

飞秒激光对人类细胞内钙信号的调控作用

王艺森 贺号* 王清月

(天津大学精密仪器与光电子工程学院 光电信息技术科学教育部重点实验室超快激光研究室, 天津 300072)

摘要 飞秒激光以其独特和优良的光学性质,为生物光子学的研究带来了全新的研究领域和技术手段。在细胞和分子生物学的研究中,飞秒激光可以精确地在亚细胞或衍射极限水平上对细胞实现精确的刺激和操作。对于飞秒激光调控人类细胞内钙信号这一全新的现象进行了回顾和综述,讨论了飞秒激光释放细胞钙存储的可能机制,分析了飞秒激光释放细胞钙信号的物理和生理过程,在细胞生物学和分子生物学的水平上探讨了细胞对飞秒激光刺激的应激反应可能的原理,并阐述了由此而来的一系列后续分子和生理过程。这种纯光学的分子信号调节对于相关细胞信号通路的研究具有重要意义,并有望进一步应用于基于飞秒激光的基因表达调节和干细胞分化的研究。

关键词 生物光学;超快光学;飞秒激光;钙离子;活性氧簇;细胞

中图分类号 Q63 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP50.080011

Calcium Signal Modulation of Human Cells by Femtosecond Laser

Wang Yisen He Hao Wang Chingyue

(*Ultrafast Laser Laboratory, Key Laboratory of Optoelectronic Information Technology
(Ministry of Education), College of Precision Instrument and Optoelectronics Engineering,
Tianjin University, Tianjin 300072, China*)

Abstract By their unique and excellent optical properties, femtosecond lasers have brought novel developments and methodologies in biophotonics researches. In researches of cell and molecular biology, femtosecond lasers can perform precise stimulations and operations to cells at the subcellular or diffraction limit level. In this article, calcium signal modulation in human cells by femtosecond lasers is reviewed, possible mechanism of optical release of cellular calcium store is discussed, and physical and physiological processes of the release are analyzed. The hypothesis of cellular responses to femtosecond lasers is investigated at cellular and molecular level, with demonstrations of following molecular and physiological processes. This all-optical modulation of molecular signals is very important to the researches of cellular signaling pathways, which can be further applied in optical regulation of gene expression and stem-cell differentiation.

Key words biotechnology; ultrafast optics; femtosecond laser; calcium ion; reactive oxygen species; cells

OCIS codes 170.7160; 320.7120; 170.1530

1 引言

飞秒激光特别是光子晶体光纤飞秒激光技术的发展^[1-2],给生物光子学的研究带来了全新的研究角度和技术手段^[3-6]。超短的飞秒脉冲使得人类首次可以对生物样本实现在时间分辨上达到飞秒量级的无创式精确激发,特别地,飞秒脉冲内超高的峰值功率使得光与物质的相互作用以非线性过程为主,这种相互作用的有效范围仅仅是非线性区域,使得空间分辨率突破了衍射极限而达到了百纳米量级,在相关的生物研究中

收稿日期: 2013-06-13; 收到修改稿日期: 2013-06-26; 网络出版日期: 2013-07-22

基金项目: 国家 973 计划(2010CB327604)、国家自然科学基金(61108080)、教育部高校博士点专项科研基金新教师基金(20110032120057)

作者简介: 王艺森(1988—),男,博士研究生,主要从事基于飞秒激光的生物光子学方面的研究。

E-mail: wangyisen@tju.edu.cn

导师简介: 王清月(1938—),男,教授,主要从事飞秒激光技术及其应用方面的研究。E-mail: chywang@tju.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: haohe@tju.edu.cn

具有非常高的空间精度和生物安全性^[7-8]。从 20 世纪 90 年代开始,人们已经开始利用飞秒激光的非线性过程用于细胞成像的荧光非线性激发。基于飞秒激光的多光子成像以及多种利用飞秒激光非线性特性的特殊成像方式已经在细胞和分子生物学研究中取得了很大进展^[9]。

进入 21 世纪以来,利用飞秒激光对细胞的精确手术和离子调控也取得了很大进展。飞秒激光的长脉冲间隔和波长对于生物样品较为安全,可以对生物样品进行较长时间的照射,因此在衍射极限精度的精密细胞手术以及转基因、细胞生理过程和骨架的研究、细胞融合、神经组织再生、分子信号调控等多领域都得到了很好的结果^[10-11],例如,基于飞秒激光的非线性成像^[12]是基因表达、基因调控、癌症检测等分子水平生物研究的最为重要有效的手段;飞秒激光转基因技术首次使得生物大分子,如核糖核酸(RNA)、一些特殊的蛋白质等被转染到细胞内成为可能^[13],通过这项技术,人们可以有效地研究一些特殊疾病的机理,控制干细胞分化,控制诱导细胞变种,生产单克隆抗体等,这将在癌症治疗、干细胞科学等领域实现突破。

因此,飞秒激光这种技术手段打开了前所未有的生物光子学研究的新局面,人们可以在细胞内的任意一个时空点进行精确的刺激,将复杂的细胞生命过程在空间和时间上清晰地解析出来,并可控地加以诱导和控制,从而使很多对于基因、癌症以及细胞生物学的研究不仅摆脱了传统生物化学手段的限制,而且具有了革命性的技术手段和研究角度,为进一步深刻研究探索生命科学中的新问题、新现象提供了可能。

本文着重探讨了飞秒激光在细胞内离子信号调控方面的进展。在传统的生化研究中,人们只能使用传统的生物化学试剂对细胞内的离子进行调节,在时间、空间精度和安全性上都存在很多问题,限制了相关亚细胞水平的分子和细胞生物学的研究。飞秒激光为无接触地精确调控细胞离子信号提供了一种全新的方法。本文介绍了飞秒激光对于细胞内钙信号精确调控这个全新的现象,分析了相关的物理过程和细胞生理过程。通过一系列飞秒激光脉冲在衍射极限范围内释放出一定的钙离子,这些钙离子会由于其浓度、飞秒激光对细胞的损伤等因素放大,并最终引发一系列特定的生理过程。这种细胞钙存储的调节对于多种生理过程,如基因转录与表达、细胞发育、凋亡、细胞信号传导等具有重要的作用。

2 钙在细胞内的作用与存储

几乎所有的生命活动都受到钙信号的调控,包括细胞水平上细胞功能的实现,以及生命组织个体水平上的生理活动,如细胞分裂、细胞凋亡、免疫反应、信号转导、肌肉伸缩及人类的思考与行为过程^[14]。在神经系统和脑科学中,钙信号作为最重要的信号传导途径,已经形成独立的重要研究领域。例如在脑科学的研究中,通过对海马体内神经元的动态观测发现,钙离子可参与形成长期记忆的过程^[15-16]。钙信号对于发育也具有非常重要的调节作用,比如人类受精卵可能由于激素或者生长因子的刺激导致细胞内 1,3,5 三磷酸肌醇(IP₃)的变化,从而形成一定振荡形式以及持续达数小时的钙信号,这些钙离子可以与相关的酶系统作用并启动细胞生长的相关程序。其他生物过程如细胞增殖、凋亡、分化也都会有钙信号的参与,并且在这些生理活动中钙信号可以呈现保持、放大、闪烁、振荡等多种变化形式。

