

激光细胞微手术的发展和应

张镇西 姚翠萍 王 晶 梅建生 杨 洋

(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分析技术与仪器研究所,
陕西, 西安 710049)

摘要 现代生命科学的发展在很大程度上依赖于对活细胞的加工和操纵, 比如切除细胞内的某些特定蛋白或细胞器等。激光细胞微手术是一个强有力的工具, 近年来在细胞微手术精度控制方面取得很大的进展。综述了激光细胞微手术的最新发展及其在生物学和生物医学工程中的应用, 对目前激光细胞微手术中存在的主要问题进行了讨论, 对比了普通激光聚焦法、飞秒激光聚焦法以及纳米金辅助的激光照射法的优点和不足。相对来说, 纳米金辅助的激光照射法具有同时对多个细胞进行操作, 并且不需要复杂的辅助仪器等主要特点。

关键词 医用光学; 细胞微手术; 纳米金; 飞秒激光

中图分类号 R318.15 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201131.0900124

Development and Application of the Laser Cell Microsurgery

Zhang Zhenxi Yao Cuiping Wang Jing Mei Jiansheng Yang Yang

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

Abstract The development of the modern life science is largely dependent on the manipulation of the cells, such as removal of the certain protein or subcellular organelle, and the laser cell microsurgery is a powerful tool. Until now, three mechanisms are explited for the laser cell surgery: general laser tightly focused irradiation, femosecond laser focused irradiation and gold nanoparticles based laser irradiation. During the past few years, extensive progress and numerous breakthroughs have been made in this area of research. Here the lastest development of laser cell microsurgery and its application in the field of biology and biomedical engineering are reviewed. Furthermore, this review covers three different laser cell microsurgerys and their advantages and disadvantages. A large amount of cells can be manipulated at the same time and no need of many expensive instruments are the main advantages of the gold nanoparticles based on laser cell surgery in comparison with present existing methods.

Key words medical optics; cell microsurgery; gold nanoparticle; femtosecond laser

OCIS codes 170.1530; 170.7160; 170.1020

1 引 言

世界上第一台激光器问世不久, 激光技术就在细胞生物学的研究基础上得到广泛的应用, 并出现了一门新学科——激光细胞生物学。细胞本身的体积小, 直径只有几个微米到十几微米, 细胞内部的结构则更加精细复杂, 所以在揭示生命功能的过程中, 借助于现代化的研究工具成为不可缺少的手段。激光由于

具有强度高, 方向性和单色性好等优点, 经过透镜聚焦后可形成功率密度高而光斑直径仅为微米量级的微光束, 利用激光微光束可以对细胞进行俘获、打孔、融合、切段、转移和移植等操作, 在细胞生物学的研究中形成了激光光镊术、激光显微照射术、激光细胞融合术以及激光细胞打孔术等激光微光束技术。

把聚焦光用于生物学和医学的微处理始于

收稿日期: 2011-07-18; **收到修改稿日期**: 2011-07-29

基金项目: 国家自然科学基金(60927011, 60878056, 61120106013)、陕西省自然科学基金和中央高校基本科研业务费专项资金资助课题。

作者简介: 张镇西(1951—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事生物医学光子影像与光谱分析技术、光生物物理学与生物光子学调控技术等方面的研究。E-mail: zxzhang@mail.xjtu.edu.cn(中国光学学会会员号: S0401115623)

1912年^[1]。激光的出现,使微处理的分辨率得到很大的提高。1962年,M. Bessis等^[2]第一次把一台红宝石激光聚焦到显微镜上对细胞进行了微处理。此后激光对细胞和亚细胞层次的微处理在整个生命科学的科研和应用中引起了人们的关注并得到了很大的发展,已经成为现代医学和生物学中一个不可或缺的工具。

目前激光的微操作和处理方法分为两种:光镊和光切除。在很多情况下光镊和光切除结合处理同一个细胞。光切除也被称为激光微手术。由于现代生物学很大程度上是基于一种简约式的“解剖”方法——大多细胞生物学家尝试通过移除生物系统的某个部分,并且研究移除这个部分后对整个系统的影响来研究生物系统整体的复杂运动。各种各样的酶方法和机械方法已经被用于解剖大型细胞集合,如组织和器官。单个蛋白可以通过基因操控,如核糖核酸干扰(RNAi)或基因去除使其在细胞内失活或移除。因此,对于不同细胞器水平的细胞内操控工具的需求在不断增加。而激光微手术可以理想地实现该目的,并且在细胞生物学家中的流行性呈上升趋势。因此现代生物学几乎各个方面都离不开激光微手术。

