

文章编号: 0253-2239(2005)12-1664-6

激光高精度细胞微手术机理的研究*

姚翠萍 李 政 张镇西**

(西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室生命科学与技术学院生物医学工程研究所, 西安 710049)

摘要: 激光微手术的精度通常受到热作用或者热机械效应间接损伤的限制。把激光脉宽调整到与吸收颗粒的热弛豫时间一致可以避免热副作用, 可对所选细胞产生选择性处理。这里胶体金与牛肠硷性磷酸脂酶(Alkaline phosphatase, AP)结合物作为分析强吸收颗粒附近的蛋白质变性的模型系统, 利用皮秒和纳秒激光对结合体进行照射, 在一定的条件下可以使蛋白质失活, 并可以使细胞膜的通透性提高。通过计算可知, 采用脉宽为皮秒或者纳秒级的激光照射纳米吸收物(胶体金)时, 颗粒很容易被加热到几百开, 而且热效应仅限于几十纳米的空间范围内。利用纳米吸收颗粒进行激光微手术的方法, 在蛋白质失活的情况下对其机理进行了分析。

关键词: 医用光学与生物技术; 激光微手术; 选择性损伤; 高精度

中图分类号: Q631 文献标识码: A

Study on the Fundamental of the Laser High-Precision Microsurgery

Yao Cuiping Li Zheng Zhang Zhenxi

(The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education and Institute of Biomedical Engineering, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049)

Abstract: The precision of laser-microsurgery is often limited by thermal and thermomechanical collateral damages. Adjusting the pulse width of the laser to the thermal relaxation time of the absorbing construction can avoid thermal side effects and facilitate a selective treatment of the selective cells. Conjugates of colloid gold and bovine intestinal alkaline phosphatase (AP) are presented as the model system for investigating protein inactivation in the vicinity of strongly absorbing nanoparticles, and under certain conditions the protein can be denatured and the membrane permeability can be increased with the irradiation of the nanosecond and picosecond laser. Calculations show that under irradiation of nano- or picosecond laser pulses gold particles of submicrometer size can easily be heated to several hundred kelvins, the thermal effects is confined in a space less than tens of nanometers. The mechanism of denaturalized protein is analyzed with this laser-based absorbing nanoparticle technology.

Key words: mechanical optics and biotechnology; laser microsurgery; selective damage; high precision

1 引 言

激光能够高精度的改变和破坏组织或者病变细胞, 在医学领域得到广泛的应用^[1~3]。通常有两种方法达到切割和改变组织或细胞所需要的精度。一种是直接将激光强聚焦在靶细胞上对细胞进行操作, 另一种方法是将选择性吸收物(染料或者热吸收效应强的微粒)粘附于靶细胞, 然后用光束进行照射处理。第一种方法的精度受到光折射性的影响, 焦点尺寸最

小也会达到半个微米以上, 而且效率很低。第二种方法理论上, 可以达到很高精度。它只受到微粒尺寸和通过照射后所造成的间接热损伤的限制, 而且此方法可以同时很多靶细胞进行操作。

第二种方法以选择性光热分解作用为基础即通过调整激光脉宽到目标物的热弛豫时间, 热损伤就会得到控制。该方法被广泛应用于治疗皮肤病、眼睛疾病、葡萄酒痣、纹身和美容^[4,5]等。两种方法原理如图 1 所示。利用纳秒或者皮秒激光脉冲, 对利

* 国家自然科学基金(60578026, 60378018)资助课题。

作者简介: 姚翠萍(1971~), 女, 陕西人, 西安交通大学博士研究生, 主要从事激光技术基因转染方面的研究。

E-mail: yaocuiping@sohu.com

** 通信联系人。E-mail: zxzhang@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2004-12-13; 收到修改稿日期: 2005-04-25

用光吸收性纳米微粒与抗体结合而选择的蛋白质进行照射, 杀死和改变靶细胞(这里用独立的蛋白质)。在治疗肿瘤的应用中, 该方法与光动力学疗法相比有很大优势。它不需要活性物质来产生光化学反应而对细胞产生毒性。相反, 当特定微粒与肿瘤细胞结合时, 能量选择性地储存在微粒中, 产生高的温度峰值, 限制在细胞层次上的微观机械裂解作用就会发生, 从而杀死靶细胞。能量的选择性储存是通过微粒而不是组织, 对一定波长的激光脉冲强吸收来完成的, 并且脉宽要足够短以使传出粒子的热量最小。短的激光脉冲保证了所吸收的能量在激光脉冲内没有时间从微粒扩散出去, 只被限制在吸收体的微小体积内。