钙信号对基因表达的调控作用是调控细胞生命活动的核心。钙离子可以引发必要的信号分子转移到核内并激活特定基因,也可以激活特定转录子的表达,又或者钙离子本身直接激活细胞核内特定基因表达^[17]。例如钙离子可以调节钙调磷酸酶的活性,进而影响和激活转录因子的迁移变化^[18],从而达到调控基因表达的目的。钙离子在细胞质与细胞核上的位置不同以及浓度变化也会对基因的表达有着不同的影响^[19]。更加复杂的是,由细胞内钙信号形成的振荡以及振荡的频率构建而成的钙信号编码,对于特定基因的表达无论是在表达效率上还是在选择针对性上都有着重要影响^[20-21]。

在一个正常的细胞中,对应于不同的生理信号刺激,钙离子的升高主要有两种途径,一种是释放细胞内的钙存储^[22-24],另一种是由于细胞内外本身具有的钙浓度差,通过打开细胞膜上的相关通道引起细胞外钙离子的内流^[25-27]。在细胞内,内质网由于具有很大的膜面积以及存储能力,可作为一个理想的储存钙的细胞器。在细胞膜和内质网等膜结构上,有很多钙通道,调节控制细胞内的钙释放和钙水平。比如肌浆网钙三磷酸腺苷(ATP)酶(SERCA)^[28-29]可以作为钙泵,将细胞质内游离的钙离子转移到内质网中存储,同时消耗一定能量。与此相对应的,细胞膜上也存在着质膜钙 ATP 酶(PMCA),可以把细胞质内的钙转移至胞外。而钙的释放可以通过钙通道蛋白 1,4,5-三磷酸肌醇受体(IP₃R)^[30]、兰诺定受体(RyR)^[31]、烟酸腺嘌呤二核

昔酸磷酸受体(NAADPR)^[32]等来进行,如图1所示。

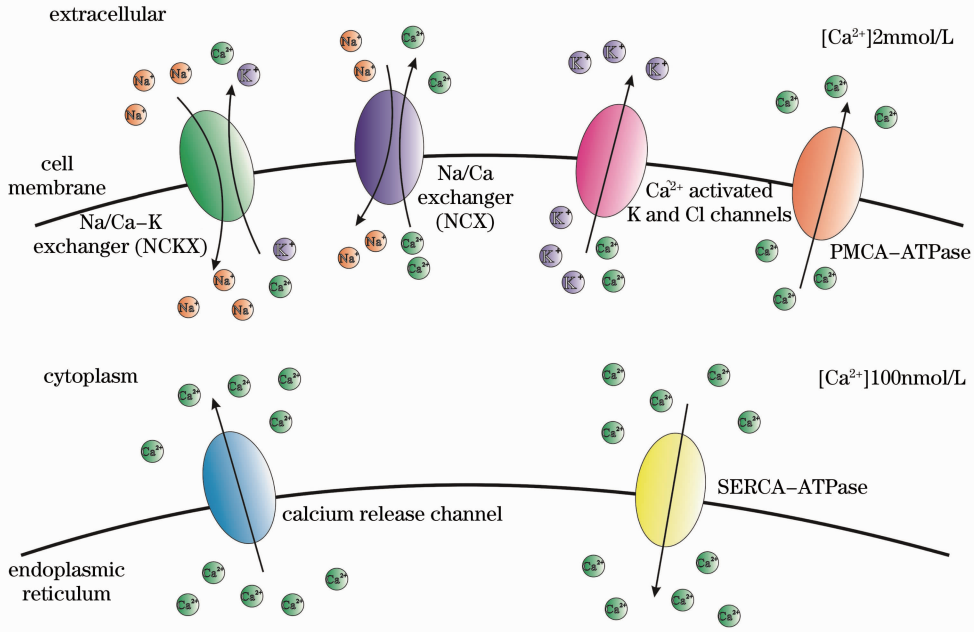


图1 细胞膜结构上的钙通道示意图

Fig. 1 Schematic diagram of calcium channel on the membrane structure

这种钙信号存储调节模式对于细胞的生理活动具有重要意义。当存在外界信号例如特定的生长因子、荷尔蒙、或者神经递质的刺激时,会导致在细胞膜上磷脂酶 C(PLC)催化磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸(PIP₂)水解产生 IP₃^[33-34],IP₃从细胞膜扩散到细胞质,与相应受体 IP₃R 相结合,打开内质网上的钙释放通道,使钙离子释放到细胞质中。在细胞内,除了内质网,其他细胞器比如线粒体、高尔基体也会充当储存钙、调控胞内钙浓度的角色。在内质网释放钙的过程中,胞内增加的钙离子会被线粒体所吸收^[35-37],并且会被返回到内质网中,或由 SERCA、PMCA 等钙泵把钙转移到细胞外或内质网中。如果钙释放导致细胞质内钙释放过快或浓度过高,超过线粒体负载钙的能力,这种平衡便会崩溃,线粒体膜电势会去极化,释放出一系列信号物质而导致细胞走向凋亡^[38-39]。调节细胞钙内流的钙通道主要是两类:一类是细胞膜上的电压调控的钙通道(VOC)^[40]、受体调控的钙通道(ROC)^[41],使得胞外钙在特定的条件下流入细胞内;另一类是钙存储调控的钙通道(SOC),近些年来钙释放激活钙通道(CRAC)被广泛报道^[42-44],相关的分子机制得到了比较透彻的研究。CRAC可以在内质网上的钙存储降低时被激活,而其中最重要的传感分子是基质交感分子 1 (STIM1)^[45]单次跨膜蛋白,它能够感测内质网中钙离子的浓度,进而把钙离子浓度降低的信息传递给细胞膜上的蛋白 Orail^[46],进而打开 CRAC 通道^[47-48]。也有一些研究表明,抗凋亡分子 Bcl-2 也可以通过定位在内质网上导致钙离子释放^[49]。

除了在细胞器内有钙的存储,近期有些研究表明细胞核也是一个重要的储存钙、参与钙信号传导的重要场所^[50]。细胞核膜是将细胞核完全包覆的双层膜,这种结构在某些地方融合形成膜孔复合体(NPC),允许小于 9 nm的粒子自由地通过,而水中的钙离子半径约为 0.4 nm,因此钙离子可以很容易地进入。有的观点认为,钙离子是否能够通过 NPC 是受核状态决定的,当 ATP 增加或者核膜钙存储下降的时候会增加 NPC 的通透性。此外,细胞核区域内也存在着与内质网对应的结构^[51-52],可以认为这种核质网是内质网向核浆区域的延伸(事实上,这种核质网结构更像是核膜向核内形成的凹陷,所以这种网状或管状结构也可以看成是与内质网连接一体的,其内部是细胞质,包括线粒体),并存在与在内质网相似的钙通道,例如 IP₃R,RyR 等^[53-54]。细胞核中的 IP₃、烟酸腺嘌呤二核苷酸磷酸(NAADP)等分子将核膜和核质网上的 IP₃R、RyR 受体激活后,可以向细胞核内释放钙^[55-56]。所以从细胞膜结构上看,细胞核内钙离子的浓度变化是与细胞质相关联的,但信号关联相对来说比较弱,所以一些研究也依然认为细胞核内单独存在钙离子的传导机制。核膜可以作为一种储存钙的场所^[57],并且也有 RyR,IP₃R^[58]等钙离子通道。细胞内钙存储与调节机制如图 2 所示。