本文综述了激光细胞微手术的最新发展及其在生物学和生物医学工程中应用,讨论了目前激光细胞微手术中存在的主要问题,对比了普通激光聚焦法、飞秒激光聚焦法以及纳米金辅助的激光照射法。

2 激光细胞微手术现状

自从激光微手术出现以来,生物学和医学领域的很多课题组都把这种技术作为最基本的工具,用于满足自己的研究需求。同时,人们也不断地对这种技术进行改进,以适应细胞生物学的发展。目前存在以下几种激光细胞微手术方法。

2.1 普通激光光源

早期的激光微手术方法中采用的光源是紫外(193~355 nm)和可见光(532 nm)的连续激光或者纳秒及皮秒脉宽的脉冲激光。但是由于细胞内的蛋白质和核酸等都对近紫外光具有强烈的吸收,样品光束路径上焦平面以外的成分也会吸收光能。这样就很难做到在活细胞内蚀除亚细胞器的同时不破坏细胞活性。聚焦纳秒绿色激光微手术的作用效果随细胞结构及类型的不同而定,有报道称在激光焦点处和焦点外均有蛋白质分子的变性^[3]。其次,由于单个活细胞的体积仅有飞升(10^{-15} L)级,在如此小

的体积上,严格控制作用在目标上的辐照度,进而确定激光引起的细胞的各种生物效应的界限,是当前激光细胞操作手术研究的重点和难点,也是曾经制约激光细胞操作手术研究进一步发展的“瓶颈”。为了克服这个缺点,人们采用了飞秒激光作为光源。

2.2 飞秒激光光源

与紫外、可见光相比,近红外飞秒激光具有以下优点:适用于任何类型的生物组织,精度高,三维方向可控;不影响细胞的活性,在近红外区细胞对热的吸收小、焦点体积周围的热损失小,蚀除仅发生在焦点体积处及其周围很小的区域内(目前报道的最小分辨率可达到360 nm)^[4]。因此飞秒激光目前被认为是进行细胞微手术的最佳工具,已经被应用于基因转染,细胞器切除等领域的研究^[5,6]。国内天津大学精仪学院超快激光研究室和江苏大学光子制造科学中心对飞秒激光细胞微手术进行了系统的研究^[7,8]。但这种方法的精度依然受到光衍射极限的限制,焦点尺寸通常最小大于半个微米,而且飞秒激光的系统复杂,通常与光镊一起使用。

2.3 染料辅助激光照射方法

激光微手术还存在另外一种方法,即如果所需要处理的物质的光吸收率远远大于周围的环境,激光直接照射后这种物质就会被损伤。如光动力疗法(PDT)、染料辅助激光失活法(CALI)以及选择性光分解作用就是这种方法的典型应用。PDT和CALI方法的共同之处在于目标区域内以光化学活性物质作为光吸收性物质。PDT方法已广泛应用于肿瘤的治疗;而在CALI方法中光化学染料借助抗原抗体结合反应,通过光化学反应有效地灭活抗原蛋白。这两种方法的机理都是氧化反应的发生,所作用的空间精度与光化学物质的扩散和光化学反应的微环境有关。

针对普通激光光源、飞秒激光光源和染料辅助激光照射方法的优缺点,研究组发展了一种激光细胞微手术的新方法——纳米金辅助的激光细胞微手术方法^[9~11]。

2.4 纳米金辅助的激光照射法

在染料辅助激光照射方法中,使用强光吸收性微粒代替染料,并采用相应波长的激光照射,则细胞损伤的程度只与光吸收性微粒的直径和激光照射时间有关。通过把照射时间调整到与组织的热弛豫时间匹配可以把热损伤控制在毫米甚至微米量级范围内。这样就可以达到所需要的精度要求。通常最大照射时间应该小于或等于组织的热弛豫时间,即

