

文章编号: 0253-2239(2010)08-2361-05

# 离体血红细胞的活性衰变规律研究

李 雷 刘 莹 杨成方 张 枫 毕 斌

(徐州师范大学物理与工程学院, 江苏 徐州 221116)

**摘要** 采用光镊技术研究了离体血红细胞的动力学过程即细胞活性的变化规律。当光镊中的半导体激光器发出的高斯光束照射红细胞使其发生形变并反转,待细胞保持动态平衡后切断激光光路,得到形变红细胞的自由回复时间,该时间长短与细胞活性相关联。通过对比被小功率 He-Ne 激光器持续照射和正常离体血液的活性衰变规律,结果表明,细胞活性均呈现出规律性的变化,波动之后逐渐减弱并最终趋向死亡。被激光持续照射的红细胞活性衰变较缓,即激光照射的作用延缓了红细胞的衰弱。研究结果能为细胞的活性和动力学分析提供参考,为血液疾病的临床检测和激光临床治疗提供帮助。

**关键词** 生物光学;激光照射;红细胞;活性衰变;光镊

中图分类号 Q631 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS20103008.2361

## Research on the Activity Decay of Red Blood Cells in Vitro

Li Lei Liu Ying Yang Chengfang Zhang Feng Bi Bin

(College of Physics & Electronic Engineering, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

**Abstract** Optical tweezers were used to study the dynamic process and the changing rule of the activity of the red blood cells in vitro. Red blood cells irradiated by the Gaussian beam of LD laser were deformed and reversed in optical tweezers. When the LD laser was cut off, the free recovery time of blood cells was obtained, which was associated with the cells' activity. By comparing the decay process of cells activity between irradiated the red blood cells by low-power He-Ne laser and static red blood cells, the results showed: the cells activity presented a changing rule that, after fluctuations, it gradually declined till cells died. Irradiated by low-power He-Ne laser, red blood cells activity decreased slowly, namely laser irradiation postponed some decay stages. The results can provide valuable reference for the study of cells viability and dynamic analysis.

**Key words** biotechnology; laser irradiation; red blood cells; activity decay; optical tweezers

## 1 引 言

红细胞在人类的健康与疾病中起到非常重要的作用。红细胞的结构和动力学(机械)的异常与健康系统的严重紊乱有着密切关系。如具有镰刀形红细胞状的贫血病和细胞骨架异常的遗传性疾病<sup>[1]</sup>;恶性肿瘤和溶血性贫血会出现嗜碱性点彩、卡波环、何-乔小体等红细胞结构异常等。

目前临床上通常采用生化方法检测红细胞的活性。例如,最广泛使用的方法——四甲偶氮唑盐

(MTT)比色法<sup>[2,3]</sup>。其原理是活细胞中的线粒体脱氢酶能将染料 MTT 转变为不溶的紫色甲瓚颗粒,并沉淀在细胞中,而死细胞没有这种特性。继而计算出活细胞所占总体的比例,间接反映出细胞群体的活性。但是由于检测过程中必须使用有毒的有机溶剂,不仅会增加工作量并且会影响实验结果的准确度,并对实验者造成不必要的伤害<sup>[4]</sup>。此外使用广泛的还有 3H 放射性同位素掺入法、台盼蓝染色法、克隆(集落)形成法等。以上这些方法在测定细

收稿日期: 2009-07-24; 收到修改稿日期: 2009-10-12

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2007204)和江苏省高校自然科学基金(07KJD14028)资助课题。

作者简介: 李 雷(1986—),男,硕士研究生,主要从事生物医学及光子学等方面的研究。E-mail: sina209@foxmail.com

导师简介: 刘 莹(1970—),女,教授,硕士生导师,主要从事光与生物组织等光谱学等方面的研究。

E-mail: liuying70@126.com(通信联系人)

胞活性的过程中都有检测物质的介入,会对实验结果产生一定干扰。而且均是从宏观上研究一群细胞的活性,通过估算存活细胞占总细胞数的比例来确定细胞的活性。虽然能够快速地了解整体的特征或者整体所处的状态,但是这些方法无法从微观上研究个体细胞的活性,更无法对个体细胞进行衰变研究。