综上所述,细胞内钙调节的生理过程如表 1 所示。

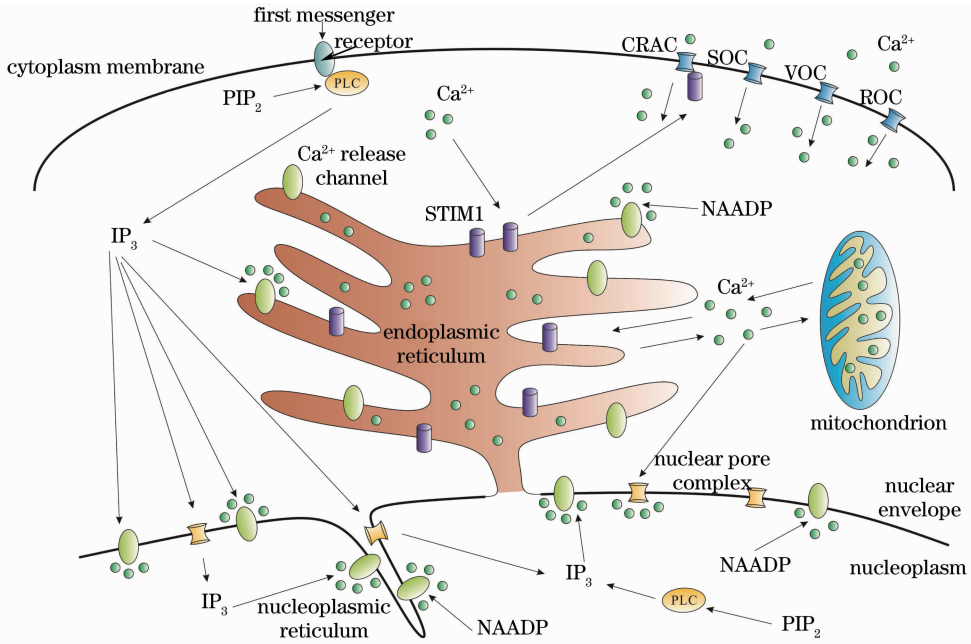


图 2 细胞内钙存储与调节示意图

Fig. 2 Schematic diagram of intracellular calcium storage and modulation

表 1 细胞内钙调节的生理过程

Table 1 Physiological processes regulated by cellular calcium

Protein	Function
Ca ²⁺ ATPase	Calcium pump on membrane
Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger	Exchanging Ca ²⁺ for Na ⁺ across the plasma membrane
Ca ²⁺ activated K ⁺ channel	Participating in membrane hyperpolarization
Calmodulin	Modulating multifold protein kinases and metabolism
Calcineurin	Phosphatase
Inositol phospholipid-specific PLC	Modulating IP ₃ and diacylglycerol
IP ₃ receptor	Releasing cellular calcium
Ryanodine receptor	Releasing cellular calcium
Protein kinase C	Participating in multifold cellular signaling
Troponin	Modulating muscle contraction
Caldesmon	Modulating muscle contraction
cAMP	Regulating enzymatic activity and metabolism
CAMKII	Regulating multifold physiological processes
NAD	Producing NADP
PI3K	Participating in cellular signaling
Annexin	Participating in vesicle transportation and activity related to calmodulin
...	...

3 飞秒激光释放细胞内钙信号的物理和生物机制

由于钙离子参与了几乎所有的细胞生命过程,因此对细胞内和细胞间的钙信号进行精确可控的调节,对于相关的生命科学研究具有非常重大的意义。传统的生化方法比如使用 IP₃ 刺激或强制打开、关闭膜结构上的钙通道,在时间上不太利于短时间的精确控制,在空间上也难于实现在亚细胞的范围内对钙离子的精确调控,同时也有可能产生对细胞其他生理过程、信号传导失控的影响,因此限制了对于钙信号调节过程的进一步研究。而飞秒激光由于其独特的高时空分辨率,可以有效地对生物样本进行精细控制,并且不接触生物

体、没有毒副作用,可作为一种洁净安全的全新研究手段^[59]。

飞秒激光与细胞相互作用主要有两类过程:热效应和非线性效应^[60]。热效应由两个因素决定:单个脉冲内的热产生和多个脉冲间的热累积。其中单个脉冲产生热主要包括线性吸收和非线性吸收,线性吸收由波长决定,非线性吸收由脉冲的峰值功率密度决定;而脉冲之间的热叠加则取决于脉冲之间的时间间隔、聚焦紧致程度以及热扩散速度。可以通过调节脉冲的波长、重复频率、平均功率来影响热效应的程度。在近红外波段,如果将脉冲重复频率降低到 1 MHz 以下,由于两个脉冲的时间间隔较长,加之很短的脉冲宽度,脉冲之间的热作用积累可以忽略不计。而在紧致聚焦的条件下(通常认为数值孔径 $NA > 1$),脉冲引起的热扩散效应也被束缚在很小的范围,对周围环境影响很小。非线性效应有以下可能的过程:多光子吸收激发,谐波产生,以及强场电离。由于细胞环境类似于水,自由电子较少,形成的等离子体密度较低,而当光子密度足够高时,其电场强度可以使得电子势垒产生较大的弯曲,因此飞秒激光作用于细胞时产生等离子体主要通过强场导致的隧穿电离,其热产生则取决于自由电子密度。通过调节飞秒激光脉冲的峰值功率的大小可以有效控制对生物组织或细胞的破坏程度。在实际实验过程中,一般认为飞秒激光脉冲峰值处的光子密度高于 10^{12} W/cm² 时,聚焦椭球内区域以非线性过程为主,可以产生约 10^{17} cm⁻³ 量级的自由电子。而远离焦点的区域,光子密度会发生显著的下降,飞秒激光几乎全部透射过去而不发生任何相互作用。因此在空间上飞秒激光与生物组织的相互作用将会被限制在一个很小的非线性区域,达到亚衍射极限的水平。聚焦飞秒激光脉冲的时域、空域和非线性过程如图 3 所示。

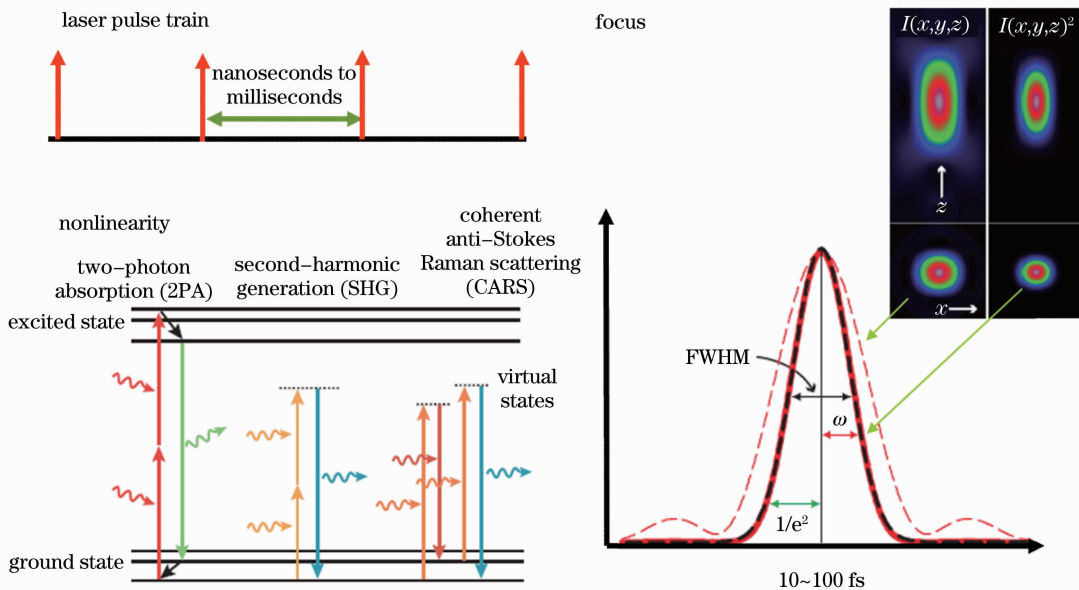


图 3 聚焦的飞秒激光脉冲时域、空域及非线性过程示意图

Fig. 3 Schematic diagram of focused femtosecond laser in time, space domain and the nonlinear course