$$t_r \leq \tau \approx \frac{d^2}{27\kappa}, \quad (1)$$

式中 d 为吸收体的半径, κ 为吸收体周围的热散射

系数。通过(1)式可知,在热弛豫时间内组织受到了一定的热损伤。

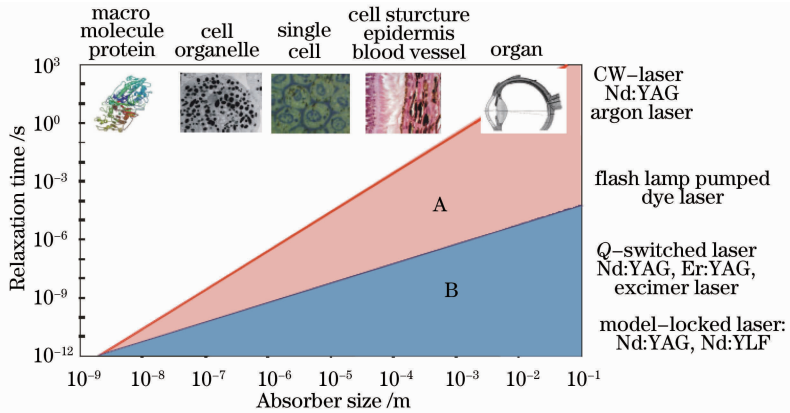


图1 吸收体大小与照射时间的关系总结。在图中选定的 A 区域范围内,可以产生选择性损伤而不会出现热弹性膨胀造成的空化现象。如果照射脉冲比图中的时间长,则会造成更大的损伤。如果照射脉冲小于图中给出的时间,即 B 区域,则会造成压力波以及空化气泡造成的机械损伤

Fig.1 Summary of the relationship between the absorber size and irradiation time. In the red region, selective damage is induced without thermoelastic cavitation. When irradiation time is beyond the A region, larger damage range will be induced. When the irradiation time is short, the mechanic mechanical damage will occur due to pressure waves and cavitation bubbles indicated by the B region

对于直径为 10 mm 的血管,照射时间应该控制在毫秒之内;对于微米级的物质其照射应该控制在微秒之内。如果要得到更高的损伤精度,不仅吸收体体积需要减小,照射时间也需要缩短。根据不同组织的热弛豫时间,图 1 对吸收体的大小和照射时间做了一个汇总,其中组织的热学参数都以水的性质为参考。如果加热(照射)时间特别短,则热弹性膨胀造成的压力会导致空化气泡的产生。当物体被迅速加热时,物体就需要通过热膨胀产生的压力波来释放能量,从而产生光声效应。在水中的光声效应时间,应该超过体积被加热期间空化气泡产生的时间等汇总在图 1 中。根据理论计算,微粒的半径越小,相应的热弛豫时间越短,在相应照射时间内其损伤程度就越小。通过相应的研究可知,采用纳米金作为光吸收性微粒,激光照射后理论上对组织的损伤可以达到纳米精度。

综上所述,激光细胞微手术可以表示为图 2 所示的激光紧聚焦法和纳米微粒辅助激光照射法。本课题组对纳米尺度激光紧聚焦光穿孔技术进行了详细的论述^[12]。通常,在利用连续激光聚焦照射实现细胞微手术时,由于激光脉宽长于激光焦点处的热扩散时间并且激光强度相对较弱,因此需要在细胞培养液中添加线性吸收染料。无论是长脉宽还是连续波激光,它们与生物材料的作用都依赖于线性吸

收,平均输出功率要达到 1 W 或更高,高功率将会对细胞本身造成较大影响。同时,连续波或长脉冲主要依靠热分解和瞬时气泡的形成来对细胞产生作用,其中热分解作用的发生要求温度必须达到 100 °C 以上,这会对细胞膜造成一定的伤害。但是利用此光源的一个显著的优点是紫外二极管激光器成本相对较低。

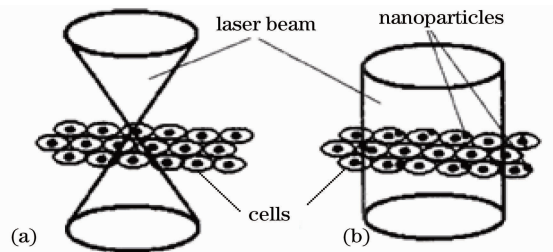


图 2 两种不同的激光细胞微手术方法原理示意图。

(a)激光聚焦方法;(b)纳米金辅助激光照射方法

Fig. 2 Cell microsurgery by the laser with different methods. (a) Tight focusing of the laser beam; (b) using gold nanoparticles in the target cells

飞秒激光的激光强度非常容易达到 10^{16} W/m² 数量级,它与水或生物介质的相互作用呈非线性,可在生物介质中产生高度局部化的非线性吸收,被吸收的激光能量非线性的积累在焦点处,这种能量由激光转移到介质的过程称为非线性能量沉积。研究表明这一过程是高度可控的。由于是非线性作用,一旦光强达到阈值强度,即刻产生大量的等离子体,

对光子的吸收急剧增加。所以实验中飞秒激光的平均输出功率可以小到几十毫瓦,使得它对细胞的影响较小。同时,飞秒激光产生的非线性能量沉积在作用过程中伴随有自由电子诱导的化学效应、热效应和热弹性机械效应等,综合利用这些效应将更有利于对细胞进行微操控,但是其操控精度仍然受到衍射极限限制。

