and TC [J]. *Chinese J. Synthetical Medical*, 2005, **6**(4):308
韩淑珍,傅健君. 低强度激光鼻腔内照射治疗高血脂症 32 例临床观察[J]. 中华综合医学杂志, 2005, **6**(4):308
- Chen Meihua, Xiao Weimin. The influence of II-LLI therapy on blood rheo-ogical property for hyperlipemia of CVD [J]. *Chinese J. Medical Physics*, 2002, **19**(1):27~32
陈美华,肖为民. II-LLI 对脑血管病合并高粘血症血液流变学的影响[J]. 中国医学物理学杂志, 2002, **19**(1):27~32
- Xiao Xuechang, Guo Yiling, Chu Xiaofan *et al.*. Effects of low power laser irradiation in nasal cavity on cerebral blood flow perfusion of patients with braininfarction [J]. *Chinese J. Physical Medicine and Rehabilitation*, 2005, **27**(7):418~420
肖学长,郭一玲,褚晓凡等. 低强度激光鼻腔内照射对脑梗死患者脑血流灌注的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, **27**(7):418~420
- Li Yan, Jiao Jianling, Liu Chengyi *et al.*. Effects of ketamine in

- combination with 468.7 mJ/cm² He-Ne laser irradiation on proliferation in human skin fibroblasts [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, **31**(4):509~512
李燕,角建瓴,刘承宜等. 氯胺酮对 He-Ne 激光照射促人正常皮肤成纤维细胞增殖作用的影响[J]. 中国激光, 2004, **31**(4):509~512
- Li Yanling, Jiao Jianling, Liu Chengyi *et al.*. Effects of He-Ne laser irradiation combined with salvia miltiorrhiza injection on the respiratory burst of bovine neutrophils [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, **31**(3):381~384
李艳玲,角建瓴,刘承宜等. He-Ne 激光与丹参注射液联用对牛中性粒细胞呼吸爆发的影响[J]. 中国激光, 2004, **31**(3):381~384
 - Yang Xiaohong, Liu Chengyi, Liu Shaoji *et al.*. Photobiomodulation on chondrocyte proliferation: in vitro evaluation [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(12):1692~1698
杨小红,刘承宜,刘少杰等. 软骨细胞光生物调节作用的体外实验[J]. 中国激光, 2006, **33**(12):1692~1698
 - Qiao Xiaoyan, Li Gang, He Bingjun *et al.*. Effects of low level laser irradiation on delayed rectifier potassium current in neuron membrane [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(9):1288~1293
乔晓艳,李刚,贺建军等. 弱激光对神经细胞膜延迟整流钾通道电流特性的影响[J]. 中国激光, 2006, **33**(9):1288~1293
 - Liu Chengyi, Wang Yanfang, Duan Rui *et al.*. Cellular photonic traditional Chinese medicine [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2007, **44**(5):23~29
刘承宜,王艳芳,段锐等. 细胞光子中医学[J]. 激光与光电子学进展, 2007, **44**(5):23~29
 - Chen Min, Luo Qingming. Biological effect of low level laser and its improving action on red blood cell deformability [J]. *Laser Biology Journal*, 2002, **11**(1):55~57
陈敏,骆清铭. 弱激光的生物学效应及对红细胞变形性的改善作用[J]. 激光生物医学, 2002, **11**(1):55~57
 - 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):478~480
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):478~480
 - Fei Liu, Hiroshi Mizukami, Sharada Sarnaik *et al.*. Calcium-dependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy [J]. *Journal of Structural Biology*, 2005, **150**:200~210
 - Tiffany L. Graves, Yi Zhang, John E. Scott. A universal competitive fluorescence polarization activity assay for S-adenosylmethionine utilizing methyltransferases [J]. *Analytical Biochemistry*, 2007, **10**:1016~1027
 - J. G. M. Dobbe, M. R. Hardeman, G. J. Streekstra *et al.*. Analyzing red blood cell-deformability distributions [J]. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2002, **28**(3):373~384
 - Shu Chien. Red cell deformability and its relevance to blood flow [J]. *Ann. Rev. Physiol.*, 1987, **49**:177~192
 - Tiina I. Karu. *The Science of Low Power Laser Therapy* [M]. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers, 1998