

激光和 LED 对酶反应生产神经酰胺的影响

张红雨^{1,2} 郭亚红¹ 李迎新² 张忠太¹ 郭芳¹ 崔洁¹

¹ 山西省肿瘤医院, 山西 太原 030013
² 中国医学科学院北京协和医学院生物医学工程研究所激光医学实验室, 天津 300192

摘要 激光照射对酶活性的影响主要取决于光源的波长和能量。系统研究了激光的波长和能量对酶活性的改变, 并且对激光和发光二极管(LED)是否对酶活性改变具有相同的效果也进行了研究。分别采用能量为 0~810 J/cm², 激光波长分别为 532、808、1064、1342 nm, LED 波长分别为 640 nm 和 810 nm 的激光照射磷脂酶 C, 通过高效薄层层析法(HPTLC)测量经过光源照射 0.5、1、2、3、4、6、17、24 h 后神经酰胺的浓度来研究酶活性的改变。酶活性改变持续时间通过以上实验数据进行评估计算。在一定波长范围内激光和 LED 照射均可以提高磷脂酶 C 的活性, 效果取决于光源的能量和波长, 在经过照射后, 酶活性的改变大约可以持续 4 h。研究结果表明在报道激光照射对酶活性改变的时候, 酶活性改变持续时间应该作为一个主要的激光参数进行声明, 还发现照射时选择波长、能量相同的激光源和 LED, 其对酶活性的改变具有同样的效果。

关键词 医用光学; 酶活性; 激光照射; 神经酰胺; 磷脂酶 C; 水解; 鞘磷脂

中图分类号 TN249; R318.51 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201441.0104001

Effect of Laser and LED on Enzymatic Production of Ceramide

Zhang Hongyu^{1,2} Guo Yahong¹ Li Yingxin² Zhang Zhongtai¹
Guo Fang¹ Cui Jie¹

¹ Shanxi Province Tumor Hospital, Taiyuan, Shanxi 030013, China
² Laser Medicine Laboratory of Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Abstract The influence of laser irradiation on enzyme activity depends on the wavelength and energy of the light. The influence of wavelength and energy on enzyme activity is studied systematically, and whether laser and LED light sources have the same effect on enzyme activity is examined. Phospholipase C is exposed at 0~810 J/cm² of lasers at the wavelength of 532, 808, 1064, 1342 nm and two LED sources at the wavelength of 640 nm and 810 nm respectively, and enzyme responses are evaluated by measuring ceramide concentration using high performance thin-layer chromatography (HPTLC) after irradiation of 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 17, 24 h. The duration of effect is evaluated from the experimental data. The enzyme activity can be increased by using either laser or LED source whose wavelength is located within a certain range, and the effect depends on the energy and wavelength of the light. The increase in enzyme activity continues for about 4 h after irradiation. The result shows that the duration of enzyme activity change should be included as one of the main laser parameters while reporting the effect of laser irradiation on enzymes. Besides, laser sources and LED sources have the same effect on enzyme activity with the same wavelength and absorbed energy.

Key words medical optics; enzyme activity; laser irradiation; ceramide; phospholipase C; hydrolysis; sphingomyelin

OCIS codes 140.3450; 350.3450

1 引 言

激光照射已经广泛应用于细胞学诊断、临床治

疗以及微生物学等方面的研究^[1-4], 激光技术也被广泛应用于各种皮肤病的治疗、新生儿黄疸(高胆红

收稿日期: 2013-07-12; 收到修改稿日期: 2013-08-18

作者简介: 张红雨(1976—), 男, 博士研究生, 主要从事激光医学方面的研究。E-mail: hongyuzhang2008@sina.cn

导师简介: 李迎新(1959—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事激光医学方面的研究。

E-mail: yingxinli2005@aliyun.com (通信联系人)