基于这种作用机制,近年来的研究发现飞秒激光可以安全、可控地对细胞内钙信号进行释放。这个现象首先在 2001 年由 Smith 等^[61]发现。他们将脉宽 140 fs、平均功率 30 mW、波长 780 nm 的飞秒激光通过 60 倍、数值孔径 0.9 的显微物镜聚焦在单个 HeLa 细胞进行 0.5 s 的曝光,胞内钙离子用 Fluo-4/AM 进行染色标记,预处理 30 min 后进行观察,发现了飞秒激光能触发单个细胞的钙水平升高,并且能够引发相邻细胞间的钙信号传递。随后,在 2003 年, Echevarría 等^[51]利用飞秒激光的二次谐波,在细胞内通过谐波光子的解笼锁过程来释放钙。实验中将钛宝石输出的 860~920 nm 的飞秒激光先倍频到 430~460 nm,然后对含有笼锁钙的细胞进行激发。实现光解与 NPE(Nitrophenylethyl ester)结合的 IP₃ 分子所对应的单光子吸收光波长最大值为 260 nm,因此倍频钛宝石激光在 NPE 分子上再次产生二次谐波的波长为 215~230 nm,可以实现光解笼锁释放 IP₃ 分子而释放钙。这种对钙的释放方式使得人类首次分别在细胞质和细胞核这样的亚细胞(亚微米)和毫秒量级的精确时空精度上对细胞内钙信号进行调节,研究钙信号在亚细胞水平上的扩

散、传输和对细胞的影响等过程,发现了细胞核释放钙可以导致核中蛋白激酶 C(PKC)迁移至核膜,然而细胞质中钙释放可以导致 PKC 迁移至细胞膜,进而证明了细胞核与细胞质相互独立的钙释放机制以及信号传导过程。2006 年,Iwanaga 等^[62]发现对细胞不同位置进行曝光释放钙信号和细胞内钙增长的机制也不同。当激光曝光在细胞核、细胞质、细胞膜上时,观察到的细胞钙响应也不同。通过在培养基中加入钙离子整合剂 EGTA 与在普通培养基条件下培养的细胞进行对比,他们提出了三种飞秒激光释放钙的可能机制:1)飞秒激光导致细胞膜物理性损伤,钙离子从胞外流向胞内;2)由飞秒激光对细胞膜的某种损伤或刺激,使得钙通道的通透性收到了某种影响,导致钙离子从培养基中流入细胞内而使胞内钙增加,或由曝光位置产生的冲击波的直接物理损伤刺激致使钙增加;3)由飞秒激光直接引起细胞内钙存储区的破坏导致钙的释放。在后续的研究中,通过改变光参数或者更换不同种类的细胞,此项研究在技术上得以进一步地细化。同年,他们的工作表明,用飞秒激光对 PC12 细胞进行激发,也可以触发钙信号,并且与 HeLa 细胞相同,曝光的平均功率越大,越容易引起钙信号的释放。将飞秒激光在细胞神经突的某一位置进行曝光,发现在 PC12 细胞中钙信号会沿着神经突向曝光点的两侧传播,一个方向可以传导至细胞体附近,另一个方向传播到神经突末端^[63]。利用飞秒激光光放钙的典型实验装置如图 4 所示。图 5(a)给出飞秒激光作用不同时间后钙释放的情况。

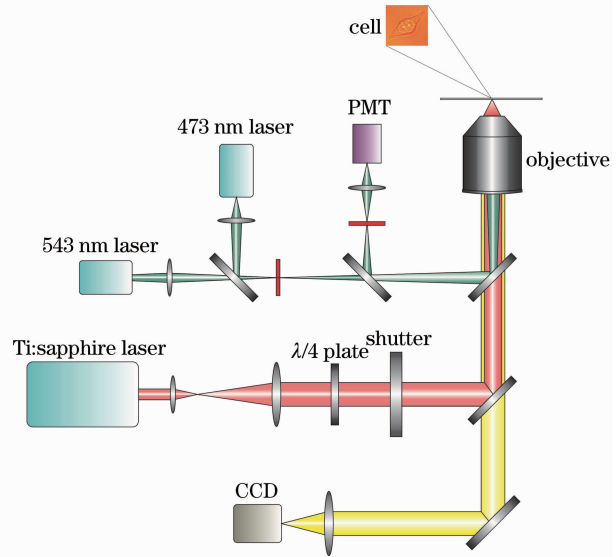


图 4 利用飞秒激光释放钙的典型实验装置
Fig. 4 Typical experimental setup for release of cellular calcium by femtosecond laser

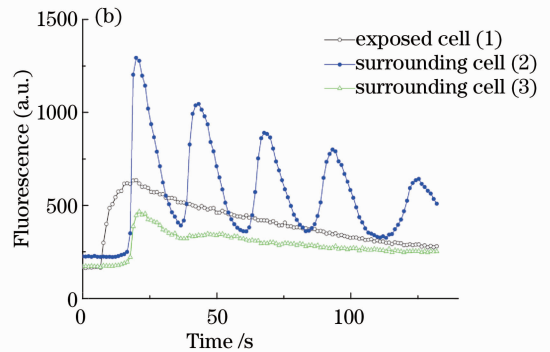
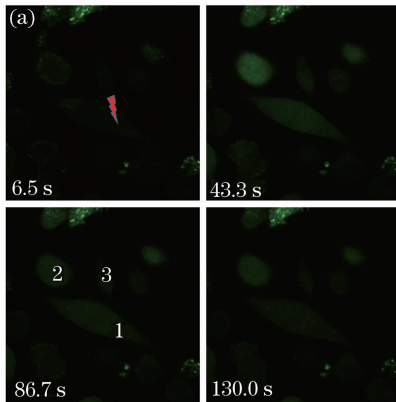


图 5 (a)飞秒激光在细胞内释放钙;(b)不同细胞的钙信号

Fig. 5 (a) Calcium triggered by femtosecond laser; (b) calcium signals in different cells

飞秒激光激发的钙释放以及钙传播是与光脉冲的重复频率相关的。维持脉冲能量不变,在 10~100 kHz 量级的重复频率下,能够产生钙信号的脉冲数量要远大于在 1 MHz 量级产生同等钙信号所需的脉冲数,至于脉冲光产生钙信号是否依赖于重复频率,存在一个阈值,在阈值之上,钙的产生与重复频率相关,而在阈值之下,钙产生与重复频率的相关性比较小,并且胞内钙信号的传播速度也与重复频率相关,100 MHz 量级飞秒激光引起的钙传播速度要大于在 100 kHz 量级时钙传播速度^[64]。当然,对于飞秒激光,平均功率、重复频率和单脉冲能量无法让仅仅一个参数变化而其余参数不变,这种重复频率的对比并不严格,仅有一定参考价值。2010 年,He 等^[65]使用飞秒激光发现细胞内的钙大部分存储于细胞质,而细胞核储存相对少的钙,并且从这两部分释放的钙可以互相渗透、互相影响。在细胞凋亡初期,细胞核内会有线粒体向内迁移以降低核内的钙水平。有报道提出飞秒激光引起的胞内钙浓度升高是与培养基环境相关的,在正常培养基条件下胞内钙浓