而在纳米颗粒辅助的(例如纳米胶体金和纳米棒)激光照射法中,纳米颗粒通过受体和配体结合,靶向标记到细胞特定的部位。特定波长的激光通过表面等离子体共振效应加热纳米颗粒。能量沉积引起的热效应在纳米颗粒周围形成微小空化气泡,空化气泡在弹性界面上引起的机械效应可以在细胞特定部位造成微损伤,从而实现细胞微手术。这种方法与紧聚焦光照射方法处理单个细胞相比,纳米颗粒辅助方法中可以采用小数值孔径的物镜,这样通过大面积的激光辐射可以同时处理大量的细胞,而细胞的选择性吸收是通过具有特异性的抗体靶向获得的。而且,这种方法中不需要其他辅助的复杂昂贵的系统,因此这是一种非常有吸引力的激光细胞微手术方法。

3 激光细胞微手术的应用

自从激光微手术出现以来,生物学和医学领域的很多课题组都把这种技术作为最基本的工具,用于满足自己的研究需求。20世纪60年代,贝克曼激光研究中心的创建者 Berns 教授就利用激光细胞微手术致力于细胞遗传学和细胞运动学的研究,有关 Michael W. Berns 教授的介绍,可参考美国激光医学会董事会的介绍^[13]。1972年,Diaccumakos等^[14]采用这种技术进行细胞融合,目前细胞融合技术已经广泛应用于单克隆抗体的制备等领域。激光细胞微手术通过多年的发展,主要应用于以下三个领域。

3.1 细胞器去除

细胞器是细胞中通过生物膜与细胞中其他部分分隔开来的、功能上独立的亚细胞结构。人们已经意识到由于生物体在生理和病理上的变化,将会对细胞器的形态产生一定的影响;反之,通过对细胞器形态的观察,在一定程度上也可以反映生物体生理和病理上的改变。而通过对细胞器的切除,人们不仅能够分析研究细胞内各种结构和功能的关系,探讨细胞的合成、分裂和遗传等生命活动,还能研究一些病理信息。目前,人们可以采用激光细胞微手术

选择性改变活细胞中的亚细胞器,比如染色体切除,中心粒、着丝点等与有丝分裂相关的细胞器等的切除。通过对这些特定部位或者细胞器的操作,科学家们可获得生物学各个层次的重要信息。

Berns等^[15]把一束低功率的氩离子激光聚焦到一个用吖啶染料染色的活细胞的染色体上,结果发现在染色体的照射区域出现了一个 $0.5\ \mu\text{m}$ 的损伤。随后的研究表明,激光微光束可以用来选择性地损伤基因的特定位置。在这些研究中用到了3种激光:低功率氩离子激光,需要对细胞器染色;高功率氩离子激光,不用染色(相当于多光子过程);四倍频的Nd:YAG激光(265 nm)。他们的实验证明,这种方法不仅可以选择性地去除核仁里的基因,而且核仁区域中相应没有染色部分的基因能够从单个照射的细胞中克隆出来。此外,现在还可以相对简单地对RNA基因进行操作,用来研究变异果蝇中RNA基因的调控作用和功能以及两栖动物卵母细胞的基因增殖。他们还通过对中心粒的切除发现处于中心体区域的RNA的第二构象在有丝分裂时纺锤体的组织功能方面起了很重要的作用。而且有丝分裂后期染色单体的最初分离并不是由微管介导的^[16]。由于这种方法可以使某段基因失活而不表达,从而用于基因调控、功能基因组学以及靶向基因治疗等基础研究领域^[17]。

除了选择性地去除某些染色体以外,一些研究组还对有丝分裂期间细胞的整个染色体进行了去除操作。在有丝分裂中期时对着丝点进行照射就可以完成对整个染色体的去除。这是因为当着丝点的微管动粒附件被破坏时,染色单体就不再附着在有丝分裂的纺锤体上。Aist等^[17]利用激光微手术去除星状体某部分研究了细胞有丝分裂中纺锤体与星状体的相互关系,研究发现,星状体的拉力会对中心纺锤体产生压力,纺锤体由此产生的反作用力就会限制细胞分裂的速度。Cheng等^[18]通过对干细胞中中心体的加工,发现干细胞中中心体的定向对于正常的细胞分化起了关键作用。

人们通过激光照射细胞可以造成单个线粒体的明显损伤,从而能够分析其收缩反应、电学反应和形态学反应。实验证明,通过照射细胞器,激光能量能够直接被捕获并储存在三磷酸腺苷中。另外的研究表明,在照射前细胞已经被电极刺穿,照射一个线粒体后细胞膜会发生明显的去极化。细胞被照射后最终总会恢复到以前的静息电位状态,从而说明细胞膜上的激光效应是暂时的,这可能是由于暂时的细