早在 1986 年, Ashkin 发明了光镊,理论上是利用光场的强度变化形成的梯度力,使得光子与微粒之间产生动量传递<sup>[5]</sup>,将微粒稳定地捕获在光束的最强位置。移动激光光束的焦点可以驱动微粒的移动,进而达到准确控制微粒的目的<sup>[6]</sup>。

光镊技术可以进行纳米生物学的研究,分散体系的研究,微精密器件的组装等<sup>[8~10]</sup>。而借助光镊研究细胞活性,具有以下优点<sup>[11~13]</sup>:

1) 可以对每一个细胞进行有目的的或者随机性的检测,直观地研究细胞的形状和细胞体的结构随着时间的变化;

2) 光镊技术无需其他化学物质的介入;

3) 采用非接触方式,可以对小微粒或者活细胞进行无损伤的操纵。

本文用光镊技术对离体血液的活性变化规律进行了研究,对比了被持续激光照射的离体血液的活性改变,得到了激光对血细胞的生物学效应、热学效应对细胞活性的影响,研究结果对细胞的动力学特

征以及激光对细胞的作用机理研究提供帮助。

## 2 实验装置与材料

实验仪器为上海中珂光镊科技有限公司生产的 LOT-3 型光镊。光镊光源为 780 nm 半导体激光器(LD),最大输出功率为 360 mW,激光光束经一片双向分束镜反射,进入 100 倍油浸物镜(数值孔径为 1.25),再会聚到观测点上形成光镊。780 nm 波长的光被水和血红蛋白吸收较少,可避免对红细胞可能的伤害。样品池置于三维操作平台上,通过控制平台使被捕获粒子相对于样品池移动,从而实现粒子的操控。

样品取自健康家鸽的新鲜血液,加肝素钠溶液抗凝。将上述血液样本用生理盐水稀释 20 倍,分成两组:样本 A 和样本 B。其中样本 A 静置于试管中,样本 B 用 3 mW 的 He-Ne 激光器连续照射。

## 3 实验结果与分析

实验中在光镊视野中选取并捕获一个红细胞,在 LD 激光作用下使其开始反转,如图 1(a)所示。由于活的红细胞细胞膜具有弹性,在光阱力的作用下细胞膜以至整个细胞都会被拉伸或者挤压,红细胞的重心发生偏移,红细胞会发生翻转。接着在光阱力的作用下,先是绕红细胞的长轴旋转至暂时平

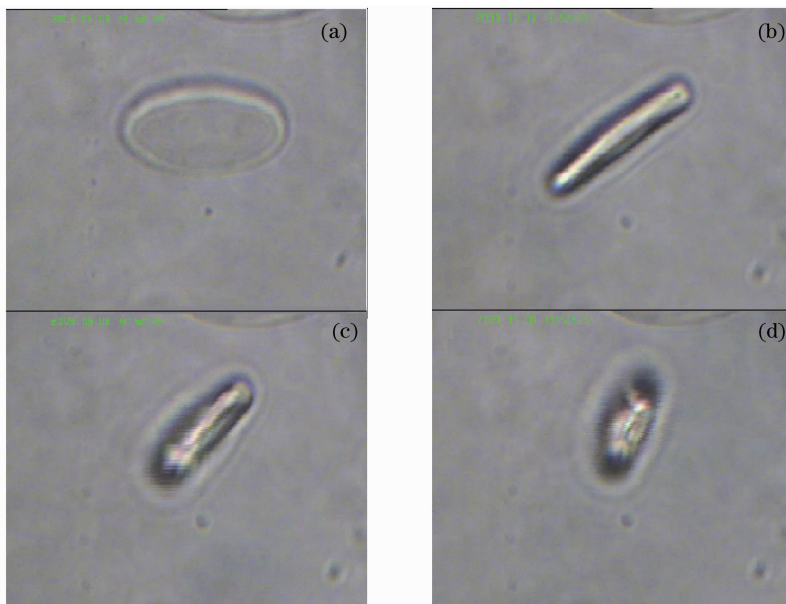


图 1 红细胞在光阱力作用下翻转。(a)开始反转;(b)绕长轴旋转;(c)绕短轴旋转;(d)达到动态平衡

Fig. 1 Reversal of red blood cell by optical trapping force. (a) start reversing; (b) rotate around long axis;