度与胞外钙浓度相差大于 4 个数量级,而飞秒激光可以造成细胞膜的穿孔造成胞外钙内流,这种对于胞外钙的吸收很大程度上依赖于飞秒激光的重复频率以及照射时间,内质网是储存钙的区域,光聚焦在恰当的位置可以导致钙水平迅速升高^[66],在有些细胞如肌细胞或内皮细胞中,钙引起的钙释放(CICR)^[67-68]可以产生或增强胞内钙的聚集。这些研究表明,飞秒激光使得亚细胞水平上的精确地释放、调节、测量钙信号等相关研究成为可能,基于这些发现,飞秒激光可以进一步地应用于钙信号参与的生物信号链路的调控中。

钙信号不仅能在被曝光的细胞中产生,在周围的细胞内也可以观察到钙离子浓度的升高,并且呈现一定形式的钙振荡,如图 5(b)所示。对于非应激性细胞,这是一种非常特别的现象。2006 年,Day 等^[69]发现在用飞秒激光实现对目标细胞的钙释放的同时,其相邻细胞不仅也会有钙释放,而且会有钙振荡。在被飞秒激光刺激的 HeLa 细胞周围,可以有多种振荡规律,比如以峰值增大或峰值减小的趋势振荡,持续数分钟,也可以只出现一次钙信号的闪烁,周围细胞钙信号的闪烁可以提前或滞后于被刺激细胞的钙闪烁。这种细胞间钙信号传播的行为主要受 ATP 调节,当在培养基中加入 ATP 受体阻断剂之后,便观察不到这种细胞间钙信号的传播行为^[70]。

4 飞秒激光对神经元和星形胶质细胞的钙释放

早在 20 世纪 80 年代,已经有研究将激光作用到神经系统中^[71],并在随后的研究中广泛地应用于神经科学领域^[72-74]。2008 年,华中科技大学研究组将飞秒激光应用于神经细胞的钙释放,观察并分析了神经细胞中的钙信号的释放和细胞间互相传播的特点,取得了一系列重要的研究成果。飞秒激光作用于神经元,被刺激的细胞周围的神经元也会观察到钙信号的变化,而刺激周围的神经元,之前被刺激的神经元也会有钙信号的变化,这种现象说明,神经元的信号是相互影响的,利用这种光学刺激、光学探测的方法可以构建出神经网络功能上的拓扑结构^[75]。将飞秒激光作用于星形胶质细胞,可引起细胞的钙水平升高,被刺激细胞周围也会观测到钙信号,并伴有振荡现象^[76]。改变飞秒激光的功率,可以发现被刺激细胞的钙信号升高以及周围钙信号振荡的强度是与飞秒激光的强度相关的。将星形胶质细胞与神经元混合培养,在一定刺激功率以及曝光时间下,刺激一个星形胶质细胞,不仅能在星形胶质细胞之间观察到钙信号的传播,神经元也会有钙信号响应,并且随着与被刺激细胞间距的增加,周围细胞的响应时间也相应加长^[77]。

飞秒激光释放细胞内钙存储的物理和生物过程目前依然尚未完全阐明,大致有三种主要猜想。1)当飞秒激光聚焦于细胞时会造成细胞膜的穿孔,而细胞外培养基的钙离子浓度远大于细胞内钙离子浓度,因此胞外钙可以通过穿孔引发胞内钙离子浓度升高,同时这些钙离子又可以引发 CICR 机制,从而进一步导致钙离子浓度的变化;2)内质网是细胞内储存钙的主要场所,飞秒激光聚焦于内质网可以造成对内质网的物理破坏,导致大量钙离子释放,同时线粒体等其他细胞器也是钙储存的场所,飞秒激光可以使这些细胞结构遭到破坏,从而引起细胞内钙离子浓度的变化;3) Ca^{2+} 、 IP_3 等可以与一些化学物质形成笼锁化合物,当飞秒激光作用于细胞时,由于其非线性作用,形成的高能量的光子可以导致这些笼锁化合物的解锁,形成自由的分子或离子,这些分子或离子可与细胞内的其他分子或蛋白质受体发挥作用,进一步导致细胞内钙离子浓度的升高。而这些机制在细胞内又不是单一存在的,飞秒激光引起细胞内钙增加的诸多物理生物机制可以是并存并相互影响的,如图 6 所示。另外,细胞质细胞核之间、细胞器之间的钙释放与调控也会相互作用,因此无论是在时间上还是空间上,关于飞秒激光引起细胞钙离子变化的具体机制还有待进一步深化研究。

基于上文所述,飞秒激光经物镜聚焦于细胞特定位置时可以触发此局部区域内的钙释放,并且释放量与飞秒激光参数有关,通常来讲激光峰值功率越高、曝光时间越长,对细胞的物理伤害就越大,而释放钙离子相应地就越多。另外脉冲重复频率、波长、聚焦程度都可以对钙离子的释放产生影响。多种细胞器参与此过程,内质网是储存钙的主要场所,也是光触发钙的主要作用对象,较高浓度的钙离子可以引起细胞内钙存储区释放更多的钙,从而维持胞内较高的钙水平。线粒体在胞内钙增加量较少的情况下可以通过 ATP 能量支持的 $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换通道吸收过量的钙,维持细胞内正常的低钙水平。调节飞秒激光的作用参数,可以产生被刺激细胞的钙振荡,也可以在较长时间内维持细胞的高钙水平。因此,飞秒激光在技术上可以较为精确地调节控制细胞内的钙水平,利用飞秒激光可研究多种细胞内的钙信号的变化,进而深入控制细胞钙信号链路和生理过程,影响和控制相应的细胞反应和生理活动。