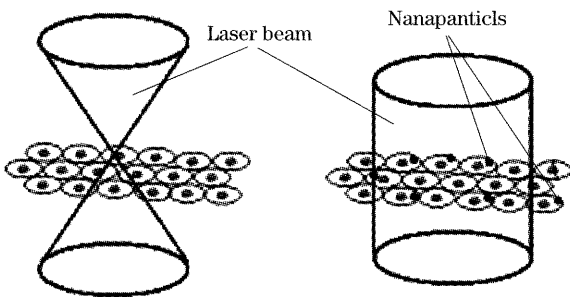


图1 两种不同的高精度激光手术原理示意图, 左边为采用激光聚焦方法, 右边为采用纳米吸收微粒附着方法
Fig. 1 Localized tissue damage by the laser with different methods, the left is by tight focusing of the laser beam and the right is by using increased absorption in the target structures

2 材料和方法

以牛肠硷性磷酸脂酶结合 15 nm 胶体金为材料。在规格为 25 mm×75 mm 的光学玻璃板(Hellma)上有 18 个小孔, 每孔直径为 2 mm, 深度为 2 mm 作为样品池, 并且配备有盖子。每个样品池可以容纳 4 μ l 样品。样品池之间距离为 8 mm。把样品放置于样品池中分别采用波长为 527 nm 脉宽为 35 ps 的皮秒激光(锁模倍频 Nd:YLF 激光), 波长为 532 nm 脉宽为 20 ns 的纳秒激光(Q 开关倍频 Nd:YLF 激光)照射; 照射方案分为直接照射和扫描照射两种。皮秒脉冲数目从 1~10⁴ 不等。每个脉冲的能量密度从 2~50 mJ/cm² 变化; 纳秒脉冲, 数目从 1~100 不等, 每个脉冲的能量密度从 10~50 mJ/cm² 变化。利用 445 nm 激光照射荧光酶作用物 4-甲基伞形酮酞磷酸盐(4-methylumbelliferylphosphatase, 4MUP)检测它的功能。这是由于激光照射使 4MUP 上的磷酸盐基团脱

落变为 4-甲基伞形酮(4-methylumbelliferone, 4MU), 在 445 nm 波长上荧光变弱。

3 实验结果

采用直径为 2 mm 的扩束光(光束为近高斯光束)直接照射样品, 激光平均能量密度为 2 mJ/cm², 此时甚至采用 10⁴ 个皮秒级脉冲或 100 个纳秒级脉冲也几乎观察不到样品的失活。由于所使用的激光光源辐射的最大功率有限, 因此实验中对光源聚焦, 使光束直径为 0.5 mm 对样品进行照射, 然后采用光束扫描方式完成对样品的均匀完全照射^[6], 可以使样品失活。分别采用纳秒和皮秒脉冲对结合物进行照射。作为对照组, 同时采用同样的条件对未结合金粒子的牛肠硷性磷酸脂酶蛋白进行照射, 结果如图 2 所示。

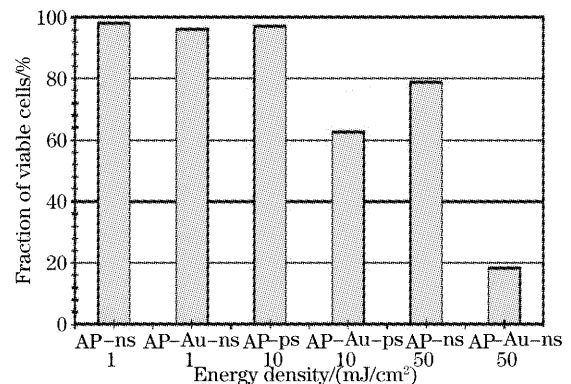


图2 分别采用 100 个纳秒脉冲(20 ns, 532 nm)和 10⁴ 个皮秒脉冲(35 ps, 527 nm)照射结合物以及对照的结果
Fig. 2 The experimental result with 100 nanosecond laser pulses (20 ns, 532 nm) and 10⁴ picosecond laser pulses (35 ps, 527 nm) for irradiating the conjugates and control samples