素症)以及癌症方面的治疗^[5-10]。在过去的几十年里,酶的应用取得了长足的发展,基于酶的各种产品呈现迅速增长的趋势,其在食物、环境、药物学以及化妆品方面扮演着越来越重要的角色。因此,激光技术在酶反应和生物催化方面的应用逐渐成为研究热点。如果在一定强度和波长范围内,激光照射对酶反应有积极的效果,那么激光技术就可以应用于酶反应中,以提高反应速度。就生物学方面研究而言,激光照射对特定的酶反应效果的研究,可以提高激光对整个生物系统影响的理解。然而仅有少量文献描述了激光对特定的酶反应的影响,Murakami等^[11]采用 1547 nm 的激光对特定酶进行热处理,发现其对酶活性具有毁灭性的影响,从而使其失去活性,而飞秒激光以及脉冲紫外波段的激光却不影响蛋白的整体性。Chen 等^[12]研究了紫外波段的激光功率对乳酸脱氢酶(LDH)酶活性的影响,发现来自牛心的 LDH 酶被波长 300 nm , 能量 3.6~18 kJ/m² 的激光照射处理后,LDH 酶活性降低和紫外波段的激光功率成一定的比例。然而,这些影响的机理仍然不清楚,尚需进一步深入研究。

本文评估了激光技术在酶反应中的应用潜力,尤其是在鞘磷脂(SM)水解生产神经酰胺的反应中。采用不同波长的激光和 LED,对 SM 水解生产神经酰胺反应中酶活性的影响进行研究,对一些参数诸如功率、能量等进行优化。

2 材料和方法

神经酰胺[图 1(a)]是所有鞘脂类的关键中间代谢产物,由于其维持表皮吸水特性的特性,使得其在头发和皮肤护理的化妆品应用中具有巨大的商业价值^[13-14]。然而化学方法合成神经酰胺是一个既费时又耗财的过程^[15]。因此寻找一种性价比高,且产量高的生产方法逐渐成为当下的研究热点。SM 是动物细胞膜中普遍存在的一种成份,也是一种来自牛奶的主要磷脂类物质。在 SM 中,神经酰胺分子通过磷酸二酯键和胆碱基团链接[图 1(b)]。通过 SM 水解反应生成神经酰胺已经被系统地研究并且对反应参数进行了优化^[16],磷脂酶 C(PLC)应用于该水解反应中。

参考物 SM、神经酰胺以及磷脂酶 C 从 Sigma-Aldrich Denmark A/S(Copenhagen, Denmark) 购买。反应底物 SM 采用牛奶碱性水解反应从 Lacprodan PL-75 纯化而来(Arla Foods Amba, Viby J. Denmark)^[17]。标准品以及其他化学试剂

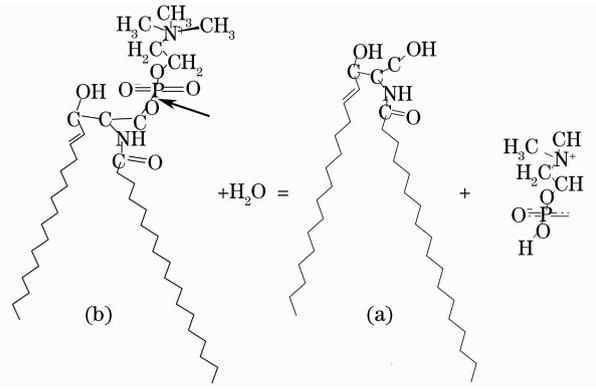


图 1 水解反应结构示意图。(a) 神经酰胺;(b) SM (箭头所指为生产神经酰胺时鞘磷脂所要断开的键)

Fig. 1 Diagram of hydrolysis reaction structures. (a) Ceramide; (b) SM (arrow indicates the bond to be cleaved in SM for producing ceramide)

均为分析纯级。

实验过程中,酶反应的反应条件参考文献[18], SM 溶液(0.4 mg/mL,乙酸乙酯:己烷=50:50,体积比), 37 °C 下超声振荡器(Bie & Berntsen, Rødovre, Denmark)震荡 5 min 使其充分溶解。底物溶液(200 μL)由加样枪移入玻璃试管中(直径 0.9 cm,高度 7.4 cm),反应从加入 12 μL 酶溶液开始 [0.026 mg/mL, 0.01 mol/L Tris buffer (pH 8.6),含酒精 25%]。反应试管采用试管帽密封在室温下以 200 r/min 水平震荡,在反应进行到 10 min 时,100 μL 混合物(取自有机相)分离出来,-20 °C 保存以备后期分析使用。为了研究水解反应随时间变化的趋势,在 0~480 min 之间的不同时间点均进行实验。