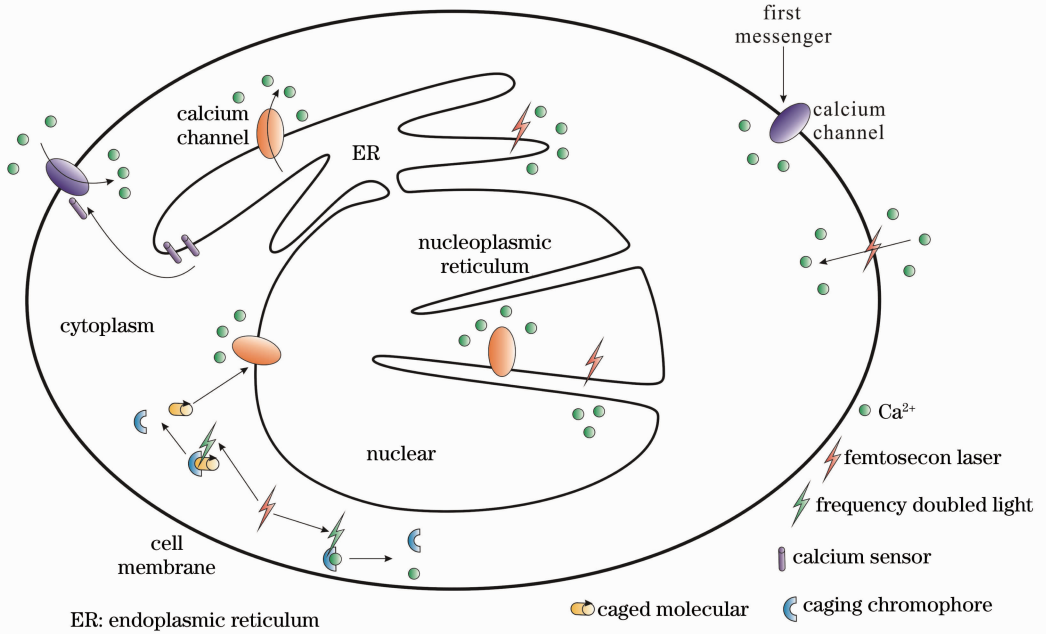


图6 飞秒激光释放钙示意图

Fig. 6 Schematic diagram of calcium released by femtosecond laser

5 光调钙信号触发的后续细胞生理过程

5.1 对线粒体的影响:活性氧簇的释放

细胞内的分子传导是广泛联系的,飞秒激光触发钙信号会同时引起细胞其他信号的变化,并且会伴随着复杂的后续信号传导。在细胞内,与钙相互影响相互调节最重要的一类信号分子是活性氧簇(ROS)。ROS是需氧细胞代谢过程中产生的一系列含氧的副产物,主要由线粒体在呼吸作用的电子传输链释放,包括超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、一氧化氮(NO)等。在分子层面,ROS可以破坏脱氧核糖核酸(DNA)、RNA,也可以氧化氨基酸、多重不饱和脂肪酸以及特定的酶。在生理层面,ROS与癌症的产生、炎症、细胞凋亡、细胞增殖、癌症的治疗有着密切的联系。当光与细胞内生的特定分子比如黄素、辅酶NADPH相互作用时就会有ROS的产生^[78]。

细胞中钙离子与ROS是密切联系的。当细胞质中的钙浓度升高时,一部分钙离子会沿着分别位于线粒体外膜(OMM)和线粒体内膜(IMM)上的电压依赖性阴离子通道(VDAC)和单向转运体(Uniporter)通道进入线粒体,激活线粒体内钙敏感的基质脱氢酶(CSMDH),增加线粒体内ATP,促进呼吸作用,产生ROS。细胞质中的钙离子和ROS进入线粒体时也会导致线粒体膜电势(MMP)以及线粒体膜通透性转运孔(PTP)的变化,这些变化又会使ROS进一步释放从而形成钙引起ROS释放以及ROS引起ROS释放(RIRR)的机制。ROS在一定程度上也可以调节SERCA、 IP_3R 、RyR以及这些通道相关蛋白的活性,从而调剂钙离子浓度。在此基础上,高钙水平会刺激呼吸作用从而进一步加速钙释放。

飞秒激光直接释放ROS也有大量报道^[79-80],主要产生机理是热效应的积累以及飞秒激光导致的自由电子产生^[81]。ROS的产生对于细胞既有正面作用又有负面作用:在细胞保持正常浓度下的ROS时,它可以调节如RyR等 Ca^{2+} 离子通道的活性^[82]、调节心肌细胞中的钙信号^[83]、调控基因表达^[84]等;当细胞内ROS过量时,可引起细胞衰老、凋亡以及坏死^[85-86],也可以导致诸如神经退行性变、癌症等疾病^[87]。飞秒激光飞秒激光对线粒体的直接破坏也可导致ROS的释放。

5.2 多种信号链路与凋亡

除了钙释放,飞秒激光会对细胞造成一系列复杂的影响,引起多种信号和生理活动的激活。在极端的情况下,飞秒激光对细胞的强物理损伤可以使得细胞直接死亡,也可以由于过量的飞秒激光刺激引起细胞内的钙和ROS水平过高引起凋亡过程。飞秒激光相对的弱刺激引起的信号链路目前研究较少,一般认为它与

连续的低能量激光照射(LPLI)^[88]对细胞的影响是相似的。华南师范大学研究组在此领域进行了大量的研究, LPLI也可以引起细胞内钙离子升高、ROS升高、线粒体膜电势变化等生理变化。LPLI通常作用于蛋白激酶C(PKC)、外周信号调节激酶(ERK)、血管内皮生长因子(VEGF)等信号蛋白来执行生物效应。

5.3 激光进一步调节钙信号及多种细胞生理过程

由于飞秒激光可以引起细胞内钙离子、活性氧簇等第二信使的释放,而这些第二信使可以参与到下游的酶类、DNA、RNA、转录因子以及相关蛋白分子的传导,进一步可以定性甚至定量地调控细胞生长、细胞凋亡、基因表达、干细胞分化等生理过程。从这个层面来说,飞秒激光为我们带来了一种全新的探究生物问题的角度,并且可以精细地揭示一些特定分子事件的过程。这将是飞秒激光深入研究生命科学问题,特别是与细胞生物学、分子生物学进一步深入结合的主要方向。

6 结束语

飞秒激光可以在衍射极限的空间尺度和极短的时间尺度上对细胞内的钙存储进行精确的释放调节。在飞秒激光作用过程中,飞秒脉冲的超高峰值对应的光子密度起到了决定性的作用,刺激细胞释放出钙存储。在这个阶段,多种细胞钙调节机制、钙通道、钙库以及细胞器都参与了这个过程,其物理和生物机制都非常复杂,使得飞秒激光释放钙的机制目前依然尚未阐明。这种激光释放细胞钙的过程与传统的生化方法完全不同,不需要任何生物化学试剂材料的参与,并且对细胞相对安全,因此为相关细胞内钙信号的研究提供了全新的技术手段。这种思路对于相关钙调节细胞过程的研究和控制也同样具有重要意义。

飞秒激光以其优良的时空分辨率、便于操控、清洁无污染、多参数可调谐等特点在生物光子学这一领域取得了一定的进展,对于一些用传统办法难于观测或难于操控的生物过程可以在一定程度上发挥激光的优势并加以解决。利用飞秒激光,可以对单细胞进行穿孔、细胞融合、转基因、靶向蚀除特定细胞器、研究神经组织的再生性质,也可以在分子水平上相对定量地调控如 Ca^{2+} 、ROS等分子以及下游DNA、蛋白分子的传导过程。除此之外,飞秒激光还在众多科学领域诸如脑神经科学、干细胞科学、蛋白质组学、多光子成像、超分辨显微等领域都有着很好的应用前景,有待于从各个角度进一步加深理论与应用的研究。