胞膜对某种离子的通透性改变造成的。通过这种方法,还阐明了包括收缩性能、电反应以及形态反应等影响心肌细胞收缩的多种因素,并借此可以研究心率失常。由于这种方法对亚微米以下的靶细胞可造成选择性的损伤,细胞微手术技术也是研究细胞功能,神经电流,神经损伤以及神经重建的有力工具^[19]。

3.2 细胞膜手术

细胞膜是防止细胞外物质自由进入细胞的屏障,它保证了细胞内环境的相对稳定,使各种生化反应能够有序运行。但在很多情况下,人们需要某些物质可以穿过细胞膜进入细胞,从而达到基因转染或者药物、抗体等转入的目的,从而进行疾病的治疗。目前激光细胞微手术已被证实是一种有效的非病毒基因递送并能永久表达的手段。2002年,U. K. Tirlapur等^[5]把钛蓝宝石飞秒激光器聚焦在细胞膜上,从而使细胞膜产生了单个特定位置的瞬时穿孔,允许DNA通过并保存了细胞的完整性,而且转染率可以达到100%。2005年,Kohli等^[20]采用10 fs的飞秒激光对活的哺乳动物细胞进行了亚微米细胞膜切割和细胞分离并且保持了细胞的活性。Evelyne Zeira等^[21]采用相干辐射钛蓝宝石锁模激光(频率为76 MHz,脉宽为200 fs,波长为780 nm)进行了非病毒的在体基因细胞内转入实验。他们通过激光照射把外源基因转入老鼠体内,并成功表达了7个月。他们认为这是一种非常有效的用于在体基因表达和接种疫苗的方法,并可以进行基因治疗。

与飞秒激光相比,采用纳米金介导的细胞膜微手术方法,可以采用纳秒激光或皮秒激光光源,而且同时可以处理较多的细胞。本课题组在2005年就明确提出了纳米金介导的细胞膜微手术方法,并且进行了系统的研究^[9]。到目前为止,采用这种方法实现了不同大小分子的细胞内转入,包括10 KD的异硫氰酸葡聚糖分子,150 KD的MIB1抗体以及3000 KD的绿色荧光蛋白(GFP)质粒载体,而且GFP能够成功表达。其中抗体的转入率达到70%以上。对于质粒载体,本课题组目前的任务就是提高其转入率,并保证能够永久表达。如果这种方法能够成功实施,有望发展为一种新的基因转染和基因治疗的方法。

此外,细胞融合是细胞工程中的一项重要技术手段,激光细胞融合术是利用短脉冲激光微光束同时照射在两个或者两个以上相邻的细胞膜上,在适当的条件下微光束可以在细胞膜上诱发瞬间的可逆性损伤,

这种瞬间的变化可以把相邻的细胞膜融合在一起形成新型细胞,现在激光细胞融合术已经成为人工定向创造新品系细胞的重要手段和制成单克隆细胞系的关键技术,对生物遗传工程的研究也具有重要意义。2006年,天津大学邢岐荣课题组^[22]采用中心波长为810 nm,脉冲重复频率为100 MHz,脉冲宽度为40 fs的飞秒激光对酵母细胞进行融合,以CCD录像系统监测靶细胞的融合过程,在靶细胞被曝光160 min后成功实现了细胞的融合。上述实验均采用的高重复率的飞秒激光脉冲,且激光脉冲能量在0.5~1.2 nJ之间,略低于冲击波形成阈值,因此细胞膜破坏的机理是多脉冲产生的热累积效应使细胞膜产生瞬时穿孔。由于细胞膜具有流动性,损伤的细胞膜会在短时间内得到修复,从而再次形成完整的屏障。在现代医学领域,激光细胞微手术通常被用于人工受精等研究。

3.3 植物细胞中的应用

与动物细胞不同的是,植物细胞有一层厚厚的由纤维素等组成的细胞壁。通常情况下很难不损伤细胞活性而又越过这层机械屏障进入细胞内部。为了克服这个问题,人们通常采用酶对细胞进行处理,从而将外源物质,如DNA等,转入细胞。然而,这种方法通常会破坏原生质,而不能用于进行特殊细胞功能分析的实验。现在,激光细胞微手术是用于植物细胞的一种理想的方法,该方法也普遍被应用于植物细胞的研究。比如,研究植物细胞分裂过程中胞质束的行为与分裂的关系^[23],研究植物细胞壁与细胞膜之间的Hechtian带的功能、位置以及物理性质^[24],或者在完整的植物细胞上打破部分细胞壁,从而使基因质粒等的外源物质进入植物细胞,并完成基因表达^[25]。