采用单个纳秒脉冲, 只有激光能量密度达到 200 mJ/cm² 时才能观察到蛋白质的失活, 并且在 200 mJ/cm² 以上蛋白质的失活大体上与激光能量密度呈正比关系。而用多脉冲时, 随着辐射量的增加蛋白质的失活也随着增加直到完全失活。使用 100 个能量密度为 450 mJ/cm² 的纳秒脉冲时, 蛋白质失活达到 100%。皮秒脉冲与纳秒脉冲有相似的效果, 只是对于一个皮秒脉冲要观察到蛋白质失活时的能量密度必须达到 50 mJ/cm² 以上。采用能量密度为 10 mJ/cm² 以上的 500 个皮秒脉冲时, 蛋白质的失活随着辐射量的增加而增加。能量密度增加到 50 mJ/cm² 时, 蛋白质的失活率为 40%。而采用 10⁴ 个脉冲时, 10 mJ/cm² 的能量密度能使 AP

失活率达到 40%，而 50 mJ/cm² 的能量密度则使失活率增加到 70%。分别测量了蛋白质失活率与能量和脉冲数目关系，如图 3 所示。其中图 3(b) 中皮

秒脉冲和纳秒脉冲分别采用的辐射能量密度为 50 mJ/cm² 和 450 mJ/cm²。

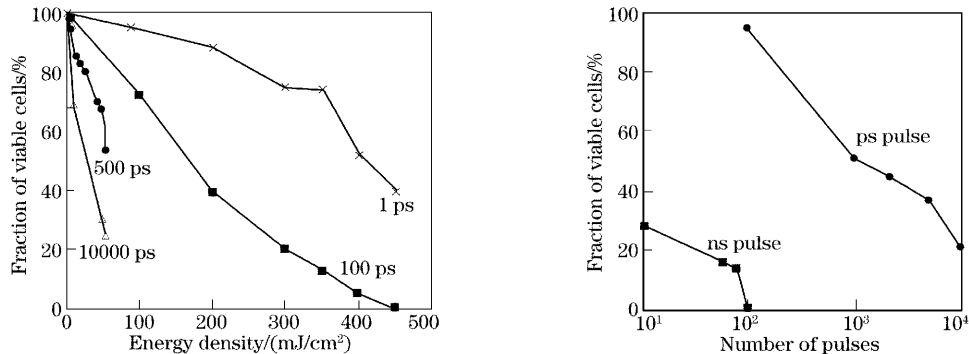


图 3 细胞存活率分别与能量密度(a)以及脉冲数目(b)的关系

Fig. 3 The viability of cell as the function of the energy density (a) and number of pulses (b)

随着辐照功率或者脉冲数目的增加，牛肠硷性磷酸脂酶活性稳定的减少。采用 10⁴ 个脉宽为 35 ps 的脉冲和 50 mJ/cm² 的能量密度时，蛋白质的失活可达到 80%，而当采用 100 个脉宽为 20 ns 的脉冲和 450 mJ/cm² 的能量密度时，蛋白质的失活可达到 100%。

通过激光照射 15 nm 的金颗粒与 L428 细胞(霍奇金病细胞)结合物，以产生细胞局部的损伤而细胞仍然存活。实验结果也表明，通过这种方法可以使细胞膜通透性提高，外源分子进入细胞达到转染的目的。

的。分别采用异硫氰酸荧光素葡聚糖 (fluorescein isothiocyanate-Dextran, FITC-D, 相对分子质量为 10⁴, 分子荧光探针) 和碘化丙啶(propidium iodide, PI, 分子荧光探针) 检测细胞膜出现的暂时的通透性和死亡的细胞。采用流式细胞仪对实验结果进行分析，细胞对 FITC-D 呈阳性，表示细胞膜通透性提高；细胞对 PI 呈阳性，表示细胞死亡。如图 4 所示。其中第四象限表示细胞膜通透性提高，但没有死亡；第一象限表示细胞有损伤；第二象限表示细胞死亡；第三象限表示细胞没有变化。