参 考 文 献

- 1 Liu Bowen, Hu Minglie, Song Youjian, *et al.*. Photonic crystal fiber femtosecond laser amplifier with millijoules and 100 fs level output [J]. Chinese J Lasers, 2010, 37(9): 2415-2418.
刘博文, 胡明列, 宋有建, 等. 微焦耳、百飞秒光子晶体光纤飞秒激光放大器[J]. 中国激光, 2010, 37(9): 2415-2418.
- 2 Wang Qingyue, Hu Minglie, Song Youjian, *et al.*. Large-mode-area photonic crystal fiber laser output high average power femtosecond pulses [J]. Chinese J. Lasers, 2007, 34(12): 1603-1606.
王清月, 胡明列, 宋有建 等. 用大模场光子晶体光纤获得高功率飞秒激光 [J]. 中国激光, 2007, 34(12): 1603-1606.
- 3 R L Fork, B I Greene, C V Shank. Generation of optical pulses shorter than 0.1psec by colliding pulse mode locking [J]. Appl Phys Lett, 1981, 38(9): 671-672.
- 4 S Lefrançois, K Kieu, Y Deng, *et al.*. Scaling of dissipative soliton fiber lasers to megawatt peak powers by use of large-area photonic crystal fiber [J]. Opt Lett, 2010, 35(10): 1569-1571.
- 5 Zhang Zhenxi, Yao Cuiping, Wang Jing, *et al.*. Development and application of the laser cell microsurgery [J]. Acta Optica Sinica, 2011, 31(9): 0900124.
张镇西, 姚翠萍, 王 晶, 等. 激光细胞微手术的发展和应 用 [J]. 光学学报, 2011, 31(9): 0900124.
- 6 Yang Haifeng, Zhou Ming, Di Jianke, *et al.*. Applications of femtosecond laser surgery in cell biology [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2009, 46(10): 71-77.
杨海峰, 周 明, 狄建科, 等. 飞秒激光手术在细胞生物学中的应用 [J]. 激光与光电子学进展, 2009, 46(10): 71-77.
- 7 U K Tirlapur, K König. Targeted transfection by femtosecond laser [J]. Nature, 2002, 418(6895): 290-291.
- 8 M F Yanik, H Cinar, H N Cinar, *et al.*. Functional regeneration after laser axotomy [J]. Nature, 2004, 432(7019): 822.
- 9 M Stroh, W R Zipfel, R M Williams, *et al.*. Multiphoton microscopy guides neurotrophin modification with poly(ethylene glycol) to enhance interstitial diffusion [J]. Nature Mater, 2004, 3(7): 489-494.
- 10 S H Chung, E Mazur. Surgical applications of femtosecond lasers [J]. J Biophoton, 2009, 2(10): 557-572.
- 11 H He, K T Chan, S K Kong, *et al.*. All-optical human cell fusion by a fiber femtosecond laser [J]. Appl Phys Lett, 2008,

- 93(16): 163901.
- 12 W R Zipfel, R M Williams, W W Webb. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences [J]. *Nature Biotechnol*, 2003, 21(11): 1369–1377.
- 13 A Uchugonova, K König, R Bueckle, *et al.*. Targeted transfection of stem cells with sub-20 femtosecond laser pulses [J]. *Opt Express*, 2008, 16(13): 9357–9364.
- 14 M J Berridge, M D Bootman, P Lipp. Calcium- a life and death signal [J]. *Nature*, 1998, 395(6703): 645–648.
- 15 H Bito, K Deisseroth, R W Tsien. Ca^{2+} -dependent regulation in neuronal gene expression [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 1997, 7(3): 419–429.
- 16 S T Wong, J Athos, X A Figueroa, *et al.*. Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP [J]. *Neuron*, 1999, 23(4): 787–798.
- 17 J Meldolesi. Calcium signalling: oscillation, activation, expression [J]. *Nature*, 1998, 392(6679): 863–866.
- 18 T Tomida, K Hirose, A Takizawa, *et al.*. NFAT function as a working memory of Ca^{2+} signals in decoding Ca^{2+} oscillation [J]. *EMBO J*, 2003, 22(15): 3825–3832.
- 19 G E Hardingham, S Chawla, C M Johnson, *et al.*. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression [J]. *Nature*, 1997, 385(6613): 260–265.
- 20 R E Dolmetsch, K Xu, R S Lewis. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression [J]. *Nature*, 1998, 392(6679): 933–936.
- 21 W Li, J Llopis, M Whitney, *et al.*. Cell-permeant caged InsP3 ester shows that Ca^{2+} spike frequency can optimize gene expression [J]. *Nature*, 1998, 392(6679): 936–941.
- 22 M J Berridge. Inositol trisphosphate and calcium signalling [J]. *Nature*, 1993, 361(6410): 315–325.
- 23 M Endo. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum [J]. *Physiol Rev*, 1977, 57(1): 71–108.
- 24 D E Clapham. Calcium signaling [J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1047–1058.
- 25 T Hofmann, V Chubanov, T Gudermann, *et al.*. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca^{2+} -activated monovalent selective cation channel [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(13): 1153–1158.
- 26 B Nilius, J Prenen, G Droogmans, *et al.*. Voltage dependence of the Ca^{2+} -activated cation channel TRPM4 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(33): 30813–30820.
- 27 D E Clapham. TRP channels as cellular sensors [J]. *Nature*, 2003, 426(6966): 517–524.
- 28 M Brini, D Bano, S Manni, *et al.*. Effects of PMCA and SERCA pump overexpression on the kinetics of cell Ca^{2+} signaling [J]. *EMBO J*, 2000, 19(18): 4926–4935.
- 29 C Olesen, M Picard, A L Winther, *et al.*. The structural basis of calcium transport by the calcium pump [J]. *Nature*, 2007, 450(7172): 1036–1042.
- 30 I F Smith, I Parker. Imaging the quantal substructure of single IP_3R channel activity during Ca^{2+} puffs in intact mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(15): 6404–6409.
- 31 C Hidalgo, R Bull, M I Behrens, *et al.*. Redox regulation of RyR-mediated Ca^{2+} release in muscle and neurons [J]. *Biol Res*, 2004, 37(4): 539–552.
- 32 S Patel, J S Marchant, E Brailoiu. Two-pore channels: regulation by NAADP and customized roles in triggering calcium signals [J]. *Cell Calcium*, 2010, 47(6): 480–490.
- 33 I P Hall. Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle [J]. *Eur Respir J*, 2000, 15(6): 1120–1127.
- 34 M R Logan, C A Mandato. Regulation of the actin cytoskeleton by PIP2 in cytokinesis [J]. *Biol Chem*, 2006, 98(6): 377–388.
- 35 T E Gunter, L Buntinas, G Sparagna, *et al.*. Mitochondrial calcium transport: mechanism and functions [J]. *Cell Calcium*, 2000, 28(5-6): 285–296.
- 36 A K Stout, H M Raphael, B I Kanterewicz, *et al.*. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake [J]. *Nature Neurosci*, 1998, 1(5): 366–373.
- 37 Y Kirichok, G Krapivinsky, D E Clapham. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel [J]. *Nature*, 2004, 427(6972): 360–364.
- 38 E Norberg, S Orrenius, B Zhivotovsky. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(1): 95–100.
- 39 K F Ferri, G Kroemer. Organelle-specific initiation of cell death pathways [J]. *Nature Cell Biol*, 2001, 3(11): E255–E263.