总之,现代生命科学的发展在很大程度上依赖于对活细胞的加工和操纵。利用细胞微手术切除细胞内的某些特定蛋白或细胞器,或者极短的时间内在细胞膜上造成可逆损伤,导入外源物质(例如基因、抗体和大分子等),对研究活细胞内部各蛋白质以及细胞器的功能、外界大分子对细胞功能的影响以及转基因动物的培养具有重要的实际意义和科学价值。

4 激光细胞微手术的机理

最早应用普通激光光源实现细胞微手术的机理是激光对细胞的热效应。对于飞秒激光其作用机理目前有三种:1)脉冲能量较低的情况下产生的化学

反应发生累积效应,从而使细胞产生局部的损伤;2)飞秒激光脉冲能量较高时,其诱导的样品内等离子体密度较高,将对样品产生热致损伤;3)飞秒激光的脉冲能量远超过冲击波形成阈值时,激光诱导的样品内等离子体密度很高,对生物样品会产生快速的物理破坏效应。这三种效应在杨海峰等^[26]的文章中有详细的论述。

1999年, Huettmann等^[27]最早对纳米颗粒介导的激光细胞微手术机理进行了研究,他们认为造成细胞损伤的根本原因是由纳米金累积的光热效应导致的蛋白热变性。随着各种先进实验手段的出现

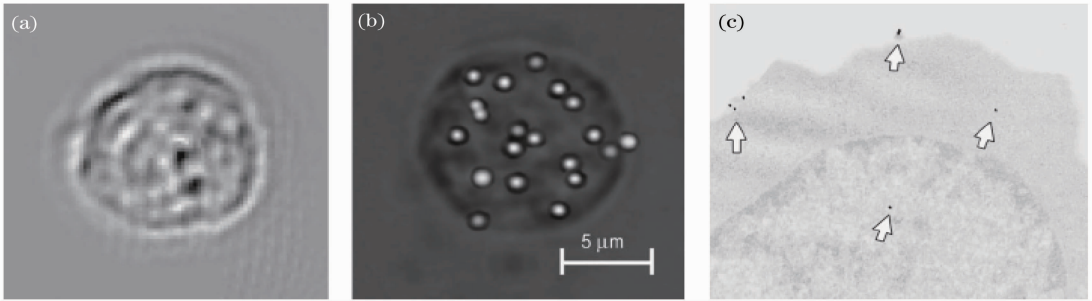


图3 (a) 100 μJ 照射后的 K562 肿瘤细胞的光热成像; (b) 20 μJ 照射后的含有 20 nm 的纳米金 K562 肿瘤细胞的光热技术成像; (c) 与纳米金培养 1 h 后相同细胞的电镜照片(放大 19000 倍), 箭头指向纳米金; 抽运激光: 波长 525 nm, 脉冲宽度 8 ns, 延迟时间 50 ns, 脉冲能量 100 mJ

Fig. 3 (a) PT images of a K562 cancer cell and (b) a cancer cell with 20 nm gold nanoparticles incorporated into it; (c) transmission electron micrograph of the same cells after a 1 h incubation with nanoparticles (19000 magnification). White arrows indicate the particles; pump laser of 525 nm wavelength, 8 ns pulse width, 50 ns time delay and 100 mJ pulse energy

采用脉宽更宽的脉冲时,照射时间大于吸收物质的热弛豫时间,纳米金吸收光能后对细胞的损伤难以控制,基本上都会造成细胞的死亡。其机理主要是由于热效应导致的蛋白质变性^[33]。

本课题组也对其机理进行了探索。以结合有纳米金的牛肠硷性磷酸脂酶为研究对象,采用不同脉宽的激光(纳秒和皮秒)对结合有纳米金的蛋白质进行照射,通过实验获得能够使蛋白质全部失活的阈值,并初步建立了光热效应模型,结合阿列纽斯方程对其中的机理进行了前沿性的探讨^[10]。研究了激光的不同参数以及激光不同的照射方式对纳米金靶向的两种细胞损伤的影响,针对不同的脉冲宽度采用不同的理论,模拟了纳米金周围介质的温度分布^[11]。此外,还通过蒙特卡洛模拟分析了短脉冲激光照射下纳米颗粒表面的温度变化以及纳米颗粒使蛋白质失活的机理^[34]。由上述研究获得结论,能量密度为 1 mJ/cm^2 的单个纳秒或者皮秒激光脉冲都可以使纳米金周围的温度达到气化程度,从而造成细胞膜的可逆损伤,实现一些外源物质细胞内转入