照射过程,将一定量的酶溶液、底物分别装入一个小试管(直径 0.9 cm,高度 7.4 cm),然后在室温下采用不同光源进行照射(640 nm 和 810nm LED, 532,808,1064,1342 nm 激光)。光源均由丹麦技术大学物理系友情提供(图 2),为了保证均匀照射,在照射过程中开启振荡器(200 r/min)。

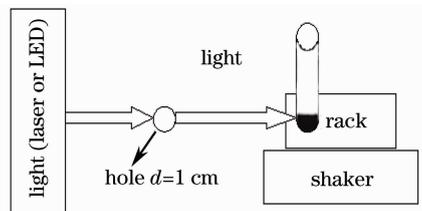


图 2 反应装置示意图

Fig. 2 Diagram of reaction device

5 种照射条件:1) 空白对照酶和底物均无激光照射;2) 在反应前激光单纯照射底物;3) 在反应前

激光单纯照射酶溶液;4)在反应过程中激光照射底物和酶溶液的混合物;5)在反应前分别照射底物和酶溶液,然后再混合。

神经酰胺浓度按照文献[19]描述的采用高效薄层层析法(HPTLC)进行定量测量。HPTLC板(Silica gel 60, E. Merck, Darmstadt, Germany)需要在水平展开室(Camag, Muttenz, Switzerland)经过预洗,展开剂为氯仿/甲醛混合液,体积比2:1,并且HPTLC板需要再经过120℃高温活化30 min。标准品以及样品通过DESAGA AS30 HPTLC Applicator(Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht, Germany)加样,等待平衡并且采用庚烷:异丙醇:乙酸混合液(体积比85:15:1)在展开室展开。HPTLC板经过烘干,喷洒炭化剂(10%硫酸铜与8%磷酸混合,质量分数)直到被淋湿,接着通过在160℃加热6 min使得可以看见脂类物质。点样的强度可以通过DESAGA CD60 HPTLC Densitometer(Sarstedt Ag & Co)在390 nm处采用吸光/反光模式进行测定。每一种脂类的质量可以根据在同一板上标准品的曲线(图3),由软件DESAGA ProQuant(1.03.200, Sarstedt Ag & Co)计算得出。由于需要控制反应时间为10 min,为确保反应速度是初始反应速度,以反应速度来表示酶活性的改变,用10 min后神经酰胺浓度来表示($\mu\text{g}/\text{mL}$),初始反应速度以神经酰胺除以反应时间来得到。



图3 HPTLC扫描板

Fig. 3 HPTLC scanning plate

统计学分析数据以均值±标准差表示($n=3$),卡方检验用来评价统计学差异, $p<0.05$ 。

3 结果

激光照射可以有效提高酶的活性。激光照射影响酶反应的(图4)主要是通过对酶活性的影响来实现。从图4中可以看出,与激光照射底物、在反应中采用激光照射以及不采用激光照射相比,反应前采用激光照射酶溶液可以最大程度地实现对酶活性的

改变,且差别具有统计学意义($p<0.01$, $p<0.05$, $p<0.05$)。然而同反应前分别照射底物和酶溶液相比,其差别不具有统计学意义($p>0.05$)。单独照射底物SM与激光照射反应混合物具有相同的效果,其差别也不具有统计学意义($p>0.05$)。结果表明激光照射不仅可以改变酶的活性,而且可以改变底物的反应活性。但是,在照射混合物的过程中,酶和底物均可以接收到来自照射光源的能量,使得酶分子和底物分子处于激发态,从而变得不稳定,因此酶和底物分子不能充分接触,反而导致反应被阻止,所以激光对反应混合物(酶和底物的混和溶液)的照射具有相反的作用。