(c) rotate around short axis; (d) reach dynamic balance

衡位置,如图 1(b)所示。随后由于光阱力和细胞重心的双重作用,红细胞又开始绕其短轴旋转如图 1(c)所示,最终红细胞达到动态平衡位置,如图 1(d)所示,其长轴与激光束方向相同,而短轴与激光束方向垂直,并且扁平凹的平面方向与激光束方向平行。此时迅速撤去激光束(细胞变化过程如图 2 所示)同时开始记时。当切断 LD 的光路后,光阱力随之消失,红细胞失去光阱力的作用开始慢慢

回复,被翻转的红细胞由于细胞本身回复的需要,重心逐渐回到翻转前的位置,进而红细胞会缓慢回复到被翻转前的形状和舒展状态,如图 2(d)所示。将细胞从失去光阱力作用至完全回复至正常状态的时间定义为该细胞的自由回复时间。该时间长短与细胞活性相关联,细胞自由回复时间长则意味着细胞活性低,回复能力差,即细胞自由回复时间能直观反映细胞的活性。

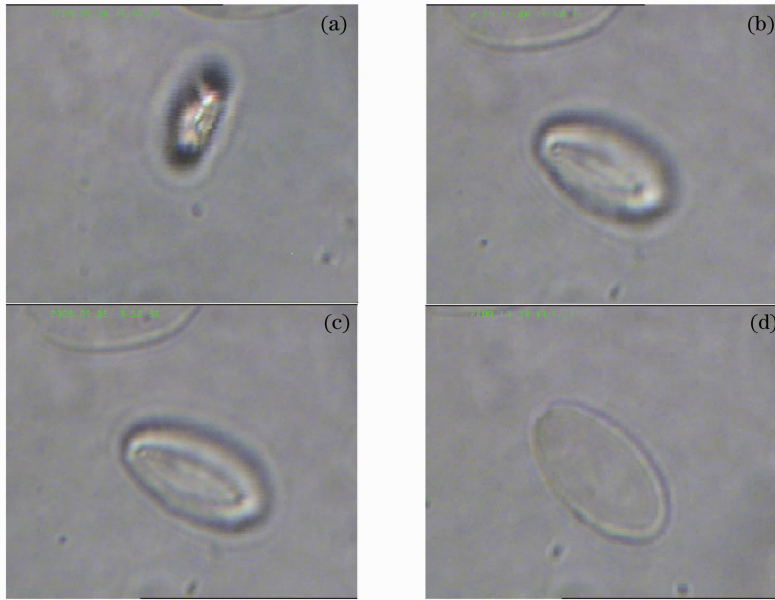


图 2 光阱力消失时红细胞的自由回复

Fig. 2 Recovery of red blood cell without optical trapping force

随机选择 10 组红细胞重复以上实验步骤,记录细胞的回复时间取平均记为该细胞的平均回复时间。30 min 之后对样本 B 重复以上实验过程,获得被小功率 He-Ne 激光器照射后红细胞的自由回复时间数据。样本 A 与样本 B 交叉进行,1 h 为一组,持续检测 8 h。每次取样本之前,都把样本轻轻摇匀,以保证实验过程中的样本为同一均匀浓度。

离体红细胞在光阱力消失之后,回复时间的差异是多种因素综合影响的结果。其中主要原因可分为内因红细胞活性和外因环境。光阱力消失之后,拉伸或者扭曲的红细胞恢复到形变前的状态,由于活性的大小不同而产生不同的内力差异会导致回复时间不同。外因环境的影响是,当红细胞离开高粘滞性的体内环境到稀释的生理盐水环境后,细胞的旋转能力逐步得到提高,回复时间逐渐减小。

图 3 为静置红细胞的回复时间和离体时间的变化关系图。从图中可以看出,细胞从离体至死亡大约经历四个阶段,先是离体后回复时间减少,然后增加,接着再次减少,直至最后慢慢增长到最终值