- 40 S J Publicover, C L R Barratt. Voltage-operated Ca^{2+} channels and the acrosome reaction; which channels are present and what do they do [J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(4): 873–879.
- 41 C D Benham, R W Tsien. A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle [J]. *Nature*, 1987, 328(6127): 275–278.
- 42 C Peinelt, M Vig, D L Koomoa, *et al.*. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai 1) [J]. *Nature Cell Biol*, 2006, 8(7): 771–773.
- 43 R M Luik, B Wang, M Prakriya, *et al.*. Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 538–542.
- 44 B A McNally, A Somasundaram, M Yamashita, *et al.*. Gated regulation of CRAC channel ion selectivity by STIM1 [J]. *Nature*, 2012, 482(7384): 241–245.
- 45 X Yang, H Jin, X Cai, *et al.*. Structural and mechanistic insights into the activation of stromal interaction molecule 1 (STIM1) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(15): 5657–5662.
- 46 X Hou, L Pedi, M M Diver, *et al.*. Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai [J]. *Science*, 2012, 338(6112): 1308–1311.
- 47 D E Clapham. A STIMulate package puts Orai calcium channels to work [J]. *Cell*, 2009, 136(5): 814–816.
- 48 C Y Park, P J Hoover, F M Mullins, *et al.*. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1 [J]. *Cell*, 2009, 136(5): 876–890.
- 49 F V Abeele, R Skryma, Y Shuba, *et al.*. Bcl-2-dependent modulation of Ca^{2+} homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells [J]. *Cancer Cell*, 2002, 1(2): 169–179.
- 50 M D Bootman, C Fearnley, I Smyrniak, *et al.*. An update on nuclear calcium signaling [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(14): 2337–2350.
- 51 W Echevarría, M F Leite, M T Guerra, *et al.*. Regulation of calcium signals in the nuclear by a nucleoplasmic reticulum [J]. *Nature Cell Biol*, 2003, 5(5): 440–446.
- 52 H He, K T Chan, S K Kong. Role of nuclear tubule on the apoptosis of HeLa cells induced by femtosecond laser [J]. *Appl Phys Lett*, 2010, 96(22): 223701.
- 53 P Marius, M T Guerra, M H Nathanson, *et al.*. Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum [J]. *Cell Calcium*, 2006, 39(1): 65–73.
- 54 S H Yoo, S W Nam, S K Huh, *et al.*. Presence of a nucleoplasmic complex composed of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor/ Ca^{2+} channel, chromogranin B, and phospholipids [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(25): 9246–9254.
- 55 J Gerasimenko, Y Maruyama, A Tepikin, *et al.*. Calcium signalling in and around the nuclear envelope [J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31(1): 76–78.
- 56 G Ramazzotti, I Faenza, R Fiume, *et al.*. The physiology and pathology of inositide signaling in the nucleus [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 226(1): 14–20.
- 57 O V Gerasimenko, J V Gerasimenko, A V Tepikin, *et al.*. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from the nuclear envelope [J]. *Cell*, 1995, 80(3): 439–444.
- 58 J P Humbert, N Matter, J C Artault, *et al.*. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(1): 478–485.
- 59 N Nishimura, C B Schaffer, B Friedman, *et al.*. Targeted insult to subsurface cortical blood vessels using ultrashort laser pulses; three models of stroke [J]. *Nature Methods*, 2006, 3(2): 99–108.
- 60 V Kohli, A Y Elezzabi, J P Acker. Cell nanosurgery using ultrashort (femtosecond) laser pulses; applications to membrane surgery and cell isolation [J]. *Laser Surg Med*, 2005, 37(3): 227–230.
- 61 N I Smith, K Fujita, T Kaneko, *et al.*. Generation of calcium waves in living cells by pulsed-laser-induced photodisruption [J]. *Appl Phys Lett*, 2001, 79(8): 1208–1210.
- 62 S Iwanaga, T Kaneko, K Fujita, *et al.*. Location-dependent photogeneration of calcium waves in HeLa cells [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2006, 45(2): 167–176.
- 63 N I Smith, S Iwanaga, T Beppu, *et al.*. Photostimulation of two types of Ca^{2+} waves in rat pheochromocytoma PC12 cells by ultrashort pulsed near-infrared laser irradiation [J]. *Laser Phys Lett*, 2006, 3(3): 154–161.
- 64 S Iwanaga, N I Smith, K Fujita, *et al.*. Slow Ca^{2+} wave stimulation using low repetition rate femtosecond pulsed irradiation [J]. *Opt Express*, 2006, 14(2): 717–725.
- 65 H He, S K Kong, K T Chan. Identification of source of calcium in HeLa cells by femtosecond laser excitation [J]. *J*

- Biomed Opt, 2010, 15(5): 057010.
- 66 J Baumgart, W Bintig, A Ngezahayo, *et al.*. Fs-laser-induced Ca^{2+} concentration change during membrane perforation for cell transfection [J]. *Opt Express*, 2010, 18(3): 2219–2229.
- 67 A Fabiato. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 1983, 245(1): C1–C14.
- 68 A Galione, A McDougall, W B Busa, *et al.*. Redundant mechanisms of calcium-induced calcium release underlying calcium waves during fertilization of sea urchin eggs [J]. *Science*, 1993, 261(5119): 348–352.
- 69 D Day, C G Cranfield, M Gu. High-speed fluorescence imaging and intensity profiling of femtosecond-induced calcium transients [J]. *Int J Biomed Imaging*, 2006, 2006: 93438.
- 70 H He, S Wang, X Li, *et al.*. Ca^{2+} waves across gaps in non-excitabile cells induced by femtosecond laser exposure [J]. *Appl Phys Lett*, 2012, 100(17): 173704.
- 71 L Avery, H R Horvitz. Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of *C. elegans* [J]. *Neuron*, 1989, 3(4): 473–485.
- 72 J Wells, C Kao, E D Jansen, *et al.*. Application of infrared light for *in vivo* neural stimulation [J]. *J Biomed Opt*, 2005, 10(6): 064003.
- 73 D M Harris, S M Bierer, J D Wells, *et al.*. Optical nerve stimulation for a vestibular prosthesis [C]. *SPIE*, 2009, 7180: 71800R.
- 74 N M Fried, G A Lagoda, N J Scott, *et al.*. Laser stimulation of the cavernous nerves in the rat prostate, *in vivo*: optimization of wavelength, pulse energy, and pulse repetition rate [C]. 30th Annual International IEEE EMBS Conference, 2008. 2777–2780.
- 75 X Liu, X Lv, S Zeng, *et al.*. Noncontact and nondestructive identification of neural circuits with a femtosecond laser [J]. *Appl Phys Lett*, 2009, 94(6): 061113.
- 76 Y Zhao, Y Zhang, W Zhou, *et al.*. Characteristics of calcium signaling in astrocytes induced by photostimulation with femtosecond laser [J]. *J Biomed Opt*, 2010, 15(3): 035001.
- 77 Y Zhao, X Liu, W Zhou, *et al.*. Astrocyte-to-neuron signaling in response to photostimulation with a femtosecond laser [J]. *Appl Phys Lett*, 2010, 97(6): 063703.
- 78 P E Hockberger, T A Skimina, V E Centonze, *et al.*. Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H_2O_2 in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(11): 6255–6260.
- 79 U K Tirlapur, K. König, C Peuckert, *et al.*. Femtosecond near-infrared laser pulses elicit generation of reactive oxygen species in mammalian cells leading to apoptosis-like death [J]. *Exp Cell Res*, 2001, 263(1): 88–97.
- 80 J Baumgart, K Kuetemeyer, W Bintig, *et al.*. Repetition rate dependency of reactive oxygen species formation during femtosecond laser-based cell surgery [J]. *J Biomed Opt*, 2009, 14(5): 054040.
- 81 H He, K T Chan, S K Kong, *et al.*. Mechanism of oxidative stress generation in cells by localized near-infrared femtosecond laser excitation [J]. *Appl Phys Lett*, 2009, 95(23): 233702.
- 82 A V Zima, L A Blatter. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 71(2): 310–321.
- 83 Y Yan, J Liu, C Wei, *et al.*. Bidirectional regulation of Ca^{2+} sparks by mitochondria-derived reactive oxygen species in cardiac myocytes [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 77(2): 432–441.
- 84 D M Brown, K Donaldson, P J Borm, *et al.*. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286(2): L344–L353.
- 85 S Papa, V P Skulachev. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging [J]. *Mol Cell Biochem*, 1997, 174(1-2): 305–319.
- 86 H U Simon, A H Yehia, F L Schaffer. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction [J]. *Apoptosis*, 2000, 5(5): 415–418.
- 87 J E Klaunig, L M Kamendulis. The role of oxidative stress in carcinogenesis [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004, 44: 239–267.
- 88 T Karu. Photobiology of low-power laser effects [J]. *Health Phys*, 1989, 56(5): 691–704.