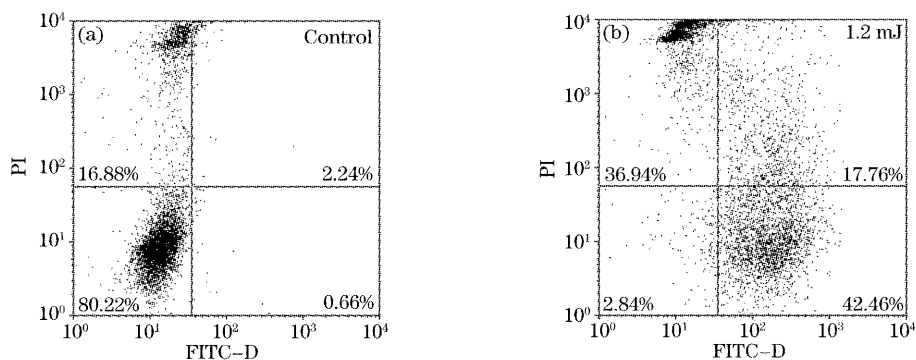


图 4 激光照射微粒细胞结合体后对细胞膜的通透性的影响，其中(a)为标准对照组，(b)为采用激光照射后的结果

Fig. 4 The change of the membrane permeability induced by laser radiation, in which, (a) is control group and (b) is the result after the radiation

4 高精度微效应机理分析

很短的加热时间可以把热效应限制在特定的范围内。当激光脉宽小于物质结构的热弛豫时间时，热扩散距离将达不到光穿透深度。因此，影响到组织的热损伤可以忽略。而其热弛豫时间 τ 由物质的直径 d 和热扩散率 α 来决定的：

$$\tau = d^2 / (27\alpha), \quad (1)$$

因而吸收物越小，热弛豫时间越小，则所需要的照射时间就越短。在组织或者水中，微秒级的脉冲的热能必须限制在 1 μ m 以内^[7]，进一步减小损伤范围到 10 nm 以内，则所需要的激光脉冲在皮秒级以内。因此要求在这么短的时间内达到所期望的损伤。下面从对吸收物内部和周围的温度计算角度来

分析是否能达到所期望的损伤效果以及损伤机理。

4.1 温度的计算

所有的光热作用中,温度是一个关键的因素^[8]。当激光照射物体时,物理过程由热产生、热传导和热效应三部分组成。热量产生是由激光参量和物体的光学性质决定的,主要是辐照度,照射时间和吸收系数。热传输完全通过物体的热力学特性来表征,如热导率和比热容量。而热效应最终依赖于物体的类型和物体内部所达到的温度。根据激光照射物质的热传输原理,可以把微粒细胞结合物建模为一个小球处于无穷大的介质中,则球内的温度和球外的温度可以根据下面的热传输微分方程计算:

$$\frac{\partial T_1}{\partial t} = k_1 \left(\frac{\partial^2 T}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial T}{\partial r} \right) + \frac{1}{\rho_1 c_1} A, \quad (2)$$

$$\begin{aligned} &0 \leq r < R, t > 0 \\ &\frac{\partial T_2}{\partial t} = k_2 \left(\frac{\partial^2 T_2}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial T_2}{\partial r} \right), \quad (3) \\ &r > R, t > 0 \end{aligned}$$

边界条件为:当 $t = 0$ 时, $T_1 = T_2$; 当 $r = R$ 时, $T_1 = T_2, k_1[(\partial/\partial r)T_1] = k_2[(\partial/\partial r)T_2]$; 当 $r \rightarrow 0$ 时, T_1 有界; 当 $r \rightarrow \infty$ 时, T_2 有界。

其中 c 为物体的比热容量, k 为热传导率, ρ 为物体的密度; A 为常量热源。采用均匀平面波照射半径很小的各向同性的金粒子, 对光的吸收率很高, 则可以认为热源为一个常量; A 的计算可参考文献^[6]。 T_1, T_2 分别为粒子和介质的温度。通过计算可得粒子内部和粒子周围的温度分布分别为

$$T_1 = \frac{R^2 A}{k_1} \left\{ \frac{k_1}{3k_2} + \frac{1-r^2/R^2}{6} - \frac{2bR}{r\pi} \left[\int_0^\infty \frac{\exp(-y^2 t/a)}{y^2} \frac{(\sin y - y \cos y) \sin(ry/R)}{(c \sin y - y \cos y)^2 + b^2 y^2 \sin^2 y} dy \right] \right\}, \quad (4)$$

$$T_2 = \frac{R^3 A}{rk_2} \left\{ \frac{k_1}{3k_2} - \frac{2}{\pi} \left[\int_0^\infty \frac{\exp(-y^2 t/a)}{y^3} \frac{(\sin y - y \cos y) [b y \sin y \cos \omega y - (\gamma \sin y - y \cos y) \sin \omega y]}{(\gamma \sin y - y \cos y)^2 + b^2 y^2 \sin^2 y} dy \right] \right\}, \quad (5)$$