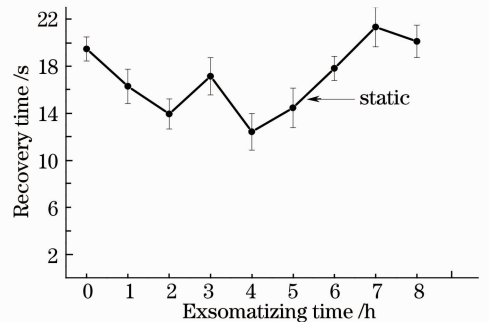


图 3 静置红细胞的回复时间图

Fig. 3 Recovery time of the static blood cells

21.3 s。相关实验证实此时红细胞趋于死亡。回复时间在第 2 h 和第 4 h 有极小值,在第 3 h 有极大值。分析认为,正常静置的血细胞,离体的环境使得血细胞的旋转能力迅速增强,表现为自由回复时间变小,且离体后血细胞的活性有所变化,只是相对外部环境对旋转能力影响可忽略。离体后的 4 h 内表现为血细胞对新环境的适应,虽然在第 3 h 左右旋转能力有所反复,但是总体趋势仍是回复时间变小的。4 h 后血细胞适应了外部环境,此时回复时间

的变化主要体现为离体细胞的活性衰变,回复时间逐渐变长,细胞活性减弱,直至最后细胞死亡。

图 4 为被激光持续照射的离体血细胞的回复时间图,从图中可以看到,被激光照射的红细胞的回复时间在开始的 2 h 左右很稳定,之后回复时间逐渐减少,大约 3 h 后呈现慢慢增长到最终值为 19.9 s。与回复时间相比,细胞活性在刚开始的两个小时保持稳定,接着细胞活性增长,3 h 后细胞活性逐渐衰减到一个极值,并最终死亡。分析认为,激光照射所产生的光热和光生物作用部分模拟了体内环境,从而推迟了并减弱了血细胞适应外部环境导致的旋转能力增强,表现为激光照射的血细胞在 3 h 内回复时间变化很小,但是 3 h 后细胞的活性衰变成了主导影响细胞回复时间的因素。由于低强度激光照射可激活红细胞膜  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶,启动葡萄糖酵解,释放 ATP 能量供红细胞利用,提高膜流动性,使红细胞易于恢复至正常形态<sup>[14]</sup>。另外激光照射能减少红细胞膜的弹性模量,使得红细胞膜的变形指数变大而刚性指数变小,从而提高红细胞的变形能力<sup>[15]</sup>。结合上述两种原因,可以认为激光短照射能起到增加细胞活性的作用。同期做的对应光谱学实验也验证了这个结论。

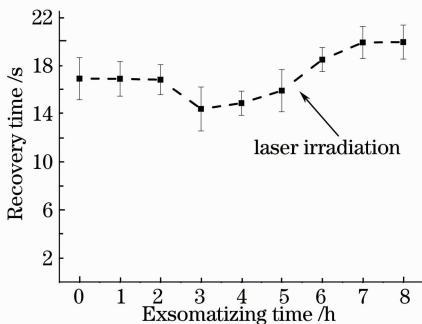


图 4 激光照射红细胞的回复时间变化图

Fig. 4 Recovery time of the red blood cells which are irradiated by He-Ne laser

## 4 结 论

为了详细分析红细胞离体后的动力学特征以及激光对红细胞的活性的影响,采用光镊技术对离体红细胞的活性及细胞的回复时间进行了测定,比较了静置的正常红细胞和激光照射的红细胞在动力学过程中的差异,可得到如下结论:

1) 随着离体时间的增加,两种红细胞的活性均呈逐渐减弱的趋势,直至最终死亡,实验上表现为红细胞的回复时间逐渐趋于一个稳定值,离体红细胞在第 7~8 h 开始大量死亡。

2) 被激光照射的红细胞活性变化较平缓,并且在部分对应时间点上,激光照射的细胞活性均比静置的细胞活性稍强。

3) 小功率激光器所带来的光热效应、光生物效应等能起到增加细胞活性的作用。激光照射的结果减少了红细胞膜的弹性模量,提高膜流动性,使得红细胞膜的变形指数变大而刚性指数变小,从而提高了红细胞的变形能力。

用光镊研究细胞的活性还可以从更多的角度进行,如可以开展个体细胞力学行为(运动、变形、粘附、分裂和铺展等)的定量检测及模型化研究,为血细胞的功能检测开辟新的途径,为临床上血液的检测提供更方便、快捷的相关研究。