以及研究的深入,研究者们发现不同脉宽段的激光与纳米颗粒及细胞作用的机理是不同的。飞秒到纳秒脉宽的激光由于加热(照射)时间特别短,则热弹性膨胀造成的压力会导致空化气泡的产生,从而会造成细胞膜穿孔^[28,29]。Huang等^[30]利用实验确定了这种方法中能够破坏肿瘤细胞的最低温度,Zharov等^[31,32]分别利用光热技术和声光成像检测了这种方法中细胞内的纳米金周围的局部热效应,观察到了气泡的产生,如图3所示。Kitz等^[32]认为细胞的损伤程度与气泡的大小有关。

效果。

5 结 论

综上所述,目前激光细胞微手术中,普通激光光源紧聚焦方法由于其精度不可控等缺点几乎不再使用,而主要的方法就是飞秒激光紧聚焦照射法和纳米金辅助的激光照射法。这两种方法有各自的优势,在细胞微手术中都具有很大的应用前景。两种方法都可以在不破坏细胞活性的条件下蚀除和切割细胞器,为研究不同细胞器对细胞功能的影响提供一种有效的方法。也为研究生命科学中很多关键的问题,比如基因治疗、神经功能再生、胚胎发育等提供一种有效的方法。然而,两种方法在机理方面都存在需要进一步解释的科学问题,如等离子体诱导蚀除的机理、高重复率激光辐照下由能量累积引起的热效应和脉冲与脉冲之间的相互作用、空化气泡的产生与细胞膜损伤精度的关系等,仍需要进一步的研究和探索。