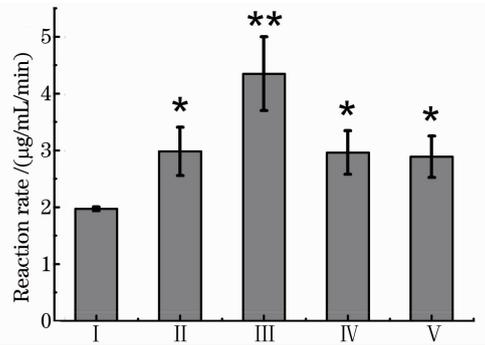


图4 激光照射对酶反应的影响

Fig. 4 Effect of laser irradiation on the enzymatic reaction

能量大小是酶的活性提高的一个关键因素。基于上面的结果,反应前照射酶溶液对改变酶反应具有最明显的效果,因此,在后面的实验中,均采用反应前对酶溶液进行照射。这种效果可能是由于激光照射可以使酶分子达到一种激发态,在这种状态下,酶分子可以以更高的速率催化酶反应。为了验证这

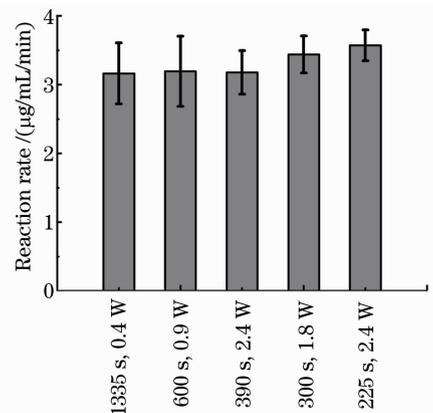


图5 波长808 nm的激光,不同功率,同样能量条件下的反应速度

Fig. 5 Reaction rates at the same energy and different power intensities using an 808 nm laser

种理论,对酶溶液进行照射处理时,采用相同的能量,但是照射时间和功率参数是不同的,能量按照功率乘以照射时间来计算。当采用 808 nm 激光照射酶溶液时,能量为 540 J,在一定范围内,无论功率和照射时间如何变化,其对酶活性的改变保持不变(图 5),5 种照射方法中任何两种相比,其差别并不具有统计学意义($p>0.05$)。另外,其他变量保持不变,能量不同的情况下对酶活性的改变进行了研究(图 6)。结果显示在一定能量范围内,酶活性的提高与能量成一定比例,然而超出一定范围后,即使增加照射能量,酶活性也不会再发生任何改变。

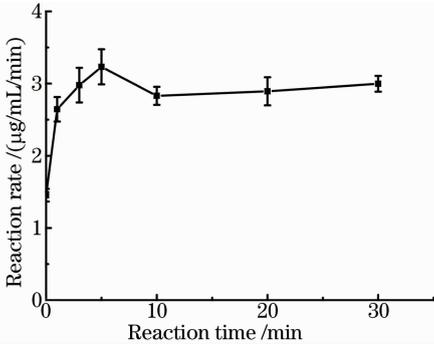


图 6 波长 808 nm 激光不同照射时间对反应速度的影响
Fig. 6 Reaction rates at different irradiation times using an 808 nm laser

希望在许多酶的应用中,激光技术可以应用于提高酶的反应速度。因此,对 SM 水解生成神经酰胺反应的时间曲线进行了研究,在反应前对酶溶液采用 808 nm 激光(功率 900 mW,照射时间 10 min)做相应的照射处理,结果如图 7 所示。与没有经过激光照射相比,反应前激光照射酶溶液可以在反应初期明显提高反应速度($p<0.05$)。随着反应时间的延长,两种实验之间的区别逐渐减小。在 4 h 和 6 h 的时候,两者之间的反应速度差别不具有统计学意义

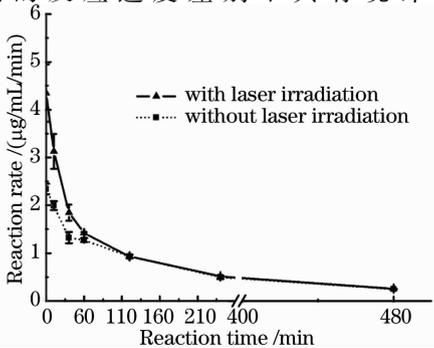


图 7 经过激光照射处理和无激光照射处理的酶对水解反应的影响随时间变化曲线
Fig. 7 Time curves of the hydrolysis reactions catalyzed by the enzyme with and without laser irradiation