## 参 考 文 献

- 1 G. Popescu, Y. Park, W. Choi *et al.*. Imaging red blood cell dynamics by quantitative phase microscopy [J]. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2008, **41**: 10~16
- 2 Cheng Huiling. The cells activity detection method of MTT [J]. *Jiangsu Medical Journal*, 1996, **22**(5): 330~331  
成惠林. 检测细胞活性的 MTT 方法 [J]. *江苏医药*, 1996, **22**(5): 330~331
- 3 Yang Fang, Lu Guohua, Liu Libing *et al.*. The key impact of the MTT test [J]. *J. the Fourth Military Medical University*, 2009, **30**(3): 243  
杨 芳, 路国华, 刘利兵 等. 影响 MTT 比色试验的关键环节 [J]. *第四军医大学学报*, 2009, **30**(3): 243
- 4 Bo Huaben, Shao Hongwei *et al.*. Studying on the detection method of lymphocyte activity [J]. *J. Southern Medical University*, 2008, **28**(3): 409~410  
薄华本, 邵红伟, 胡凌波 等. 淋巴细胞活性检测方法研究 [J]. *南方医科大学学报*, 2008, **28**(3): 409~410
- 5 A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm *et al.*. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles [J]. *Opt. Lett.*, 1986, **11**(5): 288~290
- 6 Ren Hongliang, Zhuang Lihui, Li Yinmei. Measurement of interaction potential between colloidal particles using dual optical tweezers [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(1): 151~155  
任洪亮, 庄礼辉, 李银妹. 双光镊测量胶体微粒间相互作用势 [J]. *中国激光*, 2008, **35**(1): 151~155
- 7 Chen Hongtao, Li Yinmei, Lou Liren *et al.*. Experimental conditions dependence of trap stiffness in optical tweezers [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, **31**(11): 1361~1366  
陈洪涛, 李银妹, 楼立人 等. 光阱刚度与实验条件的依赖关系 [J]. *中国激光*, 2004, **31**(11): 1361~1366
- 8 Liu ChunXiang, Guo HongLian, Jiang YuQiang *et al.*. Effect of optical magnifications on the displacement measurements in optical tweezers system [J]. *Acta Physica Sinica*, 2005, **54**(3): 1162~1165  
刘春香, 郭红莲, 降雨强 等. 光镊系统中光放大倍数对测量结果的影响 [J]. *物理学报*, 2005, **54**(3): 1162~1165
- 9 Zhou Jinhua, Gong Zan, Li Yinmei. Micromanipulation by means of optical tweezers and dielectrophoresis technologies [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2007, **16**(1): 119~126  
周金华, 龚 龔, 李银妹. 光镊与介电泳微操纵技术 [J]. *激光生物学报*, 2007, **16**(1): 119~126
- 10 Jiang Yuqiang, Guo Honglian, Liu Chunxiang *et al.*. Trapping stiffness measurement with Brownian motion analysis method at

- low sampling frequency [J]. *Acta Physica Sinica*, 2004, **53**(6): 1721~1726
- 降雨强, 郭红莲, 刘春香等. 低频率及低采样频率下用布朗运动分析法测量光阱刚度[J]. *物理学报*, 2004, **53**(6): 1721~1726
- 11 Guo Honglian, Yao Xincheng, Li Zhaolin *et al.*. Measurement of displacement and trapping force on micron-sized particles in optical tweezers system [J]. *Science in China (Series A)*, 2002, **32**(2): 97~102
- 郭红莲, 姚新程, 李兆霖等. 光镊系统中微小颗粒的位移和所受力的测量[J]. *中国科学(A辑)*, 2002, **32**(2): 97~102
- 12 Wu Zhongfu, Liu Zhihai, Guo Chengkai *et al.*. Numerical simulation and experiments of two fiber optical tweezers[J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, **28**(10): 1971~1976
- 吴忠福, 刘志海, 郭成凯等. 两种单光纤光镊捕获效果的数值仿真与实验研究[J]. *光学学报*, 2008, **28**(10): 1971~1976
- 13 Xu Feng, Hu Lin, Wang Xianwei *et al.*. Effects of low power laser irradiation on human's red blood cell[J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(6): 957~960
- 许 锋, 胡 林, 王现伟等. 低强度激光照射对离体人红细胞的影响[J]. *中国激光*, 2008, **35**(6): 957~960
- 14 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形研究[J]. *中国激光*, 2002, **A29**(2): 189~191