其中 $a = \frac{R^2 \rho_1 c_1}{k_1}, b = \sqrt{\frac{k_2 \rho_2 c_2}{k_1 \rho_1 c_1}}, \gamma = 1 - \frac{k_2}{k_1}, \omega = \left(\frac{r}{R} - 1 \right) \sqrt{\frac{k_1 \rho_2 c_2}{k_2 \rho_1 c_1}}$ 。

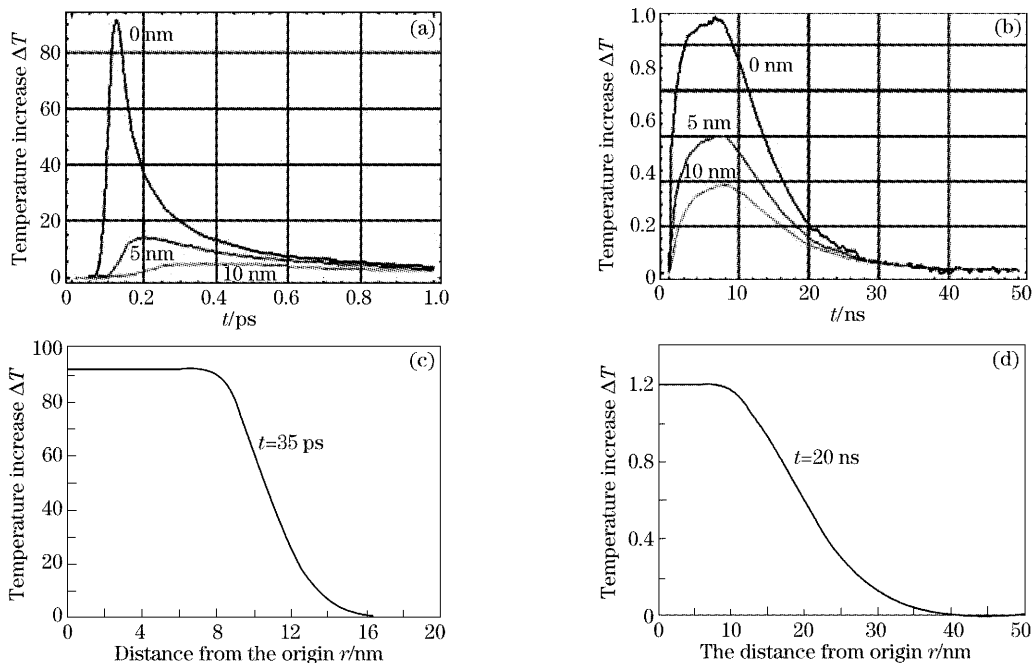


图5 金颗粒被 1 mJ/cm^2 能量密度激光照射后,温度随时间变化情况;距离表面不同距离处(0 nm, 5 nm, 10 nm)

(a)皮秒脉冲,(b)纳秒脉冲;内部和周围(c)皮秒脉冲,(d)纳秒脉冲

Fig. 5 After the gold particles are irradiated by 1 mJ/cm^2 laser pulses, the temperature change with time at distance from the surface: 0, 5 nm, 10 nm (a) picosecond laser, (b) nanosecond laser, inside and around gold particle, (c) picosecond laser, (d) nanosecond laser

上面的公式是对无限长脉冲而言的,由于热传输方程式的微分方程相对于时间成线性关系,所以对于脉宽(很小)为 τ 的脉冲的计算可由下式给出:

$$T_r = T(r, t) - T(r, t - \tau),$$

对放置于水中的 15 nm 金颗粒内部和周围的温度分布进行了计算。金粒子的热扩散率是水的 900 倍以上,在冷却的过程中微粒内部的温度可认为是一个常量。微粒周围的温度降低非常快。在距离微粒表面 10 nm 处(10 nm 大约为牛肠硷性磷酸脂酶的尺寸),它的温度大约为微粒表面温度的 5%。温度分布如图 5(a)、图 5(b)所示。在一个脉冲照射结束后,微粒的温度在皮秒范围内很快下降,如图 5(c)、图 5(d)所示。从图中可以看出,采用皮秒脉冲激光照射,脉冲结束后沿着蛋白质会产生一个很陡的温度梯度;而纳秒脉冲激光则产生一个 10 ns 的温度跳跃。