($p>0.05$)。通过分析,在反应前对酶溶液进行照射处理,其对酶反应的影响主要是通过直接激活酶活性来实现。理论上,足量的酶并不会改变反应的热动态平衡,诸如酶活性改变对反应最终的产物产量并没有任何影响。这就解释了为什么上面两种反应在水解反应结束时,其反应速度没有明显差异。

关于激光照射处理酶的大部分文献,并没有对激光照射后其对酶活性的影响持续时间进行过报道。假如激光技术将来应用于工业规模的生产时,酶活性改变的持续时间是一个关键因素。因此,在对激光激活酶活性后,其持续时间进行了进一步研究。实验结果表明,磷脂酶 C 经过 808 nm 激光(900 mW,照射时间 10 min)照射处理后,其对酶活性的提高明显高于其他的处理方法(图 4)。当磷脂酶 C 经过上述方法处理后,分别在 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 17.0, 24.0 h 时,酶溶液和底物混合进行反应,目的是为了检测酶活性改变的持续时间。图 8 所示的酶保存时间长短对其活性的影响曲线可以看出,酶活性的提高在 4 h 时达到顶峰,之后逐渐降低,在 6 h 后恢复到初始活性状态。

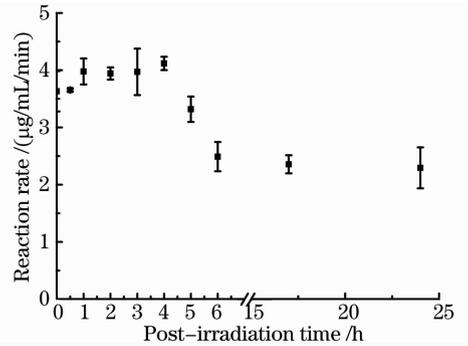


图 8 激光照射处理后酶保存时间长短对其活性的影响

Fig. 8 Effect of storage time of the enzyme treated by laser irradiation on its activity

如果能量是一样的,810 nm LED 和 808 nm 激光对酶活性的影响基本上也是一样的。就能量消耗来说,由于 LED 比激光更经济适用,在大规模生产中 LED 可能会更具有潜力。然而,仅有少数的小组做了 LED 照射对酶活性影响的研究。因此,对 LED 和激光对酶活性的影响是否具有相同的效果进行了研究,同时对 LED 能量大小是如何影响酶活性也进行了研究。结果如表 1 所示,当照射能量分别是 0, 270, 540, 810 J 时,808 nm 激光和 810 nm LED 具有相同的效果($p>0.05$)。

表1 相同能量条件下采用激光器和LED对反应速度的影响

Table 1 Reaction rate with enzyme irradiated by laser and LED with the same energy

Energy /J		0	270	540	810
Reaction rate	808 nm laser	2.47±0.06	3.36±0.23	4.99±0.48	5.00±0.48
/($\mu\text{g}/\text{mL}/\text{Min}$)	810 nm LED	2.47±0.06	3.43±0.19	4.62±0.37	4.62±0.26

另外,图5说明LED和激光照射对酶活性的影响主要取决于照射能量。此结果对于只有在酶获得一定能量时,其酶活性才会发生改变理论假设提供了很好的支持,称这个能量值为能量阈值。假设宏观水平酶活性的改变可以通过微观水平酶分子的状态来评估。当酶分子从激光或者LED照射中获得能量后,其能量状态从基态激发到了激发态。然而,由于激发态不稳定,酶分子具有回到基态的趋势。当从激发态返回到基态的酶分子数量与从基态激发到激发态的分子数量相等时,达到动态平衡(饱和状态)。当从LED和激光照射获得的能量低于酶的能量阈值时,处于激发态的酶分子较少,体现在宏观水平就表现为酶活性提高并不明显,反之,当接收到的能量等于或大于酶的能量阈值时,酶分子被充分激发到激发态,达到饱和状态,酶活性改变达到最大水平。当酶分子继续接收大于能量阈值的能量后,由于酶分子已经处于饱和状态,所以酶活性并不能进一步被提高。这种理论假设与实验结果一致。为了进一步验证这种理论假设,在接下来的实验中,分别采用532 nm激光、640 nm LED代替640 nm激光、808 nm激光、810 nm LED、1064 nm激光以及1342 nm激光。图9表明在一定能量水平时,波长640、808、810 nm的光源可以明显提高酶活性,然而对于波长532、1064、1342 nm的激光,却不能明显提高酶活性,暗示着这些波长的光源不能影响磷脂酶C的活性。对于808 nm激光和810 nm LED对磷脂酶C活性的改变进行比较,发现其差别并不具