参 考 文 献

- 1 S. Tschachotin. Die mikroskopische strahlenstichmethode, eine zelloperationsmethode [J]. *Biol. Centralblatt*, 1912, **32**: 623~630
- 2 M. Bessis, F. Gires, G. Mayer *et al.*. Irradiation des organiles cellulaires a l'aide dun laser a rubis [J]. *C. R. Acad. Sci.*, 1962, **225**: 1010~1012
- 3 A. Khodjakov, R. W. Cole, C. Rieder. A synergy of technologies: combining laser microsurgery with green fluorescent protein tagging [J]. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 1997, **38**(4): 311~317
- 4 A. Heisterkamp, I. Z. Maxwell, E. Mazur *et al.*. Pulse energy dependence of subcellular dissection by femtosecond laser pulses [J]. *Opt. Express*, 2005, **13**(10): 3690~3696
- 5 U. K. Tirlapur, K. Koenig. Targeted transfection by femtosecond laser [J]. *Nature*, 2002, **418**(6895): 290~291
- 6 S. W. Botchway, P. Reynolds, A. W. Parker *et al.*. Use of near infrared femtosecond lasers as sub-micron radiation microbeam for cell DNA damage and repair studies [J]. *Mutation Research*, 2010, **704**(1-3): 38~44
- 7 Xing Qirong, Mao Fanglin, Li Yanfeng *et al.*. Femtosecond laser cell manipulation and operation system [J]. *J. Optoelectronics · Laser*, 2002, **13**(1): 102~105
邢岐荣, 毛方林, 栗岩峰等. 飞秒激光细胞操作与手术系统 [J]. *光电子·激光*, 2002, **13**(1): 102~105
- 8 Yang Haifeng, Zhou Ming, Di Jianke *et al.*. Research on microsurgery of living cells induced by femtosecond laser [J]. *J. Optoelectronics · Laser*, 2009, **20**(4): 555~558
杨海峰, 周明, 狄建科等. 飞秒激光活细胞微手术研究 [J]. *光电子·激光*, 2009, **20**(4): 555~558
- 9 C. P. Yao, R. Rahmzadeh, Zhenxi Zhang *et al.*. Elevation of plasma membrane permeability by laser irradiation of selectively bound nanoparticles [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2005, **10**(6): 064012
- 10 Yao Cuiping, Li Zheng, Zhang Zhenxi. Study on the fundamental of the laser high-precision microsurgery [J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25**(12): 1664~1669
姚翠萍, 李政, 张镇西. 激光高精度细胞微手术机理的研究 [J]. *光学学报*, 2005, **25**(12): 1664~1669
- 11 C. P. Yao, X. C. Qu, Zhenxi Zhang *et al.*. Influence of laser parameters on nanoparticle-induced membrane permeabilization [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2009, **14**(5): 054034
- 12 Zhang Zhenxi, Liang Xiaoxun, Wang Jing *et al.*. Nano-scale optoporation based on tightly focused lasers [J]. *J. Shenzhen University (Science & Engineering)*, 2011, **28**(5): 1~6
张镇西, 梁晓轩, 王晶等. 纳米尺度激光紧聚焦光穿孔技术 [J]. *深圳大学学报理工版*, 2011, **28**(5): 1~6
- 13 The 1986-87 Aslms Board [J]. *Lasermedicine and surgery news*, **4**(6): 1~7
- 14 Elaine G. Diacumakos, Edward L. Tatum. Fusion of mammalian somatic cells by microsurgery [J]. *Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, **69**(10): 2959~2962
- 15 Michael W. Berns, J. Aist, J. Edwards *et al.*. Laser microsurgery in cell and developmental biology [J]. *Science*, 1981, **213**(4507): 505~513
- 16 Michael W. Berns, Zifu Wang, Andrew Dunn *et al.*. Gene inactivation by multiphoton-targeted photochemistry [J]. *PNAS*, 2000, **97**(17): 9504~9507
- 17 James R. Aist, Hong Liang, Michael W. Berns. Astral and spindle forces in PtK2 cells during anaphase B: a laser microbeam study [J]. *J. Cell Science*, 1993, **104**(4): 1207~1216
- 18 Jun Cheng, Nezaket Tuekel, Mahid Hemati *et al.*. Centrosome misorientation reduces stem cell division during ageing [J]. *Nature*, 2008, **456**(7222): 599~605
- 19 S. Thalhammer, G. Lahr, A. Clement-Sengewald *et al.*. Laser microtools in cell biology and molecular medicine [J]. *Laser Physics*, 2003, **13**(5): 681~691
- 20 V. Kohli, A. Y. Elezzabi, J. P. Acker. Cell nanosurgery using ultrashort (femtosecond) laser pulses: applications to membrane surgery and cell isolation [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2005, **37**(3): 227~230
- 21 Evelyn Zeira, Alexandra Manevitch, Zakharia Maneritch *et al.*. Femtosecond laser: a new intradermal DNA delivery method for efficient, long-term gene expression and genetic immunization [J]. *FASEB Journal*, 2007, **21**(13): 3522~3533
- 22 Li Huanyu, Gong Jixian, Xing Qirong *et al.*. Experimental study on the cell fusion using femtosecond laser [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(12): 1642
李寰宇, 巩继贤, 邢岐荣等. 飞秒激光诱导细胞融合技术的实验研究 [J]. *中国激光*, 2006, **33**(12): 1642
- 23 Kim C. Goodbody, J. Catharing, C. W. Lloyd *et al.*. Laser microsurgery demonstrates that cytoplasmic strands anchoring the nucleus across the vacuole of premitotic plant cells are under tension implication for division plane alignment [J]. *Development*, 1991, **113**(3): 931~939
- 24 Charles S. Buer, Pamela J. Weathers, G. A. Swartzlander *et al.*. Changes in hechtian strands in cold hardened cells measured by optical microsurgery [J]. *Plant Physiology*, 2000, **122**(4): 1365~1377
- 25 Shinichiro Kajiyama, Takeshi Shoji, Shinya Okuda *et al.*. A novel microsurgery method for intact plant tissue at the single cell level using ArF excimer laser microprojection [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, **93**(2): 325~331
- 26 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]. *激光与电子学进展*, 2009, **46**(10): 71~77
- 27 G. Huettmann, R. Birngruber. On the possibility of high-precision photothermal microeffects and the measurement of fast thermal denaturation of proteins [J]. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, 1999, **5**(4): 954~962
- 28 D. Lapotko. Optical excitation and detection of vapor bubbles around plasmonic nanoparticles [J]. *Opt. Express*, 2009, **17**(4): 2538~2556
- 29 A. Vogel, K. Lorenz, V. Horneffer *et al.*. Mechanisms of laser-induced dissection and transport of histologic specimens [J]. *Biophys. J.* 2007, **93**(12): 4481~4500
- 30 X. Huang, P. K. Jain, IH El-Sayed *et al.*. Determination of the minimum temperature required for selective photothermal destruction of cancer cells with the use of immunotargeted gold nanoparticles [J]. *Photochem. Photobiol.*, 2006, **82**(2): 412~417
- 31 V. P. Zharov, V. Galitovsky. Photothermal detection of local thermal effects during selective nanophotothermolysis [J]. *Appl. Phys. Lett.*, 2003, **83**(24): 4897~4899
- 32 M. Kitz, S. Preisser. Vapor bubble generation around gold nano-particles and its application to damaging of cells [J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, **2**(2): 291~304
- 33 B. Rosenberg, G. Kemeny, R. C. Switzer *et al.*. Quantitative evidence for protein denaturation as the cause of thermal death [J]. *Nature*, 1971, **232**(5311): 471~473
- 34 C. Liu, Zheng Li, Zhenxi Zhang. Mechanisms of laser nanoparticle-based techniques for gene transfection—a calculation study [J]. *J. Biomedical Physics*, 2009, **35**(3): 175~183