4.2 机理分析

通常可导致蛋白质变性的条件有:加热, pH 值, H 键断裂的媒介(例如尿素),特别低或高的盐溶液以及还原氧化剂。而在该实验中仅为热作用,即由于蒸汽而产生的冲击波以及空化效应^[9]而造成的机械作用和光化学作用。

根据阿里纽斯方程,蛋白质的热损伤速率为

$$K_{TD} = A_0 \exp\left[-\frac{E_a}{RT(t)}\right], \quad (6)$$

其中 R 为普适气体常量。将牛肠硷性磷酸脂酶放入水池中加热的实验中得到阿里纽斯方程中的参量:无量纲参量频率因子 $A_0 = 1.85 \times 10^{23}$, 活性能 $E_a = 161 \text{ KJ/mol}$, 这就决定在 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 时就可以得到蛋白质的热损伤。根据温度的计算值可知,对于皮秒和纳秒的激光当辐射功率分别为 4.5 mJ/cm^2 和 173 mJ/cm^2 金颗粒表面就可达到这样的温度。此外,蛋白质的损伤与所用脉冲的数目和脉冲的频率也有关系。假定每个脉冲对蛋白质的损伤是相互独立的,则有如下的关系成立^[6]:

$$IA(N) = 1 - \exp(-\alpha N), \quad (7)$$

其中, IA 代表对蛋白质的损伤, N 为脉冲数目, α 代表每个脉冲所造成的损伤。这就进一步说明了细胞的热损伤机制。因而在此过程中蛋白质的热损伤是肯定的。

根据前面的温度计算可知,热量非常迅速地通过界面并在纳秒级的范围内造成实质性的损失。热流的厚度大约为距离粒子表面 $10 \sim 15 \text{ nm}$, 造成一个很大的温度梯度。说明存在一个薄的流体层可以

导致汽化,产生空化气泡^[10]。空化气泡迅速扩张和萎缩,对相邻的组织产生机械作用。此外,粒子的碎化^[11]也是蛋白质损伤的原因。

由于金粒子高效的热吸收性,当采用皮秒或者纳秒脉冲的光照射金颗粒时,金粒子有可能释放出电子,对蛋白质产生氧化还原作用。由于皮秒和纳秒级脉冲的峰值功率密度很高,所以具有很大的电场强度,对生物组织的影响不可忽略。首先强电场会产生电致伸缩,导致很大的电致伸缩压^[12],对微粒和蛋白质的作用相同,都会产生机械作用而受到损伤。照射产生的电场在金属粒子的表面会有几个数量级的增加,又会增加拉曼散射,导致在金属粒子表面分子的双光子吸收增加。蛋白质受到强电场的照射,产生吸收系数很大的等离子^[9],因而能量也可以存储在蛋白质上,导致的热作用及多光子吸收。

5 讨 论

虽然证明了这种方法能够达到选择性高精度细胞手术的目的,但其机理却十分复杂。本文对此进行了初步的探讨。人们发现当金属微粒与牛肠硷性磷酸脂酶不直接接触,而是通过两个抗体结合时,在其它条件相同的情况下,则不会造成蛋白质的失活。其机理还不太清楚^[13]。

采用激光照射细胞-金粒子结合体,可以提高细胞膜的通透性^[10](用橡胶颗粒也能达到此目的^[14]),为将其它外来分子(药品,基因,蛋白质等)导入被照射细胞提供了另一种可能。选择性地使附着在纳米颗粒吸收物表面的蛋白质分子失活,使处理特殊的细胞成分(比如,失活细胞膜上的受体)而不是整个细胞成为可能,为基本细胞生物学的研究并达到治疗效果提供了一种潜在的工具。目前,采用激光照射由抗体结合的荧光团蛋白质结合体使单个蛋白质分子失活已经被用于活细胞^[15],在识别靶分子的肿瘤的治疗中取得令人喜悦的结果。