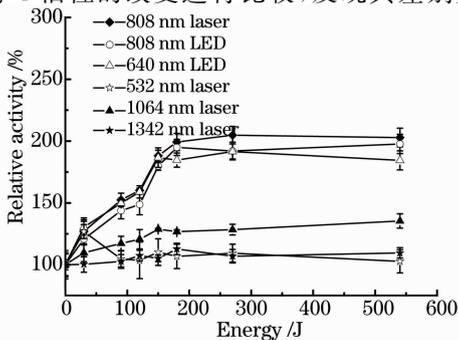


图9 不同波长激光和LED,不同能量条件对酶活性的影响

Fig. 9 Effect of laser and LED with different wavelengths and different energies on activity of enzyme

有统计学意义($p>0.05$)。

纵轴表示相对活性,按照公式 $\beta = \frac{C_1}{C_0} \times 100\%$

计算,其中 C_1 表示经过光照射处理后酶的反应速度, C_0 表示没有经过光照射处理酶的反应速度。

很明显,光照射对PLC活性(其催化SM水解生成神经酰胺)的影响主要取决于波长。与这个结论相对应的研究结果如图10所示,选择不同的波长的光源,但是能量均为540 J,提供了不同波长的光源照射对酶活性的影响。结果表明波长的选择也可能是光照射改变酶活性的一个潜在影响因素。

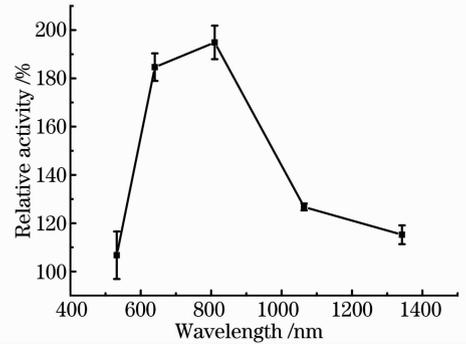


图10 540 J能量条件下不同波长激光照射对酶活性的影响

Fig. 10 Effect of laser irradiations with different wavelengths at 540 J energy on activity of enzyme

4 讨 论

实验结果表明,在水解反应前以及反应过程中,当PLC经过一定波长的激光或者LED照射后,可以显著提高反应速度。实验数据验证了只有在一定波长范围内,一定能量水平时才可以提高酶活性的理论。Yan等^[20]对于低强度激光对小鼠血清中一氧化氮(NO), β 内啡肽以及一氧化氮合酶(NOS)的影响进行了研究,实验结果表明532、632.8、650 nm的激光(3 mW,60 min照射时间)可以显著提高血清中NOS的活性, β 内啡肽浓度在经过532 nm激光照射后也明显增高。但是842 nm以及1300 nm激光对于血清中的NO,NOS以及 β 内啡肽浓度却没有明显的影响^[20]。这些结果支持关于磷脂酶C所得出的结论。Silva等^[21]研究了904 nm的GaAlAs激光对酶活性影响,得出的结论为理想的激光能量

参 考 文 献

范围约 $0.1 \sim 0.5 \text{ J/cm}^2$, 在这个范围内对酶活性的影响最大。在 Kujawa 等^[22]的工作中, 对人体红细胞或者分离的细胞膜在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, 经过低强度激光 (810 nm , $10 \sim 400 \text{ mW}$, $3.75 \sim 25 \text{ J/cm}^2$) 照射处理后的变化进行了研究。有人发现近红外的低强度激光可以改变细胞膜离子泵的三磷酸腺苷 (ATP) 酶活性, Kilańczyk 等^[23]应用 670 nm 激光 (能量剂量分别为 $19.1, 38.2, 57.3, 76.4, 95.5 \text{ J/cm}^2$) 研究其对 ATP 酶活性的影响, 发现以上所有能量剂量的激光均可以导致酶活性不同程度的升高。然而在有 ZnPc 存在的地方, 钠离子、钾离子 ATP 酶活性却出现降低。这与研究结果相一致, 尤其是能量剂量方面, 其研究所应用的能量剂量大于 ATP 酶的能量阈值, 因此导致激光采用的虽然只有 670 nm 的激光, 但是所有的能量剂量均可以影响 ATP 酶的活性。关于 ATP 酶的更多研究工作^[24], 比如采用 685 nm 激光 (35 mW , $4 \sim 50 \text{ J/cm}^2$), 照射 ATP 酶, 在 $4 \sim 24 \text{ J/cm}^2$ 能量剂量时, ATP 酶活性没有任何改变, 然而, 当能量剂量为 $32 \sim 40 \text{ J/cm}^2$ 时, ATP 酶活性可以提高 28% ; 当能量剂量超过 50 J/cm^2 时, ATP 活性不会有任何额外的提高。这就意味着当能量剂量在 $32 \sim 40 \text{ J/cm}^2$ 时, 可以影响 ATP 酶的活性, 超出这个范围后, 对于 ATP 活性的改变没有任何效果。这与本文得出的结论部分一致。

采用不同波长的光源研究其对 PLC 活性的影响, 发现最佳的波长为 808 nm 。由于 532 nm 绿光的光子能量大于红光 (640 和 808 nm), 可以推测绿光可能比红光更适合提高 PLC 的活性, 但是这个并没有被证实。通过实验, 发现红光可以明显提高 PLC 的活性, 然而绿光却不可以。因此, 推测激光波长必须在一定范围内才可以, 超出这个范围后, 其将不会影响酶的活性。正如上述文献中描述的一样, 选择精确的波长范围取决于酶的种类。

5 结 论

采用不同波长光源照射, 对 PLC 活性的影响做了深入的系统研究, 证明了在通过 SM 水解反应生成神经酰胺的反应中, 光照射确实是一种切实可行的提高酶活性的方法。结果表明一定波长范围内 ($532 \sim 1342 \text{ nm}$) 的光源照射可以明显提高酶的活性, 其对酶活性的影响主要取决于光源的能量和波长。PLC 在经过光源照射后, 活性提高可以持续大约 4 h , 这些结果为将来在工业中应用和更进一步发展提供了有价值的信息。