近几年来,人们对于将纳米颗粒作为生物传感器或者作为药物载体的研究比较感兴趣,相对而言对于将其作为组织或者细胞的微操作工具的研究给予较少的关注,而在这个方向本文对以后的研究可提供一定的参考。

致谢 本文的工作得到了德国吕贝克大学生物医学光学研究所及 Gereon Huettmann 博士的帮助,特此感谢。

参 考 文 献

- 1 Cuiping Yao, Zheng Li, Zhenxi Zhang. New algorithm and system for measuring size distribution of blood cells[J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2004, **2**(6): 343~346
- 2 Yongqiang Yang, Cuihong Zhang, Yunfei Yang *et al.*. Laser induced self-propagating high-temperature synthesis of TiNi alloy [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2005, **3**(1): 35~37
- 3 Xu Chaoyang, Tan Shici, Xing Da. Effect of He-Ne laser irradiation on $[Ca^{2+}]_i$ and immunocompetence in macrophages [J]. *Chin. J. Lasers*, 2004, **31**(2): 253~256 (in Chinese)
徐朝阳, 谭石慈, 邢 达. He-Ne 激光照射巨噬细胞对胞内钙浓度及其免疫活性的影响[J]. *中国激光*, 2004, **31**(2): 253~256
- 4 Xie Shuseng, Gong Wei, Li Hui. Selective photothermolysis in biological tissue[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2004, **41**(8): 48~51 (in Chinese)
谢树森, 龚 玮, 李 晖. 生物组织的选择性光热解效应[J]. *激光与光电子学进展*, 2004, **41**(8): 48~51
- 5 Geory Schule, Gereor Huttmann, Carsten Framme *et al.*. Non-invasive optoacoustic temperature determination of the retinal pigment epithelium during laser irradiation of the eye[J]. *J. Biomedical Optics*, 2004, **9**(1): 173~179
- 6 Gereon Huettmann, Jesper Serbin, Benno Radt *et al.*. Model system for investigating laser-induced subcellular [C]. *Proc. SPIE*, 2001, **4257**: 398~409
- 7 Gereon Huettmann, Reginald Birngruber. On the possibility of high-precision photothermal microeffects and the measurement of fast thermal denaturation of proteins[J]. *IEEE J. Select. Topics Quant. Electron.*, 1999, **5**(4): 954~962
- 8 Zhou Jingwei, Xu Xu, Yin Zhaoqin *et al.*. Numerical simulation and experimental study on thermal damage process in tissue during high-intensity laser irradiation[J]. *Chin. J. Lasers*, 2005, **32**(1): 139~144 (in Chinese)
周静伟, 徐 旭, 尹招琴等. 强激光对组织热损伤过程的数值模拟与实验研究[J]. *中国激光*, 2005, **32**(1): 139~144
- 9 Markolf H. Niemz. *Laser-Tissue interaction: Fundamentals and Applications* [M]. Berlin: Springer-Verlog, 2003
- 10 Costas M. Pitsillides, Edwin K. Joe, Xunbin Wei *et al.*. Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles[J]. *Biophysical J.*, 2003, **84**(6): 4023~4032
- 11 Vladimir P. Zharov, Valentin Galitovsky, Mark Viegas. Photothermal detection of local thermal effects during selective nanophotothermolysis[J]. *Appl. Phys. Lett.*, 2003, **83**(24): 4897~4899
- 12 Liu Puhe, Liu Guogang. *The Fundamental of Laser Biology* [M]. Beijing: Science Press, 1989 (in Chinese)
刘普和, 刘国刚. *激光生物学作用机制* [M]. 北京: 科学出版社出版, 1989
- 13 Gereon Huettmann, Benno Radt, Jesper Serbin *et al.*. High precision cell surgery with nanoparticles[J]. *Med. Laser Appl.*, 2002, **17**(1): 9~14
- 14 Yukihiko Umebayashi, Yuuichi Miyamoto, Masayoshi Wakita *et al.*. Elevation of plasma membrane permeability on laser irradiation of extracellular latex particle[J]. *J. Biochem.*, 2003, **134**(2): 219~224
- 15 Oded Tour, Rene M. Meijer, David A. Zacharias *et al.*. Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, **21**(12): 1505~1508