- 1 R Polansky, M Haas, A Heschl, *et al.*. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis[J]. *J Clin Periodontol*, 2009, 36(7): 575–580.
- 2 S Tumilty, S McDonough, D A Hurley, *et al.*. Clinical effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to eccentric exercise for the treatment of Achilles' tendinopathy: a randomized controlled trial[J]. *Arch Phys Med Rehabil*. 2012, 93(5): 733–739.
- 3 Sun Ying, Zhang Xuepeng, Liu Wei. Effect of low energy ALA-PDT on angiogenesis and glioma growth in brain[J]. *Chinese J Lasers*, 2012, 39(8): 0804001.
孙影, 张雪鹏, 刘巍. 低能量 ALA-PDT 对脑组织新生血管形成及胶质瘤生长的影响[J]. *中国激光*, 2012, 39(8): 0804001.
- 4 Zhang Meiping, Wang Xiaohua, Shan Yongjie, *et al.*. Effects of He-Ne laser and enhanced ultraviolet-B radiation on the isozymes gene expression of wheat seedlings[J]. *Chinese J Lasers*, 2011, 38(5): 0504002.
张美萍, 王小花, 陕永杰, 等. He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对小麦幼苗同工酶基因表达的影响[J]. *中国激光*, 2011, 38(5): 0504002.
- 5 E Tierney, A Barker, J Ahdout, *et al.*. Photodynamic therapy for the treatment of cutaneous neoplasia, inflammatory disorders, and photoaging[J]. *Dermatol Surg*, 2009, 35(5): 725–746.
- 6 P Agostinis, K Berg, K A Cengel, *et al.*. Photodynamic therapy of cancer: an update[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(4): 250–281.
- 7 R J Bensadoun, R G Nair. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of cancer therapy-induced mucositis: 2012 state of the art based on literature review and meta-analysis [J]. *Curr Opin Oncol*, 2012, 24(4): 363–370.
- 8 C Migliorati, I Hewson, R V Lalla, *et al.*. Systematic review of laser and other light therapy for the management of oral mucositis in cancer patients[J]. *Support Care Cancer*, 2013, 21(1): 333–341.
- 9 B Zhao, Y Y He. Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010, 10(11): 1797–1809.
- 10 Li Bin, Chen Gang, Zhang Yuanfang, *et al.*. Photodynamic effect of novel photosensitizer chlorophyllin f on bladder cancer T24 cells[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(1): 0117002.
李斌, 陈刚, 张元芳, 等. 新型光敏剂叶绿素 f 对人膀胱癌 T24 细胞的光动力杀伤作用[J]. *光学学报*, 2012, 32(1): 0117002.
- 11 S Murakami, M Kashii, H Kitano, *et al.*. Effect of laser irradiation on enzyme activity[J]. *Jpn J Appl Phys*, 2005, 44(11): 8216–8218.
- 12 E P Chen, P G Söderberg, A D MacKerell, *et al.*. Inactivation of lactate dehydrogenase by UV radiation in the 300 nm wavelength region[J]. *Acta Ophthalmologica*, 1933, 71(s208): 185i–191i.
- 13 Y C K Kenkyusho. Mass Preparation of Ceramide From Fishes and Shells at Low Costs-Comprises Extracting Sphingomyelin or Ceramide 2-Aminoethyl Phosphonate and Eliminating Phosphonic Acid[P]. 1995, Japan Patent 7265089-A.
- 14 J W H Smeets, R M D Pater, J W J Lambers. Enzymatic Synthesis of Ceramides and Hybrid Ceramides[P]. 1997, US Patent 005610040A.
- 15 E Rochlin. Process for Large-Scale Preparation of Sphingosines and Ceramides[P]. 2002, US Patent 646,9148B1.
- 16 L Zhang, L I Hellgren, X B Xu. Enzymatic production of ceramide from sphingomyelin[J]. *J Biotechnol*, 2006, 123(1): 93–105.
- 17 L Zhang, S Liang, L I Hellgren, *et al.*. Phospholipase C-catalyzed sphingomyelin hydrolysis in a membrane reactor for

- ceramide production[J]. *J Membr Sci*, 2008, 325(2): 895—902.
- 18 L Zhang, L I Hellgren, X B Xu. Kinetic study of sphingomyelin hydrolysis for ceramide production[J]. *J Mol, Catal B; Enzym*, 2008, 51(3): 93—99.
- 19 H Muller, L L Hellgren, E Olsen, *et al.*. Lipids rich in phosphatidylethanolamine from natural gas-utilizing bacteria reduce plasma cholesterol and classes of phospholipids: a comparison with soybean oil[J]. *Lipids*, 2004, 39(9): 833—841.
- 20 Yan Chenzhong, Fan Daping, Zhao Xiaoyu, *et al.*. Biological effects of intravascular low level laser irradiation with five different wavelengths[J]. *Appl Laser*, 1998, 18(2): 86—88.
颜晨钟, 樊大平, 赵晓宇, 等. 五种波长低强度激光血管内照射的生物学效应[J]. *应用激光*, 1998, 18(2): 86—88.
- 21 N S Da Silva, J W Potrich. Effect of GaAlAs laser irradiation on enzyme activity[J]. *Photomed and Laser Surg*, 2009, 28(3): 431—434.
- 22 J Kujawa, L Zavodnik, I Zavodnik, *et al.*. Effect of low-intensity (3.75-25 J/cm²) near-infrared (810 nm) laser irradiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure[J]. *J Clin Laser Med Surg*, 2004, 22(2): 111—117.
- 23 E Kilańczyk, D Pałecz, M Bryszewska. Effect of red laser light on Na⁺, K⁺-ATPase activity in human erythrocyte membranes sensitized with Zn-phthalocyanine[J]. *J Clin Laser Med Surg*, 2002, 20(2): 71—75.
- 24 H L Santos, C F Rigos, A C Tedesco, *et al.*. Biostimulation of Na, K-ATPase by low-energy laser irradiation (685 nm, 35 mW): comparative effects in membrane, solubilized and DPPC:DPPE-liposome reconstituted enzyme[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2007, 89(1): 22—28.

栏目编辑: 韩峰